

Die Entschlüsselung der Funktion von IL-10
während der Lebermetastasierung
des kolorektalen Karzinoms

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(doctor rerum naturalium)

In dem
Fachbereich Biologie
aus der Fakultät für Mathematik, Informatik
und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von
Ahmad Mustafa Shiri
aus Kabul/Afghanistan

Hamburg, Januar 2021

Die vorgelegte Arbeit wurde zwischen Juli 2017 und Dezember 2020 an dem Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik unter der Leitung von Prof. Samuel M. Huber und Prof. Ansgar W. Lohse durchgeführt.

- | | | |
|-----------|----|---|
| Gutachter | 1. | Prof. Dr. med. Samuel M. Huber
Leiter der molekularen Gastroenterologie und Immunologie
I. Medizinische Klinik und Poliklinik
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf |
| Gutachter | 2. | Prof. Dr. med. Friedrich Koch-Nolte
Leiter der molekularen Immunologie
Institut für Immunologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf |

Datum der Disputation: 02. Juli 2021

Vorsitzender der Prüfungskommission: Prof. Dr. Christian Lohr

*“To get what you never had,
you have to do what you never did”*

Denzel Washington

Amerikanischer Schauspieler,
Regisseur und Filmproduzent

Danksagung

In erster Linie bedanke ich mich herzlich bei Prof. Samuel M. Huber. Er hat mir die Möglichkeit gegeben in seinem Labor zu arbeiten und meine Dissertation zu schreiben. Ich bedanke mich für seine grenzenlose Unterstützung, seine Ideen und die Motivation das Beste aus sich heraus zu holen.

Ebenso gilt mein Dank Prof. Nicola Gagliani für seine kritische und inspirierende Art. Unsere Meetings waren stets in jeder Hinsicht eine Bereicherung für meine Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Arbeitskollegen und mittlerweile auch Freund Dr. Anastasios Giannou bedanken. Bei ihm hatte ich mein interessantes erstes Vorstellungsgespräch. Seitdem stand er mir all die Jahre zur Seite und hat mich in jeder Hinsicht unterstützt und vorangebracht. Seine besondere Art sucht seines gleichen.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Friedrich Koch-Nolte für die Übernahme des 2. Gutachters und bei Prof. Christian Lohr für die Übernahme des Vorsitzenden der Prüfungskommission bedanken.

Dann möchte ich mich bei meinen Gryffindor Kollegen: Jan Kempfski, Lilan Zhao, Jöran Lücke und Tao Zhang bedanken. Es hat mir sehr viel Spaß gemacht mit euch den Arbeitsplatz zu teilen. Wir haben viele Stunden gemeinsam verbracht, viel diskutiert und sind dadurch mehr und mehr zusammengewachsen. Des Weiteren möchte ich der gesamten AG Huber einschließlich Dr. Tanja Bedke, Dr. Leonie Brockmann, Dr. Francis Huber, Dr. Penelope Pelczar, Dr. Babett Steglich, Dr. Dörte Kleinschmidt, Dr. Shiwa Soukou-Wargalla, Morsal Sabihi, Friederike Stumme, Mikolaj Nawrocki, Beibei Liu, Rongrong Jia, Cathleen Haueis, Sandra Wende, Leya Eckermann und Jaana Helmuth für ihre Hilfsbereitschaft und ihre zahlreichen praktischen und fachlichen Hilfen bedanken. Besonders möchte ich dabei Dr. Tanja Bedke hervorheben, die bei Fragen und Problemen jederzeit geholfen hat. Danke euch allen für die unglaubliche Zeit. Es hat eine Menge Spaß gemacht.

Letztlich möchte ich mich bei meiner liebevollen und schwangeren Frau Ann-Sophie Shiri bedanken. Mir ist klar wieviel diese Arbeit von unserer gemeinsamen Zeit in Anspruch genommen hat. Doch du wusstest wie sehr sie mir am Herzen liegt. Daher danke ich dir für dein Verständnis, deine Unterstützung und deine Fürsorge.

Ich bedanke mich natürlich auch bei meinen Eltern und Geschwistern, die mich zu dem Menschen gemacht haben, der ich heute bin. Sie haben mir in unseren ersten Jahren in Deutschland, mit ihrer Arbeit und ihrem Schweiß, das Fundament gelegt ein glückliches und erfolgreiches Leben zu führen. Dann möchte ich mich zum Schluss noch bei meinen ehemaligen Lehrern und ehemaligen Freuden bedanken. Sie hätten es niemals gedacht, dass ich es wirklich schaffen werde. Ihr gabt mir die Motivation meinen Weg weiter zu bestreiten und machtet mir klar gemacht, dass es nur darauf ankommt an sich selbst zu glauben.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary.....	2
1 Einleitung	3
1.1 <i>Das kolorektale Karzinom und dessen Entstehung</i>	3
1.2 <i>Metastasierungskaskade</i>	5
1.3 <i>Tumorimmunologie</i>	8
1.4 <i>Interleukin-10: Struktur, Signalweg und Funktion</i>	9
1.5 <i>Differenzierung und Funktion von regulatorische T-Zellen (Tregs).....</i>	11
1.6 <i>Rolle von IL-10 bei der Tumorentwicklung und Metastasierung</i>	12
1.7 <i>Therapieprinzipien von CRC-Patienten mit Metastasen</i>	12
1.8 <i>Zielsetzung</i>	15
2 Materialien und Methoden.....	16
2.1 <i>Materialien</i>	16
2.1.1 <i>Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Geräte</i>	16
2.1.2 <i>Maustiere</i>	21
2.1.3 <i>Zelllinien.....</i>	22
2.1.4 <i>Antikörper und Zytokine</i>	22
2.1.5 <i>Primer und TaqMan-Sonden.....</i>	24
2.1.6 <i>TaqMan-Sonden</i>	26
2.1.7 <i>Puffer und Lösungen.....</i>	26
2.2 <i>Methoden.....</i>	28
2.2.1 <i>Genotypisierung</i>	28
2.2.2 <i>Orthotopes Metastasenmodell (spontane Lebermetastasierung).....</i>	28
2.2.3 <i>Lebermetastasen-Induktion (forciertes Lebermetastasenmodell).....</i>	28
2.2.4 <i>Extravasationsmodell</i>	29
2.2.5 <i>Sonographie.....</i>	29
2.2.6 <i>Koloskopie</i>	29
2.2.7 <i>Zellisolierung.....</i>	30
2.2.8 <i>Magnetisch aktivierte Zellsortierungs-Methode</i>	31
2.2.9 <i>Stuhltransplantation/Fäkaler Mikrobiom-Transfer.....</i>	32
2.2.10 <i>Durchflusszytometrie</i>	32
2.2.11 <i>Western blot</i>	33
2.2.12 <i>Quantitative PCR (qPCR).....</i>	35
3 Ergebnisse	37
3.1 <i>IL-10 beeinflusst maßgeblich das Wachstum und die Lebermetastasierung von Darmkrebszellen.....</i>	37
3.1.1 <i>Die Funktion von IL-10 beim Darmkrebs.....</i>	37
3.1.2 <i>Die Funktion von IL-10 bei der Lebermetastasierung von Darmkrebszellen</i>	38
3.1.3 <i>Der Effekt von IL-10 bei der spontanen Metastasierung</i>	40

3.1.4	Der Einfluss des Mikrobioms auf die Lebermetastasierung.....	41
3.2	<i>Der Effekt einer Colitis auf die Lebermetastasierung.....</i>	42
3.3	<i>Die Quelle von IL-10 bei der Lebermetastasierung.....</i>	45
3.3.1	Hämatopoetische Zellen exprimieren IL-10.....	45
3.3.2	Tregs produzieren hauptsächlich IL-10 in Lebermetastasen.....	45
3.3.3	IL-10 produzierende Tregs tragen <i>in vivo</i> zur Lebermetastasierung bei .	48
3.3.4	IL-10 produzierende Tregs akkumulieren zwischen Tag 14 und 21 nach der Induktion von Lebermetastasen.....	50
3.3.5	Krebszellen produzieren kein IL-10.....	51
3.4	<i>Die Signalweiterleitung von IL-10 in Tregs und myeloischen Zellen beeinflusst die Metastasierung in die Leber</i>	52
3.4.1	IL-10 wirkt nicht auf Krebszellen	52
3.4.2	Andere mögliche Zielzellen von IL-10 in der Leber	54
3.4.3	LSECs exprimieren beide IL-10 Rezeptoren und können mit IL-10 stimuliert werden.....	56
3.4.4	Das IL-10 Signal auf LSECs spielt bei der Lebermetastasierung nur eine untergeordnete Rolle	57
3.4.5	Das IL-10-Signal auf regulatorischen T-Zellen als auch auf myeloischen Zellen beeinflusst die Lebermetastasierung.....	59
3.5	<i>PD-L1 trägt maßgeblich zur Lebermetastasierung bei.....</i>	66
3.6	<i>Die Lebermetastasierung lässt sich mit einer IL-10-Rezeptorblockade therapieren</i>	68
4	Diskussion.....	70
4.1	<i>Die Rolle des Immunsystems bei Tumoren</i>	70
4.2	<i>IL-10: Ein zweiseitiges Schwert</i>	70
4.3	<i>Wie IL-10 die Lebermetastasierung beeinflusst.....</i>	74
5	Ausblick.....	80
	Abkürzungsverzeichnis.....	81
	Referenzen.....	83
	Anhang.....	97
	<i>Publikationen.....</i>	97
	<i>Präsentationen</i>	97
	Eidesstattliche Versicherung.....	98

Zusammenfassung

Onkologen stehen trotz jahrzehntelanger Krebsforschung weiterhin vor der Herausforderung, gezielte Therapien gegen metastasierende Krebsarten zu finden. Das kolorektale Karzinom gehört zu den drei häufigsten Krebsarten weltweit und zählt zu den am häufigsten metastasierenden Tumoren. Hat der Krebs einmal gestreut, sinkt die Wahrscheinlichkeit einer Heilung dramatisch. Daher ist eine weitere Erforschung der Metastasierungskaskade dringend notwendig. Dabei gilt es nicht nur, diese Kaskade besser zu verstehen, sondern auch die Rolle des Immunsystems während der Metastasierung genauer zu ergründen. Eine Unterbindung der Metastasierung würde sich äußerst positiv auf die Mortalität und das progressionsfreie Überleben der Patienten auswirken.

Das Interleukin-10 (IL-10), das oftmals als entzündungshemmendes Zytokin beschrieben wird, spielt in der Tumorimmunologie eine besondere Rolle. In dieser Arbeit konnte erstmals festgestellt werden, dass IL-10 trotz seiner protektiven Eigenschaften gegen Primärtumore, Schattenseiten bei der Lebermetastasierung aufweist. Unter anderem konnte beobachtet werden, dass IL-10-defiziente Mäuse vor der Lebermetastasierung geschützt waren. Dabei hatte IL-10 keinen Einfluss auf die Extravasation von Darmkrebszellen, sondern wirkte sich eher auf das späte Stadium der Metastasierungskaskade aus. Darüber hinaus konnte durch die Induktion von Lebermetastasen in Reportermause herausgefunden werden, dass FOXP3-positive CD4 positive T-Zellen (regulatorische T-Zellen oder Tregs) den größten Anteil der IL-10 Produzenten in diesem Modell darstellten. Eine spezifische Depletion der IL-10-Produktion in Tregs führte zu einer Verringerung der Lebermetastasen. Weitere Daten zeigten, dass Tregs ebenfalls auf IL-10 ansprachen, wodurch diese vermehrt IL-10 produzierten. Weiterhin konnte eine pro-metastatische Wirkung von IL-10 auf myeloische Zellen, wie Makrophagen, demonstriert werden. Der Verlust des IL-10-Signals war mit einer verringerten Expression von PD-L1 in der CD3-negativen Zellfraktion assoziiert. In diesem Zusammenhang waren auch PD-L1-defiziente Mäuse vor der Lebermetastasierung geschützt. Welche Zellen PD-L1 exprimieren und wie IL-10 dessen Expression bei der Lebermetastasierung reguliert, ist jedoch weiterhin unklar. Allerdings schützte die Antikörper-vermittelte Blockierung des IL-10-Signals vor Metastasen in der Leber und steht damit im vollen Gegensatz zu seinem Effekt auf Primärtumore. Daher sind weitere Untersuchungen notwendig, um die ambivalenten Effekte von IL-10 vollständig zu entschlüsseln.

Summary

Despite decades of cancer research, oncologists are still facing major challenges in identifying ways to treat metastatic cancers. Among them, colorectal cancer is one of the three most common cancers worldwide and has a high metastatic rate. Once the cancer has spread, the probability of life expectancy decreases dramatically. Therefore, further research focusing on the metastasis cascade is essential to better understand this phenomenon and to rule out the role of the immune system in this process. Moreover, the ultimate aim of preventing metastasis could decrease mortality rates and increase progression-free survival of patients.

Interestingly, Interleukin-10 (IL-10), which is actually an anti-inflammatory cytokine, plays a dual role in tumor immunology. Despite its protective effect on primary tumors, IL-10 surprisingly has the opposite effect on liver metastasis. Evidence of this has been provided in several mouse models, where IL-10 has been shown to promote liver metastasis. Strikingly, IL-10 does not affect the extravasation step, but rather the late stage of metastasis. Furthermore, after induction of liver metastases in reporter mice, FOXP3 positive CD4 T cells (regulatory T cells or Tregs) were the major IL-10 producers. The deletion of IL-10 expression in Tregs led to a reduction of liver metastases. Nevertheless, Tregs themselves respond to IL-10, which leads to an increased IL-10 production, and in turn, affects myeloid cells such as macrophages. The loss of IL-10 signaling in Tregs was associated with decreased expression of PD-L1 in CD3 negative cells. In this context, PD-L1-deficient mice were also protected from liver metastasis. However, the cell types that express PD-L1 and the mechanism how IL-10 regulates PD-L1 expression in liver metastasis is yet to be elucidated. Irrespectively of its effect on primary tumors, IL-10 signaling blockade protected mice against metastasis in the liver. Therefore, further investigations are necessary to reveal the ambivalent effect of IL-10.

1 Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom und dessen Entstehung

Der menschliche Verdauungstrakt ist das Organsystem, welches für die Verdauung von Nahrungsmitteln zu Nährstoffen verantwortlich ist und diese anschließend in den Blutkreislauf abgibt. Dieses System ist in zwei Abschnitte eingeteilt. Der obere Verdauungstrakt beinhaltet den Mund, den Rachen, die Speiseröhre, den Magen und den Zwölffingerdarm, während der untere Verdauungstrakt vom Ligamentum suspensorium duodeni bis zum Anus verläuft. Dieser setzt sich aus Dün- und Dickdarm sowie Rektum und Anus als letzten Teil des Verdauungssystems zusammen. Die Funktion des Dickdarms besteht überwiegend darin, Wasser zu resorbieren und unverdauliche Nahrungsbestandteile aus dem Körper auszuscheiden. In den letzten Jahrzehnten konnte eine steigende Tendenz in der Entwicklung von bösartigen Tumoren, insbesondere im Dickdarmbereich, festgestellt werden¹. Diese Tumorentität, welche auch als kolorektales Karzinom (CRC) bezeichnet wird, ist unter den drei Krebserkrankungen mit der höchsten Inzidenz sowohl bei Männern als auch bei Frauen anzutreffen².

Bis heute sind verschiedenste Einflüsse bekannt, die das CRC-Risiko erhöhen. Die maßgeblichen Faktoren, welche die Entstehung und Entwicklung eines CRC begünstigen, beziehen sich auf den Lebensstil, wie beispielsweise Übergewicht, Tabakkonsum, reduzierte körperliche Aktivität und ballaststoffarme Ernährung³⁻⁵. Auch Menschen, die regelmäßig Alkohol trinken und rohes Fleisch essen, sind häufiger von einem CRC betroffen^{6,7}. Diese umweltassoziierten Faktoren begünstigen das CRC-Risiko hauptsächlich in den westlichen Ländern. Interessanterweise erreichen Migranten aus nicht-westlichen Ländern mit niedrigeren CRC Inzidenzraten ein ähnliches CRC-Inzidenzniveau wie die westliche Bevölkerung⁸.

Des Weiteren kann die Entwicklung eines CRCs auch durch genetische Faktoren stark beeinflusst werden. Die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das Lynch-Syndrom, auch bekannt als hereditäres nicht-Polyposis-assoziiertes kolorektales Karzinom (HNPCC), sind beispielsweise vererbare genetische Veranlagungen, die bereits in jüngeren Jahren zu einem CRC führen können⁹. Ein weiteres Risiko an CRC zu erkranken ist das Alter. Mehr als die Hälfte der CRC-Patienten sind über 70 Jahre alt, nur 10% der CRC-Patienten sind jünger als 55 Jahre¹⁰.

Die meisten Patienten zeigen in einem frühen Stadium ihrer Erkrankung keinerlei Symptome. Mit fortschreitender Erkrankungsdauer können Patienten jedoch Gewichtsverlust und Bauchschmerzen entwickeln und Spuren von Blut im Stuhl aufweisen. Zu diesem Zeitpunkt ist die Wahrscheinlichkeit für ein progressionsfreies Überleben allerdings schon deutlich geringer. Daher wird eine Koloskopie alle 10 Jahre als vorbeugende Untersuchung für Männer ab dem 50. und für Frauen ab dem 55. Lebensjahr empfohlen¹¹. Aufgrund dieser präventiven Maßnahmen sowie wirksamer Behandlungen sank die Mortalität von CRC in den letzten Jahrzehnten drastisch¹⁰⁻¹². Ebenfalls stieg die altersbedingte relative 5-Jahres-Überlebensrate in den verschiedensten Ländern¹⁰⁻¹².

Abgesehen von vererbbaaren genetischen Veranlagungen entsteht ein CRC in der Regel sporadisch, wobei es zu einer Anhäufung an genetischen Veränderungen kommt. Insgesamt gibt es mindestens fünf Faktoren, welche die Karzinogenese im Dickdarm und Rektum fördern, hierbei sind drei genetisch bedingt.

Der erste Faktor ist die **chromosomale Instabilität (CIN)**. Diese ist gekennzeichnet durch einen Verlust von Heterozygotie und Aneuploidie, die bei der Mitose stattfindet. Während der Mitose kann es zu einer veränderten Anzahl an Chromosomen kommen (Aneuploidie) oder es wird durch zufällige Rekombination eine strukturelle Chromosomenaberration eingeleitet, die zu einem Verlust der Heterozygotie führt. Diese strukturelle und numerische Veränderung der Chromosomen kann subsequent zur Aktivierung von Onkogenen (wie KRAS) oder auch zum Verlust von Tumorsuppressorgenen (wie Adenomatous-Polyposis-Coli, DCC oder P53) führen¹³⁻¹⁵.

Der zweite Faktor ist die **Mikrosatelliteninstabilität (MSI)**. Hier treten Mutationen in den DNA-Mismatch-Reperaturgenen auf, die zur Folge haben, dass es bei der DNA-Replikation zu Anhäufung von Basenfehlverpaarungen kommt¹⁶. Die MSI ist die häufigste Ursache für das HNPCC¹⁶.

Der dritte Faktor besteht aus epigenetische Veränderungen. Die Epigenetik beschreibt die funktionelle Veränderung des Genoms ohne eine Veränderung der Nukleotidsequenz. Durch Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen wie RUNX3, P16, IGF2 oder SOCS1, auch bekannt als **CpG Island Methylation Phenotype (CIMP)**, werden diese Gene ausgeschaltet und inaktiv, welches eine Karzinogenese begünstigt¹⁷.

Der vierte Faktor ist eine gestörte Homöostase des **Darmmikrobioms**. Der gesamte Magen-Darm-Trakt ist mit ca. 1×10^{14} Mikroben besiedelt, darunter mehr als 1.000 verschiedenen Arten an Bakterien, Viren und Pilzen¹⁸. Bakterien haben eine essentielle Bedeutung für die Verdauung und Absorption von unterschiedlichen Nährstoffen aus unserem Darm. Eine Symbiose mit den kommensalen Mikroorganismen kann auch gestört werden und so zu einer Dysbiose führen. Während einer Dysbiose wird der Magen-Darm-Trakt von pathogenen Mikroorganismen dominiert, welche normalerweise von kommensalen kontrolliert werden¹⁹. Dies führt zur Produktion toxischer Produkte, die unter anderem genotoxisch und mutagen sind und damit krebserregend wirken¹⁹.

Schlussendlich ist der fünfte Faktor eine chronische Entzündung, wie sie beispielsweise bei **chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED)** wie der Colitis ulcerosa (CU) auftritt. Die chronisch entzündliche Erkrankung des Dickdarms ist nach FAP und HNPCC der drittgrößte Risikofaktor für die Entwicklung eines CRC^{20,21}. Es gibt aber wesentliche Unterschiede zwischen einer sporadischen und einer entzündungsbedingten Tumorentstehung. Normalerweise führt die Aktivierung des Immunsystems zu einer Anti-Tumor-Antwort. Abhängig vom direkten Umfeld kann das Immunsystem jedoch auch eine Tumorentstehung begünstigen. Hierbei werden die rekrutierten Immunzellen beeinflusst. Bei chronischen Erkrankungen wie z.B. bei der CU, liegt eine erhöhte Infiltration von T-Helfer-22-Zellen (T_H22) oder T-Helfer-17-Zellen (T_H17) vor¹⁹. Durch die unkontrollierte Freisetzung dieser Zytokine erhöht sich das Risiko deutlich an einem CRC zu erkranken²²⁻²⁵. Ebenfalls beeinflussen diese Zytokine die Metastasierung des CRC²⁶⁻³⁰.

1.2 Metastasierungskaskade

Die Metastasierung eines Primärtumors ist für die meisten krebserregten Todesfälle verantwortlich³¹. Es handelt sich hierbei um einen evolutionären Prozess, der zusammengefasst als Metastasierungskaskade beschrieben wird. Bei diesem Prozess lösen sich Krebszellen von dem Primärtumor und verbreiten sich anschließend im ganzen Körper. Dadurch bilden sich neue, sogenannte Metastasen. Dieser Vorgang verläuft in einzelnen Schritten, welche in der folgenden Abbildung dargestellt werden (s. Abb.1).

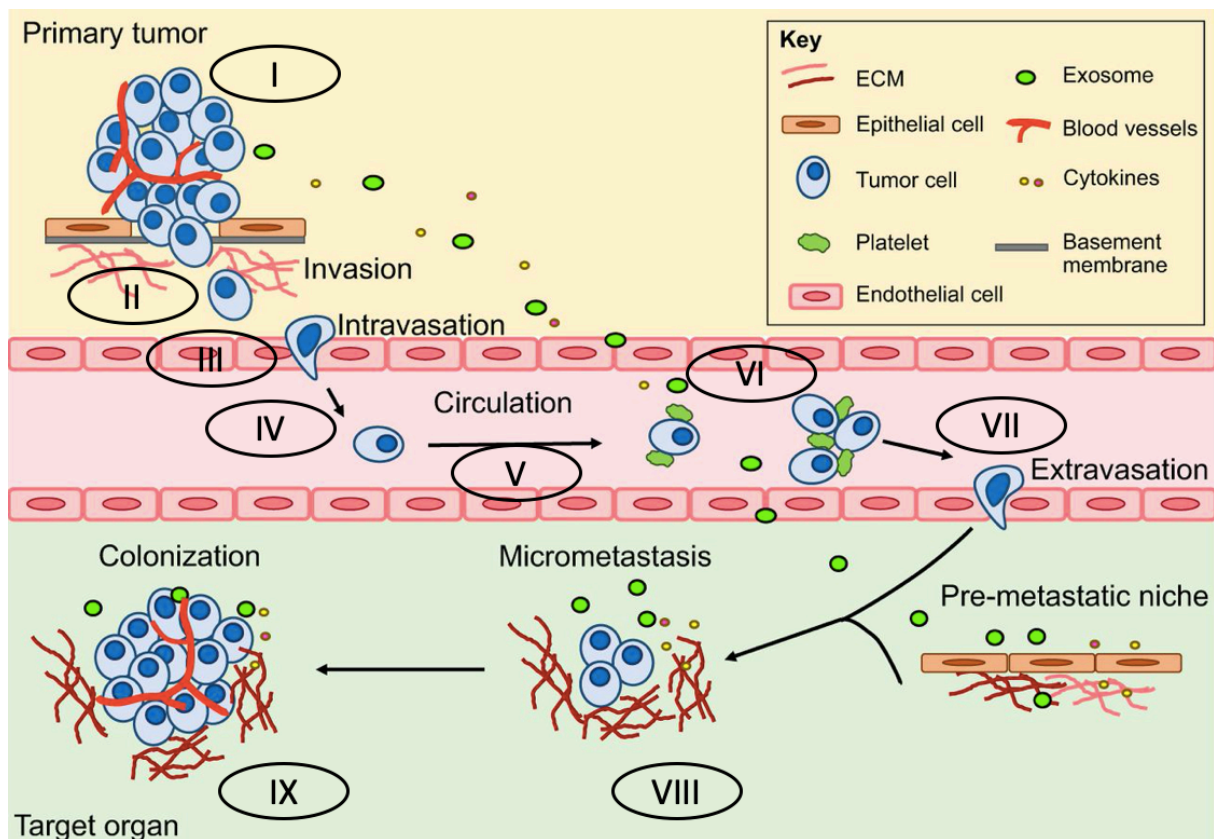


Abbildung 1: Die Metastasierungskaskade nach Gomez-Cuadrado et al. (modifiziert)³²
 Dargestellt sind die einzelnen Schritte der Metastasierung. (I) Entstehung und Progression des Primärtumors. (II) Entwicklung eines Migrationspotentials. (III) Invasion. (IV) Intravasation. (V) Verbreitung in Blut- oder Lymphgefäßen als (VI) CTC. (VII) Extravasation ins neue Gewebe. (VIII) Überleben im neuen Gewebe. (IX) Proliferation und Wachstum von Metastasen.

Als erstes muss sich der Primärtumor entwickeln und heranwachsen (I). Um zu streuen, müssen Krebszellen dann ihre Proliferation stoppen und ein Migrationspotential entwickeln, welches ihnen ermöglicht zu wandern (II)³³. Durch die Wanderung im Gewebe (III) treffen die Krebszellen dann auf die Gefäße, die das Gewebe versorgen. Nach der Intravasation (IV) verbreiten sich die Krebszellen über das Blut bzw. über das lymphatische System (V) als zirkulierende Tumorzellen (CTC, VI). In den Stufen II bis V durchlaufen die Krebszellen einen Prozess, der als epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet wird. Bei dieser Transition verändern Epithelzellen ihren Phänotyp in Richtung einer mesenchymalen Zelle. Diese Transformation veränderte die Zellmorphologie der Krebszelle so, dass das Migrationspotential und die Invasivität erhöht wird³⁴. Ein Beispiel hierfür ist das L1CR1 Protein, das die Fähigkeit der Zelle zur Entwicklung eines metastasierendes CRC (mCRC) begünstigt³⁵. Die CTCs haben im Gegensatz zu den im Gewebe

eingebetteten Tumorzellen ein höheres Metastasierungspotential, da sie Möglichkeiten besitzen, sich den Scherkräften in den Gefäßen und der Immunantwort zu entziehen^{36,37}. Die CTCs können dann an einer entfernten Stelle an der Gefäßwand anhaften, wo sie dann extravasieren (VII) und in dem neuen Gewebe/Organ als Mikrometastasen überleben müssen (VIII). Im klinischen Alltag sind vor allem Leber, Lunge, Knochen und Gehirn von Metastasen befallen. Man nimmt an, dass diese klinische Beobachtung mit der Anatomie der Gefäße zu tun hat, welche in diesen Organen einen Kapillarkreislauf bilden, der dazu führt dass die Krebszellen an diesen Stellen festsitzen³⁸.

Nach der Extravasation durchlaufen die Krebszellen eine mesenchymale-epitheliale Transition (MET), bei der die Krebszellen ihre ursprünglichen Eigenschaften zurückgewinnen und sich vorerst in einen Ruhezustand versetzen^{39,40}. Während dieses Schrittes werden leicht erkennbare Metastasen vom Immunsystem eliminiert. Mit der Zeit entwickeln die Metastasen jedoch verschiedene Strategien, mit denen sie sich einer Immunüberwachung entziehen und sich damit überlebensfähig machen können. Dabei ist der Auslöser, welcher die Krebszelle wiederum aus ihrem Ruhezustand weckt, vergleichsweise unklar.

Eine dieser Möglichkeiten sich der Immunüberwachung zu entziehen, ist zum Beispiel die Sekretion von Exosomen. Exosome sind extrazelluläre Vesikel (EV), die eine heterogene Gruppe bilden und aus dem endozytischen Prozess stammen^{41,42}. Diese Exosome werden aus dem Inneren der Zelle sekretiert und können unterschiedliche Proteine auf ihrer Oberfläche exprimieren. Diese wiederum können beispielsweise eine Immunantwort bändigen und damit eine Nische für die Metastase vorbereiten⁴³. Die Entstehung einer Metastase beginnt jedoch mit der Proliferation der Mikrometastase (IX). Dieser Prozess ist allerdings relativ ineffizient. Experimentelle Arbeiten an Mäusen konnten bereits zeigen, dass die überwiegende Mehrheit der Krebszellen entweder im Kreislauf zugrunde gehen, in den Kapillaren stecken bleiben oder 24 Stunden nach der Extravasation eine selbstinduzierte Apoptose einleiten⁴⁴. Von diesen wenigen Krebszellen, die es schaffen, sich erfolgreich in ein neues Organ anzusiedeln, wächst nur ein Bruchteil zu makroskopischen sichtbaren Metastasen heran^{31,45}.

1.3 Tumorimmunologie

Höhere Lebewesen haben komplexe Immunsysteme entwickelt, um sich vor Viren, Bakterien, Parasiten, Fremdkörpern oder entarteten Zellen schützen zu können. Um diese Zellen und Organismen zu beseitigen, existieren im Wesentlichen zwei Formen der Immunantwort: die humorale und die zelluläre Immunantwort.

Humorale Immunantwort: Die Abwehr des Pathogens verläuft nicht direkt, sondern wird beispielsweise durch Antikörper zwischenvermittelt. Die Antikörper markieren diese Fremdkörper, sodass phagozytierende Zellen, wie zum Beispiel Makrophagen oder dendritische Zellen, diese aufnehmen und abbauen können. Normalerweise findet dieser Mechanismus im Kampf gegen Viren, Parasiten oder gefährliche Toxine Anwendung. Jedoch wurde in der Tumorbekämpfung ein wesentlicher Vorteil einer Antikörper-basierten Behandlung entdeckt, der zum Teil zu großen Tumorremissionen bis hin zu einer Heilung führt^{46,47}. Da einige Tumore bestimmte Oberflächenmoleküle überexprimieren, sind Patienten, welche unter diesen Tumorentitäten leiden, bestens für die Behandlung mit monoklonale Antikörpertherapien geeignet. Zusammen mit Zytostatika stellen diese Antikörpertherapien den momentanen Goldstandard nach einer chirurgischen und/oder Strahlentherapie bei zahlreichen Krebserkrankungen dar und haben zum Beispiel bei Brustkrebs und anderen Krebsarten zu deutlichen Tumorremissionen geführt⁴⁸.

Zelluläre Immunantwort: Eine weitere Möglichkeit, sich vor unerwünschten Lebensformen zu schützen, besteht aus der zellulären Immunantwort. Bestimmte Immunzellen erkennen fremde, virusinfizierte Zellen oder entartete Zellen im Körper durch spezifische Marker und eliminieren diese durch einen direkten Zellkontakt. Zellen, die zu dieser Form der Immunantwort gehören, sind z.B. natürliche Killerzellen (NK) oder zytotoxische T-Zellen (CTL)^{49–52}. Sowohl NK-Zellen, als auch innate lymphoid cells (ILC), besitzen von Geburt an spezifische Rezeptoren, wie beispielsweise *natural cytotoxicity receptors* (NCR) bzw. *killer cell immunoglobulin-like receptors* (KIR, nur beim Menschen) und können durch die Bindung oder auch eine fehlende Bindung an dem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-I Oberflächenprotein zwischen Freund und Feind unterscheiden^{52,53}. Darüber hinaus gibt es weitere Zellen, die ebenfalls Tumorantigene erkennen können, darunter die Gruppe der T-Zellen. Diese Zellgruppe besteht in der Tumormikroumgebung hauptsächlich aus aktivierten *Cluster of Differentiation* (CD) 8 positive T-Zellen; jedoch

gibt es auch weitere Subgruppen, wie *invariant NK T-cells* (iNKT) oder $\gamma\delta$ T-Zellen, welche entartete Zellen bekämpfen können^{49,54–56}. Momentan hat sich im Hinblick auf eine zelluläre Immuntherapie die CAR-T-Zelltherapie bewährt⁵⁷. Hierbei werden T-Zellen *ex vivo* mit einem chimären Antigenrezeptor gegen ein Oberflächenprotein des Tumors ausgestattet und dem Patienten wieder verabreicht⁵⁸. Krebszellen entwickeln jedoch Wege mit denen sie sich dieser Immunüberwachung entziehen können. Eine dieser Möglichkeiten ist die Erzeugung eines immunsuppressiven Milieus, welches es den Killerzellen erschwert, die Krebszellen zu beseitigen. Hierbei fördern die Krebszellen unter anderem die Entwicklung von Tregs oder von Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM), die einen anti-inflammatorischen Phänotyp aufweisen. Neben zahlreichen Botenstoffen, die von diesen immunsuppressiven Zellen sekretiert werden, gilt besonders ein Zytokin als eines der wichtigsten Immunsuppressiva – das Interleukin (IL) -10.

1.4 Interleukin-10: Struktur, Signalweg und Funktion

IL-10 ist ein stark entzündungshemmendes und immunsuppressives Zytokin, mit einer Halbwertszeit von einer Stunde^{59,60}. Dieses Zytokin gehört zusammen mit zahlreichen anderen Zytokinen zu der IL-10-Superfamilie. Alle Mitglieder dieser Familie besitzen eine grundlegende strukturelle Ähnlichkeit, teilen zum Teil dieselben Rezeptoren und haben eine ähnliche Signalweiterleitung⁶¹. Funktionell unterscheiden sich diese Zytokine jedoch enorm. IL-10 bindet als Homodimer an einen heterodimeren Rezeptorkomplex, bestehend aus IL-10RA und IL-10RB (s. Abb.2)^{62,63}. Während IL-10RB auf allen Zellen exprimiert wird, ist IL-10RA hauptsächlich auf Immunzellen zu finden⁶⁴.

