

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik-Großhadern der Ludwigs-Maximilians-Universität  
München

Direktor: Prof.Dr.med.Dr.h.c.mult. Karl Walter Jauch

**Die Bedeutung von Indoleamine 2,3 Dioxygenase bei Patienten mit Magenkarzinom  
und der Einfluss von *Helicobacter pylori***

**Dissertation**

Zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin  
an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Fischer Christoph

aus

München

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.Rudolf Hatz

Mitberichterstatter: Prof.Dr.Andreas Eigler

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr.rer.nat. Natasja van den Engel

Dekan: Prof. Dr.med.Dr.h.c.M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 12.10.2010

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>5</b>
1.1 Helicobacter Pylori.....	5
1.1.1 Bedeutung.....	5
1.1.2 Pathologie.....	6
1.1.3 Einfluss von <i>H.pylori</i> auf das Überleben von Patienten mit Magenkarzinom.....	8
1.2 Immunsystem.....	9
1.2.1 Allgemeine Immunreaktion.....	9
1.2.2 Dendritische Zellen.....	11
1.3 Indoleamine 2,3 Dioxygenase.....	13
<b>2. Fragestellung und Zielsetzung.....</b>	<b>15</b>
<b>3. Material und Methode.....</b>	<b>17</b>
3.1 Patientenkollektiv.....	17
3.2 Histologie und Immunhistochemie.....	18
3.2.1 Immunhistochemische Färbung.....	19
3.2.2 Hämatoxilin-Eosin Färbung.....	20
3.2.3 Zytokeratinfärbung.....	21
3.2.4 Materialien der Immunhistochemie.....	21
3.3 Nachweis von IDO mRNA in Tumorgewebe von Magenkarzinompatienten.....	24
3.3.1 Methoden der Zellkultur.....	24
3.3.2 RNA Isolierung.....	26
3.3.3 cDNA Synthese.....	28
3.3.4 Polymerasekettenreaktion.....	29
3.3.5 Gelelektrophorese.....	33

3.3.6 GelProAnalyser.....	35
3.3.7 Graphpad Prism .....	35
3.3.8 Einfluss von <i>H.pylori</i> auf die IDO Expression in Magenkarzinomzelllinien.....	36
3.3.9 Geräte und Verbrauchsmaterial.....	37
<b><u>4. Ergebnisse.....</u></b>	<b>40</b>
4.1 Nachweis von IDO mittels Immunhistochemie.....	40
4.2 Nachweis von IDO mRNA in Tumorgewebe von Magenkarzinompatienten.....	44
4.3 Einfluss von <i>H.pylori</i> auf die IDO Expression in Magenkarzinomzelllinien.....	51
4.4 Langzeitüberleben in Korrelation mit <i>H.pylori</i> Status und IDO Expression.....	55
<b><u>5. Diskussion.....</u></b>	<b>58</b>
<b><u>6. Zusammenfassung.....</u></b>	<b>62</b>
<b><u>7. Anhang.....</u></b>	<b>64</b>
<b><u>8. Abkürzungsverzeichnis.....</u></b>	<b>66</b>
<b><u>9. Literatur.....</u></b>	<b>68</b>
<b><u>10. Lebenslauf.....</u></b>	<b>74</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 *Helicobacter Pylori*

### 1.1.1 Bedeutung

*Helicobacter Pylori* (*H.pylori*) ist ein gramnegatives, spiralförmiges, mikroaerophiles Stäbchenbakterium mit iophotricher Begeißelung, welches interzelluläres Adhäsionsprotein, Zytotoxin, VacA, Katalasen, Phospholipasen, Urease, Mucinase, Neutrophil activating protein, Plättchen-Aktivierender-Faktor (PAF) und Hitzeschockproteine produziert. Das Bakterium ist als eines von wenigen Bakterien dazu befähigt, sich in der Magenschleimhaut anzusiedeln und bewirkt dort Schleimhautentzündungen, die nach Jahren in eine Atrophie, Dysplasie und in seltenen Fällen in ein Magenmalignom übergehen können. *H.pylori* tritt dabei nur auf antrumähnlicher Schleimhaut auf, also im Korpus und Antrum des Magens, bzw. auch auf metaplastisch veränderter Schleimhaut (bulbus duodeni). Der Magen fungiert nach heutigem Kenntnisstand als Hauptkeimreservoir des *H.pylori*. Durch die Geißel verschafft sich das Bakterium Zugang zur Mukosa. Durch die Produktion neutralisierender Urease ist *H.pylori* säureresistent und bildet so eine ökologische Nische, in der es vom Immunsystem nur schwer zu beseitigen ist. Seine zytotoxischen Produkte, wie Proteasen, Lipasen und VacA, sind schleimhautschädigend. Somit ist ihm die Möglichkeit einer lebenslangen Persistenz gegeben.

Als mögliche Übertragungswege kommen der oro-orale, der gastro-orale, fäkal-orale Weg oder aber auch der Weg über Vektoren in Betracht. Primär relevant sind die oro-orale Übertragung, welche sich von Mensch zu Mensch vor allem im Kindesalter ereignet, und der fäkal-orale Weg, welcher überwiegend in der dritten Welt auftritt. Bisher ist eine Isolierung des *H.pylori* aus dem Speichel, Stuhl und Zahnstein möglich. Bei 2% der Infizierten kommt es in der Folge zur Ausbildung eines Magenkarzinoms [1,2]. Dies macht *H.pylori* zu einem der wichtigsten medizinisch relevanten Krankheitserreger. Mit dem Erreger sind etwa 50% der Weltbevölkerung infiziert. In den westlichen Industriestaaten sind 20-30% der 20-

Jährigen und 50-60% der über 50-Jährigen Bevölkerung betroffen, in den Entwicklungsländern liegen diese Werte weitaus höher [3]. Das Infektionsrisiko nimmt in höherem Alter zu, Männer sind ca. doppelt so häufig betroffen wie Frauen. Das Bakterium wurde 1983 durch Marshall und Warren entdeckt und ein pathologischer Zusammenhang zwischen einer *H.pylori* Infektion und der Entstehung einer Gastritis, einer Ulcuskrankheit sowie dem Magenkarzinom erkannt. Heute gilt *H.pylori* als Kofaktor bei der Entstehung von Gastritis, Ulcera und Magenmalignomen und wird von der International Agency for Research on Cancer (IARC) als ein definitives humanes Kanzerogen bezeichnet [4].

### 1.1.2 Pathologie

Bei einer Erstinfektion mit *H.pylori* löst unter anderem die Adhäsion des Bakteriums eine Interleukin-8 (IL-8) Ausschüttung der Epithelzellen aus, wodurch neutrophile Granulozyten sowie B- und T-Zellen angelockt werden [5,6]. Hierdurch entwickelt sich eine akute Gastritis, welche nach langjährigem Persistieren in eine chronische Form übergeht. Im Laufe der Entzündung kommt es zu immunologischen Veränderungen in der Magenmukosa. *H.pylori* sezerniert Neutrophil activating protein, VacA, CagA, Urease und Hitzeschockproteine. Diese dringen in das entzündlich veränderte Magenepithel ein und provozieren die Infiltration und Aktivierung von Makrophagen, Leukozyten und Granulozyten [7]. Whitney et al. beschreiben eine gesteigerte Infiltration von Makrophagen bei einer *H.pylori* assoziierten Infektion [8]. Die aktivierten Makrophagen sezernieren die Zytokine IL-12, IL-1, IL-6, TNF  $\alpha$  sowie Chemokine wie IL-8. Die freigesetzten Zytokine schaffen ein Typ-1 Zytokinmilieu. Frisch isolierte CD4+ und CD8+ Lymphozyten aus der Magenmukosa von Patienten mit *H.pylori* assoziierter Gastritis sezernieren das Typ-1 Zytokin IFN- $\gamma$ , aber nur geringe Mengen der Typ-2 Zytokine IL-4 und IL-5 [8,9]. In der Magenmukosa von *H.pylori* positiven Patienten kann mittels Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) eine erhöhte Expression der Typ-1-Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-8 und IL-17 nachgewiesen werden. Es finden sich keine Unterschiede in der Expression der Typ-2 Zytokine IL-4 und IL-10 zwischen *H.pylori* positiven und *H.pylori* negativen Patienten [10]. Trotz der *H.pylori* spezifischen,

Typ-1 polarisierten Immunantwort kann das Bakterium in der Regel nicht durch das körpereigene Immunsystem aus dem Magen eliminiert werden. Folglich kommt es zu einer lebenslangen Koexistenz. Das Ausmaß der Schleimhautläsionen bei den Erkrankten ist sehr unterschiedlich und ist abhängig von der Virulenz des Erregers, der Immunantwort des Infizierten und von exogenen Faktoren. Dabei bleibt ein großer Teil der Infizierten asymptomatisch, nur ein kleiner Teil wird klinisch manifest. Oft findet sich eine ausgeprägte Mukosainfiltration durch Makrophagen, neutrophile Granulozyten und andere Abwehrzellen, wodurch der Aktivitätsgrad der Gastritis bestimmt wird [7]. Das Oberflächenepithel wird teilweise durch Regenerationsepithel ersetzt, zudem wird die Entstehung einer intestinalen Metaplasie und Atrophie begünstigt. Die andauernde Schädigung der Drüsen- und Parietalzellen im Korpus führt zu einer verminderten Säureproduktion und Schleimhautatrophie, der daraus resultierende erhöhte pH-Wert begünstigt eine Ausbreitung und die Persistenz des Bakteriums [1]. Durch die lange Verweildauer entwickelt sich eine chronische Gastritis, welche zur spezifischen Immunantwort des humoralen Abwehrsystems führt. Bei allen infizierten Patienten kann bakterienspezifisches, mukosomales IgA nachgewiesen werden [5]. Die Antikörper IgG und IgM lassen sich sowohl in der Mukosa als auch im Serum nachweisen. Zunächst zeigt sich ein vorübergehender Anstieg der IgM-Antikörper, der von einem Ansteigen der IgG- und IgA-Titer gefolgt wird. Während das IgM wieder abfällt, verweilen IgG und IgA Antikörper, solange die Infektion mit *H.pylori* vorhanden ist. Das IgG kann mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden und fällt nach erfolgreicher, antibiotischer Therapie nach 3-6 Monaten wieder ab. Es ist somit ein guter Parameter für die Verlaufskontrolle der Erkrankung.

### 1.1.3 Einfluss von *H.pylori* auf das Überleben von Patienten mit Magenkarzinom

Obwohl *H.pylori* als Karzinogen eingestuft wird, entwickelt sich nur bei etwa 2% der *H.pylori* infizierten Personen ein Magenkarzinom. Bei circa 20% der Magenkarzinom-Patienten findet sich kein Hinweis auf eine bestehende oder stattgefundene Infektion mit dem Bakterium. Lee und Mitarbeiter untersuchten das Überleben von *H.pylori* positiven und *H.pylori* negativen Magenkarzinompatienten in einer retrospektiven Analyse [11]. Dabei entdeckten sie eine verbesserte Überlebenswahrscheinlichkeit bei Magenkarzinompatienten, welche vor dem chirurgischen Eingriff *H.pylori* positiv waren. In einer prospektiven klinischen Studie verglichen Meimarakis et al. (Abb. 1) das Überleben von *H.pylori* positiven und *H.pylori* negativen Magenkarzinompatienten nach R0-Resektion [12].

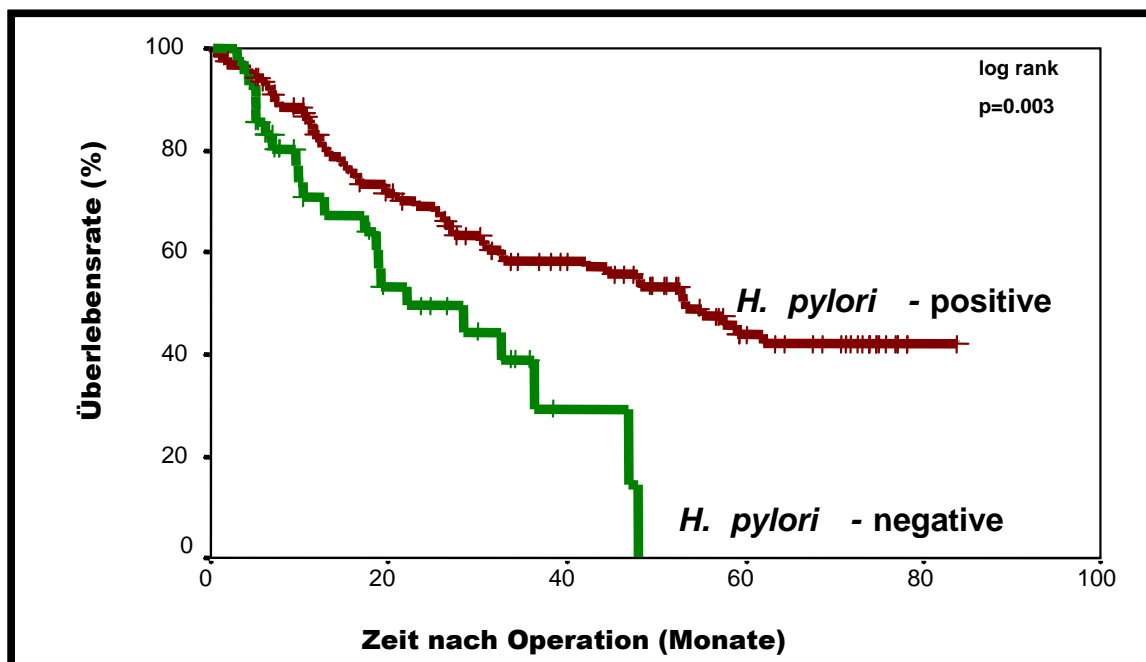


Abbildung 1: Überlebensrate von *H.pylori* positiven und *H.pylori* negativen Magenkarzinompatienten nach R0 Resektion [12].

Hierbei fanden sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Lee et al. ein signifikanter Überlebensvorteil von Patienten mit präoperativ positivem *H.pylori* Status. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit konnte *H.pylori* neben den etablierten Prognosefaktoren



Tumorinvasion und Lymphknotenstatus als unabhängiger prognostischer Faktor identifiziert werden [12].

## *1.2 Immunsystem*

### **1.2.1 Allgemeine Immunreaktion**

Das Immunsystem ist ein multizelluläres System, das in den meisten Geweben des Organismus aktiv ist. Es wird in das angeborene und das erworbene Immunsystem aufgeteilt. Das angeborene Immunsystem besteht u.a. aus Makrophagen, die im Zusammenspiel mit polymorphkernigen Granulozyten die erste Barriere gegen infektiöse Krankheitserreger darstellen. Reicht dieser Schutzmechanismus nicht aus, stützt sich auf diese unspezifische Abwehr die einige Tage später einsetzende adaptive Immunantwort, die spezifisch gegen den Krankheitserreger gerichtet ist. Sie beruht auf der Aktivität von Lymphozyten, die in zwei Hauptpopulationen, den T- und B-Lymphozyten vorkommen. T-Zellen stellen den zellulären Anteil des adaptiven Immunsystems dar, wohingegen B-Zellen den humoralen Anteil darstellen. Die differenzierten Abkömmlinge der B-Lymphozyten, die Plasmazellen, synthetisieren und sezernieren etwa  $10^{11}$  verschiedene Antikörper mit jeweils unterschiedlicher Bindungsspezifität für die jeweiligen Antigene. T-Lymphozyten sind für die zelluläre Abwehr zuständig, die vor allem gegen intrazelluläre Erreger, aber auch gegen transformierte Zellen gerichtet ist. Zur Ausübung ihrer Funktion müssen Lymphozyten aktiviert werden. Ruhende B- und T-Lymphozyten zirkulieren im Blut und wandern kontinuierlich in sekundäre Lymphorgane wie Lymphknoten, Milz oder die Mandeln ein. Reife T-Zellen, die bei ihrer Wanderung noch nicht auf Antigene gestoßen sind, bezeichnet man als naive T-Zellen. Durch Antigenkontakt werden sie zur Vermehrung und Differenzierung angeregt, so dass die Tochterzellen zur Beseitigung des Antigens beitragen können. Diese Zellen bezeichnet man als T-Effektorzellen, welche sich in zytotoxische T-Zellen, T-Helferzellen und T-Suppressorzellen differenzieren. Die T-Helferzellen und

zytotoxischen T-Zellen können anhand der Zytokine, welche sie freisetzen, in Typ-1 und Typ-2 Zellen unterschieden werden. Typ-1 Zellen sezernieren  $\text{IFN-}\gamma$ ,  $\text{TNF}\beta/\text{LT-}\alpha$ ,  $\text{TNF}\beta$  und IL-2. Typ-2 Zellen sezernieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13. Die polarisierten T-Zellen entwickeln sich aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle (Typ-0), welche sich unter anderem in Abhängigkeit des Zytokinmilieus, das während der T-Zellaktivierung besteht, sowohl in eine Typ-1 als auch in eine Typ-2 polarisierte Zelle entwickeln kann [13]. Typ-1 oder Typ-2 Zellen induzieren und unterstützen durch die freigesetzten Zytokine jeweils die Entwicklung von Lymphozyten mit einem entsprechenden Phänotyp, wohingegen sie die Entwicklung der T-Zellen zu dem entgegengesetzten Phänotyp unterdrücken. Entsprechend wird durch  $\text{IFN-}\gamma$  selektiv die Expansion von Typ-1 Zellen induziert und die Expansion von Typ-2 Zellen inhibiert. Die Typ-2 Zytokine IL-4 und IL-10 hemmen die Expansion von Typ-1 Zellen [13,14]. Durch dieses Phänomen der reziproken Hemmung polarisierter T-Zellen kommt es zur Ausprägung charakteristischer Zytokinprofile bei immunologischen Antworten. Neben antigenspezifischen  $\text{CD4}^+$  bzw.  $\text{CD8}^+$  Effektorzellen spielen T-Suppressorzellen eine entscheidende Rolle für die Homöostase und Hemmung einer überschießenden Immunreaktion. Die am ausführlichsten untersuchte Untergruppe regulatorisch wirkender Suppressorzellen sind die  $\text{CD4}^+$  Zellen, welche eine hohe Expression des IL-2 Rezeptors CD25 aufweisen und die Proliferation von  $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$  Effektorzellen mittels Zell-Zell-Kontakt hemmen [15]. Diese Zellen werden im weiteren Verlauf als regulatorische T-Zellen (Tregs) bezeichnet. Die Tregs verhindern autoaggressives Handeln gegen körpereigene Zellen und kontrollieren die immunologische antigenspezifische Antwort gegen Fremdartigene, d.h. sie halten die Balance zwischen Abwehr und Immunpathologie. Die Wichtigkeit einer Induktion von immunologischer Toleranz zeigt sich darin, dass ein Fehlen oder ein Defekt von Tregs mitverantwortlich für das Entstehen von Autoimmunerkrankungen und Allergien ist. Bei Allergikern sind die Tregs weniger effektiv in der Immunmodulation bzw. Immununterdrückung [16]. Aufgrund ihrer Eigenschaften wurden Tregs in Zusammenhang mit der Unterdrückung einer effektiven immunologischen Abwehr bei Tumorentwicklung und –proliferation gebracht. Zahlreiche Untersuchungen von Patienten mit epithelialen Tumoren

(z.B. Bronchial- und Darmkarzinome) ergaben eine auffallend höhere Anzahl von Tregs und eine erniedrigte Rate von effektiven Abwehrzellen, wie proliferierende B-Zellen. Das Ausmaß einer Krebserkrankung konnte mit der Anzahl von Tregs assoziiert werden, wobei eine erhöhte Anzahl an Tregs mit einer erhöhten Mortalitätsrate korreliert wurde [15,16].

T-Zellen verfügen über einen T-Zellrezeptor, der spezifisch Antigene, die von einer Antigen präsentierenden Zelle (APC) präsentiert werden, erkennt. Antigene werden von einer APC aufgenommen, prozessiert, in Form von Peptiden am Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (MHC-Komplex) intrazellulär gebunden und anschließend auf der Zelloberfläche präsentiert. Für eine effiziente Aktivierung muss die T-Zelle neben der T-Zellrezeptor-MHC Bindung über weitere Signale, sogenannte kostimulatorische Moleküle angeregt werden. Dazu gehören unter anderem CD80 und CD86, die mit CD28 auf den T-Zellen interagieren. Antigene können grundsätzlich von allen MHC exprimierenden Zellen präsentiert werden. Werden Antigene in Abwesenheit kostimulatorischer Moleküle präsentiert, so wird Toleranz induziert [17]. Im Gegensatz dazu stimulieren APC wie Makrophagen, dendritischen Zellen (DC) und B-Lymphozyten, welche zusätzlich kostimulatorische Moleküle besitzen, eine suffiziente Immunantwort [17].

