

Aus dem Labor für Tumorimmunologie,
LIFE-Zentrum
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. A. Hofstetter

Prognostische Bedeutung der Expression von Indoleamine-2,3-
dioxygenase (IDO) in Endothelzellen klarzelliger
Nierenzellkarzinome

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

vorgelegt von
Oliver Spring

aus Calw

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Zimmermann
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. J. E. Scherberich Prof. Dr. M. Fischereder
Dekan:	Prof. Dr. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	21.02.2008

*In Dankbarkeit gewidmet,
meinen Großeltern für die Wurzeln,
meinen Eltern für die Unterstützung
und meiner Freundin für ihre Liebe.*

1	EINLEITUNG	1
1.1	DAS NIERENZELLKARZINOM (RCC)	1
1.1.1	<i>Epidemiologie</i>	1
1.1.2	<i>Klassifikationen und Prognosefaktoren.....</i>	1
1.1.3	<i>Symptome und Diagnostik.....</i>	4
1.1.4	<i>Chirurgische Therapie</i>	5
1.1.5	<i>Strahlen- und systemische Therapie</i>	5
1.1.6	<i>Immune escape Mechanismen.....</i>	7
1.2	INDOLEAMINE-2,3-DIOXYGENASE (IDO)	10
1.2.1	<i>Molekulargenetische und biochemische Eigenschaften von IDO</i>	10
1.2.2	<i>Der Abbau von Tryptophan.....</i>	12
1.2.3	<i>IDO und die Rolle im Immunsystem</i>	13
1.2.4	<i>Potentieller Wirkmechanismus von IDO</i>	15
1.2.5	<i>IDO in malignen Gewebe.....</i>	18
1.3	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	20
2	MATERIALIEN	21
2.1	PATIENTEN.....	21
2.2	GERÄTE.....	22
2.3	HÄUFIG VERWENDETE MATERIALIEN	23
2.4	CHEMIKALIEN UND BIOLOGISCHE REAGENZIEN.....	23
2.5	KITS	24
3	METHODEN.....	25
3.1	AUFARBEITUNG DES PATIENTENMATERIALS.....	25
3.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	25
3.2.1	<i>RNA-Isolierung aus Gewebe</i>	25
3.2.2	<i>Qualitätskontrolle der RNA</i>	26
3.2.3	<i>Reverse Transkription.....</i>	29
3.2.4	<i>Polymerasen-Kettenreaktion (PCR).....</i>	30
3.2.5	<i>Elektrophorese im Agarosegel.....</i>	31
3.2.6	<i>Quantitative Real-time-PCR</i>	33
3.3	IMMUNHISTOCHEMISCHE METHODEN	37

4	ERGEBNISSE	40
4.1	QUALITÄTSKONTROLLE DER RNA	40
4.2	NACHWEIS VON IDO-MRNA IM RCC-GEWEBE	40
4.2.1	<i>Semiquantitative Bestimmung von IDO-mRNA mittels RT-PCR</i>	40
4.2.2	<i>Quantitative Bestimmung von IDO-mRNA in RCC- und tumorfreiem Nieren-Gewebe</i>	42
4.3	IMMUNHISTOCHEMIE	45
4.3.1	<i>RCC-Endothelzellen und IDO-Expression</i>	45
4.4	FOLLOW-UP	50
5	DISKUSSION	54
5.1	KONTROLLMECHANISMEN DER IDO-EXPRESSION	54
5.2	IDO-EXPRESSION IN RCC-ZELLEN	55
5.3	IDO ALS PROGNOTISCHER MARKER	57
5.4	THERAPIE MIT IDO-INHIBITOREN	58
5.5	VORSCHLAG FÜR WEITERE EXPERIMENTE ZUR UNTERSUCHUNG DER ROLLE VON IDO	59
6	ZUSAMMENFASSUNG	61
7	LITERATURVERZEICHNIS	63
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	72
9	DANKSAGUNG	74
10	LEBENS LAUF	75

1 Einleitung

1.1 Das Nierenzellkarzinom (RCC)

1.1.1 Epidemiologie

Das Nierenzellkarzinom (*renal cell carcinoma*, RCC) ist nach dem Prostata- und dem Harnblasenkarzinom das dritthäufigste urologische Malignom. In der Bundesrepublik Deutschland erkranken jährlich ungefähr 14.000 Menschen, das entspricht einem Anteil von 1-2% aller soliden Tumoren. In letzter Zeit wurde in Deutschland eine steigende Inzidenz beobachtet. Sie liegt derzeit bei ca. 17 für Männer und 7 für Frauen je 10⁵ Einwohner pro Jahr. Der Häufigkeitsgipfel dieser Erkrankung liegt zwischen dem 55. und 70. Lebensjahr. Die 1-Jahres-Überlebensrate im metastasierten Stadium ohne weitere Behandlung liegt bei 15%. Spontane Remissionen werden in 0,2 - 0,5% der Fälle beschrieben.

1.1.2 Klassifikationen und Prognosefaktoren

Seit der pathomorphologischen Erstbeschreibung von Nierentumoren durch Grawitz im Jahr 1883, ist eine Fülle von Klassifikationsvorschlägen zur Subtypisierung der epithelialen Nierenzellkarzinome vorgelegt worden. Von Aplitz führte 1943 erstmals ein Einteilungsschema nach zytomorphologischen Gesichtspunkten ein. In den 70er Jahren wurde die Einteilung nach Mostofi mit klarzelligen und granulärzelligen Formen favorisiert. Schließlich veröffentlichte Thoenes Mitte der 80er Jahre eine auf zytomorphologischen Kriterien und Wachstumsmustern basierende Unterteilung [Thoenes and Storkel, 1991]. Diese an mikroskopischen Kriterien ausgerichtete Klassifikation wurde in der Folge durch immunhistologische Untersuchungen bestätigt und ihre histogenetische Bedeutung herausgestellt. Die von Thoenes begründete Mainz-Klassifikation wurde im Jahr 1997 von der *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) unter Federführung von Storkel modifiziert [Storkel et al., 1997].

Histologisch wird im Wesentlichen zwischen klarzelligen, papillären, chromophoben und Sammelrohr-Karzinomen unterschieden. Klarzellige und papilläre Karzinome haben ihren Ursprung im proximalen Tubulus der Niere. Chromophobe und Sammelrohr-Karzinome entstehen aus den abführenden Sammelrohren.

1. Einleitung

Tabelle 1: UICC-Klassifikation der RCCs nach Storkel.

Einteilung in	Häufigkeit	Genetik
Klarzelliges Nierenkarzinom	ca. 70 %	Deletion auf Chromosom 3p, etwa 50% somatische Mutationen im von Hippel-Lindau-Gen
Papilläres Nierenkarzinom	ca. 10 - 15 %	Trisomie der Chromosomen 3q, 7, 12, 16, 17, 20 und Verlust des Y-Chromosoms
Chromophobes Nierenkarzinom	ca. 5 %	Monosomie multipler Chromosomen (1, 2, 6, 10, 13, 17, 21) und Hypodiploidie
Sammelrohr-Karzinome	ca. 1 %	unbekannt
Unklassifizierte Nierenkarzinome	ca. 10 %	unbekannt

Neben der UICC-Klassifikation nach Storkel findet auch die TNM (*tumor nodes metastasis*)-Klassifikation Verwendung. Sie berücksichtigt lediglich die Tumorausbreitung sowie die histomorphologische Differenzierung des RCCs [Wittekind et al., 2002]. Die Beschreibung der Tumordinfiltration in die Venen wird gesondert angegeben.

Tabelle 2: TNM-Klassifikation des RCCs.

T: Primärtumor

T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Tumor 7 cm oder weniger in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
<i>T1a</i>	<i>Tumor 4 cm oder weniger in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere</i>
<i>T1b</i>	<i>Tumor mehr als 4 cm, aber nicht mehr als 7 cm in größter Ausdehnung</i>
T2	Tumor mehr als 7 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
T3	Tumor breitet sich in größeren Venen aus oder infiltriert direkt Nebenniere oder perirenales Fettgewebe, jedoch nicht über die Gerotafaszie hinaus
<i>T3a</i>	<i>Tumor infiltriert direkt Nebennieren oder perirenales Gewebe, aber nicht über die Gerotafaszie hinaus (schließt peripelvines Fettgewebe mit ein)</i>
<i>T3b</i>	<i>Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in Nierenvene (n) oder V. cava unterhalb des Zwerchfells</i>
<i>T3c</i>	<i>Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in die V. cava oberhalb des Zwerchfells</i>
T4	Tumor infiltriert über die Gerotafaszie hinaus
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden

N: Regionäre Lymphknoten

N0	Keine regionäre Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase (n) in einem regionären Lymphknoten
N2	Metastase (n) in mehr als einem regionären Lymphknoten
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden

1. Einleitung

Fortsetzung der Tabelle 2:

M: Fernmetastasen

M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
MX	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden

Stadiengruppierung

Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
Stadium IV	T4	N0, N1	M0
	Jedes T	N2	M0
	Jedes T	Jedes N	M1

G: Histologisches *grading*

G1	gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3 / 4	schlecht differenziert/undifferenziert

Als Risikofaktoren für die Entstehung des RCCs gelten Expositionen mit Cadmium, Blei, petrochemischen Substanzen, Thorotrast, Teer und Holzschutzmitteln. Ausgeprägte dauerhafte Adipositas scheint die Entstehung vom RCC ebenfalls zu begünstigen. Vermehrt werden Nierenzellkarzinome bei Patienten mit Nierenadenomen und polyzystischen Nierenerkrankungen beobachtet. Weitere Risikofaktoren sind Dialysepflichtigkeit und Nikotinabusus.

Für die Überlebensprognose ist das primäre Ausmaß der Erkrankung entscheidend: je höher das TNM-Stadium desto schlechter die Prognose. So sind die Faktoren Metastasengröße und -zahl sowie Art und Anzahl der befallenen Organe entscheidend für die Prognose. Die primären Metastasierungsorte, der Häufigkeit nach geordnet, sind: Lunge, Lymphknoten, Leber, Skelett, Nebennieren, kontralaterale Niere und Gehirn. Prognostisch günstig sind Lungenmetastasen, ungünstig Skelett- und Lebermetastasen. Das metastasierte RCC gilt in der Regel als nicht heilbar. Ebenso wie das histologische *grading* – die Differenzierung – des Tumors, hat auch die histologische Subtypisierung eine prognostische Bedeutung. Patienten mit chromophobem RCC können einen günstigeren Krankheitsverlauf erwarten als solche mit klarzelligem Tumortyp. Auch eine Reihe von Laborparametern ist bei der Prognoseabschätzung hilfreich. Als günstig gilt beispielsweise ein erhöhter Erythropoetinspiegel. Eine hohe Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BKS), ein erniedrigter Hämoglobin-Wert, eine erhöhte Laktatdehydrogenase (LDH), eine Thrombozytose oder eine Neutrophilie werden als ungünstig erachtet.

1.1.3 Symptome und Diagnostik

Bei frühzeitiger Diagnose hat das RCC eine hohe Heilungschance. Die Erkennung der Krankheit im Frühstadium ist von daher maßgeblich für den Behandlungserfolg. Leider ist die richtungsweisende Symptomatik beim frühen, lokal begrenzten RCC sehr wenig ausgeprägt. Erst bei fortschreitender Tumorausdehnung nehmen Stärke und Art der Symptome zu. Die klassische, klinische Trias des RCCs mit den Leitsymptomen Hämaturie, Flankenschmerz und tastbarem Tumor wird im fortgeschrittenen Stadium nur bei 5-9 % der Patienten beobachtet. Aufgrund des oft asymptomatischen Frühstadiums spielt die Sonographie der Nieren eine wichtige Rolle bei der Diagnose. Diese kostengünstige Untersuchung ermöglicht dem Arzt die morphologische Veränderung der Niere frühzeitig festzustellen. So wird ein Großteil der Nierentumoren heute im Rahmen von Routine-Sonographien zufällig entdeckt, ohne dass bis dahin Beschwerden vorlagen. Zur Bestimmung von Größe und Ausdehnung des Tumors wird im Zuge der weiteren Diagnostik eine Computer- oder Kernspintomographie durchgeführt. Im metastasierten Stadium müssen ossäre Metastasen zudem mittels Skelettszintigraphie ausgeschlossen werden. Bei einem durch die Bildgebung bestätigtem Verdacht auf malignen Nierentumor kann die genaue Charakterisierung nur durch eine feingewebliche Untersuchung festgestellt werden. Da die eingeschränkte Aussagekraft von Feinnadelbiopsien mit dem Risiko einer Impfmastase oder Blutung einher geht, kann die genaue Diagnose oft erst nach operativer Freilegung der Niere, Entnahme einer Biopsie und histopathologischer Untersuchung gestellt werden. Nach Bestätigung der Diagnose kann in der gleichen operativen Sitzung eine Entfernung des Tumors erfolgen. Die klinische Aussagekraft kommerziell erhältlicher, spezifischer Tumormarker zur routinemäßigen Diagnostik und Beurteilung des Krankheitsverlaufes ist bis heute wissenschaftlich nicht bestätigt.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Diagnostik des häufig symptomarmen RCCs verschiedene Maßnahmen umfasst, die der Stadieneinteilung und Therapieplanung dienen. Nützlich sind dabei körperliche Untersuchungen, Laborchemie, Sonographie des Abdomens, Computer- bzw. Kernspintomographien, sowie Skelett- und Nierenszintigraphien.

1.1.4 Chirurgische Therapie

Da Strahlentherapie und systemische Therapie des RCCs nur begrenzt wirksam sind, steht die Tumorchirurgie sowohl bei der Behandlung des Primärtumors als auch der Metastasen im Vordergrund. Grundsätzlich sollte bei resektablem Primärtumor und resektablen Metastasen die radikale Entfernung aller Tumormanifestationen angestrebt werden. Als Standardtherapie gilt allgemein die radikale Tumornephrektomie. Je nach Stadium der Erkrankung und Funktion der Restniere kann das Ausmaß der chirurgischen Intervention variieren: Bei lokal begrenzten Tumoren kann unter gewissen Umständen eine Organ erhaltende Operation in Betracht gezogen werden. Bei Einzelniere, eingeschränkter Funktion der Gegenniere oder beidseitigen Tumoren hingegen ist der Organerhalt immer angezeigt. Die radikale Tumornephrektomie wird im Allgemeinen über einen transperitonealen Zugang vorgenommen. Die prophylaktische Adrenalectomie bei fehlendem Metastasenverdacht bzw. bei Vorliegen nicht resektabler Metastasen wird von den meisten Autoren als fraglich betrachtet. Empfohlen wird die Adrenalectomie nur bei erhöhtem Risiko durch sehr große Tumoren, Tumoren des oberen Nierenpols sowie bei prä- bzw. postoperativ festgestellten Nebennierenmetastasen. Eine Lymphadenektomie sollte bei palpatorisch unauffälligem Befund die ipsilateralen und paraaortalen (linksseitiger Tumor) bzw. paracavalen und retrocavalen (rechtsseitiger Tumor) Lymphknoten beinhalten.

1.1.5 Strahlen- und systemische Therapie

Leider zählt das RCC zu den weniger Strahlen-sensiblen Tumoren. Eine kurative Strahlentherapie als primäre Maßnahme ist aufgrund der hohen Strahlendosis und der limitierten Dosis-toleranz der umgebenden Strukturen nicht sinnvoll. Durch prä-, peri- und postoperative Bestrahlung des Nierenbettes wurde in verschiedenen Studien keine Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate gegenüber der alleinigen Tumorchirurgie nachgewiesen. Lediglich durch postoperative Bestrahlung in Risikokollektiven (T3) konnte eine Senkung des Lokalrezidivrisikos von 37% auf 10% beobachtet werden [Stein et al., 1992]. Mit dem Ziel der Schmerzlinderung, Stabilisierung ossärer Läsionen oder Inaktivierung von Tumoranteilen kommt die Strahlentherapie bei der Behandlung von Knochen- und Weichteilmetastasen dennoch zum Einsatz. Die Effizienz der Metastasenbestrahlung kann durch die

1. Einleitung

Kombination mit einer lokalen (Operation, Embolisierung) oder systemischen (Chemo-, Immuntherapie) Tumorthherapie erhöht werden.

Aufgrund der hohen Zytostatikaresistenz des RCCs hat die Monotherapie mit zytostatischen Chemotherapeutika derzeit keinen Stellenwert. In Kombination mit der sogenannten Immuntherapie kommen Zytostatika dennoch zum Einsatz. Die Immuntherapie basiert auf der Immunogenität des RCCs und induziert durch eine Stimulation des Immunsystems die Eliminierung von Tumorzellen. Als Therapeutika dienen die Zytokine Interferon- α (IFN- α -2a und -2b) und Interleukin-2 (IL-2). IFN- α bewirkt beim RCC Proliferationshemmung, Redifferenzierung und Apoptoseinduktion der Tumorzelle. IL-2 wirkt als Wachstumsfaktor auf T-Lymphozyten. Zudem stimulieren beide Zytokine die Effektorzellen des Immunsystems (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Zytokine in der Immuntherapie des RCCs.

Zytokin	Produktion durch	Zielzelle	Wirkung
IFN- α	alle Zellen	alle Zellen	direkte Antitumoreffekte; Stimulation von T-, NK-Zellen und Makrophagen; Hochregulation von MHC-Klasse-I-Antigenexpression; therapeutischer Einsatz bei viralen und autoimmunen Erkrankungen
IL-2	T-Zellen	T-, B-, NK-Zellen, Monozyten/Makrophagen	T-Zellaktivierung und Proliferation, B-Zellwachstum, Nk-Zellproliferation und Aktivierung Verstärkung der zytolytischen Aktivität von Monozyten und Makrophagen

Atzpodien et al. haben in einer multizentrisch, prospektiv randomisierten Studie mehrere Kombinationstherapien miteinander verglichen: Ein signifikant höheres progressionsfreies Gesamt-Überleben zeigte sich lediglich für die Kombinationstherapie mit IL-2, IFN- α und 5-Fluorouracil [Atzpodien et al., 2004]. Auch in der Klinik ist die Kombination von Zytokinen und Zytostatika der jeweiligen Monotherapie vor zu ziehen. Sie zählt in Europa zu den Standard-Erstlinienbehandlungen des RCCs. Studien haben jedoch gezeigt, dass nur ein Anteil von ca. 30% der an RCC erkrankten Patienten von einer kombinierten Immunchemotherapie profitieren [Lopez et al., 1996; Motzer et al., 1996; Fishman and Antonia, 2003]. Ein Nachteil dieser oft mit starken Nebenwirkungen behafteten Behandlung ist folglich die Ungewissheit, ob die Therapie anspricht oder nicht.

1. Einleitung

In den letzten Jahren haben weitere, vielversprechende systemische Behandlungsformen des RCCs, mit sogenannten Proteintyrosinkinase-Inhibitoren, an Bedeutung gewonnen. Die Substanzen richten sich gegen mehrere, am Zellwachstum beteiligte Enzyme (z.B. Raf-Kinase) und blockieren so die Tumorzellproliferation. Über einen weiteren Wirkmechanismus stören Tyrosinkinase-Hemmer zudem die Signaltransduktion von VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und inhibieren so die tumorinduzierte Neoangiogenese. Dem Tumor wird dadurch die Nahrungsgrundlage entzogen und das Wachstum unterdrückt. Die klinische Bedeutung der Tyrosinkinase-Inhibitoren wurde durch die randomisierte und placebokontrollierte TARGET-Studie (*treatment approaches in renal cancer global evaluation trial*) belegt [McKeage and Wagstaff, 2007]. Teilgenommen haben 903 Patienten, die an einem fortgeschrittenen RCC litten und zuvor bereits acht Monate erfolglos systemisch therapiert worden waren. Das progressionsfreie Überleben verdoppelte sich von 12 auf 24 Wochen. Auch das Gesamt-Überleben gegenüber der Placebogruppe stieg um knapp 40%. In Deutschland sind Tyrosinkinase-Inhibitoren erst seit Ende 2006 zugelassen. Die klinische Bedeutung der Behandlungsform muss in der kommenden Zeit durch weitere Studien untermauert werden. Eines steht jedoch fest: Tyrosinkinase-Inhibitoren stellen eine hoffnungsvolle Behandlungsform bei der Therapie des RCCs dar und können bei Therapieversagern der Immunchemotherapie eine gute Alternative sein.

1.1.6 *Immune escape* Mechanismen

Obwohl Tumoren eine Vielzahl von Antigenen präsentieren, wird malignes Tumorgewebe vom Immunsystem meist nicht als fremd erkannt und angegriffen [Boon and van der, 1996; Lennerz et al., 2005; van der and Van den Eynde, 2006]. Der Tumor scheint demnach in der Lage zu sein, die immunologische Antwort zu unterdrücken, ungestört zu wachsen und benachbartes Gewebe zu zerstören. Dieser pathologische Toleranz-Zustand von Seiten des Immunsystems wird als *immune escape* der malignen Tumoren bezeichnet.

Doch welcher Mechanismus erlaubt dem RCC, sich der Attacke des Immunsystems zu entziehen? Die wichtigsten Immunzellen sind im RCC-Gewebe nachweisbar und auch histologische Untersuchungen zeigen ausgeprägte entzündliche Infiltrate. Forschungsgruppen haben gezeigt, dass der Tumor sowohl von T-Zellen, B-Zellen, als auch natürlichen Killerzellen und Monozyten infiltriert wird [Heinemann et al.,

1. Einleitung

1987; Van den Hove et al., 1997; Brasanac et al., 1999]. Auch dendritische Zellen, die bei der Präsentation von Antigenen eine wichtige Rolle spielen, wurden im RCC-Gewebe in großer Anzahl beobachtet [Thurnher et al., 1996; Schwaab et al., 1999].

Die Zellen des Immunsystems sind im RCC-Gewebe nicht nur nachweisbar, sie scheinen ihre Wirkung auch entfalten zu können. Funktionelle Versuche haben gezeigt, dass RCC-Antigene von Immunzellen erkannt werden und eine Immunantwort herbeiführen. In Kokultur gehaltene CD8⁺ T-Zellen und RCC-Zellen führen *in vitro* zur Lyse der Tumorzellen. Die Antigene des Tumors werden auf der Zelloberfläche an MHC (*major histocompatibility complex*) der Klasse I präsentiert und von antigenspezifischen T-Zell-Rezeptorkomplexen erkannt und lysiert, ohne dabei das unveränderte Nierenparenchym anzugreifen [Schendel et al., 1993; Finke et al., 1992; Koo et al., 1991]. Auch CD4⁺ T-Zellen erkennen *in vitro* spezifische Tumor-Antigene [Beldegrun et al., 1990]. Anhand eines Mausmodells konnten Rosenberg et al. die Effektivität von Tumor infiltrierenden Lymphozyten bereits 1986 *in vivo* belegen. Sie beobachteten, dass der adoptive Transfer von tumorinfiltrierenden Lymphozyten eine Immunantwort und die effektive Bekämpfung des malignen Geschehens induziert [Rosenberg et al., 1986].

Trotz der Präsenz von Tumor-Antigenen, infiltrierenden Immunzellen und der nachweislich hervorgerufenen Immunantwort besteht *in situ* eine immunologische Toleranz von RCC-Gewebe. Es scheint, als ob die maligne Zelle selbst die Inaktivität von tumorinfiltrierenden Lymphozyten und die daraus resultierende Toleranz von Tumoren induziert. Forschungsgruppen konnten *in vivo* tatsächlich eine verminderte zytotoxische Aktivität von, aus RCC-Gewebe isolierten, CD8⁺ T-Zellen nachweisen [Van den Hove et al., 1997]. Im Folgenden werden einige Mechanismen beschrieben, die eine Beeinträchtigung der Funktion der Immunzellen zur Folge haben und somit zu einer Hemmung der Immunantwort führen.

Ein sogenannter *immune escape* Mechanismus des Tumors ist die Regulation der MHC-Klasse-I-Expression auf der Oberfläche der Tumorzelle. Hervorzuheben ist, dass Tumoren, wie einige Viren auch, die Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle verringern. Folglich werden den Immunzellen weniger Tumor-Antigene präsentiert und dem Angriff der MHC-restringierten T-Zellen entgegen gewirkt [Falk et al., 2002; Alcami and Koszinowski, 2000; Garrido et al., 1993; Natali et al., 1989; Pantel et al., 1991]. Dieser Mechanismus spielt auch beim *immune escape* des RCCs eine Rolle und ermöglicht so ein aggressives Tumorstadium [Atkins et al., 2004]. Neben der

1. Einleitung

verminderten Tumor-Antigen-Präsentation können RCC-Zellen die Attacken des Immunsystems auch über eine Expression nicht-klassischer MHC-Moleküle abwehren. Diese MHC-Proteine dienen als spezifische Liganden für inhibierende Rezeptoren auf Immunzellen und hemmen die Aktivität von T- und natürlichen Killerzellen [Ibrahim et al., 2001; Bukur et al., 2003].

Ein weiterer *immune escape* Mechanismus ist die Expression von Proteinen, die zur Inhibition des Immunsystems beitragen. Studien haben gezeigt, dass auch Extrakte von RCC-Zellen eine Hemmung der T-Zell-Proliferation zur Folge haben [Malinowski et al., 1997; Shabtai et al., 2003]. Die Tatsache, dass in RCCs vermehrt anti-inflammatorische Zytokine vom Typ-2 (IL-4 und IL-10) nachgewiesen wurden, spricht ebenso für eine Inhibition der T-Zellen wie die unterdurchschnittliche Menge inflammatorischer Zytokine (IL-12 und IFN- γ) [Maeurer et al., 1995; Wang et al., 1995; Nakagomi et al., 1995].

Neben den bereits erwähnten *immune escape* Mechanismen können einige Tumoren über eine reduzierte Oberflächenexpression der Fas-Rezeptoren einer durch T-Zellen hervorgerufenen Apoptose entgehen. Die Expression von Fas-Liganden ermöglicht es ihnen sogar, Apoptose in T-Zellen in einer sogenannten *counterattack* auszulösen [Strand et al., 1996; Hahne et al., 1996]. Tabelle 4 bietet eine Zusammenfassung bekannter *immune escape* Mechanismen.

Tabelle 4: Passive und aktive *immune escape* Mechanismen von malignen Tumoren.

Passive <i>immune escape</i> Mechanismen	Effekt
Niedrige oder fehlende Expression von MHC-Klasse-I auf der Tumorzelloberfläche	Mangelhafte oder fehlende Erkennung von Tumorantigenen durch T-Zellen
Expression von nicht-klassischen MHC-Klasse-I	Inhibition von T- und NK-Zellen
Mangelnde Expression von inflammatorischen Zytokinen	Fehlende Aktivierung von T-Zellen
Reduktion der Fas-Rezeptor-Expression	Reduktion der T-Zell vermittelten Apoptose
Aktive <i>immune escape</i> Mechanismen	Effekt
Expression von Fas-Liganden	Induktion der Apoptose in CD8+ T-Zellen
Expression von anti-inflammatorischen Zytokinen	Inaktivierung von T-Zellen

Neben den oben erwähnten *immune escape* Mechanismen wird dem Enzym Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) eine immunregulatorische Bedeutung

zugesprochen.IDO kann eine immunsuppressive Wirkung entfalten und so Tumorprogression fördern. In wieweit IDO an *immune escape* Mechanismen beteiligt ist, soll im folgenden Kapitel genauer beschrieben werden.

