

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

der Ludwig-Maximilians-Universität

München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Expression und Funktion von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) und
Arylhydrocarbonrezeptor (AHR) in Tumorzellen und T-Zellen im
Pankreaskarzinom**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Sabrina

Schuhbaum aus

Deggendorf

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Max Schnurr

.

Mitberichtersteller: Priv. Doz. Dr. Dominik Modest

Priv Doz. Dr. Heike Pohla

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter:

PD Dr. rer. biol. hum. Peter Düwell

Dr. rer. biol. hum. Tina Adunka

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.2020

Meinen Eltern
und meiner Tante Fannerl

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Biologische und klinische Aspekte des Pankreaskarzinoms	1
1.2 Tumorimmunologie und Tumorimmuntherapie	3
1.2.1 Das angeborene und das adaptive Immunsystem	3
1.2.1.1 Das angeborene Immunsystem	3
1.2.1.2 Das adaptive Immunsystem	4
1.2.1.3 T-Zellen	4
1.2.1.4 Aktivierende und inhibitorische Mechanismen in T-Zellen	5
1.2.2 Die Rolle von T-Zellen im Pankreaskarzinom	6
1.2.3 Die Immuntherapie des Pankreaskarzinoms	7
1.3 Mechanismen der Immunsuppression im Pankreaskarzinom	8
1.3.1 Zelluläre Mechanismen	8
1.3.1.1 Tumor-assoziierte Makrophagen	8
1.3.1.2 Myeloid-derived suppressor cells	9
1.3.1.3 Regulatorische T-Zellen	9
1.3.1.4 Tumormikromilieu	10
1.3.2 Molekulare Mechanismen	10
1.3.2.1 Galectin-1	10
1.3.2.2 Transforming growth factor- β (TGF- β)	11
1.3.2.3 Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO)	11
1.3.2.4 IDO-Inhibitoren und klinische Studien	13
1.4. Fragestellung	15
2. Material und Methoden	17
2.1 Geräte und Reagenzien	17
2.1.1 Technische Ausstattung	17
2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Pufferlösungen	17
2.1.3 Zellkulturmaterialien und -medien	20
2.1.4 Zelllinien	22
2.1.5 Reagenziensätze	22
2.1.6 Antikörper	22
2.1.6.1 Unkonjugierte Antikörper	22
2.1.6.2 Konjugierte Antikörper für FACS	22
2.1.6.3 <i>Western blot</i> Antikörper	23
2.1.7 Inhibitoren	23
2.1.8 Rekombinante Zytokine, Proteine und <i>small molecules</i>	23

2.1.9 Primer-Sequenzen für qRT-PCR	23
2.1.10 Software.....	24
2.2 Methoden	25
2.2.1 Zellkultur	25
2.2.1.1 Zellkulturbedingungen.....	25
2.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	25
2.2.1.3 Bestimmung von Zellzahl und Viabilität.....	25
2.2.1.4 Kultivierung von Tumorzelllinien	25
2.2.2 <i>Ex vivo</i> Zellisolation	26
2.2.2.1 Versuchstiere.....	26
2.2.2.2 Tumorinduktion und Isolation von Zellen aus dem Tumorgewebe.....	26
2.2.2.3 Isolation von T-Zellen aus der Milz.....	26
2.2.3 Immunologische Methoden	27
2.2.3.1 <i>Western blot</i>	27
2.2.3.2 Durchflusszytometrie (FACS, fluorescence-activated cell sorting)	27
2.2.4 Molekularbiologische Methoden.....	29
2.2.4.1 RNA-Isolation.....	29
2.2.4.2 cDNA-Transkription.....	29
2.2.4.3 Quantitative Echtzeit - Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	30
2.2.4.4 T-Zell-Proliferationsassay.....	30
2.2.5 Versuche mit humanen Zellen.....	30
2.2.5.1 Blutentnahme und Isolation von PBMCs sowie T-Zellen.....	30
2.2.6 Statistische Analyse.....	31
3. Ergebnisse	32
3.1 IDO und AHR Expressionsmuster und Funktion in murinen und humanen Pankreastumorzelllinien	32
3.1.1 IFN- γ induziert die Expression von IDO und AHR im murinen und humanen Pankreastumorzellen.....	32
3.1.2 IFN- γ induziert IDO-Protein in T110299	34
3.1.3 Untersuchung des Kynurenin-AHR-Signalwegs in murinen und humanen Pankreaskarzinomzellen	35
3.2 Expression von IDO und AHR-Signaling in murinen und humanen T-Zellen ...	37
3.2.1 TGF- β und Tumorüberstände induzieren IDO1 in murinen T-Zellen	37
3.2.2 Inhibition von AHR- nicht jedoch von TGF- β -Signaling inhibiert die IDO1-Induktion durch Tumorzellüberstand in murinen T-Zellen	40
3.2.3 TGF- β und Tumorüberstände induzieren IDO1 in humanen T-Zellen	40
3.2.4 Der AHR-Antagonist CH-223191 inhibiert die IDO1-Induktion durch Tumor-	

überstand in humanen T-Zellen.....	42
3.2.5 Kynurenin-AHR-Signalkaskade in murinen und humanen T-Zellen.....	43
3.3 Expressionsmuster des IDO1-AHR-Signalwegs in tumorinfiltrierenden T-Zellen.....	45
3.3.1 Isolation und Qualitätskontrolle tumorinfiltrierender T-Zellen	45
3.3.2 Tumorinfiltrierende T-Zellen zeigen eine erhöhte Expression von IDO1, AHR und TIPARP	46
3.3.3 Tumorinfiltrierende T-Zellen aus KPC-Mäusen exprimieren mehr IDO1-Protein als T-Zellen aus gesunden Tieren.....	47
3.4 Funktionelle Konsequenzen der IDO1-Expression in T-Zellen	48
3.4.1 Tumorüberstände hemmen die T-Zell-Proliferation.....	48
3.4.2 Einfluss von IDO- und TGF- β -Inhibitoren auf die Tumorzellüberstand-induzierte T-Zell-Proliferationshemmung.....	50
4. Diskussion	52
4.1 Expressionsmuster und Signaling in murinen und humanen Pankreastumorzelllinien	52
4.2 IDO1-Expressionsmuster und Signaling in murinen und humanen T-Zellen <i>in vitro</i> und murinen tumorinfiltrierenden T-Zellen	53
4.3 Untersuchungen zur Funktionalität von IDO	55
4.4 Ausblick und mögliche Relevanz für die Immuntherapie des Pankreaskarzinoms	57
5. Zusammenfassung	59
6. Literaturverzeichnis	61
7. Verzeichnis der Abkürzungen	69
8. Danksagung	71
9. Lebenslauf	72

1. Einleitung

1.1 Biologische und klinische Aspekte des Pankreaskarzinoms

Das Pankreaskarzinom ist mit einer durchschnittlichen 5-Jahresüberlebensrate von 8% eine der prognostisch ungünstigsten Krebserkrankungen und die vierthäufigste Krebstodesursache weltweit (Siegel et al., 2017). Bei über 90% der bösartigen Pankreaserkrankungen handelt es sich um ein duktales Adenokarzinom (Cubilla and Fitzgerald, 1985). Überwiegend sind die Patienten zwischen 60 und 80 Jahre alt, wobei die Inzidenz für betroffene Frauen bei 10.9 und für betroffene Männer bei 13.9 pro 100.000 Einwohner liegt (Howlander N, 1975-2012). Zu den Risikofaktoren zählen Diabetes mellitus, Rauchen sowie chronische Pankreatitis, z.B. aufgrund von genetischer Prädisposition oder Alkoholkonsum. Gründe für die oft infauste Prognose des Pankreaskarzinoms sind fehlende Warnsymptome, die eine späte Diagnose als Folge haben, die schnelle Ausbreitung in umgebende Blutgefäße, die frühe Ausbildung von Mikrometastasen und das schlechte Ansprechen auf eine Zytostatika- oder Strahlentherapie (Kleeff et al., 2016). Mikroskopisch wird der Tumor von einem dichten, desmoplastischen Stroma umgeben, welches größtenteils aus Kollagen, Fibroblasten und Immunzellen besteht (Chu et al., 2007). Das Stroma spielt eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung und –metastasierung. Die schlechte Gefäßversorgung des Stromas verhindert eine gute Aufnahme der Medikamente im Tumorgewebe und begünstigt die Entstehung eines hypoxischen Mikromilieus (Hidalgo and Von Hoff, 2012).

Der Ursprung der malignen Entartung liegt meist im duktalem Epithel und entwickelt sich von gutartigen Vorläuferläsionen über zunehmende Dysplasien bis hin zum invasiven Karzinom. Es sind drei verschiedene Vorläuferläsionen des Pankreastumors definiert, die sich in ihrer Differenzierung unterscheiden. Die muzinös-zystische Neoplasie (MCN), die intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie (IPMN) und die intraepitheliale Neoplasie des Pankreas (PanIN) (Distler et al., 2014). Die Progression der intraepithelialen Neoplasie in das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist aus genetischer Sicht weitgehend entschlüsselt. Relativ früh kommt es zu aktivierenden Punktmutationen im *Kirsten rat sarcoma* RAS (K_{RAS}) Onkogen. Durch Transkription des mutierten K_{RAS} -Gens wird ein abnormales Ras-Protein hergestellt, das sich ständig in der aktiven Form befindet und somit überwiegend zellproliferative Signalwege aktiviert. Des Weiteren ist bei vielen Tumoren eine Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *cyclin dependent kinase inhibitor 2A* (CDKN2A, synonym p16) nachzuweisen, was zu einem Verlust des Proteins und einer entsprechend erhöhten Zellproliferation führt. Außerdem ist in über 50% der Tumore das Tumorsuppressorprotein p53 (TP53) verändert, was dazu führt, dass Zellen die DNA-Reparatur-Checkpoints oder Zelltodsignale übergehen und schließlich eine genomische Instabilität entsteht. Die vierte gesicherte Mutation, der Verlust des *mothers against*

decapentaplegic homolog 4 (SMAD4), führt zu einer übermäßigen Aktivierung des *transforming growth factor β* (TGF-β)-Rezeptor-Signalwegs (Soreide and Sund, 2015).

Die meisten Tumore entstehen im Pankreaskopf und führen zur obstruktiven Cholestase mit Ikterus. Die klinischen Anzeichen sind meist unspezifisch und umfassen Übelkeit, Bauch- und Rückenschmerzen oder Dysglykämien (Keane et al., 2014). Zu den typischen Symptomen im fortgeschrittenen Stadium gehören Anorexie, Gewichtsverlust und Aszites.

Die Therapie und Prognose von Patienten mit einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas hängt vom Ausmaß der Erkrankung zum Diagnosezeitpunkt ab. Leitliniengerecht erfolgt bei operablen Tumoren zunächst eine chirurgische Entfernung des Tumors, gefolgt von einer anschließenden adjuvanten Therapie. Meistens befinden sich die Patienten zum Diagnosezeitpunkt jedoch bereits im metastasierten Stadium, in dem eine chirurgische Resektion in aller Regel nicht mehr sinnvoll ist. In dieser palliativen Situation ist eine systemische Chemotherapie indiziert. Seit über 20 Jahren besteht die Erstlinien-Therapie für metastasierte Pankreastumore aus einer Chemotherapie mit Gemcitabin (Burriss et al., 1997). Gemcitabin ist ein chemisches Analogon des Nukleosids Cytidin. Eine kombinierte Therapie aus Gemcitabin und Erlotinib, einem Inhibitor des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR), zeigte ein gering verbessertes medianes Gesamtüberleben (mOS), allerdings verbunden mit vermehrtem Auftreten von Nebenwirkungen wie Diarrhö oder Ekzemen (Moore et al., 2007). Eine Studie aus dem Jahr 2011 zeigte, dass im Vergleich zur Gemcitabin-Monotherapie, eine Polychemotherapie nach dem FOLFIRINOX-Schema (Leucovorin, Fluorouracil, Irinotecan und Oxaliplatin) das mediane Überleben um vier Monate verlängerte. Jedoch brachte diese aggressive Therapie erhebliche Nebenwirkungen mit sich, wie Neutropenie, Thrombozytopenie, sensorische Neuropathie, Erbrechen und Diarrhö, was in einigen Fällen zum Therapieabbruch führte (Conroy et al., 2011). Des Weiteren wurde die Kombinationstherapie aus Gemcitabin mit dem Taxan Paclitaxel (Gemcitabin-Nab-Paclitaxel) mit einer Gemcitabin-Monotherapie verglichen. Das mediane Gesamtüberleben betrug 8,5 Monate in der Kombinationstherapie versus 6,7 Monaten in der Monotherapie (Von Hoff et al., 2013). Laut einer retrospektiven Studie, erhoben an Patienten mit Tumorprogression nach Therapie mit FOLFIRINOX und anschließender Therapie mit Gemcitabin-Nab-Paclitaxel, konnte in 58% der Fälle die Krankheit kontrolliert und ein medianes Gesamtüberleben von 18 Monaten erreicht werden (Portal et al., 2015). Mehrere Studien, in denen Patienten mit lokal fortgeschrittenem Pankreaskarzinom mit Gemcitabin und einer kombinierten Strahlentherapie behandelt wurden, zeigten im Vergleich zur Gemcitabin-Monotherapie zwar einen verminderten lokalen Progress, jedoch durch fehlenden Einfluss auf das Ausbilden von Fernmetastasen kein signifikant verbessertes Gesamtüberleben (Kornek et al., 2001, Okusaka et al., 2004).

1.2 Tumorimmunologie und Tumorimmuntherapie

Die Tumorimmunologie beschäftigt sich mit der Erforschung der Wechselwirkungen zwischen Tumoren und dem Immunsystem. Das Immunsystem besitzt die Fähigkeit körperfremde von körpereigenen Zellen zu unterscheiden. Die Immuntherapie hat das Ziel – durch Unterstützung und Aktivierung der natürlichen Abwehrmechanismen –, dass Krebszellen vom Immunsystem als fremd erkannt und spezifisch zerstört werden. Eine Funktion des Immunsystems besteht darin, veränderte Zellen zu bekämpfen, oft schon bevor sie Tumore ausbilden (*elimination*) (Burnet, 1970). Gelingt es einzelnen Tumorzellen dieser Elimination zu entkommen, so treten sie in das Equilibriumsstadium ein, in dem sie in einer Art *steady state* durch das Immunsystem kontrolliert werden (*equilibrium*) (Koebel et al., 2007). Irgendwann entwickeln diese Zellen jedoch Mechanismen, um sich der Kontrolle durch das Immunsystem zu entziehen und es tritt ein proliferativer Zustand ein. Die Entrinnungsphase (*escape*) beginnt und die Krebserkrankung manifestiert sich klinisch. Während dieser drei Phasen findet eine Art Editierung (*immune editing*) der Tumorzellen durch das Immunsystem statt, mit der Ausbildung von Immunresistenzen. Um in der Zukunft erfolgreiche Immuntherapien entwickeln zu können, ist es wichtig, diese immunsuppressiven Mechanismen und Resistenzen zu entschlüsseln und gezielt zu beseitigen. Im folgenden Abschnitt werden die wichtigsten Bestandteile des Immunsystems hinsichtlich der Immuntherapie erläutert.

1.2.1 Das angeborene und das adaptive Immunsystem

Das menschliche Immunsystem besteht aus zellulären und löslichen Bestandteilen, die den Körper vor diversen Bedrohungen schützen. Es besteht aus zwei Systemen – der angeborenen und der adaptiven Immunabwehr. Beide Komponenten sind miteinander verknüpft und bekämpfen so gemeinsam Pathogene sowie transformierte körpereigene Zellen.

Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem fungiert als primäre Abwehrreaktion gegen eindringende Mikroorganismen (Ezekowitz and Hoffmann, 1996). Die angeborene Abwehr wird neben löslichen Bestandteilen wie dem Komplementsystem und der Epithelbarriere vor allem durch Makrophagen, Mastzellen, natürliche Killerzellen und dendritische Zellen (DCs) vermittelt. Diese exprimieren sogenannte Mustererkennungsrezeptoren, wie z.B. *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs), *NOD-like*-Rezeptoren (NLRs) oder *RIG-I-like*-Rezeptoren (Palucka and Banchereau, 2012), welche körperfremde aber auch körpereigene Substrate erkennen und zu einer entsprechenden Immunantwort führen (Medzhitov and Janeway, 1997). Aktivierte

Makrophagen sezernieren Chemokine und locken damit weitere Immunzellen an den Ort der Infektion. Ausgeschüttete proinflammatorische Zytokine verursachen eine lokale und systemische Entzündungsreaktion. DCs präsentieren phagozytierte und intrazellulär prozessierte Partikel auf ihrer Oberfläche im Komplex mit MHC-Molekülen und aktivieren dadurch T-Zellen (Austyn, 1992). Durch die Abläufe der antigen-unspezifischen angeborenen Immunantwort wird schließlich die adaptive Immunabwehr eingeleitet und eine an die Situation optimal angepasste spezifische Immunreaktion kann stattfinden (Schnare et al., 2001).

Das adaptive Immunsystem

Die adaptive Immunreaktion tritt – anders als die angeborene Immunabwehr – verzögert ein. Typisch für sie ist eine Antigenspezifität, wodurch sie auch auf Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und Nukleinsäuren reagieren kann, welche von den Zellen des angeborenen Immunsystems unerkant bleiben. Die Effektorzellen des adaptiven Immunsystems bilden zwei Populationen - die B- und T-Lymphozyten. Beide Zelltypen exprimieren an ihrer Oberfläche einen hochspezifischen Antigen-Rezeptor. Durch somatische Rekombination dieser B- und T-Zellrezeptorgene gibt es eine immense Vielfalt dieser Rezeptoren (Palucka and Banchereau, 2012). Die adaptive Immunabwehr lässt sich in eine humorale und zellvermittelte Antwort unterteilen. Die humorale Immunantwort wird durch B-Lymphozyten vermittelt, die nach ihrer Aktivierung Antikörper produzieren. Diese Antikörper binden extrazelluläres Antigen, das so erkannt und von Makrophagen und über das Komplementsystem neutralisiert wird. Die zellvermittelte Immunantwort bilden zum einen T-Helferzellen, die über Zytokinausschüttung Makrophagen aktivieren, um phagozytierte Mikroorganismen zu töten, und zum anderen zytotoxische T-Zellen, die direkt auf Fremdzellen und Mikroorganismen einwirken (Janeway and Medzhitov, 2002, Palucka and Banchereau, 2012, Russell and Ley, 2002). In den folgenden Abschnitten werden die T-Zellen, welche allesamt das CD3-Antigen besitzen, detaillierter erläutert.

T-Zellen

T-Zellen stellen eine der Hauptgruppen der zellvermittelten Immunabwehr dar und können in drei große Untergruppen eingeteilt werden: $CD4^+$ T-Helfer-Zellen (T_H), $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen (CTL) und regulatorische T-Zellen (T_{reg}). Jede dieser Zellen exprimiert den T-Zellrezeptor (TCR) (Andersen et al., 2006). $CD4^+$ T-Zellen können Antigenfragmente (ca. 16 Aminosäuren), die ihnen über den *major histocompatibility complex II* (MHC II) auf Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) präsentiert werden, erkennen. Eine optimale Aktivierung der T-Helferzellen kann nur über geeignete kostimulatorische Moleküle, die sich auf der Oberfläche von bestimmten APCs wie DCs befinden, erreicht werden. Die Funktion von $CD4^+$ T Zellen

besteht darin, sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort durch Aktivierung von B-Zellen und Makrophagen zu verstärken. CD8⁺ T-Zellen erkennen spezifische Epitope (ca. 8 Aminosäuren) von Peptiden, die über den MHC-Klasse-I-Komplex präsentiert werden. MHC-Klasse-I-Proteinkomplexe befinden sich auf der Oberfläche nahezu aller kernhaltigen Zellen und präsentieren endogene Peptide, die überwiegend durch das Proteasom gebildet werden (Andersen et al., 2006). Für die zytotoxischen T-Zellen gibt es drei Möglichkeiten die jeweilige Zielzelle zu zerstören. Einerseits tragen CD8⁺ T-Zellen den Fas-Liganden (CD95L) auf ihrer Oberfläche, welcher an den Fas-Rezeptor (CD95) auf der Zielzelle bindet und dadurch die Apoptose über die Caspase-Kaskade auslöst. Andererseits setzen CTL lytische Moleküle wie Perforin und Granzym frei, was ebenfalls zur Apoptose führt. Mithilfe der dritten Möglichkeit können Zielzellen, die von den zytotoxischen T-Zellen entfernt liegen, ohne direkten Zell-Zell-Kontakt getötet werden. Dafür werden Zytokine wie IFN- γ sezerniert. IFN- γ führt neben der Aktivierung von Makrophagen und Induktion der Bildung von MHC-Klasse-II-Komplexen zu einer Erhöhung der Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen, wodurch die Antigenpräsentation verbessert wird (Andersen et al., 2006). CD8⁺ T-Zellen können veränderte Antigene in transformierten Zellen erkennen und somit der Entwicklung maligner Zellen vorbeugen.

Bis zu 10% der CD4-Antigen-tragenden Zellen im Blut zeigen eine erhöhte Expression der α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25), welcher auf aktivierten T-Zellen, aber konstitutiv auf regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) zu finden ist (Sakaguchi et al., 1995). Durch autoreaktive T-Zellen, die der Negativselektion im Thymus entkommen sind, besteht die Gefahr der Entwicklung von Autoimmunreaktionen, was jedoch u.a. durch diese suppressive T_{reg}-Zellpopulation verhindert wird.

Aktivierende und inhibitorische Mechanismen in T-Zellen

Zur kompletten Aktivierung von T-Zellen werden kostimulatorische Moleküle benötigt, die über Liganden oder Rezeptoren auf APCs T-Zellen stimulieren. Die Interaktion von CD40 auf den T-Zellen mit dessen Liganden auf APCs, CD40L, oder von CD28 auf den T-Zellen mit Liganden der B7 Familie auf APCs, CD80 bzw. CD86, führt schließlich zu Zellproliferation, Zytokinausschüttung, zytotoxischer Funktion, Differenzierung, Gedächtnisausbildung sowie Überleben.

Neben den kostimulatorischen Molekülen gibt es jedoch Moleküle, die eine hemmende Wirkung auf die T-Zellen entfalten und zu den Checkpoint-Molekülen zählen. CTLA4 wird durch die T-Zell-Aktivierung induziert und konkurriert mit CD28 um die Bindung an CD80 und

CD86. Diese Interaktion führt zur Ausbildung von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) in APCs, wodurch konventionelle T-Zellen supprimiert werden und die Entwicklung von T_{reg} angeregt wird. Weiterhin kann *programmed death-ligand 1* (PD-L1) auf APCs den PD-1 Rezeptor auf T-Zellen binden, was neben einer Hemmung der T-Zell-Effektorfunktion zu T-Zell-Anergie und Apoptose führt (Chen and Flies, 2013). Auf diese Mechanismen wird in Kapitel 1.3 noch detailliert eingegangen.

1.2.2 Die Rolle von T-Zellen im Pankreaskarzinom

Clark et al. haben 2009 beschrieben, dass das Pankreaskarzinom durch erworbene Mechanismen die Funktionen der Immunzellen eindämmt, dadurch der Überwachung durch das Immunsystem entkommen kann und somit ein uneingeschränktes Tumorwachstum gefördert wird (Clark et al., 2009). Studien an bestimmten Mausmodellen lassen vermuten, dass immunsuppressive Zelltypen die Bauchspeicheldrüse zu einem relativ frühen Zeitpunkt der Tumorentstehung infiltrieren, wodurch potentiell tumorizide Lymphozytenpopulationen ausgeschaltet werden. Demnach hat es den Anschein, als ob der Grundstein für das Versagen der Immunüberwachung bei der Entstehung des Pankreaskarzinoms sehr früh gelegt wird (Clark et al., 2007).

Während der Entwicklung der Vorläuferläsionen bis hin zum Pankreaskarzinom können bereits Infiltrate mit $CD45^+$ Leukozytenpopulationen nachgewiesen werden. Leukozyten mit immunsuppressiven Eigenschaften, wie myeloide Suppressorzellen (*myeloid-derived suppressor cells*; MDSCs), tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) oder T_{reg} infiltrieren das Stroma und ermöglichen Tumorwachstum (Clark et al., 2007, Vonderheide and Bayne, 2013). Sowohl in PanINs als auch im Pankreaskarzinom ist nur eine gering ausgeprägte Infiltration mit inaktiven Effektor-T-Zellen zu beobachten, wobei ungeklärt bleibt, ob es sich dabei um naive oder um supprimierte T-Zellen handelt (Clark et al., 2007). 2013 haben Vonderheide et al. die „4 I“ Hypothese zur Immunevasion der T-Zellen aufgestellt: Induktion, Inflammation, Immunsuppression und Immunprivileg (Vonderheide and Bayne, 2013): Induktion der Tumorentstehung durch mutierte Onkogene oder Tumorsuppressorgene wie K_{RAS} oder p53, Inflammation als Folge von Mutationen, wodurch lösliche Botenstoffe aus den PanINs sezerniert werden und eine lokale Entzündungsreaktion entsteht, und Immunsuppression durch infiltrierte Zellen mit immunsuppressiven Eigenschaften (TAMs, MDSCs, T_{regs}), mit dem Ziel, die zuvor entstandene Entzündung durch Ausschüttung von immunsuppressiven Zytokinen wie TGF- β einzudämmen. Zu guter Letzt resultiert daraus das Immunprivileg und die Manifestation des Pankreaskarzinoms, da Vorläuferläsionen weiterhin die Fähigkeit besitzen sich der Eliminierung durch das Immunsystem aufgrund von tumor- und immunvermittelten Suppressionsmechanismen zu entziehen.

