

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

**Die Rolle von CCL22 in der Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen in das
hepatozelluläre Karzinom**

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

vorgelegt von

Julia Anna Hölz
geb. Fessler

aus
Köln

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. David Anz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Christian Weber
Prof Dr. Markus Guba

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. Stefan Endres

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 09.11.2023

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Julia Anna Hölz, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Die Rolle von CCL22 in der Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen in das hepatozelluläre Karzinom

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, den 06. März 2023

Julia Anna Hölz

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Hepatozelluläres Karzinom	1
1.2 Das angeborene und adaptive Immunsystem	3
1.3 Tumorimmunologie.....	4
1.3.1 Regulatorische T-Zellen	5
1.3.2 Tumormikromilieu und Immunregulation im HCC.....	7
1.4 Chemokine.....	9
1.4.1 Allgemein.....	9
1.4.2 CCL22.....	9
1.5 Fragestellung	10
2 Material und Methoden.....	12
2.1 Geräte und Reagenzien.....	12
2.1.1 Technische Geräte.....	12
2.1.2 Reagenzien, Chemikalien und Puffer	12
2.1.3 Reagenzienansätze	13
2.1.4 Materialien für die Zellkultur	14
2.1.5 Zellkultur Medien	14
2.1.6 FACS Antikörper.....	14
2.2 Tierversuche	15
2.2.1 Mäuse.....	15
2.2.2 Gewinnung von Splenozyten	15
2.2.3 Isolation von Tumor-infiltrierenden Leukozyten	15
2.2.4 Herstellung von Organlysaten	15
2.2.5 <i>In vivo</i> -Tumormodelle	16
2.3 Zelluläre Methoden.....	16
2.3.1 Allgemeine Kulturbedingungen.....	16
2.3.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität.....	16
2.3.3 Einfrieren und Auftauen von Tumorzellen.....	17
2.3.4 Kultivierung von Tumorzellen.....	17
2.3.5 Gewinnung humaner mononukleärer Zellen	17

2.3.6	Gewinnung von Tumorzellüberständen.....	17
2.3.7	Kokultivierung von Tumor- und Immunzellen.....	18
2.4	Molekularbiologische Methoden.....	18
2.4.1	Herstellung kompetenter Bakterien	18
2.4.2	Konzipierung der Primer	18
2.4.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	19
2.4.4	PCR Purifikation.....	20
2.4.5	Gelelektrophorese	20
2.4.6	DNA Gelextraktion.....	21
2.5	Klonierung.....	21
2.5.1	Spaltung durch Restriktionsendonukleasen	21
2.5.2	Ligation.....	22
2.5.3	Transformation.....	22
2.5.4	Isolation von Plasmid-DNA.....	22
2.5.5	Klonierung des pMX-CCL22-Konstruktes.....	23
2.6	Herstellung des Retrovirus und Transduktion von Tumorzellen.....	23
2.7	Immunologische Methoden	24
2.7.1	ELISA	24
2.7.2	Durchflusszytometrie.....	25
2.7.3	Immunhistologie	26
2.8	Statistische Analyse.....	26
3	Ergebnisse.....	27
3.1	Expression, Induktion und Funktion von CCL22 in Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms	27
3.1.1	Tumorzellen führen zu einer Hochregulation von CCL22 in Immunzellen.	27
3.1.2	CCL22 ist intratumoral und in der Milz von Hepa1-6 Tumor tragenden Mäusen nachweisbar.....	29
3.1.3	Regulatorische T-Zellen sind vermehrt in Hepa1-6 Tumoren nachweisbar	29
3.2	Tumorstadium und Infiltration von regulatorischen T-Zellen im CCL22- Überexpressionsmodell.....	30
3.2.1	<i>In vivo</i> führt die Überexpression von CCL22 nicht zu einem beschleunigten Tumorstadium	31
3.3	CCL22-exprimierende Zellen und FoxP3 ⁺ Zellen sind in Tumor und Stroma von HCC Patienten nachweisbar	34

3.3.1	Peritumorales CCL22 korreliert mit der Infiltration von regulatorischen T-Zellen	37
4	Diskussion.....	38
4.1	Induktion von CCL22 in Immunzellen durch HCC-Tumorzelllinien	38
4.2	CCL22 Überexpression führt nicht zu einer vermehrten Migration von regulatorischen T-Zellen im Hepa1-6 Tumormodell.....	40
4.3	CCL22-exprimierende Zellen und FoxP3 ⁺ Zellen sind in Tumor und Stroma von HCC Patienten nachweisbar	43
5	Zusammenfassung	47
6	Literaturverzeichnis	49
7	Abkürzungsverzeichnis.....	60
8	Publikationen	62
9	Danksagung	63

1 Einleitung

Tumorerkrankungen stellen nach den kardiovaskulären Erkrankungen in Deutschland die zweithäufigste Todesursache dar. Die klassische Krebstherapie mit ihren drei Säulen, der chirurgischen Tumoresektion, Strahlentherapie und Chemotherapie führten in der Vergangenheit zu einer deutlichen Verbesserung der Prognose, dennoch haben viele Krebspatienten weiterhin eine sehr limitierte Lebenserwartung. Dank neuer Erkenntnisse über das Immunsystem und Tumorummunologie konnte in den letzten Jahren ein neues Feld der Immuntherapie von Tumorerkrankungen etabliert werden. Insbesondere beim hepatozellulären Karzinom stößt die klassische Tumorthherapie an ihre Grenzen, weil viele Patienten erst in späten Stadien diagnostiziert werden und häufig Komorbiditäten vorliegen (Villanueva 2019). Außerdem stellt das HCC für die Immuntherapie ein attraktives Ziel dar, weil Pathogenese, Krankheitsprogression und Prognose eng mit dem Immunsystem verknüpft sind (Foerster, Hess et al. 2018). Dies liegt in der Tatsache begründet, dass virale Hepatitiden oder inflammatorische Erkrankungen der Leber häufig die Ursache des HCCs darstellen. Mit der Zulassung neuerer Therapieoptionen konnten bereits Fortschritte in der Behandlung erzielt werden. Dennoch ist ein tieferes Verständnis der Rolle des Immunsystems hinsichtlich Pathogenese und Krankheitsprogression des HCCs elementar, um weitere Therapiestrategien entwickeln zu können.

1.1 Hepatozelluläres Karzinom

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist weltweit der sechsthäufigste Tumor und ist mit einer 5-Jahresüberlebenschance von 18% der zweittödlichste Tumor nach dem Pankreaskarzinom. Die meisten Patienten entwickeln ein HCC auf dem Boden einer chronischen Inflammation hervorgerufen durch Alkoholkonsum, einer chronischen Virusinfektion (Hepatitis B, C), Exposition von Aflatoxin B₁, einer nichtalkoholischen Steatohepatitis (NAFLD) oder inflammatorischen Grunderkrankung der Leber (Villanueva 2019).

Die Inzidenz unterscheidet sich weltweit sehr und ist aufgrund der variablen Prävalenz der Risikofaktoren sehr heterogen (Forner, Reig et al. 2018). Das HCC auf Boden einer Hepatitis B Infektion oder Aflatoxin Exposition ist insbesondere in Sub-Sahara Afrika

und Südostasien häufig. Etwa 80% der HCC Fälle entfallen auf diese Weltregionen (El-Serag 2012). In Europa, Nordamerika und Japan stellen die Hepatitis C Infektion sowie Alkoholkonsum die größten Risikofaktoren dar (Morgan, Mandayam et al. 2004, El-Serag 2012, Ganne-Carrie and Nahon 2019). Insbesondere in Ländern der westlichen Welt steigt die Inzidenz vom hepatozellulären Karzinomen, welche auf eine nicht-alkoholische Steatohepatitis zurückzuführen ist (Dyson, Jaques et al. 2014, Younossi, Otgonsuren et al. 2015).

Die Hepatokarzinogenese ist ein mehrschrittiger Prozess, indem über Jahre auf dem Hintergrund einer Leberzirrhose Hepatozyten epigenetische und genetische Veränderungen wie *driver*-Mutationen ansammeln (Prieto, Melero et al. 2015). Die Leberzirrhose kann dabei als Präkanzerose angesehen werden. Es laufen, zum Teil parallel, Umwandlungen des Lebergewebes von niedrig-gradigen zu hoch-gradigen dysplastischen Knoten und schließlich zu frühem bis fortgeschrittenem HCC ab (Kudo 2009). Die HCC Tumormasse ist daher sehr heterogen und die Mutationen können zwischen den Tumorzellen variieren (Prieto, Melero et al. 2015). Typische Mutationen betreffen den TERT (Telomerase Reverse Transkriptase) Promoter, den Zellzyklus mit Mutationen in TP53, WNT Signalwegen oder im Chromatin *Remodeling* (Schulze, Nault et al. 2016, Villanueva 2019).

Die chronische Inflammation führt zu einer Rekrutierung von Lymphozyten in das Lebergewebe und trägt zu einer Manifestation des HCCs bei (Prieto, Melero et al. 2015). So konnte gezeigt werden, dass sowohl Zellen des angeborenen Immunsystems, als auch des adaptiven Immunsystems im HCC nachweisbar sind und einen signifikanten Einfluss auf die Prognose der Patienten haben (Yao, He et al. 2017, Foerster, Hess et al. 2018).

Für die Therapieentscheidung und somit auch die Prognose ist nicht nur das Tumorstadium, sondern auch der Grad der Leberzirrhose und die damit einhergehende Leberfunktion entscheidend. Es gibt mehrere Klassifikationssysteme für das HCC. Das am meisten verwendete und einzige prospektiv validierte System stellt die Barcelona Klassifikation dar, welche das Tumorstadium, die Leberfunktion und die körperliche Leistungsfähigkeit des Patienten umfasst (Forner, Reig et al. 2018).

In frühen Stadien (BCLC 0/A) sind eine chirurgische Resektion, Lebertransplantation oder Radiofrequenzablation mögliche Therapieoptionen. Bei nicht resezierbaren Tumoren kann eine Lebertransplantation infrage kommen. Die Milan-Kriterien (Läsion <5cm, bis zu drei Läsionen <3cm, keine extrahepatischen Manifestationen, keine vaskuläre Invasion) stellen den Maßstab zur Einschätzung der Erfolgsaussichten bei

Lebertransplantation dar. Die größte Limitation der Lebertransplantation besteht im Mangel an Spenderorganen, der zu Wartezeiten und damit einhergehender Tumorprogression führt (Sapisochin and Bruix 2017).

Die meisten Patienten werden jedoch in bereits fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert. In diesen Stadien (BCLC B/C) sind transarterielle Chemoembolisation (TACE) oder selektive interne Radiotherapie (SIRT) mögliche interventionelle Therapien (Villanueva 2019). Aufgrund der ausgeprägten Resistenz des HCCs gegenüber konventioneller Chemotherapie wurde erst 2008 mit Sorafenib, ein Multikinaseinhibitor, eine erste systemische Therapie für fortgeschrittenes HCC zugelassen (Llovet, Ricci et al. 2008). Sorafenib ist ein Seronin/Threonin-Kinase Inhibitor (c-RAF und BRAF) und blockiert Tumorangiose via *Vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR) und *Platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) Inhibition. Es wirkt direkt auf Tumorzellproliferation und -überleben mittels des RAF-MEK-ERK Signalweges (Wilhelm, Carter et al. 2004, Liu, Cao et al. 2006).

In den letzten Jahren führten neue Erkenntnisse über die Rolle des Immunsystems im HCC zur Entwicklung und dem Einsatz von mehreren neuen Medikamenten darunter Checkpointinhibitoren wie monoklonale Antikörper gegen PD-1, wie Nivolumab und Pembrolizumab oder CTLA-4 Inhibitoren wie Tremelimumab (Sangro, Gomez-Martin et al. 2013, El-Khoueiry, Sangro et al. 2017, Zhu, Finn et al. 2018). Diese Checkpointinhibitoren hemmen die Bindung der Liganden an ihre Rezeptoren und somit die Inaktivierung von T-Zellen. Ein Durchbruch konnte mit der Immuntherapie, einer Kombination eines Checkpointinhibitors (Atezolizumab) mit einem monoklonalen Antikörper gegen VEGF (Bevacizumab) in Patienten mit fortgeschrittenem HCC erzielt werden. Es zeigte sich ein signifikant besseres Gesamtüberleben sowie tumorprogressionsfreies Überleben im Vergleich zur Standardtherapie mit Sorafenib (Finn, Qin et al. 2020). Trotz dieser neuen Therapieansätze beträgt das tumorprogressionsfreie Überleben nur wenige Monate (6,8 Monate vs. 4,3 Monate zur Standardtherapie). Zusammenfassend ist die Prognose für Patienten mit fortgeschrittenen Stadien trotz neuer therapeutischer Möglichkeiten insgesamt schlecht, weswegen neue Therapiekonzepte dringend benötigt werden.

1.2 Das angeborene und adaptive Immunsystem

Das Immunsystem schützt den Organismus vor pathogenen Mikroorganismen und etabliert gleichzeitig eine Selbsttoleranz, die vor Autoimmunität schützt.

Das angeborene Immunsystem, welches die erste Barriere für eindringende Pathogene darstellt, ist insbesondere durch die Zelltypen der Phagozyten wie Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen (DC) sowie molekularen Mechanismen wie dem Komplementsystem oder der Epithelbarriere gekennzeichnet. Das adaptive Immunsystem kann in die Population der B- und T- Zellen unterteilt werden (Marrack and Kappler 1994). Das angeborene und adaptive Immunsystem sind nicht als autonome Systeme zu verstehen, sondern interagieren auf vielfältigen Ebenen und etablieren so eine effektive Immunantwort. So stellt beispielsweise die Antigenpräsentation über Antigenpräsentierende Zellen (z.B. DCs) des angeborenen Immunsystems eine Schlüsselrolle zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems dar.

Im adaptiven Immunsystem sind die B-Zellen wesentlich für die humorale Abwehr verantwortlich, während zytotoxische T-Zellen die Zellkontakt-abhängige Abwehr vermitteln. Anhand von Oberflächenmerkmalen können zytotoxische CD8⁺ Effektor T-Zellen von CD4⁺ T-Helferzellen, welche für die Maturation von B-Zellen (Th₁-Immunreaktion) oder Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen (Th₂-Immunreaktion) verantwortlich sind, unterschieden werden.

Zum einen leistet das Immunsystem die effektive Eliminierung von Pathogenen wie Viren oder Bakterien. Zum anderen spielt die Vermeidung einer überschießenden Immunantwort auf Pathogene und die Ausbildung einer Selbsttoleranz gegenüber Autoantigenen eine essenzielle Rolle der Immunregulation. Die zentrale Toleranz beschreibt die Entwicklung unreifer B- und T-Zellen im Knochenmark und Thymus durch klonale Deletion und Inaktivierung von Zellen, die auf Autoantigene reagieren. Die Ausbildung einer peripheren Toleranz bezieht sich auf reife Lymphozyten in Lymphknoten und peripherem Gewebe, welche die primär lymphatischen Gewebe verlassen haben. Regulatorische T-Zellen (Treg) spielen in der Induzierung und Aufrechterhaltung einer peripheren Toleranz eine zentrale Rolle (Zou 2006).

1.3 Tumormunologie

Rudolph Virchow beschrieb 1863 als einer der Ersten eine Leukozyteninfiltration in soliden Tumoren (Virchow 1863). 1909 stellte Paul Ehrlich die Hypothese auf, dass das Immunsystem das Wachstum von Tumoren unterdrücken würde (Ehrlich 1908). In den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde die *Immune surveillance* Theorie von Burnet und Thomas formuliert (Burnet 1967), doch erst ab den 90er Jahren konnte durch die Verwendung von *Knock-out* Mausmodellen die zentrale Rolle von B-, T- und NK-Zellen

sowie INF- γ und Perforin in der Entwicklung von spontanen und induzierten Tumoren gezeigt werden. Somit konnte die Hypothese des Zusammenspiels von Immunsystem und Tumorzellen beim Tumorwachstum untermauert werden. Dieses Zusammenspiel wird in drei Phasen unterteilt. In der ersten Phase (Eliminierung), welche die klassische *immune surveillance* Hypothese von Burnet darstellt, werden Tumorzellen vom angeborenen und adaptiven Immunsystem erkannt und abgetötet. Schafft es eine Tumorzelle durch Mutationen der Eliminierung zu entrinnen, tritt die zweite Phase, das Equilibrium, ein. In dieser Phase wird der Tumor vom adaptiven Immunsystem kontrolliert, kann jedoch nicht mehr eliminiert werden. In der dritten Phase, der Entrinnung, schafft es eine Tumorzelle unkontrolliert zu wachsen und die Tumorerkrankung wird klinisch manifest. Das Entrinnen kann durch Änderungen auf Tumorzellebene, die zu reduzierter Erkennung durch das Immunsystem führt, z.B. durch Verlust der Expression von Tumorantigenen vollzogen werden. Die Etablierung eines immunsuppressiven *tumormicroenviroments* stellt eine weitere effektive Methode dar (Dunn, Bruce et al. 2002, Schreiber, Old et al. 2011). Eine Schlüsselrolle in der Etablierung eines immunsuppressiven Milieus spielen regulatorische T-Zellen.

1.3.1 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen (Tregs) lassen sich, bis auf wenige Ausnahmen, durch die Oberflächenmarker CD4 und CD25 und den intrazellulären für die Treg-Entwicklung und Suppressionsfunktion essenziellen Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3) charakterisieren (Hori, Nomura et al. 2003). Die essenzielle Rolle von regulatorischen T-Zellen in der Immunhomöostase zeigt sich an Mäusen, die eine Mutation im FoxP3 Gen aufweisen (Brunkow, Jeffery et al. 2001). Diese „*scurfy*“ Mäuse leiden an einer schweren systemischen Autoimmunität, die durchschnittlich nach 24 Tagen zum Tod führt (Godfrey, Wilkinson et al. 1991). Auch im Menschen führen Mutationen im FoxP3 Gen zu schwerer Autoimmunität mit dem klinischen Bild des Immundysregulation-Polyendokrinopathie-Enteropathie-X-chromosomal (IPEX)-Syndroms, das durch schwere Diarrhoen, Diabetes mellitus Typ I und Dermatitis gekennzeichnet ist (Powell, Buist et al. 1982, Bennett, Christie et al. 2001). Neben der wichtigen Rolle von regulatorischen T-Zellen in der Autoimmunität, scheinen die immunsuppressiven Mechanismen von Tregs ein essentieller Teil der Tumor-vermittelten Immunsuppression darzustellen (Zou 2006).

In der peripheren CD4⁺ T-Zellpopulation machen regulatorische T-Zellen ca. 5-10% aus (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995). Man unterscheidet zwischen *natural* Tregs (nTregs), die im Thymus und *induced* Tregs (iTregs), die in der Peripherie aus autoreaktiven T-Zellen entstehen. Eine wichtige Rolle bei der Entstehung von iTregs spielt das Zytokin *Transforming growth factor β* (TGF-β). Suboptimale Stimulation von T-Zell (TCR-) Rezeptoren durch chronische niedrige Antigenkonzentration in Abwesenheit von kostimulierenden Faktoren, TGF-β und IL-2 kann zu einer Induktion von regulatorischen T-Zellen in der Peripherie führen (Chen, Jin et al. 2003, Josefowicz and Rudensky 2009).

Regulatorische T-Zellen können die Proliferation von naiven T-Zellen und die Ausdifferenzierung in Effektor T-Zellen unterdrücken. Sie sind in der Lage ausdifferenzierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, natürliche Killerzellen, Makrophagen oder dendritische Zellen zu supprimieren (Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008). Dazu lassen sich vier Suppressionsmechanismen unterscheiden: 1) Sekretion von immunsuppressiven Zytokinen, 2) Zytolyse, 3) metabolische Störung und 4) Zellkontakt-abhängige Inhibition von dendritischen Zellen (Vignali, Collison et al. 2008). Tregs sezernieren inhibitorische Zytokine wie IL-10, IL-35 und TGF-β und wirken so immunsuppressiv auf Makrophagen, CD4⁺ und CD8⁺ Effektor T-Zellen (Letterio and Roberts 1998, Hara, Kingsley et al. 2001, Collison, Workman et al. 2007). Sie können via Granzym A-, Granzym B- und Perforin B-Zellen, Natürliche Killer (NK)-Zellen und zytotoxische T-Zellen mittels Zelllyse abtöten (Grossman, Verbsky et al. 2004, Gondek, Lu et al. 2005, Zhao, Thornton et al. 2006, Cao, Cai et al. 2007). Ein weiterer Mechanismus zur Suppression von Effektor T-Zellen ist die metabolische Störung. Diese beinhaltet die „Konsumierung“ von IL-2, durch hohe Expression des CD25 Rezeptors auf Tregs, welches essentiell für das Überleben aktivierter T-Zellen ist (de la Rosa, Rutz et al. 2004). Durch direkte Zellkontakt-abhängige Interaktion mit dendritischen Zellen über den Rezeptor *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4), welcher konstitutiv auf regulatorischen T-Zellen exprimiert wird, wird die Aktivierung von Effektor T-Zellen über CD80/86 durch dendritische Zellen supprimiert, sowie die Bildung des immunsuppressiven Moleküls Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) in dendritische Zellen induziert. (Oderup, Cederbom et al. 2006).