### **1.2.2 Dendritische Zellen**

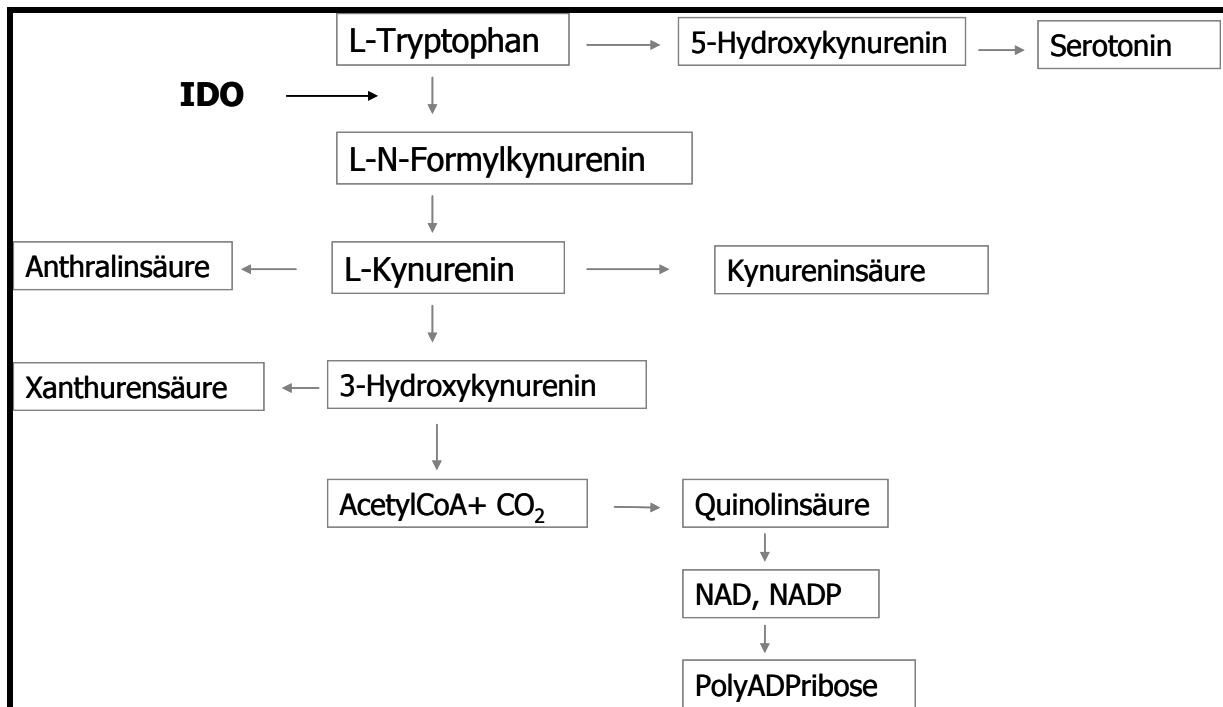
Dendritische Zellen (DC) sind die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen (APC) und spielen eine Schlüsselrolle bei der Induktion einer Immunantwort. Sie können Antigene aufnehmen und diese als Peptide, gebunden an MHC I/II, naiven T-Zellen präsentieren, wodurch therapeutische Effektorzellen stimuliert werden [18-20]. In Abhängigkeit ihres Aktivierungszustandes und des Zytokinmilieus können sie auch Tregs aktivieren. Die DC stellen eine heterogene Leukozytenpopulation dar. Es konnte eine große Zahl von Untergruppen identifiziert werden, z.B. Langerhanszellen (in der Haut), interstitielle DC (in Herz, Niere, Darm, Lunge), interdigitierende DC, folliculäre DC, lymphatische DC und Schleierzellen (veiled cells) aus Blut und Lymphknoten. DC entwickeln sich im Knochenmark

aus pluripotenten, hämatopoetischen CD34+ Vorläuferzellen und wandern als unreife Zellen in verschiedene Gewebe wie z.B. Haut und Schleimhaut ein [21]. DC gelangen über das Blut ins Interstitium, wo sie als unreife Zellen vorkommen, die effektiv Antigene aufnehmen und prozessieren können, aber nur über geringe T-Zell stimulierende Fähigkeiten verfügen. Unreife DC sezernieren kein IL-12, IL-6 oder IL-10 und exprimieren nur in geringem Umfang MHC II und die kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 [22]. Nach einem Antigenkontakt oder dem Einwirken infektiöser Stimuli, wie proinflammatorischen Zytokinen und bakteriellen Spaltprodukten migrieren sie aus den Geweben in die afferente Lymphe (das sogenannte *homing*) wo sie in den drainierenden Lymphknoten zu interdigitierenden retikulären Zellen bzw. reifen DC differenzieren [23]. Die reifen DC sind nicht mehr in der Lage Antigene aufzunehmen und zu prozessieren, verfügen aber über eine gesteigerte Fähigkeit naive T-Zellen zu Effektorzellen zu stimulieren. Die T-Zell Stimulation wird durch die Präsentation der prozessierten immunogenen Peptide auf MHC I/II-Molekülen, den Adhäsionsmolekülen CD11, CD54 und CD58, sowie den kostimulatorischen Molekülen CD80, CD86 und CD40 initiiert. Des Weiteren exprimieren reife DC Adhäsionsmoleküle wie CCR7 und exprimieren Typ-1 Zytokine wie IL-12 und TNF- $\alpha$  [24]. Eine reife dendritische Zelle ist in der Lage, 100-3000 naive T-Zellen zu polarisieren und antigenspezifische Typ-1 oder Typ-2 T-Zellen zu stimulieren. Hierbei bilden sich stabile Cluster zwischen den DC und den T-Zellen aus [25]. Werden T-Zellen von unreifen DC stimuliert, so werden Th2 polarisierte T-Zellen oder Tregs aktiviert [24]. Unreife DC induzieren durch verschiedene Mechanismen Toleranz. Neben T-Zell Anergie durch Mangel an Kostimulation, Immundeprivation durch Induktion einer Typ-2 Immunantwort, der Aktivierung antigenspezifischer Tregs auch Deletion durch Induktion von T-Zell Apoptose [26].

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass tolerogene unreife DC Indoleamine 2,3 Dioxygenase (IDO), ein Tryptophan degradierendes Enzym exprimieren. Dieses konnte auch in verschiedenen anderen Zellen, wie z.B. in Fibroblasten, Makrophagen, Trophoblasten und Epithelialzellen nachgewiesen werden. Da IDO exprimierende APC in vitro die Proliferation von T-Zellen hemmen und Tregs induzieren, spielen sie wahrscheinlich eine zentrale Rolle

bei der Induktion peripherer Toleranz [27-29]. IDO positive DC exprimieren CD123, CD11c, CD11b, CD80, CD86 sowie CCR6 [24].

### 1.3 Indoleamine 2,3 Dioxygenase (IDO)



**Abbildung 2:** Darstellung des Tryptophanstoffwechsels. IDO katalysiert sauerstoffabhängig die Umsetzung von L-Tryptophan.

Im Jahr 1936 wurde das leberständige Enzym, Tryptophan 2,3 Dioxygenase (TDO), entdeckt. Dieses katalysiert den Umbau der Aminosäure Tryptophan zu Kynurenin. Hayaishi et al. isolierten 1963 die Indoleamine 2,3 Dioxygenase aus Kaninchen, welche die gleiche oxidative Reaktion ermöglicht [30]. IDO katalysiert die O<sub>2</sub>-abhängige Umsetzung von Tryptophan, Serotonin und Melatonin, welches durch die Formaminidase zu L-N-Formylkynurenin umgebaut wird. Durch die IDO Einwirkung wird nahezu sämtliches Tryptophan aus der Zellumgebung abgebaut. Kynurenine sind als neuroaktive und immunoregulatorische Abbauprodukte bekannt. Durch die Beobachtung erhöhter Spiegel von Zwischenprodukten des Tryptophanabbaus, wie Kynurenin und N-Formylkynurenin im

Urin von Patienten mit Tuberkulose, Morbus Hodgkin und Leukämie, deren Leber-TDO völlig normale Aktivitätswerte aufwies, konnte IDO als ein weiteres Tryptophan abbauendes Enzym identifiziert werden. Dabei beeinflusst die TDO die systemische Tryptophankonzentration, während IDO die lokale reguliert [4]. Die Synthese von IDO wird durch IFN- $\gamma$  stimuliert, das von T-Zellen, DC, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten während einer Infektion vermehrt ausgeschüttet wird. Die IDO vermittelte, sauerstoffabhängige Katalyse des Tryptophanstoffwechsels hemmt die Entwicklung von Viren, Bakterien und Parasiten, da Tryptophan die am wenigsten vorhandene und damit wichtigste essentielle Aminosäure für deren Wachstum darstellt und trägt somit zur immunologischen Abwehr bei [31]. Neben diesem indirekten Effekt hemmt IDO direkt die T-Zellproliferation [26,31]. Laut Munn et al. führt die IDO Expression durch humane Makrophagen und DC in vitro zu einer Unterdrückung der T-Zellproliferation [27,32]. IDO positive DC sind durch die Expression von CD123, CD11c, CD11b, CD80, CD86 sowie CCR6 charakterisiert [33,34]. Durch die Rolle von IDO bei der Regulation und Suppression von immunologischen Prozessen wurde vermutet, dass IDO auch von Tumoren instrumentalisiert wird, um die Immunantwort des Wirtsorganismus herabzusetzen [35]. Tatsächlich konnten Uyttenhove et al. eine gesteigerte IDO Expression in Prostata-, Kolorektal-, Pankreas-, Gebärmutterhals- und Magenkarzinomen sowie in humanen Tumorzelllinien nachweisen [36]. Des Weiteren beschrieben Uyttenhove et al., dass das Wachstum von einigen Tumorzelllinien durch den IDO Inhibitor 1-Methyl-Tryptophan (1MT) beschleunigt wurde. Mellor und Munn konnten zeigen, dass durch die Transfektion von IDO in Maus-Tumorzelllinien eine antigenspezifische T-Zell Immunantwort unterdrückt wird [37]. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Expression von IDO durch Tumorzellen und DC die lokale Immunsuppression unterstützt und somit einer antitumoralen Abwehrreaktion entgegen wirkt [33]. Dadurch gewinnt IDO einen hohen Stellenwert in der antitumoralen Immunabwehr.

## 2. Fragestellung

Meimarakis et al. zeigten in einer klinischen Studie auf, dass *H.pylori* positive Magenkarzinompatienten ein signifikant besseres Überleben nach R0-Resektion (mikroskopisch gesicherte Resektion im Gesunden) des Tumors aufweisen als *H.pylori* negative Magenkarzinompatienten [12]. Verschiedene Studien berichten, dass *H.pylori* eine Immunantwort in Richtung eines Typ-1 Zytokinprofils polarisiert, welches für eine Tumorregression verantwortlich sein kann [9,10,38,39]. Van den Engel et al. untersuchten die tumorspezifische Immunantwort von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) bei Magenkarzinompatienten. In Stimulationsassays beschrieben sie die tumorspezifische Freisetzung des Typ-1 Zytokins IFN- $\gamma$  in TIL von *H.pylori* positiven Magenkarzinompatienten. Die Zellen eines *H.pylori* negativen Magenkarzinompatienten zeigten dagegen eine tumorspezifische Typ-2 Immunantwort (IL-5 Expression) [40].

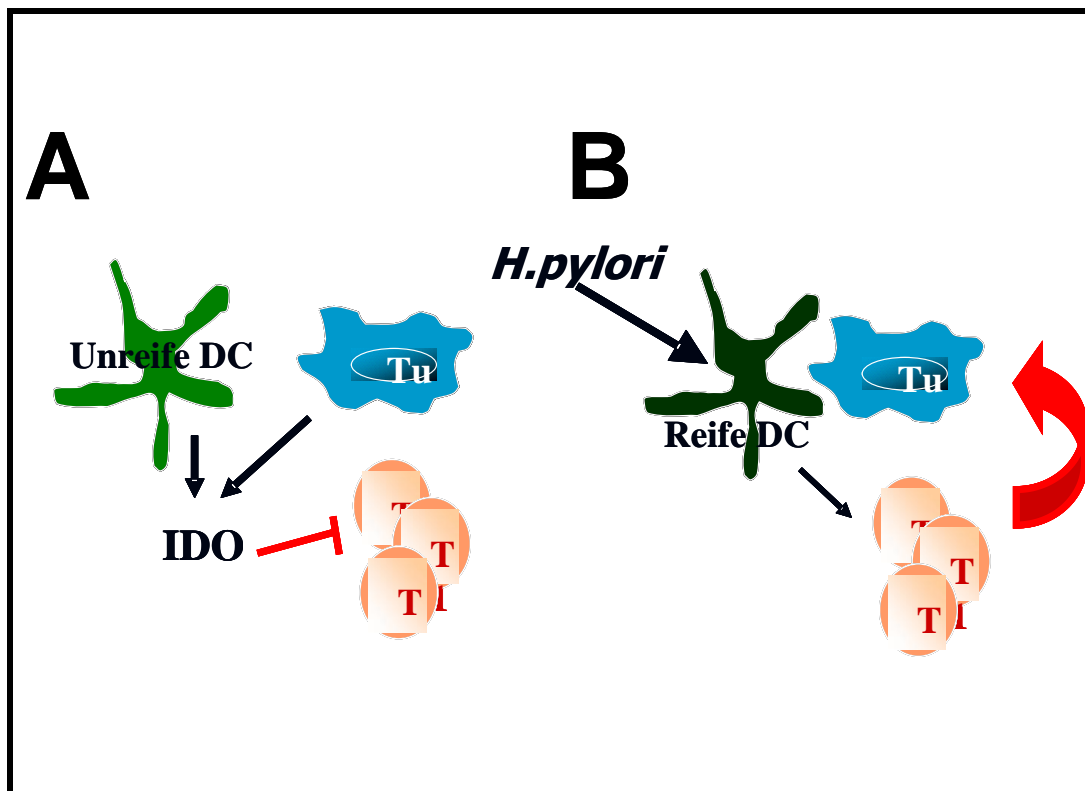


Abbildung 3: Mögliche Interaktion von IDO bei *H.pylori* positiven und *H.pylori* negativen Magenkarzinompatienten: Unreife DC exprimieren verstärkt IDO; dies führt zur Hemmung von T-Effektorzellen. Eine vorliegende *H.pylori* Infektion führt zur Ausbildung von reifen DC und Stimulation von T-Effektorzellen mit einer antitumoralen Immunantwort.

Unsere Hypothese ist, dass bei Patienten mit Magenkarzinom eine tumorspezifische Typ-1 Immunantwort durch die Expression vonIDO aus dem Tumor (Tu) und aus unreifen DC unterdrückt wird (Abb. 3A). Bei Vorliegen einer *H.pylori* Infektion kommt es zur Ausbildung eines entzündlichen Typ-1 Zytokinmilieus, in welchem vermehrt ausgereifte DC aktiviert werden, die wenig oder gar kein IDO produzieren. Die durch Tumorantigenaufnahme aktivierten DC wandern in die regionalen Lymphknoten. In Folge kann eine therapeutische, antitumorale T-Zellantwort (Abb. 3B) induziert werden, welche den signifikanten Überlebensvorteil *H.pylori* positiver Magenkarzinompatienten erklären könnte.

Dadurch ergibt sich nachfolgende Fragestellung.

Gibt es Unterschiede in der IDO Expression in Magenkarzinomgewebe von *H.pylori* positiven und *H.pylori* negativen Patienten. Besteht ein Zusammenhang zwischen der verringerten Überlebensrate von *H.pylori* negativen Patienten und einer erhöhten Expression von IDO.



## 3. Material und Methode

### 3.1 Patientenkollektiv

Seit dem Jahr 1999 wurden entsprechend dem Ethikantrag (240/01), nach ausführlicher Aufklärung und Einwilligung, von Patienten mit einem Magenkarzinom Gewebeproben von Tumorgewebe, von makroskopisch tumorfreien Magengewebe aus Antrum und Korpus sowie von tumorassoziierten Lymphknoten gewonnen. Eingeschlossen wurden Frauen und Männer zwischen dem 18. und 80. Lebensjahr mit einer Überlebensprognose von mehr als 3 Monaten. Ausschlusskriterien waren Schwangerschaft und Stillzeit, Multimorbidität, Zweitkarzinom, Alkohol- und/oder Drogenabusus, respiratorischer Insuffizienz, sowie Gerinnungsstörungen.

Von allen Gewebeproben wurde ein Teil in flüssigem Stickstoff schockgefroren, ein Teil in Formalin gelagert und anschließend in Paraffin eingebettet. Bei der Asservierung wurden zusätzliche Biopsien sowie Serumproben für die Zuordnung in *H.pylori* positive und *H.pylori* negative Präparate gewonnen. Der Nachweis von *H.pylori* wurde serologisch, bakteriologisch und histologisch an verschiedenen Instituten durchgeführt.

Die Serologie erfolgte im Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (Prof.J.Heesemann) und im Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene in Freiburg (Prof.M.Kist). Die Serumproben wurden auf *H.pylori*-spezifisches IgG und IgA hin untersucht. Die bakteriologische Untersuchung erfolgte im Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene in Regensburg (Prof.N.Lehn). Im Pathologischen Institut des Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München (Prof.U.Löhrs) erfolgten eine histologische Beurteilung des Karzinoms, sowie die Einteilung in diffusen-, intestinalen- und Misch-Typ. Der histologische Nachweis von *H.pylori* wurde im Institut für Pathologie im Klinikum Bayreuth (Prof.M.Stolte), geführt. Ein Patient wurde als *H.pylori* negativ gewertet, wenn

sowohl serologisch, bakteriologisch als auch histologisch eine Infektion mit *H.pylori* ausgeschlossen werden konnte.

Neben der Konservierung von Gewebe in Formalin oder in flüssigem Stickstoff wurden auch Biopsien für das Anlegen von Zellkulturen verwendet. Das frisch isolierte Gewebe von Tumor und tumorinfiltrierten Lymphknoten wurde in sterilem Medium auf Eis gelagert und weiterverarbeitet. Ein kleiner Teil des Gewebes wurde direkt in eine Kulturflasche mit Kompletmedium überführt. Die weitere Aufbereitung des Gewebes erfolgte nach mechanischer Zerkleinerung in einer Enzymlösung (RPMI1640, Gentamycin (100 µg/ml), DNase (20 µg/ml), Kollagenase (250 mg/ml), Hyaluronidase (100 µg/ml), Hersteller siehe Tabelle 5). Ein Gramm Gewebe wurde in 25 ml Enzymlösung suspendiert und für 16 h verdaut. Das verdaute Gewebe wurde anschließend in 3 Waschschrinen mit PBS gereinigt und in Zellkulturflaschen kultiviert. Aus diesem Gewebe wurden die 3 Magenkarzinomzelllinien (GC1, GC9, GC20) etabliert, welche in dieser Arbeit verwendet wurden.

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wurden die Namen der Patienten durch fortlaufende Nummern ersetzt. Für die Durchführung der Studie wurde ein Ethikvotum der Ethikkommission des Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München eingeholt (240/01).

### *3.2 Histologie und Immunhistochemie*

Der Nachweis von IDO auf paraffinkonserviertem Gewebe wurde mittels Immunhistochemie durchgeführt. Die Immunhistochemie basiert auf der indirekten enzymatischen Färbung von Gewebeschnitten mithilfe von Antikörpern, wobei die jeweiligen Primärantikörper unmarkiert sind. Die gegen den ersten Antikörper gerichteten Zweitantikörper (Detektionsantikörper) sind an Enzymen gebunden, die farblose Chromogene in unlöslich gefärbte Endprodukte umwandeln. Bei jeder Färbung wurden Isotyp-, Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt, um

die Spezifität der Primär- und Sekundärantikörper zu überprüfen. Als Positivkontrolle dienten Lymphknotenmetastasen von Magenkarzinomen.

Sowohl von Tumorgewebe, als auch von makroskopisch tumorfreiem Magengewebe aus Antrum und Korpus wurden mit einem Mykrotom Paraffinschnitte einer Schichtdicke von 5 µm angefertigt. Die Schnitte wurden auf 24x50 mm Objektträgern aufgezogen, über Nacht luftgetrocknet und am nächsten Tag für 3 h im Ofen bei 50 °C getrocknet.

Zur immunhistochemischen Untersuchung wurden Gewebeschnitte von 25 *H.pylori* positiven und 25 *H.pylori* negativen Magenkarzinompatienten verwendet.

### **3.2.1 Immunhistochemische Färbung**

Zur Freilegung des Gewebes sowie der Gewebeantigene wurde eine Entparaffinierung des Gewebes vorgenommen. Hierfür wurden die Objektträger 2x10 min in ein Roticlear-Bad gegeben. Im nächsten Schritt erfolgte die Rehydrierung des Gewebes durch eine absteigende Alkoholreihe (2x5 min in Ethanol 100%, 2x5 min in Ethanol 96%, 1 min in Ethanol 70%, 1x15 min in Ethanol 70% + 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Durch Zusatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Ethanol wurde die endogenen Peroxidase, welche H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit Hilfe von ATP spaltet, inaktiviert. Die Gewebeschnitte wurden in phosphate buffered saline (PBS) gewaschen und zu Demaskierung der Antigene in dem auf 96°C im Wasserbad vorgeheizten Citratpuffer 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Präparate bei Raumtemperatur im Citratbad 20 min abgekühlt. Nach dem Abkühlen wurden die Proben mit PBS gespült und anschließend vollständig mit Superblock (ZytoChemPlus HRP Kit) benetzt, um unspezifische Bindungen an den demaskierten Antigenbindungsstellen zu verhindern. Nach 5 min wurde der Superblock von den Objektträgern abdekantiert und die Präparate mit 100 µl des 1:50 verdünnten IDO Antikörpers inkubiert (Tab. 1), danach erfolgten drei Waschvorgänge mit PBS. Die Inkubationszeit des Primärantikörpers sowie der Kontrollen betrug 1 h. Bei jedem Färbevorgang wurde ein Präparat als Isotyp-Kontrolle mit murinem IgG3 und ein weiteres als Negativkontrolle mit PBS inkubiert. Die Isotyp-Kontrolle wurde zum Ausschluss unspezifischer Bindungen des Antikörpers durchgeführt. Die Negativkontrolle dient dem

Ausschluss von unspezifischen Bindungen des sekundären Antikörpers am Gewebe. Die Inkubation mit dem biotinierten Zweitantikörper erfolgte auf allen Präparaten für 10 min. Dieser Schritt diente der Verstärkung der Färbung, da der biotinierte Antikörper mehrere Biotinbindungsstellen für den Farbumschlag anbietet. Anschließend wurden die Präparate mit PBS gespült und 2x5 min in PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Präparate 10 min mit Streptavidin HRP (ZytoChemPlus HRP Kit) inkubiert. Das Streptavidin besitzt eine hohe Affinität zum Biotin, setzt in einem späteren Arbeitsschritt das 3-Amino-9Ethylcarbazol (AEC) um und bewirkt so einen rotbraunen Farbumschlag. Anschließend wurden die Objektträger mit PBS gespült und 2x5 min in PBS gewaschen. Im Folgenden wurden die Präparate in eine Küvette mit AEC gegeben und 8 min auf einen Rüttler bei 80 rpm inkubiert und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Dann wurden die Präparate 15 s in gefiltertem Hämalaun gefärbt und anschließend für 10 min unter Leitungswasser gebläut. Im letzten Arbeitsschritt wurden die Objektträger mit Glyceringelatine eingedeckelt. Die Glyceringelatine verhindert die Austrocknung des Gewebes und bewirkt die Haftung des Deckglases auf dem Objektträger, durch welches die Streuung des Lichtes beim Mikroskopieren verringert wird und so die Beurteilung der Gewebe- und Färbequalität erleichtert wird. Die verwendeten Substanzen sind in Punkt 3.2.4 aufgeführt.

### **3.2.2 Hämatoxilin-Eosin Färbung**

Um eine histologische Beurteilung der verwendeten Präparate zu ermöglichen wurde parallel eine HE Färbung angefertigt. Für die HE Färbung wurde das Gewebe 2x10 min mit Roticlear entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (2x5 min in Ethanol 100%, 2x5 min in Ethanol 96%, 1 min in Ethanol 70%) rehydriert. Danach wurde 1 min mit dest. Wasser gespült und anschließend die Objektträger 8 min in Hämalaun gefärbt. Um den Farbstoff wieder auszuwaschen erfolgte Spülung mit dest. Wasser, anschließend eine 3 min Spülung mit Leitungswasser zum Bläuen der Präparate. Zur Differenzierung der Kernfärbung wurde mit 1% HCl-Ethanol 70% kurz gespült. Vor der Eosinfärbung wurde

nochmals mit Leitungswasser gebläut und mit dest. Wasser gespült. Die Präparate wurden mit Eosin 10 min gefärbt, anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% Ethanol kurz, 96% Ethanol 5 min, 100% Ethanol 5 min) inkubiert und für 10 min in ein Xylobad getaucht. Zuletzt wurden die Präparate mit Eukittbalsam eingedeckelt.