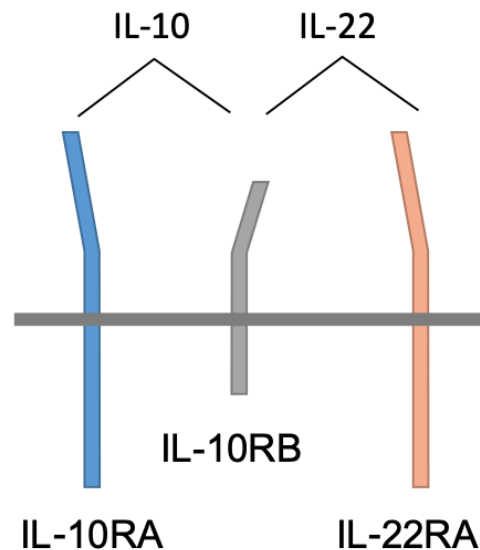


Abbildung 2: Darstellung zweier Zytokine aus der IL-10 Superfamilie und ihren entsprechenden Rezeptoren. IL-10 und IL-22 haben beide einen spezifischen Rezeptor (IL-10RA bzw. IL-22RA) und teilen sich den IL-10RB, welcher von fast allen Zellen exprimiert wird. IL-10RA ist überwiegend auf Immunzellen zu finden, kann aber auch auf anderen Zellen exprimiert werden^{64–66}. IL-22RA ist ausschließlich auf nicht-immunologischen Zellen zu finden⁶⁷.

Durch die Bindung von IL-10 an seine Rezeptoren erfolgt nach einer Signalübertragung eine Phosphorylierung von *signal transducers and activators of transcription 3* (STAT3), aber auch in geringerem Maße von STAT1 und STAT5⁶⁴. Mehrere Zelltypen, darunter Tregs, regulatorische T-Zellen vom Typ 1 (Tr1), NK-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen (DC) können IL-10 produzieren⁶⁸. Zu den Wirkungen von IL-10 gehört, dass es die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine von Makrophagen und DCs blockiert und die Fähigkeit dieser Zelltypen hemmt, antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen durch Antigenpräsentation zu stimulieren^{69–71}. Unter anderem sind auch chronischen Erkrankungen, beispielsweise im Darm, mit einem defekten IL-10 Signalweg assoziiert^{72–74}. Das macht deutlich, dass IL-10 maßgeblich zur Reglementierung von pro-inflammatorischen Zytokinen beiträgt und dieser einen negativen Effekt auf den Wirt abfedern kann. Weiterhin haben jüngste Erkenntnisse demonstriert, dass eine ausreichende Kontrolle der Immunantwort nur dann stattfindet, wenn ein Gleichgewicht zwischen T_H17 Zellen und Tregs vorliegt⁷⁵. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Funktion von CD4 positiven T-Zellen, einschließlich T_H17-Zellen und Tregs, durch den IL-10-Signalweg beeinflusst wird^{76–78}. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass IL-10 die entzündungsfördernden T_H17 Zellen unterdrückt und die Aktivität der Tregs erhöht^{77,78}.

1.5 Differenzierung und Funktion von regulatorische T-Zellen (Tregs)

Tregs gehören wie andere T-Helferzellen zu den CD4 positiven T-Zellen. Was sie gemeinsam verbindet ist ihre Vorläuferzelle, die naive T-Zelle. Die naive T-Zelle stammt aus dem Thymus und zirkuliert als unreife Zelle in die Peripherie. Hier entscheidet dann die Umgebung zu welcher CD4 positiven T-Zelle diese heranreift. Durch die Bindung des spezifischen T-Zell-Rezeptors mit einem Antigen und den Kostimulatorischen Signalen der Antigen-präsentierenden Zelle, werden unterschiedliche STAT Moleküle aktiviert⁷⁹. Es folgt daraus, dass spezifische Transkriptionsfaktoren aktiviert werden. Durch diese charakteristischen Transkriptionsfaktoren kommt es anschließend zu epigenetischen Modifikationen, Repressionen oder Anschaltungen von Genen, die die Zelle heranreifen lässt und aktiviert⁷⁹. Tregs wurden erstmalig 1995 beschrieben und waren durch die Expression der alpha-Kette des IL-2 gekennzeichnet⁸⁰. Weitere Studien zeigten, dass diese Tregs das Forkhead-Box-Protein P3 (FOXP3) als spezifischen Transkriptionsfaktor exprimieren, der für die Differenzierung und Aufrechterhaltung des Treg-Zell-Programms essentiell ist^{81,82}. Tregs werden weiter eingeteilt in natürliche Tregs (nTregs) oder periphere Tregs (pTregs)⁸³. Die Mehrheit der Tregs bilden die nTregs, die nach einer spezifischen T-Zellrezeptor-Selektion aus dem Thymus auswandern und in der Peripherie durch entsprechende Stimuli, wie IL-2 weiter expandieren⁸⁴. Die Differenzierung der pTregs erfolgt in der Peripherie aus naiven T-Zellen und ist abhängig von IL-2 und *transforming growth factor-β* (TGF-β)⁸⁵⁻⁸⁷. Das TGF-β Signal führt zur Induktion von FOXP3, während das IL-2, durch das STAT5 die Expression des Transkriptionsfaktors FOXP3 weiter verstärkt^{85,88-90}. Was die FOXP3 Expression in den nTregs jedoch induziert ist noch nicht bekannt.

Sowohl nTregs als auch pTregs tragen zur Immunhomöostase bei. Dabei ist ihr Beitrag zur Immuntoleranz so bedeutend, dass Defekte in der Funktion von Tregs katastrophale Auswirkungen haben. Sie führen zu Autoimmunerkrankungen, wie der Immundysregulation-Polyendokrinopathie-Enteropathie-X-chromosomal, die durch eine Mutation im *Foxp3* Gen ausgelöst wird⁹¹. FOXP3 positive Tregs besitzen mehrere Mechanismen, um eine Immunantwort zu unterdrücken und zu regulieren. Sie exprimieren negative T-Zell-Regulatoren, wie CTLA-4 um sie direkt zu unterbinden oder sie sezernieren TGF-β bzw. IL-10^{87,92,93}. Die Funktion von nTregs ist die Kontrolle

von Autoantigenreaktionen, während pTregs die Überreaktion des Immunsystems auf fremde Antigene, wie zum Beispiel im Darm regulieren⁸⁴.

1.6 Rolle von IL-10 bei der Tumorentwicklung und Metastasierung

Wie oben beschrieben, galt und gilt IL-10 als das Schlüsselzytokin für eine Supprimierung des Immunsystems. Im Hinblick auf die Tumorentwicklung konnte 2011 erstmals der Mechanismus für die immunmodulierenden Wirkungen von IL-10 beschrieben werden⁹⁴. Studien an Mäusen identifizierten überraschenderweise eine hemmende Funktion von IL-10 bei der Entwicklung und dem Wachstum von Tumoren^{94,95}. Es wurde bei der Verwendung von IL-10-defizienten Mäusen eine erhöhte Karzinogenese und auch ein erhöhtes Wachstum von transplantierten Tumoren beobachtet^{94,95}. Mäuse, welche orthotope Tumore besaßen oder deren Tumore chemisch induziert wurden, konnten folgerichtig durch die Verabreichung von PEGyliertem IL-10 vor einer Tumorprogression geschützt werden^{94,96}. In einer kürzlich durchgeführten klinischen Studie, in welcher Patienten mit verschiedenen Krebsarten (Darmkrebs, Melanom, Lungenkrebs, Nierenkrebs) eingeschlossen wurden, konnte des Weiteren über ein teilweises Ansprechen auf eine Behandlung mit PEGyliertem IL-10 berichtet werden^{97,98}. Besonders bemerkenswert war bei einer dieser zwei Studien, dass eine Kohorte von Patienten, welche vorher auf keine Therapie ansprach, auf eine Kombinationstherapie aus anti-*programmed cell death protein-1* (PD-1) Antikörper und rekombinantem IL-10 mit einer Tumorregression reagierte⁹⁸. Diese Studien machen IL-10 zu einem neuen und vielversprechenden therapeutischen Angriffspunkt bei Krebspatienten⁹⁹⁻¹⁰¹. Trotz dieser aktuellen Studie, die eine Anti-Tumor Wirkung von IL-10 zeigen konnte, konzentrieren sich nur wenige Arbeiten auf die Rolle von IL-10 bei der Metastasierung^{95,102,103}. Daher ist es aktuell unklar, inwieweit eine Therapie mit IL-10 auch für das metastasierende CRC anwendbar ist.

1.7 Therapieprinzipien von CRC-Patienten mit Metastasen

Weltweit wie auch in Deutschland ist das CRC eine der häufigsten Krebserkrankungen mit einer ebenfalls hohen Sterberate². Je nach Stadium des CRC treten bei 20 bis 70% der Patienten Lebermetastasen und bei 10 bis 20% der Patienten Lungenmetastasen auf¹⁰⁴. Metastasierte Tumorerkrankungen gelten zwar weiterhin als unheilbar, jedoch

konnten in den letzten Jahren neue Möglichkeiten und Behandlungskonzepte sowohl für den Primärtumor als auch für dessen Metastasen entwickelt werden. Dabei wird das übergeordnete Ziel verfolgt das Leben der Patienten unter weitestgehendem Erhalt der Lebensqualität zu verlängern. Die Effektivität der Therapien hat sich diesbezüglich in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert, sodass das progressionsfreie Überleben der Patienten verbessert wurde^{105–108}.

Grundsätzlich existieren beim CRC vier Behandlungsoptionen. Die erste Option ist ein endoskopischer oder chirurgischer Eingriff, bei welchem eine Polypektomie (entfernen eines oder mehrerer Polypen, als Vorstufen des CRC, während einer Koloskopie), eine lokale Exzision (endoskopisches Entfernen des Tumors inklusive eines ausreichenden Sicherheitsabstandes) oder eine chirurgische Resektion (entfernen eines Teils des Dickdarms und der angrenzenden Lymphknoten) durchgeführt wird. Die zweite Option basiert auf der Verwendung von Röntgenstrahlen zur Zerstörung des Tumors, welche jedoch nur beim Rektumkarzinom zur Anwendung kommt. Hierbei werden entweder Strahlungen von außen auf den Körper gesendet (externe Strahlentherapie) oder radioaktives Material wird für kurze Zeit in der Nähe des Tumors platziert (interne Strahlentherapie). Bei der dritten Option handelt es sich um die zytotoxische Chemotherapie. Diese Behandlung basiert auf der Verwendung von chemischen Verbindungen, welche die Proliferation von Zellen hemmen. Bei dieser Form der Therapie erfolgt eine systemische Behandlung. Demnach gibt es zahlreiche unspezifische Wirkungen, die dann bei Patienten zu Nebenwirkungen führen können. Aus diesem Grund ist die gezielte Therapie als vierte Option ein derzeit neuer und vielversprechender Ansatz zur Krebsbehandlung. Durch die Verwendung von kleinen Molekülen und monoklonalen Antikörpern, die deutlich spezifischer sind als die Chemotherapie, wirkt diese Behandlung nur auf bestimmte Zelltypen. Beispiele dafür sind Regorafenib oder Bevacizumab, die beide gegen angiogene Rezeptoren gerichtet sind^{109,110} und Galunisertib oder Fresolimumab, welche den *transforming growth factor-β* (TGF-β) Rezeptor blockieren¹¹¹. Es existieren noch weitere zielgerichtete Therapien, die das Immunsystem bei der Tumorbekämpfung unterstützen. Dabei nutzt man den großen Vorteil von Antikörpern aus, um eine Immunantwort zu induzieren oder zu reaktivieren. Eine weitere Klasse dieser Antikörper besteht aus den Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICI), wie etwa Antikörper gegen *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4* (CTLA-4) oder gegen *Programmed death-ligand 1* (PD-L1)¹¹². Die Blockade dieser Immuncheckpoint-Proteine, welche die Krebszelle ursprünglich

entwickelt hat, um sich vor der Immunantwort zu schützen, induziert eine Immunzell-basierte Immunantwort. Beispielsweise hat die Verwendung von Ipilimumab oder Atezolizumab zu neuen bahnbrechenden Behandlungskonzepten bei Krebspatienten geführt und somit auch die Aussicht auf einen Tumorrückgang verbessert. Ein Nachteil der Immun-Checkpoint-Inhibitoren sind jedoch, dass diese ebenfalls eine übermäßige Immunantwort induzieren und somit zu entzündlichen Erkrankungen wie Diabetes mellitus, rheumatoide Arthritis oder Enterokolitis führen können^{113–115}. Das aktuelle Therapieschema bei mCRC besteht in der Regel aus einer Kombinationstherapie aus zytotoxischen Chemotherapeutika (Oxalplatin/Irinotecan mit 5-Fluorouracil) mit oder ohne einem gezielten Therapeutikum (Bevacizumab) nach einer primären und sekundären Tumorresektion¹¹⁶. Die Kombinationstherapie hat zwar die Lebenserwartung der Patienten erhöht, wirkt sich aber negativ auf die Lebensqualität aus (z.B. periphere Neuropathie oder chronische Diarrhoe). Inwieweit welche Kombinationstherapien in welcher Konstellation am besten für die Behandlung von mCRC geeignet ist, ist heutzutage unklar. Jedoch konnte Sonbol *et al.* in einer Meta-Analyse die Wirksamkeit verschiedener Behandlungsstrategien für Patienten mit mCRC vergleichen¹¹⁷. In dieser Studie kamen die Autoren zu der Schlussfolgerung, dass eine dauerhafte Behandlung mit einem starken Kombinationscocktail aus zytotoxischen und gezielten Therapeutika das Gesamtüberleben der Patienten nicht unbedingt erhöht und empfehlen daher nach der Erstbehandlung eine Fortsetzungstherapie auf Fluoropyrimidin-Basis mit oder ohne den Zusatz von Bevacizumab¹¹⁷.

1.8 Zielsetzung

Obwohl in den letzten Jahren viele Fortschritte in der Onkologie erzielt werden konnten, ist Krebs immer noch eine der tödlichsten Erkrankungen weltweit. Dazu kommt, dass in jedem Organ Krebs entstehen kann und dieser sich auch in den verschiedensten Teilen des Körpers verbreiten kann. Dabei ist die Leber eine der häufigsten Organe, das von Metastasen betroffen ist. Onkologen sind sich einig, dass die Mortalität dieser Erkrankung in den meisten Fällen von der Metastasierungstendenz des Primärtumors abhängig ist. Wenn die Metastasierung verhindert werden könnte, könnte der Krankheitsverlauf positiv beeinflusst werden und letztendlich das progressionsfreie Überleben der Patienten signifikant erhöht werden. Die Bildung von Metastasen ist jedoch ein sehr komplexer Prozess, der durch Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zellen des Gewebes, des Immunsystems und der Krebszellen begünstigt wird. Momentan können nur vereinzelt Fortschritte im Verständnis über die Metastasierung erwirkt werden. IL-10 ist ein regulatorisches Zytokin, das von zahlreichen Zellen produziert wird und sowohl auf Immunzellen als auch auf andere Zellen wirkt. Obwohl es protektive Eigenschaften bei Primärtumoren aufweist, ist seine Funktion bei der Metastasierung nicht klar definiert. Da gastrointestinale Karzinome hauptsächlich in die Leber streuen, war das Ziel dieser Arbeit, die Auswirkung von IL-10 auf die Lebermetastasierung zu untersuchen. Es wurden folgende Fragestellungen formuliert, die in dieser Arbeit beantwortet werden:

1. Welche Funktion hat IL-10 bei der Lebermetastasierung?
2. Beeinflusst IL-10 die Lebermetastasierung indirekt über die Entstehung einer Colitis?
3. Welche Zelle produziert IL-10?
4. Auf welche Zielzelle wirkt IL-10 und welche funktionelle Relevanz hat dies bei der Lebermetastasierung?

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

In den folgenden Tabellen sind alle Verbrauchsmaterialien, Laborinstrumente/-geräte, Chemikalien, Reagenzien, Mausstämme, Zelllinien, Antikörper und Primer aufgeführt. Reagenzien und Puffer wurden mit vollständig demineralisiertem Wasser (VE-Wasser) verdünnt, das bei Bedarf entweder autoklaviert oder steril filtriert wurde.

2.1.1 Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Geräte

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
AccuCount Blank Particels	Sperotech, Fulda
CD 146 Microbeads, Maus	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Clicks Medium	Irvine, Orange County, CA, USA
Collagenase IV (100 U), von Clostridium hystolyticum	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Deckel für PCR-Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht
DNase	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS), 1 x and 10 x	PAA, Würzburg
Einbettkassetten	Kabe, Nümbrecht
Einbettkassetten	Lonza, Basel, Schweiz
Eppis 0,5 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Eppis 1,5 mL RNase-frei	Sarstedt, Nümbrecht
Eppis 2 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sarstedt, Nümbrecht
FACS Clean Lösung	BD, Heidelberg
FACS Flow, 20 L	BD, Heidelberg
FACS Rinse Solution	BD, Heidelberg
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
FACS-Röhrchen mit Deckel	BD, Heidelberg
Falcons 15mL	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Falcons 50mL	Greiner, Kremsmünster, Österreich

Fetales Kälberserum (FBS)	PAA, Würzburg
Filterspitzen 10 µL	Sarstedt, Nümbrecht
Filterspitzen 20 µL	Sarstedt, Nümbrecht
Filterspitzen 200 µL	Sarstedt, Nümbrecht
Filterspitzen 1250 µL	Sarstedt, Nümbrecht
Forene (Isofluran)	Abbvie, North Chicago, IL, USA
Handschuhe	Ansell, Richmond, Australien
Handschuhe Nitril	Halyard, Alpharetta, GA, USA
HEPES	ThermoFischer Scientific, Waltham USA
IMDM Medium	ThermoFischer Scientific, Waltham USA
Immobilon-FL	Merck-Millipor, Darmstadt
L- Glutamine	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
LumiSensor HRP Substrate kit	GenScript, Piscataway Township, NJ, USA
MACS Trennsäule	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Metallklammern	Braun Melsungen AG, Melsungen
Methanol	Carl-Roth, Karlsruhe
Nahtmaterial	Covidien, Walpole, MA, USA
Novaminsulfon-ratiopharm	Ratiopharm, Ulm
Optiprep	Sigma, Kawasaki, Japan
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	ThermoFischer Scientific, Waltham USA
PCR-Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht
PCR-Reaktionsgefäß mit Deckel	Sarstedt, Nümbrecht
Percoll	GE Healthcare, Chicago, IL, USA
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 10 µL StackPack	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 200 µL StackPack	Sarstedt, Nümbrecht
Rimadyl Injektionslösung	Pfizer, ew York City, NY, USA
Roti-Histofix (4 %)	Carl-Roth, Karlsruhe
RPMI medium	ThermoFischer Scientific, Waltham USA
Serologische Pipette 10 mL	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipette 25 mL	Greiner, Kremsmünster, Österreich

Serologische Pipette 50 mL	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipette 5 mL	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Sezierbesteck-Set	Fine Science Tools, Heidelberg
Spritze 1,0 mL	Braun, Kronberg im Taunus
Spritze 1,0 mL	Braun Melsungen AG, Melsungen
Spritze 5 mL	Braun Melsungen AG, Melsungen
Spritze 10 mL	Braun Melsungen AG, Melsungen
Spritze 20 mL	Braun Melsungen AG, Melsungen
Spritzen (26G)	BD, Heidelberg
Spritzenvorsatzfilter 0,22 µm	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzenvorsatzfilter 0,45 µm	Sarstedt, Nümbrecht
Trypanblau Lösung, 0.4 % L	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Zellkulturplatte mit 12 Vertiefungen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatte mit 48 Vertiefungen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen	Sarstedt, Nümbrecht
Zell-Sieb (100 µm)	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Zell-Sieb (40 µm)	Greiner, Kremsmünster, Österreich

Tabelle 2: Geräte

Name	Hersteller
Axio Cam MRc	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Axio Scope. A1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Zentrifuge 5424R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge 5427R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge 5810/5427R	Eppendorf AG, Hamburg
Tissue-Tek® TEC™ Embedding System	Sakura Finetek, Staufen
Durchflusszytometer AriaIIIu (Sorter)	BD, Heidelberg
Durchflusszytometer LSRII Fortessa	BD, Heidelberg
Gefrierschrank MedLine	Liebherr, Bulle FR, Schweiz

Hera Safe Sicherheitswerkbank	Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA
Hertherm™ Inkubator	ThermoFischer Scientific, Waltham USA
i-sensys MF419x Drucker	Canon, Ōta, Japan
Labor-Abzugshaube, TEC-Onomic	C+P Möbelsystem GmbH, Breidenbach
Mikroskop DMIL LED	Leica Biosystem, Nussloch
Mikrotom CUT 5062	SLEE Medical, Mainz
Neubauer Zählkammer (0,0025 mm ²)	Superior Marienfeld, Lauda-Königshofen
PerfectBlue™ Gelsystem Maxi	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Kühlschrank KG KSVV30A	Sartorius, Göttingen
Sanyo CO2 Inkubator	Ewald Innovationstechnik GmbH, Rodenberg
Shandon Citadel 1000 Gewebe Prozessor	Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA
NanoDrop	ThermoFischer Scientific, Waltham USA
C1000 Thermocycler	Bio-Rad Laboratories, München
ThermoLux Wärmeunterlage	Witte+Sutor GmbH, Murrhardt
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Ultra-Tiefkühltruhe MDF- U5386S	Panasonic Healthcare, Präfektur Tokio, Japan
UV Trans-illuminator Gel Doc TM XR+	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Vevo 3100	FUJIFILM VisualSonics, Toronto, Kanada
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
WNB Wasserbad	Memmert, Büchenbach
Westernblot Apparatur	Bio-Rad, Hercules, CA, USA

Tabelle 3: Chemikalien/Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
10x DreamTag Green buffer	ThermoFischer Scientific, Waltham USA
2-Propanol (Isopropanol)	Th. Geyer, Renningen
Agarose Ultra Pure	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

Chloroform	J.T. Baker - Fisher Scientific, Schwerte
Cytofix/Cytoperm buffer	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Cytoperm Permeabilization Buffer Plus	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Dimethylsuloxide (DMSO)	Merck, Darmstadt
dNTP mix	Fermentas, Vilnius, Litauen
DreamTaq DNA Polymerase	ThermoFischer Scientific, Waltham USA
Ethanol (absolute)	Th. Geyer, Renningen
Ethidiumbromide	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Merck, Darmstadt
Formaldehyde solution	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Fermentas, Vilnius, Litauen
Glykogen	Merck, Darmstadt
High Capacity cDNA Reverse Transcription kit	Applied Biosystem Foster City, CA, USA
Ionomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Monensin A	BioLegend, San Diego, CA, USA
Nonidet P40 (NP40)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Penicillin/Streptomycin, 10,000 units/mL	ThermoFischer Scientific, Waltham USA
Perm Buffer III	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PhosFlow Lyse/Fix buffer	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Proteinase K	Roche, Basel, Schweiz
TaqMan Fast Advanced Master Mix	ThermoFischer Scientific, Waltham USA
Trizol LS reagent	ThermoFischer Scientific, Waltham USA
Trizol reagent	ThermoFischer Scientific, Waltham USA
β -Mercaptoethanol	ThermoFischer Scientific, Waltham USA

2.1.2 Maustiere

Alle Mäuse wurden in der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen gehalten. Es wurden alters- und geschlechtsangepasste Wurfgeschwister zwischen 8 und 14 Wochen verwendet. Alle Tierversuche wurden von der „Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales, Amt für Gesundheit“ (Hamburg, Deutschland) genehmigt. Es wurden strenge Abbruchkriterien definiert, um unnötiges Leid zu verhindern und die Belastung auf ein Minimum zu reduzieren. Sobald eines dieser Abbruchkriterien erreicht wurde, wurde die Maus aus dem Versuch genommen.

Tabelle 4: Mausbezeichnungen

Maus	Funktion
C57BL/6J	Wildtyp-Maus, keine genetische Veränderung
<i>Il10</i> ^{-/-}	Homozygote Deletion von <i>Il10</i> in allen Zellen
<i>Il10</i> ^{flox/flox} <i>Foxp3</i> ^{cre+}	Homozygote Deletion von <i>Il10</i> in FOXP3-positiven Zellen (Tregs)
<i>Il10</i> ^{flox/flox} <i>Lysm</i> ^{cre+}	Homozygote Deletion von <i>Il10</i> in myeloischen Zellen
<i>Rag</i> ^{-/-} (Yale)	Homozygote Deletion der Rekombinase <i>Rag</i> , sodass es keine reifen B- und T-Zellen gibt. Sie stammt aus der Yale Universität (New Haven, CT, USA)
Reporter Maus: <i>Il10</i> ^{eGFP} <i>Foxp3</i> ^{RFP}	Alle IL-10- bzw. FOXP3-positiven Zellen exprimieren erweiterten GFP bzw. RFP
<i>Il10ra</i> ^{flox/flox} <i>Cdh5</i> ^{cre+}	Homozygote Deletion von <i>Il10ra</i> in Endothel-/Epithelzellen

Fate Maus: <i>Il17a^{cre+}Rosa26^{floxSTOPflox}YFP</i> <i>Foxp3^{RFP}</i>	Alle Foxp3-positiven Zellen exprimieren RFP, während alle IL-17 produzierenden Zellen mit YFP markiert werden
<i>Il10ra^{flox/flox}Lysm^{cre+}</i>	Homozygote Deletion von <i>Il10ra</i> in myeloischen Zellen
<i>Il10ra^{flox/flox}Cd11c^{cre+}</i>	Homozygote Deletion von <i>Il10ra</i> in dendritischen Zellen
<i>Il10ra^{flox/flox}Il17a^{cre+}</i>	Homozygote Deletion von <i>Il10ra</i> in allen IL-17 produzierenden Zellen
<i>B7h1^{-/-}</i>	Homozygote Deletion von <i>B7h1</i> (PD-L1) in allen Zellen

2.1.3 Zelllinien

Tabelle 5: Zelllinien

Maus	Herkunft
MC38	ATCC, Manassas, VA, USA
LLC	ATCC, Manassas, VA, USA

2.1.4 Antikörper und Zytokine

Tabelle 6: Antikörper für den Westernblot

Antigen	Spezifität	Wirt	Firma	Bestellnummer
Kaninchen IgG- HRP	Polyclonal	Swine	Agilent Technologies	4442
Maus IgG- HRP	Polyclonal	Rabbit	Agilent Technologies	2134
pSTAT3	Monoklonal	Kaninchen	Cell signaling Technology	122133
STAT3	Polyklonal	Maus	Cell signaling Technology	123441

Tabelle 7: Antikörper für die Durchflusszytometrie/Sortierung

Antigen	Klon	Markierung	Fluorochrom	Hersteller	Bestellnummer
CD3	17A2	Extrazellulär	AF700	BioLegend	100215
CD3	17A2	Extrazellulär	BUV395	BD	740268
CD3	17A2	Extrazellulär	BV421	BioLegend	100227
CD3	17A2	Extrazellulär	BV650	BioLegend	100229
CD4	GK1.5	Extrazellulär	AF700	BioLegend	100429
CD4	GK1.5	Extrazellulär	APC	BioLegend	100411
CD4	GK1.5	Extrazellulär	APC-Cy7	BioLegend	100413
CD4	GK1.5	Extrazellulär	BUV737	BD	612761
CD8	53-6.7	Extrazellulär	APC-Cy7	BioLegend	100713
CD8	53-6.7	Extrazellulär	PE-Cy7	BioLegend	100721
CD31	MEC133	Extrazellulär	AF647	BioLegend	102515
CD45	30-F11	Extrazellulär	BV785	BioLegend	103149
IL-10RA	1B1.3a	Extrazellulär	PE	BioLegend	112706
Isotyp	RTK2071	Extrazellulär	PE	BioLegend	400408
LAG3	C9B7W	Extrazellulär	AF647	BioLegend	125241
PD-1	29F.1A12	Extrazellulär	BV421	BioLegend	135221
PD-L1	10F.9G2	Extrazellulär	BV605	BioLegend	124321
PD-L1	10F.9G2	Extrazellulär	BV711	BioLegend	124319
pSTAT3	4/P-STAT3	Intrazellulär	BV421	BD Bioscience	565416
Zellviabilität	–	Extra- bzw. Intrazellulär	AmCyan	ThermoFischer Scientific	L34966

Tabelle 8: Materialien für Tierversuche, Zellkulturen und *in vitro* Stimulation

Name	Klon	Hersteller	Bestellnummer
Interleukin-6	-	BioLegend	570802
Interleukin-10	-	PeptoTech	210-10
Interleukin-22	-	R&D Systems	582-ML-010
Maus Anti-CD3	2C11	BioLegend	100302

Maus Anti-CD28	37.51	BioLegend	102102
Maus Anti-IL-10RA	1B1	Eigene Hybridoma	-
Maus IgG1 Isotyp	MG1-45	BioLegend	401411

2.1.5 Primer und TaqMan-Sonden

Tabelle 9: Primer für die Genotypisierung

Gen	Primer	Sequenz 5' → 3'	Wildtyp Amplifikat	Mutiertes Amplifikat
<i>Cdh5^{cre+}</i> bzw. <i>Cdh5^{cre-}</i>	Cdh5-Cre Fw	GTC CAA TTT ACT GAC CGT ACA C	-	440 bp
	Cdh5-Cre Rev	CTG TCA CTT GGT CGT GGC AGC		
<i>Foxp3^{cre+}</i>	Foxp3 KI (F) 936	AGG ATG TGA GGG ACT ACC TCC TGT A	-	346 bp
	Foxp3 KI (Rev) 937	TCC TTC ACT CTG ATT CTG GCA ATT T		
<i>Foxp3^{cre-}</i>	Foxp3 wt (F)	CCT AGC CCC TAG TTC CAA CC	322 bp	-
	Foxp3 wt (Rev)	AAG GTT CCA GTG CTG TTG CT		
<i>Foxp3^{RFP}</i>	FIR1	CAA AAC CAA GAA AAG GTG GGC	692 bp	470 bp
	FIR2	GGA ATG CTC GTC AAG AAG ACA GG		
	FIR3	CAT CTT GGA GAG TCG GTG TG		
<i>Il10^{-/-}</i> bzw. <i>Il10^{+/+}</i>	IL-10fw	GCC TTC AGT ATA AAA GGG GGA CC	200 bp	450 bp
	IL-10rev	GTG GGT GCA GTT ATT GTC TTC CCG		

	IL-10neo	CCT GCG TGC AAT CCA TCT TG		
<i>Il10^{flox/flox}</i> bzw. <i>Il10^{wt/wt}</i>	IL10fl 932	CCA GCA TAG AGA GCT TGC ATT ACA	480 bp	514 bp
	IL10fl 933	GAG TCG GTT AGC AGT ATG TTG TCC AG		
<i>Il10^{GFP}</i>	IL10KOF	GTG TGT ATT GAG TCT GCT GGA C	350 bp	-
	IL10KOR1	GTG TGG CCA GCC TTA GAA TAG		
	IL10KOR2	GGT TGC CTT GAC CAT CGA TG		
	GFP-3	AAG TCG TGC TGC TTC ATG TG	-	200 bp
	GFP-5	ACG TAA ACG GCC ACA AGT TC		
<i>Il10R^{flox/flox}</i> bzw. <i>Il10ra^{wt/wt}</i>	YAK235	ACT GCT GTA TCC CCT CAT CT	160 bp	190 bp
	YAK236	GTG AGC GGA GAT TTT AAC AG		
<i>Il17^{cre+}</i> bzw. <i>Il17^{cre-}</i>	17AypfF	CAA GTG CAC CCA GCA CCA GCT GAT C	304 bp	597 bp
	17AypfRwt	CTT AGT GGG TTA GTT TCA TCA CAG C		
	17AypfCreR	GCA GCA GGG TGT AGG CAA TGC		
<i>Lysm^{cre+}</i> bzw. <i>Lysm^{cre-}</i>	LysM Wt	TA CAG TCG GCC AGG CTG AC	350 bp	700 bp
	LysM common	CTT GGG CTG CCA GAA TTT CTC		

	LysM Mut	CCC AGA AAT GCC AGA TTA CG		
<i>Rag1</i> ^{-/-} bzw. <i>Rag1</i> ^{+/+}	Rag1WTF	GAG GTT CCG CTA CGA CTC TG	474 bp	530 bp
	Rag1R	CCG GAC AAG TTT TTC ATC GT		
	Rag1MF	TGG ATG TGG AAT GTG TGC GAG		
<i>Rosa26</i> ^{flloxSTOPflloxYFP}	Rosa26 Seq1	AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT	600 bp	350 bp
	Rosa26 Seq2	GCG AAG AGT TTG TCC TCA ACC		
	Rosa26 Seq3	GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG		

2.1.6 TaqMan-Sonden

Tabelle 10: TaqMan-Sonden für die RT-PCR

Gen	TaqMan-Sonde	Hersteller
<i>I110</i>	Mm00439614_m1	ThermoFischer Scientific, Waltham USA
<i>I110ra</i>	Mm00434151_m1	ThermoFischer Scientific, Waltham USA
<i>I110rb</i>	Mm00434157_m1	ThermoFischer Scientific, Waltham USA
<i>Hprt</i>	Mm03024075_m1	ThermoFischer Scientific, Waltham USA

2.1.7 Puffer und Lösungen

Tabelle 11: Zusammensetzung für alle Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Clicks Stimulations Medium	50 ng/mL PMA, Ionomycin (1 mM), Monensin A (1x) in Clicks Medium gelöst
DMEM/IMDM	10 % FBS und 1 % Penicillin und Streptomycin
FACS Puffer	0,5 % FCS und 0,03 % Natriumazid in PBS gelöst
Fix-Puffer	4 % Formaldehyde in MACS Puffer gelöst

HGPG (100X)	59,6 g HEPES, 14,6 g L-Glutamin, 1 % Penicillin und Streptomycin, 2,5 mg Gentamicin wurde in 500 mL RPMI gelöst und mit HCl auf den pH-Wert 7,5 eingestellt
Kollagenase Lösung	10 % FBS, 1 % HGPG (100X), 1 mL 0,5 M CaCl ₂ , 1 mL 0,5 M MgCl ₂ und 100 U/mL Kollagenase wurden in 500 mL RPMI gelöst
Laemmli Puffer (5x)	8,2 % SDS, 10 % Glycerin, 5 % β-Mercaptoethanol und 0,01 % Bromphenolblau in 60 mM Tris-HCl (pH 6) gelöst
Laufpuffer	25 mM Tris, 200 mM Glycin (pH 8.3), 0.1% SDS
Lysepuffer	5,9 g HEPES, 4,4 g NaCl, 1,05 g NaF, 5 mL TritonX-100, 2 mL 0,5 M EDTA, 50 mL Glycerol in 400 mL VE-Wasser gelöst
MACS Puffer	2 mM EDTA und 1% FBS in PBS gelöst
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , in VE-Wasser gelöst und mit HCl oder NaOH auf den pH-Wert 7,4 eingestellt
Permeabilisierungspuffer	0,1 % NP40 in MACS Puffer gelöst
Proteinase K Puffer	12,1 g Tris, 10 mL 0,5 M EDTA, 11,7 g NaCl, 5 mL 20%iges SDS in 1 L VE-Wasser gelöst
SDS (20 %)	200 g SDS in 1 L VE-Wasser gelöst
Transferpuffer	292.8 g Glycine, 121.1 g Tris, ad 1L distilled H ₂ O
Vollständiges Clicks Medium	10 % FCS, 1 % L- Glutamine, 1 % Penicillin und Streptomycin als auch 1:1000 β- Mercaptoethanol in Click's Medium

2.2 Methoden

2.2.1 Genotypisierung

Genetisch veränderte Mäuse wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) genotypisiert. Dafür wurden den Mäusen Schwanz- oder Ohrbiopsien entnommen und über Nacht bei 55 °C mittels Proteinase K verdaut. Am folgenden Tag wurde das Enzym durch eine 20-minütige Inkubation bei 95 °C hitzeinaktiviert.

