

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik München IV

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Herr Prof. Dr. med. Martin Reincke

Die Rolle von Interleukin 22 in der Pathogenese und Progression des Nierenzellkarzinoms

Dissertation

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

vorgelegt von

Severin Rodler

aus München

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Heiko Hermeking Prof. Dr. med. Michael Staehler PD. Dr. med. Sabine Brookman-May Prof. Dr. med. Michael von Bergwelt
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Marc Johannes Weidenbusch
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	10.01.2019

Die vorliegende Arbeit wurde von November 2014 bis Juli 2017 im Nephrologischen Zentrum der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV des Klinikums der Universität München durchgeführt.

(Direktor: Herr Prof. Dr. med. Martin Reincke)

Die Arbeit wurde betreut durch Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders und mitbetreut durch Herrn Dr. med. Marc Johannes Weidenbusch.

Förderung:

Die vorliegende Arbeit wurde durch das Immunotargeting of cancer (i-Target) Programm des Elitenetzwerkes Bayern unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Stefan Endres gefördert.

S. R. erhielt zusätzlich eine ideelle und finanzielle Förderung von Seiten des Max Weber-Programms, Bayern, sowie durch Lehre@LMU.

Aus der Promotion ging folgende Originalarbeit als Veröffentlichung hervor:

Weidenbusch M.*, **S. Rodler***, S. Song, S. Romoli, J.A. Marschner, F. Kraft, A. Holderied, S. Kumar, S.R. Mulay, M. Honarpisheh, S. Kumar Devarapu, M. Lech, and H.J. Anders. 2017. Gene expression profiling of the Notch-AhR-IL22 axis at homeostasis and in response to tissue injury. *Bioscience reports* 37

*geteilte Erstautorenschaft.

Die Arbeit wurde auf folgenden Kongressen präsentiert:

Rodler S., S. Song, M. Weidenbusch, B. Seliger, M. Ritter, C. Stief, H.J. Anders, P. Nuhn. Interleukin-22, a T cell secreted cytokine, contributes to renal cell carcinoma progression and is associated with poor outcome in RCC patients. 32. *Deutscher Krebskongress, Berlin, Deutschland*, 24.02 - 27.02.2016

Rodler S., S. Song, M. Weidenbusch, B. Seliger, M. Ritter, C. Stief, H.J. Anders, P. Nuhn. Interleukin-22, a T cell secreted cytokine, contributes to renal cell carcinoma progression and is associated with poor outcome in RCC patients. *Kongress der European Association of Urology (EAU) 2016, München, Deutschland*, 11.05. - 15.05.2016

Weidenbusch M., **S. Rodler**, S. Song, M. Hernandez, B. Seliger, E. Noessner, M. Ritter, M. Staehler, C. Stief, H.J. Anders, P. Nuhn. Interleukin-22, a T cell secreted cytokine, contributes to renal cell carcinoma progression and is associated with poor outcome in RCC patients. *American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting, Chicago, USA*, 03.06. - 07.06.2016

Preise:

Vortragspreis des nephrologischen Forums im Rahmen der Fellows Night 2016

*In dankbarer Erinnerung
an meine Großmutter*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	3
1 Einleitung	5
1.1 Das Nierenzellkarzinom	5
1.1.1 Epidemiologie	5
1.1.2 Definition, Ätiologie und Pathogenese	6
1.1.3 Stadieneinteilung und Prognose	7
1.1.4 Therapie	8
1.1.5 Tumormodelle	12
1.2 Das Immunsystem.....	12
1.2.1 Angeborene Immunität.....	13
1.2.2 Erworbene Immunität.....	15
1.2.3 Die Rolle des Immunsystems bei der Entstehung von Tumoren	18
1.3 IL-22	22
1.3.1 Biologie von IL-22.....	22
1.3.2 Bedeutung von IL-22 in akuten Entzündungsprozessen	23
1.3.3 Bedeutung von IL-22 in der Entstehung und Progression von Karzinomen.....	24
1.4 Zielsetzung und Hypothese.....	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Material.....	27
2.1.1 Tierversuche.....	27
2.1.2 Zellkulturversuche.....	27
2.1.3 Immunhistochemie	28
2.1.4 Kolorimetrische Messung	28
2.1.5 Luminometrische Messung.....	28
2.1.6 ELISA-Materialien.....	28
2.1.7 Reverse Transkriptase-quantitative Polymerasenkettenreaktion	28
2.1.8 Klonierung.....	29
2.1.9 Basischemikalien	30
2.1.10 Nukleotidsequenzen	31
2.1.11 Plasmid.....	31
2.1.12 Geräte	31
2.1.13 Software.....	32
2.2 Methoden	33
2.2.1 Klonierung.....	33
2.2.2 Zellkultur	41
2.2.3 Tierversuche.....	48
2.2.4 Kolorimetrische Messung	49
2.2.5 Luminometrische Messung.....	52
2.2.6 Mikroarray Analyse	53
2.2.7 Realtime pPCR.....	53
2.2.8 Mikroskopie	56
2.2.9 Statistik	56

3	Ergebnisse	57
3.1	HEK293 Zellen exprimieren keine IL22RA1 mRNA	57
3.2	Das IL22RA1/pSTAT3 Reportersystem	58
3.2.1	Generieren der Plasmide	58
3.2.2	Genexpressionsanalyse im Reportersystem	61
3.2.3	IL-22 Bindung an den IL-22 Rezeptor führt zur STAT3 Phosphorylierung	63
3.2.4	IL-22 induzierte STAT3 Phosphorylierung ist durch IL-22 AK antagonisierbar	64
3.2.5	Expression der IL-22-Rezeptoruntereinheiten und IL-22 in humanen Gewebe..	65
3.3	Unterschiedliche Wirkung von IL-22 auf humane Nierenzellkarzinomzelllinien	66
3.3.1	Humane Nierenzellkarzinomzelllinien zeigen eine heterogene IL22RA1 Expression	66
3.3.2	Humane Nierenzellkarzinomzelllinien zeigen unterschiedliches Migrations- verhalten in Abhängigkeit von der Rezeptorexpression	67
3.3.3	Vermehrte Proliferation in IL22RA1(+) Zellen unter IL-22 Stimulation	69
3.3.4	IL-22 verringert Zelltod unter Hypoxie in IL22RA1(+) Zellen	70
3.3.5	IL-22 verminderter Zelltod ist reversibel durch IL-22 AK	71
3.4	IL-22 Achse in der murinen Nierenzellkarzinomlinie Renca.....	74
3.4.1	Hohe IL22RA1 Expression in Renca Zellen	74
3.4.2	IL-22 führt zu erhöhter Migration in Renca Zellen	74
3.4.3	IL-22 hat antiapoptotische Wirkung auf Renca Zellen unter Hypoxie	75
3.5	Renca Sphären als RCC Tumormodell	76
3.5.1	Renca Sphären besitzen nekrotische Zentren.....	76
3.5.2	DCs wandern in Renca Sphären ein	77
3.5.3	BMDCs produzieren kein IL-22 nach Stimulation mit LPS, dafür IL1 β , IL-6 und TNF- α	78
4	Diskussion	79
4.1	Die IL-22 Signalkaskade im IL22RA1/pSTAT3-Reportersystem	80
4.2	Das IL-22RA1/pSTAT3 Reportersystem als Methode zum Drugscreening	81
4.3	Die IL-22 Achse in der Niere	83
4.3.1	Die IL-22 Rezeptorexpression im Nierenzellkarzinom	84
4.3.2	Die IL-22 Sekretion im Nierenzellkarzinom	85
4.4	Therapeutische Optionen zur Blockade der IL-22 Achse im Nierenzellkarzinom	86
4.5	Immuntherapie und IL-22	89
4.6	Personalisierte Medizin in der Therapie des Nierenzellkarzinoms	90
4.7	Limitationen der Studie	93
4.8	Zusammenfassung des Konzepts der Studie.....	94
5	Zusammenfassung	96
6	Literaturverzeichnis	97
7	Abkürzungsverzeichnis	109
8	Danksagung	110
9	Eidesstattliche Versicherung	111

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1 Klassifikation von Nierenzellkarzinomen	6
Tab. 1-2 Stadieneinteilung nach AJCC 2010	7
Tab. 1-3 Prognosegruppen nach AJCC 2010	8
Abb. 1-4 Therapiealgorithmus im Nierenzellkarzinom	8
Abb. 1-5 Therapiealgorithmus für das metastasierte Nierenzellkarzinom	10
Tab. 1-6 Systemische Therapie im Nierenzellkarzinom	11
Abb. 1-7 Zeitlicher Ablauf der Immunantwort.....	13
Tab. 1-8 Antigenerkennung durch Toll-like-Rezeptor	14
Abb. 1-9 Wichtige Zytokine, die von Makrophagen als Antwort auf bakterielle Antigene produziert werden.....	15
Tab. 1-10 Kostimulatorische und inhibitorische Signale zwischen T-Zellen und APCs.....	17
Abb. 1-11 Wichtige Untergruppen der T-Zellen.....	18
Abb. 1-12 Sezernierte Faktoren bilden ein immunsuppressives Mikromilieu	20
Abb. 1-13 Die IL-22/IL-22 Rezeptor Signalkaskade	23
Abb. 1-14 Rolle von IL-22 in Tumoren.....	25
Abb 2-1 pSTAT3 Reporter Plasmid	36
Tab. 2-2 Enzyme und Bindungsstellen für BP- und LR-Reaktion	37
Abb. 2-3 Gateway Cloning.....	38
Abb. 2-4 IL22RA1 Entry Clone	40
Abb. 2-5 IL22RA1 Expressionsplasmid	41
Tab. 2-6 Murine Zelllinien	41
Tab. 2-7 Humane Zelllinien	42
Abb. 2-8 Funktionsweise eines ELISA mit Sandwichmethode	51
Tab. 2-9 Reaktion der Gaussia-Luciferase	52
Tab. 2-10 Übersicht über die verwendeten humanen RNA Proben	55
Tab. 3-1 Mikroarray Analyse von HEK293 Zellen	57
Tab. 3-2 Testverdau des pcDNA-Gluc3-CMVMin-STAT3 Plasmids	58
Abb. 3-3 Gelelektrophorese von pcDNA-Gluc3-CMVMin-STAT3	59
Tab. 3-4 Testverdau des IL22RA1 Entry Clones.....	59
Abb. 3-5 Gelelektrophorese des IL22RA1 Entry Clones	60
Tab. 3-6 Testverdau des IL22RA1 Expressionsplasmids.....	60
Abb. 3-7 Gelelektrophorese des IL22RA1 Expressionsplasmids	60
Abb. 3-8 IL22RA1 mRNA Expression in Reportersystem	62
Abb. 3-9 SOCS3 mRNA Expression nach IL-22 Stimulation	62
Abb. 3-10 STAT3 Phosphorylierung nach IL-22 Stimulation im Reportersystem	63
Abb. 3-11 Inhibition der Phosphorylierung mittels IL-22 Antikörper.....	64
Abb. 3-12 IL22RA1, IL10R2 und IL-22 Expression in humanem Gewebe	65
Abb. 3-13 IL22RA1 Expression in humanen Nierenzellkarzinomzelllinien	67
Abb. 3-14 Migrationsverhalten humaner Nierenzellkarzinomzelllinien	68
Abb. 3-15 Proliferation nach 24 Stunden.....	69
Abb. 3-16 Effekte von IL-22 auf Zelltod unter Hypoxie.....	70
Abb. 3-17 Zelltod unter Medikamentenbehandlung	73
Abb. 3-18 IL22RA1 Expression in verschiedenen Zelltypen der Niere	74
Abb. 3-19 Erhöhte Migration von Renca Zellen unter IL-22 Stimulation	75
Abb. 3-20 IL-22 verhindert hypoxieinduzierten Zelltod in Renca Zellen.....	76

Abb. 3-21 Renca Sphäre mit nekrotischem Zentrum.....	77
Abb. 3-22 Renca Sphäre mit eingewanderten Dcs.....	77
Abb. 3-23 Zytokinexpressionsprofil von BMDCs nach Stimulation mit LPS	78
Abb. 4-1 IL22RA1 Expressions/pSTAT3 Reportersystem.....	81
Abb. 4-2 Medikamentenentwicklungszyklus	83
Abb. 4-3 Therapeutische Optionen der IL-22 Achsen Blockade.....	88
Abb. 4-4 Ablauf personalisierter Tumorthherapie.....	92
Abb. 4-5 Konzept der Studie	95

1 Einleitung

Im Jahr 2013 wurde die Immuntherapie von Tumoren zum Durchbruch des Jahres durch die Herausgeber des amerikanischen Journals *Science* erklärt (Couzin-Frankel, 2013). Damit erreichte eine Entwicklung ihren vorläufigen Höhepunkt, die mit Experimenten von William B. Coley Ende des 19. Jahrhunderts begonnen hatte (McCarthy, 2006). Er hatte beobachtet, dass es bei Patienten nach bakteriell induziertem Fieber zu einer Remission der Tumorerkrankung kommen kann. Da damals die daran beteiligten Mechanismen unklar und die Remissionsraten sehr unterschiedlich waren, gewannen zunächst die Strahlentherapie (Coutard, 1934) und Chemotherapie (Farber and Diamond, 1948) in der Behandlung von Tumorpatienten an Bedeutung. So sollte es noch lange dauern, bis sich die Erkenntnis durchsetzte, dass das Immunsystem und Tumore interagieren und sich wechselseitig beeinflussen (Dunn et al., 2002). Um dieses Zusammenspiel zu verstehen, muss dabei im Folgenden sowohl das Immunsystem selbst, die an der Interaktion zwischen Tumor und Immunsystem beteiligten Signalstoffe, als auch der Tumor an sich betrachtet werden.

1.1 Das Nierenzellkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Nierenzellkarzinom ist das siebthäufigste Karzinom des Mannes beziehungsweise zehnthäufigste Karzinom der Frau (Siegel et al., 2016) und stellt somit 2% aller malignen Erkrankungen dar. Nach Diagnosestellung hat es eine 5-Jahres-Überlebensrate von 73%, was darauf zurückzuführen ist, dass bei Diagnosestellung zu 65% ein noch lokal begrenzt wachsendes Karzinom vorliegt. Liegt allerdings ein metastasiertes Stadium vor, sinkt das 5-Jahres-Überleben auf 12% ab. Generell ist die Inzidenz in entwickelten Ländern höher (Znaor et al., 2015) und steigt aktuell noch an. Dies ist auf die hohe Rate an zufälligen Entdeckungen zurückzuführen, die im Rahmen von Sonografie oder Computertomographie (CT) Untersuchungen auftreten. In Europa erkranken jährlich 84.000 Patienten neu und 35.000 sterben am Nierenzellkarzinom, wobei Männer insgesamt häufiger erkranken als Frauen (Siegel et al., 2016).

1.1.2 Definition, Ätiologie und Pathogenese

Das Nierenzellkarzinom entwickelt sich aus proximalen Tubulusepithelzellen der Niere (Holthofer et al., 1983), wobei wahrscheinlich renale Karzinomstammzellen eine wichtige Rolle in diesem Prozess spielen (Peired et al., 2016). Man unterscheidet zwischen hereditären Syndromen mit Nierenzellkarzinombildung und sporadischen Nierenzellkarzinomen. Hereditäre Nierenzellkarzinome treten in einem jüngeren Alter auf und gehäuft beidseitig (Randall et al., 2014). Außerdem sind sie mit Mutationen in bestimmten Genen assoziiert (siehe Tabelle 1-1). Das sporadische Nierenzellkarzinom zeigt dagegen eine ansteigende Inzidenz bis zum 75. Lebensjahr und fällt dann wieder ab (Znaor et al., 2015). Es werden mehrere histologische Subtypen unterschieden (siehe Tabelle 1-1), wobei das klarzellige Nierenzellkarzinom den häufigsten Subtyp darstellt und am meisten beforscht wird.

Tab. 1-1 Klassifikation von Nierenzellkarzinomen

NZK Subtyp	% an NZK	Somatische Mutationen	Assoziierte hereditäre Syndrome	NZK Risiko in hereditären Syndromen
Klarzellig	>80%	VHL, PBRM, SETD2, BAP1	von-Hippel-Lindau Syndrom (VHL)	24-45%
			Tuberöse Sklerose (TSC1, TSC2)	1-3%
			Familiäres Nierenzellkarzinom (BAP1)	unbekannt
Papillär	10-15%	MET	Hereditäres papilläres NZK (MET)	67%
			hereditäre Leiomyomatose (FH)	2-21%
Chromophob	5%		Birt-Hogg Dube Syndrom (BHD)	34%
Sammelrohr	<1%			
Weitere seltene Subtypen	<1%			

Abk.: NZK: Nierenzellkarzinom, VHL: Von-Hippel-Lindau Protein, PBRM: Polybromo-1, TSC: Tuberous sclerosis, SETD2: SET domain containing 2, BAP1: BRCA associated protein-1, MET: Protoonkogen, FH: Fumarathydratase. [Modifiziert nach (Randall et al., 2014)]

Als Risikofaktoren gelten Zigarettenrauch (Cumberbatch et al., 2016), erhöhtes Körpergewicht und Bluthochdruck (Chow et al., 2000), erworbene Nierenzysten (Brennan et al., 1991), chronische Hepatitis C Infektion (Gordon et al., 2010), Analgetika (Cho et al.,

2011), genetische Faktoren (Wiklund et al., 2009), Chemotherapie (Argani et al., 2006), Sichelzellanämie und Nierensteine (Cheungpasitporn et al., 2015). Daneben gibt es Hinweise für die Beteiligung von Diabetes mellitus (Inoue et al., 2006) und chronischen Nierenerkrankungen (Lowrance et al., 2014) an der Krankheitsentstehung.

1.1.3 Stadieneinteilung und Prognose

Die Stadieneinteilung erfolgt gemäß des *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). Dabei wird die Größe des Primärtumors, das Ausmaß des Lymphknotenbefalls und das Vorliegen von Fernmetastasen beurteilt und in der TNM Klassifikation zusammengefasst (siehe Tabelle 1-2). Die einzelnen TNM-Scores können zu Prognosegruppen zusammengefasst werden (siehe Tab. 1-3), wobei das Stadium IV das einzige Stadium mit Fernmetastasen darstellt.

Tab. 1-2 Stadieneinteilung nach AJCC 2010

TNM Klassifikation		
Primärtumor (T)	TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
	T0	Kein Anhalt eines Primärtumors
	T1	Tumor ≤ 7 cm in der größten Ausdehnung, auf Niere begrenzt
	T1a	Tumor ≤ 4 cm in der größten Ausdehnung, auf Niere begrenzt
	T1b	Tumor > 4 cm aber ≤ 7 cm in der größten Ausdehnung, auf Niere begrenzt
	T2	Tumor > 7 cm in der größten Ausdehnung, auf Niere begrenzt
	T2a	Tumor > 7 cm aber ≤ 10 cm in der größten Ausdehnung, auf Niere begrenzt
	T2b	Tumor > 10 cm, auf Niere begrenzt
	T3	Tumorausbreitung bis in große Gefäße oder perirenales Gewebe aber nicht bis zur ipsilateralen Nebenniere oder über die Gerotafaszie hinaus
	T3a	Tumorausbreitung bis Vena renalis oder ihre Segmentäste, oder perirenales und/oder renales Sinusfett, aber nicht über die Gerotafaszie hinaus
	T3b	Tumorausbreitung in Vena cava oder Nierenvene (aber unterhalb des Diaphragmas)
	T3c	Tumorausbreitung bis Vena cava oberhalb des Diaphragmas oder bis in die Wand der Vena cava
	T4	Tumorausbreitung über Gerotafaszie hinaus
	Regionäre Lymphknoten (N)	NX
N0		Keine regionäre Lymphknotenmetastase
N1		Metastase in regionären Lymphknoten
Fernmetastase (M)	M0	Keine Fernmetastase
	M1	Fernmetastase

Abk.: T: Tumorgroße, N: Lymphknotenstatus, M: Fernmetastasen [Modifiziert nach (Edge and Compton, 2010)]

Neben der vor allem radiologischen Diagnostik zur Stadieneinteilung gehen in prädiktive Scores weitere Parameter ein. So gehen gemäß der Kriterien des Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC) neben dem Allgemeinzustand (Karnofsky Index < 80) und dem Abstand zwischen Diagnose und Start einer systemischen Therapie (weniger als zwölf Monate) auch Laborwerte wie Hämoglobin, Calcium und Laktatdehydrogenase (LDH) in die Prognose mit ein (Motzer et al., 2002).

Tab. 1-3 Prognosegruppen nach AJCC 2010

Stadium	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1-2	N1	M0
	T3	N0-1	M0
IV	T4	N2	M0
	Jedes T	Jedes N	M1

[Modifiziert nach (Edge and Compton, 2010)]

1.1.4 Therapie

Die Therapie des Nierenzellkarzinoms ist Stadien-abhängig und basiert auf zwei großen Säulen. Die operative Therapie umfasst neben Resektion des Primärtumors auch eventuell Metastasen Chirurgie (Ljungberg et al., 2015). Medikamentös steht eine breite Auswahl an verschiedenen Wirkstoffen zur Verfügung, wobei die meisten klassischen Chemotherapeutika keine Wirkung zeigen (Facchini et al., 2009).

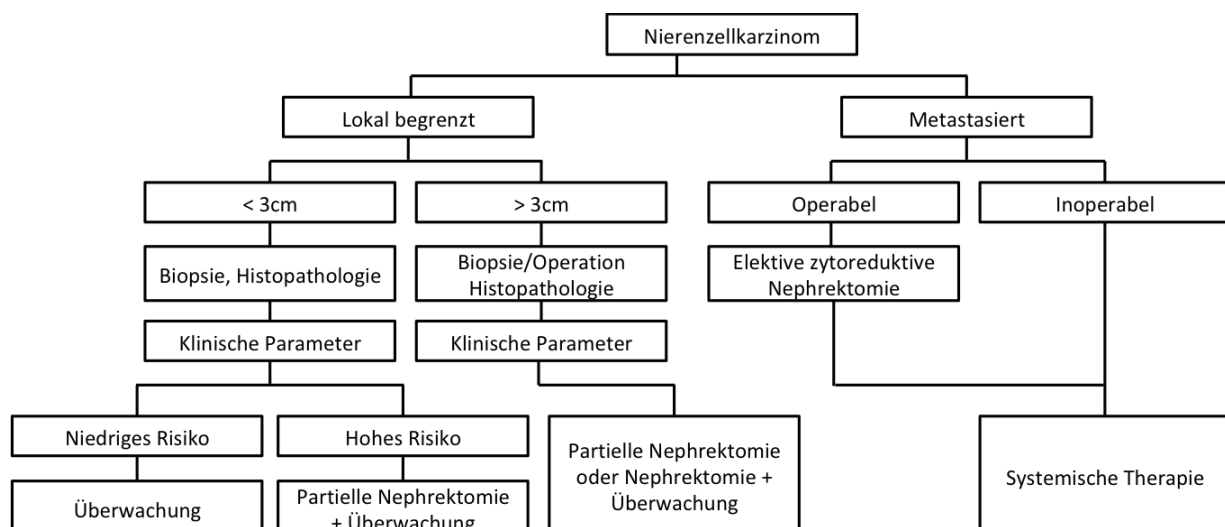


Abb. 1-4 Therapiealgorithmus im Nierenzellkarzinom

[Modifiziert nach (Hsieh et al., 2017)]

Neben dem Tumorstadium entscheidet auch das Patientenalter, Komorbiditäten und der Patientenwunsch über die Vorgehensweise.

1.1.4.1 Operative Therapie

Die operative Therapie hat den größten Stellenwert in der Therapie des Nierenzellkarzinoms und ist Therapie der Wahl bei allen nicht-metastasierten Stadien des Nierenzellkarzinoms. Die partielle Nephrektomie ist gegenüber der radikalen Nephrektomie die bevorzugte Behandlungsmethode, da mehr funktionelles Nierengewebe erhalten werden kann. Jedoch ist in allen Fällen das Vorgehen von den Risikofaktoren und dem Allgemeinzustand des Patienten abhängig. Liegen Kontraindikationen wie große Tumormasse oder Beteiligung des Hilus vor, so ist eine radikale Nephrektomie durchzuführen. In Stadium I, II und III erfolgt die Operation meist kurativ. Wird in einem fortgeschrittenen Stadium operiert, können nach vorheriger Evaluation sogar Einzelmetastasen zusammen mit dem Primärtumor kurativ reseziert werden. Für Patienten, die als chirurgische Patienten ausscheiden, besteht die Möglichkeit kleine Tumore mittels Kryotherapie oder Radiofrequenzablation zu behandeln. Auch bei beidseitigem Auftreten von Nierenzellkarzinomen im Rahmen von Syndromen ist die operative Versorgung anzustreben, wobei hier besonders auf ein nephronsparendes Vorgehen zu achten und enge Nachsorge zur frühzeitigen Entdeckung von zusätzlichen Nierenzellkarzinomen durchzuführen ist (Hsieh et al., 2017).

1.1.4.2 Systemische Therapie

Die systemische Therapie findet vor allem bei metastasiertem Nierenzellkarzinom ihre Anwendung. Studien zum adjuvanten Einsatz nach operativer Therapie haben dagegen keinen Vorteil gezeigt (Haas et al., 2016). Mittlerweile wird eine Vielzahl an Wirkstoffen in der Therapie angewendet.

Immuntherapien wurden schon früh im Nierenzellkarzinom erforscht (Ueno, 1986), erleben aber in den letzten Jahren eine Renaissance (Randall et al., 2014). Interleukin-2 (IL-2), das bereits früh eingesetzt wurde, führt zu einer gesteigerten Immunantwort und bewirkt bei einigen Patienten eine Regression des Tumors. Der Allgemeinzustand eines Patienten muss jedoch gut sein (Karnofsky Index > 80), um die starken Nebenwirkungen wie Hypotension, Verwirrtheit und Arrhythmien überstehen zu können (Klapper et al., 2008). Wegen der

hohen Toxizität darf IL-2 auch nur unter stationärer Kontrolle verabreicht werden und wird nur in ausgewählten Patienten eingesetzt.

	Erstlinientherapie	Zweitlinientherapie	Drittlinientherapie
Niedriges Risiko	Sunitinib oder Pazopanib	Cabozantinib oder Nivolumab	Cabozantinib oder Nivolumab
	Ipilimumab/Nivolumab	VEGF gezielte Therapie	Alternative gezielte Therapien
Mittleres bis hohes Risiko	Ipilimumab/Nivolumab	VEGF gezielte Therapie	Alternative gezielte Therapien
	Cabozantinib, Sunitinib oder Pazopanib	VEGF gezielte Therapie oder Nivolumab	Alternative gezielte Therapie oder Nivolumab

Abb. 1-5 Therapiealgorithmus für das metastasierte Nierenzellkarzinom

Niedriges Risiko: keine Risikofaktoren des MSKCC Scores (siehe Kap. 1.1.3), mittleres Risiko: ein bis zwei Risikofaktoren, hohes Risiko: mehr als zwei Risikofaktoren [modifiziert nach (Powles et al., 2017)].

Nivolumab ist ein *Programmed cell death protein 1* (PD-1) Antikörper und überwindet damit die Blockade des Immunsystems. Er bindet an PD-1 Rezeptor auf der Oberfläche von T-Zellen und disinhibiert damit die T-Zelle (Pardoll, 2012). Seine bessere Wirksamkeit in der Therapie des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms gegenüber Everolimus wurde in einer multizentrischen Studie gezeigt (Motzer et al., 2015).

Ipilimumab ist ein Antikörper, der das *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4* (CTLA-4) blockiert. CTLA-4 hemmt die Aktivierung von T-Zellen und führt nach Aktivierung des Immunsystems zur Rückkehr in die Homöostase (Tarhini and Iqbal, 2010). Patienten mit Nierenzellkarzinom und hohem Risiko profitieren von einer Kombinationstherapie mit Nivolumab und Ipilimumab verglichen mit Sunitinib (Escudier et al., 2017).

Interferon- α wurde früher ebenfalls eingesetzt, wurde aber zunehmend durch gezielte Therapien ersetzt (Motzer et al., 2007).

Die *molekular gezielte Therapie* greift an zwei wesentlichen Punkten in der Pathogenese des Nierenzellkarzinoms an und blockiert damit den *mechanistic Target Of Rapamycin* (mTOR) und den *vascular endothelial growth factor* (VEGF)-Signalweg. Der mTOR-Signalweg ist an zahlreichen Wachstumsprozessen beteiligt und ist vor allem in Tumorzellen aktiviert (Populo et al., 2012). VEGF ist dagegen an der Neubildung von Gefäßen beteiligt und wirkt so indirekt auf das Wachstum (Shibuya, 2011), da es die Nährstoffversorgung des Tumors verbessert.

Der *VEGF-Signalweg* kann auf zwei unterschiedliche Arten blockiert werden. Die Tyrosinkinaseinhibitoren Sorafenib, Axitinib, Cabozantinib, Pazopanib, Sunitinib blockieren die intrazelluläre Domäne des VEGF-Rezeptors und damit dessen Signalübertragung (Hsieh et al., 2017). Bevacizumab als monoklonaler Antikörper bindet dagegen sezerniertes VEGF und verhindert auf diesem Wege die Bindung an den VEGF-Rezeptor (Yang et al., 2003).

Die Blockade des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges wird durch die Substanzen Temsirolimus und Everolimus bewirkt. Der mTOR-Signalweg steigert Zellwachstum und Metabolismus und ist im Nierenzellkarzinom besonders wichtig, da *Hypoxia-inducible factor* (HIF) abhängig von der mTOR-Aktivierung ist (Battelli and Cho, 2011).

Tab. 1-6 Systemische Therapie im Nierenzellkarzinom

Substanz	Empfehlung	Empfehlungsgrad
Allgemein	Systemische Therapie des mRCC sollte auf gezielter Therapie und Immuntherapie aufbauen	A
Sunitinib und Pazopanib	Empfehlung für die Erstlinientherapie von mNZK mit niedrigem bis mittlerem Risiko	A
Bevacizumab + IFN- α	Empfehlung für die Erstlinientherapie in mNZK mit niedrigem bis mittlerem Risiko	A
Temsirolimus	Empfehlung für die Erstlinientherapie von Hochrisikopatienten	A
Cabozantinib	Vorzuziehen bei Progress nach VEGF gezielter Therapie gegenüber Everolimus	A
Nivolumab	Vorzuziehen bei Progress nach VEGF gezielter Therapie gegenüber Everolimus	A
Axitinib	Gabe als Zweitlinientherapie nach Zytokin- oder VEGF-Therapie, wenn andere Medikamente nicht sicher oder tolerabel sind	A
Everolimus	Gabe bei Versagen von VEGF gezielter Therapie, wenn andere Medikamente nicht sicher oder tolerabel sind	A
	Sequentieller Einsatz von gezielten Therapien wird empfohlen	A
Sunitinib oder Everolimus	Möglicher Einsatz als Erstlinientherapie bei nichtklarzelligem mNZK	B
Nivolumab*	Gabe nach Erst- oder Zweitlinientherapie mit VEGF gezielter Therapie	A
Monotherapie mit IFN- α or HD IL-2	Als Erstlinientherapie nicht routinemäßig empfohlen	A

*In der Darstellung wird die Empfehlung der Guidelines von 2014 für Nivolumab gezeigt. In der aktualisierten Erweiterung von 2018 (Powles et al., 2017) wird Nivolumab und Ipilimumab zur Erstlinientherapie von Patienten mit mittlerem und hohem Risiko empfohlen. Die Erweiterung von 2018 stützt sich auf eine Phase III Studie, weshalb hier noch auf die Guidelines von 2014 zurückgegriffen wird. Abk.: mNZK: metastasiertes Nierenzellkarzinom, HD: Hochdosis [Abbildung modifiziert nach (Ljungberg et al., 2015)].

1.1.5 Tumormodelle

Dreidimensionale Zellkulturen in Form von Sphroiden stellen eine effektive Möglichkeit dar, um Nierenzellkarzinome zu untersuchen, ohne auf Tiermodelle zurückgreifen zu müssen (Pan et al., 2015). Interessant sind diese Modelle neben Medikamentenscreening auch für die Untersuchung von Interaktionen zwischen Immunzellen und Tumorzellen (Liu et al., 2016).

Mausmodelle werden entweder als allogene Xenograftmodelle durchgeführt, wobei humane Nierenzellkarzinomzelllinien (Miyake et al., 2012) oder aus frischen Nierenzellkarzinomen isolierte Zellen (Pavia-Jimenez et al., 2014) verwendet werden können. Alternativ kann auf die murine Zelllinie Renca zurückgegriffen werden. Renca ist eine Zelllinie, die aus spontan entstandenen Tumoren in Balb/c Mäusen entwickelt wurde. Mit dieser lassen sich neben orthotopen Modellen (Devaud et al., 2014) auch Metastasierungsmodelle in Lunge (Welti et al., 2012) und Peritoneum (Salup et al., 1985) untersuchen.

1.2 Das Immunsystem

Der Körper des Menschen ist permanent äußerlichen Bedrohungen in Form von Infektionen und Gewebeschädigung sowie innerlichen Bedrohungen durch Entgleisen der Homöostase (Machnik et al., 2009) und Entartung von Zellen ausgesetzt. Um dennoch die Integrität des Körpers zu bewahren, ist das Immunsystem notwendig. Das Immunsystem erfüllt dabei folgende Aufgaben: Erkennen von Pathogenen, Aktivierung von Effektorfunktionen, Immunregulation und Immungedächtnis (Janeway, 2008). Das Immunsystem des Menschen gliedert sich dabei in die angeborene Immunität und die erworbene Immunität. Erst die gemeinsame Funktionalität beider Systeme gewährleistet den Schutz des Körpers gegenüber externen und internen Noxen. Das angeborene Immunsystem eliminiert Pathogene schnell durch vorgeformte Effektoren, das erworbene Immunsystem kann dafür effektiver und gezielter reagieren, es dauert vor allem bei der ersten Infektion allerdings länger, bis die Effekte zu sehen sind.

Beide Systeme interagieren miteinander und haben viele gemeinsame Schnittstellen. Eine strikte Unterteilung in zwei Systeme ist damit nur bedingt sinnvoll, wird im Folgenden aber beibehalten, da diese Unterteilung in der Literatur häufig vorgenommen wird.

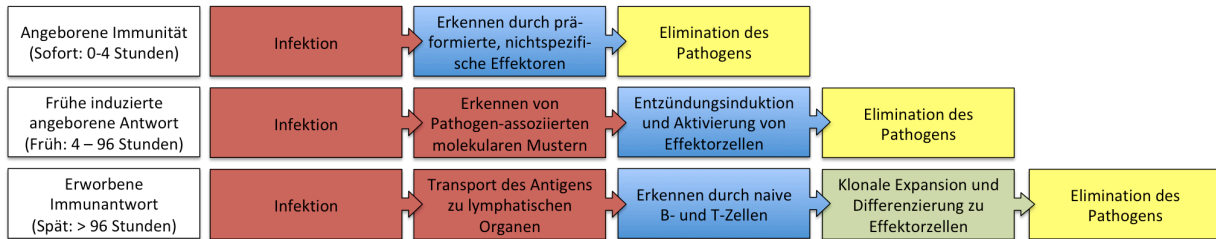


Abb. 1-7 Zeitlicher Ablauf der Immunantwort
[Modifiziert nach (Janeway, 2008)]

1.2.1 Angeborene Immunität

Das angeborene Immunsystem funktioniert als *front line of defense* und setzt sich sowohl aus hämatopoietischen Zellen als auch Epithelzellen zusammen. Epithelzellen bilden durch ihren engen Kontakt über *Tight Junctions* eine mechanische Barriere zwischen dem Körper und seiner Umgebung (zum Beispiel die Epidermis oder Darmmukosa), andererseits schaffen sie auch durch sezernierte Substanzen wie Lysozym und Defensine sowie durch den sauren pH-Wert des Magens ein antimikrobielles Milieu (Janeway, 2008).

Zu den Immunzellen des angeborenen Immunsystems gehören neben Makrophagen und dendritischen Zellen auch *natürliche Killerzellen* (NK-Zellen). Eindringende Pathogene werden entweder direkt eliminiert oder es wird eine Entzündungsreaktion eingeleitet. Das angeborene Immunsystem erkennt dabei Pathogene an repetitiven Strukturen – sogenannten *Pathogen-assoziierte molekulare Muster* (*Pathogen Associated Molecular Patterns*, kurz PAMPs) - über angeborene, präformierte Rezeptoren. Diese sind interessanterweise nicht klonal auf die Zellen verteilt wie Rezeptoren des erworbenen Immunsystems, sondern es befinden sich mehrere verschiedene Rezeptoren auf einer Zelle (Janeway, 2008). Im angeborenen Immunsystem kommt es zwar zur Bildung eines immunologischen Gedächtnisses, wobei es hauptsächlich zu epigenetischen Veränderungen in den Zellen kommt, aber zu keiner Veränderung der Rezeptoren an sich (Crisan et al., 2016). Deshalb ist die Betrachtung der Rezeptoren und ihrer jeweils zugehörigen Liganden zum Verständnis des angeborenen Immunsystems wichtig.

Eine bedeutende Rolle nehmen die evolutionär alten *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) ein. TLRs sind entweder membrangebunden extrazellulär (TLR 1, 2, 4, 5, 6) oder befinden sich endosomal (TLR 3, 7, 8, 9).

Tab. 1-8 Antigenerkennung durch Toll-like-Rezeptor

Toll-Like-Rezeptor	Ligand
TLR1, 2	Peptidoglykan, Lipoproteine, Lipoarabinomannan, GPI, Zymosan
TLR-3	dsRNA
TLR-4	LPS, Lipoteichonsäure
TLR-5	Flagellin
TLR-7	ssRNA
TLR-8	G-reiche Oligonucleotide
TLR-9	unmethylierte CpG DNA

Abk.: TLR: Toll-Like-Rezeptor, GPI: Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol, dsRNA: doppelsträngige RNA, LPS: Lipopolysaccharid; G: Guanin, C: Cytosin [modifiziert nach (Janeway, 2008)].

Daneben gibt es eine Reihe weiterer Rezeptoren wie die *Nucleotide-binding oligomerization domain-like Receptors* (NLR). Diese sind im Zytosol zu finden, wo sie mikrobielle Proteine binden können. Ebenfalls zytosolisch gelegen sind die *retinoic acid inducible gene I* (RIG-I)-Like-Rezeptoren. Eine Aktivierung der genannten Rezeptoren führt durch die Induktion des NFκB-Signalweges zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Expression von kostimulatorischen Molekülen. NLR werden hauptsächlich in Epithelzellen, dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert. Da auch TLR in dendritischen Zellen und Makrophagen stark exprimiert sind, weniger aber in Epithelzellen, wirken NLR und TLR hier synergistisch (Janeway, 2008).

Interessanterweise können nicht nur mit Pathogenen assoziierte Moleküle (PAMPs) als Ligand für die beschriebenen Rezeptoren dienen, sondern auch von körpereigenen Zellen freigesetzte Moleküle. Diese Moleküle werden dann als *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) bezeichnet und werden im Rahmen von nekrotischen beziehungsweise apoptotischen Prozessen freigesetzt. Hierzu zählen Histone, DNA, RNA, Purinmetabolite, HMGB1 und Hyaluronfragmente (Mulay and Anders, 2017).

Werden Makrophagen und dendritische Zellen nun über die beschriebenen Rezeptoren aktiviert, kommt es zur Produktion von Chemokinen, die entweder lokal oder systemisch wirken können. Lokal kommt es zum Einleiten eines lokalen Entzündungsprozesses, indem Endothel aktiviert und dessen Permeabilität erhöht wird, oder Immunzellen rekrutiert werden. Systemisch kommt es zu Fieber, Induktion von Akute-Phase-Proteinen und Schock.