1.2.3 Die Immuntherapie des Pankreaskarzinom

Aufgrund fehlender zuverlässiger Früherkennungsmöglichkeiten von präkanzerösen Neoplasien wird das Pankreaskarzinom meist erst im fortgeschrittenen, metastasierten Stadium diagnostiziert und es kann nur bei wenigen Patienten eine chirurgische Resektion des Tumors angestrebt werden (Conroy et al., 2011, Von Hoff et al., 2013). Die durchschnittliche Überlebensrate bleibt jedoch für die alleinige systemische Chemotherapie im metastasierten Stadium (7 - 11 Monate) sowie der adjuvanten Chemotherapie bei resezierten Tumoren (24 Monate) ernüchternd (Neoptolemos et al., 2004, Oettle et al., 2013), weshalb dringend neue Therapieansätze notwendig sind. Die Immuntherapie hat das Ziel, körpereigene Effektorzellen, die durch den Tumor inaktiviert werden, zu aktivieren, um schließlich Krebszellen zu erkennen und zu bekämpfen. Dafür wurden von Chen und Mellman im Jahre 2013 die sieben Schritte des „Cancer Immunity-Cycle“ beschrieben: Im ersten Schritt werden Tumorantigene freigesetzt und von DCs aufgenommen und prozessiert. Danach präsentieren DCs die gebundenen Antigene über den MHC-I- oder MHC-II-Komplex den T-Zellen, wodurch letztere schließlich aktiviert werden. Im vierten und fünften Schritt gelangen zytotoxische T-Zellen (CTLs) zum Tumor und infiltrieren ihn anschließend. CTLs erkennen folglich die Krebszellen und bilden Zellkontakte aus, wodurch sie getötet werden und durch die Freisetzung neuer Antigene der Zyklus von vorne beginnen kann (Chen and Mellman, 2013). Zur Immuntherapie des Pankreaskarzinoms gibt es diverse Ansätze: Gezielte Makrophagen-Therapie, Immuncheckpoint-Inhibitoren, Impfungen und den adoptiven T-Zell-Transfer. Die zielgerichtete Makrophagen-Therapie besteht einerseits in der Aktivierung von CD40, einem Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie, dessen Stimulation zu einer verstärkten antitumoralen Immunantwort führt (Beatty et al., 2011). Der zweite Ansatz basiert auf der Suppression tumorassoziierter Makrophagen (TAMs) durch C-X-C Chemokinrezeptor 2 (CXCR2)-Antagonisten, was zu einer tumoriziden Polarisierung der Makrophagen führen soll.

Einer der ersten eingesetzten Immuncheckpoint-Inhibitoren gegen das Pankreaskarzinom war ein anti-CTLA 4 Antikörper (Brunet et al., 1987). CTLA-4 gehört zu der Familie der CD28-Rezeptoren und bindet an CD80 und CD86. Es besitzt eine höhere Affinität als CD28, weshalb eine verminderte Aktivierung und somit Suppression von Effektor-T-Zellen resultiert. Des Weiteren führt CTLA-4 zu einer erhöhten Produktion von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) (Blank and Enk, 2015, Schneider et al., 2006). Ipilimumab ist ein blockierender CTLA-4-Antikörper, der bereits in klinischen Studien bei Patienten mit Pankreaskarzinom eingesetzt wurde und in Kombination mit der GVAX-Impfung in einem kleinen Kollektiv zu einem verbesserten Gesamtüberleben führte (Le et al., 2013). PD-1-Antikörper wie Nivolumab oder Pembrolizumab zeigten im malignen Melanom oder Nierenzellkarzinom große Erfolge, welche im Pankreaskarzinom jedoch ausblieben (Brahmer et al., 2012).

Einen großen Teil der bisherigen Immuntherapieansätze gegen das Pankreaskarzinom bilden die therapeutischen Impfungen. Hier unterscheidet man zwischen Impfungen mit vollständigen Tumorzellen (*whole-cell vaccines*, z.B. GVAX) und Impfungen, die nur auf einzelnen Antigenfragmenten von Tumorzellen basieren (*peptide vaccines*, z.B. GV1001). Ein weiterer Ansatz ist die DC-basierte Vakzinierung. DCs können mit synthetischen Peptiden bekannter Tumorzellen beladen, mit kompletter Tumor-RNA oder -DNA transfiziert bzw. direkt durch an DC-Antikörper gekoppelte Tumorantigene *in vivo* stimuliert werden (Palucka and Banchereau, 2013).

Ein weiterer attraktiver Ansatzpunkt der Immuntherapie des Pankreaskarzinoms ist der adoptive T-Zell-Transfer (ACT). Dabei werden autologe T-Zellen des Patienten (genetisch) manipuliert, expandiert und anschließend wieder reinfundiert. Dadurch soll die Tumorselektivität erhöht und der Erfolg einer Therapie verbessert werden. Weiterhin nimmt die *chimeric antigen receptor* (CAR)-T-Zell-Therapie immens an Bedeutung zu. CARs sind gentechnologisch hergestellte Rezeptoren auf T-Zellen, die gegen krebspezifische Oberflächenproteine gerichtet sind. Die Immunzellen werden somit künstlich auf die Erkennung von Krebszellen zugeschnitten. Das Besondere daran ist, dass die T-Zellen, analog zu Antikörpern, die Antigene in ihrer nativen Form erkennen und nicht auf das entsprechende MHC-Epitop angewiesen sind (Dodson et al., 2011).

1.3 Mechanismen der Immunsuppression im Pankreaskarzinom

Das immunsuppressive Milieu des PDAC entsteht durch die Tumorzellen selbst sowie durch die Mikroumgebung des Tumors. Einige der dafür verantwortlichen zellulären sowie molekularen Mechanismen sollen in den folgenden Abschnitten erläutert werden.

1.3.1 Zelluläre Mechanismen

Diverse myeloide und lymphoide Immunzellpopulationen tragen dazu bei, dass der Tumor der Immunüberwachung entrinnt. Des Weiteren spielen Stromazellen im Tumorgewebe eine entscheidende Rolle in der Immunsuppression.

Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs)

Die zahlenmäßig bedeutendste Leukozytenuntergruppe im Stroma des Pankreaskarzinoms bilden die TAMs, die unter anderem anhand der Oberflächenmarker CD11b und F4/80 (Maus) zu identifizieren sind und sich bereits in Präkanzerosen um neugebildete duktale Strukturen

ansiedeln. Durch die Produktion des Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), von Sauerstoffradikalen oder indem sie T_{regs} an den Tumor locken, hemmen TAMs die antitumorale T-Zell-Antwort (Bronte et al., 2003, Woo et al., 2001). Weiterhin sind TAMs am Remodeling der Matrix beteiligt und ermöglichen somit die Tumordinvasion. Zu beachten ist ferner die Stimulation der Tumervaskularisation durch die Bildung von *vascular epidermal growth factor* (VEGF), wodurch im nächsten Schritt die hämatogene Metastasierung ermöglicht wird (Condeelis and Pollard, 2006, Wyckoff et al., 2004).

Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs)

Weitere immunsuppressive myeloische Zellpopulationen stellen die MDSCs dar. Sie akkumulieren nicht nur in den erkrankten Bauchspeicheldrüsen sondern auch systemisch im Knochenmark, Blut und lymphatischem Gewebe. MDSCs exprimieren auf ihrer Oberfläche neben CD11b den Marker Gr-1 und werden durch zirkulierendes GM-CSF, G-CSF oder VEGF zum Tumor gelockt (Bronte et al., 2003, Melani et al., 2003). Man kann in der Maus zwei Haupttypen von MDSCs unterscheiden, $Ly6G^+$ granulozytäre PMN-MDSCs und $Ly6C^+$ monozytäre M-MDSCs. Auch beim Menschen werden diese Subtypen unterschieden, wobei hier das Expressionsmuster der Oberflächenmarker komplexer ist. MDSCs können T-Zellen auf verschiedenste Art inhibieren. Zum einen hemmen sie eine Antigen-spezifische T-Zell-Antwort, was zum Erliegen der Proliferation, Zytokinproduktion und deren zytotoxischen Funktion führt (Gabilovich et al., 2001). Zum anderen wird die zeta (ζ)-Kette des T-Zell-Rezeptors in Anwesenheit von MDSCs herunterreguliert und die Differenzierung von T_{reg} gefördert (Huang et al., 2006, Otsuji et al., 1996). MDSCs sind in der Lage, das Tumormilieu aufzuspüren, sodass sie auch in Metastasen außerhalb des Primarius zu finden sind. Aufgrund der Tatsache, dass die MDSCs innerhalb des Tumormilieus im Vergleich zu den CTLs umgekehrt proportional auftreten, kommt man zu der Annahme, dass MDSCs einen negativen Einfluss auf Migration bzw. Überleben von T-Zellen innerhalb des Tumors haben (Clark et al., 2009).

Regulatorische T-Zellen (T_{reg})

T_{reg} konnten bisher meist in fortgeschrittenen Stadien des PDAC nachgewiesen werden, mittlerweile weiß man jedoch, dass die Infiltration des Tumors mit T_{regs} bereits in sehr frühen, präinvasiven Stadien geschieht (Clark et al., 2009, Sakaguchi et al., 2001). Tumor-assoziierte T_{regs} können die IFN- γ - und IL-2-Produktion sowie die zytotoxische Funktion der T-Zellen hemmen. Eine Infiltration des Tumors mit T_{reg} korreliert mit vermindertem Überleben (Curiel et al., 2004).

Tumormikromilieu

Ein wichtiger Aspekt der Tumorimmunevasion des Pankreaskarzinoms ist sein desmoplastisches Tumorgewebe. Unter einer Desmoplasie versteht man die Vermehrung von fibrösem Bindegewebe, welche im Pankreaskarzinom eine Resistenz des Tumors auch gegenüber Chemotherapeutika begünstigt (Mahadevan and Von Hoff, 2007). Das Pankreaskarzinom zählt zu einer der stromareichsten Krebserkrankungen. Das Stroma besteht aus zellulären und azellulären Bestandteilen wie Fibroblasten, Myofibroblasten, Immunzellen, Sternzellen, Blutgefäßen, extrazellulärer Matrix (ECM) und löslichen Faktoren wie Zytokinen oder Wachstumsfaktoren. Die Zusammensetzung des Tumormikromilieus ändert sich ständig, insbesondere beim Übergang von den PanINs zum invasiven duktalem Adenokarzinom (Feig et al., 2012).

Eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der Desmoplasie spielen die pankreatischen Sternzellen. Während der Ausbildung des Pankreaskarzinoms läuft eine akute, später chronische Entzündungsreaktion ab, wodurch die Sternzellen aktiviert werden. Dadurch verändert sich ihre Morphologie, sie verlieren ihre zuvor generierten Vitamin-A-Speicher und beginnen *transforming growth factor β* (TGF- β) sowie *platelet derived growth factor* (PDGF) zu sezernieren. Diese Faktoren bewirken über eine Regulation der Transkription eine verstärkte Synthese der extrazellulären Matrix (ECM) (Yen et al., 2002). Man geht davon aus, dass die Zunahme der ECM eine vaskuläre sowie lymphatische Dysfunktion bewirkt. Durch Kompression der Blutgefäße kann kein ausreichender Perfusionsdruck im Tumorgewebe aufgebaut werden, sodass intravenös verabreichte Chemotherapeutika nicht an den Zielort gelangen, um ihre Wirkung zu entfalten. Des Weiteren fungiert das vermehrt gebildete Stroma auch als mechanische Barriere und stellt somit eine Barriere für Immunzellen dar (Provenzano et al., 2012, Whatcott et al., 2015).

1.3.2 Molekulare Mechanismen

Neben den zellulären Mechanismen unterliegt die Transformation und die Progression des Pankreaskarzinoms einer Reihe von Immuncheckpunkten, welche im Folgenden auf die wichtigsten Vertreter näher erläutert werden.

Galectin-1

Pankreastumorzellen produzieren diverse immunsuppressive Proteine, unter anderem auch Galectine. Galectine stellen eine Gruppe von 15 verschiedenen Proteinen dar, die an gewisse Kohlenhydratreste binden können und so an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind. Tang

et al. haben für Galectin-1 gezeigt, dass aktivierte pankreatische Sternzellen eine hohe Expression von Galectin-1 aufweisen. Galectin-1 induziert Apoptose in CD3⁺ T-Zellen und führt zu einer Verschiebung des Zytokin-Gleichgewichts in Richtung T_H2 (Tang et al., 2012). Somit resultieren erhöhte Level der Zytokine IL-4 oder IL-5 und erniedrigte Level an IFN- γ , IL-2 und IL-17, wodurch T-Effektorzellen gehemmt und regulatorische T-Zellen unterstützt werden. Galectin-1 fördert die Ausbreitung von T_{reg}, die Neubildung von Gefäßen und hemmt die Invasion von Effektor-T-Zellen in den Tumor (Cedeno-Laurent and Dimitroff, 2012).

Transforming growth factor- β (TGF- β)

Erhöhte TGF- β Level wurden bereits für mehrere Tumorentitäten, wie Lunge, Brust oder Bauchspeicheldrüse, beschrieben (Bierie and Moses, 2006) und umfasst drei Isoformen. TGF- β ₁ zirkuliert im Blut und ist die am schnellsten induzierbare Isoform. TGF- β ₂ spielt bei der Embryonalentwicklung eine entscheidende Rolle, wohingegen TGF- β ₃ an der Regulation von Zelladhäsion und Ausbildung von ECM des Gaumens beteiligt ist. Die verstärkte Expression von TGF- β korreliert mit dem Fortschreiten der Tumorerkrankung sowie der Ausbildung von Metastasen (Bierie and Moses, 2006). Außerdem korrelieren hohe Spiegel an TGF- β mit aggressivem und invasivem Tumorwachstum. Zudem aktiviert TGF- β pankreatische Sternzellen und trägt somit zur Desmoplasie bei. In Kombination mit IL-2 führt TGF- β zur Differenzierung von T_{reg}, welche wiederum selbst TGF- β produzieren und schließlich Effektor-T-Zellen hemmen (Rubtsov and Rudensky, 2007). TGF- β wird von vielen Zellen, wie beispielsweise Thrombozyten, Lymphozyten, Makrophagen oder Tumorzellen sezerniert und ermöglicht durch die Eindämmung der antitumoralen Immunantwort ein voranschreitendes Tumorwachstum. Des Weiteren hemmt TGF- β die Funktion von zytotoxischen T-Zellen, indem beispielsweise die Expression von *pore-forming protein* (PFP), einem wichtigen zytolytischen Molekül, oder die Produktion von IFN- γ und TNF- α unterdrückt wird, was wiederum die T-Zell-Proliferation hemmt.

Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO)

Das im Zytoplasma gelegene Enzym IDO degradiert die essenzielle Aminosäure Tryptophan zu Kynureninen und katalysiert damit den ersten und limitierenden Schritt der *de novo* Biosynthese des zentralen metabolischen Coenzym Nicotinamidadenindinukleotid (NAD) (Hayaishi, 1976, Muller and Prendergast, 2007). Es gibt zwei eng verknüpfte, homologe Gene (IDO1 und IDO2), die beide sowohl beim Menschen als auch bei der Maus auf Chromosom 8 lokalisiert sind. IDO2 besitzt im Vergleich zu IDO1 eine weitaus geringere Affinität zu Tryptophan und spielt möglicherweise in der Regulation von IDO1 eine Rolle. Die beiden Gene besitzen einen durch

IFN- γ induzierbaren Promoter, welcher in APCs wie Makrophagen und DCs, sowie Epithel- und Endothelzellen zu einer starken Hochregulation der Genexpression führt (Johnson et al., 2009). Kürzlich wurde IDO in B-Zellen nachgewiesen, dessen Einfluss zu einem regulatorischen B-Zell-Phänotyp führt (Nouel et al., 2015). Neben IFN- γ können TGF- β oder IL-6 IDO induzieren (Belladonna et al., 2008, Fallarino et al., 2012, Litzenburger et al., 2014). Die ursprünglich identifizierte und physiologische Funktion von IDO wurde als pränataler Mechanismus zum Schutz des Fetus vor dem mütterlichen Immunsystem beschrieben.

DCs werden über die Interaktion zwischen CTLA-4 und B7 Molekülen dazu angeregt, IDO zu produzieren (Fallarino et al., 2003, Munn et al., 2002). In Tumoren finden sich IDO⁺ plasmazytoide DCs, die den Tumor von der Immunabwehr abschirmen, indem sie T-Zell-Funktionen vor Ort hemmen. So führt aktives IDO in pDCs zur *de novo* Differenzierung von T_{reg} aus naïven CD4⁺ T-Zellen. Die immunsuppressive Wirkung von IDO basiert großteils auf der Depletion der essenziellen Aminosäure Tryptophan (Abb. 1). Neben den Isoenzymen IDO1 und IDO2 existiert ein drittes Enzym, Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO), welches den Abbau von Tryptophan zu Kynurenin katalysieren kann. Der Tryptophanmangel führt zu einer Hemmung des Tryptophan-Suffizienz-Signals, wodurch die aminosäuresensitive Glukokinase 1 (GLK1) blockiert wird und schließlich zur Hemmung von *mammalian target of rapamycin* (mTOR) und Proteinkinase C (PKC) führt. mTOR überwacht als Hauptsensor den Status der Aminosäuren, während PKC an der Regulation und Aktivierung des T-Zell-Rezeptors beteiligt ist (Chuang et al., 2011, Metz et al., 2012). Auf der anderen Seite führt der Verbrauch von Tryptophan zur Aktivierung eines Tryptophan-Defizienz-Signals, welches eine Anhäufung von unbeladener tRNA zur Folge hat. Dies führt zur Aktivierung der Stresskinase *general control nonderepressible 2* (GCN2). GCN2 wiederum hemmt durch Phosphorylierung des Translations-Initiationsfaktors EIF2 α die Translation in T-Zellen, was letztlich in T-Zell Anergie und Apoptose resultiert (Munn et al., 2005). In einem dritten Signalweg beeinflusst die IDO Aktivität die Kynurenin-Arylhydrocarbonrezeptor (AHR)-Signalkaskade. Kynurenin, Abbauprodukt des Tryptophans, bindet an den AHR und induziert damit die Expression von AHR-Zielgenen, wie TIPARP, AHRR oder CYP1A1, welche die Ausbildung eines immunsuppressiven Milieus fördern (Opitz et al., 2011, Stevens et al., 2009).

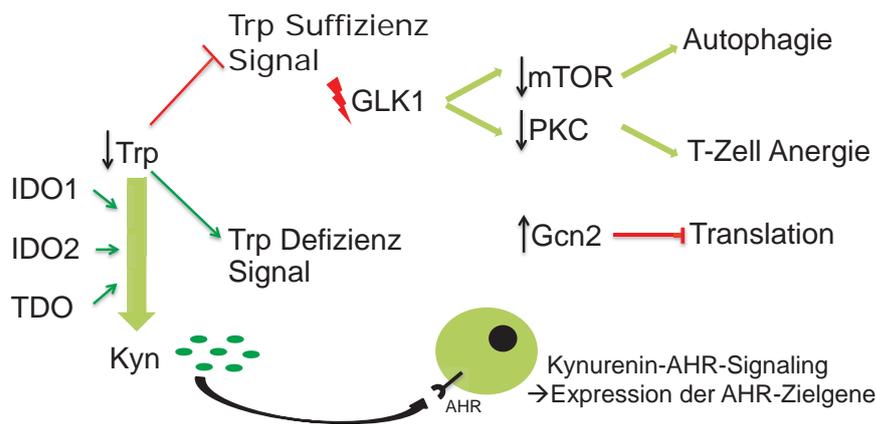


Abb. 1 Schematische Darstellung des Einflusses des Tryptophanmetabolismus auf die Funktion der T-Zellen.

Das Zusammenspiel aus Tryptophandepletion und erhöhten Mengen an Kynureninen führt zum Zellzyklusarrest, Apoptose und Anergie von T-Zellen. Folglich hemmt IDO sowohl die klonale Expansion von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen als auch die Reifung von zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen, während T_H2 -Zellen nahezu unbeeinflusst bleiben (Fallarino et al., 2002). Neben dem Tryptophanstoffwechsel als entscheidenden Faktor in der T-Zell-Hemmung besteht zudem die Theorie eines negativen Feedback-Mechanismus in T-Zellen: Aktivierte T-Zellen setzen $IFN-\gamma$ frei, was zur IDO-Induktion in APCs führt. Somit induziert dieses Zellsystem seine eigene Suppression (Grohmann et al., 2003). Witkiewicz et al. haben gezeigt, dass im Zytoplasma von gut differenzierten Pankreaskarzinomen, Lymphknotenmetastasen und humanen Pankreaskrebszelllinien - jedoch nicht im normalen Pankreasgewebe - IDO exprimiert wird. Mittlerweile wurde auch beschrieben, dass die Aggressivität von IPMNs, eine der drei Vorläuferstufen des duktaalen Adenokarzinoms des Pankreas, signifikant mit der Anzahl an T_{regs} und IDO-exprimierenden Zellen im Pankreas korreliert (Ikemoto et al., 2013).

Es wurde gezeigt, dass IDO in mehreren Krebsarten, wie dem hepatozellulären Karzinom und Mammakarzinom, überexprimiert wird und mit einer schlechten Prognose korreliert (Bi et al., 2014, Pan et al., 2008). Die Rolle von IDO im PDAC ist bisher noch nicht bis ins Detail analysiert, jedoch wurde bereits von Zhang et al. IDO in humanen Pankreaskrebszelllinien nachgewiesen (Zhang et al., 2017).

IDO-Inhibitoren und klinische Studien

Bislang wurden verschiedene Arzneistoffe entwickelt, um gezielt die immunsuppressiven Wirkungen von IDO einzudämmen. Von diesen IDO-Inhibitoren gehören Epcadostat

(INCB024360), Indoximod (D-1-MT), Navoximod (GDC-0919) und BMS 986-205 zu den fortgeschrittensten in der klinischen Entwicklung. Epacadostat, Navoximod und BMS 986-205 sind allesamt direkte IDO-Inhibitoren. Epacadostat ist ein Tryptophan-kompetitiver Inhibitor von IDO, welcher spezifisch für IDO1 ist und nur minimal IDO2 und TDO hemmt. In präklinischen Studien konnte Epacadostat bis zu 90% der Kynurenin-Level eindämmen und Tumorwachstum in immunkompetenten jedoch nicht immunkompromittierten Mäusen verringern. Epacadostat benötigt somit ein intaktes Immunsystem, um seine Wirkung entfalten zu können (Prendergast et al., 2018). Navoximod ist ein nicht-kompetitiver Tryptophan-Inhibitor mit einer stärkeren Aktivität gegen TDO als Epacadostat und BMS 986-205. Unter Navoximod konnten 50% geringere Kynurenin-Plasmalevel in Mäusen und 30% niedrigere in Menschen in Phase-1-Studien gezeigt werden (Prendergast et al., 2018) (NCT02048709). BMS 986-205 ist ein irreversibler IDO-Inhibitor, der wie Epacadostat hauptsächlich IDO1-spezifisch wirkt, und in Phase-1-Studien ebenfalls die Kynurenin-Plasmaspiegel signifikant verringerte.

Indoximod wirkt im Gegensatz zu den vorher genannten IDO-Inhibitoren indirekt auf die Signalkaskaden, an denen IDO beteiligt ist, indem die Funktion des mTORC1-Proteinkomplexes, der eigentlich durch Tryptophanmangel gehemmt wird, aufrechterhalten wird. In präklinischen Studien wurde gezeigt, dass Indoximod das Tumorwachstum hinauszögern jedoch nicht aufhalten konnte. In Kombination mit zytotoxischer Chemotherapie konnte jedoch teilweise Tumorregress beobachtet werden, wohingegen chemotherapeutische Monotherapien keinen Effekt zeigten (Muller et al., 2005). Die Auswirkungen einer IDO-Monotherapie mit Epacadostat wurden in einer Phase 1 Studie mit 52 Patienten mit therapierefraktären Malignomen (Kolonkarzinom, Melanom, Nierenzellkarzinom) untersucht. Hauptsächliche Nebenwirkungen waren Müdigkeit (69%), Übelkeit (65%), Appetitlosigkeit (54%) und Erbrechen (42%) in allen Stadien der Tumorerkrankung. Das beste Outcome hatten 14% der Patienten mit einer 16-wöchigen *stable disease*. Die gemessenen Kynurenin-Plasmalevel waren deutlich reduziert (Beatty et al., 2017).

2016 evaluierten Soliman et al. Indoximod als Monotherapie in einer klinischen Phase 1 Studie. In die Studie eingeschlossen waren hauptsächlich Sarkome, NSCLC, Kolonkarzinome und Melanome. Die häufigsten Nebenwirkungen in allen Stadien waren Müdigkeit (56%), Anämie (37%), Anorexie (37%), Dyspnoe (35%), Husten (33%) und Übelkeit (29%). Das beste Ansprechen zeigten fünf Patienten mit einer länger als sechs Monate andauernden *stable disease*. Interessanterweise hatte Indoximod unabhängig von der angewandten Dosis keinen signifikanten Einfluss auf die Kynurenin-Tryptophan-Ratios (Soliman, et al. 2016). In einer Phase II Studie (NCT0207781) wurden Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom mit Gemcitabin-Nab-Paclitaxel kombiniert mit Indoximod therapiert. Aus den 104 eingeschlossenen

Patienten ergab sich eine Ansprechrate von 46% und eine medianes Gesamtüberleben von 10,9 Monaten. Die Therapie wurde insgesamt gut vertragen, die häufigsten Nebenwirkungen waren Müdigkeit, Übelkeit und Anämie. Die Studie hat ihren primären Endpunkt (30% Reduktion des *hazard ratio*) nicht erreicht. Kombinationstherapien aus IDO- und Checkpointinhibitoren zeigen Potential. In den ECHO Studien (Epacadostat Clinical Development in Hematology and Oncology) wurden Patienten mit verschiedensten Malignomen (Kolonkarzinom, Magenkarzinom, Bronchialkarzinom, hepatozelluläres Karzinom, Ovarialkarzinom, Nierenzellkarzinom, Brustkrebs) mit einer kombinierten Therapie aus Epacadostat plus Checkpointinhibitoren therapiert (NCT02178722). Diese Kombination wurde insgesamt gut vertragen, die häufigsten Nebenwirkungen waren Müdigkeit (36%), Ekzem (36%) und Übelkeit (15%). Die Gesamtansprechrate lag zwischen 8% (Ovarialkarzinom) und 47% (Nierenzellkarzinom). Weitere Studien zur Behandlung solider Tumore mit einer kombinierten Therapie aus IDO- und Checkpointinhibitor sind Gegenstand der aktuellen Entwicklung.