Die PCR Primer und die Größe der Amplikons von den entsprechenden Genen sind in den Tabellen 9 aufgelistet. Alle PCR-Produkte wurden durch Elektrophorese auf einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt. Die DNA wurde mit Ethidiumbromid angefärbt und die Banden wurden mit einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht.

2.2.2 Orthotopes Metastasenmodell (spontane Lebermetastasierung)

Nach einer Anästhesie mittels Isofluran und einer Schmerzbehandlung mittels Carprofen oder Metamizol wurde eine mediale Laparotomie durchgeführt. Anschließend erfolgte eine orthotope Injektion von 2×10^5 Krebszellen, gelöst in 50 µL Saline in das Caecum. Die chirurgischen Einschnitte wurden wieder zugenäht und mit chirurgischen Clips verschlossen. Die Tiere wurden täglich überprüft und am Ende des Experiments mittels CO₂/O₂-Gemisch und einer anschließenden 100% CO₂ Begasung euthanasiert. Das Caecum und die Leber wurden dann für weitere Analysen entnommen.

2.2.3 Lebermetastasen-Induktion (forciertes Lebermetastasenmodell)

Die Induktion von Lebermetastasen erfolgte operativ mittels Isofluran-induzierter Anästhesie und einer Schmerzbehandlung mit Carprofen oder Metamizol. Nach der lateralen Laparotomie wurde die Milz exponiert und in zwei Teile geteilt. Anschließend erfolgte eine intrasplenische Injektion von $3,5 \times 10^5$ MC38 Darmkrebszellen, gelöst in 100 µL Saline mittels einer 27-G Nadel und anschließender partiellen Splenektomie. Die chirurgischen Einschnitte wurden wieder zugenäht und mit chirurgischen Clips verschlossen. Nach 21 Tagen erfolgte die Euthanasie dieser Mäuse mit einem CO₂/O₂ Gemisch und einer anschließenden 100% CO₂ Begasung. Die Leber wurde dann für weitere Analysen entnommen.

2.2.4 Extravasationsmodell

Das Extravasationsmodell wurde analog zum Lebermetastasenmodell durchgeführt. Jedoch gab es zwei Unterschieden. Als erstes wurden Darmkrebszellen verwendet, die ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) exprimierten und als zweites wurde die Leber bereits nach einem Tag zur weiteren Analyse entnommen.

2.2.5 Sonographie

Der Nachweis einer Metastase in der Leber als auch seine Dimensionsgröße wurden *in vivo* mittels Sonographie (Vevo 3100) unter Isofluran-Narkose gemessen.

2.2.6 Koloskopie

Um den Schweregrad der Colitis bestimmen zu können, wurde eine Koloskopie durchgeführt. Die Bestimmung des Colitis-Grades (Skala 0-15) erfolgte nach Becker et. al.¹¹⁸, wobei 0 für keine Colitis steht und 15 für eine schwere Colitis. Die Koloskopie wurde unter Narkose einmal wöchentlich durchgeführt. Hierbei wurden Punkte von 0-3 nach der morphologischen Veränderung des Dickdarms vergeben. Es wurde jeweils die Colonverdickung, die Gefäßzeichnung, Fibrin, mukosale Granularität und der Stuhl nach folgendem Schema ausgewertet:

- Colonwandverdickung: 0-transparent, 1-moderat, 2-deutlich, 3-nicht transparent
- Veränderung in der Gefäßzeichnung: 0-normal, 1-moderat, 2-deutlich, 3-Blutung
- Anwesenheit von Fibrin: 0-nicht vorhanden, 1-wenig, 2-deutlich, 3-extrem
- Mukosale Granularität: 0-nicht vorhanden, 1-moderat, 2-deutlich, 3-extrem
- Stuhlqualität: 0-normal + fest, 1-noch geformt, 2-wenig geformt, 3-flüssig

2.2.7 Zellisolierung

2.2.7.1 *Lymphozytenisolierung aus der Leber*

Die Mäuse wurden wie oben beschrieben euthanasiert. Es erfolgte dann eine Leberperfusion, indem die Leber nach einem Einschnitt in den linken Herzventrikel mittels PBS-Injektion in die Pfortader und die *Vena cava inferior* perfundiert wurde. Die Gallenblase wurde entfernt, die Leber entnommen, in kleine Stücke zerteilt und dann in einem Collagenase-Puffer überführt. Nach 25 Minuten bei 37 °C und 550 RPM wurde die Leber durch ein Metallsieb weiter homogenisiert und die Zellen mit einem Percoll-Gradienten aufgetrennt. Die Osmolarität beim Percoll-Gradienten wurde durch die Zugabe eines Teils 10x PBS zu neun Teilen Percoll (v/v) eingestellt. Dieser isotonische Percoll wurde weiter in jeweils 67% und 40% verdünnt. Nach der Homogenisierung der Leber wurde die Leberprobe erstmalig pelletiert (300 x g, 10 min). Das Pellet wurde dann in 4 mL 40 % Percoll resuspendiert und auf 4 mL 67 % Percoll gegeben, sodass sich zwei Phasen bilden konnten. Der Gradient wurde dann bei 400 x g für 20 min zentrifugiert, wobei sowohl Beschleunigung als auch Bremse auf die niedrigste Stufe eingestellt wurden. Nach dieser Zentrifugation befanden sich die Lymphozyten in der Interphase. Die Lymphozyten werden entnommen und mit 1 % FBS/PBS gewaschen.

2.2.7.2 *MC38-GFP-Isolierung aus der Leber*

Die Isolierung der MC38-GFP Zellen aus dem Extravasationsmodell erfolgte analog zu oben bis zur Homogenisierung. Danach folgte eine dreifache Zentrifugation mit 40 x g für 4 min. Hierbei wurde jeweils der Überstand in ein neues Falcon überführt. Im Anschluss daran erfolgte die Pelletierung der Zellen bei 400 x g für 10 min. Dann wurden die Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und am Durchflusszytometer analysiert.

2.2.7.3 *Isolierung sinusoidaler Endothelzellen aus der Leber (LSEC)*

Die Mäuse wurden wie oben beschrieben euthanasiert. Es erfolgte dann eine Leberperfusion, indem die Leber nach einem Einschnitt in den linken Herzventrikel mittels Injektion in die Pfortader einmal mit PBS und anschließend mit 0,05% Collagenase-Puffer perfundiert wurde. Die Gallenblase wurde entfernt, die Leber

entnommen und in kleine Stücke zerteilt. Hierbei wurden zwei Lebern jeweils zusammen in ein Falcon mit Collagenase-Puffer überführt. Nach 25 Minuten bei 37 °C und 550 RPM wurden die Lebern durch ein Metallsieb (unsteriles Arbeiten) oder in einem 100 µm Zellsieb (steriles Arbeiten) weiter homogenisiert. Anschließend erfolgte eine zweifache Zentrifugation von 40 x g für 4 min, wobei der Überstand immer in ein neues Falcon überführt wurde. Anschließend wurde der Überstand bei 400 x g für 8 min komplett pelletiert. Das Pellet wurde in maximal 5 mL PBS resuspendiert und zu 2 mL Optiprep gegeben und vermischt. Darüber wurde dann 1 mL PBS vorsichtig pipettiert, sodass sich zwei Phasen bilden konnten. Anschließend wurde das Homogenisat bei 400 x g für 20 min zentrifugiert, wobei sowohl Beschleunigung als auch Bremse auf die niedrigste Stufe eingestellt wurden. Die weiße Interphase wurde in einem neuen Röhrchen gesammelt und einmal mit PBS bei 400 x g und 8 min gewaschen. Die Einzelzellsuspension wurde durch ein 40 µm Zellsieb filtriert und zentrifugiert (400 x g und 8 min). Für die spezifische Isolierung der Lebersinusoidale Endothelzellen (LSEC) wurde die magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS)-Methode verwendet (siehe unten). IMDM-Komplettmedium wurde verwendet, um die LSECs auf kollagenbeschichteten Platten bei 37 °C zu kultivieren. LSECs wurden erstmalig 24 Stunden nach Kultivierung mit PBS gewaschen und anschließend dann alle zwei Tage. Nach 3 bis 5 Tagen erlangten die LSECs ihre ursprüngliche Morphologie.

2.2.8 Magnetisch aktivierte Zellsortierungs-Methode

Die Isolierung der LSECs erfolgte nach Herstellerangaben (Miltenyi Biotech). Im Prinzip wurden die Zellen aus der Interphase in PBS gewaschen (400 x g, 8 min, 4 °C) und danach in 300 µL MACS-Puffer für 10 min bei 4 °C inkubiert, welcher einen FcR-Block (1:100) und einen anti-CD16/32 (1:100) Antikörper enthielt. Die Zellen wurden danach wieder in PBS gewaschen (400 x g, 8 min, 4 °C). Im Anschluss daran wurden die Zellen in MACS-Puffer für 10 min bei 4 °C inkubiert, der 30 µL CD146 *Microbeads* enthielt. Nach einem weiteren Waschschrift liefen die Zellen über eine MACS-LS-Säule, die an einem Magneten befestigt wurde und die nicht markierte Zellen von CD146-markierte Zellen trennte. Abschließend wurde die Säule aus dem Magneten entnommen und die CD146-positiven Zellen mit MACS-Puffer aus der

Säule gedrückt. Die Zellen wurden zentrifugiert (400 × g, RT, 8 min) und in IMDM Medium resuspendiert.

2.2.9 Stuhltransplantation/Fäkaler Mikrobiom-Transfer

Vor der Stuhltransplantation erfolgte bei den Mäusen ein vierstündiger Futterentzug. Während dieser Zeit wurde der Stuhl aus dem Darm von *Rag-/-* (*Yale*) Mäusen isoliert und in *Brain heart infusion*-Medium gelöst. Mittels einer Gavagiernadel wurden 200 µL gelöster Stuhl in die Empfängermaus transplantiert. Die Transplantation fand durch das Schlucken der Stuhlsuspension statt.

2.2.10 Durchflusszytometrie

2.2.10.1 Oberflächenfärbung

Nach der Isolierung von Lymphozyten aus den Organen wurden die Zellen gewaschen und in 100 µL PBS-Puffer (4 °C, 15 min, lichtgeschützt) gefärbt, der einen FcR-Block-Antikörper (1:100) und Fluorochrom-markierte Antikörper gegen spezifische Oberflächenproteine enthielt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, pelletiert und für die Messung in 250 µL MACS-Puffer resuspendiert.

2.2.10.2 Intrazelluläre Färbung

Nach der Isolierung der Lymphozyten erfolgte eine Stimulation der Zellen in 1 mL Clicksmedium für 4 h und 37 °C, welches Ionomycin (1 mM), Monensin A (2 uM) und Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA, 50 ng / mL) enthielt. Nach der Stimulation wurden die Zellen gewaschen, pelletiert und Oberflächenproteine wurden wie oben beschrieben gefärbt. Danach folgte eine Fixierung mit 4 % Formaldehydlösung (PFA) lichtgeschützt für 15 min bei Raumtemperatur (RT). Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Permeabilisierung mit 0,1% NP40 bei RT für 4 min. Nach einem weiteren Waschschrift wurden dann die intrazellulären Proteine in 100 µL gefärbt, entweder lichtgeschützt und über Nacht oder lichtgeschützt für 1 h bei RT. Vor den Messungen wurden die Zellen gewaschen, pelletiert und in 250 µL MACS-Puffer resuspendiert.

2.2.10.3 *pSTAT3 Färbung*

Nach Isolierung der Lymphozyten erfolgte eine Stimulation der Zellen in 1 mL Clicksmedium mit dem entsprechenden Zytokin für 15 min bei 37 °C. Nach einem Waschschrift mit 1 % FBS/PBS (350 x g für 5 min) wurden die Zellen in 4 % PFA fixiert (20 min, lichtgeschützt). Nach zwei weiteren Waschschriften wurde mit 90 % Methanol (100 % Methanol + 10 % VE-Wasser) für 30 min bei -20 °C inkubiert. Nach wiederum zwei Waschschriften erfolgte die intrazelluläre Färbung von pSTAT3 lichtgeschützt für 1 h bei RT. Letztendlich folgte nach einem weiteren Waschschrift die Resuspendierung in 200 µL 1 % FBS/PBS und anschließender Auswertung am Durchflusszytometer.

2.2.10.4 *Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS)*

Die Zellen wurden wie oben beschrieben auf Oberflächenmarker gefärbt und durch ein 40 µL Zellsieb filtriert. Die Zellsortierung wurde an einer BD FACSAria-Fusion durchgeführt und die Zellen wurden in einem Röhrchen sortiert, das kaltes vollständiges Medium enthielt. Die Reinheit der sortierten Zellen lag routinemäßig über 99 %.

2.2.10.5 *Datenerfassung und -analyse*

Die Proben wurden im LSR II Fortessa Durchflusszytometer und vorläufig mit der FACS Diva-Software analysiert. Die endgültige Datenanalyse wurde mit der FlowJo-Analysesoftware durchgeführt.

2.2.11 **Western blot**

2.2.11.1 *Zellyse und Bestimmung der Proteinkonzentration*

Die Zellen wurden mit einem Lyse-Puffer lysiert und mit einem Zellschaber von der Zellkulturplatte abgekratzt. Es erfolgte eine Zentrifugation des Lysats bei 14.000 g für 5 min. Der Überstand wurde in ein neues Reagenzgefäß überführt und die Proteinkonzentration wurde mit dem NanoDrop bestimmt. Die Proteinmessung erfolgte mit einem Extinktionskoeffizienten von 1 Abs = 1 mg/mL, wobei VE-Wasser als Referenzwert eingestellt wurde. Es wurden Zweifachbestimmungen mit jeweils 2 µL Probenvolumen durchgeführt.

2.2.11.2 *Proteinelektrophorese (10% SDS-PAGE)*

Die Proteine wurden durch Verdünnung mit VE-Wasser und Laemmli-Puffer auf 60 µg pro Probe eigestellt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Danach wurden die Proteinproben auf einer 10% Tris/Glycin/Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) aufgetrennt. Hierfür wurde die Gelkammer zunächst mit dem Laufpuffer gefüllt, Proben wurden in die Gelvertiefungen pipettiert und die Elektrophorese wurde erstmalig für 10 min bei 80 V und anschließend bei 120 V für weitere 30 min durchgeführt.

2.2.11.3 *Proteintransfer und Nachweis*

Nach der Proteinelektrophorese auf der SDS-PAGE wurden die Proteine mittels der Wet-Blot Elektrophorese vom Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Hierfür wurde die Membran zunächst mit Methanol und anschließend mit dem Transferpuffer für 5 min äquilibriert. Das Filter-Membran-Gel Sandwich wurde sorgfältig in einer kleinen Schüssel zusammengesetzt. Mit einem Falcon wurden die Luftbläschen zwischen Membran und Gel durch vorsichtiges Aufdrücken entfernt. In einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer wurde dieses Membran-Gel Sandwich dann komplett eingetaucht. Danach erfolgte die Elektrophorese bei 400 mA. Nach 60 min wurde die geblottete Membran mit Blockierungspuffer (5% Milchpulver in 0,05 % PBS-Tween) bei RT für 1 h mit 350 U/min inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit der Antikörperlösung (s. Tabelle 6) über Nacht bei 4 °C mit ebenfalls 350 U/min. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 Mal für 5 min und 350 U/min mit PBS-T gewaschen und dann mit einem *Horseradish Peroxidase* (HRP)-konjugierten Antikörper für 1 h bei RT und 350 U/min inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschen wurde der Blot mit einem chemilumineszierenden HRP-Substrat für 5 min inkubiert, bevor dieser dann auf einen Röntgenfilm abgelichtet wurde. Der Film wurde abschließend durch einen Entwickler geführt und die Proteinleiter wurde sorgfältig auf dem Film markiert.

2.2.12 Quantitative PCR (qPCR)

2.2.12.1 RNA-Isolierung

Zur RNA-Isolierung wurde Trizol nach Anweisungen des Herstellers verwendet. Hierbei wurden 1 mL Trizol FL 5 Minuten bei RT zu den Zellen aus der Zellkultur gegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein Reagenzgefäß überführt, das 200 µL Chloroform enthielt. Das Reagenzgefäß wurde für mindestens 30 Sekunden lang gevortext und anschließend 10 Minuten lang bei RT inkubiert. Erfolgte die RNA-Isolierung aus dem Gewebe wurde ein 5 mm x 5 mm messendes Stück abgeschnitten und in einem Reagenzgefäß mit kleinen Glaskügelchen versetzt. Dann wurde zu dieser Gewebsprobe Trizol gegeben und in einem Shaker geschüttelt. Im Anschluss erfolgte ebenfalls eine 10-minütige Inkubation bei RT. Die Proben wurden 15 Minuten bei 4 °C und 12.000 × g zentrifugiert. Das Gemisch trennte sich daraufhin in eine untere Phenol-Chloroform-Phase und eine obere wässrige Phase. Die wässrige Phase (ca. 500 µL) enthielt die RNA, welche in ein neues Reagenzgefäß überführt wurde, in welches bereits 500 µL Isopropanol vorpipettiert wurde. Anschließend folgte eine Inkubation über Nacht bei -20 °C. Am nächsten Tag wurde die RNA pelletiert (12.000 × g, 30 min, 4 °C). Das RNA-Pellet wurde mit 700 µL 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (12.000 × g, 30 min, 4 °C). Danach wurde das Pellet für ca. 1 h bei RT luftgetrocknet und danach in RNase-freiem Wasser (15 bis 30 µL) resuspendiert. Entweder wurden die Proben bei -80 °C weiter gelagert oder direkt für die komplementäre DNA (cDNA)-Synthese verwendet.

2.2.12.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde die RNA-Konzentration auf 500 ng/µL eingestellt. Im Anschluss wurde 1 µL RNA in einen PCR-Mix pipettiert, der eine reverse Transkriptase enthielt. Das Gemisch wurde für 10 min bei 25 °C inkubiert und es folgte eine 5-minütige Hitzeinaktivierung bei 85 °C. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert oder die quantitative PCR (qPCR) wurde direkt im Anschluss durchgeführt.

2.2.12.3 *qPCR in Echtzeit*

Bei der qPCR erfolgte eine PCR in Echtzeit. Hierbei wurden spezifische Reportersonden, sogenannte TaqMan-Sonden, verwendet. Die angewendeten Sonden sind in Tabelle 10 aufgelistet. Der Amplifikationsansatz wurde in eine Platte mit 96 Vertiefungen pipettiert. Die PCR startete bei 50 °C für 2 min. Die Proben wurden dann für 10 min auf 95 °C erhitzt. Anschließend folgte ein 40-maliger Zyklus am Gerät mit jeweils 15 Sekunden auf 95 °C und 1 min bei 60 °C. Der Ct-Wert (*Cycler of threshold*) wurde mittels der *Fit-Point* Methode definiert. Auf Grundlage der relativen Quantifizierung wurde das Ergebnis mittels der ΔCt Formel ($2^{\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{Zielgen}} - \text{Ct}_{\text{Referenzgen}}}$) berechnet. Dabei wurden alle Ergebnisse auf das Haushaltsgen *Hprt* normalisiert.

3 Ergebnisse

3.1 IL-10 beeinflusst maßgeblich das Wachstum und die Lebermetastasierung von Darmkrebszellen

3.1.1 Die Funktion von IL-10 beim Darmkrebs

Der Einfluss von IL-10 auf die Karzinogenese und auf das Tumorwachstum ist bereits in verschiedensten Krebsmodellen beschrieben worden^{94,95}. Daher wurde zuerst untersucht, welche Funktion IL-10 in dem orthotopen Caecum-Modell (CRC-Modell) besitzt. Hierfür wurden den Wildtyp (Wt) Mäusen und den IL-10-defizienten Mäusen (*Il10*^{-/-}) Darmkrebszellen in das Caecum injiziert (s. Abb. 3A). Als primärer Endpunkt wurde das Gesamtüberleben bestimmt (s. Abb. 3B). Es wurde beobachtet, dass *Il10*^{-/-} Mäuse eine niedrigere Überlebensrate besitzen und ein verstärktes Tumorwachstum aufweisen (s. Abb. 3C). Diese Daten weisen somit auf eine protektive Eigenschaft von IL-10 auf die Entstehung bzw. auf das Wachstum von Darmkrebstumoren hin.

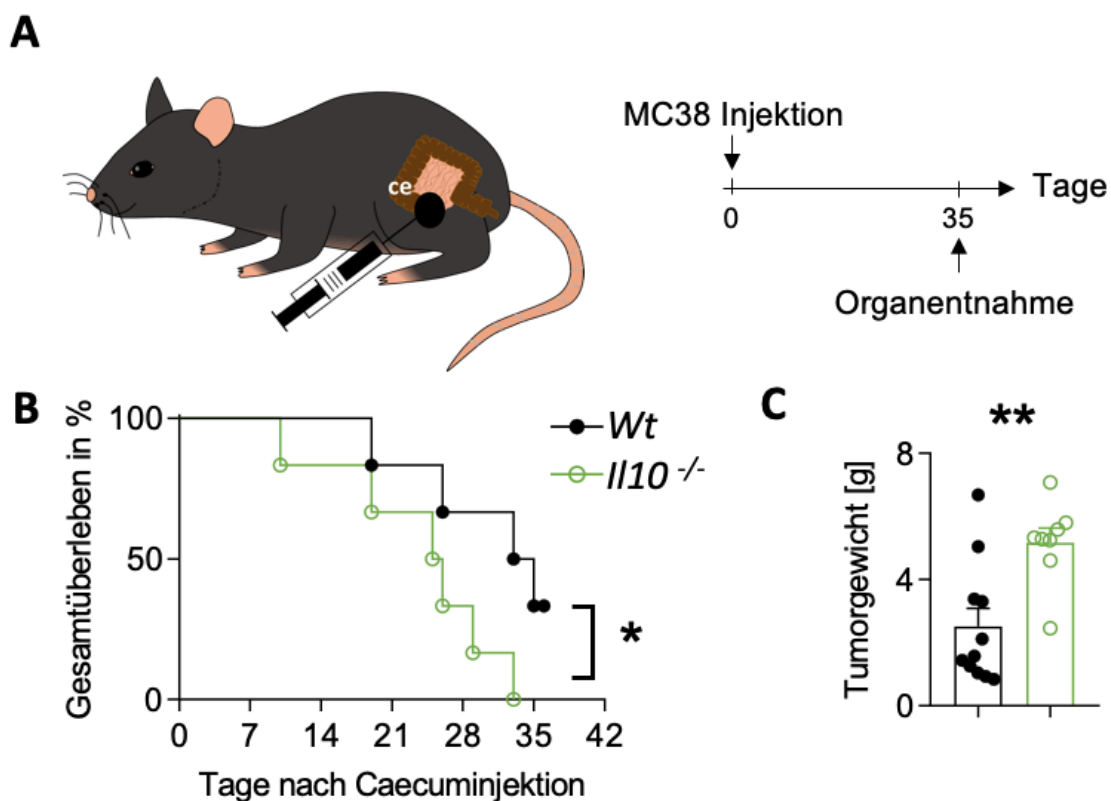


Abbildung 3: IL-10 blockiert das Tumorwachstum. (A) MC38-Darmkrebszellen wurden orthotop in das Caecum von Wildtyp- oder in *Il10*^{-/-} Mäuse injiziert. (B) Das Gesamtüberleben der Mäuse. (C) Tumorgewicht nach der Caecum-Injektion. Die Daten wurden mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Als nicht signifikant (ns) gilt der p -Wert $> 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p \leq 0,01$, der durch den Mantel-Cox-Test und Mann-Whitney-U-Test berechnet wurde.

3.1.2 Die Funktion von IL-10 bei der Lebermetastasierung von Darmkrebszellen

Frühere Arbeiten haben bereits gezeigt, dass eine IL-10-Therapie bei Melanomen, Lungenkrebs, Brustkrebs oder anderen Primärtumoren eine protektive Wirkung aufweist^{96–98}. Jedoch wurde der Einfluss von IL-10 auf die Metastasierung nicht vollständig aufgeklärt. Von Mumm *et al.* wurde nur beschrieben, dass in den orthotopen Tumormodellen die geringe Überlebensrate in den *Il10*^{-/-} Mäusen mit mehr Metastasen korrelierte, diese Daten wurden jedoch nie veröffentlicht⁹⁴. Zwar wurde wenige Monate später postuliert, dass IL-10 vor Lungenmetastasen schützt, jedoch fehlen weitläufige Erkenntnisse wie IL-10 die Metastasierung in diesem Modell reguliert^{94,95}. Ebenfalls ist die Leber beim CRC häufiger von Metastasen betroffen als die Lunge¹¹⁹. Daher galt die Aufgabe, den Einfluss von IL-10 auf die Lebermetastasierung zu untersuchen. Hierfür wurde das forcierte Lebermetastasenmodell verwendet (s. Abb. 4A). Bei diesem Modell hatte der Genotyp der Mäuse keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben (s. Abb. 4B). Um *in vivo* das Maß an Lebermetastasen zu veranschaulichen, wurde eine Ultraschalluntersuchung der Leber durchgeführt (s. Abb. 4C). Es zeigte sich hier, dass die Leber von *Il10*^{-/-} Mäusen deutlich kleinere bzw. weniger Metastasen aufwies als die Wildtyp-Kontrolle. Für die quantitative Analyse wurde nach dem Experiment die Leber entnommen. Anschließend wurde das Gewicht der Leber bestimmt und die Anzahl der Metastasen auf der Leberoberfläche quantifiziert (s. Abb. 4D). Überraschenderweise stellte sich heraus, dass die Lebern von *Il10*^{-/-} Mäusen deutlich leichter sind und weniger Metastasen aufweisen als von Wildtyp-Kontrollen (s. Abb. 4D). Daraus folgt, dass IL-10 die Lebermetastasierung fördert und somit einen schädlichen Effekt aufweist.

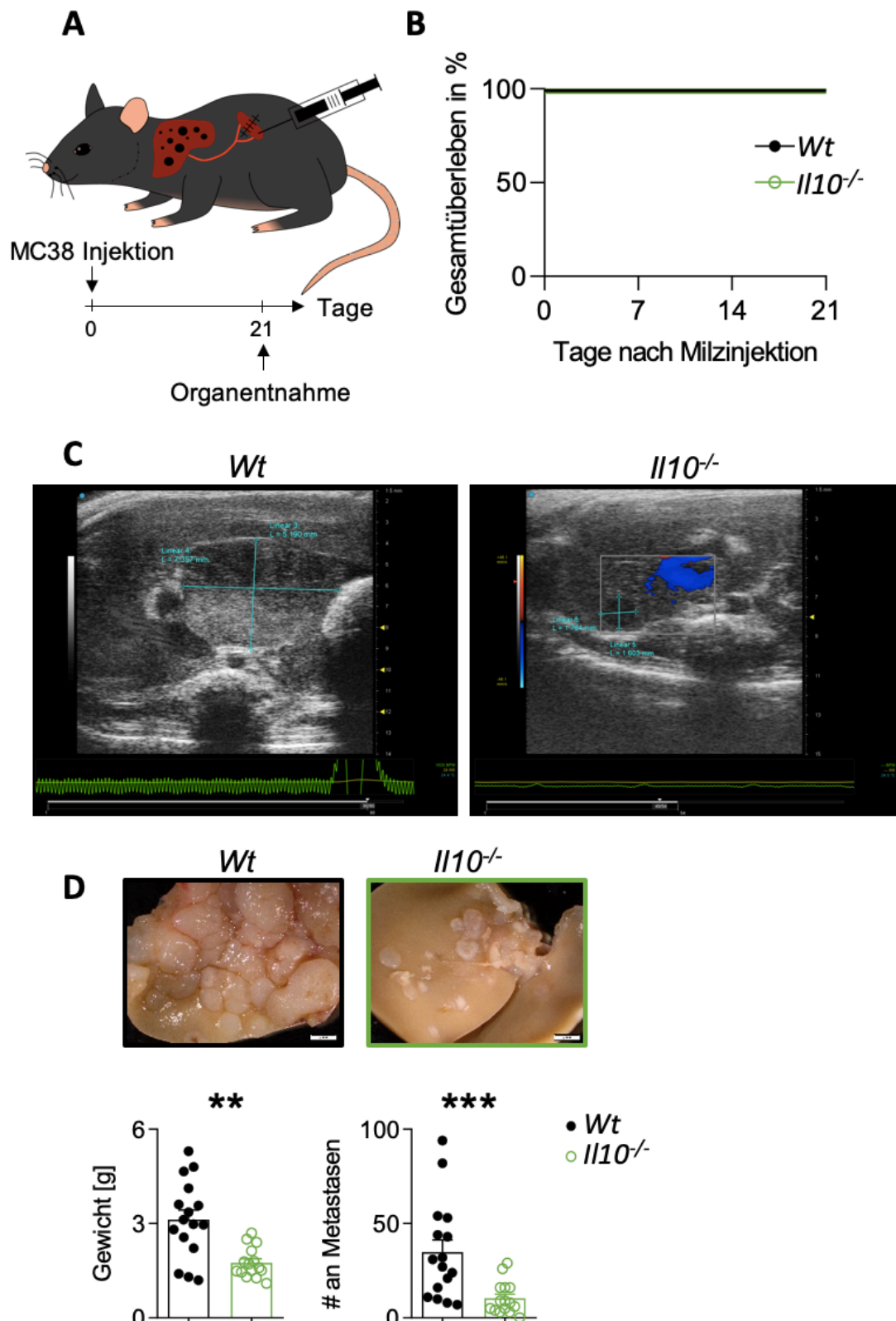


Abbildung 4: IL-10 beeinflusst die Lebermetastasierung. (A) MC38-Darmkrebszellen wurden intrasplenisch in Wildtyp (*Wt*) und in *Il10^{-/-}* Mäuse injiziert. (B) Das Gesamtüberleben der Mäuse. (C) Ultraschall-Bildgebung. (D) Repräsentative Bilder, einschließlich des Lebergewichts und der Anzahl an Lebermetastasen. Die Daten wurden mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Als nicht signifikant (ns) gilt der p -Wert $> 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p < 0,001$, der durch den Mann-Whitney-U-Test berechnet wurde.

3.1.3 Der Effekt von IL-10 bei der spontanen Metastasierung

In Abbildung 3 wurde der protektive Effekt von IL-10 auf den Primärtumor dargestellt. In Abbildung 4 ist dagegen der pathogene Effekt von IL-10 bei der forcierten Metastasierung zu sehen. Bei dem forcierten Modell werden einige Schritte der Metastasierungskaskade übersprungen, wie z.B. die Migration und die Intravasation. Dadurch spiegelt dieses Modell nicht den kompletten Krankheitsverlauf wieder, weswegen eine spontane Metastasierung ein aussagekräftigeres Modell darstellen würde. Bedauerlicherweise entwickelten die *Il10*^{-/-} Mäuse nach der Injektion von MC38-Darmkrebszellen in das Caecum einen größeren Primärtumor, der zur vorzeitigen Erfüllung der klar definierten Abbruchkriterien führte, sodass während dieses frühen Zeitpunktes in der Leber keine Metastasen sichtbar waren. Das war einer der Hauptgründe, weswegen bei diesem spontanen Metastasenmodell Lewis Lung Carcinoma (LLC)-Zellen verwendet wurden (s. Abb. 5A). Das Wachstum des Primärtumors wird in diesem Organ nicht durch eine IL-10-Defizienz beeinflusst (s. Abb. 5B).

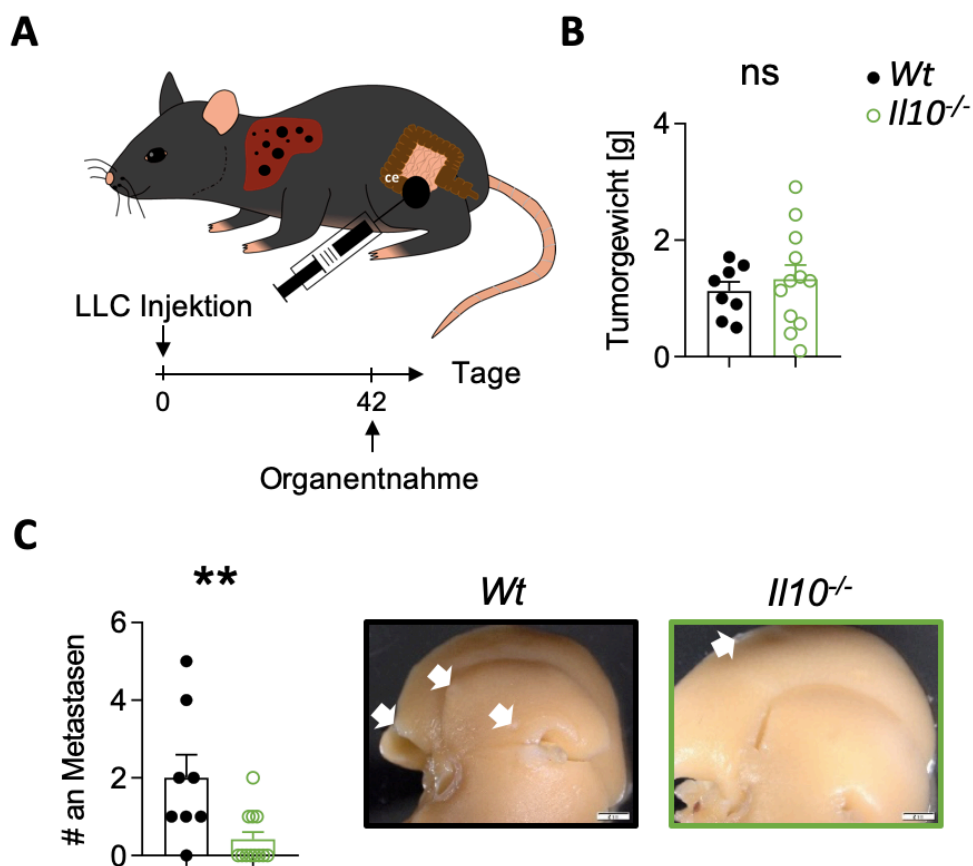


Abbildung 5: IL-10 fördert die spontane Metastasierung in die Leber. (A) LLC-Krebszellen wurden orthotop in das Caecum von Wildtyp (*Wt*) und in *Il10*^{-/-} Mäuse injiziert. (B) Tumorgewicht nach der Caecum-Injektion. (C) Repräsentative Bilder, einschließlich der Anzahl an

Lebermetastasen. Die Daten wurden mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Als nicht signifikant (ns) gilt der p -Wert $> 0,05$; **: $p \leq 0,01$, der durch den Mann-Whitney-U-Test berechnet wurde.