IL-1 β	TNF- α	IL-6	IL-8	IL-12
Lokale Effekte				
Aktivierung von Endothel und Lymphozyten, lokale Gewebezzerstörung, Erhöhter Zugang für Effektorzellen	Aktivierung von Endothel und erhöhte Permeabilität	Lymphozytenaktivierung und Erhöhung der Antikörperproduktion	Rekrutierung von Neutrophilen, Basophilen und T-Zellen	Aktivierung von NK-Zellen, Differenzierung von CD4+ T-Zellen zu T _H 1-Zellen
Systemische Effekte				
Fieber, IL-6 Produktion	Fieber, Mobilisierung von Metaboliten, Schock	Fieber, Induktion von Akute-Phase-Proteinen		

Abb. 1-9 Wichtige Zytokine, die von Makrophagen als Antwort auf bakterielle Antigene produziert werden [modifiziert nach (Janeway, 2008)]

Ein weiterer wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems ist das von Jules Bordet entdeckte Komplementsystem (Nesargikar et al., 2012). Es umfasst eine Gruppe von Proteinen, die im Blutplasma als inaktive Vorstufen gelöst vorliegen. Das Komplementsystem kann über den klassischen Signalweg mittels Antigen-Antikörper-Komplex aktiviert werden, durch Lektin, das an die Oberfläche von Pathogenen binden kann, oder über den alternativen Signalweg, der direkt über die Oberfläche eines Pathogens vermittelt wird. Die Komplementaktivierung führt zum Rekrutment von Immunzellen, Opsonierung des Pathogens oder zu einer Zerstörung der Membran des Pathogens (Ricklin et al., 2016).

1.2.2 Erworbene Immunität

Das erworbene Immunsystem existiert nur in Wirbeltieren (Boehm, 2011) und kann gezielt auf einzelne Antigene reagieren. Die wichtigsten Immunzellen sind hierbei B- und T-Lymphozyten. B-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Antikörperproduktion während T-Zellen sowohl Effektor- als auch Regulationsfunktionen übernehmen. Das Prinzip der Antigenerkennung wird von B- und T-Zellen durch zwei verschiedene Wege verwirklicht. B-Zellen erkennen Antigene mittels Immunglobuline, die entweder als membrangebundene B-Zellrezeptoren oder als sezernierte Antikörper existieren. T-Zellen exprimieren dagegen membrangebundene T-Zellrezeptoren, die allerdings nur präsentierte Peptide erkennen (Garcia et al., 1999). B-Zellrezeptor und T-Zellrezeptor weisen dabei strukturelle Ähnlichkeiten auf. Unreife dendritische Zellen nehmen im peripheren Gewebe Pathogene

und Antigene mittels Makropinozytose und rezeptorvermittelte Endozytose auf und wandern in regionale Lymphknoten ein, wo sie das Antigen präsentieren. Hier werden die präsentierten Antigene von naiven B- und T-Zellen erkannt, die daraufhin klonal expandieren und terminal differenzieren.

Im Unterschied zum angeborenen Immunsystem sind die Rezeptoren des erworbenen Immunsystems auf einer Zelle klonal verteilt, was heißt, dass eine Zelle nur einen Rezeptor exprimiert (Janeway, 2008). Dieser ist aber spezifisch und entsteht sowohl durch angeborene Gensegmentneuanordnungen als auch durch Mutationen: Die einzelnen V-Regionen sind von verschiedenen Gensegmenten kodiert und werden über somatische Rekombination zusammengesetzt, an dessen Ende ein komplettes V-Region-Exon entsteht. Die Segmente sind angeboren und werden nur über Kombination verschieden angeordnet. An den Übergängen der Segmente werden eine zufällige Anzahl an palindromischen (P) und *Non template encoded* (N)-Nukleotiden eingefügt, was zusammen mit der Auswahl der verschiedenen Leichtketten die Variabilität der Antikörper weiter erhöht. Zusätzlich kommt es im Bereich der V-Region zu somatischer Hypermutation, die diese Variabilität nochmals deutlich erhöht (Grawunder et al., 1998).

1.2.2.1 B-Zellen

B-Zellaktivierung erfolgt in den sekundären lymphatischen Organen durch Bindung eines Antigens an einen B-Zellrezeptor. Für eine starke Bindung sind zusätzliche Signale durch kostimulatorische Moleküle oder T-Helferzellen notwendig. Nach terminaler Differenzierung werden aus diesen Zellen Plasmazellen, wobei die sezernierten Antikörper drei Funktionen übernehmen können. Sie können Antigene durch direkte Bindung neutralisieren. Sie können nach Bindung an ein Antigen zur Opsonierung durch Bindung an Makrophagen führen und können zur Komplementaktivierung führen (Janeway, 2008).

1.2.2.2 T-Zellen

T-Zellen besitzen einen T-Zellrezeptor, der sich aus zwei Ketten zusammensetzt (TCR α und TCR β). T-Zellen erkennen Antigene nur, wenn sie an der Oberfläche einer antigenpräsentierenden Zelle präsentiert werden. Dabei wird das Antigen auf dem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Molekül einer antigenpräsentierenden Zelle präsentiert. Es gibt zwei Klassen von MHC Molekülen. MHC I Moleküle befinden sich auf der

Oberfläche beinahe jeder Zelle mit Ausnahme von Erythrozyten und Trophoblastenzellen und präsentieren Peptide, die vom Proteasom der Zelle aus zytosolischen Proteinen gebildet werden. MHC-II Komplexe werden von antigenpräsentierenden Zellen gebildet und sind mit extrazellulären Proteinen beladen, die mittels Endozytose aus dem Extrazellulärraum aufgenommen werden (Neefjes et al., 2011).

Dabei werden in ihren nichtpolymorphen Bereich MHC I Moleküle von *Cluster of differentiation 8* (CD8) und MHCII Moleküle von CD4 gebunden. CD4 und CD8 sind Oberflächenproteine von T-Zellen und klassifizieren somit zwei Gruppen von T-Zellen. Die Bindung des T-Zellrezeptors (TCR) an ein präsentiertes Antigen reicht für eine Aktivierung der T-Zelle aber noch nicht aus. Es werden weitere kostimulatorische Signale (Abb. 1-10) benötigt (Pardoll, 2012).

Tab. 1-10 Kostimulatorische und inhibitorische Signale zwischen T-Zellen und APCs

Wirkung auf APC	APC	T-Zelle	Wirkung auf T-Zelle
	PDL1 oder PDL2	PD1	-
	CD80 oder CD86	CD28	+
	CD80 oder CD86	CTLA-4	-
	B7RP1	ICOS	+
	B7-H3	?	-
	B7-H4	?	-
	HVEM	BTLA	-
		KIR	-
	MHC Class I oder II	TCR	Signal 1
		LAG3	-
	CD137L	CD137	+
	OX40L	OX40	+
	CD70	CD27	+
+	CD40	CD40L	-
	GAL9	TIM3	-
	Adenosin	A2aR	-

Die Bindung von MHC Molekülen an den T-Zellrezeptor bewirkt das primäre Signal (Signal 1). Daneben sind kostimulatorische (+) und inhibitorische (-) Moleküle an der Signaltransduktion beteiligt. Abk.: APC: Antigenpräsentierende Zelle wie beispielsweise dendritische Zellen oder Makrophagen, ICOS: Inducible T-Cell Costimulator, HVEM: Herpesvirus Entry Mediator, BTLA: B- and T-Lymphocyte attenuator, KIR: Killer-cell immunoglobulin-like receptors, TCR: T-Zellrezeptor, LAG3: Lymphocyte-activation gene 3, CD137 (L): Cluster of differentiation 137 (Ligand), OX40 (L): TNF-Rezeptorfamilie (Ligand), Gal9: Galectin-9, TIM3: T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3, A2aR: Adenosin A2a Rezeptor [modifiziert nach (Pardoll et al.)].

Man teilt T-Zellen nach den beiden Oberflächenmarkern in CD4+ und CD8+ Zellen ein. Während ihrer Reifung haben T-Zellen zwischenzeitlich beide Oberflächenmarker. Daneben können Effektor- und Regulatorzellen unterschieden werden.

CD4+ T _H 1-Zellen	CD4+ T _H 2-Zellen	CD4+ T _H 9-Zellen	CD4+ T _H 17-Zellen	CD4+ T _H 22-Zellen
Aktivierung infizierter Makrophagen/ Unterstützung von B-Zellen zur Antikörperproduktion	Unterstützung von B-Zellen zur Antikörperproduktion / v. a. Switch zu IgE	Immunsuppression oder Aktivierung abhängig vom Mikromilieu	Verstärken der Neutrophilenantwort, Homöostase von Epithelzellen	Wichtige Rolle in der Homöostase von Epithelzellen
CD4+ T _{FH} -Zellen	CD4+ regulatorische T-Zellen	CD8+ zytotoxische T-Zellen	NKT-Zellen	γδ-T-Zellen
Induktion und Erhalt von Keimzentren im Lymphfollikeln	Unterdrücken der T-Zell Antwort	Töten von virusinfizierten Zellen	Regulation der Immunantwort	Rolle bei intraepithelialen Infektionen

Abb. 1-11 Wichtige Untergruppen der T-Zellen

T-Zellen bilden die zwei wichtigen Untergruppen CD4+ und CD8+, wobei insbesondere CD4+ Zellen in weitere Unterklassen unterteilt werden. Abk.: T_H: T-Helferzelle [modifiziert nach (Kaplan et al., 2015) und (Janeway, 2008)].

1.2.3 Die Rolle des Immunsystems bei der Entstehung von Tumoren

Somatische Zellen können durch mehrere Mutationen entarten, wobei Tumorsuppressorgene und Protoonkogene in diesem Prozess eine entscheidende Rolle spielen. Bereits Paul Ehrlich beschrieb, dass ohne einen Abwehrmechanismus die natürliche Karzinomfrequenz viel höher sein sollte, als sie tatsächlich ist (Ehrlich, 1909).

Dabei zog die Theorie des *Immunoediting*, die im Prozess der Tumorentstehung eine entscheidende Rolle spielt, viel Aufmerksamkeit auf sich (Dunn et al., 2002). Die Tumorentstehung in Interaktion mit dem Immunsystem vollzieht sich dabei in drei Schritten:

1. der Verhinderung der Entstehung von Tumoren
2. dem Equilibrium und
3. dem Tumorescape.

1.2.3.1 Verhinderung der Entstehung von Tumoren

Das Immunsystem ist im Wesentlichen über drei Mechanismen an der Verhinderung der Tumorentstehung beteiligt:

Elimination viraler Infektionen: Diese Funktion des Immunsystems wurde in epidemiologischen Studien beobachtet. Immunsupprimierte Transplantationspatienten haben ein erhöhtes Karzinomrisiko (Chapman et al., 2013). Mehrere Viren sind bekannte Auslöser von Tumoren, unter anderem HPV (Boshart et al., 1984), EBV (Epstein et al., 1964), HBV (Blumberg et al., 1965), HCV, HIV (Goncalves et al., 2016). Können diese durch das Immunsystem eliminiert werden, bevor es zu einer Entartung der infizierten Zelle kommt, kann somit die Tumorentstehung verhindert werden.

Elimination von Pathogenen: Ein chronisch, entzündliches Milieu trägt zur Tumorentstehung bei (Coussens and Werb, 2002). Dessen Entstehung kann das Immunsystem verhindern, indem bakterielle Infektionen oder Gewebstoxen effizient eliminiert werden und damit der Entzündungsprozess gestoppt wird. Auf der anderen Seite kann es aber gerade durch das Immunsystem an dieser Stelle zum Aufrechterhalten des Entzündungsprozesses kommen. In chronischen Entzündungen werden beispielsweise NF- κ B, STAT3, and HIF-1 Signalwege aktiviert, die auch in Tumoren aktiviert sind (Multhoff et al., 2011). Die von Immunzellen sezernierten Faktoren wie die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) tragen zudem über DNA-Schäden und Inhibierung von Reparaturmechanismen (Sawa and Ohshima, 2006) zur Tumorbildung bei. Hieraus lässt sich ableiten, dass das Immunsystem oft eine zweiseitige Beteiligung an der Tumorentstehung hat und sowohl pro- als auch antitumoral wirken kann.

Elimination von entarteten Zellen durch Erkennung von Neoantigenen oder fehlender MHC Expression: Dieser Mechanismus wird sowohl durch das angeborene als auch das adaptive Immunsystem vermittelt. Bereits früh ist gezeigt worden, dass CD8⁺ Zellen das Überleben im Kolonkarzinom beeinflussen (Naito et al., 1998). Mittlerweile kann dieser Mechanismus therapeutisch durch Entwicklung von Antikörpern (Daniels-Wells et al., 2013) oder T-Zellrezeptoren (Khalil et al., 2016) effektiv genutzt werden.

1.2.3.2 Equilibrium

Immer wieder können einzelne Tumorzellen den oben genannten Eliminationsmechanismen entgehen und bilden ein dynamisches Gleichgewicht mit dem Immunsystem des Wirtes. Dabei wird durch Lymphozyten und Interferon γ (IFN- γ) ein Selektionsdruck auf die Tumorzellen ausgeübt, wodurch die Tumorzellen, die die höchste Widerstandsfähigkeit gegen die Immunantwort zeigen, selektiert werden (Dunn et al., 2002). Am Ende dieses

Prozesses, der mehrere Jahre dauern kann, stehen Tumorzellen, die entweder nicht mehr als maligne vom Immunsystem erkannt werden oder nicht mehr eliminiert werden können.

1.2.3.2.1 Immunsuppression

Es gibt mehrere Mechanismen, über die eine tumorinduzierte Immunsuppression bewirkt wird. Dabei werden sezernierte Faktoren von membrangebundenen Molekülen unterschieden. Für eine effektive T-Zellaktivierung sind neben der Aktivierung des T-Zellrezeptors auch kostimulatorische Signale wichtig. Tumore können auf ihrer Oberfläche Moleküle exprimieren, die negative kostimulatorische Effekte auf T-Zellen haben. Hierzu zählen PD-L1 und PD-L2, die beide an PD-1 binden, sowie CD86, das an CTLA-4 bindet (Stambook et al., 2017). Beide Zielstrukturen werden mittlerweile als therapeutisches Ziel genutzt und können mit Antikörpern blockiert werden.

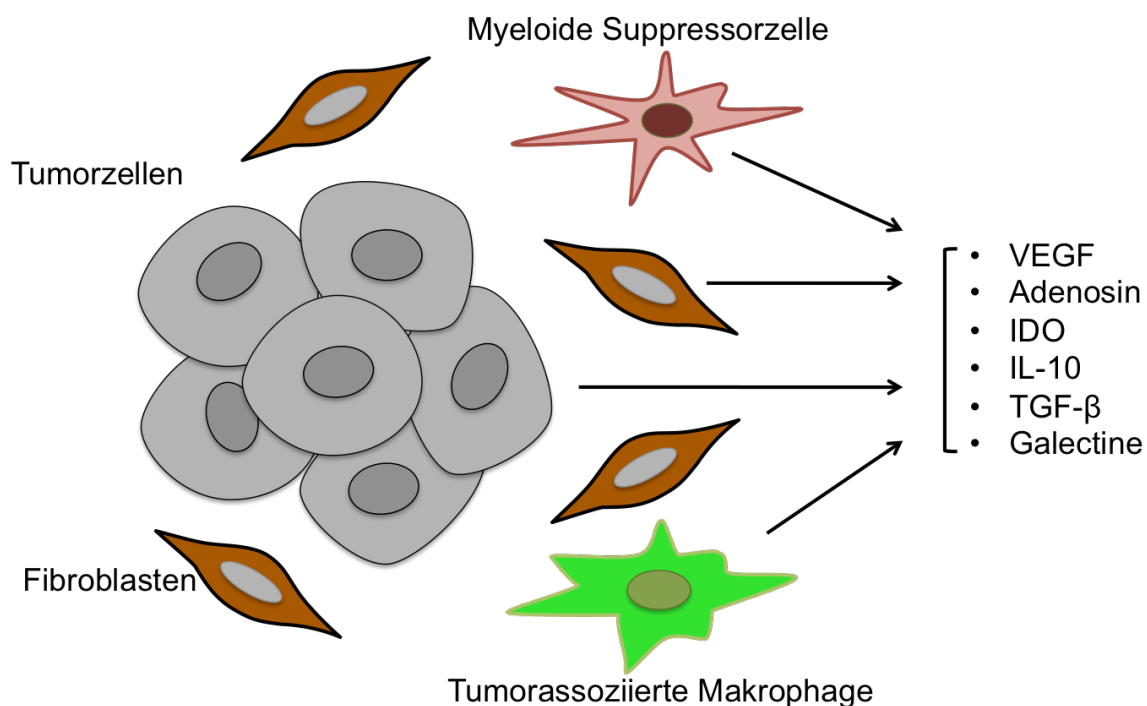


Abb. 1-12 Sezernierte Faktoren bilden ein immunsuppressives Mikromilieu

Tumorzellen, Stromazellen und infiltrierende myeloische Zellen sezernieren Substanzen, die lokal die Immunantwort unterdrücken können. Abk.: IDO: Indolamin-2,3-Dioxygenase, IL-10: Interleukin 10, TGF- β : Transforming growth factor β [modifiziert nach (Mahoney et al., 2015)].

Neben den membrangebunden inhibitorischen Signalen gibt es eine Vielzahl an sezernierten Faktoren, die ebenfalls die Aktivierung von T-Zellen verhindern. Diese Faktoren können sowohl von Tumorzellen gebildet werden als auch von tumorassoziierten Stromazellen sowie

von infiltrierenden Immunzellen (Mahoney et al., 2015) gebildet werden (Abb. 1-12). Eine wichtige Stellung nimmt dabei TGF- β ein, das bei der Progression von Tumoren eine wichtige Rolle spielt (Syed, 2016).

1.2.3.2 Veränderung von Zielstrukturen

Manche Tumore zeigen Veränderungen in ihren Oberflächenmolekülen, die dazu führen, dass das Immunsystem die Zellen nicht mehr als fremd erkennt. Tumore können eine niedrige *Immunogenität* aufweisen, indem sie die Expressionsrate an MHC Moleküle reduzieren oder keine kostimulatorischen Moleküle exprimieren, die für eine effektive Immunantwort notwendig sind. Außerdem werden manche Antigene, auf die das Immunsystem initial reagiert, durch Bindung des entsprechenden Antikörpers internalisiert werden.

1.2.3.3 Escape

Einzelne Tumorzellen können sich dem Gleichgewicht im Equilibrium entziehen und können dauerhaft nicht mehr als maligne erkannt beziehungsweise nicht mehr eliminiert werden. Diese Zellen vermehren sich daraufhin unkontrolliert und führen zur klinisch feststellbaren Tumorerkrankung.

Die an diesen Schritten beteiligten Mechanismen sind bisher nicht vollständig verstanden. Wichtig ist jedoch die komplexe Interaktion des Immunsystems mit dem Tumor und deren wechselseitige Beeinflussung. An diesem Prozess sind neben den beschriebenen membrangebundenen Faktoren vor allem Zytokine beteiligt (Dranoff, 2004). Ein wichtiges hiervon ist Interleukin 22 (IL-22), auf das im Folgenden näher eingegangen wird.

1.3 IL-22

IL-22 ist im Jahr 2000 von der Renault Arbeitsgruppe zum ersten Mal beschrieben worden (Dumoutier et al., 2000) und hat durch seine selektive Wirkung auf Epithelzellen das Interesse schnell auf sich gezogen. Dabei hat es seine Bedeutung in der Homöostase von Gewebe und wirkt an Regenerationsprozessen mit (Dudakov et al., 2015).

1.3.1 Biologie von IL-22

IL-22 ist aufgrund struktureller Gemeinsamkeiten Teil der IL-10 Familie und befindet sich auf Chromosom 12p15 (Wolk and Sabat, 2006). Das Interleukin wird von Immunzellen sezerniert, wobei ILC3 (Serafini et al., 2014), T_H1, T_H17 und T_H22 polarisierte T-Helferzellen (Dudakov et al., 2015) gut charakterisierte Syntheseorte sind. Neben diesen Zellen lymphatischen Ursprungs sind auch Makrophagen (Liu et al., 2017) und dendritische Zellen (Kulkarni et al., 2014) und damit Zellen des myeloischen Systems als Produktionsort beschrieben, wobei umstritten ist, ob hier eine relevante Produktion stattfindet (Rutz et al., 2013). Das Interleukin wird auf Stimuli wie IL-23, IL-1-b, IL-7, *Aryl Hydrocarbon* (AhR)- und NOTCH-Signaling (Dudakov et al., 2015) hin sezerniert. Die Zielstruktur ist der heterodimere IL-22 Rezeptor, der aus einer für die Funktion bestimmenden IL22RA1 Kette und einer ubiquitär exprimierten IL10R2 Kette besteht. Die IL22RA1 Kette wird in Epithelzellen exprimiert. Nach Bindung von IL-22 an seinen Rezeptor wird über die Aktivierung der Tyrosinkinase JAK1 und TYK2 (Dudakov et al., 2015) vorrangig der *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3), aber auch STAT1 und STAT5 phosphoryliert. Daneben ist die Aktivierung von PI3Akt und MAP Kinasen beschrieben. Der endogene Antagonist von IL-22 ist das *IL-22 binding protein* (IL-22 BP), das große Ähnlichkeit zur extrazellulären Domäne von IL22RA1 zeigt (Wei et al., 2003). Mehrere Mechanismen tragen zu einer Verhinderung überschießender Aktivierung des IL-22 Signalweges bei. Dabei ist der *Suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3) einer der wichtigsten Regulatoren, der intrazellulär STAT3 vermittelt vermehrt exprimiert wird und selbst STAT3 Signale unterdrückt (Brand et al., 2007).

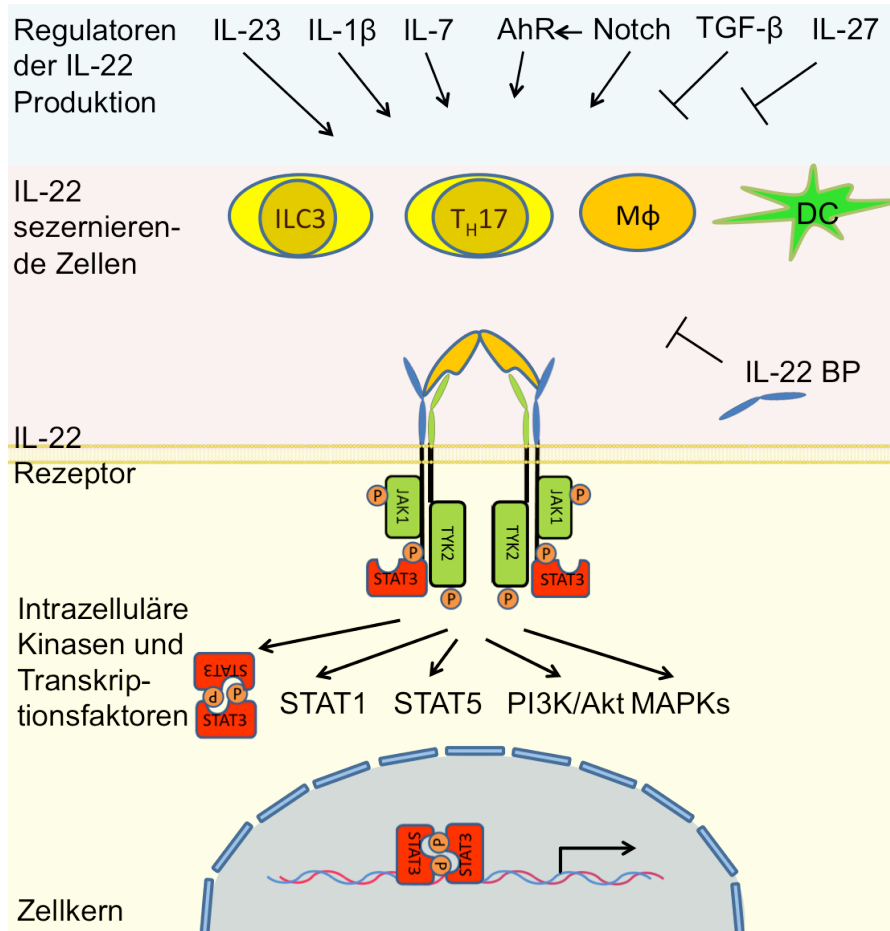


Abb. 1-13 Die IL-22/IL-22 Rezeptor Signalkaskade
 [Modifiziert nach (Weidenbusch et al., 2015) und (Dudakov et al., 2015)]

1.3.2 Bedeutung von IL-22 in akuten Entzündungsprozessen

Physiologisch hat IL-22 wichtige Funktionen in der Homöostase von Geweben und fördert Wundheilung und Gewebereparatur (Sonnenberg et al., 2011). Zwar führt IL-22 zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF) und IL-1 α (Liang et al., 2010) und führt zu Entzündungsprozessen in den Atemwegen (Sonnenberg et al., 2010). Auf der anderen Seite schützt IL-22 durch Produktion von antimikrobiellen Proteinen wie S100A, Reg und Defensine direkt vor bakteriellen Infektionen (Zheng et al., 2008). Damit führt IL-22 über eine beschleunigte Elimination von Pathogenen und schneller Regeneration zu einer verkürzten Dauer der Entzündungsprozesse (Sonnenberg et al., 2011). Außerdem wirkt IL-22 auch direkt antiapoptotisch und proliferativ (Radaeva et al., 2004) und trägt so zu verminderten Gewebeschaden und Regeneration bei. Die funktionelle Bedeutung von IL-22 erscheint insgesamt kontextabhängig, so dass unterschiedliche Effekte in den Tiermodellen zu beobachten sind.

1.3.3 Bedeutung von IL-22 in der Entstehung und Progression von Karzinomen

IL-22 hat bereits in seinen physiologischen Funktionen eine komplexe Rolle und ist auch an der Karzinogenese auf verschiedene Art und Weise beteiligt (Lim and Savan, 2014):

Entzündung und Immunsuppression: In Kolonkarzinomzellen kann IL-22 die iNOS und IFN- γ Expression erhöhen (Ziesche et al., 2007) und trägt so zu einer Entzündungsreaktion bei. Andererseits produzieren Pankreaszellen nach IL-22 Stimulation TGF- β und IL-10 und führen so zu einer verminderten Aktivierung von Jurkat T-Zellen (Curd et al., 2012).

Proliferation: Vor allem in Lungen und Lebertumoren sind deutlich proliferative Effekte von IL-22 gefunden worden (Ren et al., 2010). Dabei scheint es, also ob die initial regenerativen Funktionen bei Persistenz der IL-22 Produktion dazu führen, dass Tumore die Zellzykluskontrolle überwinden können. Einschränkend ist zuzusagen, dass für die Nierenzellkarzinomzelllinie A498 (Zhang et al., 2011) und die Mammakarzinomzelllinie EMT6 (Weber et al., 2006) ein G2/M Zellzyklusarrest beobachtet worden ist, der auf die Aktivierung nicht klassischer Wege über pSTAT1 zurückzuführen ist.

Angiogenese: *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) ist ein bekannter Wachstumsfaktor für Angiogenese (Hoeben et al., 2004). IL-22 erhöht die Ausschüttung von (VEGF) in Pankreaskarzinomzellen (Curd et al., 2012) und in einem Kolonkarzinom Xenograft-Modell (Jiang et al., 2013). Dagegen wurde in einem Xenograft-Mammakarzinommausmodell (Weber et al., 2006) kein Einfluss auf die Gefäßdichte gefunden, wobei nicht klassische Effekte beobachtet wurden.

Epithelial-mesenchymale Transition: Die Rolle von IL-22 in der Epithelial-mesenchymalen Transition ist bisher unklar. IL-22 führt zu einer verminderten Expression von Differenzierungsmarkern in Keratinozyten (Nogales et al., 2008) und in oralem Plattenepithelkarzinom (Naher et al., 2012). Auf der anderen Seite verhindert es die epithelial-mesenchymale Transition in einem Bleomycin abhängigen Schädigungsmodell (Liang et al., 2013).

Zusammenfassend hängt die Rolle von IL-22 von Kontextfaktoren und der Progressionsstufe des Tumors ab. So scheint IL-22 in mit Virusinfektionen oder chronischen bakteriellen Infektionen assoziierten Tumoren eine präventive Rolle zu spielen durch eine schnelle Beendigung der Noxe und beschleunigte Gewebsregeneration. Auf der anderen Seite kann eine dysregulierte IL-22 Produktion über die Phosphorylierung von STAT3 zu erhöhter

Proliferation von Tumorzellen und vermehrtes Gefäßwachstum über VEGF vermittelt kommen.

Einschränkend ist festzuhalten, dass bisher kein direkter Zusammenhang zwischen Tumorgenese und IL-22 Produktion gefunden worden ist (Perusina Lanfranca et al., 2016). Die beschriebenen Zusammenhänge können auch auf entzündliche Effekte mit subsequent erhöhten IL-22 Spiegeln zurückzuführen sein. Mausmodelle, in denen IL-22 Knockouts Effekte gezeigt haben, basieren auf chronischen Entzündungsmodellen des Darms und der Leber, in denen IL-22 protektiv wirkt (Lim and Savan, 2014), womit ein Beweis für einen direkten Zusammenhang fehlt.

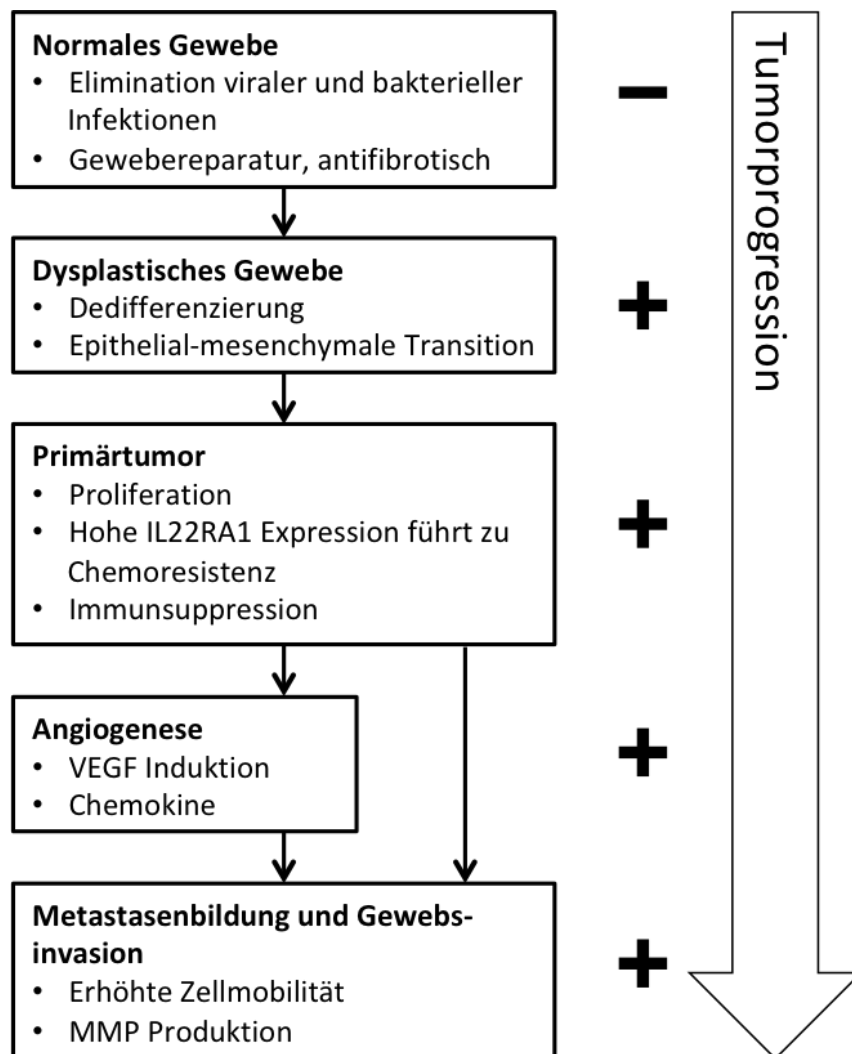


Abb. 1-14 Rolle von IL-22 in Tumoren

IL-22 besitzt antitumorale (-) Effekte auf normales Gewebe, indem es virale und bakterielle Infektionen eliminiert und zur Geweberegeneration beiträgt. Dagegen zeigen sich protumorale (+) Effekte auf allen Stufen der Tumorentwicklung. Abk.: MMP: Matrix-Metalloprotease [modifiziert nach (Lim and Savan, 2014)].

1.4 Zielsetzung und Hypothese

Bisher ist die Rolle von IL-22 beim Nierenzellkarzinom unklar, da die beschriebenen Studien kein konklusives Bild über die Effekte von IL-22 liefern können. Insbesondere die Ergebnisse in der Zelllinie A498 stehen in Gegensatz zu den publizierten proliferativen und anti-apoptotischen Effekten von IL-22. Anhand von mRNA Daten von Patienten mit Nierenzellkarzinom hat unsere Arbeitsgruppe zudem eine signifikante Korrelation zwischen hoher IL22RA1 Expression und verschlechtertem Überleben in einer TCGA Kohorte gefunden. In einer weiteren Studie haben wir in einem anderem Kollektiv den gleichen Zusammenhang auf Proteinebene zeigen können. Auf diesen Beobachtungen aufbauend sollen deshalb folgende drei Fragestellungen untersucht werden:

(1) In einem ersten Schritt soll ein auf Luciferase-Assay basierendes Hochdurchsatz-Testsystem entwickelt werden, um die Aktivierung des wichtigen STAT3 Signalweges nach IL-22 Stimulation nachvollziehen zu können. Gleichzeitig soll untersucht werden, ob sich dieses Testsystem auch eignet, um eine medikamenteninduzierte Aktivierung dieser Achse darzustellen.

(2) In einem zweiten Schritt soll untersucht werden, in welchen humanen Geweben eine relevante Expression wichtiger Moleküle der IL-22 Signalkaskade stattfindet. Caki-1 und A498 sind als Zelllinien mit IL22RA1 Expression beschrieben worden. Zunächst soll die IL22RA1 Expression in weiteren humanen Nierenzellkarzinomzelllinien untersucht werden. IL-22 zeigt anti-apoptotische und proliferative Wirkung auf Tubuluszellen. Abhängig von ihrer Expression sollen die NZK-Zelllinien im Anschluß auf diese Effekte von IL-22 untersucht werden.

(3) Die Rolle von IL-22 in der murinen Nierenzellkarzinomzelllinie Renca soll abschließend geklärt werden, da sie die wichtigste murine Zelllinie für Nierenzellkarzinommodelle darstellt. Nach Bestimmung der IL22RA1 Expression und Gewinnung von funktionellen Daten soll auch ein 3D *in vitro* Modell generiert werden, um die Interaktion von Immunzellen und Renca Zellen untersuchen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tierversuche

2.1.1.1 Versuchstiere

Acht Wochen alte Balb/c Mäuse Charles River, Sulzfeld

2.1.1.2 Versuchstierhaltung

Makrolone Typ 2 Käfige Techniplast, Hamburg
Tierfutter Sniff Spezialdiäten, Soest

2.1.2 Zellkulturversuche

1ml, 2ml, 5ml, 10 ml Spritzen	B. Braun, Melsungen
24 G Kanülen	B. Braun, Melsungen
3 cm Zellkulturplatte	Thermofisher Scientific, Darmstadt
10 cm Zellkulturplatte	Thermofisher Scientific, Darmstadt
6-Kammer-Zellkulturplatte	Thermofisher Scientific, Darmstadt
12-Kammer-Zellkulturplatte	Thermofisher Scientific, Darmstadt
24-Kammer-Zellkulturplatte	Thermofisher Scientific, Darmstadt
96-Kammer-Zellkulturplatte	Thermofisher Scientific, Darmstadt
BD Falcon® Zellfilter 70 µm	BD Biosciences, San Jose, USA
CoolCell®	Sigma-Aldrich, München
Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)	Sigma-Aldrich, München
Tryptan-Blau	Sigma-Aldrich, München
RPMI 1640-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM	Thermofisher Scientific, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom KG, Berlin
Penicillin / Streptomycin (100x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Dulbecco's PBS (1x)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Zellkultur Inserts	Ibidi, Martinsried
LPS	Invivogen, San Diego, USA
rh IL-22	Immunotools, Friesoythe
rm IL-22	Immunotools, Friesoythe
rm GM-CSF	Immunotools, Friesoythe
Cabozantinib	Selleckchem, Houston, USA
Everolimus	Selleckchem, Houston, USA
Sorafenib	Selleckchem, Houston, USA
Sunitinib	Selleckchem, Houston, USA
CellTracker™ Green CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate)	Thermofisher Scientific, Darmstadt

bisBenzimide H 33342 Trihydrochloridie Sigma-Aldrich, München

Propidiumiodid Sigma-Aldrich, München

MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit Lonza, Basel, Schweiz

2.1.3 Immunhistochemie

Lab-Tek® Chamber Slide™ System Thermofisher Scientific, Darmstadt

Anti IL-22 Receptor Alpha Antikörper Abcam, Cambridge, UK

Cy-3 gelabelter Antikaninchen Antikörper Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA

DAPI Invitrogen, Darmstadt

2.1.4 Kolorimetrische Messung

Cytotoxicity Detection Kit Roche, Mannheim

CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Promega, Madison, USA

2.1.5 Luminometrische Messung

BioLux® *Gaussia* Luciferase Assay Kit New England Biolabs, Ipswich, USA
Röhre 5ml, 75x12mm, PS Sarstedt, Nümbrecht

2.1.6 ELISA-Materialien

Nunc Maxisorp® ELISA-Platte Thermofisher Scientific, Darmstadt

Maus IL-22-ELISA-Ready-Set-Go!® eBioscience, San Diego, USA

Maus IL-6-ELISA-Set OptEIA™ BD Biosciences, Heidelberg

Maus TNF-α-ELISA-Set OptEIA™ BD Biosciences, Heidelberg

Maus IL-1β-ELISA-Set OptEIA™ BD Biosciences, Heidelberg

HRP-konjugierter anti-Maus-IgG-Ziegenantikörper Bethyl Laboratories, Montgomery, USA

TMB-Substrat Reagenzset BD Biosciences, Heidelberg

1M H₂SO₄ Roth, Karlsruhe

2.1.7 Reverse Transkriptase-quantitative Polymerasenkettenreaktion

2.1.7.1 RNA Proben

Human total RNA Master panel II Clontech, Mountain View, USA

2.1.7.2 RNA-Isolation

PureLink® RNA Mini Kit Ambion, Darmstadt

RNAse-freies DNase Set Qiagen GmbH, Hilden

100% Ethanol Merck, Darmstadt

β-Mercaptoethanol Roth, Karlsruhe

2.1.7.3 cDNA-Synthese

5x FS Puffer Invitrogen, Karlsruhe
 Reverse Transkriptase „SS-II“ Invitrogen, Karlsruhe
 25 mM dNTPs GE Healthcare, München
 0,1 M Dithiothreitol Invitrogen, Karlsruhe
 lineares Acrylamid Ambion, Darmstadt
 Hexanucleotid-Mix Roche, Mannheim
 Diethylpyrocarbonat (DEPC) Sigma-Aldrich, München
 RNAsin Promega, Mannheim

2.1.7.4 Quantitative Polymerasekettenreaktion

LightCycler® 96-Kammer-Platte Roche, Mannheim
 SYBRgreen I Sigma-Aldrich, München
 25 mM MgCl₂ Fermentas, St. Leon-Rot
 300 nM PCR-Primer Metabion, Martinsried
 10x-Taq-Puffer Fermentas, St. Leon-Rot
 25 mM dNTPs Fermentas, St. Leon-Rot
 PCR-Optimierungsreagenz Bitop AG, Witten
 Bovines Serumalbumin Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.8 Klonierung

One Shot™ Mach1™ T1 Phage-Resis-Thermofisher Scientific, Darmstadt
 tant Chemically Competent *E. coli*

QIAquick Gel Extraction Kit Quiagen, Venlo, Niederlande
 EndoFree Plasmid Maxi Kit Quiagen, Venlo, Niederlande
 InnuPREP Plasmid Mini Kit Analytik Jena, Jena, Deutschland
 Not1 Thermofisher Scientific, Darmstadt
 BSRG1 Thermofisher Scientific, Darmstadt
 AVR11 Thermofisher Scientific, Darmstadt
 Puffer 2.1 New England Biolabs, Ipswich, USA
 Puffer 3.1 New England Biolabs, Ipswich, USA
 Blasticidin Invivogen, San Diego, USA
 Doxycyclin Hyclate Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
 Hygromycin B Roche Diagnostics, Mannheim
 Puromycin Invivogen, San Diego, USA
 T4 DNA Ligase Puffer New England Biolabs, Ipswich, USA

2.1.8.1 Luria Bertani (LB) Medium (pro Liter H₂O)

10g Bacto Tryptone BD, Franklin Lakes, USA
 5g Hefeextrakt BD, Franklin Lakes, USA

10g NaCl Roth, Karlsruhe

2.1.8.2 SOC Medium (pro Liter H₂O)

20 g Bacto Tryptone BD, Franklin Lakes, USA

20mM Glucose Roth, Karlsruhe

5g Hefeextrakt BD, Franklin Lakes, USA

2,5mM KCl Roth, Karlsruhe

10mM MgCl Roth, Karlsruhe

10mM MgSO₄ Roth, Karlsruhe

10mM NaCl Roth, Karlsruhe

2.1.8.3 Einfriermedium (pro Liter H₂O)

132,3mM KH₂PO₄ Merck, Darmstadt

21mM Sodium Citrate x 2H₂O Merck, Darmstadt

3,7mM MgSO₄ x 7H₂O Roth, Karlsruhe

68,1mM (NH₄)₂SO₄ Roth, Karlsruhe

459,3mM K₂HPO₄ x 3H₂O Merck, Darmstadt

35,2% (w/v) Glycerol Roth, Karlsruhe

2.1.8.4 Puffer 1M (pro Liter H₂O)

5mM KCl Merck, Darmstadt

15mM MgCl Roth, Karlsruhe

120mM Na₂HO₄/NaH₂PO₄, pH7.2 Merck, Darmstadt

50mM Mannitol Merck, Darmstadt

2.1.8.5 6x Loading Buffer für Agarose Gels

0,25% (w/v) Bromphenol Blue Roth, Karlsruhe

0,25% (w/v) Xylen-Cyanol FF Merck, Darmstadt

30% (v/v) Glycerol Roth, Karlsruhe

2.1.8.6 10x Annealing Buffer

100 mM Tris-HCl Roth, Karlsruhe

1 M NaCl Roth, Karlsruhe

10 mM EDTA Roth, Karlsruhe

2.1.9 Basischemikalien

Aceton Merck, Darmstadt

Agarose ultrapure Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

Ammoniumchlorid Merck, Darmstadt

Borsäure Merck, Darmstadt

Dinatriumhydrogenphosphat Merck, Darmstadt

Ethidiumbromid Merck, Darmstadt

2.1.12.2 ELISA-Geräte

ELISA-Lesegerät Tecan, GENios Plus	Tecan, Crailsheim
ELISA-Platten Spüler ELx50	BioTek, Bad Friedrichshall

2.1.12.3 Zellkultur

CoolCell® Cell Freezing Containers	Biocision, Mill Valley, USA
Sterilwerkbank Class II, Typ A/B3	Baker Company, Sanford, USA
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Zellinkubator Type B5060 EC-CO2	Heraeus Sepatech, Osterode

2.1.12.4 Nukleinsäure-Analysen

Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermoschüttler UNO-II	Biometra, Göttingen
Photometer Ultrospec 1000	Amersham, Freiburg
LightCycler 480 PCR-Gerät	Roche Diagnostics, Mannheim
Mastercycler Pro	Eppendorf, Hamburg

2.1.12.5 Zentrifugen

Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5418	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech, Osterode

2.1.12.6 Waagen

Waage BP 110S	Sartorius, Göttingen
Waage Mettler PJ 3000	Mettler Toledo, Gießen

2.1.12.7 Sonstige Geräte

Mikrowelle	Severin, Sundern
Pipetten Pipetman® P	Gilson, Middleton, USA
Pipettenspitzen Typ Gilson®	Peske, Aindling-Arnhofen
pH meter WTW	WTW GmbH, Weilheim
Vortex Genie 2™	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad HI1210	Leica Microsysteme, Solms

2.1.13 Software

ImageJ	University of Wisconsin-Madison, Madison, USA
Prism	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
Snappgene Viewer	GSL Biotech LLC, Chicago, USA
Microsoft Excel, Word	Microsoft Corp., Redmond, USA
R	https://www.r-project.org
Bioconductor Package	https://www.bioconductor.org

2.2 Methoden

2.2.1 Klonierung

Für schnelle Analysen der IL-22R/pSTAT3 Achse sollte ein einfach handhabbares System erstellt werden, das auch sequentielle Analysen und Medikamententestung ermöglicht. Für die Signaltransduktion von IL-22 ist die IL22RA1 Kette entscheidend, wobei eines der wichtigsten Targets STAT3 ist, das phosphoryliert wird. Somit sollte ein IL22RA1 Expressionsplasmid erstellt werden und zur Messung der Aktivierung des Pathways ein pSTAT3-Reporter. Zur Herstellung des pSTAT3-Reporter Elementes wurde auf einfache Ligation zurückgegriffen, während für das IL22RA1 Expressionsplasmid die *Gateway Cloning* Methode verwendet wurde. Im Folgenden werden zunächst allgemeine Methoden erklärt, die für die verschiedenen Klonierungstechniken verwendet wurden und anschließend auf Besonderheiten näher eingegangen.