### 3.2.3 Zytokeratinfärbung

Um das Ausmaß der Infiltration maligner Zellen in den untersuchten Resektaten zu bestimmen wurde bei allen Präparaten eine Zytokeratinfärbung durchgeführt. Die Zytokeratinfärbung wurde anhand des unter Punkt 3.2.1 aufgeführten Färbeprotokolls durchgeführt, wobei der Primärantikörper der Firma Immunotech 1:100 verdünnt wurde (Tab. 1). Als Isotypkontrolle wurden die Präparate mit IgG1 inkubiert.

### 3.2.4 Materialien der Immunhistochemie

**Tabelle 1: Primärantikörper der Immunhistochemie**

Antikörper	Isotyp	Verdünnung	Stockkonzentration	Hersteller
IDO	Maus IgG3	1:50	1,0 mg/ml	Chemicon International, Temecula, USA
Maus IgG3		1:50	1,0 mg/ml	Biozol, Eching, D
Maus IgG1		1:100	1,0 mg/ml	Biozol
Zytokeratin	IgG1	1:100	0,12 mg/ml	Immunotech, Marseille, F

**Tabelle 2: Substanzen der Immunhistochemie**

<b>Substanzen und Puffer</b>	<b>Hersteller</b>
AEC: 3Amino-9Ethylcarbazol	Sigma, Steinheim, D
N,N-Dimethylformamide	Fluka, Buchs, CH
Natriumacetat wasserfrei	Merck, Darmstadt, D
37% Essigsäure	Merck
Anti-Breit-Spektrum-Biotin-Antikörper	Zytomed, Berlin, D
Eosin	Sigma
Eukitt	O.Kindler, Freiburg, D
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30%	Merck
Hämalaun	Merck
Kaiser´s Glyceringelatine	Merck
Roticlear	Roth, Karlsruhe, D
Streptavidin HRP Dako	Dako, Via Real, USA
Super Block	Zytomed
Super Plus Objektträger 24x50 mm	Menzel, Braunschweig, D
Xylol	Roth
ZytoChemPlus HRP	Zytomed

**PBS-Puffer-Lösung**

Die PBS-Pufferlösung dient als Spüllösung zum Abspülen von ungebundenem Antikörper auf den Gewebeschnitten. Gleichzeitig verhindert die auf den physiologischen Blut-pH-Wert 7,4 eingestellte Lösung das Austrocknen des Gewebes und ein osmotisches Aufplatzen der Zellen. Die Zusammensetzung des PBS-Puffers ist in Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3: Ansatz des PBS Puffers**

Substanz	Menge	Hersteller
Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	8,1 mM	Merck Darmstadt, D
Kaliumchlorid KCl	2,7 mM	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat $\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,5 mM	Merck
Natriumchlorid NaCl	137 mM	Fluka, Buchs, CH
in dest. Wasser.	pH 7,4	Apotheke, Klinikum Großhadern, LMU

**Citrat-Puffer-Lösung**

Der Citrat-Puffer besteht aus zwei Komponenten, Lösung A und B, welche kurz vor Verwendung zusammengeführt werden. Die verwendeten Substanzen sind in Tabelle 4 aufgeführt.

**Tabelle 4: Substanzen des Citratpuffers**

Substrat	Hersteller
Essigsäure $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{H}_2\text{O}$	Sigma, Steinheim, D
Natriumcitrat $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7\text{2H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt, D

Lösung A ist eine 0,1 M Essigsäurelösung in dest. Wasser.

Lösung B ist eine 0,1 M Natriumcitratlösung in dest. Wasser. Die beiden Lösungen wurden bis zu ihrem Gebrauch bei 4°C verwahrt. Unmittelbar vor Anwendung wurden pro Küvette 5,4 ml aus Lösung A und 24,6 ml aus Lösung B und 270 ml  $\text{H}_2\text{O}$  dest. vermischt und der Puffer im Wasserbad langsam auf 96°C erhitzt.

## **AEC-Lösung**

Die verwendeten Komponenten sind in Tabelle 2 dargestellt.

Es wurden 50 mg AEC (3Amino-9Ethylcarbazol) entnommen und in 5 ml N, N-Dimethylformamide aufgelöst. Ein 100 fach konzentrierter Acetatpuffer wurde aus 50 ml dest. Wasser, 28,7 g Natriumacetat und 9,4 ml 37% Essigsäure angesetzt. Die gebrauchsfertige AEC-Lösung wurde durch Vermischen von 200 ml dest. Wasser, 2 ml Natriumacetat, 5 ml des gelösten AEC und 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% hergestellt.

### *3.3 Nachweis von IDO mRNA in Tumorgewebe von Magenkarzinompatienten*

Die IDO Expression wurde ebenfalls auf Ribonukleinsäure (RNA) Ebene mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) Analysen in kultivierten Magenkarzinomzelllinien, in Magenkarzinompräparaten und in tumorfreiem Korpusgewebe untersucht.

#### **3.3.1 Methoden der Zellkultur**

Alle Arbeiten mit vitalen Zellen, wurden an einer Sterilwerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um Kontaminationen mit Bakterien und Pilzen zu vermeiden. Zum Auftauen der Zellen wurden die Probenröhrchen in einem 37°C warmen Wasserbad erwärmt, bis die Zellsuspension am Rand des Röhrchens aufgetaut war. Anschließend wurde die Suspension in ein mit 35 ml Complete Medium (CM) (Tab. 5) gefülltes 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 7 min bei 1200 U/min und 18°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml CM resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in eine Zellkulturflasche überführt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden in CM kultiviert. Alle 3-4 Tage wurde das Medium gewechselt. Kurz vor Konfluenz wurden die Zellen durch Zugabe von 66 µl Trypsin-EDTA (1x) /cm<sup>2</sup> Zellfläche für 3 bis 5 min, abhängig von der Zelladhärenz, bei 37°C abgelöst. Die Trypsinwirkung wurde



durch Zugabe von FCS-haltigem Medium geblockt. Die abgelösten Zellen wurden zentrifugiert, in CM aufgenommen und auf neue Kulturflaschen verteilt.

Für die Langzeitlagerung von Zellen in flüssigem Stickstoff wurden Zellen mit Trypsin aus einer konfluent bewachsenen Zellkulturflasche abgelöst, gewaschen und in FCS mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert. DMSO wird zugesetzt um die Bildung von Eiskristallen zu verhindern, die das Platzen der Zellen verursachen würden. Alle Arbeitsschritte wurden zügig und mit 4°C kaltem Einfriermedium durchgeführt. Die Zellsuspension wurde in 1,2 ml Cryovials (Simport, Quebec, CA) pipettiert, für 24 h in einem 90%igen Ethanolbad bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert. Die verwendeten Substanzen sind in Tabelle 5 aufgeführt, die untersuchten Zelllinien in Tabelle 6 aufgelistet.

**Tabelle 5: Substanzen der Zellkultur**

Substanz	Zusammensetzung/Konzentration	Hersteller
DNase I	10 U/µl	Roche, Grenzach-Wyhlen, D
FCS		Invitrogen, Carlsbad, USA
Gentamycin	100 µg/ml	Cambrex, Verviers, B
HBSS Hank's Balanced Salt Solution		Cambrex
Hyaluronidase	100 µg/ml	Sigma, Steinheim, D
IFN-γ	20 µg/ml	PeptoTech, London, GB
Kollagenase	250 mg/ml	Sigma, Steinheim, D
Nährmedium der Tumorzelllinien: Complete Medium (CM)	RPMI 1640 10% FCS 1 mM NaPyruvat 0,1 mM NEAA 2 mM L-Glutamin 50 µg/ml Gentamycin	Cambrex
Trypsin/EDTA	200 mg/l Versene 500 mg/l Trypsin 1:250	Cambrex

**Tabelle 6: Untersuchte Magenkarzinomzelllinien**

Magenkarzinomzelllinie	Herkunft
23132	Primäres Magenkarzinom
GC1 LN-Tu	Lymphknotenmetastase
GC20 LN-Tu	Lymphknotenmetastase
GC9 LN-Tu	Primäres Magenkarzinom
Hs746T	Weichteilmetastase
MKN1	Primäres Magenkarzinom
MKN28	Lymphknotenmetastase
N87	Lebermetastase

### 3.3.2 RNA Isolierung

Für die RNA Isolierung aus dem Tumorgewebe wurden aus den Präparaten bei -23°C im Kryostaten 10 µm dicke Schnitte erstellt. Von jedem Gewebe wurden 20 Schnitte in 20 µl Gewebepuffer (Tab. 7) für die RNA Gewinnung überführt.

Aufgrund der allgemein sehr geringen Volumina an Gewebe beziehungsweise RNA, war eine photometrische Analyse der Patienten-RNA nicht möglich. Die Qualität der RNA wurde durch β-Actin und 18S rRNA als „housekeeping“ Gen berücksichtigt (siehe 3.3.4).

**Tabelle 7: Gewebepuffer**

Substrate	Hersteller	Menge
1,25 PCR-Puffer	Roche, Grenzach-Wyhlen, D	2,5 µl
1 U DNase I (10 U/µl)	Roche	0,1 µl
2 mM DTT	Roche	0,4 µl
5 U RNAsin (30 U/µl)	Roche	0,167 µl
H <sub>2</sub> O RNase freies Wasser	Sigma, Steinheim, D	16,833 µl
Gesamtvolumen		20 µl

Für die RNA Isolierung aus Magenkarzinomzelllinien wurden die Zellen kultiviert und vor Konfluenz weiterverarbeitet. Die RNA Gewinnung aus den Zelllinien und aus den Patientengewebeproben erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen. Das Prinzip dieser RNA-Gewinnung besteht aus einer Kombination von Gewebe Lyse mit Guanidin-Isothiocyant, sowie RNA-Aufbereitung und Filterung mittels einer Silicatgel-Membran.

**Tabelle 8: Bestandteile des RNeasy Mini Kit**

Material	Firma
β-Mercapto-Ethanol 25 ml	Sigma, Steinheim, D
RLT Lysepuffer	Qiagen, Hilden, D
RPE Waschpuffer 55 ml Konzentrat	Qiagen
Buffer RW1 Waschpuffer	Qiagen
Probenröhrchen 2 ml	Qiagen
Ethanol 100% mit Petrolether vergällt 5l	Apotheke
Ethanol 70%	Apotheke
QIA Shredder (50)	Qiagen
RNAse freies Wasser 1 l	Sigma
Rneasy mini Säule, PCR rein	Qiagen
Safe lock tube PCR rein 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg, D

Die Isolierung von RNA erfolgte bei Raumtemperatur an einem zuvor mit 80%igem Alkohol gereinigten RNA-Platz, um Verunreinigung durch Fremd-RNA zu verhindern.

Die im Gewebepuffer aufgelösten Schnitte wurden in 600 µl RLT Lyse Puffer mit 1% β-Mercapto-Ethanol resuspendiert. Die Mischung wurde in eine Shreddersäule pipettiert und 2 min bei 14000 rpm in einer Eppendorf Zentrifuge zentrifugiert. Dem Eluat wurden 600 µl Ethanol 70% zugegeben, die Suspension auf eine RNeasy Säule gegeben und bei 10000 rpm für 15 s zentrifugiert. Die Säule wurde nachfolgend mit 700 µl RW1-Puffer und 500 µl RPE Puffer gewaschen und 15 s bei 10000 rpm zentrifugiert.

Nach einem weiteren Waschschrift mit 500 µl RPE wurde 2 min bei 10000 rpm zentrifugiert und mit einem neuen Auffangröhrchen 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert um Pufferreste an der Säule zu entfernen. Die Säule wurde in ein neues Röhrchen gestellt, 30 µl RNase freies Wasser auf die Membran pipettiert und 1 Minute bei 10000 rpm zentrifugiert. Bei den Zelllinien wurde mittels Photometer die extrahierte messenger RNA (mRNA) Konzentration spektrophotometrisch (Biophotometer 6131, Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Aufgrund der quantitativ geringen RNA-Menge aus Patientengewebe konnte keine photometrische Analyse erfolgen. Die so isolierte RNA wurde bei –80°C weggefroren und gelagert.

### 3.3.3 cDNA Synthese

Vor der Synthese der komplementären DNA (cDNA) wurde eine DNase1-Verdauung durchgeführt, um eventuell vorhandene, genomische Desoxyribonukleinsäure (DNA) zu eliminieren. 2 µg RNA wurden mit einer Einheit DNase1 auf 7 µl RNase freies Wasser gegeben und 30 min bei 37°C im Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Die RNA aus Gewebe wurde unverdünnt (3,5 µl) eingesetzt. Die Proben wurden 5 min bei 75°C inkubiert, um die DNase zu inaktivieren und die RNA zu denaturieren. Anschließend wurden die Proben auf Eis gekühlt. Für die cDNA-Synthese wurde die denaturierte RNA zum cDNA Mastermix gegeben (Tab. 9) und 1 h bei 37°C, sowie 10 min bei 95°C inkubiert. Am Ende der Umschreibung wurden die Proben auf 4°C abgekühlt. Jeweils 5 Patientenproben und 1 Negativkontrolle (RNase freies Wasser) wurden gemeinsam synthetisiert.

Die Lagerung der cDNA erfolgte bei –80°C.

**Tabelle 9: Substrate der cDNA Herstellung**

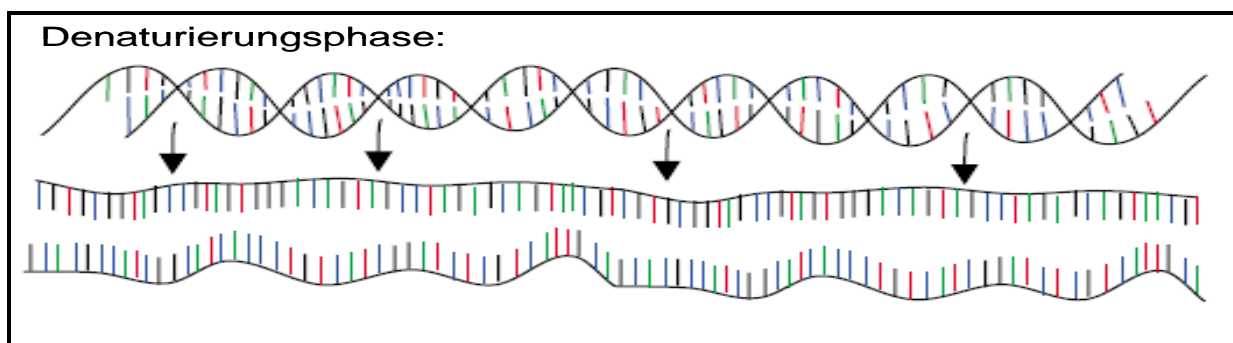
Substanzen	Menge pro Ansatz	Hersteller
2mM dNTP , bestehend aus: Desoxyribonucleoside Triphosphate Set PCR Grade 4x 25µmol dATP, dCTP, dGTP, dTTP	0,2 µl	Roche, Grenzach-Wyhlen, D

10 mM DTT	0,65 µl	Roche
PDT15	0,5 µl	Roche
MMLV RT (200U/µl)	0,5 µl	Invitrogen, Carlsbad, USA
RNAse freies Wasser	3,35 µl	Sigma, Steinheim, D
First Strand Buffer 5x	1,3 µl	Invitrogen
Gesamtvolumen	6,5 µl	
zugegebene RNA	3,5 µl	

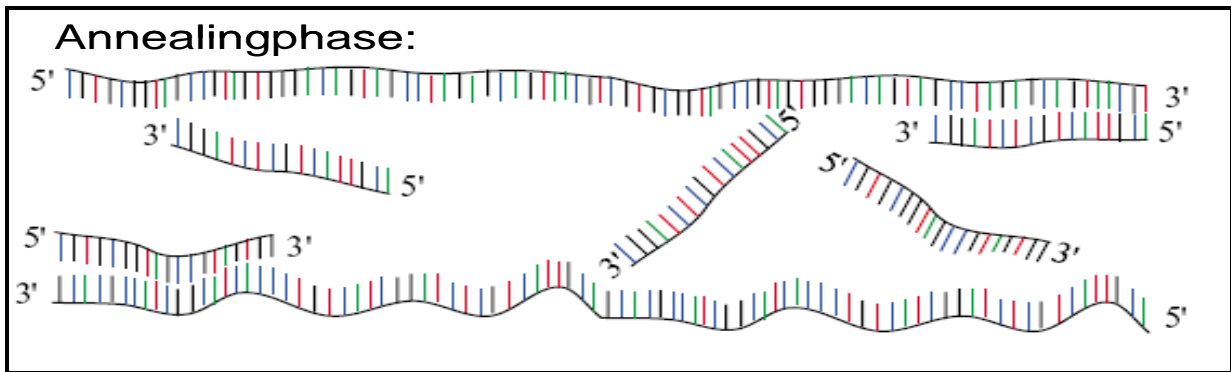
### 3.3.4 Polymerasekettenreaktion

Die cDNA stellt eine Sequenz der DNA dar, die mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) aus einer mRNA katalysiert wird. Da die Introns bei der RNA Synthese entfallen, werden durch die cDNA nur die Exons eines Gens codiert. Die cDNA wird mit Hilfe der PCR amplifiziert. Die PCR bezweckt, eine sehr große Zahl von Kopien eines Genabschnittes zu bilden, damit diese Sequenz nachweisbar wird.

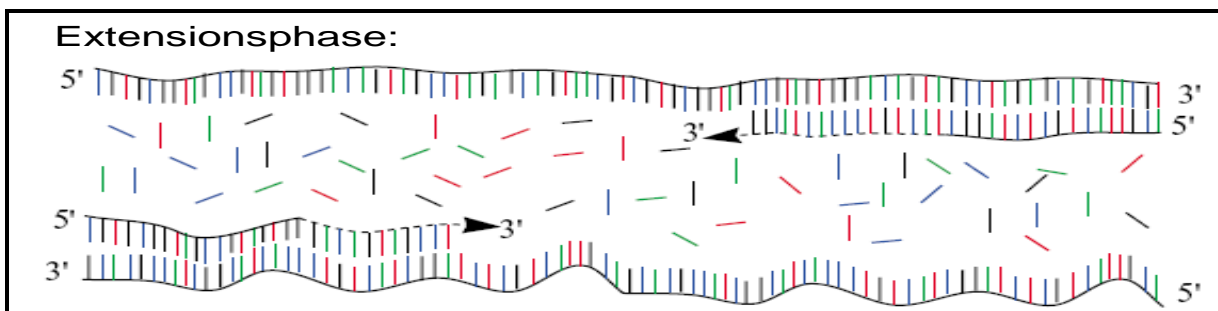
Prinzipiell lassen sich drei Hauptschritte in einer PCR unterscheiden, die Denaturierung, Annealing- und Verlängerungsphase, die für beispielsweise 30 oder 40 Zyklen wiederholt werden. Die Proben werden hierbei in einen Cycler gegeben, der diese aufheizen und ebenfalls in kurzer Zeit wieder abkühlen kann.



Die Phase der Denaturierung erfolgt bei 95°C: Während dieser Phase wird der DNA-Doppelstrang zu Einzelsträngen aufgebrochen und alle enzymatischen Reaktionen stoppen.



Die Annealingphase erfolgt bei z.B. 54°C: Die Primer lagern sich über Ionenbindung an entsprechende Strangstellen, die sie erkennen können. Die Primer dienen der Polymerase zur Anbindung, damit diese den komplementären Strang erstellen kann. Die gewählte Temperatur ist abhängig von der Primersequenz und -länge, so dass sie primerspezifisch bestimmt werden muss.



Die Extension- bzw. Verlängerungsphase erfolgt bei 72°C, dies ist die optimale Arbeitstemperatur der Taqpolymerase. Diese liest den Strang vom 3'- zum 5'-Ende und katalysiert den passenden Gegenstrang. Weil jeder Einzelstrang wiederum für sich multipliziert wird, gibt es einen exponentiellen Anstieg der Anzahl an Kopien. Jede PCR wird mit bestimmten Primern durchgeführt, abhängig vom Genabschnitt, der nachgewiesen werden soll.

In dieser Arbeit kamen als Primer IDO, IL-8,  $\beta$ -Actin und 18S rRNA (Tab. 12) zur Anwendung. Das  $\beta$ -Actin Gen ist ein so genanntes „housekeeping“ Gen. Als housekeeping Gene bezeichnet man diejenigen Gene die in allen Zellen konstant exprimiert werden. Bei Auftreten des  $\beta$ -Actin Gens wird angenommen, dass  $\beta$ -Actin konstitutiv exprimiert wird, wodurch die Genexpression als Vergleichsgröße bei der semiquantitativen Auswertung herangezogen werden kann. 18S rRNA kam zum Teil ebenfalls als housekeeping Gen zur Anwendung.

In einem PCR Zyklus wurden jeweils 5 Patientenproben, eine Positivkontrolle (THP1 [41]) und eine Negativkontrolle amplifiziert. 2 µl der gewonnenen cDNA wurden in 48 µl PCR Mastermix (Tab. 10) mit Hilfe der PCR amplifiziert. Als Kontrollen wurden bei jedem Amplifizierungsvorgang eine Positivkontrolle mit cDNA aus Magenkarzinomzelllinien, sowie eine Negativkontrolle mit RNase freiem Wasser durchgeführt. In Tabelle 11 sind die Cyclerprogramme für den Nachweis des entsprechenden Genabschnittes dargestellt.