Durch die längere Haltung der Mäuse konnten nach einiger Zeit kleine makroskopische Metastasen detektiert werden, die quantifiziert wurden (s. Abb. 5C). Da hier $Il10^{-/-}$ Mäuse wieder deutlich weniger Lebermetastasen entwickeln als die Wildtyp-Kontrolle, folgt daraus, dass IL-10 auch im spontanen Modell die Metastasierung fördert.

3.1.4 Der Einfluss des Mikrobioms auf die Lebermetastasierung

Die Wildtyp-Mauslinie als auch die $Il10^{-/-}$ Mauslinie sind separate Linien, die in getrennten Käfigen gehalten werden. Bei unseren Experimenten hätte sich somit ein nicht-genetischer Faktor eingeschleust haben können, der die Lebermetastasierung beeinflusst. Dieser nicht-genetische Einfluss ist das Mikrobiom. Es wird angenommen, dass beim Menschen unterschiedliche genetische Veranlagungen, aber auch Umwelteinflüsse zu einer veränderten Darmflora führen, die dann z.B. in eine Dysbiose übergehen kann. Diese Dysbiose beeinflusst die Karzinogenese im Darm¹²⁰. Weiterhin wird auch die Leber durch ihre Funktion als Stoffwechselorgan von den aus dem Darm stammenden mikrobiellen Produkten beeinflusst. Es könnte somit möglich sein, dass der vermeintlich genetische Effekt in der $Il10^{-/-}$ Linie aus den Abbildungen 4 und 5 nur durch ein verändertes Mikrobiom hervorgerufen wird. Um diesen Verdacht auszuschließen, wurde die forcierte Lebermetastasierung in Wurfgeschwistern durchgeführt (s. Abb. 6A), die in den Käfigen gemischt gehalten wurden ($Il10^{+/+}$ bzw. $Il10^{-/-}$).

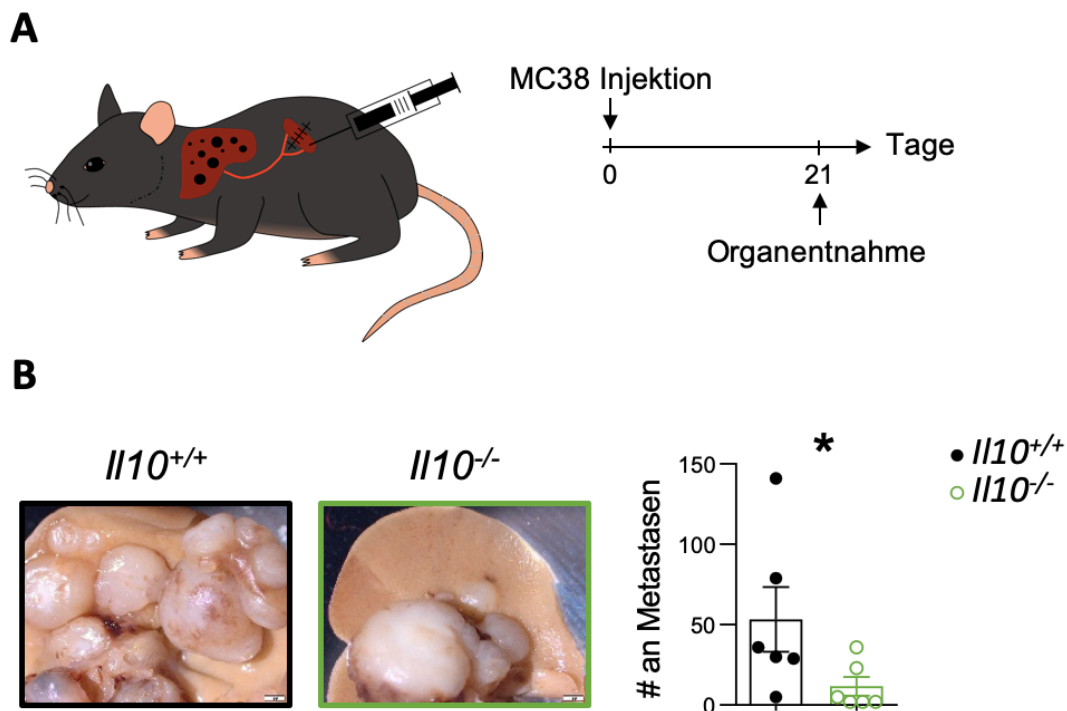


Abbildung 6: Der genetische KO beeinflusst die Metastasierung. (A) MC38-Darmkrebszellen wurden intrasplenisch in Wurfgeschwister (*Il10^{+/+}* bzw. *Il10^{-/-}*) Mäuse injiziert. (B) Repräsentative Bilder, einschließlich der Anzahl an Lebermetastasen. Die Daten wurden mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Als signifikant (*) gilt der p -Wert $> 0,05$; *: $p < 0,05$, der durch den Mann-Whitney-U-Test berechnet wurde.

Hier ist deutlich erkennbar, dass die Lebermetastasierung in der *Il10^{-/-}* Linie vom genetischen KO beeinflusst wird (s. Abb. 6B).

3.2 Der Effekt einer Colitis auf die Lebermetastasierung

Da in den vorherigen Abbildungen ein pathogener Effekt von IL-10 bei der Metastasierung festzustellen war, stellte sich die Frage nach der Ursache für diesen Effekt. Die Leber und der Darm stehen in einem engen Kontakt miteinander und kommunizieren über das portal-venöse System und über den Gallentrakt miteinander. Die Literatur weist darauf hin, dass *Il10^{-/-}* Mäuse anfälliger für eine spontane Colitis sind^{72,74}. Daher wurde bei den Wildtyp- und den *Il10^{-/-}* Mäusen als auch bei den Wurfgeschwister *Il10^{+/+}* bzw. *Il10^{-/-}* eine Koloskopie im forcierten Metastasenmodell durchgeführt (s. Abb. 7). Es galt hier zu überprüfen, ob die Mäuse während des forcierten Lebermetastasenmodells eine Colitis entwickeln.

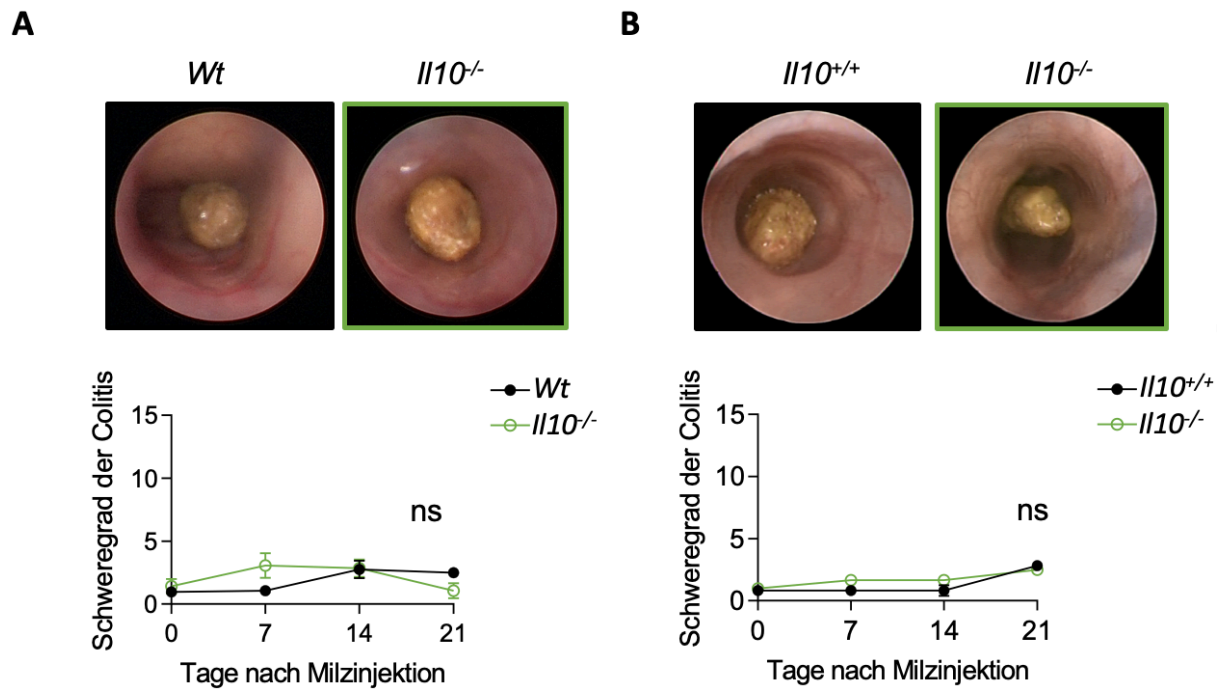


Abbildung 7: IL-10-defiziente Mäuse entwickeln keine spontane Colitis. MC38-Darmkrebszellen wurden intrasplenisch in (A) Wildtyp (*Wt*) und in *Il10^{-/-}* Mäuse bzw. (B) in Wurfgeschwister (*Il10^{+/+}* bzw. *Il10^{-/-}*) injiziert. Es sind repräsentative Bilder und der Schweregrad der Colitis dargestellt. Als nicht signifikant (ns) gilt der *p*-Wert > 0,05, der durch den mixed two-way ANOVA Test berechnet wurde.

Hier zeigte sich jedoch, dass die Mäuse während der gesamten Zeit keine Colitis entwickelten. Daher entstand die Überlegung, den Mäusen ein colitogenes Mikrobiom zu verabreichen, um die Entstehung einer Colitis zu fördern. Hierfür wurde den Mäusen das Mikrobiom von *Rag^{-/-}* Mäusen, die ohne Embryotransfer von der Yale Universität importiert wurden (*Rag^{-/-}(Yale)*) übertragen. Diese Mäuse besitzen Pathobioten, die eine Colitis begünstigen¹²¹. Hierfür wurden 4 Wochen alten Wildtyp und *Il10^{-/-}* Mäusen das Mikrobiom der *Rag^{-/-}(Yale)* Mäuse oral verabreicht und alle Mäuse wurden wöchentlich koloskopiert (s. Abb. 8A und B). Nach 6 weiteren Wochen wurde das forcierte Lebermetastasenmodell angewendet und nach drei weiteren Wochen wurden die Lebermetastasen quantifiziert (s. Abb. 8C).

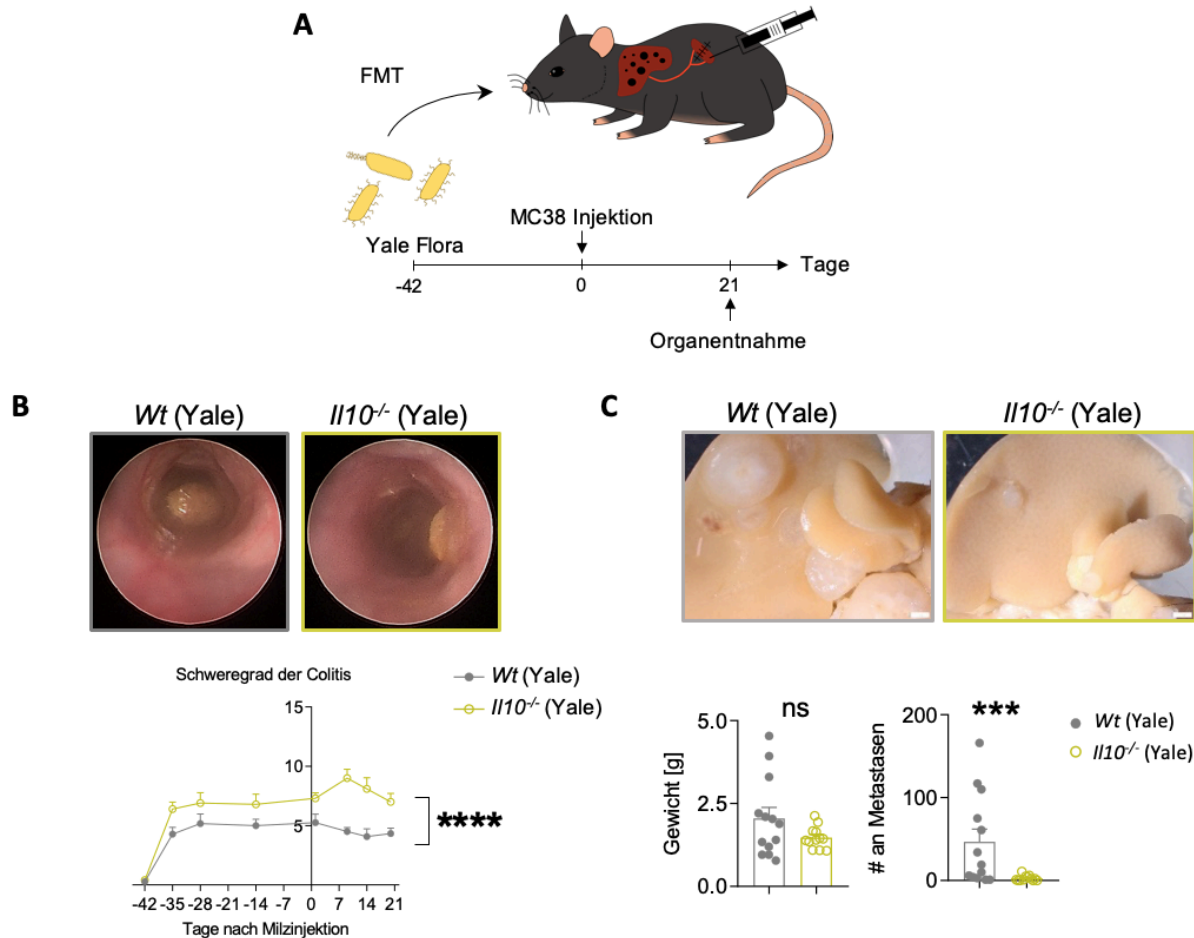


Abbildung 8: IL-10 defiziente Tiere sind auch während einer Colitis von der Lebermetastasierung geschützt. (A) Nach einem fäkalen Mikrobiom-Transfer (FMT) mit der Yale-Flora und einer Inkubationszeit von 6 Wochen wurden MC38-Darmkrebszellen intrasplenisch in Wildtyp (Wt) und *Il10*^{-/-} Mäuse injiziert. (B) Darstellung des jeweiligen Schweregrads der Colitis sowie repräsentative Bilder von (A). (C) Repräsentative Bilder, einschließlich des Lebergewichts und der Anzahl an Lebermetastasen 21 Tage nach Milzinjektion. Die Daten wurden mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Als nicht signifikant (ns) gilt der p -Wert $> 0,05$; ***: $p \leq 0,001$; ****: $p < 0,0001$, der durch den mixed two-way ANOVA Test und Mann-Whitney-U-Test berechnet wurde.

Es zeigt sich hier, dass durch das Übertragen der *Rag*^{-/-}(Yale)-Flora neben den *Il10*^{-/-} Mäusen auch die Wildtyp-Mäuse eine Colitis entwickeln. Die Colitis ist jedoch bei den Wildtyp-Kontrollen deutlich milder als bei den *Il10*^{-/-} Mäusen. Jedoch zeigte die Induktion von Lebermetastasen, dass *Il10*^{-/-} Mäuse weiterhin geschützt sind. Folglich sind IL-10 defiziente Tiere unabhängig von einer begleitenden Colitis vor der Lebermetastasierung geschützt.

3.3 Die Quelle von IL-10 bei der Lebermetastasierung

Bisher konnte gezeigt werden, dass IL-10 die Metastasierung von Darmkrebszellen und Lungenkrebszellen in die Leber fördert. Es stellte sich daher die weiterführende Frage, welche Zelle IL-10 in der Leber produziert und ob diese IL-10-produzierende Zelle relevant für die Metastasierung ist.

3.3.1 Hämatopoetische Zellen exprimieren IL-10

In einem ersten Schritt wurde untersucht, welche Zellen in der gesunden Leber IL-10 produzieren können. Hierfür wurde eine transgene *Il10^{eGFP}Foxp3^{RFP}*-Reportermaus verwendet, um die Expression von IL-10 in hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen zu untersuchen (s. Abb. 9).

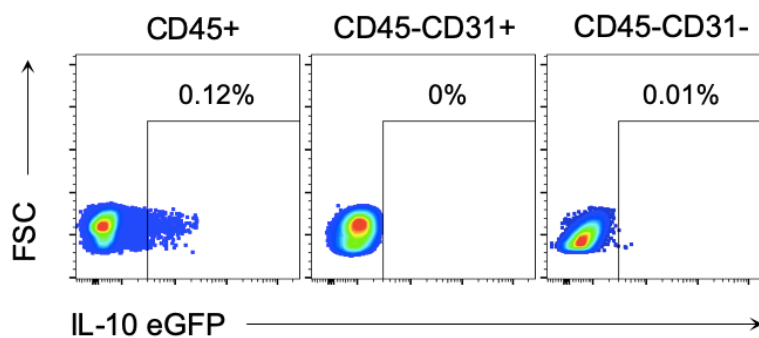


Abbildung 9: Nur hämatopoetische Zellen exprimieren IL-10. Durchflusszytometrische Analyse einer gesunden Leber. Es wird die IL-10 Expression in verschiedenen Zellpopulationen in der Leber dargestellt. Die hämatopoetischen Zellen wurden mit dem CD45 markierten Antikörper detektiert, während bei den nicht-hämatopoetischen Zellen zwischen LSECs (CD45-CD31+) und restlichen Zellen (CD45-CD31-) unterschieden wurde.

Hier wird deutlich erkennbar, dass in einer gesunden Mausleber IL-10 fast ausschließlich von hämatopoetischen Zellen stammen kann, da die nicht-hämatopoetischen Zellen kein signifikantes IL-10 produzieren.

3.3.2 Tregs produzieren hauptsächlich IL-10 in Lebermetastasen

Da IL-10 nur von den Leukozyten in der Leber produziert wird, wurde genauer untersucht, welche spezifische Zellpopulation IL-10 exprimiert und inwieweit sich diese Quelle von IL-10 bei der Lebermetastasierung ändert. Frühere Arbeiten haben gezeigt,

dass verschiedene Zelltypen, darunter Foxp3⁺ Tregs, Tr1-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und DCs IL-10 produzieren können⁶⁴. Die Quelle von IL-10 während der Metastasierung ist immer noch unbekannt. Um diese Quelle zu bestimmen, wurde überprüft, ob T-Zellen oder Zellen des angeborenen Immunsystems die Produktion von IL-10 während der Metastasierung hochregulieren. Hierfür wurden sowohl gesunde Mauslebern als auch Lebern mit Metastasen von transgenen *Il10^{eGFP}Foxp3^{RFP}*-Reportertermäusen mithilfe des Durchflusszytometers untersucht (s. Abb. 10). Es ist hier erkennbar, dass T-Zellen IL-10 signifikant hochregulieren. Innerhalb der Population der T-Zellen regulieren hauptsächlich CD4⁺ T-Zellen und nicht CD8⁺ die IL-10-Produktion herauf (s. Abb. 10A und B).

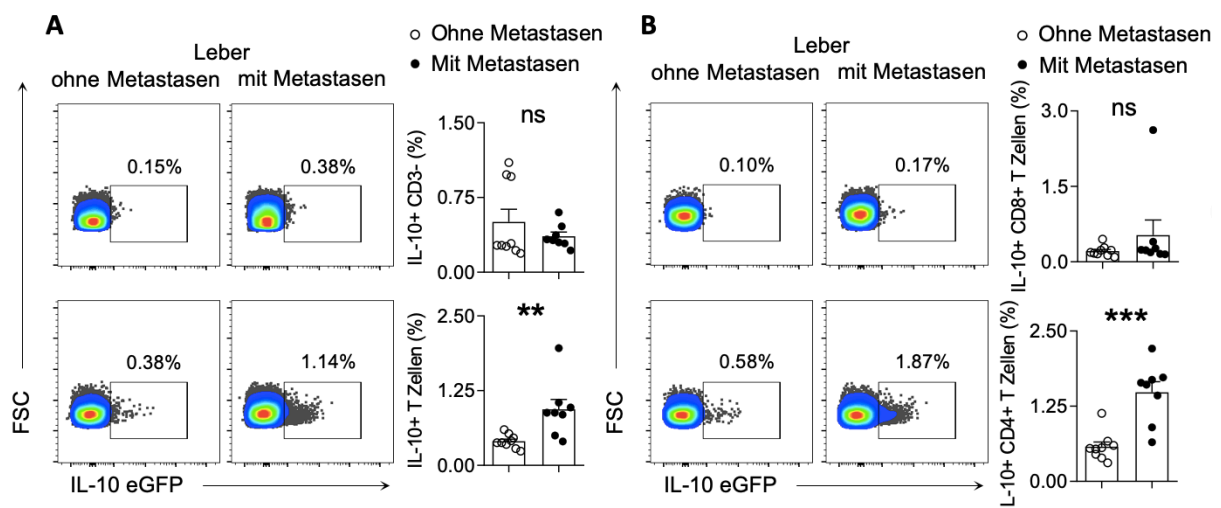


Abbildung 10: CD4⁺ T-Zellen regulieren die IL-10 Expression während der Lebermetastasierung hoch. Die IL-10 Expression einer gesunden Leber im Vergleich zu einer mit Metastasen. Hierfür wurden MC38-Darmkrebszellen intrasplenisch in *Il10^{eGFP}Foxp3^{RFP}*-Reportertermäuse injiziert und anschließend die Zytokinexpression am Durchflusszytometer nach 21 Tagen analysiert. (A) IL-10 Expression in den CD3 negativen Fraktionen (oberer Teil) als auch in den T-Zellen (unterer Teil) (B) IL-10 Expression in den CD8⁺ T-Zellen (oberer Teil) als auch in den CD4⁺ T-Zellen (unterer Teil). Die Daten wurden mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Als nicht signifikant (ns) gilt der *p*-Wert > 0,05; *: *p* < 0,05; **: *p* ≤ 0,01; ***: *p* < 0,001, der durch den Mann-Whitney-U-Test berechnet wurde.

Die Hochregulation von IL-10 in den CD4⁺ T-Zellen lässt leider keine Rückschlüsse auf die Hauptproduzenten von IL-10 während der Metastasierung zu. Daher wurde in einem neuen Ansatz ein Gate auf die IL-10-produzierenden Leukozyten (CD45+IL-10+) gesetzt. Anschließend wurde der prozentuelle Anteil der jeweiligen

Population (CD3-, CD8+ T-Zellen, CD4+Foxp3- T-Zellen, CD4+Foxp3+ T-Zellen und der Rest) aus diesem Gate ausgerechnet und graphisch dargestellt (s. Abb. 11).

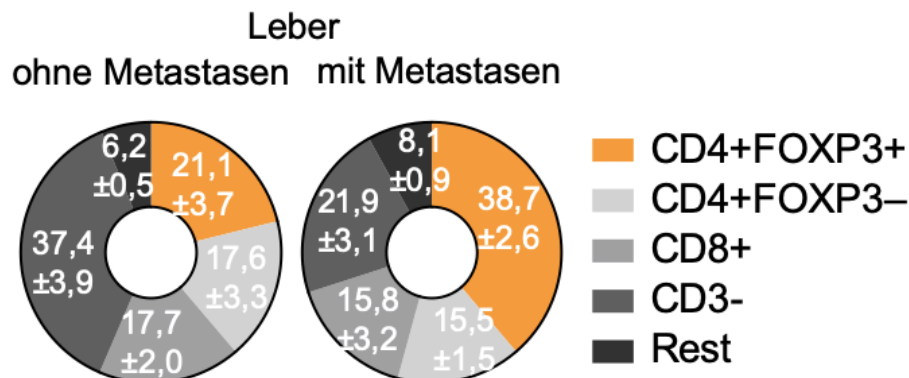


Abbildung 11: IL-10 wird während der Lebermetastasierung hauptsächlich von Tregs produziert. Allgemeine Verteilung aller IL-10 produzierenden Leukozyten in einer gesunden Leber im Vergleich zu Lebergewebe mit Metastasen (21 Tage nach MC38-Milzinjektion). Die Daten wurden mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

Hierbei stellte sich heraus, dass IL-10 während der Lebermetastasierung hauptsächlich von CD4+Foxp3+ T-Zellen stammt, den sogenannten Tregs (s. Abb. 11). Mittels einer neuen Analyse sollte nochmals verifiziert werden, welche Zelle IL-10 produziert. Hierfür wurde das tSNE (*t-distributed stochastic neighbor embedding*) Tool in der Flowjo Software angewendet. tSNE besitzt den Vorteil, dass die Daten bei einer FACS-Analyse mit vielen Parametern in einer tSNE-Karte vereinfacht und vor allem unvoreingenommen dargestellt werden können. Daher ist im Folgenden exemplarisch eine Leber mit Metastasen aus der *Il10^{eGFP}Foxp3^{RFP}*-Reportermaus dargestellt (s. Abb. 12).

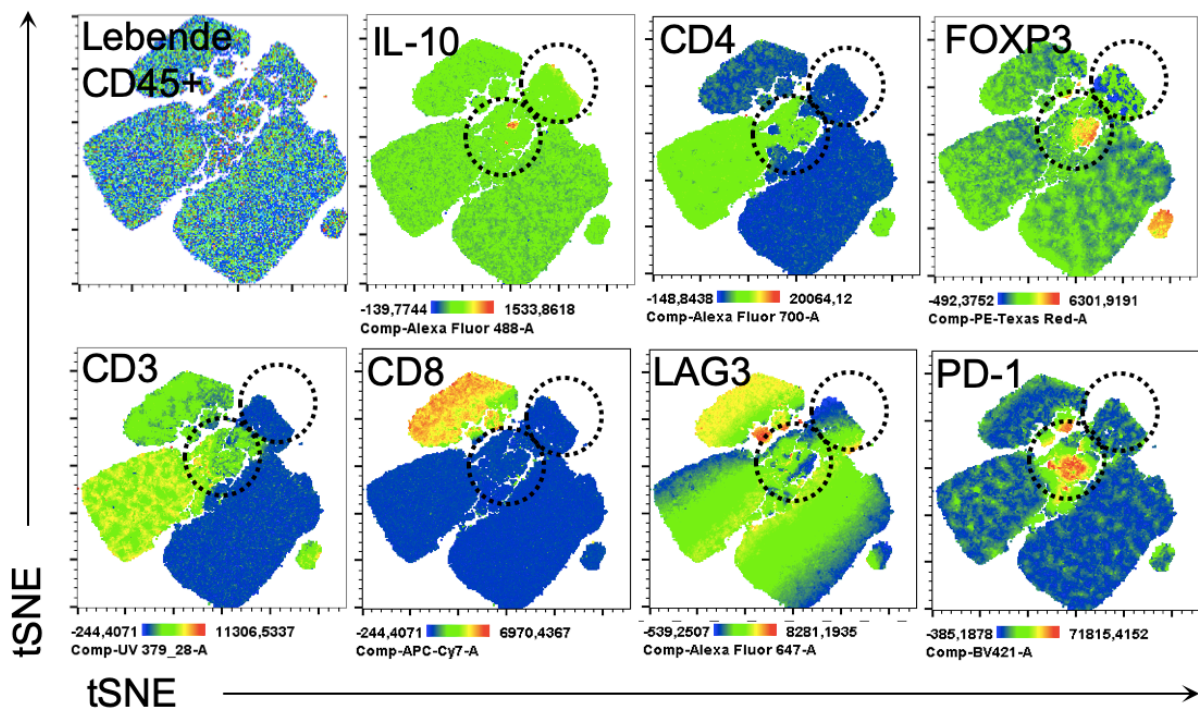


Abbildung 12: tSNE-Karte von lebenden Leukozyten aus der Leber mit Metastasen. tSNE-Analyse einer Leber mit Metastasen (21 Tage nach MC38-Injektion) mit dem Flowjo-Programm. Die verschiedenen Plots zeigen die Expression der gefärbten Proteine einschließlich der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (MFI). Die gepunkteten Kreise weisen auf die Populationen mit der stärksten Expression von IL-10, gemessen an der Höhe des MFI, hin.

In Abbildung 12 zeigt sich eine Expression von IL-10 in aktivierten Tregs (CD4+ FOXP3+PD-1+) und in CD3 negativen Zellen, nicht jedoch in CD4+ FOXP3+PD-1 negativen Treg Zellen. Diese Analysen machen deutlich, dass IL-10 von unterschiedlichen Zellen während der Metastasierung produziert werden kann, jedoch quantitativ hauptsächlich von Tregs stammt.

3.3.3 IL-10 produzierende Tregs tragen *in vivo* zur Lebermetastasierung bei

Wie oben festgestellt, stellen Tregs die Hauptproduzenten von IL-10 während der Metastasierung dar. Um die funktionelle Relevanz dieser Feststellung zu testen, wurde das forcierte Modell der Lebermetastasierung in Wildtyp-Mäusen (*Il10^{wt/wt} Foxp3^{cre+}*) und in Mäusen verwendet, in denen Tregs kein IL-10 produzieren können, da sie hauptsächlich FOXP3 exprimieren (*Il10^{flox/flox} Foxp3^{cre+}*) (s. Abb. 13).

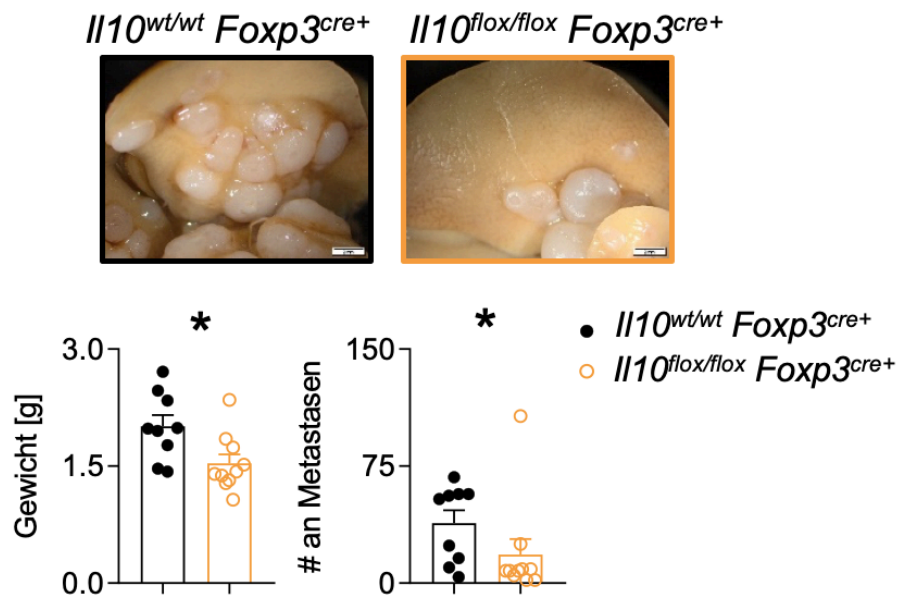


Abbildung 13: IL-10 von Tregs trägt *in vivo* maßgeblich zur Lebermetastasierung bei. MC38-Darmkrebszellen wurden intrasplenisch in Wildtyp Mäuse ($Il10^{wt/wt} Foxp3^{cre+}$) und in konditionelle Mäuse injiziert, in denen Tregs kein IL-10 produzieren können ($Il10^{flox/flox} Foxp3^{cre+}$). Nach 21 Tagen wurde die Leber entnommen, das Gewicht der Leber bestimmt und die Lebermetastasen quantifiziert. Ein repräsentatives Bild ist hier abgebildet. Die Daten wurden mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Als signifikant (*) gilt der p -Wert $<0,05$, der durch den Mann-Whitney-U-Test berechnet wurde.

Mäuse mit fehlender IL-10 Produktion in FOXP3-positiven Zellen waren vor der Lebermetastasierung geschützt (s. Abb. 13). Die tSNE analyse deutete darauf hin, dass auch in der CD3-negativen Population eine IL-10 Expression vorliegt (s. Abb. 12). Bei einem Primärtumor exprimieren TAMs ebenfalls IL-10¹²². Daher wurde untersucht inwieweit die Deletion des IL-10s in den myeloischen Zellen einen Einfluss auf die Metastasierung nimmt. Dafür wurden Lebermetastasen in Wildtyp-Mäusen ($Il10^{wt/wt} Lysm^{cre+}$) und in Mäusen induziert, in denen myeloische Zellen kein IL-10 produzieren können ($Il10^{flox/flox} Lysm^{cre+}$) (s. Abb. 14). Hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wt und dem konditionellen KO festgestellt werden (s. Abb. 14).