2.2.1.1 Transformation in *E. coli* Mach 1

E. coli wurden vorsichtig auf Eis aufgetaut und 50 ng Plasmid zu den Bakterien hinzupipettiert. Nach einer 30 minütigen Inkubationszeit auf Eis wurden die Bakterien für 30 Sekunden bei 42°C hitzegeschockt. Dabei nimmt ein Teil der Bakterien das Plasmid auf. Anschließend werden die Bakterien sofort zurück auf Eis gebracht und 250 µl S.O.C. Medium hinzugefügt. Das Eppendorfgefäß mit den Bakterien wird im Anschluss eine Stunde lang bei 37°C auf dem Thermoschüttler inkubiert. Dann werden die Bakterien auf einer Platte mit entsprechendem Selektionsmedium ausgestrichen, um monoklonale Kolonien zu erhalten.

2.2.1.2 Mini Prep

E. coli Bakterien wurden in 1,5 ml Vollmedium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum bei 37°C über Nacht vermehrt. Anschließend wurde die Suspension in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und eine Minute zentrifugiert, bis sich ein Bakterienpellet gebildet hat. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet wurde gemäß Herstellerangaben in 250 µl Resuspensionspuffer resuspendiert. Anschließend wurde zur Lyse der Bakterien 250 µl Lysierungspuffer zugegeben, für fünf Minuten inkubiert und dann weitere 350 µl Neutralisationspuffer hinzugefügt. Nach dem darauf folgenden Zentrifugationsschritt befindet sich das Plasmid in der flüssigen Phase und kann in Filterröhrchen abpipettiert werden. Das Plasmid bindet dabei an die Säulen und der

Überstand kann abzentrifugiert werden. Nach jeweils einem Waschschrift mit Washing solution A und Washing solution B wurde das Plasmid aus den Membranen mit *Elution Buffer P* herausgewaschen und mit Hilfe des Nanodrops wurde die Konzentration des Plasmids bestimmt.

2.2.1.3 Maxi Prep

E. coli Bakterien wurden über Nacht in 50 ml LB Medium im Thermoschüttler bei 37°C vermehrt. Am nächsten Tag wurden zunächst 900 µl *E. coli* Suspension abpipettiert und wie im folgenden Abschnitt beschrieben für die Kryokonservierung vorbereitet. Der übrige Teil wurde bei 6000 x g für 15 Minuten bei 4°C als Pellet abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Bakterienpellet wurde anschließend gemäß Herstellerangaben mit 10 ml *P1 Buffer* resuspendiert. Anschließend wurden 10 ml Buffer P2 hinzugefügt und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert, woraufhin weiter 10 ml gekühlter *P3 Buffer* zugefügt wurde. Anschließend wurde das Zelllysat filtriert und das Filtrat mit 2,5 ml *ER Buffer* für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein QUIAGEN-Tip 500 mit 10 ml *QBT Buffer* equilibriert, woraufhin das Lysat durch die Säulen des QUIAGEN-Tip laufengelassen wurde. Hierbei bindet die DNA an die Säulen. Es folgten mehrere Waschschriffe mittels *QC Buffer*. Anschließend wurde die DNA wieder mittels 15 ml *QN Buffer* von den Säulen gelöst und in ein 50 ml Eppendorftube aufgefangen. Mit Hilfe von 10,5 ml Isopropanol wurde die gelöste DNA wieder präzipitiert und dann durch Zentrifugation bei 15000 g für 30 Minuten bei 4°C abpelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen. Mit 5 ml 70% Ethanol wurde das Pellet resuspendiert und damit gewaschen. Mittels eines weiteren Zentrifugationsschrittes (15000 g für 30 Minuten bei 4°C) wurde wiederum ein DNA-Pellet gewonnen, das nach Verwerfen des Überstandes luftgetrocknet wurde. Anschließend wurde die gewonnene DNA in *TE Buffer* resuspendiert und zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.1.4 Kryokonservierung der plasmidtragenden *E. coli*

Von jedem *E. coli* Ansatz für den Maxi Prep wurden zuvor 900 µl *E. coli* Suspension abpipettiert und mit 100 µl Einfriermedium in ein Kryoröhrchen gemischt. Das Kryoröhrchen wurde mittels einer Freezingbox langsam auf -80°C gekühlt und bei dieser Temperatur für weitere Experimente gelagert.

2.2.1.5 Schneiden mit Restriktionsenzymen

Zur Ergebniskontrolle wurden mit jedem Plasmid Testverdauungen durchgeführt. Dabei wurde 1 µg Plasmid mit Restriktionsenzym und Puffer in den vom Hersteller angegebenen Dosierungen zusammengefügt. Anschließend wurde der Mix 60 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Die Auswahl der Enzyme erfolgte mit Hilfe der Website des New England Biolabs und es wurde dabei vor allem auf die Methylierungsempfindlichkeit der Enzyme geachtet. Anschließend wurden soweit möglich immer Enzymkombinationen gewählt, die mit dem gleichen Puffer verwendet werden können.

2.2.1.6 Agarosegelelektrophorese

Zunächst wurde eine 0,6 prozentige Agaroselösung hergestellt und auf 100°C erhitzt. Das erhitzte Gel wurde in die Kammern gegossen und ein Kamm hineingestellt, um später Taschen zum Beladen zu erhalten. Nach vollständigem Abkühlen des Gels wurden die Kämmen entfernt, und mit TBE Puffer (90mM Tris, 2 mM Borsäure und mit EDTA auf pH 8,0 adaptiert + 0,5% Ethidiumbromid) übergossen. Jede Tasche wurde mit 5µl Plasmid und 1 µl Ladepuffer (makroskopisch sichtbar) gefüllt, wobei in einer Tasche statt Plasmid ein Standard mitlief. Anschließend wurde 160 V Spannung angelegt und gewartet, bis der Ladepuffer 70% des Gels überschritten hat. Die verschiedenen Banden wurden mittels UV-Lichts visualisiert und fotografiert.

2.2.1.7 Klonierung des pSTAT3 Reporter Plasmids

Für die Experimente wurde auf eine Codon optimierte Version der Luciferase aus *Gaussia princeps* zurückgegriffen, die extrazellulär sezerniert wird, um sie im Zellkulturüberstand messen zu können. Folgende Schritte wurden zur Generierung des pSTAT3 Reporter Plasmids durchgeführt. Zunächst wurden beide Oligonucleotide annealt, damit sie einen Doppelstrang bilden. Anschließend erfolgte die Ligation dieses Doppelstranges in einem zur Verfügung gestellten und optimierten Backbone, der bereits wichtige Sequenzen wie die *Gaussia*-Luciferase aufweist.

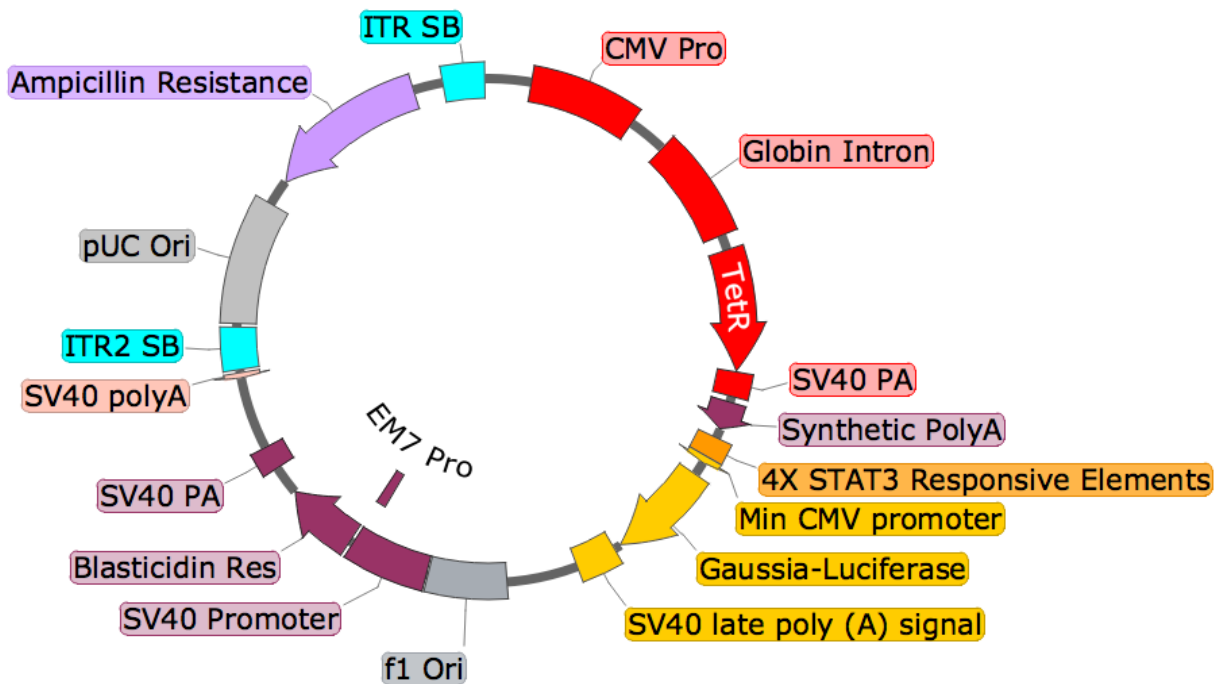


Abb 2-1 pSTAT3 Reporter Plasmid

In Orange: vier hintereinander geschaltete pSTAT3 Bindungssequenzen, daran anschließend in gelb ein Min CMV Promoter, der eine niedrige Basalaktivität aufweist. Bindet pSTAT3 an die pSTAT3 bindenden Sequenzen, wird die Promoteraktivität verstärkt und vermehrt Gaussia-Luciferase gebildet.

2.2.1.7.1 Annealing der beiden Oligonukleotide

Zunächst wurden die beiden beschriebenen Oligonukleotide jeweils auf eine Konzentration von 200 μM mit RNA-freiem Wasser verdünnt. Anschließend wurde die Annealingreaktion angesetzt, indem jeweils 5 μl des Forward beziehungsweise Reverse STAT3 inserts zusammen mit 2 μl 10X *Annealing Buffer* und 8 μl H_2O in ein Eppendorfgefäß pipetiert wurde. Dann wurde bei 98°C für vier Minuten im Thermomixer inkubiert. Bei der Abkühlung auf Raumtemperatur lagerten sich die Einzelstränge dabei komplementär aneinander.

2.2.1.7.2 Ligation in pcDNA-Gluc3-CMVMin-backbone

Der gewonnene Annealing Mix wurde 1:31 verdünnt. Anschließend wurden 5 μl des verdünnten Annealing Mixes mit 3 μl (entspricht 500 ng) geschnittenem Backbone (PstI und XhoI verdaut), 1 μl T4 Ligase Puffer und 1 μl T4 DNA Ligase zusammen in einem Eppendorf über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Plasmide wie beschrieben in *E. coli* transformiert.

2.2.1.7.3 Testverdau des pSTAT3 Reporter Plasmids

Der Testverdau des pSTAT3-Reporter Plasmids wurde mit 0,3 µl BsrGI, 0,3 µl NotI, 1 µl Puffer 2.1 und 5,4 µl H₂O durchgeführt.

2.2.1.8 Gateway Cloning zur Herstellung eines IL22RA1 Expressionsplasmids

Gateway Cloning ist eine Klonierungsmethode, die von der Firma Invitrogen entwickelt wurde und eine Weiterentwicklung der klassischen Klonierung mittels Restriktion und Ligation darstellt. Das Verfahren ermöglicht so einen schnellen und sehr effektiven Austausch von DNA-Fragmenten zwischen Plasmiden (Hartley et al., 2000). Bei Lambda Phagen war ein sequenzspezifischer Rekombinationsprozess beobachtet worden, der über *att*-Bindestellen gesteuert wird. Lambda Phagen können so ihre DNA in die DNA von *E. coli* integrieren. Wichtige Enzyme, die diesen Prozess steuern, sind die phageneigene *Integrase* (Int) und die *Integration Host Factor* (IHF) Proteine der *E. coli*-Bakterien für den lysogenen Weg (BP-Reaktion) sowie lambda Int, Excisionase (Xis) Proteine und IHF Proteine für den lytischen Weg (LR-Reaktion). *Gateway Cloning* benutzt nun diese Enzyme beziehungsweise leichte Modifikationen von ihnen, um zu klonierende DNA Fragmente in vorgefertigte Backbones zu klonieren.

Tab. 2-2 Enzyme und Bindungsstellen für BP- und LR-Reaktion

Zyklus	Reaktion	Catalysiert von
Lysogen	$attB \times attP \rightarrow attL \times attR$	BP Clonase™ (Int, IHF)
Lytisch	$attL \times attR \rightarrow attB \times attP$	LR Clonase™ (Int, Xis, IHF)

Phagen Proteine: Integrase (Int), Excisionase (Xis), *E. coli* Proteine: Integration Host Faktor (IHF). [Modifiziert nach (Hartley et al., 2000)].

Gateway Cloning umfasst drei wichtige Schritte (siehe Abbildung 2-3), nämlich die Herstellung eines PCR Fragmentes, die Erzeugung eines Entry Clones durch die BP-Reaktion und Erzeugung eines Expressionsplasmides mittels LR-Reaktion.

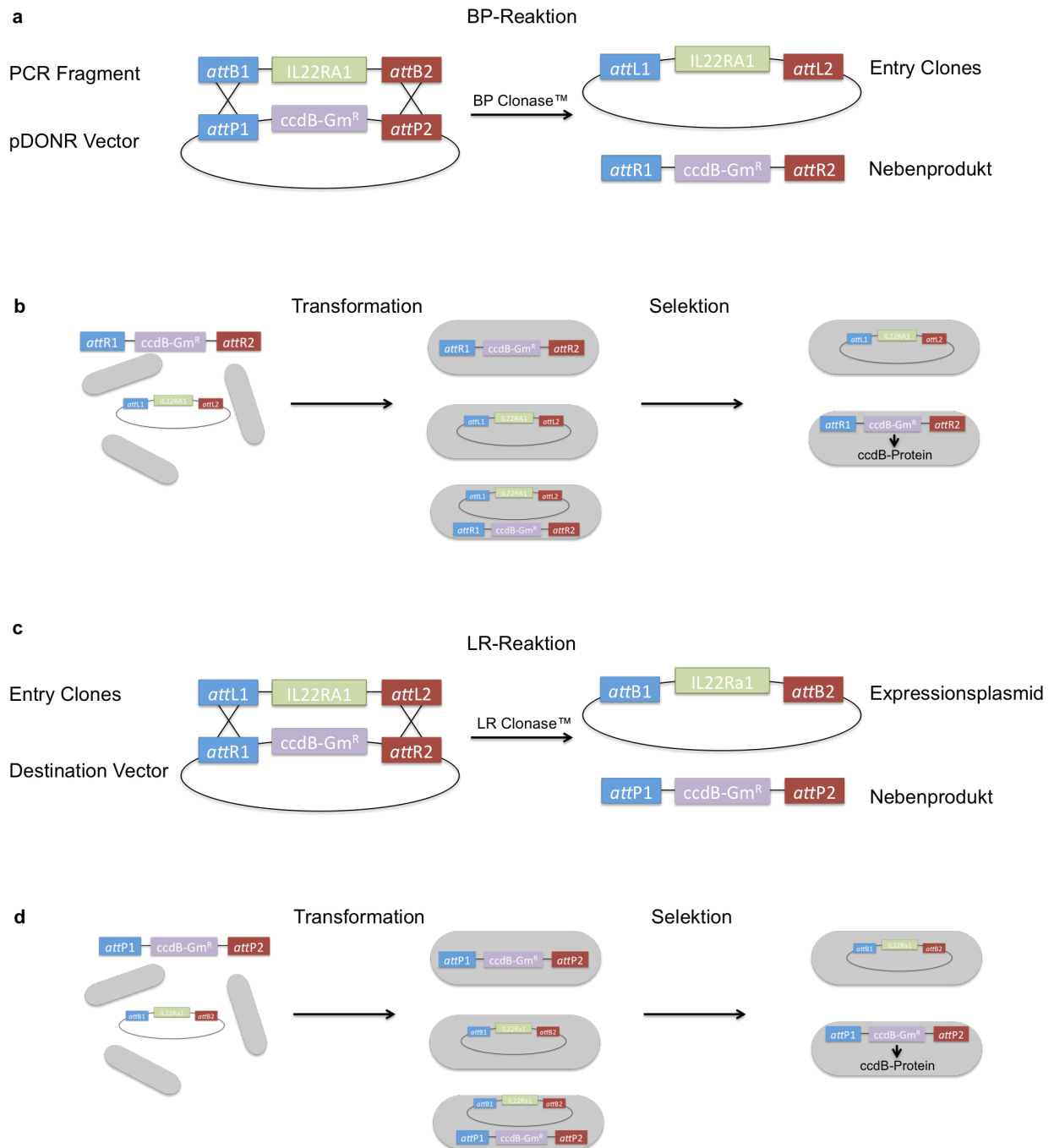


Abb. 2-3 Gateway Cloning

In Grau: *E. coli* Bakterien; Abk.: ccdB-Gm^R: Selbstmordgen, [Modifiziert nach (Hartley et al., 2000)]

Im ersten Schritt des *Gateway Clonings* werden *PCR Fragmente* benutzt, die das Gene of interest besitzen und das an beiden Seiten von zwei spezifischen Sequenzen flankiert wird. Als Ausgangsmoleküle für die PCR können Plasmide aus cDNA Bibliotheken benutzt werden, die das Gene of interest besitzen. Die PCR wird mit Primern durchgeführt, die an den überlappenden Enden die 25 bp lange att-Bindestellen enthalten sowie 18 – 25 bp des Gene

of interest. Somit enthält jedes PCR Fragment am Ende das zu klonierende Gen, das an beiden Seiten von att-Bindestellen flankiert wird.

Ist das PCR Fragment hergestellt, findet in der *BP Reaktion* ein DNA Austausch zwischen PCR Fragment und pDonor Vektor statt, wobei die attB an die entsprechenden attP-Bindestellen binden. Der pDONR Vektor enthält attP-Bindestellen, die meist zwei Selektionsmarker des Vektors flankieren. Das ccdB Protein als wichtigster negativer Selektionsmarker interferiert mit der *E. coli* Gyrase und verhindert so das Wachstum der meisten *E. coli* Stämme. Daneben besitzen Gatewaykassetten das Choramphenicol-Resistenzgen (Cm^R), das ebenfalls in pDONR Vektor und Destination Vector zwischen beiden attP-Bindestellen zu finden ist. Darüberhinaus besitzen die verwendeten pDONR Vektoren weitere Selektionsmarker außerhalb der attB-Kassette, um mit den Plasmiden auch eine positive Selektion durchführen zu können. In der BP-Reaktion entstehen nun ein Entry Clone, der attL-Bindestellen besitzt, und ein Nebenprodukt mit attR-Bindestellen. Wie in Abb. 2-3 zu sehen ist, kommt es dabei zu einem Austausch des Zielgens mit dem Selbstmordgen ccdB. Im Anschluss werden die entstandenen Plasmide in *E. coli* Zellen transformiert. Bakterien, die das Nebenprodukt enthalten, werden absterben (negative Selektion) und Bakterien mit Entry Clone können proliferieren. Da der Entry Clone noch ein zusätzliches Resistenzgen trägt, können die Entry Clone tragenden Bakterien positiv selektioniert werden.

In der *LR-Reaktion* kommt es im nächsten Schritt zu einem Austausch zwischen Entry Clone (attL) und Destination Vector (attR). Hierbei entstehen ein Expressionplasmid, das wiederum attB-Bindestellen hat, sowie ein Nebenprodukt mit attP-Bindestellen. Wie in der BP-Reaktion wird das Zielgen gegen das Selbstmordgen ccdB ausgetauscht und in der anschließenden Selektion können analog zur BP-Reaktion die entsprechenden expressionplasmidtragenden Bakterien selektioniert werden.

2.2.1.8.1 PCR mit Gateway Primern

IL22RA1 tragende *E. coli* wurden aus dem Kryostock auf einer Ampicillin-Agarplatte ausgestrichen. Anschließend wurden wie beschrieben Mini Preps angesetzt. Die hierbei gewonnene DNA wurde im Folgenden als Template verwendet für die PCR wurde jeweils 9 µl Puffer (5x), 6 µl dNTPs (1,25 mM), 9 µl Fw-Primer, 9 µl RV-Primer, 2,25 µl Phusion DNA Polymerase, 500 ng Template und mit H₂O auf 25 µl Gesamtvolumen in speziellen PCR-Tubes zusammengebracht. Anschließend wurde die PCR gestartet, indem der Mastercycler

zunächst 5 Minuten bei 98°C gestartet wurde, dann 30 Zyklen jeweils 30 Sekunden 98°C, 58°C und 72°C. Abschließend folgt eine zehn Minuten lange Inkubation bei 72°C und die PCR Produkte wurden im Anschluss bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

2.2.1.8.2 BP-Reaktion IL22RA1

Anschließend wurden die in der PCR gewonnenen DNA Fragmente für die BP-Reaktion verwendet. Jeweils 100 ng PCR-Produkt und 100 ng pDONRTM Vektor wurden in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit TE Puffer auf 8 µl aufgefüllt, anschließend wurde die BP-Reaktion durch das Hinzufügen von 2 µl BP Clonase II Enzyme Mix gestartet und bei 25 °C eine Stunde inkubiert. Mittels Inkubation mit 1 µl Proteinase K Solution für 10 Minuten bei 37°C wurde die Reaktion gestoppt. Im Anschluss wurde der gewonnene Plasmid Mix wie beschrieben in *E. coli* transformiert und nach Plasmidaufreinigung Testverdaue durchgeführt. Hierzu wurden 0,3 µl PstI, 1 µl Puffer 3.1 sowie 5,7 µl H₂O als Reaktionsansatz verwendet und der Testverdau wie beschrieben durchgeführt.

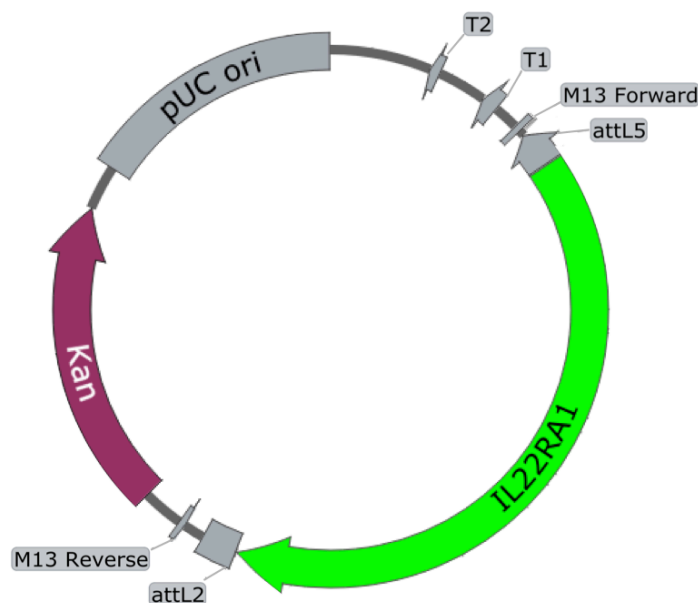


Abb. 2-4 IL22RA1 Entry Clone

2.2.1.8.3 LR-Reaktion IL22RA1

Gemäß Herstellerangaben wurden 50 ng des IL22RA1-Entry Clones zusammen mit 100 ng des Destination Vectors in TE Puffer (ph 8) auf ein Volumen von 8 µl verdünnt. Anschließend wurden 2 µl LR Clonase Plus Enzyme Mix hinzugefügt. Dann wurde der Ansatz bei 25°C für 16

Stunden inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde 1 µl Proteinase K Lösung hinzugefügt und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die gewonnenen Plasmide in *E. coli* wie beschrieben transformiert. Zur Kontrolle wurde mit 0,3 µl BSR GI, 0,3 µl Bam HI, 1 µl Puffer 3.1 sowie 3 µl H₂O Testverdaue durchgeführt.

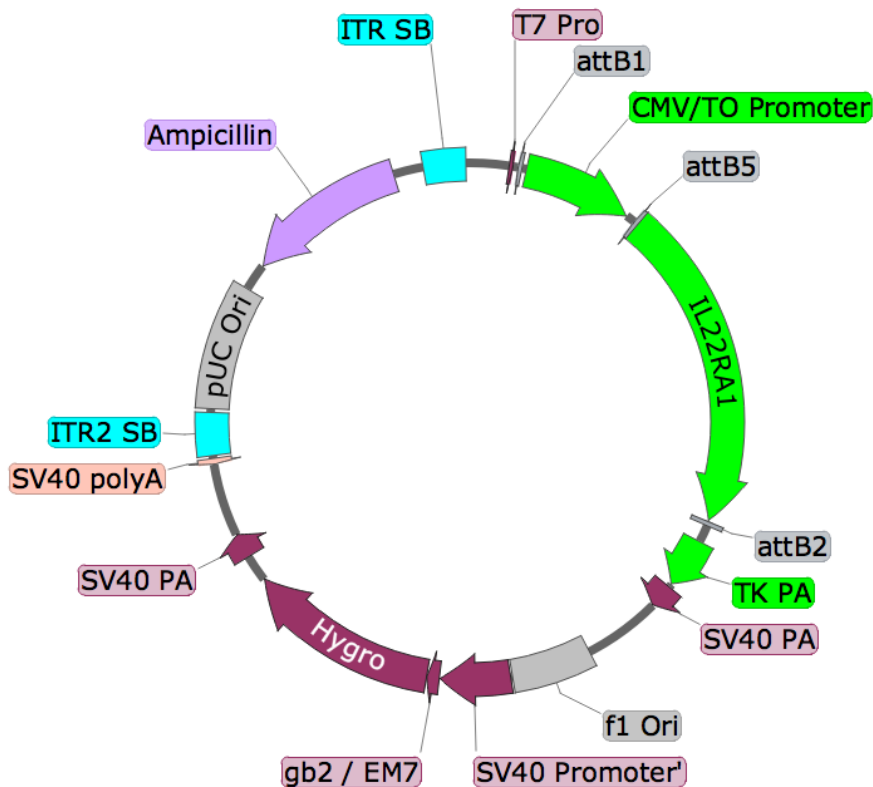


Abb. 2-5 IL22RA1 Expressionsplasmid

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Verwendete Zelllinien

Alle Zelllinien wurden vor Beginn der Experimente mittels Mycoplasma Detection Kit auf Kontamination mit Mycoplasmen getestet.

Tab. 2-6 Murine Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	ATCC
Renca	Spontan entstandener Tumor in Balb/c Mäusen	ATCC CRL-2947
MTC	Meduläre Tubulusepithelzelle	
GEC	Glomeruläre Epithelzelle	-
3T3	Fibroblast	-

Tab. 2-7 Humane Zelllinien

Name	Stadium	TNM	Grading	Charakteristika	ATCC
MZ1774 Caki-1	II	pT2pN0pM0	3	49, männlich, Kaukasier	ATCC HTB-46
MZ1879 A498	III	pT3b, pN0pM0	3	52, männlich	- ATCC HTB-44
KTCTL-2 Caki-2		pT3a, N1, Mx	2	weiblich 69, männlich, Kaukasier	ATCC HTB-47
RCC26	I	pT1N0M0G2	2		-
KTCTL-26		pT2a, M1	2	69, männlich, Kaukasier	-
KTCTL-1M		pT2, N1, Mx	2 bis 3		-
MZ1790	II	pT2pN0pM0	3		-
RCC 53	IV	pT2N1MxG2-3	2 bis 3	Lungenmetastase eines Nierenzellkarzinoms	-
HK-2	-	-	-	Proximale Tubuluszellen, mit HPV-16 immortalisiert	ATCC CRL-2190

2.2.2.2 Allgemein

Alle Zelllinien wurden sofern nicht anders angegeben in DMEM + 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und alle drei Tage eins zu zehn gesplittet. Zellen wurden aus der exponentiellen Wachstumsphase heraus bei 80-90% Konfluenz für die folgenden Experimente verwendet.

2.2.2.3 Trypsinieren von Zellen

Adhärenz wachsende Zellen müssen, um sie für Experimente verwenden zu können, vom Boden der Zellkulturplatte gelöst werden. Hierbei wurde auf die Endoprotease Trypsin zurückgegriffen, die Proteine spezifisch am C-terminalen Ende der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin scheidet. Zunächst wird das Zellkulturmedium entfernt. Im Anschluss wird der Zellmonolayer mit 10 ml PBS einmal vorsichtig gespült, um das Trypsin-inhibierende Serum vollständig zu entfernen. Im Anschluss werden 4 ml Trypsin hinzugefügt und für fünf Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Im Anschluss werden durch vorsichtiges Klopfen am Zellkulturschalenrand die restlichen Zellen abgelöst, Trypsin wird durch die Zugabe von 8 ml Vollkulturmedium (RPMI beziehungsweise DMEM + 10% FCS) inhibiert und die Zellen können für weitere Arbeitsschritte verwendet werden.

2.2.2.4 Quantifizierung vitaler Zellen

Die zu quantifizierenden Zellen wurden zunächst wie beschrieben vom Boden abgelöst und zentrifugiert. Im Anschluss wurden sie in 2 ml Medium resuspendiert. 10 µl dieser Suspension wurden in eine bereitstehende 96-Well Zellkulturplatte überführt und mit 90 µl Trypanblau gemischt. 10 µl dieser Suspension wurden nun auf eine Neubauerzellkammer gemäß Herstellerangaben aufgebracht. Jeweils vier Felder à 16 Quadrate wurden ausgezählt. Trypanblau kann nur die Zellmembran toter Zellen passieren, womit eine Differenzierung zwischen lebenden Zellen (ungefärbt) und toten Zellen (blau) möglich ist. Die Zellzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

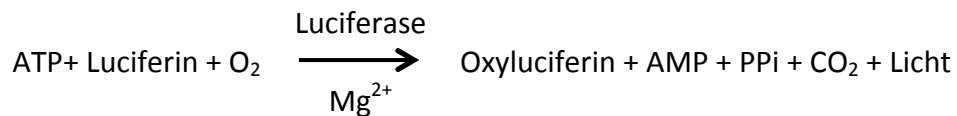
$$\text{Zellzahl} = 10 \times 10^4 \times (\text{Anzahl ungefärbter Zellen}) / (\text{Anzahl der gezählten Felder})$$

2.2.2.5 Einfrieren, Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zellen wurden zunächst wie oben beschrieben abgelöst und quantifiziert. Im Anschluss wurden die Zellen abzentrifugiert und in Einfriermedium (90% FCS + 10% DMSO) resuspendiert. Pro Kryoröhrchen wurden $5-10 \times 10^6$ Zellen pro 1,5 ml Einfriermedium eingefroren. Um den Einfrierprozess möglichst langsam und damit zellschonend zu gestalten, wurden die Kryoröhrchen zunächst in einer CoolCell® Einfrierbox in den -80°C kalten Kühlschrank gestellt. Die Kryobox bewirkt ein verlangsamtes und standardisiertes Einfrieren von 1°C pro Minute. Auf diese Art eingefrorene Kryoröhrchen wurden nach 24 Stunden zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff transferiert. Zum Auftauen wurden die Tubes direkt in ein 37°C warmes Wasserbad gegeben und anschließend direkt in Zellkulturschalen mit Vollmedium gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach zwölf Stunden wurde das Medium gewechselt, um das membrantoxische DMSO aus der Zellkultur zu entfernen.

2.2.2.6 Testung auf Mycoplasmenkontamination

In regelmäßigen Abständen wurden alle verwendeten Zelllinien auf Kontamination mit Mycoplasmen getestet. Der Test beruht auf der Umwandlung von ADP zu ATP durch mycoplasmeneigene Enzyme. In einem zweiten Schritt wird das gebildete ATP durch folgende Reaktion umgesetzt, wobei Licht gebildet wird, das vom Lumimeter gemessen werden kann:



Gemäß Herstellerangaben wurde hierzu 2 ml Zellkulturüberstand von Kulturen, die mindestens 24 Stunden inkubiert worden sind, in ein 2 ml Eppendorfgefäß abpipettiert. Dieses wurde bei 200 g für 5 Minuten zentrifugiert, um eventuelle Zellen am Boden als Pellet abzuzentrifugieren. Im Anschluss wurden in einem Lumimetertube 100 µl MycoAlertTM PLUS Reagent mit 100 µl Zellkulturüberstand zusammen für 5 Minuten inkubiert. Dann erfolgte die erste Messung (Messung A) mittels Lumimeter und es wurden 100 µl MycoAlertTM PLUS Substrate zu jedem Tube hinzupipettiert. Nach 10 Minuten Inkubation erfolgte die zweite Messung (Messung B) im Lumimeter. Anschließend wurde die Ratio der beiden Messungen gebildet (Ratio = Messung B/Messung A). Werte kleiner als 1 wurden als Mycoplasmen frei interpretiert, bei Werten zwischen 1 und 1,2 wurde der Test wiederholt und Ratios über 1,2 wurden als kontaminiert betrachtet. Als Kontrollen wurden immer mit Mykoplasmen kontaminierter Zellkulturüberstand (Positivkontrolle) und frisches Medium alleine (Negativkontrolle) verwendet.

2.2.2.7 Invasivitätsassays

Für die Untersuchung von Invasivität der Zellen wurden sterile IBIDI Zellkultur Inserts verwendet, die vor den Experimenten in 12-Well Plates überführt wurden. Am Boden des Wells wurde mit Folienstift eine senkrecht zu den Taschen verlaufende Linie zur Orientierung gezogen. In Vorexperimenten wurde die Zellzahl pro Kammer optimiert und schließlich auf 25.000 Zellen festgelegt. Die Zellen wurden trypsinisiert und abzentrifugiert und im Anschluss gezählt. Zellzahl wurde in DMEM + 5% FCS in einer Konzentration von 25.000 Zellen/70 µl resuspendiert. Jeweils 70 µl Zellsuspension wurden in jede Kammer gegeben und Zellen konnten über zwölf Stunden am Boden festhaften. Anschließend wurden die Cell culture inserts mit einer sterilen Pinzette entfernt und die Wells zweifach mit 1x PBS gespült, um nichthaftende Zellen zu entfernen. Im Anschluss wurden 0,5 ml DMEM als Negativkontrolle, DMEM + 1 ng/ml IL-22 bzw 10 ng/ml und DMEM + 10% FCS in die entsprechenden Wells gegeben. Direkt im Anschluss wurden am Lichtmikroskop Aufnahmen von jedem Well gemacht (t0), wobei pro Well jeweils ein Bild oberhalb der Markierung und eines unterhalb der Markierung gemacht wurde. Aufnahmen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten wiederholt. Die zellfreie Fläche wurde im Anschluss mit ImageJ vermessen.