1.4. Fragestellung

Das Adenokarzinom des Pankreas ist ein aggressiver Tumor mit ausgeprägtem immunsuppressivem Tumormilieu, was mit einer infausten Prognose einhergeht. IDO spielt eine entscheidende Rolle in der tumorinduzierten Immunsuppression. Wegen seiner zentralen Funktion in der Immunregulation werden bereits einige klinische Studien zur IDO-Inhibition mit sog. *small molecules* durchgeführt.

Bis heute konzentrieren sich wissenschaftliche Untersuchungen auf die Expression von IDO in myeloiden Zellpopulationen, insbesondere APCs, sowie Tumorzellen. Die Expression und Funktion von IDO wurde bisher für Epithelzellen und APCs gezeigt. Zuletzt sind B-Zellen hinzugekommen, die über die TGF- β /IDO-Achse die T-Zell-Proliferation beeinflussen. Vorversuche unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die Hemmung der T-Zell-Proliferation nach Inkubation mit Tumorzellkulturüberständen durch IDO-Inhibitoren aufgehoben werden konnte (Adunka, 2014). Dieses Ergebnis veranlasste uns zu einer neuen Hypothese, nämlich dass T-Zellen wohlmöglich selbst IDO exprimieren können, was einen negativen *feedback loop* zur Folge hätte. Vom Tumor sezernierte Faktoren, wie TGF- β , könnten in T-Zellen IDO induzieren, was letztlich über die Depletion von Tryptophan sowie den Kynurenin-AHR-Signalweg zu T-Zell Suizid im Tumor führt. Auch benachbarte T-Zellen könnten über diesen Mechanismus getroffen werden (Abb. 2).

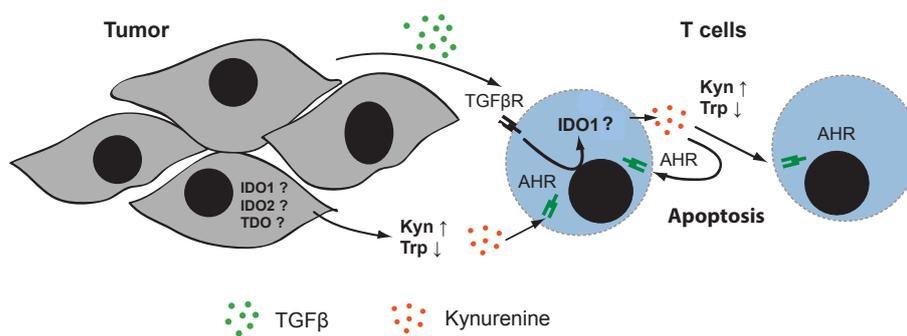


Abb. 2 Schematische Darstellung der TGF- β -IDO-Achse und des Kynurenin-AHR-Signalwegs

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es folgende Punkte zu untersuchen:

1. In ausgewählten murinen und humanen Pankreastumorzelllinien soll die Expression und Regulation von IDO-1/2, sowie der Kynurenin-AHR-Signalweg analysiert werden.
2. Charakterisierung der TGF- β -IDO-Achse in murinen und humanen T-Zellen.
3. Nachweis der enzymatischen Aktivität und Funktion von IDO in murinen und humanen T-Zellen.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Reagenzien

2.1.1 Technische Ausstattung

Blotting System	Bio-Rad, Deutschland
ELISA Reader (Mithras LB940)	Berthold Technologies, Deutschland
FACSCanto II	BD Bioscience, Deutschland
Lightcycler® 480 II	Roche, Deutschland
Mikroskop Axiovert25 and Axiovert200M	Zeiss, Deutschland
NanoDrop® 2000c Spectrophotometer	Thermo Scientific, Deutschland
pH-Meter	WTW, Deutschland
Thermocycler T3	Biometra, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf, Deutschland
Waage CPA 1003S	Sartorius AG, Deutschland
<i>Western blot</i> Auslesegerät (LAS4000 mini)	FujiFilm, Deutschland
Zentrifuge (Multifuge 3L-R)	Thermo Scientific, Deutschland
Zentrifuge (5424 and 5415R)	Eppendorf, Deutschland
Nitrocellulose Membran (AmershamTM-HybondTM-ECL)	GE Healthcare, Deutschland

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Pufferlösungen

Antisedan	Pfizer, USA
Bio Coll Separating solution	Biochrome, Deutschland
Bovines Serum Albumin	Roth, Deutschland
Chloroform	Roth, Deutschland
CountBright™ absolute Counting Beads	life technologies, Deutschland
DC Protein Assay (Bradford)	Bio-Rad, Deutschland

Dimethylsulfoxid	Roth, Deutschland
DNase I	Roche, Deutschland
Dorbene	Pfizer, USA
Dulbecco's PBS (1x)	Lonza, Belgien
ECL	Thermo Scientific, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Deutschland
FACSFlow, FACSClean	BD Biosciences
Flumazenil	Inresa, Deutschland
Heparin-Natrium Braun 25000 I.E./5 ml	Rathipharm, Deutschland
Isofluran-CP®	CP-Pharma, Deutschland
Isopropanol	Applichem, Deutschland
KAPA PROBE FAST Universal qPCR Master Mix	peqlab, Deutschland
Kollagenase	Sigma-Aldrich, Deutschland
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Deutschland
Methanol	Merck, Deutschland
Midazolam	Ratiopharm, Deutschland
Naloxon	Inresa, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃ , 10%)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl 0.9%)	Baxter, UK
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Deutschland
Primer-probe mix, 10x konz.	Roche, Deutschland
Saponin	Sigma-Aldrich, Deutschland
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄ , 2N)	Apotheke Uni München, Deutschland
Temgesic (Buprenorphin)	RB Pharmaceuticals, UK
TMB Substrate Reagent Set	BD Bioscience, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Deutschland
Trypsin-EDTA(10x)	PAA, Österreich

Tween® 20

Roth, Deutschland

Zell-Lysepuffer (10x)

Cell Signaling Technology, USA

ELISA:

Puffer 1: 7,13g NaHCO₃

Puffer 2: 10% FBS in PBS

1,59g Na₂CO₃

1,0 L ddH₂O

Waschpuffer: 0,05% Tween20 in PBS

Titration zu pH=9,5 mit 1M NaOH

Western blot:

Laemmli Puffer (6x)

Sammelpuffer (4x, pH 6.8)

347 mM SDS

248 mM Tris

299 µM Bromphenolblau

14 mM SDS

4.7 ml Glycerol

15 µM Bromphenolblau

0.5 M Tris, pH 6.0

in Reinwasser

649 mM DTT

4.1 ml Reinwasser

Trennpuffer (4x, pH 8.8)

Laufpuffer (10x)

1.5 M Tris

248 mM Tris

14 mM SDS

1.92 M Glycin

in Reinwasser

35 mM SDS

in Reinwasser

Transferpuffer (20x)

Transferpuffer (1x)

198 mM Tris

20x Stock

2 M Glycin

10% MeOH

in Reinwasser

in Reinwasser

Blocking Puffer

5% BSA

in TBST

Waschpuffer (TBST)

165.9 mM Tris-HCl

44.5 mM Tris

1.5 M NaCl

0.5% Tween 20

Durchflusszytometrie:FACS-Azid-Puffer

2mM EDTA

2% FBS

0.1% NaN₃

in PBS

Permeabilisierungspuffer

0.5% Saponin

in PBS

Fixationspuffer

1% PFA

in PBS

T-Zell Assay:MACS Puffer

0.2% FBS

2mM EDTA

in PBS

2.1.3 Zellkulturmaterialien und –medien

β-Mercaptoethanol

Roth, Deutschland

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)

Roth, Deutschland

Dynabeads® Mouse T activator CD3/CD28

life technologies, Deutschland

Fetales Kälberserum (FBS)

life technologies, Deutschland

L-Glutamin (200 mM)

PAA, Österreich

MEM-NEAA (nicht essenzielle Aminosäuren)	life technologies, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (100 x)	PAA, Österreich
Roswell Park Memorial Institute (RPMI)	Biochrome, Deutschland 1640 Medium
Natriumpyruvat	Biochrome, Deutschland
VLE RPMI 1640 (very low endotoxin)	Biochrome, Deutschland

Plastikmaterialien für die Verwendung in der Zellkultur wurden von den Firmen BD Bioscience (Deutschland), Corning (USA), Eppendorf (Deutschland), Greiner Bio-One (Deutschland) und Sarstedt (Deutschland) erworben.

Tumorzellmedium

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

T-Zell-Medium

10% FBS
 2 mM L-Glutamin
 100 IU/ml Penicillin
 100 µg/ml Streptomycin
 1 mM Natriumpyruvat
 1% MEM-NEAA
 50 µM β-Mercaptoethanol
 in RPMI 1640

DC-Medium

10% FBS
 2 mM L-Glutamin
 100 IU/ml Penicillin
 100 µg/ml Streptomycin
 1 mM Natriumpyruvat
 1% MEM-NEAA
 50 µM β-Mercaptoethanol
 in VLE RPMI 1640

2.1.4 Zelllinien

Panc02	murines Pankreaskarzinom (chemisch induziertes Modell), freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Prof. Peter Nelson Labor (LMU München)
T110299	murines Pankreaskarzinom (genetisches Modell), freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Prof. Jens Siveke Labor (TU München)
510479	murines Pankreaskarzinom (genetisches Modell), freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Prof. Jens Siveke Labor (TU München)
Capan-2	humanes Pankreaskarzinom, freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Prof. Patrick Michl Labor (Universitätsklinikum Halle)
IMIM-PC1	humanes Pankreaskarzinom, freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Prof. Patrick Michl Labor (Universitätsklinikum Halle)
MIA-Paca-2	humanes Pankreaskarzinom, American Type Culture Collection (ATCC), USA
PANC-1	humanes Pankreaskarzinom, Cell Lines Service (CLS), Deutschland

2.1.5 Reagenziensätze

Cell Trace TM CFSE Cell Proliferation kit	life technologies, Deutschland
MACS Säulen LS columns	Miltenyi Biotech, Deutschland
MACS Pan T cell isolation kit II, murin	Miltenyi Biotech, Deutschland
MACS Pan T cell isolation kit II, human	Miltenyi Biotech, Deutschland
peqGOLD Total RNA Isolierungskit	peqlab, Deutschland
RevertAid TM First strand cDNA Synthese Kit	Thermo Scientific, USA

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Unkonjugierte Antikörper

Spezifität	Speziesreaktivität	Herkunft	Verdünnung
Anti-CD3ε	Maus	eBioscience	1:100
Anti-CD28	Maus	eBioscience	1:100
Anti-CD3ε	Mensch	eBioscience	1:100
Anti-CD28	Mensch	eBioscience	1:100

2.1.6.2 Konjugierte Antikörper für FACS

Spezifität	Wirt/Isotyp	Speziesreaktivität	Konjugat	Herkunft	Verdünnung
CD3	Hamster/IgG1	Maus	APC	BD	1:100

				Bioscience	
CD4	Ratte/IgG2a	Maus	PerCP	BioLegend	1:100
CD8a	Ratte/ IgG2a	Maus	APC-Cy7	BioLegend	1:100

2.1.6.3 Western blot Antikörper

Spezifität	Wirt/Isotyp	Speziesreaktivität	Konjugat	Herkunft
Anti-IDO	Ratte/IgG1	Maus	HRP	Biolegend
Anti-rat	Ziege/IgG	Ratte	HRP	Santa Cruz
Anti-rabbit	Ziege/ IgG	Kaninchen	HRP	Santa Cruz
Anti-IDO	Kaninchen/IgG	Mensch	HRP	abcam

2.1.7 Inhibitoren

D-1-Methyltryptophan (D-1-MT) (IDO)	Sigma-Aldrich, Deutschland
SD-208 (TGF- β RI)	TOCRIS bioscience, USA
CH 223191 (AHR-RI)	Sigma-Aldrich, Deutschland
LY 2157229 (TGF- β RI)	Cayman Chemical, Deutschland
INCB 024360 (IDO)	TOCRIS bioscience, USA

2.1.8 Rekombinante Zytokine, Proteine und *small molecules*

Interferon- γ (IFN- γ)	R&D Systems, Deutschland
Interleukin-6 (IL-6), murin/human	Peptotech, Deutschland
Kynurenin	Cayman Chemical, Deutschland
TGF- β , murin/human	R&D Systems, Deutschland

2.1.9 Primer-Sequenzen für qRT-PCR

Gen	5' \rightarrow 3'	
HPRT murin	links	GGAGCGGTAGCACCTCCT
	rechts	CTGGTTCATCATCGCTAATCAC
β -actin murin	links	CTAAGGCCAACC GGGAAAAG
	rechts	ACCAGAGGCATACAGGGACA
IDO1 murin	links	GGGCTTTGCTCTACCACATC
	rechts	AAGGACCCAGGGGCTGTAT
IDO2 murin	links	GTCCTTGGGGAGATAACCACA
	rechts	CCAAGGCTTGTAATGATCTGG
TDO murin	links	GCTTTGGACTTCAATGACTTCAG

	rechts	GCCGGAAGTGTAGACTCTGG
AHR murin	links	TGCACAAGGAGTGGACGA
	rechts	AGGAAGCTGGTCTGGGGTAT
TIPARP murin	links	TCCTGTTTCATACTGATTCCATATT
	rechts	CAGATGATTTGTGATGAAGTTGC
CYP1A1 murin	links	TCTTTTGGGAGGAAGTGGAA
	rechts	TCCATACATGGAAGGCATGA
AHRR murin	links	GGGTAAAGAGCTTCTTCCAAGC
	rechts	ACGGGGAACCCTCTGTATG
HPRT human	links	TGACCTTGATTTATTTGCATACC
	rechts	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT
IDO1 human	links	GTGTTTCACCAAATCCACGAT
	rechts	CTGATAGCTGGGGGTGC
IDO2 human	links	TGCAGCGACTGAGACTGTCTAT
	rechts	CCGGATGCCTGCATAAAA
TDO human	links	GGAGAAGAAAATGAACTGCTACTTAAA
	rechts	GGCTCTAAACCTGGAGTTCTTTC
AHR human	links	AGCCGGTGCAGAAAACAG
	rechts	CTATGCCGCTTGGGAAGGAT
TIPARP human	links	GGAAATTCTTCTGTAGGGACCA
	rechts	AATCAATCGAATGACAGACTG
CYP1A1 human	links	TCCAAGAGTCCACCCTTCC
	rechts	AAGCATGATCAGTGTAGGGATCT
AHRR human	links	TGCTTCATCTGCCGTGTG
	rechts	AGCTGCCAAGCCTGTGAC

2.1.10 Software

Adobe Creative Suite 6	Adobe Systems, USA
Endnote X7	Thomson Reuters, USA
FACSDiva	BD Bioscience, Deutschland
FlowJo 8.7	Tree Star, USA
GraphPad Prism 5.0b	GraphPad Software, USA
ImageJ	Image J Software, USA
Microsoft Office 2011	Microsoft, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Zellkulturbedingungen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37° C, einem Gasgemisch mit 5 Volumenprozent CO₂ sowie einer Luftfeuchtigkeit von 95%. Die Experimente wurden unter sterilen Bedingungen unter einer laminaren Luftströmung durchgeführt. Die Kontamination mit Mikroorganismen von Zellkulturbeständen wurde durch regelmäßige visuelle Kontrolle sowie durch Testung der Überstände auf Mykoplasmen ausgeschlossen.

Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Für die Kryokonservierung wurden die entsprechenden Zellen einmalig mit PBS gewaschen, trypsiniert und anschließend in 1ml Einfriermedium, 10% DMSO in FBS, in einem Kryoröhrchen bei -80° C eingefroren. Der Transport in flüssigen Stickstoff erfolgte 24 Stunden später. Zur Re-Kultivierung der Zellen wurden diese aus dem Stickstofftank entnommen, durch Tauchen in 37° warmem Wasser zügig aufgetaut und anschließend in Kulturmedium überführt. Nach einem Waschgang wurden die Zellen in einer sterilen Zellkulturflasche kultiviert.

Bestimmung von Zellzahl und Viabilität

Zellzahl und Viabilität wurden mittels Trypanblau-Ausschlussfärbung bestimmt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 5 µl der entsprechenden Zellsuspension mit 95 µl Trypanblau versetzt. 10 µl dieses Ansatzes dienten als repräsentative Probe und wurden anschließend unter einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellzahl errechnet sich dabei nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Anzahl der gezählten vitalen Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Gruppenquadranten}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10.000 = \text{vitale Zellen pro ml}$$

Kultivierung von Tumorzelllinien

Alle Tumorzelllinien wurden unter den genannten Zellbedingungen (2.2.1 Zellkultur) in DMEM Vollmedium in Zellkulturflaschen (T75) kultiviert.

2.2.2 *Ex vivo* Zellisolation

Versuchstiere

C57BL/6 Mäuse wurden von Janvier (St. Berthevin Cedex, France) gekauft. LSL- K_{ras}^{G12D} p53-Cre (KPC)-Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Jens Siveke der II. Medizinischen Klinik im Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München zur Verfügung gestellt. Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Experimente zwischen sechs und zehn Wochen alt. Alle Tierversuche wurden durch die Regierung von Oberbayern genehmigt und sind unter dem Aktenzeichen 55 2-1-54-2532-175-2012 registriert.

Tumorinduktion und Isolation von Zellen aus dem Tumorgewebe

Bevor die Tumorzellen subkutan injiziert wurden, wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Es wurden 5×10^5 T110299 Tumorzellen subkutan in einem Volumen von 100 μ l PBS injiziert. Das Tumorstadium wurde alle zwei Tage mit einem Messschieber gemessen. Die Mäuse wurden bei einer Tumorstadium von 100 mm², bei ulzerierten Tumoren oder bei Erreichen anderer im Tierversuchsantrag definierten Abbruchkriterien nach Isofluran-Narkose getötet. Die Tumore wurden mit einem Skalpell entfernt, mechanisch zerkleinert, in ein Falcon Röhrenchen mit Kollagenase und DNase überführt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Gewebe-Zell-Suspension weiter mit Hilfe des GentleMACS Dissoziators zerkleinert und erst durch ein 100 μ m, dann durch ein 20 μ m Nylon-Sieb gefiltert. Im Anschluss konnten spezifische Zelltypen (z.B. T-Zellen) aufgereinigt werden (s.u.).

Isolation von T-Zellen aus der Milz

Für die Isolation von murinen T-Zellen aus der Milz wurde das MACS T-Zell-Isolationskit Pan T cell kit untouched II verwendet. Das Prinzip basiert auf einer Negativselektion, indem alle Nicht-T-Zellen mit sogenannten MicroBeads markiert werden. Dabei handelt es sich um etwa 50 Nanometer große Magnetpartikel, an die Antikörper gebunden sind. Die markierten Zellen werden anschließend magnetisch entfernt. Im ersten Schritt wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt und über ein 40 μ m Nylon Sieb gegeben, um Gewebereste zu entfernen. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 400 x g zentrifugiert und anschließend mit Erythrozytenlysepuffer (5 ml, 5 Minuten bei Raumtemperatur) behandelt. Anschließend wurde ad 50 ml mit PBS aufgefüllt, um die Erylyse zu stoppen, und die Zellen für 5 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit MACS-Puffer wurden die Zellen gezählt und die Zellsuspension schließlich auf 40 μ l MACS-Puffer pro 10^7 Zellen eingestellt. Im folgenden Schritt wurden die Zellen mit 10 μ l monoklonalen Biotin-konjugiertem Antikörpercocktail pro 10^7 Zellen für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die im Kit enthaltenen Antikörper richteten sich

gegen CD11b, CD11c, CD19, CD45R (B220), CD49b (DX5), CD105, Anti-MHC Klasse II, und Anti-Ter-119. In einem zweiten Schritt wurden 20 μl pro 10^7 Zellen mit Streptavidin-konjugierten, magnetischen MicroBeads gelabelt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschrift mit MACS-Puffer wurde die Zellsuspension auf eine MACS-Säule (LS, geeignet für bis zu 10^8 Zellen) innerhalb eines magnetischen Feldes gegeben, wobei magnetisch-markierte Nicht-T-Zellen an die Säule gebunden wurden. Die unmarkierten T-Zellen wurden in der Säule nicht retiniert (Negativselektion). Die Reinheit der isolierten T-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft.

2.2.3 Immunologische Methoden

Western blot

Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit Zellysepuffer 30 Minuten lang auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Proben für zehn Minuten bei $16.000 \times g$ bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und der Proteingehalt mittels Bradford-Assay bestimmt. Die Proben wurden mit Laemmli Puffer gemischt und bei 95°C für fünf Minuten erhitzt. Die Lysate wurden, je nach Größe des jeweiligen Zielproteins, über ein 10% oder 12% SDS Gel aufgetrennt. Als Proteingrößenstandard wurden 5 μl *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific) eingesetzt. Der Gellauf betrug 90 Minuten bei konstanten 100V. Mit dem *Mini Trans-Blot® Electrophoresis Transfercell* (Biorad) wurden die Proteine mittels des Transferpuffers auf eine Nitrocellulose Membran übertragen. Der Transfer erfolgte bei 350 mA für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Geblockt wurde die Membran mit 5% BSA in TBST für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Die Primäntikörper wurden in 1% BSA und 0,05% Natriumazid in PBS verdünnt und die Membran darin bei 4°C über Nacht auf einem Rüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für je zehn Minuten mit TBST gewaschen und dann mit dem passenden Sekundäntikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Rüttler inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für je zehn Minuten mit TBST gewaschen. Ausgelesen wurde die Membran durch Zugabe des ECL Substrats (Thermo Scientific) mit dem *Western blot Analyzer LAS 4000 mini*.

Durchflusszytometrie (FACS, fluorescence-activated cell sorting)

Sowohl zellmembranständige als auch intrazelluläre Proteine wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie anhand Fluorochrome-markierter Antikörper quantitativ nachgewiesen.

Fluorochrom	Exzitationspeak (nm)	Emissionspeak (nm)	Laser FACSCanto II (nm)	Filter FACSCanto II
APC	650	660	633	660/20
APC-Cy7	650	785	633	780/60
CFSE	492	517	488	530/30
FITC	495	525	488	530/30
Pacific blue	404	455	405	450/50
PE	564	575	488	585/42
PE-Cy7	564	767	488	780/60
PerCP	482	678	488	670
PI	493	619	488	610/20

Bei der vorliegenden Arbeit wurde das Durchflusszytometer BD FACSCanto II für die Analyse verwendet, welches drei verschiedene Laser benutzt: Ein blauer Laser (488 nm, luftgekühlt, 20 mW fester Zustand), ein roter Laser (633 nm, 17 mW HeNe) und ein violetter Laser (405 nm, 30 mW fester Zustand). Es wurde darauf geachtet, dass die spektralen Emissionsüberlappungen der einzelnen Fluorochrome so gering wie möglich sind, was schließlich vor der eigentlichen Analyse mittels Kompensationsvorgängen eingestellt wurde. Für die Oberflächenfärbung wurden die Zellen in Puffer resuspendiert und schließlich bei 400 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Färbung mit den Antikörpern durchgeführt. Die optimale Verdünnung für jeden einzelnen Antikörper wurde zuvor getestet und das entsprechende Volumen somit in die Zellsuspension pipettiert. Die Proben wurden anschließend resuspendiert und für 30 Minuten bei 4°C im Dunklen inkubiert. Nachdem die Proben ein weiteres Mal mit FACS Azidpuffer gewaschen und danach in 150 µl davon resuspendiert geworden sind, waren die Proben messbereit.

Um eine intrazelluläre Färbung zu erreichen, müssen die Antikörper die Zellmembran passieren. Um dies zu erreichen, wurden die Zellen mit 200 µl einer Lösung aus 0,5% Saponin in PBS permeabilisiert und darin für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Färbeantikörper wurden nach entsprechender Verdünnung in die 0,5% Saponinlösung pipettiert und anschließend zu den Zellen gegeben. Inkubiert wurden die Zellen für 30 Minuten bei 4°C im Dunklen. Falls der Primärantikörper ungelabelt war, wurde nach einem Waschschrift mit 0,5% Saponin ein sekundärer, fluorochromgelabelter Antikörper hinzugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation wurden die Zellen mit 200 µl FACS Azidpuffer gewaschen und waren messbereit.

Falls die Zellen nicht sofort nach der Färbung analysiert werden konnten, wurden sie mit 200 µl von 1% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Dazu wurden sie für 20 Minuten bei 4°C im Dunklen inkubiert und anschließend mit 200 µl PBS gewaschen.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

RNA-Isolation

Die Isolation zytoplasmatischer RNA aus Tumorzellen wurde mit Hilfe des *peqGOLD Total RNA* Isolationskit durchgeführt. Die Proben wurden zunächst mit einem Guanidin-Thiocyanat-haltigen Puffer lysiert und homogenisiert. Im zweiten Schritt wurden die Lysate mittels spezieller DNA-bindenden Säule von DNA befreit und der Durchfluss anschließend mit gleichem Volumen 70% Ethanol gemischt. Danach wurde die Probe auf eine *RNA-bindende Säule übertragen*, an deren Membran die gesamte RNA bindet. Nach zwei Waschschritten wurde die mRNA mit 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die Konzentration der eluierten RNA wurde photometrisch per Nano Drop® bestimmt.

Die Extraktion zytoplasmatischer RNA aus 5 bis 10×10^6 Zellen T-Zellen erfolgte mit 1 ml Trizol Reagenz. Durch Zugabe von 200 µl Chloroform und Zentrifugation bei 12.000 x g für 15 Minuten wird die Suspension in eine obere, wässrige und eine untere, organische Phase aufgetrennt. Die RNA befindet sich in der wässrigen Phase und wird komplett abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die anschließende Zugabe von 100 % Isopropyl-Alkohol zur wässrigen Phase führt zur Ausfällung der RNA.