**Tabelle 10: Ansatz der PCR**

Substrat	Menge pro Ansatz	Hersteller
10 mM dNTP	1 µl	Roche, Grenzach-Wyhlen, D
10x Reaction Buffer	5 µl	Roche
DNase freies Wasser	41,2 µl	Sigma, Steinheim, D
Primer antisense	0,3 µl	siehe Tabelle 12
Primer sense	0,3 µl	siehe Tabelle 12
5 U/ml Taqpolymerase	0,2 µl	Roche
Gesamtvolumen	48 µl	
zugegeben cDNA	2 µl	

**Tabelle 11: PCR Protokoll**

Genabschnitt	Arbeitsschritte	Temperatur	Zeit
β-Actin	1:	94°C	5 min
	2:	92°C	30 s
	3:	59°C	30 s
	4:	72°C	35 s
	5:Schritt 2 bis 4 22x wiederholt		
	6:	75°C	5 min
	7:	4°C	konstant

IDO	1:	94°C	5 min	
	2:	92°C	30 s	
	3:	59°C	1 min	
	4:	72°C	1 min	
	5:	Schritt 2 bis 4 38x wiederholt		
	6:	75°C	5 min	
	7:	4°C	konstant	
IL-8	1:	94°C	5 min	
	2:	92°C	30 s	
	3:	59°C	1 min	
	4:	72°C	1 min	
	5:	Schritt 2 bis 4 38x wiederholt		
	6:	75°C	5 min	
	7:	4°C	Konstant	
18S rRNA	1:	94°C	5 min	
	2:	92°C	30 s	
	3:	59°C	1 min	
	4:	72°C	1 min	
	5:	Schritt 2 bis 4 38x wiederholt		
	6:	75°C	5 min	
	7:	4°C	konstant	

**Tabelle 12: Primer der PCR**

Bezeichnung	Hersteller	Basensequenz der Primer 5' bis 3' :
β-Actin forward	Metabion, München, D	ACC AAC TGG GAC GAC ATG GAG
β-Actin reverse	Metabion	GTG AGG ATC TTC ATG AGG TAG TC
Indoleamine 2,3 Dioxygenase forward	Metabion	GGT CAT GGA GAT GTC CGT AA



Indoleamine 2,3 Dioxygenase reverse	Metabion	ACC AAT AGA GAG ACC AGG AAG AA
IL-8 forward	Metabion	ATG ACT TCC AAG CTG GCC GC
IL-8 reverse	Metabion	GAG AAG TTT TTG AAG AGG GCT GA
18S rRNA	Metabion	CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA
18S rRNA	Metabion	GCT GGA ATT ACC GCG GCT

### 3.3.5 Gelelektrophorese

Zur Auswertung der aus der PCR gewonnenen DNA wurde eine Kombination aus Gelelektrophorese mit optischer Analyse verwendet. Die Gelelektrophorese ist eine Methode um verschiedene Arten von Molekülen aufzutrennen. Hierbei bewegt sich ein Gemisch aus zu trennenden Molekülen mittels eines elektrischen Feldes durch ein Ethidiumbromid-Agarose-Gel, welches sich in einer ionischen Pufferlösung, z.B. TAE-Puffer (Tab. 13), befindet. Das Gel wirkt während der Molekülbewegung wie eine Art Sieb. Negativ geladene DNA Moleküle wandern in Richtung der positiv geladenen Anode, Kleine DNA Moleküle schneller als Große. Ethidiumbromid lagert sich in die DNA und kann unter UV Licht sichtbar gemacht werden. Gleiche DNA Moleküle durchlaufen das Gel in so genannten gleichen Banden. Ist die Größe einiger Moleküle bekannt, kann man deren Größe mit anderen Banden bzw. Molekülen abschätzen. Dabei helfen auch so genannte Molekulargewichtsstandards (z.B. 100 Basenpaar (bp) Marker).

**Tabelle 13: Ansatz Ethidium-Bromid-Gel**

Substrate	Menge pro Gel	Hersteller
1xTAE Puffer Tris 40 mM, Essigsäure 0,11%, EDTA 1 mM pH 8,0	100 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Agarose gold universal	1,5 g	Peqlab, Erlangen, D
Ethidiumbromid	3 µl	Biorad, Hercules, USA

Für die Herstellung eines 1,5% Agarosegels wurden 100 ml des 1xTAE-Puffers mit 1,5 g Agarose aufgeköcht und 10 min gemischt. Anschließend wurde das Gel in eine dafür vorgesehene Gelkammer gegossen, 3 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und die DNA-Kämme in das Gel gesetzt. 10 µl des 6 x Ladepuffers (MBI Fermentas, St.Leon-Rot) wurden zu 50 µl PCR Probe pipettiert, gut gemischt und pro Geltasche 10 µl pipettiert. Die erste und letzte Geltasche wurde für den 100 bp Marker (Zusammensetzung siehe Tab. 14) vorgesehen. Die PCR Produkte wurden bei einer Spannung von 80V für 10 min, anschließend von 120V für 60 min aufgetrennt. Nach abgelaufener Zeit wurde das Gel mit einer Kamera mit Ethidiumbromidfilter (Cool Snap Pro, Roper Scientific, Japan) und unter UV-Licht photographiert. Die Intensität der Banden wurde densitometrisch mit dem Gel-pro-Analyser-System ausgewertet.

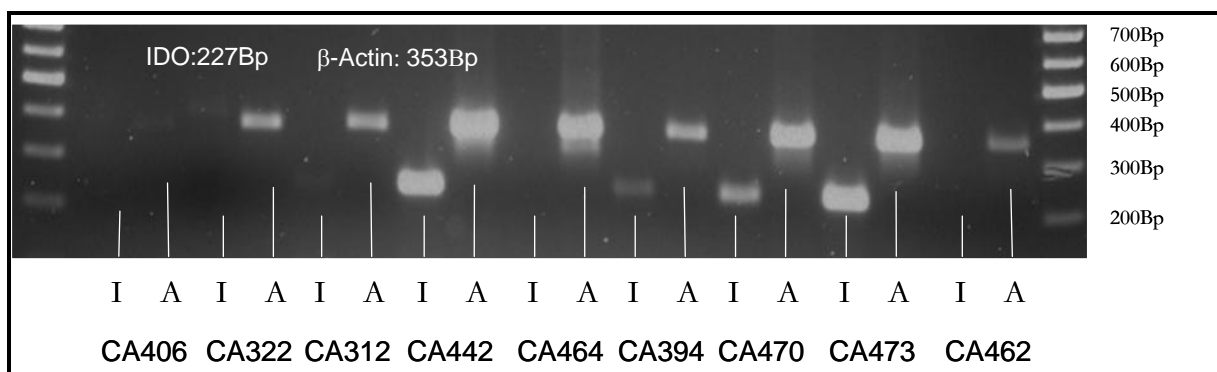
**Tabelle 14: Ansatz des Basenpaar Markers**

Substrat	Menge pro Geltasche	Hersteller
6 x Ladepuffer Loading Dye Solution 1ml	3 µl	MBI Fermentas, St.Leon-Rot, D
DNase freies Wasser	14,6 µl	Sigma, Steinheim, D
100 bp DNA Ladder 0,05 mg	2,4 µl	MBI Fermentas
Gesamtvolumen	20 µl	

### 3.3.6 GelProAnalyser

Mit dem GelProAnalyser Programm können die bei Gelelektrophorese abfotografierten Banden dokumentiert, verglichen und verrechnet werden.

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde die optische Dichte jeder IDO- und  $\beta$ -Actin-Bande gemessen. Um immer gleiche Bedingungen bei der Auswertung der Banden zu gewährleisten, wurden sämtliche Einstellung, wie Zoom, Helligkeit und Kontrast standardmäßig verwendet. Abbildung 4 zeigt beispielhaft die Trennung der PCR Produkte auf dem Agarosegel mit 227 Basenpaar (Bp) großen IDO Fragmenten und 353 Bp großen  $\beta$ -Actin Fragmenten.



**Abbildung 4: Beispielhafte Darstellung der zur Auswertung verwendeten Elektrophorese Banden. I: IDO, A:  $\beta$ -Actin, Positivkontrolle und Negativkontrolle erfolgten vorab Patientennamen wurden durch fortlaufende Karzinomnummern ersetzt (z.B. CA 406)**

### 3.3.7 Graphpad Prism

Zur statistischen Auswertung der optischen Dichten, wurde zuerst die Ratio von IDO zu  $\beta$ -Actin entsprechender Banden gebildet, anschließend mit verschiedenen Daten, wie *H.pylori*-Status, Geschlecht, Tumortyp (Lauren Klassifikation [42]) oder durchgemachter *H.pylori*-Gastritis verglichen und mit Hilfe von Graphpad Prism Version 3.00 statistisch (Mann-Whitney test) ausgewertet. P Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant gewertet. Sofern eine Subgruppenanalyse durchgeführt wurde, wurde das Signifikanzniveau p mit der Anzahl der möglichen Alterationen multipliziert, im Sinne einer Bonferroni-Korrektur.

Im Text sind der Median und das Konfidenzintervall (KI) dargestellt. Das Konfidenzintervall ist ein Begriff aus der mathematischen Statistik. Er sagt etwas über die Präzision der Lageschätzung eines Parameters aus. Das Konfidenzintervall, auch Vertrauensbereich oder Vertrauensintervall bezeichnet, enthält mit einer (Irrtums-)Wahrscheinlichkeit von  $p$  mit der Untergrenze  $G_U$  und der Obergrenze  $G_O$  nicht den wahren Wert. Anders gesagt, ein Konfidenzintervall mit einer 95-prozentigen Überdeckungswahrscheinlichkeit ist so zu verstehen, dass in 95 Prozent aller Stichproben das KI den wahren Wert enthält. Die Unter- und Obergrenze sind im Text mit eckigen Klammern angegeben.

### **3.3.8 Einfluss von *H.pylori* auf die IDO Expression in Magenkarzinomzellen**

Um die IDO Expression in Tumorzelllinien nachzuweisen und einen möglichen Einfluss von *H.pylori* auf die IDO Expression zu bestimmen wurden die in Tabelle 6 aufgeführten, von Magenkarzinomprimärtumoren und –metastasen abstammenden Zelllinien auf eine eventuell vorhandene konstitutive IDO Expression hin untersucht. Jede Zelllinie wurde 24 h mit 20 ng/ml IFN- $\gamma$  inkubiert und die IDO Expression bestimmt. Als Kontrolle wurde für jede Zelllinie  $\beta$ -Actin und zum Teil 18S rRNA als housekeeping Gen mitgeführt. Zelllinien, welche bereits im unstimulierten Zustand eine deutliche IDO Expression zeigten (GC9, GC20, Hs746T, N87, MKN1) wurden auf eine mögliche, hemmende Wirkung einer direkten *H.pylori* Inkubation untersucht. Als Medium wurde CM ohne Gentamycin verwendet, da bei einer Inkubation mit Gentamycin eine Inaktivierung des Bakteriums durch das Antibiotikum erfolgt. Jede Zelllinie wurde entweder mit Medium, 24 h mit 20 ng/ml IFN- $\gamma$  oder für 5 h bzw. 24 h mit *H.pylori* (Stamm P12, MOI 10) inkubiert. Die Stimulierung erfolgte im Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München. *H.pylori* P12 wurden uns dankenswerter Weise von der Arbeitsgruppe um Prof. R. Haas zur Verfügung gestellt.

Die Zellen wurden mit 600  $\mu$ l RLT- Puffer mit 1%  $\beta$ -Mercapto lysiert und unter dem Mikroskop die Zerstörung der Zellmembranen kontrolliert. Mittels Zell-Scraper wurden die

Zellen abgelöst. Die RNA und cDNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit wie unter Punkt 3.3.2 und 3.3.3 beschrieben präpariert. Als Kontrollversuch einer erfolgreichen *H.pylori* Stimulation wurden die IL-8 Expression in den Proben untersucht. Die IL-8 PCR wurde mit 30 Zyklen bei 94°C Denaturierungstemperatur, 59°C Annealingtemperatur und 72°C Extensionstemperatur durchgeführt (Tab. 11, 12).

### 3.3.9 Geräte und Verbrauchsmaterial

**Tabelle 15: Verwendete Geräte**

Gerät	Hersteller
Biophotometer 6131	Eppendorf, Hamburg, D
Brutschrank	Binder, Tuttlingen, D
Geldokumentationssystem	Leica, Wetzlar, D
Kamera, Cool Snap Pro	Roper Scientific, Tokyo, J
Kryostat Jung Frigucut 2800E	Leica
Kühlschrank -20°C Arctis	AEG, Nürnberg, D
Kühlschrank 4°C	Liebherr, Biberach, D
Kühlschrank -80°C	Heraeus, Hanau, D
Magnetrührer, IKACombimag RTC	Janke & Kunkel, Staufen, D.
Mikroskop Laborlux DM LB2	Leica
Mikrowelle 1000 W	Siemens, München, D
Mykrotom HM400	Microm, Heidelberg, D
Neubauerzählkammer	Boehringer, Mannheim, D
PCR-Platz/DNA-Workstation	UNIEQUIP, Martinsried, D
PH Meter	WTW, Weilheim, D
Pipetten: Pipetten Reference 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl Easypet	Eppendorf
Rüttler Unimax 1010	Heidolph, Schwabach, D
Sicherheitswerkbank	Heraeus

Stickstofftank AirLiquid	Kryotechnik, Wiesbaden, D
Temperaturzyklusautomat	Eppendorf
Vortexgerät: Vortexgenie	Bader und Hobein AG, Zürich, CH
Waagen: Electronic Balance Mettler PL 1200	A&D Company, Tokyo, J Mettler Waagen GMBH, Gießen, D
Wasserbad	Julabo, Seelbach, D
Zentrifuge 5417R Kühlzentrifuge Rotina 48R	Eppendorf Hettich, Tuttlingen

**Tabelle 16: Verbrauchsmaterialien**

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Handschuhe	Semperit, Hannover, D
Sterile Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, D
Papierfilter Grade3 hw,65 g/m <sup>2</sup>	Sartorius, Göttingen, D
Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden, D
Zentrifugenröhrchen	TPP, Trasadingen, CH
Zellscaper	TPP, Trasadingen, CH

**Tabelle 17: Chemikalien**

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
50x TAE-Puffer	Eppendorf, Hamburg, D
Agarose gold universal	Peqlab, Erlangen, D
Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, D
EDTA: Ehtylendiaminetetraacetic Acid	Sigma, Steinheim, D
Ethanol 100%,96%,70%	Apotheke Klinikum Innenstadt
Ethidiumbromid	Biorad, Hercules, USA
Glyceringelatine	Merck

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30%	Merck
HCL 37%	Merck
Kaliumchlorid KCL	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Natriumchlorid NaCl	Fluka Schweiz
Trypanblau	Cambrex, Verviers, B
Wasserstoffperoxid 3%	Apotheke Klinikum Innenstadt

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Nachweis von IDO mittels Immunhistochemie

IDO positive Zellen konnten im Tumor, Antrum und Korpus sowohl bei *H.pylori* positiven, als auch bei *H.pylori* negativen Präparaten nachgewiesen werden (Abb. 5, 6). Die IDO positiven Zellen konnten mithilfe der Zytokeratinfärbung (Abb. 7, 8) morphologisch als Tumorzellen identifiziert werden. Neben einzelnen IDO positiven Zellen (Abb. 5 A, B), führte der IDO Antikörper zu ausgeprägten unspezifischen Färbungen, welche insbesondere bei Mukosazellen auftraten (Abb. 9 A, Nr. 1; Abb. 10 A, B). Aufgrund der ausgeprägten unspezifischen Färbung war eine Auswertung nicht möglich.

Somit konnte aus den Ergebnissen der Immunhistochemie keine Aussage über die Anzahl IDO positiver Zellen im Korpus, Antrum oder Tumor bei *H.pylori* positiven und *H.pylori* negativen Magenkarzinompatienten gemacht werden.

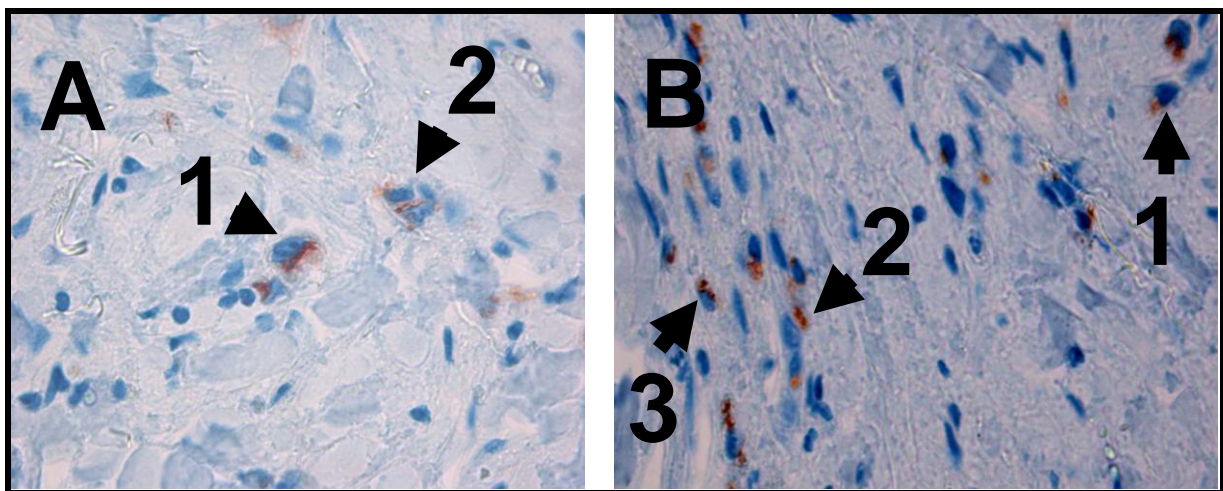
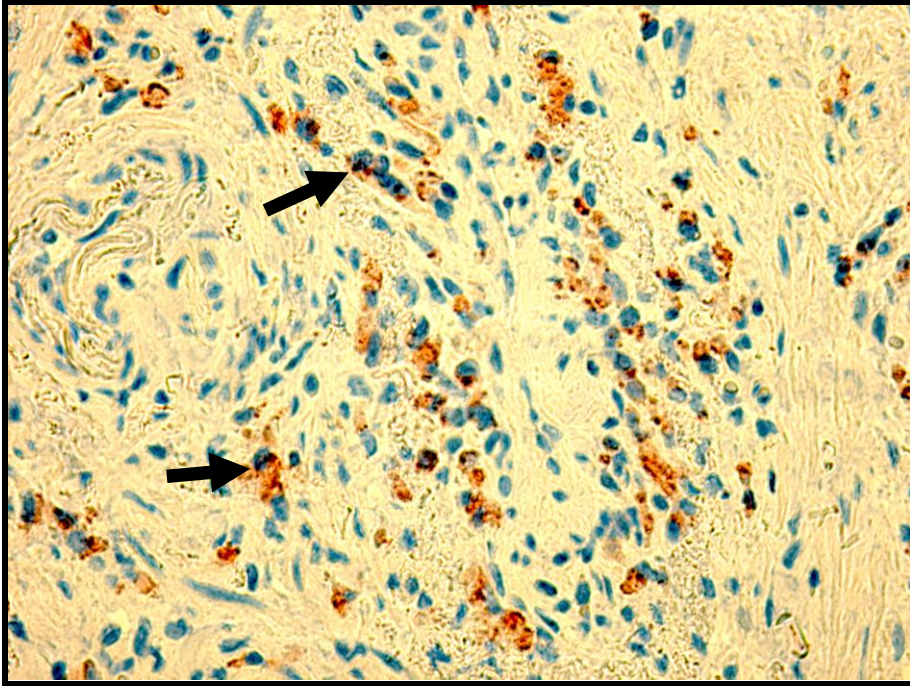
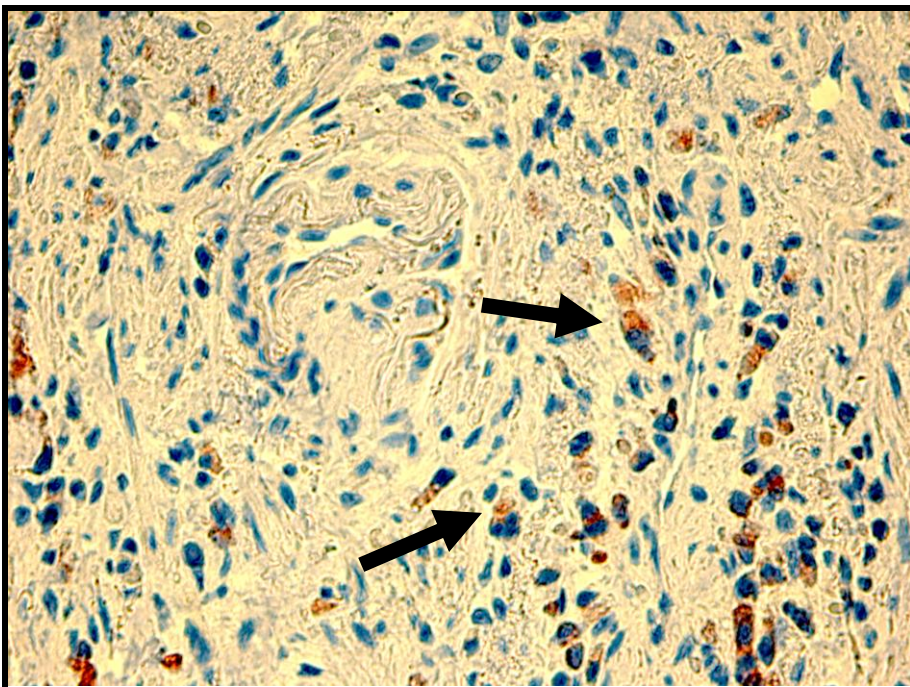


Abbildung 5: Immunhistochemischer Nachweis von IDO in Magenkarzinomgewebe: Immunfärbung von IDO. A: Tumorpräparat 324 eines *H.pylori* negativen Patienten, Vergrößerung 400x, Pfeile zeigen IDO positive Zellen B: Tumorpräparat 448 eines *H.pylori* positiven Patienten, Vergrößerung 400x, Pfeile zeigen IDO positive Zellen





**Abbildung 6: Immunhistochemischer Nachweis von IDO in Magenkarzinomgewebe: Immunfärbung von IDO. Tumorpräparat 323 eines *H.pylori* positiven Patienten, Vergrößerung 40x, Pfeile zeigen IDO positive Zellen.**



**Abbildung 7: Immunhistochemischer Nachweis von Tumorzellen in Magenkarzinomgewebe: Zytokeratinfärbung. Tumorpräparat 323 eines *H.pylori* positiven Patienten, Vergrößerung 40x, Pfeile zeigen Tumorzellen.**



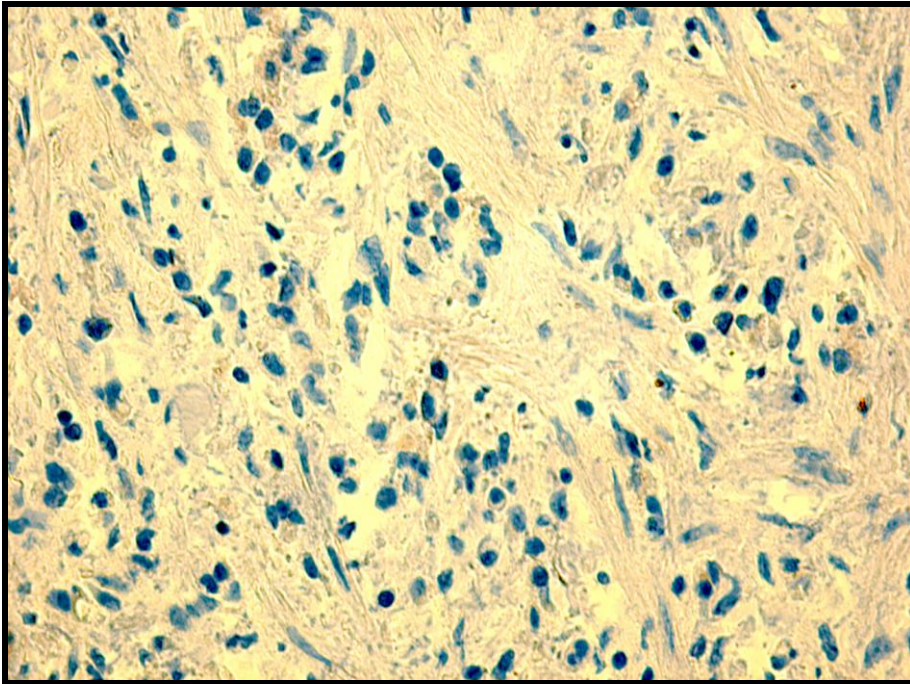


Abbildung 8: Isotypkontrolle in Magenkarzinomgewebe: Isotypkontrollfärbung. Tumorpräparat 323 eines *H.pylori* positiven Patienten, Vergrößerung 40x.

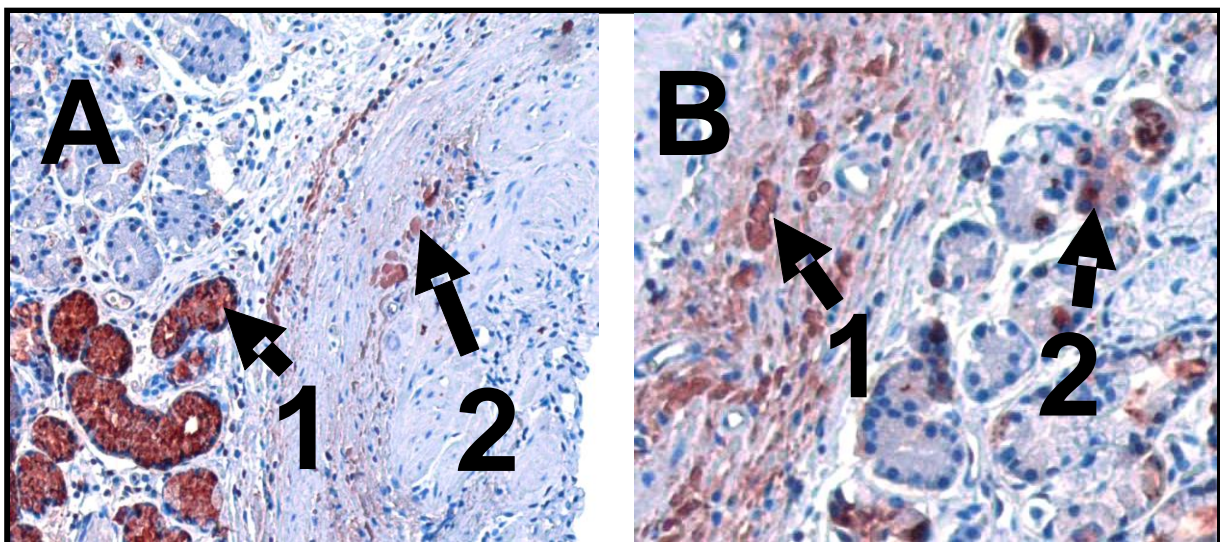
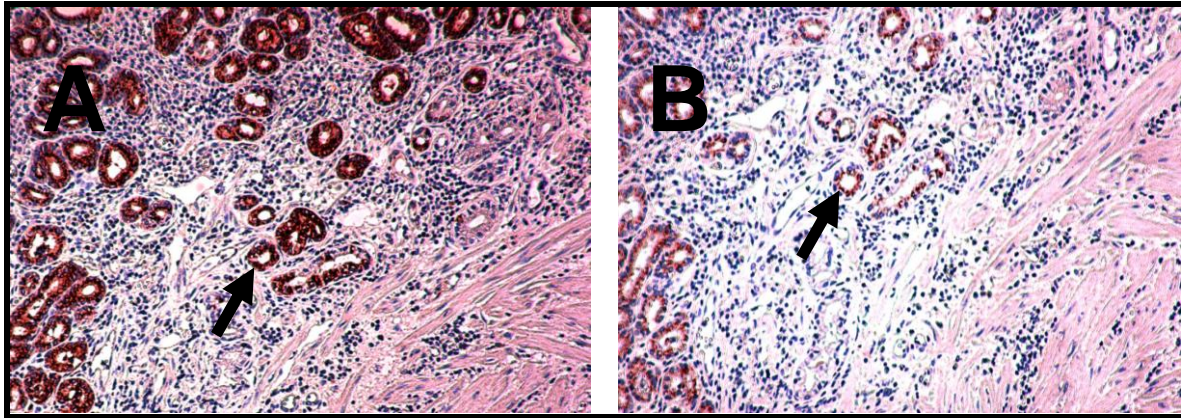


Abbildung 9: Unspezifische Bindungen von IDO Antikörper in Magengewebe: Immunfärbung von IDO. A: Korpuspräparat 324 eines *H.pylori* negativen Patienten, Vergrößerung 100x, Pfeile zeigen auf unspezifisch gefärbte Zellen B: Korpuspräparat 324, Vergrößerung 200x. Pfeile zeigen auf unspezifisch gefärbte Zellen



**Abbildung 10: Vergleich von IDO Immunfärbung und Isotypfärbung: A: Immunfärbung von IDO, Tumorpräparat 316 eines *H.pylori* negativen Patienten, Vergrößerung 20x, Pfeile zeigen auf unspezifisch gefärbte Zellen. B: Isotypfärbung, Tumorpräparat 316, Vergrößerung 20x, Pfeile zeigen auf unspezifisch gefärbte Zellen**

Für den immunhistochemischen Nachweis von IDO auf Paraffingewebe wurde der Primärantikörper, Indoleamine 2, 3 Dioxygenase, der Firma Chemikon International verwendet. Es zeigte sich, dass selbst bei sehr starker Verdünnung des Primärantikörpers eine nicht auswertbarere Hintergrundfärbung und massive Farbzusammenschlüsse auftraten, welche Modifikationen am Färbeprotokoll notwendig machten. Die Umstellung auf einen anderen Sekundärantikörper (DAKO) führte zu aussagekräftigeren Färbungen. Des Weiteren wurden von jedem Patienten eine HE Färbung und eine Zytokeratinfärbung (Marker für Karzinomzellen) angefertigt. Bei einigen Präparaten schien der Färbeporgang erfolgreich (Abb. 5 A, B, Abb. 6), es zeigten sich einzelne gut differenzierbare IDO positive Zellen, welche durch Zytokeratinfärbung und Isotypkontrolle morphologisch als Tumorzellen identifiziert werden konnten. Bei etwa 20% der Präparate zeigten sich aber erneut massive Farbzusammenschlüsse oder unspezifische gefärbte Zellen und Zellareale (Abb. 9, 10), welche trotz zahlreicher Modifikationen an Primärantikörperverdünnung, Sekundärantikörperverdünnung, Citratpuffertemperatur und Inkubationszeit letztendlich keine auswertbare IDO-Färbung ergaben. Die unspezifisch falsch positiv gefärbten Zellen fanden sich sowohl im Tumorgewebe, als auch im tumorfreien Gewebe von Korpus und Antrum.

Die Differenzierung spezifisch gefärbter IDO positiver und IDO negativer Zellen war aufgrund dieser Problematik nicht möglich, eine Auszählung der positiv gefärbten Zellen pro Mikroskopsehfeld zum Teil nicht durchführbar.

Die Ursache der unspezifischen Färbung liegt vermutlich am monoklonalen Primärantikörper von Chemikon International, da auch anderen Forschungsgruppen im Klinikum nachträglich über ähnliche Probleme bei der IDO Färbung berichtet haben. Ein polyklonaler Antikörper wäre für den Nachweis von IDO wünschenswert gewesen, da es sich bei polyklonalen Antikörpern um ein Gemisch mehrerer verschiedener Antikörper unterschiedlicher Spezifität handelt, die verschiedene Epitope eines bestimmten Antigens erkennen und daran binden. Im Gegensatz dazu werden monoklonale Antikörper aus einer Zelllinie, die aus einer Einzelzelle hervorgegangen ist, gewonnen. Sie sind alle identisch und binden an ein spezifisches Epitop eines bestimmten Antigens. Zum Zeitpunkt der Studie stand nur der monoklonale IDO Antikörper von Chemikon International zur Verfügung.

#### ***4.2 Nachweis von IDO mRNA in Tumorgewebe von Magenkarzinompatienten***

Von 21 *H.pylori* negativen und 27 *H.pylori* positiven Patienten wurde RNA aus Tumorbiopsien isoliert und die IDO und  $\beta$ -Actin bzw. 18S rRNA Expression mit RT-PCR untersucht. Die Intensität der PCR Fragmente nach Auftrennung im Agarosegel sind im Anhang aufgelistet (Tab. 18, 19). Das Verhältnis der optischen Dichte von IDO zum housekeeping Gen  $\beta$ -Actin (Ratio IDO/ $\beta$ -Actin) wurde im Bezug zur *H.pylori* Infektion sowie Geschlecht und Tumortyp analysiert.

Beim Vergleich der IDO Expression von Magenkarzinomgewebe (n=17) mit tumorfreiem Korpusgewebe (n=18) des gleichen Patienten zeigte sich eine signifikant höhere IDO Expression im Tumorgewebe  $p=0,009$ . Der Median der Tumorbiopsien lag bei 0,971 [KI 0,743-1,10]. In tumorfreien Korpusbiopsien lag der Median bei 0,540 [KI 0,398-0,736], (Abb. 11). Nach Gruppierung der Proben in *H. pylori* positive- und negative Patienten, war in



beiden Subgruppen tendenziell ebenfalls eine höhere IDO Expression in Tumorgewebe vorhanden. Durch die geringe Fallzahl, war dies jedoch nicht signifikant (Abb. 12). Die IDO Expression in *H.pylori* negativen Tumorgewebe (Median=0,954 [KI 0,544-1,163]) lag tendenziell höher ( $p=0,125$ ) als in tumorfreiem Korpusgewebe des gleichen Patienten ( $n=9$ ; Median=0,369 [KI 0,246-0,627]). Die IDO Expression in *H.pylori* positivem Tumorgewebe (Median=1,009 [KI 0,765-1,230]) war tendenziell höher ( $p=0,390$ ) als in tumorfreiem Korpusgewebe des gleichen Patienten ( $n=8$ ; Median=0,778 [KI 0,342-1,020]) (Abb. 12).

Beim Vergleich zwischen *H.pylori* positiven ( $n=8$ ) und *H.pylori* negativen ( $n=9$ ) Patienten zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der IDO Expression in Tumorgewebe ( $p=0,961$ ) oder tumorfreiem Korpusgewebe ( $p=0,278$ ). (Abb. 12).

Bei der Untersuchung des Gesamtkollektivs aller *H.pylori* positiver ( $n=27$ ) und *H.pylori* negativer Patienten ( $n=21$ ) fand sich kein signifikanter Unterschied in der IDO/ $\beta$ -Actin Ratio ( $p=0,140$ ). Bei *H.pylori* positiven Patienten betrug der Median der IDO Expression 0,099 [KI 0,117-0,321]. Der Median der IDO/ $\beta$ -Actin Ratio aller *H.pylori* negativen Patienten lag bei 0,038 [KI 0,007-0,394] (Abb. 13).

Weiterhin wurde das gesamte Kollektiv nach geschlechtsspezifischen Unterschieden in der IDO Expression untersucht. Zwischen den männlichen Patienten ( $n=36$ ) und weiblichen Patienten ( $n=12$ ) fand sich kein signifikanter Unterschied  $p=0,461$  (Abb. 14). Der Median lag bei den männlichen Patienten bei 0,070 [KI 0,080-0,335] und bei den weiblichen Patienten bei 0,028 [KI 0,005-0,391]. Es fand sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied der IDO Expression bei intestinalem ( $n=26$ ) und diffusem Tumortyp ( $n=16$ ) (Abb. 15). Die mediane IDO Expression der Patienten mit intestinalem Tumortyp lag bei 0,054 [KI 0,012-0,344], bei Patienten mit diffusem Tumortyp bei 0,095 [KI 0,052-0,362].

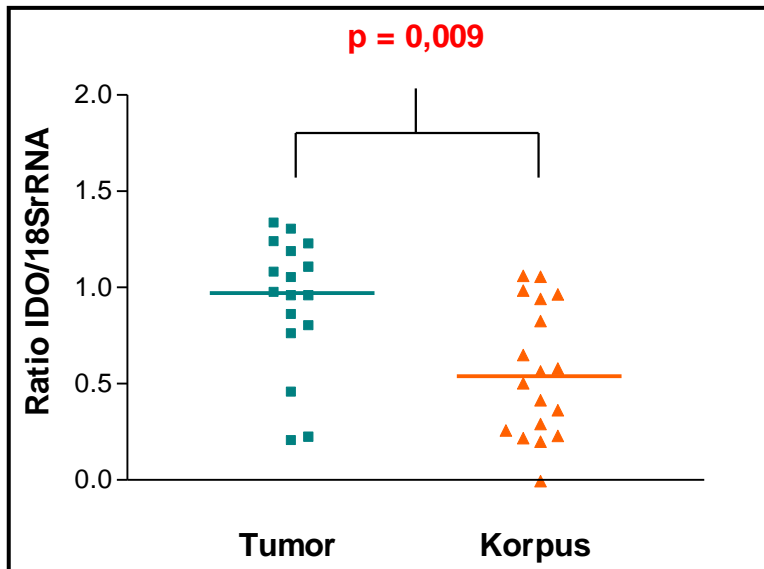


Abbildung 11: IDO Expression in Tumor- und Korpusgewebe von Magenkarzinompatienten. Tumor- und Korpusbiopsien wurden mittels RT-PCR auf die Genexpression von IDO und 18S rRNA untersucht. Jedes Symbol zeigt die IDO/18S rRNA Ratio eines Patienten. Linien zeigen den Median. Die grünen Quadrate stellen die Tumorproben, die orangen Dreiecke die Korpusproben dar.

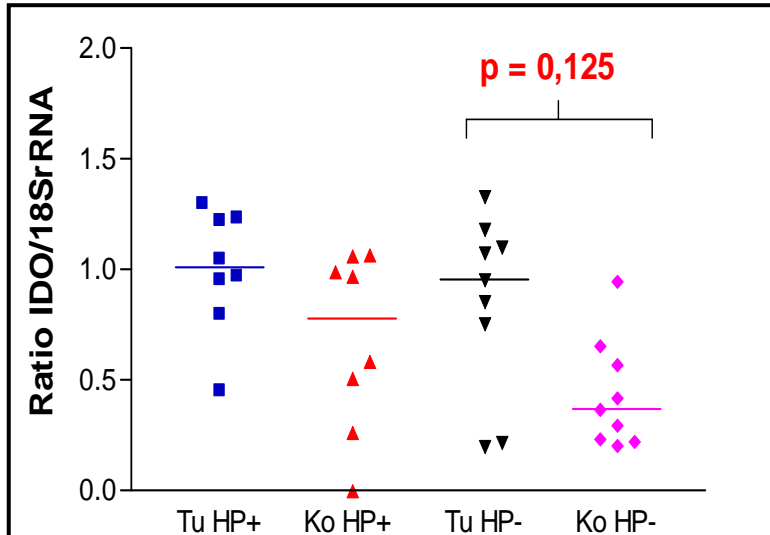


Abbildung 12: IDO Expression in Tumor- und Korpusgewebe *H.pylori* negativer und positiver Magenkarzinompatienten. Tumorbiopsien wurden mittels RT-PCR auf die Genexpression von IDO und 18S rRNA untersucht. Jedes Symbol zeigt die IDO/18S rRNA Ratio eines Patienten. Linien zeigen den Median. Die blauen Quadrate stellen die Tumorproben, die roten Dreiecke die Korpusproben eines *H.pylori* positiven Patienten dar. Die schwarzen Dreiecke stellen die Tumorproben, die rosa Quadrate die Korpusproben eines *H.pylori* negativen Patienten dar. Für die Bestimmung des Signifikanzniveaus p (siehe Text) wurde eine Bonferroni Korrektur durchgeführt.

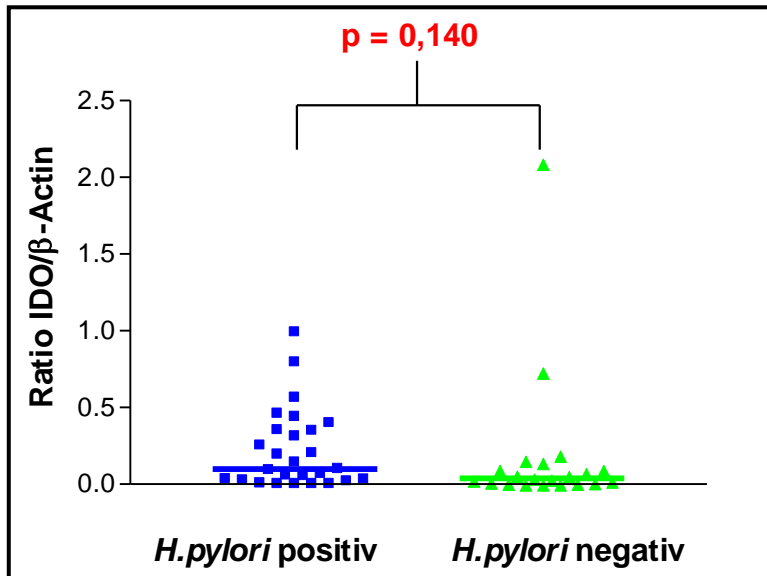


Abbildung 13: IDO Expression in Tumorgewebe *H.pylori* negativer und positiver Magenkarzinompatienten. Tumorbiospien wurden mittels RT-PCR auf die Genexpression von IDO und β-Actin untersucht. Jedes Symbol zeigt die IDO/β-Actin Ratio eines Patienten. Linien zeigen den Median. Die blauen Quadrate stellen die *H.pylori* positiven, die grünen Dreiecke die *H.pylori* negativen Patienten dar.

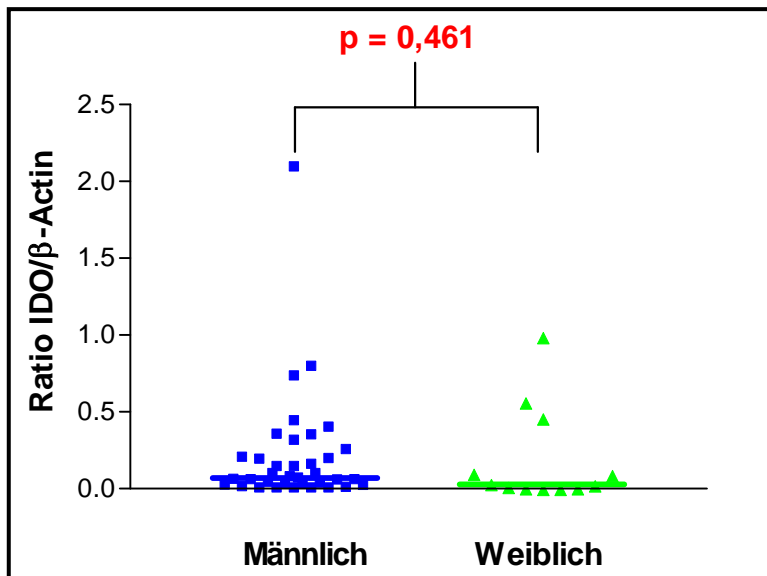


Abbildung 14: IDO Expression in Tumorgewebe von männlichen und weiblichen Magenkarzinompatienten. Jedes Symbol zeigt die IDO/β-Actin Ratio eines Patienten. Linien zeigen den Median. Die blauen Quadrate stellen die männlichen Patienten, die grünen Dreiecke die weiblichen Patienten dar.

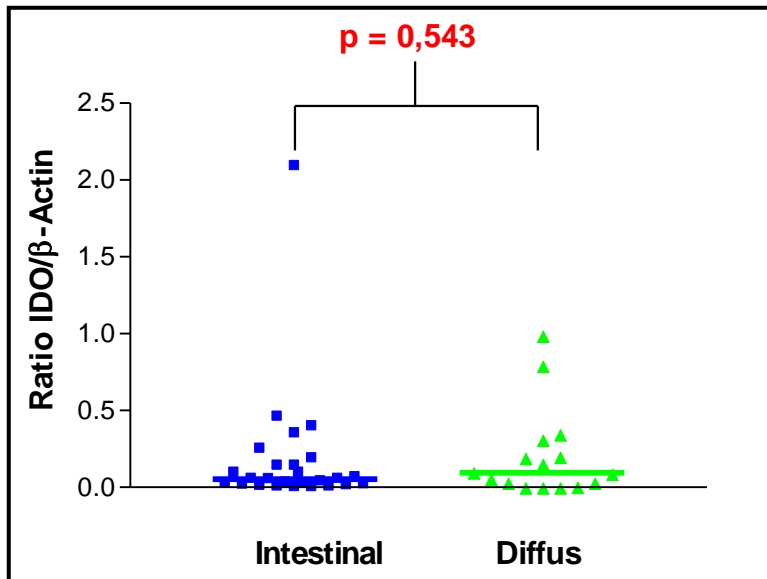


Abbildung 15: IDO Expression in intestinalelem und diffuselem Tumorgewebe von Magenkarzinompatienten. Jedes Symbol zeigt die IDO/β-Actin Ratio eines Patienten. Linien zeigen den Median. Die blauen Quadrate stellen die Patienten mit intestinalelem Tumortyp, die grünen Dreiecke die Patienten mit diffuselem Tumortyp dar.

Die Mediane der IDO Expression bei *H.pylori* positiven (n=18) und *H.pylori* negativen (n=18) männlichen Patienten lagen bei 0,167 [KI 0,098-0,307] und bei 0,056 [KI 0,014-0,459] (p=0,261)(Abb. 16). Der Median der IDO Expression bei weiblichen *H.pylori* positiven (n=9) Patienten lag bei 0,091 [KI 0,015-0,517] und bei *H.pylori* negativen (n=3) Patienten bei 0,005 [KI 0,001-0,023](p=0,064). Somit fand sich kein signifikanter Unterschied der IDO Expression zwischen *H.pylori* positiven und *H.pylori* negativen männlichen und weiblichen Patienten.

*H.pylori* positive Patienten (n=9) mit diffuselem Magenkarzinom wiesen eine signifikant höhere IDO Expression auf als *H.pylori* negative Patienten (n=7; p=0,003)(Abb. 17 A). Der Median der IDO Expression lag bei *H.pylori* positiven Patienten mit diffuselem Tumortyp bei 0,200 [KI 0,084-0,595], bei negativen Patienten bei 0,004 [KI 0,001-0,089].

*H.pylori* positive (n=14) und *H.pylori* negative (n=12) Patienten mit intestinalelem Tumortyp hatten keinen Expressionsunterschied (p=0,918)(Abb. 17 B). Der Median der IDO Expression lag bei *H.pylori* positiven und negativen Patienten bei 0,054 [KI 0,039-0,226] und 0,046 [KI 0,005-0,605].