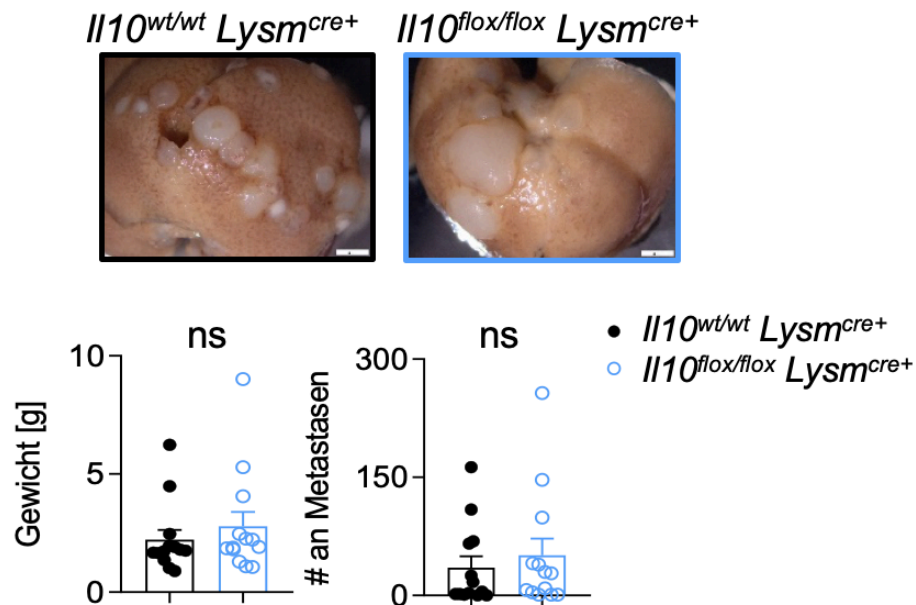


Abbildung 14: IL-10 von myeloischen Zellen hat *in vivo* keinen Einfluss auf die Lebermetastasierung. MC38-Darmkrebszellen wurden intrasplenisch in Wildtyp Mäuse ($Il10^{wt/wt}Lysm^{cre+}$) und in konditionelle Mäuse injiziert, in denen myeloische Zellen kein IL-10 produzieren können ($Il10^{flx/flx}Lysm^{cre+}$). Nach 21 Tagen wurde die Leber entnommen, das Gewicht der Leber bestimmt und die Lebermetastasen quantifiziert. Ein repräsentatives Bild ist hier abgebildet. Die Daten wurden mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Als nicht signifikant (ns) gilt der p -Wert $> 0,05$, der durch den Mann-Whitney-U-Test berechnet wurde.

Diese Beobachtungen deuten somit zusammenfassend nicht nur darauf hin, dass FOXP3-positive T-Zellen die Hauptquelle von IL-10 während der Lebermetastasierung sind, sondern auch, dass deren Produktion von IL-10 funktionell relevant ist.

3.3.4 IL-10 produzierende Tregs akkumulieren zwischen Tag 14 und 21 nach der Induktion von Lebermetastasen

Da Tregs die Hauptquelle von IL-10 darstellen, stellte sich die Frage, zu welchem Zeitpunkt der Metastasierung sich der Anteil an Tregs vergrößert und wann diese hauptsächlich IL-10 produzieren. Hierfür wurde ein Experiment zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt, bei dem nach unterschiedlichen Tagen (0, 7, 14 und 21 Tage) nach der Lebermetastaseninduktion die Leber analysiert wurde (s. Abb. 15). Dabei sollte überprüft werden, wann FOXP3+CD4+ T-Zellen expandieren und wann sie im Vergleich zu den anderen Zellen vermehrt IL-10 produzieren.

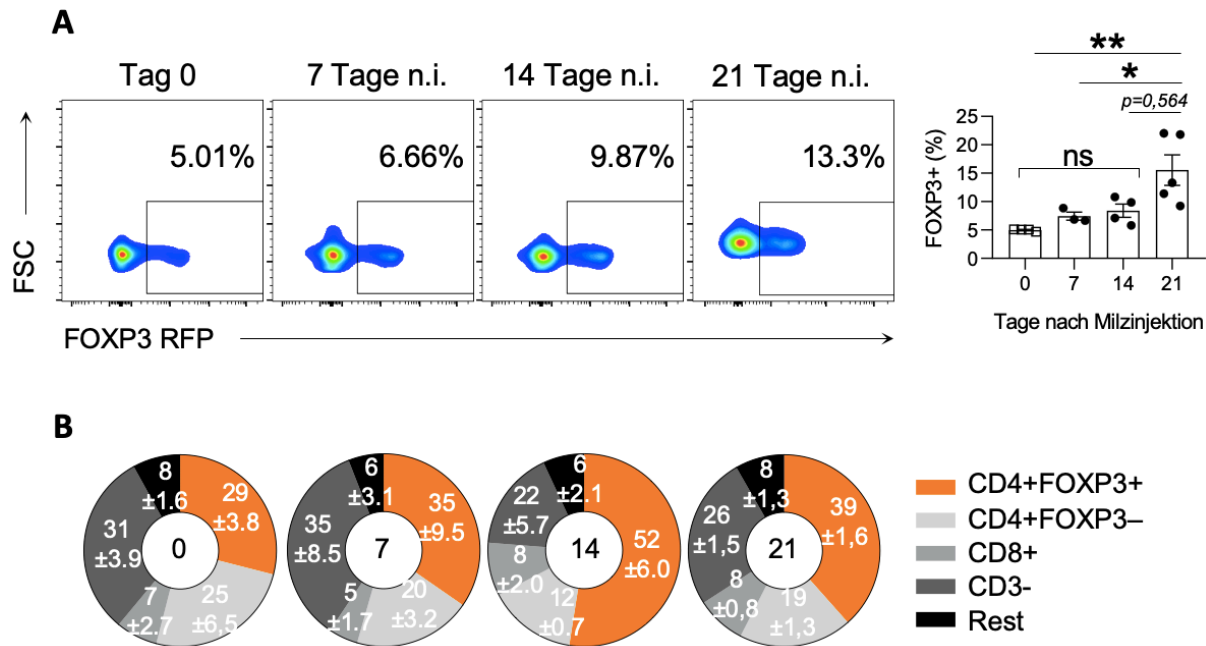


Abbildung 15: Tregs werden zwischen den Tagen 14 und 21 zu Hauptproduzenten von IL-10. MC38-Darmkrebszellen wurden intrasplenisch in *Il10^{eGFP}Foxp3^{RFP}*-Reporterermäuse injiziert. Nach den angegebenen Tagen wurde die Leber entnommen und am Durchflusszytometer analysiert. (A) Prozentualer Anteil an FOXP3+ Zellen innerhalb der CD4+ T-Zellpopulation. (B) Allgemeine Verteilung aller IL-10-produzierenden Zellen während der verschiedenen Tage nach der Milzinjektion von MC38-Zellen. Die Daten wurden mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Als nicht signifikant (ns) gilt der p -Wert $> 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p < 0,001$, der durch den oneway-ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Tests berechnet wurde.

Es wurde festgestellt, dass es erst nach 21 Tagen zu einer deutlich erhöhten Anhäufung an FOXP3-positiven Tregs in der Leber kam (s. Abb. 15A). Interessant war jedoch zu beobachten, dass bereits zwischen dem 7. und 14. Tag die Tregs zur Hauptquelle von IL-10 wurden (s. Abb. 15B). Hieraus ergibt sich, dass die IL-10-produzierenden Tregs vermutlich bereits in der Anfang- bzw. Zwischenphase der Metastasierung einen maßgeblichen Beitrag zur Förderung der Metastasierung leisten.

3.3.5 Krebszellen produzieren kein IL-10

Des Weiteren wurde überprüft, ob Krebszellen ebenfalls in der Lage sind, IL-10 zu produzieren. Es wurde mittels qPCR die IL-10-Expression in MC38- und LLC-Zellen bestimmt (s. Abb. 16).

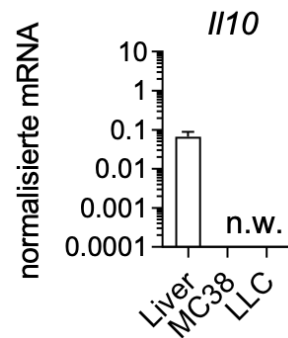


Abbildung 16: Krebszellen produzieren kein IL-10. mRNA-Expression von *Il10* aus *in vitro* gehaltenen MC38- oder LLC-Krebszellen. Normalisiert wurde mittels der mRNA-Expression von *Hprt*, wobei die mRNA-Expression aus der Gesamtleber als Positivkontrolle diente. Die Daten wurden mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. N.w. bedeutet: nicht nachweisbar.

In beiden Krebszelllinien konnte eine Expression von IL-10 nicht detektiert werden (s. Abb. 16). Daher erfolgte die Schlussfolgerung, dass sowohl MC38-Zellen als auch LLC-Zellen kein IL-10 produzieren.

3.4 Die Signalweiterleitung von IL-10 in Tregs und myeloischen Zellen beeinflusst die Metastasierung in die Leber

Die vorhergegangenen Daten weisen darauf hin, dass IL-10 maßgeblich die Lebermetastasierung beeinflusst und dass IL-10 hauptsächlich von Tregs produziert wird. Es stellte sich daraufhin die Frage, auf welche Zelle IL-10 wirkt. Dabei kann das IL-10 nicht nur auf Immunzellen wirken, sondern eventuell auch auf Krebszellen

3.4.1 IL-10 wirkt nicht auf Krebszellen

Um den Effekt von IL-10 auf die Krebszellen zu validieren, wurde in einem ersten Schritt überprüft, ob die Krebszellen die Rezeptoren IL-10RA und IL-10RB für IL-10 besitzen und mit IL-10 *in vitro* stimuliert werden können (s. Abb. 17).

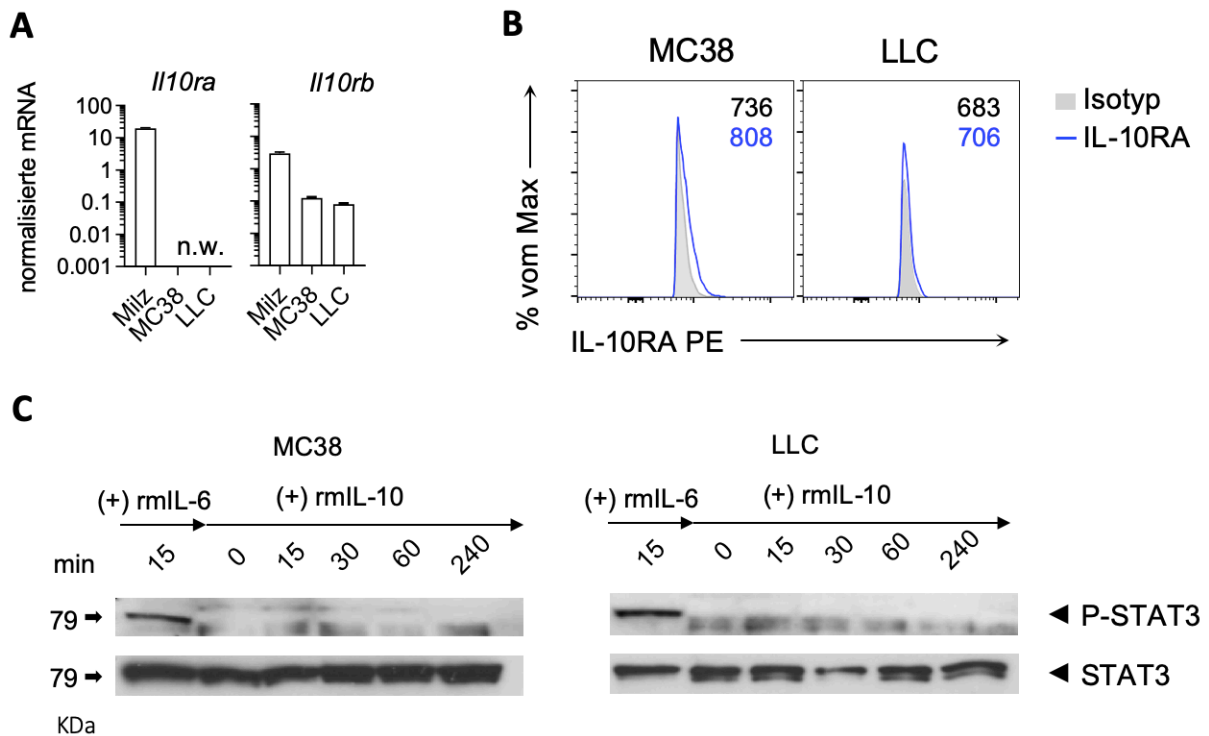


Abbildung 17: Krebszellen reagieren nicht auf eine Stimulation mit IL-10. (A) mRNA-Expression der beiden IL-10-Rezeptoren von *in vitro* gehaltenen MC38- oder LLC-Krebszellen (siehe Abb.16). Normalisiert wurde mittels der mRNA-Expression von *Hprt*, wobei die mRNA-Expression aus der Milz als Positivkontrolle diente. (B) Durchflusszytometrische Expression des spezifischen IL-10 Rezeptors (IL-10RA) auf den Krebszellen. (C) Repräsentativer Western Blot, der die pSTAT3-Aktivierung in den Krebszellen zeigt, die mit IL-10 (100 ng/mL) oder mit IL-6 (10 ng/mL, diente als Positivkontrolle) stimuliert wurden. Die Daten wurden mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. N.w. bedeutet: nicht nachweisbar.

Die qPCR-Daten zeigen, dass beide Krebszellen zwar den unspezifischen Rezeptor IL-10RB besitzen, jedoch nicht den spezifischen Rezeptor IL-10RA (s. Abb. 17A). Zugleich konnte die Oberflächenfärbung mit einem monoklonalen IL-10RA Antikörper keine Expression des spezifischen IL-10 Rezeptors auf den Krebszellen detektieren (s. Abb. 17B). Der letztendliche Beleg, dass die Krebszellen nicht auf IL-10 reagieren, wurde mit einem Western Blot erbracht (s. Abb. 17C). Hier zeigte sich, dass sich der Transkriptionsfaktor STAT3 nicht durch eine IL-10 Stimulation aktivieren lässt (s. Abb. 17C). Somit kann IL-10 nur auf die Wirtszellen der Maus wirken.

3.4.2 Andere mögliche Zielzellen von IL-10 in der Leber

Da Krebszellen nicht auf eine IL-10 Stimulation reagieren, kann IL-10 während der Metastasierung nur auf Wirtszellen wirken. Um genauer zu untersuchen, welche Zelle der Maus als potenzielle Zielzelle in Frage kommt, wurde die IL-10-Rezeptorexpression in den verschiedenen Immunzellen der Leber analysiert (s. Abb. 18).

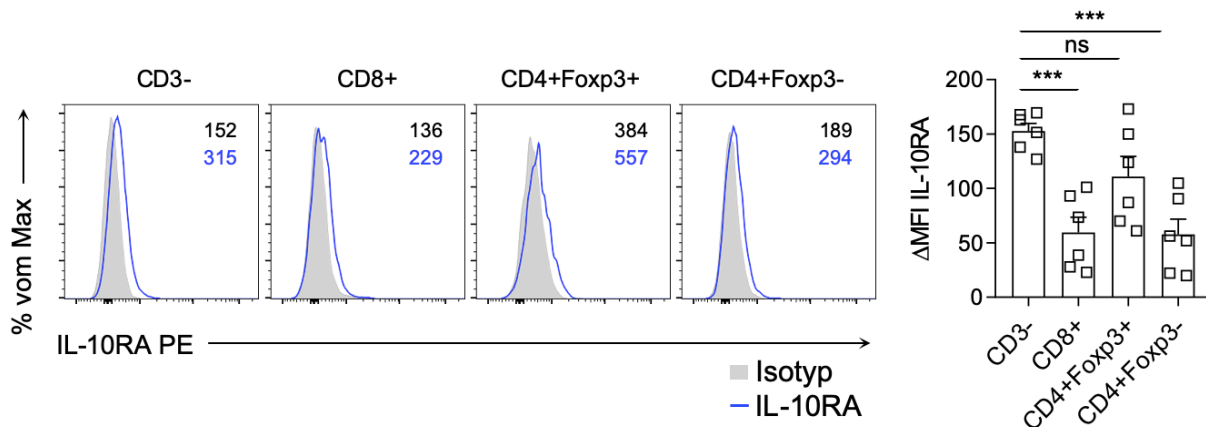


Abbildung 18: Expression des spezifischen IL-10 Rezeptors in den Immunzellen der Leber.

Durchflusszytometrische Analyse des spezifischen IL-10 Rezeptors (IL-10RA) auf den verschiedenen Zellpopulationen in der Leber und anschließende Berechnung der Differenz (Δ) der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI). Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Als nicht signifikant (ns) gilt der p -Wert $>0,05$; ***: $p \leq 0,001$, der durch den oneway-ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Tests berechnet wurde.

Wie erwartet, war die stärkste Expression des IL-10-Rezeptors in den CD3-negativen Zellen feststellbar (s. Abb. 18). Wie zuvor beschrieben, zeigte sich auch in den Tregs eine starke Expression des IL-10-Rezeptors (s. Abb. 18)^{75,77,78}. Anschließend sollte untersucht werden, auf welche dieser Zellenpopulationen IL-10 wirkt, indem es den Transkriptionsfaktor STAT3 aktiviert. Da auch Gewebszellen einen IL-10 Rezeptor besitzen, wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 zwischen Immunzellen und den restlichen Zellen nach einer *in vitro* Stimulation am Durchflusszytometer bestimmt (s. Abb. 19A). Es zeigt sich hier, dass hauptsächlich die Zellen des Immunsystems (CD45-positive Zellen) auf IL-10 reagieren. Es können aber auch andere Zellen (CD45-negative Zellen) auf IL-10 angesprochen werden (s. Abb. 19A).

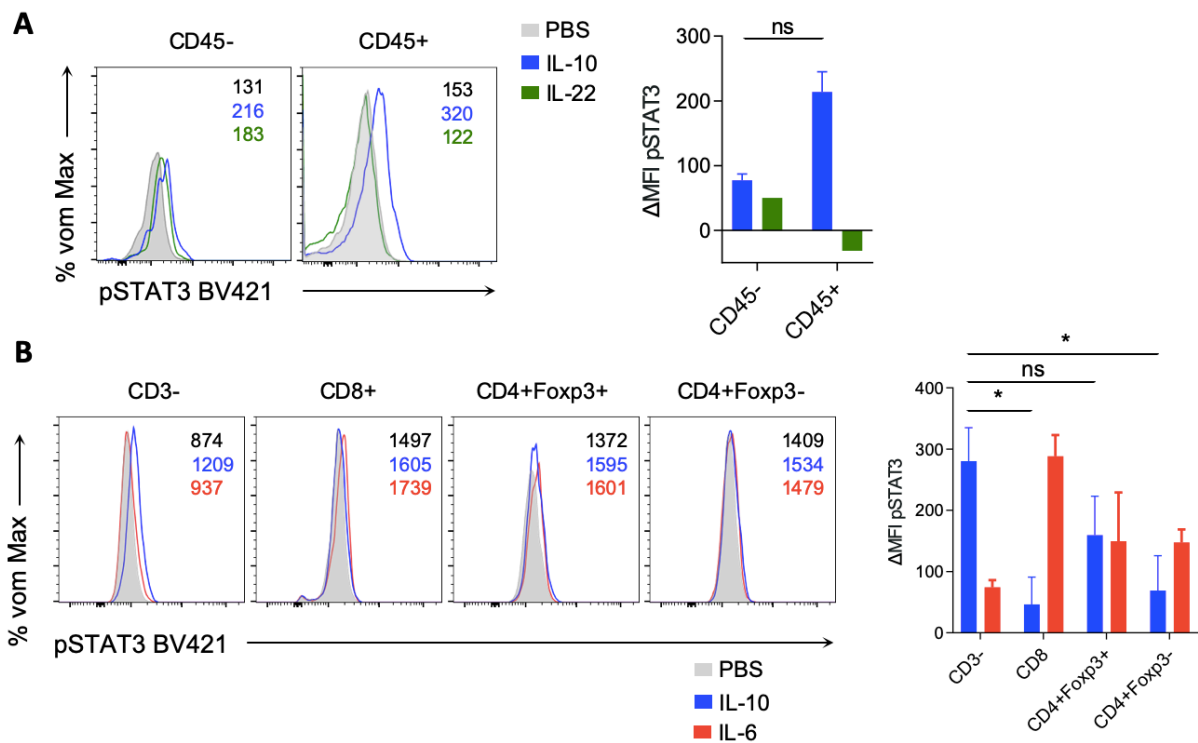


Abbildung 19: Die Aktivierung von pSTAT3 in Immunzellen und Nichtimmunzellen nach Stimulation mit IL-10. (A) Durchflusszytometrische Analyse der pSTAT3-Aktivierung zwischen Immunzellen und Nichtimmunzellen aus der Leber nach Stimulation mit IL-10, IL-22 oder PBS. IL-22 diente hier als Kontrolle. (B) Die gleiche Analyse in den verschiedenen Immunzellpopulationen in den Immunzellen nach Stimulation mit IL-10, IL-6 oder PBS. Diesmal diente IL-6 als Kontrolle. Anschließend erfolgte die Berechnung der Differenz (Δ) der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI). Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Als nicht signifikant (ns) gilt der p -Wert $>0,05$; *: $p < 0,05$, der durch den twoway-ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Tests berechnet wurde.

Nach der Unterteilung der Immunzellzellen in die verschiedenen Immunzellpopulationen zeigte sich in Abbildung 19B das gleiche Bild wie in Abbildung 18. Die CD3-negativen Zellen reagierten am stärksten auf IL-10 *in vitro*, aber auch Tregs zeigten eine erhöhte pSTAT3-Expression nach IL-10-Stimulation (s. Abb. 19B). Somit konnte geschlossen werden, dass sowohl die Zellen des angeborenen Immunsystems als auch die Tregs auf IL-10 reagieren können.

3.4.3 LSECs exprimieren beide IL-10 Rezeptoren und können mit IL-10 stimuliert werden

Wie oben beschrieben konnte in der CD45-negativen Fraktion von aus der Leber isolierten Zellen eine STAT3 Aktivierung festgestellt werden (s. Abb. 19A). Da bereits gezeigt wurde, dass Gewebszellen beide IL-10 Rezeptoren besitzen, wurde angenommen, dass eventuell LSEC ebenfalls die entsprechenden IL-10 Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen^{65,66}. Daher sollte erstmalig überprüft werden, ob LSECs die IL-10-Rezeptoren exprimieren (s. Abb. 20).

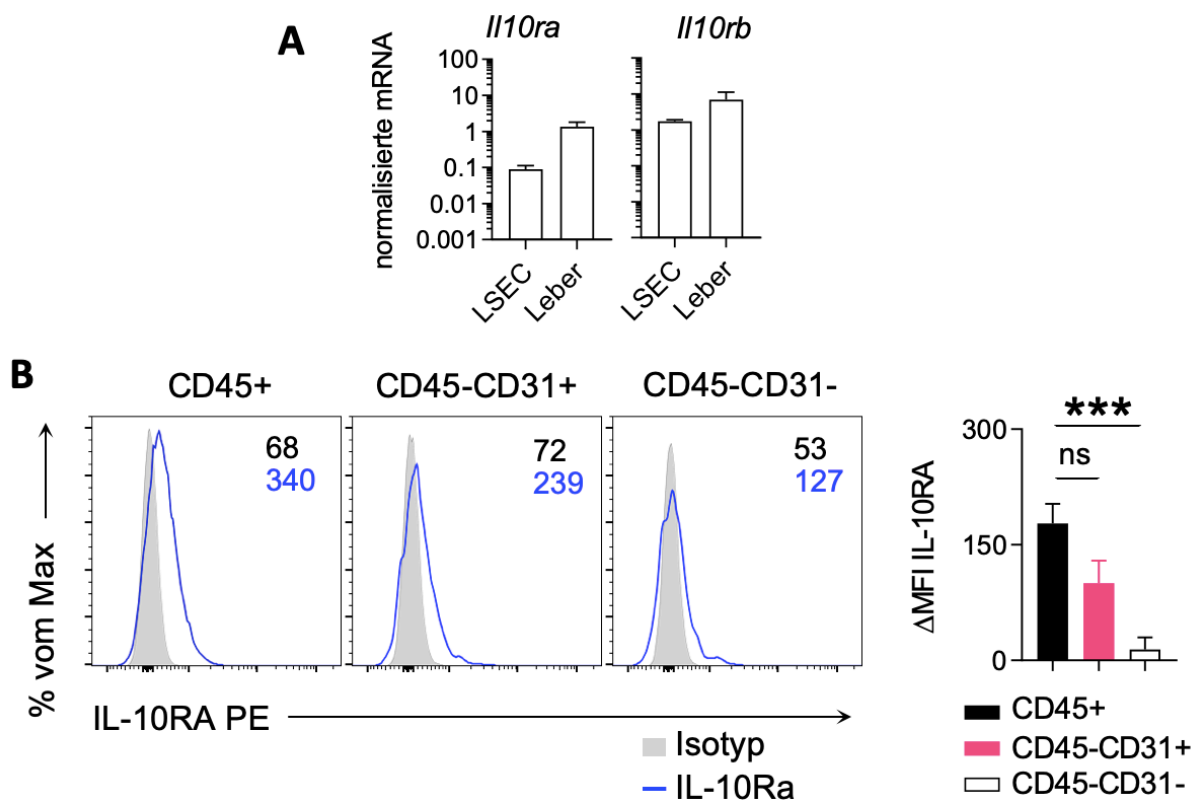


Abbildung 20: LSECs exprimieren die IL-10-Rezeptoren. (A) mRNA Expression beider IL-10-Rezeptoren in *in vitro* kultivierten LSECs. Normalisiert wurde mittels der mRNA-Expression von *Hprt*, wobei die mRNA-Expression aus der Leber als Positivkontrolle diente. (B) Durchflusszytometrische Analyse des spezifischen IL-10 Rezeptors (IL-10RA) auf LSECs (CD45-CD31+) und Immunzellen (CD45+) aus der Leber und anschließende Berechnung der Differenz (Δ) der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI). Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Als nicht signifikant (ns) gilt der p -Wert $>0,05$; ***: $p \leq 0,001$, der durch den oneway-ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Tests berechnet wurde.

Mittels qPCR konnte nachgewiesen werden, dass LSECs beide IL-10-Rezeptoren exprimieren (s. Abb.20 A). Ebenfalls konnte mit der durchflusszytometrischen Analyse

gezeigt werden, dass LSECs den spezifischen IL-10 Rezeptor IL-10RA auf ihrer Oberfläche tragen, auch wenn dessen Expression auf LSECs geringer ist als auf Leukozyten (s. Abb. 20B).

Um in einem nächsten Schritt zu zeigen, dass der Rezeptor auf den LSECs auf IL-10 reagiert, wurden LSECs *in vitro* mit IL-10 stimuliert und pSTAT3 mittels Western Blot quantifiziert (s. Abb. 21). Es zeigt sich hier, dass nach der Stimulation mit IL-10 eine Phosphorylierung von STAT3 bereits nach 15 min erfolgte.

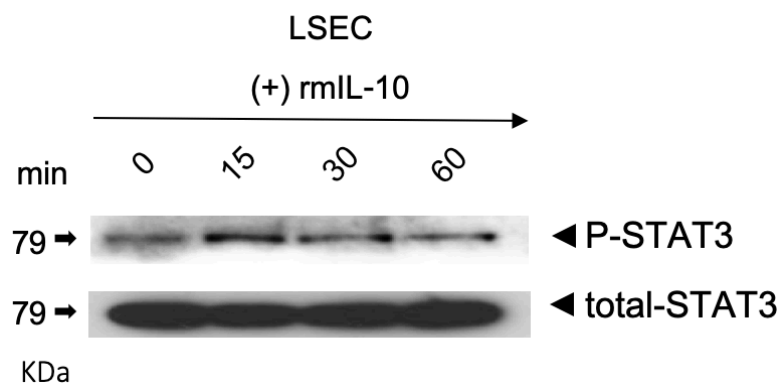


Abbildung 21: LSECs reagieren auf IL-10. Repräsentativer Western Blot, der eine Zunahme von pSTAT3 in *in vitro* kultivierten LSECs zeigt, die mit rm100 ng/mL IL-10 stimuliert wurden.

3.4.4 Das IL-10 Signal auf LSECs spielt bei der Lebermetastasierung nur eine untergeordnete Rolle

Die eigentliche Funktion von Endothelzellen liegt darin, eine Barriere zwischen dem Blutkreislauf und dem umliegenden Gewebe zu bilden, denn sie können durch ihre Integrität die Extravasation blockieren. Da LSECs die IL-10-Rezeptoren exprimieren und prinzipiell auf IL-10 reagieren, könnte IL-10 eine Auswirkung auf die Permeabilität der LSECs haben und somit eine Extravasation begünstigen. Daher wurde in den IL-10-defizienten Mäusen und deren Wildtyp-Wurfgeschwistern (*Il10^{-/-}* bzw. *Il10^{+/+}*) zunächst das Extravasationsmodell angewendet (s. Abb.22).

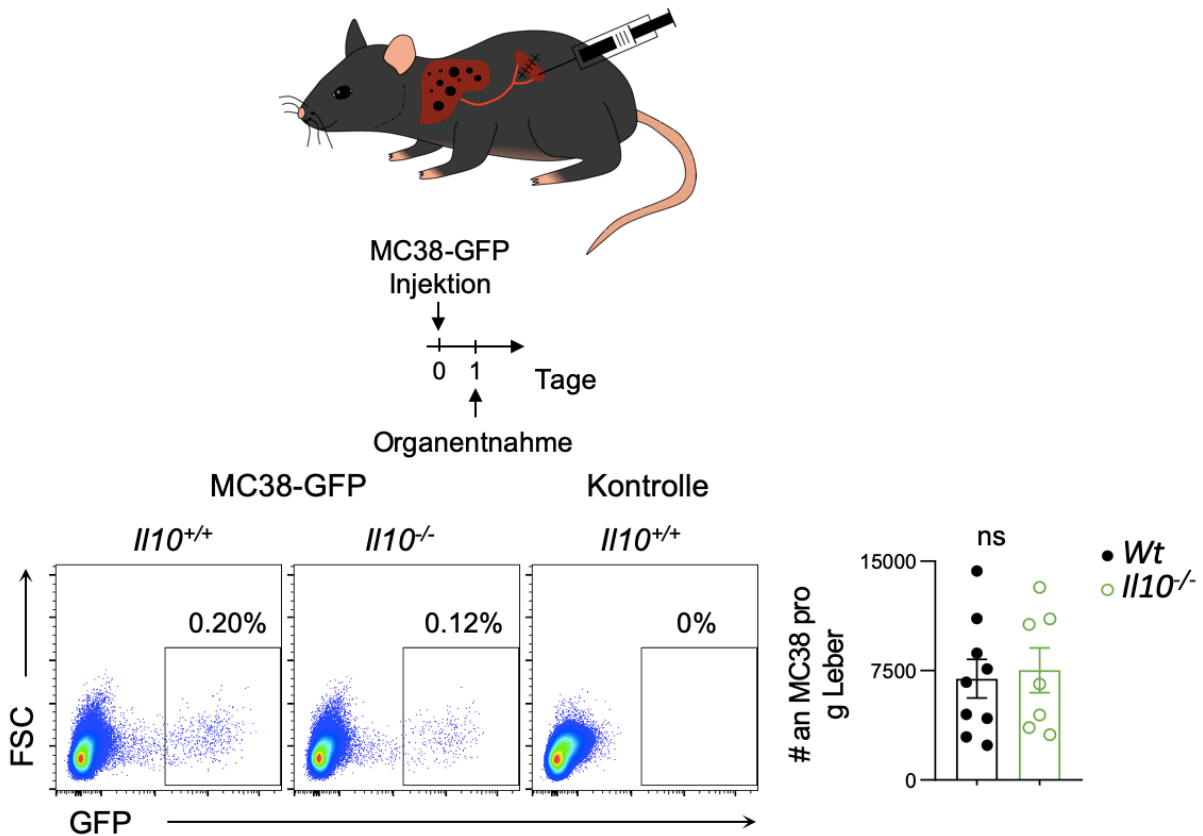


Abbildung 22: IL-10 hat keinen Einfluss auf die Extravasation von Krebszellen. Durchflusszytometrische Analyse der Anzahl an extravasierten GFP-exprimierenden MC38-Darmkrebszellen in der Leber einen Tag nach intrasplenischer Injektion. Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Als nicht signifikant (ns) gilt ein p -Wert $>0,05$, der durch den Mann-Whitney-U-Test berechnet wurde.

Wie in Abbildung 22 zu erkennen ist, gibt es keine Unterschiede in der Anzahl an extravasierten Darmkrebszellen in der Leber. Das bedeutet, dass das IL-10 keinen Einfluss auf die Extravasation hat. Da LSECs neben ihrer Barrierefunktion noch eine immunologische Funktion besitzen, wurde überprüft, ob die IL-10-Signalweiterleitung in LSECs generell die Lebermetastasierung beeinflusst. Hierfür wurde das forcierte Modell der Lebermetastasierung in Wildtyp Mäusen (*Il10ra^{wt/wt} Cdh5^{cre+}*) und in Mäusen verwendet, in denen Endothel- als auch Epithelzellen nicht den spezifischen IL-10-Rezeptor produzieren können (*Il10ra^{flox/flox} Cdh5^{cre+}*) (s. Abb. 23). Denn das Gen *Cdh5* codiert das Protein *vascular endothelial cadherin*, das überwiegend in Gefäßzellen exprimiert wird.

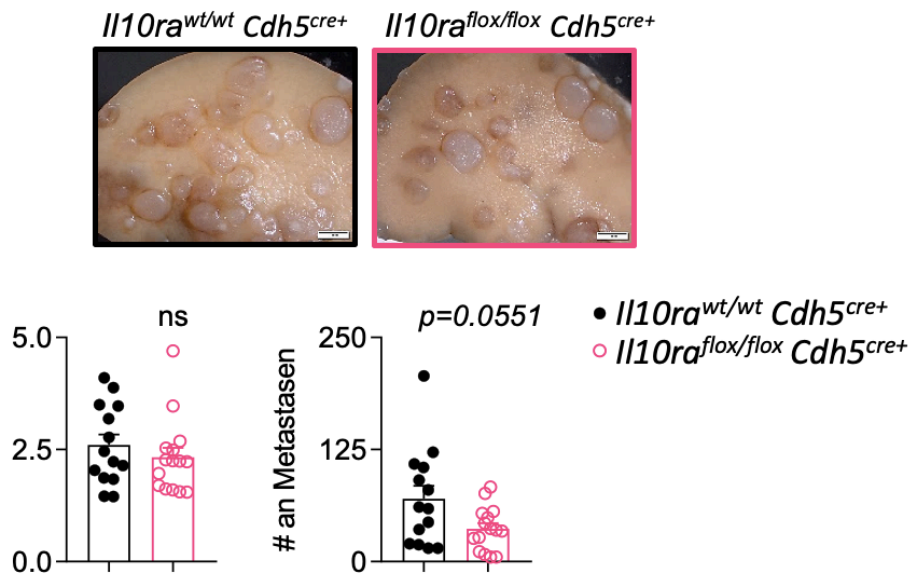


Abbildung 23: Der Verlust der IL-10 Signalweiterleitung auf LSECs leistet keinen wesentlichen Beitrag zur Lebermetastasierung. MC38-Darmkrebszellen wurden intrasplenisch in Wildtyp Mäuse ($Il10ra^{wt/wt}Cdh5^{cre+}$) und in konditionelle Mäuse injiziert, in denen LSECs nicht den spezifischen IL-10 Rezeptor exprimieren ($Il10ra^{flox/flox}Cdh5^{cre+}$). Nach 21 Tagen wurde die Leber entnommen, das Gewicht der Leber bestimmt und die Lebermetastasen quantifiziert. Ein repräsentatives Bild ist hier abgebildet. Die Daten wurden mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Als nicht signifikant (ns) gilt der p -Wert $> 0,05$, der durch den Mann-Whitney-U-Test berechnet wurde.