Nach weiterer Zentrifugation war am Boden des Eppendorf-Röhrchens ein RNA-Pellet sichtbar. Nach einem Waschschriff mit 75 % Ethanol und anschließender fünfminütiger Zentrifugation bei 7.500 x g wurde der Überstand abgenommen und das RNA-Pellet an der Luft getrocknet. Zuletzt wurde dies in 20 bis 40 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Nach zehnmütiger Inkubation bei 56° C folgte die photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration und Reinheit. Für sämtliche Arbeitsschritte wurden RNase-freie Materialien benutzt. Die extrahierte RNA konnte im gelösten Zustand direkt zur reversen Transkription verwendet oder in 75% Ethanol bei -80° eingefroren werden.

cDNA-Transkription

Die Transkription der cDNA wurde mit Hilfe des *RevertAID™ First strand cDNA Synthesis kit* durchgeführt. In diesem Kit wurden die reverse Transkriptase *RevertAid™ M-MuLV* für die Synthese der cDNA und der RNase Inhibitor *RiboLock™* zur Vermeidung einer RNA-Degradierung eingesetzt. Oligo(dT)18 Primer dienten der selektiven cDNA-Synthese an 3'-poly(A)-tragender RNA. 0,5 ng -5,0 µg der zuvor isolierten RNA wurden für 60 Minuten bei 42°C mit 1 µl oligo(dT)18 Primer, Nuklease-freies Wasser (Endvolumen von 12 µl), 4 µl Reaktionspuffer (5x), 1 µl RiboLock™ RNase Inhibitor (20 U/µl), 2 µl dNTP Mix (10 mM) und

1 µl RevertAid™ M-MuLV reverse Transkriptase (200 U/µl) inkubiert. Abgestoppt wurde diese Reaktion durch 5-minütiges Erhitzen auf 70°C.

Quantitative Echtzeit – Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die qRT-PCR ist eine (semi)quantitative PCR-Methode zur Bestimmung von DNA/RNA-Mengen. In der vorliegenden Arbeit wurde die sondenbasierte PCR verwendet, wofür außer den Primern auch noch Fluorochrom-markierte Sonden benötigt werden. Bei diesen Sonden handelt es sich um Oligonukleotide, welche sowohl einen Fluoreszenzreporter am einen Ende und einen Fluoreszenz-löschenden Farbstoff (Quencher) am anderen Ende besitzen. Durch die 5'→3' Aktivität der Taq-Polymerase wird die Sonde abgebaut und Fluoreszenz ermöglicht.

T-Zell-Proliferationsassay

Isolierte naive T-Zellen wurden mit Hilfe des *Cell Trace™ CFSE Cell Proliferation Kit* mit CFSE gefärbt. Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFSE) ist ein membrangängiger Farbstoff, der im inneren der Zellen durch unspezifische Proteasen in ein impermeables Produkt umgesetzt wird. Die CFSE-Färbung wird nach jeder Zellteilung auf die Tochterzellen übertragen, wobei die Intensität dementsprechend abnimmt. Isolierte T-Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 5 ml PBS resuspendiert. 2.5 µl 5 mM CFSE (Endkonzentration 2.5 µM) wurden mit 5 ml PBS gemischt und zu den T-Zellen dazugegeben. Nach vier Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Färbung mit 10% FBS in PBS (ad 50ml) abgestoppt, 5 Minuten bei 400 x g zentrifugiert und anschließend in T-Zell-Medium resuspendiert. Die T-Zellen wurden danach mit den murinen/humanen *T-activator CD3/CD28 Dynabeads®* gemischt, um die T-Zell-Proliferation zu stimulieren.

2.2.5 Versuche mit humanen Zellen

Blutentnahme und Isolation von PBMCs sowie T-Zellen

Für die venöse Blutentnahme wurden 50 ml Spritzen benutzt, in die zuvor 250 IE Heparin gegeben wurden. 10 ml Blut wurden auf 10 ml 0,9% NaCl gegeben und mit 10 ml Biocoll Lösung unterschichtet. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 1000 x g, 20° C und niedrigster Bremsstufe der Zentrifuge waren mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) als gut sichtbarer Zellring zwischen den Lösungsschichten erkennbar, welcher vorsichtig entnommen werden konnte. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift in 0,9% NaCl, wonach die Zellen in humanem T-Zell-Medium resuspendiert und unter Verwendung des MACS Kits Pan T cell untouched human, analog der murinen T-Zellisolation, aufgereinigt wurden.

2.2.6 Statistische Analyse

In der vorliegenden Arbeit sind bei einer Vielzahl an Experimenten die Werte als arithmetisches Mittel plus Standardabweichung (SD) ausgewiesen worden. Die statistische Signifikanz wurde anhand des ungepaarten t-test oder des einfaktoriellen Anova-Tests mit Bonferroni-Korrektur bestimmt. Als Maß für statistische Signifikanz wurde $p < 0,05$, $p < 0,01$ und $p < 0,001$ angenommen und mit *, ** und *** markiert. Für statistische Berechnungen wurde das Programm GraphPad Prism verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 IDO und AHR Expressionsmuster und Funktion in murinen und humanen Pankreastumorzelllinien

3.1.1 IFN- γ induziert die Expression von IDO und AHR in murinen und humanen Pankreastumorzelllinien

In dieser Arbeit wurden zunächst verschiedene murine und humane Pankreastumorzelllinien auf die Expression von IDO1, IDO2, TDO und AHR untersucht. IDO1, IDO2 und TDO katalysieren jeweils den Abbau von Tryptophan zu Kynurenin. Kynurenin ist ein physiologischer Ligand des Arylhydrocarbonrezeptors (AHR). IFN- γ ist ein bekannter Stimulus, mit dem die IDO Expression induziert werden kann (Yasui et al., 1986). Zellen der murinen Linien Panc02, T110299 und 510479 sowie der humanen Zelllinien Capan-2, MIA-Paca-2 und IMIM-PC1 wurden für 48 Stunden mit oder ohne 1000 U/ml IFN- γ kultiviert. Nach Extraktion der RNA und reverser Transkription wurde die Expression der Gene IDO1, IDO2, TDO und AHR via qRT-PCR analysiert. Ohne Stimulation mit IFN- γ zeigten alle drei murinen Zelllinien keine Expression von IDO1, IDO2 oder TDO (Abb. 3). AHR konnte basal in allen drei Zelllinien nachgewiesen werden, die höchste Expression in Panc02. Nach IFN- γ -Stimulation zeigten Panc02 eine IDO1-Expression sowie eine signifikante Erhöhung der AHR-Expression. Die T110299 zeigten ebenfalls nach Stimulation mit IFN- γ eine IDO1-Expression sowie eine gesteigerte AHR-Expression, wobei das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde. Für die 510479 ließ sich trotz IFN- γ Stimulation keine IDO-Expression nachweisen, AHR wurde durch IFN- γ nicht signifikant induziert. In den humanen Zelllinien MIA-Paca-2, IMIM-PC1 sowie Capan-2 (Abb. 4) konnte ohne Stimulation mit IFN- γ keine IDO1 oder IDO2 Expression nachgewiesen werden. TDO und AHR wurden basal in allen drei Zelllinien exprimiert, am stärksten in Capan-2. Nach Stimulation mit IFN- γ zeigten MIA-Paca-2 eine Induktion von IDO1 sowie TDO. In IMIM-PC1 wurde lediglich die AHR-Expression gesteigert (jedoch nicht signifikant), während die Expression von TDO unverändert blieb und IDO1 sowie IDO2 nicht nachgewiesen werden konnte. Capan-2 zeigten nach IFN- γ Stimulation eine geringe Expression von IDO1, sowie einen leichten AHR- und TDO-Anstieg durch IFN- γ . Interessanterweise zeigten die humanen Pankreastumorzelllinien nach Stimulation mit IFN- γ nur eine geringere Expression von IDO1 in Vergleich zu den murinen Zelllinien.

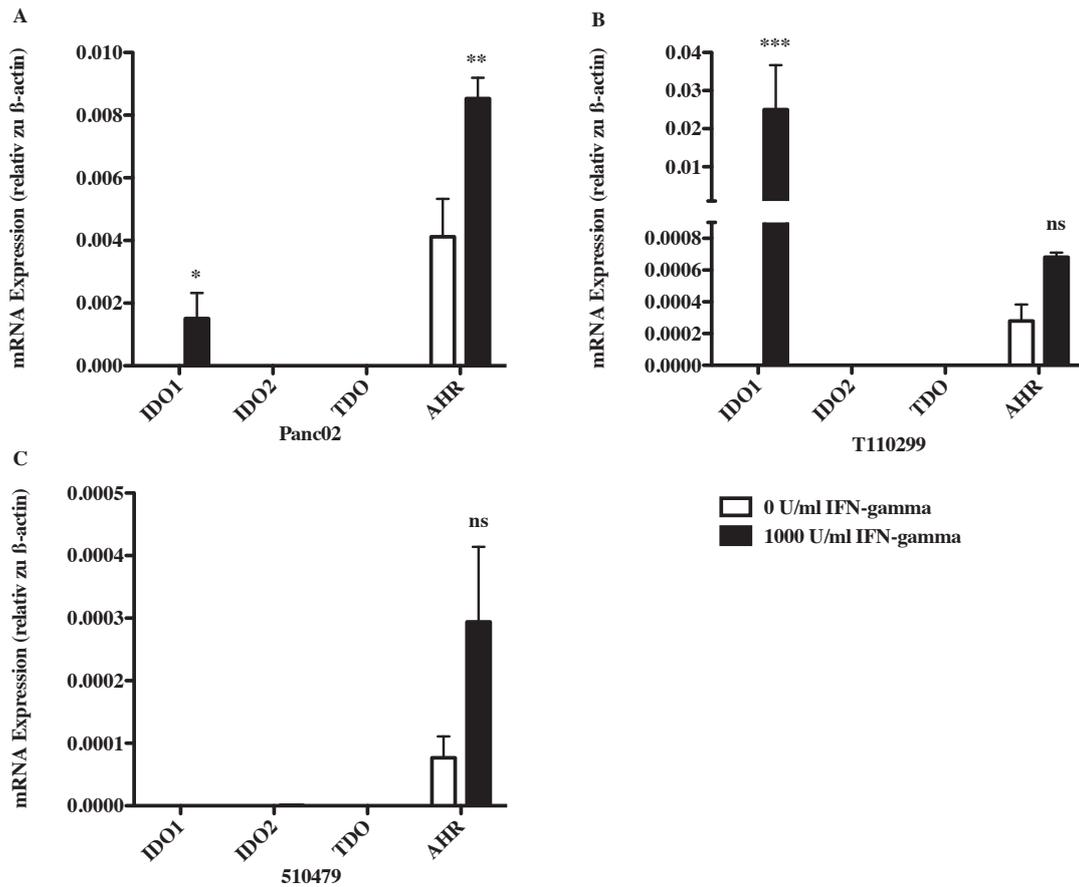


Abb. 3 Induktion von IDO1, IDO2, TDO und AHR in murinen Pankreaskarzinomzellen durch IFN- γ .

3×10^5 murine Pankreaskarzinomzellen (**A** Panc02, **B** T110299, **C** 510479) wurden für 48 h in einer 6-Well-Platte in DMEM-Vollmedium +/- 1000 U/ml IFN- γ kultiviert. RNA wurde extrahiert und mit reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Expression von IDO1-, IDO2-, TDO- sowie AHR-mRNA wurde mittels qRT-PCR bestimmt, wobei β -actin als Referenzgen diente. Angezeigt sind Daten von drei unabhängigen Experimenten mit Mittelwerten + SD. Signifikante Unterschiede wurden mittels ungepaartem t-Test analysiert. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

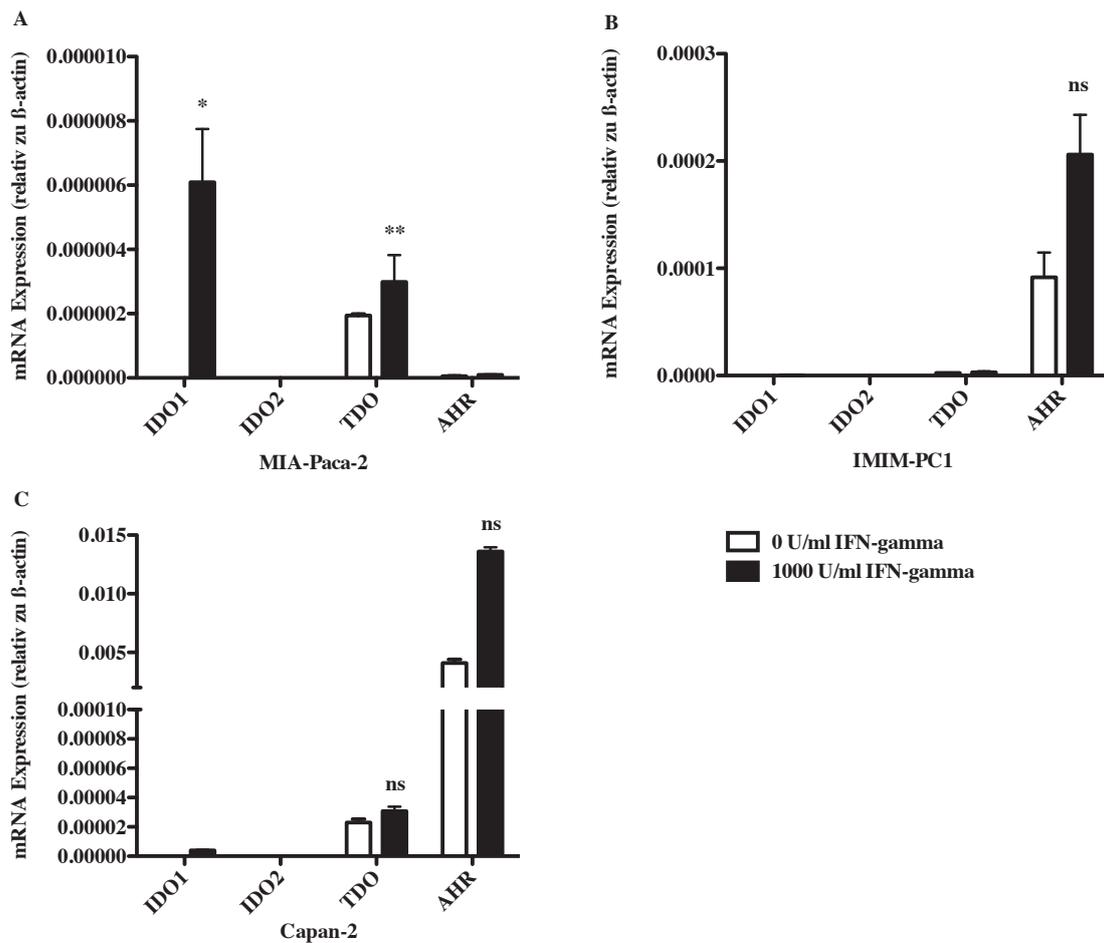


Abb. 4 Induktion von IDO1, IDO2, TDO und AHR in humanen Pankreaskarzinomzellen durch IFN- γ .

3×10^5 humane Pankreaskarzinomzellen (**A** MIA-Paca-2, **B** IMIM-PC1, **C** Capan-2) wurden für 48 h in einer 6-Well-Platte in DMEM-Vollmedium +/- 1000 U/ml IFN- γ kultiviert. RNA wurde extrahiert und mit reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Expression von IDO1-, IDO2-, TDO- sowie AHR-mRNA wurde mittels qRT-PCR bestimmt, wobei β -actin als Referenzgen diente. Angezeigt sind Daten von drei unabhängigen Experimenten mit Mittelwerten + SD. Signifikante Unterschiede wurden mittels ungepaartem t-Test analysiert. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

3.1.2 IFN- γ induziert IDO1-Protein in T110299

Im nächsten Schritt sollte die gezeigte Induktion von IDO1 auf mRNA-Ebene auf Proteinebene nachgewiesen werden. Bei fehlender IDO2-Expression auf mRNA-Ebene (Abb. 3) wurde die Untersuchung auf IDO1 beschränkt. Aufgrund der guten Induzierbarkeit wurden T110299 Zellen verwendet. Diese wurden für 48 Stunden mit oder ohne IFN- γ , IL-6 oder TGF- β , zwei anderen publizierten IDO-Induktoren, kultiviert und schließlich via *Western blot* Analyse die Expression von IDO1-Protein untersucht (Abb. 5).

Die IDO1 Expression wurde in T110299 durch IFN- γ gut induziert, während IL-6 und TGF- β keinen signifikanten Einfluss hatten. Die Expressionsstärke von IDO1 wurde aus drei unabhängigen Versuchen mittels ImageJ quantifiziert.

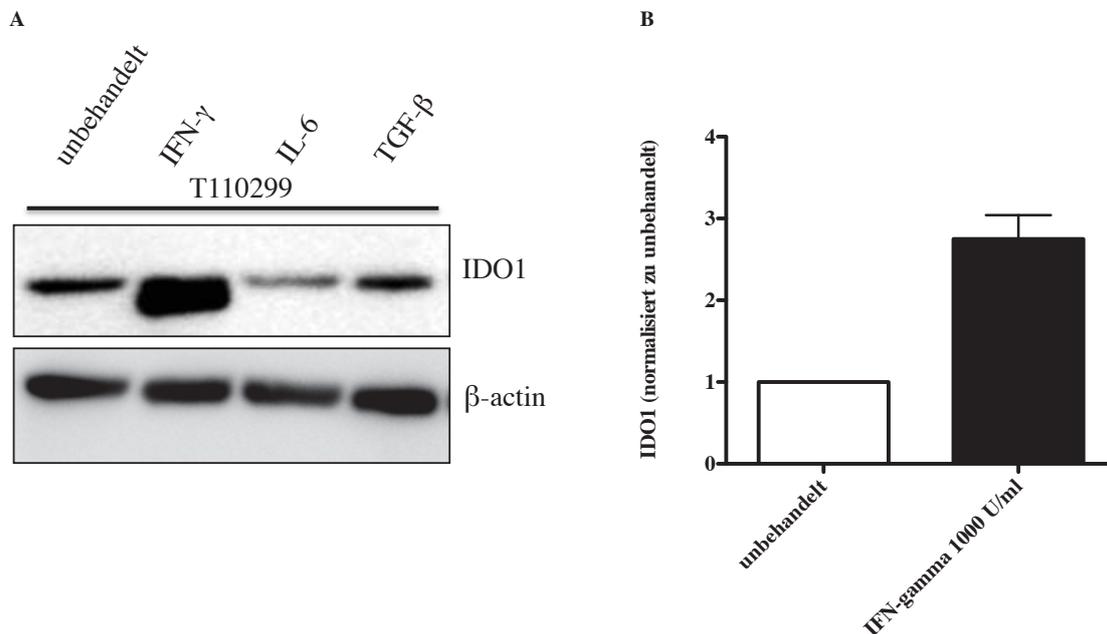


Abb. 5 IFN- γ induziert IDO1 in T110299 Zellen.

A 3×10^5 T110299 Pankreaskarzinomzellen wurden für 48 h in einer 6-Well-Platte in DMEM-Vollmedium unbehandelt, mit 1000 U/ml IFN- γ , 10 ng/ml IL-6 oder 10 ng/ml TGF- β kultiviert. Die Zellen wurden in *Cell Lysis Buffer* resuspendiert und für 20 min auf Eis lysiert. Die Menge an IDO1-Protein wurde mit *Western blot* bestimmt, wobei β -actin als Referenzprotein diente. Gezeigt ist ein repräsentativer *Western blot* aus drei unabhängigen Experimenten. **B** Die Menge an IDO1-Protein relativ zu β -actin wurde mittels *ImageJ* quantifiziert. Angezeigt sind gemittelte Daten aus drei unabhängigen Experimenten, wobei die Expression von unbehandelten Zellen als „1“ (100%) festgelegt wurde. Gezeigt sind Mittelwerte + SD.

Die Daten zeigen, dass T110299 Zellen bereits nach 48 h-Kultivierung (unbehandelt) IDO exprimieren und durch Stimulation mit IFN- γ eine IDO-Induktion erzeugt wird, wohingegen IL-6 oder TGF- β diesbezüglich keinen Einfluss haben.

3.1.3 Untersuchung des Kynurenin-AHR-Signalwegs in murinen und humanen Pankreaskarzinomzellen

Die drei Enzyme IDO1, IDO2 und TDO bauen Tryptophan zu Kynurenin ab, welches letztlich über Bindung an den Arylhydrocarbonrezeptor (AHR) immunsuppressiv wirkt. In dieser Arbeit sollte nun getestet werden, ob der Kynurenin-AHR-Signalweg in murinen sowie humanen Pankreaskarzinomzellen intakt ist. Geprüft wurde die Expression von AHR-Zielgenen am Beispiel von TIPARP und CYP1A1, die im Falle einer funktionellen Kynurenin-Signalkaskade

durch den AHR induziert werden. Dazu wurden die murinen Panc02, T110299 und 510479 Zellen sowie die humanen Capan-2, MIA-Paca-2 und IMIM-PC1 Zellen für 24 Stunden in Ab- bzw. Anwesenheit von Kynurenin kultiviert. Anschließend wurde die mRNA Expression von TIPARP und CYP1A1 bei den murinen und den humanen Zellen mittels qRT-PCR ermittelt, wobei HPRT als Referenzgen diente. Zu sehen war ein signifikanter Anstieg von TIPARP in allen drei murinen Zelllinien, die mit Kynurenin behandelt wurden (Abb. 6A). Ebenso war eine erhöhte Expression von CYP1A1 in allen drei murinen Zelllinien zu beobachten, die jedoch nur bei T110299 und 510479 Signifikanzniveau erreichte (Abb. 6B).

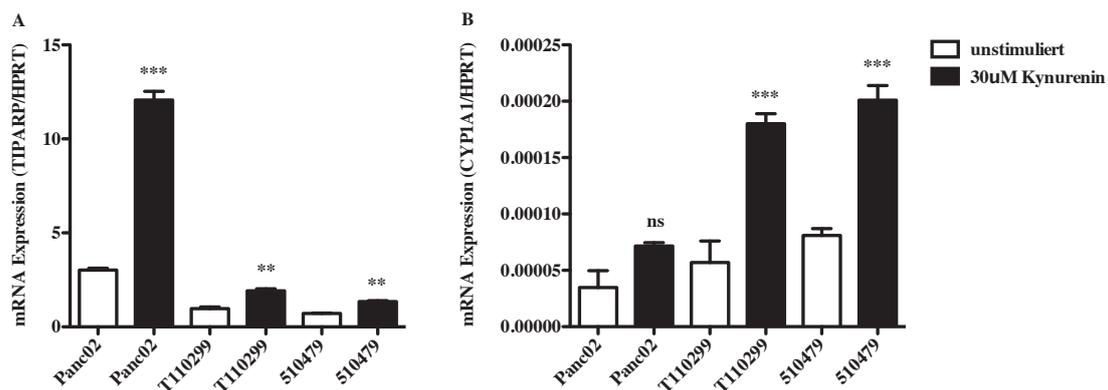


Abb. 6 Kynurenin induziert die Expression der AHR-Zielgene TIPARP und CYP1A1 in murinen Pankreaskarzinomzellen.

3×10^5 murine Pankreaskarzinomzellen (Panc02, T110299, 510479) wurden für 24 h in einer 6-Well-Platte in DMEM-Vollmedium in Ab- bzw. Anwesenheit von 30 μ M Kynurenin kultiviert. Die Expression von TIPARP (A) und CYP1A1 mRNA (B) wurde mittels qRT-PCR bestimmt, wobei HPRT als Referenzgen diente. Angezeigt sind die Daten von drei unabhängigen Experimenten mit Mittelwerten + SD. Signifikante Unterschiede wurden mittels Oneway-ANOVA inklusive Bonferroni-Korrektur analysiert. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0.001$.

Bei den humanen Zelllinien konnte man unstimuliert bereits eine unterschiedlich hohe Expression von TIPARP bzw CYP1A1 beobachten. TIPARP wurde ohne Zugabe von Kynurenin von IMIM-PC1 am stärksten exprimiert, während Capan-2 nur eine sehr geringe Expression aufwies. Nach Stimulation mit Kynurenin zeigten IMIM-PC1 und Capan-2 einen signifikanten Anstieg der TIPARP mRNA Expression, wohingegen MIA-Paca-2 eine nahezu unveränderte Expression aufwies (Abb. 7A). Die basale Expression von CYP1A1 unterschied sich ebenfalls zwischen den Zelllinien. IMIM-PC1 zeigte erneut die höchste Expression, gefolgt von Capan-2 und MIA-Paca-2. Stimulation mit Kynurenin führte in allen drei Zelllinien zu einer signifikanten Hochregulation (Abb. 7B).

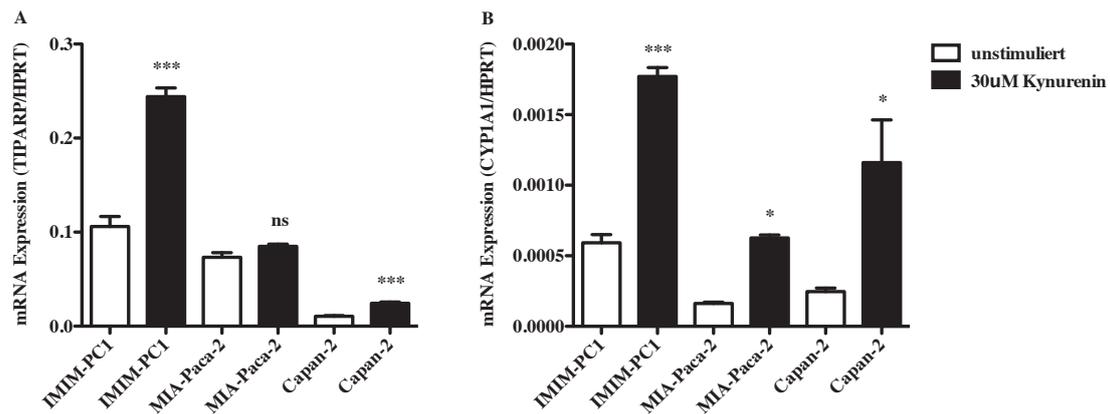


Abb. 7 Kynurenin induziert die AHR-Zielgene TIPARP (A) und CYP1A1 (B) in humanen Pankreaskarzinomzellen.