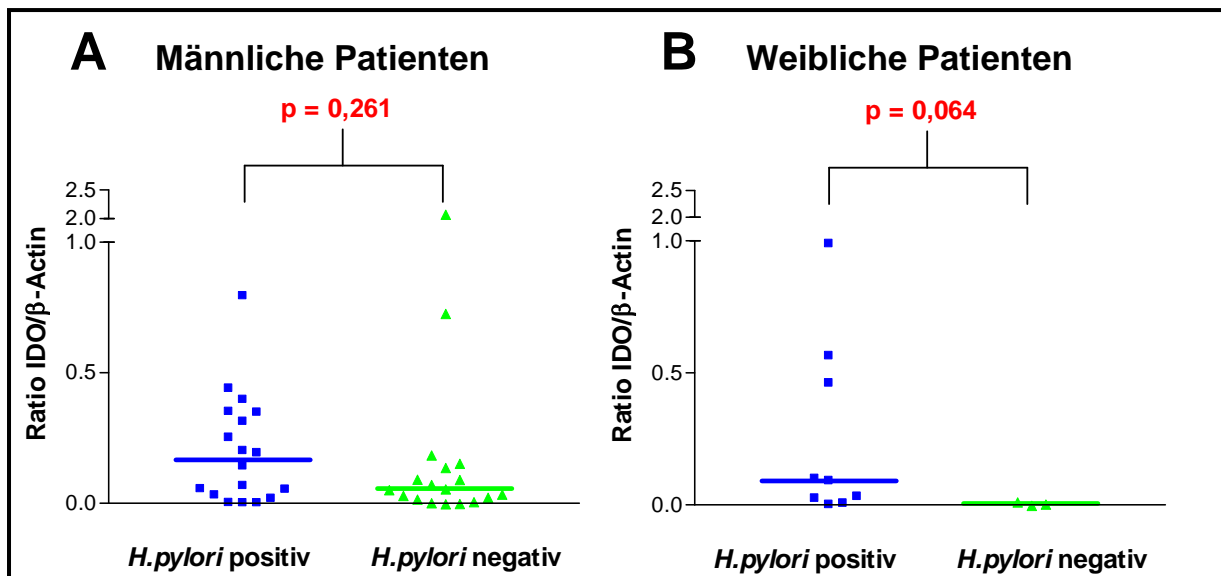


Abbildung 16: IDO Expression in Tumorgewebe von männlichen und weiblichen Magenkarzinompatienten nach *H.pylori* Status unterschieden. Jedes Symbol zeigt die IDO/ $\beta$ -Actin Ratio eines Patienten. Linien zeigen den Median. Die blauen Quadrate stellen die *H.pylori* positiven, die grünen Dreiecke die *H.pylori* negativen Patienten dar.

A: Männliche Patienten.

B: Weibliche Patienten.

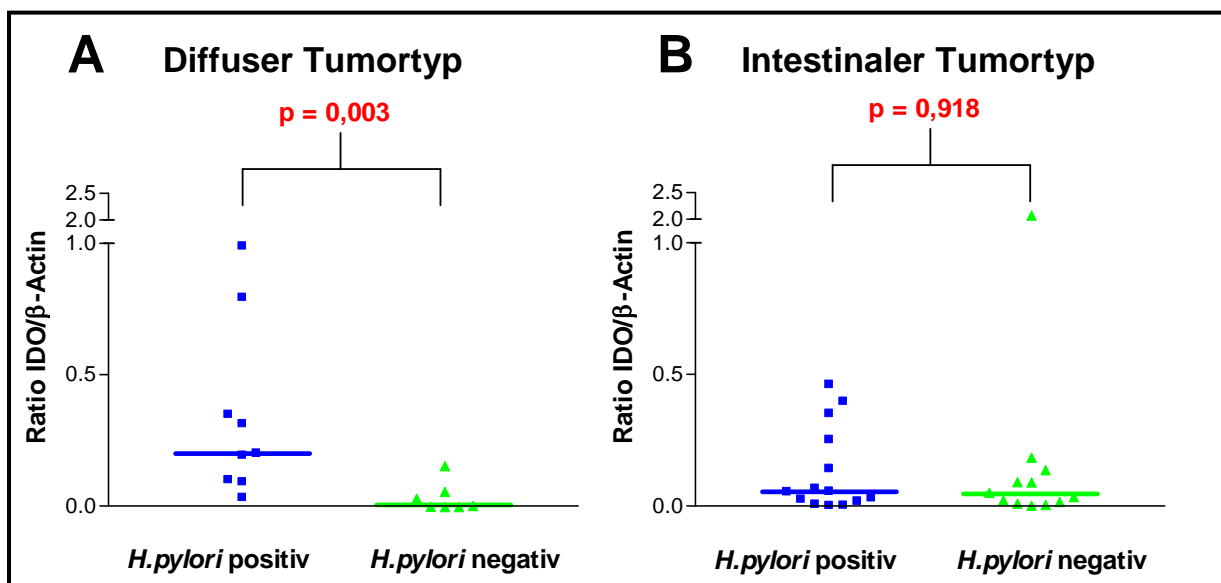
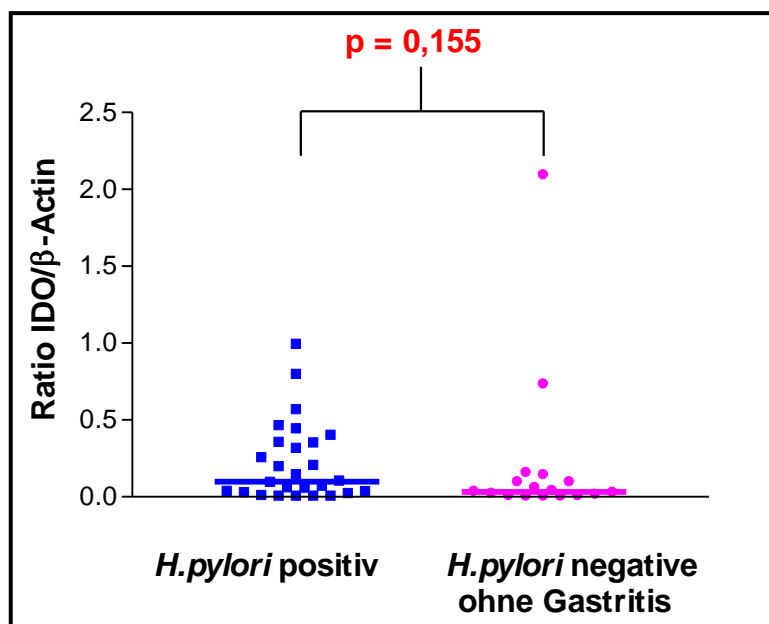


Abbildung 17: IDO Expression in intestinalem und diffusem Tumorgewebe von Magenkarzinompatienten nach *H.pylori* Status unterschieden. Jedes Symbol zeigt die IDO/ $\beta$ -Actin Ratio eines Patienten. Linien zeigen den Median. Die blauen Quadrate stellen die *H.pylori* positiven, die grünen Dreiecke die *H.pylori* negativen Patienten dar.

A: Patienten mit diffusem Tumortyp.

B: Patienten mit intestinalem Tumortyp.

Bei der histologischen Beurteilung der Magenschleimhautbiopsien wurde zum Teil von den beteiligten Pathologen das histologische Bild einer *H.pylori* induzierten Gastritis beschrieben (ExHP Gastritis), obwohl der direkte *H.pylori* Nachweis über Warthin-Starry (WS) Färbung negativ blieb. Wenn es auch serologisch und bakteriologisch kein Indiz für eine *H.pylori* Infektion gab, wurden diese Patienten als *H.pylori* negativ eingestuft. Um eventuelle sich hieraus ergebende Unsicherheiten in der Zuordnung des *H.pylori* Status zu überprüfen wurde eine separate Auswertung durchgeführt. Dabei wurde die IDO Expression in den Tumorbiopsien von allen *H.pylori* positiven Patienten (n=27) nur mit negativen Biopsien verglichen, welche keinerlei histologische Anzeichen für eine *H.pylori* induzierte Gastritis (n=17) aufwiesen (Abb. 18). Dies ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Patientengruppen (p=0,155). Der Median für die *H.pylori* positiven Patienten lag bei 0,099 [KI 0,117-0,321], der Median bei den *H.pylori* negativen Patienten ohne Anzeichen für eine *H.pylori* induzierte Gastritis bei 0,033 [KI 0,001-0,471].



**Abbildung 18** IDO Expression in Tumorgewebe von *H.pylori* positiven und *H.pylori* negativen Magenkarzinompatienten ohne Anzeichen einer *H.pylori* induzierten Gastritis. Jedes Symbol zeigt die IDO/β-Actin Ratio eines Patienten. Linien zeigen den Median. Die blauen Quadrate stellen die *H.pylori* positiven, die rosa Punkte die *H.pylori* negativen Patienten dar.

### 4.3 Einfluss von *H.pylori* auf die IDO Expression in Magenkarzinomzelllinien

Um einen möglichen, direkten Einfluss von *H.pylori* auf die IDO Genexpression in Tumorzellen zu untersuchen wurden Magenkarzinomzelllinien (Tab. 6) auf ihre konstitutive IDO Expression hin untersucht.

Von 8 untersuchten Tumorzelllinien exprimierten 5 Zelllinien (GC9, GC20, Hs746T, N87, MKN1) konstitutiv IDO (Abb. 19, 20, 21). Die IDO Expression konnte durch IFN- $\gamma$  (20 ng/ml/24 h) in allen Zelllinien verstärkt werden. Die Zelllinien GC1, MKN28, 23132 zeigten ohne Stimulation keine oder eine nur sehr schwach ausgeprägte IDO Expression. Die Stimulation mit IFN- $\gamma$  (20 ng/ml/24 h) führte zu einer deutlichen Steigerung der IDO Expression in allen drei Zelllinien (Abb. 20, 22).

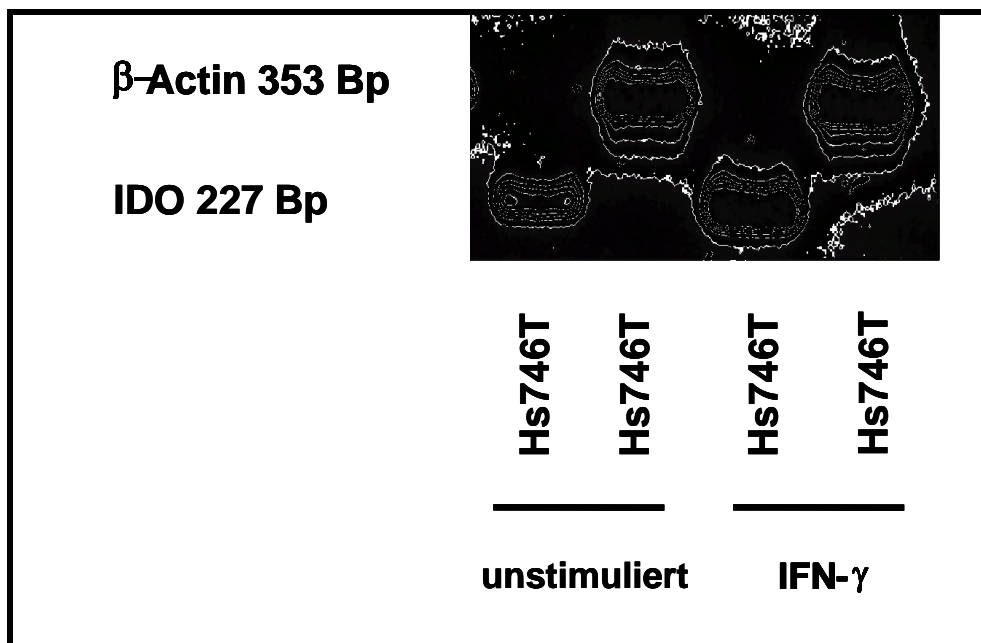


Abbildung 19: IDO Expression der Magenkarzinomzelllinie Hs746T: Primer IDO 227 Bp / 39 PCR Zyklen ,  $\beta$ -Actin 353 Bp / 23 PCR Zyklen. IDO und  $\beta$ -Actin Expression ohne Stimulation und nach Inkubation mit IFN- $\gamma$  (20 ng/ml) für 24 h

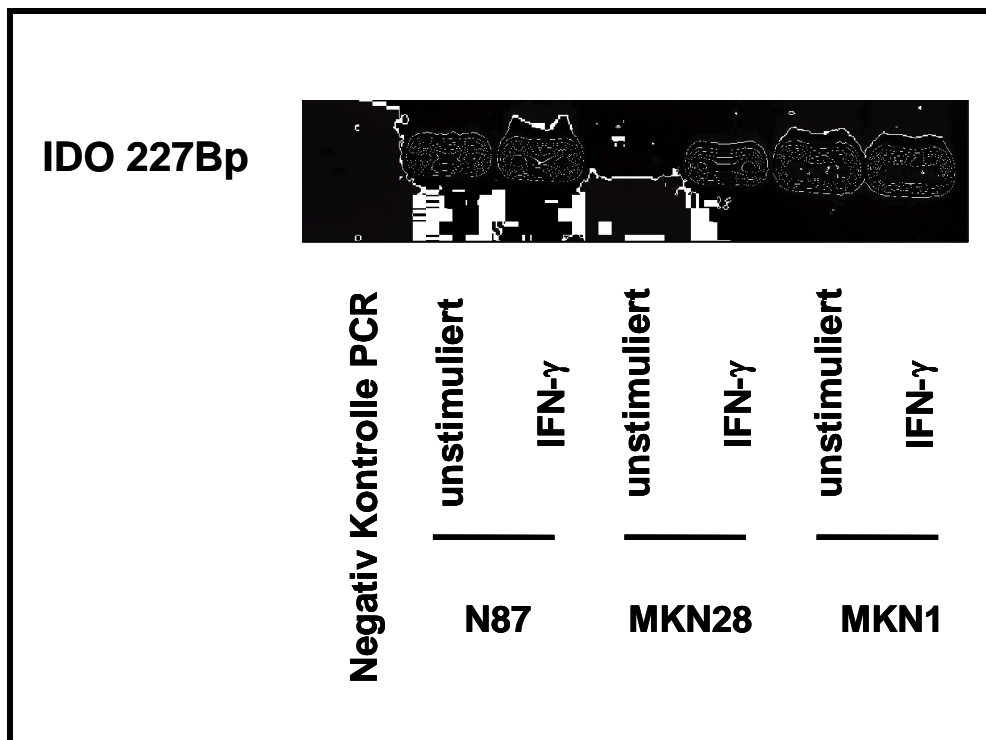


Abbildung 20: IDO Expression in Magenkarzinomzelllinien N87, MKN1, MKN28: Primer IDO 227 Bp / 39 PCR Zyklen. IDO Expression ohne Stimulation und nach Inkubation mit IFN- $\gamma$  (20 ng/ml) für 24 h.

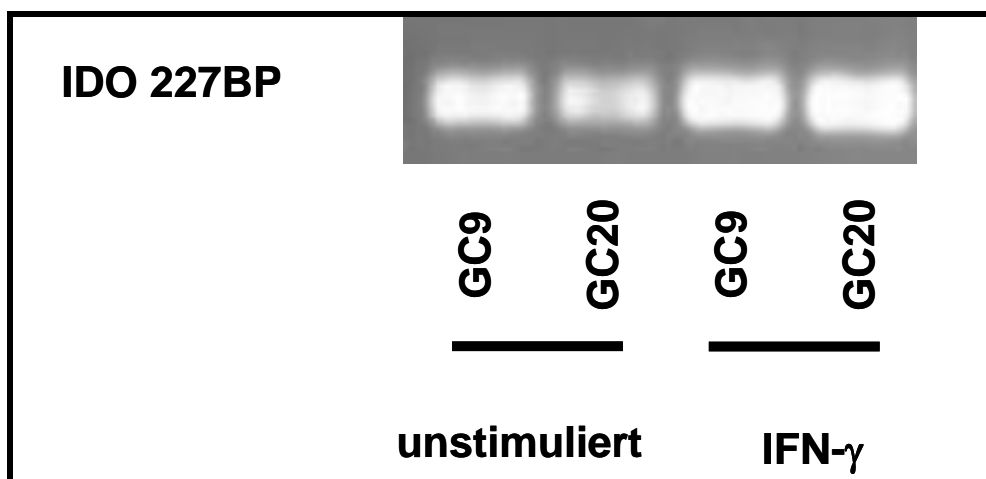
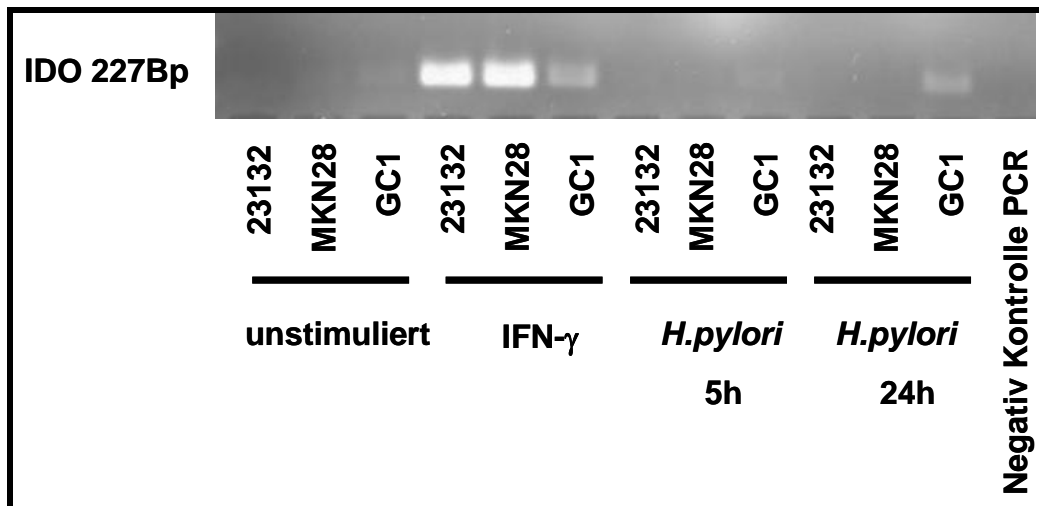


Abbildung 21: IDO Expression in Magenkarzinomzelllinien GC9, GC20: Primer IDO 227 Bp / 39 PCR Zyklen. IDO Expression ohne Stimulation und nach Inkubation mit IFN- $\gamma$  (20 ng/ml) für 24 h.

Um den Einfluss von *H.pylori* auf die IDO Expression zu untersuchen wurden zunächst die Zelllinien GC1, MKN28 und 23132 verwendet. Es wurde die IDO Expression ohne Stimulation und nach Inkubation mit IFN- $\gamma$  (20 ng/ml) für 24 h, sowie die Expression nach Inkubation für 5 h und 24 h mit *H.pylori* P12 (MOI 10) bestimmt.

In den unstimulierten Zelllinien 23132 und MKN28 konnte keine, bei GC1 eine sehr schwache IDO Expression nachgewiesen werden (Abb. 22). IFN- $\gamma$  Stimulation induzierte bei MKN28, 23132 und GC1 IDO Expression (Abb. 21).

Die Inkubation mit *H.pylori* P12 (MOI 10) für 5 h induzierte bei MKN28, 23132 und GC1 keine IDO Expression. Nach 24 h Inkubation mit *H.pylori* P12 fand sich bei GC1 eine geringe Induktion der IDO Expression (Abb. 22).



**Abbildung 22: IDO Expression in Magenkarzinomzelllinien 23132, MKN28, GC1: Primer IDO 227 Bp / 39 PCR Zyklen. IDO Expression ohne Stimulation, nach Inkubation mit IFN- $\gamma$  (20 ng/ml) für 24 h, nach *H.pylori* P12 Stimulation für 5 h und 24 h.**

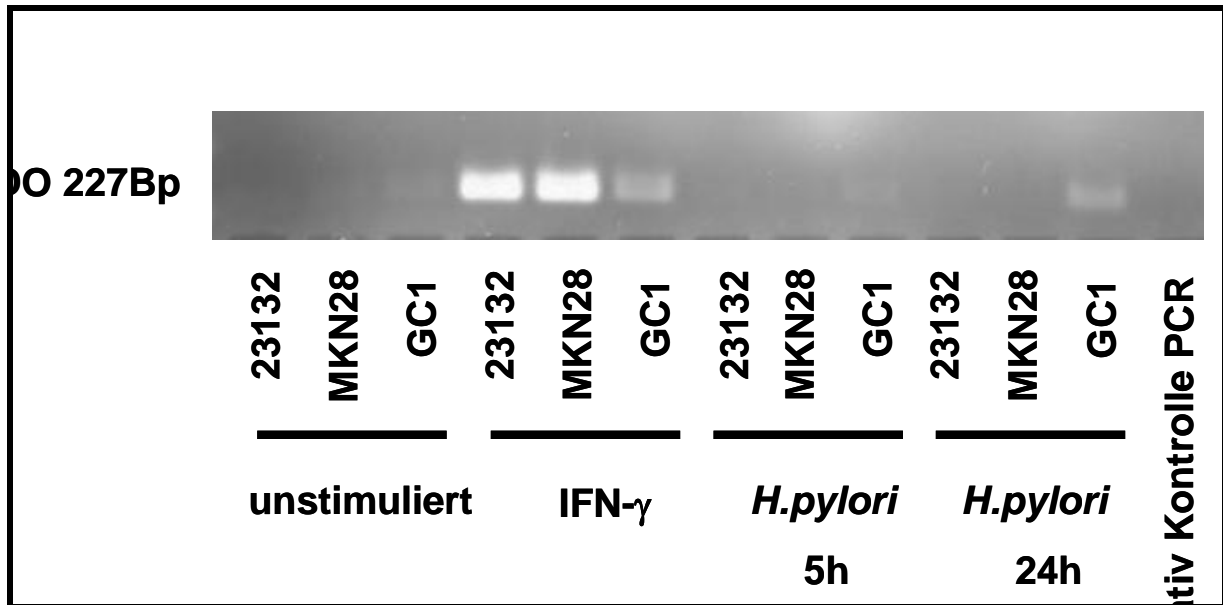
Durch Inkubation der Magenkarzinomzelllinien mit *H.pylori* P12 kam es, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Sharma et al. [6], zu einer deutlichen Steigerung der IL-8 Expression. Die IL-8 Expression wurde in unstimulierten, IFN- $\gamma$  (20 ng/ml/24 h) und *H.pylori* (5 h, 24 h, MOI 10) stimulierten Zelllinien GC1, MKN28 und 23132 bestimmt.

Bei Magenkarzinomzelllinie 23132 konnte eine geringe IL-8 Expression in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden (Abb. 23). Ein Unterschied in der Expression zwischen der unstimulierten, der IFN- $\gamma$  inkubierten sowie den *H.pylori* stimulierten (5 h, 24 h) Proben konnte nicht nachgewiesen werden.