In Abbildung 23 zeigt sich, dass die IL-10-Signalweiterleitung in LSECs keinen relevanten Einfluss auf die Lebermetastasierung hat. Ein geringer Effekt konnte letztlich nicht ausgeschlossen werden. Jedoch scheint der Haupteffekt von IL-10 auf die Immunzellen gerichtet zu sein, sodass der Fokus für die weitere Zielzellsuche auf die Immunzellen gelegt wurde.

3.4.5 Das IL-10-Signal auf regulatorischen T-Zellen als auch auf myeloischen Zellen beeinflusst die Lebermetastasierung

In den vorherigen Experimenten konnte festgestellt werden, dass sowohl Zellen des angeborenen Immunsystems als auch Tregs den IL-10 Rezeptor am stärksten exprimieren (s. Abb. 18) und *in vitro* auf IL-10 reagieren (s. Abb. 19). Es stellte sich daraufhin die Frage, inwieweit der Verlust des IL-10 Signals in diesen Zelltypen die Lebermetastasierung beeinflusst. Es wurde zunächst in den IL-10-Rezeptor-

defizienten Tregs ($Il10ra^{lox/lox}Foxp3^{cre+}$) und in den entsprechenden Wildtyp-Kontrollen ($Il10ra^{wt/wt}Foxp3^{cre+}$) eine Lebermetastasierung induziert (s. Abb. 24).

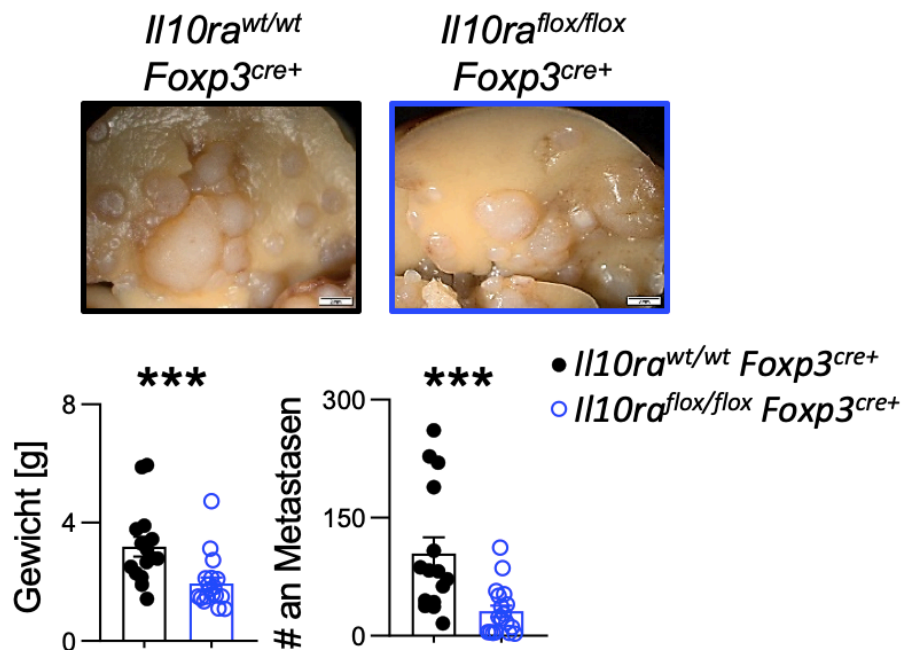


Abbildung 24: Tregs benötigen das IL-10-Signal, um die Lebermetastasierung zu fördern. MC38-Darmkrebszellen wurden intrasplenisch in Wildtyp Mäuse ($Il10ra^{wt/wt}Foxp3^{cre+}$) und in konditionelle Mäuse injiziert, in denen Tregs nicht den spezifischen IL-10 Rezeptor exprimieren ($Il10ra^{lox/lox}Foxp3^{cre+}$). Nach 21 Tagen wurde die Leber entnommen, das Gewicht der Leber bestimmt und die Lebermetastasen quantifiziert. Ein repräsentatives Bild ist hier abgebildet. Die Daten wurden mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Als signifikant (***) gilt der p -Wert $<0,001$, der durch den Mann-Whitney-U-Test berechnet wurde.

Es zeigte sich hier, dass der Verlust des IL-10-Signals in Tregs einen erheblichen Einfluss auf die Lebermetastasierung hat. Darüber hinaus wurde überprüft, ob der Verlust des IL-10-Signals in den Tregs zu einer geringeren Expression des FOXP3 Transkriptionsfaktors führt oder zu einer verminderten Aktivierung (s. Abb. 25). Die Aktivierung wurde anhand der PD-1 Expression bestimmt. Schließlich stammt die IL-10 Produktion bei der Lebermetastasierung von PD-1 positiven Tregs (s. Abb. 12).

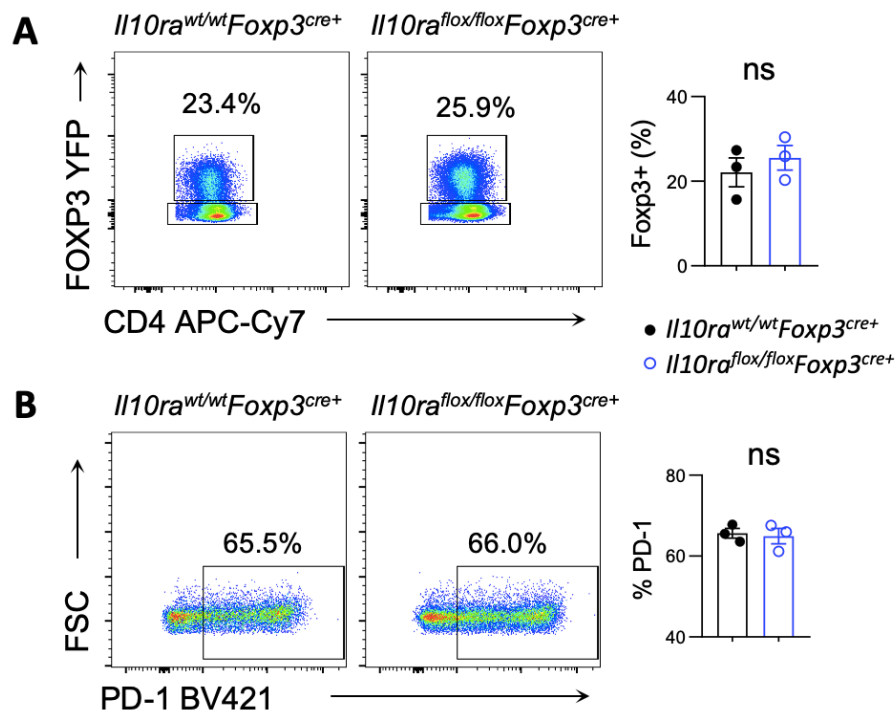


Abbildung 25: Der Verlust des IL-10-Signals in Tregs hat keinen Einfluss auf die FOXP3-Expression und die Aktivierung von Tregs bei der Lebermetastasierung. MC38-Darmkrebszellen wurden intrasplenisch in Wildtyp Mäuse (*Il10ra^{wt/wt}Foxp3^{cre+}*) und in konditionelle Mäuse injiziert, in denen Tregs nicht den spezifischen IL-10 Rezeptor exprimieren (*Il10ra^{flox/flox}Foxp3^{cre+}*). Nach 21 Tagen wurde die Leber entnommen und die Expression von (A) FOXP3 und (B) PD-1 in CD4+ T-Zellen bestimmt. Als nicht signifikant (ns) gilt der p -Wert $> 0,05$, der durch den Mann-Whitney-U-Test berechnet wurde.

Hier konnte durch den Verlust des IL-10 Signals kein Einfluss auf die Stabilität der FOXP3-Expression nachgewiesen werden (s. Abb. 25A). Ebenso konnte mittels der Expression von PD-1 kein Unterschied in der Aktivierung von Tregs festgestellt werden (s. Abb. 25B).

Eine Studie zeigte interessanterweise, dass im Darm ein IL-10-Signal auf den Tregs die IL-10-Produktion vermittelt und aufrechterhält⁷⁸. Daraus folgte die Hypothese, dass die Treg Zelle eventuell nur die Rolle als IL-10-Hauptproduzent einnimmt, jedoch das Wachstum von Metastasen durch eine andere Zielzelle vermittelt wird. Aus diesem Grund wurde erst überprüft ob ein IL-10 Signal in hepatischen Tregs ebenfalls die IL-10 Produktion moduliert und ob diese sich durch die Aktivierung mit einem Antikörper-Cocktail aus anti-CD3 und anti-CD28 beeinflussen lässt (s. Abb. 26).

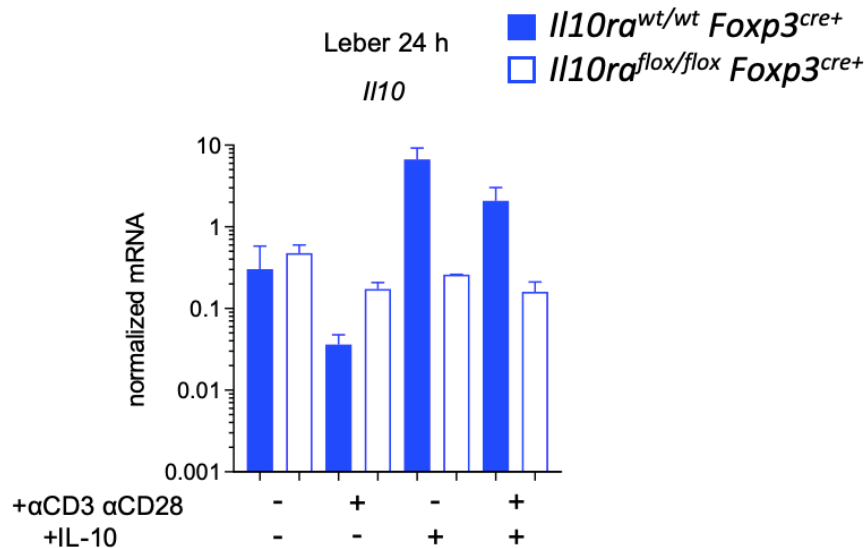


Abbildung 26: Ein IL-10-Signal auf den Tregs fördert die IL-10 Produktion. Tregs wurden aus der Leber von Wildtyp Mäusen (*Il10ra*^{wt/wt}*Foxp3*^{cre+}) oder aus konditionellen Mäusen sortiert, in denen Tregs nicht den spezifischen IL-10 Rezeptor exprimieren (*Il10ra*^{flox/flox}*Foxp3*^{cre+}). Anschließend wurden die Zellen entweder mit IL-10 (100 ng/mL) und/oder mit 2 µg/mL anti-CD3 bzw. anti-CD28 für 24 h stimuliert. Anschließend wurde die RNA isoliert und die mRNA-Expression von *Il10* bestimmt. Normalisiert wurde mittels der mRNA-Expression von *Hprt*. Die Daten wurden mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

Aus der Abbildung 26 wird deutlich, dass Tregs aus der Leber vermehrt IL-10 produzieren, sofern ein IL-10-Signal vorliegt. Dieses Signal ist unabhängig von der Aktivierung des T-Zell Rezeptors (s. Abb. 26). Außerdem wird klar, dass dieser Effekt verloren geht, wenn sie den entsprechenden IL-10 Rezeptor nicht besitzen (s. Abb. 26).

Dadurch wurde die Hypothese verstärkt, dass IL-10 in einem ersten Schritt auf Tregs wirkt, um diese zu einer vermehrten IL-10-Produktion anzuregen. In einem zweiten Schritt wirkt dieses IL-10 wiederum auf weitere Zellen und ruft damit den pathogenen Effekt bei der Lebermetastasierung hervor. Einer dieser Zelltypen könnten zum Beispiel T_H17 Zellen sein. Jüngste Erkenntnisse zeigen, dass T_H17 Zellen die Metastasierung in die Leber als auch in die Lunge unterbinden^{30,123}. Weitere Daten belegen ebenfalls, dass die Funktion von T_H17 Zellen durch IL-10 unterbunden wird⁷⁵. Daher sollte überprüft werden, ob es zu einer Anhäufung von T_H17 bei der Lebermetastasierung kommt und ob diese vom IL-10-Signal abhängig ist. Hierfür wurde eine Fate Maus verwendet, in der alle Zellen dauerhaft ein gelb-fluorzierendes

Protein (YFP) exprimieren, sobald sie erstmalig IL-17A produzieren (s. Abb. 27A)¹²⁴. Nach der Lebermetastaseninduktion erfolgte 21 Tage später die Quantifizierung der T_H17-Zellen am Durchflusszytometer (s. Abb. 27B und C).

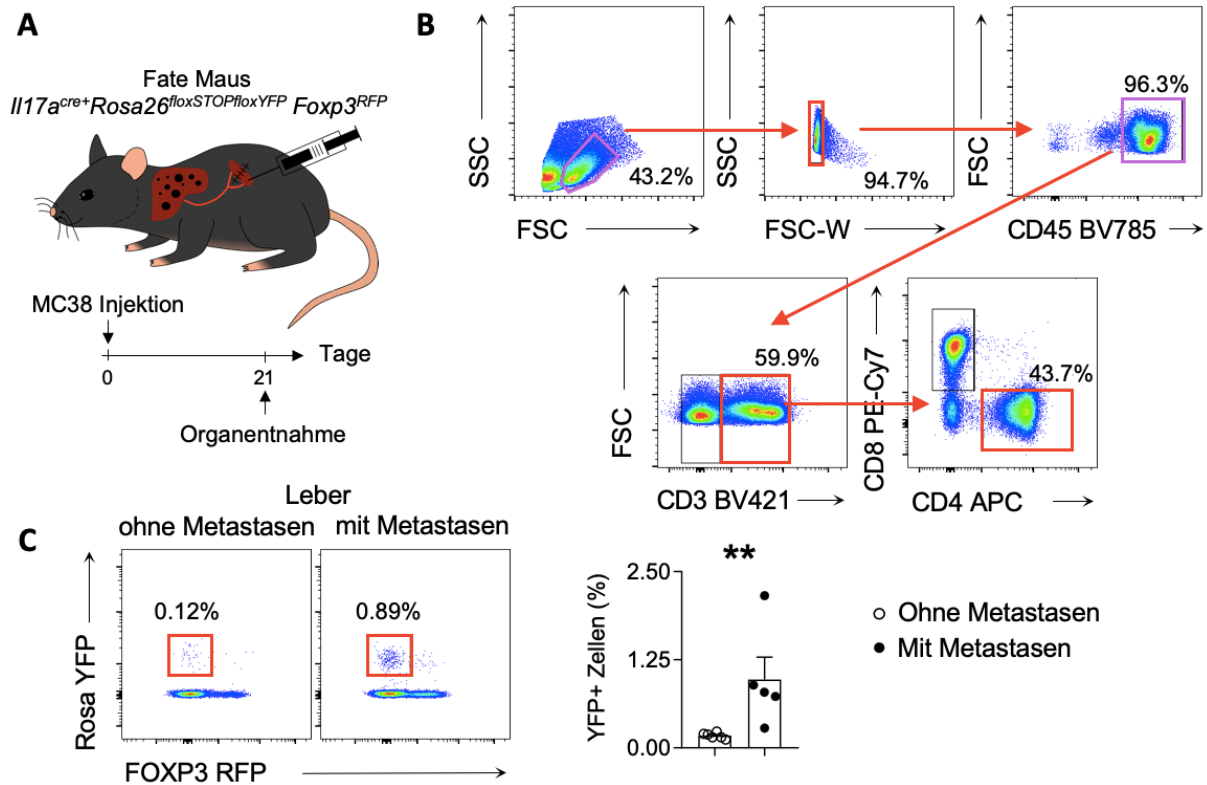


Abbildung 27: Erhöhte Anhäufung von T_H17 Zellen bei der Lebermetastasierung. (A) MC38-Darmkrebszellen wurden intrasplenisch in Fate Mäuse injiziert. Nach 21 Tagen wurde die Leber entnommen und mit einer gesunden Leber verglichen. (B und C) Darstellung der Gatingstrategie und der anschließenden Quantifizierung der T_H17 Zellen. Die Daten wurden mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Als signifikant (**) gilt der p -Wert < 0,01, der durch den Mann-Whitney-U-Test berechnet wurde.

In Abbildung 27 zeigt sich, dass es zur einer Anhäufung von T_H17 Zellen bei der Lebermetastasierung kommt. Um zu überprüfen, ob eine Signalwirkung von IL-10 auf den T_H17 Zellen eine Rolle spielt, wurden Lebermetastasen in Wildtyp-Kontrollen ($Il10ra^{flox/flox}Il17a^{cre-}$) und in Mäuse induziert, in denen alle IL-17 produzierenden Zellen keine IL-10 Rezeptor mehr exprimieren ($Il10ra^{flox/flox}Il17a^{cre+}$) (s. Abb. 28).

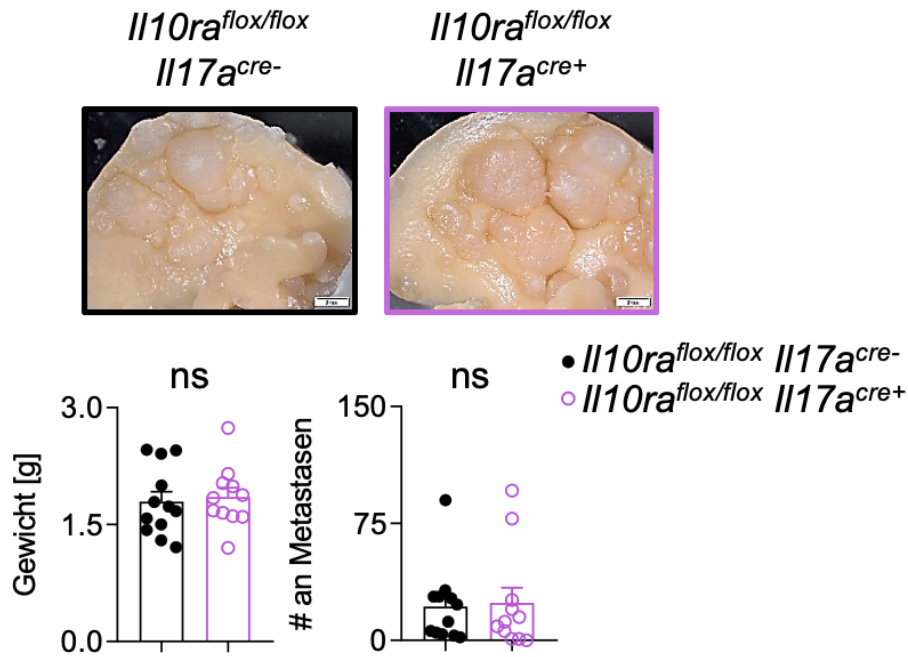


Abbildung 28: Die IL-10-Signalweiterleitung auf T_H17 Zellen und allen anderen IL-17 produzierenden Zellen spielt keine Rolle bei der Lebermetastasierung. MC38-Darmkrebszellen wurden intrasplenisch in Wildtyp Mäuse (*Il10ra^{flox/flox}Il17^{cre-}*) und in konditionelle Mäuse injiziert, in denen IL-17 produzierende Zellen nicht den spezifischen IL-10 Rezeptor exprimieren (*Il10ra^{flox/flox}Il17^{cre+}*). Nach 21 Tagen wurde die Leber entnommen, das Gewicht der Leber bestimmt und die Lebermetastasen quantifiziert. Ein repräsentatives Bild ist hier abgebildet. Die Daten wurden mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Als nicht signifikant (ns) gilt der *p*-Wert > 0,05, der durch den Mann-Whitney-U-Test berechnet wurde.

In Abbildung 28 konnte kein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Versuchsgruppen festgestellt werden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass bei der Lebermetastasierung IL-10 auf allen IL-17 produzierenden Zellen, einschließlich T_H17 Zellen keine Rolle spielt. Angesichts dessen wurde in Mäusen mit entweder IL-10-Rezeptor-defizienten myeloischen Zellen oder in IL-10-Rezeptor-defizienten dendritischen Zellen (*Il10ra^{flox/flox}Cd11c^{cre+}*) als auch in den entsprechenden Wildtyp-Kontrollen (*Il10ra^{wt/wt}Lysm^{cre+}* bzw. *Il10ra^{wt/wt}Cd11c^{cre+}*) Lebermetastasen induziert (s. Abb. 29).

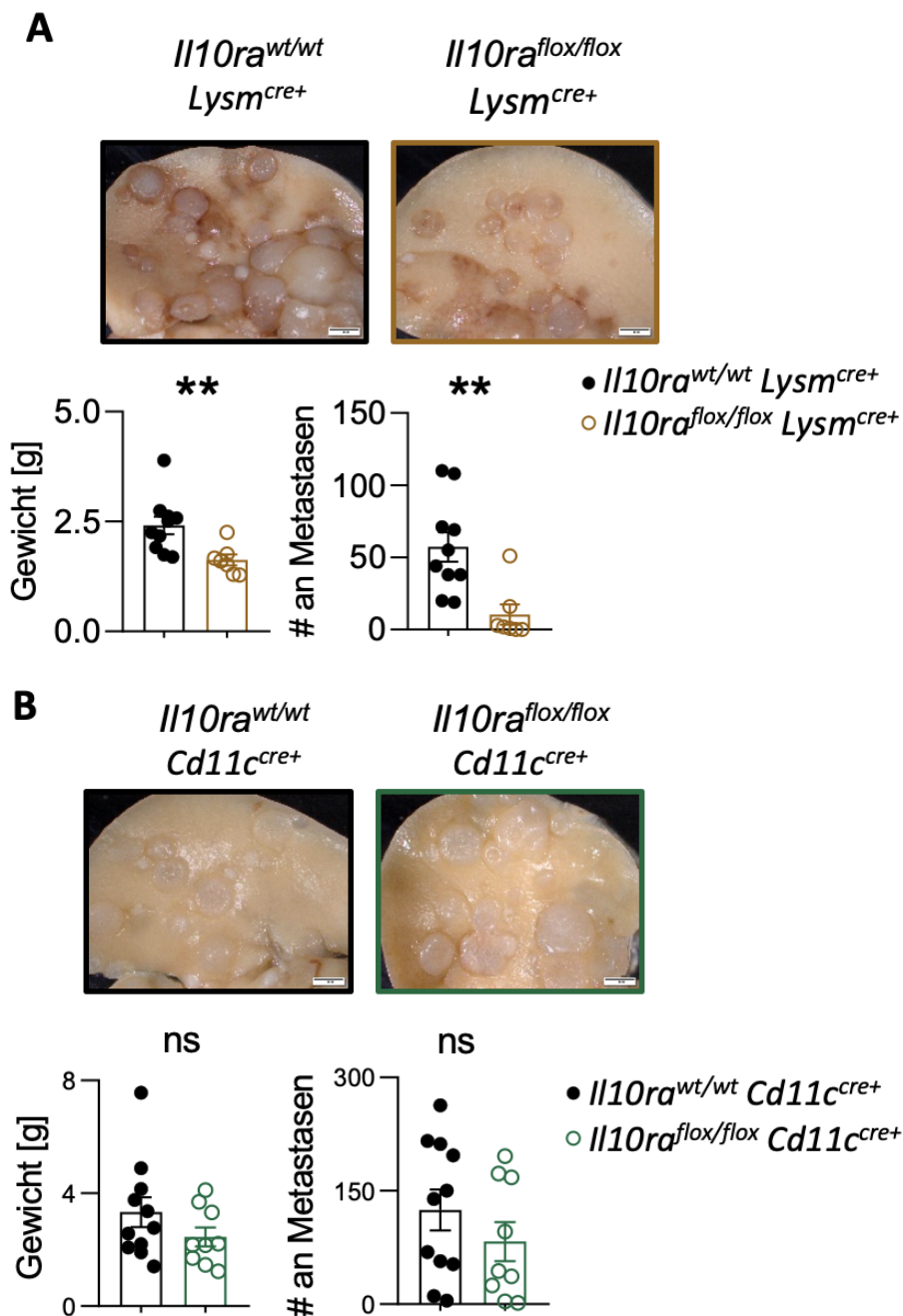


Abbildung 29: Die IL-10 Signalweiterleitung trägt auf myeloischen Zellen, aber nicht auf dendritischen Zellen zur Lebermetastasierung bei. MC38-Darmkrebszellen wurden intrasplenisch in Mäuse mit (A) IL-10-Rezeptor-defizienten myeloischen Zellen (*Il10ra*^{flox/flox}*Lysm*^{cre+}) oder (B) IL-10-Rezeptor-defizienten dendritischen Zellen (*Il10ra*^{flox/flox}*Cd11c*^{cre+}) als auch den entsprechenden Wildtyp-Kontrollen injiziert. Nach 21 Tagen wurde die Leber entnommen, das Gewicht der Leber bestimmt und die Lebermetastasen quantifiziert. Ein repräsentatives Bild ist hier abgebildet. Die Daten wurden mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Als nicht signifikant (ns) gilt der *p*-Wert > 0,05; **: *p* ≤ 0,01, der durch den Mann-Whitney-U-Test berechnet wurde.

Es zeigte sich hier, dass der Verlust des IL-10-Signals in myeloischen Zellen im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle einen dramatischen Einfluss auf die Lebermetastasierung hat (s. Abb. 28A). Im Gegensatz dazu konnte *in vivo* kein Unterschied zwischen Mäusen mit IL-10-Rezeptor-defizienten dendritischen Zellen und den Wildtyp-Kontrollen festgestellt werden (s. Abb. 29B).

Es erfolgte somit die Schlussfolgerung, dass IL-10 auf Tregs und auf myeloischen Zellen wirken kann und damit die Lebermetastasierung fördert.

3.5 PD-L1 trägt maßgeblich zur Lebermetastasierung bei

Viele Tumorentitäten exprimieren PD-L1 auf ihrer Oberfläche und werden so zur Zielscheibe der gezielten Immuntherapie⁴⁷. Jedoch wurde festgestellt, dass eine Therapie gegen PD-L1 auch auf Tumore wirkt, die kein PD-L1 vorweisen¹²⁵. Dies lässt den Verdacht aufkommen, dass auch nicht-entartete Zellen PD-L1 exprimieren können. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass IL-10 auf Makrophagen wirken kann, um dort die Expression von Checkpoint-Inhibitoren wie PD-L1 zu verändern^{126,127}. Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass IL-10 - welches während der Lebermetastasierung von Tregs benötigt wird um deren IL-10-Produktion zu steigern - ebenfalls auf Zellen des angeborenen Immunsystems wirken kann und dabei Checkpoint-Inhibitoren reguliert. Die Hochregulierung von PD-L1 beispielsweise würde eine ausreichende Immunantwort dieser Zellen in der Regel unterdrücken¹²⁸. Daher galt es in einem ersten Schritt festzustellen, ob PD-L1, welches von den Wirtszellen exprimiert wird, einen generellen Einfluss auf die Lebermetastasierung hat (s. Abb. 30A). Hierfür wurden Lebermetastasen in den Wildtyp Mäusen (*B7h1^{+/+}*) als auch in PD-L1-defizienten Mäusen (*B7h1^{-/-}*) induziert (s. Abb. 30A). Als Zweites sollte überprüft werden, ob es zu einer unterschiedlichen Expression von PD-L1 auf den Immunzellen bei der Lebermetastasierung in Mäusen mit IL-10-Rezeptor-defizienten Tregs kommt (s. Abb. 30B). Hierfür wurde in den IL-10-Rezeptor-defizienten Tregs (*Il10ra^{flox/flox}Foxp3^{cre+}*) und in den entsprechenden Wildtyp-Kontrollen (*Il10ra^{wt/wt}Foxp3^{cre+}*) eine Lebermetastasierung induziert (s. Abb. 30B).

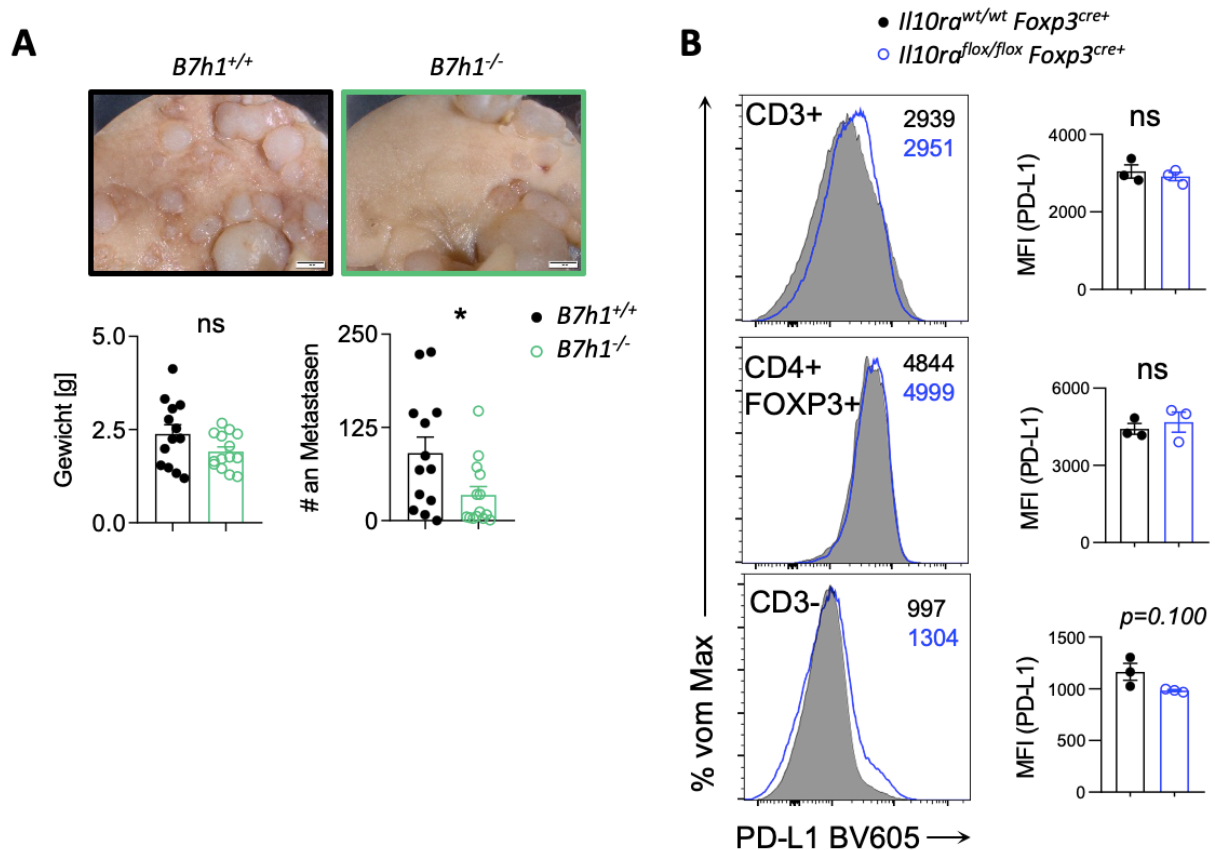


Abbildung 30: PD-L1 hat einen wesentlichen Einfluss auf die Lebermetastasierung. (A) MC38-Darmkrebszellen wurden intrasplenisch in Wildtyp Mäuse (*B7h1^{+/+}*) und in PD-L1-defiziente Mäuse (*B7h1^{-/-}*) injiziert. Nach 21 Tagen wurde die Leber entnommen, das Gewicht der Leber bestimmt und die Lebermetastasen quantifiziert. Ein repräsentatives Bild ist hier abgebildet. (B) Expression von PD-L1 in CD3 positiven T-Zellen (oberer Teil), in Tregs (mittlerer Teil) und in CD3 negativen Zellen (untere Teil) nach 21 Tagen Lebermetastaseninduktion in Wildtyp-Mäusen (*Il10ra^{wt/wt}Foxp3^{cre+}*) und in konditionelle Mäuse, in denen Tregs nicht den spezifischen IL-10 Rezeptor exprimieren (*Il10ra^{flox/flox}Foxp3^{cre+}*). Die Daten wurden mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Als nicht signifikant (ns) gilt der *p*-Wert > 0,05; *: *p* < 0,05, der durch den Mann-Whitney-U-Test berechnet wurde.

Die *in vivo* Daten aus Abbildung 30A belegen, dass PD-L1-defiziente Tiere vor der Lebermetastasierung geschützt sind, obwohl MC38 Darmkrebszellen selber PD-L1 exprimieren¹²⁹. Welche Immunzelle PD-L1 während der Lebermetastasierung exprimiert, ist nicht bekannt. Jedoch zeigte sich, dass in Mäusen, deren Tregs während der Lebermetastasierung nicht auf ein IL-10-Signal reagieren konnten, es tendenziell zu einer verminderten Expression von PD-L1 auf den CD3 negativen Zellen kommt (s. Abb. 30B). Welche spezifische CD3 negative Zelle hiervon betroffen ist, ist unklar.

Jedoch sind Mäuse mit IL-10-Rezeptor-defizienten myeloischen Zellen ($Il10ra^{flox/flox}Lysm^{cre+}$) ebenfalls vor der Metastasierung geschützt (s. Abb. 29A). Ob diese Befunde jedoch miteinander verknüpft sind, ist ebenfalls unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

3.6 Die Lebermetastasierung lässt sich mit einer IL-10-Rezeptor-blockade therapieren

Im letzten Schritt sollte ein finales „*Proof of Concept*“-Experiment durchgeführt werden. Ziel war es, die oben erhobenen Beobachtungen nicht nur zu verstärken, sondern auch die Wichtigkeit des IL-10-Signals während der Metastasierung hervorzuheben. Außerdem sollte der therapeutische Nutzen dieses Zytokins nochmals hervorgehoben werden. Daher wurde verifiziert, inwieweit eine Blockade des IL-10-Signals die Lebermetastasierung beeinflussen kann. Hierfür wurde das IL-10-Signal mit einem Antikörper gegen den IL-10RA für die gesamte experimentelle Dauer der Lebermetastaseninduktion unterbunden (s. Abb. 31).