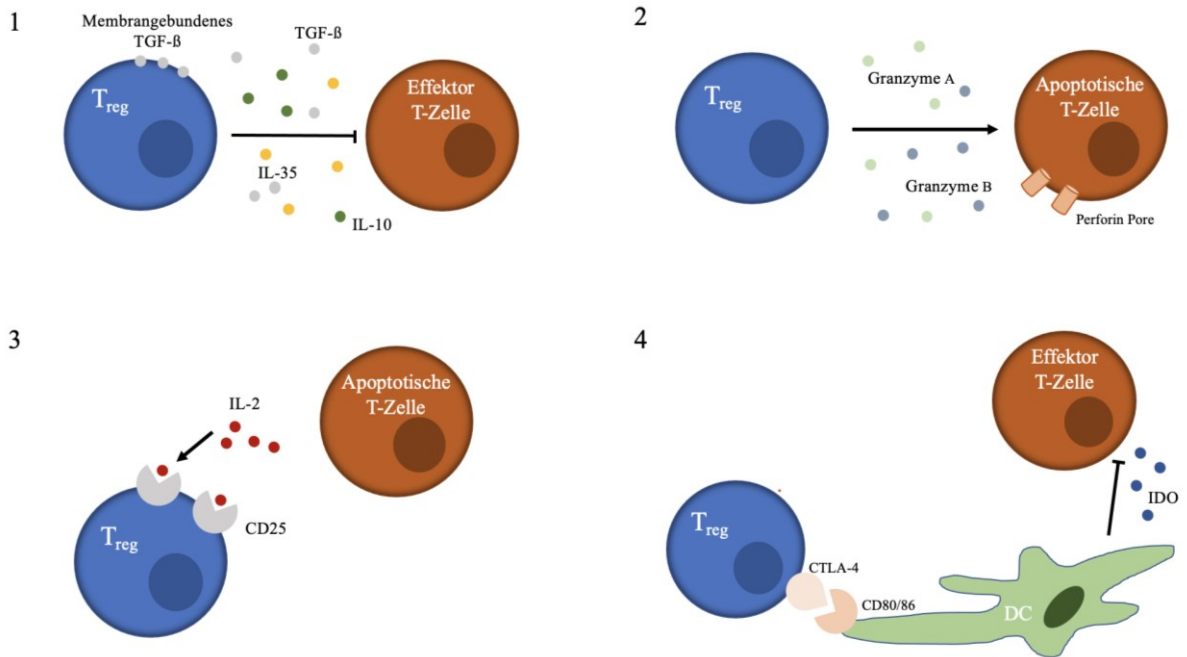


Abb. 1 Mechanismen der Suppression durch regulatorische T-Zellen modifiziert nach (Vignali, Collison et al. 2008) **1)** Inhibitorische Zytokine wie IL-10, IL-35 oder TGF- β **2)** Granzyme A/B oder Perforin abhängige Zytolyse **3)** Störung des Metabolismus durch IL-2 Konsumierung **4)** DC vermittelte Suppression

1.3.2 Tumormikromilieu und Immunregulation im HCC

Die Leber hat eine Schlüsselrolle in der Abwehr von Pathogenen und der Etablierung einer Selbsttoleranz. Sie ist durch ein immunsuppressives Mikromilieu gekennzeichnet (Jenne and Kubes 2013). Nicht-parenchymale Leberzellen, wie Lebersinusoid Endothelzellen (LSECS), hepatische Sternzellen (HSCS) und Kupferzellen, kooperieren zur Aufrechterhaltung des immunsuppressiven Mikromilieus (Shetty, Lalor et al. 2018). So konnte gezeigt werden, dass Lebersinusoid Endothelzellen inhibitorische Moleküle wie *programmed cell death 1 ligand 1* (PD-L1) exprimieren und weniger ko-stimulatorische Rezeptoren wie CD80 und CD86 vorhanden sind. Zudem führen sie TGF- β abhängig, zu einer Induktion von regulatorischen T-Zellen (Diehl, Schurich et al. 2008, Carambia, Frenzel et al. 2013, Carambia, Freund et al. 2014). Hepatische Sternzellen produzieren *hepatocyte growth factor* (HGF), der myeloide Suppressorzellen (MDSC) fördert und zu einer Akkumulation von Tregs in der Leber führt (Höchst, Schildberg et al. 2013, Sangro, Sarobe et al. 2021). Kupfferzellen führen zu einer immunologischen Toleranz durch Produktion von IL-10, Prostaglandinen und IDO (Krenkel and Tacke 2017), sowie durch Aktivierung von FoxP3 in CD4⁺ T-Zellen (Buonaguro, Mauriello et al. 2019).

Ebenso spielt die Rekrutierung von Immunzellen in das HCC Tumorgewebe eine elementare Rolle in der Pathogenese (Yao, He et al. 2017, Foerster, Hess et al. 2018). So ist im Tumorgewebe im Vergleich zu gesunder Leber eine erhöhte Infiltration von Zellen des angeborenen Immunsystems wie dendritischen Zellen und Makrophagen und des adaptiven Immunsystems wie Th₂-Zellen nachweisbar. Für eine effektive antitumorale Immunantwort essenzielle Zellpopulationen, wie zytotoxische Zellen und dendritische Antigen-präsentierende Zellen, sind jedoch signifikant reduziert (Foerster, Hess et al. 2018). DC exprimieren in der Leber weniger *major histocompatibility complex* (MHC)-II und ko-stimulierende Moleküle. Somit können DC nicht zu einer starken T-Zell Stimulation beitragen (Dou, Ono et al. 2018). Über die Produktion von anti-inflammatorischem Prostaglandin E₂ durch hepatische dendritische Zellen wird der immunsuppressive Metabolit IDO in DC hochreguliert. IDO führt zu einer erhöhten IL-10 Sekretion und induziert somit Tregs (Raich-Regue, Glancy et al. 2014, Dou, Ono et al. 2018).

Zusätzlich zu dem immunsuppressiven Milieu der Leber und dem Einfluss von Immunzellen produzieren die HCC Tumorzellen verschiedene immunsuppressive Moleküle wie TGF- β , IL-10, IDO, VEGF, PDGF, EGFR-Liganden und immuninhibitorische „Checkpoint“ Moleküle. Dadurch können Tumorzellen der Immunantwort des angeborenen und adaptiven Immunsystems entkommen (Prieto, Melero et al. 2015). Neben dem immunsuppressiven Mikromilieu spielt die chronische Inflammation im HCC eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung. Die Zytokine *tumor necrosis factor* (TNF)- α , Lymphotoxin- β und IL-6 konnten als Tumor-supportive Zytokine im HCC identifiziert werden (Grivennikov, Greten et al. 2010).

Zusammenfassend ist das Tumormikromilieu im HCC durch ein komplexes System aus hepatischen nicht-parenchymalen Zellen (LSECS, HSCS, Kupffer-Zellen), infiltrierenden Immunzellen und Tumorzellen gekennzeichnet. Die verschiedenen Zellpopulationen interagieren durch Zell-Zell-Kontakte, Zytokine, Chemokine und andere lösliche Faktoren (Sangro, Sarobe et al. 2021). Dieses komplexe Zusammenspiel hat einen substanziellen Einfluss auf das Entrinnen des Tumors vor dem Immunsystem und damit auf die Prognose von HCC Patienten. So ist die adaptive Immunantwort in Patienten mit HCC abgeschwächt, was sich an der Anreicherung von erschöpften und dysfunktionalen T-Zellen in den Tumor-infiltrierenden Lymphozyten zeigt (Flecken, Schmidt et al. 2014). Hohe CD3⁺ und CD8⁺ positive Zellzahlen sind mit einem verlängerten Gesamtüberleben der Patienten assoziiert. Im Gegensatz dazu sind sowohl

eine erhöhte absolute Anzahl von Tregs, als auch eine erhöhte Ratio von FoxP3⁺/CD4⁺-Zellen und FoxP3⁺/CD8⁺-Zellen mit einem verkürzten Gesamtüberleben und krankheitsfreien Überleben assoziiert (Yao, He et al. 2017). Die Anzahl von Tregs ist im Blut von HCC Patienten im Vergleich zu Gesunden erhöht und korreliert mit der Anzahl von Tregs in den tumor-infiltrierenden Leukozyten (TIL) (Ormandy, Hillemann et al. 2005). Insbesondere die FoxP3⁺/CD4⁺-Ratio konnte als unabhängiger Risikofaktor für das Gesamtüberleben identifiziert werden (Tu, Ding et al. 2016).

1.4 Chemokine

1.4.1 Allgemein

Das Immunsystem ist sowohl in der Homöostase, als auch während Entzündungsreaktionen auf die Migration von Leukozyten angewiesen. Um die Kontroll- und Abwehrfunktion auszufüllen, ist es essenziell, dass Immunzellen in spezifische Gewebe migrieren können. Die Steuerelemente dieser zielgerichteten Migration sind Chemokine. Die Migration der Leukozyten erfolgt anhand eines Konzentrationsgradienten und wird Chemotaxis genannt. Chemokine gehören zu der Untergruppe der Zytokine und sind kleine Proteine, die eine Molmasse von 8-14 kDA aufweisen. Die Tertiärstruktur ist hochkonserviert und anhand ihres Amino-Terminus, sowie der Anzahl und Position der Cysteinreste werden sie in vier Gruppen unterteilt (CC, CXC, CX3C, XC) (Zlotnik and Yoshie 2000). Man unterscheidet Chemokine, die insbesondere der Homöostase dienen, von Chemokinen, die bei einer Inflammation im Gewebe sezerniert werden. Einige Chemokine können nicht eindeutig zu einer der beiden Gruppen zugeordnet werden. Darunter fällt das Chemokin CCL22 (Zlotnik, Yoshie et al. 2006). Anhand von Chemokinrezeptoren, die je nach Reife und Zelltyp auf Leukozyten exprimiert werden, wandern diese in das spezifische Gewebe und lösen dort eine Immunantwort aus (Lanzavecchia and Sallusto 2000).

1.4.2 CCL22

CCL22 gehört zu der Familie der CC-Chemokine und wurde in den 1990er Jahren erstmalig beschrieben. Es gehört zu den Chemokinen, die sowohl in der Immunhomöostase, als auch im Inflammationsgeschehen eine Rolle spielen (Zlotnik, Yoshie et al. 2006).

CCL22, initial *Macrophage-derived chemokine* (MDC) genannt (Godiska, Chantry et al. 1997), wird konstitutiv von Makrophagen und DC und in lymphatischem Gewebe wie Thymus, Milz und Lymphknoten exprimiert (Mantovani, Gray et al. 2000).

In Monozyten, B-Zellen und T-Helferzellen kann die Expression durch IL-1, IL-4, IL-13, LPS und TNF- α induziert werden (Schaniel, Pardali et al. 1998, Iellem, Colantonio et al. 2000, Mantovani, Gray et al. 2000).

CCL22 bindet ausschließlich an den Chemokinrezeptor CCR4 (Imai, Chantry et al. 1998) und führt so zu einer spezifischen Migration von CCR4-exprimierenden Zellen. Diese sind vorwiegend Th₂-Zellen und Tregs (Imai, Nagira et al. 1999, Iellem, Mariani et al. 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die CCL22-spezifische Migration von Tregs in Lymphknoten, Lunge und Darm zu einer physiologischen Immunregulation beiträgt (Sather, Treuting et al. 2007, Yuan, Bromley et al. 2007).

Erstmalig wurde im Ovarialkarzinom durch Curiel et al. die Verbindung zwischen CCL22, Tregs und einem verkürzten Überleben beschrieben. So konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass es über die Chemokin-Chemokinrezeptor-Achse CCL22-CCR4 zu einer Migration von Tregs in den Tumor kommt (Curiel, Coukos et al. 2004). Auch in anderen Tumorentitäten, wie dem Mammakarzinom, Magenkarzinom oder Ösophaguskarzinom, konnte der Zusammenhang zwischen CCL22 und einer vermehrten Treg-Migration gesehen werden (Mizukami, Kono et al. 2008, Maruyama, Kono et al. 2010, Li, Liu et al. 2013).

1.5 Fragestellung

Die Migration von Tregs über die Chemokin-Chemokinrezeptor-Achse CCL22-CCR4 in den Tumor wurde bereits für mehrere Tumorentitäten gezeigt. Bekannt ist, dass Tregs im HCC Gewebe akkumulieren und mit einer negativen Prognose assoziiert sind (Fu, Xu et al. 2007, Tu, Ding et al. 2016). Über die Mechanismen der Migration von Tregs in das HCC ist wenig bekannt. In dieser Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, welche Rolle das Chemokin CCL22 in der Migration von Tregs in das HCC spielt. Dabei sollten insbesondere folgende Fragen geklärt werden:

- 1) Wird das Chemokin CCL22 durch HCC Zelllinien gebildet?
- 2) Ist CCL22 in murinen HCC Tumoren nachweisbar?

- 3) Führt die Überexpression des Chemokins CCL22 zu einer vermehrten Migration von regulatorischen T-Zellen?
- 4) Können CCL22 und regulatorische T-Zellen auch in humanem HCC Gewebe nachgewiesen werden?

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Reagenzien

2.1.1 Technische Geräte

Alpha Imager	Alpha Innotech, San Leandro, USA
CO ₂ – Brutschrank (BD6220)	Heraeus, Hanau, Deutschland
FACS Canto II	BD Bioscience, New Jersey, USA
Gefrierschrank -80°C	Thermo Scientific, Waltham, USA
Kühl- und Gefrierschränke 4°C, -20°C	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Gelelektrophorese System	Bio-Rad, München, Deutschland
Lamin Air Flow	Heraeus, Hanau, Deutschland
LightCycler480 System	Roche, Mannheim, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena, Deutschland
MiniMACS, QuadroMACS	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mithras LB940 ELISA Reader	Bertold, Bad Wildbad, Deutschland
Multifuge 3L-R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Multifuge 4KR	Heraeus, Hanau, Deutschland
Nanophotometer	Implen GmbH, München, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Optik Labor Frischknecht, Balgach, Deutschland
pH-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
PowerPac Basic Spannungsgerät	Bio-Rad, München, Deutschland
Shaker	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen, Deutschland
Vortex-Schüttler	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
Waage CPA 1003S	CPA 1003S Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.2 Reagenzien, Chemikalien und Puffer

Agarose LE	Biozym Hess, Oldendorf, Deutschland
BD Pharm Lyse Lysing Buffer (10x)	BD Biosciences, New Jersey, USA
Biocoll Separationsmedium	Biochrom, Berlin, Deutschland
Bovine serum albumine (BSA)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Collagenase	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
DNase I	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
dNTP Mix, 10 mM	Invitrogen, Carlsbad, USA
Donkey Serum	Millipore, Billerica, USA
Dulbecco's Phosphate buffered saline (PBS)	PAA, Pasching, Deutschland
Ethanol	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

FACS Flow, FACS Safe	BD Biosciences, New Jersey, USA
Heparin-Natrium 2.500 IE / 5ml	B.Braun AG, Melsungen, Deutschland
Isofluran (Forene®)	Abbott, Zug, Schweiz
Isopropanol (100 Vol%)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Isopropanol (70 Vol%)	Apotheke Innenstadt LMU, München, Deutschland
Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent	Invitrogen, Carlsbad, USA
MgCl ₂ 25mM	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
MolTaq DNA	Polymerase Molzym, Bremen, Deutschland
Natriumchlorid 0,9%	Apotheke Innenstadt LMU, München, Deutschland
O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Percoll, d=1,124 g/ml	Biochrome, Berlin, Deutschland
Pfu Ultra Fusion HS	Stratagene, Waldbronn, Deutschland
Schwefelsäure 2N	Apotheke Innenstadt LMU, München, Deutschland
Sodium pyruvate	PAA, Pasching, Österreich
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich Steinheim, Deutschland
Trypsin (10x)	PAA, Pasching, Österreich
Tween 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<u>ELISA Verdünnungspuffer</u>	<u>ELISA Waschpuffer</u>
1% BSA in PBS	0.05% Tween20 in PBS
<u>Fixationspuffer für FACS Proben</u>	<u>Erylyse Puffer</u>
2% PFA in PBS	10% BD Pharm Lyse in destilliertem Wasser
<u>Laufpuffer (10x) für SDS-PAGE Gelelektrophorese</u>	
ddH ₂ O	
1 % SDS (Natriumdodecylsulfat)	
0,25 M Tris-Cl	
2 M Glycin	
pH 8,3	

2.1.3 Reagenzienansätze

Bio-Plex Cell Lysis Kit	BioRad, München, Deutschland
Bradford-Assay	BioRad, München, Deutschland
CCL22 muriner Zytokin ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA
CCL22 humaner Zytokin ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA
FOXP3 Färbung Puffer Set	eBioscience, San Diego, USA
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit 50 preps	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
JetQuick Gel Spin Kit	Genomed, Löhne, Deutschland
JetQuick PCR Purification Kit	Genomed, Löhne, Deutschland
Revert Aid First strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
LS, MS und LD Säulen	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland

2.1.4 Materialien für die Zellkultur

Beta- Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Steinheim, Deutschland
Blasticidin	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Dulbecco's modified Eagles medium DMEM, High Glucose	PAA, Pasching, Österreich
FBS (Fetales Kälberserum)	Gibco Products, Grand Island NY, USA
HEPES-Puffer 1M	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
MEM Non-essential amino acids	Gibco Products, Grand Island NY, USA
Natrium-Pyruvat	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin & Streptomycin (100x)	PAA, Pasching, Österreich
Puromycin	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Roswell Park Memory Institute (RPMI)	PAA, Pasching, Österreich
Trypsin (10x)	PAA, Pasching, Österreich
VLE (Very Low Endotoxine) RPMI	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

2.1.5 Zellkultur Medien

T-Zell Medium

10% FBS
2mM L-Glutamin
100 IU/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
1mM Natrium-Pyruvat
1mM MEM-NEAA
1/1000 β -Mercaptoethanol
in VLE-RPMI

Plat-E-Medium

10µg/ml Blasticidin
1mg/ml Puromycin
in DMEM Vollmedium

Kryo – Medium

90% FBS
10% DMSO

DMEM - Vollmedium

10% FBS
2mM L-Glutamin
100 IU/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
in DMEM High Glucose

Plat-E-Hungermedium

3% FBS
2mM L-Glutamin
100 IU/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
in DMEM

2.1.6 FACS Antikörper

Anti-CD3	Biologend, San Diego, USA
Anti-CD4	Biologend, San Diego, USA
Anti-CD8	Biologend, San Diego, USA
Anti-FoxP3	Biologend, San Diego, USA
Anti-Ki67	Biologend, San Diego, USA

2.2 Tierversuche

2.2.1 Mäuse

Es wurden weibliche C57BL/6 Mäuse von Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) erworben. Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Experimente 6-12 Wochen alt. Für alle Versuche wurden die Mäuse mit Isofluran betäubt. Die Tierversuche wurden von der zuständigen Behörde, der Regierung von Oberbayern, genehmigt.

2.2.2 Gewinnung von Splenozyten

Die Mäuse wurden unter Isofluran-Anästhesie durch zervikale Dislokation getötet. Das Fell der Mäuse wurde desinfiziert, das Peritoneum durch einen Flankenschnitt eröffnet und die Milz unter sterilen Bedingungen entnommen. Zur Isolation der Splenozyten wurde die entnommene Milz mechanisch zerkleinert. Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein 40µm Zellsieb gefiltert. Das Filtrat wurde abzentrifugiert (400g, 7 min, RT), der Überstand verworfen und die Zellen mit Erylyse lysiert. Nach 2 min wurde die Reaktion mit PBS gestoppt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Die gewonnenen Splenozyten wurden in T-Zell Medium gelöst und für weitere Experimente verwendet.

2.2.3 Isolation von Tumor-infiltrierenden Leukozyten

Nach dem Töten der Mäuse wurden die Tumore entnommen und aufgeteilt. Der eine Teil wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren, um später die Chemokin-Level mittels ELISA zu messen. Der andere Teil wurde zur Isolation Tumor-infiltrierender Leukozyten verwendet. Der Tumor wurde zerkleinert, mit 1mg/ml Collagenase und 0,05mg/ml DNase bei 37°C für 30 min inkubiert. Danach wurden sie erst durch ein 100µm und danach ein 40µm Zellsieb gefiltert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf einen Gradienten aus 44% Percoll (obere Phase) und 67% Percoll (untere Phase) geschichtet und dann für 30 min bei 800g zentrifugiert. Die Leukozyten der Interphase wurden abgenommen und für FACS Färbungen verwendet.

2.2.4 Herstellung von Organlysaten

Um die Konzentration von CCL22 in Organen von Mäusen zu bestimmen, wurden diese unter sterilen Bedingungen entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden die gefrorenen Organe mit einem gekühlten Mörser zerkleinert und in sterile Eppendorf Röhren gefüllt. Es wurde 15µl – 80µl Bio-Rad Zellyse Puffer, je

nach Menge der gemörserten Organe, verwendet. Die lysierten Organe wurden für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und währenddessen mehrfach gevortext. Anschließend wurden die Lösungen bei 13.000g und 4°C für 30 min abzentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und bei -80°C eingefroren. Der Proteingehalt der Organlysate wurde dann mit dem Bradford-Assay (BioRad Laboratories) bestimmt. Die CCL22 Konzentration wurde mithilfe eines murinen CCL22 ELISA's ausgewertet und auf den gesamten Proteingehalt des Organlysats genormt.

2.2.5 *In vivo*-Tumormodelle

Für die *in vivo* Tumormodelle wurde die hepatozelluläre Karzinomzelllinie Hepa1-6 und die modifizierte Zelllinie Hepa1-6 PMX-CCL22 mit der Mauslinie C57BL/6 verwendet. Dafür wurden die adhärennten Tumorzellen mithilfe von Trypsin gelöst und dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Tumorzellen gezählt und 2×10^6 Tumorzellen in 100µl PBS in die Flanke der Mäuse subkutan injiziert.

Das Wachstum der Tumore wurde alle zwei Tage mit einem Messschieber vermessen und die Mäuse entweder bei einer Tumorgöße von 120mm² getötet oder (falls die Größe von 120mm² bis dahin nicht erreicht wurde) an Tag 21 getötet und Tumor und Milz entnommen. Die entnommenen Tumore wurden für die oben beschriebenen Methoden verwendet.

2.3 Zelluläre Methoden

2.3.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Zellkultur erfolgte bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und einem fünfprozentigen CO₂/Luftgemisch in einem Begasungsbrutschrank. Die Experimente wurden unter sterilen Bedingungen unter einer *Laminar-Air-Flow* durchgeführt.

2.3.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Die Zellzahl und Vitalität wurde mittels des Trypanblau-Exklusionstest überprüft. Der Trypanblau-Exklusionstest ermöglicht es, zwischen toten und lebenden Zellen zu diskriminieren, indem nicht vitale Zellen aufgrund der gestörten Membranintegrität den Farbstoff aufnehmen und blau erscheinen, während vitale Zellen den Farbstoff ausschließen. Die Zellen wurde mithilfe des Neubauer Hämocytozers gezählt. Dafür wurden 10µl Zellsuspension mit 90µl Trypanblaulösung verdünnt, 10µl davon wurden in ein Neubauer-Hämocytozometer gegeben und vier Quadranten ausgezählt. Die Anzahl der

Zellen pro ml wurde durch die Multiplikation der Zellen pro Zählkammer mit dem Verdünnungsfaktor und 10^4 berechnet.

2.3.3 Einfrieren und Auftauen von Tumorzellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden ca. $1-5 \times 10^6$ Zellen in Kryoröhrchen mit 900 μ l FBS und 100 μ l DMSO überführt. Das DMSO dient dazu Eiskristalle zu verhindern, welche die Zellmembranen zerstören würden. Die Zellen wurden zunächst bei -80°C für 72h eingefroren und dann in flüssigen Stickstoff überführt. Bei Bedarf wurden die Zellen dem flüssigen Stickstoff entnommen und rasch in Kulturmedium resuspendiert. Zur Kultivierung wurden die Zellen anschließend gewaschen, gezählt und in frisches Kulturmedium überführt.

2.3.4 Kultivierung von Tumorzellen

Die adhärent wachsenden Tumorzellen wurden im passenden Medium kultiviert. Sobald die Kulturflaschen konfluierend bewachsen waren, wurde das Kulturmedium abgenommen. Die Zellen wurden mittels Trypsin/EDTA in PBS abgelöst, gewaschen, gezählt und mit frischem Medium in die Kulturflasche gegeben.

2.3.5 Gewinnung humaner mononukleärer Zellen

Zur Gewinnung von PBMCs wurde Blut von freiwilligen Spendern aus der Abteilung Klinische Pharmakologie verwendet. Periphere mononukleäre Zellen können aufgrund ihrer Dichte mit Hilfe eines Biocoll Gradienten durch Zentrifugation von Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen getrennt werden. Zu diesem Zweck wurde einprozentiges heparinisiertes Vollblut 1:1 mit PBS verdünnt, mindestens in einem 1:3 Verhältnis auf Biocoll geschichtet (meist 35ml Blut auf 15ml Biocoll) und bei 1000g, Bremse 1, 20 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Durch die höhere Dichte des ungeladenen Sucrose-Polymers passieren Erythrozyten und tote Zellen die Biocoll Phase, während die mononukleären Zellen, die eine höhere Dichte aufweisen, in der Interphase akkumulieren. Diese Interphase wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und dreimal mit 0,9% NaCl gewaschen. Die Zellen wurden in T-Zell Medium aufgenommen und bei 37°C kultiviert.

2.3.6 Gewinnung von Tumorzellüberständen

Für Experimente mit Tumorzellüberständen und Immunzellen erfolgte zur Gewinnung von Tumorzellüberständen eine 48- bis 72-stündige Kultur von 5×10^6 Tumorzellen (Huh7, Hep3B, HepG2, Hepa1-6) in 25ml Medium. Der Überstand von den adhären

Tumorzellen wurde abgenommen und bei 400g für 7 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand durch ein 0,2µm Sieb steril filtriert. Die gewonnenen Tumorzellüberstände wurden entweder sofort für weitere Experimente verwendet oder bei -20°C eingefroren.

2.3.7 Kokultivierung von Tumor- und Immunzellen

Zur Kokultivierung von Tumor- und Immunzellen wurden murine Splenozyten oder humane PBMCs in einer 96well-Platte ausgesät. Für Experimente mit murinen Splenozyten wurden 5×10^5 Zellen, für Experimente mit humanen PBMCs wurden 2×10^5 Zellen in 50µl pro well ausplattiert. Anschließend wurden 150µl einer Tumorzellsuspension (5×10^4 Huh7, Hep3B, HepG2 oder Hepa1-6 Tumorzellen) oder zellfreie Kulturüberstände von Tumorzellen hinzugefügt. Es folgte eine 48-stündige Inkubation bei 37°C im Begasungsbrutschrank. Nach 48h wurde die 96well-Platte bei 400g für 7 min zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Die Auswertung der Chemokinkonzentration erfolgte mittels ELISA.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurden *Escherichia coli* vom Stamm DH5α verwendet. Die Bakterien wurden in LB-Flüssigkultur und LB-Agarplatten gezüchtet. Um Bakterien zu selektionieren, wurde dem LB Medium 100µg/ml Ampicillin hinzugefügt. Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurden diese in 100ml LB Medium bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,40-0,55 expandiert. Anschließend wurde das Medium auf 4°C gekühlt und die Bakterien per Zentrifugation (10 min, 400rpm) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien in 30ml Transfektionspuffer I suspendiert. Die Bakterien wurden bei 4°C für 5 min inkubiert und erneut durch Zentrifugation pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes und Resuspension in 4ml Transfektionspuffer II wurden Aliquots (50-100µl) in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.4.2 Konzipierung der Primer

Die Primer wurden mit Hilfe der DNASTAR Lasergene Software (Masion, Wisconsin) konzipiert. Über die Genbank des *National Center of Biotechnology Information* erfolgte

die Auswahl der Primersequenz. Die Primer wurden bei der Firma Metabion (Metabion International AG, Martinsried, Deutschland) bestellt.

2.4.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode, um einen genau definierten Teil von extrahierter DNA zu vervielfältigen. Um die gewünschte DNA Matrix zu vervielfältigen, werden sequenzspezifische homologe Primer eingesetzt, die jeweils strangaufwärts und -abwärts positioniert werden, und somit den zu amplifizierenden Teil genau definieren. Die Größe der Primer variiert zwischen 15-30 Basenpaaren und die maximale Größe eines in einer Standard-PCR zu amplifizierenden DNA-Fragments darf 10.000 Basenpaare nicht überschreiten. Die Reaktion verläuft in drei Schritten, der Denaturierung, der Primerhybridisierung sowie der Elongation. Im ersten Schritt wird die DNA denaturiert. Es erfolgt die Auftrennung von doppelsträngiger DNA in Einzelstränge. Anschließend lagern sich die Primer an die homologe DNA an. Im letzten Schritt wird die DNA durch eine thermostabile DNA-Polymerase vervielfältigt. Am Ende dieser Reaktion ist die gewünschte DNA verdoppelt.

Die PCR Methode wurde zur Amplifizierung von cDNA genutzt. Wenn die PCR für Klonierung genutzt wurde, wurden spezifische Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen geschaffen, um das gezielte Klonieren in ein Ziel-Plasmid zu ermöglichen. Um das Entstehen von Punktmutationen zu verhindern, wurde eine PfuUltra Polymerase (Fermentas, Deutschland) verwendet. Diese Polymerase hat eine spezielle 3' zu 5' Exonuklease-Aktivität, und hat damit eine höhere Genauigkeit als herkömmliche Polymerasen.

PfuUltra Polymerase

nach Bedarf	DNA (100 pg bis 500 pg)
1x	10x PfuUltra II Reaction Buffer
0.2 mM pro dNTP	Invitrogen TM dNTP Mix (10 mM pro dNTP)
0.25µM	Upstream Primer (10 µM)
0.25µM	Downstream primer (10 µM)
1.25U	PfuUltra DNA-Polymerase (5 U/µl)

Standard PCR Zyklus Bedingungen:

Funktion	Dauer	Temperatur	
1. Initiale DNA Denaturierung	5 min	95°C	
2. DNA Denaturierung	20 sek	95°C	} 30 - 35 Zyklen
3. Primerhybridisierung	20 sek	65°C	
4. Extension	15 sek	72°C	
5. Elongation	3 min	72°C	
6. Ende	∞	4°C	

Die Schritte 2. - 4. wurden für 30 Zyklen wiederholt. Nach der PCR wurde zu jeder Probe 1x DNA-Ladepuffer (Fermentas) hinzugegeben. Der Ladepuffer enthielt zwei verschiedene Puffer (Bromophenol Blue und Xylene Cyanol FF) die zur Erkennung der DNA während der Elektrophorese dienen. Die mit dem Ladepuffer vermengten Proben wurden in ein Agarose-Gel für die Längenauftrennung mittels Gelelektrophorese gegeben.

2.4.4 PCR Purifikation

Die PCR Produkte, die weiterverwendet wurden, insbesondere für molekularbiologisches Klonieren, wurden mithilfe des JET Quick PCR Purification Kits weiter aufgereinigt. Dies erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers. Dafür wurde zu jeder Probe 400µl H1 Lösung gegeben und in eine JetQuick Spin Column pipettiert. Anschließend wurde für 1 min bei 12.000g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule daraufhin mit 500µl der Lösung H2 gewaschen. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Zur Auswaschung der DNA wurden 40µl erwärmtes steriles H₂O in die SpinColumn pipettiert (12.000g für 2 min) und erneut zentrifugiert.

2.4.5 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde für die Auftrennung und Visualisierung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe verwendet. In diesem Fall wurde die Technik genutzt, um PCR Proben zu analysieren. Für die Elektrophorese wurde ein 2%iges Agarose-Gel (2% Agarose, 1x TAE) hergestellt. Das Agarosepulver wurde kurz aufgeköcht und 0,003% Ethidiumbromid hinzugeben. Durch das anschließende Abkühlen formen sich quervernetzte Polymere. Durch Anlegen eines elektrischen Poles wandert die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung zum positiven Pol. Durch die quervernetzten Polymere erfolgt eine Größenauftrennung der DNA. Je kleiner das DNA-Fragment, umso schneller wandert es durch das Gel. Die exakte Größe wurde dann mit Hilfe von 1kb DNA Ladder (Fermentas-GeneRuler™) bestimmt.

2.4.6 DNA Gelextraktion

Zur Extraktion von Doppelstrang DNA PCR Proben aus Agarose-Gel wurde das JETQuick GelExtraktion Kit verwendet. Das Kit ermöglicht DNA-Fragmente von einer Länge von 40bp bis zu 20kb zu reinigen. Die DNA bindet an einer Silica-basierten Membran in der Zentrifugationskartusche im Beisein von Salz-haltigen Puffern, während kontaminierende Substanzen durch die Säule wandern. 80-95% der DNA-Fragmente werden isoliert mit einer maximalen Bindungskapazität von 20kb. Die DNA löst sich im letzten Schritt durch Puffer mit niedrigem Salzgehalt von der Silica-basierten Membran (Vogelstein und Gillespie, 1979). Die Extraktion erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Zusammengefasst wird die DNA-Bande aus dem Agarose-Gel nach der Gelelektrophorese ausgeschnitten und in das zugehörige Eppendorf Tube gebracht. Für 100mg Gel wurde 300µl Lösung L1 hinzugefügt. Zum Auflösen des Gels wurde das Tube für 15 min bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde das flüssige Gel in eine JETQuick Zentrifugationskartusche eingebracht und für 1200g für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 500µl Lösung L2 und einem darauffolgenden Zentrifugierschritt (12.000g, 1 min) gewaschen. Der Durchfluss wurde ebenfalls verworfen. Als letzter Schritt wurde 50µl steriles, vorgewärmtes Wasser in die Zentrifugationskartusche pipettiert und für 12.000g und 2 min zentrifugiert.

2.5 Klonierung

Klonierung ist eine Methode, um ein definiertes DNA-Fragment in einen Vektor einzubringen, um dieses dann durch Bakterien zu amplifizieren. Jede Klonierung beinhaltet vier Schritte: Fragmentierung (Spaltung durch Restriktionsendonukleasen), Ligation von DNA-Fragmenten, Transformation in Bakterien und Selektion.

2.5.1 Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Der Verdau durch Restriktionsendonukleasen wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Reaktionsansatz setzte sich aus 0.2-2µg DNA mit 10-20U von einer oder zwei Restriktionsendonukleasen und dem entsprechenden Puffer zusammen. Die Reaktionsdauer lag bei einer Stunde bei 37°C. Anschließend wurden die Proben auf ein Agarose-Gel aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt. Zur Aufreinigung wurde das JETQuick PCR Purifikationskit verwendet. Die DNA-Konzentration wurde mit Standard Photometrie ermittelt.

2.5.2 Ligation

Mit Hilfe der Ligation können spezifische DNA-Fragmente in die *multiple cloning site* (MCS) eines Vektors eingefügt werden. Dafür wird der Vektor mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen im Klonierungsabschnitt (MCS) geöffnet und anschließend mittels Gelelektrophorese aufgereinigt. Ebenso wird das zu verknüpfende DNA-Fragment mit den gleichen Restriktionsendonukleasen verdaut und mit Gelelektrophorese aufgereinigt. So entstehen im Vektor und im DNA-Fragment überlappende Enden, welche über Ligation des DNA-Fragmentes mit dem Plasmidrückrad verbunden werden. Für die Ligation wurde das Enzym T4 Ligase (Fermentas) verwendet. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Vektor DNA	1µl
Insert DNA	6µl
T4 Ligase	2µl
10x T4 DNA-Ligase Puffer	2µl
H ₂ O	aufgefüllt auf 20µl

2.5.3 Transformation

Transformation beschreibt das Einbringen des Vektor-Insert-Konstruktes in Bakterien. Dafür wurden DH5α *E. coli* verwendet. Die Bakterien wurden zuvor in Pellets bei -80°C in flüssigem Stickstoff eingefroren und für die Transformation auf Eis aufgetaut. Der Plasmid-Vektor wurde hinzugegeben. Bakterien und Vektor wurden für 45s im Heizblock erhitzt, um einen Hitzeschock auszulösen, damit die Zellmembran kurzzeitig permeabel für die einzubringende DNA wird. Nach Inkubation auf Eis wurden die Bakterien auf Selektionsantibiotikum (Ampicillin)-enthaltende LB-Agarplatten ausplattiert. Wenn die Transformation erfolgreich war, konnten Kolonien nach 24h bei 37°C selektioniert und in 2ml mit Ampicillin versetzten LB-Medium für 16h bei 37°C hochgezogen werden.

2.5.4 Isolation von Plasmid-DNA

Die Aufreinigung der Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte mittels GenJET™ Plasmid Miniprep Kit. Nach Proliferation der Bakterien für 16h bei 37°C wurden die Bakterien bei 12.000g für 2 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 250µl Resuspensionslösung gelöst und 250µl Lyselösung hinzugegeben. Nach gründlichem Mischen der Lösung wurde 350µl Neutralisierungslösung hinzugegeben und für 5 min bei 12.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die GeneJET™ Säule aufgetragen und erneut für 1 min bei 12.000g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule wurde

zweimal mit 500µl Waschlösung und anschließenden Zentrifugationsschritten (12.000g, 1 min) gewaschen. Die DNA wurde dann mit 50µl vorgewärmten (70°C) sterilem H₂O gelöst und abzentrifugiert (12.000g, 2 min).

2.5.5 Klonierung des pMX-CCL22-Konstruktes

Die mCCL22 cDNA wurde aus dem Ursprungsvektor herausgeschnitten, mittels PCR amplifiziert und als EcoR1/xho1 Fragment in ein retrovirales Plasmid kloniert. Als Expressionsvektor wurde der retrovirale Vektor pMX-puro verwendet. Die amplifizierte mCCL22-DNA wurde mithilfe von Primern mit Sequenzen versehen, welche die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen EcoR1 und xho1 beinhalten. Außerdem wurde zur besseren Expression eine Kozak-Sequenz hinzugefügt. Anschließend wurden Insert und Vektor mit den Restriktionsenzymen EcoR1 und xho1 verdaut, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und aufgereinigt. Die Ligation beider Bestandteile erfolgte in einem letzten Schritt. Die erfolgreiche Ligation beider DNA-Fragmente wurde durch einen analytischen Restriktionsverdau mit den Endonukleasen EcoR1 und xho1 überprüft.

Primer:

mCCL22 – EcoR1 5'attaGAATTCgccaccatggctaccctgcgtgctc 3'

mCCL22 – xho1 5'taatCTCGAGctaggacagtttatggagtag 3'

pMX-CCL22 Sequenz:

Primer (rot); Kozak Sequenz (blau); mCCL22 (grün)

5'

attaGAATTCgccaccatggctaccctgcgtgctccactcctggctcctcgtccttcttgcgtggtggcaattcagacctc
gatgcaggtccctatggtgccaatgtggaagacagtatctgctgccaggactacatccgtcaccctctgccatcacgtttagt
aaggagttctctggacctcaaaatcctgccgaagcctggcgtgtttgataaccgtaagaaccgagatatctgtgccgatc
ccaggcaggtctgggtgaagaagctactccataaactgtcctagCTCGAGatta

3'

2.6 Herstellung des Retrovirus und Transduktion von Tumorzellen

Ein Tag vor der Transfektion wurden 1-1,5x10⁶ Platinum-E (Plat-E) -Zellen in einer 6-well Platte mit 3ml in ihrem spezifischen Medium ausplattiert und über Nacht unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Wenn die Zellen am nächsten Tag 70-90% Konfluenz erreicht hatten, wurde die Plasmid-Lösung hergestellt. Während der Inkubationszeit der Plasmid-Lösung von 5 min wurde das Medium der Plat-E-Zellen entfernt und vorsichtig durch Plat-E-Hungermedium ausgetauscht. Ein steriles 13ml Polystyren-Tube wurde mit

150µl HBSS-Phosphatpuffer befüllt und die Plasmidlösung wurde unter Vortexen tropfenweise hinzugegeben. Für 30 min wurde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Lösung auf die Plat-E-Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 6h wurde das Hungermedium abgenommen und durch Plat-E-Medium ersetzt. Der Virusüberstand konnte nach 42h geerntet werden. Durch anschließende sterile Filtration durch einen 0,45µm Millex-Spritzenvorsatzfilter konnte der Überstand von Zelldebris befreit werden. Die Plat-E-Zellen wurde mit 3ml frischem Medium versehen, um eine erneute Ernte nach 24h zu ermöglichen. Der gefilterte Virus wurde auf eine 20% Sucrose Lösung gegen und mit Ultrazentrifugation (2h bei 27.000rpm) konzentriert. Anschließend wurde das Viruspellet aufgelöst und für die Transduktion von Hepa1-6 Zellen genutzt. Nach 36h wurden die transduzierten Hepa1-6 Tumorzellen mittels Puromycin selektioniert, dafür wurden die Tumorzellen für 72h mit Puromycin (5µg/ml) behandelt. Die selektionierten Tumorzellen wurden dann auf die Produktion von CCL22 mittels ELISA überprüft.

Plasmid Lösung:

	Menge (absolut)	Konzentration
Retroviraler Vektor	18µg	120ng/µl
CaCl ₂	30µmol	200mM
Chloroquine	38nmol	253µM
Steriles H ₂ O	Aufgefüllt auf 150µl	

2.7 Immunologische Methoden

2.7.1 ELISA

Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) ist eine Methode zur Quantifizierung von spezifischen Proteinen in einer Lösung. Es wurde ein sogenannter „Sandwich“-ELISA verwendet, wobei im ersten Schritt eine 96-well Platte mit 50µl pro well Antikörper (2,0µl/ml CCL22-coating antibody) beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach drei Waschschritten mit PBS+0,05% Tween wurde zunächst ein 150µl pro well ELISA Blockierungspuffer (PBS +10%FCS) aufgetragen, um unspezifische Proteinbindungen mit der Platte zu verhindern. Nach einer Stunde Inkubation wurde die Platte erneut dreimal gewaschen und 50µl Probe (pur oder mit PBS+1%BSA verdünnt) sowie eine Standard-Verdünnungsreihe mit bekannter Proteinkonzentration aufgetragen und für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Die

Standardverdünnungsreihe dient zur Berechnung der exakten Proteinkonzentration in der zu untersuchenden Probe. Nach dreimaligem Waschen wurden 50µl eines gegen CCL22 gerichteten, spezifischen, biotinylierten Antikörpers (50ng/ml CCL22 *detection antibody*) hinzugefügt. Nach zweistündiger Inkubation folgte erneut ein dreimaliger Waschschrift mit ELISA Waschpuffer. Danach wurde die Platte mit 50µl Enzymlösung (1/200 Streptavidin-Peroxidase mit PBS verdünnt) für 20 min in Dunkelheit inkubiert. Um die ungebundenen Enzyme zu eliminieren, wurde die Platte erneut dreimal gewaschen. Im letzten Schritt wurde 50µl der Substratlösung (zu gleichen Teilen H₂O₂ und Tetramethylbenzidin) hinzugegeben und solange in Dunkelheit belassen, bis sich eine deutliche Blaufärbung in der dritthöchsten Standardverdünnung zeigte. Zur Beendigung der Reaktion wurde 50µl H₂SO₄ Lösung hinzugegeben und die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels optischer Dichte erfolgte bei 450nm mit dem Mithras Plattenleser. Für diese Arbeit wurde das humane und murine CCL22-Kit (R&D System) verwendet. Der ELISA wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.7.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch *flow cytometry* genannt, ist eine Methode, um Zellen anhand ihrer Größe und Granularität sowie mithilfe von an Antikörpern-gekoppelten, fluoreszierenden Molekülen, Oberflächen- und intrazelluläre Merkmale von Zellen zu zählen, zu analysieren und aufzureinigen. Jede einzelne Zelle passiert mehrere Laser, welche die Brechung des Lichtes durch die Zelle (*Forward Scatter*: Größe/Volumen; *Side scatter*: Granularität), sowie fluoreszierende Farben messen können. Es werden an Antikörper-gekoppelte, fluoreszierende Moleküle verwendet, die an intrazellulären, aber auch Zelloberflächen-Merkmalen binden. Jeder Farbstoff hat sein Anregungs- und Emissionsmaximum bei einer bestimmten Wellenlänge. So können verschiedene Farbstoffe zur gleichen Zeit getrennt gemessen werden und somit Zellen auf mehrere unterschiedliche Merkmale hin untersucht werden. Für alle Experimente in dieser Arbeit wurde das FACS Canto II verwendet, das drei verschiedene Laser (405nm, 488nm, 633nm) beinhaltet. Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo-Software.

Analyse von Oberflächenantigenen

Die Zellen wurden in PBS suspendiert und mit 10µl/ml monoklonalem Antikörper für 30 min in Dunkelheit inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit PBS zweimalig

gewaschen. Der Überstand verworfen und in 2% FCS-haltigem PBS suspendiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Analyse von intrazellulären Antigenen

Die Bestimmung von intrazellulären Molekülen erfolgte mithilfe des FoxP3-Staining Buffer Sets (eBioscience). Nach der Färbung der Oberflächenantigene wurden die Zellen abzentrifugiert und in Fixations-/Permeabilisierungsreagenz gelöst. Die Zellen wurden für 30 min bei 4°C inkubiert und zweimalig mit Permeabilisierungspuffer gewaschen. Die Zellen wurden dann in 50µl Permeabilisierungspuffer suspendiert und 10µl/ml anti-FoxP3 Antikörper wurden hinzugefügt. Die intrazelluläre Färbung erfolgte für 30 min bei 4°C in Dunkelheit. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in PBS mit 2% FCS suspendiert und am FACS Canto II analysiert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 400g für 5 min bei 4°C.

2.7.3 Immunhistologie

Mit Formalin-fixierte in Paraffin-eingebettete (FFPE) HCC Gewebeschnitte von 62 Patienten und einer gesunden Kontrolle aus den Archiven des Instituts für Pathologie der Ludwigs-Maximilians-Universität wurden analysiert. Alle Gewebeschnitte wurden immunhistochemisch aufgearbeitet und entweder mit Antikörpern gegen CD8, FoxP3 oder CCL22 behandelt. Dies erfolgte nach Standardprotokollen und wurde durch Mitarbeiter des Pathologischen Instituts der LMU durchgeführt. Die gesamte Präparatoberfläche wurde analysiert und nach morphologischen Kriterien in Tumorepithel, umgebende, tumorfreie Leber und Stroma eingeteilt. Die Bereiche mit der höchsten Zellinfiltration wurden ausgewählt und 10 Hauptgesichtsfelder (HPF) in 40facher Vergrößerung ausgezählt. Die Bilder wurden mit einem Zeiss Mikroskop entweder bei 40- oder 20-facher Vergrößerung aufgenommen und mit Adobe Photoshop hinsichtlich Kontrastes und Größe bearbeitet.

2.8 Statistische Analyse

Für die vorliegende Arbeit wurden Ergebnisse durch ihr arithmetisches Mittel, ihren Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of mean* = SEM) angegeben. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem Student-t-Test für unverbundene Stichproben. Statistische Signifikanz wurde angenommen für $p < 0,05$, $p < 0,01$ und $p < 0,001$ und mit Markierungen *, **, *** versehen. Alle statistischen Auswertungen erfolgten mit der GraphPad Prism Software.

3 Ergebnisse

3.1 Expression, Induktion und Funktion von CCL22 in Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms

Es wurde für zahlreiche Tumorentitäten gezeigt, dass die immunsuppressive Wirkung von regulatorischen T-Zellen ein wichtiger Bestandteil des Entkommens des Tumors vor der Kontrolle des Immunsystems darstellt (Zou 2006). Im hepatozellulären Karzinom weisen die Patienten mit hohen intratumoralen und im Stroma nachgewiesenen Tregs ein schlechteres Überleben auf (Zhou, Ding et al. 2009). Das Chemokin CCL22 vermittelt über den auf Tregs exprimierten Chemokinrezeptor CCR4 die Migration von Tregs in den Tumor (Curiel, Coukos et al. 2004). In den nachfolgenden Experimenten soll die Rolle von CCL22 im hepatozellulären Karzinom und die Migration von Tregs im HCC näher beschrieben werden.

3.1.1 Tumorzellen führen zu einer Hochregulation von CCL22 in Immunzellen

Als Erstes wurde untersucht, ob und durch welche Zellen das Chemokin CCL22 im hepatozellulären Karzinom gebildet wird. Dafür wurden die Überstände von einer murinen und drei humanen HCC-Zelllinien auf die Expression von CCL22 mittels ELISA untersucht. Für die murine Zelllinie wurden Splenozyten mit dem C57BL/6 Hintergrund und für die Versuche mit humanen Zelllinien Spender PBMCs verwendet. Murine Splenozyten wurden für 48h mit der murinen HCC-Zelllinie Hepa1-6 kokultiviert (**Abb. 2A**). Humane PBMCs wurden für 48h mit drei unterschiedlichen humanen HCC-Zelllinien kokultiviert (**Abb. 2B**). Anschließend wurde die humane und murine Konzentration von CCL22 mittels ELISA in den Überständen gemessen. In keiner der HCC Zelllinien konnte *in vitro* die Bildung von CCL22 detektiert werden. In Kultur genommene Immunzellen produzierten geringe Mengen von CCL22. Die Kokultur von Immunzellen mit der murinen Hepa1-6 Tumorzelllinie führte zu einem signifikanten Anstieg der CCL22 Sekretion. In den humanen Zelllinien konnte dieser Effekt in der Hep3B Tumorzelllinie gezeigt werden. In der Kokultivierung von PBMCs mit der Tumorzelllinie HepG2 war nur ein geringer Anstieg im Vergleich zur CCL22 Sekretion von allein kultivierten PBMCs zu sehen. Die Kokultivierung von Immunzellen mit der humanen HCC-Zelllinie Huh-7 führte zu keiner Induktion von CCL22.

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die CCL22 Sekretion durch die Tumorzellen oder die Immunzellen erfolgt. Außerdem sollte überprüft werden, ob die CCL22 Induktion Zellkontakt-abhängig ist oder durch einen löslichen Faktor vermittelt wird. Dafür wurden Splenozyten für 48h in zellfreien Überständen von Hepa1-6 Tumorzellen kultiviert (**Abb. 2C**). Interessanterweise konnte die CCL22 Induktion auch mit zellfreien Überständen beobachtet werden. Die CL22 produzierenden Zellen müssen daher Immunzellen und nicht Tumorzellen sein. Ebenso scheint die Hochregulation in Splenozyten nicht Zellkontakt-abhängig zu sein, sondern muss über einen von Tumorzellen sezernierten, löslichen Faktor vermittelt werden.

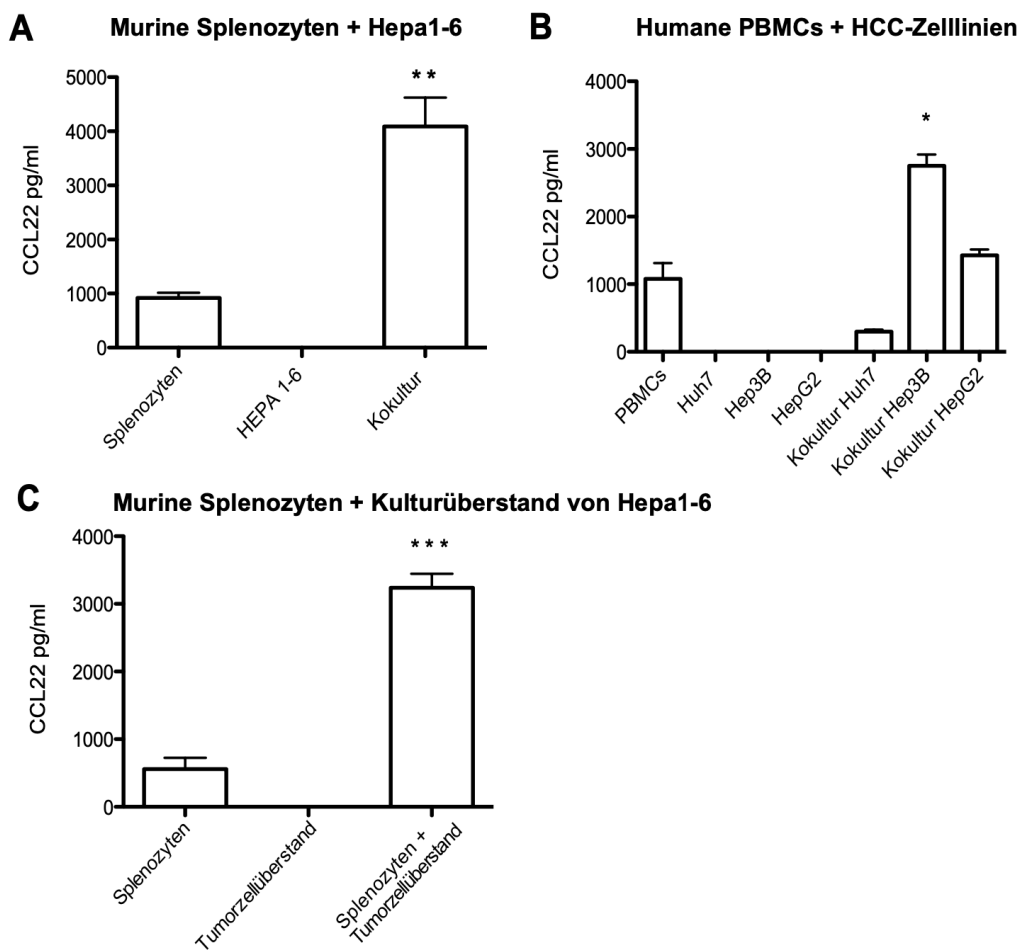


Abb. 2: CCL22 in der Kokultur von Immunzellen mit Tumorzellen oder deren Überständen.
A CCL22 in der Kokultur muriner Splenozyten mit der murinen Hepa1-6 HCC-Zelllinie. C57BL/6 Splenozyten (5×10^5 Zellen/50 μ l) wurden 48h mit Hepa1-6 Zellen (5×10^4 Zellen/150 μ l) kultiviert. CCL22 im Überstand wurde mittels ELISA gemessen. Angezeigt sind Mittelwerte + SEM (n=3). **, p < 0,002.
B CCL22 in der Kokultur mit humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) und HCC-Tumorzelllinien. Humane PBMCs (2×10^5 Zellen/50 μ l) wurden 48h mit Tumorzellen (5×10^4 Zellen/150 μ l) kultiviert. Verwendet wurden die humanen HCC-Zelllinien Huh7, Hep3B und HepG2. CCL22 im Überstand wurde mittels ELISA gemessen. Angezeigt sind Mittelwerte + SEM (n=2). *, p < 0,02.
C CCL22 in der Kultur muriner Splenozyten mit Tumorzellüberständen der murinen Hepa1-6 HCC-Zelllinie. C57BL/6 Splenozyten (5×10^5 Zellen/50 μ l) wurden 48h mit Tumorzellüberständen von Hepa1-6 kultiviert. CCL22 im Überstand wurde mittels ELISA gemessen. Angezeigt sind Mittelwerte + SEM (n=3). ***, p < 0,0005.

3.1.2 CCL22 ist intratumoral und in der Milz von Hepa1-6 Tumor tragenden Mäusen nachweisbar

Nachdem in der Kokultur von Splenozyten und der murinen HCC Zelllinie Hepa1-6 *in vitro* eine CCL22 Induktion gesehen wurde, überprüften wir, ob CCL22 auch in Geweben wie Milz und Tumor bei Hepa1-6 tragenden Mäusen nachgewiesen werden kann. Die Zelllinie Hepa1-6 entstand spontan in C57BL/6 Mäusen und stellt ein anerkanntes murines HCC-Tumormodell in immunkompetenten Mäusen dar. Zur Überprüfung unserer Fragestellung wurden Mäusen mit dem C57BL/6 Hintergrund subkutane Tumore mit Hepa1-6 Zellen gesetzt und die Mäuse bei einer adäquaten Tumorgroße getötet. Anschließend wurden den Mäusen die Milz und der Tumor entnommen und die CCL22 Konzentration mittels ELISA gemessen (**Abb. 3**). Sowohl in der Milz als auch im Tumorgewebe von Hepa 1-6 Tumoren konnte CCL22 nachgewiesen werden.

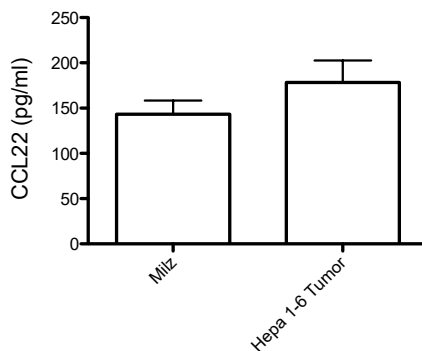


Abb. 3: CCL22 in Milz und Hepa1-6 Tumoren. Die Tumore wurden reseziert, lysiert und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay bestimmt. Die CCL22 Spiegel wurden durch ELISA gemessen und auf die Proteinkonzentration genormt. Gezeigt sind die Mittelwerte (n=7).

3.1.3 Regulatorische T-Zellen sind vermehrt in Hepa1-6 Tumoren nachweisbar

Mithilfe des Chemokinrezeptors CCR4 migrieren Tregs in CCL22 exprimierendes Gewebe. In den vorausgegangenen Experimenten konnte CCL22 sowohl in der Milz, als auch im Tumor im Hepa1-6 Mausmodell nachgewiesen werden. Als nächstes sollte untersucht werden, ob Tregs Hepa1-6 Tumore infiltrieren. Dazu wurden Mäusen mit dem C57BL/6 Hintergrund subkutane Tumore mit der Hepa1-6 Zelllinie gesetzt und die Mäuse bei einer adäquaten Tumorgroße getötet. Milz und Tumor wurden entnommen, zerkleinert und die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Es konnten Tregs in Milz und Tumor nachgewiesen werden, dabei zeigten sich im Tumorgewebe signifikant mehr Tregs als in der Milz. (**Abb. 4**).

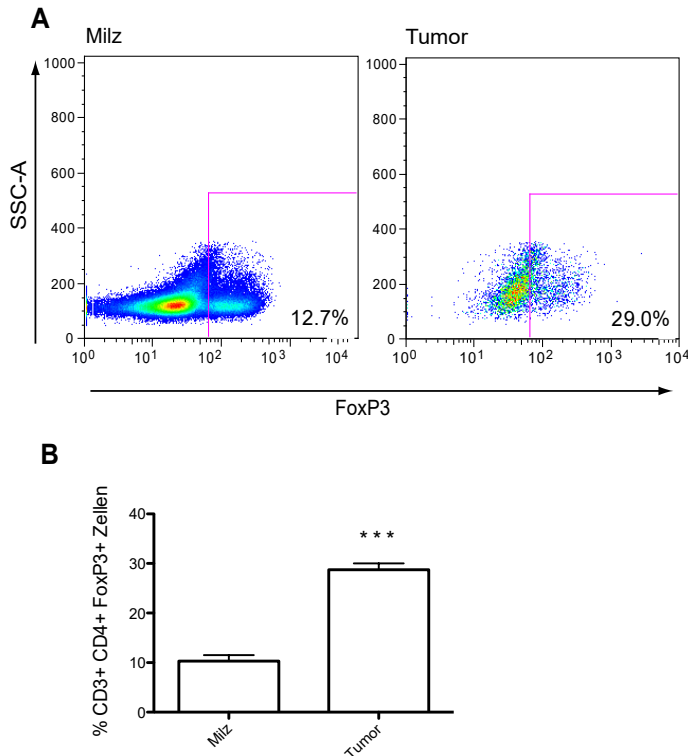


Abb. 4: Infiltration von regulatorischen T-Zellen in Milz und Hepa 1-6 Tumoren. C57BL/6 Mäusen wurden Hepa1-6 Tumorzellen (2×10^6 Zellen) subkutan injiziert. Die Tumore und die Milz wurden bei einer Tumorgroße von 120 mm^2 entnommen. Die Tumor-infiltrierenden Leukozyten wurden isoliert und mit *flow cytometry* analysiert. Angegeben sind die prozentualen Anteile der Population regulatorischer T-Zellen, definiert als FoxP3⁺ Zellen, innerhalb der CD3⁺ CD4⁺ Zellen im *live-gate*. **A** Gezeigt ist ein repräsentativer FACS Plot für Milz und Tumor. **B** Dargestellt sind Mittelwerte + SEM (n=3). ***, p < 0,0001.

3.2 Tumorwachstum und Infiltration von regulatorischen T-Zellen im CCL22-Überexpressionsmodell

Um das Zusammenspiel von CCL22, die Migration von regulatorischen T-Zellen und die damit verbundenen Auswirkungen auf das Tumorwachstum besser verstehen zu können, wurde eine neue Zelllinie geschaffen, in der die Expression von CCL22 hochreguliert wurde. Zu diesem Zweck wurde ein Vektor hergestellt, in dem CCL22 vor einen konstitutiv aktiven Promoter kloniert wurde, welcher zu einer kontinuierlichen Expression von CCL22 führt. Die murine HCC-Zelllinie Hepa1-6 wurde mit diesem Vektor lentiviral transduziert. Die erfolgreiche Transduktion wurde mittels ELISA überprüft. Im Vergleich zur Wildtyp Zelllinie, welche *in vitro* kein CCL22 bildet, zeigten sich deutlich erhöhte Konzentrationen von CCL22 in der transduzierten Zelllinie (**Abb. 5 A**).

Im Folgenden wurde überprüft, ob die transduzierte PMX-CCL22 Hepa1-6 Zelllinie auch *in vivo* zu signifikant höheren CCL22 Konzentrationen führen würde. Dazu wurden im C57BL/6 Modell subkutane Tumore in der transduzierten Zelllinie und als Kontrolle in der Hepa1-6 Zelllinie gesetzt, bei adäquater Größe entnommen und auf den CCL22 Gehalt hin untersucht (**Abb. 5 B**). Es konnte gezeigt werden, dass die CCL22 Level in Hepa1-6 PMX-CCL22 Tumoren signifikant höher waren als in Tumoren der Wildtyp Zelllinie.