3×10^5 humane Pankreaskarzinomzellen (IMIM-PC1, MIA-Paca, Capan-2) wurden für 24 h in einer 6-Well-Platte in DMEM-Vollmedium in Ab- bzw. Anwesenheit von 30 μM Kynurenin kultiviert. Die Expression von TIPARP (A) bzw. CYP1A1 mRNA (B) wurde daraufhin mittels *real-time-PCR* bestimmt, wobei HPRT als Referenzgen diente. Angezeigt sind die Daten von drei unabhängigen Experimenten. Die Säulen zeigen die Mittelwerte + SD. Signifikante Unterschiede wurden mittels Oneway-ANOVA inklusive Bonferroni-Korrektur analysiert. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

3.2 Expression von IDO und AHR-Signaling in murinen und humanen T-Zellen

3.2.1 TGF- β und Tumorüberstände induzieren IDO1 in murinen T-Zellen

In Vorversuchen führte die Behandlung von T-Zellen mit dem IDO-Inhibitor D-1-MT vor Zugabe von Zellüberständen generiert von Pankreaskarzinomzellen zu einer erhöhten T-Zell-Proliferation im Gegensatz zu den T-Zellen, welche nicht mit D-1-MT vorbehandelt wurden. Dieses Ergebnis veranlasste uns zu der Hypothese, dass T-Zellen wohlmöglich selbst IDO1 produzieren. In einem ersten Schritt wurde die IDO1- und AHR-Expression auf mRNA-Ebene untersucht. Dafür wurden murine CD3^+ T-Zellen für 48 Stunden kultiviert und mit TGF- β , Panc02- oder T110299-Zellüberstand stimuliert. Schließlich wurde die IDO1 bzw. AHR mRNA Expression im Verhältnis zu dem Referenzgen HPRT mittels qRT-PCR bestimmt.

Während unbehandelte T-Zellen nahezu keine IDO1 mRNA exprimierten, zeigten TGF- β -stimulierte T-Zellen eine bis zu zehnfache Induktion. Die Überstände von Panc02 und T110299 Zellen führten zu einer noch ausgeprägteren IDO1-Induktion (Abb. 8A). Die Expression des Arylhydrocarbonrezeptors (AHR) zeigte sich in den unbehandelten T-Zellen als sehr gering, durch Tumorüberstände wurde dieser nicht, durch TGF- β jedoch stark induziert (Abb. 8B).

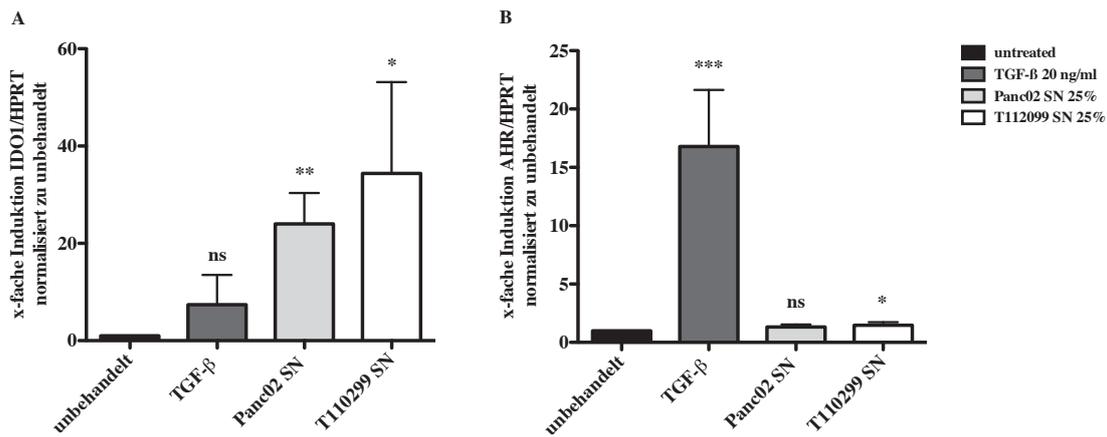


Abb. 8 Expression von IDO1 und AHR in murinen T-Zellen nach Stimulation mit TGF-β oder Tumorzellüberständen

3 x 10⁶ murine CD3⁺ T-Zellen wurden mittels MACS aus Splenozyten isoliert und anschließend für 48 h in einer 12-Well-Platte in RPMI-T-Zell-Medium in Ab- bzw. Anwesenheit von 20 ng/ml TGF-β, 25% Panc02 Zellüberstand oder 25% T110299 Zellüberstand kultiviert. Die Expression von IDO1- (A) bzw. AHR-mRNA (B) wurde mittels qRT-PCR bestimmt, wobei HPRT als Referenzgen diente. Angezeigt sind die Daten von drei unabhängigen Experimenten, normalisiert zu unbehandelten Zellen. Die Säulen zeigen die Mittelwerte + SD. Signifikante Unterschiede wurden mittels Oneway-ANOVA inklusive Bonferroni-Korrektur analysiert. * p < 0,05; ** p < 0,005; *** p < 0.001.

Die Ergebnisse zeigten eine IDO1-Expression in murinen T-Zellen auf mRNA-Ebene, weshalb im nächsten Schritt nach IDO1 auf Proteinebene gesucht werden sollte. Hierfür wurden CD3⁺ T-Zellen für 48 Stunden kultiviert und mit Überständen unterschiedlicher Tumorentitäten kultiviert, um zu prüfen, ob IDO1 in T-Zellen auch durch das Tumormilieu anderer Organe induziert wird. Neben den in der gesamten Arbeit verwendeten Pankreaskarzinomzellen Panc02, T110299 und 510479 induzieren ebenfalls 4T1, eine Brustkrebszelllinie, B16, eine Melanomzelllinie, und LCCL1, eine Lungenkrebszelllinie, IDO1 in T-Zellen (Abb. 9).

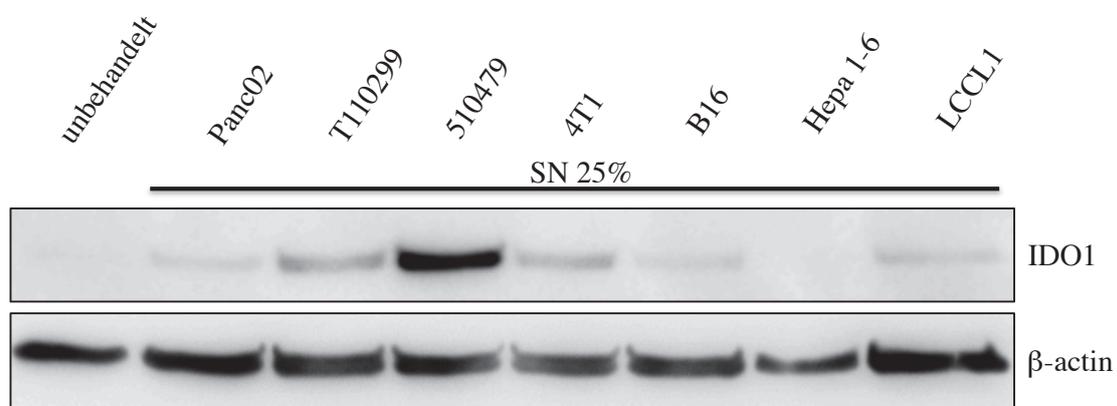


Abb. 9 Tumorüberstände verschiedener Tumorentitäten induzieren IDO1-Protein in murinen T-Zellen.

3 x 10⁶ murine CD3⁺ T-Zellen wurden mittels MACS aus Milzen isoliert und anschließend für 48 h in Anwesenheit von aktivierenden anti-CD3/CD28-Antikörpern in RPMI-T-Zell-Medium

in Ab- bzw. Anwesenheit von 25% Tumorüberstand kultiviert. β -actin diene als Referenzprotein. Die geladene Proteinmenge pro Probe lag bei 30 μ g. Gezeigt ist ein repräsentativer Westernblot von drei Experimenten.

Im nächsten Schritt wurde getestet, ob neben Tumorüberständen auch Zytokine wie IL-6 oder TGF- β IDO1-Protein in T-Zellen induzieren können. T-Zellen wurden für 48 Stunden unter Zugabe von Medium, IL-6, TGF- β oder Tumorüberständen kultiviert und die IDO1 Proteinexpression mittels *Western blot* analysiert. Neben einer starken Induktion von IDO1 durch Panc02- und T110299-Zellüberstände konnte auch für die Zytokine eine Expressionszunahme beobachtet werden (Abb. 10A). Um eine semiquantitative Aussage über die IDO1-Expression zu treffen, wurden drei verschiedene Blots mittels ImageJ quantifiziert und im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle normalisiert. Während die Tumorüberstände zu einer mehr als doppelt so hohen IDO1-Proteinexpression führen, ist sie durch TGF- β und IL-6 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zwar gesteigert, jedoch deutlich geringer ausgeprägt (Abb. 10B).

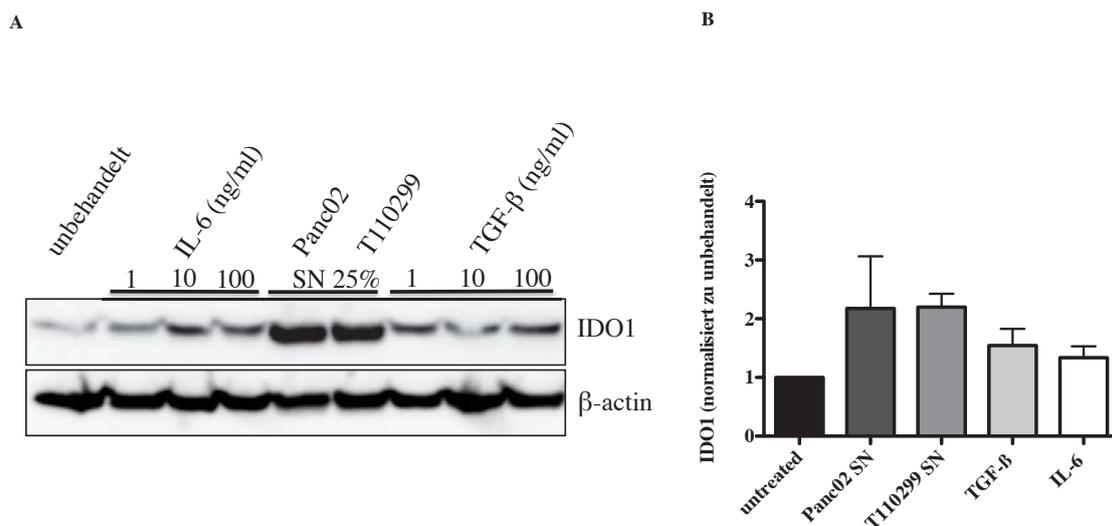


Abb. 10 Pankreastumorzellüberstände induzieren die Expression von IDO1-Protein in murinen T-Zellen.

A. 3×10^6 murine $CD3^+$ T-Zellen wurden mittels MACS aus Splenozyten isoliert und anschließend für 48 h in einer 12-Well-Platte, die über Nacht mit murinen anti-CD3/CD28-Antikörper ge-coated wurde, in RPMI-T-Zell-Medium in Ab- bzw. Anwesenheit von IL-6 (1, 10, 100 ng/ml), TGF- β (1, 10, 100 ng/ml) oder 25% Panc02- bzw. T110299-Tumorüberstand kultiviert. Die Menge an IDO1-Protein wurde mittels *Western blot* bestimmt. β -actin diene als Referenzprotein. Die geladene Proteinmenge pro Probe waren 30 μ g. Gezeigt ist ein repräsentativer *Western blot* von drei unabhängigen Experimenten. **B.** Die Menge an IDO1-Protein relativ zu β -actin wurde mittels *ImageJ* quantifiziert. Angezeigt sind die Daten aus drei unabhängigen Experimenten. Die Säulen zeigen die Mittelwerte + SD.

3.2.2 Inhibition von AHR- nicht jedoch von TGF- β -Signaling inhibiert die IDO1-Induktion durch Tumorzellüberstand in murinen T-Zellen

IDO1 katalysiert den Abbau der Aminosäure Tryptophan zu Kynurenin, welches schließlich an den AHR bindet (Opitz et al., 2011). Um zu testen, welchen Effekt die Blockade des AHR zur Folge hat, wurden T-Zellen für zwei Stunden mit dem AHR-Antagonisten CH-223191 inkubiert bevor Tumorüberstand hinzugegeben wurde. Nach zwei Tagen Kultivierung wurden die Zellen lysiert und die IDO1 Proteinexpression mittels *Western blot* analysiert. Interessanterweise wurde die IDO1-Induktion durch T110299-Tumorüberstand durch den CH-223191 verhindert. Als zusätzliche Kontrolle diente DMSO als Lösungsmittel von CH-223191. DMSO alleine hatte keinen Einfluss auf die IDO1-Induktion. Auch der TGF- β Inhibitor SD208 zeigte keinen Einfluss auf die IDO1 Expression (Abb. 11). Somit scheint die IDO-1 Induktion in T-Zellen durch Tumorzellüberstände über den AHR vermittelt zu werden.

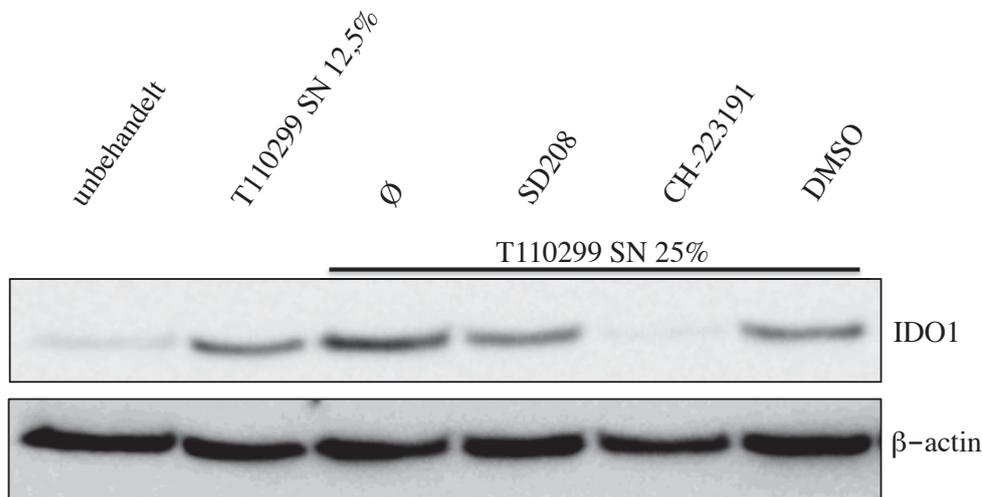


Abb. 11 AHR-Antagonist CH-223191 inhibiert die IDO1-Induktion durch T110299-Zellüberstand in murinen T-Zellen.

3×10^6 murine CD3⁺ T-Zellen wurden mittels MACS aus Splenozyten isoliert und anschließend für 48 h in einer 12-Well-Platte, die über Nacht mit murinen anti-CD3/CD28-Antikörpern gecoated wurde, in RPMI-T-Zell-Medium in Ab- bzw. Anwesenheit von 12% bzw. 25% T110299 Zellüberstand (SN) kultiviert. Wie angegeben wurden zusätzlich SD208 (10 μ M), CH-223191 (10 μ M) oder DMSO (Lösungsmittelkontrolle) zugegeben. Die Expression von IDO1-Protein wurde mittels *Western blot* bestimmt, wobei β -actin als Referenzprotein diente. Die geladene Proteinmenge pro Probe waren 30 μ g. Gezeigt ist ein repräsentativer *Western blot* aus drei unabhängigen Experimenten.

3.2.3 TGF- β und Tumorüberstände induzieren IDO1 in humanen T-Zellen

Als nächstes wurde die IDO1-Expression in humanen T-Zellen analysiert. Hierzu wurden CD3⁺ T-Zellen gesunder Probanden mittels MACS aus PBMC isoliert und analog zu den Versuchen im murinen System untersucht. Zunächst wurden die frisch isolierten T-Zellen unter der Zugabe von TGF- β bzw. Überständen von humanen Pankreaskarzinomzelllinien (MIA-Paca-2,

PANC-1) für 48 Stunden kultiviert. Nach RNA-Extraktion wurde mittels qRT-PCR die Expression von IDO1-mRNA analysiert. Verglichen zur unbehandelten Kontrolle zeigte sich für die mit TGF- β und PANC-1-Überstand behandelten T-Zellen eine geringe, jedoch signifikante Induktion von IDO1. MIA-Paca-2 Überstände führten zu keiner signifikanten IDO1 Induktion (Abb. 12).

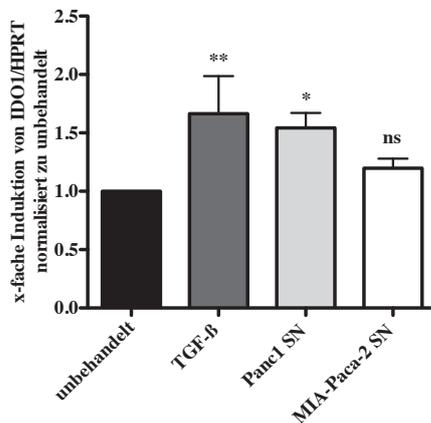


Abb. 12 Expression von IDO1 mRNA in humanen T-Zellen nach Stimulation mit TGF- β oder Tumorüberständen.

3×10^6 humane CD3⁺ T-Zellen wurden mittels MACS aus PBMCs isoliert und anschließend für 48 h mit humanen anti-CD3/CD28 Antikörpern in RPMI-T-Zell-Medium versetzt mit 10 ng/ml IL-2 in Ab- bzw. Anwesenheit von 20 ng/ml TGF- β , 25% PANC-1 oder MIA-Paca-2 Tumorzellüberstand kultiviert. Die IDO1 mRNA Expression wurde mittels qRT-PCR analysiert. HPRT diente als Referenzgen. Angezeigt sind die Daten von drei unabhängigen Experimenten. Die Säulen zeigen die Mittelwerte + SD. Signifikante Unterschiede wurden mittels Oneway-ANOVA inklusive Bonferroni-Korrektur analysiert. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

Im nächsten Schritt wurde die Expression von IDO1 auf Proteinebene untersucht. Humane T-Zellen wurden aus PBMCs isoliert und für 48 Stunden unter Zugabe von IL-6, TGF- β oder Zellüberstand von Capan-2, IMIM-PC1, MIA-Paca-2, oder PANC-1 Zellen kultiviert. Die IDO1 Expression wurde mittels *Western blot* analysiert. Korrespondierend zu den Ergebnissen auf mRNA-Ebene induzierten die Zellüberstände humaner Pankreaskarzinomzelllinien IDO1 in humanen T-Zellen. Während TGF- β auf mRNA-Ebene eine leichte Induktion von IDO1 erzielte, konnte sie auf Proteinebene nicht gezeigt werden (Abb. 13).

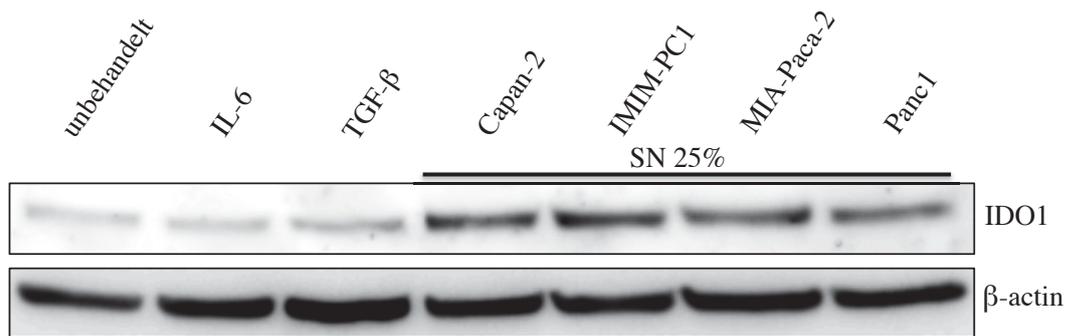


Abb. 13 Tumorüberstände humaner Pankreaskarzinomzellen induzieren IDO1 in humanen T-Zellen.

3×10^6 CD3⁺ T-Zellen wurden aus PBMCs isoliert und mit humanen anti-CD3/CD28 Antikörpern für 48 h in RPMI-T-Zell-Medium versetzt mit 10 ng/ml IL-2 in Ab- bzw. Anwesenheit von IL-6 (10 ng/ml), TGF-β (10 ng/ml) oder 25% Tumorüberstand von Capan-2, IMIM-PC1, MIA-Paca-2, bzw. PANC-1 Zellen kultiviert. Die Expression von IDO1-Protein wurde mit *Western blot* bestimmt. β-actin diente als Referenzprotein. Die geladene Proteinmenge pro Probe waren 30 μg. Gezeigt ist ein repräsentativer *Western blot* aus drei unabhängigen Experimenten.

3.2.4 Der AHR-Antagonist CH-223191 inhibiert die IDO1-Induktion durch Tumorüberstand in humanen T-Zellen

Nachdem bereits in murinen T-Zellen ein Einfluß von AHR-Inhibition auf die durch Tumorzellüberstand induzierte IDO1-Expression gesehen wurde, erfolgte analog hierzu eine Untersuchung humaner T-Zellen. Humane T-Zellen wurden nach zweistündiger Inkubation mit dem AHR-Antagonisten CH-223191 mit Tumorüberstand versehen und für weitere 48 Stunden kultiviert. Danach wurde ein *Western blot* für IDO1 angefertigt. Beobachtet werden konnte eine IDO1-Induktion durch IMIM-PC1-Überstand, was durch DMSO (Lösungsmittelkontrolle) nicht beeinflusst wurde (Abb. 14A). Analog zum murinen System hemmte CH-223191 die IDO1-Induktion durch Tumorüberstand (Abb. 14).

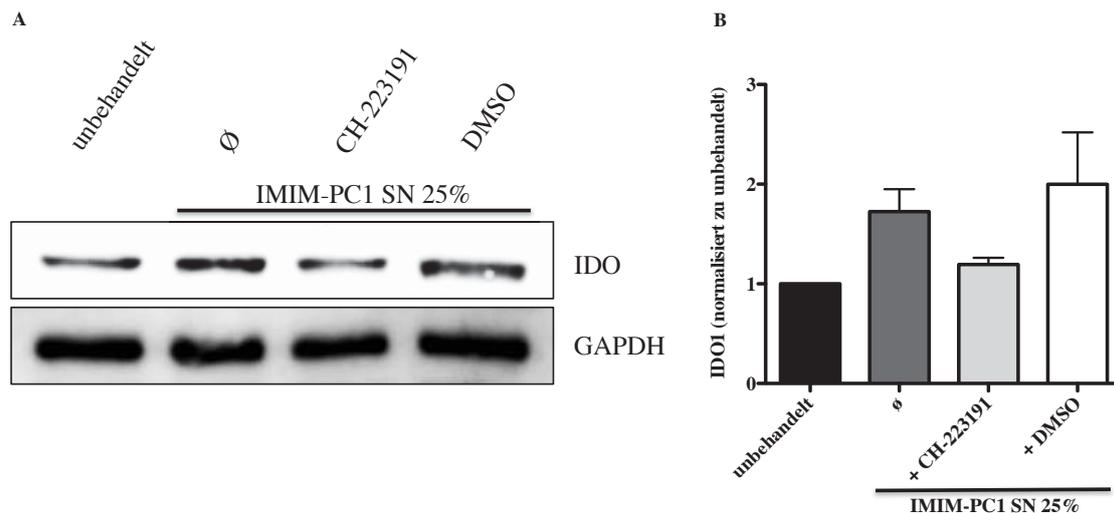


Abb. 14 Der AHR-Antagonist CH-223191 inhibiert die IDO1-Induktion durch Tumorzellüberstand in humanen T-Zellen.

A. 3×10^6 CD3⁺ T-Zellen wurden aus PBMCs isoliert und mit humanen anti-CD3/CD28 Antikörpern für 48 h in RPMI-T-Zell-Medium versetzt mit 10 ng/ml IL-2 und 25% IMIM-PC1 Tumorüberstand in Ab- bzw. Anwesenheit von CH-223191 (10 μ M) bzw. DMSO kultiviert. IDO1-Protein wurde mittels *Western blot* bestimmt, GAPDH diente als Referenzprotein. Die geladene Proteinmenge pro Probe waren 30 μ g. Gezeigt ist ein repräsentativer *Western blot* aus drei unabhängigen Experimenten. **B.** Die relative Expression von IDO1 im Verhältnis zu GAPDH wurde für die jeweiligen Bedingungen mit ImageJ quantifiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei Versuchen.

3.2.5 Kynurenin-AHR-Signalkaskade in murinen und humanen T-Zellen

Wie bereits für murine und humane Pankreaskarzinomzellen in Kapitel 3.1 gezeigt, verfügen die untersuchten Tumorzelllinien über eine funktionelle AHR-Signalkaskade. Die durch IDO1 entstandenen Kynurenine binden an den AHR und sollten dadurch zu einer gesteigerten Expression von AHR-Zielgenen führen. Um diesen Signalweg in T-Zellen zu untersuchen, wurden murine und humane T-Zellen für 48 Stunden in An- oder Abwesenheit von Kynurenin kultiviert und schließlich die mRNA-Expression der AHR-Zielgene TIPARP und AHRR mittels qRT-PCR analysiert. In murinen T-Zellen wurde die Expression von TIPARP- und AHRR-mRNA durch Kynurenin Zugabe signifikant gesteigert (Abb. 15).

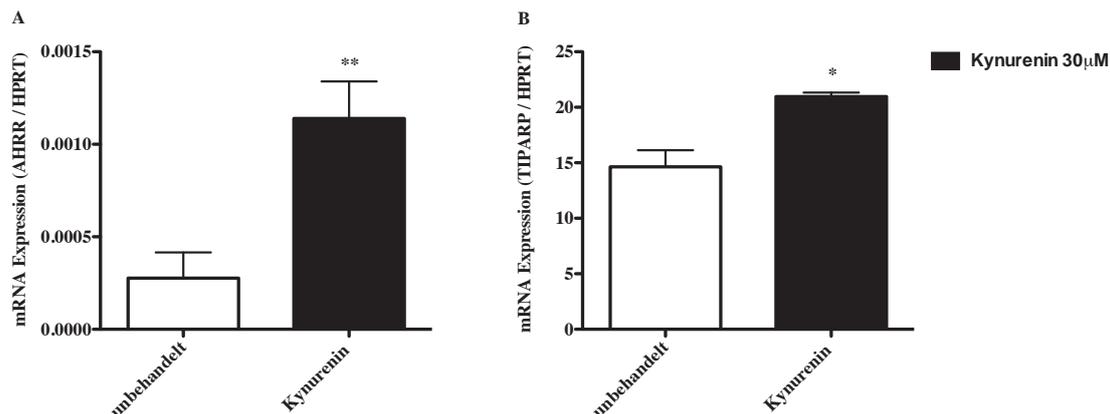


Abb. 15 Intakte AHR-Signalkaskade in murinen T-Zellen.