1.2 Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO)

1.2.1 Molekulargenetische und biochemische Eigenschaften von IDO

Das Indoleamine-2,3-dioxygenase-Gen enthält 10 Exone (15 kb) und ist beim Menschen auf Chromosom 8 lokalisiert. Die Gentranskription von *IDO* unterliegt einer strengen Kontrolle. Sie wird vor allem durch Entzündungsmediatoren über die JAK-STAT- (*Janus activated kinase; signal transducer and activator of transcription*) und die IRF1-Kaskade (*Interferon-regulatory factor 1*) ausgelöst. Spezifische Sequenzen wie ISRE (*interferon stimulatory response elements*) und GAS (*γ-activating sequences*) im Bereich des IDO-Promoters vermitteln die Aktivierung [Chon et al., 1996] (Abbildung 1A). Die IDO-mRNA kodiert ein Protein mit 405 Aminosäuren mit einem molekularen Gewicht von 45 kDa [Mellor and Munn, 2004]. Die tertiäre Struktur des IDO-Proteins wird durch eine kleine und eine große Domäne einer alpha-Helix gebildet. Zwischen diesen Domänen ist eine Häm-Gruppe lokalisiert [Sugimoto et al., 2006].

Das IDO-Enzym, das den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Tryptophankatabolismus katalysiert, wird jedoch nur unter bestimmten Bedingungen aktiviert. Essentiell hierfür ist die Häm-Gruppe. Erst durch eine Umwandlung von dreiwertigen in zweiwertige Eisenionen wird die Bindung von Tryptophan und O₂ und somit der weitere Abbau der Aminosäure ermöglicht [Thomas and Stocker, 1999]. Die bei der Elektronenreduktion beteiligten Co-Faktoren sind unbekannt (Abbildung 1B).

Nach erfolgreicher Transkription, Translation und Aktivierung des Proteins, baut IDO die Aminosäure Tryptophan (Trp) ab. Bei Säugetieren wird die oxidative Degradation von Tryptophan durch zwei Enzyme katalysiert: IDO und Tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO). Beide Enzyme katalysieren die gleiche Reaktion. Sie spalten die Doppelbindung des Pyrrol-Rings zwischen den Positionen 2 und 3 und bestimmen im ersten Schritt die Geschwindigkeit des Tryptophanabbaus [Stone and Darlington, 2002]. Die Synthese von TDO beschränkt sich größtenteils auf die Leber und scheint keiner Regulation durch das Immunsystems zu unterliegen. Im Gegensatz dazu ist

1. Einleitung

die Expression von IDO in unterschiedlichen Geweben nachgewiesen und durch immunologische Signale auslösbar.

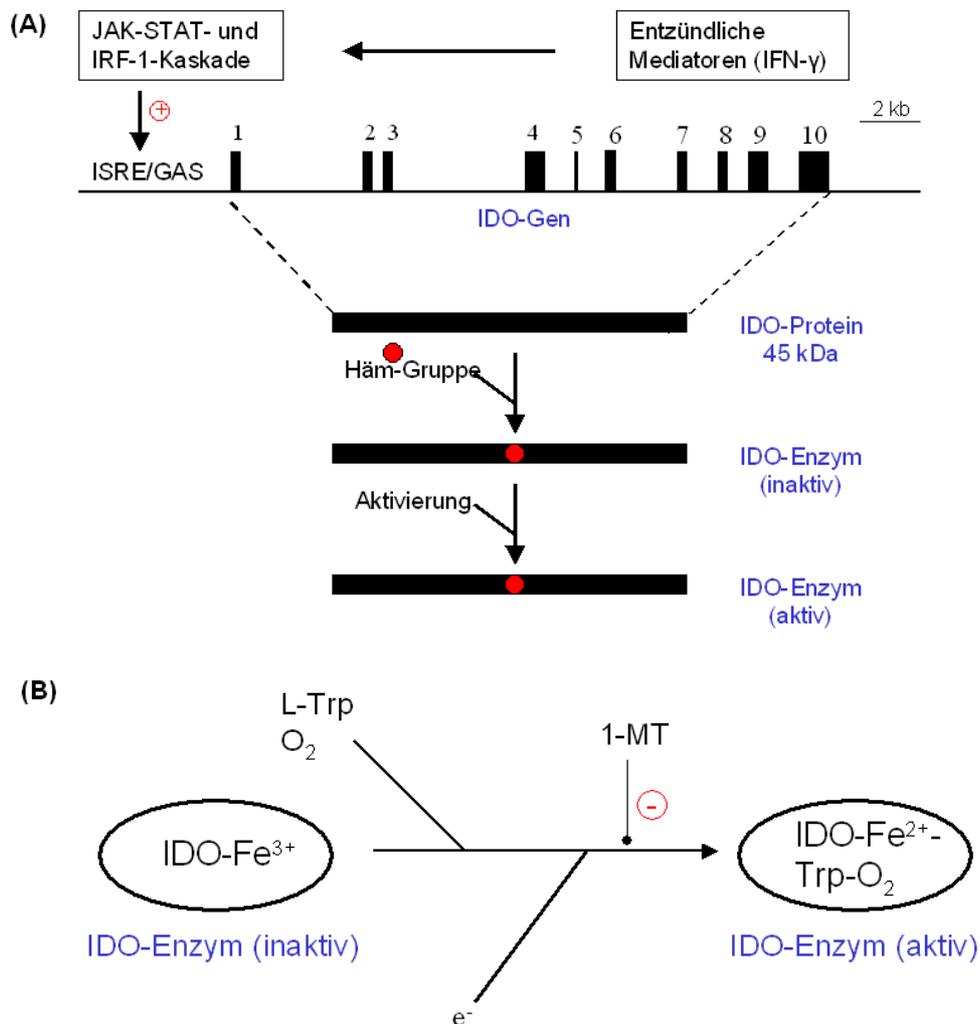


Abbildung 1: IDO-Genstruktur, Transkription und Enzymaktivierung von IDO. (A) Aktivierung des IDO-Promotors erfolgt über ISRE- (*interferon stimulatory response elements*) und GAS (*γ-activating sequences*)-Elemente nach Stimulation der JAK-STAT- (*Janus activated kinase; signal transducer and activator of transcription*) und IRF1-Kaskade (*Interferon-regulatory factor 1*) durch entzündliche Mediatoren. **(B) Aktivierung des IDO-Enzyms** über eine Elektronenreduktion des Häm-Eisens, ermöglicht die Bindung von Tryptophan und O₂ für den weiteren Aminosäurenabbau.

IDO ist ein intrazelluläres Enzym. In der Literatur wird keine sekretorische oder extrazelluläre Form beschrieben. Hohe, funktionelle IDO-Expression ist in der Plazenta [Kudo et al., 2004; Honig et al., 2004], im Darm, den Lymphknoten, der Milz und der Lunge zu beobachten [Takikawa et al., 1986]. Bei folgenden Zellen wurde die Expression von IDO-Protein beobachtet: Immunzellen (dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen und Eosinophile), Epithelien, Fibroblasten und Endothelien [Grohmann et al., 2003; Mellor and Munn, 2004; Takikawa, 2005].

Gewebe, dieIDO aufweisen, haben eine immunologisch aktive Schleimhaut oder lymphatische Komponenten, IDO synthetisierende Zellen erfüllen immunologische Aufgaben. Diese Tatsachen legen die Vermutung nahe, dass IDO im Immunsystem eine wichtige Rolle spielt. Dies wird durch die starke Korrelation zwischen Entzündung, proinflammatorischen Zytokinen und IDO-Expression untermauert. Einer der potentesten IDO-Induktoren ist Interferon- γ (IFN- γ). Des Weiteren sind auch Lipopolysaccharide (LPS), Interleukin-1 (IL-1) und der Tumornekrosefaktor (TNF) zur Erhöhung der *in vitro* Expression von IDO befähigt [Babcock and Carlin, 2000; Robinson et al., 2003].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die IDO-Expression streng reguliert ist, ausschließlich nach Aktivierung durch spezielle Mediatoren stattfindet und nur durch eine begrenzte Anzahl von Zellen erfolgt.

1.2.2 Der Abbau von Tryptophan

Tryptophan ist eine Aminosäure mit einem aromatischen Strukturanteil. Sie gehört zu den essentiellen Aminosäuren, kann vom menschlichen Körper also nicht synthetisiert werden. Tryptophan muss folglich exogen mit der Nahrung zugeführt werden. Tryptophan wird, wie alle Aminosäuren, zur Synthese von Proteinen benötigt. Zudem dient es als Vorstufe des biogenen Amins Serotonin und des epiphysären Hormons Melatonin. Außerdem ist Tryptophan ein Provitamin, bei dessen Abbau Nicotinsäuremononucleotid entsteht, das wiederum zur Synthese von Nicotinamid-Adenindinucleotid (NAD⁺) herangezogen wird.

Beim Abbau von Tryptophan erfolgt zunächst die oxidative Spaltung des Pyrrol-Rings, dann die Abtrennung der Alaninseitenkette und anschließend die oxidative Öffnung des Benzolrings. Im ersten Schritt wird der Pyrrolring durch die Einführung molekularen Sauerstoffs gespalten. Verantwortlich dafür sind die Dioxygenasen IDO und TDO. Vom Reaktionsprodukt Formylkynurenin wird im Zytosol Formiat abgespalten. Es entsteht Kynurenin, welches durch die mitochondriale Oxygenase in Hydroxykynurenin überführt wird. Die Pyridoxal-Phosphatabhängige Katalyse im Zytosol, bewirkt eine Abspaltung von Alanin. Durch diese Kynureninasereaktion entsteht 3-Hydroxyanthranilat, ein Derivat der Benzoesäure. Im weiteren Abbauweg folgt die Spaltung des Benzolringes von Hydroxyanthranilat durch die Dioxygenase. Es entsteht Acroleyl- β -aminofumarat (Synonym: α -Amino- β -Carboxymuconsäure- ϵ -Semialdehyd). Dieses Abbauprodukt dient der Bildung von Chinolinsäure, einem

1. Einleitung

Pyridinderivat, das nach Verknüpfung mit Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) und nachfolgender Decarboxylierung als Nicotinsäuremononucleotid zur NAD^+ -Biosynthese herangezogen wird.

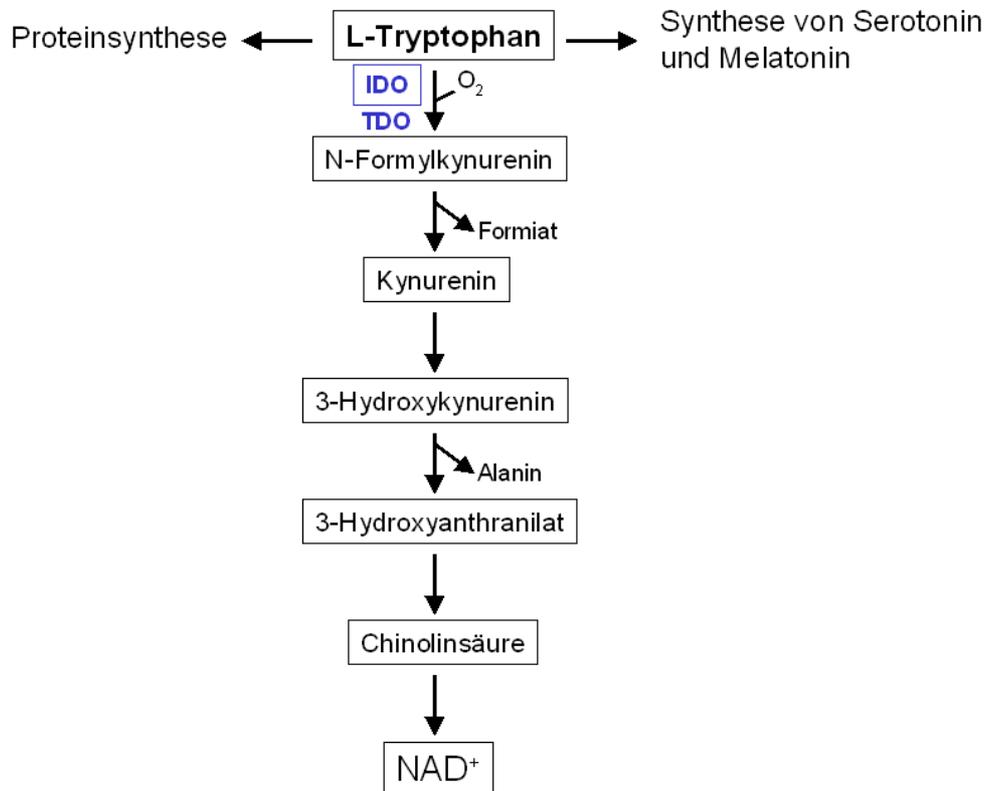


Abbildung 2: Übersicht des Tryptophan-Metabolismus. Tryptophan dient der Synthese von Proteinen, Serotonin und Melatonin. Über den Abbauweg von Tryptophan entsteht Nicotinsäuremononucleotid, welches zur Synthese von Nikotinamid-Adenindinucleotid (NAD^+) benötigt wird.

1.2.3 IDO und die Rolle im Immunsystem

Die biologische Rolle von IDO im Immunsystem ist derzeit Gegenstand wissenschaftlicher Forschung weltweit. Die Bedeutung von IDO bei der Abwehr bestimmter Infektionen wurde schon vor einigen Jahren untersucht. Der Stand der Forschung soll im folgenden Abschnitt wiedergegeben werden.

Viele Mikroorganismen können ihr eigenes Tryptophan synthetisieren. Einige Organismen, zu ihnen zählt auch der Mensch, sind jedoch von der exogenen Zufuhr abhängig, d.h. auxotroph. Auxotrophe Organismen reagieren sensitiv auf den Abbau von Tryptophan durch IDO. In zahlreichen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Proliferation von *Chlamydia pneumoniae*, *Toxoplasma gondii*, Streptokokken der Gruppe B und Mykobakterien in Zellkultur durch eine IFN- γ stimulierte IDO-

1. Einleitung

Expression in Fibroblasten und Makrophagen unterdrückt werden kann [Pfefferkorn, 1984; Carlin et al., 1989; Gupta et al., 1994; MacKenzie et al., 1998; Hayashi et al., 2001]. Alle beschriebenen Erreger sind entweder intrazellulär oder leben in enger Verbindung mit der Wirtszelle. Neben Bakterien reagieren auch einige Viren sensitiv auf aktives IDO-Protein. Zahlreiche Veröffentlichungen zeigen während viraler Infektionen *in vitro* eine IDO induzierte Hemmung der Vervielfältigung des *Cytomegalievirus* (CMV) und des *Herpes-simplex-Virus* (HSV) [Bodaghi et al., 1999; Adams et al., 2004]. Den antibakteriellen und antiviralen Effekt der auxotrophen Organismen schreiben die Autoren der Tryptophan abbauenden Aktivität von IDO zu. Der lokale Abbau von Tryptophan, entzieht den Erregern eine essentielle Aminosäure zur Proteinsynthese. Folglich wird die Vervielfältigung der Erreger gehemmt. Bestätigt wird dies durch die Beobachtung, dass sich die Replikation der Mikroorganismen bei exogener Zufuhr von Tryptophan wieder normalisiert. Diese Beispiele bestätigen eine Beteiligung von IDO bei der Bekämpfung von Infektionen *in vitro*. Auch *in vivo*, konnte die Bedeutung von IDO nachgewiesen werden. So wurde beobachtet, dass IFN- γ -defiziente Mäuse, die nicht in der Lage sind IDO zu induzieren, weniger dazu befähigt waren, *Chlamydia pneumoniae* und *Toxoplasma gondii*-Infektionen *in vivo* zu kontrollieren [Silva et al., 2002; Fujigaki et al., 2002; Rottenberg et al., 2000]. Unklar bleibt jedoch, ob die Beobachtung einem Mangel an IDO oder einem der vielen fehlenden Effekte des IFN- γ zuzuschreiben ist. Letztlich steht der Beweis, dass IDO bei der Abwehr von Infektionen *in vivo* einen günstigen Einfluss hat, noch aus.

Neben dem antimikrobiellen Effekt spielt IDO auch bei der Erzeugung von immunologischer Toleranz eine Rolle: Es unterstützt die Mechanismen, die eine Hemmung der Immunantwort verursachen. Dies wurde durch eine 1998 veröffentlichte Arbeit gezeigt [Munn et al., 1998]. Die Verabreichung des pharmakologischen Inhibitors [Cady and Sono, 1991], 1-Methyl-Tryptophan (1-MT), führt bei trächtigen Mäusen zur Abstoßung (semi)allogener Feten. Die Hemmung von funktionellem IDO in der Schwangerschaft hebt die physiologische Toleranz auf und verursacht eine Immunreaktion der Mutter gegen das fetale semiallogene Gewebe. Ein Prozess, der einerseits das intakte mütterliche Immunsystem und andererseits väterliche Alloantigene benötigt. Diese Beobachtung liefert den ersten Anhaltspunkt dafür, dass IDO bei der Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz gegen Antigene eine Rolle spielt.

1. Einleitung

Die Behauptung konnte durch weitere Mausmodelle untermauert werden. Beispielsweise wurde nachIDO-Inhibition eine Zunahme der Symptome des allergischen *Asthma bronchiale* [Hayashi et al., 2004], der autoimmun-bedingten *Enzephalomyelitis* [Sakurai et al., 2002] und von entzündlichen Darmerkrankungen [Gurtner et al., 2003] registriert. Die Versuche verdeutlichen, dass bei entzündlichen und autoimmun bedingten Erkrankungen die pharmakologische Hemmung vonIDO eine Abnahme der Toleranz und eine dadurch resultierende Verschlechterung der Krankheitssymptome zur Folge hat.

All diese Ergebnisse sprechen IDO eine immunsuppressive Wirkung zu. Weitere Arbeiten haben versucht, eben diese Wirkung für die Transplantationschirurgie zu nutzen. Es konnte nachgewiesen werden, dass durch Gentransfer eine ektop erzeugte IDO-Überexpression stark immunsuppressiv wirkt und dadurch Toleranz erzeugt. Bei IDO transfizierten Lungentransplantaten wurde trotz voller allogener MHC-Barriere und Verzicht auf immunsuppressive Therapien, eine Akzeptanz des Empfängers beobachtet [Swanson et al., 2004; Liu et al., 2006]. Ähnliche Ergebnisse wurden mit Korneatransplantaten erzielt [Beutelspacher et al., 2006]. Die Ergebnisse zeigen, dass die pharmakologische IDO-Inhibition Toleranz nicht nur unterdrückt, sondern diese durch eine IDO-Überexpression auch erzeugen kann.

Zusammenfassend lässt sich die komplexe Rolle von IDO im Immunsystem wie folgt beschreiben: *In vitro* lässt sich eine Beteiligung von IDO bei der Bekämpfung von bestimmten Erregern nachweisen. Noch gibt es jedoch keine Beweise dafür, dass IDO auch *in vivo* bei der Abwehr von Mikroorganismen eine Rolle spielt. Neben dieser antimikrobiellen Wirkung, kann IDO an der Mutter-Kind-Barriere, bei entzündlichen und autoimmunologischen Erkrankungen eine immunsuppressive Wirkung und dadurch eine Art Toleranz entfalten. Zudem gibt es in der Transplantationschirurgie Ansätze, die immunsuppressive Wirkung von IDO therapeutisch zu nutzen.

1.2.4 Potentieller Wirkmechanismus von IDO

Der erste Wirkmechanismus, der IDO zugesprochen wurde, ist der antimikrobielle Effekt durch lokalen Entzug der essentiellen Aminosäure Tryptophan [Pfefferkorn, 1984]. Der Baustein Tryptophan steht bei der Proteinsynthese nicht zur Verfügung, die Replikation bei auxotrophen Erregern wird folglich verhindert.

1. Einleitung

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, spieltIDO auch bei der Aufrechterhaltung immunologischer Toleranz eine Rolle. Wie bereits erwähnt, hat die Arbeitsgruppe um David Munn nach systemischerIDO-Inhibition eine Abstoßung allogener Feten beobachtet. Um diese Ergebnisse genauer zu untersuchen, wurde T-Zell-defizienten Mäusen (RAG^{-/-}-Mäusen) in einem Folgeexperiment 1-MT verabreicht. Eine Abstoßung der Feten, wie bei Wildtypmäusen typisch konnte nicht beobachtet werden. Das durch die Inhibition vonIDO verursachte Absterben der Feten ist demnach T-Zell vermittelt [Munn et al., 1998]. Vermutet wurde, dassIDO bei einer Schwangerschaft T-Zellen hemmt und so Toleranz gegen fetale Antigene aufrechterhält. Diese Vermutung konnte David Munn 1999 bestätigen: In Zellkultur gehaltene, IFN- γ stimulierte Makrophagen verstoffwechseln Tryptophan und inhibieren in Kokultur gehaltenene T-Zellen in ihrer Proliferation. Trotz Antigenpräsentation und Kostimulation verharren die T-Zellen in der G1-Phase des Zellzyklusses [Munn et al., 1999]. Neben Makrophagen können unter anderem auch dendritische ZellenIDO exprimieren und eine immunsuppressive Wirkung entfalten [Hwu et al., 2000; Grohmann et al., 2002; Munn et al., 2004]. Als Erklärung wurde ein durch den Tryptophan-Mangel erzeugter T-Zell hemmender Effekt unterstellt. Der detaillierte Wirkmechanismus ist jedoch unbekannt. 2005 konnte einem an der Signalkaskade mitwirkenden Molekül, der Streß-Kinase GCN2 (*general control nonderepressible 2*), eine Beteiligung an der Wirkung vonIDO zugesprochen werden. Der durchIDO entstehende lokale Mangel an Tryptophan und der Anstieg unbeladener Transfer-RNA (tRNA) in der Zelle, aktiviert GCN2 [Dong et al., 2000] und hemmt dadurch T-Zellen in ihrer Proliferation. Dies konnten David Munn und Mitarbeiter durch folgende Versuche belegen: *In vitro* wird die Proliferation von GCN2 defizienten T-Zellen durchIDO-Aktivität nicht gehemmt. Auch *in vivo* werden T-Zellen von GCN2-*knockout*-Mäusen nicht durchIDO exprimierende dendritische Zellen aus tumortragenden Lymphknoten inhibiert [Munn et al., 2005]. Zusammengefasst legen diese Befunde nahe, dassIDO über den lokalen Entzug von Tryptophan GCN2 aktiviert und dadurch eine Hemmung der T-Zellen erzielt.

Weitere Hinweise belegen, dassIDO neben der Hemmung von T-Zellen noch andere Auswirkungen hat. So stellten Lee und Mitarbeiter fest, dass in Tryptophan verarmten Medien kultivierte T-Zellen eine gesteigerte Sensitivität gegenüber CD95L-induzierter Apoptose aufweisen [Lee et al., 2002]. Nicht nur der Mangel an Tryptophan selbst, sondern auch die Abbauprodukte von Tryptophan lösen in T-Zellen Apoptose aus.

1. Einleitung

So konnte gezeigt werden, dass aus der Maus stammende Thymozyten und CD4⁺ T-Zellen *in vitro* durch 3-Hydroxyanthranilat und Chinolinsäure zur Apoptose angeregt werden. Dieser Effekt konnte durch eine geringere Konzentration von Tryptophan im Medium verstärkt werden [Fallarino et al., 2002].

Tryptophanabbauprodukte können nicht nur Apoptose induzieren, sondern dem Tryptophanmangel ähnlich, eine T-Zell-hemmende Wirkung entfalten. In Versuchen mit menschlichen T-Zellen wurde ein antiproliferativer und zytotoxischer Effekt von exogen zugeführten Kynurenin und 3-Hydroxyanthranilat beobachtet [Frumento et al., 2002; Terness et al., 2002]. Auch *in vivo* konnte ein T-Zell-hemmender Effekt durch die Gabe von Tryptophanabbauprodukten nachgewiesen werden: In einem Rattenmodell wurde das Überleben von allogenen Hauttransplantaten signifikant verlängert [Bauer et al., 2005]. Auch bei Mäusen mit autoimmun bedingter *Enzephalomyelitis* konnten die Symptome signifikant reduziert werden. Die Wirkung der Tryptophanabbauprodukte auf die T-Zellen, wurde durch die wissenschaftliche Forschung bisher noch nicht detailliert beschrieben. Diskutiert wird eine direkte T-Zell toxische Wirkung, ebenso wie ein über Rezeptoren eingeleiteter Zelltod.

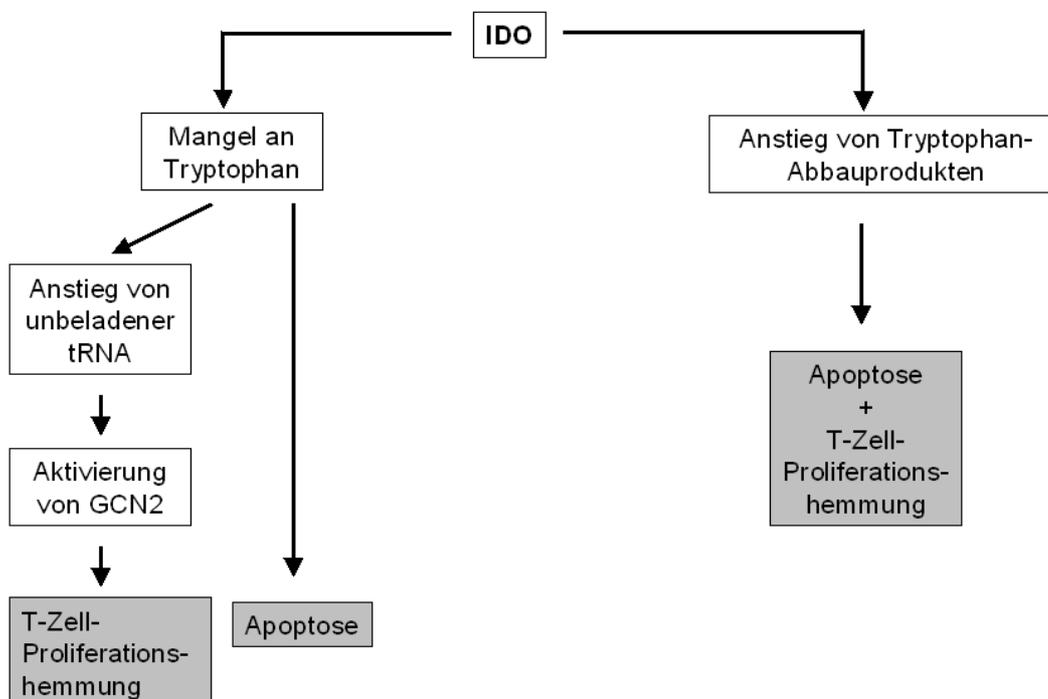


Abbildung 3: Potentieller Wirkmechanismus der IDO-induzierten Immunsuppression. Die enzymatische Aktivität von IDO bewirkt einen lokalen Tryptophanmangel und einen Anstieg von Tryptophanabbauprodukten. Der Tryptophanmangel bewirkt einen Anstieg von unbeladener tRNA, welche die Streß-Kinase GCN2 (*general control nonderepressible 2*) in T-Zellen aktiviert. Aktiviertes GCN 2 kann die Proliferation von T-Zellen hemmen. Ein weiterer Effekt des Tryptophanmangels ist die Induktion von Apoptose. Auch Tryptophanabbauprodukte können Apoptose und T-Zell-Proliferationshemmung verursachen.