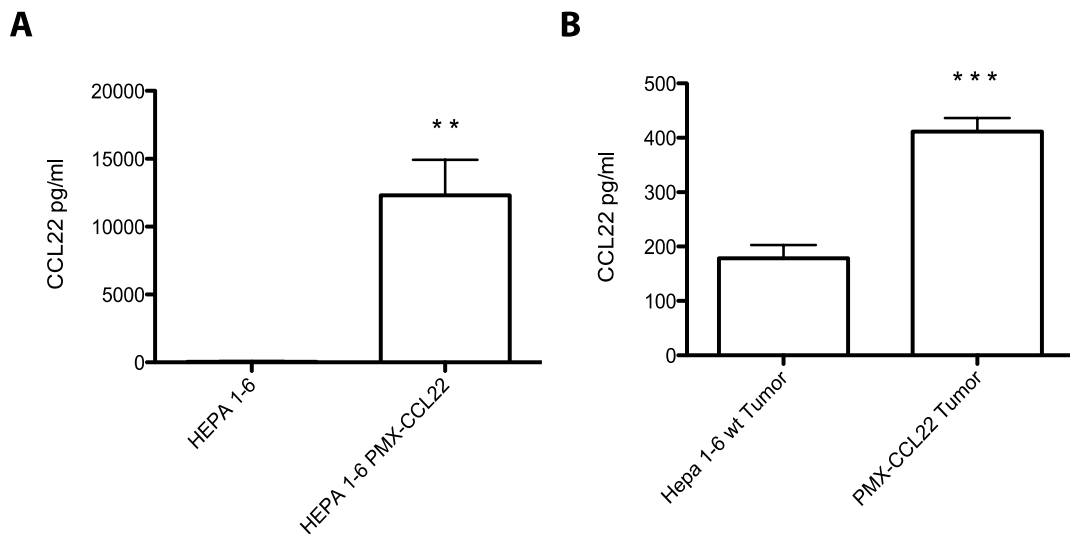


Abb. 5: CCL22 in Hepa1-6 Tumorzellen und mit PMX-CCL22 transduzierten Hepa1-6 Tumorzellen *in vitro* und *in vivo*. **A** Hepa 1-6 PMX-CCL22 transduzierte Zellen (5×10^4 Zellen) und Hepa 1-6 Tumorzellen (5×10^4 Zellen) wurden für 48h in einer 96-well-Platte inkubiert. CCL22 wurde in den Überständen mittels ELISA gemessen. Angezeigt sind Mittelwerte + SEM (n=2). **, p < 0,008. **B** C57BL/6 Mäusen wurden Hepa 1-6 Tumorzellen (2×10^6 Zellen) oder PMX-CCL22-Hepa1-6 Tumorzellen (2×10^6 Zellen) subkutan injiziert. Die Tumorgöße wurde jeden zweiten Tag erhoben. Bei einer Tumorgöße von 120mm^2 wurden die Mäuse getötet und Milz sowie Tumor entnommen. Die Proteinkonzentration in den Tumorlysaten wurde mittels Bradford-Assay bestimmt. Die CCL22 Spiegel wurden durch ELISA gemessen. Angezeigt sind die Mittelwerte + SEM von je 7 individuellen Mäusen. ** p < 0,0001

3.2.1 *In vivo* führt die Überexpression von CCL22 nicht zu einem beschleunigten Tumorwachstum

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die höheren CCL22 Konzentrationen in den Tumoren der transduzierten Hepa1-6 Zelllinie zu einem schnelleren Tumorwachstum und der vermehrten Infiltration von regulatorischen T-Zellen führen würde. Dazu wurde das Hepa1-6 Tumormodell und Mäuse mit dem C57BL/6 Hintergrund ausgewählt. Es wurden zwei Gruppen gebildet: Der einen Gruppe wurde die Wildtyp Zelllinie (Hepa1-6 wt) und der anderen Gruppe die transduzierte Zelllinie (PMX-CCL22) subkutan gespritzt.

Die Tumorgrößen wurden alle zwei Tage gemessen und die Mäuse bei einer Tumorgröße von 120mm² getötet. Tumor und Milz wurden entnommen und die Tumor-infiltrierenden Leukozyten mittels Durchflusszytometrie untersucht (**Abb.**). In der Versuchsgruppe der transduzierten Zelllinie ließ sich im Vergleich zur Kontrollgruppe kein beschleunigtes Tumorwachstum beobachten (**Abb. A**). Die durchschnittliche Tumorgröße war in der Kontrollgruppe deutlich größer. Interessanterweise wiesen die PMX-CCL22 Tumore eine signifikant höhere Infiltration von T-Zellen (CD3⁺ Zellen) auf (**Abb. B**). Auch war die Anzahl der T-Effektor-Zellen (CD8⁺ Zellen) in den transduzierten Tumoren im Vergleich zur Kontrollgruppe höher, jedoch nicht statistisch signifikant (**Abb. C**). In beiden Gruppen zeigte sich eine hohe Infiltration von regulatorischen T-Zellen (CD3+CD4+FoxP3+ Zellen) in die Tumore, ein Unterschied in der Anzahl der Tregs konnte nicht gezeigt werden (**Abb. D**). Die Effekte könnten auf eine vermehrte Immunogenität des PMX-Vektors zurückzuführen sein.

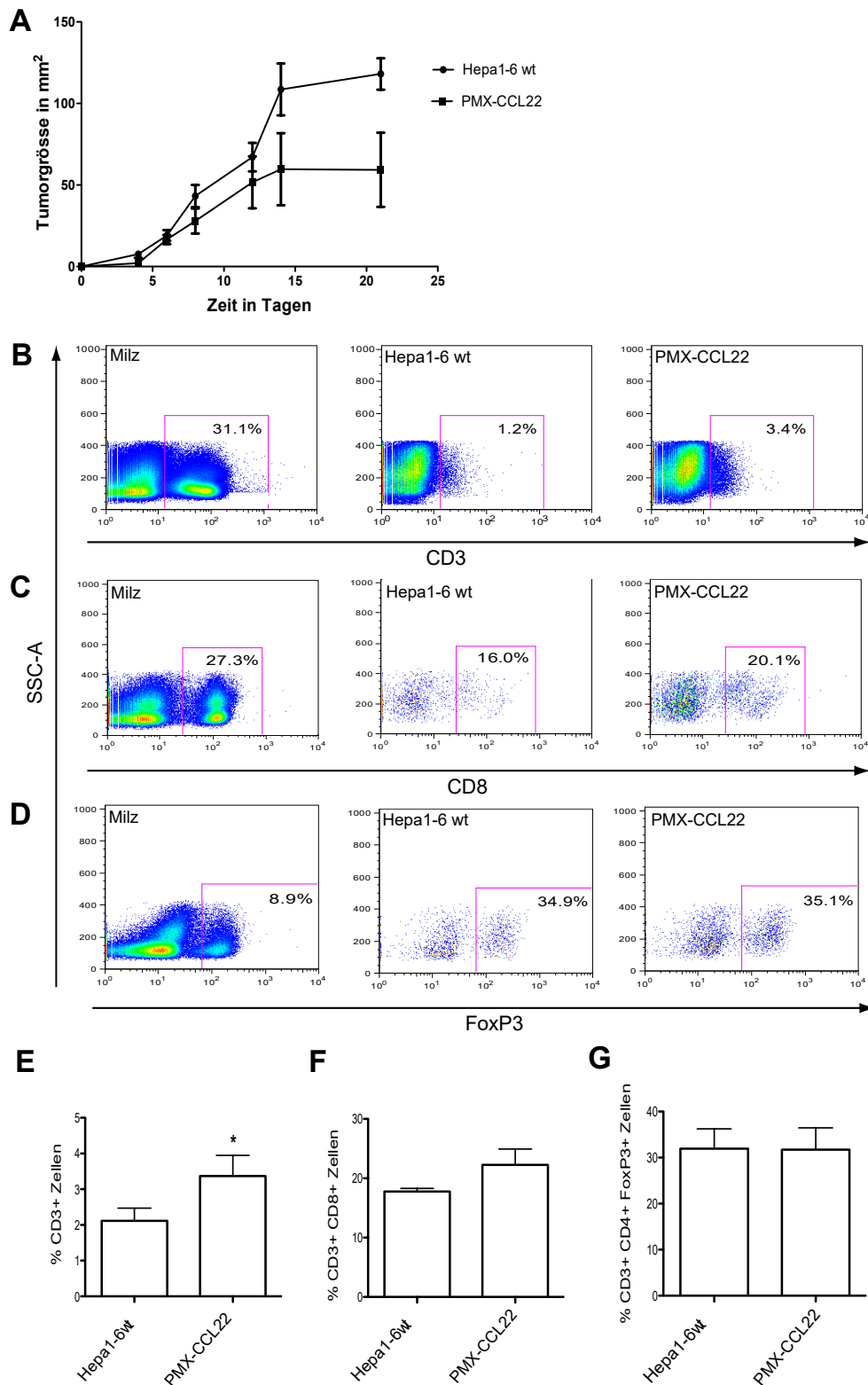


Abb. 6: Wachstumskurven und T-Zellinfiltration in Hepa1-6 Wildtyp (wt) und PMX-CCL22 tragenden Mäusen. Weibliche C57BL/6 Mäuse wurden Hepa1-6 wt Tumorzellen (2×10^6 Zellen) oder PMX-CCL22-Hepa1-6 Tumorzellen (2×10^6 Zellen) subkutan injiziert. Die Tumorgroße wurde jeden zweiten Tag für 21 Tage erhoben. **A** Angezeigt ist der jeweilige Mittelwert \pm SEM von 7 individuellen Mäusen. **B-G** An Tag 21 wurden Milz und Tumor entnommen. Die Tumor-infiltrierenden Leukozyten wurden isoliert und mittels *flow cytometry* die relativen T-Zellpopulationen analysiert. Gezeigt sind repräsentative FACS blots für Milz, Hepa1-6 und PMX-CCL22 Tumore und prozentuale Anteile des *live-gates* für CD3⁺ T-Zellen (**B+E**), für CD3⁺CD8⁺ Effektor T-Zellen (**C+F**) und für CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen (**D+G**). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. *, $p < 0.047$ (n=7).

3.3 CCL22-exprimierende Zellen und FoxP3⁺ Zellen sind in Tumor und Stroma von HCC Patienten nachweisbar

Im Mausmodell mit Hepa1-6 Tumoren konnten das Chemokin CCL22 und regulatorische T-Zellen im Tumor nachgewiesen werden. Um zu überprüfen, ob die murinen Daten auf den Menschen übertragbar sind, wurden Gewebeschnitte von Patienten mit HCC untersucht.

In einer retrospektiven Studie mit humanem HCC Gewebe sollte überprüft werden, ob CCL22 in der Leber, im Tumor und im Tumor-umgebenden Stroma exprimiert wird und inwiefern dies einen Einfluss auf die Anzahl der infiltrierten Tregs im Gewebe hat. Dazu wurden in Formalin-fixierte und in Paraffin-eingebettete (FFPE) HCC Gewebeschnitte von 62 Patienten und einer gesunden Kontrolle auf die Expression von CCL22, FoxP3 und CD8 untersucht. Alle Patienten wurden am Klinikum der Universität München im Zeitraum von 2008-2013 operiert und behandelt (siehe **Tabelle 1**). Die Altersspanne der Patienten umfasste 20 bis 98 Jahre und 85,7% der Patienten waren männlich. Von den Gewebeschnitten entstammten 90,5% dem Primärtumor und entsprachen in 88,9% dem hepatozellulären Karzinom als einziger Tumorentität. 76% der Tumore (48/63) wurden als solitärer Tumor mit oder ohne Gefäßinvasion oder als multiple Tumoren < 5 cm (Tumorstadium pT1 oder pT2) reseziert.

Charakteristika	n/total	%
Alter		
≤ 50	10/63	15,9
≥ 50	48/63	76,2
NA	5/63	7,9
Geschlecht		
Männlich	54/63	85,7
Weiblich	9/63	14,3
Probenherkunft		
Primärtumor	57/63	90,5
Rezidivtumor	4/63	6,3
Metastasen	2/63	3,2
Histologischer Subtyp		
HCC	56/63	88,9
Fibrolamelläres HCC	3/63	4,8
HCC + CCC	2/63	3,2
HCC o. HCC + CCC	1/63	1,6
Klarzelliges HCC	1/63	1,6
Tumorstadium		
pT1	27/63	42,9
pT2	21/63	33,3
pT3	8/63	12,7
pT4	1/63	1,6
NA	6/63	9,5
Lymphknotenstatus		
pN0	17/63	27,0

pN1	2/63	3,2
NA	44/63	69,8
Grading		
G1	11/63	17,4
G2	28/63	44,4
G3	17/63	27,0
NA	7/63	11,1
Tumorresektion		
R0	54/63	85,7
R1	5/63	7,9
NA	4/63	6,3

Tabelle 1: Patientencharakteristika von Patienten mit reseziertem hepatozellulären Karinom.
 Abkürzungen: HCC: hepatozelluläres Karzinom. CCC: Kolorektales Karzinom. NA: *not available*.

Die HCC Gewebeschnitte wurden immunhistochemisch auf CCL22, FoxP3 und CD8 gefärbt. Nach typischen histomorphologischen Kriterien wurden Tumor, Stroma (inkludiert intra- und peritumorales Stroma) und Leber definiert und die positiven Zellen quantifiziert. Die Zellzahl für jede Zellart wurde für jeden Patienten einzeln analysiert und in *heatmaps* dargestellt.

In nahezu allen Schnitten konnten CCL22-exprimierende Zellen nachgewiesen werden. Morphologisch ähnelten die Zellen immunologischen Zellen und wiesen eine typische, zytoplasmatische Färbung auf. Es konnten keine CCL22-positiven Tumorzellen identifiziert werden. CCL22-exprimierende Zellen konnten im tumorumgebenden Stroma in hoher Anzahl nachgewiesen werden (**Abb. 7 A**). Ebenso wie CCL22-exprimierende Zellen waren in den meisten Schnitten CD8⁺ Zellen und FoxP3⁺ Zellen in unterschiedlicher Anzahl nachweisbar. Auch waren die meisten Immunzellen insbesondere im peri- und intratumoralen Stroma und nicht im eigentlichen Tumor nachweisbar. Bei Patienten mit einer hohen intratumoralen Infiltration eines Zelltyps war die Anzahl dieser Zellen auch im Stroma und in gesunder Leber erhöht. Der Mittelwert der Zellzahl für CCL22-exprimierende Zellen (Anzahl der Zellen/10 HPF) lag bei 2 im Tumor, 44 im Stroma und 23 in der Leber (**Abb. 7 C**). Bei regulatorischen T-Zellen waren im Mittelwert 42 im Tumor, 121 im Stroma und 22 in der umgebenden Leber nachweisbar. Die höchsten absoluten Zellzahlen zeigten sich bei CD8⁺ Zellen mit 167 (Tumor), 538 (Stroma) und 423 (Leber). Immunzellen in der peritumoralen Leber waren insbesondere im Bereich von Portalfeldern zu finden. In der gesunden Kontrolle waren in der Leber die absoluten Zellzahlen mit einer Zelle/10 HPF für CCL22, 25 CD8⁺ Zellen/10 HPF und 5 FoxP3⁺ Zellen/10 HPF deutlich niedriger. Zusammenfassend war die Infiltration der Immunzellen und CCL22-exprimierenden Zellen im peri- und intratumoralen Stroma im Vergleich zum Tumor am höchsten.

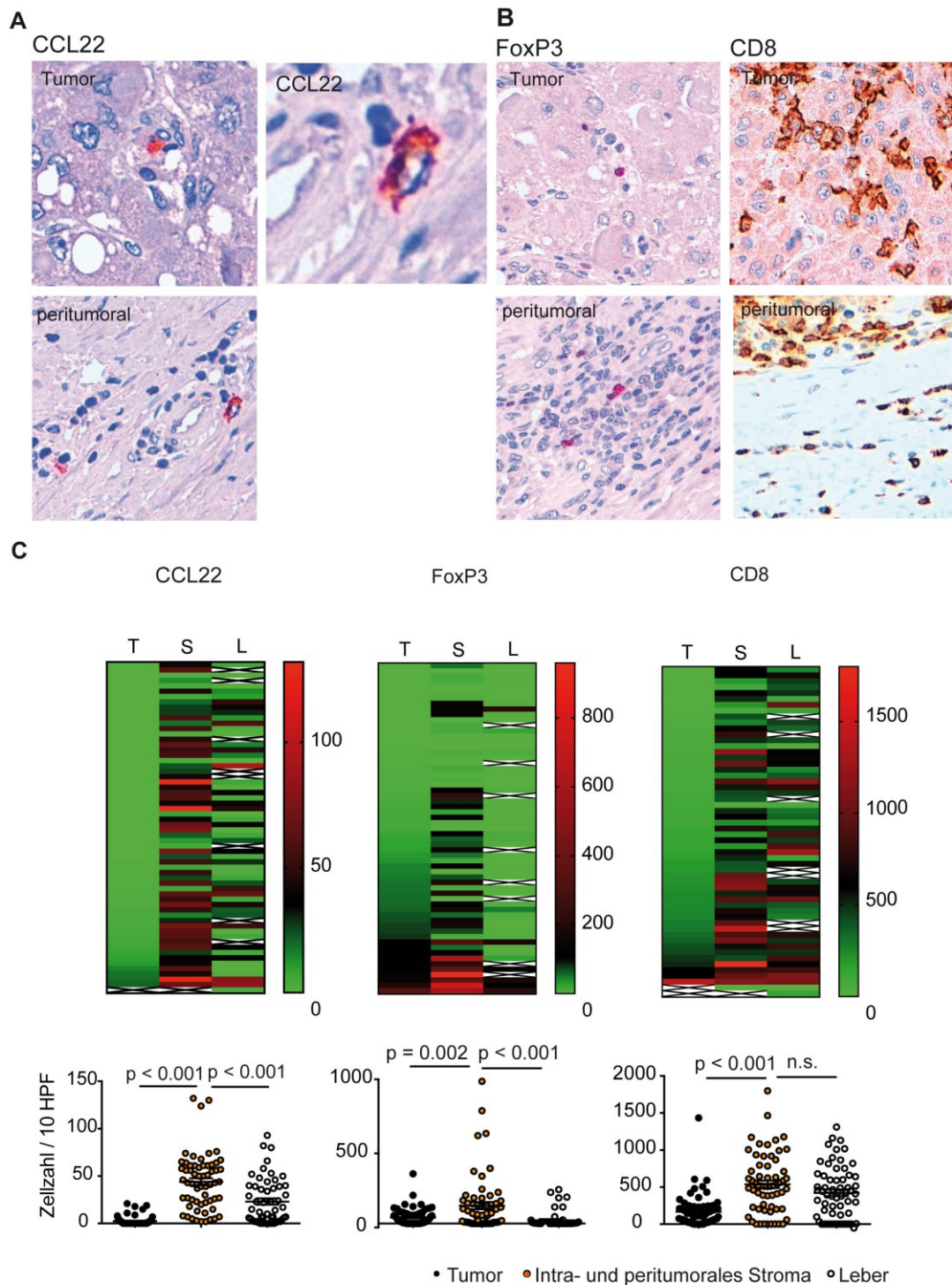


Abb. 7: CCL22-exprimierende Zellen, FoxP3 und CD8+ T-Zellen im HCC. In Formalin-fixierte und Paraffin-eingebettete (FFPE) Gewebeschnitte wurden immunhistochemisch auf CCL22, FoxP3 und CD8 gefärbt und lichtmikroskopisch quantitativ untersucht. Die Bilder wurden in 40-facher Vergrößerung aufgenommen und in Größe und Kontrast mit Adobe Photoshop bearbeitet. **A** CCL22-exprimierende Zellen in Tumor und peritumoralem Stroma. In Vergrößerung ist eine CCL22 positive Zelle gezeigt. **B** CD8- und FoxP3-positive Zellen in Tumor und peritumoralem Stroma. **C** Verteilung der CCL22-exprimierenden Zellen und T-Zellen in *heatmaps* und Punktdiagrammen. Die Gewebeschnitte wurden durchsucht und 10 Hauptgesichtsfelder (HPF) mit hoher Zellinfiltration in 40-facher Vergrößerung ausgezählt. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der positiven Zellen pro 10 HPF. Jede Linie in der *heatmap* stellt einen Patienten dar, bei durchgestrichenen Feldern enthielt der Gewebeschnitt diese Information nicht. Abkürzungen: p: p-Wert, T: Tumor, S: Stroma, L: Leber.

3.3.1 Peritumorales CCL22 korreliert mit der Infiltration von regulatorischen T-Zellen

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die CCL22-exprimierenden Zellen mit FoxP3⁺ T-Zellen in den HCC Gewebeschnitten korrelieren (**Abb. 8**). Dafür wurde die Anzahl der positiven Zellen/10 HPF ausgezählt und mit dem Pearson Korrelationskoeffizienten in Bezug gesetzt. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen intratumoralem CCL22 und der Anzahl der Tregs gezeigt werden. Interessanterweise korrelierten die im peritumoralem Lebergewebe nachweisbaren CCL22-positiven Zellen signifikant mit der Infiltration von regulatorischen T-Zellen im Tumor, Stroma und Lebergewebe.