2×10^6 murine $CD3^+$ T-Zellen wurden aus Milzen isoliert und anschließend für 24 h mit anti-CD3/CD28-Antikörpern in RPMI-T-Zell-Medium in Ab- bzw. Anwesenheit von $30 \mu\text{M}$ Kynurenin kultiviert. Die Expression von AHRR- (A) bzw. TIPARP-mRNA (B) wurde mittels qRT-PCR untersucht. HPRT diente als Referenzgen. Angezeigt sind die Daten von drei unabhängigen Experimenten. Die Säulengraphik zeigt die Mittelwerte + SD. Signifikante Unterschiede wurden mittels ungepaartem t-Test analysiert. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

Entsprechende Ergebnisse fanden sich auch für humane T-Zellen, die im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach Behandlung mit Kynurenin einen signifikanten Anstieg der TIPARP- bzw. AHRR-mRNA Expression zeigten (Abb. 16).

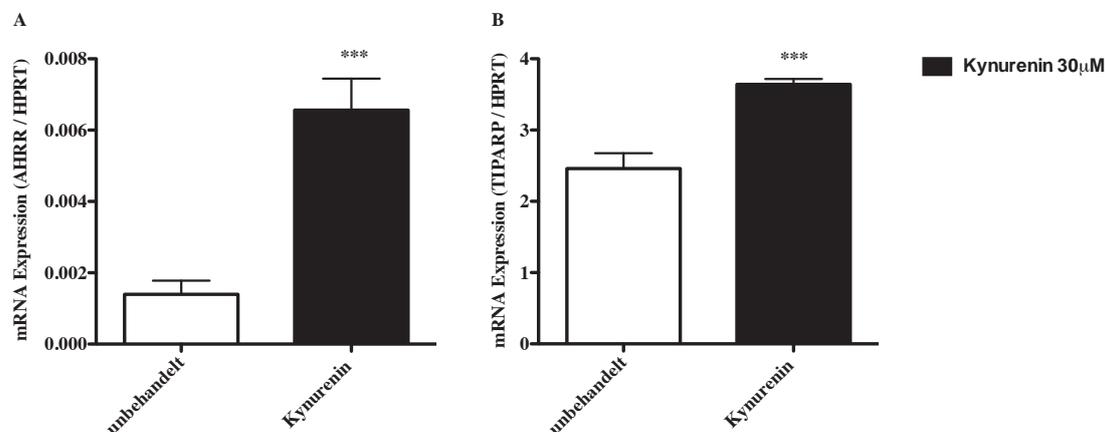


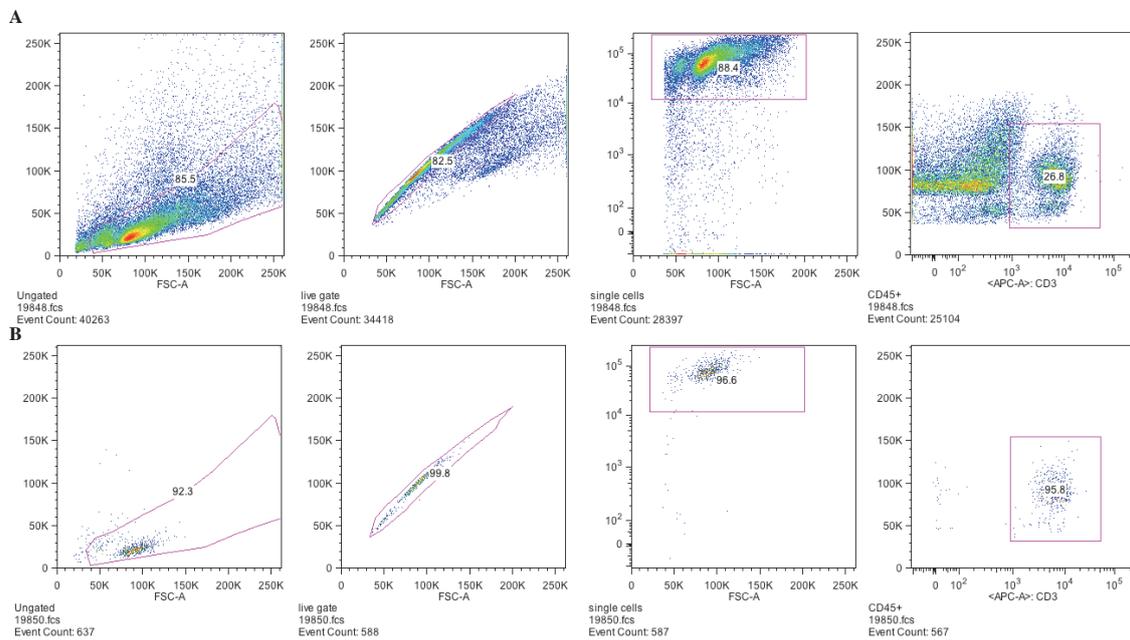
Abb. 16 Intakte AHR-Signalkaskade in humanen T-Zellen.

2×10^6 humane $CD3^+$ T-Zellen wurden aus PBMCs isoliert und anschließend für 24 h mit anti-CD3/CD28-Antikörpern in RPMI-T-Zell-Medium versetzt mit 10 ng/ml IL-2 in Ab- bzw. Anwesenheit von $30 \mu\text{M}$ Kynurenin kultiviert. Die Expression von AHRR- (A) bzw. TIPARP-mRNA (B) wurde mittels qRT-PCR untersucht. HPRT diente als Referenzgen. Angezeigt sind die Daten von drei unabhängigen Experimenten. Die Säulen zeigen die Mittelwerte + SD. Signifikante Unterschiede wurden mittels ungepaartem t-Test analysiert.*** $p < 0,001$.

3.3 Expressionsmuster des IDO1-AHR Signalwegs in tumorinfiltrierenden T-Zellen

3.3.1 Isolation und Qualitätskontrolle tumorinfiltrierender T-Zellen

Es stellte sich nun die Frage, ob T-Zellen in tumortragenden Tieren *in vivo* ebenfalls IDO1 exprimieren. Dazu wurden C57BL/6 Mäusen subkutan T110299-Zellen injiziert. Etwa vier Wochen nach Tumorinduktion wurden CD3⁺ T-Zellen aus Milz und Tumor mit MACS isoliert und anschließend mittels FACS zusätzlich aufgereinigt, um eine möglichst hohe Reinheit zu erzielen. Der Anteil an CD3⁺ T-Zellen aus den Milzen betrug nach der Aufreinigung über 95%, aus den Tumoren sogar nahezu 100% (Abb. 17).



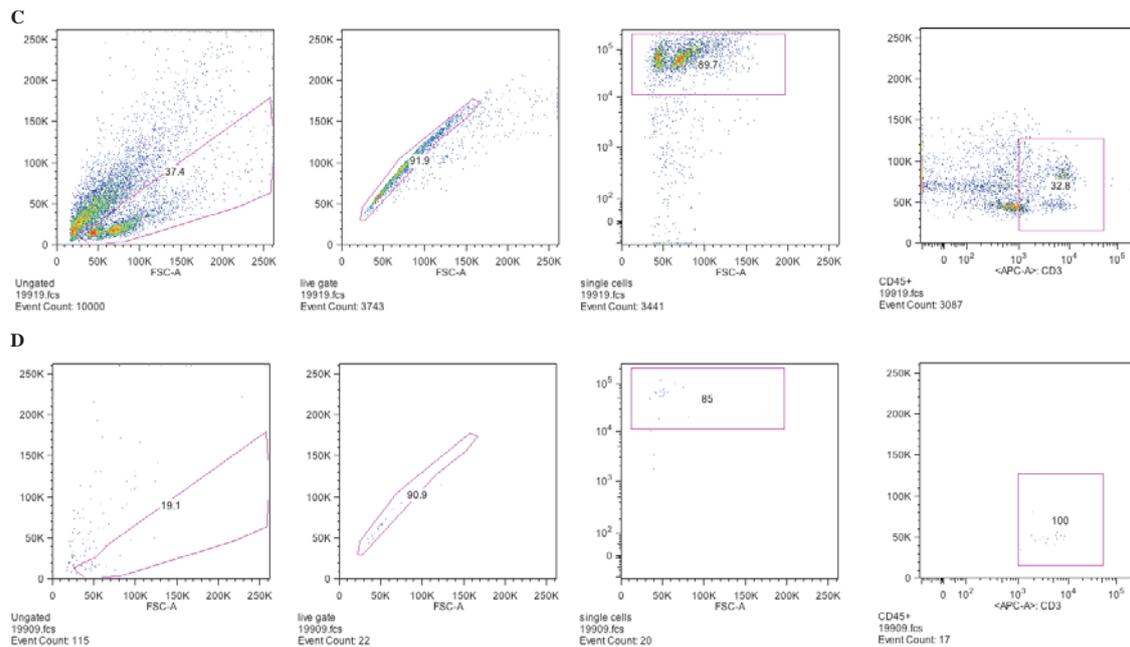


Abb. 17 Reinheit isolierter $CD3^+$ T-Zellen aus der Milz vor (A) und nach (B) der FACS-Aufreinigung, sowie Reinheit der $CD3^+$ T-Zellen aus dem Tumor nach MACS- (C) und FACS-Aufreinigung (D).

A. Milzzellsuspensionen zeigen nach Erylyse einen Anteil ca. 27 % an $CD3^+$ T-Zellen. Die vier Abbildungen zeigen die FACS-Gatingstrategie von links nach rechts: Live-Gate, single cells, $CD45^+$ und schließlich $CD3^+$. **B.** Gezeigt ist die Post-Sort-Probe mit einem Anteil von 95,8 % an $CD3^+$ T-Zellen. **C.** Anreicherung von $CD3^+$ T-Zellen aus Tumoren. Die vier Abbildungen zeigen das FACS-Gating von links nach rechts: Live-Gate, single cells, $CD45^+$ und schließlich $CD3^+$. **D.** Gezeigt ist die Post-Sort-Probe mit einem Anteil von 100% an $CD3^+$ T-Zellen.

3.3.2 Tumordinfiltrierende T-Zellen zeigen eine erhöhte Expression von IDO1, AHR und TIPARP

T-Zellen wurden wie oben beschrieben isoliert, die RNA gewonnen und anschließend via qRT-PCR die Expression von IDO1-, AHR- und TIPARP-mRNA bestimmt. Zur besseren Anschaulichkeit wurde die jeweilige Gen-Expression der Wildtyp T-Zellen als Basiswert „1“ (100%) normalisiert und die faktorielle Expression der anderen Gruppen im Vergleich dazu dargestellt. T-Zellen aus Milzen von tumorfreien als auch tumortragenden Tieren zeigten eine nur geringe Expression von IDO1, AHR und TIPARP und wiesen keinen signifikanten Unterschied auf. Tumordinfiltrierende T-Zellen hingegen zeigten eine signifikant gesteigerte Expression der drei Gene im Vergleich zu den T-Zellen aus Milzen von tumortragenden oder tumorfreien Tieren (Abb. 18).

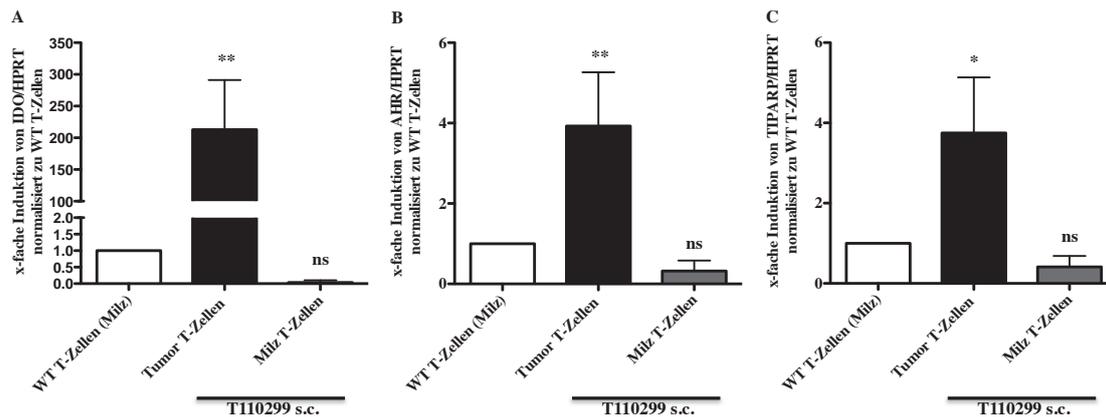


Abb. 18 T-Zellen aus subkutanen T110299-Tumoren zeigen eine höhere Expression von IDO1-, AHR- und TIPARP-mRNA als T-Zellen aus der Milz.

CD3⁺ T-Zellen aus Tumor und Milz wurden mittels MACS und FACS isoliert. IDO1- (A), AHR- (B) bzw. TIPARP-mRNA (C) wurde mittels qRT-PCR bestimmt. HPRT diente als Referenzgen. Angezeigt sind Daten von drei unabhängigen Experimenten. Die Säulen zeigen die Mittelwerte + SD. Signifikante Unterschiede wurden mittels Oneway-ANOVA inklusive Bonferroni-Korrektur analysiert. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

3.3.3 Tumordinfiltrierende T-Zellen aus KPC-Mäusen exprimieren mehr IDO1-Protein als T-Zellen aus gesunden Tieren

Als nächstes sollte die IDO1-Induktion auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Für einen Proteinnachweis mittels *Western blot* werden im Vergleich zur qRT-PCR verhältnismäßig viele Zellen benötigt. Bei dem T110299-Modell zeigte sich das Problem, dass Tumore früh ulzerierten, sodass die T-Zellen nicht repräsentativ waren. Daher wurde ein genetisches Pankreastumormodell, sog. KPC-Mäuse, gewählt. Bei diesen Tieren entstehen innerhalb weniger Wochen spontan Pankreasadenokarzinome (Hingorani, et al. 2003). CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden aus Tumoren und Milzen mittels FACS isoliert und die Zellen aus drei Tieren gepoolt. Die Expression von IDO1-Protein wurde mittels *Western blot* analysiert. CD4⁺ T-Zellen aus dem Tumor sowie aus der Milz der tumortragenden Mäuse zeigen eine stärkere Expression von IDO1 als die CD4⁺ T-Zellen aus Kontrolltieren ohne Tumor. CD8⁺ T-Zellen aus dem Tumor zeigten keinen Unterschied im Vergleich zu den Kontrollen, wohingegen CD8⁺ T-Zellen aus der Milz der tumortragenden Maus eine stärkere IDO-Expression als CD8⁺ T-Zellen aus Kontroll-Milzen aufwiesen (Abb. 19).

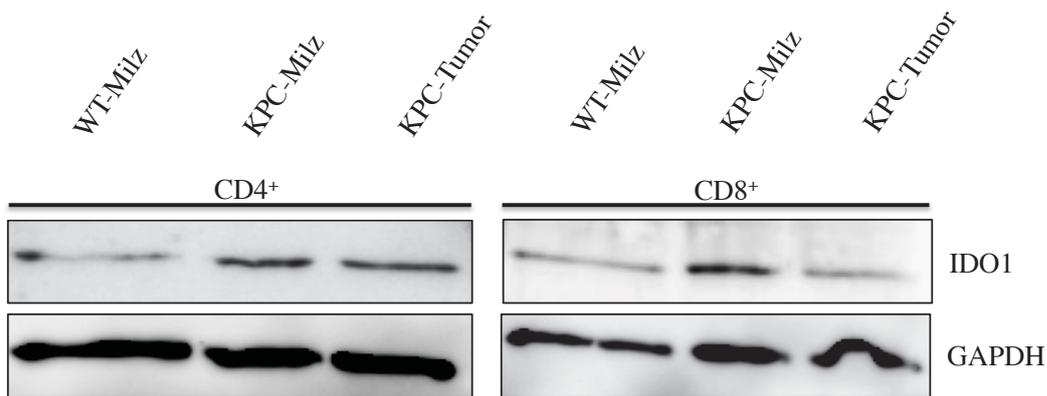


Abb. 19 CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus KPC-Mäusen zeigen eine stärkere IDO-Expression als T-Zellen aus Milzen tumorfreier Mäuse.

CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus Tumor und Milz von Wildtyp- sowie KPC-Tieren (genetisches Pankreaskarzinommodell) wurden mittels MACS und FACS isoliert. Die IDO1 Expression wurde mittels *Western blot* bestimmt, GAPDH diente als Referenzprotein. Die geladene Proteinmenge pro Bedingung lag bei 25 µg (aufgrund der geringen Ausbeute wurden die Proben aus jeweils drei Mäusen gepoolt).

3.4 Funktionelle Konsequenzen der IDO1-Expression in T-Zellen

3.4.1 Tumorüberstände hemmen die T-Zell-Proliferation

Nachdem wir die Expression von IDO1 in T-Zellen *in vitro* und *ex vivo* nachweisen konnten, war es unser Ziel im nächsten Schritt die Funktionalität von IDO1 zu überprüfen. IDO1 wurde ursprünglich als immunsuppressives Enzym beschrieben. Es liegt nahe, dass die Expression von IDO1 in T-Zellen zu einer verminderten Aktivität von T-Zellen, beispielsweise der proliferativen Kapazität, führt. Um dies zu testen, verwendeten wir ein auf αCD3/CD28 mAb-basiertes Standardverfahren, um die Proliferation von T-Zellen zu analysieren. CFSE-markierte T-Zellen wurden mit αCD3/CD28 Dynabeads aktiviert und für 72 Stunden kultiviert. Anschließend wurde im FACS die Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gemessen. Um eine genormte Auswertung vornehmen zu können, wurden bei jedem Versuch *counting beads* verwendet. Abbildung 20 zeigt die Gatingstrategie.

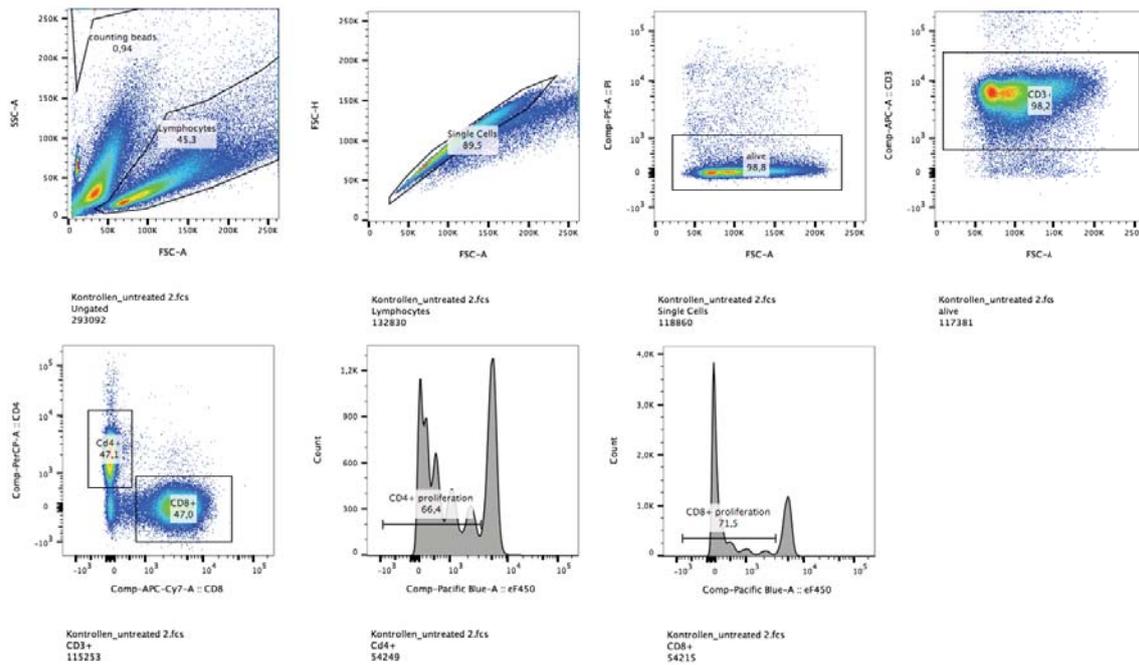


Abb. 20 FACS-Gatingstrategie zur Analyse der T-Zell-Proliferation.

CD3⁺ T-Zellen wurden aus Splenozyten isoliert, mit CFSE markiert und für 72 h kultiviert. Gezeigt von links nach rechts: Live-Gate mit Quantifizierungs-Beads, Single cell-Gate, Life-Gate, Gating von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, sowie Histogramme zur Proliferation (CFSE-Verdünnung).

Zunächst wurde der Einfluss von Tumorüberstand auf die Proliferation von T-Zellen untersucht. Die T-Zellkulturen wurden mit 6% bzw. 12% Tumorzellüberstand von Panc02- bzw. T110299-Zellen oder TGF- β inkubiert und für 72 Stunden kultiviert. Die FACS-Analyse ergab eine signifikante Hemmung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Proliferation durch Panc02-Überstand (Abb. 21 A) und T110299-Überstand (Abb. 21 B). Während im T110299-Modell die CD4⁺ T-Zellen bei 6% Überstand noch eine Proliferation von etwa 30% aufwiesen, lag diese bei 12% Überstand nur noch bei ca. 10%. CD8⁺ T-Zellen zeigten bei 6% Überstand noch ca. 25% Proliferation, wohingegen bei 12% Überstand weniger als 10% proliferierte Zellen zu beobachten waren. Durch Zugabe von 20 ng/ml TGF- β zum Kulturmedium wurden CD8⁺ T-Zellen mehr als CD4⁺ T-Zellen in ihrer Proliferation eingeschränkt (Abb. 21 C).

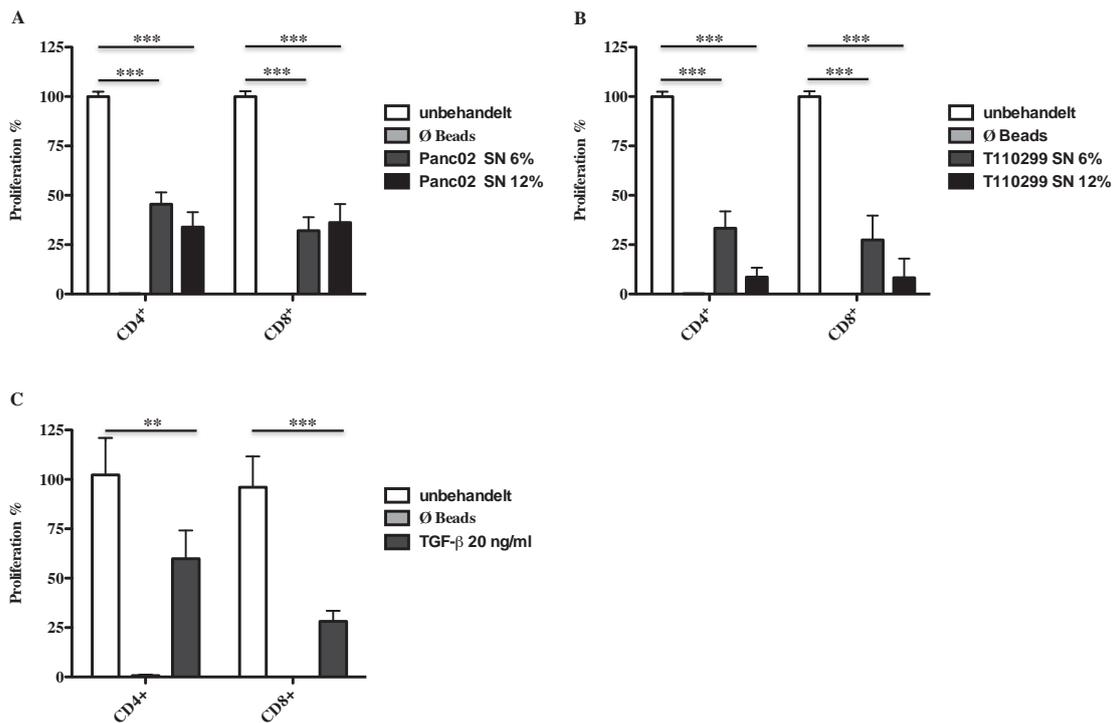


Abb. 21 Tumorzellüberstand und TGF- β hemmen die Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen.

CD3⁺ T-Zellen wurden aus Milzen isoliert, mit CFSE markiert, mit α CD3/CD28 Dynabeads stimuliert und in Ab- bzw. Anwesenheit von 6% bzw. 12% Panc02- oder T110299-Tumorzellüberstand (A, B), oder mit 20 ng/ml TGF- β (C) für 72 h kultiviert. Die T-Zell-Proliferation wurde durchflusszytometrisch analysiert. Die Proliferation ohne Tumorüberstand wurde auf 100% gesetzt. Angezeigt sind repräsentative Daten aus drei verschiedenen Experimenten. Die Säulen zeigen die Mittelwerte + SD. Signifikante Unterschiede wurden mittels Oneway-ANOVA inklusive Bonferroni-Korrektur analysiert. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

3.4.2 Einfluss von IDO- und TGF- β -Inhibitoren auf die Tumorzellüberstand-induzierte T-Zell-Proliferationshemmung

Pankreaskarzinomzellen produzieren größere Mengen an TGF- β als nicht-maligne Zellen des Pankreas (Derynck et al., 1985, Zhang et al., 2017). Um zu überprüfen, welchen Einfluss TGF- β bzw. T-Zell-intrinisches IDO1 in der Tumorzellüberstand-vermittelten Hemmung der T-Zell-Proliferation spielen, wurden in anschließenden Versuchen IDO1- (D-1-MT, INCB 024360) bzw. TGF- β -Inhibitoren (LY2157229) eingesetzt. T-Zellen wurden zwei Stunden mit 2 mM D-1-MT, 100 nM INCB 024360 oder 10 μ M LY2157229 inkubiert bevor 3% bzw. 6% Tumorüberstand von Panc02- bzw. T110299-Zellen hinzugefügt wurden. Das Lösungsmittel DMSO ohne Inhibitor diente als Kontrolle. Bei den Versuchen mit Panc02 Zellüberständen zeigte sich für den IDO1-Inhibitor D-1-MT eine signifikante Verbesserung der T-Zellproliferation, sowohl für CD4⁺ als auch für CD8⁺ T-Zellen, wobei diese bei CD8⁺ T-Zellen stärker ausfiel. Sowohl der zweite IDO1-Inhibitor INCB 024360 als auch der TGF- β -

Inhibitor LY2157229 zeigten diesbezüglich keinen Effekt (Abb. 22 A, B). Bei Versuchen mit T110299-Überstand zeigte sich hingegen ausschließlich für den TGF- β -Inhibitor LY 2157229 ein positiver Effekt auf die T-Zellproliferation. LY2157229 führte bei CD4⁺ T-Zellen allerdings nur bei 3% Tumorüberstand zu einer Verbesserung, während bei CD8⁺ T-Zellen der Effekt bei beiden Konzentrationen zu sehen war (Abb. 22 C, D).