1. Einleitung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass IDO über den lokalen Entzug von Tryptophan und durch Tryptophanabbauprodukte eine T-Zell Proliferationshemmung sowie eine Apoptose auslösen kann. Abbildung 3 zeigt eine Zusammenfassung der bekannten Wirkmechanismen von IDO.

1.2.5 IDO in malignen Gewebe

Maligne Tumoren präsentieren eine Vielzahl von Antigenen, die vom Immunsystem auch erkannt werden [Boon and van der, 1996; Lennerz et al., 2005]. Es gibt jedoch Wege, die es Tumoren ermöglichen, effektiven Attacken von Seiten der Immunzellen zu verhindern, ungestört zu wachsen und benachbartes Gewebe zu zerstören. Dieser Mechanismus wird als *immune escape* bezeichnet und wurde bereits in Kapitel 1.1.6 behandelt. Im Folgenden wird die immunsuppressive Wirkung von IDO in malignen Tumoren beschrieben.

Auch in malignem Gewebe scheint IDO in der Lage zu sein, die Immunantwort zu unterdrücken. In einem Experiment von Friberg et al. wurden LLC-Zellen (*lewis lung carcinoma*-Zellen) mit, aus Mäusen isolierten, peripheren Lymphozyten kultiviert. Unter Gabe von 1-MT wurde, im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne IDO-Inhibitor, eine deutliche Proliferation der T-Zellen festgestellt. Auch *in vivo* wurde bei Mäusen nach Injektion von LLC-Zellen und pharmakologischer Gabe von 1-MT ein geringeres Tumorstadium beobachtet. In den nach zehn Tagen seziierten Tumoren wurden immunhistochemisch IDO exprimierende Monozyten nachgewiesen [Friberg et al., 2002]. Friberg et al. postulieren, dass die Existenz von IDO im Tumor zu einer Hemmung der gegen den Tumor gerichteten Immunantwort führt.

Uyttenhove und Mitarbeiter haben zur weiteren Erforschung der Rolle von IDO im Tumorgewebe folgende Experimente durchgeführt. Verwendet wurde eine Tumorzelllinie, die einerseits hoch letal ist und andererseits gut definierte Tumor-Antigene präsentiert. Gegen diese Antigene wurden Mäuse immunisiert. Nach Injektion der Tumorzelllinie konnte kein malignes Tumor-Wachstum festgestellt werden. Das Immunsystem war in der Lage, die Tumorzellen effektiv zu bekämpfen. Wurde dieselbe Tumorzelllinie nun mit IDO transfiziert, war nach der Injektion ein unkontrolliertes Wachstum des Tumors zu beobachten. Der immunsuppressive Effekt von IDO konnte durch die Gabe von 1-MT wieder aufgehoben werden. In der selben Veröffentlichung wurde die Expression von IDO immunhistochemisch im Großteil der untersuchten menschlichen Tumorarten nachgewiesen [Uyttenhove et

1. Einleitung

al., 2003]. Die Ergebnisse zeigen, dass der Tumor durch IDO-Expression in der Lage ist, die T-Zell-Antwort zu inhibieren und eine Abstoßung des malignen Gewebes zu verhindern. Dies wird durch die Beobachtung untermauert, dass Patienten mit IDO-positiven Adenokarzinomen des Ovars, kolorektalen Adenokarzinomen, Endometrium- und Ösophaguskarzinomen jeweils im Vergleich zu den Patienten mit geringer IDO-Expression eine schlechtere Prognose aufwiesen [Okamoto et al., 2005; Brandacher et al., 2006; Ino et al., 2006; Sakurai et al., 2004]. Daher wird der Einsatz von IDO-Inhibitoren bei der supportiven systemischen Tumorthherapie diskutiert und weiter untersucht [Hou et al., 2007].

Im Gegensatz zu den oben dargelegten Ergebnissen, existieren jedoch auch Studien, in denen Tumorpatienten durch die Expression von IDO profitieren: Durch immunhistochemische Untersuchungen von HCCs (*hepatocellular carcinoma*) wurden IDO-positive Leukozyten entdeckt; die Tumorzellen waren jedoch IDO-negativ. Patienten mit hoher IDO-Expression hatten eine bessere Prognose im Gegensatz zu denen mit geringem IDO-Gehalt [Ishio et al., 2004]. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte später in einem Mausmodell nachweisen, dass Mäuse nach Tumorzellinjektion durch Gabe von 1-MT im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne IDO-Inhibitor Applikation ein größeres Tumorstadium aufwiesen [Kai et al., 2003].

Auch weitere immunhistochemische Untersuchungen an Tumorgewebe von Patienten mit nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen haben gezeigt, dass Patienten mit hoher IDO-Expression im Tumorgewebe eine bessere Prognose aufweisen. Erneut wurden infiltrierende Lymphozyten als IDO-exprimierende Zellen detektiert [Astigiano et al., 2005]. Dieser antitumoröse Effekt wurde, wie auch schon bei der antimikrobiellen Wirkung von IDO, dem lokalen Entzug der essentiellen Aminosäure Tryptophan oder dem Ablauf einer Antitumorimmunreaktion zugesprochen.

Der aktuelle Forschungsstand zeigt: Die Rolle von IDO in malignen Geweben wird kontrovers diskutiert. IDO-exprimierende Tumorzellen können über eine Hemmung der T-Zellen die Immunantwort unterdrücken und die Progression der Erkrankung fördern. Im Gegensatz dazu gibt es auch Studien, die eine Regression des Tumors mit IDO-positiven infiltrierenden Lymphozyten in Verbindung bringen.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Das RCC ist ein immunogener Tumor, folglich hat sich neben der chirurgischen Behandlung die Immuntherapie etabliert. Dabei wird das Immunsystem über stimulierende Zytokine bei der Bekämpfung des Tumors unterstützt. Leider profitieren nur ca. 30% der behandelten Patienten von einer kombinierten Immunchemotherapie. Ein Marker, der vor Beginn der Behandlung Aussagen über die Ansprechbarkeit der Immuntherapie macht, existiert leider nicht.

IDO ist ein Tryptophan-abbauendes Enzym. Durch den lokalen Entzug der essentiellen Aminosäure Tryptophan kann IDO die Replikation von bestimmten Mikroorganismen hemmen. Zudem wirkt IDO immunsuppressiv und kann an der Mutter-Kind-Barriere, bei entzündlichen sowie autoimmunen Erkrankungen und bei allogenen Transplantaten zu Toleranz führen. Die Wirkung von IDO in malignen Tumoren ist heterogen und wurde im vorherigen Kapitel beschrieben.

Ziel dieser Arbeit ist es, Informationen über die Rolle von IDO im RCC zu erlangen. Im Mittelpunkt steht die Frage, ob die Expression von IDO im Tumor eine Prognose im Hinblick auf das Überleben der RCC-Patienten zulässt und ob eine Beziehung zwischen IDO und dem Erfolg einer Immuntherapie besteht. Um diese Fragen zu beantworten, wurde eine IDO-Expressionsanalyse an RCC-Gewebe und Tumorfreiem Nierengewebe durchgeführt und mittels semiquantitativer und quantitativer Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) der IDO-mRNA Gehalt der Patientenproben bestimmt. Um heraus zu finden, welche Zellen genau IDO exprimieren, wurden immunhistochemische Färbungen des Patientengewebes durchgeführt. Zuletzt wurde überprüft, ob eine Korrelation zwischen IDO-Expression und Überlebensrate der Patienten vorliegt.

2 Materialien

2.1 Patienten

Das untersuchte RCC-Gewebe stammt von Patienten, bei denen im Zeitraum von September 1993 bis September 2002 an der Urologischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) am Klinikum Großhadern eine Nephrektomie durchgeführt wurde. Die Gewebe-Biopsien wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Im Rahmen des *staging*s durchliefen alle Patienten eine Basisdiagnostik. Diese beinhaltete eine Anamnese, eine körperliche Untersuchung, Urin- und Blutanalysen, eine Sonographie des Abdomens, eine Röntgenuntersuchung des Thorax in zwei Ebenen und eine Computer- bzw. Magnetresonanztomographie. Wenn für differenzialdiagnostische Erwägungen und die weitere Therapieplanung erforderlich, wurden Zusatzuntersuchungen durchgeführt.

Tabelle 5: Charakterisierung des Patientenkollektivs anhand von Alter, Geschlecht, TNM-Status und histologischer Differenzierung.

Charakteristika	Patienten		
	Anzahl	%	
Alle Patienten	20	100%	
Alter (Jahre)	< 60	12	60%
	> 60	8	40%
Geschlecht	weiblich	8	40%
	männlich	12	60%
Tumorstadium (T)	T1	4	20%
	T2	4	20%
	T3	11	55%
	T4	1	5%
Lymphknoten-Metastasen (N)	N0	14	70%
	N1	1	5%
	N2	3	15%
	Nx	2	10%
Metastasen (M)	M0	8	40%
	M1	12	60%
	Mx	0	0%
Histologische Differenzierung (G)	G1	0	0%
	G2	8	40%
	G3	12	60%

Die histologische Einteilung der RCCs erfolgte durch Mitarbeiter des Pathologischen Instituts der LMU. Die Stadieneinteilung der Primärtumoren wurde gemäß der UICC-

2. Materialien

und TNM-Klassifikation der RCCs vorgenommen. Insgesamt wurden 20 Patienten mit einem klarzelligem RCC untersucht.

Von 20 untersuchten Patienten waren 8 Frauen und 12 Männer im Alter von 32 bis 69 Jahren. Die Charakterisierung des Patientenkollektivs anhand der prozentualen Verteilung von Alter, Geschlecht, TNM-Status und histologischer Differenzierung ist Tabelle 5 zu entnehmen.

2.2 Geräte

Agilent 2100 bioanalyzer	Agilent
Elektrophoresekammer, horizontal	Invitrogen
Gefriermikrotom CM 3050	Leica
Geldokumentationssystem Fluor-S Multilayer	Bio Rad
Heizblock Thermomixer Comfort	Eppendorf
Light Cycler 3.39	Roche
Mehrkanalpipetten (5-50µl, 25-200µl)	Dunn Labortechnik
Mikropipetten (0,5-10µl, 10-100µl, 20-200µl, 100-1000µl)	Eppendorf
Mikrowelle Mikromat	AEG
Photometer Gene Quant II	Pharmacia Biotech
Pipettierassistent Pipetboy acu	Hirschmann
RNA LabChip [®]	Agilent
Sterilwerkbank	BSK Luft- und Klimatechnik
Stickstofftank Chronos Biosafe	Messer Griesheim
Vortexer VF 2	IKA Labortechnik
Waagen	
Präzisionswaage BP2100	Sartorius
Analysewaage MCI	Sartorius
Zentrifugen	

2. Materialien

Kühlzentrifuge Varifuge 3.0R	Eppendorf
Kühlzentrifuge 541 R	Heraeus

2.3 Häufig verwendete Materialien

Deckgläser 24x40 mm	Mennel-Gläser
Handschuhe Sempermed Nitril	Semperit
Einfrierröhrchen (2ml)	Nunc
Objektträger Super Frost Plus®	Mennel-Gläser
Pipetten (5,10 und 25ml)	Falcon
Pipettenspitzen (200 und 1000µl)	Greiner
Pipettenspitzen, gestopft	Biozym
Reaktionsgefäße (0,2ml) Softstrips	Biozym
Reaktionsgefäße (1,5ml und 2ml)	Eppendorf

2.4 Chemikalien und biologische Reagenzien

100kb DNA Marker	Fermentas
Agarose	Invitrogen
Aquatex	Merck
β-Mercaptoethanol	Sigma
„Blue Juice“- Gelladepuffer	Invitrogen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Ethidiumbromid	Bio-Rad
Ethanol	Merck
Freezing Medium®	Leica
Isopropanol	Sigma
Mayer's Hämalaunlösung	Merck

2. Materialien

Methanol	Merck
PBS-Puffer	Apotheke Klinikum Groshadern
TAE (100mM Tris-Acetat, 10mM EDTA, pH 7,5)-Puffer	Invitrogen
Wasserstoffperoxid 30%	Merck

2.5 Kits

Imm PRESS™	Vectorlabs
Light Cycler® Fast Start DNA Master ^{Plus} Sybr Green	Roche
QIAshredder™	Qiagen
Reverse Transcription System	Promega
Rneasy® Mini Kit	Qiagen

3 Methoden

3.1 Aufarbeitung des Patientenmaterials

Nach der Überführung aus flüssigem Stickstoff werden die Gewebeproben in Einbettmedium durch Einfrieren fixiert und mit Hilfe eines Gefriermikrotoms auf der Probenplattform bei -23°C geschnitten. Für die molekularen Untersuchungen (siehe 3.2) werden 20-30 Schnitte mit einer Dicke von $10\ \mu\text{m}$ bei -23°C in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt, auf Trockeneis transportiert, um anschließend die RNA zu isolieren (siehe 3.2.1). Die Paraffinschnitte zur Anfertigung der immunhistochemischen Färbungen (siehe 3.3) wurden uns vom Pathologischen Institut der LMU zur Verfügung gestellt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 RNA-Isolierung aus Gewebe

Die Isolierung der RNA aus dem, zuvor mit Hilfe des Gefriermikrotoms (siehe 3.1) geschnittenen, Patientengewebe erfolgt mit dem RNeasy® Mini-Reagenziensystem. Um möglichst viel RNA freizusetzen, wird durch die Zugabe eines Guanidinisothiocyanat-haltigen Puffers die Zell- und Organellenmembran aufgetrennt. Durch die effiziente Inaktivierung vorhandener RNasen gewährleistet der Puffer die Isolierung einer intakten RNA. Das so entstehende Lysat wird mit Hilfe von QIAshredder®-Spinsäulen und anschließender Zentrifugation homogenisiert. Dabei werden hochmolekulare genomische DNA und andere hochmolekulare Zellbestandteile geschert und die Viskosität des Zelllysats reduziert. Dem Herstellerprotokoll entsprechend wird das Lysat mit einem Ethanol-haltigem Puffer versetzt und auf eine RNeasy®-Säule aufgetragen. Die Zugabe von Ethanol fördert die selektive Bindung der RNA an eine Silicagel-Membran während der nachfolgenden Zentrifugation. Verunreinigungen an der Membran werden durch die Verwendung von Waschpuffern entfernt. Abschließend wird die RNA mit $30\ \mu\text{l}$ RNase-freiem Wasser von der RNeasy®-Säule abgelöst.

Durch die Verwendung des RNeasy® Mini-Reagenziensystem werden sowohl proteinkodierende Boten (messenger)-RNA (mRNA) als auch ribosomale RNA gewonnen. Durch die selektive Abtrennung der RNA-Spezies mit weniger als 200

3. Methoden

Nukleotiden Länge (15-20% der Gesamt-RNA) kommt es zu einer Anreicherung der mRNA. Die isolierte und gereinigte RNA wird bei -80°C aufbewahrt.

3.2.2 Qualitätskontrolle der RNA

Direkt anschließend an die Isolierung der RNA aus den Patientengeweben wurde die Qualität unserer Proben mit Hilfe von photometrischen Messungen und der Kapillarelektrophorese überprüft.

Durch die photometrischen Messungen wird die Konzentration der RNA bei 260 nm bestimmt. Hierzu wird 2 μl RNA-Lösung mit 98 μl RNase freiem Wasser im Verhältnis 1:50 verdünnt und in eine Quarzküvette gegeben. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht und der Messung der Lichtabsorption im Photometer, kann die Konzentration anhand folgender Formel errechnet werden: $c [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}^{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40$. Zusätzlich wird das Verhältnis der Absorptionswerte von 260 nm und 280 nm ermittelt. Der Quotient gibt Aufschluss über etwaige Proteinkontamination und erlaubt eine Schätzung der Reinheit der RNA. Im Optimum liegen die Werte zwischen 1,8 und 2,0.

Um die Intaktheit der RNA zu überprüfen, wird die Kapillarelektrophorese angewandt. Zur Durchführung wird ein Miniatur-Chip benötigt, dessen Vertiefungen mit Glaskapillaren untereinander verbunden sind. Die Kapillaren werden mit einer fluoreszierenden Gelmatrix gefüllt, anschließend werden die zu analysierenden Proben in die Vertiefungen gegeben. Nun tauchen Elektroden in die flüssigkeitsgefüllten Vertiefungen des Chips und erlauben so die elektrophoretische Trennung der Proben entsprechend ihrer Größe. Nacheinander werden sie an einen Messpunkt vorbei geleitet, dabei wird die Fluoreszenz des RNA-Farbstoffkomplexes laserinduziert gemessen. Um die Größe der Fragmente und die Konzentration der zu messenden Proben zu bestimmen, wird bei jeder Messung ein Standard mitgeführt (RNA 6000 ladder standard, Agilent Technologies). Dieser enthält sechs verschieden große RNA-Fragmente (0,2-6 kb) mit einer Gesamt-Konzentration von 150 ng/ μl . Durch Vergleich mit dem Standard liefert die Computersoftware (2100 expert software, Agilent Technologies) zwei unterschiedliche Darstellungen: zum einen das Elektropherogramm und zum anderen eine Fluoreszenzaufnahme, die dem Bild einer Agarosegelelektrophorese entspricht. Beide Darstellungsformen liefern Informationen über den Zustand der RNA-Probe. In erster Linie ermöglichen sie jedoch Aussagen über deren Qualität, Verunreinigungs- und Degradationszustand. Die

3. Methoden

Kapillarelektrophorese wurde den vom Hersteller vorgeschlagenen Versuchsbedingungen entsprechend durchgeführt.

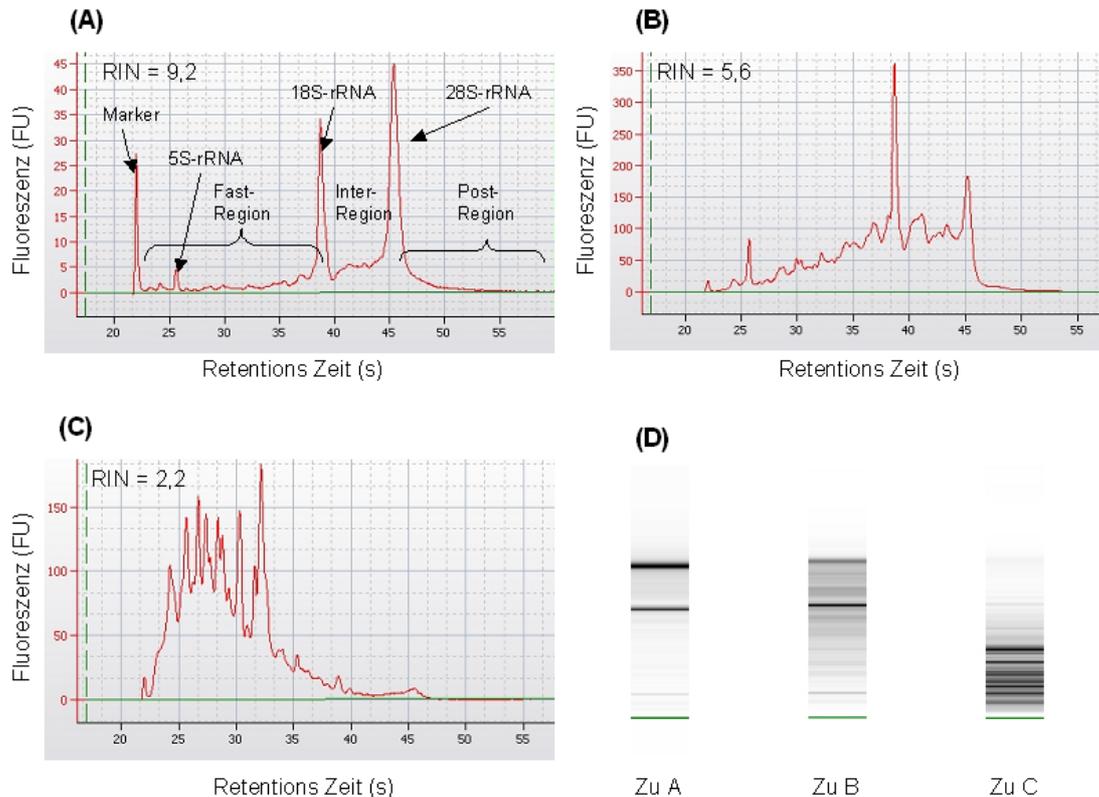


Abbildung 4: Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA. Aus dem Patientengewebe wird mit Hilfe des RNeasy® Mini-Reagenziensystems die RNA isoliert. Die Qualitätskontrolle erfolgt durch Kapillarelektrophorese mit dem Agilent 2100 bioanalyzer und dem RNA LapChip kit. Aus den Elektropherogrammen wird mit Hilfe der Software die RNA Integrity Number (RIN) errechnet. Für die Versuche dieser Arbeit wurden nur RNA mit einer RIN größer 6,5 verwendet. **(A)** Elektropherogramm einer intakten RNA (RIN = 9,2). Zudem werden *Fast-*, *Inter-* und *Post-Region* sowie Marker, 5S-, 18S- und 28S-rRNA abgetragen. **(B)** Elektropherogramm einer partiell degradierten RNA (RIN = 5,6). **(C)** Elektropherogramm einer stark degradierten RNA (RIN = 2,2). **(D)** Geldarstellung der Fluoreszenzaufnahme der unter (A) bis (C) gezeigten Proben.

Mit ca. 90% stellt die ribosomale RNA (rRNA) den größten RNA-Anteil einer Zelle dar. Dementsprechend wird bei der Kapillarelektrophorese vor allem rRNA (5S, 18S und 28S) dargestellt. Da davon auszugehen ist, dass alle RNA-Spezies gleichermaßen degradiert werden, kann folglich über den Zustand der rRNA auf die Qualität des sehr viel kleineren Anteiles der mRNA geschlossen werden. Abbildung 4A zeigt das Elektropherogramm einer intakten RNA-Probe. Die gemessene Fluoreszenz wird gegen die Retentions-Zeit aufgetragen. Zu Erkennen sind drei große Ausschläge: Der Marker, die 18S-rRNA und die 28S-rRNA. In Abbildung 4D

3. Methoden

sind die Messdaten in Form eines Agarosegelbildes dargestellt. Auch hier sind die bereits erwähnten Ausschläge in Form von Banden zu erkennen.

Um die Qualitätsbeurteilung der RNA-Proben zu standardisieren errechnet die Software aus dem Elektropherogramm die so genannte *RNA Integrity Number* (RIN). Zur Berechnung wird sowohl die gesamte elektrophoretische Kurve der RNA-Probe als auch die An- bzw. Abwesenheit von Degradationsprodukten herangezogen. Die RIN liegt zwischen 1-10, wobei der Wert 1 eine stark degradierte und der Wert 10 eine vollständig intakte RNA kennzeichnet [Schroeder et al., 2006]. Das Verhältnis der 28S- zu den 18S-Fragmenten (rRNA-Ratio) stellt ein zusätzliches Maß für die Qualität der Probe dar und sollte optimalerweise im Bereich um den Wert 2 liegen. Die in Abbildung 4A dargestellte RNA-Probe hat eine RIN von 9,2 und eine rRNA-Ratio von 1,9.

Der graduelle Prozess bei der Degradation von RNA führt im Elektropherogramm zu folgenden Veränderungen: Zunächst kommt es zu zusätzlichen Signalen im Bereich zwischen den 18S- und den 28S-Fragmenten, der so genannten *inter region*. Im weiteren Verlauf der Degradation wird zuerst die 28S- und anschließend die 18S-rRNA abgebaut. Die dabei entstehenden Degradationsprodukte führen im Bereich zwischen den 18S-Fragmenten und dem Lauffrontmarker, der *fast region*, zu Ausschlägen. Bei fortschreitender Degradation der RNA werden die entstehenden Abbauprodukte zunehmend kleiner. Abbildung 4B zeigt die beginnende Degradation einer RNA-Probe mit einer RIN von 5,6: Die einzelnen rRNA-Fragmente sind noch zu erkennen. Im Fall der großen 28S-rRNA zeigt sich jedoch ein deutlicher Abbau. Diese Beobachtung schlägt sich in einem deutlich niedrigeren Wert der rRNA-Ratio von 0,6 nieder. Die Wölbung der elektrophoretischen Kurve zwischen den 5S- und dem Rest der 28S-Fragmente wird durch die bereits abgebaute 28S-rRNA verursacht. Auch in der Geldarstellung der Fluoreszenzaufnahme verursachen die Abbauprodukte, neben den zwei typischen Banden der rRNA, zusätzliche Signale. Abbildung 4C zeigt das Bild einer fortgeschrittenen Degradation. Die typischen Signale einer RNA-Probe sind weder im Elektropherogramm noch in der Geldarstellung zu erkennen. Deutlich sichtbar ist lediglich eine Reihe von Produkten mit einer Laufzeit, die geringer ist, als die der 18S-rRNA. Diese Produkte sind kleiner und stellen Abbauprodukte dar. Die RNA Probe in Abbildung 4C hat eine RIN von 2,2 und gilt somit als stark degradiert.

3. Methoden

3.2.3 Reverse Transkription

Für die Umschreibung von messenger RNA (mRNA) in komplementäre DNA (cDNA) wird ein Reverses-Transkriptions-Reagenziensystem verwendet. Dabei wird die gesamte zelluläre RNA durch die Zugabe retroviraler Reverser Transkriptasen (AMV-RT) in der so genannten Erststrangreaktion in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Ausgelöst wird dieser Vorgang durch die komplementäre Bindung von *Random-Hexamer*-Primern an die mRNA. Die Verlängerung der Primer erfolgt durch die Anlagerung von weiteren Nukleotiden über die RNA-abhängige DNA-Polymerase in 5'→3'-Richtung. Die unspezifischen *Random*-Primer binden an mehreren Stellen innerhalb der mRNA, folglich entstehen unterschiedlich lange und unvollständige cDNA-Kopien. Die reverse Transkription wird den vom Hersteller vorgeschlagenen Versuchsbedingungen entsprechend durchgeführt: In der Denaturierung wird 1 µg der RNA-Probe mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 9,9 µl aufgefüllt und anschließend bei 70°C für 10 Minuten inkubiert. Das weitere Vorgehen ist in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tabelle 6: Reaktionsansatz (A) und Inkubationsbedingungen (B) für die reverse Transkription.