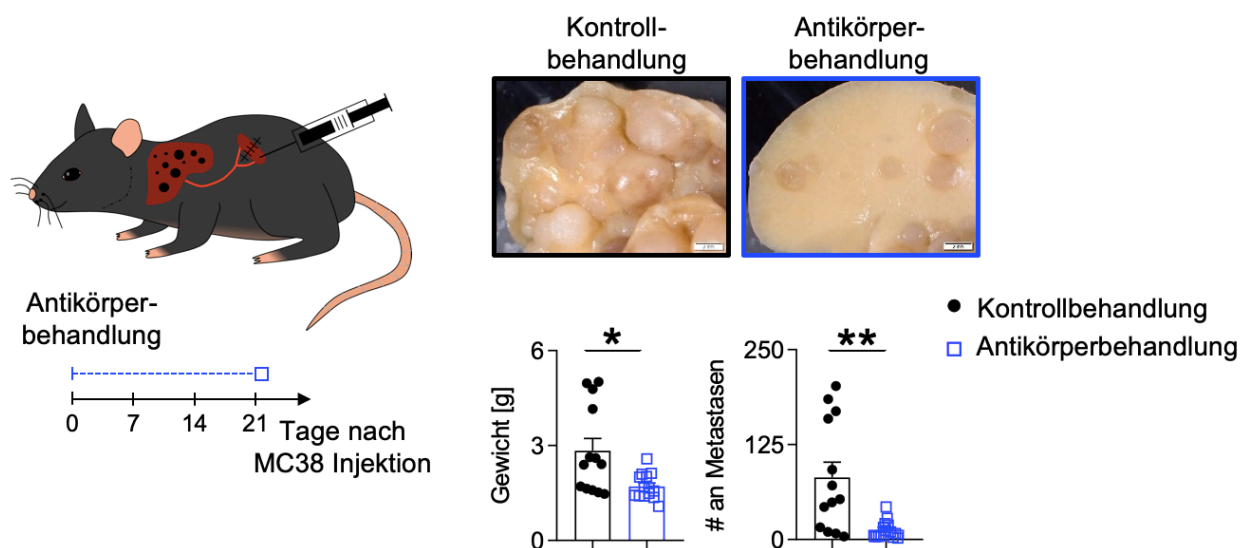


Abbildung 31: Ein IL-10-Rezeptor blockierender Antikörper schützt vor der Lebermetastasierung. Wildtyp Mäuse erhielten entweder eine Kontrollbehandlung oder eine Behandlung mit einem IL-10-Rezeptor-blockierenden Antikörper in einer Konzentration von 6 mg/kg Körpergewicht kurz vor der Lebermetastaseninduktion. Nach 21 Tagen wurde die Leber entnommen, das Gewicht der Leber bestimmt und die Lebermetastasen quantifiziert. Ein repräsentatives Bild ist hier abgebildet. Als signifikant (*) gilt der p -Wert $p < 0,05$; **: $p \leq 0,01$, der durch den Mann-Whitney-U-Test berechnet wurde.

Hierbei zeigt sich eindeutig, dass das Blockieren des IL-10-Signals die Lebermetastasierung in Mäusen signifikant reduziert. Angesichts dessen könnte eine zukünftige Behandlung gegen die Lebermetastasierung mit einem anti-IL-10-Rezeptor-Antikörper eine vielversprechende Option sein. Jedoch müssten hierfür diese vorläufigen Ergebnisse in humanen Studien validiert werden.

4 Diskussion

4.1 Die Rolle des Immunsystems bei Tumoren

Das Immunsystem besitzt eine entscheidende Rolle bei der Tumorbekämpfung. Ein intaktes Immunsystem erkennt entartete Zellen in unserem Körper und beseitigt diese. Dies lässt sich am besten an Patienten beobachten, deren Tumorinzidenzrate aufgrund der Gabe von immunsuppressiven Medikamenten steigt¹³⁰. Daraus kann geschlossen werden, dass das Immunsystem einen wesentlichen Einfluss bei der Bekämpfung von Entstehung und Wachstum maligner Zellen hat. Daher entwickeln Tumore Mechanismen, um sich vor dem Immunsystem zu schützen. Einer dieser Wege ist zum Beispiel ein Umfeld zu schaffen, in welches die Tumor-tötenden Zellen schwer vordringen können. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, Zellen zu rekrutieren, die die Immunantwort aktiv unterdrücken. Solche Zellen sind beispielsweise myeloide Suppressorzellen, TAMs oder Tregs¹³¹. Diese Zellen sind während einer gewöhnlichen Entzündungsreaktion wichtig, um das aktivierte Immunsystem wieder herunterzufahren, sodass eine Heilung des Gewebes stattfinden kann. Jedoch nutzen viele Tumore genau diese Zellen, um Abwehrmechanismen des Immunsystems zu unterdrücken, sodass der Tumor weiterwachsen kann. Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten zeigen, dass IL-10 trotz seiner Wirkung auf Primärtumore eine ambivalente Funktion während der Entstehung von Metastasen besitzt.

4.2 IL-10: Ein zweiseitiges Schwert

In den letzten Jahren konnten immer mehr Studien zeigen, dass viele Zytokine duale Effekte aufweisen. Ein Beispiel hierfür ist die Rolle von IL-22 beim CRC. IL-22 gehört ebenfalls zu der IL-10 Superfamilie und teilt sich einen Rezeptor mit IL-10¹³². Frühere Studien haben gezeigt, dass IL-22 die Tumorprogression im Darm sowohl fördern als auch unterbinden kann^{22,133–135}. Diese entgegengesetzten Effekte machen eine Einteilung des Zytokins schwierig und werden meistens kontrovers diskutiert. Weitere Ergebnisse zeigten jedoch, dass dieser ambivalente Effekt von IL-22 nicht nur vom verwendeten Tumormodell abhängig ist, sondern auch mit dem Zeitpunkt der IL-22-Blockade, bzw. Wirkung assoziiert ist^{22,136}. Inwieweit ein solcher ambivalenter Effekt auch auf IL-10 zutrifft und ob es zu unterschiedlichen Zeitpunkten verschiedene Funktionen ausübt, ist momentan unklar.

IL-10 ist dafür bekannt, eine starke Wirkung auf hämatopoetische Zellen auszuüben. Ein Effekt von IL-10 ist hierbei die Hemmung der Effektorfunktionen von T-Zellen oder Makrophagen⁶⁹⁻⁷¹. Zudem reguliert IL-10 das Wachstum und die Differenzierung von den verschiedensten Zellen des Immunsystems, kann aber auch auf Nicht-Immunzellen wirken⁶⁴⁻⁶⁶. Die Hauptfunktion von IL-10 ist hierbei die Unterdrückung oder das Beenden von Entzündungsreaktionen. Eine Studie aus den 1990er Jahren hat erstmalig einen unerwarteten Effekt von IL-10 bei der Tumorentstehung zeigen können¹⁰². Hier wurde IL-10 in Krebszellen überexprimiert und anschließend dessen Wirkung auf die Tumorprogression überprüft¹⁰². Diese Studien zeigten erstmals, dass das IL-10 das Wachstum von orthotopen Tumoren inhibiert. Eine Überexpression von IL-10 in den Krebszellen ist jedoch vergleichsweise artifiziell und damit wenig physiologisch. In den 1990er Jahren waren die Möglichkeiten, um grundlegende Mechanismen über den verstärkenden Einfluss von IL-10 auf das Immunsystem zu beschreiben, noch relativ limitiert. Dies änderte sich jedoch 2011. Mumm *et al.* beschrieben erstmalig, wie IL-10 die Tumorprogression in der Maus regulieren kann⁹⁴. Hier wurde deutlich, dass IL-10 auf CTLs wirkt und dabei die Expression von Granzym B und Interferon- γ fördert. Somit führte IL-10 in dieser Studie zu einer Tumorremission. Auch andere Studien konnten diesen protektiven Effekt von IL-10 bei der Karzinogenese in Maus und Mensch zeigen^{95,96,137}. Die in dieser Dissertation vorgelegten Ergebnisse können diesen Effekt ebenfalls bestätigen (s. Abb. 3). Diese Beobachtungen identifizierten IL-10 als ein neues vielversprechendes Therapeutikum für Krebspatienten. Dementsprechend wurde die Behandlung mit PEGyliertem IL-10 als Krebstherapie in mehreren klinischen Studien getestet^{97,99-101,138}. Unter anderem wurde in diesen kürzlich durchgeführten Studien, in welche Patienten mit verschiedenen Krebsarten wie Hautkrebs oder Nierenkrebs eingeschlossen wurden, von einem partiellen Ansprechen auf die IL-10-Behandlung berichtet^{97,98}. Erstaunlicherweise zeigte sich ebenfalls ein gutes Ansprechen auf eine IL-10-Therapie in der Kombination mit anti-PD-1-Antikörpern oder Tyrosinkinase-Inhibitoren in einer Kohorte von schwer behandelbaren Patienten¹³⁹. Interessanterweise verläuft die Therapie nicht bei allen Tumorentitäten erfolgsversprechend; bei einigen Tumoren hatte sich während der IL-10-Therapie der Krankheitsverlauf sogar verschlimmert⁹⁷. Mumm *et al.* nahmen damals an, dass die erhöhte Mortalität in Mäusen mit einer IL-10-Defizienz mit der Anzahl an Metastasen assoziiert sei, wiesen diese Vermutung jedoch nicht direkt nach⁹⁴. Zwar konnten andere Studien feststellen, dass IL-10 die

Metastasierung in die Lunge unterdrückt⁹⁵, jedoch streuen besonders gastrointestinale Tumore wie das CRC vermehrt in die Leber und weniger in die Lunge¹¹⁹. Fraglich ist zudem, ob IL-10 die Metastasierung in derselben Weise kontrolliert, wie den Primärtumor. Da die Funktion von IL-10 bei mCRC in die Leber noch unbekannt ist, sollte diese Funktion in dieser Dissertation ergründet werden. Diese wurde zunächst mit einem spontanen und einem forcierten Lebermetastasen-Modell untersucht. Bei der Anwendung des spontanen Modells mit Darmkrebszellen wuchs der Primärtumor in den *Il10^{-/-}* Mäusen so schnell, dass diese Mäuse aufgrund des Erfüllens der Abbruchkriterien vorzeitig euthanisiert werden mussten und sich zu diesem Zeitpunkt noch keine Metastasen entwickeln konnten (s. Abb. 3B und 3C). Darüber hinaus liegt durch eine schnellere Wachstumsgeschwindigkeit des Primärtumors eine größere Tumormasse und somit eine erhöhte Anzahl an Krebszellen vor. Dies hätte die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die tumor-fördernde Wirkung in den *Il10^{-/-}* Mäusen einen Effekt während der Metastasenentstehung maskiert hätte. Obwohl der natürliche Ursprung der LLC-Zellen nicht im Darm, sondern in der Lunge liegt, wurden dennoch diese Zellen eingesetzt, da das Wachstum des Primärtumors dieser Entität nicht von einer IL-10-Defizienz abhängig ist (s. Abb. 5B). Hier zeigte sich überraschenderweise, dass IL-10 die Lebermetastasierung von Lungenkarzinomen aus dem Caecum fördert (s. Abb. 5C). Um jedoch Rückschlüsse auf das Metastasierungsverhalten von Darmkrebszellen in Abhängigkeit von IL-10 zu ziehen, wurde ein forciertes Lebermetastasenmodell angewendet. Dieses Modell umgeht die ersten Schritte der Metastasierungskaskade und somit auch den Effekt von IL-10 auf den Primärtumor. Interessanterweise zeigte sich hier eine gleiche Wirkung von IL-10 während der Lebermetastasierung (s. Abb. 4) wie beim spontanen Modell (s. Abb. 5).

Da die Wildtyp-Mäuse und *Il10^{-/-}* Mäuse in getrennten Käfigen gehalten wurden, muss neben dem Genotyp auch das Mikrobiom berücksichtigt werden, welches die Lebermetastasierung hätte beeinflussen können. Beim Menschen zeigen bereits einige Ergebnisse, dass eine veränderte Darmflora die Entstehung von CRC begünstigen kann^{19,140}. Bakterien beeinflussen ebenfalls die Metastasierung in die Leber^{54,141,142}, welches entweder direkt oder indirekt geschieht. Das Bakterium *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) ist ein Beispiel für einen direkten Einfluss auf die Tumorprogression und Metastasierung. Es konnte gezeigt werden, dass *F. nucleatum* durch ein Protein auf seiner Oberfläche in Darmkrebszellen eindringen kann und die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen in

den Krebszellen induzieren kann¹⁴¹. Zudem war das Invasion- und Migrationspotential dieser Darmkrebszellen nach der Penetration des Bakteriums deutlich höher. Als Beispiel für einen indirekten Einfluss auf die Metastasierung sind die *Clostridium* Arten zu nennen⁵⁴. Diese Bakterien unterbinden die Rekrutierung von NKT-Zellen in die Leber, wodurch sowohl primäre Tumore als auch Metastasen begünstigt werden. Die Induktion von Lebermetastasen in teilweise IL-10-defizienten Wurfgeschwistern, welche in demselben Käfig untergebracht waren, ergab jedoch, dass der protektive Phänotyp in den *Il10*^{-/-} Mäusen nicht vom Mikrobiom abhängig ist, sondern tatsächlich vom Genotyp (s. Abb. 6). Interessanterweise deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass IL-10 die Bildung von Lebermetastasen fördert. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zur ebenfalls beschriebenen hemmenden Rolle von IL-10 bei der Krebsentstehung und Lungenmetastasierung^{94,95}.

Im Folgenden stellte sich die Frage nach der Ursache für diesen unterschiedlichen Effekt. Es ist bekannt, dass Mäuse mit einer IL-10-Defizienz in der Regel häufiger chronische Entzündungen wie beispielsweise eine Enterokolitis entwickeln⁷². Diese Enterokolitis zeichnet sich durch eine erhöhte Infiltration von pro-inflammatorischen Zellen in den Darm aus⁷⁴. Sowohl die infiltrierenden Zellen als auch ihre produzierten Zytokine sind in der Lage, einen systemischen Effekt auszuüben, wie z.B. auf die Leber. Die Leber ist nämlich nicht nur im ständigen Kontakt mit dem Darm, sondern stellt auch das Migrationsziel einiger Zellen aus dem Darm dar. Dies wurde bereits eindrucksvoll von Mathies *et al.* nachgewiesen¹⁴³. Die im Rahmen dieser Dissertation vorliegenden Daten deuten daraufhin, dass Mäuse mit IL-10-Defizienz, die in der Tierversuchsanstalt des UKE gehalten und dort via Embryotransfer importiert wurden, sowohl vor als auch während einer Lebermetastaseninduktion keine spontane Colitis entwickeln (s. Abb. 7). Deshalb wurde ihnen die Darmflora von *Rag*^{-/-} (*Yale*)-Mäusen transferiert. Diese Mäuse besitzen ein dysbiotisches, colitogenes Mikrobiom, das via Gavage auf andere Mäuse übertragen werden kann und dort die Entwicklung einer Colitis begünstigt. Die Colitis in der Wildtyp Maus fiel den Erwartungen zur Folge milder als in der *Il10*^{-/-} Maus aus (s. Abb. 8B). Jedoch blieb auch in diesem Experiment der Phänotyp weiterhin stabil (s. Abb. 8C). Insgesamt zeigt dieses Experiment, dass sich IL-10 unabhängig von dem Mikrobiom der Versuchsgruppen auf die Metastasierung in der Leber auswirkt. Jedoch liegt auch hier der initial beobachtete Effekt von IL-10 bei der Lebermetastasierung vor. In der Tat berichteten mehrere Studien, dass eine niedrige IL-10-Serumkonzentration mit einer besseren und einer hohen

Konzentrationen mit einer schlechteren Prognose beim CRC assoziiert sei, was auf eine pathogene Rolle von IL-10 in diesem Zusammenhang hindeutet^{144–146}. Auch vorläufige Ergebnisse aus einer humanen Studie suggerieren diesen pathogenen Effekt von IL-10 auf die Lebermetastasierung von CRC-Patienten¹⁴⁷. Unter anderem zeigen auch weitere Mausstudien mit murinen Melanomzelllinien, dass IL-10 die Metastasierung in die Leber fördert^{148,149}. Abgesehen davon konnte eine Phase-3-Studie (SEQUOIA), welche die Kombination einer IL-10-Behandlung mit FOLFOX (Folinsäure, 5-FU, Oxaliplatin) bei Patienten mit metastasierendem Bauchspeicheldrüsenkrebs untersuchte, keinen Vorteil gegenüber einer Therapie mit FOLFOX alleine feststellen¹³⁸. Unter der Berücksichtigung der oben angegebenen Studien weist die aktuelle Datenlage insgesamt darauf hin, dass die Immuntherapie mittels einer IL-10-Behandlung womöglich bei primären Tumoren wirksam ist, nicht jedoch bei Metastasen^{97–101,138}. Zudem legen diese Daten nahe, dass eine IL-10-Behandlung auch die Bildung und das Wachstum von Metastasen fördern könnte und damit das progressionsfreie Überleben beeinträchtigen könnte^{144–149}.

4.3 Wie IL-10 die Lebermetastasierung beeinflusst

Wie bereits erwähnt ist IL-10 maßgeblich an der Entwicklung von Krebs und Autoimmunerkrankungen beteiligt, wobei mehrere Zelltypen IL-10 produzieren können. Vor allem beim Primärtumor weisen Studien darauf hin, dass sowohl Makrophagen als auch Tregs durch ihre IL-10-Produktion die Tumorprogression begünstigen können. Welche Zellen bei der Metastasierung IL-10 produzieren, war bis zum jetzigen Zeitpunkt jedoch nicht bekannt. Durch die Verwendung einer Reportermaus konnte erstmalig beschrieben werden, welche Zelltypen IL-10 bei der Lebermetastasierung produzieren. Hier stellte sich heraus, dass es sich um CD4+FOXP3+ Tregs handelt, die die Hauptquelle von IL-10 darstellen (s. Abb. 11). Ebenfalls zeigte die tSNE-Analyse, die eine unvoreingenommen Analyse von FACS-Daten ermöglicht, dass nicht nur aktivierte FOXP3+PD-1+ Tregs IL-10 produzieren, sondern auch CD3 negative Zellen (s. Abb. 12). Die IL-10-Produktion in angeborenen und adaptiven Zellen wiederum bedarf eines Stimulus. Eine Möglichkeit, wie Makrophagen zur IL-10-Produktion angeregt werden können ist die Aufnahme von apoptotischen Zellen¹⁵⁰. Apoptotische Zellen sind Zellen, die in einem programmierten Zelltod verfallen, und im Gegensatz zu nekrotischen Zellen keine Entzündung

hervorrufen¹⁵¹. Unter anderem verfällt ein Teil der metastasierten Krebszellen sowohl in Nekrose als auch in Apoptose¹⁵¹. Das liegt unter anderem an den veränderten Bedingungen der neuen Umgebung, denen sie ausgesetzt sind. Dabei unterbindet die Apoptose eigentlich die Verbreitung von metastasierten Krebszellen. Unter anderem sind Makrophagen dafür bekannt, apoptotischen Zellen mit den Rezeptor-Tyrosinkinase, AXL und MERTK aufzunehmen und so zu eliminieren¹⁵². Jedoch könnte eine erhöhte Aufnahme von apoptotischen Zellen eine Metastasierung ebenfalls begünstigen. Diese Annahme beruht darauf, dass bei der Phagozytose von apoptotischen Zellen sowohl TGF- β als auch IL-10 von Makrophagen freigesetzt werden^{153–155}. Diese beiden Faktoren sind weitestgehend dafür bekannt die Entstehung und das Überleben von Tregs zu fördern^{78,156}. Es wurde ebenfalls interessanterweise beschrieben, dass von Tregs und Makrophagen produziertes IL-10 eine zentrale Rolle bei der Induktion einer hepatischen Toleranz spielt und damit extrahepatische Entzündungsreaktionen und Autoimmunerkrankungen herunterreguliert werden¹⁵⁷. Durch die Verwendung von Mäusen mit IL-10-defizienten Tregs (*Il10^{flox/flox}Foxp3^{cre+}*) oder IL-10-defizienten myeloischen Zellen (*Il10^{flox/flox}Lysm^{cre+}*) wurde festgestellt, dass nur das von Tregs und nicht das von Makrophagen und anderen myeloischen Zellen produzierte IL-10 maßgeblich an der Lebermetastasierung beteiligt ist (s. Abb. 13 und 14). Der Phänotyp in den *Il10^{flox/flox}Lysm^{cre+}* Mäusen ist hierbei besonders interessant, da dieser eigentlich einen Primärtumor begünstigt¹³¹. Dies lässt vermuten, dass Faktoren, die die Entstehung von Primärtumoren beeinflussen, folglich nicht unbedingt immer auch an der Entstehung und dem Wachstum von Metastasen beteiligt sind. Interessant zu beobachten war zudem, dass Tregs erst in der letzten Phase der Metastasierungskaskade expandieren, jedoch bereits vorher die Produktion von IL-10 hochregulieren (s. Abb. 15) und somit schon früher den größten Anteil der IL-10-Produzenten bilden. Ob es sich hierbei um nTregs oder pTregs handelt, ist soweit nicht klar. Generell lassen sich nTregs mit pTregs bis auf ihren Entstehungsort und ihre Differenzierung nur schwer unterscheiden. Für die Unterscheidung dieser beiden Klassen sind die zuvor verkündeten Marker Helios und Neuropilin-1 nicht ausreichend^{84,158,159}. Dennoch liegt die Vermutung nahe, dass es sich um pTregs handeln könnte. Das liegt unter anderem daran, dass die Leber über die Portalvene im ständigen Kontakt mit Fremd-Antigenen aus dem Darm ist und somit pTregs fördert. Des Weiteren können Krebszellen direkt TGF- β ausscheiden oder indirekt freisetzen,

z.B. aus der metastatischen Nische¹⁶⁰. Damit wird die Differenzierung von naiven T-Zellen zu pTregs begünstigt⁸⁵⁻⁸⁷.

Krebszellen durchlaufen nach der Extravasation in einem neuen Organ eine Immuneditionierung. Eine Immuneditionierung wurde erstmals 2002 von Dunn *et al.* beschrieben und verläuft in den drei Phasen Eliminierung, Equilibrium und Entkommen¹⁶¹. In diesen drei Phasen werden verschiedenste Zellen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems aktiviert, die die Progression des Tumors überwachen und regulieren. In der ersten Phase (Eliminierung) wird der Großteil der Tumorzellen zerstört. Jedoch überleben einige wenige Krebszellen diesen Angriff und verhalten sich im Folgenden ruhig (Equilibrium). In der dritten Phase wachsen die dem Immunsystem entkommenen Tumore konstant (Entkommen). Beim Wachstum von Tumoren ist ein immunsuppressives Umfeld besonders vorteilhaft. Eine Unterdrückung des Immunsystems ist ein natürlicher Vorgang und physiologisch sehr wichtig, damit das Gewebe nach einer Entzündungsreaktion regenerieren kann. Beim Krebs wirkt sich dieser Vorgang jedoch nachteilig aus. Da es nach der Extravasation zu einem erhöhten Absterben von Krebszellen kommt, liegen folglich erhöhte pro-inflammatorische Signale vor, die unter anderem IL-10-produzierende Tregs induzieren können. Vermutlich unterstützen diese IL-10-produzierenden Tregs das Überleben der Metastasen auf eine indirekte Weise, indem deren IL-10 auf Zellen des Immunsystems wirkt und somit den Übergang von der Equilibrium-Phase zur letzten Phase fördert. In dieser letzten Phase fließen weitere Faktoren ein, die nicht nur die Krebszellen vor der Immunüberwachung schützen, sondern auch deren Progression fördern.

Unterschiedliche Krebsarten streuen in den verschiedensten Organen. Das CRC streut häufig in die Leber; aber auch andere Tumorentitäten wie Lungenkrebs, Brustkrebs oder Hautkrebs können unter Umständen in die Leber metastasieren^{119,160}. Dies deutet darauf hin, dass die Leber eine hohe Anfälligkeit dafür besitzt, Metastasen zu bilden. Obwohl die hauptsächliche Leberfunktion der Stoffwechsel ist, weisen vermehrt Daten darauf hin, dass die Leber ähnlich wie ein lymphatisches Organ fungiert¹⁶². So kann die Leber beispielsweise eine systemische Toleranz induzieren¹⁶³. Hierbei leisten die nicht-konventionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC), wie beispielsweise die LSECs, einen wichtigen Beitrag¹⁶³. LSECs haben neben ihren eigentlichen physiologischen Funktionen als endotheliale Barriere überraschenderweise auch eine immunologische Funktion¹⁶⁴. So können sie beispielsweise Antigene

auf MHC-I und MHC-II präsentieren und hierdurch eine Toleranz einleiten¹⁶⁵. Zudem exprimieren sie auch Immun-Checkpoint Inhibitoren, wie PD-L1 auf ihrer Oberfläche¹⁶⁶. Des Weiteren spielen sie auch eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten in die Leber, wodurch sie die Lebermetastasierung beeinflussen können⁵⁴. Da IL-10 zum Teil die Expression dieser Immun-Checkpoint Inhibitoren und anderer ko-stimulatorischer Proteine in konventionellen APC reguliert, wurde geschaut, ob IL-10 auch eine Signalweiterleitung in LSECs induziert und damit Auswirkungen auf die Lebermetastasierung hat. Die Daten aus dieser Arbeit zeigen, dass LSEC prinzipiell auf IL-10 reagieren können (s. Abb. 20 und 21), diese Interaktion jedoch nur einen marginalen Effekt auf die Lebermetastasierung hat (s. Abb. 23). Da die Bildung von Metastasen in einem direkten Zusammenhang mit einer effizienten Extravasation steht, wurde ebenfalls überprüft, ob IL-10 das Extravasationsverhalten beeinflussen kann. Dies war nicht der Fall (s. Abb. 22). Das bedeutet, dass sich der Effekt von IL-10 auf LSECs nicht auf ein verändertes Extravasationsverhalten zurückzuführen lässt. Da der Verlust des IL-10-Signals in LSECs nur einen kleinen Unterschied bei der Lebermetastasenlast zeigt, wurde der Fokus auf Tregs und CD3 negative Zellen gelegt, welche den IL-10-Rezeptor am stärksten exprimieren (s. Abb. 18 und 19). Hier zeigte sich bei der Lebermetastasierung ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp-Mäusen und Mäusen mit IL-10-Rezeptor-defizienten Tregs bzw. myeloischen Zellen, nicht jedoch in Mäusen mit IL-10-Rezeptor-defizienten DCs (s. Abb. 24 und 29). Das bedeutet, dass das hauptsächlich von Tregs produzierte IL-10 nicht nur auf Tregs selbst wirkt, sondern auch auf myeloische Zellen. Ob diese Beobachtungen aus den zwei konditionellen Mauslinien eventuell sogar verknüpft werden können, ist zu jetzigem Zeitpunkt noch nicht klar. Jedoch hat der beobachtete Effekt der IL-10-Signaltransduktion in Tregs eine besondere Bedeutung. Dieser führte zu der Hypothese, dass die beiden Phänotypen tatsächlich in Verbindung stehen. In den Tregs wird nämlich ein simples Regulationsmodell (Feed-Forward-Loop) vermutet, dass bereits für den Darm gezeigt wurde⁷⁸. Durch ein empfangenes IL-10 Signal wird das Überleben sowie die Stabilität der Tregs gesteigert, das wiederum zu einer erhöhten Produktion von IL-10 in diesen Tregs führt⁷⁸. Dieser Mechanismus konnte auch in hepatischen Tregs festgestellt werden (s. Abb. 26). Dies verstärkt daher den Verdacht, dass es sich hierbei um einen additiven Effekt handeln könnte, bei dem die Tregs nicht die endgültigen IL-10-Zielzellen sind. Vielmehr würde durch eine IL-10-Amplifikation eine immunsuppressive Wirkung auf eine andere Zellpopulation

ausgeübt, welche dann folglich die Lebermetastasierung begünstigen würde. Eine mögliche Zielzellpopulation wären die T_H17 Zellen. T_H17 Zellen beeinflussen unter anderem die Metastasierung in Leber und Lunge^{30,123}. Da das von Tregs produzierte IL-10 nicht nur die Funktion von Tregs, sondern auch von T_H17 Zellen regulieren kann^{75,77,78}, wurde in einem ersten Schritt überprüft, ob T_H17 Zellen während der Lebermetastasierung verstärkt aufzufinden sind und in welchem Umfang das IL-10-Signal diese Zellen bei der Lebermetastasierung zu beeinflussen vermag. Nach der Induktion von Lebermetastasen kam es zu einer erhöhten Anhäufung von T_H17 Zellen, die entweder IL-17 produzierten oder es produziert hatten (s. Abb. 27). Jedoch hatte der Verlust des IL-10-Signals in diesen T_H17 Zellen keine Auswirkungen auf die Lebermetastasierung (s. Abb. 28).

Die Untersuchung der Rolle von PD-L1 wurde in der Vergangenheit in der Regel auf Primärtumore beschränkt, die zeigten, dass Krebszellen diesen Liganden exprimieren¹⁶⁷. Dabei wurde davon ausgegangen, dass Tumorzellen PD-L1 exprimieren und sich so der Immunüberwachung entziehen können. Daher können Tumorpatienten, bei denen dieser ICI vorliegt, von einer Antikörper-Therapie profitieren. Dennoch überrascht die Beobachtung an Tumorpatienten, die auf eine PD-L1-Antikörper-Therapie ansprechen, obwohl deren Tumor kein PD-L1 exprimiert¹²⁵. Das impliziert, dass eine PD-L1-Antikörper-Therapie auch indirekt auf PD-L1 negative Tumorzellen wirken kann. Neue Erkenntnisse zeigen tatsächlich, dass PD-L1, wenngleich im gesunden Zustand in Immunzellen und Gewebszellen nur begrenzt exprimiert, bei einer Entzündung hochreguliert werden kann¹⁶⁸. Dabei wird davon ausgegangen, dass PD-L1, welches am stärksten von APCs exprimiert wird, in der *trans*-Form an PD-1 von T-Zellen bindet und so die Effektorfunktion von T-Zellen dämpft¹²⁸. Es wurde aber ebenfalls *in vitro* herausgefunden, dass PD-L1 nicht nur an PD-1 bindet, sondern auch an CD80^{169,170}. Dabei bindet PD-L1 beide Moleküle auch in der *cis*-Form^{169,170}. Die funktionelle Bedeutung der *cis*-Bindungsform wurde schließlich auch *in vivo* in Tumormodellen gezeigt¹⁷¹. Demnach ist der Mechanismus, durch den PD-L1 die Immunantwort beeinflussen kann, weitaus komplizierter als gedacht. Neben den Tumorzellen exprimieren auch T-Zellen und APCs wie DCs oder Makrophagen PD-L1^{128,172,173}. In dieser Dissertation wurde daher zunächst überprüft, ob die Expression von PD-L1 auf den Wirtszellen, Metastasen in der Leber beeinflussen kann. Es stellte sich heraus, dass PD-L1-defizienten Mäusen vor einer Lebermetastasierung geschützt waren (s. Abb. 30A), obwohl die injizierte MC38-

Zelllinie bekanntlich PD-L1 exprimiert und PD-L1 positive Exosome sekretieren kann¹²⁹. Trotzdem war dieser beobachtete Effekt wenig überraschend, da bereits postuliert wurde, dass die Wirksamkeit einer PD-L1-Antikörper-Therapie von der Expression dieses Proteins auf den APCs abhängig ist und weniger von dessen Expression auf den MC38-Tumorzellen¹⁷³. Da Studien bereits gezeigt haben, dass IL-10 die Expression von PD-L1 auf Monozyten reguliert, wurde vermutet, dass dies auch bei der Lebermetastasierung der Fall ist^{127,174}. Daher wurde *in vivo* überprüft, inwieweit ein fehlender *feedback-forward loop* von Treg-produziertem IL-10 die Expression von PD-L1 in T-Zellen oder APCs regulieren kann (s. Abb. 30B). Es wurde herausgefunden, dass bei der Lebermetastasierung in Mäusen, deren Tregs keinen IL-10 Rezeptor besaßen, eine verminderte Expression von PD-L1 in den APCs vorlag (s. Abb. 30B, unterer Abschnitt). Diese Reduktion von PD-L1 konnte jedoch nicht in den T-Zellen nachgewiesen werden (s. Abb. 30B, oberer Abschnitt). Da die Inhibierung des IL-10-Signals nur in den myeloischen Zellen, nicht aber in den DCs einen Phänotyp hervorruft, wird vermutet, dass IL-10 die Expression von PD-L1 in Makrophagen hochreguliert und somit die Metastasenentstehung fördert. Zuletzt konnte auch gezeigt werden, dass eine Blockierung des IL-10-Signals nach einer primären Tumorresektion einen neuen Therapieansatz darstellen könnte, da diese Blockade vor der Lebermetastasierung in der Maus schützt (s. Abb. 31). Erste Erkenntnisse aus humanen Studien an CRC-Patienten mit Lebermetastasen verstärken diese Annahme¹⁴⁷. Die nächste Herausforderung besteht nun darin, weitere Mechanismen zu ergründen, durch welche IL-10 seine pathogenen Eigenschaften während der Lebermetastasierung bewirkt. Dies kann letztendlich dazu beitragen, neue zielgerichtete Medikamente zu entwickeln und erfolgreiche klinische Strategien zu etablieren.

5 Ausblick

Für den Menschen ist der Krebs immer noch einer der größten Todesursachen. Dabei assoziieren leider viele Menschen mit der Diagnose Krebs immer noch Hoffnungslosigkeit. Die Erkenntnisse der letzten Jahrzehnte in der Onkologie, Immunbiologie, Pharmakologie, Molekularbiologie als auch in der Bildgebung führten zu weitläufigen Fortschritten in der präklinischen und translationalen Forschung. Dank dieser Fortschritte befindet sich die heutige Krebsforschung in den Anfängen einer personalisierten Medizin. Durch die neuartigen Krebstherapien leben Krebspatienten nicht nur länger, sondern haben auch eine deutlich verbesserte Lebensqualität und diese wiederum verstärkt die Hoffnung auf eine Heilung.

Bei vielen Krebsarten, wie das maligne Melanom oder das CRC ist der primäre Tumor nicht das Hauptproblem. In vielen Fällen kann dieser aus dem Körper vollständig reseziert werden. Dennoch entwickeln diese Patienten nach vielen Jahren Metastasen, was darauf hindeutet, dass sich diese Tumorzellen bereits vor der Diagnose ausgebreitet haben. Die Behandlung von Metastasen ist immer noch für Onkologen sehr herausfordernd und kompliziert. Einerseits bekämpft das Immunsystem diese Tumore und andererseits hilft es ihm bei der Ausbreitung. Hier leisten Zytokine einen entscheidenden Beitrag zur Regulierung unterschiedlichster biologischer Funktionen. Unter ihnen hat das IL-10 bei der Regulierung der Immunantwort sowie bei Entzündungsprozessen eine Schlüsselfunktion. In der Tumorummunologie scheint dieses Zytokin jedoch „zweigleisig“ zu fahren. In Hinblick auf den Primärtumor wirkt es gegen den Tumor und fördert die Bekämpfung des Tumors indem es auf CTL wirkt. Bei der Metastasierung wirkt es gegenteilig und fördert die Entstehung indem es verstärkt auf Tregs und Makrophagen wirkt. Zwar konnte die Expression von PD-L1 die Metastasierung entscheidend beeinflussen, jedoch müssen weitere Studien letztendlich den *in vivo* Beweis liefern, ob dies in Abhängigkeit zum IL-10 steht. Insgesamt deuten diese Daten aber auf eine pathogene Eigenschaft des IL-10 bei der Lebermetastasierung hin. Diese Wirkung steht im Gegensatz zu seinem Effekt beim Primärtumor. Es sollte daher weiter überprüft werden, in wieweit dieser Effekt von IL-10 auf die Metastasierung auf andere Krebsarten zutrifft oder ob die Leber eventuell mit seiner Fähigkeit zur Induktion einer Immuntoleranz häufiger von Metastasen betroffen ist als andere Organe.