MKN28 Zellen zeigten im unstimulierten Zustand und nach Inkubation mit IFN- $\gamma$  eine gering ausgeprägte IL-8 Expression. Die Stimulation mit *H.pylori* (5 h, 24 h) führte zu einer deutlich gesteigerten IL-8 Expression. Die Magenkarzinomzelllinie GC1 wies in unstimuliertem

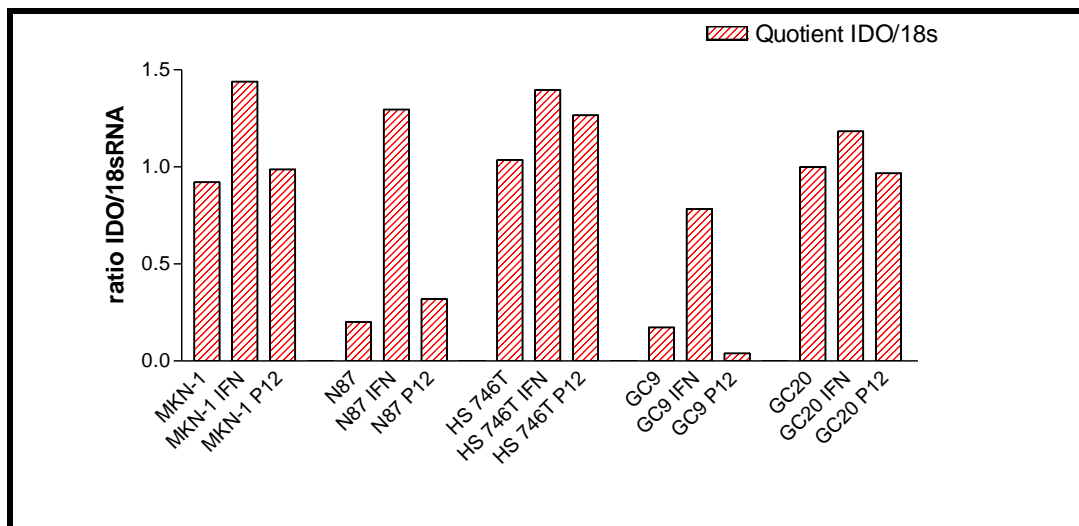
Zustand, wie auch nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  und *H.pylori* P12 (5 h, 24 h) eine deutlich ausgeprägte IL-8 Expression auf.

Die Zelllinie Hs746T, wurde als Kontrolle mitgeführt. Im unstimulierten, sowie IFN- $\gamma$  inkubierten Zustand zeigte Hs746T eine deutliche IL-8 Expression.



**Abbildung 23:** IL-8 Expression in Magenkarzinomzelllinien 23132, MKN28, GC1, Hs746T: Primer IL-8 292 Bp/39 PCR Zyklen. IL-8 Expression ohne Stimulation, nach Inkubation mit IFN- $\gamma$  (20 ng/ml/24 h), nach *H.pylori* Stimulation für 5 h und 24 h.

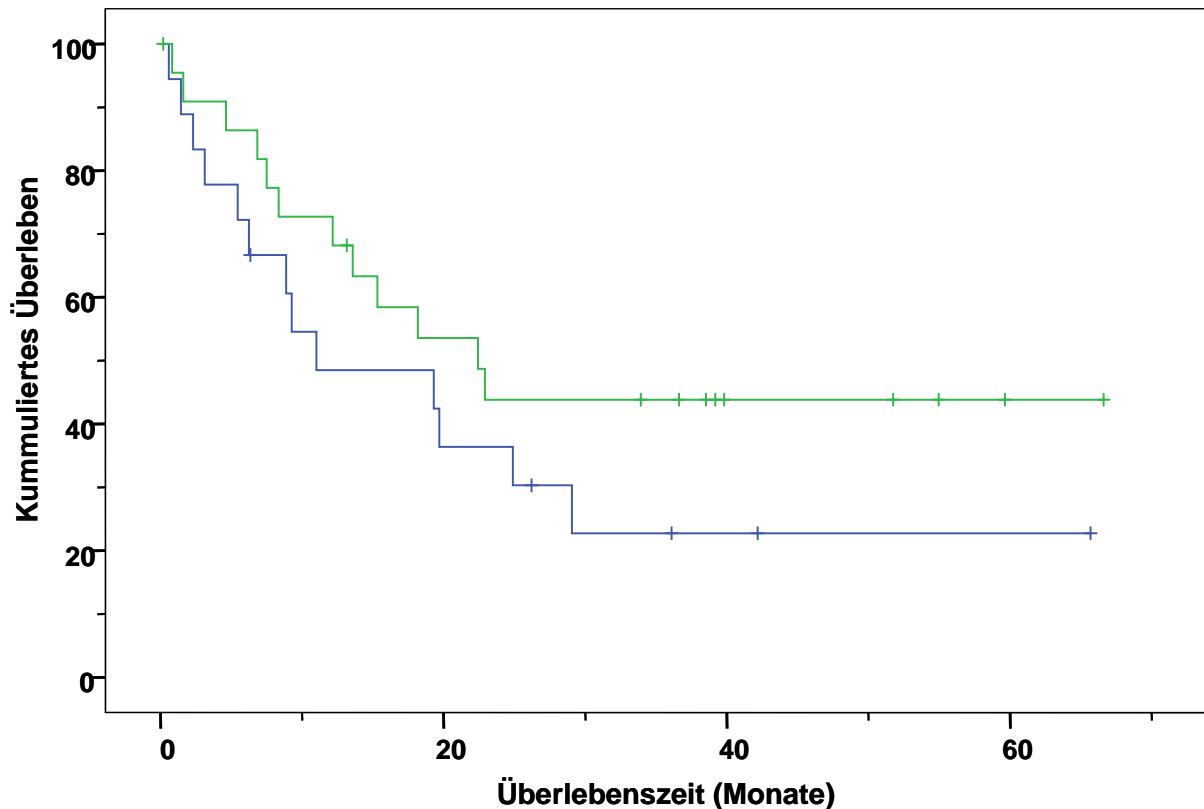
Weiterhin wurde untersucht, ob bei konstitutiv IDO exprimierenden Zelllinien (GC9, GC20, Hs746T, N87, MKN1) eine direkte Beeinflussung durch *H.pylori* P12 besteht. Inkubation mit IFN- $\gamma$  (20 ng/ml) für 24 h führte bei allen Zelllinien zu gesteigerter IDO Expression. Inkubation für 24 h mit *H.pylori* (P12, MOI 10) führte bei MKN1, N87 und Hs746T zu gesteigerter IDO Expression, wohingegen die GC9 und GC20 Zelllinie gering reduzierte IDO Expression aufzeigten (Abb. 24).



**Abbildung 24: IDO Expression in Magenkarzinomzelllinien MKN-1, N87, GC9, GC20. Primer IDO 227 Bp / 39 PCR Zyklen. IDO Expression ohne Stimulation, nach Inkubation mit IFN- $\gamma$  (20 ng/ml) für 24 h, nach *H.pylori* P12 Stimulation für 24 h.**

#### *4.4 Langzeitüberleben in Korrelation mit *H.pylori* Status und IDO Expression*

Bei 41 Magenkarzinom Patienten wurde retrospektiv das Überleben in Korrelation mit *H.pylori* und der IDO Expression analysiert. Das medianes Überleben (ÜL) nach R0 Resektion des gesamten Patientenkollektivs (n=41) war 19,3 Monate. *H.pylori* positive Patienten (n=23) hatten ein verlängertes Überleben ( $p=0,203$ ; ÜL=22,4 Mon) im Vergleich zu *H.pylori* negativen Patienten (n=18; ÜL=11,0 Mon) (Abb. 25). Dies wurde bereits an einem größeren Patientenkollektiv von Meimarakis et al. gezeigt [12] (Abb. 1).



**Abbildung 25: Medianes Überleben in Korrelation mit *H.pylori* Status: Die grüne Kurve zeigt die *H.pylori* positiven Patienten, die blaue Kurve die *H.pylori* negativen.**

Für die Auswertung des Überlebens in Abhängigkeit zur IDO Expression wurde das Patientenkollektiv in eine Gruppe mit hoher IDO Expression ( $IDO \geq 0,207$ ) und eine Gruppe mit niedriger IDO Expression ( $IDO < 0,207$ ) unterteilt. Es zeigte sich ein tendenziell verlängertes ÜL (24,9 Monate) bei Patienten mit hoher IDO Expression ( $n=20$ ) im Vergleich zu 13,6 Monaten bei Patienten mit niedriger IDO Expression ( $n=21$ ;  $p=0,136$ )(Abb. 26).



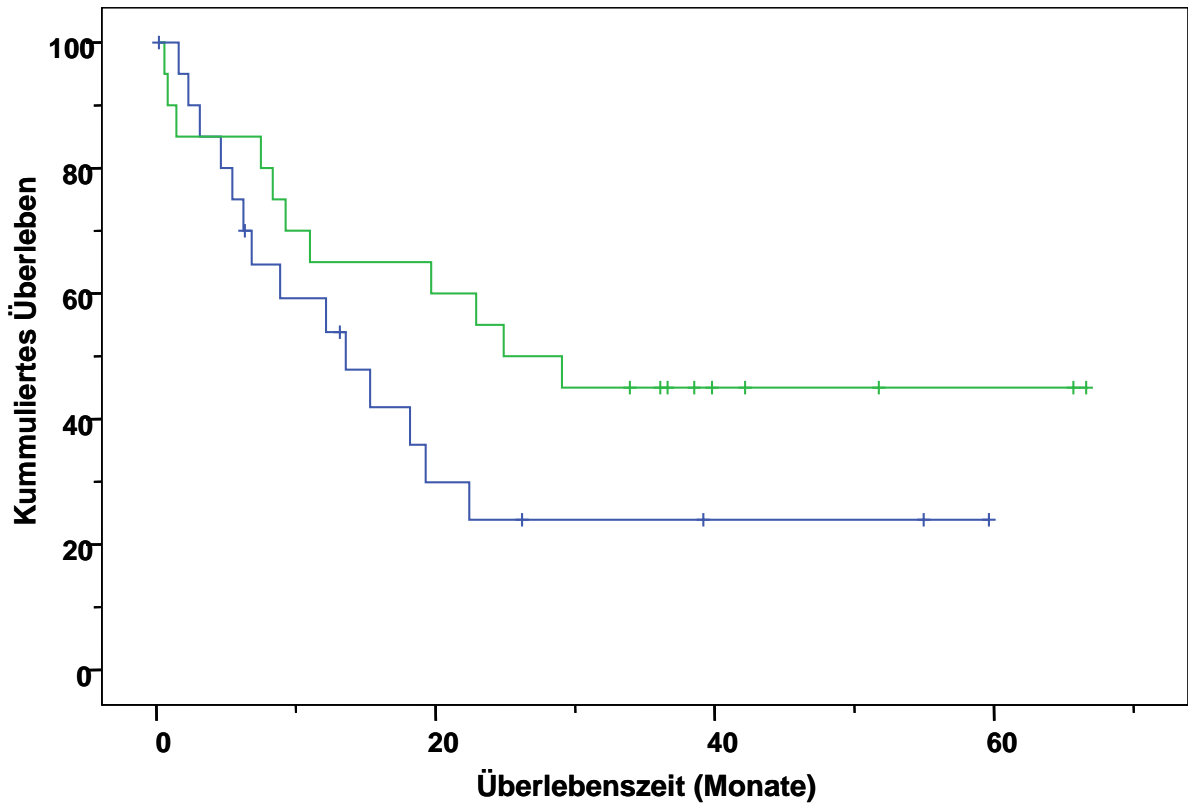


Abbildung 26: IDO Expression in Korrelation mit medianem Langzeitüberleben. Die grüne Kurve zeigt das Überleben bei hoher IDO Expression, die blaue Kurve bei niedriger IDO Expression.

## 5. Diskussion

IDO initiiert und katalysiert den Tryptophanabbau im Kynureninstoffwechsel. Die im Tryptophanstoffwechsel nachgeschalteten Enzyme produzieren eine Serie von immunsuppressiven Tryptophanmetaboliten. Einige dieser Metaboliten unterdrücken die T-Zellproliferation in vitro oder verursachen T-Zell Apoptose, andere haben Einfluss auf NK-Zellfunktionen [43-45]. Auch in Abwesenheit von IDO können die nachgeschalteten Enzyme bei Kynureninsubstitution immunsuppressive Metabolite erzeugen [46]. Zusätzlich zu den immunsuppressiven Effekten der Tryptophanmetabolite scheint auch der zelluläre Stress durch die lokale Katalyse Immunsuppression zu bedingen. Die Bedeutung von IDO in der Regulation der tumorinitiierten Immunsuppression konnte bislang nicht aufgeklärt werden. Bei der Toleranzinduktion durch Tumore spielen verschiedene Faktoren und Mechanismen eine Rolle. Diese können im Tumor selbst oder an Schlüsselpositionen mit Tumorantigenkontakt, wie Tumor drainierende Lymphknoten (TDLN) wirken. Mögliche tolerogene Mechanismen sind die initiale Herabregulation von Tumorantigenen, Inhibition von T-Killerzellen und T-Effektorzellen, sowie die Aktivierung von Treg. Es finden sich immer mehr Hinweise darauf, dass IDO an all diesen Prozessen, sowohl im Tumor, als auch in TDLN beteiligt ist [50-53].

Da die meisten Tumorantigene zuerst in TDLN präsentiert werden, kommt diesen eine Schlüsselrolle bei der Beeinflussung der Immunantwort zu [54,55]. IDO wird in TDLN von Menschen [34,56] und Mäusen [33] exprimiert. IDO exprimierende Zellen wurden immunhistochemisch in LN von Patienten mit malignem Melanom, Mama-, Bronchial-, Kolon- und Magenkarzinom gefunden [33,36].

Auch in Tumoren konnte IDO nachgewiesen werden. Uyttenhove et al. wiesen eine gesteigerte IDO Expression in Prostata-, Kolon-, Rektum-, Pankreas-, Cervix- und Magenkarzinomen nach [36]. Die Arbeitsgruppe um Uyttenhove vermutete, dass die IDO Expression durch Tumorzellen ein immunsuppressives Mikromilieu für den Tumor schafft. Uyttenhove et al. zeigten, dass IDO transfizierte Maustumorzellen resistent gegen

immunologische Abstoßung sind, auch in Mäusen, welche gegen den Tumor präimmunisiert wurden und diesen Tumor ohneIDO Expression vollständig abgestoßen hatten [36].

Es scheint aber auch möglich, dassIDO nicht ausschließlich vom Tumor exprimiert wird, sondern auch sekundär durch inflammatorische Zytokine von Leukozyten wie z.B. DC aus der initialen Abwehrreaktion des Wirtsorganismus gegen den Tumor induziert wird. Eine Erhöhung derIDO Expression in Tumorzelllinien durch Typ1 Zytokine wie IFN- $\gamma$  ist eindeutig belegt [57].

Wir konnten in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Uyttenhove et al. im Gewebe von Patienten mit MagenkarzinomIDO mRNA nachweisen [36]. DieIDO Expression im Tumor war signifikant höher als im tumorfreien Korpus. Wie von Munn et al. beschrieben, konnten wirIDO positive Zellen ebenfalls immunhistochemisch in Magenkarzinomen nachweisen [35].

Neben der oben beschriebenenIDO Expression in DC und Magenkarzinomzellen könnte das Bakterium *H.pylori*, welches bei einer Vielzahl von Patienten im Magen nachweisbar ist, eine wichtige Rolle bei der Induktion derIDO Expression spielen. Wir konnten kürzlich zeigen, dass *H.pylori* positive Magenkarzinompatienten ein signifikant besseres Überleben nach R0-Resektion des Tumors aufweisen als *H.pylori* negative Magenkarzinompatienten [12]. Dies führte zur Hypothese, dass bei *H.pylori* negativen Magenkarzinompatienten eine tumorspezifische Immunantwort durch die Expression vonIDO aus dem Tumor und aus unreifen DC unterdrückt wird. Wie oben erwähnt konnten wir eine signifikant erhöhteIDO Expression im Tumor von Magenkarzinompatienten im Vergleich zu tumorfreiem Gewebe nachweisen. In der Analyse derIDO Expression des Gesamtkollektivs von *H.pylori* positiven und *H.pylori* negativen Magenkarzinompatienten fand sich kein signifikanter Unterschied. *H.pylori* positive Patienten wiesen jedoch tendenziell eine höhereIDO Expression auf als *H.pylori* negative Patienten. Raitala et al. konnten zeigen, dassIDO bei *H.pylori* seropositiven Patienten im Serum verstärkt exprimiert wird. Zur Bestimmung derIDO Expression wurde das Verhältnis von Kynurenin zu Tryptophan im Serum durch reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC) bestimmt [58,59]. Eine erhöhteIDO

Expression konnte nur bei Patienten mit einem CTLA4(+)<sup>49</sup> Genotyp und Patienten mit dem TGFβ1-509 Allel nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe um Raitala folgerte, dass die IDO Expression hauptsächlich durch Typ-1 Differenzierungssignale wie IFN-γ oder LPS bei einer vorliegenden *H.pylori* Infektion stimuliert wird.

Um einen direkten Einfluss von *H.pylori* auf die IDO Expression in Magenkarzinomzellen zu untersuchen, inkubierten wir Magenkarzinomzelllinien mit *H.pylori* und untersuchten die IDO Expression mittels RT-PCR. Interessanter Weise fanden wir bei 5 von 8 Zelllinien eine konstitutive IDO Expression. Im Gegensatz dazu fand sich bei 3 Zelllinien keine konstitutive IDO Expression. Nach Inkubation mit *H.pylori* zeigten 4 von 6 Zelllinien eine gesteigerte IDO Expression, wohingegen 2 Zelllinien keine Steigerung der IDO Expression aufwiesen.

Als Positivkontrolle der *H.pylori* Stimulation wurde die IL-8 Expression untersucht. 2 von 8 Zelllinien exprimierten konstitutiv IL-8. Nach Inkubation mit *H.pylori* für 5 h zeigte die Magenkarzinomzelllinie MKN28 eine deutlich gesteigerte IL-8 Expression. Sharma et al. [6], welcher die Reaktion von Magenepithelzelllinien auf die *H.pylori* Stimulation (0 bis 26 h) in vitro untersuchte, fand ein IL-8 Expressionsmaximum der MKN28 Zelllinie nach 6 h *H.pylori* Inkubation. Die unstimulierte MKN28 Zelllinie zeigte in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen eine schwach ausgeprägte IL-8 Expression. Aufgrund der vergleichbaren Ergebnisse ist von einer korrekten *H.pylori* Stimulation auszugehen.

Im Gegensatz zu einer möglichen Stimulation der IDO Expression durch *H.pylori* wurde eine Erhöhung der IDO Expression durch IFN-γ in Tumorzelllinien mehrfach nachgewiesen [8,9,57,60]. Die IDO vermittelte Toleranzinduktion bei *H.pylori* positiven Magenkarzinompatienten könnte somit sekundär durch inflammatorische Zytokine aus der initialen Abwehrreaktion des Wirtsorganismus gegen den Tumor induziert werden. Van den Engel et al. untersuchten die tumorspezifische Immunantwort von TIL bei Magenkarzinompatienten. In Stimulationsassays beschrieben sie die tumorspezifische Freisetzung des Typ-1 Zytokins IFN-γ in TIL von *H.pylori* positiven Magenkarzinompatienten. Die Zellen eines *H.pylori* negativen Magenkarzinompatienten zeigten dagegen eine tumorspezifische Typ-2 Immunantwort (IL-5 Expression) [40]. Wir

konnten ebenfalls bei allen untersuchten Magenkarzinomzelllinien eine deutliche Steigerung der IDO Expression durch eine 24 stündige Inkubation mit IFN- $\gamma$  feststellen. Eine gesteigerte IDO Expression konnten wir nach Inkubation sowohl an konstitutiv IDO exprimierenden Zelllinien, als auch an Zelllinien mit keiner oder geringer IDO Expression nachweisen. Weitergehende Forschungsarbeit zur IFN- $\gamma$  vermittelten Steigerung der IDO Expression bei *H.pylori* induzierter Typ-1 Immunantwort scheinen viel versprechend.

Bei 41 Magenkarzinompatienten untersuchten wir retrospektiv das Überleben in Korrelation mit dem *H.pylori* Status und der IDO Expression. *H.pylori* positive Patienten zeigten ein verlängertes Überleben im Vergleich zu *H.pylori* negativen Patienten, was bereits an einem größeren Patientenkollektiv von Meimarakis et al. gezeigt werden konnte [12].

Bei der Korrelation des Überlebens mit der IDO Expression zeigte sich interessanter Weise ein verlängertes ÜL bei hoher IDO Expression im Vergleich zu Patienten mit niedriger IDO Expression. Dies steht primär im Gegensatz zu den Arbeiten von Okamoto et al., Ino et al. und Brandacher et al., die eine erhöhte IDO Expression bei Ovarialkarzinom, Sarkom und Kolonkarzinom mit einer signifikant schlechteren klinischen Prognose korrelierten [61-63]. Brandacher et al. wiesen bei einem Kollektiv von 143 Kolonkarzinompatienten über RT-PCR, HPLC und Immunhistochemie eine hohe IDO Expression bei 39,2% der Patienten nach. Eine hohe IDO Expression korrelierte signifikant mit einer verminderten Anzahl CD3+ T-Zellen, der Häufigkeit von Lebermetastasen, sowie einer schlechteren klinischen Prognose [61]. Interessanter Weise wiesen Patienten mit einer hohen IDO Expression anfänglich sogar einen besseren klinischen Verlauf auf als Patienten mit niedriger IDO Expression. Brandacher et al. folgerten, dass initial hohe IDO Expression durch Toleranzinduktion den Wirt anfänglich vor einer zu massiv verlaufenden Anti-Tumor-Immunantwort schützt. Selbst nach erfolgter Tumorresektion verbleibt das tolerante Mikromilieu und führt langfristig zu einer Verschlechterung der klinischen Langzeitprognose. Für eine abschließende Beurteilung dieser Hypothese wäre ein größeres Patientenkollektiv, sowie längerfristige Nachuntersuchungen notwendig.

Nach unseren Daten ist es unwahrscheinlich, dass *H.pylori* selbst die IDO Expression in Magenkarzinomzellen stimuliert. Inwieweit möglicherweise andere Zellen wie DC durch *H.pylori* zur IDO Synthese angeregt werden ist unklar. Weitergehende Forschung speziell über die *H.pylori* induzierte, IFN- $\gamma$  vermittelten Steigerung der IDO Expression scheint viel versprechend.

## 6. Zusammenfassung

*H.pylori* positive Magenkarzinompatienten zeigen ein signifikant besseres Überleben nach R0-Resektion des Tumors auf als *H.pylori* negative Magenkarzinompatienten [12]. Die Ursachen für diesen signifikanten Überlebensvorteil *H.pylori* positiver Magenkarzinompatienten konnte jedoch bislang nicht aufgedeckt werden. Unsere Hypothese ist, dass bei Patienten mit Magenkarzinom eine tumorspezifische Immunantwort durch die Expression von IDO aus dem Tumor und aus unreifen DC unterdrückt wird. Bei Vorliegen einer *H.pylori* Infektion kommt es zur Ausbildung eines entzündlichen Milieus, in welchem vermehrt ausgereifte DC aktiviert werden, die wenig oder gar kein IDO produzieren. Die aktivierten DC nehmen Tumorantigene auf und wandern in die regionalen Lymphknoten. In Folge kann eine therapeutische, antitumorale T-Zellantwort induziert werden, welche den signifikanten Überlebensvorteil *H.pylori* positiver Magenkarzinompatienten erklären könnte.

Die Untersuchungen der IDO Expression erfolgten in drei methodischen Ansätzen. Der erste Ansatz hatte zum Ziel, IDO Expression mittels immunhistochemischen Untersuchungen auf paraffinkonserviertem Gewebe von *H.pylori* positiven und *H.pylori* negativen Magenkarzinompräparaten nachzuweisen. Der zweite methodische Ansatz zielte darauf, die IDO Genexpression mittels RT-PCR aus kryokonserviertem Gewebe von *H.pylori* positiven und *H.pylori* negativen Magenkarzinompräparaten nachzuweisen. Im dritten Ansatz wurde der direkte Einfluss von *H.pylori* auf Magenkarzinomzelllinien und IDO Expression

untersucht. Abschließend wurde der *H.pylori* Status und die IDO Expression mit dem Überleben korreliert.

IDO konnte immunhistochemisch in Magenkarzinomgeweben nachgewiesen werden. Eine Korrelation der IDO mRNA Expression und des *H.pylori* Status war nicht möglich.

RT-PCR Analysen zeigten im Tumorgewebe eine signifikant höhere IDO Expression als im tumorfreien Korpusgewebe. Die IDO Expression war bei *H.pylori* positiven Patienten mit diffusem Magenkarzinom signifikant höher als im Vergleich zu *H.pylori* negativen Patienten mit diffusem Magenkarzinom.

Eine direkte in vitro Inkubation von Magenkarzinomzelllinien mit *H.pylori* führte bei 66% der Zelllinien zu einer Steigerung der IDO Expression. Die Inkubation der Magenkarzinomzelllinien mit IFN- $\gamma$  führte bei allen untersuchten Zelllinien zu einer signifikanten Steigerung der IDO Expression.

Eine retrospektive Betrachtung der untersuchten Patienten zeigte ein längeres Überleben bei *H.pylori* positiven Magenkarzinompatienten im Vergleich zu *H.pylori* negativen Magenkarzinompatienten nach R0 Resektion des Magens.

Entgegen unserer Hypothese wiesen Magenkarzinompatienten mit einer hohen IDO Expression ein verlängertes Überleben im Vergleich zu Patienten mit einer niedrigen IDO Expression auf. Der oben erwähnte Unterschied im Überleben zwischen *H.pylori* positiven und *H.pylori* negativen Magenkarzinompatienten kann somit nicht durch Unterschiede in der IDO Expression erklärt werden.

Möglicherweise induziert eine *H.pylori* Infektion eine Typ1 Zytokinmilieu, welches zu einer erhöhten IDO Expression führt.

Welche Zellen für die IDO Expression verantwortlich sind, sowie der genaue IDO Wirkmechanismus bleibt weiterhin unklar. Ob IDO direkt von den Tumorzellen, von DC oder anderen Zellen gebildet wird, müssen weitere Untersuchungen klären.

## 7. Anhang

Tabelle 18: Intensität der IDO und  $\beta$ -Actin Fragmente bei *H.pylori* negativen Patienten

Ca-Nr	OD IDO	OD $\beta$ -Actin	Ratio	ExHpGastritis	m/f	Int / Diff
312	719,4	37677	0,0190	n	m	i
318	16,3	9820,9	0,0016	n	m	d
322	889,8	35323	0,0251	n	m	i
324	23,09	36734	0,0006	n	f	d
354	1126,7	19481	0,0578	n	m	d
362	67,9	84413	0,0008	n	m	d
369	47,2	3493,2	0,0135	n	f	i
387	8447	88831	0,0950	n	m	i
388	258,5	58299	0,0044	n	m	d
392	9070,4	4338,1	2,0908	n	m	i
393	7476,4	79575	0,0939	n	m	i
394	7518,9	40078	0,1876	j	m	i
407,GC1	11306	72521	0,1558	n	m	d
411	10924	78075	0,1399	n	m	i
417	346,6	66791	0,0051	n	f	i
421,GC9	4420,6	81540	0,0542	j	m	i
431	2661,1	70423	0,0377	n	m	i
436	3590,9	48492	0,0740	j	m	-
461	3160,1	96426	0,0327	n	m	d
473	69547	95360	0,7293	n	m	-
475	177,3	20953	0,0084	j	m	i

Ca-Nr: Karzinomnummer

OD: integrierte optische Dichte der Fragmente

Ratio: IDO/ $\beta$ -Actin

ExHpGastritis: Gastritis Nachweis ja/nein

m/f: male/female

Int/Diff: Tumortyp intestinal/diffus



**Tabelle 19: Intensität der IDO und  $\beta$ -Actin Fragmente bei *H.pylori* positiven Patienten:**

Ca-Nr	OD IDO	OD $\beta$ -Actin	Ratio	Gastritis j/n	m/f	Int/ Diff
406	186,5	5908,6	0,0315	n	f	d
410	5613,4	61742	0,0909	n	f	d
413	47969	121000	0,3964	j	m	i
416	3760,1	68866	0,0546	j	m	i
419	1959	29576	0,0662	j	m	i
420	299,7	9918,3	0,0302	n	m	i
425	4298	22365	0,1921	n	m	d
429	20843	66771	0,3121	j	m	d
433,GC20	28855	62671	0,4604	j	f	i
434	170,2	32803	0,0051	j	f	i
435	5443,7	103000	0,0528	j	m	i
440	76,8	43521	0,0017	j	m	i
442	62618	111000	0,5641	n	f	-
444	12,1	27,6	0,4393	j	m	-
447	19688	2481	0,7933	j	m	d
452	916,3	53896	0,0170	j	m	i
454	12,7	63,6	0,2002	j	m	d
462	595,7	24392	0,0244	j	f	i
463	10,6	107,6	0,0989	n	f	d
464	27,6	34127	0,0008	j	f	-
465	8,2	57,9	0,1414	n	m	i
466	89,1	90,1	0,9885	n	f	d
469	12572	49971	0,2515	j	m	i
470	29009	82679	0,3508	n	m	i
471	26,4	49054	0,0005	j	m	i
472	11577	33310	0,3475	j	m	d
474	13,8	69411	0,0001	j	m	-

Legende siehe Tabelle 18

## 8. Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 20: Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
APC	Antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
Cag A	Zytotoxin assoziiertes Antigen A
CCR	Chemokinrezeptor
CD	Cluster of differentiation/ Zelloberflächenantigen
cDNA	Komplementäre DANN
CM	Komplettmedium
CTLA4	Zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamidtriacid
GCN2	General Control Nondepressible 2
GPR	G-Protein Rezeptor
H.pylori	Helicobakter pylori
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradish- Peroxidase
IARC	International agency for research on cancer
IDO	Indoleamine 2,3 Dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunglobulin- Superfamilie
IL	Interleukin
KI	Konvidenzintervall
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Lymphotoxin
MHC	Haupt- Histokompatibilitätskomplex
mRNA	Messenger RNA
NF	Nekrose Faktor
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
Taq	Thermus aquaticus
TDLN	Tumor drainierter Lymphknoten
TDO	Tryptophan 2,3 Dioxygenase
TGF	Tumorwachstumsfaktor
TIL	Tumor infiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T- Zelle

Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
Tu	Tumor
VacA	Vakuolisierendes Zytotoxin A
WHO	Weltgesundheitsorganisation

## 9. Literatur

- [1] D. Forman, Helicobacter pylori infection: a novel risk factor in the etiology of gastric cancer, J. Natl. Cancer Inst. 83 (1991) 1702-1703.
- [2] D. Forman, D.G. Newell, F. Fullerton, J.W. Yarnell, A.R. Stacey, N. Wald, F. Sitas, Association between infection with Helicobacter pylori and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation, BMJ 302 (1991) 1302-1305.
- [3] Roessner A.,P.U. and Müller-Hermelink H.K., "Pathologie für Zahnmediziner," p 332, Urban & Fischer, 2004.
- [4] Türck Jochen, Regulation IFN-gamma vermittelter antiparasitärer Effektormechanismen: Einfluss von Cytokinen und Glukokortikoiden auf die Aktivierung der Indoleamin 2,3 Dioxygenase, (4 A.D.), Dissertation.
- [5] J.E. Crabtree, P. Peichl, J.I. Wyatt, U. Stachl, I.J. Lindley, Gastric interleukin-8 and IgA IL-8 autoantibodies in Helicobacter pylori infection, Scand. J. Immunol. 37 (1993) 65-70.
- [6] S.A. Sharma, M.K. Tummuru, G.G. Miller, M.J. Blaser, Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to Helicobacter pylori stimulation in vitro, Infect. Immun. 63 (1995) 1681-1687.
- [7] P. Correa, Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis, Am. J. Surg. Pathol. 19 Suppl 1:S37-43. (1995) S37-S43.
- [8] A.E. Whitney, T.S. Emory, A.M. Marty, P.A. O'Shea, G.W. Newman, B.D. Gold, Increased macrophage infiltration of gastric mucosa in Helicobacter pylori-infected children, Dig. Dis. Sci. 45 (2000) 1337-1342.
- [9] K.B. Bamford, X. Fan, S.E. Crowe, J.F. Leary, W.K. Gourley, G.K. Luthra, E.G. Brooks, D.Y. Graham, V.E. Reyes, P.B. Ernst, Lymphocytes in the human gastric mucosa during Helicobacter pylori have a T helper cell 1 phenotype, Gastroenterology 114 (1998) 482-492.
- [10] F. Lizza, T. Parrello, L. Sebkova, L. Pensabene, M. Imeneo, M. Mancuso, A.M. La Vecchia, G. Monteleone, P. Strisciuglio, F. Pallone, Expression of proinflammatory and Th1 but not Th2 cytokines is enhanced in gastric mucosa of Helicobacter pylori infected children, Dig. Liver Dis. 33 (2001) 14-20.
- [11] W.J. Lee, J.T. Lin, C.T. Shun, W.C. Lee, S.C. Yu, P.H. Lee, K.J. Chang, T.C. Wei, K.M. Chen, Comparison between resectable gastric adenocarcinomas seropositive and seronegative for Helicobacter pylori, Br. J. Surg. 82 (1995) 802-805.

- [12] G. Meimarakis, H. Winter, I. Assmann, R. Kopp, N. Lehn, M. Kist, M. Stolte, K.W. Jauch, R.A. Hatz, *Helicobacter pylori* as a prognostic indicator after curative resection of gastric carcinoma: a prospective study, *Lancet Oncol.* 7 (2006) 211-222.
- [13] T.R. Mosmann, S. Sad, The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more, *Immunol. Today* 17 (1996) 138-146.
- [14] T. Nakamura, R.K. Lee, S.Y. Nam, E.R. Podack, K. Bottomly, R.A. Flavell, Roles of IL-4 and IFN-gamma in stabilizing the T helper cell type 1 and 2 phenotype, *J. Immunol.* 158 (1997) 2648-2653.
- [15] H. Groux, An overview of regulatory T cells, *Microbes. Infect.* 3 (2001) 883-889.
- [16] S. Hori, T. Nomura, S. Sakaguchi, Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3, *Science* 299 (2003) 1057-1061.
- [17] Löffler and Petrides, "Biochemie und Pathobiochemie," pp 1057-1062, Springer, 1998.
- [18] J.P. Ridge, F. Di Rosa, P. Matzinger, A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell, *Nature* 393 (1998) 474-478.
- [19] K. Inaba, M. Inaba, [Dendritic cells], *Nippon Rinsho* 63 Suppl 4 (2005) 123-129.
- [20] K. Inaba, M. Inaba, Antigen recognition and presentation by dendritic cells, *Int. J. Hematol.* 81 (2005) 181-187.
- [21] H. Bernhard, M.L. Disis, S. Heimfeld, S. Hand, J.R. Gralow, M.A. Cheever, Generation of immunostimulatory dendritic cells from human CD34+ hematopoietic progenitor cells of the bone marrow and peripheral blood, *Cancer Res.* 55 (1995) 1099-1104.
- [22] D.N. Hart, Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response, *Blood* 90 (1997) 3245-3287.
- [23] R.M. Steinman, The dendritic cell system and its role in immunogenicity, *Annu. Rev. Immunol.* 9. (1991) 271-296.
- [24] M.B. Lutz, G. Schuler, Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?, *Trends Immunol.* 23 (2002) 445-449.
- [25] J. Banchereau, R.M. Steinman, Dendritic cells and the control of immunity, *Nature* 392 (1998) 245-252.
- [26] U. Grohmann, F. Fallarino, P. Puccetti, Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO, *Trends Immunol.* 24 (2003) 242-248.

- [27] P. Hwu, M.X. Du, R. Lapointe, M. Do, M.W. Taylor, H.A. Young, Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation, *J. Immunol.* 164 (2000) 3596-3599.
- [28] A.L. Mellor, B. Baban, P. Chandler, B. Marshall, K. Jhaver, A. Hansen, P.A. Koni, M. Iwashima, D.H. Munn, Cutting edge: induced indoleamine 2,3-dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion, *J. Immunol.* 171 (2003) 1652-1655.
- [29] P. Terness, J.J. Chuang, T. Bauer, L. Jiga, G. Opelz, Regulation of human auto- and alloreactive T cells by indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-producing dendritic cells: too much ado about IDO?, *Blood* 105 (2005) 2480-2486.
- [30] O. Hayaishi, H. Taniuchi, Studies on the metabolism of kynurenic acid. I. The formation of L-glutamic acid, D- and L-alanine, and acetic acid from kynurenic acid by *Pseudomonas* extracts, *J. Biol. Chem.* 236 (1961) 2492-2497.
- [31] A.L. Mellor, D.H. Munn, Tryptophan catabolism and regulation of adaptive immunity, *J. Immunol.* 170 (2003) 5809-5813.
- [32] D.H. Munn, E. Shafizadeh, J.T. Attwood, I. Bondarev, A. Pashine, A.L. Mellor, Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism, *J. Exp. Med.* 189 (1999) 1363-1372.
- [33] D.H. Munn, M.D. Sharma, D. Hou, B. Baban, J.R. Lee, S.J. Antonia, J.L. Messina, P. Chandler, P.A. Koni, A.L. Mellor, Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes, *J. Clin. Invest* 114 (2004) 280-290.
- [34] J.R. Lee, R.R. Dalton, J.L. Messina, M.D. Sharma, D.M. Smith, R.E. Burgess, F. Mazzella, S.J. Antonia, A.L. Mellor, D.H. Munn, Pattern of recruitment of immunoregulatory antigen-presenting cells in malignant melanoma, *Lab Invest* 83 (2003) 1457-1466.
- [35] D.H. Munn, A.L. Mellor, IDO and tolerance to tumors, *Trends Mol. Med.* 10 (2004) 15-18.
- [36] C. Uyttenhove, L. Pilotte, I. Theate, V. Stroobant, D. Colau, N. Parmentier, T. Boon, B.J. Van den Eynde, Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase, *Nat. Med.* 9 (2003) 1269-1274.
- [37] A.L. Mellor, D.B. Keskin, T. Johnson, P. Chandler, D.H. Munn, Cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase inhibit T cell responses, *J. Immunol.* 168 (2002) 3771-3776.
- [38] H. Winter, H.M. Hu, C.H. Poehlein, E. Huntzicker, J.J. Osterholzer, J. Bashy, D. Lashley, B. Lowe, J. Yamada, G. Alvord, W.J. Urba, B.A. Fox, Tumour-induced polarization of tumour vaccine-draining lymph node T cells to a type 1 cytokine profile predicts inherent strong immunogenicity of the tumour and correlates with therapeutic efficacy in adoptive transfer studies, *Immunology* 108 (2003) 409-419.

- [39] F. Sommer, G. Faller, P. Konturek, T. Kirchner, E.G. Hahn, J. Zeus, M. Rollinghoff, M. Lohoff, Antrum- and corpus mucosa-infiltrating CD4(+) lymphocytes in *Helicobacter pylori* gastritis display a Th1 phenotype, *Infect. Immun.* 66 (1998) 5543-5546.
- [40] N.K. van den Engel, H. Winter, D. Ruttinger, I. Shau, M. Schiller, B. Mayer, T. Moudgil, G. Meimarakis, M. Stolte, K.W. Jauch, B.A. Fox, R.A. Hatz, Characterization of immune responses in gastric cancer patients: a possible impact of *H. pylori* to polarize a tumor-specific type 1 response?, *Clin. Immunol.* 120 (2006) 285-296.
- [41] S. Tsuchiya, M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno, K. Tada, Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1), *Int. J. Cancer.* 26 (1980) 171-176.
- [42] P. Lauren, The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An Attempt at a Histo-clinical classification, *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 64:31-49. (1965) 31-49.
- [43] F. Fallarino, U. Grohmann, C. Vacca, C. Orabona, A. Spreca, M.C. Fioretti, P. Puccetti, T cell apoptosis by kynurenines, *Adv. Exp. Med. Biol.* 527:183-90. (2003) 183-190.
- [44] G. Frumento, R. Rotondo, M. Tonetti, G. Damonte, U. Benatti, G.B. Ferrara, Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase, *J. Exp. Med.* %19;196 (2002) 459-468.
- [45] P. Terness, T.M. Bauer, L. Rose, C. Dufter, A. Watzlik, H. Simon, G. Opelz, Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites, *J. Exp. Med.* %19;196 (2002) 447-457.
- [46] M.L. Belladonna, U. Grohmann, P. Guidetti, C. Volpi, R. Bianchi, M.C. Fioretti, R. Schwarcz, F. Fallarino, P. Puccetti, Kynurenine pathway enzymes in dendritic cells initiate tolerogenesis in the absence of functional IDO, *J. Immunol.* 177 (2006) 130-137.
- [47] D.H. Munn, M.D. Sharma, A.L. Mellor, Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells, *J. Immunol.* 172 (2004) 4100-4110.
- [48] K.A. Swanson, Y. Zheng, K.M. Heidler, T. Mizobuchi, D.S. Wilkes, CD11c+ cells modulate pulmonary immune responses by production of indoleamine 2,3-dioxygenase, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 30 (2004) 311-318.
- [49] D. von Bubnoff, H. Matz, C. Frahnert, M.L. Rao, D. Hanau, S.H. de la, T. Bieber, FcεRI induces the tryptophan degradation pathway involved in regulating T cell responses, *J. Immunol.* 169 (2002) 1810-1816.
- [50] G.J. van Mierlo, Z.F. Boonman, H.M. Dumortier, A.T. den Boer, M.F. Fransen, J. Nouta, E.I. van der Voort, R. Offringa, R.E. Toes, C.J. Melief, Activation of

- dendritic cells that cross-present tumor-derived antigen licenses CD8<sup>+</sup> CTL to cause tumor eradication, *J. Immunol.* 173 (2004) 6753-6759.
- [51] A.K. Nowak, R.A. Lake, A.L. Marzo, B. Scott, W.R. Heath, E.J. Collins, J.A. Frelinger, B.W. Robinson, Induction of tumor cell apoptosis in vivo increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells, *J. Immunol.* 170 (2003) 4905-4913.
- [52] A.Y. Huang, P. Golumbek, M. Ahmadzadeh, E. Jaffee, D. Pardoll, H. Levitsky, Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens, *Science.* 264 (1994) 961-965.
- [53] K.M. Hargadon, C.C. Brinkman, S.L. Sheasley-O'Neill, L.A. Nichols, T.N. Bullock, V.H. Engelhard, Incomplete differentiation of antigen-specific CD8 T cells in tumor-draining lymph nodes, *J. Immunol.* 177 (2006) 6081-6090.
- [54] D.H. Munn, A.L. Mellor, The tumor-draining lymph node as an immune-privileged site, *Immunol. Rev.* 213:146-58. (2006) 146-158.
- [55] A.J. Cochran, R.R. Huang, J. Lee, E. Itakura, S.P. Leong, R. Essner, Tumour-induced immune modulation of sentinel lymph nodes, *Nat. Rev. Immunol.* 6 (2006) 659-670.
- [56] D.H. Munn, M.D. Sharma, J.R. Lee, K.G. Jhaver, T.S. Johnson, D.B. Keskin, B. Marshall, P. Chandler, S.J. Antonia, R. Burgess, C.L. Slingluff, Jr., A.L. Mellor, Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase, *Science* 297 (2002) 1867-1870.
- [57] C.M. Robinson, P.T. Hale, J.M. Carlin, The role of IFN-gamma and TNF-alpha-responsive regulatory elements in the synergistic induction of indoleamine dioxygenase, *J. Interferon Cytokine Res.* 25 (2005) 20-30.
- [58] A. Raitala, J. Karjalainen, S.S. Oja, T.U. Kosunen, M. Hurme, Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity is lower in atopic than in non-atopic individuals and is enhanced by environmental factors protecting from atopy, *Mol. Immunol.* 43 (2006) 1054-1056.
- [59] A. Raitala, J. Karjalainen, S.S. Oja, T.U. Kosunen, M. Hurme, Helicobacter pylori-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in vivo is regulated by TGFB1 and CTLA4 polymorphisms, *Mol. Immunol.* 44 (2007) 1011-1014.
- [60] M.L. Belladonna, U. Grohmann, P. Guidetti, C. Volpi, R. Bianchi, M.C. Fioretti, R. Schwarcz, F. Fallarino, P. Puccetti, Kynurenine pathway enzymes in dendritic cells initiate tolerogenesis in the absence of functional IDO, *J. Immunol.* 177 (2006) 130-137.
- [61] G. Brandacher, A. Perathoner, R. Ladurner, S. Schneeberger, P. Obrist, C. Winkler, E.R. Werner, G. Werner-Felmayer, H.G. Weiss, G. Gobel, R. Margreiter, A. Konigsrainer, D. Fuchs, A. Amberger, Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells, *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 1144-1151.



- [62] K. Ino, N. Yoshida, H. Kajiyama, K. Shibata, E. Yamamoto, K. Kidokoro, N. Takahashi, M. Terauchi, A. Nawa, S. Nomura, T. Nagasaka, O. Takikawa, F. Kikkawa, Indoleamine 2,3-dioxygenase is a novel prognostic indicator for endometrial cancer, *Br. J. Cancer*. 95 (2006) 1555-1561.
- [63] A. Okamoto, T. Nikaido, K. Ochiai, S. Takakura, M. Saito, Y. Aoki, N. Ishii, N. Yanaihara, K. Yamada, O. Takikawa, R. Kawaguchi, S. Isonishi, T. Tanaka, M. Urashima, Indoleamine 2,3-dioxygenase serves as a marker of poor prognosis in gene expression profiles of serous ovarian cancer cells, *Clin. Cancer Res*. 11 (2005) 6030-6039.