A

RNA-Probe (1µg) + Rnase freies Wasser	9,9 µl
Primer Random Hexamer (0,5 µg/µl)	1,0 µl
RT-Puffer (10x)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4,0 µl
DNTP Mix (10 mM)	2,0 µl
RNAse Hemmer (40 U/µl)	0,5 µl
AMV RevTranskriptase (25 U/µl)	0,6 µl
<hr/>	
Volumen pro Versuchsansatz	20 µl

B	Versuchsschritt	Temperatur (°C)	Dauer (min.)
	Primeranlagerung	25	10
	Verlängerung	42	60
	Denaturierung	95	5
	Ende	4	für immer

3.2.4 Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)

Als Positivkontrolle wird eine Reaktion mit dem *housekeeping*-Gen *GAPDH* etabliert. Als *housekeeping*-Gen werden Gene bezeichnet, die für exprimierte Proteine kodieren, die in jeder Zelle vorkommen. Zum einen wird dadurch die Beurteilung der cDNA-Qualität ermöglicht, zum anderen können Aussagen über den experimentellen Verlauf der PCR getroffen werden.

Bei der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) wird eine bestimmte Sequenz der cDNA durch spezifische Primer begrenzt. Diese bestehen aus 20-23 Nukleotiden und ermöglichen die enzymatische Amplifikation der cDNA. Eine Übersicht der verwendeten Oligonukleotide gibt die folgende Tabelle.

Tabelle 7: Genspezifische Oligonukleotide

Gen	Oligonukleotid	Sequenz	Produktgröße
IDO	Strang	5' GGTCATGGAGATGTCCGTAA 3'	227 bp
	Gegenstrang	5' ACCAATAGAGAGACCAGGAAGAA 3'	
GAPDH	Strang	5' AAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC 3'	868 bp
	Gegenstrang	5' AGTGGGTGTCGCTGTTGAAGTC 3'	

Ausgelöst wird die PCR mit der Denaturierung. Durch kurzzeitiges Erhitzen auf 94°C kommt es dabei zur Aufhebung der Wasserstoff-Brücken-Bindungen, folglich wird die DNA in ihre Einzelstränge zerlegt. Anschließend werden die beiden spezifischen Primer an jeweils komplementären Bereichen der DNA anhybridisiert. Dieser Vorgang wird als *annealing* bezeichnet. Die Länge und die Zusammensetzung der Oligonukleotide bestimmt die Reaktionstemperatur. Bei den von uns untersuchten Proben lag die Temperatur zwischen 60-62°C. In der anschließenden *extension* werden die Einzelstränge mit Hilfe von hitzestabilen *Taq*-Polymerase in 3'-Richtung verlängert. Als Bausteine dienen ihr die im Reaktionsansatz vorhandenen Nukleotiden (dNTPs). Im zweiten Reaktionszyklus erfolgt zunächst die Denaturierung der zuvor gebildeten Doppelstränge, worauf hin nach Anlagerung der Primer die enzymatische Verlängerung stattfindet. Auf diesem Weg wird die zu untersuchende Zielsequenz pro Zyklus verdoppelt und im Laufe des Experiments exponentiell vermehrt. Die PCR wurde den Angaben des Herstellers gemäß durchgeführt. (siehe Tabellen 8).

3. Methoden

Tabelle 8: Reaktionsansatz (A) und Inkubationsbedingungen (B) für die Polymerase-Kettenreaktion.

A		IDO	GAPDH
cDNA-Probe (1:5 mit deionisiertem Wasser verdünnt)		10,0 µl	5,00 µl
Forward Primer (25 pmol/µl)		0,40 µl	0,40 µl
Reverse Primer (25 pmol/µl)		0,40 µl	0,40 µl
PCR-Puffer (10x)		2,50 µl	2,50 µl
MgCl ₂ (25 mM)		1,50 µl	1,50 µl
dNTP Mix (25 mM)		0,20 µl	0,20 µl
Taq Polymerase (5 U/µl)		0,13 µl	0,13 µl
deionisiertes Wasser		9,78 µl	14,87 µl
Volumen pro Versuchsansatz		25,0 µl	25,0 µl

B		IDO (35 Zyklen)	GAPDH (30 Zyklen)
Versuchsschritte	Dauer (min)	Temperatur (°C)	Temperatur (°C)
Denaturierung:	0,3	94	94
Amplifikation:	Denaturierung	94	94
	Primeranlagerung	62	62
	Verlängerung	72	72
Verlängerung:	10	72	72

3.2.5 Elektrophorese im Agarosegel

Durch die Elektrophorese im Agarosegel können die bei der PCR entstandenen Produkte in einer hochmolekularen Gelmatrix ihrer Größe entsprechend aufgetrennt und dargestellt werden. Aufgrund der negativen Ladung der Phosphatgruppen wandern die DNA-Fragmente im elektrischen Feld in Richtung Anode. Entscheidend für das Wanderungsverhalten ist die Größe der zu analysierenden Nukleinsäuren, die Stärke des angelegten elektrischen Feldes, die Konformation der Makromoleküle und die Porengröße der Gelmatrix.

Um in der Gelmatrix eine optimale Auftrennung der DNA-Fragmente mit einer Größe zwischen 100-20000 Basenpaaren (bp) zu gewährleisten, wird die Agarose in einer Konzentration von 2% verwendet. Dazu wird die Agarose in einem Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer und Wasser aufgeköcht und zu einer homogenen Lösung verarbeitet. Nach der Abkühlung auf ca. 60°C wird das Gemisch mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 1 µg/ml), ein roter Phenanthridin-Farbstoff, versetzt (siehe Tabelle 9A). Während der Elektrophorese lagert sich der Farbstoff sequenzunspezifisch zwischen benachbarten Basen der DNA ein und ermöglicht später durch UV-Transillumination ($\lambda=308$ nm) eine Sichtbarmachung der DNA-Fragmente.

3. Methoden

Anschließend wird die Agarose-Lösung in horizontale Gelkammern mit Auftrennstrecken von 10 bzw. 16 cm gegossen und die Polymerisation abgewartet. Der Laufpuffer dient unter anderem als elektrisches Leitmedium und wird durch die Mischung des TAE-Puffer, Wasser und Ethidiumbromid hergestellt. Anschließend wird er ebenfalls in die Gelkammern gefüllt (siehe Tabelle 9B).

Tabelle 9: (A) Rezeptur des zwei prozentigen Agarosegels. (B) Rezeptur des Laufpuffers.

(A) Chemikalien	Menge, bzw. Volumen
Agarose	2 g
10xTAE-Puffer	10 ml
Aqua bidest	90 ml
Ethidiumbromid	2 µl

(B) Chemikalien	Volumen
10xTAE-Puffer	100 ml
Aqua bidest	900 ml
Ethidium Bromid	20 µl

Die aufzutrennenden DNA-Proben werden mit dem Auftragspuffer Bromphenolblau versetzt und anschließend in die, bei der Gelherstellung ausgesparten, Geltaschen pipettiert. Bromphenolblau erfüllt in diesem Zusammenhang zwei Aufgaben: Da die DNA-Lösungen annähernd die gleiche Dichte wie der Laufpuffer aufweisen, erleichtert der Auftragspuffer durch eine Erhöhung der Dichte das Pipettieren der Proben in die Geltaschen. Zudem markiert er die Elektrophoresefront.

Um die Fragmentlänge abschätzen zu können, wird bei jedem Lauf ein Größenstandard in Form eines 100 bp-DNA-Leiters mitgeführt.

Bei einer Spannung von 80 mV wird nun die eigentliche Gelelektrophorese durchgeführt. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgt durch die computergestützte digitale Ablichtung unter UV-Licht mit einer Belichtungsdauer von 20 sec.

Die Agarosegel-Bilder wurden wie folgt ausgewertet: Die Banden der aus Patientengewebe amplifizierten IDO-cDNA wurden aufgrund ihrer Fluoreszenzintensität in vier Kategorien eingeteilt. In der ersten Kategorie waren keine, in der zweiten leichte, in der dritten mittelstarke und in der vierten starke Banden zu beobachten. Um die Objektivität des Verfahrens zu sichern, wurde die visuelle Einteilung der Banden von verschiedenen Personen insgesamt dreimal wiederholt. Bei Abweichungen in der Zuordnung wurde zur weiteren Auswertung der gerundete Mittelwert herangezogen.

3. Methoden

3.2.6 Quantitative *Real-time*-PCR

Im Gegensatz zur semiquantitativen PCR erlaubt die *Real-time*-PCR, über eine Messung von laserinduzierten Fluoreszenzsignalen, eine quantitative Echtzeitanalyse. Zu diesem Zweck wird dem PCR-Ansatz neben den spezifischen Primern auch ein interkalierender DNA-Farbstoff hinzugefügt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff lagert sich in der DNA ein (interkaliert) bzw. bindet an die doppelsträngige DNA. Die gemessene Fluoreszenz ist somit direkt proportional zur Menge des PCR-Produktes, das während der PCR von Zyklus zu Zyklus exponentiell zunimmt.

Für die *Real-time*-PCR wird das FastStart-DNA-Master^{Plus}-Kit von Roche verwendet. Dabei wird die Reaktion in einem Gesamtvolumen von 20 µl angesetzt und den Angaben des Herstellers gemäß durchgeführt (Tabellen 10).

Als Positivkontrolle wird die Reaktion mit dem *housekeeping*-Gen β -actin etabliert. Wie bei der Polymerase-Kettenreaktion (siehe 3.2.4) ermöglicht das *housekeeping*-Gen auch hier eine Beurteilung der cDNA-Qualität.

Tabelle 10: Reaktionsansatz (A) und Inkubationsbedingungen (B) der Quantitativen *Real-time*-PCR.

(A)	IDO Menge (µl)	β -actin Menge (µl)
cDNA Probe (1:5 mit deionisiertem Wasser verdünnt)	6	2
Forward-Primer (25 pmol/µl)	0,25	0,4
Reverse-Primer (25 pmol/µl)	0,25	0,4
Master Mix	4	4
Wasser	9,5	13,2
Volumen je Versuchsansatz	20	20

(B) Versuchsschritt	Zyklen	Segment	Temperatur (°C)	Zeit
Vor-Inkubation				
	1		95	10 min
Amplifikation				
Quantifikation	45	Denaturation	95	10 sec
		Primeranlagerung	60	10 sec
		Verlängerung	72	16 sec
Schmelzkurve				
Schmelzkurve	1	Denaturation	95	0 sec
		Primeranlagerung	65	15 sec
		Verlängerung	95 (0,1 °C/s)	0 sec
Abkühlung				
	1		40	30 sec

3. Methoden

Nach Abschluss der *Real-time*-PCR liefert die Software (LightCycler Software Version 3.5, Roche) auf Basis der Ergebnisse zwei unterschiedliche graphische Darstellungen: Zum einen den Amplifikations-Plot, zum anderen die so genannte Schmelzkurve des Amplifikationsprodukts.

Bei der Amplifikation wird das Fluoreszenzsignal im Reaktionsgefäß nach jedem Zyklus gemessen und gegen die Zyklenzahl aufgetragen. Nach Abschluss der *Real-time*-PCR entsteht so der Amplifikations-Plot. Der Verlauf lässt sich dabei in drei Phasen einteilen: in eine Hintergrund-Phase, eine Phase exponentiellen Wachstums (Log-Phase) und eine Plateau-Phase (siehe Abbildung 5).

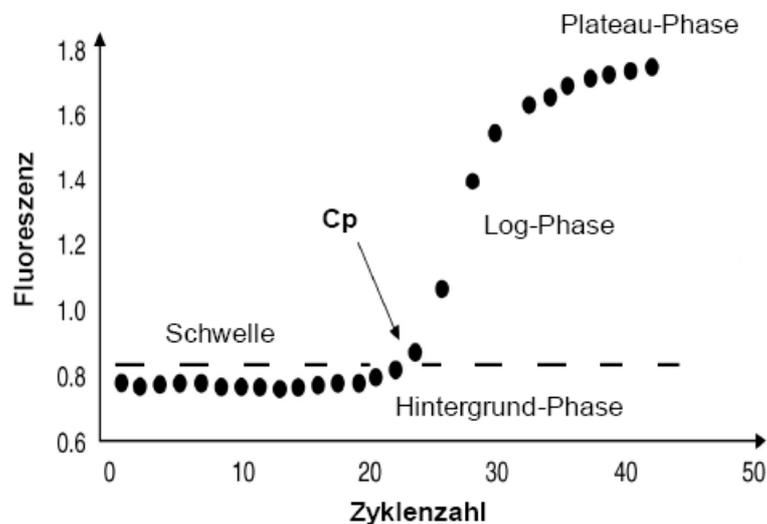


Abbildung 5: Phasen des Amplifikationsprodukts in der quantitativen *Real-time*-PCR.

In der ersten Phase übertreffen Hintergrundsignale diejenigen des PCR-Produkts. In Abhängigkeit von der initialen Menge an DNA, heben sich die Fluoreszenzsignale des PCR-Produkts im weiteren Verlauf statistisch signifikant von denen des Hintergrunds ab. Der individuelle Schwellenwert wird durch die Software bestimmt und als *crossing point* (CP) bezeichnet. Er ist definiert durch die Zyklenzahl, bei der die Fluoreszenzsignale der amplifizierten Probe die Hintergrundsignale überschreiten. Der CP gilt als direktes Maß für die Menge des PCR-Produkts: Je niedriger der Wert, desto höher ist Kopienzahl und Ausgangskonzentration der Probe.

Abbildung 6 ist ein Beispiel für die Auswertung einer *Real-time*-PCR und zeigt die Amplifikations-Plots von 16 Proben. Als Positivkontrolle wird cDNA von INF- γ stimulierten THP1-Zellen verwendet, als Negativkontrolle dient Wasser. Der

3. Methoden

Fluoreszenzwert der Negativkontrolle darf während der gesamten Messung nicht ansteigen. Bei einem steigenden Fluoreszenzwert der Wasserkontrolle wurden die Proben im weiteren Verlauf nicht berücksichtigt.

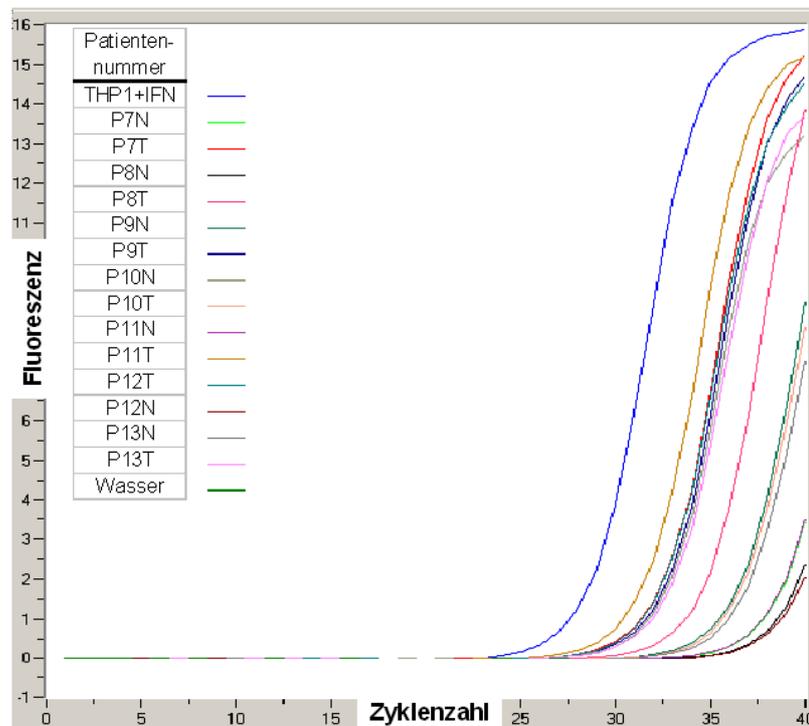


Abbildung 6: Quantitative Bestimmung der IDO-cDNA in tumorfreiem Nieren (N)- und RCC-Gewebe (T) mittels *Real-time-PCR*. Ein μg der aus den RCC- und Nieren-Gewebe gewonnenen, Gesamt-RNA wurde in einem Versuchsansatz von 20 μl revers transkribiert. Anschließend wurde eine *Real-time-PCR* den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen entsprechend durchgeführt. Zu sehen ist die **Zunahme der IDO-cDNA in Abhängigkeit von Zykluszahl**, gemessen anhand der SybrGreen-Einlagerung in doppelsträngige cDNA. Die *Real-time-PCR* wurde mit einer Zykluszahl von 40 Wiederholungen durchgeführt.

Nach der Amplifikation wird die Schmelzkurve bestimmt. Die Temperatur des Reaktionsansatzes wird erhöht, die amplifizierte doppelsträngige DNA trennt sich in Einzelstränge auf und verliert, da der Fluoreszenzfarbstoff nur an doppelsträngige DNA bindet, ihre Fluoreszenz. Jedes spezifische DNA-Fragment weist abhängig von Länge und Nukleotidzusammensetzung eine eigene Schmelztemperatur auf. Mit Hilfe der Schmelzkurve können von daher Aussagen über die Reinheit des Amplifikats sowie über den Unterschied zwischen spezifischen und unspezifischen Produkten getroffen werden. Sind die amplifizierten PCR-Produkte gleich, sollten sie auch die gleiche Schmelztemperatur aufweisen. In Abbildung 7 sind die Schmelzkurven der 16 untersuchten Proben dargestellt.

3. Methoden

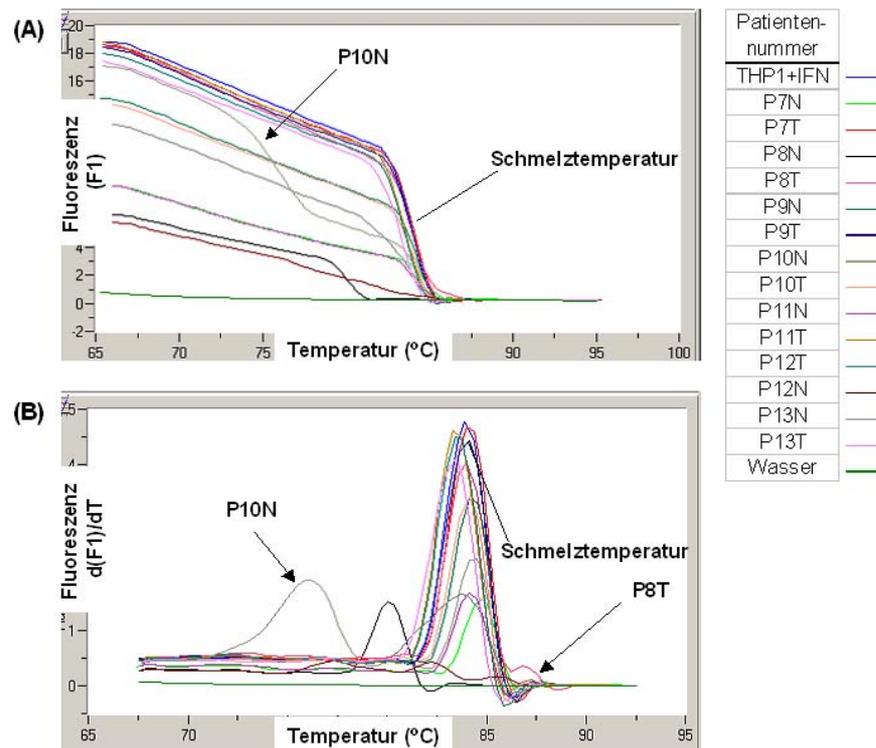


Abbildung 7: Schmelzkurven der in Abbildung 6 gezeigten *Real-time*-PCR. (A) zeigt die Rohdaten der Schmelzkurve, (B) die erste Ableitung der Rohdaten, das Maximum entspricht der Schmelztemperatur.

Deutlich zu erkennen ist, dass der Großteil der Proben bei der gleichen Temperatur denaturiert. Einige Kurven (z.B. P10N und P8T) zeigen jedoch einen abweichenden Verlauf und weisen folglich auch Differenzen bei der Schmelztemperatur auf. Dies spricht für die Bildung unspezifischer Produkte. Zur weiteren Analyse wird mit der, bei der *Real-time*-PCR amplifizierte IDO-cDNA, ein Agarosegel angefertigt. Während das korrekte IDO-cDNA-Amplifikationsprodukt mit einer Länge von 227 bp bei den meisten Proben beobachtet wird, weichen die Proben P10N und P8T in der Tat deutlich vom erwarteten Wert ab (Abbildung 8).

Bei P10N ist neben dem IDO-Amplifikationsprodukt ein weiteres unspezifisches Produkt zu erkennen. Dies erklärt die Denaturierung eines Teils der *Real-time*-PCR Probe bei einer niedrigeren Temperatur.

Bei Probe P8T verhält es sich genau umgekehrt: Neben dem erwarteten IDO-cDNA-Fragment weist das Agarosegel zusätzlich ein längeres Produkt auf. Folglich denaturiert ein Teil des *Real-time*-PCR Produkts bei einer höheren Temperatur.

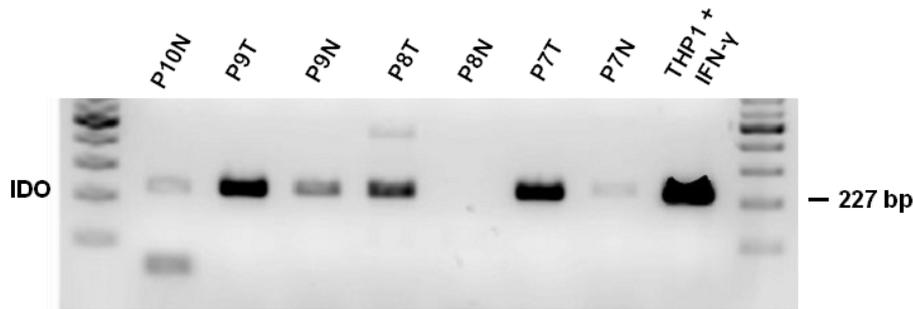


Abbildung 8: Nachweis von unspezifischen *Real-time*-PCR-Amplifikationsprodukten am Beispiel der Proben P10N und P8T. Ein μg der aus dem RCC-Gewebe gewonnenen Gesamt-RNA wird in einem Versuchsansatz von 20 μl revers transkribiert. Im Anschluß wird nach den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen gemäß eine *Real-time*-PCR durchgeführt. Das Amplifikationsprodukt wird mittels Elektrophorese in einem 2%-igen Agarosegel der Größe entsprechend aufgetrennt.

Die anhand von Abbildung 7 und 8 erläuterten Beispiele verdeutlichen, dass die Schmelzkurven einer zusätzlichen Kontrolle der Methode dienen. Die ermittelten CP-Werte werden nur dann zur weiteren Auswertung herangezogen, wenn die dazugehörige Probe eine spezifische Schmelzkurve aufweist.

3.3 Immunhistochemische Methoden

Um IDO auf der Proteinebene nachzuweisen, werden immunhistochemische Färbungen angefertigt. Die Peroxidase-Färbung wird anhand einer indirekten Zwei-Schritt-Methode durchgeführt: Zunächst bindet ein unkonjugierter Primärantikörper an das zu färbende Antigen, anschließend wird ein zweiter, enzymmarkierter Sekundärantikörper aufgetragen, der sich gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers richtet. Abschließend folgt die Substrat-Chromogenreaktion. Die detaillierte Vorgehensweise wird im folgenden Abschnitt erläutert.

Zunächst werden die Paraffinschnitte zweimal je fünf Minuten in Xylol entparaffiniert und anschließend ebenfalls je fünf Minuten, in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96% und 75% Ethanol) sowie einer Spülung mit Aqua dest. rehydriert. Beim folgenden Antigen-*retrieval* werden die Schnitte mit einer, im Verhältnis 1:10 verdünnten, Tris/EDTA Stammlösung bei 95-99°C 30 Minuten in einer Mikrowelle erhitzt. Das *retrieval* soll die Antikörperbindung an Epitope des Antigens vereinfachen. Nach dem die Objektträger 20 Minuten abgekühlt sind, werden sie dreimal in einem PBS (*phosphate buffered saline*) -Puffer gewaschen und anschließend insgesamt für fünf Minuten einer Peroxidaseblockierung (80 ml PBS +

3. Methoden

10 ml Methanol + 10 ml H₂O₂ 30%) unterzogen. In diesem Schritt wird die endogene Peroxidase blockiert, damit bei der eigentlichen Färbereaktion lediglich die Peroxidase markierten Sekundärantikörper reagieren. Zur weiteren immunhistochemischen Färbung wird ein Verstärkungskit (ImmPRESS®, Vector) verwendet. Die für die Färbung verantwortlichen Enzyme werden dabei zu Mikropolymeren verbunden und an einen spezifischen Sekundärantikörper gekoppelt. Durch Erhöhung der enzymatischen Aktivität kommt es folglich zu einer Verstärkung des Farbsignals. Im Anschluss an drei Waschgänge, folgt der Proteinblock mit 2,5 prozentigem Pferdeserum. Er dient der Absättigung unspezifischer Fc-Rezeptoren. Im Anschluß werden die Paraffinschnitte für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper (Tabelle 11) in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Puffer wird der HRP (*horseradish peroxidase*) -gekoppelte Anti-Maus-Sekundärantikörper (ImmPRESS®, Vector) für 30 Minuten aufgetragen.

Tabelle 11: Verwendete Primärantikörper.

Primärantikörper: Monoklonaler Maus anti ... Antikörper	Quelle	verwendete Konzentration
IDO	Dr. Takikawa	35 µg/ml
MOPC 21	Sigma	10 µg/ml
CEACAM1	Genovac GmbH	10 µg/ml
CD45	DakoCytomation	7 µg/ml
Ki67	DakoCytomation	0,8 µg/ml
CD34	Ventana Medical Systems	8 µg/ml

Die eigentliche Peroxidase-Färbung folgt nach erneuten Waschgängen. In der 15-minütigen Peroxidase-Färbung ermöglicht die Meerrettichperoxidase die Oxidation des Chromogens 3-amino-9-ethylcarbazol (AEC), das ein unlösliches rotes Endprodukt bildet. Abschließend folgen die Hämalaun-Gegenfärbung und die Eindeckelung der Objektträger. Tabelle 12 zeigt die einzelnen Schritte der verwendeten Peroxidase-Färbung.

3. Methoden

Tabelle 12: Die verwendete Zwei-Schritt-Methode zur immunhistochemischen Färbung von Paraffinschnitten.

Inkubationsschritt	Reagenz	Inkubationszeit, -temperatur	Waschgang
Peroxidase-Blockierung	80 ml PBS +10 ml Methanol +10 ml H ₂ O ₂ 30%	5 min, Raumtemperatur	3 x PBS
Abdeckung	Pferdeserum 2,5% in PBS	20 min, Raumtemperatur	3 x PBS
Primärantikörper	siehe Tab. 11	2 h, Raumtemperatur	3 x PBS
Sekundärantikörper	-	30 min, Raumtemperatur	3 x PBS
Peroxidase-Färbung	16 mg AEC + 4 ml DMF + 46 ml Acetatpuffer + 60 µl H ₂ O ₂ 30%	15 min, Raumtemperatur	3 x Aqua dest
Gegenfärbung	Hämalaun	30 sec	3 min in Wasser
Eindeckeln	in Aquatex	-	-

Für jedes gefärbte Präparat wird eine Isotypkontrolle angefertigt. Anstelle des IDO-Primärantikörpers wird der Paraffinschnitt mit gereinigtem IgG1-Isotyp (*mouse IgG1* MOPC 21) inkubiert. Die Konzentration des verwendeten MOPC21 beträgt 10 µg/ml. Die Quantifizierung der mit den verschiedenen Antikörpern gefärbten Paraffinschnitte erfolgte mit Hilfe eines Rasterokulars bei 400-facher Vergrößerung. Als Maßeinheit diente die Anzahl der gefärbten Zellen pro Gesichtsfeld. Es wurden mindestens 25 Gesichtsfelder, über die gesamte Tumorschnittfläche verteilt, analysiert. Zur statistischen Auswertung wurde der Spearman-Rangkorrelations-Test verwendet.

Drei Tage lang mit INF-γ stimulierte THP1-Zellen dienten als Positivkontrolle. Mittels einer Zytocentrifuge wurden jeweils 100 µl der THP1-Zellensuspension auf Glasobjektträger aufgebracht (5 min, 1000 rpm bei Raumtemperatur). Das entspricht einer errechneten Zellzahl von 40.000 Zellen pro Objektträger. Nach einer Trockenzeit von 12-24 Stunden bei Raumtemperatur werden die Zytospinpräparate entweder sofort weiterverarbeitet oder für die später erfolgende immunhistochemische Markierung bei -80°C gelagert.

4 Ergebnisse

4.1 Qualitätskontrolle der RNA

Um exakte Informationen über Konzentration und Qualität der verwendeten RNA zu erhalten, wurden bei den RNA-Proben photometrische Messungen sowie eine Kapillarelektrophorese durchgeführt. Die Messungen mittels Photometer ergeben zwei wichtige Werte: Zum einen die RNA-Konzentration und zum anderen das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm. Die bestimmte Konzentration der RNA-Proben lag im Messbereich zwischen 94 und 660 µg/ml, das Verhältnis der Absorptionswerte von 260 nm zu 280 nm zwischen 1,6 und 1,9.

Der weiteren Qualitätskontrolle diene die Kapillarelektrophorese. Bei dieser Methode wird die RNA-Probe elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend deren Fluoreszenz gemessen. Um die Bewertung der RNA-Proben zu standardisieren, errechnet die Software aus dem Elektropherogramm die so genannte RIN [Schroeder et al., 2006]. Für die anschließende PCR-Untersuchung wurden lediglich RNA-Proben mit einer RIN über 6,5 verwendet. RNA-Proben mit einer niedrigeren RIN wurden erneut isoliert und den Angaben in Abschnitt 3 gemäss weiterverarbeitet. Die RIN wurde für insgesamt 38 Proben bestimmt. Die Messwerte liegen zwischen 6,5 und 9,2, der Mittelwert beträgt 7,9.

4.2 Nachweis von IDO-mRNA im RCC-Gewebe

4.2.1 Semiquantitative Bestimmung von IDO-mRNA mittels RT-PCR

In einer Studie aus dem Jahr 2003 berichten Uyttenhove et al., dass IDO-mRNA in einer Reihe von menschlichen Tumoren nachweisbar ist [Uyttenhove et al., 2003], die Frequenz IDO-positiver Tumoren eines Typs variiert jedoch erheblich.

Um eine erste Übersicht der Expressionsverteilung in RCC- und Normalnieren-Gewebe zu erhalten, wurde der Gehalt der IDO-mRNA von 20 klarzelligen RCC und 18 korrespondierenden tumorfremem Nierengewebe mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt. Die PCR-Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und ihre Menge, wie in Material und Methoden-Abschnitt beschrieben, abgeschätzt.

Abbildung 9A zeigt ein Beispiel für die Auswertung eines Agarosegel-Bildes. Dargestellt wird jeweils die IDO-cDNA der tumorfremen Niere (N) und des RCC-

4. Ergebnisse

Gewebes (T). Eine dreitägige IFN- γ -Stimulation resultiert in THP1-Zellen in einem starken Anstieg der IDO-mRNA-Menge. Sie dienen daher als Positivkontrolle. Aufgrund der fehlenden IDO-Expression nicht stimulierter THP1-Zellen eignen sich diese als Negativkontrolle. GAPDH diene in seiner Eigenschaft als *housekeeping*-Gen. GAPDH-cDNA weist eine Produktlänge von 868 bp auf und diene der Kontrolle von Menge und Qualität der RNA.

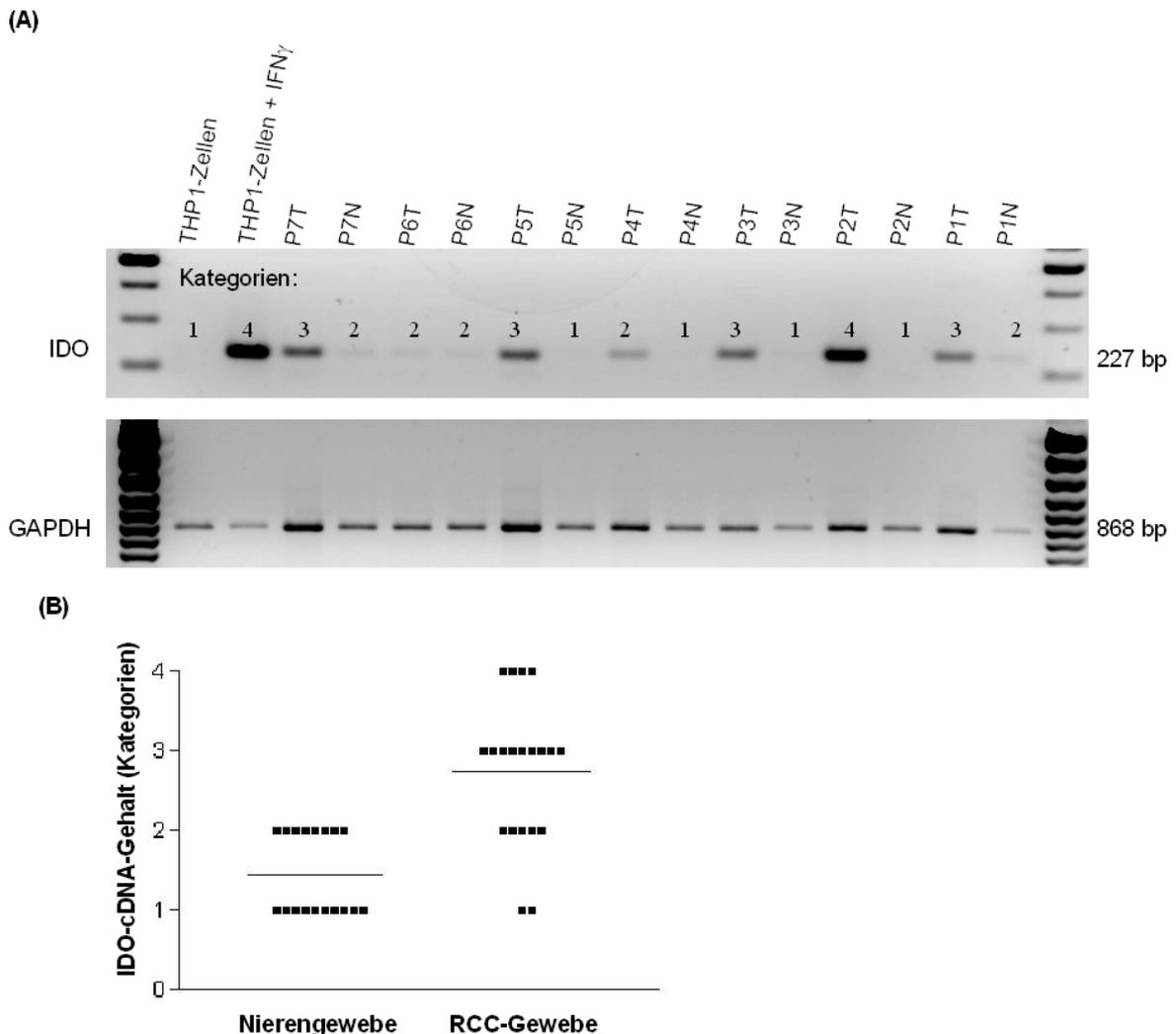


Abbildung 9: Semiquantitativer Nachweis von IDO-mRNA in tumorfreiem Nieren (N)- und RCC-Gewebe (T). (A) Zum RT-PCR-Nachweis von IDO-mRNA wurde 1 μ g der aus dem RCC-Gewebe gewonnenen Gesamt-RNA in einem Versuchsansatz von 20 μ l revers transkribiert und in einem Verhältnis von 1:5 verdünnt. Im Anschluß folgte die PCR mit genspezifischen Primern von 20% des RT-Ansatzes. Die Hälfte des in der PCR verwendeten Reaktionsansatzes (12,5 μ l) wurde mittels Elektrophorese in einem 2%-igen Agarosegel der Größe entsprechend aufgetrennt. Die Zahlen innerhalb der Laufspuren zeigen die von uns vorgenommene Zuordnung in Kategorien. Exemplarisch sind die Ergebnisse für 7 Patienten gezeigt. P, Patient; T, RCC-Tumorgewebe; N, korrespondierendes tumorfreies Normalgewebe aus der tumortragenden Niere. (B) **Streudiagramm der kategorisierten IDO-cDNA-Mengen**, die mittels RT-PCR aus tumorfreiem Nieren- und RCC-Gewebe bestimmt wurden. Die Horizontalen markieren jeweils den Mittelwert.

4.2.2 Quantitative Bestimmung von IDO-mRNA in RCC- und tumorfreiem Nieren-Gewebe

Die RT-PCR-Auswertung der RCC-Proben ergab, im Vergleich zu den Messungen bei tumorfreiem Nierengewebe, eine erhöhte Genexpression von IDO-cDNA in RCC-Gewebe. Jedoch variierte die IDO-Expression zwischen den einzelnen RCC-Proben erheblich. Um den Unterschied zwischen tumorfreiem Nierengewebe und Tumor, aber auch die Differenzen zwischen den einzelnen RCC-Proben genauer zu bestimmen, wurde mit identischen Patientenproben eine quantitative *Real-time-PCR* durchgeführt. Die Zunahme der PCR-Produkte, die Schmelzkurven und deren erste Ableitungen sind für einen Teil der Proben in Abbildung 10 gezeigt. Zur weiteren Auswertung wurden nur Messungen herangezogen, deren Negativkontrolle (Wasser statt cDNA-Lösung) keine Produktbildung aufwies.

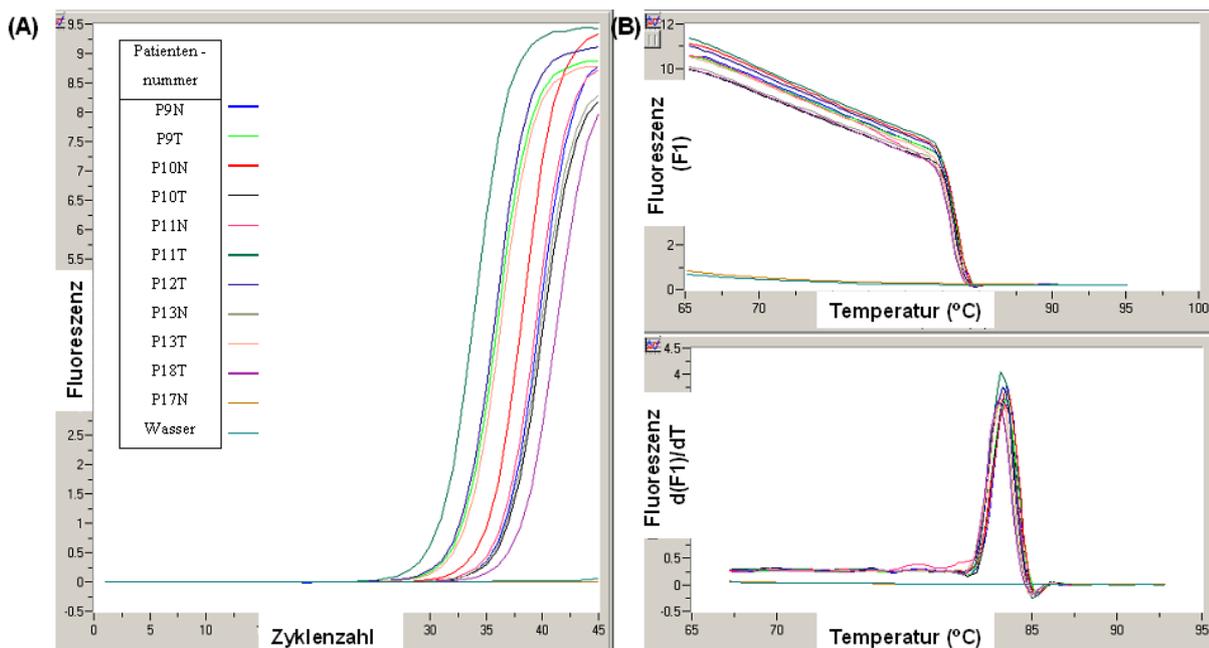


Abbildung 10: Quantitative Bestimmung der IDO-cDNA in tumorfreiem Nieren (N)- und RCC-Gewebe (T) mittels *Real-time-PCR*. Ein μg der aus den RCC- und Nieren-Gewebe gewonnenen, Gesamt-RNA wurde in einem Versuchsansatz von 20 μl revers transkribiert. Anschließend wurde eine *Real-time-PCR* den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen entsprechend durchgeführt. **(A) Zunahme der IDO-cDNA in Abhängigkeit von Zykluszahl**, gemessen anhand der SybrGreen-Einlagerung in doppelsträngige cDNA. Die *Real-time-PCR* wurde mit einer Zykluszahl von 45 Wiederholungen durchgeführt. **(B) Schmelzkurven** zur Überprüfung der Spezifität des Amplifikationsproduktes.

Alle untersuchten Proben beginnen bei ca. 84 °C zu denaturieren. Dies lässt auf eine identische Länge und Nukleotidzusammensetzung der untersuchten cDNA schließen. Folglich gibt die Schmelzkurve Auskunft über die Spezifität der PCR-

4. Ergebnisse

Reaktion. Zur weiteren Auswertung der *Real-time*-PCR wurden lediglich Proben herangezogen, deren Amplifikations-Plot und Schmelzkurven mit den in Abbildung 10 gezeigten Beispielen vergleichbar waren.

Um die Genauigkeit der Methode zu kontrollieren, wurden die Messungen bei insgesamt 16 zufällig ausgewählten Proben mehrfach wiederholt. Abbildung 11 zeigt eine Übersicht aller empirischen Standardabweichungen: Die Werte liegen zwischen 0,06 und 1,2 Zyklen, der Mittelwert beträgt 0,45 Zyklen und wird in der Grafik durch eine Horizontale dargestellt.

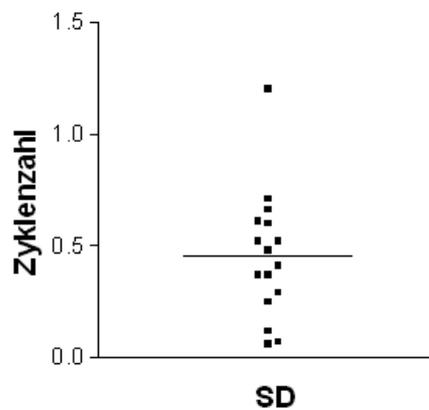


Abbildung 11: Streudiagramm der Standardabweichungen (SD) zur Überprüfung der Meßgenauigkeit der mittels der *Real-time*-PCR mehrmals quantifizierten IDO-cDNA-Mengen. Die Horizontale markiert den Mittelwert.

Quantitative Messungen wurden bei insgesamt 38 Proben durchgeführt. 18 davon stammen aus tumorfreien Nierengewebe, 20 aus RCC-Gewebe. Als *housekeeping*-Gen wurde bei der *Real-time*-PCR β -Actin verwendet und für jede Probe separat bestimmt. Abbildung 12B zeigt die CP-Werte für die Quantifizierung von β -Actin-cDNA. Die CP(crossing point)-Werte entsprechen der Zyklenzahl, bei denen eine vorbestimmte Produktmenge während des Amplifikationsprozesses erreicht wird. Links sind die Proben aus tumorfreiem Nierengewebe dargestellt: Der Mittelwert beträgt 25,63, die Standardabweichung 0,82 Zyklen. Die rechte Hälfte der Grafik fasst die Ergebnisse der Proben aus Tumorgewebe zusammen: Der Mittelwert liegt bei 25,23 Zyklen, die Standardabweichung bei 0,88.

Abbildung 12A stellt die CP-Werte der IDO-*Real-time*-PCR dar. Bei mehrfach bestimmten Proben, wurde bei der weiteren Auswertung der Mittelwert berücksichtigt. Proben, bei denen während der insgesamt 45 Amplifikationszyklen kein Fluoreszenzanstieg zu verzeichnen war, gingen mit einem CP-Wert von 45 in

4. Ergebnisse

die Berechnung ein. Auf der linken Seite sind die tumorfreen Nierengewebe mit einem Mittelwert von 38,34 Zyklen aufgetragen, auf der rechten Seite die Tumorgewebe mit einem Mittelwert von 34,20 Zyklen.

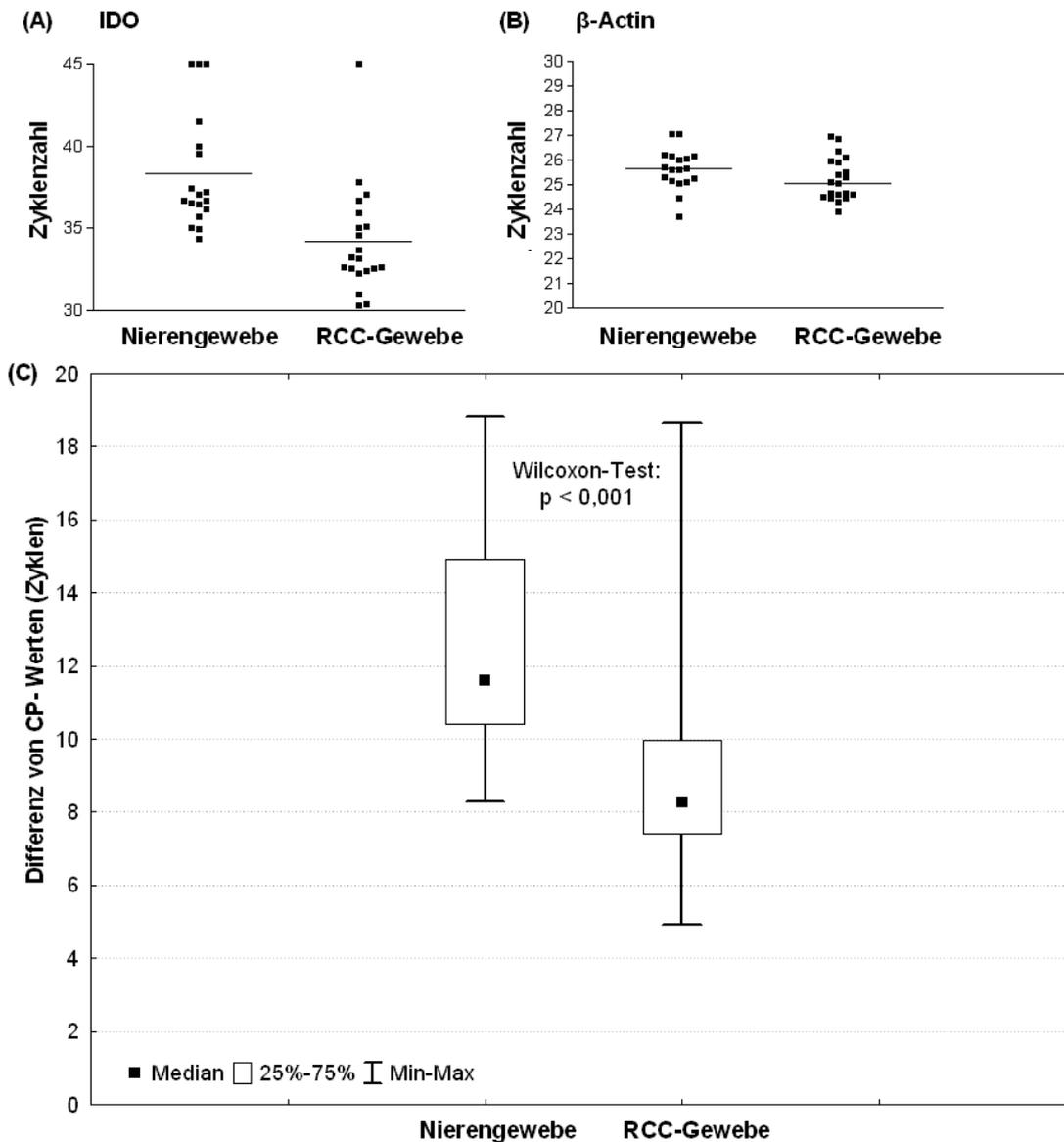


Abbildung 12: Quantitative Bestimmung der IDO-cDNA in tumorfreiem Nieren- und RCC-Gewebe mittels *Real-time*-PCR. (A) Streudiagramm der mittels *Real-time*-PCR bestimmten IDO-cDNA-Mengen, dargestellt als CP-Werte. (B) Streudiagramm der mittels *Real-time*-PCR bestimmten β -Actin-cDNA-Mengen, dargestellt als CP-Werte. (C) IDO-cDNA-Menge in tumorfreien Nieren- und RCC-Gewebe nach Korrektur für den β -Actin-cDNA-Gehalt der Proben, dargestellt als Differenz der CP-Werte aus IDO- und β -Actin-cDNA-Mengenbestimmung. Die statistische Signifikanz des IDO-cDNA-Gehalts wurde mit Hilfe des Rangsummentest nach Wilcoxon untersucht.

Die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR und der quantitativen *Real-time*-PCR zeigten, dass RCC-Gewebe mehr IDO-mRNA enthält als tumorfreies Nierengewebe.

4. Ergebnisse

Schon die Auswertung der semiquantitativen RT-PCR in Abbildung 9 lieferte durch die Zuordnung in höhere Kategorien erste Hinweise für eine stärkere IDO-Expression in RCC-Gewebe. Abbildung 12A ist zu entnehmen, dass die RCC-Proben im Durchschnitt einen niedrigeren CP-Wert aufweisen und folglich mehr IDO-mRNA enthalten als die Proben aus tumorfreiem Nierengewebe.

Die statistische Auswertung der durch die *Real-time*-PCR gewonnenen Ergebnisse erfolgte anhand des Rangsummentestes nach Wilcoxon. Er vergleicht den IDO-cDNA-Gehalt der RCC-Proben mit dem der Proben aus tumorfreiem Nierengewebe. Im Vergleich zu tumorfreiem Nierengewebe zeigt das Testergebnis eine hochsignifikante ($p < 0,001$) Anreicherung von IDO-mRNA im RCC-Gewebe der Patienten (Abbildung 12C).

4.3 Immunhistochemie

4.3.1 RCC-Endothelzellen und IDO-Expression

Durch die PCR-Untersuchungen konnte ein signifikant höherer Gehalt an IDO-mRNA im RCC-Gewebe festgestellt werden. Um die IDO-Expression auch auf der Proteinebene nachzuweisen, wurden aus Patientengewebe gewonnene Paraffinschnitte mit Hilfe eines monoklonalen anti-IDO-Antikörpers immunhistochemisch untersucht. Gleichzeitig konnten dadurch auch die IDO exprimierenden Zellen im RCC-Gewebe lokalisiert werden.

Als Positiv- und Negativkontrolle wurden THP1-Zellen aus einer monozytären Leukämiezelllinie verwendet (siehe Abbildung 13), die nach dreitägiger Stimulation mit IFN- γ IDO exprimieren. Zellen, die dieser Stimulation nicht unterzogen wurden, zeigen keine IDO-Expression. Abbildungen 13A und B zeigen Beispiele für die Positiv- und Negativkontrollen nach Reaktion mit dem anti-IDO-Antikörper und Detektion mittels Peroxidase-Färbung. Eine Isotypkontrolle ist in Abbildung 13C zu sehen. Als Primärantikörper wurde ein IgG1-Isotyp (MOPC 21) verwendet. Bei falsch negativen bzw. positiven Kontrollen wurde die Färbung wiederholt.

4. Ergebnisse

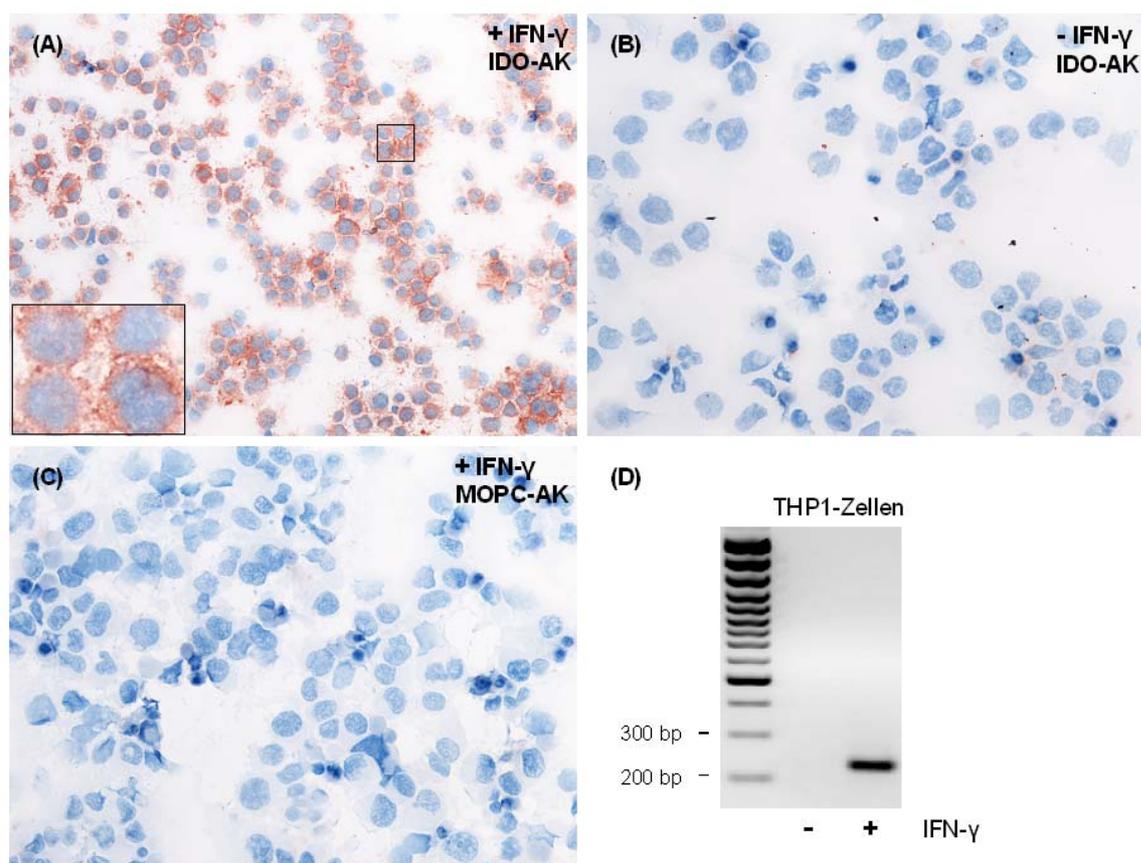


Abbildung 13: Kontrolle der Spezifität der für die immunhistochemischen Färbungen verwendeten monoklonalen anti-IDO-Antikörper. Nach dreitägiger IFN- γ -Stimulation wurden THP1-Zellen entweder mit dem anti-IDO-Antikörper (A) oder dem MOPC21-Antikörper als Isotypkontrolle (IgG1; C) inkubiert und nach Reaktion mit einem Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper mittels Peroxidase-Färbung angefärbt. THP1-Zellen nach 3-tägiger Kultivierung ohne IFN- γ -Stimulation dienten als Negativkontrolle (B). Der Nachweis der IDO-Expression auf mRNA-Ebene erfolgte durch PCR (D). Ein μg der aus den THP1-Zellen gewonnenen Gesamt-RNA wurde in einem Versuchsansatz von 20 μl revers transkribiert und in einem Verhältnis von 1:5 verdünnt. Im Anschluß folgte die PCR mit genspezifischen Strang- und Gegenstrangprimern. Die Hälfte des in der PCR verwendeten Reaktionsansatzes (12,5 μl) wurde mittels Elektrophorese in einem 2%-igen Agarosegel der Größe entsprechend aufgetrennt.

Immunhistochemischen Färbungen mit dem IDO-spezifischen monoklonalen Antikörper wurden bei insgesamt 20 Proben aus tumorfreiem Nierengewebe sowie 20 RCC-Proben durchgeführt. Aus der Abbildung 14 geht hervor, dass sich die Expression des IDO-Proteins auf RCC-Gewebe beschränkt. Im tumorfreien Nierengewebe konnten keinerlei IDO-positive Strukturen beobachtet werden (Abbildung 14C, D). IDO-positiv im RCC, ist jedoch nicht, wie zuvor angenommen, Tumor-, sondern Endothelzellen (Abb. 14A, 15A, B). IDO-positive Tumorzellen konnten in den von mir untersuchten primären RCC-Proben nicht festgestellt werden.

4. Ergebnisse

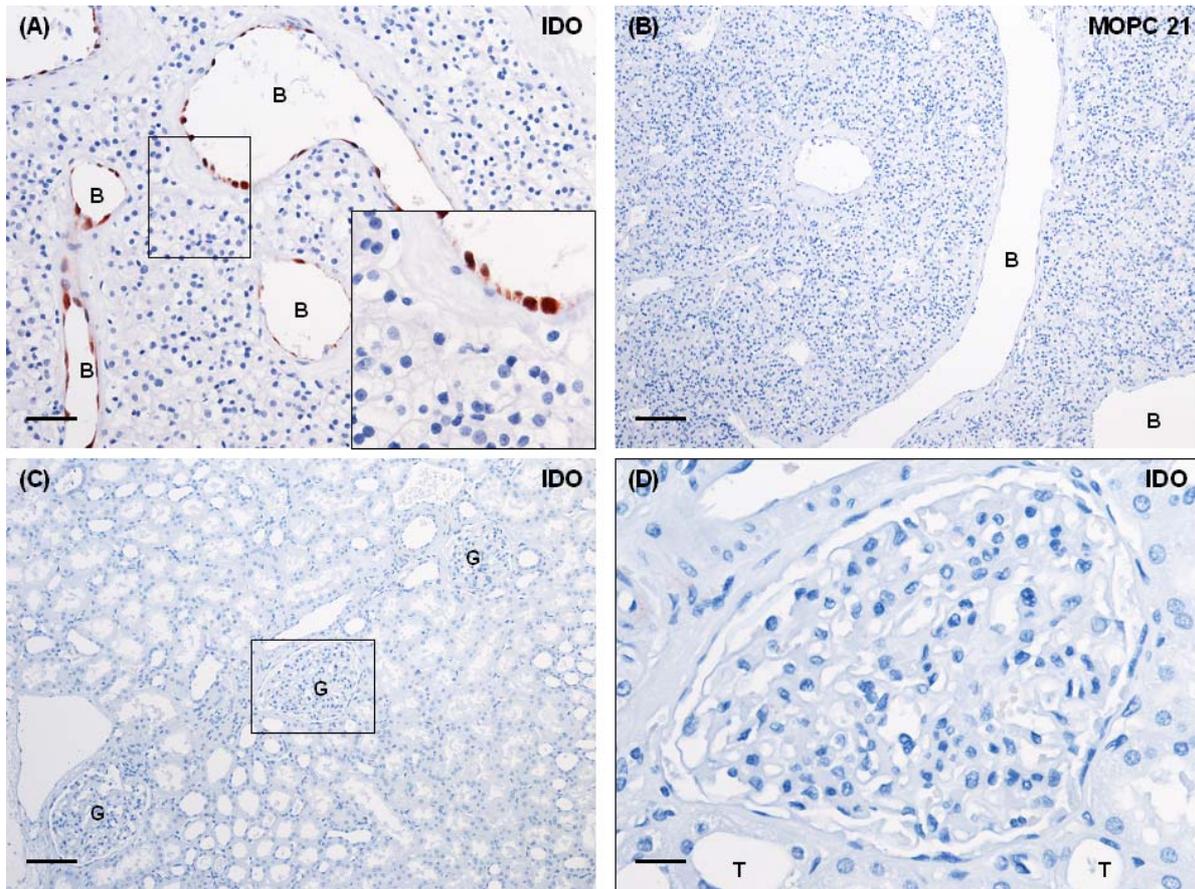


Abbildung 14: Nachweis von IDO in Endothelzellen von RCC-Gewebe. Dünnschnitte von Paraffin eingebettetem Gewebe wurden entparaffiniert und ein Antigen-*retrieval* durchgeführt (siehe Material und Methoden). Es folgte eine anti-IDO/Peroxidase-Färbung mit anschließender Hämalaun Gegenfärbung. **(A) Färbung eines RCC-Paraffinschnittes mit dem IDO-spezifischen monoklonalen Antikörper.** **(B) Isotypkontrolle des in (A) gezeigten Paraffinschnittes.** **(C) Färbung eines tumorfreien Gewebeschnittes mit dem IDO-Antikörper.** **(D) Ausschnittvergrößerung eines Glomerulum** aus (C). In tumorfreien Gewebeabschnitten konnte kein IDO-Protein nachgewiesen werden. Die Balken entsprechen in (A) 100 μm ; in (B) und (C) 200 μm ; in (D) und der Ausschnittvergrößerung von (A) 50 μm . Die Buchstaben kennzeichnen morphologische Strukturen: B, Blutgefäß; G, Glomerulus und T, Tubulli.

Durch weitere Färbungen mit einem monoklonalen anti-CD34-Antikörper konnte der endotheliale Ursprung der IDO-positiven Zellen belegt werden (Abbildung 15B). Im RCC stellen IDO-positive Endothelien jedoch oft nur eine Minderheit der Gesamtendothelien dar. In bestimmten Bereichen kommt es jedoch zu einer deutlichen Häufung dieser kleinen, IDO-positiven Blutgefäße. Diese Regionen sind meist von Bindegewebssträngen umgeben oder liegen am Rand des Tumorgewebes. Zusätzlich zu den vaskulären, endothelialen Zellen wurden gelegentlich auch CD45-positive Leukozyteninfiltrate als IDO-positiv beobachtet (Abbildung 15D).

4. Ergebnisse

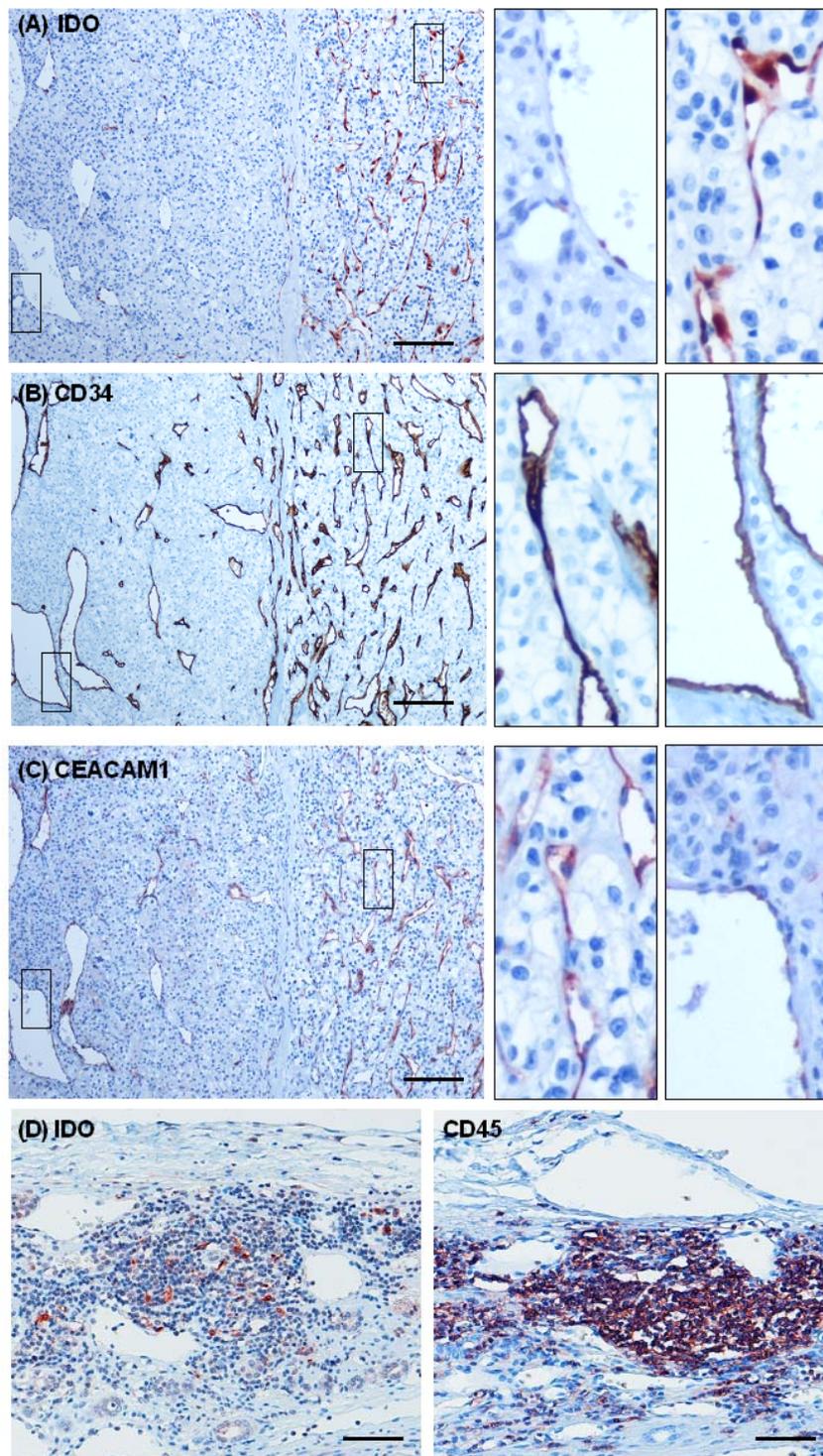


Abbildung 15: IDO wird vor allem in neugebildeten Endothelien exprimiert. Parallele Dünnschnitte von Paraffin eingebettetem Gewebe wurden entparaffiniert und ein Antigen-*retrieval* durchgeführt (siehe Material und Methoden). Es folgte eine anti-IDO- (A), CD34 (B) und CEACAM1-Peroxidase-Färbung (C) mit anschließender Hämalaun Gegenfärbung. (D) Beispiel für ein tumorperipheres, IDO-positives Leukozyteninfiltrat, das über seine CD45-Expression nachgewiesen wurde. Die Balken in (A), (B) und (C) entsprechen 200 µm; in (D) 100 µm. Die Ausschnittvergrößerungen in (A), (B) und (C) sind jeweils noch mal 4-fach vergrößert.

4. Ergebnisse

Um die IDO exprimierenden Endothelien im RCC genauer charakterisieren zu können, wurde eine zusätzliche Färbung mit einem CEACAM1-erkennenden monoklonalen Antikörper durchgeführt. CEACAM1 wird in erster Linie von neu gebildeten Endothelien im Tumor synthetisiert [Kammerer et al., 2004; Ergun et al., 2006]. Der Antikörper dient folglich als Marker für die im Rahmen der Neoangiogenese neu gebildeten und noch nicht stabilisierten Blutgefäße [Oliveira-Ferrer et al., 2004; McDonald and Choyke, 2003]. Die Auswertung der Färbungen hat gezeigt, dass sich auch die CEACAM1-Expression auf bestimmte Areale des Tumors begrenzt und eine ähnliche Verteilung aufweist wie die IDO-positiven Endothelien. Auch wenn nicht alle CEACAM1-positiven Zellen IDO exprimieren, so sind doch fast alle IDO-positiven Zellen auch CEACAM1-positiv.

CD34- und CEACAM1-Färbungen zeigten, dass IDO in erster Linie von neu gebildeten Blutgefäßen in der Peripherie des Tumors synthetisiert wird, in der vorrangig Neoangiogenese beobachtet wird [Fox et al., 1993].

Die Quantifizierung der mit dem monoklonalen IDO-spezifischen Antikörper gefärbten Endothelzellen erfolgte mit Hilfe eines Rasterokulars bei 400-facher Vergrößerung. Als Maßeinheit diente die Anzahl der gefärbten Endothelzellen pro Gesichtsfeld. Es wurden mindestens 25 Gesichtsfelder, über die gesamte Tumorschnittfläche verteilt, analysiert. War im Schnitt mehr als eine Endothelzelle positiv, wurde dies mit einer hohen IDO-Expression gleichgesetzt. Bei weniger als einer positiven Endothelzelle pro Gesichtsfeld wurde zur weiteren Auswertung eine geringe Expression festgehalten. Von insgesamt 20 RCC-Proben wurden sechs Proben einer hohen und vier einer geringen Expression zugeordnet. In den restlichen RCC-Proben konnte kein IDO immunhistologisch nachgewiesen werden. Ein Vergleich der immunhistochemischen Färbungen mit den Ergebnissen der PCR zeigt, dass PCR-negative Proben auch immunhistochemisch keine IDO-positiven Strukturen aufwiesen. Trotz positivem PCR-Nachweis von IDO-mRNA konnte dennoch bei vier Proben immunhistochemisch kein IDO nachgewiesen werden. Diese Beobachtung lässt sich am ehesten durch die fokale Expression von IDO erklären. Von dieser Ausnahme abgesehen, korreliert der IDO-mRNA-Gehalt der untersuchten Gewebe mit der Menge an IDO-Protein. Abbildungen 16A bis C zeigen drei Beispiele immunhistochemisch mit anti-IDO-Antikörper gefärbter Paraffinschnitte von RCC-Gewebe von drei Patienten mit unterschiedlichem IDO-Gehalt, Abbildung 16D die

4. Ergebnisse

entsprechenden amplifizierten IDO-cDNA-Fragmente nach Agarosegel-elektrophorese.

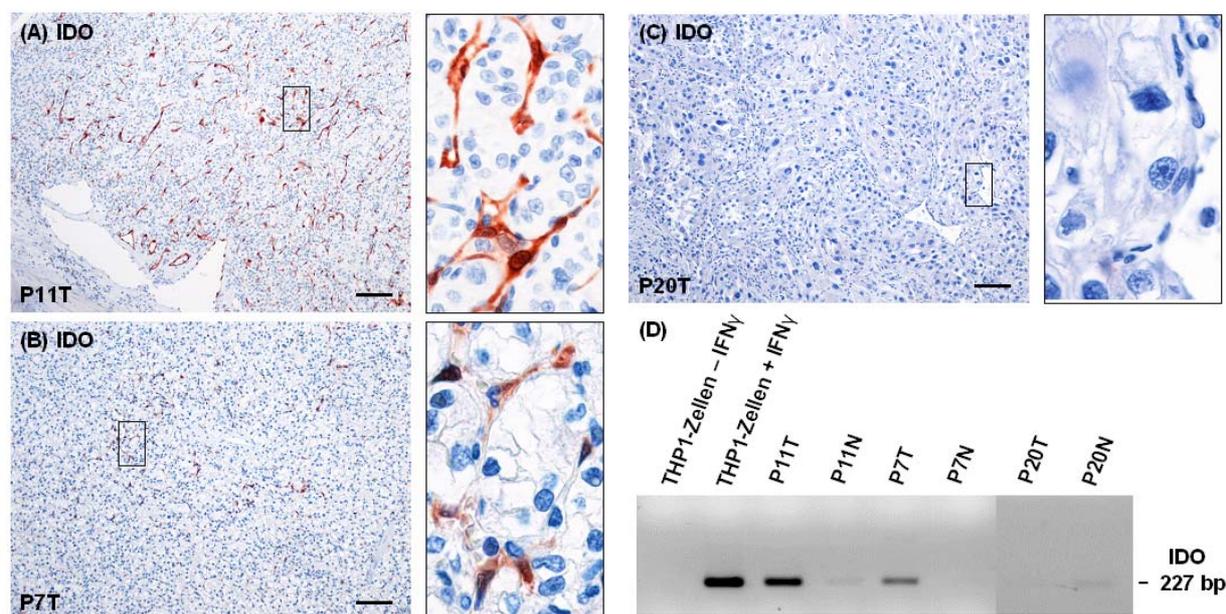


Abbildung 16: Korrelation von IDO-mRNA- und IDO-Protein-Gehalt in RCC-Gewebe. Dünnschnitte von in Paraffin eingebettetem Gewebe wurden entparaffiniert und ein Antigen-retrieval durchgeführt (siehe Material und Methoden). Im Anschluss an die Peroxidase-Färbung mit dem monoklonalen IDO-Antikörper erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämalaun. **Gewebeschnitte mit hoher (Patient P11, A), mit geringer (Patient P11, B) und ohne IDO-Proteinexpression (Patient P20, C)** sind gezeigt. Die Balken in (A), (B) und (C) entsprechen 200 μm , die Ausschnittvergrößerungen wurden jeweils noch mal 5fach vergrößert. Die Anfärbungen mit dem anti-IDO-Antikörper korrelieren gut mit dem **PCR-Nachweis von IDO-cDNA aus den gleichen Tumorproben (D)**. Ein μg der gewonnenen Gesamt-RNA wurde in einem Versuchsansatz von 20 μl revers transkribiert und in einem Verhältnis von 1:5 verdünnt. Im Anschluß wurde die PCR mit genspezifischen Strang- und Gegenstrangprimern durchgeführt. Die Hälfte des in der PCR verwendeten Reaktionsansatzes (12,5 μl) wurde mittels Elektrophorese in einem 2%-igen Agarosegel der Größe entsprechend aufgetrennt. P, Patient; T, RCC-Tumor.

4.4 Follow-up

Bereits durch die PCR-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass IDO nicht im tumorfreien Nierengewebe, sondern lediglich im RCC-Gewebe gebildet wird. Diese Feststellung wurde durch immunhistochemische Peroxidase-Färbungen mit einem IDO-spezifischen monoklonalen Antikörper bestätigt. Zudem konnte durch weitere Färbungen mit CD34- und CEACAM1-Antikörper der Hauptsyntheseort von IDO als die im Rahmen der Neoangiogenese gebildeten Endothelien identifiziert werden. Da die Bildung von IDO in den untersuchten Proben variiert, stellt sich die Frage nach dem möglichen Einfluss der IDO-Expression in Nierenzellkarzinomen auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten.

4. Ergebnisse

Vergleicht man den mittels quantitativer RT-PCR bestimmten relativen IDO-mRNA-Gehalt mit der Überlebensdauer der Patienten, so zeigen Patienten mit hoher IDO-Expression eine signifikant höhere Überlebenswahrscheinlichkeit. Abbildungen 17A und B zeigen die Kaplan-Meier-Überlebenskurven der untersuchten Patienten.

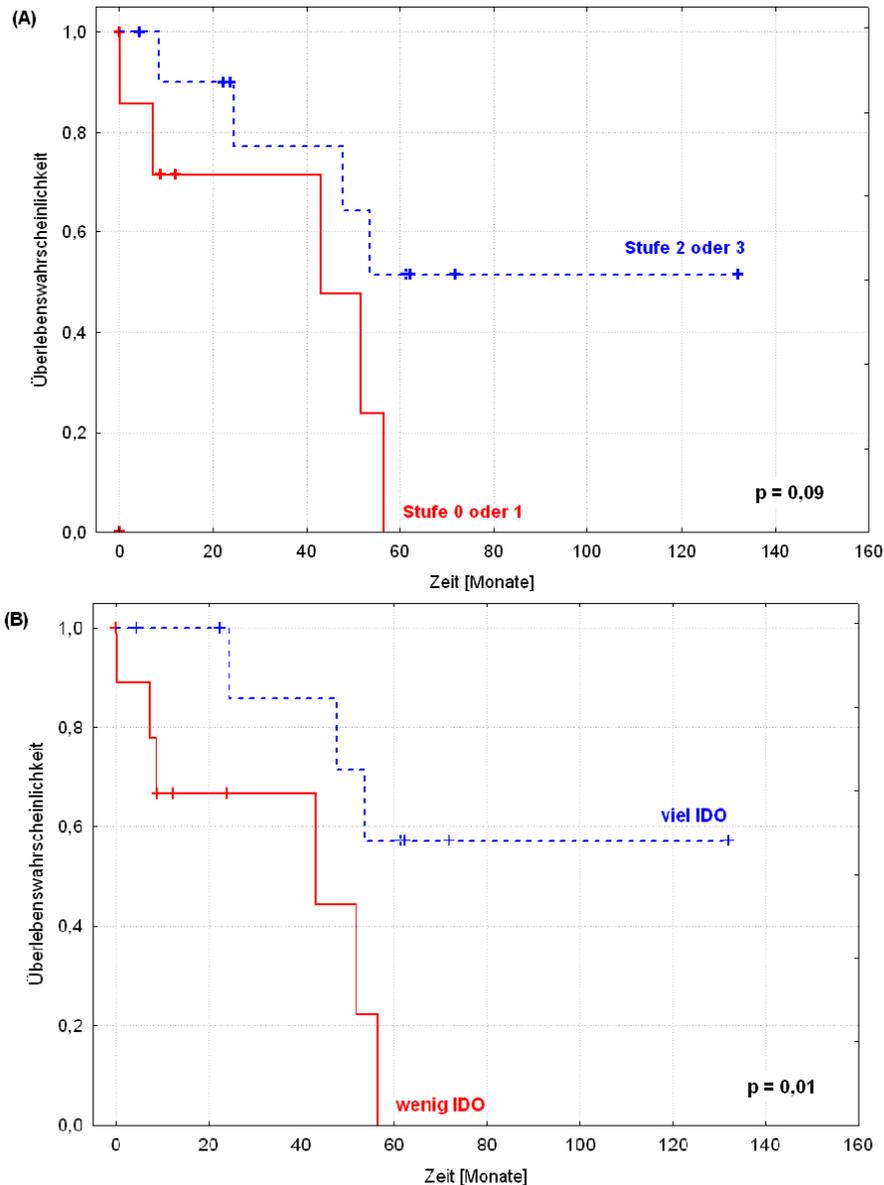


Abbildung 17: Patienten mit einem hohen IDO-mRNA-Gehalt zeigen eine höhere Überlebenswahrscheinlichkeit. Kaplan-Meier-Überlebenskurven wurden auf Basis des IDO-mRNA-Gehalts, der entweder mittels semiquantitativer (A) oder quantitativer PCR (B) bestimmt wurde, errechnet. Patienten, deren Proben einen hohen IDO-Gehalt aufweisen (Auswertungskategorie 3 oder 4, semiquantitative RT-PCR; IDO-cDNA-Gehalt < 8 Zyklen, quantitative *Real-time*-PCR), können demnach von einer höheren Überlebenswahrscheinlichkeit ausgehen als Patienten mit einem niedrigen (Auswertungskategorie 0 oder 1, semiquantitative Bestimmung: $p=0,09$; IDO-cDNA-Gehalt > 8 Zyklen, quantitative RT-PCR: $p=0,01$).

4. Ergebnisse

Da IDO vorrangig in den Endothelien exprimiert wird und eine signifikante Korrelation von IDO-cDNA-Gehalt und Überlebenswahrscheinlichkeit zumindest nach quantitativer Bestimmung nachgewiesen wurde, gelangten wir zu folgender Hypothese: Durch die Expression von IDO in den Endothelien wird der Zustrom von Tryptophan in das umgebende Gewebe vermindert. Der lokale Mangel an Tryptophan entzieht den Tumorzellen eine essentielle Aminosäure für die Proteinsynthese, wodurch deren Proliferation gehmmt wird. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden die Paraffinschnitte der Patienten einer immunhistochemischen Färbung mit dem Ki67-Antikörper unterzogen. Ki67 wird in Zellkernen proliferierender Zellen gebildet und gilt als prognostischer Marker für RCC-Patienten, wobei ein hoher Ki67-Gehalt mit einer verminderten Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten korreliert [Dudderidge et al., 2005].