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
APC	Antigenpräsentierenden Zellen
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CIMP	<i>CpG Island Methylation Phenotype</i>
CIN	Chromosomale Instabilität
CRC	Kolorektales Karzinom (engl. <i>colorectal cancer</i>)
CTC	Zirkulierende Tumorzelle (engl. <i>circulating tumor cell</i>)
CTL	Zytotoxische T-Zelle (engl. <i>cytotoxic T lymphocyte</i>)
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4</i>
CU	Colitis ulcerosa
DC	Dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
<i>et al.</i>	und andere (lateinisch: <i>et alii</i>)
EV	Extrazelluläre Vesikel
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FBS	Fetales Kälberserum
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HNPCC	Hereditäres nicht-Polyposis-assoziiertes kolorektales Karzinom
IL	Interleukin
ILCs	Innate lymphoide Zellen
KIR	<i>Killer cell immunoglobulin-like receptor</i>
KO	<i>Knock-Out</i>
LLC	Lewis Lungenkarzinom
LSEC	Lebersinusoidale Endothelzellen
MACS	Magnetisch aktivierte Zellsortierung
MC38	<i>Murine Carcinoma</i> (Darmkrebszellen)
mCRC	Metastasierendes CRC
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>
MHC-I/-II	Haupthistokompatibilitätskomplex-I bzw. -II
MET	Mesenchymale-epitheliale-Transition

MSI	Mikrosatelliteninstabilität
NCR	<i>Natural cytotoxicity receptors</i>
NP40	Nonidet P40
NK	Natürlichen Killerzellen
Ns	Nicht signifikant
nTreg	Natürliche regulatorische T-Zelle
n.w.	nicht nachweisbar
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
PFA	Formaldehyd
pTreg	Periphere regulatorische T-Zelle
RFP	Rot-fluorzierendes Protein
qPCR	Quantitative PCR
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
STAT3	<i>Signal transducers and activators of transcription 3</i>
TAM	<i>Tumor-associated macrophages</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
Treg	Regulatorischen T-Zellen
tSNE	<i>t-distributed stochastic neighbor embedding</i>
VE-Wasser	Demineralisiertes Wasser
YFP	Gelb-fluorzierendes Protein

Referenzen

1. Adam, R., Hoti, E., Folprecht, G. & Benson, A. B. Accomplishments in 2008 in the management of curable metastatic colorectal cancer. *Gastrointest. Cancer Res.* **3**, S15-22 (2009).
2. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* **136**, E359–E386 (2015).
3. Vrieling, A. & Kampman, E. Review Article The role of body mass index , physical activity , and diet in colorectal cancer recurrence and survival : a review of the literature 1 – 4. *Am. J. Clin. Nutr.* **92**, 471–491 (2010).
4. Renehan, A. G., Tyson, M., Egger, M., Heller, R. F. & Zwahlen, M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* **371**, 569–78 (2008).
5. Messina, C. R., Lane, D. S. & Anderson, J. C. Perceptions of risk factors for colorectal cancer and colorectal cancer risk-related behaviors among current, ex-, and nonsmokers. *J. Cancer Educ.* **28**, 444–453 (2013).
6. Gong, J. *et al.* Genome-Wide Interaction Analyses between Genetic Variants and Alcohol Consumption and Smoking for Risk of Colorectal Cancer. *PLoS Genet.* **12**, e1006296 (2016).
7. Xu, X. *et al.* Red and processed meat intake and risk of colorectal adenomas: A meta-analysis of observational studies. *Int. J. Cancer* **132**, 437–448 (2013).
8. Flood, D. M. *et al.* Colorectal cancer incidence in Asian migrants to the United States and their descendants. *Cancer Causes Control* (2000). doi:10.1023/A:1008955722425
9. Centelles, J. J. General aspects of colorectal cancer. *ISRN Oncol.* **2012**, 139268 (2012).
10. RKI and GEKID. *Cancer in Germany 2015/2016. 12th edition.* (2020).
11. Chen, C., Stock, C., Hoffmeister, M. & Brenner, H. Public health impact of colonoscopy use on colorectal cancer mortality in Germany and the United States. *Gastrointest. Endosc.* **87**, 213-221.e2 (2018).
12. SEER Cancer Statistics Review 1975-2013 National Cancer Institute. 1992–2013 (2016).
13. Wood, L. D. *et al.* The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* **318**, 1108–1113 (2007).
14. Fearon, E. R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*

- 61**, 759–767 (1990).
15. Demagny, H. & De Robertis, E. M. Point mutations in the tumor suppressor Smad4/DPC4 enhance its phosphorylation by GSK3 and reversibly inactivate TGF- β signaling. *Mol. Cell. Oncol.* **3**, e1025181 (2016).
 16. Prasad, M. A. & Barbara, J. Microsatellite Instability and Intestinal Tumorigenesis. *Intestinal Tumorigenesis: Mechanisms of Development & Progression. Springer International Publishing* **53**, 29–53 (2015).
 17. Kawasaki, T. *et al.* CpG island methylator phenotype-low (CIMP-low) colorectal cancer shows not only few methylated CIMP-high-specific CpG islands, but also low-level methylation at individual loci. *Mod. Pathol.* **21**, 245–255 (2008).
 18. Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* **31**, 107–133 (1977).
 19. Gagliani, N., Hu, B., Huber, S., Elinav, E. & Flavell, R. A. The fire within: Microbes inflame tumors. *Cell* **157**, 776–783 (2014).
 20. Kulaylat, M. N. & Dayton, M. T. Ulcerative colitis and cancer. *J. Surg. Oncol.* **101**, 706–712 (2010).
 21. Jiang, R. *et al.* IL-22 is related to development of human colon cancer by activation of STAT3. *BMC Cancer* **13**, 59 (2013).
 22. Huber, S. *et al.* IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature* **491**, 259–263 (2012).
 23. Grivennikov, S. I. *et al.* Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature* **491**, 254–258 (2012).
 24. Perez, L. G. *et al.* TGF- β signaling in Th17 cells promotes IL-22 production and colitis-associated colon cancer. *Nat. Commun.* (2020). doi:10.1038/s41467-020-16363-w
 25. Wang, K. *et al.* Interleukin-17 receptor a signaling in transformed enterocytes promotes early colorectal tumorigenesis. *Immunity* (2014). doi:10.1016/j.immuni.2014.11.009
 26. Wang, Q., Feng, M., Yu, T., Liu, X. & Zhang, P. Intratumoral regulatory T cells are associated with suppression of colorectal carcinoma metastasis after resection through overcoming IL-17 producing T cells. *Cell. Immunol.* (2014). doi:10.1016/j.cellimm.2014.01.002
 27. Wang, X. *et al.* IL-17 constrains natural killer cell activity by restraining IL-15-driven cell maturation via SOCS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2019).

- doi:10.1073/pnas.1904125116
28. Mitchell, A. *et al.* A chemokine/chemokine receptor signature potentially predicts clinical outcome in colorectal cancer patients. *Cancer Biomarkers* **26**, 291–301 (2019).
 29. Tseng, J. Y. *et al.* Interleukin-17A modulates circulating tumor cells in tumor draining vein of colorectal cancers and affects metastases. *Clin. Cancer Res.* (2014). doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-2162
 30. Kryczek, I., Wei, S., Szeliga, W., Vatan, L. & Zou, W. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood* **114**, 357–359 (2009).
 31. Massagué, J. & Obenauf, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature* **529**, 298–306 (2016).
 32. Gomez-Cuadrado, L., Tracey, N., Ma, R., Qian, B. & Brunton, V. G. Mouse models of metastasis: Progress and prospects. *DMM Disease Models and Mechanisms* (2017). doi:10.1242/dmm.030403
 33. Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation* (2009). doi:10.1172/JCI39104
 34. Bednarz-Knoll, N., Alix-Panabières, C. & Pantel, K. Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. *Cancer Metastasis Rev.* (2012). doi:10.1007/s10555-012-9370-z
 35. Ganesh, K. *et al.* L1CAM defines the regenerative origin of metastasis-initiating cells in colorectal cancer. *Nat. Cancer* (2020). doi:10.1038/s43018-019-0006-x
 36. Nash, G. F., Turner, L. F., Scully, M. F. & Kakkar, A. K. Platelets and cancer. *Lancet Oncol.* **3**, 425–430 (2002).
 37. Gupta, G. P. & Massagué, J. Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell* **127**, 679–695 (2006).
 38. Kienast, Y. *et al.* Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat. Med.* (2010). doi:10.1038/nm.2072
 39. Chambers, A. F., C.Groom, A. & C.MacDonald, I. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 563–572 (2002).
 40. Pantel, K. & Brakenhoff, R. H. Dissecting the metastatic cascade. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 448–456 (2004).
 41. Tkach, M., Kowal, J. & Théry, C. Why the need and how to approach the functional diversity of extracellular vesicles. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*

- (2018). doi:10.1098/rstb.2016.0479
42. Van Niel, G., D'Angelo, G. & Raposo, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2018). doi:10.1038/nrm.2017.125
 43. Hoshino, A. *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* (2015). doi:10.1038/nature15756
 44. Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R. & Weinberg, R. A. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* (2017). doi:10.1016/j.cell.2016.11.037
 45. Luzzi, K. J. *et al.* Multistep nature of metastatic inefficiency: Dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am. J. Pathol.* (1998). doi:10.1016/S0002-9440(10)65628-3
 46. Topalian, S. L. *et al.* Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N. Engl. J. Med.* (2012). doi:10.1056/nejmoa1200690
 47. Brahmer, J. R. *et al.* Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *N. Engl. J. Med.* (2012). doi:10.1056/nejmoa1200694
 48. Oh, D. Y. & Bang, Y. J. HER2-targeted therapies — a role beyond breast cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology* (2020). doi:10.1038/s41571-019-0268-3
 49. Boon, T., Cerottini, J. C., Van Den Eynde, B., Van Der Bruggen, P. & Van Pel, A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annual Review of Immunology* (1994). doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.002005
 50. Chen, D. S. & Mellman, I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity* (2013). doi:10.1016/j.immuni.2013.07.012
 51. Seaman, W. E., Sleisenger, M., Eriksson, E. & Koo, G. C. Depletion of natural killer cells in mice by monoclonal antibody to NK-1.1. Reduction in host defense against malignancy without loss of cellular or humoral immunity. *J. Immunol.* (1987).
 52. Chiossone, L., Dumas, P. Y., Vienne, M. & Vivier, E. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nature Reviews Immunology* (2018). doi:10.1038/s41577-018-0061-z
 53. Vivier, E. *et al.* Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* (2011). doi:10.1126/science.1198687
 54. Ma, C. *et al.* Gut microbiome-mediated bile acid metabolism regulates liver cancer via NKT cells. *Science* (80-.). (2018). doi:10.1126/science.aan5931
 55. Coffelt, S. B. *et al.* IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to

- promote breast cancer metastasis. *Nature* (2015). doi:10.1038/nature14282
56. Chien, Y. H., Meyer, C. & Bonneville, M. $\gamma\delta$ T cells: First line of defense and beyond. *Annual Review of Immunology* (2014). doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120216
 57. Brentjens, R. J. *et al.* Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood* (2011). doi:10.1182/blood-2011-04-348540
 58. Cho, J. H., Collins, J. J. & Wong, W. W. Universal Chimeric Antigen Receptors for Multiplexed and Logical Control of T Cell Responses. *Cell* (2018). doi:10.1016/j.cell.2018.03.038
 59. Fiorentino, D. F., Bond, M. W. & Mosmann, T. R. Two types of mouse t helper cell: IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* (1989). doi:10.1084/jem.170.6.2081
 60. Powell, M. J., Thompson, S. A. J., Tone, Y., Waldmann, H. & Tone, M. Posttranscriptional Regulation of IL-10 Gene Expression Through Sequences in the 3'-Untranslated Region. *J. Immunol.* (2000). doi:10.4049/jimmunol.165.1.292
 61. Ouyang, W. & O'Garra, A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity* **50**, 871–891 (2019).
 62. Zdanov, A. *et al.* Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon γ . *Structure* (1995). doi:10.1016/S0969-2126(01)00193-9
 63. Josephson, K., Logsdon, N. J. & Walter, M. R. Crystal structure of the IL-10/IL-10R1 complex reveals a shared receptor binding site. *Immunity* (2001). doi:10.1016/S1074-7613(01)00169-8
 64. Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. & O'Garra, A. Interleukin -10 and the Interleukin -10 Receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 683–765 (2001).
 65. Denning, T. L. *et al.* Expression of IL-10 receptors on epithelial cells from the murine small and large intestine. *Int. Immunol.* (2000). doi:10.1093/intimm/12.2.133
 66. Kominsky, D. J. *et al.* IFN- γ -Mediated Induction of an Apical IL-10 Receptor on Polarized Intestinal Epithelia. *J. Immunol.* (2014). doi:10.4049/jimmunol.1301757
 67. Sonnenberg, G. F., Fouser, L. A. & Artis, D. *Functional biology of the IL-22-IL-*

- 22R pathway in regulating immunity and inflammation at barrier surfaces. Advances in Immunology* **107**, (Elsevier Inc., 2010).
68. Couper, K. N., Blount, D. G. & Riley, E. M. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *J. Immunol.* **180**, 5771–5777 (2008).
 69. René de Waal, M. *et al.* Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J. Exp. Med.* **174**, 915–924 (1991).
 70. Fiorentino, D. F. *et al.* IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.* **147**, 3815–3822 (1991).
 71. Ip, W. K. E., Hoshi, N., Shouval, D. S., Snapper, S. & Medzhitov, R. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science (80-.)*. **356**, 513–519 (2017).
 72. Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. & Müller, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75**, 263–274 (1993).
 73. Engelhardt, K. R. & Grimbacher, B. IL-10 in humans: lessons from the gut, IL-10/IL-10 receptor deficiencies, and IL-10 polymorphisms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **380**, 1–18 (2014).
 74. Berg, D. J. *et al.* Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4⁺ Th1-like responses. *J. Clin. Invest.* **98**, 1010–1020 (1996).
 75. Huber, S. *et al.* Th17 Cells Express Interleukin-10 Receptor and Are Controlled by Foxp3⁻ and Foxp3⁺ Regulatory CD4⁺ T Cells in an Interleukin-10-Dependent Manner. *Immunity* **34**, 554–565 (2011).
 76. Groux, H. *et al.* A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**, 737–742 (1997).
 77. Kamanaka, M. *et al.* Memory/effector (CD45RB^{lo}) CD4 T cells are controlled directly by IL-10 and cause IL-22-dependent intestinal pathology. *J. Exp. Med.* **208**, 1027–1040 (2011).
 78. Chaudhry, A. *et al.* Interleukin-10 Signaling in Regulatory T Cells Is Required for Suppression of Th17 Cell-Mediated Inflammation. *Immunity* **34**, 566–578 (2011).
 79. Zhu, J., Yamane, H. & Paul, W. E. Differentiation of effector CD4⁺ T cell populations. *Annual Review of Immunology* (2010). doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101212

80. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* (1995).
81. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* (2003). doi:10.1126/science.1079490
82. JD, F., MA, G. & AY, R. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* (2003).
83. Elkord, E. Thymus-derived, peripherally derived, and in vitro-induced T regulatory cells. *Frontiers in Immunology* (2014). doi:10.3389/fimmu.2014.00017
84. Lin, X. *et al.* Advances in distinguishing natural from induced Foxp3+ regulatory T cells. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* (2013).
85. Davidson, T. S., DiPaolo, R. J., Andersson, J. & Shevach, E. M. Cutting Edge: IL-2 Is Essential for TGF- β -Mediated Induction of Foxp3 + T Regulatory Cells . *J. Immunol.* (2007). doi:10.4049/jimmunol.178.7.4022
86. Marie, J. C., Letterio, J. J., Gavin, M. & Rudensky, A. Y. TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4 +CD25+ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* (2005). doi:10.1084/jem.20042276
87. Huber, S. *et al.* Cutting Edge: TGF- β Signaling Is Required for the In Vivo Expansion and Immunosuppressive Capacity of Regulatory CD4 + CD25 + T Cells . *J. Immunol.* (2004). doi:10.4049/jimmunol.173.11.6526
88. Chen, W. J. *et al.* Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *J. Exp. Med.* (2003). doi:10.1084/jem.20030152
89. Selvaraj, R. K. & Geiger, T. L. A kinetic and dynamic analysis of Foxp3 induced in T cells by TGF- β . *J. Immunol.* (2007). doi:10.4049/jimmunol.179.2.1390-b
90. Horwitz, D. A., Zheng, S. G., Wang, J. & Gray, J. D. Critical role of IL-2 and TGF- β in generation, function and stabilization of Foxp3+ CD4+ Treg. *European Journal of Immunology* (2008). doi:10.1002/eji.200738109
91. Bennett, C. L. *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* (2001). doi:10.1038/83713
92. Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L. & Powrie, F. An essential

- role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* (1999). doi:10.1084/jem.190.7.995
93. Annunziato, F. *et al.* Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4+CD25+ human thymocytes. *J. Exp. Med.* (2002). doi:10.1084/jem.20020110
 94. Mumm, J. B. *et al.* IL-10 Elicits IFN γ -Dependent tumor immune surveillance. *Cancer Cell* **20**, 781–796 (2011).
 95. Tanikawa, T., Wilke, C. M., Kryczek, I., Chen, G. Y. & Kao, J. Interleukin-10 Ablation Promotes Tumor Development , Growth , and Metastasis. *Cancer Res.* **72**, 420–430 (2012).
 96. Qiao, J. *et al.* Targeting Tumors with IL-10 Prevents Dendritic Cell-Mediated CD8+ T Cell Apoptosis. *Cancer Cell* **35**, 901-915.e4 (2019).
 97. Naing, A. *et al.* Safety, antitumor activity, and immune activation of pegylated recombinant human interleukin-10 (AM0010) in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.* **34**, 3562–3569 (2016).
 98. Naing, A. *et al.* PEGylated IL-10 (Pegilodecakin) Induces Systemic Immune Activation, CD8+ T Cell Invigoration and Polyclonal T Cell Expansion in Cancer Patients. *Cancer Cell* **34**, 775-791.e3 (2018).
 99. Naing, A. *et al.* Pegilodecakin combined with pembrolizumab or nivolumab for patients with advanced solid tumours (IVY): a multicentre, multicohort, open-label, phase 1b trial. *Lancet Oncol.* (2019). doi:10.1016/S1470-2045(19)30514-5
 100. Jotte, R. M. *et al.* Randomized phase II study of nivolumab (N) alone versus with pegilodecakin (PEG) in combination with N in patients (pts) with post-platinum immunotherapy-naive stage IV non-small cell lung cancer (NSCLC) and no or low PD-L1 expression (CYPRESS 2). *J. Clin. Oncol.* (2020). doi:10.1200/jco.2020.38.15_suppl.e21744
 101. Spigel, D. R. *et al.* Randomized phase II study of pembrolizumab (P) alone versus pegilodecakin (PEG) in combination with P as first-line (1L) therapy in patients (pts) with stage IV non-small cell lung cancer (NSCLC) with high PD-L1 expression (CYPRESS 1). *J. Clin. Oncol.* (2020). doi:10.1200/jco.2020.38.15_suppl.9563
 102. Huang, S., Xie, K., Bucana, C. D., Ullrich, S. E. & Bar-Eli, M. Interleukin 10 suppresses tumor growth and metastasis of human melanoma cells: Potential

- inhibition of angiogenesis. *Clin. Cancer Res.* (1996).
103. Itakura, E. *et al.* IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence. *Mod. Pathol.* (2011). doi:10.1038/modpathol.2011.5
 104. Penna, C. & Nordlinger, B. Colorectal metastasis (liver and lung). *Surgical Clinics of North America* (2002). doi:10.1016/S0039-6109(02)00051-8
 105. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2020. *CA. Cancer J. Clin.* (2020). doi:10.3322/caac.21590
 106. Van Cutsem, E. *et al.* Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: Updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J. Clin. Oncol.* (2011). doi:10.1200/JCO.2010.33.5091
 107. Masi, G. *et al.* Randomized trial of two induction chemotherapy regimens in metastatic colorectal cancer: An updated analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* (2011). doi:10.1093/jnci/djq456
 108. Douillard, J. Y. *et al.* Randomized, Phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) Versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: The PRIME study. *J. Clin. Oncol.* (2010). doi:10.1200/JCO.2009.27.4860
 109. Wilhelm, S. M. *et al.* Regorafenib (BAY 73-4506): A new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *Int. J. Cancer* **129**, 245–255 (2011).
 110. Hurwitz, H. I. *et al.* Efficacy and safety of bevacizumab in metastatic colorectal cancer: pooled analysis from seven randomized controlled trials. *Oncologist* **18**, 1004–1012 (2013).
 111. Villalba, M., Evans, S. R., Vidal-Vanaclocha, F. & Calvo, A. Role of TGF- β in metastatic colon cancer: it is finally time for targeted therapy. *Cell and Tissue Research* (2017). doi:10.1007/s00441-017-2633-9
 112. Fehrenbacher, L. *et al.* Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): A multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet* **387**, 1837–1846 (2016).
 113. Ueda, H. *et al.* Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* **423**, 506–511 (2003).

114. Lee, Y. H., Bae, S.-C., Kim, J.-H. & Song, G. G. Meta-analysis of genetic polymorphisms in programmed cell death 1. *Zent. Rheumatol.* **74**, 230–239 (2015).
115. Beck, K. E. *et al.* Enterocolitis in patients with cancer after antibody blockade of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4. *J. Clin. Oncol.* **24**, 2283–2289 (2006).
116. Van Cutsem, E. & Oliveira, J. Advanced colorectal cancer: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* (2009). doi:10.1093/annonc/mdp130
117. Sonbol, M. B. *et al.* The Role of Maintenance Strategies in Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review and Network Meta-analysis of Randomized Clinical Trials. *JAMA Oncol.* **6**, 1–7 (2020).
118. Becker, C., Fantini, M. C. & Neurath, M. F. High resolution colonoscopy in live mice. *Nat. Protoc.* (2007). doi:10.1038/nprot.2006.446
119. Obenauf, A. C. & Massague, J. Surviving at a distance: organ specific metastasis. *Trends Cancer* **1**, 76–91 (2015).
120. Sobhani, I. *et al.* Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS One* (2011). doi:10.1371/journal.pone.0016393
121. Palm, N. W. *et al.* Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell* **158**, 1000–1010 (2014).
122. Ruffell, B. *et al.* Macrophage IL-10 Blocks CD8+ T Cell-Dependent Responses to Chemotherapy by Suppressing IL-12 Expression in Intratumoral Dendritic Cells. *Cancer Cell* (2014). doi:10.1016/j.ccell.2014.09.006
123. Martin-Orozco, N. *et al.* T Helper 17 Cells Promote Cytotoxic T Cell Activation in Tumor Immunity. *Immunity* **31**, 787–798 (2009).
124. Gagliani, N. *et al.* Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature* **523**, 221–5 (2015).
125. Dong, W. *et al.* The mechanism of anti-pd-l1 antibody efficacy against pd-l1–negative tumors identifies nk cells expressing pd-l1 as a cytolytic effector. *Cancer Discov.* (2019). doi:10.1158/2159-8290.CD-18-1259
126. Lamichhane, P. *et al.* IL10 release upon PD-1 blockade sustains immunosuppression in ovarian cancer. *Cancer Res.* **77**, 6667–6678 (2017).
127. Bloch, O. *et al.* Gliomas promote immunosuppression through induction of B7-H1 expression in tumor-associated macrophages. *Clin. Cancer Res.* (2013).

- doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3314
128. Peng, Q. *et al.* PD-L1 on dendritic cells attenuates T cell activation and regulates response to immune checkpoint blockade. *Nat. Commun.* (2020). doi:10.1038/s41467-020-18570-x
 129. Poggio, M. *et al.* Suppression of Exosomal PD-L1 Induces Systemic Anti-tumor Immunity and Memory. *Cell* (2019). doi:10.1016/j.cell.2019.02.016
 130. Grulich, A. E., van Leeuwen, M. T., Falster, M. O. & Vajdic, C. M. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet* (2007). doi:10.1016/S0140-6736(07)61050-2
 131. Erreni, M., Mantovani, A. & Allavena, P. Tumor-associated macrophages (TAM) and inflammation in colorectal cancer. *Cancer Microenviron.* (2011). doi:10.1007/s12307-010-0052-5
 132. Ouyang, W. & O'Garra, A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity* (2019). doi:10.1016/j.immuni.2019.03.020
 133. Gronke, K. *et al.* Interleukin-22 protects intestinal stem cells against genotoxic stress. *Nature* (2019). doi:10.1038/s41586-019-0899-7
 134. Kirchberger, S. *et al.* Innate lymphoid cells sustain colon cancer through production of interleukin-22 in a mouse model. *J. Exp. Med.* (2013). doi:10.1084/jem.20122308
 135. Kryczek, I. *et al.* IL-22+CD4+ T cells promote colorectal cancer stemness via STAT3 transcription factor activation and induction of the methyltransferase DOT1L. *Immunity* **40**, 772–784 (2014).
 136. Kempski, J. *et al.* IL22BP Mediates the Antitumor Effects of Lymphotoxin Against Colorectal Tumors in Mice and Humans. *Gastroenterology* (2020). doi:10.1053/j.gastro.2020.06.033
 137. Naing, A. *et al.* PEGylated IL-10 (Pegilodecakin) Induces Systemic Immune Activation, CD8+ T Cell Invigoration and Polyclonal T Cell Expansion in Cancer Patients. *Cancer Cell* **34**, 775-791.e3 (2018).
 138. Hecht, J. R. *et al.* Randomized Phase III Study of FOLFOX Alone and with Pegilodecakin as Second-line Therapy in Patients with Metastatic Pancreatic Cancer (SEQUOIA). *J. Clin. Oncol.* (2020). doi:10.1200/jco.2020.38.4_suppl.637

139. Naing, A. *et al.* Pegilodecakin as monotherapy or in combination with anti-PD-1 or tyrosine kinase inhibitor in heavily pretreated patients with advanced renal cell carcinoma (RCC): Updated results from phase I/Ib IVY study. *J. Clin. Oncol.* **38**, 679 (2020).
140. Tilg, H., Adolph, T. E., Gerner, R. R. & Moschen, A. R. The Intestinal Microbiota in Colorectal Cancer. *Cancer Cell* (2018). doi:10.1016/j.ccell.2018.03.004
141. Casasanta, M. A. *et al.* Fusobacterium nucleatum host-cell binding and invasion induces IL-8 and CXCL1 secretion that drives colorectal cancer cell migration. *Sci. Signal.* (2020). doi:10.1126/SCISIGNAL.ABA9157
142. Bullman, S. *et al.* Analysis of Fusobacterium persistence and antibiotic response in colorectal cancer. *Science* (80-.). (2017). doi:10.1126/science.aal5240
143. Mathies, F. *et al.* Colitis Promotes a Pathological Condition of the Liver in the Absence of Foxp3 + Regulatory T Cells . *J. Immunol.* **201**, 3558–3568 (2018).
144. O'Hara, R. J. *et al.* Advanced colorectal cancer is associated with impaired interleukin 12 and enhanced interleukin 10 production. *Clin. Cancer Res.* **4**, 1943–1948 (1998).
145. Zhao, S., Wu, D., Wu, P., Wang, Z. & Huang, J. Serum IL-10 Predicts Worse Outcome in Cancer Patients: A Meta-Analysis. *PLoS One* **10**, e0139598 (2015).
146. Abtahi, S. *et al.* Dual association of serum interleukin-10 levels with colorectal cancer. *J. Cancer Res. Ther.* **13**, 252–256 (2017).
147. Sullivan, K. M. *et al.* IL-10 blockade reactivates antitumor immunity in human colorectal cancer liver metastases. in *AACR Annual Meeting Abstract* 4489 (2019). doi:10.1158/1538-7445.sabcs18-4489
148. Sadegh, L., Chen, P. W., Brown, J. R., Han, Z. & Niederkorn, J. Y. NKT cells act through third party bone marrow-derived cells to suppress NK cell activity in the liver and exacerbate hepatic melanoma metastases. *Int. J. Cancer* **137**, 1085–1094 (2015).
149. Yang, W. *et al.* NKT cell exacerbation of liver metastases arising from melanomas transplanted into either the eyes or spleens of mice. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 3094–3102 (2011).
150. Chung, E. Y. *et al.* Interleukin-10 Expression in Macrophages during Phagocytosis of Apoptotic Cells Is Mediated by Homeodomain Proteins Pbx1 and Prep-1. *Immunity* (2007). doi:10.1016/j.immuni.2007.11.014
151. Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y. & Yu, Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis,

- and cancer metastasis. *Mol. Cancer* **14**, 1–14 (2015).
152. Zagórska, A., Través, P. G., Lew, E. D., Dransfield, I. & Lemke, G. Diversification of TAM receptor tyrosine kinase function. *Nat. Immunol.* (2014). doi:10.1038/ni.2986
 153. Voll, R. E., Herrmann, M., Roth, E. A., Stach, C. & Kalden, J. R. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* **534**, 0–1 (1997).
 154. Fadok, V. A. *et al.* Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF. *J. Clin. Invest.* (1998). doi:10.1172/JCI1112
 155. Xu, W. *et al.* IL-10-producing macrophages preferentially clear early apoptotic cells. *Blood* (2006). doi:10.1182/blood-2005-10-4144
 156. Carambia, A. *et al.* TGF- β -dependent induction of CD4+CD25+Foxp3 + Tregs by liver sinusoidal endothelial cells. *J. Hepatol.* **61**, 594–599 (2014).
 157. Horst, A. K., Neumann, K., Diehl, L. & Tiegs, G. Modulation of liver tolerance by conventional and nonconventional antigen-presenting cells and regulatory immune cells. *Cellular and Molecular Immunology* (2016). doi:10.1038/cmi.2015.112
 158. Thornton, A. M. *et al.* Expression of Helios, an Ikaros Transcription Factor Family Member, Differentiates Thymic-Derived from Peripherally Induced Foxp3 + T Regulatory Cells. *J. Immunol.* (2010). doi:10.4049/jimmunol.0904028
 159. Yadav, M. *et al.* Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J. Exp. Med.* (2012). doi:10.1084/jem.20120822
 160. Vanharanta, S. & Massagué, J. Origins of Metastatic Traits. *Cancer Cell* **24**, 410–421 (2013).
 161. Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology* (2002). doi:10.1038/ni1102-991
 162. Racanelli, V. & Rehermann, B. The liver as an immunological organ. *Hepatology* (2006). doi:10.1002/hep.21060
 163. Carambia, A. *et al.* Nanoparticle-based autoantigen delivery to Treg-inducing liver sinusoidal endothelial cells enables control of autoimmunity in mice. *J. Hepatol.* **62**, 1349–1356 (2015).
 164. Lohse, A. W. *et al.* Antigen-presenting function and B7 expression of murine

- sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells. *Gastroenterology* (1996). doi:10.1053/gast.1996.v110.pm8613007
165. Shetty, S., Lalor, P. F. & Adams, D. H. Liver sinusoidal endothelial cells — gatekeepers of hepatic immunity. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (2018). doi:10.1038/s41575-018-0020-y
 166. Diehl, L. *et al.* Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8⁺ T cell tolerance. *Hepatology* (2008). doi:10.1002/hep.21965
 167. Wu, P., Wu, D., Li, L., Chai, Y. & Huang, J. PD-L1 and survival in solid tumors: A meta-analysis. *PLoS One* (2015). doi:10.1371/journal.pone.0131403
 168. Zou, W., Wolchok, J. D. & Chen, L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Sci. Transl. Med.* (2016). doi:10.1126/scitranslmed.aad7118
 169. Chaudhri, A. *et al.* PD-L1 Binds to B7-1 only in cis on the same cell surface. *Cancer Immunol. Res.* (2018). doi:10.1158/2326-6066.CIR-17-0316
 170. Zhao, Y. *et al.* Antigen-Presenting Cell-Intrinsic PD-1 Neutralizes PD-L1 in cis to Attenuate PD-1 Signaling in T Cells. *Cell Rep.* (2018). doi:10.1016/j.celrep.2018.06.054
 171. Sugiura, D. *et al.* Restriction of PD-1 function by cis-PD-L1/CD80 interactions is required for optimal T cell responses. *Science* (80-.). (2019). doi:10.1126/science.aav7062
 172. Diskin, B. *et al.* PD-L1 engagement on T cells promotes self-tolerance and suppression of neighboring macrophages and effector T cells in cancer. *Nat. Immunol.* (2020). doi:10.1038/s41590-020-0620-x
 173. Tang, H. *et al.* PD-L1 on host cells is essential for PD-L1 blockade–mediated tumor regression. *J. Clin. Invest.* (2018). doi:10.1172/JCI96061
 174. Taube, J. M. *et al.* Differential expression of immune-regulatory genes associated with PD-L1 display in melanoma: Implications for PD-1 pathway blockade. *Clin. Cancer Res.* (2015). doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0244

Anhang

Publikationen

- 2020 Kempski J#, Giannou AD#, ,... **Shiri AM**, ..., Huber S. Interleukin-22BP mediates the anti-tumor effects of lymphotoxin in colorectal cancer in mice and humans. ***Gastroenterology*** Volume 159, Issue 4, Pages 1417-1430.e3 (2020)
- 2017 Kleinschmidt D#, Giannou AD#, **Shiri AM**, ...Huber S. A Protective Function of IL-22BP in Ischemia Reperfusion and Acetaminophen-Induced Liver Injury. ***J Immunol.*** 199, 4078-4090 (2017).

Präsentationen

- Okt 2019 **Vortrag**
8th international Congress on Cancer Metastasis
San Francisco, USA
- Juni 2018 **Vortrag**
12th German Meeting on Immune Regulation
12527 Berlin, Germany

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Hamburg, Januar 2020

Ahmad Mustafa Shiri