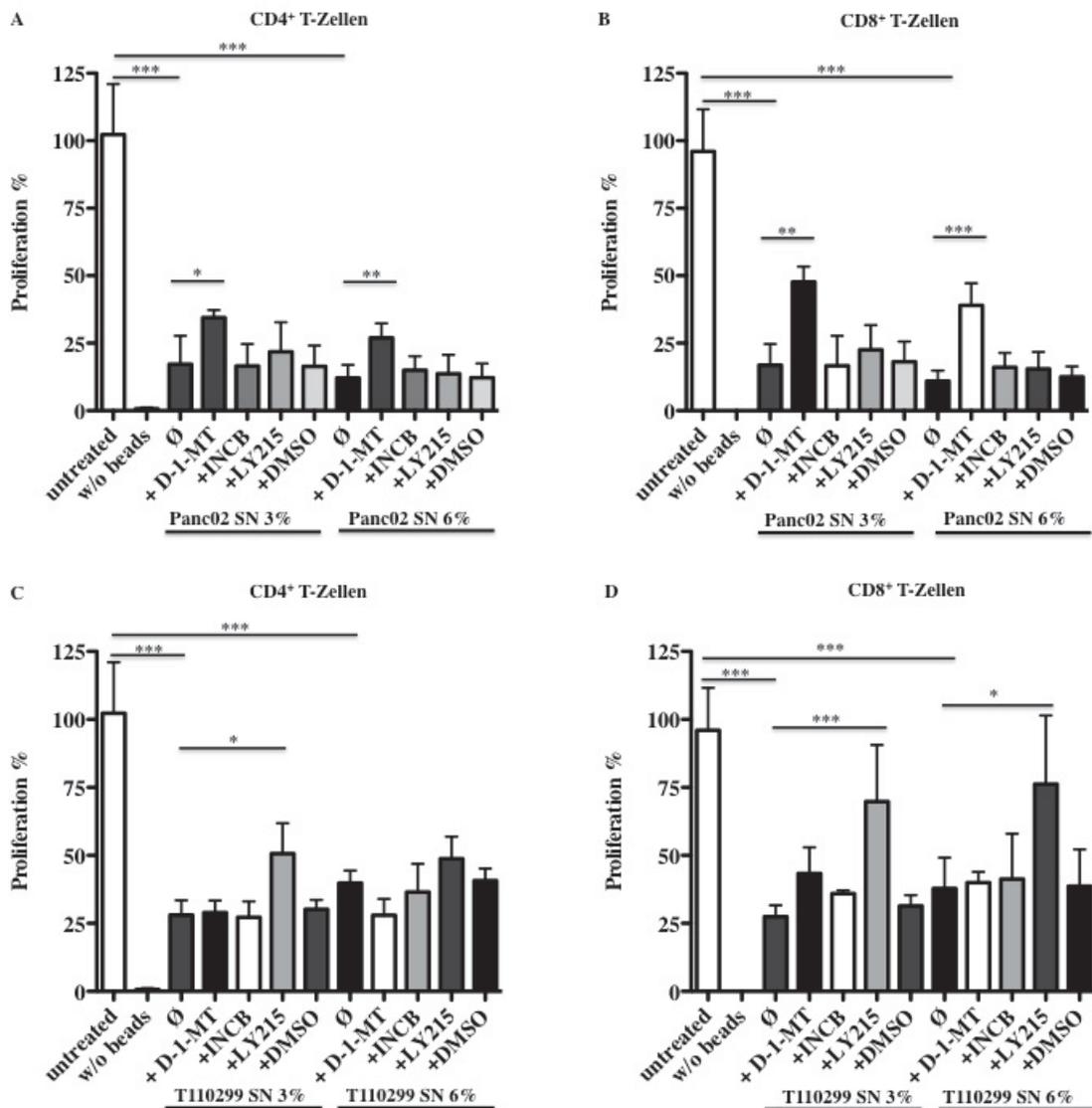


Abb. 22 Einfluss von IDO1- bzw. TGF- β -Inhibitoren auf die Hemmung der T-Zell-Proliferation durch Tumorzellüberstand.

CD3⁺ T-Zellen wurden aus Milzen isoliert, mit CFSE markiert und 2 h mit IDO1- oder TGF- β -Inhibitoren inkubiert. Danach wurden die T-Zellen mit α CD3/CD28 Dynabeads, unter Beimengen von 3% bzw. 6% Tumorzellüberstand aus Panc02- bzw. T110299-Zellen, für 72 h kultiviert. DMSO diente als Lösungsmittelkontrolle. Die T-Zell-Proliferation wurde durchflusszytometrisch analysiert. Die Proliferation ohne Tumorüberstand wurde auf 100% normalisiert. Angezeigt sind repräsentative Daten aus drei verschiedenen Experimenten. Die Säulen zeigen die Mittelwerte + SD. Signifikante Unterschiede wurden mittels Oneway-ANOVA inklusive Bonferroni-Korrektur analysiert. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

4. Diskussion

Das Adenokarzinom des Pankreas bedient sich einer Vielzahl an Mechanismen, um der Eliminierung durch das Immunsystem zu entgehen. Hier kommt dem immunsuppressiven Tumormikromilieu eine entscheidende Rolle zu, indem es eine lokale Immunabwehr im Tumor effizient unterdrückt und Tumorprogression begünstigt. Das Enzym IDO1 ist an vielen Prozessen, sowohl in der Immunsuppression als auch in der Immunregulation, beteiligt. Eine Überexpression von IDO1, sowie der damit verbundenen schlechten Prognose, wurde bereits für mehrere Tumorentitäten, wie Brust-, Magen- und hepatozellulärem Karzinom, nachgewiesen (Bi et al., 2014, Liu et al., 2016, Pan et al., 2008). Welche Rolle IDO1 im Pankreaskarzinom spielt, ist weitgehend unerforscht. Aufgrund der komplexen Wirkweise ist die detaillierte Analyse von IDO1 Expression und Funktion Gegenstand der Forschung.

4.1 Expressionsmuster und Signaling in murinen und humanen Pankreastumorzelllinien

Es wurde beschrieben, dass IDO1 unter anderem in humanen Pankreaskarzinomen exprimiert wird. Mit IFN- γ ist ein Zytokin bekannt, welches maßgeblich an der Regulation der IDO1 Expression beteiligt ist (Yasui et al., 1986). Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit in murinen und humanen Pankreaskarzinomzelllinien reproduziert werden. Bei murinen Panc02 und T110299 Zellen wurde IDO1 durch IFN- γ induziert, während nahezu keine basale Expression vorhanden war. Die Induktion von IDO1 durch IFN- γ in T110299 Zellen wurde auf Proteinebene bestätigt. Die Zelllinie 510479 zeigte weder basal noch nach Stimulation mit IFN- γ eine IDO1 Expression, was auf eine genetische Heterogenität der Tumore hinweist. Bei den humanen Zelllinien konnte in MIA-Paca-2 eine Induktion von IDO1 durch IFN- γ gesehen werden. Auch andere humane Zelllinien wie PANC-1, CFPAC-1 und BxPC-3, zeigen der Literatur zufolge eine IDO1 Expression nach Stimulation mit IFN- γ (Zhang et al., 2017). Witkiewicz et al. zeigte ebenfalls, dass in humanen Capan-1 und PL5 Zellen nach Stimulation mit IFN- γ IDO induziert werden kann (Witkiewicz et al., 2008). In unseren Versuchen konnten wir dies für Capan-2 und IMIM-PC1 jedoch nicht sehen. Möglicherweise ist dies auf Unterschiede in der Zellkultur zurückzuführen.

2011 haben Opitz et al. erstmals beschrieben, dass Kynurenin ein physiologischer Ligand des Arylhydrocarbonrezeptors ist und dessen Aktivierung eine wichtige Rolle in der Tumorgenese spielt (Opitz et al., 2011). Unter diesem Aspekt untersuchten wir die Expression von AHR und dessen Zielgenen, TIPARP und CYP1A1, nach Stimulation mit Kynurenin. Unsere Ergebnisse

zeigten, dass Kynurenin in allen untersuchten murinen und humanen Pankreaskarzinomzelllinien (Panc02, T110299, 510479 und MIA-Paca-2, IMIM-PC1, Capan-2) die AHR-Zielgene hochregulierte. Die Daten zeigen somit einen intakten Kynurenin-AHR-Signalweg in den von uns verwendeten murinen und humanen Pankreaskarzinomzelllinien. In Panc02 wurde TIPARP deutlich stärker induziert als in T110299 und 510479. CYP1A1 hingegen wurde in T110299 und 510479 stärker hochreguliert als in Panc02. Bei den humanen Zelllinien führte Kynurenin vor allem in den IMIM-PC1 zu einer gesteigerten Expression von TIPARP und CYP1A1, in den MIA-Paca-2 und Capan-2 konnte ebenfalls eine Induktion beider Zielgene gezeigt werden, jedoch in geringerer Ausprägung. Analog zu unseren Beobachtungen verweist auch die Literatur auf eine Hochregulation von den AHR-Zielgenen CYP1A1 oder TIPARP durch Kynurenin. Litzenburger et al. haben 2014 gezeigt, dass Kynurenine die Expression von TIPARP und CYP1A1 in humanen Ovarialkarzinom- und Lungenkarzinomzellen deutlich steigerten (Litzenburger et al., 2014). Des Weiteren konnte TIPARP und CYP1A1 durch TCDD, einem chlorhaltigen Toxin mit einer hohen Affinität für den AHR, in humanen Brustkrebszellen induziert werden (MacPherson et al., 2013, Mimura and Fujii-Kuriyama, 2003).

Unsere Studie zeigt somit, dass IFN- γ die Expression von IDO1 in den murinen Panc02 und T110299 Zellen sowie in den humanen MIA-Paca-2 Zellen induziert. Außerdem konnten wir in allen verwendeten murinen und humanen Pankreaskarzinomzelllinien ein funktionelles Kynurenin-AHR-Signaling nachweisen.

4.2 IDO1-Expressionsmuster und Signaling in murinen und humanen T-Zellen *in vitro* und murinen tumorinfiltrierenden T-Zellen

Versuche unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass durch die Behandlung von T-Zellen mit dem IDO1-Inhibitor D-1-MT ihre durch Tumorüberstand gehemmte proliferative Kapazität teilweise wiederhergestellt werden kann (Adunka, 2014). Diese Versuche deuteten darauf hin, dass T-Zellen selbst IDO exprimieren könnten. Zu den in der Literatur beschriebenen Induktoren von IDO1 zählen IFN- γ , TGF- β , PGE2 und IL-6 (Litzenburger et al., 2014, Muller and Prendergast, 2007, Pallotta et al., 2011, Yasui et al., 1986). In unserer Studie untersuchten wir zunächst murine, dann humane T-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen oder Tumorüberständen auf die Expression von IDO1. TGF- β und die Überstände von Panc02 und T110299 Zellen induzierten IDO1 in murinen T-Zellen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene, während die IDO1-Expression in unbehandelten T-Zellen nicht nachweisbar war. Dies bedeutet, dass T-Zellen basal kein IDO1 exprimieren, sondern dessen Expression erst

induziert werden muss, beispielsweise durch o.g. Zytokine, welche vermehrt im Tumormikromilieu vorherrschen. Auffällig war, dass die Tumorüberstände sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene IDO1 deutlich stärker hochregulierten als TGF- β . Dies führt zu der Annahme, dass TGF- β zwar an der IDO-Induktion beteiligt ist, jedoch weitere sezernierte Moleküle eine zusätzliche Rolle für dessen Induktion spielen. Untermuert wird diese Theorie weiterhin durch die nur gering reduzierte IDO1-Induktion nach Inkubation der T-Zellen mit dem TGF- β -Inhibitor SD-208 vor Überstandzugabe. In der Annahme, dass das Tumormilieu die T-Zellen dazu veranlassen könnte vermehrt IDO1 zu exprimieren, um so einer Immunantwort zu entkommen, untersuchten wir in einem zweiten Schritt tumorinfiltrierende T-Zellen aus subkutanen T110299 Tumoren sowie T-Zellen aus Splenozyten tumortragender Mäuse auf die Expression von IDO1, AHR und TIPARP. Wir konnten auf mRNA-Ebene zeigen, dass IDO1, AHR und TIPARP in tumorinfiltrierenden T-Zellen um ein Vielfaches höher exprimiert wurden, als in den aus der Milz isolierten T-Zellen tumortragender Mäuse oder den T-Zellen aus der Milz tumorfreier C57BL/6 Mäuse. Daraus lässt sich schließen, dass tumorinfiltrierende T-Zellen durch das Mikromilieu des Tumors dazu gebracht werden IDO1 zu exprimieren. Außerdem wird durch die Hochregulation von AHR und dessen Zielgen TIPARP gezeigt, dass die durch die enzymatische Aktivität von IDO1 entstehenden Kynurenine an dem AHR der T-Zellen wirken und die Expression von AHR-Zielgenen induzieren (Litzenburger et al., 2014, Opitz et al., 2011).

Um die *in vivo* Relevanz dieses Befundes weiter zu untermauern, isolierten wir CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus spontan entstehenden Pankreastumoren von KPC-Mäusen, einem genetischen Pankreaskarzinommodell, sowie deren Milzen und untersuchten die IDO1-Expression auf Proteinebene. Hierbei konnte eine verstärkte Expression von IDO1 in den tumorinfiltrierenden sowie in den aus der Milz isolierten CD4⁺ T-Zellen beobachtet werden. Die CD8⁺ T-Zellen aus der Milz der KPC-Mäuse exprimierten IDO1 stärker als T-Zellen aus tumorfreien Mäusen. Überraschenderweise war in den tumorinfiltrierenden CD8⁺ T-Zellen IDO1 kaum nachweisbar. Analog zu den CD4⁺ T-Zellen hätten wir eher eine Induktion von IDO1 in den tumorinfiltrierenden CD8⁺ T-Zellen erwartet (Clark et al., 2007, Vonderheide and Bayne, 2013).

Analog zu den murinen T-Zellen konnte auch in humanen T-Zellen eine Induktion von IDO1-mRNA durch TGF- β und Tumorüberstände (PANC1, MIA-Paca-2) gesehen werden. Auf Proteinebene blieb jedoch die Induktion durch TGF- β aus und es konnte lediglich für die Tumorüberstände Capan-2, IMIM-PC1, MIA-Paca-2 und PANC1 eine gesteigerte Expression von IDO1 im Vergleich zu unbehandelten Zellen gezeigt werden. Die Induktion von IDO1 Expression durch TGF- β wurde bereits beschrieben (Belladonna et al., 2008, Fallarino et al.,

2012). In der Literatur finden sich bis heute jedoch noch keine Hinweise auf eine Expression von IDO1 in T-Zellen. Kürzlich wurde IDO erstmals in B-Zellen nachgewiesen (Nouel et al., 2015). Durch Vogel et. al wurde bereits 2008 gezeigt, dass der AHR an der Regulation der IDO-Expression beteiligt ist. In seinen Studien induzierte TCDD die Expression von IDO in DCs aus der Lunge und Milz, während bei AHR^{-/-} Mäusen keine IDO-Induktion durch TCDD beobachtet werden konnte. Hieraus lässt sich folgendes Modell ableiten: Im Mikromilieu des Pankreaskarzinoms herrschen erhöhte Spiegel an IDO1, wodurch Tryptophan abgebaut wird und Kynurenine entstehen. Kynurenin als physiologischer Ligand des AHR kann im nächsten Schritt durch Bindung an den AHR IDO1 in T-Zellen induzieren. Um zu prüfen, ob Kynurenin überhaupt an T-Zellen wirkt, untersuchten wir die Expression von AHR-Zielgenen nach Stimulation mit Kynurenin. TIPARP und AHRR mRNA wurde in murinen und humanen T-Zellen nach Kynurenin Zugabe höher exprimiert als in Abwesenheit. Korrespondierend zu diesen Ergebnissen wurde in der Literatur beschrieben, dass humane CD4⁺ T-Zellen aus Patienten mit allergischer Rhinitis durch ITE, ein weiterer Ligand des AHR, vermehrt IL-10 produzierten (Wei et al., 2014). Die Induktion der AHR-Zielgene TIPARP bzw. CYP1A1 durch Kynurenin wurde für humane Ovarialkarzinom- und Lungenkrebszellen gezeigt (Litzenburger et al., 2014).

Nachdem sich in dieser Arbeit heraus stellte, dass das Kynurenin-AHR-Signaling in murinen und humanen T-Zellen funktionell aktiv ist, untersuchten wir im nächsten Schritt den Einfluss des AHR-Antagonisten CH-223191 auf die Expression von IDO1. In T-Zellen, die unter dem Einfluss von CH-223191 mit T110299 Überstand kultiviert wurden, konnte die IDO1 Induktion verhindert werden. Dies weist auf eine auto-/parakrine Rückkopplung hin. Dasselbe Ergebnis ließ sich in humanen T-Zellen unter Verwendung von IMIM-PC1 Überstand zeigen, wenn auch nicht so ausgeprägt. Unsere Ergebnisse sind also im Einklang mit Vogel et al. und zeigen eine durch AHR-regulierte Expression von IDO1, erstmals jedoch auch in T-Zellen (Vogel et al., 2008).

4.3 Untersuchungen zur Funktionalität von IDO

Das immunsuppressive Tumormikromilieu unterdrückt gegen den Tumor gerichtete Immunantworten und führt zu T-Zell Anergie und Seneszenz (Clark et al., 2009, Kleeff et al., 2016). In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen durch lösliche Faktoren in Panc02 und T110299 Kulturüberständen in ihrer Proliferation deutlich gehemmt wurden. Bereits die Zugabe von 3% Überstand zum Kulturmedium resultierte in einer Suppression der T-Zellproliferation von mehr als 50%. Wie zu erwarten zeigte auch die Zugabe

von TGF- β einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Hier lag die Suppressivität bei 40% bzw. bis zu 70%.

Panc02 Tumore produzieren große Mengen an TGF- β , was sich auch *in vivo* in hohen TGF- β Serumkonzentrationen in Panc02-tumortragenden Mäusen widerspiegelt (Ellermeier et al., 2013). In der Literatur finden sich Hinweise, dass TGF- β die Entwicklung von T_{regs} aus CD4⁺ T-Zellen begünstigt, Apoptose in Effektor-T-Zellen induziert, die Zytokinproduktion in zytotoxischen T-Zellen hemmt, zur Runterregulation des IL-2-Rezeptors auf T-Zellen führt sowie an der Induktion von IDO beteiligt ist (Belladonna et al., 2008, Rubtsov and Rudensky, 2007).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass TGF- β die Expression von IDO1 in T-Zellen induziert, jedoch im geringeren Ausmaß wie die Tumorüberstände, woraus sich schließen lässt, dass sich im Tumorüberstand weitere lösliche Faktoren befinden, die IDO1 induzieren. Das Zytokin IL-6, welches ebenfalls von Tumorzellen sezerniert wird, zeigte weder alleine noch zusammen mit TGF- β eine signifikante IDO1 Induktion. Umfassende Sekretomanalysen der Tumorzellen könnten diesbezüglich weiteren Aufschluss liefern. Mit verschiedenen Inhibitoren wurde zunächst der Einfluss von TGF- β sowie der IDO1- Kynurenin-AHR Signalkaskade anhand der T-Zell-Proliferation in Anwesenheit von Tumorzellüberstand untersucht. Für die Hemmung von TGF- β benutzten wir den *small molecule inhibitor* LY-2157299, auch Galunisertib genannt. Galunisertib ist ein Inhibitor der TGF- β -Rezeptor-I-Kinase, der spezifisch die Phosphorylierung von SMAD2 hemmt. In verschiedenen Tiermodellen zu Brustkrebs, Darmkrebs oder dem hepatozellulären Karzinom konnte für Galunisertib bereits eine antitumorale Wirkung beschrieben werden (Herbertz et al., 2015). Wir beobachteten, dass durch die Inkubation der T-Zellen mit 10 μ M LY-2157299 vor Zugabe des T110299 Tumorüberstands die Proliferation der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen partiell verbessert werden konnte, wohingegen kein positiver Effekt bei den mit Panc02 Überstand behandelten T-Zellen gesehen wurde. Letzteres war überraschend, da Panc02 hohe Level von TGF- β produzieren (Ellermeier et al., 2013). Offensichtlich spielen hier andere Faktoren im Tumorüberstand eine wesentlich größere inhibitorische Rolle als TGF- β . Für den inhibitorischen Effekt der T110299 Zelllinie hingegen scheint TGF- β durchaus wichtig zu sein.

Um die Rolle von IDO1 diesbezüglich zu analysieren, kamen die beiden IDO-Inhibitoren D-1-MT und INCB 024360 zum Einsatz. D-1-MT (1-Methyltryptophan) ist aufgrund seiner Ähnlichkeit zu Tryptophan ein kompetitiver IDO-Inhibitor, der bereits in klinischen Studien bei

Tumorpatienten erprobt wurde (NCT02077881). Wir haben uns für das D-Isomer entschieden, da dieses einen größeren Einfluss auf die T-Zell-Proliferation hat. INCB 024360 (Epacadostat) ist ein weiterer *small molecule inhibitor*, der IDO aufgrund höherer Affinität im Vergleich zu Tryptophan blockt (Koblish et al., 2010, Moon et al., 2015). Dieser wird derzeit in Kombinationstherapieansätzen mit Checkpoint-Inhibitoren in klinischen Phase I und II Studien (NCT03006302) getestet. In unseren Versuchen inkubierten wir die T-Zellen mit D-1-MT bzw. INCB 024360 bevor der Tumorüberstand dazugegeben wurde. D-1-MT konnte die durch Panc02 Überstand gehemmte Proliferation der CD4⁺ T-Zellen um circa 15% und die der CD8⁺ T-Zellen um knapp 30% anheben, während die Proliferationshemmung in der T110299 Gruppe nahezu unbeeinflusst blieb. Der *small molecule inhibitor* INCB 024360 führte überraschenderweise zu keiner verbesserten Proliferation. Diese Ergebnisse zeigen, dass unterschiedliche Mechanismen bezüglich der T-Zellsuppression bei den verschiedenen Tumorzelllinien überwiegen, wobei TGF- β eine wichtigere Rolle bei T110299 und IDO1 bei Panc02 Zellen zu spielen scheint.

4.4 Ausblick und mögliche Relevanz für die Immuntherapie des Pankreaskarzinoms

Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass neben der enzymatischen Funktion IDO1 auch eine potenzielle Funktion als *signalling molecule* über sogenannte ITIMs (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*) hat. Bislang wurden zwei verschiedene ITIMs, ITIM1 und ITIM2 in IDO1 nachgewiesen, welche im phosphorylierten Zustand als Andockstelle für verschiedene Proteine dienen können. Ein identifizierter Ligand ist SOCS3, welcher als *feedback-inhibitor* von IL-6 bekannt ist (Orabona et al., 2012). Während es bereits eine Vielzahl an Studien über die enzymatische Funktion von IDO gibt, beschäftigen sich lediglich ein paar wenige Studien mit der Funktion als *signalling molecule*. Für die Zukunft sind deshalb weitere Studien, z.B. mit IDO1-*knockout*-Mäusen, erforderlich, um mehr Klarheit über die komplexen Wirkungen von IDO1 in der Immunregulation zu bekommen.

Des Weiteren ist der vollständige Einfluss von IDO1 auf die Funktionalität von T-Zellen noch relativ unklar. In dieser Arbeit wurde u.a. gezeigt, dass mittels IDO-Inhibitoren eine verbesserte Proliferation von T-Zellen nach Tumorüberstandzugabe erreicht werden konnte. Um jedoch eine detailliertere Analyse vornehmen zu können, erscheinen Versuchsmodelle mit *knockout*-Mäusen bzw. *CRISP-Cas9 Gene editing* in humanen T-Zellen sinnvoll. In neuen Entwicklungen der Immuntherapie werden mittels dem adoptivem Transfer von CAR T-Zellen bei überwiegend nicht-soliden Tumoren erstaunliche klinische Erfolge erzielt. Für solide Tumore bleibt der

erwünschte Erfolg jedoch aus, möglicherweise aufgrund des für T-Zellen feindlichen Milieus im Tumorstroma. Hier könnte die TGF β -IDO1-AHR Achse im Tumor eine zentrale Rolle spielen. Die Generierung von IDO1-defizienten CAR-T-Zellen wäre ein interessanter Therapieansatz, der derzeit in präklinischen Tumormodellen in unserer Arbeitsgruppe verfolgt wird. Ebenso kann die Rolle von IDO1 hinsichtlich Migration, Persistenz und Funktionalität der T-Zellen *in vivo* in Pankreastumormodellen anhand von IDO1-*knockout*-Mäusen untersucht werden.

Nachdem IDO1 bereits vor Jahrzehnten in DCs und vor wenigen Jahren in B-Zellen nachgewiesen wurde, konnte in dieser Arbeit erstmals IDO1 in T-Zellen in murinen Tumormodellen nachgewiesen werden (Johnson et al., 2009, Nouel et al., 2015). In der Literatur existieren bislang nur sehr wenige Hinweise auf eine Expression von IDO1 in T-Zellen. Weitere Untersuchungen zur Regulation und Funktion von IDO1 in T-Zellen sind aus unserer Sicht unabdingbar.