Die Auswertung der mit dem spezifischen, monoklonalen Ki67-Antikörper gefärbten Paraffinschnitte erfolgte wie die Bestimmung IDO-positiver Endozelzellen mit Hilfe eines Rasterokulars bei 400-facher Vergrößerung. Die Ergebnisse zeigen eine hoch signifikante, inverse Korrelation zwischen der Anzahl IDO-positiver Tumorendothelzellen und der Anzahl von Tumorzellen mit Ki67-positiven Kernen ($p < 0,01$). Patienten mit hoher IDO-Expression weisen folglich einen niedrigen Gehalt an Ki67-positiven Tumorzellen auf und umgekehrt.

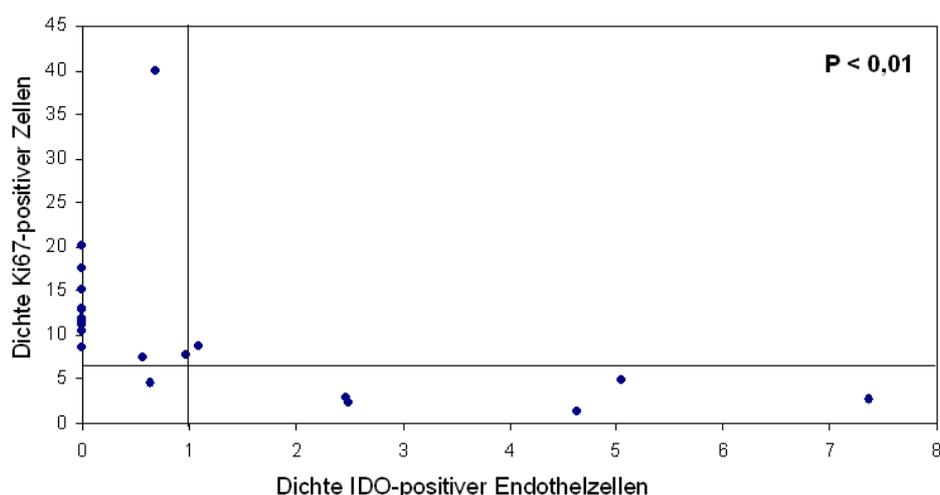


Abbildung 18: Inverse Korrelation zwischen der Expression von IDO in Tumorendothelzellen- und des Proliferationsmarker Ki67 in Tumorzellen. Die Paraffinschnitte wurden mit einem Rasterokular bei 400-facher Vergrößerung ausgezählt. Patienten mit einem hohen IDO-Gehalt weisen geringe Ki67-Mengen auf und umgekehrt ($p < 0,01$). Die statistische Signifikanz der Korrelation wurde mit Hilfe des Spearman-Rangkorrelations-Tests untersucht.

4. Ergebnisse

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine hohe IDO-Expression mit einer besseren Überlebenswahrscheinlichkeit korreliert. Die Hypothese, dass IDO durch den lokalen Abbau von Tryptophan die Tumorpheriferation hemmt, wird durch die inverse Korrelation von IDO mit der Ki67-Expression untermauert.

5 Diskussion

5.1 Kontrollmechanismen der IDO-Expression

In der Literatur wurde die Expression des Tryptophan abbauenden Enzyms IDO in verschiedenen Tumorgeweben nachgewiesen [Mellor and Munn, 2004; Zheng et al., 2006; Okamoto et al., 2005; Brandacher et al., 2006; Hou et al., 2007; Astigiano et al., 2005]. Jedoch wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Studie veröffentlicht, die sich mit der Rolle von IDO im RCC beschäftigt. Das Ziel dieser Arbeit war es unter anderem, eine Analyse der IDO-Expression im RCC durchzuführen. Die Ergebnisse der PCR-Untersuchungen zeigten, dass die untersuchten RCC-Proben einen höheren IDO-mRNA-Gehalt als die tumorfreien Gewebe aufwiesen. Diese Beobachtung wurde durch immunhistochemische Färbungen bestätigt. Die Expression von IDO ist auf das RCC beschränkt. In tumorfreiem Nierengewebe konnte weder IDO-mRNA noch IDO-Protein nachgewiesen werden. Bis dato wurden in den oben erwähnten Studien als IDO-exprimierende Zellen lediglich die Tumorzellen selbst oder infiltrierende Leukozyten beobachtet. In dieser Arbeit wird zum ersten Mal berichtet, dass in einem malignen Tumor vorrangig die Endothelzelle der Syntheseort von IDO ist. Die Präsenz von IDO im Primärtumor von RCC-Patienten und die Fähigkeit IDO in Endothelien zu induzieren, scheint also eine Eigenschaft des RCCs zu sein.

Zum jetzigen Zeitpunkt ist der genaue Mechanismus unbekannt, wie die Expression von IDO in Endothelien des RCC-Gewebes induziert wird. Doch wie im Kapitel 1 schon beschrieben, sind inflammatorische Mediatoren zur Induktion von IDO befähigt. IFN- γ ist einer der potentesten Induktoren von IDO-Expression. Dies konnten Hansen und Mitarbeiter durch folgende Experimente bestätigen. Bei mit Malariaerregern infizierten Mäusen, wurde in verschiedenen Organen die Expression von IDO nachgewiesen. Wohingegen bei nicht infizierten oder IFN- γ defizienten Mäusen (IFN- $\gamma^{-/-}$ -Mäusen) kein IDO nachweisbar war [Hansen et al., 2004]. Die Präsenz von Erregern und inflammatorischer Stimuli, wie IFN- γ , scheint essentiell für die IDO-Expression zu sein. Neben IFN- γ existieren jedoch noch weitere Zytokine und entzündliche Stimuli, die IDO induzieren können. IFN- α , IFN- β und der *Toll-like* Rezeptorligand [Takikawa, 2005], wie auch IL-4, IL-6, IL-10, *tumor growth factor- β*

und das Prostaglandin E₂ können die Induktion von IDO verursachen [Thomas and Stocker, 1999].

Doch welche Zellen synthetisieren diese stimulierenden Faktoren und induzieren so die Expression von IDO? Eine Möglichkeit wäre, dass die Tumorzelle selbst, die Synthese von IDO in Endothelien verursachen kann. Dies könnte zum Beispiel im Rahmen der Neoangiogenese geschehen. Diese Behauptung wird dadurch bestätigt, dass in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen IDO vor allem in der Peripherie des Tumorgewebes beobachtet wurde, wo bekanntlich Neoangiogenese stattfindet [Fox et al., 1993]. Zudem wurde bei dem Vergleich der IDO- und CEACAM1-Färbungen eine weitgehende Überlappung festgestellt. Wie weiter oben schon erwähnt, wird CEACAM1 vor allem in neu gebildeten Endothelien exprimiert [Ergun et al., 2006]. Zusammenfassend ist zu sagen, dass für die im Rahmen der Neoangiogenese stattfindende Induktion von IDO durch die Tumorzelle, zum einem die IDO-Expression in der Peripherie des Tumors und zum anderen die Überlappung der IDO- und CEACAM1-Färbung spricht. Vielleicht sind aber doch andere Zellen für die Induktion der IDO-Expression verantwortlich. Tumor infiltrierende aktivierte Leukozyten könnten ein Milieu von Zytokinen aufrechterhalten, die eine Synthese von IDO in Endothelien des Tumors ermöglichen. Von der Präsenz und Funktionalität von natürlichen Killerzellen und zytotoxischen T-Zellen im RCC-Gewebe wurde in der Literatur berichtet [Schendel et al., 1997; Fox et al., 1993; Schleyen et al., 2006]. Jedoch konnte in unseren immunhistochemischen Untersuchungen keine Korrelation zwischen den CD45-positiven Leukozyten und den IDO-positiven Endothelien registriert werden. Der genaue Mechanismus, der IDO in den Endothelien induziert, bleibt weiterhin unbekannt und muss noch weiter erforscht werden.

5.2 IDO-Expression in RCC-Zellen

In veröffentlichten Studien, die sich mit der Bedeutung von IDO in verschiedenen Tumoren beschäftigt haben, wurde die Tumorzelle als der vorrangige Ort der Synthese genannt [Uyttenhove et al., 2003; Okamoto et al., 2005; Brandacher et al., 2006; Ino et al., 2006]. In den von uns durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen der RCC-Primärtumoren konnten jedoch keine IDO-positiven Tumorzellen beobachtet werden. Unsere Arbeitsgruppe konnte in weiterführenden

5. Diskussion

Experimenten feststellen, dass im Prinzip RCC-Zellen *in vitro* dazu befähigt sind, IDO zu exprimieren. Riesenberg et al. führten folgende Versuche durch [Riesenberg et al., 2007].

Zwei RCC-Zelllinien, RCC26 und A498, wurden mittels quantitativer *Real-time-PCR* und *Western-blot*-Analysen auf die Anwesenheit von IDO-mRNA und IDO-Protein untersucht. Ohne Stimulation konnte in den Zellen kein IDO-mRNA oder IDO-Protein nachgewiesen werden. Erst nach dreitägiger Stimulation mit IFN- γ stieg in beiden Zelllinien der Gehalt von IDO an. Diese Zunahme der IDO-Mengen glich der von IFN- γ stimulierten endothelialen Zellen. Wurde die IFN- γ -Stimulation gestoppt, so sank auch der Gehalt von IDO in den RCC-Zellen wieder. *In vitro* ist die Expression von IDO in RCC-Zellen also reversibel. Diese Beobachtungen zeigen, dass RCC-Zellen nach geeigneter Stimulation *in vitro* dazu befähigt sind, IDO zu exprimieren. Des Weiteren wurden in immunhistochemischen IDO-Färbungen RCC-Primärtumoren und Metastasen untersucht. Auch bei diesen Versuchen wurde im RCC die Endothelzelle als der vorrangige Syntheseort von IDO beobachtet. Im Primärtumor waren keine Tumorzellen IDO-positiv. Jedoch wurde in zwei von fünf untersuchten Lymphknotenmetastasen IDO immunhistologisch in Tumorzellen nachgewiesen [Riesenberg et al., 2007]. Das war der erste Anhaltspunkt dafür, dass RCC-Zellen auch *in vivo* IDO exprimieren können.

RCC-Zellen sind also im Prinzip *in vitro* und *in vivo* dazu befähigt, IDO zu exprimieren. *In vitro* exprimieren RCC-Zellen nur unter ständiger Stimulation IDO. Nach Sistieren der Stimulation, sinkt die IDO-Expression wieder. Die Beobachtung, dass *in vivo* RCC-Zellen in zwei von fünf untersuchten Lymphknotenmetastasen IDO synthetisieren, ist wahrscheinlich nur unter starker Stimulation, wie z.B. in Anwesenheit von aktivierten Immunzellen möglich. Diese Zellen können über sezernierte Zytokine das *IDO*-Gen induzieren. Diese ständige Stimulation ist also vermutlich nur in Nachbarschaft einer Ansammlung von aktivierten Leukozyten möglich, wie dies der Fall in Lymphknotenmetastasen sein dürfte. Bestätigung findet diese Vermutung in der Tatsache, dass weder im Primärtumor noch in anderen Metastasen (Nebennieren- und Lungenmetastasen) IDO-Protein in Tumorzellen nachweisbar war [Riesenberg et al., 2007].

Im RCC bleibt der Hauptsyntheseort von IDO das Endothel. Eine hohe IDO-Expression in den Endothelien des Tumors korreliert zudem mit einem längeren Überleben. Diese Beobachtung findet in der Arbeit von Riesenberg et al. seine

Bestätigung [Riesenberg et al., 2007]. Inwieweit IDO als prognostischer Marker fungieren kann, soll im nächsten Kapitel beschrieben werden.

5.3 IDO als prognostischer Marker

Die Rolle von IDO in malignem Gewebe wird kontrovers diskutiert. In verschiedenen Experimenten wurde IDO eine T-Zell hemmende Eigenschaft zugesprochen. Durch diese IDO-Wirkung kann die Immunantwort gegen das maligne Gewebe gehemmt und eine Progression des Tumors erreicht werden. Dies konnte durch folgende Beobachtungen bestätigt werden: Patienten mit einem hohen IDO-Gehalt in Adenokarzinomen des Ovars, kolorektalen Adenokarzinomen, Endometrium- und Ösophaguskarzinomen weisen jeweils eine schlechtere Prognose auf [Okamoto et al., 2005; Brandacher et al., 2006; Ino et al., 2006; Sakurai et al., 2004]. Im Gegensatz dazu wurde berichtet, dass Patienten mit hoher IDO-Expression in nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen und hepatozellulären Karzinomen ein längeres Überleben aufweisen [Astigiano et al., 2005; Ishio et al., 2004].

Diese Arbeit hat sich mit der Bedeutung von IDO im RCC-Gewebe beschäftigt. In PCR-Untersuchungen wurde festgestellt, dass mehr als ein Drittel der Patienten (8/20) eine hohe IDO-mRNA-Expression und gleichzeitig ein längeres Überleben aufweisen. Bestätigt wurde diese Tendenz, durch die hoch signifikante inverse Korrelation zwischen der Dichte der IDO-positiven Endothelien und der Anzahl der proliferierenden Ki67-positiven Tumorzellen. Ki67 ist ein prognostischer Marker für RCC-Patienten, eine geringe Ki67-Expression in den Kernen der RCC-Zellen ist mit einem längeren Überleben vergesellschaftet. Aufgrund der Tatsache, dass IDO vorrangig in den im Rahmen der Neoangiogenese neu gebildeten Endothelien exprimiert wird und dies zu einer Erhöhung der Überlebenschancen führt, stellen wir folgende Hypothese auf: Die Expression von IDO in Endothelien hemmt durch den lokalen Entzug der essentiellen Aminosäure Tryptophan oder durch die Bildung von tumortoxischen Tryptophan-Abbauprodukten die Proliferation des Tumors. Dadurch weisen die RCC-Patienten mit einer hohen IDO-Expression eine erhöhte Überlebenschance auf. Somit kann IDO im RCC ein gewisser prognostischer Wert zugesprochen werden. Jedoch bedarf es zur Festigung dieser Aussage noch weitere Untersuchungen mit höheren Fallzahlen.

5.4 Therapie mit IDO-Inhibitoren

IDO kann in Tumorzellen, sowie in dendritischen Zellen in Lymphknoten eine Art immunogene Toleranz induzieren. Diese immunsuppressive Wirkung von IDO, die eine Immunantwort gegen das maligne Gewebe hemmt, führte dazu, den Einsatz von geeigneten IDO-Inhibitoren zu propagieren, um den vom Tumor erzeugten *immune escape* zu umgehen. In einem Experiment von Friberg und Mitarbeiter wurden LLC-Zellen (*lewis lung carcinoma*-Zellen) mit aus Mäusen isolierten peripheren Lymphozyten kultiviert. Unter Gabe von 1-MT wurde, im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne IDO-Inhibitor, eine deutlich erhöhte Proliferation der T-Zellen festgestellt. Auch *in vivo* wurde bei Mäusen nach Injektion von LLC-Zellen und pharmakologischer Gabe von 1-MT ein geringeres Tumorstadium beobachtet [Friberg et al., 2002]. Ähnliche Ergebnisse erzielte Uyttenhove und Mitarbeiter. Verwendet wurde eine Tumorzelllinie, die einerseits hoch letal ist und andererseits gut definierte Tumorantigene präsentiert. Gegen diese Antigene wurden Mäuse immunisiert. Nach Injektion der Tumorzelllinie konnte kein Wachstum des malignen Tumors festgestellt werden. Wurde diese Tumorzelllinie nun mit IDO transfiziert, war nach der Injektion ein unkontrolliertes Wachstum des Tumors zu beobachten. Der immunsuppressive Effekt von IDO konnte durch die Gabe von 1-MT wieder aufgehoben werden [Uyttenhove et al., 2003]. Zudem konnte in weiteren Mausmodellen gezeigt werden, dass der Einsatz von IDO-Inhibitoren die Effizienz von Chemotherapeutika erhöhen kann [Muller and Scherle, 2006; Hou et al., 2007]. Diese Forschungsarbeiten verdeutlichen, dass die Gabe von IDO-Inhibitoren in manchen Tumortypen zur Regression des Tumors führt. Jedoch wurden auch andere Studien veröffentlicht, in denen die Applikation von IDO-Inhibitoren zu einer Progression des Tumorstadiums führen. Kai und Mitarbeiter haben bei Mäusen HCC-Zellen injiziert. Nach pharmakologischer Gabe von 1-MT wurde, im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne IDO-Inhibitor, ein größeres Tumorstadium beobachtet [Kai et al., 2003]. Hier scheint also, im Gegensatz zu den oben erwähnten Beispielen, der Einsatz von IDO-Inhibitoren zu einer Proliferation des Tumors zu führen. Die Hemmung von funktionellem IDO im RCC wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht untersucht, der Effekt von IDO-Inhibitoren auf das RCC bleibt weiterhin offen.

Da die Strahlentherapie und die systemische Therapie beim RCC nur eine begrenzte Wirksamkeit aufweisen, steht die radikale Tumorchirurgie im Vordergrund. Neben der chirurgischen Behandlung hat sich die Immuntherapie etabliert. Die Immuntherapie

basiert auf der Immunogenität des RCCs und induziert durch eine Stimulation des Immunsystems die Eliminierung von Tumorzellen. Als Therapeutika dienen unter anderem die Zytokine Interferon- α (IFN- α -2a und -2b) und Interleukin-2 (IL-2). Wie bereits erwähnt, induzieren diese Zytokine auch die Expression von IDO. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine hohe IDO-Expression mit einer erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit vergesellschaftet ist. Diese Tatsachen lassen den Einsatz von IDO-Inhibitoren bei der Therapie des RCCs als fraglich erscheinen. Inwieweit der Benefit der Immuntherapie von IDO abhängt, ist gegenwärtig unklar.

Die hier erwähnten Tatsachen verdeutlichen, dass die Rolle von IDO in der Tumor-Wirt-Interaktion weitaus komplexer ist als angenommen. Pharmakologische Hemmung von IDO in bestimmten Tumoren kann das Tumorwachstum hemmen. In anderen Tumortypen, wie im RCC, kann hohe IDO-Expression eine Regression des Tumors bewirken. Ein Einsatz von IDO-Inhibitoren zur Behandlung von RCC-Patienten scheint von daher kontraindiziert. Umgekehrt sollte eher versucht werden, durch eine selektive Induktion der IDO-Expression in Endothelien von RCC-Patienten, eine Verbesserung der Prognose zu erzielen. Diese Möglichkeit repräsentiert einen neuen Therapieansatz beim RCC und benötigt noch weitere Forschungsarbeit.

5.5 Vorschlag für weitere Experimente zur Untersuchung der Rolle von IDO

Die Rolle von IDO in malignem Gewebe ist heterogen. In manchen Tumortypen scheint IDO die Prognose des Wirtes zu verschlechtern, in anderen wiederum führt die Präsenz von IDO zu einer Erhöhung der Überlebenswahrscheinlichkeit. Dies scheint abhängig zu sein, ob Tumorzellen IDO exprimieren und somit vermutlich zum *immune escape* beitragen oder IDO die Anwesenheit von IDO-produzierenden Lymphozyten im Tumor anzeigt. In dieser Arbeit wurde die Rolle von IDO im RCC-Gewebe untersucht. IDO wird vor allem von Endothelien synthetisiert, die im Rahmen der Neoangiogenese des Tumors gebildet wurden. Eine hohe IDO-Expression in den Endothelien der RCC-Patienten ist mit einem längeren Überleben vergesellschaftet. Dies legt folgende Hypothese nahe: Durch die Tryptophan abbauende Aktivität der IDO exprimierenden Endothelien im RCC-Gewebe entsteht ein lokaler Mangel an der essentiellen Aminosäure Tryptophan. Dadurch fehlt den Tumorzellen ein Baustein

5. Diskussion

der Proteinsynthese, was zur Hemmung ihrer Proliferation führt. Zur Bestätigung oder Widerlegung unserer Hypothese werden noch weitere Experimente benötigt, die wie folgt aufgebaut sein könnten.

In vitro könnten für RCC-Zelllinien der Tryptophanbedarf im Vergleich zu anderen Tumorzelllinien bestimmt werden. Ein anderer Ansatz wäre, die Sensitivität von RCC-Zelllinien gegenüber verschiedenen Tryptophan-Abbauprodukten vergleichend zu erfassen. Zur weiteren Erforschung der Bedeutung von IDO im RCC-Gewebe wären auch Mausmodelle sinnvoll (Kudo-Saito Clin Cancer Res 2007; Mestas J Immunol 2005). Nach Injektion von RCC-Zellen könnte in verschiedenen Ansätzen IDO-Inhibitoren, wie 1-MT, verabreicht werden. Dadurch könnten im Vergleich zu den Kontrollgruppen Aussagen über das Überleben und die Tumorgroße gemacht werden. Der sezierte Tumor könnte dann mit Hilfe von immunhistochemischen und PCR-Untersuchungen auf den Gehalt von IDO geprüft werden. Zudem könnte man in einem weiteren Experiment mit IDO-knockout-Mäusen (Baban J Reprod Immunol. 2004 Apr;61(2):67-77), RCC-Zellen injizieren und im Vergleich zu normalen Mäusen Tumorgroße und Überleben untersuchen. Bei der Interpretation der Ergebnisse solcher Experimente muss man allerdings berücksichtigen, dass IDO auch in der Regulation der Anti-Tumorimmunantwort eine Rolle spielen kann. Überexpression von IDO in Tumorendothelzellen würde dieses Problem umgehen.

Des Weiteren wäre es interessant die Frage zu klären, inwieweit IDO bei der Wirkung der Immuntherapie beteiligt ist. Wie bereits erwähnt, kann IDO durch die bei der Immuntherapie verwendeten Therapeutika induziert werden. Unsere Ergebnisse zeigten, dass eine hohe IDO-Expression mit einem verlängerten Überleben vergesellschaftet ist. Jedoch konnte nicht in alle RCC-Proben ein hoher IDO-Gehalt nachgewiesen werden. Auch die Immuntherapie spricht nur bei ca. einem Drittel der RCC-Patienten an. Marker, welche die Effizienz einer Immuntherapie vorhersagen könnten, würden die Entscheidung für die Anwendung der nebenwirkungsreichen Immuntherapie deutlich vereinfachen. Vielleicht stellt sich durch weitere Experimente IDO als ein solcher Marker heraus. Weiterführende Versuche könnten folgendermaßen aussehen. Zunächst könnte in einem Kollektiv von RCC-Patienten, die eine Immuntherapie erhalten haben, der IDO-Gehalt im Primärtumor bestimmt werden. In dem folgenden *Follow-up* könnten die Patienten auf das Ansprechen der Immuntherapie in Abhängigkeit des IDO-Gehalt ihres Primärtumors untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit ist die prognostische Bedeutung von Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) im Nierenzellkarzinom (*renal cell carcinoma*, RCC).

Das RCC ist nach dem Prostata- und dem Harnblasenkarzinom das dritthäufigste urologische Malignom weltweit. In der Bundesrepublik Deutschland erkranken jährlich ungefähr 14.000 Menschen, dies entspricht einem Anteil von 1 - 2% aller soliden Tumoren. Die 1-Jahres-Überlebensrate im metastasierten Stadium liegt, ohne weitere Behandlung, bei 15%. Da Strahlentherapie und systemische Therapie beim RCC nur begrenzt wirksam sind, hat die Tumorchirurgie sowohl bei der Behandlung des Primärtumors als auch der Metastasen einen hohen Stellenwert. Die Monotherapie mit zytostatischen Chemotherapeutika spielt aufgrund der hohen Zytostatikaresistenz des RCCs derzeit keine Rolle. In Kombination mit der sogenannten Immuntherapie kommen Zytostatika dennoch zum Einsatz. Basierend auf der Immunogenität des RCCs, induziert die Immuntherapie durch eine Stimulation des Immunsystems die Eliminierung von Tumorzellen. Als Therapeutika dienen die Zytokine Interferon- α und Interleukin-2.

IDO ist ein Tryptophan abbauendes Enzym. Bei auxotrophen Pathogenen kann IDO durch den lokalen Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan einen antibakteriellen und antiviralen Effekt entfalten. Über die T-Zell-Hemmung kann IDO bei entzündlichen und autoimmunologischen Erkrankungen sowie an der Mutter-Kind-Barriere zudem Toleranz erzeugen. Dies führte zu ersten therapeutischen Anwendungen von pharmakologischen IDO-Inhibitoren beispielsweise in der Transplantationschirurgie.

Die Rolle von IDO in malignen Geweben wird hingegen kontrovers diskutiert. Über eine T-Zell-Hemmung können IDO-exprimierende Tumorzellen die Immunantwort behindern und die Progression der Erkrankung fördern. Im Gegensatz dazu gibt es Berichte, die ein verlängertes Überleben von Tumorpatienten mit IDO-positiven, infiltrierenden Lymphozyten in Verbindung bringt.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, Informationen über die Rolle von IDO im relativ immunogenen RCC zu erlangen. Zu diesem Zweck wurde eine IDO-mRNA-Expressionsanalyse in RCC- und tumorfreien Nierengeweben mittels semiquantitativer und quantitativer Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Zudem wurden IDO-Protein exprimierende Zellen immunhistochemisch identifiziert.

6. Zusammenfassung

Die Ergebnisse der quantitativen *Real-time*-PCR zeigen, dass RCC-Gewebe mehr IDO-mRNA enthält als tumorfreies Nierengewebe, der IDO-mRNA-Gehalt der RCC-Proben jedoch stark variiert. Die statistische Auswertung belegt, dass Proben mit hohem IDO-mRNA-Gehalt eine signifikant höhere Überlebenswahrscheinlichkeit aufweisen. Durch immunhistochemische Untersuchungen wurde festgestellt, dass im tumorfreien Gewebe keinerlei IDO-positive Strukturen zu beobachten sind. IDO-positiv im RCC, sind jedoch nicht, wie zuvor angenommen, Tumor-, sondern Endothelzellen. Durch Färbungen mit Endothelzell-charakterisierenden CD34- und CEACAM1-Antikörpern wurde gezeigt, dass die IDO-positiven Endothelzellen zu unreifen, durch Neoangiogenese gebildeten Gefäßen gehören. Diese Beobachtungen und der Befund einer inversen Korrelation zwischen der Dichte der IDO-positiven Endothelien und dem Gehalt Ki67-positiver, in Proliferation befindlicher RCC-Zellen untermauern folgende Hypothese: Durch die Tryptophan abbauende Wirkung von IDO entsteht ein lokaler Mangel an der essentiellen Aminosäure Tryptophan. Dieser Baustein fehlt nun den Tumorzellen für ihre Proteinsynthese, was zur Hemmung ihrer Proliferation führt.

In weiterführenden Arbeiten wäre es interessant zu klären, in wieweit IDO bei der Immuntherapie von RCC-Patienten eine Rolle spielt. Vielleicht könnte IDO als Marker für die Ansprechbarkeit der Immuntherapie herangezogen werden. Zudem könnte in einem Mausmodell der Einsatz von IDO-induzierenden Faktoren untersucht werden, um zu klären, ob durch Induktion von IDO eine Regression des RCCs erreicht werden kann.

7 Literaturverzeichnis

Adams O, Besken K, Oberdorfer C, MacKenzie CR, Takikawa O, Daubener W (2004) Role of indoleamine-2,3-dioxygenase in alpha/beta and gamma interferon-mediated antiviral effects against herpes simplex virus infections. *J Virol* 78: 2632-2636

Alcami A, Koszinowski UH (2000) Viral mechanisms of immune evasion. *Trends Microbiol* 8: 410-418

Astigiano S, Morandi B, Costa R, Mastracci L, D'Agostino A, Ratto GB, Melioli G, Frumento G (2005) Eosinophil granulocytes account for indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated immune escape in human non-small cell lung cancer. *Neoplasia* 7: 390-396

Atkins D, Ferrone S, Schmahl GE, Storkel S, Seliger B (2004) Down-regulation of HLA class I antigen processing molecules: an immune escape mechanism of renal cell carcinoma? *J Urol* 171: 885-889

Atzpodien J, Kirchner H, Jonas U, Bergmann L, Schott H, Heynemann H, Fornara P, Loening SA, Roigas J, Muller SC, Bodenstein H, Pomer S, Metzner B, Rebmann U, Oberneder R, Siebels M, Wandert T, Puchberger T, Reitz M (2004) Interleukin-2- and interferon alfa-2a-based immunochemotherapy in advanced renal cell carcinoma: a Prospectively Randomized Trial of the German Cooperative Renal Carcinoma Chemoimmunotherapy Group (DGCIIN). *J Clin Oncol* 22: 1188-1194

Babcock TA, Carlin JM (2000) Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in interferon-treated epithelial cells. *Cytokine* 12: 588-594

Bauer TM, Jiga LP, Chuang JJ, Randazzo M, Opelz G, Terness P (2005) Studying the immunosuppressive role of indoleamine 2,3-dioxygenase: tryptophan metabolites suppress rat allogeneic T-cell responses in vitro and in vivo. *Transpl Int* 18: 95-100

Belldegrun A, Kasid A, Uppenkamp M, Rosenberg SA (1990) Lymphokine mRNA profile and functional analysis of a human CD4+ clone with unique antitumor specificity isolated from renal cell carcinoma ascitic fluid. *Cancer Immunol Immunother* 31: 1-10

Beutelspacher SC, Pillai R, Watson MP, Tan PH, Tsang J, McClure MO, George AJ, Larkin DF (2006) Function of indoleamine 2,3-dioxygenase in corneal allograft rejection and prolongation of allograft survival by over-expression. *Eur J Immunol* 36: 690-700

Bodaghi B, Goureau O, Zipeto D, Laurent L, Virelizier JL, Michelson S (1999) Role of IFN-gamma-induced indoleamine 2,3 dioxygenase and inducible nitric oxide synthase in the replication of human cytomegalovirus in retinal pigment epithelial cells. *J Immunol* 162: 957-964

Boon T, van der BP (1996) Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med* 183: 725-729

7. Literaturverzeichnis

- Brandacher G, Perathoner A, Ladurner R, Schneeberger S, Obrist P, Winkler C, Werner ER, Werner-Felmayer G, Weiss HG, Gobel G, Margreiter R, Konigsrainer A, Fuchs D, Amberger A (2006) Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. *Clin Cancer Res* 12: 1144-1151
- Brasanac D, Markovic-Lipkovski J, Hadzi-Djokic J, Muller GA, Muller CA (1999) Immunohistochemical analysis of HLA class II antigens and tumor infiltrating mononuclear cells in renal cell carcinoma: correlation with clinical and histopathological data. *Neoplasma* 46: 173-178
- Bukur J, Rebmann V, Grosse-Wilde H, Luboldt H, Ruebben H, Drexler I, Sutter G, Huber C, Seliger B (2003) Functional role of human leukocyte antigen-G up-regulation in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 63: 4107-4111
- Cady SG, Sono M (1991) 1-Methyl-DL-tryptophan, beta-(3-benzofuranyl)-DL-alanine (the oxygen analog of tryptophan), and beta-[3-benzo(b)thienyl]-DL-alanine (the sulfur analog of tryptophan) are competitive inhibitors for indoleamine 2,3-dioxygenase. *Arch Biochem Biophys* 291: 326-333
- Carlin JM, Borden EC, Sondel PM, Byrne GI (1989) Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human mononuclear phagocytes. *J Leukoc Biol* 45: 29-34
- Chon SY, Hassanain HH, Gupta SL (1996) Cooperative role of interferon regulatory factor 1 and p91 (STAT1) response elements in interferon-gamma-inducible expression of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene. *J Biol Chem* 271: 17247-17252
- Dong J, Qiu H, Garcia-Barrio M, Anderson J, Hinnebusch AG (2000) Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain. *Mol Cell* 6: 269-279
- Dudderidge TJ, Stoeber K, Loddo M, Atkinson G, Fanshawe T, Griffiths DF, Williams GH (2005) Mcm2, Geminin, and Ki67 define proliferative state and are prognostic markers in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 11: 2510-2517
- Ergun S, Tilki D, Oliveira-Ferrer L, Schuch G, Kilic N (2006) Significance of vascular stabilization for tumor growth and metastasis. *Cancer Lett* 238: 180-187
- Falk CS, Mach M, Schendel DJ, Weiss EH, Hilgert I, Hahn G (2002) NK cell activity during human cytomegalovirus infection is dominated by US2-11-mediated HLA class I down-regulation. *J Immunol* 169: 3257-3266
- Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A, Fioretti MC, Puccetti P (2002) T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ* 9: 1069-1077
- Finke JH, Rayman P, Edinger M, Tubbs RR, Stanley J, Klein E, Bukowski R (1992) Characterization of a human renal cell carcinoma specific cytotoxic CD8+ T cell line. *J Immunother* 11: 1-11
- Fishman M, Antonia S (2003) Novel therapies for renal cell carcinoma--an update. *Expert Opin Investig Drugs* 12: 593-609

7. Literaturverzeichnis

- Fox SB, Gatter KC, Bicknell R, Going JJ, Stanton P, Cooke TG, Harris AL (1993) Relationship of endothelial cell proliferation to tumor vascularity in human breast cancer. *Cancer Res* 53: 4161-4163
- Friberg M, Jennings R, Alsarraj M, Dessureault S, Cantor A, Extermann M, Mellor AL, Munn DH, Antonia SJ (2002) Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection. *Int J Cancer* 101: 151-155
- Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatti U, Ferrara GB (2002) Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med* 196: 459-468
- Fujigaki S, Saito K, Takemura M, Maekawa N, Yamada Y, Wada H, Seishima M (2002) L-tryptophan-L-kynurenine pathway metabolism accelerated by *Toxoplasma gondii* infection is abolished in gamma interferon-gene-deficient mice: cross-regulation between inducible nitric oxide synthase and indoleamine-2,3-dioxygenase. *Infect Immun* 70: 779-786
- Garrido F, Cabrera T, Concha A, Glew S, Ruiz-Cabello F, Stern PL (1993) Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol Today* 14: 491-499
- Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P (2003) Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol* 24: 242-248
- Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, Candeloro P, Belladonna ML, Bianchi R, Fioretti MC, Puccetti P (2002) CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 3: 1097-1101
- Gupta SL, Carlin JM, Pyati P, Dai W, Pfefferkorn ER, Murphy MJ, Jr. (1994) Antiparasitic and antiproliferative effects of indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme expression in human fibroblasts. *Infect Immun* 62: 2277-2284
- Gurtner GJ, Newberry RD, Schloemann SR, McDonald KG, Stenson WF (2003) Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase augments trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. *Gastroenterology* 125: 1762-1773
- Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J, Tschopp J (1996) Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 274: 1363-1366
- Hansen AM, Ball HJ, Mitchell AJ, Miu J, Takikawa O, Hunt NH (2004) Increased expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in murine malaria infection is predominantly localised to the vascular endothelium. *Int J Parasitol* 34: 1309-1319
- Hayashi T, Beck L, Rossetto C, Gong X, Takikawa O, Takabayashi K, Broide DH, Carson DA, Raz E (2004) Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 114: 270-279
- Hayashi T, Rao SP, Takabayashi K, Van Uden JH, Kornbluth RS, Baird SM, Taylor MW, Carson DA, Catanzaro A, Raz E (2001) Enhancement of innate immunity against *Mycobacterium avium* infection by immunostimulatory DNA is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect Immun* 69: 6156-6164

7. Literaturverzeichnis

- Heinemann D, Smith PJ, Symes MO (1987) Expression of histocompatibility antigens and characterisation of mononuclear cell infiltrates in human renal cell carcinomas. *Br J Cancer* 56: 433-437
- Honig A, Rieger L, Kapp M, Sutterlin M, Dietl J, Kammerer U (2004) Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression in invasive extravillous trophoblast supports role of the enzyme for materno-fetal tolerance. *J Reprod Immunol* 61: 79-86
- Hou DY, Muller AJ, Sharma MD, DuHadaway J, Banerjee T, Johnson M, Mellor AL, Prendergast GC, Munn DH (2007) Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses. *Cancer Res* 67: 792-801
- Hwu P, Du MX, Lapointe R, Do M, Taylor MW, Young HA (2000) Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J Immunol* 164: 3596-3599
- Ibrahim EC, Guerra N, Lacombe MJ, Angevin E, Chouaib S, Carosella ED, Caignard A, Paul P (2001) Tumor-specific up-regulation of the nonclassical class I HLA-G antigen expression in renal carcinoma. *Cancer Res* 61: 6838-6845
- Ino K, Yoshida N, Kajiyama H, Shibata K, Yamamoto E, Kidokoro K, Takahashi N, Terauchi M, Nawa A, Nomura S, Nagasaka T, Takikawa O, Kikkawa F (2006) Indoleamine 2,3-dioxygenase is a novel prognostic indicator for endometrial cancer. *Br J Cancer* 95: 1555-1561
- Ishio T, Goto S, Tahara K, Tone S, Kawano K, Kitano S (2004) Immunoactivative role of indoleamine 2,3-dioxygenase in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 19: 319-326
- Kai S, Goto S, Tahara K, Sasaki A, Kawano K, Kitano S (2003) Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase suppresses NK cell activity and accelerates tumor growth. *J Exp Ther Oncol* 3: 336-345
- Kammerer R, Riesenberger R, Weiler C, Lohrmann J, Schleyden J, Zimmermann W (2004) The tumour suppressor gene CEACAM1 is completely but reversibly downregulated in renal cell carcinoma. *J Pathol* 204: 258-267
- Koo AS, Tso CL, Shimabukuro T, Peyret C, deKernion JB, Belldegrun A (1991) Autologous tumor-specific cytotoxicity of tumor-infiltrating lymphocytes derived from human renal cell carcinoma. *J Immunother* 10: 347-354
- Kudo Y, Boyd CA, Spyropoulou I, Redman CW, Takikawa O, Katsuki T, Hara T, Ohama K, Sargent IL (2004) Indoleamine 2,3-dioxygenase: distribution and function in the developing human placenta. *J Reprod Immunol* 61: 87-98
- Lee GK, Park HJ, Macleod M, Chandler P, Munn DH, Mellor AL (2002) Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology* 107: 452-460
- Lennerz V, Fatho M, Gentilini C, Frye RA, Lifke A, Ferrel D, Wolfel C, Huber C, Wolfel T (2005) The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16013-16018

7. Literaturverzeichnis

- Liu H, Liu L, Fletcher BS, Visner GA (2006) Sleeping Beauty-based gene therapy with indoleamine 2,3-dioxygenase inhibits lung allograft fibrosis. *FASEB J* 20: 2384-2386
- Lopez HE, Kirchner H, Atzpodien J (1996) Interleukin-2 based home therapy of metastatic renal cell carcinoma: risks and benefits in 215 consecutive single institution patients. *J Urol* 155: 19-25
- MacKenzie CR, Hadding U, Daubener W (1998) Interferon-gamma-induced activation of indoleamine 2,3-dioxygenase in cord blood monocyte-derived macrophages inhibits the growth of group B streptococci. *J Infect Dis* 178: 875-878
- Maeurer MJ, Martin DM, Castelli C, Elder E, Leder G, Storkus WJ, Lotze MT (1995) Host immune response in renal cell cancer: interleukin-4 (IL-4) and IL-10 mRNA are frequently detected in freshly collected tumor-infiltrating lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* 41: 111-121
- Malinowski K, Kono K, Takayama T, Terashima T, Tsukuda K, Waltzer W, Rapaport FT (1997) Inhibition of lymphocyte proliferative responses by renal cell carcinoma extract. *Transplant Proc* 29: 839-841
- McDonald DM, Choyke PL (2003) Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med* 9: 713-725
- McKeage K, Wagstaff AJ (2007) Sorafenib: in advanced renal cancer. *Drugs* 67: 475-483
- Mellor AL, Munn DH (2004) IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 4: 762-774
- Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM (1996) Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 335: 865-875
- Muller AJ, Scherle PA (2006) Targeting the mechanisms of tumoral immune tolerance with small-molecule inhibitors. *Nat Rev Cancer* 6: 613-625
- Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL (1999) Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med* 189: 1363-1372
- Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D, Mellor AL (2005) GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity* 22: 633-642
- Munn DH, Sharma MD, Hou D, Baban B, Lee JR, Antonia SJ, Messina JL, Chandler P, Koni PA, Mellor AL (2004) Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest* 114: 280-290
- Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL (1998) Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281: 1191-1193

7. Literaturverzeichnis

- Nakagomi H, Pisa P, Pisa EK, Yamamoto Y, Halapi E, Backlin K, Juhlin C, Kiessling R (1995) Lack of interleukin-2 (IL-2) expression and selective expression of IL-10 mRNA in human renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 63: 366-371
- Natali PG, Nicotra MR, Bigotti A, Ventura I, Marcenaro L, Giacomini P, Russo C (1989) Selective changes in expression of HLA class I polymorphic determinants in human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 6719-6723
- Okamoto A, Nikaido T, Ochiai K, Takakura S, Saito M, Aoki Y, Ishii N, Yanaihara N, Yamada K, Takikawa O, Kawaguchi R, Isonishi S, Tanaka T, Urashima M (2005) Indoleamine 2,3-dioxygenase serves as a marker of poor prognosis in gene expression profiles of serous ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* 11: 6030-6039
- Oliveira-Ferrer L, Tilki D, Ziegeler G, Hauschild J, Loges S, Irmak S, Kilic E, Huland H, Friedrich M, Ergun S (2004) Dual role of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in angiogenesis and invasion of human urinary bladder cancer. *Cancer Res* 64: 8932-8938
- Pantel K, Schlimok G, Kutter D, Schaller G, Genz T, Wiebecke B, Backmann R, Funke I, Riethmuller G (1991) Frequent down-regulation of major histocompatibility class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells. *Cancer Res* 51: 4712-4715
- Pfefferkorn ER (1984) Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 908-912
- Riesenberg R, Weiler C, Spring O, Eder M, Buchner A, Popp T, Castro M, Kammerer R, Takikawa O, Hatz R, Stief C, Zimmermann W (2007) Expression of indoleamine-2,3-dioxygenase in tumor endothelial cells correlates with long term survival of renal cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res* im Druck
- Robinson CM, Shirey KA, Carlin JM (2003) Synergistic transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Interferon Cytokine Res* 23: 413-421
- Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R (1986) A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 233: 1318-1321
- Rottenberg ME, Gigliotti RA, Gigliotti D, Ceausu M, Une C, Levitsky V, Wigzell H (2000) Regulation and role of IFN-gamma in the innate resistance to infection with *Chlamydia pneumoniae*. *J Immunol* 164: 4812-4818
- Sakurai K, Enomoto K, Amano S, Kimura T, Sugito K, Kimizuka K, Ikeda T, Shibata M, Negishi N (2004) [Study of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in patients of esophageal squamous cell carcinoma]. *Gan To Kagaku Ryoho* 31: 1780-1782
- Sakurai K, Zou JP, Tschetter JR, Ward JM, Shearer GM (2002) Effect of indoleamine 2,3-dioxygenase on induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 129: 186-196

7. Literaturverzeichnis

- Schendel DJ, Gansbacher B, Oberneder R, Kriegmair M, Hofstetter A, Riethmuller G, Segurado OG (1993) Tumor-specific lysis of human renal cell carcinomas by tumor-infiltrating lymphocytes. I. HLA-A2-restricted recognition of autologous and allogeneic tumor lines. *J Immunol* 151: 4209-4220
- Schendel DJ, Oberneder R, Falk CS, Jantzer P, Kressenstein S, Maget B, Hofstetter A, Riethmuller G, Nossner E (1997) Cellular and molecular analyses of major histocompatibility complex (MHC) restricted and non-MHC-restricted effector cells recognizing renal cell carcinomas: problems and perspectives for immunotherapy. *J Mol Med* 75: 400-413
- Schleypen JS, Baur N, Kammerer R, Nelson PJ, Rohrman K, Grone EF, Hohenfellner M, Haferkamp A, Pohla H, Schendel DJ, Falk CS, Noessner E (2006) Cytotoxic markers and frequency predict functional capacity of natural killer cells infiltrating renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 12: 718-725
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7: 3
- Schwaab T, Schned AR, Heaney JA, Cole BF, Atzpodien J, Wittke F, Ernstoff MS (1999) In vivo description of dendritic cells in human renal cell carcinoma. *J Urol* 162: 567-573
- Shabtai M, Ye H, Kono K, Takayam T, Terashima K, Tsukuda K, Frischer Z, Waltzer WC, Malinowski K (2003) Immune inhibitory effects of renal cell carcinoma extract on lectin and alloantigen-induced peripheral blood and tumor infiltrating lymphocyte blastogenesis. *Urol Oncol* 21: 27-32
- Silva NM, Rodrigues CV, Santoro MM, Reis LF, Alvarez-Leite JI, Gazzinelli RT (2002) Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during in vivo infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. *Infect Immun* 70: 859-868
- Stein M, Kuten A, Halpern J, Coachman NM, Cohen Y, Robinson E (1992) The value of postoperative irradiation in renal cell cancer. *Radiother Oncol* 24: 41-44
- Stone TW, Darlington LG (2002) Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 1: 609-620
- Storkel S, Eble JN, Adlakha K, Amin M, Blute ML, Bostwick DG, Darson M, Delahunt B, Iczkowski K (1997) Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 80: 987-989
- Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Muller M, Otto G, Strand D, Mariani SM, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR (1996) Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nat Med* 2: 1361-1366

7. Literaturverzeichnis

- Sugimoto H, Oda S, Otsuki T, Hino T, Yoshida T, Shiro Y (2006) Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: catalytic mechanism of O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2611-2616
- Swanson KA, Zheng Y, Heidler KM, Mizobuchi T, Wilkes DS (2004) CD11c⁺ cells modulate pulmonary immune responses by production of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30: 311-318
- Takikawa O (2005) Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 12-19
- Takikawa O, Yoshida R, Kido R, Hayaishi O (1986) Tryptophan degradation in mice initiated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Biol Chem* 261: 3648-3653
- Terness P, Bauer TM, Rose L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, Opelz G (2002) Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med* 196: 447-457
- Thoenes W, Storkel S (1991) [Pathology of benign and malignant renal cell tumors]. *Urologe A* 30: W41-W50
- Thomas SR, Stocker R (1999) Redox reactions related to indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway. *Redox Rep* 4: 199-220
- Thurnher M, Radmayr C, Ramoner R, Ebner S, Bock G, Klocker H, Romani N, Bartsch G (1996) Human renal-cell carcinoma tissue contains dendritic cells. *Int J Cancer* 68: 1-7
- Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, Van den Eynde BJ (2003) Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 9: 1269-1274
- Van den Hove LE, Van Gool SW, Van Poppel H, Baert L, Coorevits L, Van Damme B, Ceuppens JL (1997) Phenotype, cytokine production and cytolytic capacity of fresh (uncultured) tumour-infiltrating T lymphocytes in human renal cell carcinoma. *Clin Exp Immunol* 109: 501-509
- van der BP, Van den Eynde BJ (2006) Processing and presentation of tumor antigens and vaccination strategies. *Curr Opin Immunol* 18: 98-104
- Wang Q, Redovan C, Tubbs R, Olencki T, Klein E, Kudoh S, Finke J, Bukowski RM (1995) Selective cytokine gene expression in renal cell carcinoma tumor cells and tumor-infiltrating lymphocytes. *Int J Cancer* 61: 780-785
- Wittekind C, Compton CC, Greene FL, Sobin LH (2002) TNM residual tumor classification revisited. *Cancer* 94: 2511-2516

7. Literaturverzeichnis

Zheng X, Koropatnick J, Li M, Zhang X, Ling F, Ren X, Hao X, Sun H, Vladau C, Franek JA, Feng B, Urquhart BL, Zhong R, Freeman DJ, Garcia B, Min WP (2006) Reinstalling antitumor immunity by inhibiting tumor-derived immunosuppressive molecule IDO through RNA interference. *J Immunol* 177: 5639-5646

8 Abkürzungsverzeichnis

1-MT	1-Methyl-Tryptophan
AG	Antigen
AK	Antikörper
AMV	<i>avian-myeloblastosis-virus</i>
BKS	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
Bp	Basenpaare
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CEA	<i>carcinoembryonic antigen</i>
CEACAM	<i>CEA-related cell-adhesion molecule</i>
CMV	Cytomegalievirus
CP	<i>crossing point</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	2'-(Desoxy) Ribonukleosid 5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GAS	<i>gamma-activating sequences</i>
GCN2	<i>general control nonderepressible 2</i>
HCC	<i>hepatocellular carcinoma</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSV	Herpes-simplex-Virus
IDO	Indoleamine-2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRF1	<i>interferon-regulatory factor 1</i>
JAK	<i>janus activated kinase</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
LLC-Zellen	<i>lewis lung carcinoma-Zellen</i>
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LPS	Lipopolysaccharide
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenindinucleotid
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
OD	Optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PRPP	Phosphoribosylpyrophosphat
RCC	<i>renal cell carcinoma</i>
RIN	<i>RNA integrity number</i>

8. Abkürzungsverzeichnis

RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	Reverse Transkription
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAE	Tris-Acetat/EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TDO	Tryptophan-2,3-dioxygenase
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	<i>tumor nodes metastasis</i>
tRNA	Transfer-RNA
Trp	Tryptophan
UICC	<i>union internationale contre le cancer</i>

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Labors für Tumorimmunologie. Hervorheben möchte ich meinen Betreuer, Herrn Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann. In den vergangenen Jahren stand er mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite und hat sich dafür immer sehr viel Zeit genommen. Herrn Dr. Rainer Riesenberg danke ich nicht nur für seine Unterstützung bei der Immunhistochemie, sondern auch für seine guten Tipps und Ratschläge. Für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung und den Zuspruch, wenn es mal nicht so lief, bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Alexander Buchner. Anja Henning und Mirna Castro haben mich tatkräftig bei der Durchführung der Kapillarelektrophorese unterstützt, vielen Dank.

Zudem danke ich dem Pathologischen Institut der LMU München für die Anfertigung der Paraffinschnitte. Besonderer Dank gilt auch dem Pathologen Herrn Dr. Christoph Weiler für die Unterstützung bei der immunhistochemischen Auswertung. Für die Bereitstellung des monoklonalen IDO-Antikörpers möchte ich mich bei Dr. Osamu Takikawa aus Japan bedanken. Nicht nur finanzielle, sondern auch fachliche Unterstützung habe ich durch den Promotionsstudiengang Molekulare Medizin unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Heesemann erhalten. Vielen Dank.

Selbstverständlich haben auch Menschen außerhalb des Labors einen entscheidenden Anteil an dieser Arbeit. Besonderer Dank gilt meiner gesamten Familie, die niemals an mir gezweifelt hat. Danke für eure Unterstützung, danke für eure guten Ratschläge und danke, dass ihr immer hinter mir steht. Meiner Mutter danke ich zudem für die Korrektur dieser Arbeit.

Das Ende der Danksagung ist meiner Freundin Anne gewidmet. Sie hat meine Launen während des Studiums und der Fertigstellung dieser Arbeit am nächsten miterlebt. Ohne sie hätte ich es nie geschafft. Vielen Dank für deine Liebe. Zudem danke ich ihr für die Unterstützung bei der Niederschrift und die ständige Motivationsarbeit.

10. Lebenslauf

10 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Oliver Spring
Geburtsdatum: 22. August 1978
Geburtsort: Calw
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

AUSBILDUNG

09/1985 - 07/1989 Grundschule, Bonn
09/1989 - 07/1996 Rotteck-Gymnasium, Freiburg
09/1996 - 06/1998 Staudinger-Gesamtschule, Freiburg
06/1998 Abitur mit den Leistungskursen Mathematik und Sport

STUDIUM

04/2001 - 05/2007 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
08/2004 - 10/2007 Doktorarbeit im Rahmen des Promotionsstudienganges Molekulare Medizin im Labor für Tumorimmunologie am Klinikum der Universität München-Großhadern
Thema: Prognostische Bedeutung der Expression von Indoleamine-2,3-Dioxygenase (IDO) in Endothelzellen klarzelliger Nierenzellkarzinome.

PRAKTISCHE MEDIZINISCHE AUSBILDUNG

Famulaturen:
03/2004 Maria-Theresia Krankenhaus (Chirurgie), München
09/2004 Praxis Dr. Spring (Orthopädie), Freiburg
03/2005 Praxis Dr. Spring (Orthopädie), Freiburg
09/2005 Universitäts-Kinderspital beider Basel (Kinderorthopädie), Basel, Schweiz

Praktisches Jahr:
02/2006 - 06/2006 Klinikum der Universität München-Großhadern (Orthopädie), München
06/2006 - 10/2006 Bürgerspital Solothurn (Innere Medizin), Solothurn, Schweiz
10/2006 - 01/2007 Spital Menziken (Chirurgie), Menziken, Schweiz

10. Lebenslauf

PUBLIKATION

Riesenberg R., Weiler C., Spring O., Eder M., Buchner A., Popp T., Castro M., Kammerer R., Takikawa O., Hatz R., Stief C., Hofstetter A., Zimmermann W.

Expression of indoleamine-2,3-dioxygenase in tumor endothelial cells correlates with long term survival of renal cell carcinoma patients

Clin Cancer Res (2007), im Druck

BERUFS - UND ARBEITSERFAHRUNG

05/1996 - 03/1998	Pflegeaushilfe im St. Antonius Pflegeheim, Freiburg
11/1998 - 12/1999	Zivildienstleistender im Rettungsdienst des Deutschen Roten Kreuzes, Freiburg
11/1999	Abschluss der Ausbildung zum Rettungssanitäter
02/2000 - 03/2001	Rettungssanitäter in Festanstellung im Rettungsdienst des Deutschen Roten Kreuzes, Freiburg
04/2002 - 04/2004	Pflegeaushilfe im Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München