2.2.2.8 Hypoxieassays

In Vorexperimenten wurde die effektivste Induktion von Hypoxie getestet. Hierzu wurde Hypoxie im Inkubator (1% O₂), in Hypoxiekammer (0% O₂) und chemisch mit CoCl₂ hergestellt. Im Inkubator besteht die Gaszusammensetzung aus 1% O₂, 5% CO₂ und 86% N₂. Die besten Ergebnisse wurden im Inkubator bei einer Hypoxiezeit von 48 Stunden erzielt und wurden als die am besten die biologische Situation abbildende Methode angesehen. Alle Zelllinien wurden in einer Anzahl von 5000 Zellen/90 µl DMEM/Well in 96-Well Plates ausgebracht und 6 Stunden serumfrei inkubiert. Im Anschluss wurde in jedes Well 10 µl Stimulationsmedium in entsprechender Konzentration hinzugefügt und für 48 Stunden bei 1% O₂ inkubiert. Danach wurde die Zellkulturplatte zentrifugiert, der Zellkulturüberstand in eine andere 96-Well Platte überführt und per LDH Assay Zelltod bestimmt.

2.2.2.9 Medikamententherapie

Für die Simulation der Medikamententherapie wurden von jeder Zelllinie 5.000 Zellen pro Well in 100 µl DMEM + 5% FCS über Nacht in 96-Well Zellkulturplatten ausgebracht und am nächsten Tag für sechs Stunden serumfrei kultiviert. Hierzu wurde das alte Medium vorsichtig abpipettiert und durch 80 µl DMEM ersetzt. Nach Ablauf der serumfreien Kultivierung wurden 10 µl Stimulationsmedium (DMEM+ 100 ng/ml IL-22 beziehungsweise DMEM als Kontrolle) hinzugefügt und für 30 Minuten im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Anschließend wurden 10 µl DMEM mit der jeweiligen Konzentration des Medikaments hinzugefügt, so dass die zuvor getesteten Endkonzentrationen erreicht wurden. Anschließend wurden die Zellkulturplatten bei 37°C und 5% CO₂ für 24 Stunden inkubiert. Die Experimente wurden beendet durch Abzentrifugieren der Platten und Überführen des Zellkulturüberstandes in eine separate 96-Well Platte. Der Zelltod wurde dann mit Hilfe des LDH Assays bestimmt.

2.2.2.10 Zellstimulation für mRNA Expressionsanalyse

HEK293 Zellen und HEK293 (pSTAT3, IL22RA1) wurden in einer Dichte von 10⁶Zellen/Well in 6-Well Plates ausgebracht und über Nacht in DMEM + 10% FCS anwachsen gelassen. Sobald die Zellen 90% Konfluenz erreicht hatten, wurde das Medium gegen serumfreies DMEM Medium gewechselt und die Zellen wurden für vier Stunden serumfrei kultiviert. Um eine Überexpression des IL22RA1-Proteins zu erreichen wurde in den entsprechenden Wells

Doxycyclin zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 1 µg/ml erreicht wurde. Nach vier Stunden wurde rh IL-22 zur Stimulation hinzugegeben, wobei eine Konzentration von 50 ng/ml erzielt wurde. Als Kontrolle dienten jeweils serumfreie HEK293 Zellen. Am Ende dieser vierstündigen Stimulation wurde das Medium abgesaugt und 350 µl *Lysis Buffer* zugegeben. Bis zur Isolation der mRNA wurden die Zellkulturplatten bei -20°C gelagert.

2.2.2.11 3D Zellkultur

Grundvoraussetzung für die Generierung von Sphären aus normalerweise adhären wachsenden Zellen ist die Schaffung von Zellkulturbedingungen, die den Zellen keine Oberfläche zum Anwachsen bieten. Wenn Zellen keine Oberfläche zum Anwachsen finden, können sie jedoch weiterhin mit anderen Zellen Zellkontakte ausüben. Nach Vorexperimenten wurde sich gegen die Hanging Drop Methode und für die Verwendung von pHEMA (Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)) beschichteten Platten entschieden. Für die Herstellung von pHEMA beschichtete Platten wurden zunächst 2 mg pHEMA in 100 ml 96% Ethanol gelöst und 2 ml auf 3-cm-Platten ausgebracht und eintrocknen gelassen. Dieser Vorgang wurde ein zweites Mal wiederholt. Im Anschluss wurden die Platten zur Sterilisation für 30 Minuten unter UV-Licht gestellt und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Für die Generierung von dreidimensionalen Tumorsphären wurden in Kultur befindliche Renca Zellen verwendet. Die Renca Zellen wurden auf die vorbereiteten pHEMA Platten in einer Dichte von 5.000 Zellen pro Platte ausgebracht und für 14 Tage in 5ml RPMI + 10% FCS kultiviert. Das Medium wurde alle fünf Tage ersetzt.

2.2.2.12 Live Cell Imaging von Renca Sphären

Die so generierten Renca Sphären sollten auf das Vorliegen eines nekrotischen Zentrums getestet werden. Die Idee hierbei ist, dass man mit Hilfe zweier Fluorophore zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden kann. Hoechst 33342 bindet DNA und kann somit verwendet werden, um Zellen zu markieren. Zur Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen wurde Propidiumiodid (PI), ein Farbstoff, der permeabilisierte Membranen toter Zellen durchdringen kann, verwendet. Die Emissionsspektren beider Farbstoffe (Hoechst 33342: 460-480 nm; PI: 590 nm) unterscheiden sich deutlich, so dass sie durch Einsatz zweier Filter einfach unterschieden werden können. Zunächst wurden die Sphären für zwölf Stunden mit 1 µg/ml Hoechst 33342 und 10 µg/ml PI in RPMI+10% FCS bei 37°C kultiviert.

Anschließend wurde die Zellkulturschale vorsichtig am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Hierbei wurden Filter von 470 nm Wellenlänge zur Detektion von Hoechst 33342 und 610 nm Wellenlänge zur Detektion von PI verwendet. Es wurden Bilder mit jedem Filter aufgenommen und anschließend mit Hilfe der ImageJ-Software fusioniert und analysiert.

2.2.2.13 CMFDA Markierung von *Bone marrow derived dendritic cells* (BMDCs)

Um das Invasionsverhalten von BMDCs zu untersuchen wurden BMDCs wie beschrieben gewonnen. Zunächst wurde die Zellkulturplatte mit den BMDCs mehrfach mit PBS gespült. Anschließend wurde CMFDA auf 5 μ M in DMEM verdünnt und BMDCs wurden hiermit für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde die CMFDA-Lösung entfernt und durch Vollmedium ersetzt. Nach 30 Minuten haben die Zellen den aufgenommenen CMFDA Farbstoff oxidiert und können unter dem Fluoreszenzmikroskop geprüft werden. Hierbei kann CMFDA mittels des dritten Filters mit 525 nm Wellenlänge von Hoechst und PI unterschieden werden.

2.2.2.14 Transfektion

Zur Transfektion der Zellen wurde auf das Nucleofector Amaxa System zurückgegriffen, das auf dem Prinzip der Elektroporation beruht (Maasho et al., 2004). Dabei wird mittels eines Kondensators elektrische Spannung erzeugt, die in die Membran der zwischen den Kondensatorplatten liegenden Zellen zeitlich begrenzt permeabilisiert. Dabei gehen die Zellen teilweise zu Grunde, weshalb für die Wahl des Transfektionsprogrammes ein Kompromiss zwischen Vitalität der Zellen und Effizienz eingegangen werden muss. Zur Testung der Transfektionseffizienz verschiedener Programme wurden Renca Zellen transient mit GFP-Plasmid transfiziert, für HEK293 lagen bereits etablierte Protokolle vor.

Zur stabilen Transfektion muss das Plasmid in das Genom der Zelle integriert werden, da es sonst im Zytoplasma abgebaut wird (Vaughan et al., 2006). Hierfür wurde auf das Sleeping beauty Transposon System (SB100) zurückgegriffen. Dabei findet eine Rekombinationsreaktion statt, die die von den entsprechenden flankierenden Sequenzen eingeschlossene Genkassette an jeder beliebigen Stelle des Genoms mit einer TA-Sequenz in die DNA integrieren kann (Plasterk et al., 1999). Alle in der dieser Arbeit verwendeten Expressions und Reporterkonstrukte tragen dazu die nötigen Sleeping Beauty ITR (Englisch: Inverted Terminal Repeat) Sequenzen außerhalb der zu integrierenden Kassetten. Für die

Experimente wurden SB100 Plasmid mittels Maxi Prep hergestellt. Zellen wurden in einer Konzentration von 100.000 Zellen/100 µl in Puffer 1M resuspendiert und 1,25 µg Plasmid und 3,75 µg SB100 Plasmid wurden hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Transfektion am Amaxa mit den folgenden Protokollen: HEK293: Q001, Renca: I013. Nach der Transfektion wurden die Zellen möglichst schnell wieder in Vollmedium gebracht und für 24 Stunden bei Standardzellkulturbedingungen kultiviert. Anschließend wurde die Selektion der transfizierten Zellen begonnen, indem für pSTAT3-transfizierte Zellen 0.8 µg/ml Blasticidin zugesetzt wurde und für IL22RA1-transfizierte Zellen 150 µg/ml Hygromycin. Die Selektion wurde auch an untransfizierten Zellen zur Kontrolle vorgenommen. Innerhalb einer Woche starben alle untransfizierten Zellen ab und nur die transfizierten Zellen überlebten. Nach einer weiteren Woche unter Selektionsmedium wurden die Zellen entweder für Experimente verwendet oder wie beschrieben zur Lagerung bei -80°C vorbereitet.

2.2.2.15 Stimulation von IL22RA1/pSTAT3 Reporter Plasmid tragenden Zellen

Zellen wurden aus der exponentiellen Wachstumsphase genommen und in einer Dichte von 20.000 Zellen/Well und 100 µl DMEM + 10% FCS in 96-Well-Platten ausgebracht. Zellen konnten über Nacht adhärent werden. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Wells einmal mit PBS gespült, und 90 µl serumfreies DMEM in jedes Well pipettiert. Nach 6 Stunden Inkubation wurde in jedes Well 10 µl Medium mit den folgenden Substanzen zugegeben, um im Well die folgenden Endkonzentrationen zu erreichen: rh IL-22 wurde in Zehnerpotenzen aufsteigender Konzentration gegeben und Doxycyclin in einer Konzentration von 1 µg/ml. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert und anschließend 30 µl Überstand abpipettiert und bei 4°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

2.2.3 Tierversuche

2.2.3.1 Tierhaltung

Die für die Experimente verwendeten Tiere wurden in Gruppen von maximal 5 Tieren pathogen-frei gehalten. Die Tiere waren einem zwölfstündigen Tag/Nachtrhythmus ausgesetzt und hatten uneingeschränkten Zugang zu Futter und Trinkwasser. Sowohl die Käfige, als auch das Futter, das Trinkwasser, Einstreu und Nestwatte wurden vor Gebrauch autoklaviert und spätestens alle 7 Tage gewechselt.

2.2.3.2 Isolation von BMDCs aus Knochenmark von Balb/c Mäusen

Aus dem Knochenmark von Mäusen können dendritische Zellen gewonnen werden, die Bone marrow derived dendritic cells (BMDCs) genannt werden (Helft et al., 2015). Die Mäuse wurden im Alter von 8 Wochen in Narkose mittels zervikaler Dislokation getötet und mittels Fixierung auf einer desinfizierten Unterlage befestigt. Während des gesamten Isolationsvorgangs befanden sich die Mäuse unter konstantem Luftstrom, um möglichst steril zu arbeiten. Zunächst wurden die Mäuse mit 70% Alkohol desinfiziert und Femur sowie Humerus mittels sterilen OP-Bestecks freigelegt. Das Knochenmark wurde durch Schnitt im Bereich der Metaphyse eröffnet und mit einer 24G Nadel punktiert. Mittels RPMI+10% FCS wurde das Mark herausgespült und in einen 50 ml Falcon Tube überführt. Dieser wurde fünf Minuten lang bei 1500 RPM zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 1 ml sterilem 0,155 M Ammoniumchlorid resuspendiert und weitere 2 ml hinzugefügt. Mit diesem Schritt wurden die roten Blutzellen lysiert. Nach fünf Minuten wurde das Ammoniumchlorid mittels 3 ml PBS verdünnt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt mit 1500 rpm für 5 Minuten. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Zellen durch einen 70 µm Zellfilter gesiebt und die durchgegangenen Zellen nochmals abzentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 1 ml PBS resuspendiert und die Zellen wie beschrieben quantifiziert und mittels Trypanblau auf ihre Vitalität untersucht. Anschließend wurden in eine 6-Well Platte jeweils 10^6 Zellen/Well pipettiert und 2 ml Medium mit einer Endkonzentration von 100 ng/ml GM-CSF hinzugefügt. Die Platten wurden im Folgenden unter Standardbedingungen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am 4. Tag wurde 1,5 ml Frischmedium hinzugefügt und am 8. Tag fand ein kompletter Mediumwechsel statt. So können aus den Knochenmark BMDCs generiert werden (Brasel et al., 2000).

2.2.4 Kolorimetrische Messung

Das Prinzip von kolorimetrischen Assays besteht in der Konzentrationsbestimmung von Lösungen anhand von Vergleichsmessungen beziehungsweise Standardkurven.

2.2.4.1 LDH Assay

Zur Quantifizierung des stattgefundenen Zelltodes wurde auf den LDH Assay zurückgegriffen. Wenn Zellen sterben, wird die äußere Zellmembran permeabilisiert und das normalerweise

intrazelluläre Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) gelangt in den Zellkulturüberstand. Die Menge des freigesetzten LDH kann somit als proportional zum stattgefundenen Zelltod gesehen werden. Das freigesetzte LDH kann mit Hilfe des Cytotoxicity Detection Kit (LDH) quantifiziert werden. Hierbei setzt die freigesetzte LDH NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ um. Dieses wiederum reduziert Tetrazoliumsals zu Formazansalz. Bei 492 nm zeigt Tetrazoliumsals keine wesentliche Absorption während rötliches Formazansalz eine deutliche Absorption zeigt. Gemäß Herstellerangaben wurden 100 μl Zellkulturüberstand mit 100 μl Assayreagenz (250 μl von Flasche 1 gemischt mit 11,250 ml von Flasche 2) mit Hilfe einer Mehrkanalpipette zusammenpipettiert. Direkt im Anschluss wurde die 96-Well Platte in den ELISA-Reader gestellt und die Absorption bei 492 nm wurde gemessen. Die Messung wurde im Abstand von fünf Minuten insgesamt sechsmal wiederholt. Im Anschluss wurde Zelltod gemäß folgender Formel berechnet:

$$\text{Zelltod} = \frac{\text{Experimenteller Wert} - \text{Niedrigkontrolle}}{\text{Positiv Kontrolle} - \text{Niedrigkontrolle}} \times 100$$

2.2.4.2 MTT-Assay

Zur Quantifizierung der metabolischen Aktivität von Zellen und damit als ein Maß für die Anzahl lebender Zellen wurde der MTT-Assay verwendet (PMID 6606682). Dieser Test basiert darauf, dass der in die Zellkultur gegebene gelbe Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) von Zellen aufgenommen und anschließend intrazellulär zu blau-violetten Formazan reduziert wird. Dieser Prozess findet nur in lebenden Zellen statt, da nur hier die für die Reaktion benötigten Reduktionsäquivalente NADH und NADPH vorliegen.

Zellen wurden für die Experimente zunächst vier Stunden serumfrei kultiviert und anschließend für 24 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen IL-22 stimuliert. Dann wurden gemäß Herstellerangaben 15 μl MTT-Dye in jedes Well pipettiert und die Zellkulturplatte für weitere drei Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion des MTT-Dyes durch Zugabe von Stop-Solution beendet. Dabei wirkt die Stop-Solution als Detergenz, lysiert so die Zellen und setzt das Formazan frei. Die Zellkulturplatte wurde daraufhin für zwölf Stunden lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert und im Anschluss bei 570 nm im ELISA-Reader ausgewertet.

2.2.4.3 Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Das ELISA-Verfahren (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, mit dem vor allem Viren und Zytokine quantifiziert werden können. Dabei bindet der primäre Antikörper, der spezifisch für das jeweilige Antigen ist, das zu messende Antigen. Ein weiterer Antikörper (sekundärer Antikörper), der an ein Enzym gekoppelt ist, bindet daraufhin die Fc-Regionen der primären Antikörper. Das gekoppelte Enzym setzt daraufhin ein zugegebenes Substrat um. Dabei verändert das Substrat sein Absorptionsspektrum (es kommt makroskopisch zu einem Farbumschlag). Der Farbumschlag kann mit Hilfe der kolorimetrischen Messung quantifiziert werden und ist proportional zur Konzentration des Antigens (Janeway, 2008).

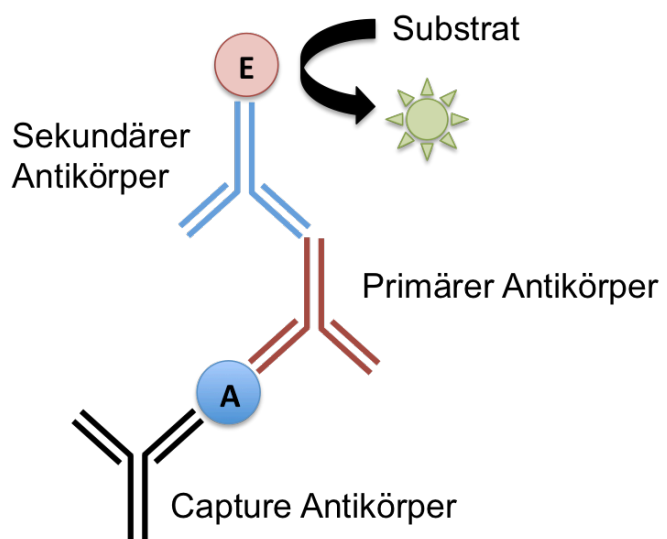


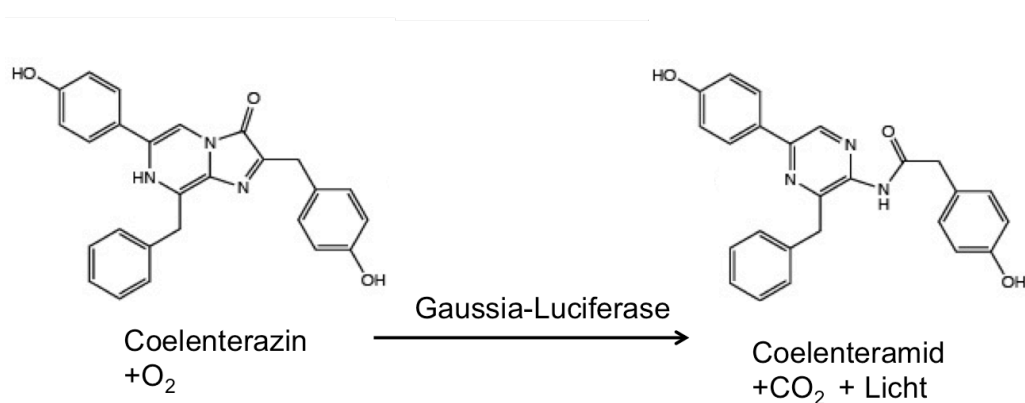
Abb. 2-8 Funktionsweise eines ELISA mit Sandwichmethode
Abk.: A: Antigen, E: Enzym [Modifiziert nach (Janeway, 2008)].

In den vorliegenden Experimenten wurde die Sandwichmethode verwendet, bei der das Antigen von einem zusätzlichen Antikörper am Boden festgehalten wird. Gemäß Herstellerangabe wurde eine 96-Well ELISA-Platte mit einem für IL-22 spezifischen Antikörper (Capture Antibody) beschichtet und bei 4°C für zwölf Stunden inkubiert. Um überschüssigen Antikörper zu entfernen, wurden die Wells in einem ELISA-Platten Spüler gereinigt. Unspezifische Bindungen wurden durch einen Blockschrift minimiert. Nach entsprechenden Waschschriffen wurden anschließend 100 µl Zellkulturüberstände in die jeweiligen Wells pipettiert und das vorhandene IL-22 konnte sich während einer

zwölfstündigen Inkubationszeit an den Capture Antikörper binden. Nach weiteren Waschschrritten folgte eine Inkubation mit dem Detection Antikörper. Wiederum erfolgten Waschschrritte und eine 30-minütige Inkubation mit Avidin-HRP. Anschließend wurde nach einem letzten Waschschrtritt 100 μ l der Substratlösung (1x TMB Solution) zugegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 μ l 2N H₂SO₄ gestoppt (das Enzym denaturiert im sauren Bereich) und die Platte wurde bei einer Absorption von 450 nm und 570 nm gelesen. Die Absorptionswerte für 570 nm wurden von denen für 450 nm substrahiert. Anschließend wurde die Zytokinkonzentration anhand der mitgelaufenen Standardkurve berechnet.

2.2.5 Luminometrische Messung

Die Phosphorylierung von STAT3 sollte mittels luminometrischer Messung quantifiziert werden. Hierbei katalysiert die in den Zellkulturüberstand sezernierte Gaussia-Luciferase die Oxidation von Coelenterazin, in deren Folge Licht entsteht (Goerke et al., 2008).



Tab. 2-9 Reaktion der Gaussia-Luciferase

Für die Messung der Gaussia-Luciferase (GLuc) wurde zunächst die GLuc Assay Lösung hergestellt, indem für 100 Reaktionen 50 μ l BioLux Gluc Substrat und 800 μ l BioLux Stabilizer zu 5 ml *BioLux Gluc Assay Buffer* hinzugefügt wurde. Die Lösung wurde vorsichtig gemischt und für 25 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden jeweils 20 μ l Zellkulturüberstand und 50 μ l Assay Lösung in ein 5 ml Sarstedt-Röhrchen pipettiert, für 40 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Hilfe des Luminometers gemessen.

2.2.6 Mikroarray Analyse

Die Technologie wurde von Stephen Fodor (Fodor et al., 1991) entscheidend geprägt und ermöglicht eine kostengünstige und schnelle Quantifizierung von Nukleinsäure (Lenoir and Giannella, 2006). Dabei werden einzelsträngige cDNAs auf Glaschips aufgedruckt. Nach Inkubation mit fluoreszenzmarkierter cDNA kann am Fluoreszenzverhalten die Veränderung der relativen Genexpression abgelesen werden. Für die Experimente wurde auf bestehende Daten von frei zugänglichen Chips der Geo Accession Database zurückgegriffen. Für die Analyse wurden die zwei Proben GSM153779 und GSM153780 verwendet (Gierman et al., 2007). Beide Serien dienen zur Auswertung eines parallel durchgeführten Experiments mit HEK293 Zellen, wobei die RNA jeweils separat isoliert, gelabelt und hybridisiert wurde. Unter Verwendung der R Software und des *Bioconductor* Programmpaketes wurde die Expression von Genen durch Berechnung von *Detection calls* mittels des MAS5 Algorithmus ermittelt.

2.2.7 Realtime pPCR

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR) ist eine von Kary Mullis (Mullis et al., 1986) entwickelte Methode zur Vervielfältigung von Nukleotiden. Dabei wird in einem ersten Schritt die doppelsträngige DNA durch Erhitzen in ihre Einzelstränge aufgespalten. In einem zweiten Schritt (Annealing Phase) können Primer (Oligonukleotide aus meist 18-22 bp) an spezifische Sequenzen binden. Eine hitzestabile DNA Polymerase synthetisiert in der Elongationsphase einen komplementären DNA Strang. Als Ausgangssubstanz für die qPCR wird complementary DNA (cDNA) verwendet, da die Taq-Polymerase nur DNA-Stränge synthetisiert. Die cDNA wird aus mRNA gewonnen, in dem das Enzym Reversetranskriptase verwendet wird, das aus Retroviren bekannt ist (Coffin and Fan, 2016).

2.2.7.1 mRNA Isolierung

Das Grundprinzip der RNA Isolierung besteht darin, dass zunächst Zellen lysiert werden, um die intrazellulär vorliegende RNA freizusetzen. In folgenden Schritten wird die RNA durch Waschschrte über Säulen isoliert. Dabei bindet RNA aufgrund ihrer Ladung an die Säulen, während Proteine und Lipide abgewaschen werden können. Mittels pH Änderung kann in einem weiteren Schritt die RNA wieder von den Säulen gelöst und so wiedergewonnen werden.

Gemäß Herstellerangaben wurden Zellen jeweils mit *Lysis Buffer* + 1% 2-Mercaptoethanol lysiert. Anschließend wurde die äquivalente Menge 70% Ethanol zugesetzt und die Zellen wurden für zehn Sekunden gevortext. Dann wurden jeweils 700 µl der lysierten Zellen auf eine Filtermembran gegeben. Während des folgenden Zentrifugationschrittes band die mRNA an die Membranen, während der Überstand im unteren Teil des Reaktionsgefäßes aufgefangen wurde. Es folgten ein Waschschrift mit *Wash Buffer I* und zwei Waschschrift mit *Wash Buffer II*. Anschließend wurde die Membran durch Zentrifugation getrocknet. Dann wurden 30 µl RNA/DNA-freies Wasser auf die Membranen pipettiert und während der 60 Sekunden langen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die mRNA von den Membranen gelöst. Anschließend wurde die mRNA in ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß abzentrifugiert.

2.2.7.2 Murine cDNA Herstellung

Zur Herstellung von cDNA (complementary DNA) wird das Prinzip der Reverse Transkriptase (Haddad and Baldwin, 2010) genutzt, die RNA in DNA umschreiben kann. Zunächst wird 1 µg mRNA in ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und mit DEPC-H₂O auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Anschließend wird der Ansatz bei 65°C in einem Thermoblock für 5 Minuten inkubiert, um eventuell auftretende Kontamination mit DNAsen zu verhindern. Danach werden die Eppendorfgefäße wieder auf Eis gekühlt. Zu jedem Ansatz wird daraufhin 10 µl Mastermix hinzugegeben, der aus 4 µl 5x FS-Puffer, 0,4 µl 25 mM dNTPs, 1 µl 0,1 M DTT, 0,25 µl (15 µg/µl) lineares Acrylamid, 0,215 µl Hexanucleotid, 0,5 µl (40U/µl) RNAsin, 0,435 µl Superscript II und 3,2 µl H₂O besteht. Für RT- wird Superscript und RNAsin weggelassen und durch H₂O ersetzt. Anschließend wird der Reaktionsansatz für 90 Minuten auf dem Thermoblock bei 42°C inkubiert.

2.2.7.3 Humane cDNA

Zur Untersuchung der IL-22 Achse unter Homöostase in menschlichem Gewebe wurde auf kommerziell verfügbare RNA Proben der Firma Clontech zurückgegriffen. Die Proben werden mittels einer Guanidinium Thiocyanate Methode (Chomczynski and Sacchi, 1987) hergestellt und enthalten somit auch 18s RNA zur Normalisierung. Die meisten Gewebeproben stellen Gemische von mehreren gesunden Probanden dar (siehe Tabelle 2- 10).

Tab. 2-10 Übersicht über die verwendeten humanen RNA Proben

Gewebe	Anzahl der Individuen	Alter
Niere	1	40
Darm	3	24 - 29
Leber	3	24 - 64
Hoden	7	24 - 87
Herz	3	30 - 39
Lunge	3	32 - 61
Gehirn	4	21 - 29
Knochenmark	4	58-76
Thymus	22	18 - 57
Milz	15	22 - 69

Analog zur murinen cDNA Herstellung wurde jeweils 1 µg RNA zur cDNA Herstellung verwendet. Alle weiteren Schritte erfolgten wie weiter oben dargestellt.

2.2.7.4 PCR

Zunächst wurde die gewonnene cDNA 1:43 mit DEPC H₂O verdünnt. Anschließend wurde ein Mastermix bestehend aus Vorwärts- und Rückwärtsprimer, Cybergreen und Taq Polymerase hergestellt. In jedes Well der PCR Platte wurden 11,4 µl Mastermix und 8,6 µl verdünnte cDNA pipettiert. Die PCR Platte wurde mit einer transparenten Folie luftdicht verschlossen. Mittels eines Lightcycler 480 wurde die PCR Platte im Anschluss ausgewertet. Dabei wurde ein Programm gewählt, das 40 Zyklen umfasst und eine Initiationsphase von 95°C, eine Annealing Phase von 60°C und eine Elongationsphase von 72°C aufweist. Als Kontrollen für eventuelle falsch positive Signale wurden RT- Ansätze, Mastermix mit H₂O und nur H₂O alleine verwendet. Expressionswerte wurden gegenüber dem Housekeeping Gene GAPDH mittels folgender Formel normalisiert und damit die relative Expression berechnet:

$$\text{Rel. Expression}_{\text{Probe}} = 2^{-(Cp_{\text{GAPDH}} - Cp_{\text{Probe}})}$$

Primer wurden entweder von qPrimer bezogen oder mittels Oligoperfect designed. Dabei wurden alle Primer so konstruiert, dass sie ähnliche Schmelztemperaturen haben, um ein einheitliches PCR Programm verwenden zu können. Selbstbindung beziehungsweise Dimerbildung und Haarschleifenbildung wurden mittels OligoCalc (www.simgene.com) bereits *in silicio* untersucht. Vor Verwendung wurde die Effizienz aller Primer durch Verdünnungsreihen getestet.

2.2.8 Mikroskopie

2.2.8.1 Fixierung von Zellen

Nierenzellkarzinomzelllinien wurden in 8-Kammerzellkultursystemen ausgebracht und unter Standardbedingungen bis zu 95% Konfluenz wachsen gelassen. Anschließend wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Kammern wurden einmal mit 1x PBS gespült und anschließend mit 200 µl einer auf -20°C gekühlten Fixierungslösung (Methanol: Aceton=1:1) gefüllt und bei -20°C zehn Minuten lang inkubiert. Dann wurde die Fixierungslösung abpipettiert und das Zellkultursystem wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung luftdicht gelagert.

2.2.8.2 Immunhistochemische Färbung von IL22RA1

Zunächst wurden die Kammern vom Boden des Zellkultursystems entfernt. Anschließend wurde der Glasslide mit PBS gespült. IL22RA1 Antikörper wurde 1:100 in PBS verdünnt und eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Slide mit 300 µl PBS gespült und mit PBS zehn Minuten lang inkubiert. Alexa Rot Lösung wurde für 30 Minuten im Dunkeln aufgetragen. Nach einem weiteren PBS Waschschrift und 10-minütiger Inkubation mit PBS wurde der Slide abschließend mit DAPI eingedeckt und bei 4°C lichtgeschützt bis zum Mikroskopieren aufbewahrt.

2.2.9 Statistik

Statistische Analysen wurden mit Hilfe der Graphpad Prism Software sowie Excel durchgeführt. Für gepaarte Stichproben wurde zur Berechnung des p-Wertes der zweiseitige Student-t-Test verwendet, für mehrere Gruppen wurde auf einfaktorielle *Analysis of Variance* (ANOVA) zurückgegriffen. Statistische Signifikanz wurde wie beschrieben berechnet und in vorliegender Arbeit folgendermaßen gekennzeichnet: $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.0001$ ****.

3 Ergebnisse

3.1 HEK293 Zellen exprimieren keine IL22RA1 mRNA

Zunächst wurde mit Hilfe von Mikroarrayanalyse untersucht, ob in HEK293 Zellen ein IL-22 Signaling überhaupt stattfinden kann. Die freiverfügbaren Chips wurden wie beschrieben analysiert.

Tab. 3-1 Mikroarray Analyse von HEK293 Zellen

Gen	GSM153779 P/M/A Calls	GSM153780 P/M/A Calls
IL22RA1	A	A
IL10R	P	P
JAK1	P	P
	A	P
	P	P
	A	A
	A	A
TYK2	P	P
STAT1	P	P
	P	P
	P	P
	P	A
	P	P
	P	P
STAT3	P	P
	P	P
	P	P
STAT5	A	A
PI3K	P	P
	P	P
	P	P
Akt	P	P
MAPK1	P	P

Abk.: P: Present (anwesend) – p-Wert < tightcutoff; M: marginal (grenzwertig) – p-Wert zwischen tightcutoff und loosecutoff; A: absent (abwesend) – p-Wert >=loosecutoff

Wichtige Proteine für das IL-22 Signaling sind die am Aufbau des Rezeptors beteiligten Untereinheiten IL22RA1 und IL-10R, die für die Signalübertragung wichtigen Tyrosinkinasen

JAK1 und TYK2, sowie wichtige Signalübertragungsproteine STAT1, STAT3, STAT5, PI3K, Akt und MAP Kinasen. Die Mikroarray-Daten zeigen, dass in HEK293 Zellen keine Expression der IL22RA1 Rezeptoruntereinheit stattfindet. Die meist ubiquitär exprimierte IL10R-Rezeptoruntereinheit war dagegen exprimiert. Die Kinasen JAK1, TYK2, PI3K, Akt und MAPK1 sowie die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3 waren exprimiert. Lediglich STAT5, das auch als Transkriptionsfaktor dienen kann, wird nicht exprimiert.

3.2 Das IL22RA1/pSTA3 Reportersystem

3.2.1 Generieren der Plasmide

Die Plasmide wurden wie in Kap. 2.2.1 beschrieben hergestellt. Im Folgenden sollte mittels Restriktionsenzymen die hergestellten Plasmide geschnitten werden, um dann in der Gelelektrophorese zu überprüfen, ob die Klonierungsschritte erfolgreich waren. Dieses Verfahren testet, ob nach jedem Arbeitsschritt große Plasmidteile fehlen oder falsch integriert wurden. Es wurde jeweils mit Snapgene Viewer errechnet, wie lang die Plasmidfragmente zu erwarten sind. In der anschließenden Gelelektrophorese wurde dann anhand des mitgelaufenen Standards die Länge der Fragmente ermittelt.

3.2.1.1 Test des pSTAT3 Reporter Plasmids

Durch Ligation eines pSTAT3 Responsive Elements in den pcDNA-Gluc3-CMVMin-Backbone sollte ein pSTAT3 Reporter Plasmid hergestellt werden. Für das Plasmid wurden Banden mit einer Größe von 421 Basenpaaren und 8066 Basenpaaren Länge erwartet (siehe Tab. 3-2).

Tab. 3-2 Testverdau des pcDNA-Gluc3-CMVMin-STAT3 Plasmids

Enz L	Start	Ende	Größe	Enz R
NotI	2497	2917	421	BsrGI
BsrGI	2918	2496	8066	NotI

Das erste Plasmidfragment befindet sich zwischen der Schnittstelle von NotI an der 2497. Base und der Schnittstelle von BsrGI an der 2917. Base des Plasmids. Seine Länge beträgt 421 Basenpaare. Abk. Enz L: Enzym, das auf der linken Seite des Fragmentes schneidet, ENZ R: Enzym, das auf der rechten Seite des Fragmentes schneidet (5'-3').

In der Gelelektrophorese zeigten sich, dass in zwei Ansätzen (Ansatz 1 und 4; siehe Abb. 3-3) die Fragmente die erwartete Länge von 421 und 8066 Basenpaaren aufweisen. Die Ligation des pSTAT3 Responsive Elements in den pcDNA-Gluc3-CMVMin-Backbone hat hier also erfolgreich stattgefunden und wurde durch Sequenzierung bestätigt.

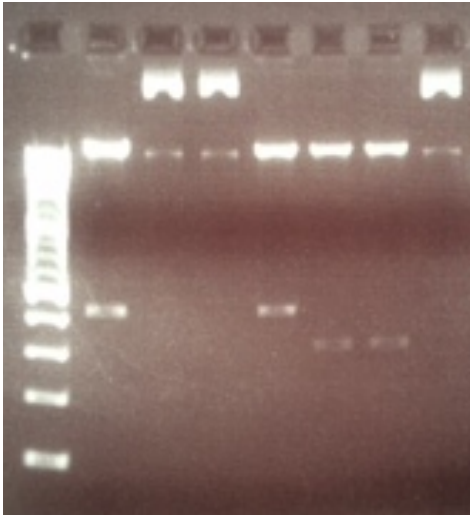


Abb. 3-3 Gelelektrophorese von pcDNA-Gluc3-CMVMin-STAT3

In der Spalte ganz links ist der mitgelaufene Standard zu sehen. Daneben werden die Spalten aufsteigend nummeriert. Nur in Spalte eins und vier zeigt sich jeweils eine Bande bei 421 bp und bei 806bp.

3.2.1.2 Test des IL22RA1 Entry Clones

In der BP-Reaktion wurde ein IL22RA1 Entry Clone generiert. Hier waren wiederum mehrere Ansätze parallel gelaufen, weshalb mittels Testverdau untersucht werden sollte, welche BP-Reaktion richtig abgelaufen ist. Die Länge der Fragmente ist wie in Tab. 3-4 dargestellt zu erwarten gewesen.

Tab. 3-4 Testverdau des IL22RA1 Entry Clones

Enz L	Start	Ende	Größe	Enz R
PstI	1018	1606	589	PstI
PstI	1607	2010	404	PstI
PstI	2011	2506	496	PstI
PstI	2507	1017	2793	PstI

In der Gelelektrophorese zeigte sich, dass alle vier Ansätze (siehe Abb. 3-5) Fragmente der erwarteten Länge aufweisen. Auch dieser Klonierungsschritt wurde durch Teilsequenzierung verifiziert.

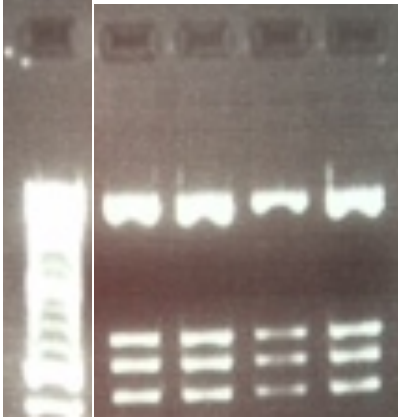


Abb. 3-5 Gelelektrophorese des IL22RA1 Entry Clones

In der Spalte ganz links ist der mitgelaufene Standard zu sehen. Daneben werden die Spalten aufsteigend nummeriert. In allen vier Spalten sind Fragmente der Längen 404, 496, 589 und 2793 Basenpaaren zu sehen.

3.2.1.3 Test des IL22RA1 Expressionplasmids

In der LR Reaktion wurde ein IL22RA1 Expressionsplasmid hergestellt. Hierbei wurden drei LR-Reaktionen parallel durchgeführt und anschließend in Testverdauen validiert.

Tab. 3-6 Testverdau des IL22RA1 Expressionsplasmids

Enz L	Start	Ende	Größe	Enz R
Bsr GI	266	997	732	BamHI
BamHI	998	2705	1708	BsrGI
BsrGI	2706	265	6172	BsrGI

In der Gelelektrophorese zeigen sich zwei Ansätze (Ansatz zwei und drei; siehe Abb. 3-6) mit den zu erwartenden Längen an Fragmenten.

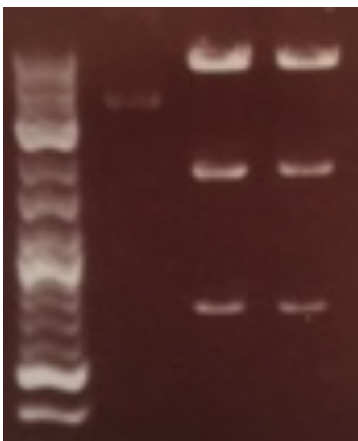


Abb. 3-7 Gelelektrophorese des IL22RA1 Expressionsplasmids

In der Spalte ganz links ist der mitgelaufene Standard zu sehen. Daneben werden die Spalten aufsteigend nummeriert. In Spalte zwei und drei finden sich Banden bei 732, 1708 und 6172 Basenpaaren.

Durch die Testverdaue kann der Rückschluss gezogen werden, ob größere Sequenzbereiche des Plasmids vorhanden sind und ob somit der Austausch der Plasmidfragmente funktioniert hat. Der Austausch von einzelnen Basenpaaren kann so nicht erfasst werden, weshalb der IL22RA1 Expression Clone, wie die anderen hier verwendeten Plasmide, zusätzlich sequenziert wurde.

3.2.2 Genexpressionsanalyse im Reportersystem

Nachdem im ersten Schritt die Expression der meisten an der IL-22 Signaltransduktion beteiligten Proteine gezeigt wurde, sollte nun zunächst gezeigt werden, dass im Testsystem nach Transfektion mit dem IL22RA1 Plasmid dessen mRNA auch exprimiert wird. Da die Zellen zugleich mit einem pSTAT3-Reporter Plasmid transfiziert waren, sollte die IL22RA1 Expression auch auf die Doxycyclininduzierbarkeit untersucht werden. Zum besseren Verständnis des Reportersystems sei an dieser Stelle auf Abbildung 4-1 verwiesen, in der die Funktionsweise des Expressions- und Reporter Plasmids detailliert dargestellt ist.

3.2.2.1 Überexpression von IL22RA1 mRNA im Testsystem

Zur Bestimmung der IL22RA1 Konzentration wurde als negative Kontrolle untransfizierte HEK293 Zellen verwendet, da diese gemäß der Mikroarrayanalysen keine IL22RA1 Expression zeigen. Außerdem sollte gezeigt werden, wie stark der Promotor des IL22RA1 Plasmids bereits ohne Doxycyclinstimulation aktiv ist. In untransfizierten HEK293 Zellen konnte keine detektierbare IL22RA1 Expression gefunden werden. Bereits ohne Doxycyclininkubation zeigen doppeltransfizierte HEK293 Zellen eine relevante IL22RA1 Expression. Werden diese Zellen mit 1 µg/ml Doxycyclin inkubiert, kann diese Expression nochmals deutlich gesteigert werden.

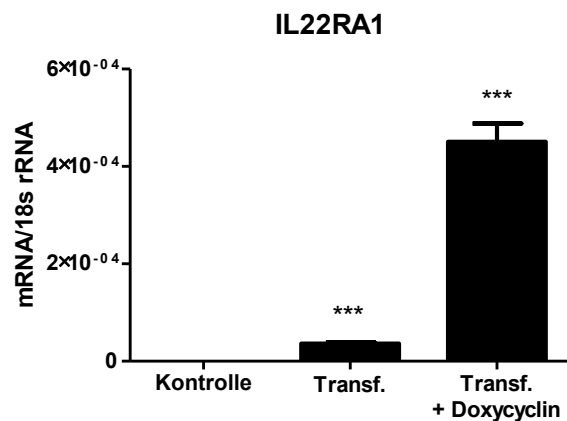
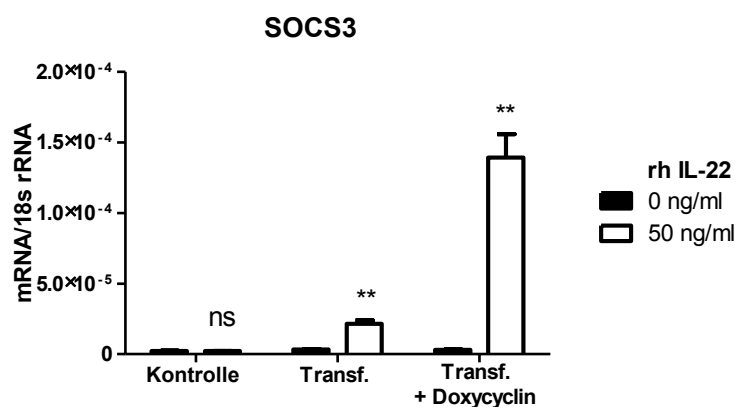


Abb. 3-8 IL22RA1 mRNA Expression in Reportersystem

HEK293 Zellen wurden untransfiziert als Kontrolle verwendet. Transfizierte Zellen waren sowohl mit dem IL22RA1-Expressionsplasmid als auch dem pSTAT3-Reporter Plasmid transfiziert. Die mRNA wurde nach 4 Stunden Inkubation mit beziehungsweise ohne Doxycyclin bestimmt.

3.2.2.2 Erhöhte Expression von SOCS3 nach IL-22 Stimulation

Da bereits gezeigt worden ist, dass unser Testsystem die für den IL-22 Rezeptor entscheidende IL22RA1-Kette exprimiert, untersuchten wir nachfolgend welche Gene dadurch reguliert werden. SOCS3 wird ohne IL-22 Stimulation nicht reguliert, wenn aber der Rezeptor (also sowohl IL22RA1 als auch IL10R) vorliegt, zeigt sich eine signifikant erhöhte Expression, wobei analog zur IL22RA1 Expression bereits doppeltransfizierte Zellen ohne Doxycyclinstimulation eine Veränderung in den Expressionslevels zeigen.



HEK293 Zellen wurden untransfiziert als Kontrolle verwendet, transfizierte Zellen waren sowohl mit dem pSTAT3-Reporter Plasmid als auch mit dem IL22RA1-Expressionsplasmid transfiziert.

SOCS3 als negativer Regulator von pSTAT3 wird somit aktiviert, um eine überschießende Antwort der Zelle zu verhindern.

3.2.3 IL-22 Bindung an den IL-22 Rezeptor führt zur STAT3 Phosphorylierung

Da in den vorherigen Experimenten gezeigt wurde, dass die Aktivierung der IL-22 Achse zu einer Veränderung auf mRNA Ebene führt, sollte auch untersucht werden, ob das Reportersystem funktioniert. Hierzu untersuchten wir die Phosphorylierung von STAT3 bei 24 Stunden Inkubation. Dabei nahmen wir an, dass eine Dosissteigerung von IL-22 auch zu einer verstärkten Luciferase-Aktivität führen sollte. Zellen ohne Doxycyclininkubation sollten eine signifikant niedrigere Luciferase-Aktivität zeigen, als Zellen mit Doxycyclin, da nur diese den IL-22 Rezeptor exprimieren.

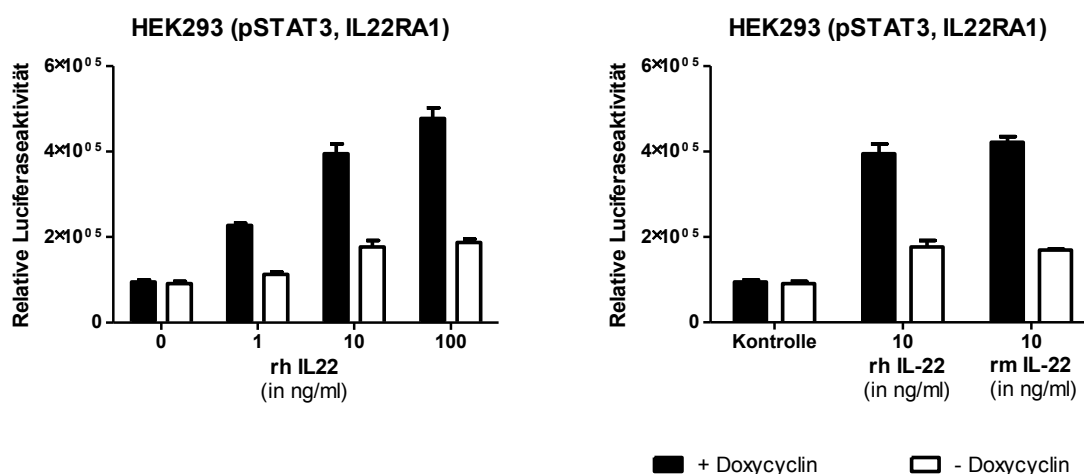


Abb. 3-10 STAT3 Phosphorylierung nach IL-22 Stimulation im Reportersystem

Gaussia-Luciferase-Aktivität im Zellkulturüberstand nach Inkubation mit IL-22. Schwarze Balken repräsentieren Proben mit Doxycyclininkubation, das bereits vier Stunden vor Beginn der IL-22 Stimulation hinzugefügt wurde.

Es zeigte sich bei 24-stündiger Inkubation der Zellen eine Luciferase-Aktivität, die bereits ohne IL-22 Stimulation zu beobachten war (siehe Abbildung 3-10: 0 ng/ml IL-22). In der Gruppe mit Doxycyclin zeigte sich mit ansteigender Dosis IL-22 auch eine erhöhte Luciferaseexpression. Allerdings konnte auch in der Gruppe ohne Doxycyclin ein Anstieg der Luciferase-Aktivität beobachtet werden. Diese war aber bei allen gewählten IL-22 Konzentrationen (1, 10 und 100 ng/ml) signifikant geringer als bei HEK293 Zellen, die über Doxycyclin eine vermehrte IL-22 Expression haben. Zudem sollte getestet werden, ob es einen Unterschied macht, ob humanes oder murines IL-22 zur Stimulation verwendet wird.

Hierbei fiel auf, dass es bei Stimulation mit 10 ng/ml humanen beziehungsweise murinen IL-22 keinen signifikanten Unterschied in der Luciferaseaktivität und damit in der STAT3 Phosphorylierung der Zellen gab.

3.2.4 IL-22 induzierte STAT3 Phosphorylierung ist durch IL-22 AK antagonisierbar

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob sich die IL-22 induzierte Phosphorylierung von STAT3 auch durch vorhergehende Inkubation mit IL-22 Antikörper (AK) verhindern lässt. Nach 24 Stunden Inkubation mit 10 ng/ml IL-22 zeigt sich, dass die Gaussia-Luciferase-Aktivität und damit die STAT3 Phosphorylierung davon abhängt, mit wie viel IL-22 AK die Zellen inkubiert worden sind. Dosisabhängig nimmt die relative Luciferase-Aktivität im Zellkulturüberstand ab, je höher die Konzentration des IL-22 AK ist. Die Negativkontrolle (serumfreies Zellkulturmedium) zeigt die niedrigste Luciferase-Aktivität, während sehr niedrige Dosen des IL22 AK (1-100 pg/ml) eine relative Luciferase-Aktivität zeigen, die gleich der Luciferase-Aktivität einer reinen IL-22 Stimulation (Positivkontrolle) ist.

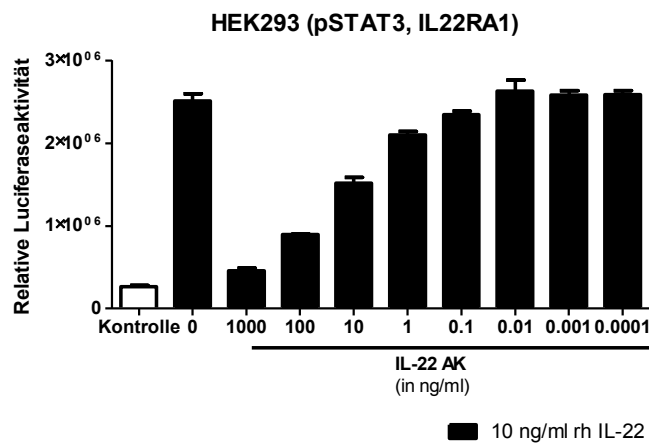


Abb. 3-11 Inhibition der Phosphorylierung mittels IL-22 Antikörper

Gaussia-Luciferase-Aktivität im Zellkulturüberstand nach 24 Stunden Inkubation mit IL-22. Schwarze Balken repräsentieren Proben, die mit 10 ng/ml rh IL-22 stimuliert worden sind.

3.2.5 Expression der IL-22-Rezeptoruntereinheiten und IL-22 in humanen Gewebe

Wichtiger Bestandteil des IL-22 Signalings ist die IL22RA1 Untereinheit, wie die *in vitro* Experimente mit den IL22RA1/pSTAT3-Reportersystem gezeigt haben. In welchen Geweben aber IL-22 Signaling überhaupt stattfinden kann und wie es sich mit der Expression der beiden IL-22 Rezeptoruntereinheiten in humanen Geweben verhält, sollte im Folgenden untersucht werden.

Zunächst sollte gezeigt werden, in wie weit wichtige Bestandteile der IL-22 Achse in den entsprechenden Gewebe unter Homöostasebedingungen überhaupt exprimiert werden. Hierzu wurde die Expression von IL22RA1, IL10R2 sowie IL22 in Niere, Colon, Leber, Hoden, Herz, Lunge, Gehirn, Knochenmark, Thymus und Milz untersucht.

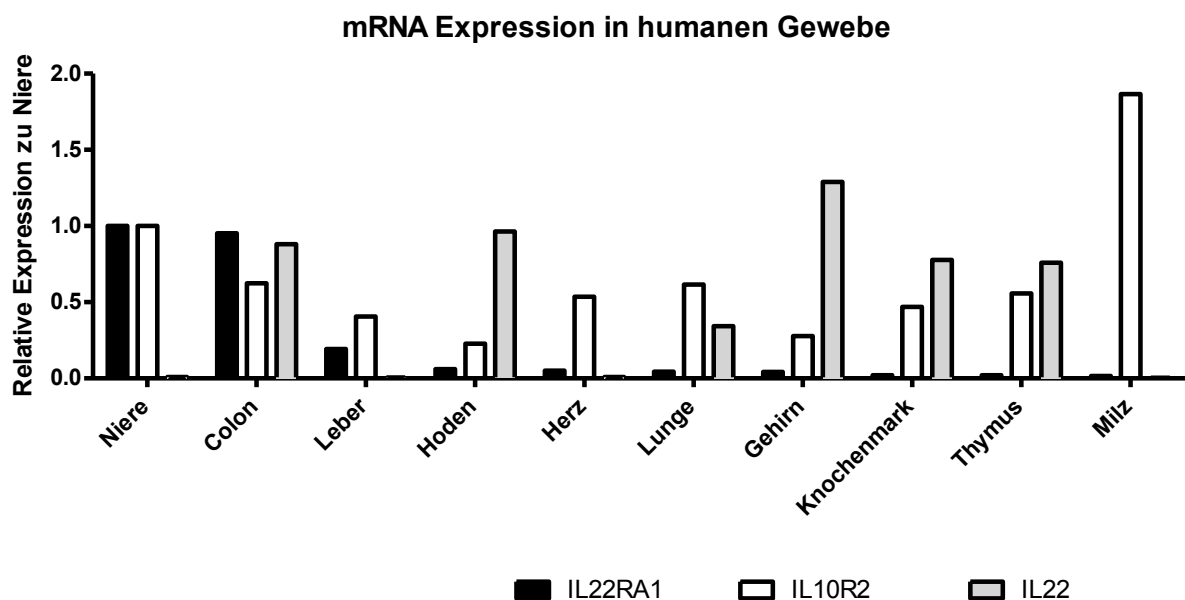


Abb. 3-12 IL22RA1, IL10R2 und IL-22 Expression in humanem Gewebe

Alle Ergebnisse sind Mittelwerte von technischen Duplikaten, aber nicht biologischen, da auf Organpools zurückgegriffen wurde. Alle mRNA Werte wurden gegenüber der Expression in der Niere normalisiert, im Falle von IL-22 mit dem Faktor 100 geteilt (Weidenbusch et al., 2017).

In der Niere, dem Colon und der Leber wurde die höchste Expression der IL22RA1 mRNA gefunden, wohingegen die anderen Gewebe eine deutlich geringere Expression zeigen. Die zweite für das Signaling wichtige Rezeptoreinheit IL10R2 war dahingegen ubiquitär in allen Geweben exprimiert, mit der höchsten relativen Expression in der Milz. Das Interleukin selbst war in Homöostase vor allem in den lymphatischen Organen Knochenmark und Thymus, sowie in Darm, Gehirn, Hoden und Lunge exprimiert.

3.3 Unterschiedliche Wirkung von IL-22 auf humane Nierenzellkarzinomzelllinien

3.3.1 Humane Nierenzellkarzinomzelllinien zeigen eine heterogene IL22RA1 Expression

Nach der Untersuchung der IL-22 Signalkaskade im Reportersystem und der Analyse der IL-22 Achse in humanen Geweben sollte in einem weiteren Schritt untersucht werden, ob humane Nierenzellkarzinomzelllinien genauso wie in humanen Biopsien (Song, (Urbschat et al., 2016)) beobachtet eine hohe Heterogenität in der IL22RA1 Expression zeigen. Tatsächlich zeigten sich deutliche Unterschiede in der mRNA Expression. Alle Expressionslevel wurden gegenüber HK-2 normalisiert, da diese Zelllinie als Modell für Tubuluszellen dient und somit die Basisexpressionsrate von IL22RA1 in der Niere widerspiegelt. Somit konnten die Zelllinien MZ1774, Caki-1 und MZ1879 als IL22RA1(+)-Zelllinien definiert werden, da sie die höchste Expression zeigen. MZ1790 dagegen ist eine IL22RA1(-)-Zelllinie, da sie zu HK-2 eine signifikant verminderte IL22RA1 Expression vorweist. RCC53 weist ebenfalls eine verminderte IL22RA1 Expression auf, wurde aber nicht in die folgenden Experimente eingeschlossen, da die Zelllinie von einer Metastase eines RCCs abstammt und somit keine primäre RCC-Zelllinie darstellt. Diese Ergebnisse wurden mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen von IL22RA1 auf Proteinebene validiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Zelllinien mit erhöhter IL22RA1 mRNA Expression auch positiv für das IL22RA1 Protein sind, wohingegen Zelllinien mit erniedrigter IL22RA1 mRNA Expression auch keine Proteinexpression zeigen.

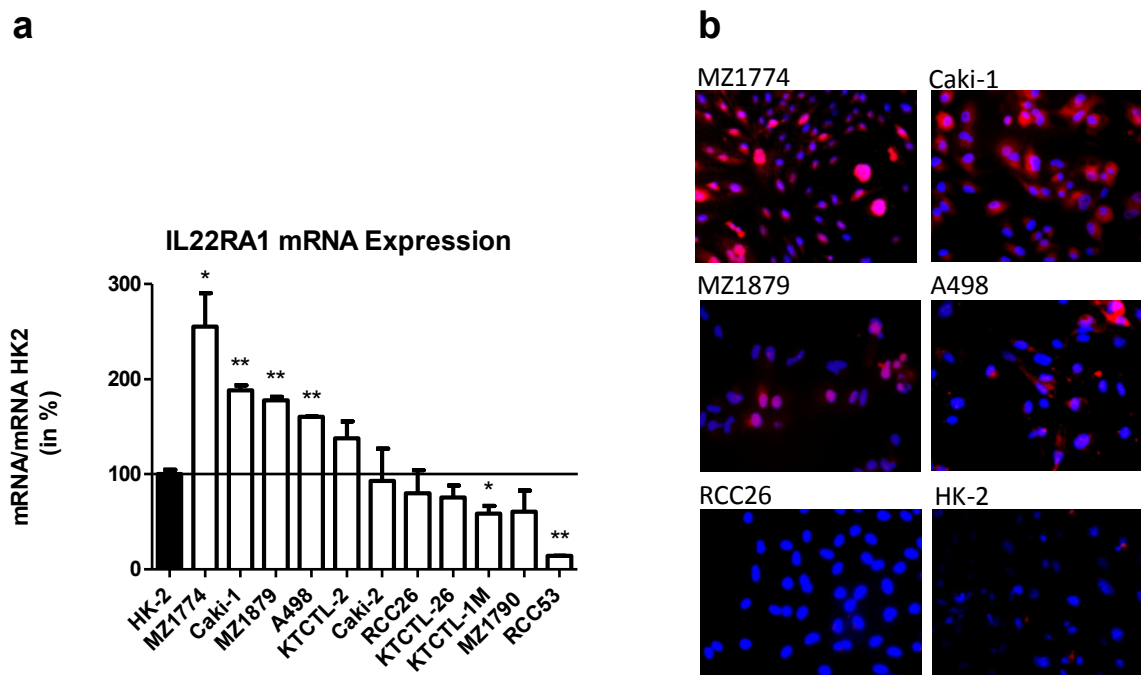


Abb. 3-13 IL22RA1 Expression in humanen Nierenzellkarzinomzelllinien

a.: IL22RA1 mRNA wurde mittels PCR quantifiziert. Gezeigt werden die Expressionswerte relativ zur Tubuluszelllinie HK-2.

b.: Mittels immunfluoreszenzchemischer Färbung wurde das IL22RA1 Protein sichtbar gemacht (rot). Zellkerne wurden mittels DAPI (blau) gegengefärbt.

3.3.2 Humane Nierenzellkarzinomzelllinien zeigen unterschiedliches Migrationsverhalten in Abhängigkeit von der Rezeptorexpression

Das Migrationsverhalten von Karzinomzellen ist wichtig in der Beurteilung der Zellen zur Metastasenbildung. IL-22 ist als Zytokin beschrieben worden, das zu einer erhöhten Migrationstendenz von Zellen führen kann (Rui et al., 2017). Als Testverfahren wurde auf Scratchassays zurückgegriffen, die eine etablierte Methode zur Untersuchung von Migrationsverhalten darstellt. In unserer eigenen Studie *in vitro* konnte beobachtet werden, dass IL22RA1(+)-Zelllinien eine dosisabhängige Erhöhung des Migrationsverhaltens zeigen, und somit sowohl ein signifikant erhöhtes Migrationsverhalten gegenüber der Negativkontrolle (Medium) als auch signifikant weniger Migration als die Positivkontrolle (Medium + 10% FCS) aufweisen. Zu beachten ist, dass es geringe Unterschiede in dem generellem Migrationsverhalten der unterschiedlichen Zelllinien gibt. In IL22RA1(-)-Zellen (MZ1790) konnten keine IL-22 abhängigen Effekte beobachtet werden, wobei die Positiv- und Negativkontrolle ähnliche Ergebnisse zeigte wie in den IL22RA1(+)-Zelllinien.

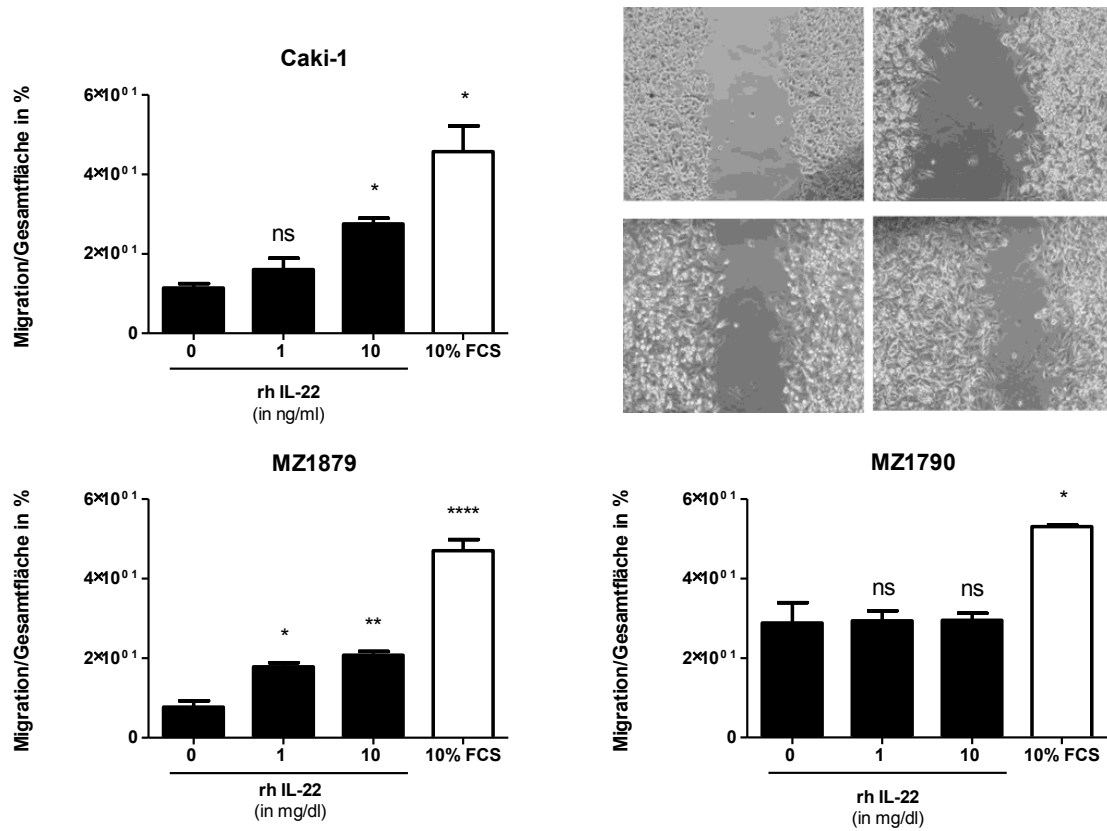


Abb. 3-14 Migrationsverhalten humaner Nierenzellkarzinomzelllinien

Die zellfreie Fläche wurde berechnet und gegenüber der ursprünglichen zellfreien Fläche in Verhältnis gesetzt. Als Zellen werden hier beispielhaft Caki-1 Zellen dargestellt wobei in der oberen Reihe Kontrolle und 1 ng/ml IL-22 dargestellt ist, in der Reihe darunter 10 ng/ml IL-22 und 10% FCS (jeweils von links nach rechts)

3.3.3 Vermehrte Proliferation in IL22RA1(+) Zellen unter IL-22 Stimulation

IL-22 ist als proliferativer Stimulus etabliert und trägt so zu einer beschleunigten Gewebsregeneration bei (siehe Kap. 1.3.2). Es sollte im Folgenden untersucht werden, ob IL-22 auch Einfluss auf das Wachstum von Nierenzellkarzinomzellen hat. Um das Wachstum zu quantifizieren, wurde der MTT-Assay durchgeführt, mit dessen Hilfe auf die Zellzahl zurückgeschlossen werden kann. IL22RA1(+)-Zelllinien zeigen eine erhöhte Absorption nach Inkubation mit IL-22, was auf eine höhere Proliferationsrate schließen lässt als in unstimulierten Zellen. IL22RA1(-)-Zelllinien wurden dagegen nicht durch IL-22 in ihrem Wachstumsverhalten verändert. Medium mit 10% FCS diene als positive Kontrolle, da hier ein starkes Wachstum der Zellen zu erwarten ist, was auch beobachtet wurde.

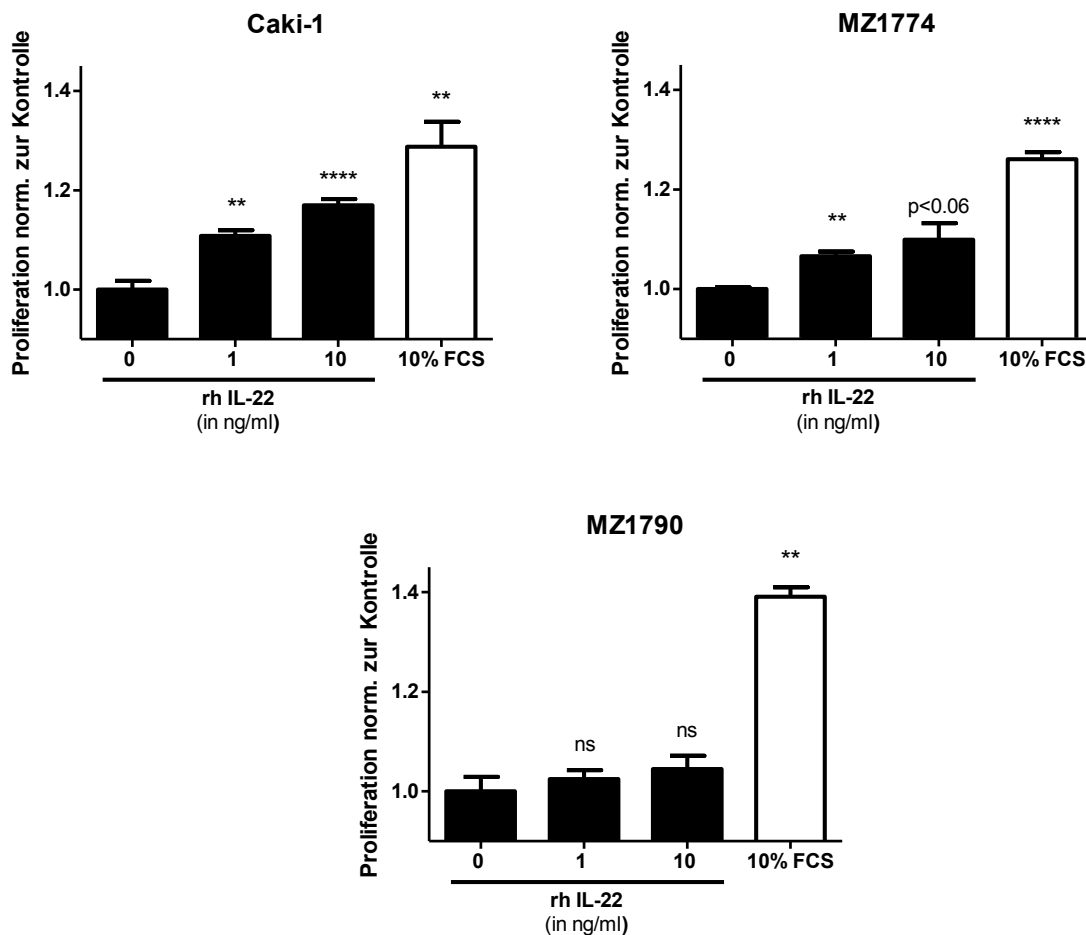


Abb. 3-15 Proliferation nach 24 Stunden

Stimulation mit beziehungsweise ohne IL-22. Caki-1 und MZ1774 sind Zelllinien mit IL22RA1 Expression, MZ1790 ohne IL22RA1 Expression.

3.3.4 IL-22 verringert Zelltod unter Hypoxie in IL22RA1(+) Zellen

Hypoxie ist ein Problem, das im Nierenzellkarzinom eine relevante Rolle spielt. Sowohl schnelles Wachstum als auch die dadurch verminderte Blutversorgung sind hierfür wichtig. Es wurde deshalb als nächstes der Fragestellung nachgegangen, ob IL-22 das Überleben von Zellen unter Hypoxie verbessert. Unter Hypoxie trat in allen Nierenzellkarzinomzelllinien Zelltod auf, wobei diese Zelltodrate ohne IL-22 als Kontrolle benutzt wurde. IL-22RA1(+)-Zelllinien zeigten eine je nach IL-22 Dosis verringerte Zelltodrate im Vergleich zur Kontrolle ohne IL-22 (Abb. 3-16). In MZ1790 (IL22RA1(-)) ließen sich diese Effekte dagegen nicht beobachten und es zeigten sich somit keine Effekte von IL-22 auf diese Zelllinie.

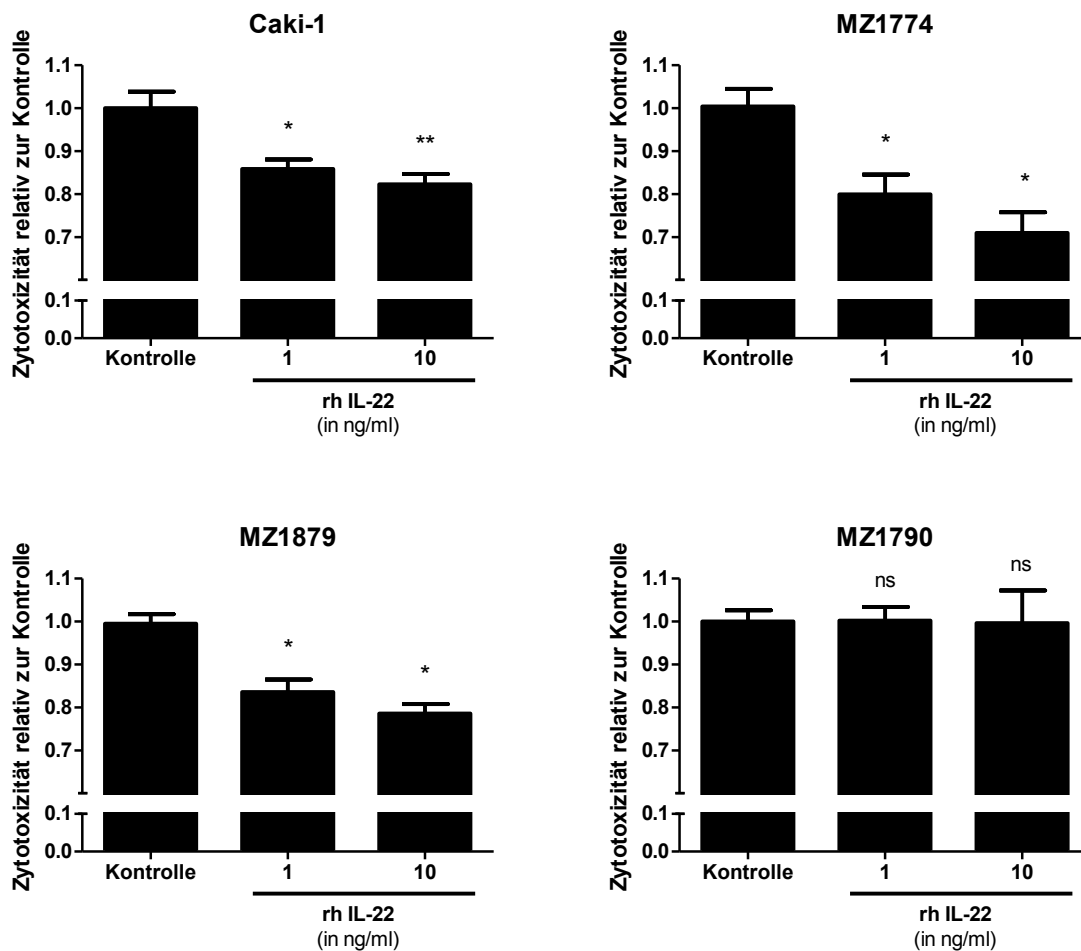


Abb. 3-16 Effekte von IL-22 auf Zelltod unter Hypoxie

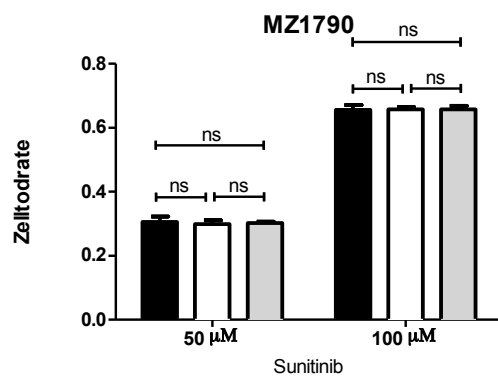
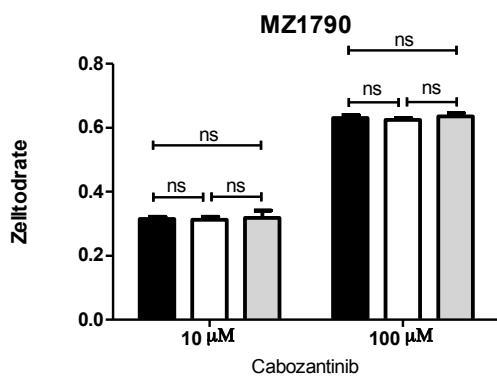
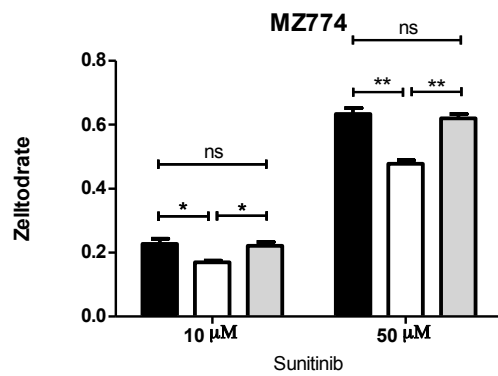
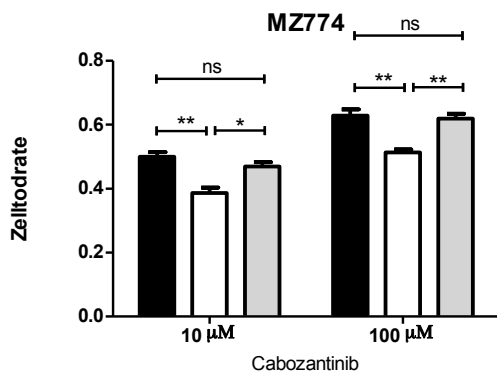
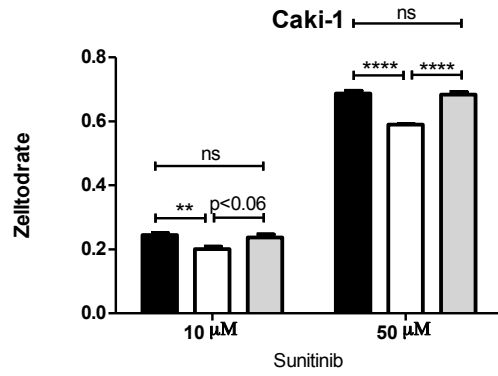
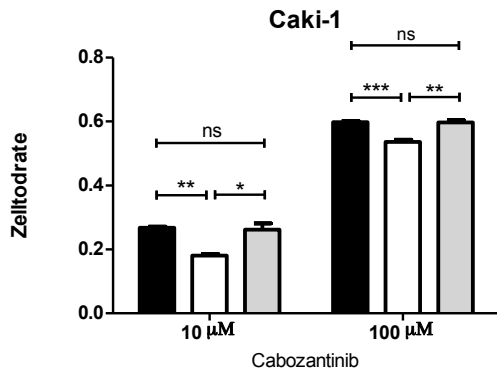
Die Zelltodrate wurde gegenüber der Kontrolle (0 ng/ml IL-22) normalisiert.

3.3.5 IL-22 verminderter Zelltod ist reversibel durch IL-22 AK

Eine der wichtigsten Überlegungen in Hinblick auf therapeutisches Vorgehen ist, welchen Einfluss IL-22 auf Zelltod unter Medikamententherapie hat. Es ist bereits beschrieben worden, dass in anderen Karzinomen eine positive Korrelation zwischen Therapieresistenz und IL-22 Serumspiegeln vorliegt (Kobold et al., 2013). Diese Effekte sollten im Folgenden genauer untersucht werden.

Bereits in den Hypoxieversuchen ist zudem aufgefallen, dass IL-22 in IL22RA1(+)-Zelllinien Zelltod verhindern kann. Diese Effekte sollten nun auch unter Medikamententherapie untersucht werden. Sunitinib, Sorafenib, Everolimus und Cabozantinib finden Anwendung in der Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms und wurden auch in den folgenden Experimenten verwendet. Es lässt sich beobachten, dass die verschiedenen Zelllinien unterschiedlich sensibel auf die Medikamente reagieren. So beträgt die Zelltodrate für Caki-1 unter 20 μ M Sorafenib 16% Prozent, während MZ1774 bei 1 μ M bereits eine Zelltodrate von 38% aufweist. Der beobachtete Zelltod lässt sich durch Inkubation mit IL-22 signifikant in den beiden Zelllinien Caki-1 und MZ1774 vermindern, die auch den IL-22 Rezeptor besitzen. MZ1790 zeigt dagegen keine Unterschiede in der Zelltodrate zwischen der Inkubation mit reinem Medium oder IL-22.

Wichtig zur Einschätzung therapeutischer Optionen im Nierenzellkarzinom ist der Versuch, ob sich die beobachteten IL-22 abhängigen Effekte mit Hilfe eines IL-22 Antikörpers antagonisieren lassen. Durch Zugabe des IL-22 AK lässt sich die IL-22 bewirkte Abnahme der Zelltodrate in den beiden IL22RA1(+) Zelllinien Caki-1 und MZ1774 rückgängig machen. Auf MZ1790 hat die Gabe von IL-22 oder des IL-22 Antikörpers dagegen keinen Effekt.



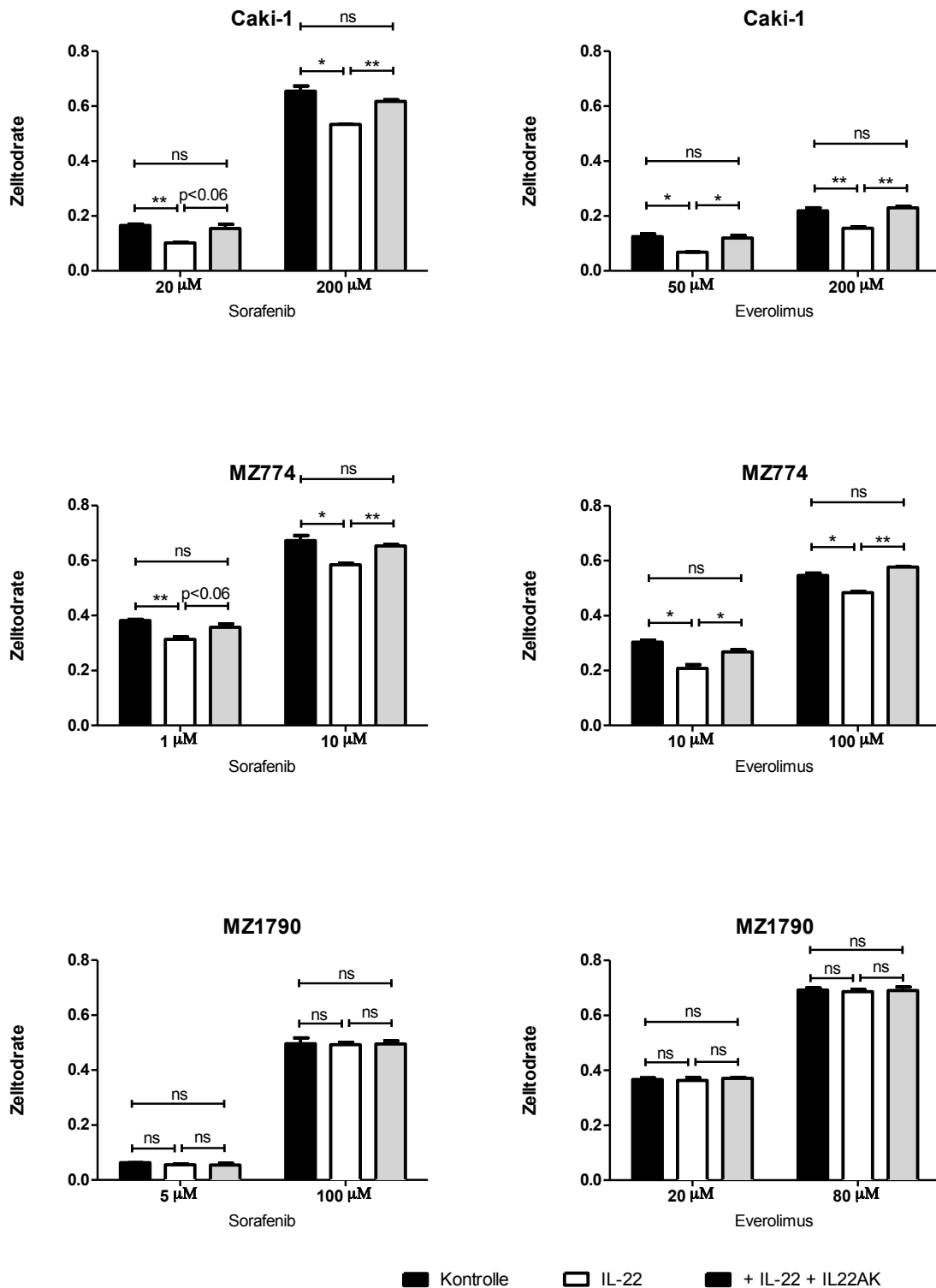


Abb. 3-17 Zelltod unter Medikamentenbehandlung

Dargestellt wird die relative Zelltodrate berechnet nach Kap. 2.2.4.1.

3.4 IL-22 Achse in der murinen Nierenzellkarzinomlinie Renca

Die Effekte, die *in vitro* in humanen Zelllinien beobachtet wurden, sollten auch in murinen Zellen untersucht werden. Hierzu griffen wir auf die murine Nierenzellkarzinomzelllinie Renca zurück, da sich diese auch für orthotope Tiermodelle eignet und somit ein wichtiges Modell für die Untersuchung immunologischer Vorgänge während des Tumorwachstums in der Niere ist.

3.4.1 Hohe IL22RA1 Expression in Renca Zellen

Zunächst sollte analog zu der Studie in humanen Zelllinien untersucht werden, ob Renca Zellen die wichtige IL22 Rezeptoruntereinheit IL22RA1 exprimiert. Verglichen wurde sie hierbei mit anderen Zelllinien, die in der Niere vorkommen. Renca Zellen zeigen eine hochsignifikant ($p < 0.001$) höhere Expression der IL22RA1 mRNA als meduläre Tubuluszellen (MTC), Glomeruläre Epithelzellen (GEC) und Fibroblasten (3T3). Zu beachten ist, dass die IL22RA1 Expression von MTCs auch signifikant höher ist als die von GEC und 3T3.

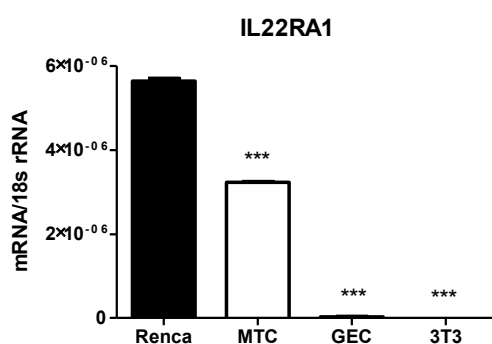


Abb. 3-18 IL22RA1 Expression in verschiedenen Zelltypen der Niere

Renca Zellen wurden mit medulären Tubuluszellen (MTC), Glomerulären Epithelzellen (GEC) und Fibroblasten (3T3) hinsichtlich ihrer IL22RA1 mRNA Expression verglichen.

3.4.2 IL-22 führt zu erhöhter Migration in Renca Zellen

Zunächst sollte wieder das Migrationsverhalten der Renca Zellen unter IL-22 Stimulation untersucht werden. Hierbei zeigt sich, dass es in allen Gruppen zu einer Migration in die zellfreie Fläche kommt. Innerhalb einer Gruppe lässt sich feststellen, dass je später gemessen wird (nach 24, 36 beziehungsweise 48 Stunden), desto kleiner die verbleibende freie Fläche ist. Zu jedem der drei Zeitpunkte zeigt sich außerdem, dass die Migration

abhängig von der gegebenen Dosis IL-22 ist. Nach 24, 36 und 48 Stunden ist die verbleibende freie Fläche signifikant kleiner, wenn die Zellen mit 1 ng/ml IL-22 beziehungsweise mit 10 ng/ml IL-22 stimuliert worden sind.

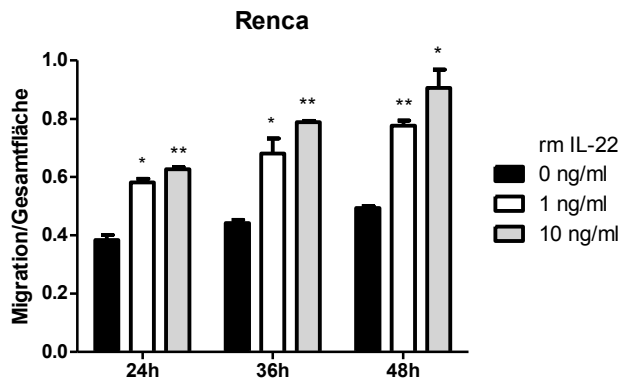


Abb. 3-19 Erhöhte Migration von Renca Zellen unter IL-22 Stimulation

3.4.3 IL-22 hat antiapoptotische Wirkung auf Renca Zellen unter Hypoxie

Analog zur Situation im Menschen spielt auch im murinen Karzinom Hypoxie und wie Zellen damit umgehen können, eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression. Um diese Einflüsse zu untersuchen wurden wiederum Renca Zellen unter Hypoxie mit verschiedenen Dosen rekombinant murinen IL-22 stimuliert. Hierbei zeigte sich ein dosisabhängig verringerter Zelltod. Interessanterweise lassen sich diese Effekte auch mit chemisch induzierter Hypoxie mittels CoCl_2 beobachten.

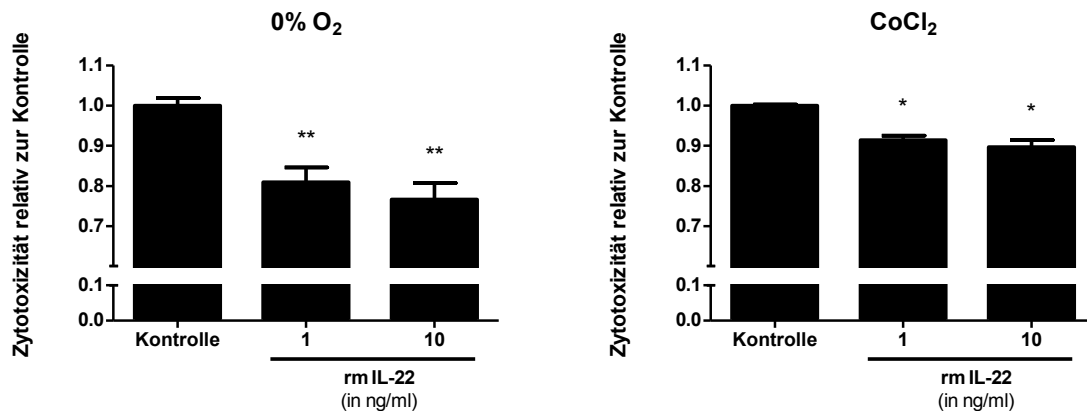


Abb. 3-20 IL-22 verhindert hypoxieinduzierten Zelltod in Renca Zellen

Dargestellt wird der durch Hypoxie herbeigeführte Zelltod relativ zu der gemessenen Zytotoxizität in der Kontrolle (1). 0% O₂ wurde mittels einer Gaskammer erreicht, wohingegen im zweiten Versuch Hypoxie chemisch mittels CoCl₂ herbeigeführt wird.

3.5 Renca Sphären als RCC Tumormodell

Spheroide haben in den letzten Jahren vermehrt Aufmerksamkeit auf sich gezogen, da sie eine wirksame Methode sind, um das Wachstumsverhalten und die Interaktion von Tumoren mit Immunzellen dreidimensional zu beobachten (Liu et al., 2016). Somit können auch Tierversuche verringert werden, da beispielsweise einige Interaktionen zwischen Tumorzellen und Immunzellen auf diesem Wege ebenfalls beobachtet werden können.

3.5.1 Renca Sphären besitzen nekrotische Zentren

Zunächst wurde die Kultivierung von Renca Sphären etabliert und das Wachstumsverhalten des Tumors beobachtet. Die Sphären wurden gefärbt, wobei tote Zellen PI aufnehmen und damit rot erscheinen. Im Zentrum der Sphären sind rote Zellen zu finden, die von mehreren Schichten blauer Zellen umgeben waren. Somit lässt sich zeigen, dass die Zellen kugelartige Sphären bilden, in deren Mitte sich ein nekrotisches Zentrum befindet, das von mehreren Schichten lebender Zellen umgeben wird.

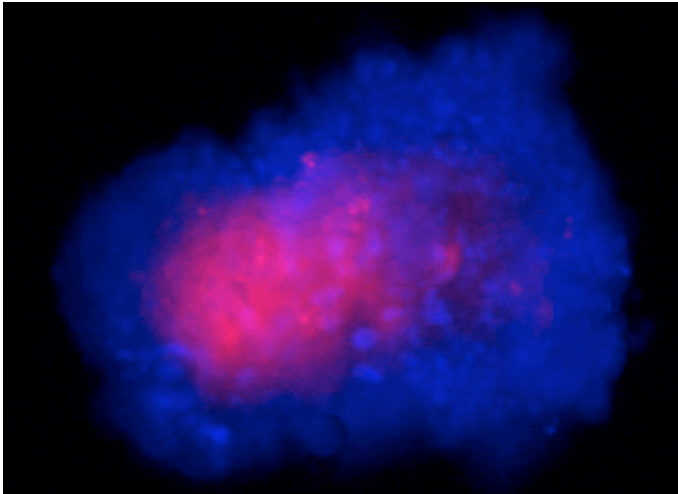


Abb. 3-21 Renca Sphäre mit nekrotischem Zentrum

Tote Zellen sind mit PI (rot) gefärbt, lebende Zellen mit Hoechst 33342 (blau) gefärbt.

3.5.2 DCs wandern in Renca Sphären ein

Inkubiert man Renca Sphären mit CMFDA markierten dendritischen Zellen, wandern diese innerhalb von 24 Stunden in die Renca Sphären ein. Dabei wandern die Zellen vorwiegend in die Zone zwischen lebenden und nekrotischen Zellen und siedeln sich in dieser Grenzzone an.

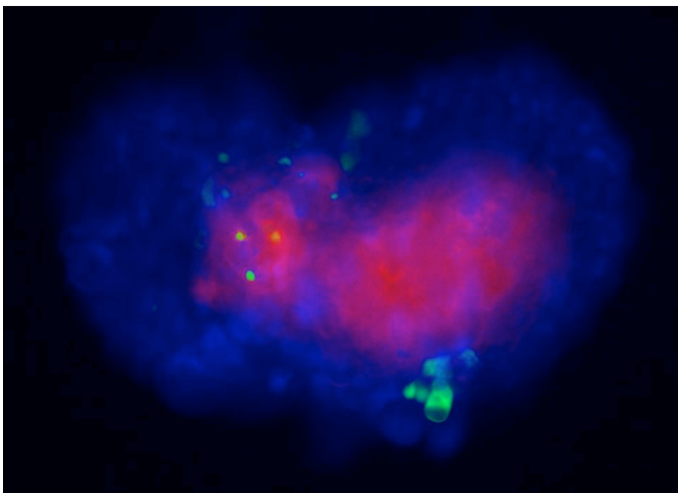


Abb. 3-22 Renca Sphäre mit eingewanderten Dcs

In der Fluoreszenzfärbung der Renca Sphären erscheinen lebende Zellen blau (Hoechst 33342), tote Zellen dagegen rot (PI) und BMDCs grün (CMFDA markiert).

3.5.3 BMDCs produzieren kein IL-22 nach Stimulation mit LPS, dafür IL1 β , IL-6 und TNF- α

Aus C57/Bl6 Mäusen generierte BMDCs sollen IL-22 produzieren. Da Renca Zellen aber einen Balb/c Hintergrund haben, sollte in den vorliegenden Experimenten auch BMDCs von Balb/c Mäusen verwendet werden. BMDCs mit Balb/c Hintergrund zeigen weder unstimuliert noch nach Gabe von LPS eine Sekretion von IL-22. Dagegen konnte bereits in der unstimulierten Gruppe eine geringe Konzentration der Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α gefunden werden. Nach Stimulation mit LPS zeigt sich ein hochsignifikanter Anstieg der drei Zytokine im Zellkulturüberstand der BMDCs.

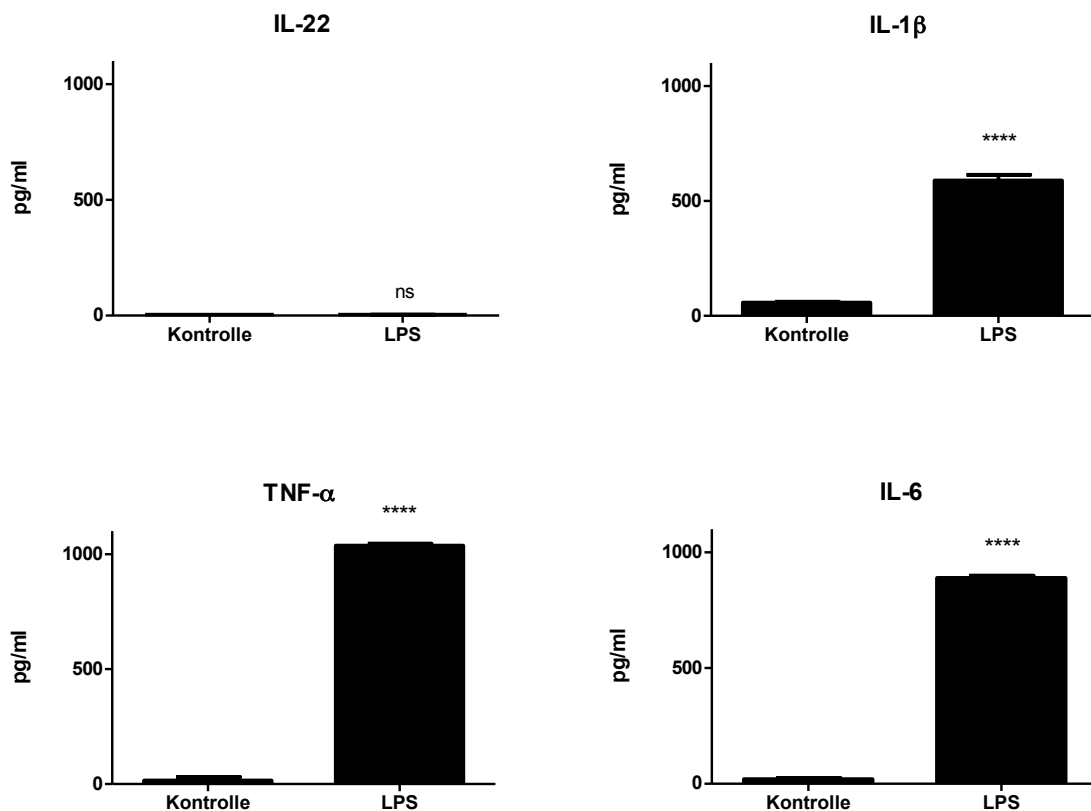


Abb. 3-23 Zytokinexpressionsprofil von BMDCs nach Stimulation mit LPS

In der Kontrollgruppe wurden die differenzierten BMDCs serumfrei stimuliert, in der LPS Gruppe wurden die BMDCs mit 100 ng/ml LPS stimuliert.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit hatte sich zum Ziel gesetzt die Rolle von IL-22 in der Pathogenese und Progression des Nierenzellkarzinoms zu untersuchen. Dabei wurde die Hypothese aufgestellt, dass IL-22 im Nierenzellkarzinom protumorale Effekte aufweist und so zur Progression und Invasivität der Erkrankung beiträgt. Die Hypothese wird durch Studien von Song (Song, 2017) gestützt, der gezeigt hat, dass die IL-22 Rezeptorexpression mit einem verschlechtertem Outcome bei Nierenzellkarzinompatienten assoziiert ist. Auch in anderen Tumorentitäten wurden protumorale Effekte von IL-22 beobachtet. So ist eine hohe IL-22 Expression im kleinzelligen Lungenkarzinom zu finden (Kobold et al., 2013), chemoresistente Lungenkarzinomzellen haben eine erhöhte Expression von IL22RA1 und proliferieren stärker nach IL-22 Gabe (Kobold et al., 2013) als unstimulierte Zellen. Zudem zeigen beispielsweise Glioblastomzellen eine verringerte Apoptoserate unter IL-22 Gabe und haben so einen Überlebensvorteil (Akil et al., 2015). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen diese Hypothese erfolgreich:

(1) Es wurde erfolgreich ein IL22RA1-Überexpressions/pSTAT3-Reportersystem erstellt, das die Aktivierung der IL-22/IL22RA1/pSTAT3-Achse messen kann. Hierzu wurde ein Gaussia-Luciferase-Reporter benutzt, der bei Phosphorylierung von STAT3 zur Sekretion von Gaussia-Luciferase führt.

(2) Die Expression von IL22RA1 ist in der Niere am höchsten und kann sowohl in einigen humanen als auch murinen Zelllinien detektiert werden. Abhängig von der IL22RA1 Expression zeigt IL-22 in humanen Nierenzellkarzinomzelllinien proliferative und antiapoptotische Effekte. Diese Effekte sind auch in der murinen Zelllinie Renca zu finden.

(3) Dendritische Zellen wandern in nekrotische Tumorsphären ein, produzieren aber nicht wie erwartet IL-22, dafür IL-1 β , IL-6 und TNF- α .

Aus diesen Ergebnissen ergeben sich nun einige Fragestellungen, die im Folgenden diskutiert werden. Dabei wird vor allem darauf eingegangen, wie sich die Ergebnisse in der Forschung anwenden und als Therapiekonzept im Rahmen personalisierter Medizin einsetzen lassen. Abschließend wird auf die Limitationen dieser Studie eingegangen sowie das in dieser Studie erarbeitete neue Konzept von IL-22 im Nierenzellkarzinom zusammengefasst.

4.1 Die IL-22 Signalkaskade im IL22RA1/pSTAT3-Reportersystem

Gaussia-Luciferase ist ein sehr vielseitig einsetzbares Enzym und kann benutzt werden, um nichtinvasiv die Expression von Genen, Promoteraktivität, Protein-Proteininteraktionen, Signaltransduktionsprozesse sowie Tumorwachstum und Ansprechen von Therapien zu messen (Maguire et al., 2009). Wir benutzen Gaussia-Luciferase, um die Phosphorylierung von STAT3 zu messen. Als Zellen wollten wir HEK293 Zellen verwenden, da diese sehr robust und einfach zu transfizieren sind. Die Mikroarrayanalysen dieser Zellen hatte jedoch ergeben, dass sie keine IL-22 Rezeptor exprimieren. Dies war allerdings ein Vorteil, weil wir hierdurch gleich einen induzierbaren IL-22 Rezeptor in die Zellen einbauen konnten, was wichtig für die Analyse ist. Nur so kann eine Phosphorylierung von STAT3 über den IL-22 Signalweg von anderen Signalwegen, die über STAT3 laufen, unterschieden werden. Wir mussten für unser Reportersystem also ein induzierbares Expressionsplasmid herstellen, das durch Doxycyclingabe zur Transkription von IL22RA1 führt, und ein Reporter Plasmid, das nach Phosphorylierung von STAT3 Gaussia-Luciferase herstellt.

Das pSTAT3-Reporter Plasmid wurde dabei mittels einfacher Ligation hergestellt, während für das IL22RA1 Expressionsplasmid auf *Gateway Cloning* zurückgegriffen wurde. Der genaue Aufbau der jeweiligen Plasmide ist im Methodenteil detailliert dargestellt, weshalb im Folgenden nur die wichtigsten Elemente erklärt werden, die zum Verständnis der Funktion wichtig sind. Das pSTAT3-Plasmid produziert einerseits als Reaktion der Bindung von pSTAT3 an die entsprechenden Sequenzen Gaussia-Luciferase, andererseits exprimiert es dauerhaft einen Tet-Repressor (siehe Abb. 4-1). Der Tet-Repressor wiederum bindet an eine Sequenz im Promotorbereich des IL22RA1-Plasmids und verhindert dadurch die Transkription von IL22RA1 mRNA. Wird jedoch Doxycyclin hinzugegeben, bindet dieses an den TetR und verändert dessen Konfiguration. Hierdurch kommt es zu keiner Bindung an die Promotersequenz mehr und die IL22RA1 mRNA kann transkribiert werden.

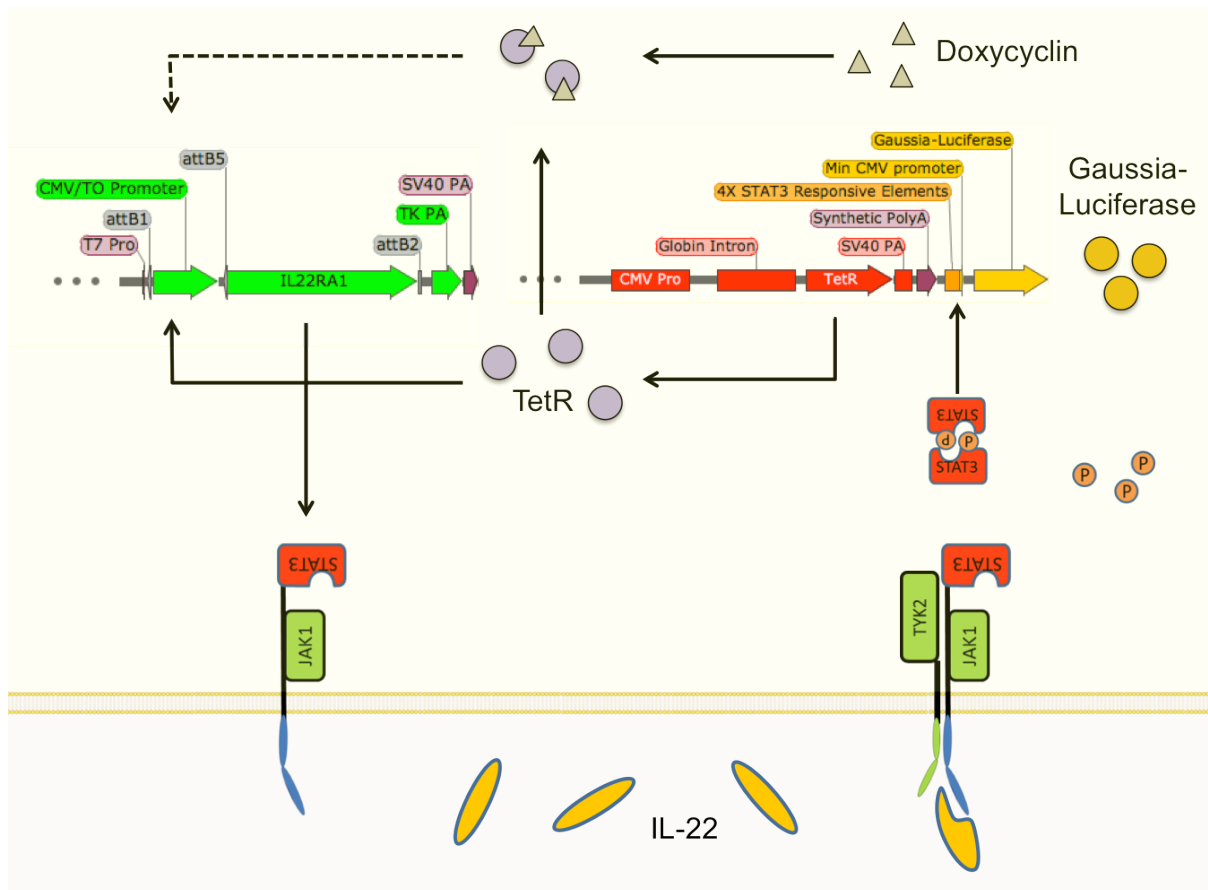


Abb. 4-1 IL22RA1 Expressions/pSTAT3 Reportersystem

Der Tet-Repressor geht nach Bindung von Doxycyclin eine Konformationsänderung durch und kann nicht mehr an die CMV/TO Promoterregion binden (gestrichelter Pfeil). Bindet der Tet-Repressor nicht mehr an die Promotorsequenz, kann IL22RA1 transkribiert und translatiert werden. Kommt es zu einer Bindung von IL-22 (in gelb) an den Rezeptor, wird das intrazelluläre STAT3 phosphoryliert. Das phosphorylierte STAT3 bindet dann an die STAT3 responsive elements und führt zur Bildung von Gaussia-Luciferase, die extrazellulär sezerniert wird. Abk.: TetR: Tet-Repressor.

4.2 Das IL-22RA1/pSTAT3 Reportersystem als Methode zum Drugscreening

Im Rahmen dieser Arbeit ist nun erfolgreich die Funktionalität des IL22RA1/pSTAT3 Reportersystems demonstriert worden. Das System kann unterschiedliche IL-22 Konzentrationen dosisabhängig mittels der sezernierten Gaussia-Luciferase messen. Die Expression der wichtigen IL22 Rezeptoruntereinheit IL22RA1 kann in transfizierten Zellen nachgewiesen werden und ist auch doxycyclinabhängig, wobei bereits transfizierte Zellen ohne Doxycyclin eine Expression der IL22RA1 mRNA zeigen. Transfizierte Zellen zeigen zudem auch ohne Doxycyclin eine gesteigerte Gaussia-Luciferase-Aktivität nach IL-22 Stimulation im Zellkulturüberstand. Dies ist wahrscheinlich auf eine inkomplette Suppression des Promoters durch den Tet-Repressor zurückzuführen, wodurch auch ohne Doxycyclin eine

eingeschränkte Transkription der IL22RA1 mRNA stattfinden kann. Bestimmt man den Quotient der Gaussia-Luciferase-Aktivität der HEK293 Zellen mit und ohne Doxycyclin kann diese Hintergrundaktivität allerdings eliminiert werden. Das Reportersystem reagiert zudem gleichermaßen auf rekombinant murines und humanes IL-22 und hat damit eine breite Anwendungsmöglichkeit in Experimenten mit humanen und murinen Zellen.

Nachdem also gezeigt wurde, dass das System funktioniert, wird im Folgenden dargelegt, was die möglichen Anwendungsgebiete sind. Ein wichtiger Einsatzbereich dieses Systems kann im *Drug Screening* gesehen werden. In der pharmazeutischen Forschung werden häufig sogenannte *Small molecules* getestet, die bessere pharmakologische Eigenschaften als beispielsweise Antikörper aufweisen (Paul et al., 2010). Im Entwicklungszyklus eines Medikamentes werden oft noch in akademischer Forschung Zielstrukturen beschrieben, die in den jeweiligen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen. Anschließend wird versucht ein Molekül zu finden beziehungsweise zu designen, das mit der Zielstruktur interagiert (Target to Hit). In folgenden Schritten wird dieses Molekül noch verändert, um bessere pharmakologische Eigenschaften zu erreichen (Hit to Lead). Der Prozess, in dem ein Molekül für die Zielstruktur (Target to Hit) gefunden wird, ist von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung eines Pharmakons, da es den Anfang der langen und teuren Entwicklung darstellt. Dabei werden je nach Herangehensweise nach *in silicio* Vorauswahlen oder dem Einsatz von künstlicher Intelligenz (Marechal, 2008) ganze Molekülbibliotheken nach dem Zufallsprinzip durchsucht und getestet, ob die entsprechenden Moleküle die Zielstruktur aktivieren beziehungsweise inhibieren.

Hierbei kann unser Reportersystem ein kostengünstiger und robuster Assay sein, der auch Hochdurchsatz-Screening geeignet ist (Maguire et al., 2009). Gaussia-Luciferase wird nach extrazellulär sezerniert und kann somit im Zellkulturüberstand gemessen werden, was beispielsweise Zelllyseschritte einspart. Außerdem sind so auch sequentielle Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten möglich.

Unser System lässt zwei mögliche Anwendungsfelder zu. In Hinblick auf die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen in Abschnitt 3.4 und unter Berücksichtigung der Literatur wird in der Onkologie an Antagonisten der IL-22 Achse geforscht (Lim and Savan, 2014). Genauso wichtig ist aber auch die Untersuchung von potentiellen Agonisten der IL-22 Achse. Diese spielen vor allem in der Regeneration der Niere eine Rolle (Kulkarni et al., 2014), was aber in

der Erforschung des Nierenzellkarzinoms vor dem Hintergrund der Niereninsuffizienz eine wichtige Rolle spielt.

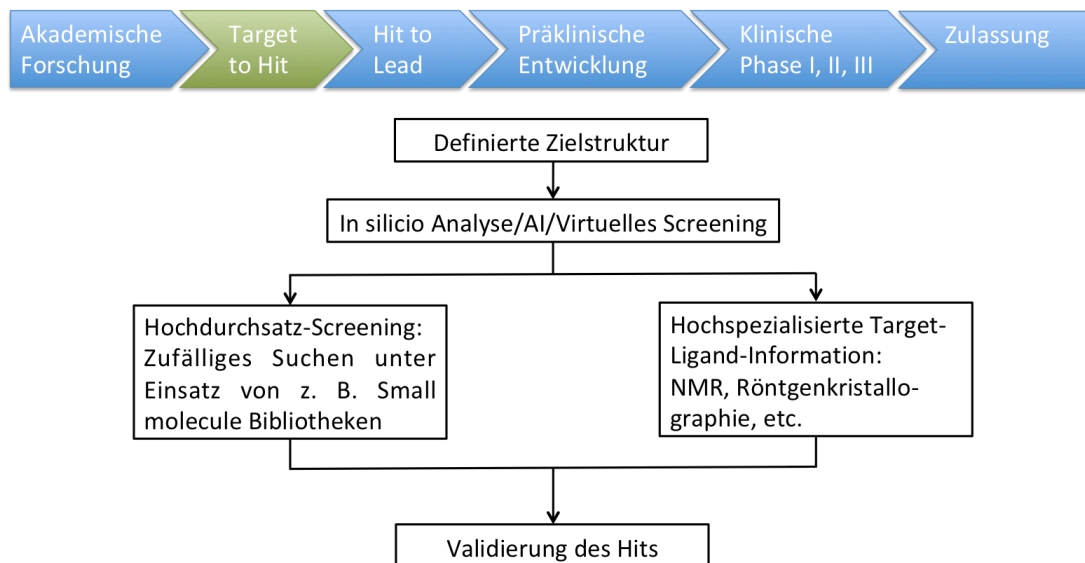


Abb. 4-2 Medikamentenentwicklungszyklus

Die Entwicklung von Target zum Hit beginnt mit einer definierten Zielstruktur. Dann können computergestützte Vorauswahlen getroffen werden. Anschließend gibt es zwei mögliche Wege, wobei die gezeigten Methoden die beiden Extreme darstellen. Entweder wird auf Zufall basierende Screeningverfahren zurückgegriffen oder versucht über spezialisierte Strukturanalysen einen Hit zu finden. Abk.: AI: Artificial intelligence, NMR: nuclear magnetic resonance [(Modifiziert nach (Paul et al., 2010) und (Bleicher et al., 2003))]

An welcher Stelle der IL-22 Signalkaskade dabei angegriffen werden soll, wird in Kap. 4.4 eingehend diskutiert. Das Testsystem kann jedoch alle Modulationen auf der Höhe von pSTAT3 oder Upstream davon abbilden, da die Aktivierung der Zelle erst durch die Konzentration von phosphoryliertem STAT3 gemessen wird.

4.3 Die IL-22 Achse in der Niere

Die humane Niere zeigt eine vergleichsweise hohe Expression der für das IL-22 Signaling wichtigen IL22RA1 Rezeptoruntereinheit. Daneben wurden in Leber und Colon ebenfalls hohe IL22RA1 Expressionen gefunden. Dies verwundert nicht, da in beiden Organen zahlreiche Pathologien bekannt sind, die über IL-22 Signaling zumindest in Teilen vermittelt werden. So spielt IL-22 beispielsweise eine wichtige Rolle im Kolonkarzinom (Kirchberger et al., 2013) und trägt zur Regeneration der Leber in verschiedenen Tiermodellen bei (Radaeva et al., 2004). In der Niere ist die Expression von IL22RA1 bekannt und einige Erkrankungen sind untersucht worden, in denen IL-22 hier eine wichtige Rolle spielt. So ist in Patienten, die

an systemischen Lupus erythematodes leiden, erhöhte IL-22 Plasmalevel beobachtet worden (Zhao et al., 2013). Da das Nierenzellkarzinom von Tubuluszellen ausgeht und die Hauptexpression von IL22RA1 auf diesen ist, wurde die Hypothese aufgestellt werden, dass auch im Nierenzellkarzinom diese Signalachse eine Rolle spielt.

4.3.1 Die IL-22 Rezeptorexpression im Nierenzellkarzinom

Vergleicht man die Expressionsraten des IL22RA1 mRNA zwischen den verschiedenen Nierenzellkarzinomzelllinien fällt eine große Heterogenität auf. Es wurde bereits von einer anderen Forschungsgruppe beschrieben, dass Nierenzellkarzinome verschiedener Patienten deutlich unterschiedliche IL22RA1 Expressionsraten aufweisen (Urbschat et al., 2016). Diese Heterogenität wurde in den gezeigten Experimenten ebenfalls beobachtet. Die verschiedenen Tumorzelllinien, die ursprünglich aus humanen Nierenzellkarzinomen gewonnen worden sind, zeigen deutliche Unterschiede in der IL22RA1 Expressionsrate. Caki-1, MZ1774 und MZ1879 zeigen eine deutliche Expression des Rezeptors (IL22RA1+), wohingegen MZ1790 keine Expression des Rezeptors aufweist.

IL22RA1(+)-Zelllinien reagieren mit erhöhter Proliferation, Migration sowie verringertem Zelltod unter Hypoxie und Medikamententherapie. Proliferation (Kobold et al., 2013) und verringerter Zelltod (Akil et al., 2015) sind auch in Zelllinien anderer Karzinomentitäten beobachtet worden. Dem gegenüber stehen die Ergebnisse einer chinesischen Arbeitsgruppe, die für die Nierenzellkarzinomzelllinie A498 gezeigt hat, dass (Zhang et al., 2011) IL-22 die Proliferation dieser Zelllinie hemmt und zu einem G2/M-Phasen Arrest führt. Diese Effekte werden über pSTAT1 vermittelt. In einem Xenograft-Mausmodell wurde in der gleichen Studie nach IL-22 Behandlung ein geringeres Tumolvolumen beobachtet (Zhang et al., 2011). Demgegenüber ist in einer Studie zur SOCS3 Expression im Nierenzellkarzinom kein Unterschied der IL-22 und IL-22 Rezeptor Expression zwischen gesundem Gewebe und Tumoren gefunden werden (Urbschat et al., 2016). Es zeigte sich aber die bereits angesprochene hohe interpersonelle Variabilität der IL-22 Rezeptor Expression und nicht signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Weiterhin ist bekannt, dass die Zelllinie Caki-1 den IL-22 Rezeptor exprimiert (Kotenko et al., 2001), wobei dessen Funktionalität bisher nicht überprüft wurde. Auch für die Zelllinie TK-10 ist eine IL22RA1 Expression beschrieben worden. Anders als in A498 ist für diese Zelllinie eine deutliche

Phosphorylierung von STAT3 nach IL-22 Stimulation beschrieben worden (Xie et al., 2000), was auch in anderen Geweben häufig zu beobachten ist (Radaeva et al., 2004).

In der murinen Niere exprimieren nur Tubuluszellen den IL-22 Rezeptor (Kulkarni et al., 2014). Interessanterweise sind von zwei Arbeitsgruppen klare Effekte von IL-22 auf Tubuluszellen der Niere beschrieben worden. In akuten Schädigungsmodellen der Niere (AKI) kann durch IL-22 der hypoxieinduzierte Zelltod von murinen Tubuluszellen verringert (Xu et al., 2014) werden. Zudem wurde in Scratchassays gezeigt, dass IL-22 proregenerative Effekte auf primäre Tubulusepithelzellen hat (Kulkarni et al., 2014). Auch diese Effekte sind auf eine Phosphorylierung von STAT3 zurückzuführen (Kulkarni et al., 2014). Sie unterstützen damit die Ergebnisse dieser Arbeit, und verdeutlichen, dass der klassische Signalweg über STAT3 abläuft.

4.3.2 Die IL-22 Sekretion im Nierenzellkarzinom

Bisher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Wirkung von IL-22 an verschiedenen Nierenzellkarzinomzelllinien untersucht und somit *in vitro* Hypothesen generiert, was die Effekte von IL-22 im Nierenzellkarzinom sind. Um die Rolle von IL-22 im Nierenzellkarzinom zu verstehen, muss aber auch untersucht werden, ob und wie es zu einer lokalen Produktion von IL-22 kommt.

Im Menschen sind zahlreiche Zelltypen beschrieben worden, die IL-22 produzieren. Hier wird IL-22 hauptsächlich von ILCs, T_H17 und T_H22 Zellen produziert. Daneben sind aber auch einige andere Immunzellen beschrieben worden, die IL-22 produzieren. In weiteren Experimenten wird herauszufinden sein, welche Zellen im Nierenzellkarzinom hierfür verantwortlich sind. In der gesunden humanen Niere war in der vorliegenden Arbeit nur eine sehr niedrige IL-22 Expression nachzuweisen. IL-22 wird also erst auf bestimmte auslösende Faktoren hin sezerniert und ist dann an der Entstehung beziehungsweise Aufrechterhaltung von Pathologien beteiligt. Auch in Mausmodellen sind in den verschiedenen Krankheitsmodellen unterschiedliche Zelltypen beschrieben worden, die IL-22 produzieren. Die Versuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten kein IL-22 in dendritischen Zellen, die aus dem Knochenmark von Balb/c Mäusen isoliert worden sind, nachweisen. In BMDCs von C57/ Bl6 Mäusen wurde allerdings IL-22 nachgewiesen (Kulkarni et al., 2014). Hier können spezifische Unterschiede zwischen diesen beiden Mausstämmen vorliegen, was beispielsweise für die Expressionslevel anderer Zytokine beschrieben ist (Watanabe et al.,

2004). Interessanterweise wurde in einem Rag^{-/-} Mausmodell, das keine T-Zellen hat, CD11c⁺ Zellen als Quelle von IL-22 identifiziert (Zheng et al., 2008) und als dendritische Zellen interpretiert. Später wurden diese Zellen aber als ILCs beschrieben (Lamarthee et al., 2016). Andere Gruppen haben in *in vitro* Experimenten keine relevanten IL-22 Produktion in murinen dendritischen Zellen feststellen können (Rutz et al., 2013).

IL-1 β , IL-6 und TNF- α konnten dagegen gefunden werden, was von anderen Arbeitsgruppen bereits publiziert ist (Morelli et al., 2001). Von diesen drei Zytokinen ist IL-1 β ein sehr gut etablierter Faktor, der die IL-22 Produktion stimuliert (Sutton et al., 2009). Es wurde beispielsweise gezeigt, dass nekrotischer Supernatant von Tumorzelllinien über IL-1 β Sekretion von myelischen Zellen zu IL-22 Sekretion von CD4⁺ Zellen führt (Voigt et al., 2017). Auch von dendritischen Zellen sezerniertes IL-6 und TNF- α kann zu IL-22 Produktion führen (Duhon et al., 2009). Es wird in Tiermodellen mit Renca Zellen herauszufinden sein, welche Immunzellen hier IL-22 produzieren, und wie diese Sekretion von dendritischen Zellen über Zytokinausschüttung orchestriert wird.

4.4 Therapeutische Optionen zur Blockade der IL-22 Achse im Nierenzellkarzinom

Es stellt sich nun die Frage, wie man nun in die IL-22 Signalkaskade am besten therapeutisch eingreift. Im Prinzip kann die ganze Signalkaskade therapeutisch angegriffen werden (siehe Abb. 4-3). Man unterscheidet dabei Faktoren, die zu einer verringerten IL-22 Produktion führen von Antikörpern, die bereits gebildetes IL-22 neutralisieren beziehungsweise die Bindung an den IL 22 Rezeptor verhindern. Von diesen beiden Klassen lassen sich Substanzen unterscheiden, die intrazellulär mit an der Signaltransduktion beteiligten Kinasen beziehungsweise Transkriptionsfaktoren interagieren.

Die in der Kaskade früheste Blockade kann durch Antikörper bewirkt werden, die die von dendritischen Zellen sezernierten Zytokine TNF- α , IL-23 und IL-1 β blockieren. Diese Antikörper verhindern dadurch die Aktivierung und das Überleben von T-Zellen. Die Blockade von TNF- α , IL-23 und IL-1 β wird bereits in Erkrankungen wie Psoriasis (Leonardi et al., 2008) und rheumatoide Arthritis (Maini et al., 1999) eingesetzt, ist aber nicht spezifisch für den IL-22 Signalweg. Zudem besteht das Risiko, durch Ausschaltung wichtiger Entzündungssignalwege vermehrt Infektionen und Tumore zu bekommen (Bongartz et al.,

2006). Andere Autoren diskutieren dagegen beispielsweise IL-1 β als interessante Zielstruktur, um IL-22 vermittelte protumorale Effekte zu verringern (Voigt et al., 2017).

Es können außerdem auch weitere Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren in den T-Zellen angesteuert werden, um die IL-22 Sekretion zu verringern. Hierzu zählt der Aryl Hydrocarbon Rezeptor (AhR), der eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von T-Zellen und Produktion von IL-22 spielt (Ramirez et al., 2010). Wir haben gezeigt, dass in verschiedenen renalen Krankheitsmodellen die AhR/Notch Achse unterschiedlich reguliert ist (Weidenbusch et al., 2017). Die Bedeutung dieser Achse muss somit im Nierenzellkarzinom noch untersucht werden und damit die Frage, welche Effekte eine Modellierung dieser Achse haben würde. Neben AhR ist die CCL20/CCR6 Achse ein möglicher Angriffspunkt für eine Medikamententherapie. CCR6 ist ein Rezeptor, an den CCL20 binden kann, womit T-Zellen in das Gewebe angelockt werden (Wang et al., 2009). Bleiben in der T-Zelle Signale von diesem Rezeptor aus, werden weniger T-Zellen in das entsprechende Gewebe rekrutiert und entsprechend kein IL-22 gebildet.

Haben T_H22, T_H17 oder ILC3 IL-22 bereits gebildet, kann die lokale IL-22 Konzentration durch neutralisierende Antikörper oder durch das IL-22 Binding Protein (IL-22BP) verringert werden. Eine Gruppe hat gezeigt, dass ein Mangel an IL-22 BP zu einer verstärkten Tumorbildung in einem kolitisinduzierten Tumormodell führt (Huber et al., 2012). Diese Studie verdeutlicht die große Bedeutung von IL-22 BP in der Regulation der IL-22 Achse und zeigt gleichzeitig das therapeutische Potential auf, das in der Regulation der IL-22 BP Expression liegt. IL-22 BP als endogener IL-22 Blocker wird durch Inflammasomaktivierung in Folge eines Gewebeschadens verringert exprimiert und begünstigt so über höhere lokale IL-22 Spiegel die Regeneration. Alternativ zu Antikörpern, die IL-22 selbst binden, kann auch die Bindung von IL-22 an seinen Rezeptor mittels Antikörper, die den extrazellulären Teil des Rezeptors binden, unterbunden werden.

Intrazellulär können die an der Phosphorylierung von STAT3 beteiligten Moleküle JAK1 und TYK2 blockiert werden. Wie die Forschung in anderen Tumorentitäten und der Rheumatologie zeigt, ist hierbei auf den genauen Subtyp des Janus Kinase zu achten. Es sollte ein möglichst selektiver Inhibitor gefunden werden, um Nebenwirkungen zu minimieren (Norman, 2014). Sirtuin 1 (SIRT 1) kann darüber hinaus mittels Deacetylierung die weiteren Funktionen von STAT3 nach IL-22 Aktivierung verhindern (Sestito et al., 2011).

Die höchste Effektivität scheint die Blockade des IL22RA1 Rezeptors zu haben (Sabat et al., 2014). Die selektive Expression auf Epithelzellen reduziert die Beeinflussung anderer Signalkaskaden. Trotzdem sind zahlreiche Nebenwirkungen vorstellbar. Gerade bei Patienten, die an epithelialen Infektionen oder an Leber- oder Pankreasschaden (beides alkoholinduziert) leiden, sollte spezielle Vorsicht geboten werden, da hier IL-22 entscheidend an Regenerationsprozessen beteiligt ist.

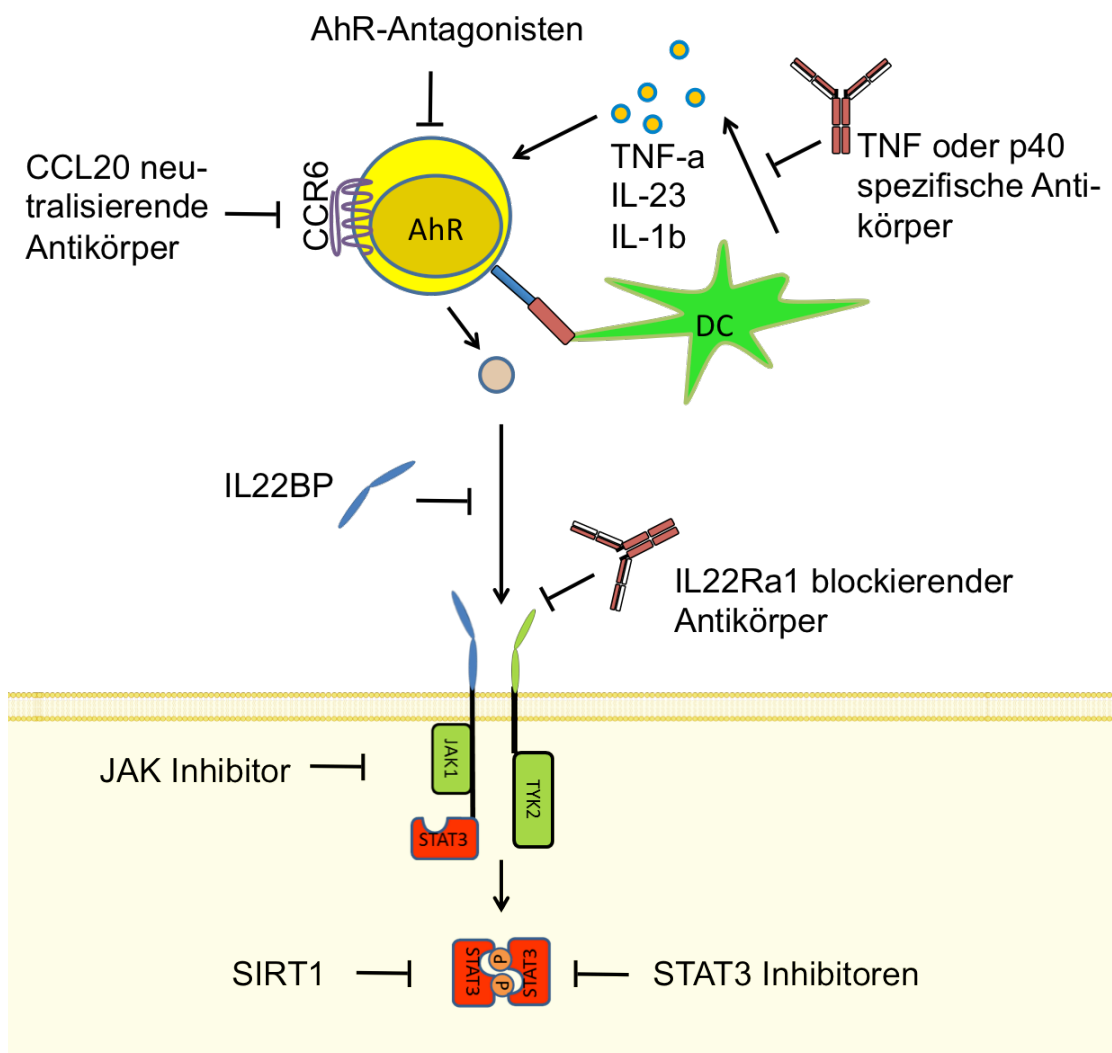


Abb. 4-3 Therapeutische Optionen der IL-22 Achsen Blockade

Extra- und intrazelluläre Targets zur Inhibierung des IL-22 Signalweges. Abk.: DC: dendritische Zellen, CCR6: Chemokinrezeptor 6 auf T-Zelle, SIRT1: Sirutin 1, [modifiziert nach (Sabat et al., 2014)].

Limitierend für den Einsatz von Blockern der IL-22/IL22RA1 Achse im Nierenzellkarzinom scheint auch zu sein, dass sie an der Regeneration von Nierengewebe entscheidend beteiligt sind. In Ischämie-modellen der murinen Niere wurde gezeigt, dass Interleukin 22 die Regeneration beschleunigt und zu einem verminderten Untergang von Tubuluszellen führt

(Kulkarni et al., 2014; Xu et al., 2014). Während einer partiellen Nephrektomie wird die Arteria renalis für circa 20 Minuten (Krane et al., 2013) geklemmt. Durch die Entfernung des Tumors mit entsprechendem Sicherheitsabstand kommt es bereits zum Verlust von Nierengewebe und damit Verlust von Filtrationsleistung. Der zusätzliche Schaden durch die Ischämie (Funahashi et al., 2012) kann zu Niereninsuffizienz und damit zu einem verschlechtertem Outcome führen (Weight et al., 2010). Schlussfolgernd lässt sich somit feststellen, dass der Einsatz von IL-22 Antikörpern im Zeitbereich der Nephrektomie kritisch zu sehen ist und somit am besten adjuvant nach Nephrektomie bei verbliebenen Tumorresten oder bei inoperablen Tumor durchzuführen ist. Analog beispielsweise zur Therapie mit selektiven Östrogenrezeptormodulatoren (SERM) bei östrogenrezeptorpositivem Mammakarzinom (Lim et al., 2012) sollte zudem vor Therapiebeginn der Nachweis eines positiven IL22 Rezeptorstatus erfolgen, da der Einsatz dieser Medikamente auf Grund der beschriebenen Nebenwirkungen nicht risikolos ist.

4.5 Immuntherapie und IL-22

In der Einleitung dieser Doktorarbeit ist die besondere Stellung der Immuntherapie in der modernen Tumorthherapie angeklungen. Unbestritten ist auch beispielsweise die wichtige Rolle von Nivolumab als Antikörper gegen den PD-1 Rezeptor im fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom (Motzer et al., 2015). Dennoch rücken nun, da mehrere Jahre Erfahrung mit dieser Substanzklasse besteht, vermehrt die Nebenwirkungen (Postow et al., 2018) und Therapieversagen in den Vordergrund. Im Falle von Nivolumab sprachen gerade einmal 25% der Patienten auf die Therapie an [allerdings gegenüber 5% in der mit Everolimus behandelten Kontrollgruppe (Motzer et al., 2015)]. Auch Kombinationen wie Nivolumab zusammen mit Ipilimumab wurden in einer Phase III Studie getestet und zeigten noch etwas bessere Ansprechraten (Escudier et al., 2017).

Bisher hat noch keine Studie untersucht, welchen Einfluss die Immuncheckpointblockade auf die Serumspiegel von IL-22 beziehungsweise auf die Frequenz von IL22+T-Zellen im Tumorgewebe hat. Eine Studie hat gezeigt, dass die Blockade von CTLA-4 in T_H17-Zellen zu einer verstärkten IL-22 Sekretion führt (Ying et al., 2010). Auch ist gezeigt worden, dass die PD-1/PD-L1 Achse zu einer verringerten Aktivierung von T_H22-Zellen führt, die dadurch weniger proliferieren und IL-22 sezernieren (Sugita et al., 2013). Diese Studien lassen vermuten, dass Therapien mittels Immuncheckpointblockade mit einer Disinhibierung von T-

Zellen (Postow et al., 2015) auch die Frequenz an IL-22+Zellen steigen lassen. Dies könnte in einer bestimmten Patientensubgruppe beispielsweise mit erhöhter IL22RA1 Expression im Tumorgewebe zu Therapieversagen führen.

Welche Patienten aber profitieren und welche nicht? Diese Frage wird in Zukunft genau zu hinterfragen sein. Hierbei muss auf die Frage nach personalisierter Medizin im Nierenzellkarzinom nachgegangen werden, da nur auf diesem Wege die bestmögliche Ansprechrate mit minimalen Nebenwirkungen erzielt werden kann.

4.6 Personalisierte Medizin in der Therapie des Nierenzellkarzinoms

In der Therapie des Nierenzellkarzinoms wird das Repertoire der Therapiemöglichkeiten durch die neuen Möglichkeiten der Immuntherapie noch einmal deutlich erweitert. Gleichzeitig zeigt sich aber, dass es nicht den einen richtigen Therapiealgorithmus gibt, sondern dass für jeden Patienten abhängig von Risikokonstellationen eine individuelle Therapie gefunden werden muss. Hierzu müssen aber klare Kriterien geschaffen werden, nach denen die Auswahl der jeweiligen Medikamente erfolgt. Bisher wird ein Nierenzellkarzinom lediglich nach histologischen Subtyp sowie Eindringtiefe und Metastasierung unterteilt. Mit Einführung neuer Therapiemöglichkeiten und verbesserter Kenntnis molekularer Vorgänge erscheint es aber, dass diese Kriterien Nierenzellkarzinome nicht ausreichend beschreiben. Im Zuge der Möglichkeiten moderner Sequenziertechniken zeigt sich immer deutlicher, dass weniger die primäre Tumorlokalisierung ausschlaggebend für die Klassifikation sein sollte, sondern das genetische und epigenetische Profil des Tumors (Heim et al., 2014). Um das Outcome der Patienten weiter zu verbessern und die Toxizität der Therapie zu senken, sollte die Ansprechrate des Patienten vorhersagbar werden. Hierzu kann sowohl auf sogenannte Biomarker als auch auf *in vitro* Testverfahren zurückgegriffen werden.

Biomarker zur Früherkennung haben sich in der Klinik auf Grund der niedrigen Frequenz des Nierenzellkarzinoms noch nicht durchgesetzt. Präklinisch wird momentan beispielsweise an Aquaporin 1 und Perilipin-2 geforscht (Morrissey et al., 2015). Bis sich jedoch einer dieser Marker durchsetzen kann, wird die Bildgebung das entscheidende Screeninginstrument bleiben (Hsieh et al., 2017). Neben dem Screening können Biomarker eine wichtige Rolle zur Bestimmung der Ansprechwahrscheinlichkeit einer Therapie spielen. Hier lassen sich

Biomarker im Serum und Urin sowie Marker im Gewebe unterscheiden. Das Beispiel VEGF zeigt, wie schwierig es ist einen Marker mit hohem prädiktiven Wert für die Ansprechrates eines Medikaments zu finden. Zwar korreliert der Marker in placebobehandelten Patienten invers mit dem Überleben der Patienten, bekommt ein Patient aber Sorafenib, lässt sich keine generelle Aussage über die Ansprechrates der Therapie ableiten. Lediglich Klassifikation nach *High Grade* and *Low Grade* anhand der 75. Perzentile des VEGF-Levels ist signifikant in der Prädiktion des Therapieansprechens (Escudier et al., 2009). Ähnliche retrospektive Ergebnisse wurden auch von Song für den IL-22 Rezeptor gefunden. Er zeigt, dass die Expression der IL22RA1 Kette im Tumorgewebe invers mit dem Überleben von Nierenzellkarzinompatienten korreliert (Song, 2017). Die Arbeitsergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen zudem am Beispiel der humanen Nierenzellkarzinomzelllinien, dass auch die IL22RA1 Kette als solcher Biomarker zur Wahl der richtigen Therapie herangezogen werden kann.

In vitro kann mittels Spheroide, die aus patienteneigenen Tumorgewebe gewonnen werden können, die Sensitivität eines Patienten gegenüber Medikamenten (Huang et al., 2015) getestet werden. Dies wird bei der genauen Analyse, welche Therapie angewendet werden soll, eine wichtige Rolle spielen. Außerdem können so auch Effekte von Immunzellen untersucht werden, die in zweidimensionalen Modellen nicht untersucht werden können (Liu et al., 2016). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Spheroide verdeutlichen das große Potential und seine gute Anwendbarkeit im Nierenzellkarzinom. Die Sphären weisen deutlich mehr Gemeinsamkeit mit Nierenzellkarzinomen auf als es normale zweidimensionale Zellkulturen zeigen. Gerade die gebildeten nekrotischen Zentren machen sie unter mehreren Aspekten interessant. Hier werden Zellsubstanzen wie DNA (Ishii et al., 2001), Histone (Allam et al., 2012) und HMGB1 (Rovere-Querini et al., 2004) freigesetzt. Diese können beispielsweise über TLR4 dendritische Zellen und Makrophagen anlocken und aktivieren, die über die nachfolgende Aktivierung des Immunsystems und sezernierten Zytokine zu einer Sekretion von IL-22 führen. Es bleibt zu untersuchen, wie diese Mechanismen im Einzelnen ablaufen und wie so diagnostisch und therapeutisch in Zukunft Patienten mit Nierenzellkarzinom behandelt werden können.

Ein möglicher Diagnose- und Therapieablauf für Tumorpatienten sollte also beispielweise wie der von Pauli vorgeschlagene Prozess aussehen (Pauli et al., 2017). Nach Diagnose einer Tumorerkrankung wird, beispielsweise nach operativer Entfernung des Primärtumors,

zunächst eine Sequenzierung der Tumor DNA durchgeführt. Fallen hierbei Mutationen in Genen auf, die therapeutisch angegriffen werden können, wird mit dieser Therapie begonnen. Parallel dazu werden aus dem Tumorgewebe dreidimensionale Organoide gezüchtet, die auf ihre Medikamentensensitivität getestet werden. Neben reinem Medikamententest können so aber auch wie dargestellt Tumorimmuninteraktionen untersucht werden. Zur Validierung der Screeningergebnisse können die Organoiden in Mäuse transplantiert werden und diese mit den entsprechenden Medikamenten therapiert werden.

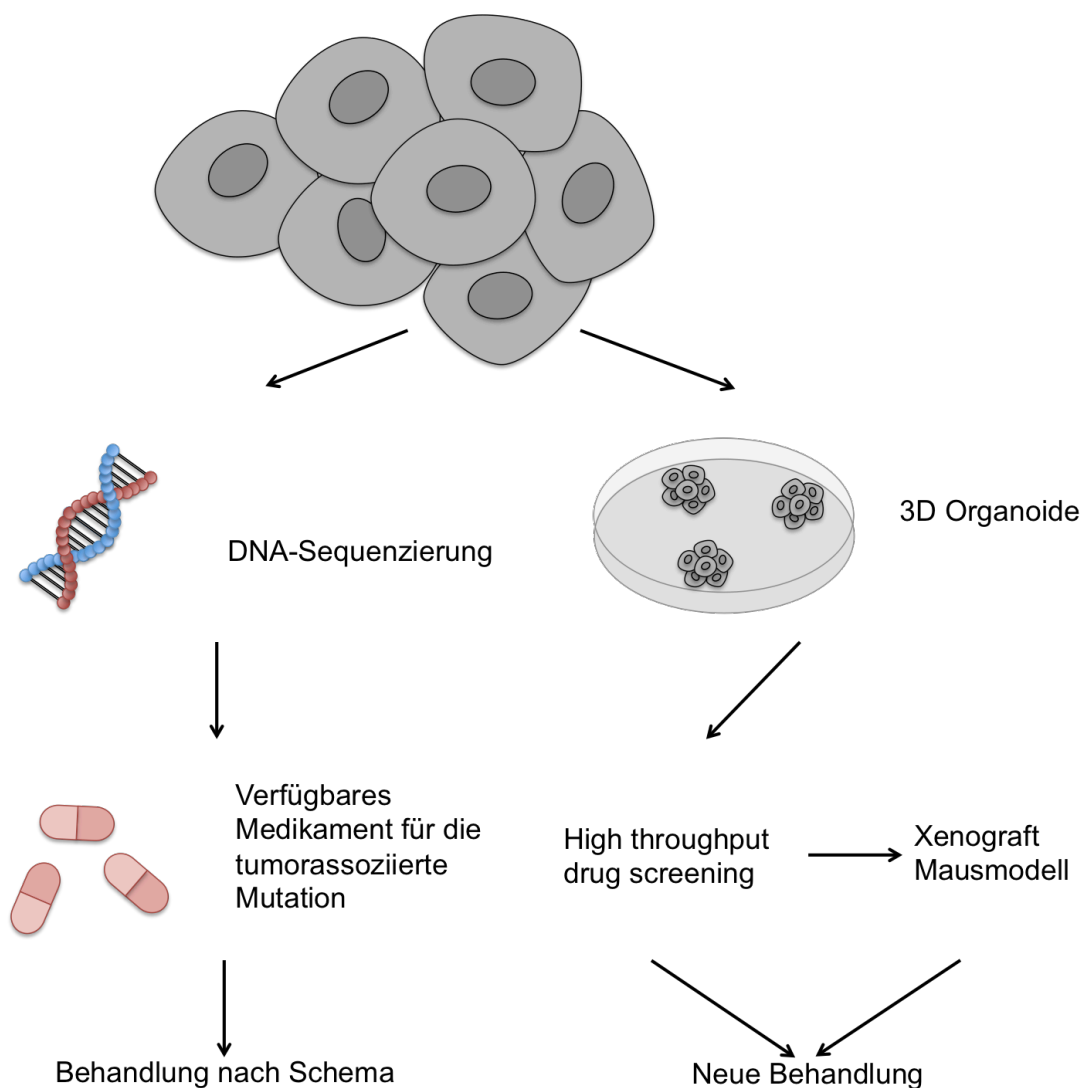


Abb. 4-4 Ablauf personalisierter Tumorthherapie
[Modifiziert nach (Pauli et al., 2017)]

4.7 Limitationen der Studie

Die vorliegende Arbeit weist einige wichtige Limitationen auf. Alle Experimente mit BMDCs wurden mit weiblichen, acht Wochen alten Balb/c Mäusen durchgeführt. In der Forschung verwendete Mausstämme sind Inzuchtstämme, weshalb bereits zwischen verschiedenen Mausstämmen große Unterschiede in der Expression von Proteinen auftreten können (Kunert-Keil et al., 2006). Zudem lassen sich in Mausmodellen gemachte Beobachtungen nicht grundsätzlich auf den Menschen übertragen. Eine Studie zur Sicherheit des CD28 Antikörpers TGN1412 führte 2006 in gesunden Probanden zu einer massiven Freisetzung von proentzündlichen Zytokinen, obwohl der Antikörper in mehreren Mausmodellen und später auch Javanaaffnen getestet worden war (Pallardy and Hunig, 2010). Dennoch eignen sich insbesondere das Rencamodell unter Berücksichtigung einzelner Ausnahmen für die Untersuchung von Immuntherapieansätzen (Lechner et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden zwar noch keine *in vivo* Daten erhoben, aber dennoch durch die Charakterisierung der Renca Zelllinie und die Untersuchung der nekrotischen Sphären wichtige Grundlagen dafür gelegt. In einem nächsten Schritt müsste im Rencamodell mit IL-22 Knock out Mäusen untersucht werden, ob es Unterschiede im Überleben gegenüber Wildtypmäusen gibt. Anschließend sollte mittels Durchflusszytometrie beziehungsweise immunhistochemischen Färbungen gezeigt werden, welche Zellen die wichtigsten IL-22 Produzenten *in vivo* sind und wie die Sekretion gesteuert wird. In diesem Zusammenhang mögliche wichtige Zytokine wie das von BMDCs sezernierte IL-1 β wurde dagegen bereits in dieser Arbeit identifiziert.

Limitierend für die Aussagekraft der Experimente mit Organewebe gesunder humaner Probanden war die geringe Probandenzahl (n=1 für Niere, n=3 für Darm oder Leber), so dass auch interindividuelle Unterschiede in der Expressionsrate die Ergebnisse beeinflussen könnten. Aus ethischen Überlegungen ist aber von einer deutlichen Ausweitung der Probandenzahl abzusehen, da die Gewebeproben von gesunden Probanden verwendet wurden.

Generell lassen sich die *in vitro* beobachteten Ergebnisse nicht 1:1 auf den Menschen übertragen. Tumorzelllinien repräsentieren bedingt durch interindividuelle und intratumorale Heterogenität immer nur einen kleinen Ausschnitt der Situation *in vivo* und unterliegen der zufälligen Selektion einzelner Zellen bei der Isolation aus dem primären Tumorgewebe (Gillet et al., 2013). Zusätzlich sind Zelllinien immer durch Kontamination mit anderen Zelllinien und genetischem Drift gefährdet (Torsvik et al., 2014). Deshalb wurde in

dieser Studie für die Experimente bewusst auf ein sehr breites Panel von elf humanen Nierenzellkarzinomzelllinien zurückgegriffen, um diese Risiken auf ein Minimum zu reduzieren. Die zu A498 gemachte Studie (Zhang et al., 2011), die nur auf einer Zelllinie basiert, ist somit unter diesem Aspekt kritisch zu sehen. Trotzdem finden Tumorzelllinien eine breite Anwendung in der Forschung. Gleichzeitig sollte aber immer überlegt werden, ob sie die richtige Methode für die gewählte Fragestellung sind. Aus diesem Grund wurde auch in der vorliegenden Studie für die Untersuchung der Interaktion zwischen Tumorzellen und Immunzellen die Kultur dreidimensionaler Renca Sphären etabliert.

Eine wichtige Fragestellung konnte diese Studie nicht adressieren. Bisher ist nicht geklärt, ob erhöhte IL-22 Spiegel beziehungsweise eine Überexpression des IL-22 Rezeptors zu einem schlechteren Outcome führt und somit direkt an der Pathophysiologie der Tumorprogression beteiligt sind. Alternativ können die erhöhten IL-22 Spiegel auch Ausdruck einer Entzündungsreaktion des Mikromilieus fortgeschrittener Tumorerkrankungen sein. Eine abschließende Antwort auf diese Fragestellung konnte diese Arbeit durch das Studiendesign offensichtlich nicht erbringen und ist bisher auch nicht von anderen Arbeitsgruppen abschließend geklärt worden (Perusina Lanfranca et al., 2016).

4.8 Zusammenfassung des Konzepts der Studie

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemachten *in vitro* Versuche führen unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur zu folgendem neuen Konzept zur Rolle von IL-22 im Nierenzellkarzinom (siehe Abb. 4-5). Nierenzellkarzinomzellen sezernieren Substanzen, die dendritische Zellen aktivieren. Hierbei handelt es sich um DAMPS, die wahrscheinlich vorwiegend im Bereich von Nekrosen in Form von DNA, Histone oder HMGB1 freigesetzt werden. Diese können über TLR4 dendritische Zellen aktivieren, was mittels Messung von IL-1 β , IL-6 und TNF- α nach LPS Stimulation (TLR4 Ligand) getestet wurde. Die freigesetzten Zytokine aktivieren bisher im Nierenzellkarzinom nicht identifizierte T-Zellsubsets, am wahrscheinlichsten aber T_H22, ILC3 oder T_H17. IL-22 führt in Zellen mit IL22RA1 intrazellulär zu einer Phosphorylierung von STAT3, was im Reportersystem demonstriert werden konnte. Der Transkriptionsfaktor pSTAT3 aktiviert im Anschluss verschiedene proliferative und antiapoptotische Zellprogramme. Es kommt zu erhöhten Proliferations- und Migrationsraten der Nierenzellkarzinomzelllinien. Außerdem zeigen die Zellen eine erhöhte Hypoxietoleranz

und verringertem Zelltod nach Medikamentengabe. Über diese Mechanismen kann IL-22 zur Progression des Nierenzellkarzinoms beitragen.

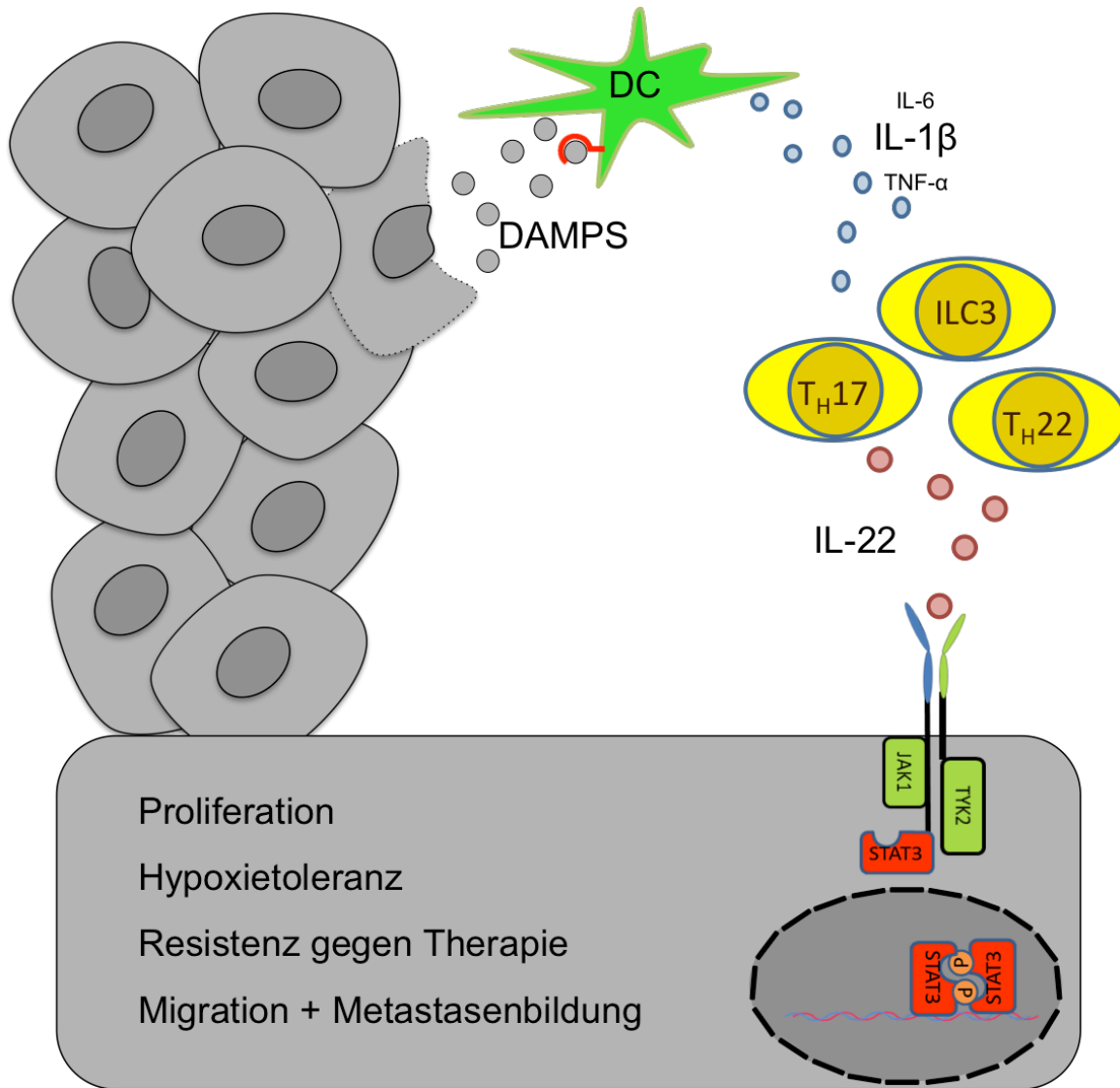


Abb. 4-5 Konzept der Studie

In Grau: Nierenzellkarzinomzellen; Nekrotische Areale im Nierenzellkarzinom sezernieren DAMPS (grau), die dendritische Zellen (DC) über TLR4 (rot) aktivieren. Daraufhin wird IL-1 β , IL-6 und TNF- α (blau) sezerniert und aktivieren ILC3, T_H17 oder T_H22 Zellen. Daraufhin wird IL-22 (rot) freigesetzt und führt zu Proliferation, Hypoxietoleranz, Therapieresistenz sowie Migration und Metastasenbildung in IL22RA1+ Nierenzellkarzinomzellen. Diese Effekte werden über die Phosphorylierung von STAT3 vermittelt.

5 Zusammenfassung

Die Prognose des Nierenzellkarzinoms hat sich zwar in den letzten Jahren deutlich verbessert, dennoch bleiben insbesondere metastasierte Stadien schwer zu behandeln, da klassische Chemotherapeutika fast keine Wirkung zeigen. Vielversprechend sind die ersten Studien mit neuen Wirkstoffen, die die Aufhebung der Immunsuppression anzielen. Die Bedeutung des Immunsystems bei der Pathogenese und Progression des Nierenzellkarzinoms ist bisher jedoch nicht verstanden, insbesondere warum ein großer Teil der Patienten nicht auf Immuntherapie anspricht (Motzer et al., 2015).

Daher sollte diese Arbeit die Rolle des Interleukins 22 in der Pathogenese des Nierenzellkarzinoms untersuchen. IL-22 wird dabei vorrangig von Immunzellen gebildet und wirkt nur auf Epithelzellen. In der humanen Niere ist insgesamt eine hohe Expression der für die Signalübertragung wichtigen IL22RA1 Rezeptoruntereinheit zu finden. Da hauptsächlich Tubuluszellen hierfür verantwortlich sind und das Nierenzellkarzinom von Tubuluszellen ausgeht, wurde die Bedeutung der IL-22 Achse *in vitro* untersucht. Nierenzellkarzinomzelllinien weisen eine heterogene IL22RA1 Expression auf und lassen sich in Zellen mit hoher IL22RA1 Expression (IL22RA1+) und mit niedriger IL22RA1 (IL22RA1-) Expression unterscheiden. IL22RA1+ Zelllinien zeigen eine durch IL-22 gesteigerte Proliferation und Migration sowie verringerten Zelltod unter Hypoxie und unter Medikamentenbehandlung. Die murine Zelllinie Renca exprimiert ebenfalls IL22RA1 und zeigt auch gesteigerte Migration und verringerten Zelltod unter Hypoxie. Renca Zellen bilden zudem Sphären mit nekrotischen Zentren, wodurch sie ein geeignetes Modell für das Nierenzellkarzinom sind. Zudem wurde ein zellbasiertes Screeningtool für die Aktivierung der IL-22 Achse geschaffen, das sich zum Medikamentenscreening sowie Untersuchung der Interaktion zwischen Immunzellen und Tumorzellen eignet. Zusammenfassend zeigt diese Arbeit am Beispiel des Interleukins 22 die Bedeutung der Interaktion zwischen Tumorzellen und Immunzellen sowie potentielle Ursachen für das Versagen von Immuntherapien auf. Außerdem werden mit dem IL22RA1/pSTAT3 Reportersystem und den Renca Sphären zwei Möglichkeiten untersucht, wie zukünftig personalisierte Medizin in der Therapie des Nierenzellkarzinoms eingesetzt werden kann.

6 Literaturverzeichnis

- Akil, H., A. Abbaci, F. Lalloue, B. Bessette, L.M. Costes, L. Domballe, S. Charreau, K. Guilloteau, L. Karayan-Tapon, F.X. Bernard, F. Morel, M.O. Jauberteau, and J.C. Lecron. 2015. IL22/IL-22R pathway induces cell survival in human glioblastoma cells. *PLoS one* 10:e0119872.
- Allam, R., C.R. Scherbaum, M.N. Darisipudi, S.R. Mulay, H. Hagele, J. Lichtnekert, J.H. Hagemann, K.V. Rupanagudi, M. Ryu, C. Schwarzenberger, B. Hohenstein, C. Hugo, B. Uhl, C.A. Reichel, F. Krombach, M. Monestier, H. Liapis, K. Moreth, L. Schaefer, and H.J. Anders. 2012. Histones from dying renal cells aggravate kidney injury via TLR2 and TLR4. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 23:1375-1388.
- Argani, P., M. Lae, E.T. Ballard, M. Amin, C. Manivel, B. Hutchinson, V.E. Reuter, and M. Ladanyi. 2006. Translocation carcinomas of the kidney after chemotherapy in childhood. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24:1529-1534.
- Battelli, C., and D.C. Cho. 2011. mTOR inhibitors in renal cell carcinoma. *Therapy (London, England : 2004)* 8:359-367.
- Bleicher, K.H., H.J. Bohm, K. Muller, and A.I. Alanine. 2003. Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. *Nature reviews. Drug discovery* 2:369-378.
- Blumberg, B.S., H.J. Alter, and S. Visnich. 1965. A "NEW" ANTIGEN IN LEUKEMIA SERA. *Jama* 191:541-546.
- Boehm, T. 2011. Design principles of adaptive immune systems. *Nature reviews. Immunology* 11:307-317.
- Bongartz, T., A.J. Sutton, M.J. Sweeting, I. Buchan, E.L. Matteson, and V. Montori. 2006. Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *Jama* 295:2275-2285.
- Boshart, M., L. Gissmann, H. Ikenberg, A. Kleinheinz, W. Scheurlen, and H. zur Hausen. 1984. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *The EMBO journal* 3:1151-1157.
- Brand, S., J. Dambacher, F. Beigel, K. Zitzmann, M.H. Heeg, T.S. Weiss, T. Pruffer, T. Olszak, C.J. Steib, M. Storr, B. Goke, H. Diepolder, M. Bilzer, W.E. Thasler, and C.J. Auernhammer. 2007. IL-22-mediated liver cell regeneration is abrogated by SOCS-1/3 overexpression in vitro. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 292:G1019-1028.
- Brasel, K., T. De Smedt, J.L. Smith, and C.R. Maliszewski. 2000. Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood* 96:3029-3039.
- Brennan, J.F., M.M. Stilmant, R.K. Babayan, and M.B. Siroky. 1991. Acquired renal cystic disease: implications for the urologist. *British journal of urology* 67:342-348.
- Chapman, J.R., A.C. Webster, and G. Wong. 2013. Cancer in the transplant recipient. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 3.
- Cheungpasitporn, W., C. Thongprayoon, O.A. O'Corragain, P.J. Edmonds, P. Ungprasert, W. Kittanamongkolchai, and S.B. Erickson. 2015. The risk of kidney cancer in patients with kidney stones: a systematic review and meta-analysis. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* 108:205-212.

- Cho, E., G. Curhan, S.E. Hankinson, P. Kantoff, M.B. Atkins, M. Stampfer, and T.K. Choueiri. 2011. Prospective evaluation of analgesic use and risk of renal cell cancer. *Archives of internal medicine* 171:1487-1493.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 162:156-159.
- Chow, W.H., G. Gridley, J.F. Fraumeni, Jr., and B. Jarvholm. 2000. Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men. *The New England journal of medicine* 343:1305-1311.
- Coffin, J.M., and H. Fan. 2016. The Discovery of Reverse Transcriptase. *Annual review of virology* 3:29-51.
- Coussens, L.M., and Z. Werb. 2002. Inflammation and cancer. *Nature* 420:860-867.
- Coutard, H. 1934. Principles of X-ray therapy of malignant disease. *Lancet (London, England)* 2: 1-12.
- Couzin-Frankel, J. 2013. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science (New York, N.Y.)* 342:1432-1433.
- Crisan, T.O., M.G. Netea, and L.A. Joosten. 2016. Innate immune memory: Implications for host responses to damage-associated molecular patterns. *European journal of immunology* 46:817-828.
- Cumberbatch, M.G., M. Rota, J.W. Catto, and C. La Vecchia. 2016. The Role of Tobacco Smoke in Bladder and Kidney Carcinogenesis: A Comparison of Exposures and Meta-analysis of Incidence and Mortality Risks. *European urology* 70:458-466.
- Curd, L.M., S.E. Favors, and R.K. Gregg. 2012. Pro-tumour activity of interleukin-22 in HPAFII human pancreatic cancer cells. *Clinical and experimental immunology* 168:192-199.
- Daniels-Wells, T.R., G. Helguera, R.K. Leuchter, R. Quintero, M. Kozman, J.A. Rodriguez, E. Ortiz-Sanchez, O. Martinez-Maza, B.C. Schultes, C.F. Nicodemus, and M.L. Penichet. 2013. A novel IgE antibody targeting the prostate-specific antigen as a potential prostate cancer therapy. *BMC cancer* 13:195.
- Devaud, C., J.A. Westwood, L.B. John, J.K. Flynn, S. Paquet-Fifield, C.P. Duong, C.S. Yong, H.J. Pegram, S.A. Stacker, M.G. Achen, T.J. Stewart, L.A. Snyder, M.W. Teng, M.J. Smyth, P.K. Darcy, and M.H. Kershaw. 2014. Tissues in different anatomical sites can sculpt and vary the tumor microenvironment to affect responses to therapy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 22:18-27.
- Dranoff, G. 2004. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* 4:11-22.
- Dudakov, J.A., A.M. Hanash, and M.R. van den Brink. 2015. Interleukin-22: immunobiology and pathology. *Annual review of immunology* 33:747-785.
- Duhen, T., R. Geiger, D. Jarrossay, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2009. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature immunology* 10:857-863.
- Dumoutier, L., J. Louahed, and J.C. Renauld. 2000. Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164:1814-1819.
- Dunn, G.P., A.T. Bruce, H. Ikeda, L.J. Old, and R.D. Schreiber. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology* 3:991-998.

- Edge, S.B., and C.C. Compton. 2010. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology* 17:1471-1474.
- Ehrlich, P. 1909. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Beiträge zur experimentellen Pathologie und Chemotherapie* 117-164.
- Epstein, M.A., B.G. Achong, and Y.M. Barr. 1964. VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *Lancet (London, England)* 1:702-703.
- Escudier, B., T. Eisen, W.M. Stadler, C. Szczylik, S. Oudard, M. Staehler, S. Negrier, C. Chevreau, A.A. Desai, F. Rolland, T. Demkow, T.E. Hutson, M. Gore, S. Anderson, G. Hofilena, M. Shan, C. Pena, C. Lathia, and R.M. Bukowski. 2009. Sorafenib for treatment of renal cell carcinoma: Final efficacy and safety results of the phase III treatment approaches in renal cancer global evaluation trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27:3312-3318.
- Escudier, B., N. Tannir, D.F. McDermott, O.A. Frontera, B. Melichar, E.R. Plimack, P. Barthelemy, S. George, V. Neiman, C. Porta, T.K. Choueiri, T. Powles, F. Donskov, P. Salman, C.K. Kollmannsberger, B. Rini, S. Mekan, M.B. McHenry, H.H. Hammers, and R.J. Motzer. 2017. CheckMate 214: Efficacy and safety of nivolumab + ipilimumab v sunitinib for treatment-naïve advanced or metastatic renal cell carcinoma, including IMDC risk and PD-L1 expression subgroups. *ESMO 2017 Congress. Abstract LBA5* Presented September 10, 2017.
- Facchini, G., F. Perri, M. Caraglia, C. Pisano, S. Striano, L. Marra, F. Fiore, P. Aprea, S. Pignata, and R.V. Iaffaioli. 2009. New treatment approaches in renal cell carcinoma. *Anti-cancer drugs* 20:893-900.
- Farber, S., and L.K. Diamond. 1948. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. *The New England journal of medicine* 238:787-793.
- Fodor, S.P., J.L. Read, M.C. Pirrung, L. Stryer, A.T. Lu, and D. Solas. 1991. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science (New York, N.Y.)* 251:767-773.
- Funahashi, Y., R. Hattori, T. Yamamoto, N. Sassa, T. Fujita, and M. Gotoh. 2012. Effect of warm ischemia on renal function during partial nephrectomy: assessment with new 99mTc-mercaptoacetyltriglycine scintigraphy parameter. *Urology* 79:160-164.
- Garcia, K.C., L. Teyton, and I.A. Wilson. 1999. Structural basis of T cell recognition. *Annual review of immunology* 17:369-397.
- Gierman, H.J., M.H. Indemans, J. Koster, S. Goetze, J. Seppen, D. Geerts, R. van Driel, and R. Versteeg. 2007. Domain-wide regulation of gene expression in the human genome. *Genome research* 17:1286-1295.
- Gillet, J.P., S. Varma, and M.M. Gottesman. 2013. The clinical relevance of cancer cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* 105:452-458.
- Goerke, A.R., A.M. Loening, S.S. Gambhir, and J.R. Swartz. 2008. Cell-free metabolic engineering promotes high-level production of bioactive *Gaussia princeps* luciferase. *Metabolic engineering* 10:187-200.
- Goncalves, P.H., J.M. Montezuma-Rusca, R. Yarchoan, and T.S. Uldrick. 2016. Cancer prevention in HIV-infected populations. *Seminars in oncology* 43:173-188.
- Gordon, S.C., D. Moonka, K.A. Brown, C. Rogers, M.A. Huang, N. Bhatt, and L. Lamerato. 2010. Risk for renal cell carcinoma in chronic hepatitis C infection. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association*

- for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 19:1066-1073.
- Grawunder, U., R.B. West, and M.R. Lieber. 1998. Antigen receptor gene rearrangement. *Current opinion in immunology* 10:172-180.
- Haas, N.B., J. Manola, R.G. Uzzo, K.T. Flaherty, C.G. Wood, C. Kane, M. Jewett, J.P. Dutcher, M.B. Atkins, M. Pins, G. Wilding, D. Cella, L. Wagner, S. Matin, T.M. Kuzel, W.J. Sexton, Y.N. Wong, T.K. Choueiri, R. Pili, I. Puzanov, M. Kohli, W. Stadler, M. Carducci, R. Coomes, and R.S. DiPaola. 2016. Adjuvant sunitinib or sorafenib for high-risk, non-metastatic renal-cell carcinoma (ECOG-ACRIN E2805): a double-blind, placebo-controlled, randomised, phase 3 trial. *Lancet (London, England)* 387:2008-2016.
- Haddad, F., and K.M. Baldwin. 2010. Reverse transcription of the ribonucleic acid: the first step in RT-PCR assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 630:261-270.
- Hartley, J.L., G.F. Temple, and M.A. Brasch. 2000. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome research* 10:1788-1795.
- Heim, D., J. Budczies, A. Stenzinger, D. Treue, P. Hufnagl, C. Denkert, M. Dietel, and F. Klauschen. 2014. Cancer beyond organ and tissue specificity: next-generation-sequencing gene mutation data reveal complex genetic similarities across major cancers. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 135:2362-2369.
- Helft, J., J. Bottcher, P. Chakravarty, S. Zelenay, J. Huotari, B.U. Schraml, D. Goubau, and C. Reis e Sousa. 2015. GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity* 42:1197-1211.
- Hoeben, A., B. Landuyt, M.S. Highley, H. Wildiers, A.T. Van Oosterom, and E.A. De Bruijn. 2004. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacological reviews* 56:549-580.
- Holthofer, H., A. Miettinen, R. Paasivuo, V.P. Lehto, E. Linder, O. Alfthan, and I. Virtanen. 1983. Cellular origin and differentiation of renal carcinomas. A fluorescence microscopic study with kidney-specific antibodies, antiintermediate filament antibodies, and lectins. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 49:317-326.
- Hsieh, J.J., M.P. Purdue, S. Signoretti, C. Swanton, L. Albiges, M. Schmidinger, D.Y. Heng, J. Larkin, and V. Ficarra. 2017. Renal cell carcinoma. *Nature reviews. Disease primers* 3:17009.
- Huang, L., A. Holtzinger, I. Jagan, M. BeGora, I. Lohse, N. Ngai, C. Nostro, R. Wang, L.B. Muthuswamy, H.C. Crawford, C. Arrowsmith, S.E. Kalloger, D.J. Renouf, A.A. Connor, S. Cleary, D.F. Schaeffer, M. Roehrl, M.S. Tsao, S. Gallinger, G. Keller, and S.K. Muthuswamy. 2015. Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell- and patient-derived tumor organoids. *Nature medicine* 21:1364-1371.
- Huber, S., N. Gagliani, L.A. Zenewicz, F.J. Huber, L. Bosurgi, B. Hu, M. Hedl, W. Zhang, W. O'Connor, Jr., A.J. Murphy, D.M. Valenzuela, G.D. Yancopoulos, C.J. Booth, J.H. Cho, W. Ouyang, C. Abraham, and R.A. Flavell. 2012. IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature* 491:259-263.
- Inoue, M., M. Iwasaki, T. Otani, S. Sasazuki, M. Noda, and S. Tsugane. 2006. Diabetes mellitus and the risk of cancer: results from a large-scale population-based cohort study in Japan. *Archives of internal medicine* 166:1871-1877.

- Ishii, K.J., K. Suzuki, C. Coban, F. Takeshita, Y. Itoh, H. Matoba, L.D. Kohn, and D.M. Klinman. 2001. Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of APCs. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167:2602-2607.
- Janeway, C. 2008. *Janeway's immunobiology. 7th ed./ Kenneth Murphy, Paul Travers, Marc Walport.*
- Jiang, R., H. Wang, L. Deng, J. Hou, R. Shi, M. Yao, Y. Gao, A. Yao, X. Wang, L. Yu, and B. Sun. 2013. IL-22 is related to development of human colon cancer by activation of STAT3. *BMC cancer* 13:59.
- Kaplan, M.H., M.M. Hufford, and M.R. Olson. 2015. The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nature reviews. Immunology* 15:295-307.
- Khalil, D.N., E.L. Smith, R.J. Brentjens, and J.D. Wolchok. 2016. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nature reviews. Clinical oncology* 13:394.
- Kirchberger, S., D.J. Royston, O. Boulard, E. Thornton, F. Franchini, R.L. Szabady, O. Harrison, and F. Powrie. 2013. Innate lymphoid cells sustain colon cancer through production of interleukin-22 in a mouse model. *The Journal of experimental medicine* 210:917-931.
- Klapper, J.A., S.G. Downey, F.O. Smith, J.C. Yang, M.S. Hughes, U.S. Kammula, R.M. Sherry, R.E. Royal, S.M. Steinberg, and S. Rosenberg. 2008. High-dose interleukin-2 for the treatment of metastatic renal cell carcinoma : a retrospective analysis of response and survival in patients treated in the surgery branch at the National Cancer Institute between 1986 and 2006. *Cancer* 113:293-301.
- Kobold, S., S. Volk, T. Clauditz, N.J. Kupper, S. Minner, A. Tufman, P. Duwell, M. Lindner, I. Koch, S. Heidegger, S. Rothenfuer, M. Schnurr, R.M. Huber, W. Wilczak, and S. Endres. 2013. Interleukin-22 is frequently expressed in small- and large-cell lung cancer and promotes growth in chemotherapy-resistant cancer cells. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 8:1032-1042.
- Kotenko, S.V., L.S. Izotova, O.V. Mirochnitchenko, E. Esterova, H. Dickensheets, R.P. Donnelly, and S. Pestka. 2001. Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. *The Journal of biological chemistry* 276:2725-2732.
- Krane, L.S., P.W. Mufarrij, T.B. Manny, and A.K. Hemal. 2013. Comparison of clamping technique in robotic partial nephrectomy: does unclamped partial nephrectomy improve perioperative outcomes and renal function? *The Canadian journal of urology* 20:6662-6667.
- Kulkarni, O.P., I. Hartter, S.R. Mulay, J. Hagemann, M.N. Darisipudi, S. Kumar Vr, S. Romoli, D. Thomasova, M. Ryu, S. Kobold, and H.J. Anders. 2014. Toll-like receptor 4-induced IL-22 accelerates kidney regeneration. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 25:978-989.
- Kunert-Keil, C., F. Bisping, J. Kruger, and H. Brinkmeier. 2006. Tissue-specific expression of TRP channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains. *BMC genomics* 7:159.
- Lamarthee, B., F. Malard, P. Saas, M. Mohty, and B. Gaugler. 2016. Interleukin-22 in Graft-Versus-Host Disease after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Frontiers in immunology* 7:148.

- Lechner, M.G., S.S. Karimi, K. Barry-Holson, T.E. Angell, K.A. Murphy, C.H. Church, J.R. Ohlfest, P. Hu, and A.L. Epstein. 2013. Immunogenicity of murine solid tumor models as a defining feature of in vivo behavior and response to immunotherapy. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* 36:477-489.
- Lenoir, T., and E. Giannella. 2006. The emergence and diffusion of DNA microarray technology. *Journal of biomedical discovery and collaboration* 1:11.
- Leonardi, C.L., A.B. Kimball, K.A. Papp, N. Yeilding, C. Guzzo, Y. Wang, S. Li, L.T. Dooley, and K.B. Gordon. 2008. Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 76-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 1). *Lancet (London, England)* 371:1665-1674.
- Liang, M., J. Wang, H. Chu, X. Zhu, H. He, Q. Liu, J. Qiu, X. Zhou, M. Guan, Y. Xue, X. Chen, and H. Zou. 2013. Interleukin-22 inhibits bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Mediators of inflammation* 2013:209179.
- Liang, S.C., C. Nickerson-Nutter, D.D. Pittman, Y. Carrier, D.G. Goodwin, K.M. Shields, A.J. Lambert, S.H. Schelling, Q.G. Medley, H.L. Ma, M. Collins, K. Dunussi-Joannopoulos, and L.A. Fouser. 2010. IL-22 induces an acute-phase response. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185:5531-5538.
- Lim, C., and R. Savan. 2014. The role of the IL-22/IL-22R1 axis in cancer. *Cytokine & growth factor reviews* 25:257-271.
- Lim, E., O. Metzger-Filho, and E.P. Winer. 2012. The natural history of hormone receptor-positive breast cancer. *Oncology (Williston Park, N.Y.)* 26:688-694, 696.
- Liu, F., J. Huang, B. Ning, Z. Liu, S. Chen, and W. Zhao. 2016. Drug Discovery via Human-Derived Stem Cell Organoids. *Frontiers in pharmacology* 7:334.
- Liu, Y., V.K. Verma, H. Malhi, G.J. Gores, P.S. Kamath, A. Sanyal, N. Chalasani, B. Gao, and V.H. Shah. 2017. Lipopolysaccharide downregulates macrophage-derived IL-22 to modulate alcohol-induced hepatocyte cell death. *American journal of physiology. Cell physiology* 313:C305-c313.
- Ljungberg, B., K. Bensalah, S. Canfield, S. Dabestani, F. Hofmann, M. Hora, M.A. Kuczyk, T. Lam, L. Marconi, A.S. Merseburger, P. Mulders, T. Powles, M. Staehler, A. Volpe, and A. Bex. 2015. EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update. *European urology* 67:913-924.
- Lowrance, W.T., J. Ordonez, N. Udaltsova, P. Russo, and A.S. Go. 2014. CKD and the risk of incident cancer. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 25:2327-2334.
- Maasho, K., A. Marusina, N.M. Reynolds, J.E. Coligan, and F. Borrego. 2004. Efficient gene transfer into the human natural killer cell line, NKL, using the Amaxa nucleofection system. *Journal of immunological methods* 284:133-140.
- Machnik, A., W. Neuhofer, J. Jantsch, A. Dahlmann, T. Tammela, K. Machura, J.K. Park, F.X. Beck, D.N. Muller, W. Derer, J. Goss, A. Ziomber, P. Dietsch, H. Wagner, N. van Rooijen, A. Kurtz, K.F. Hilgers, K. Alitalo, K.U. Eckardt, F.C. Luft, D. Kerjaschki, and J. Titze. 2009. Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism. *Nature medicine* 15:545-552.
- Maguire, C.A., N.C. Deliolanis, L. Pike, J.M. Niers, L.A. Tjon-Kon-Fat, M. Sena-Esteves, and B.A. Tannous. 2009. Gaussia luciferase variant for high-throughput functional screening applications. *Analytical chemistry* 81:7102-7106.
- Mahoney, K.M., P.D. Rennert, and G.J. Freeman. 2015. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. *Nature reviews. Drug discovery* 14:561-584.

- Maini, R., E.W. St Clair, F. Breedveld, D. Furst, J. Kalden, M. Weisman, J. Smolen, P. Emery, G. Harriman, M. Feldmann, and P. Lipsky. 1999. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. *Lancet (London, England)* 354:1932-1939.
- Marechal, E. 2008. Chemogenomics: a discipline at the crossroad of high throughput technologies, biomarker research, combinatorial chemistry, genomics, cheminformatics, bioinformatics and artificial intelligence. *Combinatorial chemistry & high throughput screening* 11:583-586.
- McCarthy, E.F. 2006. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *The Iowa orthopaedic journal* 26:154-158.
- Miyake, M., S. Anai, K. Fujimoto, S. Ohnishi, M. Kuwada, Y. Nakai, T. Inoue, A. Tomioka, N. Tanaka, and Y. Hirao. 2012. 5-fluorouracil enhances the antitumor effect of sorafenib and sunitinib in a xenograft model of human renal cell carcinoma. *Oncology letters* 3:1195-1202.
- Morelli, A.E., A.F. Zahorchak, A.T. Larregina, B.L. Colvin, A.J. Logar, T. Takayama, L.D. Faló, and A.W. Thomson. 2001. Cytokine production by mouse myeloid dendritic cells in relation to differentiation and terminal maturation induced by lipopolysaccharide or CD40 ligation. *Blood* 98:1512-1523.
- Morrissey, J.J., V.M. Mellnick, J. Luo, M.J. Siegel, R.S. Figenschau, S. Bhayani, and E.D. Kharasch. 2015. Evaluation of Urine Aquaporin-1 and Perilipin-2 Concentrations as Biomarkers to Screen for Renal Cell Carcinoma: A Prospective Cohort Study. *JAMA oncology* 1:204-212.
- Motzer, R.J., J. Bacik, B.A. Murphy, P. Russo, and M. Mazumdar. 2002. Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 20:289-296.
- Motzer, R.J., B. Escudier, D.F. McDermott, S. George, H.J. Hammers, S. Srinivas, S.S. Tykodi, J.A. Sosman, G. Procopio, E.R. Plimack, D. Castellano, T.K. Choueiri, H. Gurney, F. Donskov, P. Bono, J. Wagstaff, T.C. Gaurer, T. Ueda, Y. Tomita, F.A. Schutz, C. Kollmannsberger, J. Larkin, A. Ravaud, J.S. Simon, L.A. Xu, I.M. Waxman, and P. Sharma. 2015. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *The New England journal of medicine* 373:1803-1813.
- Motzer, R.J., T.E. Hutson, P. Tomczak, M.D. Michaelson, R.M. Bukowski, O. Rixe, S. Oudard, S. Negrier, C. Szczylik, S.T. Kim, I. Chen, P.W. Bycott, C.M. Baum, and R.A. Figlin. 2007. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *The New England journal of medicine* 356:115-124.
- Mulay, S.R., and H.J. Anders. 2017. Crystal nephropathies: mechanisms of crystal-induced kidney injury. *Nature reviews. Nephrology* 13:226-240.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51 Pt 1:263-273.
- Multhoff, G., M. Molls, and J. Radons. 2011. Chronic inflammation in cancer development. *Frontiers in immunology* 2:98.
- Naher, L., T. Kiyoshima, I. Kobayashi, H. Wada, K. Nagata, H. Fujiwara, Y.F. Ookuma, S. Ozeki, S. Nakamura, and H. Sakai. 2012. STAT3 signal transduction through interleukin-22 in oral squamous cell carcinoma. *International journal of oncology* 41:1577-1586.

- Naito, Y., K. Saito, K. Shiiba, A. Ohuchi, K. Saigenji, H. Nagura, and H. Ohtani. 1998. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer research* 58:3491-3494.
- Neefjes, J., M.L. Jongsma, P. Paul, and O. Bakke. 2011. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature reviews. Immunology* 11:823-836.
- Nesargikar, P.N., B. Spiller, and R. Chavez. 2012. The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors. *European journal of microbiology & immunology* 2:103-111.
- Nogales, K.E., L.C. Zaba, E. Guttman-Yassky, J. Fuentes-Duculan, M. Suarez-Farinas, I. Cardinale, A. Khatcherian, J. Gonzalez, K.C. Pierson, T.R. White, C. Pensabene, I. Coats, I. Novitskaya, M.A. Lowes, and J.G. Krueger. 2008. Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *The British journal of dermatology* 159:1092-1102.
- Norman, P. 2014. Selective JAK inhibitors in development for rheumatoid arthritis. *Expert opinion on investigational drugs* 23:1067-1077.
- Pallardy, M., and T. Hunig. 2010. Primate testing of TGN1412: right target, wrong cell. *British journal of pharmacology* 161:509-511.
- Pan, T., E.L. Fong, M. Martinez, D.A. Harrington, S.H. Lin, M.C. Farach-Carson, and R.L. Satcher. 2015. Three-dimensional (3D) culture of bone-derived human 786-O renal cell carcinoma retains relevant clinical characteristics of bone metastases. *Cancer letters* 365:89-95.
- Pardoll, D.M. 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews. Cancer* 12:252-264.
- Paul, S.M., D.S. Mytelka, C.T. Dunwiddie, C.C. Persinger, B.H. Munos, S.R. Lindborg, and A.L. Schacht. 2010. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature reviews. Drug discovery* 9:203-214.
- Pauli, C., B.D. Hopkins, D. Prandi, R. Shaw, T. Fedrizzi, A. Sboner, V. Sailer, M. Augello, L. Puca, R. Rosati, T.J. McNary, Y. Churakova, C. Cheung, J. Triscott, D. Pisapia, R. Rao, J.M. Mosquera, B. Robinson, B.M. Faltas, B.E. Emerling, V.K. Gadi, B. Bernard, O. Elemento, H. Beltran, F. Demichelis, C.J. Kemp, C. Grandori, L.C. Cantley, and M.A. Rubin. 2017. Personalized In Vitro and In Vivo Cancer Models to Guide Precision Medicine. *Cancer discovery* 7:462-477.
- Pavia-Jimenez, A., V.T. Tcheuyap, and J. Brugarolas. 2014. Establishing a human renal cell carcinoma tumorgraft platform for preclinical drug testing. *Nature protocols* 9:1848-1859.
- Peired, A.J., A. Sisti, and P. Romagnani. 2016. Renal Cancer Stem Cells: Characterization and Targeted Therapies. *Stem cells international* 2016:8342625.
- Perusina Lanfranca, M., Y. Lin, J. Fang, W. Zou, and T. Frankel. 2016. Biological and pathological activities of interleukin-22. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 94:523-534.
- Plasterk, R.H., Z. Izsvak, and Z. Ivics. 1999. Resident aliens: the Tc1/mariner superfamily of transposable elements. *Trends in genetics : TIG* 15:326-332.
- Populo, H., J.M. Lopes, and P. Soares. 2012. The mTOR signalling pathway in human cancer. *International journal of molecular sciences* 13:1886-1918.
- Postow, M.A., M.K. Callahan, and J.D. Wolchok. 2015. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 33:1974-1982.

- Postow, M.A., R. Sidlow, and M.D. Hellmann. 2018. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *The New England journal of medicine* 378:158-168.
- Powles, T., L. Albiges, M. Staehler, K. Bensalah, S. Dabestani, R.H. Giles, F. Hofmann, M. Hora, M.A. Kuczyk, T.B. Lam, L. Marconi, A.S. Merseburger, S. Fernandez-Pello, R. Tahbaz, A. Volpe, B. Ljungberg, and A. Bex. 2017. Updated European Association of Urology Guidelines Recommendations for the Treatment of First-line Metastatic Clear Cell Renal Cancer. *European urology*.
- Radaeva, S., R. Sun, H.N. Pan, F. Hong, and B. Gao. 2004. Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 39:1332-1342.
- Ramirez, J.M., N.C. Brembilla, O. Sorg, R. Chicheportiche, T. Matthes, J.M. Dayer, J.H. Saurat, E. Roosnek, and C. Chizzolini. 2010. Activation of the aryl hydrocarbon receptor reveals distinct requirements for IL-22 and IL-17 production by human T helper cells. *European journal of immunology* 40:2450-2459.
- Randall, J.M., F. Millard, and R. Kurzrock. 2014. Molecular aberrations, targeted therapy, and renal cell carcinoma: current state-of-the-art. *Cancer metastasis reviews* 33:1109-1124.
- Ren, X., B. Hu, and L.M. Colletti. 2010. IL-22 is involved in liver regeneration after hepatectomy. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 298:G74-80.
- Ricklin, D., E.S. Reis, and J.D. Lambris. 2016. Complement in disease: a defence system turning offensive. *Nature reviews. Nephrology* 12:383-401.
- Rovere-Querini, P., A. Capobianco, P. Scaffidi, B. Valentini, F. Catalanotti, M. Giazzon, I.E. Dumitriu, S. Muller, M. Iannacone, C. Traversari, M.E. Bianchi, and A.A. Manfredi. 2004. HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO reports* 5:825-830.
- Rui, J., Z. Chunming, G. Binbin, S. Na, W. Shengxi, and S. Wei. 2017. IL-22 promotes the progression of breast cancer through regulating HOXB-AS5. *Oncotarget* 8:103601-103612.
- Rutz, S., C. Eidenschenk, and W. Ouyang. 2013. IL-22, not simply a Th17 cytokine. *Immunological reviews* 252:116-132.
- Sabat, R., W. Ouyang, and K. Wolk. 2014. Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system. *Nature reviews. Drug discovery* 13:21-38.
- Salup, R.R., R.B. Herberman, M.A. Chirigos, T. Back, and R.H. Wiltout. 1985. Therapy of peritoneal murine cancer with biological response modifiers. *Journal of immunopharmacology* 7:417-436.
- Sawa, T., and H. Ohshima. 2006. Nitrate DNA damage in inflammation and its possible role in carcinogenesis. *Nitric oxide : biology and chemistry* 14:91-100.
- Serafini, N., R.G. Klein Wolterink, N. Satoh-Takayama, W. Xu, C.A. Vosshenrich, R.W. Hendriks, and J.P. Di Santo. 2014. Gata3 drives development of RORgammat+ group 3 innate lymphoid cells. *The Journal of experimental medicine* 211:199-208.
- Sestito, R., S. Madonna, C. Scarponi, F. Cianfarani, C.M. Failla, A. Cavani, G. Girolomoni, and C. Albanesi. 2011. STAT3-dependent effects of IL-22 in human keratinocytes are counterregulated by sirtuin 1 through a direct inhibition of STAT3 acetylation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25:916-927.

- Shibuya, M. 2011. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes & cancer* 2:1097-1105.
- Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal. 2016. Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians* 66:7-30.
- Song, S. 2017. A histology-based four protein array for postoperative outcome prediction in clear cell renal cell carcinoma. *Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät*.
- Sonnenberg, G.F., L.A. Fouser, and D. Artis. 2011. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nature immunology* 12:383-390.
- Sonnenberg, G.F., M.G. Nair, T.J. Kirn, C. Zaph, L.A. Fouser, and D. Artis. 2010. Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *The Journal of experimental medicine* 207:1293-1305.
- Stambrook, P.J., J. Maher, and F. Farzaneh. 2017. Cancer Immunotherapy: Whence and Whither. *Molecular cancer research : MCR* 15:635-650.
- Sugita, S., Y. Kawazoe, A. Imai, Y. Usui, M. Takahashi, and M. Mochizuki. 2013. Suppression of IL-22-producing T helper 22 cells by RPE cells via PD-L1/PD-1 interactions. *Investigative ophthalmology & visual science* 54:6926-6933.
- Sutton, C.E., S.J. Lalor, C.M. Sweeney, C.F. Brereton, E.C. Lavelle, and K.H. Mills. 2009. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* 31:331-341.
- Syed, V. 2016. TGF-beta Signaling in Cancer. *Journal of cellular biochemistry* 117:1279-1287.
- Tarhini, A.A., and F. Iqbal. 2010. CTLA-4 blockade: therapeutic potential in cancer treatments. *OncoTargets and therapy* 3:15-25.
- Torsvik, A., D. Stieber, P.O. Enger, A. Golebiewska, A. Molven, A. Svendsen, B. Westermarck, S.P. Niclou, T.K. Olsen, M. Chekenya Enger, and R. Bjerkvig. 2014. U-251 revisited: genetic drift and phenotypic consequences of long-term cultures of glioblastoma cells. *Cancer medicine* 3:812-824.
- Ueno, M. 1986. Interleukin 2 induced cytotoxicity on renal cell carcinoma. 2. Synergistic effects of interleukin 2 and interferon gamma. *The Keio journal of medicine* 35:90-100.
- Urbschat, A., S. Stumpf, J. Hanze, P. Paulus, T.J. Maier, C. Weipert, R. Hofmann, and A. Hegele. 2016. Expression of the anti-inflammatory suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) in human clear cell renal cell carcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 37:9649-9656.
- Vaughan, E.E., J.V. DeGiulio, and D.A. Dean. 2006. Intracellular trafficking of plasmids for gene therapy: mechanisms of cytoplasmic movement and nuclear import. *Current gene therapy* 6:671-681.
- Voigt, C., P. May, A. Gottschlich, A. Markota, D. Wenk, I. Gerlach, S. Voigt, G.T. Stathopoulos, K.A.M. Arendt, C. Heise, F. Rataj, K.P. Janssen, M. Königshoff, H. Winter, I. Himsl, W.E. Thasler, M. Schnurr, S. Rothenfusser, S. Endres, and S. Kobold. 2017. Cancer cells induce interleukin-22 production from memory CD4(+) T cells via interleukin-1 to promote tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114:12994-12999.
- Wang, C., S.G. Kang, J. Lee, Z. Sun, and C.H. Kim. 2009. The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut. *Mucosal immunology* 2:173-183.

- Watanabe, H., K. Numata, T. Ito, K. Takagi, and A. Matsukawa. 2004. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock (Augusta, Ga.)* 22:460-466.
- Weber, G.F., F.C. Gaertner, W. Erl, K.P. Janssen, B. Blechert, B. Holzmann, H. Weighardt, and M. Essler. 2006. IL-22-mediated tumor growth reduction correlates with inhibition of ERK1/2 and AKT phosphorylation and induction of cell cycle arrest in the G2-M phase. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177:8266-8272.
- Wei, C.C., T.W. Ho, W.G. Liang, G.Y. Chen, and M.S. Chang. 2003. Cloning and characterization of mouse IL-22 binding protein. *Genes and immunity* 4:204-211.
- Weidenbusch, M., S. Rodler, and H.J. Anders. 2015. Interleukin-22 in kidney injury and regeneration. *American journal of physiology. Renal physiology* 308:F1041-f1046.
- Weidenbusch, M., S. Rodler, S. Song, S. Romoli, J.A. Marschner, F. Kraft, A. Holderied, S. Kumar, S.R. Mulay, M. Honarpisheh, S. Kumar Devarapu, M. Lech, and H.J. Anders. 2017. Gene expression profiling of the Notch-AhR-IL22 axis at homeostasis and in response to tissue injury. *Bioscience reports* 37.
- Weight, C.J., B.T. Larson, A.F. Fergany, T. Gao, B.R. Lane, S.C. Campbell, J.H. Kaouk, E.A. Klein, and A.C. Novick. 2010. Nephrectomy induced chronic renal insufficiency is associated with increased risk of cardiovascular death and death from any cause in patients with localized cT1b renal masses. *The Journal of urology* 183:1317-1323.
- Welti, J.C., T. Powles, S. Foo, M. Gourlaouen, N. Preece, J. Foster, S. Frentzas, D. Bird, K. Sharpe, A. van Weverwijk, D. Robertson, J. Soffe, J.T. Eler, R. Pili, C.J. Springer, S.J. Mather, and A.R. Reynolds. 2012. Contrasting effects of sunitinib within in vivo models of metastasis. *Angiogenesis* 15:623-641.
- Wiklund, F., S. Tretli, T.K. Choueiri, S. Signoretti, K. Fall, and H.O. Adami. 2009. Risk of bilateral renal cell cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27:3737-3741.
- Wolk, K., and R. Sabat. 2006. Interleukin-22: a novel T- and NK-cell derived cytokine that regulates the biology of tissue cells. *Cytokine & growth factor reviews* 17:367-380.
- Xie, M.H., S. Aggarwal, W.H. Ho, J. Foster, Z. Zhang, J. Stinson, W.I. Wood, A.D. Goddard, and A.L. Gurney. 2000. Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *The Journal of biological chemistry* 275:31335-31339.
- Xu, M.J., D. Feng, H. Wang, Y. Guan, X. Yan, and B. Gao. 2014. IL-22 ameliorates renal ischemia-reperfusion injury by targeting proximal tubule epithelium. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 25:967-977.
- Yang, J.C., L. Haworth, R.M. Sherry, P. Hwu, D.J. Schwartzentruber, S.L. Topalian, S.M. Steinberg, H.X. Chen, and S.A. Rosenberg. 2003. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *The New England journal of medicine* 349:427-434.
- Ying, H., L. Yang, G. Qiao, Z. Li, L. Zhang, F. Yin, D. Xie, and J. Zhang. 2010. Cutting edge: CTLA-4--B7 interaction suppresses Th17 cell differentiation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185:1375-1378.
- Zhang, F., D. Shang, Y. Zhang, and Y. Tian. 2011. Interleukin-22 suppresses the growth of A498 renal cell carcinoma cells via regulation of STAT1 pathway. *PloS one* 6:e20382.
- Zhao, L., Z. Jiang, Y. Jiang, N. Ma, K. Wang, Y. Zhang, and L. Feng. 2013. IL-22+CD4+ T-cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 238:193-199.
- Zheng, Y., P.A. Valdez, D.M. Danilenko, Y. Hu, S.M. Sa, Q. Gong, A.R. Abbas, Z. Modrusan, N. Ghilardi, F.J. de Sauvage, and W. Ouyang. 2008. Interleukin-22 mediates early host

-
- defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nature medicine* 14:282-289.
- Ziesche, E., M. Bachmann, H. Kleinert, J. Pfeilschifter, and H. Muhl. 2007. The interleukin-22/STAT3 pathway potentiates expression of inducible nitric-oxide synthase in human colon carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry* 282:16006-16015.
- Znaor, A., J. Lortet-Tieulent, M. Laversanne, A. Jemal, and F. Bray. 2015. International variations and trends in renal cell carcinoma incidence and mortality. *European urology* 67:519-530.

7 Abkürzungsverzeichnis

AhR	Aryl Hydrocarbon Rezeptor
APC	Antigenpräsentierende Zelle
AKI	Akute Schädigung der Niere
BMDC	Bone marrow derived dendritic cell
CCL20	Chemokinligand 20
CCR6	Chemokinrezeptor 6
CD4	Cluster of differentiation 4
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
HIF-1	Hypoxia-inducible factor
IFN- γ	Interferon γ
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IL(-22)	Interleukin, z. B. Interleukin 22
IL-22 BP	IL-22 Bindeprotein
ILC3	Innate lymphoid cell von Typ 3
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
JAK1	Janus Kinase 1
LDH	Laktatdehydrogenase
MHC I(II)	Haupthistokompatibilitätskomplex I (II)
MMP	Matrixmetalloprotease
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PAMP	Pathogenassoziiertes molekulares Muster
PCR	Polymerase chain reaction
PD-1	Programmed cell death protein 1
PI	Propidium Iodid
RIG-I	Retinoic acid inducible gene I
RNA	Ribonukleinsäure
SOCS(3)	Suppressor of cytokine signaling (3)
STAT(3)	Signal transducer and activator of transcription (3)
TCR	T-Zellrezeptor
TGF- β	Transforming growth factor β
TLR(4)	Toll-like-Rezeptor (4)
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TYK2	Tyrosinkinase 2
VEGF	Vascular endothelial growth factor

8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Hans-Joachim Anders für die großzügige Unterstützung und Begeisterung für die Forschung bedanken. Mir hat das Projekt sehr gut gefallen und ich habe mich über das Vertrauen gefreut, an diesem neuen Forschungsbereich der Arbeitsgruppe mitarbeiten zu dürfen.

Ein sehr großer Dank geht an meinen Betreuer Herrn Dr. med. Marc Johannes Weidenbusch für die langjährige Unterstützung, Mentoring und Ausbildung zum *Physician Scientist*, sowie an Shangqing Song, mit dem ich an vielen Projekten zusammengearbeitet habe. Carsten Jäckel gilt ein besonderer Dank, der für alle molekularbiologischen und bioinformatischen Fragen der Plasmidkonstruktion und Mikroarray Auswertung immer sachkundig mit Rat und Tat zur Seite stand.

Des Weiteren möchte ich allen Mitgliedern des Labors für die gute Zusammenarbeit und die Hilfe bei vielen Methoden danken. Besonders danke ich Frau Dr. rer. nat. Stefanie Steiger für die wissenschaftliche und emotionale Unterstützung und Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Bruno Luckow für kritische Diskussionen. Daneben geht mein Dank an Alexander Blaut, Franziska Kraft und Nina Fleckinger, die die Zeit im und außerhalb des Labors spannend gemacht haben. Ein besonderer Dank geht zudem an Simone Romoli und Santosh Kumar für die vielen Erklärungen und Hilfen bei allen Methoden sowie an Shrikant Mulay, Jyasi Desai, Daigo Nakazawa, Tomo Fujikura, Anais Rocanin und Alexander Holderied für die freundschaftliche Zusammenarbeit. Außerdem geht mein Dank an Janina Mandelbaum, Dan Draganovici und Ewa Radomska für die hervorragende technische Unterstützung.

Mein Dank gilt auch den Mitgliedern des i-Target Graduiertenkolleg, die wichtige Austauschpartner waren, sowie Herrn Prof. Dr. med. Stefan Endres und Herrn PD Dr. med. Sebastian Kobold für die Aufnahme und Unterstützung im Graduiertenkolleg. Zudem möchte ich ganz herzlich Herrn Professor Dr. med. Dr. phil. Fuat Oduncu für langjähriges Mentoring im Studium danken.

Meiner Familie möchte ich für ihre Unterstützung und Geduld bei diesem langen Projekt danken und vor allem Julia, die ich während meiner Arbeit kennen lernen durfte.

Zuletzt möchte ich meinem Paten und Mentor danken, der mich auf meinem gesamten Weg vor und durch das Studium begleitet hat und mich zu dem macht, was ich bin, und immer an mich geglaubt hat.

Eidesstattliche Versicherung

Rodler, Severin

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Die Rolle von Interleukin 22 in der Pathogenese und Progression des Nierenzellkarzinoms

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, 18.04.2018

Ort, Datum

Severin Rodler

Unterschrift Doktorandin/Doktorand