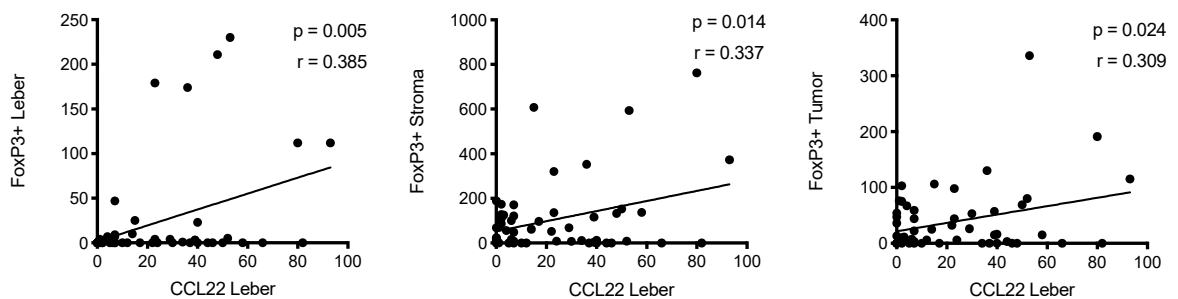


Abb. 8: Korrelation der CCL22-exprimierenden Zellen mit der Infiltration regulatorischer T-Zellen. Dargestellt ist die Anzahl von infiltrierenden regulatorischen T-Zellen (=FoxP3⁺ Zellen) pro 10 Haupt Gesichtsfeldern (HPF) in der Leber, im Tumorstroma und intratumoral in Korrelation mit CCL22-exprimierenden Zellen in der Leber. Die Korrelation wurde mit dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson berechnet. p: p-Wert; r: Korrelationskoeffizient.

4 Diskussion

Es sind zahlreiche Mechanismen bekannt, die maligne Tumore nutzen, um sich der Erkennung und der Bekämpfung durch das Immunsystem zu entziehen. Bei der Bildung eines immunsuppressiven Mikromilieus spielen regulatorische T-Zellen eine wichtige Rolle. Über die Chemokin-Chemokinrezeptor-Achse CCL22-CCR4 können regulatorische T-Zellen in den Tumor migrieren (Curiel, Coukos et al. 2004, Anz, Rapp et al. 2015). In Mäusen konnte die CCL22 vermittelte Migration von Tregs in den Tumor in einem Lungenkarzinom-Modell gezeigt werden (Mailloux and Young 2009). Im Menschen wurden erhöhte CCL22 Level in vielen malignen Tumoren, wie u.a. im Ovarialkarzinom (Curiel, Coukos et al. 2004) und Mammakarzinom (Gobert, Treilleux et al. 2009, Faget, Biota et al. 2011) beschrieben. Für mehrere Tumorentitäten, wie das Mammakarzinom, das Magenkarzinom oder das Plattenepithelkarzinom der Zunge, konnte CCL22 als negativer prognostischer Faktor identifiziert werden (Li, Liu et al. 2013, Wu, He et al. 2018, Kimura, Nanbu et al. 2019).

4.1 Induktion von CCL22 in Immunzellen durch HCC-Tumorzelllinien

Über die Mechanismen der CCL22 Induktion im Tumorgewebe ist bisher wenig bekannt. Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe konnten die Induktion von CCL22 in Immunzellen durch verschiedene murine Tumorzellen (Melanom-, Mammakarzinom-, Pankreaskarzinom-, Kolonkarzinom- und Lymphomzellen) und humane Tumorzellen (Pankreaskarzinom-, Melanom-, Mammakarzinom- und Ovarialkarzinomzellen) zeigen. Die Induktion von CCL22 wurde in der Kokultur von Tumor- und Immunzellen als auch in der Kultur von Immunzellen mit zellfreien Tumorzellüberständen gesehen (Wiedemann 2014). In dieser Arbeit konnte erstmalig die Induktion von CCL22 in Immunzellen durch hepatozelluläre Karzinomzellen nachgewiesen werden (siehe **Abb. 2**). In murinen Hepa1-6 Zellen konnte eine Induktion sowohl in der Kokultur mit murinen Splenozyten, als auch mit zellfreien Überständen gezeigt werden (siehe **Abb. 2 B+C**). Auch in den humanen HCC-Zelllinien Hep3B und HepG2 konnte man in der Kokultur eine Hochregulation von CCL22 in PBMCs sehen (siehe **Abb. 2 B**). Keine der Tumorzelllinien produzierte CCL22 *in vitro*.

In der Literatur werden verschieden Zellarten als Quelle für tumor-assoziiertes CCL22 angegeben. Im Mammakarzinom konnten Tumorzellen als CCL22 produzierende Zellen

identifiziert werden (Faget, Biota et al. 2011, Li, Liu et al. 2013). Neuere Studien zeigen jedoch, dass Immunzellen, wie dendritische Zellen, Makrophagen und Monozyten die Hauptquelle für CCL22 sind (Mailloux, Clark et al. 2010, Anz, Rapp et al. 2015, Sun, Sun et al. 2016, Wiedemann, Knott et al. 2016). Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit, in der ebenfalls Immunzellen und nicht Tumorzellen als Quelle von CCL22 zu identifizieren waren (siehe **Abb.2 C**).

Die Hochregulation von CCL22 war auch durch zellfreie Tumorzellüberstände zu induzieren. Diese Induktion ist eine Zellkontakt-unabhängige Stimulation der Expression von CCL22 in Immunzellen durch Tumorzellen. Die Tumorzellen müssen einen löslichen Faktor bilden, der zu einer Hochregulation von CCL22 in Immunzellen führt. Als lösliche Faktoren, die zu einer CCL22 Induktion bei Tumorerkrankungen führen, findet man in der Literatur IL-27, das CCL22 in tumor-assoziierten dendritischen Zellen (Xia, Wei et al. 2014) und TGF- β , das CCL22 in myeloiden dendritischen Zellen induziert (Hanks, Holtzhausen et al. 2013).

Durch unsere Arbeitsgruppe konnte, durch humane Tumorzellen gebildetes, IL-1 als CCL22 Induktor in Immunzellen identifiziert werden (Wiedemann, Knott et al. 2016). Zudem zeigen Daten unserer Arbeitsgruppe, dass die humane HCC-Zelllinie Hep3B auf mRNA Level IL-1 exprimiert (Wiedemann, Knott et al. 2016). Daher ist es möglich, dass die Induktion von CCL22 in PBMCs durch Hep3B auf IL-1 zurückzuführen ist.

Die humane HCC-Zelllinie HepG2 induzierte ebenfalls CCL22 in PBMCs, jedoch nicht statistisch signifikant (siehe **Abb. 2 B**). IL-1 Expression durch HepG2-Zellen mittels RT-PCR konnte nach Stonāns et al. nicht detektiert werden (Stonāns, Stonāne et al. 1999). Interessanterweise konnten Gutierrez-Ruiz et al. zeigen, dass die Inkubation von HepG2 Zellen mit Ethanol oder Acetaldehyd zu einer Induktion von IL-1 Expression führte (Gutierrez-Ruiz, Gomez Quiroz et al. 2001). Die HCC Zelllinie Huh7 induzierte in der vorliegenden Arbeit kein CCL22 in PBMCs (siehe **Abb. 2 B**). Auch in der Literatur konnte kein Hinweis auf eine Expression von IL-1 durch Huh7 gefunden werden.

Im murinen Modell konnte sowohl in der Kokultur als auch mit Überständen eine Induktion von CCL22 in Splenozyten gesehen werden. Interessanterweise exprimieren Hepa1-6 Zellen jedoch kein IL-1 (Wiedemann, Knott et al. 2016). Nachfolgende Arbeiten in der Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass der CCL22 Gehalt im Tumor durch eine IL-1 Blockade mittels des humanen IL-1-Rezeptorantagonisten Anakinra unverändert blieb. Auch hatte die IL-1 Blockade keinen Effekt auf das Tumorstadium im Hepa1-6 Tumormodell (Vetter 2020). Es müssen daher im murinen Modell noch andere Faktoren

für eine Hochregulation von CCL22 durch Tumorzellen verantwortlich sein.

Die selektive Blockade der Induktion von CCL22 durch Tumorzellen stellt ein attraktives Ziel in der immunologischen Tumorthherapie dar. In den humanen HCC-Zelllinien könnte IL-1 der entscheidende Faktor sein, der zur Hochregulation von CCL22 führt. Mit Anakinra steht ein potenzieller humaner Antikörper gegen IL-1 zur Verfügung. Weitere Untersuchungen müssen klären, inwiefern der Einsatz von Anakinra zu einer Inhibition der CCL22 Hochregulation und damit möglicherweise verminderten Migration von regulatorischen T-Zellen in das humane hepatozelluläre Karzinom führt.

4.2 CCL22 Überexpression führt nicht zu einer vermehrten Migration von regulatorischen T-Zellen im Hepa1-6 Tumormodell

Im hepatozellulären Karzinom haben regulatorische T-Zellen eine Schlüsselrolle bei der Etablierung eines immunsuppressiven Mikromilieus (Huang, Wang et al. 2012, Lin, Chen et al. 2013, Tu, Ding et al. 2016). Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass die Anzahl der infiltrierenden Tregs direkt mit der Prognose von HCC Patienten korrelieren (Huang, Wang et al. 2012, Tu, Ding et al. 2016). Die spezifische Migration von Tregs auf das Chemokin CCL22 konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden (Curiel, Coukos et al. 2004, Anz, Rapp et al. 2015).

In dieser Arbeit konnte CCL22 in Tumoren der murinen HCC Zelllinie Hepa 1-6 nachgewiesen werden. Ebenso wurde eine Infiltration von regulatorischen T-Zellen in Hepa1-6 Tumoren gesehen (siehe **Abb. 4**). Ein wesentlicher Aspekt dieser Arbeit war zu untersuchen, ob die Überexpression von CCL22 durch einen konstitutiv aktiven Promoter zu einer vermehrten Migration von regulatorischen T-Zellen in den Tumor und einem verringerten Tumorwachstum führen würde.

Obwohl *in vitro* und *in vivo* auf Proteinebene durch erfolgreiche virale Transduktion höhere CCL22 Expression in der Hepa 1-6 PMX-CCL22-Zelllinie und im PMX-CCL22 Tumorgewebe nachweisbar waren (siehe **Abb. 5**), konnte keine vermehrte Migration von regulatorischen T-Zellen in die CCL22 überexprimierenden Hepa1-6 Tumoren nachgewiesen werden (siehe **Abb. 6, D+G**). Bereits in Vorarbeiten anderer Gruppen wurde im Hepa1-6 Modell *in vivo* intratumorale CCL22 Expression nachgewiesen (Yang, Li et al. 2012). In Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe war der CCL22 Gehalt verschiedener muriner Tumore untersucht worden. Die Hepa 1-6 Tumore hatten im Vergleich zu den vorher untersuchten Tumoren den zweithöchsten CCL22 Gehalt

(Wiedemann 2014). Eine mögliche Hypothese für die unveränderte Migration von Tregs in das Tumorgewebe im CCL22-Überexpressionsmodell ist, dass die gesteigerte CCL22 Konzentration bei bereits hohem CCL22 Level im Wildtyp-Tumor keinen zusätzlichen Anreiz zur Migration entlang des Chemokingradienten darstellt.

In der Literatur mehren sich Hinweise, dass nicht nur die Chemokinachse CCL22-CCR4 für die Migration von Tregs verantwortlich ist, sondern auch andere Chemokine und ihre korrespondierenden Rezeptoren eine Rolle spielen. Es konnte eine höhere HCC-Rezidivrate nach Lebertransplantation über die Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen über die Chemokinachse CXCL10/CXCR3 gezeigt werden (Li, Ling et al. 2016). Das Chemokin CXCL12 und der korrespondierende Rezeptor CXCR4 sind im Blut von HCC Patienten signifikant erhöht und mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Außerdem konnte eine Korrelation zwischen CXCL12 und der Infiltration von Tregs gezeigt werden (Wang, Gao et al. 2021). Ebenso beschreiben Chen et al. eine selektive Rekrutierung von Tregs via CCL20-CCR6-Achse in das hepatozelluläre Karzinom (Chen, Lin et al. 2011). Sie zeigen eine vermehrte Expression von CCL20 auf mRNA- und Proteinebene in HCC Tumoren und eine signifikante Korrelation mit der Infiltration von regulatorischen T-Zellen. Zirkulierende regulatorische T-Zellen von HCC Patienten zeigten eine vermehrte Expression von CCR6 und migrierten *in vitro* verstärkt zu rekombinantem CCL20 im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Interessanterweise konnten Chen et al. CCR4, der Rezeptor für CCL22, nicht vermehrt auf PBMCs von HCC Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachweisen. Es zeigte sich *in vitro* auch keine Migration zu CCL22 (Chen, Lin et al. 2011). Neben den verschiedenen Chemokinachsen als Anreiz zur Migration von regulatorischen T-Zellen, können regulatorische T-Zellen auch im Gewebe selbst durch Faktoren wie TGF- β induziert werden (Fu, Zhang et al. 2004). Mögliche Erklärungsansätze für die gleichbleibende Anzahl von Tregs in den Wildtyp Hepa1-6 Tumoren im Vergleich zum CCL22-Überexpressionsmodell sind daher zum einen der Einfluss anderer Chemokine und zum anderen die Induktion von regulatorischen T-Zellen im Tumor selbst.

Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe hatten ein beschleunigtes Tumorwachstum bei systemisch erhöhten CCL22 Leveln nachgewiesen (Wiedemann 2014). Mit der Tumorzelllinie CT26 wurden Mäusen subkutan Tumore gesetzt, die einen im Vergleich zu Tumoren anderer Zelllinien niedrigeren CCL22 Gehalt aufweisen. Alle 48h erfolgten subkutane Injektionen mit rekombinantem CCL22. Die Tumore in den Mäusen mit

erhöhten CCL22 Leveln zeigten einen deutlichen Wachstumsvorteil (Wiedemann 2014). Ebenso konnte in einem induzierbaren CCL22 Überexpressionsmodell ein Wachstumsvorteil für Tumore mit höherem CCL22 Gehalt gezeigt werden (Rapp 2013). Die Überexpression von CCL22 in den transduzierten Hepa1-6 Tumoren führte in dieser Arbeit nicht zu einem beschleunigten Tumorwachstum. Diese Daten stehen in Widerspruch zu den von Yang et al. publizierten Daten, die in CCL22-überexprimierenden Hepa1-6 Tumoren ein vermehrtes Tumorwachstum und eine erhöhte Infiltration von regulatorischen T-Zellen zeigten (Yang, Li et al. 2012).

Dieser Widerspruch könnte mit einer erhöhten Immunogenität, der von uns verwendeten transduzierten Zelllinie zusammenhängen. Dafür spricht, dass die Anzahl der infiltrierenden CD3⁺ T-Zellen im Tumor der transduzierten Zelllinie im Vergleich zu den Hepa1-6 wt Tumoren signifikant erhöht war (siehe **Abb. 6 B+E**). Auch zeigten sich mehr infiltrierende CD8⁺ T-Zellen in den transduzierten Tumoren, dies war jedoch nicht statistisch signifikant (siehe **Abb. 6 C+F**).

Es ist bekannt, dass adenovirale Vektoren eine starke Immunantwort auslösen können, wenn diese direkt in den Organismus gegeben werden. Das Immunsystem reagiert jedoch nicht ausschließlich nur auf Virusbestandteile, sondern eliminiert auch transgene Zellen. Dies ist am ehesten auf Neoantigene durch das Einbringen veränderten genetischen Materials zurückzuführen (Yuasa, Sakamoto et al. 2002). Dieser Effekt ist nicht auf adenovirale Vektoren beschränkt, sondern wurde ebenfalls für retrovirale Vektoren gezeigt. So beschreiben Lamers et al. eine zelluläre und humorale Immunantwort in immunkompetenten Menschen gegen retrovirale Epitope auf *ex vivo* transduzierten T-Zellen (Lamers, Willemsen et al. 2011). In der Literatur finden sich keine Angaben zu einer erhöhten Immunogenität des in dieser Arbeit verwendeten retroviralen PMX-Puro-Vektors. Eine direkte Immunantwort gegen Bestandteile der Virushülle ist sicher auszuschließen, weil nur gereinigte transduzierte Tumorzellen in die Maus gegeben wurden. Unklar bleibt, ob die adaptive zelluläre Immunantwort, die wir mit der erhöhten Infiltration von CD3⁺ Zellen und CD8⁺ T-Zellen in den transduzierten Tumoren nachweisen konnten, auf virale Epitope oder Neoantigene der transgenen Zellen zurückzuführen ist. In den letzten Jahren konnte ein neues Hepa 1-6 Tumormodell mit orthotopen Hepa 1-6 Tumoren und Fähigkeit zur Metastasierung (durch Tumorzellinjektion in die Leber oder Tumorgewebeimplantation in die Leber) etabliert werden (Rao, You et al. 2016). In einem orthotopen Hepa 1-6 Modell konnten Gao et al. zeigen, dass die Mehrheit der Tumor-infiltrierenden regulatorischen T-Zellen CCR4, den

Chemokinerezeptor von CCL22, exprimierten und die Therapie mit einem CCR4-Antikörper zu einer reduzierten Infiltration von Tregs und reduziertem Tumorwachstum führte (Gao, You et al. 2022). Im Hinblick auf das immunsuppressive Mikromilieu der Leber und das die physiologischen Verhältnisse besser widerspiegelnde orthotope Modell, könnte es interessant sein zu untersuchen, ob mit unserer transduzierten Zelllinie PMX-CCL22 eine andere Ausprägung der Infiltration von regulatorischen T-Zellen sowie ein anderes Wachstumsverhalten der Tumore zu beobachten wären.

Es sind weitere Studien notwendig, um die Migration von regulatorischen T-Zellen und CCL22 in das hepatozelluläre Karzinom besser zu verstehen. Curiel et al. beschrieben nach dem Einsatz von Antikörpern gegen CCL22 eine reduzierte Infiltration von regulatorischen T-Zellen im murinen Ovarialkarzinom. Um die funktionelle Relevanz von CCL22 für die Migration von regulatorischen T-Zellen im Hepa1-6 Tumormodell besser aufzuschlüsseln, könnte die Blockade von CCL22 durch Antikörper, sowie die Nutzung eines orthotopen Hepa1-6 Tumormodells ein möglicher Ansatz sein. Eine erste klinische Studie mit dem rekombinanten humanisierten Antikörper Mogamulizumab, der selektiv CCR4 bindet, zeigte in Kombination mit Nivolumab ein gutes Ansprechen bei HCC Patienten, jedoch ging die Therapie mit einer deutlichen Lymphopenie einher (Doi, Muro et al. 2019). Die selektive Blockade von CCL22 könnte daher ein vielversprechender Ansatz einer Immuntherapie bei HCC Patienten mit potenziell weniger Nebenwirkungen sein.

4.3 CCL22-exprimierende Zellen und FoxP3⁺ Zellen sind in Tumor und Stroma von HCC Patienten nachweisbar

Um die Rolle von CCL22 im Zusammenhang mit der Migration von regulatorischen T-Zellen im humanen Hepatozellulären Karzinom besser zu verstehen, wurden retrospektiv Gewebeschnitte von 62 Patienten mit HCC im Hinblick auf die Expression von CCL22, CD8 und FoxP3 untersucht. In der Literatur war ein Zusammenhang zwischen der Infiltration von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen und immunsuppressiven, regulatorischen T-Zellen mit Überleben und Prognose von HCC Patienten beschrieben worden (Fu, Xu et al. 2007).

Es zeigte sich eine deutliche Infiltration von CCL22-exprimierenden Zellen im Tumor-umgebenden Stroma und im Lebergewebe der HCC Patienten (siehe **Abb. 7**). Die CCL22-exprimierenden Zellen waren morphologisch myeloischen Ursprungs, Monozyten oder dendritische Zellen. Ursprünglich wurden Tumorzellen als die

Hauptquelle von CCL22 angesehen. Diese Annahme fundierte hauptsächlich auf einer Studie im Mammakarzinom (Faget, Biota et al. 2011). Andere Studien konnten sowohl für das Mammakarzinom als auch andere Tumorentitäten myeloide Zellen als Hauptquelle für CCL22 identifizieren (Anz, Eiber et al. 2011, Anz, Rapp et al. 2015, Wiedemann, Knott et al. 2016). Diese Erkenntnisse decken sich mit den Ergebnissen dieser Studie im HCC, bei der wir zeigten, dass myeloid-geformte Zellen und nicht Tumorzellen CCL22⁺ waren (Wiedemann, Röhrle et al. 2019).

In dieser Untersuchung waren die CCL22-exprimierenden Zellen, als auch die Immunzellen (FoxP3⁺ Zellen, CD8⁺ Zellen) hauptsächlich im tumorumgebenden Stroma und nicht im Tumorepithel selbst lokalisiert (siehe **Abb. 7**). Ebenso waren in der Leber deutlich mehr CCL22⁺ Zellen und CD8⁺ Zellen als im Tumor nachweisbar. Diese Daten stehen im Kontrast zu Gao et al., die eine deutlich höhere intratumorale als peritumorale CCL22-Expression in Hepatitis B-assoziierten HCC Tumoren nachweisen konnten (Gao, Fan et al. 2020). Eine mögliche Erklärung ist, dass Gao et al. ausschließlich in Hepatitis B-assoziierten Tumoren CCL22 nachweisen konnte und in unserer Studie nicht nach Ursachen des HCCs differenziert wurde. Außerdem fand der CCL22 Nachweis, im Gegensatz zu unserer Studie, ausschließlich auf Transkriptionsebene und nicht auf Proteinebene (Western Blot/Immunhistochemie) statt. In der Literatur finden sich mehrere Studien, die eine höhere Immunzellinfiltration im peritumoralen Gewebe beschreiben als im Tumor selbst (Bell, Chomarat et al. 1999, Kuang, Zhao et al. 2011). Bell et al. vermuten, dass beim Mammakarzinom in peritumoralen Stromaarealen wichtige immunologische Vorgänge, wie das *Priming* von T-Zellen durch reife dendritische Zellen, stattfinden (Bell, Chomarat et al. 1999). Auch Foerster et al. konnten eine Hochregulierung von Signalwegen, die für die Kommunikation zwischen angeborenen und adaptiven Zellen des Immunsystems im peritumoralen HCC Gewebe verantwortlich sind, nachweisen (Foerster, Hess et al. 2018). Diese Beobachtung könnte erklären, dass wir deutlich mehr Immunzellen im peritumoralen Stroma und Lebergewebe nachweisen konnten als im Tumorgewebe selbst.

In unserer Patientenkohorte korrelierte die Anzahl von CCL22-exprimierenden Zellen im peritumoralen Lebergewebe und Stroma positiv mit den infiltrierenden FoxP3⁺ Zellen im Tumor, Stroma und Lebergewebe (siehe **Abb. 8**). Wie bereits veröffentlicht, kann durch Tumorzellen sezerniertes IL-1 zu einer peritumoralen Anreicherung von CCL22-positiven Zellen führen (Wiedemann, Knott et al. 2016). Dies oder ein ähnlicher, parakriner Mechanismus wie die Induktion durch IL-27 (Xia, Wei et al. 2014) oder

TGF- β (Hanks, Holtzhausen et al. 2013) könnte die positive Korrelation zwischen CCL22-exprimierenden Zellen und regulatorischen T-Zellen erklären.

Für mehrere Tumorentitäten, wie das Vulvakarzinom und das maligne Melanom, konnte eine prognostische Relevanz der peritumoralen Immuzellinfiltration, insbesondere der Tregs und CD8⁺ T-Zellen, gezeigt werden (Chłopik, Selim et al. 2018, Sabbatino, Scognamiglio et al. 2020). In dieser Kohorte zeigte sich jedoch kein Zusammenhang zwischen Chemokinexpression oder Immuzellinfiltration und dem rezidivfreien Überleben oder Gesamtüberleben (Wiedemann, Röhrle et al. 2019). Dies steht im Widerspruch zu vielen Studien, in denen ein direkter Zusammenhang zwischen Treg- und zytotoxischer T-Zell (CD8⁺ Zellen)-Infiltration und der Prognose von HCC Patienten gezeigt werden konnte (Fu, Xu et al. 2007). Ebenso ist eine Korrelation von peritumorale CCL22 Expression mit kürzerem rezidivfreien Überleben und Gesamtüberleben beschrieben (Yeung, Lo et al. 2015). Yeung et al. messen jedoch lediglich CCL22 auf Transkriptionsebene. Es wurde keine immunhistochemische Untersuchung der Infiltration durch CCL22-exprimierende Zellen durchgeführt. Mögliche Ursachen dafür, dass wir keinen Effekt nachweisen konnten, könnte die zu kleine Patientenkohorte sein. Außerdem wurde in unserer Kohorte die Ursache des HCCs und der Grad der Leberzirrhose nicht näher differenziert. So ist beschrieben, dass sich die Infiltration von Immuzellen in Bezug auf die Ursache des HCCs deutlich unterscheiden kann: In HCCs auf Boden einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NAFLD) kommt es zu einem selektiven Verlust von CD4⁺ Zellen (Ma, Kesarwala et al. 2016), während es in HCC Tumoren, denen eine Hepatitis B zugrunde liegt, zu einer Akkumulation von CD4⁺ Zellen kommt (Gao, Fan et al. 2020). Insbesondere die Infiltration von Tregs ist höher und eine korrespondierende deutliche Reduktion in CD8⁺ T-Zellen ist bei Hepatitis B-positiven Tumoren nachweisbar (Gao, You et al. 2021). Die hohe Anzahl von Immuzellen im peritumoralen Stroma und Lebergewebe, sowie die positive Korrelation von CCL22-exprimierenden Zellen mit Tregs, könnten Hinweise dafür sein, dass das *Tumormicroenvironment* über die Grenzen des Tumors hinausreicht. Dennoch sind weitere Untersuchungen notwendig, um zu differenzieren, ob das Phänomen auf den Tumor oder die zugrundeliegende Leberzirrhose und Inflammation zurückzuführen ist (Wiedemann, Röhrle et al. 2019).

Zusammenfassend sind weitere Studien notwendig, um die prognostische Relevanz von peri- und intratumoraler CCL22 Sekretion zu verstehen. Insbesondere im Hinblick auf Ätiologie und den Grad der zugrunde liegenden Leberzirrhose im HCC und der damit

einhergehenden Inflammationsreaktion ist CCL22 sehr interessant. Ein größeres Patientenkollektiv wäre wünschenswert, um die genaue Rolle von CCL22 in den verschiedenen Ursachen des HCCs zu differenzieren und um den Einfluss von CCL22 auf Tumorstadium, Metastasierungstendenz, rezidivfreies Überleben und Mortalität zu identifizieren.

5 Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist weltweit der sechsthäufigste Tumor und ist mit einer 5-Jahresüberlebenschance von 18% der zweittödlichste Tumor. Im HCC spielt die Inflammation und Rekrutierung von Immunzellen in das Tumorgewebe eine elementare Rolle in der Pathogenese. Ein Mechanismus der Entrinnung des Tumors vor dem Immunsystem stellt die Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen (Tregs) in das Tumorgewebe dar. Im HCC wurde eine hohe Infiltration von Tregs im Tumorgewebe als negativer prognostischer Marker beschrieben. Für viele Tumorentitäten konnte gezeigt werden, dass das Chemokin CCL22 zu einer Migration von Tregs in das Tumorgewebe führt. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob CCL22 in HCC Gewebe nachweisbar ist, welche Zellen CCL22 bilden und ob es durch eine vermehrte CCL22 Expression zu einer verstärkten Migration von regulatorischen T-Zellen in den Tumor kommt.

Im ersten Abschnitt wurde untersucht, ob CCL22 durch HCC Zelllinien gebildet wird. Es konnte *in vitro* kein CCL22 in Tumorzellüberständen nachgewiesen werden. Um die Bildung und Induktion von CCL22 näher zu verstehen, wurden Kokulturen aus HCC Tumorzelllinien oder aus deren Kulturüberständen mit Immunzellen durchgeführt. Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die Tumorzellen als auch deren zellfreie Überstände zu einer starken Induktion von CCL22 in Immunzellen *in vitro* führen.

Im nächsten Teil konnte gezeigt werden, dass CCL22 in murinen HCC Tumoren (Hepal-6 Tumormodell) *in vivo* nachweisbar ist und zahlreiche Tregs den Tumor infiltrieren. Um den Einfluss von CCL22 auf die Migration von Tregs näher zu untersuchen, wurde mittels lentiviraler Transduktion einer murinen HCC Zelllinie (Hepal-6) mit CCL22-Überexpression geschaffen. Die CCL22 Überexpression hatte jedoch keinen Einfluss auf die Infiltration durch Tregs und das Tumorwachstum.

Zudem wurden humane HCC Gewebeschnitte auf die Expression von CCL22, FoxP3 und CD8 hin untersucht. Es konnte eine deutliche Infiltration von CCL22-exprimierenden Zellen insbesondere im peritumoralem Stroma und Lebergewebe nachgewiesen werden. Das peritumorale CCL22 korrelierte positiv mit den infiltrierenden Tregs.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass CCL22 im murinen und

humanen HCC nachweisbar ist und nicht durch Tumorzellen, sondern durch Immunzellen gebildet wird. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Bildung von CCL22 in Tumor-infiltrierenden Immunzellen durch HCC Tumorzellen induziert wird und dass die Anzahl der infiltrierenden Tregs in humanen Tumoren mit der CCL22 Expression korreliert. Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen zu dem Verständnis des Tumormikromilieus im HCC bei und identifizieren CCL22 als mögliche Zielstruktur für potenzielle Immuntherapien.

6 Literaturverzeichnis

- Anz, D., S. Eiber, C. Scholz, S. Endres, T. Kirchner, C. Bourquin and D. Mayr (2011). "In breast cancer, a high ratio of tumour-infiltrating intraepithelial CD8+ to FoxP3+ cells is characteristic for the medullary subtype." Histopathology **59**(5): 965-974.
unbedingt Abstände
- Anz, D., M. Rapp, S. Eiber, V. H. Koelzer, R. Thaler, S. Haubner, M. Knott, S. Nagel, M. Golic, G. M. Wiedemann, F. Bauernfeind, C. Wurzenberger, V. Hornung, C. Scholz, D. Mayr, S. Rothenfusser, S. Endres and C. Bourquin (2015). "Suppression of intratumoral CCL22 by type I interferon inhibits migration of regulatory T cells and blocks cancer progression." Cancer Res **75**(21): 4483-4493.
- Bell, D., P. Chomarat, D. Broyles, G. Netto, G. M. Harb, S. Lebecque, J. Valladeau, J. Davoust, K. A. Palucka and J. Banchereau (1999). "In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas." J Exp Med **190**(10): 1417-1426.
- Bennett, C. L., J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, T. E. Kelly, F. T. Saulsbury, P. F. Chance and H. D. Ochs (2001). "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3." Nat Genet **27**(1): 20-21.
- Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paepfer, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler and F. Ramsdell (2001). "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." Nat Genet **27**(1): 68-73.
- Buonaguro, L., A. Mauriello, B. Cavalluzzo, A. Petrizzo and M. Tagliamonte (2019). "Immunotherapy in hepatocellular carcinoma." Ann Hepatol **18**(2): 291-297.
- Burnet, F. M. (1967). "Immunological aspects of malignant disease." Lancet **1**(7501): 1171-1174.
- Cao, X., S. F. Cai, T. A. Fehniger, J. Song, L. I. Collins, D. R. Piwnica-Worms and T. J. Ley (2007). "Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance." Immunity **27**(4): 635-646.
- Carambia, A., C. Frenzel, O. T. Bruns, D. Schwinge, R. Reimer, H. Hohenberg, S. Huber, G. Tiegs, C. Schramm, A. W. Lohse and J. Herkel (2013). "Inhibition of inflammatory CD4 T cell activity by murine liver sinusoidal endothelial cells." J Hepatol **58**(1): 112-118.
- Carambia, A., B. Freund, D. Schwinge, M. Heine, A. Laschtowitz, S. Huber, D. C. Wraith, T. Korn, C. Schramm, A. W. Lohse, J. Heeren and J. Herkel (2014). "TGF- β -dependent induction of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs by liver sinusoidal endothelial cells." J Hepatol **61**(3): 594-599.
- Chen, K. J., S. Z. Lin, L. Zhou, H. Y. Xie, W. H. Zhou, A. Taki-Eldin and S. S. Zheng (2011). "Selective recruitment of regulatory T cell through CCR6-CCL20 in

hepatocellular carcinoma fosters tumor progression and predicts poor prognosis." PLoS One **6**(9): e24671.

Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady and S. M. Wahl (2003). "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." J Exp Med **198**(12): 1875-1886.

Chłopik, A., M. A. Selim, Y. Peng, C. L. Wu, G. Tell-Marti, K. M. Paral, S. C. Shalin, S. Kraft, C. K. Hsu, C. R. Shea, S. Puig, M. T. Fernandez-Figueras, W. Biernat, J. Ryś, A. Marszałek and M. P. Hoang (2018). "Prognostic role of tumoral PDL1 expression and peritumoral FoxP3+ lymphocytes in vulvar melanomas." Hum Pathol **73**: 176-183.

Collison, L. W., C. J. Workman, T. T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K. M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R. S. Blumberg and D. A. Vignali (2007). "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." Nature **450**(7169): 566-569.

Curiel, T. J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J. R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M. L. Disis, K. L. Knutson, L. Chen and W. Zou (2004). "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival." Nat Med **10**(9): 942-949.

de la Rosa, M., S. Rutz, H. Dorninger and A. Scheffold (2004). "Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function." Eur J Immunol **34**(9): 2480-2488.

Diehl, L., A. Schurich, R. Grochtmann, S. Hegenbarth, L. Chen and P. A. Knolle (2008). "Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8+ T cell tolerance." Hepatology **47**(1): 296-305.

Doi, T., K. Muro, H. Ishii, T. Kato, T. Tsushima, M. Takenoyama, S. Oizumi, K. Gemmoto, H. Suna, K. Enokitani, T. Kawakami, H. Nishikawa and N. Yamamoto (2019). "A Phase I Study of the Anti-CC Chemokine Receptor 4 Antibody, Mogamulizumab, in Combination with Nivolumab in Patients with Advanced or Metastatic Solid Tumors." Clin Cancer Res **25**(22): 6614-6622.

Dou, L., Y. Ono, Y. F. Chen, A. W. Thomson and X. P. Chen (2018). "Hepatic Dendritic Cells, the Tolerogenic Liver Environment, and Liver Disease." Semin Liver Dis **38**(2): 170-180.

Dunn, G. P., A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old and R. D. Schreiber (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." Nat Immunol **3**(11): 991-998.

Dyson, J., B. Jaques, D. Chattopadhyay, R. Lochan, J. Graham, D. Das, T. Aslam, I. Patanwala, S. Gaggar, M. Cole, K. Sumpter, S. Stewart, J. Rose, M. Hudson, D. Manas and H. L. Reeves (2014). "Hepatocellular cancer: the impact of obesity, type 2 diabetes and a multidisciplinary team." J Hepatol **60**(1): 110-117.

Ehrlich, P. (1908). "Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung." 73-290.

- El-Khoueiry, A. B., B. Sangro, T. Yau, T. S. Crocenzi, M. Kudo, C. Hsu, T. Y. Kim, S. P. Choo, J. Trojan, T. H. R. Welling, T. Meyer, Y. K. Kang, W. Yeo, A. Chopra, J. Anderson, C. Dela Cruz, L. Lang, J. Neely, H. Tang, H. B. Dastani and I. Melero (2017). "Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial." Lancet **389**(10088): 2492-2502.
- El-Serag, H. B. (2012). "Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma." Gastroenterology **142**(6): 1264-1273 e1261.
- Faget, J., C. Biota, T. Bachelot, M. Gobert, I. Treilleux, N. Goutagny, I. Durand, S. Léon-Goddard, J. Y. Blay, C. Caux and C. Ménétrier-Caux (2011). "Early detection of tumor cells by innate immune cells leads to T(reg) recruitment through CCL22 production by tumor cells." Cancer Res **71**(19): 6143-6152.
- Finn, R. S., S. Qin, M. Ikeda, P. R. Galle, M. Ducreux, T. Y. Kim, M. Kudo, V. Breder, P. Merle, A. O. Kaseb, D. Li, W. Verret, D. Z. Xu, S. Hernandez, J. Liu, C. Huang, S. Mulla, Y. Wang, H. Y. Lim, A. X. Zhu, A. L. Cheng and I. M. Investigators (2020). "Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma." N Engl J Med **382**(20): 1894-1905.
- Flecken, T., N. Schmidt, S. Hild, E. Gostick, O. Drogwitz, R. Zeiser, P. Schemmer, H. Bruns, T. Eiermann, D. A. Price, H. E. Blum, C. Neumann-Haefelin and R. Thimme (2014). "Immunodominance and functional alterations of tumor-associated antigen-specific CD8+ T-cell responses in hepatocellular carcinoma." Hepatology **59**(4): 1415-1426.
- Foerster, F., M. Hess, A. Gerhold-Ay, J. U. Marquardt, D. Becker, P. R. Galle, D. Schuppan, H. Binder and E. Bockamp (2018). "The immune contexture of hepatocellular carcinoma predicts clinical outcome." Sci Rep **8**(1): 5351.
- Forner, A., M. Reig and J. Bruix (2018). "Hepatocellular carcinoma." Lancet **391**(10127): 1301-1314.
- Fu, J., D. Xu, Z. Liu, M. Shi, P. Zhao, B. Fu, Z. Zhang, H. Yang, H. Zhang, C. Zhou, J. Yao, L. Jin, H. Wang, Y. Yang, Y. X. Fu and F. S. Wang (2007). "Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients." Gastroenterology **132**(7): 2328-2339.
- Fu, S., N. Zhang, A. C. Yopp, D. Chen, M. Mao, D. Chen, H. Zhang, Y. Ding and J. S. Bromberg (2004). "TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors." Am J Transplant **4**(10): 1614-1627.
- Ganne-Carrie, N. and P. Nahon (2019). "Hepatocellular carcinoma in the setting of alcohol-related liver disease." J Hepatol **70**(2): 284-293.
- Gao, Y., X. Fan, N. Li, C. Du, B. Yang, W. Qin, J. Fu, G. J. Markowitz, H. Wang, J. Ma, S. Cheng and P. Yang (2020). "CCL22 signaling contributes to sorafenib resistance in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma." Pharmacol Res **157**: 104800.

Gao, Y., M. You, J. Fu, M. Tian, X. Zhong, C. Du, Z. Hong, Z. Zhu, J. Liu, G. J. Markowitz, F. S. Wang and P. Yang (2021). "Intratumoral stem-like CCR4+ regulatory T cells orchestrate the immunosuppressive microenvironment in HCC associated with hepatitis B." J Hepatol.

Gao, Y., M. You, J. Fu, M. Tian, X. Zhong, C. Du, Z. Hong, Z. Zhu, J. Liu, G. J. Markowitz, F. S. Wang and P. Yang (2022). "Intratumoral stem-like CCR4+ regulatory T cells orchestrate the immunosuppressive microenvironment in HCC associated with hepatitis B." J Hepatol **76**(1): 148-159.

Gobert, M., I. Treilleux, N. Bendriss-Vermare, T. Bachelot, S. Goddard-Leon, V. Arfi, C. Biota, A. C. Doffin, I. Durand, D. Olive, S. Perez, N. Pasqual, C. Faure, I. Ray-Coquard, A. Puisieux, C. Caux, J. Y. Blay and C. Ménétrier-Caux (2009). "Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome." Cancer Res **69**(5): 2000-2009.

Godfrey, V. L., J. E. Wilkinson and L. B. Russell (1991). "X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse." Am J Pathol **138**(6): 1379-1387.

Godiska, R., D. Chantry, C. J. Raport, S. Sozzani, P. Allavena, D. Leviten, A. Mantovani and P. W. Gray (1997). "Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells." J Exp Med **185**(9): 1595-1604.

Gondek, D. C., L. F. Lu, S. A. Quezada, S. Sakaguchi and R. J. Noelle (2005). "Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism." J Immunol **174**(4): 1783-1786.

Grivennikov, S. I., F. R. Greten and M. Karin (2010). "Immunity, inflammation, and cancer." Cell **140**(6): 883-899.

Grossman, W. J., J. W. Verbsky, B. L. Tollefsen, C. Kemper, J. P. Atkinson and T. J. Ley (2004). "Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells." Blood **104**(9): 2840-2848.

Gutierrez-Ruiz, M. C., L. E. Gomez Quiroz, E. Hernandez, L. Bucio, V. Souza, L. Llorente and D. Kershenovich (2001). "Cytokine response and oxidative stress produced by ethanol, acetaldehyde and endotoxin treatment in HepG2 cells." Isr Med Assoc J **3**(2): 131-136.

Hanks, B. A., A. Holtzhausen, K. S. Evans, R. Jamieson, P. Gimpel, O. M. Campbell, M. Hector-Greene, L. Sun, A. Tewari, A. George, M. Starr, A. B. Nixon, C. Augustine, G. Beasley, D. S. Tyler, T. Osada, M. A. Morse, L. Ling, H. K. Lysterly and G. C. Blobe (2013). "Type III TGF- β receptor downregulation generates an immunotolerant tumor microenvironment." J Clin Invest **123**(9): 3925-3940.

Hara, M., C. I. Kingsley, M. Niimi, S. Read, S. E. Turvey, A. R. Bushell, P. J. Morris, F. Powrie and K. J. Wood (2001). "IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo." J Immunol **166**(6): 3789-3796.

- Höchst, B., F. A. Schildberg, P. Sauerborn, Y. A. Gäbel, H. Gevensleben, D. Goltz, L. C. Heukamp, A. Türler, M. Ballmaier, F. Gieseke, I. Müller, J. Kalff, C. Kurts, P. A. Knolle and L. Diehl (2013). "Activated human hepatic stellate cells induce myeloid derived suppressor cells from peripheral blood monocytes in a CD44-dependent fashion." J Hepatol **59**(3): 528-535.
- Hori, S., T. Nomura and S. Sakaguchi (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science **299**(5609): 1057-1061.
- Huang, Y., F. M. Wang, T. Wang, Y. J. Wang, Z. Y. Zhu, Y. T. Gao and Z. Du (2012). "Tumor-infiltrating FoxP3⁺ Tregs and CD8⁺ T cells affect the prognosis of hepatocellular carcinoma patients." Digestion **86**(4): 329-337.
- Iellem, A., L. Colantonio, S. Bhakta, S. Sozzani, A. Mantovani, F. Sinigaglia and D. D'Ambrosio (2000). "Inhibition by IL-12 and IFN-alpha of I-309 and macrophage-derived chemokine production upon TCR triggering of human Th1 cells." Eur J Immunol **30**(4): 1030-1039.
- Iellem, A., M. Mariani, R. Lang, H. Recalde, P. Panina-Bordignon, F. Sinigaglia and D. D'Ambrosio (2001). "Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells." J Exp Med **194**(6): 847-853.
- Imai, T., D. Chantry, C. J. Raport, C. L. Wood, M. Nishimura, R. Godiska, O. Yoshie and P. W. Gray (1998). "Macrophage-derived chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor 4." J Biol Chem **273**(3): 1764-1768.
- Imai, T., M. Nagira, S. Takagi, M. Kakizaki, M. Nishimura, J. Wang, P. W. Gray, K. Matsushima and O. Yoshie (1999). "Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine." Int Immunol **11**(1): 81-88.
- Jenne, C. N. and P. Kubers (2013). "Immune surveillance by the liver." Nat Immunol **14**(10): 996-1006.
- Josefowicz, S. Z. and A. Rudensky (2009). "Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance." Immunity **30**(5): 616-625.
- Kimura, S., U. Nanbu, H. Noguchi, Y. Harada, K. Kumamoto, Y. Sasaguri and T. Nakayama (2019). "Macrophage CCL22 expression in the tumor microenvironment and implications for survival in patients with squamous cell carcinoma of the tongue." J Oral Pathol Med **48**(8): 677-685.
- Krenkel, O. and F. Tacke (2017). "Liver macrophages in tissue homeostasis and disease." Nat Rev Immunol **17**(5): 306-321.
- Kuang, D. M., Q. Zhao, Y. Wu, C. Peng, J. Wang, Z. Xu, X. Y. Yin and L. Zheng (2011). "Peritumoral neutrophils link inflammatory response to disease progression by fostering angiogenesis in hepatocellular carcinoma." J Hepatol **54**(5): 948-955.

- Kudo, M. (2009). "Multistep human hepatocarcinogenesis: correlation of imaging with pathology." *J Gastroenterol* **44 Suppl 19**: 112-118.
- Lamers, C. H., R. Willemsen, P. van Elzakker, S. van Steenberghe-Langeveld, M. Broertjes, J. Oosterwijk-Wakka, E. Oosterwijk, S. Sleijfer, R. Debets and J. W. Gratama (2011). "Immune responses to transgene and retroviral vector in patients treated with ex vivo-engineered T cells." *Blood* **117**(1): 72-82.
- Lanzavecchia, A. and F. Sallusto (2000). "Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells." *Science* **290**(5489): 92-97.
- Letterio, J. J. and A. B. Roberts (1998). "Regulation of immune responses by TGF-beta." *Annu Rev Immunol* **16**: 137-161.
- Li, C. X., C. C. Ling, Y. Shao, A. Xu, X. C. Li, K. T. Ng, X. B. Liu, Y. Y. Ma, X. Qi, H. Liu, J. Liu, O. W. Yeung, X. X. Yang, Q. S. Liu, Y. F. Lam, Y. Zhai, C. M. Lo and K. Man (2016). "CXCL10/CXCR3 signaling mobilized-regulatory T cells promote liver tumor recurrence after transplantation." *J Hepatol* **65**(5): 944-952.
- Li, Y. Q., F. F. Liu, X. M. Zhang, X. J. Guo, M. J. Ren and L. Fu (2013). "Tumor secretion of CCL22 activates intratumoral Treg infiltration and is independent prognostic predictor of breast cancer." *PLoS One* **8**(10): e76379.
- Lin, S. Z., K. J. Chen, Z. Y. Xu, H. Chen, L. Zhou, H. Y. Xie and S. S. Zheng (2013). "Prediction of recurrence and survival in hepatocellular carcinoma based on two Cox models mainly determined by FoxP3+ regulatory T cells." *Cancer Prev Res (Phila)* **6**(6): 594-602.
- Liu, L., Y. Cao, C. Chen, X. Zhang, A. McNabola, D. Wilkie, S. Wilhelm, M. Lynch and C. Carter (2006). "Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5." *Cancer Res* **66**(24): 11851-11858.
- Llovet, J. M., S. Ricci, V. Mazzaferro, P. Hilgard, E. Gane, J. F. Blanc, A. C. de Oliveira, A. Santoro, J. L. Raoul, A. Forner, M. Schwartz, C. Porta, S. Zeuzem, L. Bolondi, T. F. Greten, P. R. Galle, J. F. Seitz, I. Borbath, D. Haussinger, T. Giannaris, M. Shan, M. Moscovici, D. Voliotis, J. Bruix and S. I. S. Group (2008). "Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma." *N Engl J Med* **359**(4): 378-390.
- Ma, C., A. H. Kesarwala, T. Eggert, J. Medina-Echeverez, D. E. Kleiner, P. Jin, D. F. Stroncek, M. Terabe, V. Kapoor, M. ElGindi, M. Han, A. M. Thornton, H. Zhang, M. Egger, J. Luo, D. W. Felsher, D. W. McVicar, A. Weber, M. Heikenwalder and T. F. Greten (2016). "NAFLD causes selective CD4(+) T lymphocyte loss and promotes hepatocarcinogenesis." *Nature* **531**(7593): 253-257.
- Mailloux, A. W., A. M. Clark and M. R. Young (2010). "NK depletion results in increased CCL22 secretion and Treg levels in Lewis lung carcinoma via the accumulation of CCL22-secreting CD11b+CD11c+ cells." *Int J Cancer* **127**(11): 2598-2611.

- Mailloux, A. W. and M. R. Young (2009). "NK-dependent increases in CCL22 secretion selectively recruits regulatory T cells to the tumor microenvironment." J Immunol **182**(5): 2753-2765.
- Mantovani, A., P. A. Gray, J. Van Damme and S. Sozzani (2000). "Macrophage-derived chemokine (MDC)." J Leukoc Biol **68**(3): 400-404.
- Marrack, P. and J. Kappler (1994). "Subversion of the immune system by pathogens." Cell **76**(2): 323-332.
- Maruyama, T., K. Kono, S. Izawa, Y. Mizukami, Y. Kawaguchi, K. Mimura, M. Watanabe and H. Fujii (2010). "CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to infiltration of regulatory T cells in esophageal squamous cell carcinoma." Dis Esophagus **23**(5): 422-429.
- Mizukami, Y., K. Kono, Y. Kawaguchi, H. Akaike, K. Kamimura, H. Sugai and H. Fujii (2008). "CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3+ regulatory T cells in gastric cancer." Int J Cancer **122**(10): 2286-2293.
- Morgan, T. R., S. Mandayam and M. M. Jamal (2004). "Alcohol and hepatocellular carcinoma." Gastroenterology **127**(5 Suppl 1): S87-96.
- Oderup, C., L. Cederbom, A. Makowska, C. M. Cilio and F. Ivars (2006). "Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression." Immunology **118**(2): 240-249.
- Ormandy, L. A., T. Hillemann, H. Wedemeyer, M. P. Manns, T. F. Greten and F. Korangy (2005). "Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma." Cancer Res **65**(6): 2457-2464.
- Powell, B. R., N. R. Buist and P. Stenzel (1982). "An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy." J Pediatr **100**(5): 731-737.
- Prieto, J., I. Melero and B. Sangro (2015). "Immunological landscape and immunotherapy of hepatocellular carcinoma." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **12**(12): 681-700.
- Raich-Regue, D., M. Glancy and A. W. Thomson (2014). "Regulatory dendritic cell therapy: from rodents to clinical application." Immunol Lett **161**(2): 216-221.
- Rao, Q., A. You, Z. Guo, B. Zuo, X. Gao, T. Zhang, Z. Du, C. Wu and H. Yin (2016). "Intrahepatic Tissue Implantation Represents a Favorable Approach for Establishing Orthotopic Transplantation Hepatocellular Carcinoma Mouse Models." PLoS One **11**(1): e0148263.
- Rapp, M. (2013). The Influence of the Chemokine CCL22 on Tumor Development and Growth.

- Sabbatino, F., G. Scognamiglio, L. Liguori, A. Marra, A. M. Anniciello, G. Polcaro, J. Dal Col, A. Caputo, A. L. Peluso, G. Botti, P. Zeppa, S. Ferrone and S. Pepe (2020). "Peritumoral Immune Infiltrate as a Prognostic Biomarker in Thin Melanoma." Front Immunol **11**: 561390.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh and M. Toda (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." J Immunol **155**(3): 1151-1164.
- Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, T. Nomura and M. Ono (2008). "Regulatory T cells and immune tolerance." Cell **133**(5): 775-787.
- Sangro, B., C. Gomez-Martin, M. de la Mata, M. Inarrairaegui, E. Garralda, P. Barrera, J. I. Riezu-Boj, E. Larrea, C. Alfaro, P. Sarobe, J. J. Lasarte, J. L. Perez-Gracia, I. Melero and J. Prieto (2013). "A clinical trial of CTLA-4 blockade with tremelimumab in patients with hepatocellular carcinoma and chronic hepatitis C." J Hepatol **59**(1): 81-88.
- Sangro, B., P. Sarobe, S. Hervás-Stubbs and I. Melero (2021). "Advances in immunotherapy for hepatocellular carcinoma." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **18**(8): 525-543.
- Sapisochin, G. and J. Bruix (2017). "Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: outcomes and novel surgical approaches." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **14**(4): 203-217.
- Sather, B. D., P. Treuting, N. Perdue, M. Miazgowiec, J. D. Fontenot, A. Y. Rudensky and D. J. Campbell (2007). "Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease." J Exp Med **204**(6): 1335-1347.
- Schaniel, C., E. Pardali, F. Sallusto, M. Speletas, C. Ruedl, T. Shimizu, T. Seidl, J. Andersson, F. Melchers, A. G. Rolink and P. Sideras (1998). "Activated murine B lymphocytes and dendritic cells produce a novel CC chemokine which acts selectively on activated T cells." J Exp Med **188**(3): 451-463.
- Schreiber, R. D., L. J. Old and M. J. Smyth (2011). "Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion." Science **331**(6024): 1565-1570.
- Schulze, K., J. C. Nault and A. Villanueva (2016). "Genetic profiling of hepatocellular carcinoma using next-generation sequencing." J Hepatol **65**(5): 1031-1042.
- Shetty, S., P. F. Lalor and D. H. Adams (2018). "Liver sinusoidal endothelial cells - gatekeepers of hepatic immunity." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **15**(9): 555-567.
- Stonāns, I., E. Stonāne, S. Russwurm, H. P. Deigner, K. J. Böhm, M. Wiederhold, L. Jäger and K. Reinhart (1999). "HepG2 human hepatoma cells express multiple cytokine genes." Cytokine **11**(2): 151-156.

- Sun, J., J. Sun, B. Song, L. Zhang, Q. Shao, Y. Liu, D. Yuan, Y. Zhang and X. Qu (2016). "Fucoidan inhibits CCL22 production through NF- κ B pathway in M2 macrophages: a potential therapeutic strategy for cancer." Sci Rep **6**: 35855.
- Tu, J. F., Y. H. Ding, X. H. Ying, F. Z. Wu, X. M. Zhou, D. K. Zhang, H. Zou and J. S. Ji (2016). "Regulatory T cells, especially ICOS(+) FOXP3(+) regulatory T cells, are increased in the hepatocellular carcinoma microenvironment and predict reduced survival." Sci Rep **6**: 35056.
- Vetter, V. K. (2020). Das Chemokin CCL22 – Mechanismen der Induktion und Rolle für die Funktion dendritischer Zellen.
- Vignali, D. A., L. W. Collison and C. J. Workman (2008). "How regulatory T cells work." Nat Rev Immunol **8**(7): 523-532.
- Villanueva, A. (2019). "Hepatocellular Carcinoma." N Engl J Med **380**(15): 1450-1462.
- Virchow, R. (1863). Die Krankhaften Geschwulste. (Aetologie der neoplastischen Geschwulste/Pathogenie der neoplastischen Geschwulste). Berlin, Verlag von August Hirschwald.
- Wang, S., S. Gao, Y. Li, X. Qian, J. Luan and X. Lv (2021). "Emerging Importance of Chemokine Receptor CXCR4 and Its Ligand in Liver Disease." Front Cell Dev Biol **9**: 716842.
- Wiedemann, G. M. (2014). Tumorzell-induzierte Hochregulation des Chemokins CCL22 in Immunzellen.
- Wiedemann, G. M., M. M. Knott, V. K. Vetter, M. Rapp, S. Haubner, J. Fessler, B. Kühnemuth, P. Layritz, R. Thaler, S. Kruger, S. Ormanns, D. Mayr, S. Endres and D. Anz (2016). "Cancer cell-derived IL-1 α induces CCL22 and the recruitment of regulatory T cells." Oncoimmunology **5**(9): e1175794.
- Wiedemann, G. M., N. Röhrle, M. C. Makeschin, J. Fessler, S. Endres, D. Mayr and D. Anz (2019). "Peritumoural CCL1 and CCL22 expressing cells in hepatocellular carcinomas shape the tumour immune infiltrate." Pathology **51**(6): 586-592.
- Wilhelm, S. M., C. Carter, L. Tang, D. Wilkie, A. McNabola, H. Rong, C. Chen, X. Zhang, P. Vincent, M. McHugh, Y. Cao, J. Shujath, S. Gawlak, D. Eveleigh, B. Rowley, L. Liu, L. Adnane, M. Lynch, D. Auclair, I. Taylor, R. Gedrich, A. Voznesensky, B. Riedl, L. E. Post, G. Bollag and P. A. Trail (2004). "BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis." Cancer Res **64**(19): 7099-7109.
- Wu, S., H. He, H. Liu, Y. Cao, R. Li, H. Zhang, H. Li, Z. Shen, J. Qin and J. Xu (2018). "C-C motif chemokine 22 predicts postoperative prognosis and adjuvant chemotherapeutic benefits in patients with stage II/III gastric cancer." Oncoimmunology **7**(6): e1433517.

Xia, S., J. Wei, J. Wang, H. Sun, W. Zheng, Y. Li, Y. Sun, H. Zhao, S. Zhang, T. Wen, X. Zhou, J. X. Gao, P. Wang, Z. Wu, L. Zhao and Z. Yin (2014). "A requirement of dendritic cell-derived interleukin-27 for the tumor infiltration of regulatory T cells." J Leukoc Biol **95**(5): 733-742.

Yang, P., Q. J. Li, Y. Feng, Y. Zhang, G. J. Markowitz, S. Ning, Y. Deng, J. Zhao, S. Jiang, Y. Yuan, H. Y. Wang, S. Q. Cheng, D. Xie and X. F. Wang (2012). "TGF- β -miR-34a-CCL22 signaling-induced Treg cell recruitment promotes venous metastases of HBV-positive hepatocellular carcinoma." Cancer Cell **22**(3): 291-303.

Yao, W., J. C. He, Y. Yang, J. M. Wang, Y. W. Qian, T. Yang and L. Ji (2017). "The Prognostic Value of Tumor-infiltrating Lymphocytes in Hepatocellular Carcinoma: a Systematic Review and Meta-analysis." Sci Rep **7**(1): 7525.

Yeung, O. W., C. M. Lo, C. C. Ling, X. Qi, W. Geng, C. X. Li, K. T. Ng, S. J. Forbes, X. Y. Guan, R. T. Poon, S. T. Fan and K. Man (2015). "Alternatively activated (M2) macrophages promote tumour growth and invasiveness in hepatocellular carcinoma." J Hepatol **62**(3): 607-616.

Younossi, Z. M., M. Otgonsuren, L. Henry, C. Venkatesan, A. Mishra, M. Erario and S. Hunt (2015). "Association of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) with hepatocellular carcinoma (HCC) in the United States from 2004 to 2009." Hepatology **62**(6): 1723-1730.

Yuan, Q., S. K. Bromley, T. K. Means, K. J. Jones, F. Hayashi, A. K. Bhan and A. D. Luster (2007). "CCR4-dependent regulatory T cell function in inflammatory bowel disease." J Exp Med **204**(6): 1327-1334.

Yuasa, K., M. Sakamoto, Y. Miyagoe-Suzuki, A. Tanouchi, H. Yamamoto, J. Li, J. S. Chamberlain, X. Xiao and S. Takeda (2002). "Adeno-associated virus vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient skeletal muscles evokes enhanced immune response against the transgene product." Gene Ther **9**(23): 1576-1588.

Zhao, D. M., A. M. Thornton, R. J. DiPaolo and E. M. Shevach (2006). "Activated CD4⁺CD25⁺ T cells selectively kill B lymphocytes." Blood **107**(10): 3925-3932.

Zhou, J., T. Ding, W. Pan, L. Y. Zhu, L. Li and L. Zheng (2009). "Increased intratumoral regulatory T cells are related to intratumoral macrophages and poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients." Int J Cancer **125**(7): 1640-1648.

Zhu, A. X., R. S. Finn, J. Edeline, S. Cattan, S. Ogasawara, D. Palmer, C. Verslype, V. Zagonel, L. Fartoux, A. Vogel, D. Sarker, G. Verset, S. L. Chan, J. Knox, B. Daniele, A. L. Webber, S. W. Ebbinghaus, J. Ma, A. B. Siegel, A. L. Cheng, M. Kudo and K.-. investigators (2018). "Pembrolizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma previously treated with sorafenib (KEYNOTE-224): a non-randomised, open-label phase 2 trial." Lancet Oncol **19**(7): 940-952.

Zlotnik, A. and O. Yoshie (2000). "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." Immunity **12**(2): 121-127.

- Zlotnik, A., O. Yoshie and H. Nomiya (2006). "The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution." Genome Biol 7(12): 243.
- Zou, W. (2006). "Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy." Nat Rev Immunol 6(4): 295-307.

7 Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovines Serumalbumin
CCL	Chemokin-Ligand
CCR	Chemokin-Rezeptor
CD	Cluster of differentiation
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
DC	Dendritische Zellen
cDNA	Copy-Desoxyribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescent-activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
FFPE	Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HGF	Hepatocyte growth factor
HSCS	Hepatische Sternzelle
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPEX	Immundysregulation-Polyendokrinopathie- Enteropathie-X-chromosomal
iTreg	Induzierte regulatorische T-Zelle
LSECS	Lebersinusoid-Endothelzelle
MDC	Macrophage-derived chemokine
MDSC	Myeloide Suppressorzelle
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	Messenger-RNA

n	Stichprobengröße
NAFLD	Nichtalkoholische Steatohepatitis
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
ns	Nicht signifikant
nTreg	Natürliche regulatorische T-Zelle
PFA	Paraformaldehyd
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate-buffered saline
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD-1	Programmed cell death protein 1
PDGF	Platelet-derived growth factor
PD-L1	Programmed cell death 1 ligand 1
rpm	Rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memory Institute
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler
SIRT	Selektive interne Radiotherapie
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TCR	T-Zell-Rezeptor
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase
TGF- β	Transforming growth factor β
TIL	Tumor-infiltrierende-Leukozyten
TNF- α	Tumor necrosis factor
Treg	Regulatorische T-Zelle
nTreg	Natural Tregs
VLE	Very low endotoxin
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
wt	Wildtyp

8 Publikationen

Originalarbeiten

1. Wiedemann, G. M., M. M. Knott, V. K. Vetter, M. Rapp, S. Haubner, **J. Fessler**, B. Kühnemuth, P. Layritz, R. Thaler, S. Kruger, S. Ormanns, D. Mayr, S. Endres and D. Anz (2016). "Cancer cell-derived IL-1 α induces CCL22 and the recruitment of regulatory T cells." Oncoimmunology **5**(9): e1175794.
2. Wiedemann, G. M., N. Röhrle, M. C. Makeschin, **J. Fessler**, S. Endres, D. Mayr and D. Anz (2019). "Peritumoural CCL1 and CCL22 expressing cells in hepatocellular carcinomas shape the tumour immune infiltrate." Pathology **51**(6): 586-592.

9 Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Stefan Endres für die Möglichkeit unter der Förderung des FöFoLe-Promotionsprogrammes, in der Abteilung für Klinische Pharmakologie promovieren zu dürfen.

Ich bin Prof. Dr. David Anz sehr dankbar für die Überlassung dieses vielseitigen und spannenden Promotionsprojektes und die sehr engagierte und stets geduldige Betreuung. Sein Optimismus und Begeisterung für die Wissenschaft waren sehr inspirierend.

Bei dem gesamten Team der Abteilung für klinische Pharmakologie möchte ich mich herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Insbesondere Dr. Moritz Rapp bin ich für das Erlernen zahlreicher wissenschaftlicher Methoden und die geduldige Unterstützung und Hilfe während meiner gesamten Laborzeit sehr dankbar.

Zuletzt danke ich von Herzen meinen Eltern, meinen Freunden und besonders Hannes Hölz für ihre Unterstützung, Rückhalt und anhaltende Nachsicht.