5. Zusammenfassung

Die Grundlage für die Tumorummuntherapie ist die Annahme, dass Immunzellen in der Lage sind, Krebszellen spezifisch zu erkennen und zu eliminieren. Das Pankreaskarzinom zeichnet sich durch ein besonders immunsuppressives Milieu aus, wodurch Immunzellen, insbesondere Effektor-T-Zellen, in ihrer Funktion gehemmt sind. Für die Entwicklung neuer Therapien ist daher ein besseres Verständnis der Mechanismen der tumorinduzierten Immunsuppression essenziell. Indolamin-2,3-Dioxygenase-1 (IDO1) ist ein Enzym, welches im Tumormilieu immunsuppressive Funktionen ausübt. IDO1, sowie die Isoenzyme IDO2 und Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO), regulieren den Abbau der essenziellen Aminosäure Tryptophan zu Kynureninen. Der Mangel an Tryptophan und akkumulierende Kynurenine führen über verschiedene Signalwege zur T-Zellenergie und -apoptose. Über die Expression von IDO1 in Tumorzellen finden sich in der Literatur Berichte. Unbekannt ist hingegen, ob IDO1 auch von T-Zellen unter bestimmten Umständen im Tumorgewebe exprimiert werden kann.

Zuerst wurden verschiedene murine und humane Pankreastumorzelllinien auf die Expression von IDO1, IDO2 und TDO, sowie den Kynurenin-Rezeptor Arylhydrocarbonrezeptor (AHR), vor und nach Stimulation mit IFN- γ untersucht. Es zeigte sich, dass in den murinen Zelllinien Panc02 und T110299 und in der humanen Zelllinie MIA-Paca-2 die Expression von IDO1, sowie in allen untersuchten murinen Zelllinien und in den humanen Zelllinien Capan-2 und IMIM-PC1 die Expression von AHR durch IFN- γ induzierbar ist. Um herauszufinden, ob die Tumorzelllinien einen funktionellen Kynurenin-AHR-Signalweg besitzen, wurden die Zelllinien mit Kynurenin stimuliert und anschließend die Expression der AHR-Zielgene TIPARP und CYP1A1 analysiert. AHR-Zielgene wurden in allen Zelllinien durch die Stimulation mit Kynurenin signifikant hochreguliert, was einen intakten Kynurenin-AHR-Signalweg belegt.

Interessanterweise stellte sich heraus, dass IDO1 auch in T-Zellen unter bestimmten Bedingungen exprimiert wird. *In vitro* konnte die Induktion von IDO1 in murinen T-Zellen durch TGF- β und Überstände von Pankreastumorzellen auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden. Ebenfalls induzierten Tumorüberstände humaner Pankreastumorzellen die Expression von IDO1 in humanen T-Zellen. Der Kynurenin-AHR-Signalweg zeigte sich auch in den T-Zellen funktionell aktiv. In murinen und humanen T-Zellen fand sich nach Zugabe von Kynurenin eine erhöhte Expression der AHR-Zielgene TIPARP und AHR. Des Weiteren zeigte sich nach Inkubation der T-Zellen mit dem AHR-Antagonisten CH223191 eine verminderte IDO1-Expression durch Tumorüberstand, was für einen positiven *feedback loop* spricht (siehe Abb. 23).

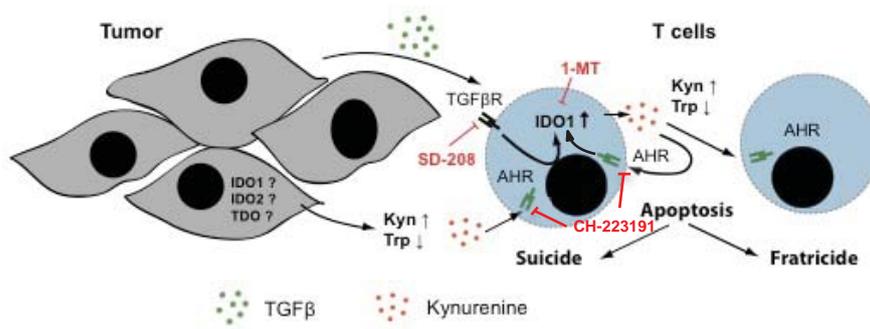


Abb. 23 Schematische Darstellung der TGF- β /IDO-Achse und des Kynurenin-AHR-Signalwegs mit positivem *feedback loop* und verwendeten Inhibitoren.

Um die Expression von IDO1 in tumorinfiltrierenden T-Zellen auch *in vivo* nachzuweisen, isolierten wir aus Mäusen mit Pankreastumoren (KPC-Modell) T-Zellen aus dem Tumor und der Milz. Auf mRNA-Ebene sahen wir in den tumorinfiltrierenden T-Zellen eine signifikant höhere Expression von IDO1 als in T-Zellen aus Milzen tumortragender bzw. tumorfreier Mäuse. In der KPC-Maus zeigten auch die aus der Milz isolierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen eine verstärkte IDO1-Expression im Vergleich zu T-Zellen aus tumorfreien Mäusen.

Es stellte sich nun die Frage, ob IDO1 in den T-Zellen auch funktionell aktiv ist. Hierzu wurde der Einfluss von IDO1 auf die proliferative Kapazität der T-Zellen untersucht. Tumorüberstände von Panc02- und T110299-Zellen hemmten deutlich die Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Interessanterweise verbesserte sich durch den Einsatz des IDO1-Inhibitors D-1-MT die Proliferation von T-Zellen in Anwesenheit von Tumorüberstand, was auf eine T-Zell-inhibitorische Funktion von IDO1 hinweist, die therapeutisch zugänglich ist.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit erstmals, dass in T-Zellen durch Kontakt mit Tumorzell-sezernierten Faktoren sowie im Tumormikromilieu *in vivo* eine IDO1 Expression induziert werden kann. Da es sich bei IDO1 um ein immunsuppressives Enzym handelt, könnte die gezielte Hemmung bzw. genetische Deletion von IDO1 in adoptiv transferierten T-Zellen, wie z.B. CAR-T-Zellen, einen neuen Therapieansatz darstellen, um die tumorinduzierte Immunsuppression zu durchbrechen.

6. Literaturverzeichnis

- Adunka T. Characterization of murine pancreatic carcinoma models regarding immunosuppressive mechanisms and therapy with bifunctional siRNA targeting galectin-1. *Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät* 2014
urn:nbn:de:bvb:19-174491
- Andersen M H, Schrama D, Thor Straten P & Becker J C. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 32-41.
- Austyn J M. Antigen uptake and presentation by dendritic leukocytes. *Semin Immunol* 1992; 4:227-236
- Beatty G L, Chiorean E G, Fishman M P, Saboury B, Teitelbaum U R, Sun W, . . . Vonderheide R H. CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. *Science* 2011; 331:1612-1616
- Beatty G L, O'Dwyer P J, Clark J, Shi J G, Bowman K J, Scherle P A, . . . Gajewski T F. First-in-human phase I Study of the oral inhibitor of Indoleamine 2,3-Dioxygenase-1 Epacadostat (INCB024360) in patients with advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res* 2017; 13:3269-3276
- Belladonna M L, Volpi C, Bianchi R, Vacca C, Orabona C, Pallotta M T, . . . Puccetti P. Cutting edge: Autocrine TGF-beta sustains default tolerogenesis by IDO-competent dendritic cells. *J Immunol* 2008; 181:5194-5198
- Bi W W, Zhang W H, Yin G H, Luo H, Wang S Q, Wang H, . . . Nie D Z. Analysis of indoleamine 2-3 dioxygenase (IDO) and EGFR co-expression in breast cancer tissue by immunohistochemistry. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15:5535-5538
- Bierie B and Moses H L. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:506-520
- Blank C U and Enk A. Therapeutic use of anti-CTLA-4 antibodies. *Int Immunol* 2015; 27:3-10
- Brahmer J R, Tykodi S S, Chow L Q, Hwu W J, Topalian S L, Hwu P, . . . Wigginton J M. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012; 366: 2455-2465
- Bronte V, Serafini P, Mazzoni A, Segal D M and Zanovello P. L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends Immunol* 2003; 24:302-306
- Brunet J F, Denizot F, Luciani M F, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei M G and Golstein P. A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature* 1987; 328:267-270
- Burnet F M. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 1970; 13:1-27
- Burriss H A, 3rd, Moore M J, Andersen J, Green M R, Rothenberg M L, Modiano M R, . . . Von Hoff D D. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line

- therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1997; 15:2403-2413
- Cedeno-Laurent F and Dimitroff C J. Galectin-1 research in T cell immunity: past, present and future. *Clin Immunol* 2012; 142:107-116
- Chen D S and Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 2013; 39:1-10
- Chen L and Flies D B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:227-242
- Chu G C, Kimmelman A C, Hezel A F and DePinho R A. Stromal biology of pancreatic cancer. *J Cell Biochem* 2007; 101:887-907
- Chuang H C, Lan J L, Chen D Y, Yang C Y, Chen Y M, Li J P, . . . Tan T H. The kinase GLK controls autoimmunity and NF-kappaB signaling by activating the kinase PKC-theta in T cells. *Nat Immunol* 2011; 12:1113-1118
- Clark C E, Beatty G L and Vonderheide R H. Immunosurveillance of pancreatic adenocarcinoma: insights from genetically engineered mouse models of cancer. *Cancer Lett* 2009; 279:1-7
- Clark C E, Hingorani S R, Mick R, Combs C, Tuveson D A and Vonderheide R H. Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion. *Cancer Res* 2007; 67:9518-9527
- Condeelis J and Pollard J W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 2006; 124:263-266
- Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouche O, Guimbaud R, Becouarn Y, . . . Intergroup P. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2011; 364:817-1825
- Cubilla A L and Fitzgerald P J. Cancer of the exocrine pancreas: the pathologic aspects. *CA Cancer J Clin* 1985; 35:2-18
- Curiel T J, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, . . . Zou W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004; 10:942-949
- Derynck R, Jarrett J A, Chen E Y, Eaton D H, Bell J R, Assoian R K, . . . Goeddel D V. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 1985; 316:701-705
- Distler M, Aust D, Weitz J, Pilarsky C and Grutzmann R. Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN. *Biomed Res Int* 2014; 2014:474-905
- Dodson L F, Hawkins W G and Goedegebuure P. Potential targets for pancreatic cancer immunotherapeutics. *Immunotherapy* 2011; 3:517-537

- Ellermeier J, Wei J, Duewell P, Hoves S, Stieg M R, Adunka T, . . . Schnurr M. Therapeutic efficacy of bifunctional siRNA combining TGF-beta1 silencing with RIG-I activation in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2013; 73:1709-1720
- Ezekowitz R A B and Hoffmann J A. Innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1996; 8:1-2
- Fallarino F, Grohmann U, Hwang K W, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, . . . Puccetti P. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4:1206-1212
- Fallarino F, Grohmann U and Puccetti P. Indoleamine 2,3-dioxygenase: from catalyst to signaling function. *Eur J Immunol* 2012; 42:1932-1937
- Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A, . . . Puccetti P. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ* 2002; 9:1069-1077
- Feig C, Gopinathan A, Neesse A, Chan D S, Cook N and Tuveson D A. The pancreas cancer microenvironment. *Clin Cancer Res* 2012; 18:4266-4276
- Gabrilovich D I, Velders M P, Sotomayor E M and Kast W M. Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *J Immunol* 2001; 166:5398-5406
- Grohmann U, Fallarino F and Puccetti P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol* 2003; 24:242-248
- Hayaishi O. Properties and function of indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Biochem* 1976; 79:13P-21P
- Herbertz S, Sawyer J S, Stauber A J, Gueorguieva I, Driscoll K E, Estrem S T, . . . Lahn M M. Clinical development of galunisertib (LY2157299 monohydrate), a small molecule inhibitor of transforming growth factor-beta signaling pathway. *Drug Des Devel Ther* 2015; 9:4479-4499
- Hidalgo M and Von Hoff D D. Translational therapeutic opportunities in ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res* 2012; 18:4249-4256
- Hingorani S R, Petricoin E F, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz M A, . . . Tuveson D A. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 2003; 4:437-450
- Huang B, Pan P Y, Li Q, Sato A I, Levy D E, Bromberg J, . . . Chen S H. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res* 2006; 66:1123-1131
- Ikemoto T, Shimada M, Komatsu M, Yamada S, Saito Y, Mori H, . . . Utsunomiya T. Indoleamine 2,3-dioxygenase affects the aggressiveness of intraductal papillary mucinous neoplasms through Foxp3+CD4+CD25+ T cells in peripheral blood. *Pancreas* 2013; 42:130-134

- Janeway C A, Jr and Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:197-216
- Johnson B A, 3rd, Baban B and Mellor A L. Targeting the immunoregulatory indoleamine 2,3 dioxygenase pathway in immunotherapy. *Immunotherapy* 2009; 1:645-661
- Keane M G, Horsfall L, Rait G and Pereira S P. A case-control study comparing the incidence of early symptoms in pancreatic and biliary tract cancer. *BMJ Open* 2014; 4:e005720
- Kleeff J, Korc M, Apte M, La Vecchia C, Johnson C D, Biankin A V, . . . Neoptolemos J P. Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2016; 2:16022
- Koblish H K, Hansbury M J, Bowman K J, Yang G, Neilan C L, Haley P J, . . . Fridman J S. Hydroxyamidine inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase potently suppress systemic tryptophan catabolism and the growth of IDO-expressing tumors. *Mol Cancer Ther* 2010; 9:489-498
- Koebel C M, Vermi W, Swann J B, Zerafa N, Rodig S J, Old L J, . . . Schreiber R D. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 2007; 450:903-907
- Kornek G V, Potter R, Selzer E, Schratte A, Ulrich-Pur H, Rogy M, . . . Scheithauer W. Combined radiochemotherapy of locally advanced unresectable pancreatic adenocarcinoma with mitomycin C plus 24-hour continuous infusional gemcitabine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 49:665-671
- Le D T, Lutz E, Uram J N, Sugar E A, Onners B, Solt S, . . . Laheru D A. Evaluation of ipilimumab in combination with allogeneic pancreatic tumor cells transfected with a GM-CSF gene in previously treated pancreatic cancer. *J Immunother* 2013; 36:382-389
- Litzenburger U M, Opitz C A, Sahm F, Rauschenbach K J, Trump S, Winter M, . . . Platten M. Constitutive IDO expression in human cancer is sustained by an autocrine signaling loop involving IL-6, STAT3 and the AHR. *Oncotarget* 2014; 5:1038-1051
- Liu H, Shen Z, Wang Z, Wang X, Zhang H, Qin J, . . . Sun Y. Increased expression of IDO associates with poor postoperative clinical outcome of patients with gastric adenocarcinoma. *Sci Rep* 2016; 6:21319
- MacPherson L, Tamblyn L, Rajendra S, Bralha F, McPherson J P and Matthews J. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin poly(ADP-ribose) polymerase (TiPARP, ARTD14) is a mono-ADP-ribosyltransferase and repressor of aryl hydrocarbon receptor transactivation. *Nucleic Acids Res* 2013; 41:1604-1621
- Mahadevan D and Von Hoff D D. Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther* 2007; 6:1186-1197
- Medzhitov R and Janeway C A, Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997; 9:4-9

- Melani C, Chiodoni C, Forni G and Colombo M P. Myeloid cell expansion elicited by the progression of spontaneous mammary carcinomas in c-erbB-2 transgenic BALB/c mice suppresses immune reactivity. *Blood* 2003; 102:2138-2145
- Metz R, Rust S, Duhadaway J B, Mautino M R, Munn D H, Vahanian N N, . . . Prendergast G C. IDO inhibits a tryptophan sufficiency signal that stimulates mTOR: A novel IDO effector pathway targeted by D-1-methyl-tryptophan. *Oncoimmunology* 2012; 1:1460-1468
- Mimura J and Fujii-Kuriyama Y. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1619:263-268
- Moon Y W, Hajjar J, Hwu P and Naing A. Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer. *J Immunother Cancer* 2015; 3:51
- Moore M J, Goldstein D, Hamm J, Figier A, Hecht J R, Gallinger S, . . . G. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2007; 25:1960-1966
- Muller A J, DuHadaway J B, Donover P S, Sutanto-Ward E and Prendergast G C. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nat Med* 2005; 11:312-319
- Muller A J and Prendergast G C. Indoleamine 2,3-dioxygenase in immune suppression and cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; 7:31-40
- Munn D H, Sharma M D, Baban B, Harding H P, Zhang Y, Ron D and Mellor A L. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity* 2005; 22:633-642
- Munn D H, Sharma M D, Lee J R, Jhaver K G, Johnson T S, Keskin D B, . . . Mellor A L. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* 2002; 297:1867-1870
- Neoptolemos J P, Stocken D D, Friess H, Bassi C, Dunn J A, Hickey H, . . . C. European Study Group for Pancreatic. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2004; 350:1200-1210
- Nouel A, Pochard P, Simon Q, Segalen I, Le Meur Y, Pers J O and Hillion S. B-Cells induce regulatory T cells through TGF-beta/IDO production in A CTLA-4 dependent manner. *J Autoimmun* 2015; 59:53-60
- Oettle H, Neuhaus P, Hochhaus A, Hartmann J T, Gellert K, Ridwelski K, . . . Riess H. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. *JAMA* 2013; 310:1473-1481
- Okusaka T, Ito Y, Ueno H, Ikeda M, Takezako Y, Morizane C, . . . Ikeda H. Phase II study of radiotherapy combined with gemcitabine for locally advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2004; 91:673-677

- Opitz C A, Litzenburger U M, Sahn F, Ott M, Tritschler I, Trump S, . . . Platten M. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 2011; 478:197-203
- Orabona C, Pallotta M T and Grohmann U. Different partners, opposite outcomes: a new perspective of the immunobiology of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Mol Med* 2012; 18:834-842
- Otsuji M, Kimura Y, Aoe T, Okamoto Y and Saito T. Oxidative stress by tumor-derived macrophages suppresses the expression of CD3 zeta chain of T-cell receptor complex and antigen-specific T-cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:13119-13124
- Pallotta M T, Orabona C, Volpi C, Vacca C, Belladonna M L, Bianchi R, . . . Grohmann U. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol* 2011; 12:870-878
- Palucka K and Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer* 2012; 12:265-277
- Palucka K and Banchereau J. Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. *Immunity* 2013; 39:38-48
- Pan K, Wang H, Chen M S, Zhang H K, Weng D S, Zhou J, . . . Xia J C. Expression and prognosis role of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134:1247-1253
- Portal A, Pernot S, Tougeron D, Arbaud C, Bidault A T, de la Fouchardiere C, . . . Taieb J. Nab-paclitaxel plus gemcitabine for metastatic pancreatic adenocarcinoma after Folfirinox failure: an AGEO prospective multicentre cohort. *Br J Cancer* 2015; 113:989-995
- Prendergast G C, Malachowski W J, A Mondal, Scherle P and Muller A J. Indoleamine 2,3-Dioxygenase and its therapeutic inhibition in cancer. *Int Rev Cell Mol Biol* 2018; 336:175-203
- Provenzano P P, Cuevas C, Chang A E, Goel V K, Von Hoff D D and Hingorani S R. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2012; 21:418-429
- Rubtsov Y P and Rudensky A Y. TGFbeta signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:443-453
- Russell J H and Ley T J. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:323-370
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, . . . Takahashi T. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 2001; 182:18-32

- Schnare M, Barton G M, Holt A C, Takeda K, Akira S and Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2001; 2:947-950
- Schneider H, Downey J, Smith A, Zinselmeyer B H, Rush C, Brewer J M, . . . Rudd C E. Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. *Science* 2006; 313:972-1975
- Siegel R L, Miller K D and Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 2017; 67:7-30
- Soliman H H, Minton S E, Han H S, Ismail-Khan R, Neuger A, Khambati F, . . . Antonia S J. A phase I study of indoximod in patients with advanced malignancies. *Oncotarget* 2016; 7:22928-22938
- Soreide K and Sund M. Epidemiological-molecular evidence of metabolic reprogramming on proliferation, autophagy and cell signaling in pancreas cancer. *Cancer Lett* 2015; 356:281-288
- Stevens E A, Mezrich J D and Bradfield C A. The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system. *Immunology* 2009; 127:299-311
- Tang D, Yuan Z, Xue X, Lu Z, Zhang Y, Wang H, . . . Jiang K. High expression of Galectin-1 in pancreatic stellate cells plays a role in the development and maintenance of an immunosuppressive microenvironment in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2012; 130:2337-2348
- Vogel C F, Goth S R, Dong B, Pessah I N and Matsumura F. Aryl hydrocarbon receptor signaling mediates expression of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 375:331-335
- Von Hoff D D, Ervin T, Arena F P, Chiorean E G, Infante J, Moore M, . . . Renschler M F. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med* 2013; 369:1691-1703
- Vonderheide R H and Bayne L J. Inflammatory networks and immune surveillance of pancreatic carcinoma. *Curr Opin Immunol* 2013; 25:200-205
- Wei P, Hu G H, Kang H Y, Yao H B, Kou W, Liu H, . . . Hong S L. An aryl hydrocarbon receptor ligand acts on dendritic cells and T cells to suppress the Th17 response in allergic rhinitis patients. *Lab Invest* 2014; 94:528-535
- Whatcott C J, Han H and Von Hoff D D. Orchestrating the tumor microenvironment to improve survival for patients with pancreatic cancer: normalization, not destruction. *Cancer J* 2015; 21:299-306
- Witkiewicz A, Williams T K, Cozzitorto J, Durkan B, Showalter S L, Yeo C J and Brody J R. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection. *J Am Coll Surg* 2008; 206:849-854;

- Woo E Y, Chu C S, Goletz T J, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, . . . June C H. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2001; 61:4766-4772
- Wyckoff J, Wang W, Lin E Y, Wang Y, Pixley F, Stanley E R, . . . Condeelis J. A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res* 2004; 64:7022-7029
- Yasui H, Takai K, Yoshida R and Hayaishi O. Interferon enhances tryptophan metabolism by inducing pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase: its possible occurrence in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83:6622-6626
- Yen T W, Aardal N P, Bronner M P, Thorning D R, Savard C E, Lee S P and Bell R H, Jr. Myofibroblasts are responsible for the desmoplastic reaction surrounding human pancreatic carcinomas. *Surgery* 2002; 131:129-134
- Zhang T, Tan X L, Xu Y, Wang Z Z, Xiao C H and Liu R. Expression and prognostic value of Indoleamine 2,3-dioxygenase in pancreatic cancer. *Chin Med J (Engl)* 2017; 130:710-716

7. Verzeichnis der Abkürzungen

AHR	Arylhydrocarbonrezeptor
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BSA	Bovines Serumalbumin
CAR	Chimärer Antigenrezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (CD-Antigen)
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidylester
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i>
DC	Dendritische Zelle
D-1-MT	D-1-Methyltryptophan
DMEM	Dulbeccos's Modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPMN	Intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie
i.v.	Intravenös
KYN	Kynurenin
Kras	V-Ki-ras 2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MCN	Muzinöse zystische Neoplasie
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cell</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>

NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NSCLC	<i>Non small-cell lung cancer</i>
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBMC	Mononukleäre Zellen der peripheren Blutes
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PDAC	Duktales Adenokarzinom des Pankreas
pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PD-L1	<i>Programmed cell death ligand 1</i>
PGE2	Prostaglandin E ₂
PI	Propidiumiodid
PSC	Pankreas-Sternzelle
qRT-PCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Kulturmedium)
RT	Raumtemperatur
s.c.	Subkutan
SD	Standardabweichung
SEM	<i>Standard error of mean</i>
TAM	Tumorassoziierte Makrophagen
TBST	<i>TRIS-buffered saline</i> mit <i>Tween 20</i>
TCDD	Tetrachlordibenzodioxin
TCR	T-Zell-Rezeptor
TDO	Tryptophan-2,3-Dioxygenase
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
T _H -Zellen	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zellen
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

8. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Max Schnurr bedanken für die Überlassung des Themas, der steten Unterstützung, den Anregungen und Korrekturen dieser Arbeit. Ich habe durch Herrn Prof. Schnurr eine nicht nur wissenschaftliche sondern auch menschliche Begleitung erfahren dürfen, für die ich sehr dankbar bin.

Mein Dank geht an Prof. Stefan Endres für die Möglichkeit, im Rahmen des Programms „Förderung von Forschung und Lehre“ der LMU München in der Abteilung für Klinische Pharmakologie meine Dissertation abzulegen. Für die finanzielle Unterstützung dadurch bin ich ebenfalls sehr dankbar.

Frau Dr. rer. biol. hum. Tina Adunka hat mir als Betreuerin dieser Arbeit zu jeder Zeit mit großem Engagement zur Seite gestanden. Angefangen von der zeitintensiven Einarbeitung beim Erlernen der erforderlichen Methoden im Labor bis hin zur Ergebnisauswertung oder dem Vorbereiten von Präsentationen und vielem mehr hat sie zum Gelingen dieser Arbeit entscheidend mitgeholfen. Ich bedanke mich ganz herzlich für diese wertvolle und durchaus mehr als kollegiale Unterstützung.

Aus meiner Arbeitsgruppe möchte ich speziell Herrn PD Dr. rer. biol. hum. Peter Düwell für die Mitbetreuung meines Projekts sowie Frau Sabrina Kirchleitner und Frau Christine Hörth für die freundschaftliche Zusammenarbeit im Labor und ihre stetige Hilfsbereitschaft danken. Herrn Max Knott und Herrn Moritz Schmidbauer gilt mein größter Dank für eine sicherlich unvergessliche Zeit im Labor und eine beständige Freundschaft.

Bei dem gesamten Team der Abteilung für Klinische Pharmakologie möchte ich mich für ein motiviertes und zugleich lockeres, zwischenmenschlich angenehmes Arbeitsklima bedanken.

Herrn Dr. med. Michael Hristov gebührt ebenfalls ein großes Dankeschön für seine stetige Hilfsbereitschaft beim FACSORT.

Mein Dank gilt zudem meinen Eltern sowie meinem Verlobten Eddy, die mich immer unterstützt haben und einen großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beitragen.

Eidesstattliche Versicherung

Schuhbaum, Sabrina

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

— dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Expression und Funktion von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) und Arylhydrocarbonrezeptor (AHR) in Tumorzellen und T-Zellen im Pankreaskarzinom

— selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 3.11.2020

Ort, Datum

Sabrina Schuhbaum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand