

Aus der Klinik und Poliklinik für
Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. C.-T. Germer

**Korrelation der Expression von Indoleamine-2,3-Dioxygenase (IDO)
und Subgruppen von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs)
in Adenokarzinomen des Rektums
nach neoadjuvanter Radiochemotherapie**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Julia Schollbach
aus Königsbronn-Zang

Würzburg, Dezember 2019

Referent: Prof. Dr. med. Ingo Klein

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Bülent Polat

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 26.02.2021

Die Promovendin ist Ärztin.

Aus dieser Dissertation entstandene Publikationen:

Schollbach J, Kircher S, Wiegering A, Seyfried F, Klein I, Rosenwald A, Germer CT, Löb S. Prognostic value of tumour-infiltrating CD8+ lymphocytes in rectal cancer after neoadjuvant chemoradiation: is indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO1) a friend or foe? *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2019 Apr;68(4):563-575 (1)

Schollbach J, Kircher S, Wiegering A, Anger F, Rosenwald A, Germer CT, Löb S. The local immune phenotype influences prognosis in patients with nodal-positive rectal cancer after neoadjuvant chemoradiation. *Int J Colorectal Dis*. 2020 Feb;35(2):365-370. doi: 10.1007/s00384-019-03466-0. Epub 2019 Dec 11. PMID: 31828368.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das kolorektale Karzinom	1
1.1.1 <i>Epidemiologie</i>	1
1.1.2 <i>Anatomie und Histologie</i>	1
1.1.3 <i>Pathogenese und Risikofaktoren</i>	2
1.1.4 <i>Klinik und Früherkennung</i>	4
1.1.5 <i>Diagnosestellung und Staging</i>	4
1.1.6 <i>Behandlungsstrategien</i>	7
1.1.7 <i>Nachsorge</i>	8
1.2. Tumor-infiltrierende Lymphozyten und Immunoscore	10
1.3. Indoleamin-2,3-Dioxygenase (IDO)	12
1.3.1 <i>Eigenschaften und Expression</i>	12
1.3.2 <i>IDO1 und seine Rolle als Immunregulator</i>	13
1.3.3 <i>IDO1-Expression in Tumoren</i>	15
1.3.4 <i>Der Tryptophan-Katabolismus als Angriffspunkt für neue Therapien</i>	17
1.4. Zielsetzung der Arbeit	20
2. Material und Methoden	21
2.1. Material	21
2.1.1 <i>Patienten</i>	21
2.1.2 <i>Geräte</i>	24
2.1.3 <i>Häufig verwendete Materialien</i>	24
2.1.4 <i>Chemikalien und biologische Reagenzien</i>	25
2.1.5 <i>Kits und Antikörper</i>	25
2.2. Methoden	26
2.2.1 <i>Aufarbeitung des Patientenmaterials</i>	26

2.2.2. Immunhistochemische Färbung (CD8+)	26
2.2.3. Immunhistochemische Färbung (IDO)	27
2.2.4. Immunhistochemische Auswertung von CD8+-Lymphozyten	29
2.2.5. Immunhistochemische Auswertung von IDO	31
2.3. Angaben zur Statistik	32
3. Ergebnisse	33
3.1. Patientencharakteristik	33
3.2. Immunhistochemische Färbung CD8+ und IDO	35
3.3 Korrelation von IDO und CD8+	40
3.4. Assoziation mit klinisch-pathologischen Variablen	42
3.5. Einfluss auf Gesamt- und Rezidivfreies Überleben	46
3.6. Prognostischer Einfluss	51
3.7. Fälle mit vollständiger Tumorregression (ypT0)	54
4. Diskussion	56
4.1. Einfluss auf die lokale Immunantwort	56
4.2. IDO und CD8+-Lymphozyten als prognostische Marker	57
4.3. Wirkung von CD8+ auf die IDO-Expression	59
4.4. Immunoprofile als medikamentöse Therapieansätze	61
5. Zusammenfassung	63
6. Literaturverzeichnis	65
7. Anhang	74
7.1. Abbildungsverzeichnis	74
7.2. Tabellenverzeichnis	74
7.3. Abkürzungsverzeichnis	75
Danksagung	
Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1. Das kolorektale Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

Mit einer weltweiten Inzidenz von 1 Million und 500 000 Todesfällen pro Jahr stellt das kolorektale Karzinom (CRC) das häufigste Malignom des Gastrointestinaltraktes dar (2). Im Jahr 2014 erkrankten in Deutschland 61.010 Menschen an einem CRC (27.890 Frauen und 33.120 Männer). Damit belegt das CRC Platz 2 der häufigsten Krebserkrankungen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Frauen bei 75 Jahren, für Männer bei 72 Jahren. Das 5-Jahres-Überleben beläuft sich im Durchschnitt auf 63%. Ca. 30% der kolorektalen Tumoren sind im Rektum lokalisiert (3).

1.1.2. Anatomie und Histologie

Nach UICC-Klassifikation werden als Rektumkarzinom jene Tumoren bezeichnet, deren aboraler Rand bei der Messung mit dem starren Rektoskop 16 cm oder weniger von der Anokutanlinie entfernt ist. Entsprechend ihrem Abstand von der Anokutanlinie erfolgt eine Unterteilung in Karzinome des oberen Rektumdrittels (12 – 16 cm), des mittleren Rektumdrittels (6 - <12 cm) und des unteren Rektumdrittels (< 6 cm) (4, 5). Ergänzend kann eine chirurgische Höhenlokalisierung des Rektumkarzinoms ab Linea dentata erfolgen. Dies ist aufgrund der Längenvariabilität des Analkanals insbesondere für die tief-sitzenden Rektumkarzinome zur präoperativen Beurteilung bzw. Einschätzung des Sphinktererhalts von Vorteil.

Histologisch liegt bei über 95 % der Patienten ein Adenokarzinom vor. Andere seltenere Histologien sind neuroendokrine Tumoren, kleinzellige Karzinome, Siegelringzellkarzinome, Lymphome, Sarkome, gastrointestinale Stromatumoren oder speziell im Rektum auch Plattenepithelkarzinome.

1.1.3 Pathogenese und Risikofaktoren

Die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms beruht auf einem multifaktoriellen Geschehen. Die meisten Karzinome gehen über mehrere Stufen genetischer Mutationen aus Adenomen hervor; klassischerweise beginnend mit primären Mutationen im *APC*-Gen und nachfolgender chromosomaler Instabilität (6). Das Erkrankungsrisiko wird durch den Einfluss von endogenen und exogenen Risikofaktoren erhöht. So scheint unter anderem der Lebensstil eine Rolle zu spielen: Fett- und fleischlastige sowie ballaststoffarme Ernährung, erhöhter Alkohol- und Nikotinkonsum und mangelnde Bewegung und Adipositas werden mit einem erhöhten Karzinomrisiko assoziiert. Auch chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa) sowie ein gehäuftes Auftreten von kolorektalen Karzinomen in der Familie erhöhen das Erkrankungsrisiko (7).

Nur in weniger als 5% der Fälle ist eine definierte genetische Erkrankung wie die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP, Mutationen innerhalb des *APC*-Gens) oder das hereditäre kolorektale Karzinom ohne Polyposis (HNPCC-/ Lynch-Syndrom, Mutation in den Genen *MSH2*, *MLH1*, *PMS1*, *PMS2*, *MSH6*, *TGFR2*, *MLH3*) Ursache eines CRCs (8). Weitere mit kolorektalen Karzinomen vergesellschaftete Krankheitsbilder sind beispielsweise das Cowden- oder Peutz-Jeghers-Syndrom.

Für die Diagnosestellung eines HNPCC müssen alle sogenannten Amsterdam-Kriterien erfüllt sein (Tabelle 1). Ebenfalls zur Diagnosestellung hinzugezogen werden, können die Bethesda-Kriterien (Tabelle 2). Bereits wenn eines der Bethesda-Kriterien erfüllt ist, gilt ein HNPCC als sehr wahrscheinlich und es sollte eine weitere molekulargenetische Analyse erfolgen.

Tabelle 1. Amsterdam-Kriterien (AC1: nur CRC, AC2: extrakolische Manifestationen miteinbezogen) (9)

1	Mindestens drei Angehörige der Familie mit HNPCC-assoziierten Karzinomen (Kolon/Rektum, Endometrium, Dünndarm, Urothel (Ureter/Nierenbecken))
2	Mindestens zwei aufeinanderfolgende Generationen betroffen
3	Mindestens ein erstgradig verwandtes Familienmitglied
4	Mindestens einer der Erkrankten ist/war bei Diagnose jünger als 50 Jahre
5	Ausschluss einer familiären adenomatösen Polyposis

Tabelle 2. Revidierte Bethesda-Kriterien (9)

1	Patient mit CRC vor dem 50. Lebensjahr
2	Patient mit synchronen oder metachronen kolorektalen oder anderen HNPCC-assoziierten Tumoren (Kolon, Rektum, Endometrium, Magen, Ovar, Pankreas, Ureter, Nierenbecken, biliäres System, Gehirn (v.a. Glioblastom), Haut (Talgdrüsenadenome und -karzinome, Keratoakanthome, Dünndarm)), unabhängig vom Alter bei Diagnose
3	Patient mit CRC vor dem 60. Lebensjahr mit typischer Histologie eines MSI-H-Tumors (Tumor-infiltrierende Lymphozyten, Crohn's like Lesions, muzinöse oder siegelringzellige Differenzierung, medulläres Karzinom)
4	Patient mit CRC, der einen Verwandten 1. Grades mit einem CRC oder einem HNPCC-assoziierten Tumor vor dem 50. Lebensjahr hat
5	Patient mit CRC (unabhängig vom Alter), der mindestens zwei Verwandte 1. oder 2. Grades hat, bei denen ein CRC oder ein HNPCC-assoziiertes Tumor (unabhängig vom Alter) diagnostiziert wurde

1.1.4. Klinik und Früherkennung

Es gibt keine charakteristischen Frühsymptome. Mögliche Beschwerden vor allem in fortgeschrittenen Stadien können Veränderungen des Stuhlgangs wie Obstipation, „Bleistiftstühle“ oder rektale Blutabgänge sein. Hinzu können Symptome der Anämie (Blässe, Schwindel, Tachykardien) sowie allgemein Karzinom-verdächtige B-Symptome kommen wie ungewollter Gewichtsverlust, Nachtschweiß und Leistungsabfall. Rektale Blutabgänge sollten auch bei bekanntem Hämorrhoidalleiden zum koloskopischen Karzinomausschluss führen. Ein leitliniengerechtes Screening beinhaltet einen fäkalen okkulten Bluttest (FOBT/alternativ immunologischer FOBT = iFOBT; jährlich ab dem 50. LJ als Alternative zur Koloskopie) sowie als Goldstandard die Koloskopie (ab dem 50. LJ, bei unauffälligem Befund alle 10 Jahren). Bei vollständiger Koloskopie ist kein Stuhltest auf okkultes Blut nötig. Falls eine komplette Koloskopie abgelehnt wird, wird ein jährlicher Stuhltest auf okkultes Blut sowie alle fünf Jahre eine Sigmoidoskopie empfohlen (7, 8).

1.1.5 Diagnosestellung und Staging

Zur Diagnostik bei neu aufgetretenen Symptomen gehören eine körperliche Untersuchung inklusive digital-rektaler Untersuchung und eine komplette Koloskopie mit Biopsie bzw. bei nicht komplett durchführbarer Koloskopie die Recto-/Sigmoidoskopie. Zum leitliniengerechten präoperativen Staging kommen hinzu die Abdomensonografie, Röntgen-Thorax (bzw. CT Thorax/Abdomen) und die Abnahme des Tumormarkers CEA (Carcinoembryonales Antigen).

Insbesondere beim Rektumkarzinom kommt dem lokalen Staging eine entscheidende Bedeutung bei der weiteren Therapieplanung zu (s. Kapitel Behandlungsstrategien) und sollte daher um eine starre Rektoskopie (genaue Abschätzung des Abstandes von Karzinom zu Schließmuskel bzw. zur Linea dentata), ein MRT-Becken (Abstand des Tumors zur mesorektalen Faszie) sowie eine rektale Endosonographie (zur Bestimmung der Infiltrationstiefe) ergänzt werden (9). Bei kolorektalen Karzinomen ist das TNM-System (Tumor-Lymphknoten-Metastasen) des American Joint Committee on Cancer/Union

Internationale Contre le Cancer (AJCC/UICC-TNM) der internationale Standard für die pathologische und klinische Tumorklassifikation (10).

Tabelle 3: TNM-Klassifikation (11)

T-Stadium	
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Submukosa
T2	Muscularis propria
T3	Subserosa, nicht peritonealisiertes perikolisches/perirektales Gewebe
T4	Tumor infiltriert andere Nachbarstrukturen/Organe
T4a	viszerales Peritoneum
T4b	Infiltration anderer Organe oder Strukturen
N-Stadium	
Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten
N1a	Metastasen in 1 Lymphknoten
N1b	Metastasen in 2-3 Lymphknoten
N1c	Tumorknötchen (Satelliten) im Fettgewebe der Subserosa ohne Lymphknotenmetastasen
N2	Befall von 4 oder mehr regionären Lymphknoten
N2a	Metastasen in 4-6 regionären Lymphknoten
N2b	Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten
M-Stadium	
Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1a	Fernmetastasen in einem Organ
M1b	Fernmetastasen in mehreren Organen

Tabelle 4: UICC-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms (9)

	T	N	M
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1/T2	N0	M0
Stadium II	T3/T4	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
Stadium III	jedes T	N1/N2	M0
IIIA	T1/T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3/T4	N1	M0
	T2/T3	N2a	M0
	T1/T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3/T4a	N2b	M0
	T4b	N1/N2	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1
IVA	jedes T	jedes N	M1a
IVB	jedes T	jedes N	M1b

1.1.6. Behandlungsstrategien

Zwar haben Kolon- und Rektumkarzinome viele Gemeinsamkeiten bezüglich ihrer Ätiologie und Histologie; unterscheiden sich aber vor allem in der Behandlungsstrategie. Daher spielt, wie im Abschnitt „Diagnosestellung“ bereits erwähnt, die genaue Höhenangabe des Tumors im Rektum eine entscheidende Rolle. So werden Tumoren im oberen Drittel des Rektums vom Prinzip wie Kolonkarzinome behandelt, d.h. eine neoadjuvante Therapie wird in aller Regel nicht durchgeführt, stattdessen erfolgt die primäre Resektion des Karzinoms plus partieller oder totaler mesorektaler Exzision (11).

Tumoren des mittleren und unteren Drittels werden dagegen in fortgeschrittenen Stadien (UICC-Stadien II und III, cT3/4 und/oder cN+, locally advanced rectal cancer, LARC) entsprechend einem multimodalen Therapiekonzept neoadjuvant vorbehandelt. Dieses besteht entweder aus einer neoadjuvanten Radiochemotherapie (1,8 - 2 Gy Einzeldosis bis 45 – 50,4 Gy Gesamtdosis kombiniert mit oralem Capecitabin oder infusionalem 5-Fluoruracil) oder einer Kurzzeit-Radiotherapie (5 x 5 Gy) in Kombination mit einer sich anschließenden tiefen anterioren Rektumresektion und totaler mesorektaler Exzision (TME).

Die Kombination aus neoadjuvanter Vorbehandlung und weitläufiger Exzision erhöht die Erfolgsrate von Sphinkter-erhaltenden Operationen und reduziert die lokale Rezidivrate erheblich (12-15). Langfristige Nachuntersuchungen waren bisher jedoch nicht in der Lage, eine Verbesserung des Rezidivfreien- bzw. Gesamtüberlebens (DFS bzw. OS) nachzuweisen (16, 17).

Auch in Bezug auf eine adjuvante Chemotherapie nach erfolgter präoperativer Radiochemotherapie zeigt sich die Datenlage bislang noch uneindeutig. Eine klare Leitlinienempfehlung für oder wider eine adjuvante Chemotherapie gibt es demnach aktuell nicht, erfolgt aber am ehesten mit der Gabe von Capecitabin oder 5-FU (18, 19).

Bei metastasierten Tumoren kann je nach (potenzieller) Resektabilität eine Metastasenresektion mit vor- bzw. nachgeschaltener medikamentöser Tumor- und/oder Antikörpertherapie erfolgen.

1.1.7. Nachsorge

Eine strukturierte Nachsorge zur Detektion von lokalen Rezidiven und Fernmetastasen sowie zur Verbesserung der Lebensqualität wird in den aktuellen Leitlinien nach einem klaren Schema empfohlen (9). Nach R0-Resektion im UICC-Stadium II und III sind regelmäßige Nachsorgeuntersuchungen in Intervallen wie in Tabelle 5 beschrieben, indiziert.

Gesonderte Empfehlungen ergehen für Patienten im Tumorstadium UICC I: Nach R0-Resektion ist eine rein koloskopische Nachsorge empfohlen. Diese sollte postoperativ nach einem Jahr und bei unauffälligem Befund alle 5 Jahre erfolgen. Des Weiteren ist nach R2-Resektion und somit palliativer Situation eine strukturierte Nachsorge wie in Tabelle 5 genannt nicht erforderlich. Nach kurativer Metastasentherapie im UICC-Stadium IV gelten dagegen die empfohlenen Nachsorgeintervalle.

Tabelle 5. Nachsorgeschema gemäß aktueller S3-Leitlinie

Untersuchung	Monat										
	3	6	9	12	15	18	21	24	36	48	60
Anamnese, körperl. Unters. CEA		X		X		X		X	X	X	X
Koloskopie		X ¹		X ²							X ²
Sono Abdomen		X		X		X		X	X	X	X
Sigmoidoskopie (Rektoskopie) ³		X		X		X		X			
CT Thorax/ Abdomen ⁴	X										
Röntgen Thorax ⁵				X				X	X	X	X

¹wenn präoperativ keine vollständige Koloskopie erfolgt ist

²bei unauffälligem Befund alle 5 Jahre

³nur beim Rektumkarzinom ohne neoadjuvante oder adjuvante Radiochemotherapie

⁴nur beim Rektumkarzinom 3 Monate nach Abschluss der tumorspezifischen Therapie (Operation bzw. adjuvante Strahlen-/Chemotherapie) als Ausgangsbefund

⁵nur beim Rektumkarzinom

1.2. Tumor-infiltrierende Lymphozyten und Immunoscore

Das TNM-Staging-System des American Joint Committee on Cancer / Union Internationale Contre le Cancer (AJCC / UICC) ist traditioneller Standard zur Klassifikation und zur Beurteilung hinsichtlich Behandlung und prognostischer Einschätzung von kolorektalen Karzinomen. Es umfasst die Ausdehnung des Primärtumors (T), das Vorhandensein regionaler Lymphknotenmetastasen (N) sowie das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) (10). Allerdings hat die derzeitige Klassifizierung nur eine begrenzte Aussagekraft bezüglich einer genauen Überlebensprognose sowie eines Ansprechens auf die angewandte Therapie (20, 21). Daher werden verstärkt weitere Möglichkeiten zur Klassifizierung und zur Unterscheidung verschiedener Subtypen von Darmkrebs geprüft.

So haben sich unter anderem mehrere Studien mit dem immunologischen Milieu und der Immunantwort des Wirts gegen Krebszellen beschäftigt und konnten zeigen, dass die Zusammensetzung, Dichte und Lokalisation des In-situ-Infiltrates von Immunzellen in Tumoren einen bedeutenden prognostischen Einfluss hat (22-25). Immuninfiltrate sind nicht nur zwischen einzelnen Tumorarten sehr heterogen sondern divergieren auch von Patient zu Patient. Zytotoxische T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen spielen eine tragende Rolle in der Beseitigung von Tumorzellen, während andere Populationen wie regulatorische T-Zellen (T_{regs}) und myeloide Suppressorzellen die Antitumor-Immunantwort dämpfen und somit malignes Zellwachstum und Gewebeinvasion fördern können (26, 27).

Doch nicht nur in kolorektalen Karzinomen sondern auch in anderen Arten von Tumoren wie Melanomen, Brust-, Urothel-, Speiseröhren-, Nieren-, Prostata- oder Pankreaskarzinomen wird eine hohe T-Zell-Infiltration mit einem besseren klinischen Outcome in Verbindung gebracht (27). Ebenso kann der Immunoscore Aufschluss über das Ansprechen auf eine Therapie geben: So zeigte sich bei Patienten mit kolorektalem Karzinom mit Lebermetastasen und einer hohen CD8+-Infiltration ein besseres Ansprechen auf eine Chemotherapie (28).

Weitreichende Studien beschäftigten sich ausgiebig mit dem Immunfiltrat in Krebszellen und etablierten einen sogenannten "Immunoscore". Dieser basiert auf der Quantifizierung (Zellen/mm²) von zwei Lymphozyten-Populationen (in erster Linie CD3+- und CD8+-Lymphozyten) im Zentrum und an der Invasionsfront des kolorektalen Karzinoms und der Erstellung eines Gesamtscores im Bereich von Immunoscore 0 (I0) bis Immunoscore 4 (I4) (29).

Mehrere Arbeiten konnten zeigen, dass der Immunoscore als zusätzlicher Prognosefaktor für das krankheitsfreie Überleben und das Gesamtüberleben eine tragende Rolle bei kolorektalen Karzinomen einnimmt und der bestehenden AJCC/UICC-TNM-Klassifizierung sogar teilweise überlegen ist (30). Die jüngsten Ergebnisse einer großangelegten Studie mit mehr als 2600 Patienten mit einem Kolonkarzinom Stadium I-III, deren Immuninfiltrat als Immunoscore quantifiziert wurde, zeigten, dass der Immunoscore einen größeren prognostischen Wert aufweist als das pT-Stadium, das pN-Stadium, die lymphovaskuläre Invasion, die Tumordifferenzierung und der MSI-Status. Die prognostische Wertigkeit durch das TNM-Staging wurde durch Hinzunahme des Immunoscores (TNM+I) verbessert (31).

All diese Ergebnisse unterstützen die Implementierung eines Immunoscores als neuen Bestandteil einer TNM-Immunklassifikation von malignen Tumoren (32, 33).

1.3. Indoleamin-2,3-Dioxygenase (IDO)

1.3.1 Eigenschaften und Expression

Die essentielle Aminosäure Tryptophan wird von allen Lebensformen für die Proteinsynthese benötigt und dient als Vorstufe des biogenen Amins Serotonin sowie des epiphysären Hormons Melatonin (34). Über eine Stoffwechsellkaskade wird L-Tryptophan (Trp) zu L-Kynurenin (Kyn) abgebaut. Der erste und geschwindigkeitsbegrenzende Schritt dieses Katabolismus wird von drei verschiedenen Enzymen erbracht: Indoleamine-2,3-Dioxygenase (IDO1), Indoleamine-2,3-Dioxygenase 2 (IDO2) und Tryptophan-2,3-Dioxygenase 2 (TDO) (35-37). In dieser Arbeit liegt das Hauptaugenmerk auf IDO 1.

IDO1 wird von dem Indoleamine-2,3-Dioxygenase-Gen codiert. Dieses enthält 10 Exonen und ist beim Menschen auf Chromosom 8 lokalisiert. IDO1 hat ein molekulares Gewicht von 45 kDa (38, 39). Die Gentranskription wird von verschiedenen Entzündungsmediatoren wie beispielsweise Interferon- γ (IFN- γ), Lipopolysacchariden (LPS) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) reguliert (40). Im Bereich der IDO-Promoterregion vermitteln spezifische Sequenzen wie ISRE (interferon stimulated response element) und GAS (interferon-gamma activated sequence) seine Aktivierung (41). Eine Hochregulierung des IDO1-Gens findet sich in vielen verschiedenen Arten von Geweben und zellulären Untergruppen, wie beispielsweise in der Plazenta während der Schwangerschaft, während einer Infektion, nach Transplantation, bei Autoimmunität und in Karzinomen (42-45). IDO1 wird hauptsächlich von drei verschiedenen Zelltypen exprimiert: Myeloiden Zellen, vor allem Antigen-präsentierende Zellen (APC) wie dendritische Zellen (DC) und Makrophagen, sowie Endothelzellen und Tumorzellen. Die IDO1-Expression wurde für jeden dieser Zelltypen bereits einzeln berichtet (46). Die verschiedenen IDO1-exprimierenden Zellen können je nach Gewebeart auch koexistieren und ihr Anteil zudem je nach Gewebe oder auch Tumor stark variieren (46).

1.3.2. IDO1 und seine Rolle als Immunregulator

IDO1 ist einer der Regulierungsmechanismen, die zur Immunsuppression und Immuntoleranz in verschiedenen Gewebearten beitragen. Ein immunregulatorisches Potential von IDO1 wurde erstmals in einem Mausmodell gezeigt. Die Behandlung von schwangeren Mäusen mit einem IDO1-Blocker (1-D,L-Methyl-Tryptophan) resultierte in einem Abort, vermutlich durch eine T-Zell-vermittelte Abstoßung des (semi-)allogenen Embryos. Die Schlussfolgerung der Autoren lautete, dass eine Hemmung von IDO1 in der Schwangerschaft den fetalen Schutz gegen eine mütterliche Immunabstoßung aufhebt und in einem Abort resultiert (47).

Die durch IDO1-vermittelte Immunmodulation hängt mit dessen Schlüsselposition im Tryptophanmetabolismus zusammen. IDO1 katalysiert den initialen, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des oxidativen Katabolismus von Verbindungen, die Indolringe enthalten, einschließlich Tryptophan (Trp) und 5-Hydroxytryptamin (5-HT). Zellen, die IDO1-Gene exprimieren, depletieren Trp und erzeugen bioaktive Kataboliten, sogenannte Kynurenine (Kyn). Zusätzliche Enzyme bauen Kyn weiter ab und erzeugen Kataboliten wie Kynurensäure (KA), 3-Hydroxyanthranilsäure (HAA), Chinolinsäure (QA) und Niacin (48).

Demnach moduliert und unterstützt IDO1 eine immunsuppressive Umgebung über zwei wesentliche Mechanismen: 1. eine Tryptophandepletion und damit einhergehenden Tryptophanmangel und 2. den vermehrten Anfall von Tryptophan-Abbauprodukten (Kyn) (Abbildung 1). Einige Immunzellen reagieren auf die Trp-Depletion und die Akkumulation von Kyn-Kataboliten. So führt ein Abfall der Trp-Konzentration unter anderem zu einem Anstieg an unbeladener Transfer-RNA (tRNA), der wiederum eine vermehrte Aktivierung einer Stresskinase GCN2 (general control non-derepressible 2) nach sich zieht. Aktiviertes GCN2 kann letztlich in Zellzyklusarrest, T-Zell-Proliferationshemmung und Apoptose enden (49-53).

Doch nicht nur ein Mangel an Tryptophan sondern auch der vermehrte Anfall von Trp-Abbauprodukten spielt eine Rolle in der IDO1-vermittelten

Immunsuppression. So ist das oben bereits erwähnte Kynurenin ein Ligand des Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR); ein zusammenfassend immunsuppressiv wirkender Transkriptionsfaktor, dessen Aktivierung unter anderem zu einer Differenzierung von T-Effektor-Zellen in regulatorische T-Zellen und einer veränderten Immunogenität von dendritischen Zellen führen kann (54-56).

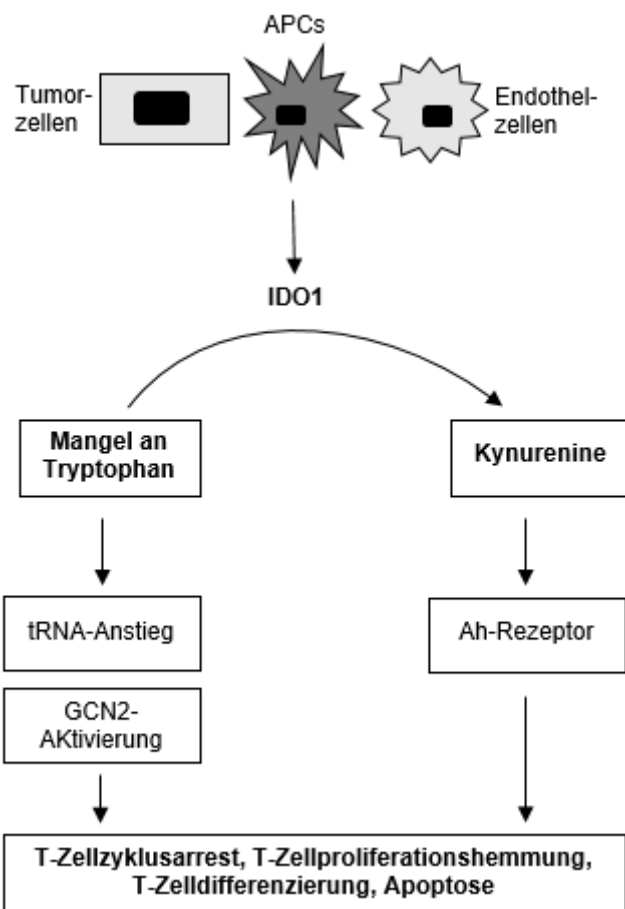


Abbildung 1. Modulation der Immunantwort durch IDO1. Zu den IDO1-exprimierenden Zellen gehören Tumorzellen, Antigen-präsentierende Zellen (APCs) und Endothelzellen. Durch die verstärkte Anwesenheit von IDO1 kommt es einerseits zu einem Mangel an Tryptophan, andererseits zu einer Akkumulation von Tryptophan-Abbauprodukten (Kynurenine). Beide Mechanismen führen zu einer Unterdrückung der angeborenen und adaptiven Immunität und fördern tolerogene Reaktionen.

1.3.3. IDO1-Expression in Tumoren

Ein entscheidender Durchbruch in Bezug auf die physiologische Bedeutung des Tryptophan-Katabolismus fand 1998 mit der wegweisenden Arbeit von Munn, Mellor und ihren Kollegen statt, die IDO als einen Mechanismus der T-Zell-vermittelten Immunsuppression während der Schwangerschaft identifizierten (47). Im Verlauf folgten zahlreiche weitere Studien, die sich mit der immunmodulierenden Rolle von IDO1 in Tumoren beschäftigten und dessen Rolle als einer der potenziellen Schlüsselspieler der Immunevasion bei Krebs beim Menschen diskutierten.

So beschäftigten sich Theate et al. in einer umfangreichen Studie detailliert mit dem Auftreten und der von Gewebe zu Gewebe unterschiedlichen Verteilung von IDO1-exprimierenden Zellen (in erster Linie myeloiden Zellen, Endothelzellen und Tumorzellen) und beschrieben eine Überexpression von IDO1 vor allem in Endometriumkarzinomen, Cervixkarzinomen und Melanomen; aber auch in Tumoren des Gastrointestinaltraktes wie dem Ösophaguskarzinom, dem kolorektalen Karzinom und Magenkarzinomen (46).

Normalerweise steht IDO1 unter der Kontrolle des Tumorsuppressors Bin1 (57, 58), eines der am häufigsten abgeschwächten Gene bei menschlichen Tumoren (59-62). Die IDO1-Erhöhung in Krebszellen kann daher direkt auf eine Störung einer Tumorsuppressorfunktion zurückgeführt werden, für die während des malignen Fortschreitens eine starke Selektion zu bestehen scheint (61).

Eine weitere Forschungsgruppe berichtete über eine hemmende Wirkung von IFN- γ auf die Proliferation von Krebszellen, die durch Tryptophanentzug über die enzymatische IDO1-Aktivität vermittelt wird (63).

Uyttenhove et al. beschrieben eine IDO-Expression in einer Vielzahl an unterschiedlichen menschlichen Tumorarten und postulierten zudem, dass die Blockade der IDO-Aktivität durch die Gabe des pharmakologischen IDO-Inhibitors 1-Methyltryptophan (1-MT) zu einer verringerten Tumorpheriferation führt (45). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Friberg et. al, die in vivo bei Mäusen nach Injektion von LLC-Zellen (Lewis lung carcinoma-Zellen) und Gabe des IDO-Inhibitors 1-MT ein geringeres Tumorstwachstum und eine gesteigerte T-

Zell-Aktivität beobachteten (64). Jedoch konnte durch eine reine IDO1-Inhibition kein vollständiger Tumorregress erreicht werden. In Kombination mit diversen Chemotherapeutika ließ sich der Effekt jedoch deutlich steigern. So beobachteten beispielsweise Muller et al. eine Tumorregression in T-Zell-kompetenten Mäusen nach der Gabe von 1-MT in Kombination mit einer Chemotherapie und zeigten so einen weiteren möglichen therapeutischen Nutzen einer Inhibition von IDO1 auf (58, 65).

Zahlreiche Autoren beschreiben in ihren meist auf immunhistochemischen Färbungen basierenden Studien eine positive Korrelation zwischen einer hohen IDO1-Expression und einem Tumorprogress. In der Mehrzahl der Studien, unter anderem bei Patientin mit Endometriumkarzinom (66, 67), Ovarialkarzinom (68), kolorektalem Karzinom (69) oder Nasopharynxkarzinom (70) hatten die Patienten mit einer hohen IDO1-Expression im Tumor oder Tumor-umgebenden Stroma ein verringertes Gesamtüberleben bzw. krankheitsfreies Überleben. Doch gibt es auch Studien, die eine genau gegensätzliche Korrelation aufzeigen. So beschreibt Riesenberg et al. ein verbessertes Gesamtüberleben bei Patienten mit Nierenzellkarzinom und hohem IDO1-Anteil in Endothelzellen (71). Auch in einer Studie von Ishio et al. an hepatozellulären Karzinomen weisen Patienten mit hohem IDO1-Anteil ein prolongiertes progressionsfreies Überleben auf (72).

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, dass es zwar eine Korrelation zwischen IDO1-Expression und einem Tumorprogress zu geben scheint; der kausale Zusammenhang kann jedoch nicht durch diese korrelativen Beobachtungen erklärt werden. So scheint IDO1 über eine Suppression von T-Zellen die Immunantwort zu unterdrücken. Andererseits zeigen einige der Karzinome aber auch eine bessere Prognose im Zusammenhang mit IDO-positiven infiltrierenden T-Lymphozyten. Die exakte Rolle von Indoleamine-2,3-Dioxygenase ist daher im weiten Feld der bislang getätigten Studien immer noch nicht endgültig geklärt.

1.3.4 Der Tryptophan-Katabolismus als Angriffspunkt für neue Therapien

Eine Vielzahl an verschiedene Tumoren exprimiert IDO1 und schafft es auf diese Weise, der Immunabwehr zu entgehen. Folglich scheint eine Inhibition von IDO1 ein vielversprechender Ansatz zu sein, was die Entwicklung neuer, gezielter Immuntherapien angeht. Aktuell gibt es daher mehrere klinische Studien, in denen der Nutzen einer IDO1-Inhibition als Monotherapie oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen auf ihren potenziellen synergistischen Wert untersucht wird.

Einer der ersten entdeckten Inhibitoren des IDO-Signalwegs war 1-Methyl-Tryptophan (1-MT), das in zwei Stereoisomeren existiert: Das L-Isomer (1-L-MT) ist der stärkere Inhibitor von IDO1, wohingegen das D-Isomer (1-D-MT, Indoximod) zwar eine höhere IDO2-Selektivität zeigt, aber dennoch eine signifikant höhere Antitumoraktivität aufweist, indem es die T-Zellfunktion umkehrt, mit Chemotherapeutika synergisiert (73) und zudem als indirekter Inhibitor des IDO1-Signalwegs die durch Tryptophan-Depletion induzierte mTORC1-Inhibition umkehrt (53, 74). In einer Phase-I-Studie mit 48 Patienten mit therapierefraktären, fortgeschrittenen Malignomen zeigte sich eine gute Verträglichkeit von Indoximod. Zudem wurden fünf Fälle mit einem Stable Disease von mehr als sechs Monate beobachtet (73).

Ein weiterer, oral verfügbarer IDO1-Inhibitor, dem aktuell das Hauptinteresse zahlreicher Studien gilt, ist Epacadostat. Epacadostat erhöhte in vitro die T-/NK-Zellproliferation und die IFN- γ -Produktion und unterdrückte regulatorische T-Zellen (T_{regs}). In vivo unterdrückte Epacadostat auch das Tumorwachstum bei immunkompetenten, jedoch nicht bei immundefizienten Mäusen (75). Als Monotherapie zeigte sich in einer Phase-I-Studie bei Patienten mit soliden Tumoren ebenso wie bei Indoximod als bestes Ergebnis lediglich ein Stable Disease bei 18 von 52 Patienten (76).

Bei im Einsatz der beiden IDO1-Inhibitoren als Monoagent eher überschaubaren Ergebnissen, konzentrierten sich weitere Studien auf die Kombination einer IDO-Inhibition mit bereits etablierten Chemotherapeutika. Vor allem Checkpoint-

Inhibitoren wie PD1-Inhibitoren (Pembrolizumab, Nivolumab), CTLA-4-Antikörpern (Ipilimumab) oder PD-L1-Antikörpern (unter anderem Atezolizumab) dienen als interessante Kombinationspartner. So zeigte beispielsweise die Kombination von Indoximod und Pembrolizumab bei Melanompatienten eine ebenso gute Remissionsrate wie durch die bereits etablierten Wirkstoffe Nivolumab und Ipilimumab; jedoch ohne ausgeprägte Nebenwirkungen (77). In einer anderen Phase-II-Studie bei Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom führte die gleichzeitige Anwendung von Indoximod nach Impfung der Patienten mit Sipuleucel-T (Impfstoff gegen dendritische Zellen) zu einer zweifachen Verlängerung des Patientenüberlebens (78). Im Gegensatz dazu ergab in zwei weiteren Phase-II-Studien mit mehr als hundert Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom und 169 Patienten mit metastasiertem Brustkrebs die gleichzeitige Anwendung von Indoximod kaum oder keinen statistisch signifikanten Unterschied in Bezug auf das progressionsfreie Überleben oder das Gesamtüberleben (74, 79, 80).

Die Kombination von Epacadostat mit Checkpoint-Inhibitoren (CPI) im Rahmen der ECHO 202 und -204 Studien klingt erfolgsversprechend: So zeigten Patienten mit unterschiedlichen Arten von Karzinomen in der Kombination eines CPI mit Epacadostat bessere Überlebensraten als in der Monoanwendung eines CPIs, bei vergleichsweise weniger Nebenwirkungen (81-85).

Überraschenderweise zeigten die jüngsten Ergebnisse der ECHO-301-Studie, der ersten großen Phase-3-Studie, dass Epacadostat bei Patienten mit metastasiertem Melanom als zusätzlicher Agent zum PD1-Inhibitor Pembrolizumab keinen wesentlichen Vorteil mit sich bringt (86). Basierend auf den negativen Ergebnissen der ECHO 301-Studie sowie auch in der Pankreaskrebs-Kohorte von ECHO-203 wurden mehrere Versuche mit dem IDO-Inhibitor Epacadostat abgebrochen (87).

Weitere Studien beschäftigen sich aktuell mit neuen Kombinationsmöglichkeiten, wie beispielsweise die Verknüpfung einer Strahlentherapie mit Epacadostat bei Lymphompatienten (88) oder die Integration von Peptid-Impfstoffen und Anti-

Angiogenese-Wirkstoffen (89). In Bezug auf die Entwicklung von IDO1-Peptiden als Impfstoffe haben bereits Andersen et al. gezeigt, dass IDO1 von bestimmten CD8-T-Zellen erkannt wird und diese T-Zellen wiederum IDO1-exprimierende Tumorzellen erkennen und töten können (90). In einer Phase-I-Studie bei Patienten mit fortgeschrittenem Lungenkrebs konnte durch IDO1-Peptidimpfstoffe eine Stabilisierung der Krankheit erreicht werden (91).

Zusammenfassend sind in den vergangenen Jahren zahlreiche neue Ansätze zur IDO1-Inhibition in Studien untersucht worden. Das Hauptaugenmerk liegt dabei vor allem auf oralen IDO1-Inhibitoren wie Epacadostat, die zwar im Einsatz als Monoagent nur wenige Vorteile aufweisen, aber in Kombination mit Checkpoint-Inhibitoren für ein besseres Tumorsprechen zu sorgen scheinen – wenn auch die erste große Phase-III-Studie bei Melanompatienten eher enttäuschende Ergebnisse hervorbrachte. Weitere Forschungen in Kombination mit anderen synergistischen Wirkstoffen werden für die Zukunft der IDO-Inhibitoren auf dem Gebiet der Immuntherapie von entscheidender Bedeutung sein.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Jährlich versterben weltweit 500.000 Patienten an den Folgen eines kolorektalen Karzinoms. In Deutschland stellt es die zweithäufigste Krebserkrankung dar. Prognoseeinschätzung und Therapieplanung richten sich seit vielen Jahren nach traditionellen Klassifikationen und Staging-Systemen. Fraglich bleibt, ob diese die Komplexität der Tumorbiologie erfassen. Demnach liegt ein wissenschaftlicher Fokus in der Erforschung der Rolle des Immunsystems in der Pathogenese kolorektaler Karzinome. Zudem erlangen immunologische Parameter (z.B. Mikrosatellitenstabilität) zunehmend Einfluss als prognostische Faktoren. Gerade beim kolorektalen Karzinom konnte ein klar definierter Immunoscore prognostisch die TNM-Klassifikation überragen und steht kurz davor, in die Klassifikation des kolorektalen Karzinoms mitaufgenommen zu werden. Hinsichtlich der prognostischen Wertigkeit einer IDO1-Expression in Malignomen und vor allem beim kolorektalen Karzinom herrscht Uneinigkeit. In Bezug auf neoadjuvant behandelte Malignome gibt es bislang keine Untersuchungen.

Das Ziel dieser Arbeit ist es daher, eine mögliche prognostische Rolle einer IDO1-Expression und/oder CD8 T-Zell-Infiltration in Tumorproben von Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom nach neoadjuvanter Radiochemotherapie zu evaluieren. Des Weiteren gilt es herauszufinden, ob Korrelationen zwischen IDO1-exprimierenden und CD8-positiven Zellen mit klinisch-pathologischen Parametern bestehen. Abschließend soll der Einfluss einer IDO1- und/oder CD8-Expression auf das tumorfreie bzw.-Gesamtüberleben der Patienten untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Patienten

Alle gefärbten und untersuchten Präparate stammen von Patienten mit einem histologisch gesicherten lokal fortgeschrittenen Adenokarzinom des Rektums (LARC) im mittleren und unteren Drittel (uT3/uT4 uN-/+, uT1-uT4 uN+), die zwischen 2009 und 2015 am Universitätsklinikum Würzburg operiert wurden. Eingeschlossen wurden nur jene Patienten, die vor der Tumorsektion (Low-anterior-Resektion des Rektums mit totaler mesorektaler Exzision) eine neoadjuvante Langzeit-Radiochemotherapie (RCTx, 1,8 - 2 Gy Einzeldosis bis 45 – 50,4 Gy Gesamtdosis kombiniert mit oralem Capecitabin oder infusionalem 5-Fluoruracil) bekommen hatten. Die Operation erfolgte im Anschluss nach etwa sechs bis acht Wochen. Des Weiteren wurden nur jene Patienten eingeschlossen, die bei Diagnosestellung keine Fernmetastasen aufwiesen und R0-reseziert wurden.

Alle Patienten wurden eingehend körperlich untersucht. Das lokale Staging erfolgte mittels starrer Endoskopie plus endorektaler Sonographie sowie eines MRT des Beckens. Zum Nachweis von Fernmetastasen wurden CT-Aufnahmen von Thorax und Abdomen erstellt. Die entsprechenden Patientendaten wie beispielsweise Alter, Geschlecht, Body-Mass-Index (BMI) oder Tumorcharakteristiken sowie Behandlungsmerkmale wie Therapieregime, OP-Verfahren und histologische Einteilungen sowie Follow-Up-Daten wie Rezidivfreies- und Gesamtüberleben wurden retrospektiv aus Patientenakten und dem umfassenden Register des Comprehensive Cancer Center der Universitätsklinik Würzburg erhoben. Die histologische Einteilung der kolorektalen Karzinome wurde durch Mitarbeiter des Pathologischen Instituts der Universitätsklinik Würzburg vorgenommen. Die Tumorklassifizierung erfolgte entsprechend der UICC- und TNM-Klassifikation für kolorektale Adenokarzinome. Die Nachuntersuchung der Patienten wurde gemäß den nationalen S3-Leitlinien durchgeführt (9).

Zu Beginn ergab sich so ein Kollektiv von 106 Patienten. Insgesamt 15 Patienten, deren Tumorpräparate nach Resektion als ypT0 (vollständige Tumorregression)

klassifiziert wurde, wurden als gesondertes Kollektiv betrachtet (siehe Kapitel 3.7). Zudem mussten aufgrund qualitativ ungenügender CD8+-Färbung nochmals sieben Präparate von der immunhistochemischen Bewertung ausgeschlossen werden. Für die statistischen Berechnungen bezüglich Überlebenskurven (Kaplan-Meier-Kurven) und der Cox-Proportional-Hazard-Modelle wurden zudem alle Fälle mit einem ungenügenden Follow-Up von weniger als einem Jahr ausgeschlossen (Abbildung 2, Flussdiagramm).

Alle durchgeführten Verfahren entsprachen den Standards des institutionellen Ethikkomitees und der Erklärung von Helsinki von 1964 und ihren späteren Änderungen. Die Genehmigung der Studie wurde zuvor bei der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg (Referenznummer 34/16) eingeholt. Alle Patienten haben schriftlich ihre Einwilligung erteilt.

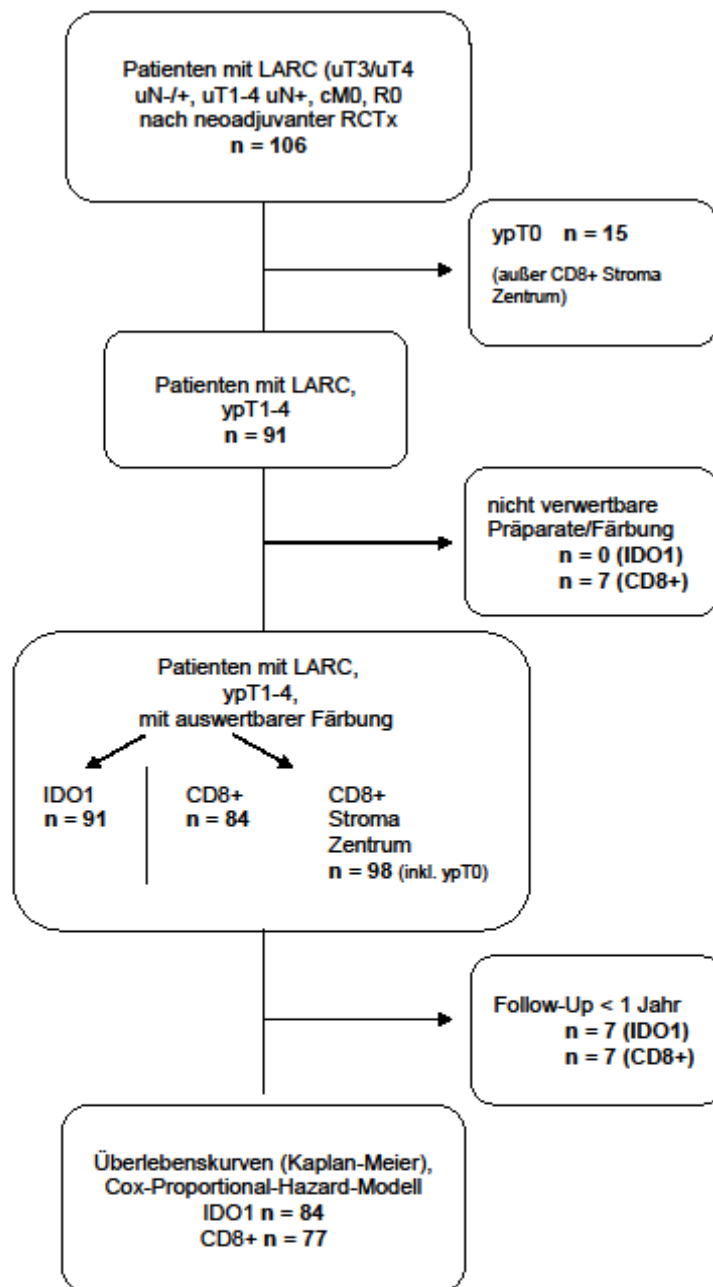


Abbildung 2. Flussdiagramm zur Veranschaulichung der Studienpopulation. Aus einem Grundkollektiv von 106 Patienten wurden Präparate mit einer qualitativ unzureichenden immunhistochemischen Färbung aussortiert. Patienten mit einem ypT0-Tumor (15 Fälle) wurden von der Gesamtauswertung ausgeschlossen und sind nur in der Betrachtung der CD8+-Infiltration im stromalen Tumorzentrum enthalten. Fälle mit ungenügendem Follow-Up flossen nicht in die Berechnungen zum Überleben mit ein.

2.1.2. Geräte

Kühlplatte (Leica)

Heizbad (Medax)

Schlittenmikrotom (HN 40, Reichert-Jung)

Objektträger-Schnelltrockner (TDO Sahara, Medite)

Vortexer (L46, Labinco)

Dampfkochtopf (WMF)

Heizplatte (A.Hartenstein)

Folieneindeckautomat (Tissue-Tek, Sakura)

Lichtmikroskop (BX 50, Olympus)

Pipettierautomat (Freedom EVO, Tecan)

2.1.3. Häufig verwendete Materialien

Mikrotommesser (R35, Feather)

Mikrotomöl (Engelbrecht)

Objektträger (Super Frost Plus, R.Langenbrinck)

Handschuhe (TouchNTuff Robust Nitrile 92-600, Ansell)

Coverplates (Shandon Coverplate, Thermo Scientific)

Reagiergefäß (1,5ml, Sarstedt)

Pipetten (0,1-2,5 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, Eppendorf)

Pipettenspitzen (2,5 µl, 200 µl, 1000 µl, Sarstedt, Typ Eppendorf)

Folie Eindeckautomat (KP Tape, Klinipath)

2.1.4. Chemikalien und biologische Reagenzien

Freezing Spray (Leica)

Xylol (Pathologisches Institut Würzburg)

Citronensäure CS 6,0 (Pathologisches Institut Würzburg)

PBS-Puffer (pH 7,4, Pathologisches Institut Würzburg)

Ethanol (Pathologisches Institut Würzburg)

Hämalaun nach Meyer (Pathologisches Institut Würzburg)

2.1.5. Kits und Antikörper

Advance™ HRP Detection Kit (K4068) von Dako

(Dako Advance HRP Link + Dako Advance HRP Enzyme)

EnVision™ FLEX DAB+ Substrate Chromogen System von Dako

(Dako EnVision FLEX DAB+Chromogen + Dako EnVision Flex Substrate Buffer)

anti-CD8-Antikörper (Clone C8/144B, Dako, Verdünnung 1:80)

anti-CD1a-Antikörper (Clone O10, Santa Cruz, Verdünnung 1:100)

anti-CD163-Antikörper (Clone 10D6, Leica Biosystems, Verdünnung 1:200)

anti-CD5-Antikörper (Clone 4C5, Leica Biosystems, Verdünnung 1:100)

anti-IDO-Antikörper (Anti-Human IDO Purified, V1NC3IDO Antikörper, 0,5mg/mL, Mouse IgG2b, kappa, eBioscience, Verdünnung 1:1000)

2.2. Methoden

2.2.1. Aufarbeitung des Patientenmaterials

Entsprechend gängiger Methoden werden Tumorpräparate nach ihrer Resektion in gepuffertem Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet im Pathologischen Institut der Universitätsklinik Würzburg aufbewahrt.

Zur immunhistochemischen Auswertung wurden mit dem Mikrotom 4 µm dünne Schnitte der Tumorpräparate angefertigt und anschließend für eine Stunde im Brutschrank bei 56°C getrocknet. Danach wurden die Schnitte über Nacht in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 90%, 80%, 70%) rehydriert und dann nochmal mit Aqua dest. gespült.

2.2.2. Immunhistochemische Färbung (CD8+)

Zur Vorbereitung auf die Färbung wurden alle entparaffinierten und rehydrierten Schnitte in Citronensäure (CS 6,0) bei 118-124°C in einem handelsüblichen Dampfkochtopf für 10 Minuten gekocht und anschließend in Aqua dest. gekühlt. Die Antikörperfärbung erfolgte mittels einer halbautomatischen Färbemaschine (Tecan, Freedom EVO) nach standardisierten Protokollen unter Hinzuziehung des Advance™ HRP Detection Kit (K4068) von Dako und des EnVision™ FLEX DAB+ Substrate Chromogen System zur Visualisierung. Als Antikörper diente ein monoklonaler Anti-CD8+-Antikörper (Clone C8/144B, Dako, Verdünnung 1:80). Stichprobenartige wurden zur besseren Quantifizierung der IDO1-Färbung zudem einige Exemplare mit weiteren monoklonalen CD-Antikörpern gefärbt. Verwendet wurden dabei ein monoklonaler anti-CD1a-Antikörper (Clone O10, Santa Cruz, Verdünnung 1:100), ein monoklonaler anti-CD163-Antikörper (Clone 10D6, Leica Biosystems, Verdünnung 1:200) und ein monoklonaler anti-CD5-Antikörper (Clone 4C5, Leica Biosystems, Verdünnung 1:100).

Zum Abschluss wurden alle Präparate für 3 Minuten mit Hämalaun nach Meyer gegengefärbt, anschließend für 10 Minuten gewässert, kurz in Alkohol (100% Ethanol) geschwenkt, für 25 Minuten im Brutschrank bei 56°C getrocknet und die Objektträger abschließend mittels eines Eindeckautomaten eingedeckelt.

2.2.3. Immunhistochemische Färbung (IDO)

Ebenso wie bei der CD8+-Färbung wurden als erster Schritt alle entparaffinierten und rehydrierten Präparate zur Vorbereitung in Citronensäure (CS 6,0) bei 118-124°C in einem handelsüblichen Dampfkochtopf für 10 Minuten gekocht und anschließend in Aqua dest. gekühlt. Für die anschließende manuelle immunhistochemische Färbung zur Detektierung der IDO1-Expression wurde ebenfalls das Advance™ HRP Detection Kit (K4068) von Dako und das EnVision™ FLEX DAB+ Substrate Chromogen System benutzt. Als Primärantikörper diente ein gereinigter monoklonaler IDO-Antikörper (V1NC3IDO Antikörper, Mouse IgG2b, kappa, eBioscience, Verdünnung 1:1000), der mit IDO1 reagiert, aber keine Kreuzreaktion mit IDO2 aufweist. Als positive Kontrolle wurde normale Plazenta verwendet. Negative Kontrollen umfassten das Weglassen von primärem IDO1-Antikörper auf Plazenta-Duplikat entsprechend vorangegangener Studien (46).

Als ersten Schritt der Färbung wurden alle Objekte für 7 Minuten mit einem PBS-Puffer (phosphate buffered saline-Puffer) gewaschen, um dann für 1 Stunde mit dem Primärantikörper inkubiert zu werden (Verdünnung mit DAKO Real Antibody Diluent, 1:1000). Nach einem weiteren 7-minütigen Waschgang mit PBS erfolgte die Hinzugabe des Sekundärantikörpers (DAKO Advance HRP Link) für 30 Minuten. Nach erneutem Waschen mit PBS für 7 Minuten wird das Enzym (DAKO Advance HRP Enzyme) für 30 Minuten hinzugegeben. Es folgten ein 7-minütiger Waschgang mit PBS-Puffer und die Hinzugabe des DAB EnVision™ FLEX DAB+ Substrate Chromogen System für 10 Minuten. Erneutes Waschen für 7 Minuten mit PBS.

Zum Abschluss erfolgte wie auch bei CD8+-Färbung die Gegenfärbung mit Hämalaun nach Meyer für 3 Minuten, anschließend wurden die Objektträger für 10 Minuten gewässert, kurz in Alkohol (100% Ethanol) geschwenkt, für 25 Minuten im Brutschrank bei 56°C getrocknet und die Objektträger abschließend mittels eines Eindeckautomaten eingedeckelt.

Um die Verwertbarkeit der gefärbten Präparate zu gewährleisten, wurden alle Präparate nach der Färbung unter dem Lichtmikroskop (Olympus BX 50) begutachtet.

Tabelle 6. Arbeitsprotokoll Immunhistochemische IDO1-Färbung

Entparaffinieren in Xylol	über Nacht
Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (100%, 90%, 80%, 70%)	durch die Reihen ziehen bis Schnitte klar
Spülen in Aqua dest.	1 min
Vorbehandlung im Dampftopf (CS 6,0) bei 118-124°C	10 min
Abkühlung in Aqua dest.	1 min
Färbung:	
1. Primär-AK (Verdünnung mit DAKO Real Antibody Diluent 1:1000)	1h
Spülen in PBS	7 min
2. Dako Advance HRP Link	30 min
Spülen in PBS	7 min
3. Dako Advance HRP Enzyme	30 min
Spülen in PBS	7 min
4. DAB EnVision™ FLEX DAB+ Substrate Chromogen System	10 min
Spülen in PBS	7 min
Gegenfärben mit Hämatoxylin	3 min
Wässern (in fließendem Wasser)	10 min
kurz in Alkohol tauchen, dann Trockenschrank	25 min
Eindecken mit Automat	

2.2.4. Immunhistochemische Auswertung von CD8+-Lymphozyten

Die Auswertung der immunhistochemischen CD8+-Färbung erfolgte orientierend an vorangegangenen Studien (24, 25, 92) semiquantitativ unter dem Lichtmikroskop (Olympus BX 50) an drei verschiedenen Lokalisationen: dem Stroma an der Tumordinvasionsfront, dem Stroma im Tumorzentrum und im Tumorepithel (intraepitheliale Expression). Als Invasionsfront gilt dabei die Stelle, an der der Tumor am tiefsten ins Gewebe eindringt, als Zentrum gilt der Bereich, der mit deutlichem Abstand zur Invasionsfront und dem Lumen liegt (Abbildung 3).

An allen drei Lokalisationen wurden mindestens drei repräsentative Stellen begutachtet (High Power Fields, HPF, 40-fache Objektivvergrößerung) und basierend auf der Anzahl der infiltrierenden CD8+-Lymphozyten für jede Lokalisation eine Einteilung der Präparate wie folgend vorgenommen: Für das Stroma an der Invasionsfront und im Tumorzentrum galt hierbei 1= keine oder niedrige CD8+-Infiltration (0-10 CD8+-Zellen/HPF), 2= mäßige Infiltration (11-30 Zellen/HPF), 3= reichlich Infiltration (31-50 Zellen/HPF) und 4= hohe CD8+-Infiltration (>50 Zellen/HPF). Für die intraepitheliale CD8+-Infiltration galt: 1= keine oder niedrige CD8+-Infiltration (0-1 CD8+-Zellen/HPF), 2= mäßig (2-4 Zellen/HPF), 3= reichlich (5-10 Zellen/HPF) und 4= hohe CD8+-Infiltration (>11 Zellen/HPF).

Als Summe aller drei einzelnen Lokalisationen wurde ein CD8+-Gesamtscore, der von 3-12 reicht, für jedes Präparat errechnet. Anhand dessen wurden die Patienten schlussendlich in drei Untergruppen mit einem niedrigen (low, 3-4), mittleren (intermediate, 5-6) und hohen (high, 7-12) CD8-Gesamtscore eingeteilt.

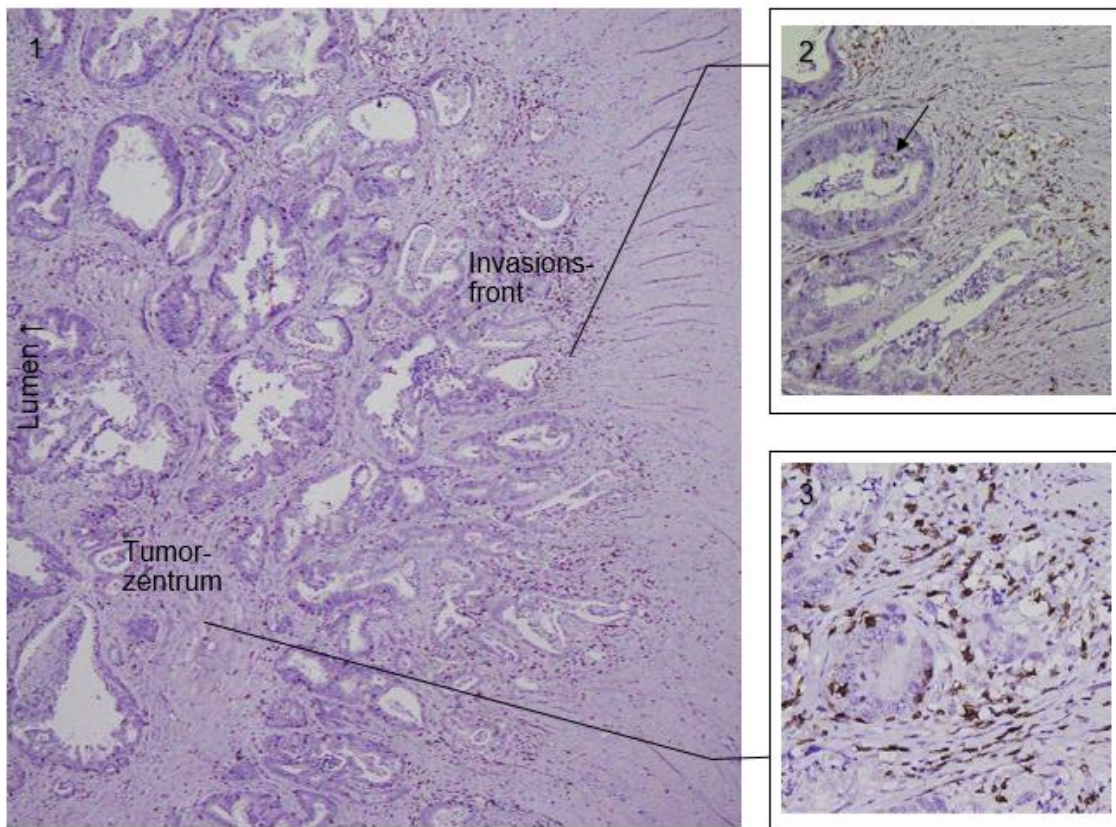


Abbildung 3. Bestimmung der CD8+-Lymphozyten-Infiltration an drei verschiedenen Lokalisationen. Zur Auswertung der CD8+-Infiltration wurde die Anzahl an CD8+-Zellen an drei verschiedenen Stellen (1) im immunhistochemisch gefärbten Tumorpräparat bestimmt: dem Stroma an der Invasionsfront (2), dem Tumorepithel an der Invasionsfront (2, Pfeil) und dem Stroma im Tumorzentrum (3).

2.2.5. Immunhistochemische Auswertung von IDO

Zur Bewertung der IDO-Expression wurde ausschließlich die Invasionsfront begutachtet. In einer semiquantitativen Auswertung wurden neoplastische Epithelzellen und Stromazellen getrennt voneinander begutachtet und der Anteil an positiven IDO-exprimierenden Epithel- bzw. Stromazellen als prozentualer Anteil aller Zellen in diesem Kompartiment bestimmt. Die Patienten wurden so in den beiden Fraktionen in Gruppen aufgeteilt: 0= keine IDO-Expression, 1= <5%, 2= >5%, 3= >50% IDO1-exprimierende Zellen (Abbildung 4).

Folglich berechnet sich für jeden Patienten ein IDO1-Gesamtscore von 0-6 als Summe der epithelialen und stromalen IDO1-Expression. Entsprechend bisheriger Studien (93) wurden alle Fälle abschließend in zwei Kategorien eingeteilt: Fälle mit niedriger IDO1-Expression (IDO low, Gesamt-IDO1-Score 0-2) und Fälle mit hoher IDO1-Expression (IDO high, Gesamt-IDO1-Score 3-6).

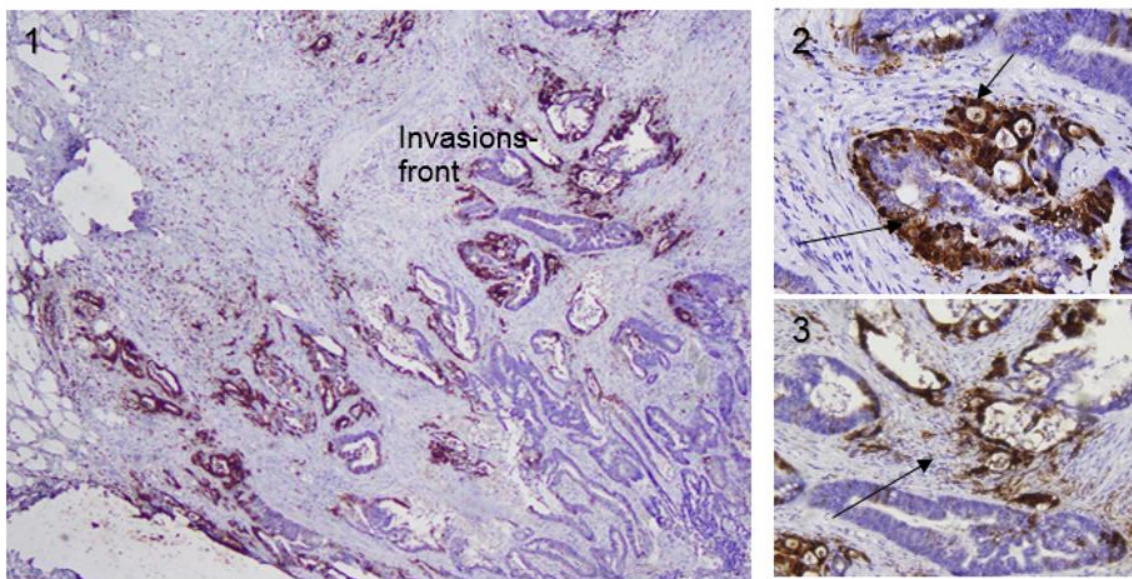


Abbildung 4. Bestimmung der IDO1-Expression an der Invasionsfront. Zur Bewertung der IDO-Expression wurde in jedem immunhistochemisch aufgearbeiteten Tumorpräparat ausschließlich die Invasionsfront (1) begutachtet und der prozentuale Anteil an positiven IDO-exprimierenden Tumor- (2) bzw. Stromazellen (3) bestimmt.

2.3. Angaben zur Statistik

Zur statistischen Auswertung und grafischen Darstellung diente das Programm IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0. (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA). Kreuztabellen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test für kategoriale Variablen oder dem exakten Test nach Fisher analysiert, wenn die erwarteten Häufigkeiten pro Zelle weniger als fünf waren. Korrelationen zwischen den verschiedenen CD8+- und IDO1-Scores wurden durch nichtparametrische Kendall Tau-b-Korrelationskoeffizienten bestimmt.

Zur Überlebensanalyse und Beschreibung des Gesamt- und Rezidivfreien Überlebens wurden Kaplan-Meier-Kurven verwendet. Unterschiede im Überleben zwischen den Gruppen wurden durch Log-Rank-Tests erhoben.

Cox-Proportional-Hazard-Regressionsmodelle wurden für die univariate und multivariate Überlebensanalyse verwendet. In allen Überlebenszeitanalysen wurden Patienten mit einem Follow-Up von weniger als einem Jahr sowie alle Patienten mit Fernmetastasen ausgeschlossen.

In allen Analysen wurde ein p-Wert $<0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Patientencharakteristik

Das Patientenkollektiv bestand aus 106 Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom des unteren und mittleren Drittels, die sich zwischen Mai 2009 und März 2015 einer multimodalen Therapie in der Universitätsklinik Würzburg unterzogen haben. Alle Patienten erhielten eine neoadjuvante Radiochemotherapie, hatten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung keine Fernmetastasen und sind R0-reseziert worden.

Etwa zwei Drittel der Patienten war männlich (67,9%), das andere Drittel weiblich (32,1%). Der mittlere Altersdurchschnitt lag bei 64 Jahren (39-88), der mittlere Body-Mass-Index (BMI) lag bei 26,2 kg/m² (17,0-49,5). 97,2% der Patienten waren im Staging mit einem cT3/T4-Tumor diagnostiziert worden, 65,1% waren nodal-positiv. Die Operation wurde in 86 Fällen (81,1%) als tiefe anteriore Resektion mit totaler mesorektaler Exzision (TME) durchgeführt, in 20 Fällen (18,9%) als Rektumexstirpation mit TME. Die pathologische Begutachtung des Resektionspräparats ergab in 15 Fällen (14,2%) eine komplette Tumorregression. 73 Patienten (69,5%) aller Patienten erhielten eine adjuvante Chemotherapie. Das 5-Jahres-Rezidivfreies-Überleben (Disease-free survival, DFS) lag im Gesamtkollektiv bei 63,2% und das 5-Jahres-Gesamtüberleben (Overall survival, OS) bei 76,8%. Eine ausführliche Beschreibung des Patientenkollektivs findet sich in Tabelle 7.

Tabelle 7. Klinische Patientendaten und Tumorcharakteristika.

	Anzahl (Prozent)
Patienten (n, %)	106 (100)
Alter (Jahre; median (min-max))	64 (39-88)
Geschlecht (n, %) Weiblich Männlich	34 (32,1) 72 (67,9)
BMI (kg/m²; median (min-max))	26,2 (17,0-49,5)
cT (n, %) T2 T3 T4	3 (2,8) 91 (85,8) 12 (11,4)
cN (n, %) N- N+	37 (34,9) 69 (65,1)
Operation (n, %) tiefe anteriore Resektion Rektumexstirpation	86 (81,1) 20 (18,9)
ypT (n, %) 0 1 2 3 4	15 (14,2) 8 (7,5) 37 (34,9) 43 (40,6) 3 (2,8)
ypN (n, %) N- N+	83 (78,3) 23 (21,7)
ypUICC Stadium (n, %) 0 1 2 3	14 (13,1) 34 (32,1) 29 (27,4) 29 (27,4)
Resektionsstatus (n, %) R0	106 (100)
Adjuvante Therapie (n, %) Nein Ja Fehlend	32 (30,5) 73 (69,5) 1
5-Jahres DFS (%)	63,2
5-Jahres OS (%)	76,8

3.2. Immunhistochemische Färbung CD8+ und IDO

Um das Vorhandensein von IDO1-positiven- (IDO1+) Zellen und tumorinfiltrierenden CD8-positiven- (CD8+) T-Lymphozyten auf Proteinebene nachzuweisen, wurden immunhistochemische Färbungen der Gewebeproben mit Hilfe monoklonaler Antikörper (anti-IDO-Antikörper, Anti-Human IDO Purified, V1NC3IDO Antikörper, 0,5mg/mL, Mouse IgG2b, kappa, eBioscience, Verdünnung 1:1000, und anti-CD8-Antikörper, Clone C8/144B, Dako, Verdünnung 1:80) durchgeführt. Anschließend wurde die IDO1- und CD8-Expression semiquantitativ unter dem Lichtmikroskop durch Anwendung von zuvor dokumentierten und angepassten Skalierungssystemen für IDO1- (93) und CD8-(24, 92) Expression und durch Berechnung eines Gesamtscores für jeden Marker bewertet. Die T-Lymphozyten-Infiltration wurde an drei verschiedenen Lokalisationen untersucht: dem Stroma an der Invasionsfront, dem Stroma im Tumorzentrum und innerhalb des Tumorepithels und entsprechend in Gruppen eingeteilt (Abbildung 5). Die IDO1-Expression wurde innerhalb des Tumorstromas an der Invasionsfront und innerhalb des Tumorepithels beurteilt (Abbildung 6). Alle Proben wurden zweimal von zwei unabhängigen Beobachtern bewertet (Kappa-Werte Beobachter 1: 0,74-0,89, Kappa-Werte Beobachter 2: 0,67-0,83, Interobserver Kappa-Werte: 0,71-0,81), um eine schlüssige Beurteilung bezüglich der CD8- und IDO1-Quantifizierung zu erhalten und um Intra- und Interobserver-Variabilitäten auszuschließen.

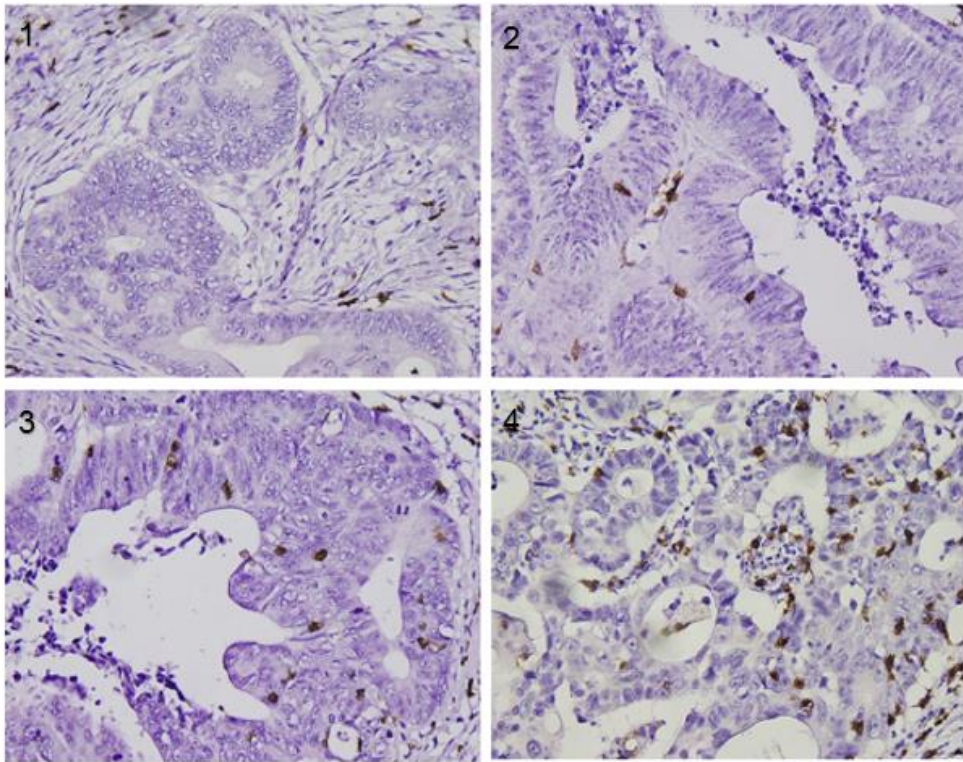


Abbildung 5. Auswertung der intraepithelialen CD8+-Infiltration. Unter 40-facher Vergrößerung wurde zur Auswertung der intraepithelialen CD8+-Infiltration die Anzahl der CD8+-Zellen pro Gesichtsfeld (High Power Field, HPF) gezählt: 1=keine/wenig CD8+-Zellen (1), 2=mäßig (2), 3=reichlich (3), 4=hoch (4).

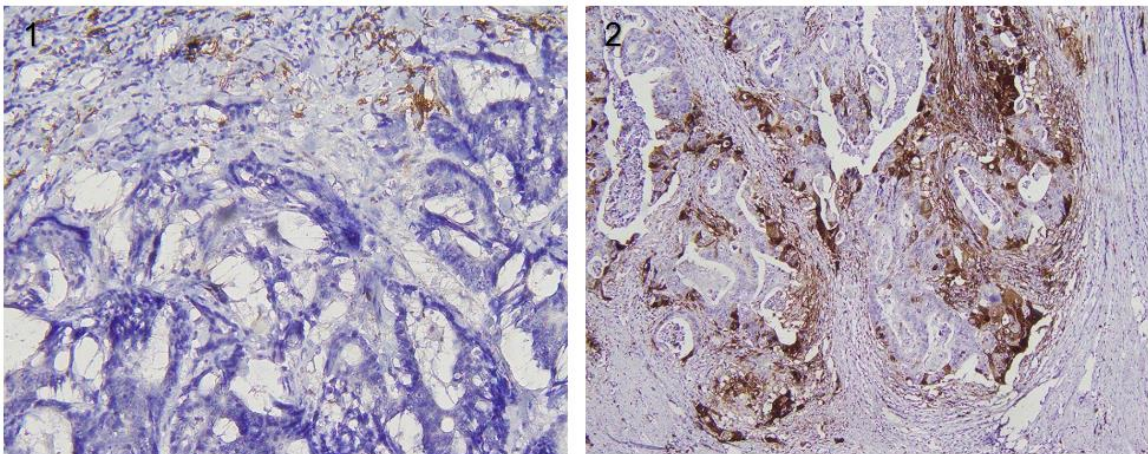


Abbildung 6. Beispiele für IDO low und IDO high Expression. Mehr als 90 Prozent aller Tumorpräparate zeigten eine positive IDO1-Färbung an der Invasionsfront, die entsprechend eines Scoringsystems in IDO low (IDO1-Gesamtscore 0-2, nur wenige IDO1-Zellen in Tumorepithel und Stroma) (1) und IDO high (IDO1-Gesamtscore 3-6, viel IDO1-Expression in Epithel und Stroma) (2) eingeteilt wurden. 20-fache (1) und 10-fache (2) Vergrößerung.

In die weiteren statistischen Berechnungen schlossen wir alle Primärtumoren mit einer vollständigen histologischen Tumorregression (ypT0) nach neoadjuvanter Radiochemotherapie für die Berechnung eines Gesamtscores aus, da für die histologische Untersuchung keine residuale invasive Tumorfront vorlag und es folglich nicht möglich war, einen Gesamtscore für die IDO1- und CD8-Expression (wie im Abschnitt „Methoden“ beschrieben) für diese Proben zu berechnen. Lediglich in der Sparte „stromale CD8+-Expression im Tumorzentrum“ sind die ypT0-Tumoren mitinbegriffen und werden nochmals gesondert betrachtet (s. Kapitel 3.7). Aufgrund fehlender Daten oder schlechter Färbequalität untersuchten wir schließlich 91 Tumorproben (85,8% aller 106 Präparate) auf IDO1-Expression und 84 Proben (79,2%) auf CD8+-Expression bzw. 98 Proben (92,1%) auf stromale CD8+-Expression im Tumorzentrum, ypT0-Tumoren miteingeschlossen.

84 von 84 Tumorproben (100%) zeigten eine CD8+-Lymphozyteninfiltration, 56% davon mit einer sehr hohen T-Zell-Anzahl (CD8+-Gesamtscore 7-12), während die übrigen eine eher schwache T-Zell-Infiltration aufwiesen (CD8+-Gesamtscore 3-4: 19%, 5-6: 25%). Die numerische Verteilung der CD8+-Lymphozyten war innerhalb der drei ausgewerteten Lokalisationen nahezu gleich, tendenziell aber innerhalb des Tumorstromas etwas höher als im Tumorepithel (Tabelle 8).

Tabelle 8. Verteilung der CD8+-Lymphozyten in den verschiedenen Sublokalisationen innerhalb eines Präparats.

CD8+- Infiltration	Sublokalisationen innerhalb eines Präparats, n (%)		
	Tumorepithel (n=84)	Stroma Front (n=84)	Stroma Zentrum (n=98)
1	34 (40,5)	14 (16,7)	24 (24,5)
2	20 (23,8)	28 (33,3)	32 (32,7)
3	13 (15,5)	22 (26,2)	24 (24,5)
4	17 (20,2)	20 (23,8)	18 (18,4)

85 von 91 Tumorpräparaten (93,4%) zeigten eine positive IDO1-Färbung, 38,5% dieser Proben wiesen dabei ein hohes IDO1-Expressionsprofil auf (Gesamt-IDO1-Score 3-6). 6,6% der Präparate blieb ohne positive IDO1-Färbung. In Bezug auf die verschiedenen Lokalisationen im Stroma und Epithel zeigten sich deutlichere Unterschiede: Mehr als 90% der Proben wiesen eine positive IDO1-Färbung im Tumorstroma auf, dagegen nur 63,8% der Tumoren eine positive intraepitheliale IDO1-Expression (Tabelle 9).

Tabelle 9. Verteilung der IDO1-exprimierenden Zellen in den verschiedenen Sublokalisationen innerhalb eines Präparats.

IDO1-Expression	Sublokalisationen innerhalb eines Präparats, n (%)	
	Tumorepithel (n=91)	Stroma Front (n=91)
0	33 (36,3)	6 (6,6)
1	36 (39,6)	43 (47,3)
2	16 (17,6)	38 (41,8)
3	6 (6,6)	4 (4,4)

Um besser quantifizieren zu können, welche Zellen im Tumorstroma positiv auf die IDO1-Färbung reagierten, färbten wir stichprobenartig etwa ein Drittel der Präparate mithilfe monoklonaler Antikörper gegen verschiedene Oberflächen-Antigene: Zum Einsatz kamen ein anti-CD1a-Antikörper (Clone O10, Santa Cruz, Verdünnung 1:100), ein anti-CD163-Antikörper (Clone 10D6, Leica Biosystems, Verdünnung 1:200) sowie ein anti-CD5-Antikörper (Clone 4C5, Leica Biosystems, Verdünnung 1:100). Die Auswertung der Proben ergab, dass unter den IDO1-positiven-Stromazellen hauptsächlich CD163-positive Histiozyten (Monozyten, Makrophagen) vorherrschen, gefolgt von CD5-positiven T-Lymphozyten und Granulozyten (Abbildung 7). Allenfalls nur ganz vereinzelt fanden sich CD1a-positive myeloische dendritische Zellen. Dabei stellen die stichprobenartigen Färbungen lediglich eine Momentaufnahme dar, die keinen genauen Aufschluss darüber gibt, ob IDO1 von den genannten Zellen im Stroma exprimiert wird, oder sich IDO-positive Zellen vermehrt in Lymphozyten- bzw. Histiozyten-reichen Arealen im Tumorstroma ansammeln.

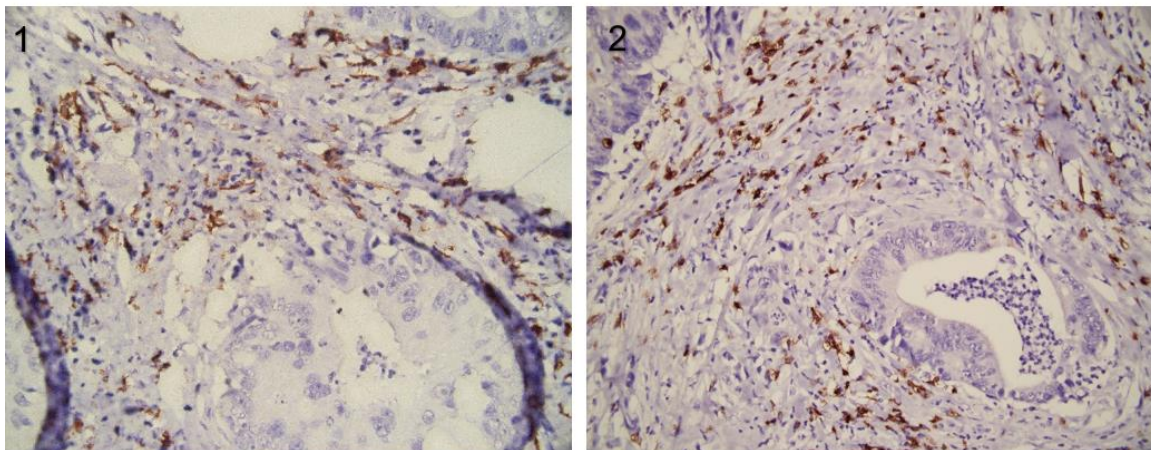


Abbildung 7. Stichprobenartige Untersuchung IDO1-positiv-gefärbter Stromazellen. Zur weiteren Quantifizierung IDO1+-Zellen wurden einzelne Präparate mit verschiedenen CD-Antikörpern gefärbt. Dabei zeigte sich, dass unter den IDO1-positiven Stromazellen vor allem CD163-positive Histiozyten (1, 600-fache Vergrößerung) und CD5-positive T-Lymphozyten zu finden sind (2, 400-fache Vergrößerung).

3.3 Korrelation von IDO und CD8+

Die variierenden Häufigkeiten von infiltrierenden CD8+-Lymphozyten sowie IDO1-positiven Zellen an allen drei Lokalisationen sind in einer Gesamtbewertung für jeden Marker zusammengefasst (wie im Methodenteil beschrieben) und in einer Kreuztabelle in Tabelle 10 dargestellt. Die Anzahl der CD8+-Lymphozyten korreliert stark und positiv mit der Anzahl der IDO1+-Stroma- oder Tumorzellen ($p=0,002$, Kendall-tau-b 0,357): 57,4% der Tumoren mit einem hohen Gesamt-CD8-Score (7-12) zeigten ebenfalls einen hohen Gesamt-IDO1-Wert (3-6). Im Gegensatz dazu hatten nur 18,8% der Tumoren mit einem niedrigen (3-4) bzw. 19,0% der Tumore mit einem moderaten (5-6) Gesamt-CD8-Score dies getan. Diese Proben zeigten einen niedrigen Gesamt-IDO1-Wert (0-2) in 81,3% bzw. 81,0%. In Bezug auf verschiedene Tumorlokalisationen an der Invasionsfront wurde eine ähnliche und sogar noch stärkere Assoziation im Tumorstroma beobachtet: Etwa 70% der Proben mit hohem Gesamt-CD8-Score (CD8+ 3 oder 4) zeigten einen hohen Gesamt-IDO1-Score (IDO 2 oder 3) ($p=0,0081$, Kendall-tau-b 0,409) (Tabelle 11). Im Gegensatz dazu zeigten nur etwa ein Drittel bis die Hälfte der Proben mit einem hohen intraepithelialen CD8+-Anteil (CD8+ 3 oder 4) auch einen hohen intraepithelialen IDO1-Score (IDO 2 oder 3) ($p=0,004$, Kendall-tau-b 0,344) (Tabelle 12).

Tabelle 10. Kreuztabelle zur Darstellung der Korrelation zwischen CD8+-Gesamtscore und IDO1-Gesamtscore.

CD8 Gesamt (n)	IDO1 Gesamt (n, %)*			p-Wert
	low (0-2)	high (3-6)	Total (n, %)	
low (3-4)	13 (81,3)	3 (18,8)	16 (100)	0,002
intermediate (5-6)	17 (81,0)	4 (19,0)	21 (100)	
high (7-12)	20 (42,6)	27 (57,4)	47 (100)	
Total (n, %)	50 (59,5)	34 (40,5)	84 (100)	

*) Prozentsatz der Tumoren mit niedriger oder hoher IDO1-Expression (low (0-2), high (3-6)) innerhalb jeder CD8-Score-Gruppe (low (3-4), intermediate (5-6) oder high (7-12)).

Tabelle 11. Kreuztabelle zur Darstellung der Korrelation zwischen stromaler CD8+-Infiltration und stromaler IDO1-Expression.

	IDO1 stromal ¹ (n, %) ²					
CD8 stromal ¹ (n)	0	1	2	3	Total (n, %)	p-Wert
1	2 (14,3)	9 (64,3)	3 (21,4)	0 (0,0)	14 (100)	0,008
2	3 (10,7)	18 (64,3)	7 (25,0)	0 (0,0)	28 (100)	
3	0 (0,0)	6 (27,3)	14 (63,6)	2 (9,1)	22 (100)	
4	0 (0,0)	6 (30,0)	12 (60,0)	2 (10,0)	20 (100)	
Total (n, %)	5 (6,0)	39 (46,4)	36 (42,9)	4 (4,8)	84 (100)	

¹ CD8 Expressions-Level 1–4: 1 = keine oder niedrige, 2 = mäßige, 3 = reichlich, 4 = hohe Infiltration; IDO1 Expressions-Level: 0 = keine IDO1 Expression, 1 = <5%, 2 = >5%, 3 = >50% gefärbte IDO1-exprimierende Zellen.

² Prozentsatz der Tumoren mit niedriger oder hoher IDO1-Expression innerhalb jeder CD8-Gruppe.

Tabelle 12. Kreuztabelle zur Darstellung der Korrelation zwischen intraepithelialer CD8+-Infiltration und intraepithelialer IDO1-Expression.

	IDO1 epithel ¹ (n, %) ²					
CD8 epithel ¹ (n)	0	1	2	3	Total (n, %)	p-Wert
1	17 (50,0)	13 (38,2)	4 (11,8)	0 (0,0)	34 (100)	0,004
2	7 (35,0)	9 (45,0)	3 (15,0)	1 (5,0)	20 (100)	
3	2 (15,4)	7 (53,8)	4 (30,8)	0 (0,0)	13 (100)	
4	3 (17,6)	5 (29,4)	4 (23,5)	5 (29,4)	17 (100)	
Total (n, %)	29 (34,5)	34 (40,5)	15 (17,9)	6 (7,1)	84 (100)	

¹ CD8 Expressions-Level 1–4: 1 = keine oder niedrige, 2 = mäßige, 3 = reichlich, 4 = hohe Infiltration; IDO1 Expressions-Level: 0 = keine IDO1 Expression, 1 = <5%, 2 = >5%, 3 = >50% gefärbte IDO1-exprimierende Zellen.

² Prozentsatz der Tumoren mit niedriger oder hoher IDO1-Expression innerhalb jeder CD8-Gruppe.

3.4. Assoziation mit klinisch-pathologischen Variablen

Die Gesamtscores von tumorinfiltrierenden CD8+-Lymphozyten und IDO1-exprimierenden Zellen wurden mit klinisch-pathologischen Parametern korreliert (Tabelle 13 und 14). Die Gesamt-CD8-Expression korrelierte dabei signifikant mit einem höheren Alter ($p=0,042$) und einer tendenziell niedrigeren Mortalität ($p=0,054$). Zudem führt ein Mehr an CD8+-Lymphozyten zu einer signifikanten Verschiebung hin zu niedrigeren ypT-Kategorien ($p=0,032$): 66,0% der Tumorproben mit einem hohen CD8-Gesamtscore (7-12) weisen niedrigere und damit prognostisch bessere ypT-Kategorien (ypT1 und 2) auf. Im Vergleich befinden sich bei den Fällen mit niedrigen CD8-Gesamtscore (3-4) nur 31,3% der Fälle in den ypT-Kategorien 1 und 2. Im Hinblick auf die Tumorklassifikation (ypUICC) war ein hoher CD8-Gesamtscore signifikant mit einem niedrigeren ypUICC-Stadium assoziiert ($p=0,047$). 51,1% der Proben mit einem hohen CD8-Gesamtscore wurden in das ypUICC-Stadium 1 eingestuft, während dies bei nur 31,3% der Proben mit einem niedrigen CD8-Score der Fall war (Tabelle 13). Eine signifikante Assoziation zwischen dem CD8-Gesamtscore und dem Regressionsgrad nach Dworak war nicht zu erkennen ($p=0.416$).

Auch die Gesamt-IDO1-Expression zeigte eine positive Assoziation mit einem höheren Alter ($p=0,008$) und einen klaren Trend zu einem niedrigeren Tumorrezidivrisiko ($p=0,078$) (Tabelle 14). Eine signifikante Assoziation zwischen IDO1-Expression und dem ypUICC-Stadium war nicht gegeben ($p=0.421$).

Des Weiteren analysierten wir die Korrelation klinisch-pathologischer Variablen mit der Expression von IDO1 und CD8 in verschiedenen Tumorlokalisationen. In den Tabellen 15 und 16 sind die signifikanten Parameter aufgelistet. Im Vergleich zum CD8-Gesamtscore fand sich dabei eine noch stärkere Assoziation der intraepithelialen CD8-Expression mit der ypT-Klassifikation ($p=0,029$). Die intraepitheliale CD8-Expression korrelierte zudem signifikant mit niedrigeren ypUICC-Stadien ($p=0,006$) und einem nodal-negativen Status ($p=0,019$). (Tabelle 15). Die stromale IDO1-Expression korrelierte positiv mit dem rezidivfreien Überleben ($p=0,05$) (Tabelle 16).

Tabelle 13. Korrelation des CD8+-Gesamtscores mit klinisch-pathologischen Parametern.

	CD8+-Gesamtscore (n=84)			p-Wert
	low (3-4)	intermediate (5-6)	high (7-12)	
Anzahl an Patienten (n,%)	16 (19,0)	21 (25,0)	47 (56,0)	
Alter (Jahre, median, (min-max))	59 (42-75)	62 (39-83)	67 (42-88)	0,042^a
Geschlecht				0,504 ^c
weiblich	3 (18,8)	8 (38,1)	15 (31,9)	
männlich	13 (81,3)	13 (61,9)	32 (68,1)	
ypUICC-Stadium (n, %)				0,047^c
1	5 (31,3)	3 (14,3)	24 (51,1)	
2	5 (31,3)	10 (47,6)	11 (23,4)	
3	6 (37,5)	8 (38,1)	12 (25,5)	
Grading (n, %)				0,651 ^c
G1/G2	14 (87,5)	18 (90,0)	43 (93,5)	
G3/G4	2 (12,5)	2 (10,0)	3 (6,5)	
fehlend	0	1	1	
Regressionsgrad (Dworak, n, %)				0,416 ^c
0	0 (0,0)	0 (00)	1 (2,4)	
1	2 (13,3)	8 (40,0)	7 (17,1)	
2	11 (73,3)	11 (55,0)	27 (65,9)	
3	2 (13,3)	1 (5,0)	6 (14,6)	
fehlend	1	1	6	
ypT (n, %)				0,032^c
1	1 (6,3)	0 (0,0)	6 (12,8)	
2	4 (25,0)	6 (28,6)	25 (53,2)	
3	10 (62,5)	14 (66,7)	15 (31,9)	
4	1 (6,3)	1 (4,8)	1 (2,8)	
ypN (n, %)				0,234 ^c
N-	10 (62,5)	15 (71,4)	39 (83,0)	
N+	6 (37,5)	6 (28,6)	8 (17,0)	
Tumorrezidiv (n, %)				0,338 ^c
nein	10 (62,5)	13 (61,9)	36 (76,6)	
ja	6 (37,5)	8 (38,1)	11 (23,4)	
Tod (n, %)				0,054 ^c
nein	10 (62,5)	17 (81,0)	42 (89,4)	
ja	6 (37,5)	4 (19,0)	5 (10,6)	

^{a)} ONEWAY-Anova, ^{b)} Chi-Quadrat-Test ^{c)} exakter Test nach Fisher

Tabelle 14. Korrelation des IDO1-Gesamtscores mit klinisch-pathologischen Parametern.

	IDO1-Gesamtscore (n=91)		
	low (0-2)	high (3-6)	p-Wert
Anzahl an Patienten (n,%)	56 (61,5)	35 (38,5)	
Alter (Jahre, median, (min-max))	61 (39-83)	68 (45-88)	0,008^a
Geschlecht			0,696 ^b
weiblich	17 (30,4)	12 (34,3)	
männlich	39 (69,6)	23 (65,7)	
ypUICC-Stadium (n, %)			0,421 ^c
1	18 (32,1)	16 (45,7)	
2	19 (33,9)	10 (28,6)	
3	19 (33,9)	9 (25,7)	
Grading (n, %)			0,705 ^c
G1/G2	49 (89,1)	31 (93,9)	
G3/G4	6 (10,9)	2 (6,1)	
fehlend	1	1	
Regressionsgrad (Dworak, n, %)			0,902 ^c
0	1 (2,0)	0 (0,0)	
1	10 (19,6)	7 (21,9)	
2	34 (66,7)	20 (62,5)	
3	6 (11,8)	5 (15,6)	
fehlend	5	3	
ypT (n, %)			0,204 ^c
1	6 (10,7)	2 (5,7)	
2	18 (32,1)	19 (54,3)	
3	30 (53,6)	13 (37,1)	
4	2 (3,6)	1 (2,9)	
ypN (n, %)			0,215 ^b
N-	40 (71,4)	29 (82,9)	
N+	16 (28,6)	6 (17,1)	
Tumorrezidiv (n, %)			0,078 ^b
nein	35 (62,5)	28 (80,0)	
ja	21 (37,5)	7 (20,0)	
Tod (n, %)			0,514 ^b
nein	45 (80,4)	30 (85,7)	
ja	11 (19,6)	5 (14,3)	

a) ONEWAY-Anova, b) Chi-Quadrat-Test c) exakter Test nach Fisher

Tabelle 15. Korrelation der intraepithelialen CD8+-Infiltration mit signifikanten klinisch-pathologischen Parametern.

	CD8 Intraepithelial (n=84)				p-Wert
	1	2	3	4	
Anzahl an Patienten (n,%)	34 (40,5)	20 (23,8)	13 (15,5)	17 (20,2)	
ypUICC (n, %)					0,006^c
1	9 (26,5)	5 (25,0)	4 (30,8)	14 (82,4)	
2	12 (35,3)	9 (45,0)	4 (30,8)	1 (5,9)	
3	13 (38,2)	6 (30,0)	5 (38,5)	2 (11,8)	
ypT (n, %)					0,029^c
1	2 (5,9)	2 (10,0)	1 (7,7)	2 (11,8)	
2	10 (29,4)	7 (35,0)	5 (38,5)	13 (76,5)	
3	20 (58,8)	11 (55,0)	6 (46,2)	2 (11,8)	
4	2 (5,9)	0 (0,0)	1 (7,7)	0 (0,0)	
ypN (n, %)					0,019^c
N-	23 (67,6)	16 (80,0)	8 (61,5)	17 (100,0)	
N+	11 (32,4)	4 (20,0)	5 (38,5)	0 (0,0)	

^{b)} Chi-Quadrat-Test ^{c)} exakter Test nach Fisher

Tabelle 16. Korrelation der stromalen IDO1-Expression mit signifikanten klinisch-pathologischen Parametern.

	IDO1 Stromal (n=91)				p-Wert
	0	1	2	3	
Anzahl an Patienten (n,%)	6 (6,6)	43 (47,3)	38 (41,8)	4 (4,4)	
Alter (Jahre, median, (min-max))	57 (43-72)	61 (39-83)	68 (42-88)	68 (55-78)	0,022^a
Tumorrezidiv (n, %)					0,050^c
nein	2 (33,3)	27 (62,8)	30 (78,9)	4 (100,0)	
ja	4 (66,7)	16 (37,2)	8 (21,1)	0 (0,0)	

^{a)} ONEWAY-Anova, ^{c)} exakter Test nach Fisher

3.5. Einfluss auf Gesamt- und Rezidivfreies Überleben

Rezidivfreies- (Disease Free Survival, DFS) und Gesamtüberleben (Overall Survival, OS) wurden mit dem CD8-Gesamtscore und dem IDO-Gesamtscore verglichen. Tabelle 17 und die Abbildungen 8-11 veranschaulichen anhand von Kaplan-Meier-Überlebenskurven das DFS und OS der Patienten in Bezug auf die Höhe der CD8- und IDO-Expression. Ausgeschlossen aus dieser Betrachtung sind alle Patienten mit einem Follow-Up von weniger als einem Jahr. Dabei zeigte sich, dass ein hoher CD8-Gesamtscore (7-12) mit einem statistisch signifikant verbesserten Gesamtüberleben einhergeht (5-Jahres-OS für CD8+ 7-12: 93,7%; für CD8+ 3-4: 59,6%, log rank $p=0,023$, Abbildung 8). In Bezug auf das Rezidivfreie Überleben zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied, tendenziell ist aber auch hier ein Vorteil in einem hohen CD8+-Gesamtscore zu sehen (Abbildung 9).

Ein hoher IDO-Gesamtscore (3-6) korrelierte signifikant mit einem verlängerten Rezidivfreien Überleben (5-Jahres-DFS für IDO1 high: 73,4% und für IDO1 low: 53,1%, log rank $p=0,033$, Abbildung 11). Dagegen gibt es im Gesamtüberleben keinen signifikanten Unterschied zwischen IDO1-high- und IDO1-low-Fällen (Abbildung 10).

Tabelle 17. 2- und 5-Jahres-Überlebensraten.

	Fälle / Rezidive / Tod	2-Jahres OS	5-Jahres OS	2-Jahres DFS	5-Jahres DFS
CD8+ Gesamt					
3-4	15 / 6 / 5	100%	59,6%	66,7%	59,3%
5-6	20 / 8 / 4	95,0%	76,0%	80,0%	40,3 %
7-12	42 / 11 / 2	97,6%	93,7%	83,0%	70,7%
Total	77 / 25 / 11				
IDO1 Gesamt					
low	51 / 21 / 8	96,0%	79,5%	70,6%	53,1%
high	33 / 7 / 4	96,8%	85,3%	90,6%	73,4%
Total	84 / 28 / 12				

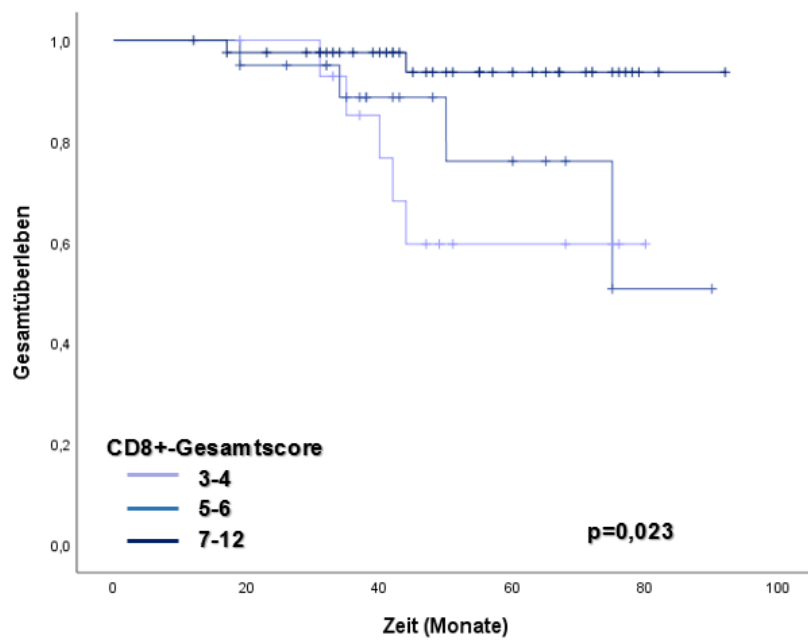


Abbildung 8. Gesamtüberleben in Bezug auf die Höhe des CD8+-Gesamtscores. Mittels Kaplan-Meier-Kurve lässt sich zeigen, dass das Gesamtüberleben der Patienten mit hohem CD8+-Gesamtscore (7-12) signifikant verbessert ist ($p=0,023$).

Numbers at risk:

Zeit (Monate)	0	20	40	60	80
CD8 low (3-4)	15	14	9	4	0
CD8 intermediate (5-6)	20	18	10	5	1
CD8 high (7-12)	42	39	29	14	2

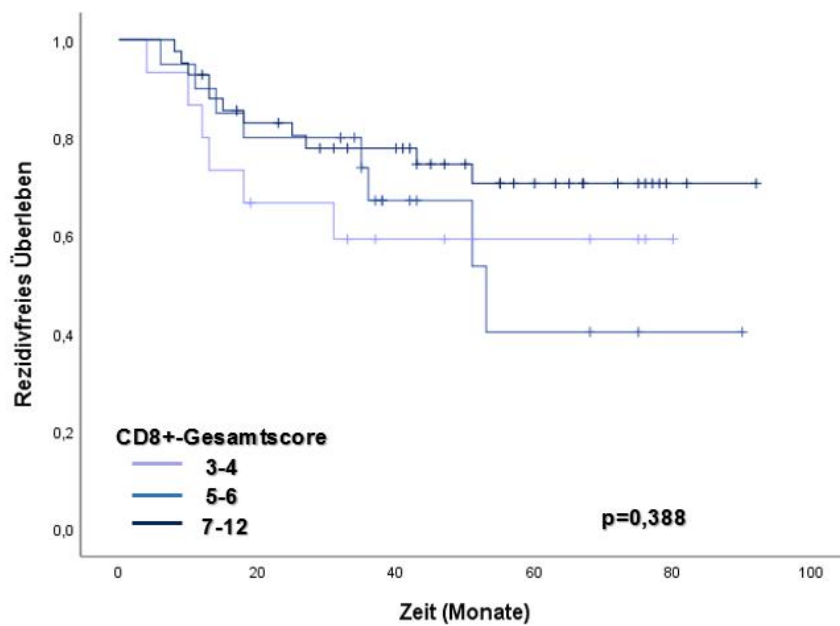


Abbildung 9. Rezidivfreies Überleben in Bezug auf die Höhe des CD8+-Gesamtscores. Für Patienten mit hohem CD8+-Gesamtscore zeigt die Kaplan-Meier-Kurve ein besseres Rezidivfreies Überleben, wenn auch nicht signifikant ($p=0,388$).

Numbers at risk:

Zeit (Monate)	0	20	40	60	80
CD8 low (3-4)	15	9	6	4	0
CD8 intermediate (5-6)	20	16	7	3	1
CD8 high (7-12)	42	33	26	13	2

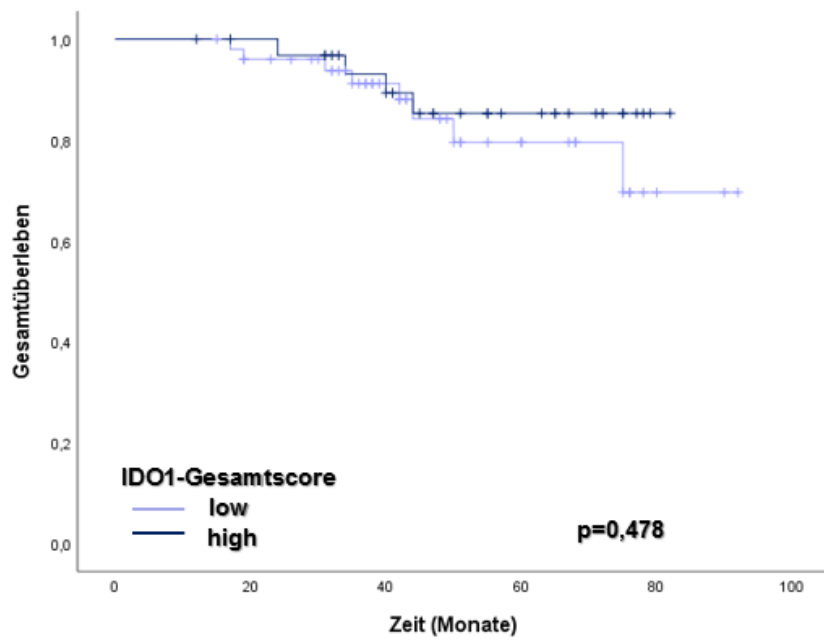


Abbildung 10. Gesamtüberleben in Bezug auf die Höhe des IDO1-Gesamtscores. Die Kaplan-Meier-Kurve gibt für Patienten mit hohem IDO1-Gesamtscore (IDO high) ein lediglich minimal verbessertes Gesamtüberleben auf längere Sicht an ($p=0,478$).

Numbers at risk:

Zeit (Monate)	0	20	40	60	80
IDO1 low (0-2)	51	46	29	11	2
IDO1 high (3-6)	33	31	23	13	1

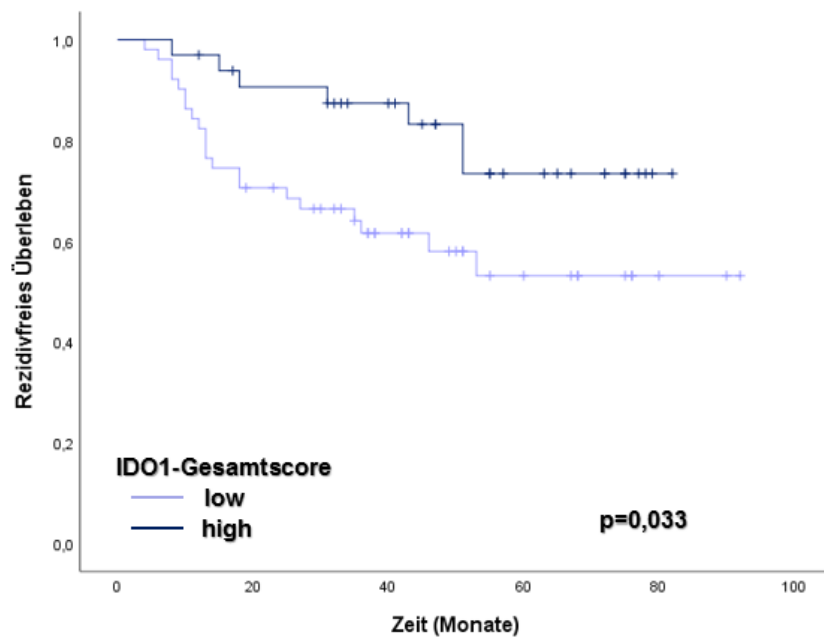


Abbildung 11. Rezidivfreies Überleben in Bezug auf die Höhe des IDO1-Gesamtscores. Patienten mit hohem IDO1-Gesamtscore (IDO high) zeigen in der Kaplan-Meier-Kurve ein signifikant besseres Rezidivfreies Überleben ($p=0,033$).

Numbers at risk:

Zeit (Monate)	0	20	40	60	80
IDO1 low (0-2)	51	35	21	9	2
IDO1 high (3-6)	33	28	22	11	1

3.6. Prognostischer Einfluss

Wir untersuchten die prognostische Signifikanz des CD8- und des IDO1-Gesamtscores sowie verschiedener klinisch-pathologischer Variablen mittels Cox-Proportional-Hazard-Modellen. Der CD8-Gesamtscore (HR 0,137, 95%CI 0,027-0,708, $p=0,018$) und das ypN-Stadium (HR 3,331, 95%CI 1,007-11,019, $p=0,049$) bildeten sich als prognostische Faktoren für das Gesamtüberleben in der univariaten Analyse heraus. Auch bei der Analyse in einem multivariaten Modell, das für diese beiden Variablen angepasst wurde, blieb der CD8-Gesamtscore ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben (HR 0,158, 95%CI 0,030-0,830, $p=0,029$) (Tabelle 18).

Der IDO-Gesamtscore (HR 0,335, 95%CI 0,133-0,843, $p=0,020$), das ypN-Stadium (HR 2,663, 95%CI 1,188-5,970, $p=0,017$) und die ypT-Kategorie (HR 2,344, 95%CI 1,009-5,446, $p=0,048$) stellten sich als prognostische Faktoren für das rezidivfreie Überleben in einer univariaten Analyse heraus. Auch hier blieb der IDO-Gesamtscore in einer multivariaten Analyse, angepasst für IDO1-Gesamtscore, ypN- und ypT-Kategorie, eine signifikante, unabhängige prognostische Variable ($p=0,046$) (Tabelle 19).

Tabelle 18. Uni- und multivariate Analyse für das Gesamtüberleben.

	Univariate Analyse			Multivariate Analyse ¹		
	HR	95% CI	p-Wert	HR	95% CI	p-Wert
CD8 Gesamt						
low (3-4)	1			1		
inter. (5-6)	0,691	0,185-2,580	0,583	0,689	0,187-2,611	0,594
high (7-12)	0,137	0,027-0,708	0,018	0,158	0,030-0,830	0,029
IDO1 Gesamt						
low (0-2)	1		0,202			
high (3-6)	0,420	0,111-1,591				
ypN						
N-	1		0,049	1		0,125
N+	3,331	1,007-11,019		2,584	0,769-8,679	
ypT						
low (1/2)	1		0,051			
high (3/4)	4,608	0,991-21,434				
Alter						
< 65 J	1		0,770			
> 65 J	0,837	0,254-2,755				

¹Multivariate Analyse mit den Variablen CD8-Gesamtscore und ypN.

Tabelle 19. Uni- und multivariate Analyse für das Rezidivfreie Überleben.

	Univariate Analyse			Multivariate Analyse ¹		
	HR	95% CI	p-Wert	HR	95% CI	p-Wert
CD8						
Gesamt						
low (3-4)	1					
inter. (5-6)	0,928	0,321-2,680	0,890			
high (7-12)	0,556	0,205-1,506	0,249			
IDO1						
Gesamt						
low (0-2)	1		0,020	1		0,046
high (3-6)	0,335	0,133-0,843		0,384	0,150-0,983	
ypN						
N-	1		0,017	1		0,095
N+	2,663	1,188-5,970		2,089	0,880-4,961	
ypT						
low (1/2)	1		0,048	1		0,299
high (3/4)	2,344	1,009-5,446		1,618	0,652-4,017	
Alter						
< 65 J	1		0,122			
> 65 J	0,524	0,231-1,188				

¹Multivariate Analyse mit den Variablen IDO1-Gesamtscore, ypN und ypT.

3.7. Fälle mit vollständiger Tumorregression (ypT0)

Wir führten immunhistochemische Analysen für die Auswertung der CD8+-Infiltration an Patienten mit einer vollständigen Tumorregression (ypT0) durch (initial 15 Fällen, ein Fall wurde aufgrund schlechter Färbequalität ausgeschlossen; so dass sich am Ende 14 ypT0-Fälle ergaben).

Allerdings gibt es in diesen Proben keine residuale invasive Tumorfront, die ein wesentlicher Parameter für die Berechnung des Gesamtscores für die IDO1- und CD8-Expression ist. Aus diesem Grund haben wir Tumorproben mit einer vollständigen Regression nach neoadjuvanter Radiochemotherapie aus unseren statistischen Berechnungen, wie sie in den vorangegangenen Kapiteln präsentiert wurden, ausgeschlossen. Lediglich in der Subgruppe „stromale CD8+-Expression im Tumorzentrum“ sind die ypT0-Fälle miteinbezogen (Tabelle 20).

Unter der Annahme, dass jene Fälle mit der höchsten Tumorregression (ypT0) auch die höchste Immunzelldichte aufweisen, zeigen unsere Ergebnisse (Tabelle 20) interessanterweise keine signifikante Assoziation von stromalen CD8+-T-Zellzahlen im Tumorzentrum mit irgendeinem klinisch-pathologischen Parameter (im Vergleich zur intraepithelialen CD8-Expression an der invasiven Tumorfront, s. Kapitel 3.4, Tabelle 15). Wir haben auch keinen prognostischen Einfluss bei der Einbeziehung von ypT0-Fällen festgestellt.

Tabelle 20. Korrelation der stromalen CD8+-Infiltration im Tumorzentrum mit ausgewählten klinisch-pathologischen Parametern (ypT0-Fälle miteinbezogen).

	CD8 Stroma Zentrum (n=98)				p-Wert
	1	2	3	4	
Anzahl an Patienten (n, %)	24 (24,5)	32 (32,7)	24 (24,5)	18 (18,4)	
ypUICC-Stadium (n, %)					0,412 ^c
0	6 (25,0)	2 (6,3)	2 (8,3)	3 (16,7)	
1	6 (25,0)	8 (25,0)	12 (50,0)	6 (33,3)	
2	5 (20,8)	11 (34,4)	5 (20,8)	5 (27,8)	
3	7 (29,2)	11 (34,4)	5 (20,8)	4 (22,2)	
Grading (n, %)					0,792 ^c
G1/G2	21 (87,5)	27 (90,0)	22 (95,7)	17 (94,4)	
G3/G4	3 (12,5)	3 (10,0)	1 (4,3)	1 (5,6)	
fehlend	0	2	1	0	
Regressionsgrad (Dworak, n, %)					0,339 ^c
0	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (4,5)	0 (0,0)	
1	2 (9,1)	10 (33,3)	3 (13,6)	2 (13,3)	
2	12 (54,5)	16 (53,3)	11 (50,0)	10 (66,7)	
3	2 (9,1)	2 (6,7)	4 (18,2)	1 (6,7)	
4	6 (27,3)	2(6,7)	3 (13,6)	2 (13,3)	
fehlend	2	2	2	3	
ypT (n, %)					0,085 ^c
0	6 (25,0)	2 (6,3)	3 (12,5)	3 (16,7)	
1	1 (4,2)	0 (0,0)	4 (16,7)	2 (11,1)	
2	5 (20,8)	15 (46,9)	11 (45,8)	4 (22,2)	
3	11 (45,8)	14 (43,8)	6 (25,0)	8 (44,4)	
4	1 (4,2)	1 (3,1)	0 (0,0)	1 (5,6)	
ypN (n, %)					0,192 ^c
N-	18 (75,0)	22 (68,8)	22 (91,7)	15 (83,3)	
N+	6 (25,0)	10 (31,3)	2 (8,3)	3 (16,7)	
Tumorrezidiv (n, %)					0,115 ^b
nein	16 (66,7)	19 (59,4)	21 (87,5)	14 (77,8)	
ja	8 (33,3)	13 (40,6)	3 (12,5)	4 (22,2)	
Tod (n, %)					0,158 ^c
nein	16 (66,7)	27 (84,4)	22 (91,7)	14 (77,8)	
ja	8 (33,3)	5 (15,6)	2 (8,3)	4 (22,2)	

^{b)} Chi-Quadrat-Test ^{c)} exakter Test nach Fisher

4. Diskussion

4.1. Einfluss auf die lokale Immunantwort

Standardisierte Behandlungsalgorithmen für Patienten, die an einem kolorektalen Karzinom erkrankt sind, sind umfassend durch nationale und internationale Richtlinien vorgegeben (94). Der therapeutische Ansatz für Patienten mit Karzinomen des mittleren und unteren Rektums basiert auf klinischen Klassifikationssystemen (cTNM) und auf der histopathologischen Einteilung des AJCC/UICC-TNM-Systems. Obwohl das pathologische Tumorklassifizierungssystem ((y)pUICC Stadium I-IV) wichtige Informationen über die Prognose des Patienten liefert, so erfasst es weder die Komplexität der Tumorbiologie noch die individuelle Tumorummunologie. Mittlerweile gibt es eindeutige Hinweise, dass Dichte, Phänotyp und Lokalisation von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) in primären kolorektalen Karzinomen eine genaue Vorhersage des klinischen Outcomes liefern (22, 95). Die Quantifizierung der Dichte, Lokalisation und Art der TILs, "Immunoscore" genannt, erwies sich sogar als dem als Goldstandard geltendem TNM-System überlegen bei der Vorhersage des krankheitsfreien- und Gesamtüberlebens (29, 32, 33).

Darüber hinaus kann die Genauigkeit des "Immunoscore" verbessert werden, indem die Lokalisierung von TILs in zwei Bereiche innerhalb des Primärtumors bestimmt wird: dem Tumorzentrum und der Invasionsfront (95). Die Regulation der Lymphozyteninfiltration innerhalb des Tumors bzw. dessen Stromas bleibt jedoch komplex (96). IDO1, ein Tryptophan-abbauendes Enzym, scheint einen tiefgreifenden Einfluss auf die lokale adaptive Immunantwort zu haben. Es zeigte sich, dass IDO1 entweder durch Tumor- oder Stromazellen exprimiert wird (hauptsächlich Antigen-präsentierende Zellen) (36, 97). Eine lokale Tryptophan-Depletion und/oder Akkumulation von Metaboliten interferiert mit T-Zell-Funktion, -Proliferation und -Differenzierung. Dies deutet darauf hin, dass IDO1 eine immunsuppressive Umgebung orchestriert, vermutlich durch die Kontrolle lokaler T-Zellfunktionen (98).

4.2. IDO und CD8+-Lymphozyten als prognostische Marker

In dieser Studie untersuchten wir die Dichte und Lokalisation tumorinfiltrierender CD8+-T-Lymphozyten sowie die IDO1-Expression in chirurgisch resezierten Tumoren von Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom (locally advanced rectal cancer, LARC) nach neoadjuvanter Radiochemotherapie. Frühere Studien, die sich auf das lokale Immunprofil von Patienten mit kolorektalem Karzinom konzentrierten, schlossen Patienten mit Rektumkarzinom nach neoadjuvanter Radiochemotherapie aus (24, 95, 99).

Bedenken über unvorhersehbare oder sogar reduzierende Effekte auf die T-Zell-Infiltration oder profunde histologische Veränderungen in der Architektur des Primärtumors wurden als Hauptgegenargumente für die Analyse von vorbehandelten Tumorproben angeführt. Letzteres könnte für Methoden gelten, die quantitative automatisierte immunhistochemische Scores verwenden (33), die die geänderte histopathologische Architektur nach Neoadjuvanz nicht erfassen können. In dieser Studie wurde jedoch eine semiquantitative Analyse von Tumorschnitten erhoben. Alle Proben wurden zweimal von zwei unabhängigen Beobachtern bewertet, um eine schlüssige Beurteilung der CD8- und IDO1-Quantifizierung zu erhalten und intra- und inter-Beobachter-Variabilitäten auszuschließen. Unter Verwendung eines immunhistochemischen Ansatzes und unter Anwendung etablierter Quantifizierungsmethoden für CD8+-Lymphozyten sowie IDO1-Expression wurde eine positive Korrelation der CD8+-Lymphozytenzahlen und des Ausmaßes der IDO1-Expression in LARC festgestellt. Sowohl die CD8+-Lymphozytenzahl als auch die IDO1-Expression korrelierten mit einem besseren Gesamtüberleben bzw. rezidivfreien Überleben des Patienten und erwiesen sich als unabhängige prognostische Marker in der multivariaten Analyse. Insgesamt identifizierten wir 15 von 106 Patienten mit einer vollständigen histologischen Tumorantwort (ypT0) und schlossen diese von unseren weiteren statistischen Betrachtungen aus. Von den übrigen untersuchten Proben zeigten alle eine Infiltration mit CD8-positiven-T-Lymphozyten; 56% davon sogar mit einer sehr hohen Anzahl an CD8+-Zellen (CD8-Gesamtscore 7-12). Es wurde lange angenommen, dass der durch die

Chemotherapie induzierte Zelltod zur Apoptose führt. Folglich sollte die Standardantwort eher eine immunologische Toleranz als eine Immunaktivierung sein. Kürzlich wurde jedoch gezeigt, dass ein Chemotherapie-assoziiertes Zelltod, abhängig vom jeweiligen Chemotherapeutikum, sogar eine anhaltende Tumorantigen-spezifische Immunantwort induzieren kann (100, 101). Interessanterweise können diese Befunde teilweise auch auf den durch Strahlentherapie induzierten Zelltod ausgeweitet werden. So zeigt sich, dass Strahlung die lokale Immunantwort entweder durch Hochregulierung von stimulatorischen Molekülen auf der Tumorzelloberfläche oder durch Formung des lokalen Immunzelleninfiltrats beeinflusst (102). Zusammenfassend scheinen Chemo- und/oder Radiotherapie einen immunogenen Prozess an Tumorzelltod zu fördern, der zu lokalen und/oder systemischen anti-Tumor-Immunantworten führen kann.

In diesem Zusammenhang stellen unsere Ergebnisse eine klinisch relevante Erkenntnis dar: Tumorproben mit einer ausgedehnten Infiltration von CD8-positiven Lymphozyten nach neoadjuvanter Radiochemotherapie wurden häufiger hinsichtlich Tumorgöße (ypT1 oder ypT2) und Lymphknotenstatus (ypN-) in niedrigere Tumorkategorien eingeteilt. Darüber hinaus führte eine intensive CD8-Lymphozyten-Infiltration zu einer signifikanten Verschiebung in Richtung der unteren ypUICC-Stadien, einem bekannten prognostischen Parameter für ein verlängertes Gesamtüberleben. In diesem Zusammenhang hatten Patienten mit hohem CD8-Gesamtscore eine signifikant verlängerte 5-Jahres-Überlebensrate; wie auch bereits in vorigen Studien beschrieben (23, 103).

Wir beobachteten eine prognostische Diskrepanz in Bezug auf verschiedene Lokalisationen innerhalb des Tumors mit einer besseren Prognose für intraepithelial gelegene T-Zellen im Vergleich zu jenen im Tumorstroma. Die biologische Erklärung, warum intraepitheliale CD8-T-Zellen einen größeren Einfluss auf die Prognose haben als die im Tumorstroma lokalisierten, ist wahrscheinlich auf ihre direkte antitumorale Wirkung zurückzuführen. Die CD8-T-Zellen, die das Tumorepithel in unmittelbarer Nähe infiltrieren, sind

höchstwahrscheinlich spezifisch gegen den Tumor gerichtet und könnten daher als wirksamer angesehen werden. Die Hypothese, dass die Sublokalisierung infiltrierender Lymphozyten prognostische Bedeutung hat, hat sich aus früheren Studien verstärkt (95, 99). Eine intraepitheliale Lokalisation von zytotoxischen T-Zellen könnte in dieser Hinsicht möglicherweise einen wirksameren Schutz bedeuten.

4.3. Wirkung von CD8+ auf die IDO-Expression

Eine immunregulatorische Funktion von IDO1 wurde erstmals in einem Schwangerschafts-Mausmodell beschrieben (47). Die Behandlung von trächtigen Mäusen mit einem IDO1-Inhibitor (1-D,L-Methyl-Tryptophan) führte zu einer T-Zell-vermittelten Abstoßung von semiallogenen Embryonen (47). In den folgenden Jahren wurde das Konzept der IDO1-vermittelten Immunregulation auf maligne Erkrankungen ausgedehnt (45). In den letzten Jahren wurde eine IDO1-Expression bei verschiedenen Karzinomen teilweise mit einer aggressiveren Erkrankung und schlechteren Prognose assoziiert (104). Dennoch bleibt die Datenlage spärlich und in Bezug auf das kolorektale Karzinom heterogen. Widersprüchlichkeiten treten auf, wenn Studien hinsichtlich der Expressionsprofile von IDO1 (konstitutiv vs. durch entzündliche Stimuli induzierbar), der Natur von IDO1-exprimierenden Zellen (Tumorzellen vs. Antigen-präsentierende Zellen), der Dichte der IDO1-Expression und ihrer Lokalisierung in verschiedene Tumorkompartimenten (Tumorzentrum vs. invasive Tumorfront) verglichen werden. Darüber hinaus wird der prognostische Wert der IDO-Expression oder ihre Auswirkung auf Rezidivfreies- und Gesamtüberleben nicht einheitlich bewertet (93, 105, 106). Mögliche Störfaktoren für diese abweichenden Ergebnisse wurden ausführlich untersucht (35, 36, 46, 97, 107, 108).

Unter Verwendung einer definierten Studienpopulation zeigten mehr als 90% der vorbehandelten Rektumkarzinomproben eine positive Färbung für IDO1. Interessanterweise zeigten Tumoren mit einem hohen IDO1-Gesamtscore auch einen hohen CD8-Gesamtscore, ein Ergebnis, das sich von früheren

Beobachtungen bei Patienten mit kolorektalem Karzinom weit unterscheidet (93, 105). Wir nehmen an, dass diese Befunde eher einen Zustand der Immunaktivierung als den einer Immuntoleranz widerspiegeln, im Sinne eines lokalen Entzündungsmilieus nach neoadjuvanter Radiochemotherapie. In Tiermodellen wurde gezeigt, dass IDO1 in Tumoren als Reaktion auf eine lokale Strahlentherapie hochreguliert ist. Interessanterweise führte die pharmakologische Blockade der IDO1-Aktivität nicht zu einem verringerten Tumorwachstum oder zu verstärkten lokalen anti-Tumor-Immunantworten (109). Ein Teil der IDO1-Expression durch neoplastische Zellen oder Stromazellen könnte aus einer andauernden Immunantwort resultieren, an der CD8+-Lymphozyten beteiligt sind, die IFN- γ , den Hauptinduktor der IDO1-Expression, produzieren (110). Daten aus einem Maus-Melanommodell zeigen deutlich, dass die IDO1-Expression streng von der Anwesenheit von intratumoralen CD8+-Lymphozyten abhängt, die IFN- γ produzieren (111). Darüber hinaus gehört IDO1 zusammen mit anderen T-Zell-spezifischen und IFN- γ -induzierten Genen zu einer Gruppe von Genen, deren Expression in Tumoren vor Immuntherapie auf ein besseres klinisches Ansprechen schließen lässt (112). In dieser Studie, die mit unseren Ergebnissen vergleichbar ist, ist der entscheidende Prognosefaktor höchstwahrscheinlich das Vorhandensein tumorinfiltrierender CD8+-Lymphozyten. IDO1 wird sekundär als Reaktion auf von diesen Lymphozyten produziertes IFN- γ induziert.

Wir sind uns der Tatsache bewusst, dass immunhistochemische Studien keine funktionellen Rückschlüsse auf das lokale Zusammenspiel von IDO1-Expression und Lymphozyteninfiltration erlauben. Unsere Ergebnisse unterstützen jedoch eindeutig einen prognostischen Wert sowohl der IDO1-Expression als auch der CD8-Infiltration. Der IDO1-Gesamtscore erwies sich als unabhängiger prognostischer Marker für das Rezidivfreie Überleben, während der CD8-Gesamtscore eine prognostische Relevanz hinsichtlich des Gesamtüberlebens aufwies.

4.4. Immunoprofile als medikamentöse Therapieansätze

Die multimodale Behandlung von lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinomen hat die Lokalrezidivrate drastisch reduziert, aber ein verbessertes Gesamtüberleben nicht erreicht (16). Das individuelle Ansprechen der Rektumkarzinome auf eine neoadjuvante Therapie kann höchst unterschiedlich sein und auch die Empfehlung über eine adjuvante Therapie zur Reduktion des Risikos einer Fernmetastasierung bleibt bei weiterhin heterogener Datenlage ohne klare Leitlinien (113). Die Anwendung sowohl etablierter histologischer Kriterien (ypTNM-Klassifikation) als auch definierter Immunophänotypen könnte dazu beitragen, adjuvante Therapieansätze langfristig an unterschiedlichen Immunprofilen zu orientieren.

Sørensen und Kollegen haben gezeigt, dass IDO1 beim Menschen von bestimmten CD8-T-Zellen spontan erkannt wird (114). Tatsächlich scheinen diese Zellen als spezifische zytotoxische T-Lymphozyten zu wirken, die IDO1-exprimierende Tumorzellen erkennen und abtöten können (115). Diese Beobachtungen haben zu Bemühungen geführt, IDO1-Peptide als Antikrebsimpfstoffe zu untersuchen, wie in einer kürzlich durchgeführten klinischen Studie gezeigt wurde, die frühe Hinweise auf eine langfristige Stabilisierung der Erkrankung bei Patienten mit metastasiertem Lungenkrebs lieferte (90, 91). LARC-Patienten mit einem starken IDO1-Expressionsprofil nach neoadjuvanter Radiochemotherapie könnten von einem additiven IDO1-zielgerichteten immuntherapeutischen Ansatz, wie der Impfung mit IDO1-abgeleiteten Peptiden, profitieren. Der Abbau der lokalen immunsuppressiven Umgebung, d.h. Hemmung der IDO1-Aktivität, könnte bei diesen Patienten sogar zu erhöhten Antigen-spezifischen Immunantworten führen.

IDO1-Inhibitoren zeigten in präklinischen Studien enttäuschende Ergebnisse, wenn sie als Monotherapie eingesetzt wurden (116). Bei Verwendung in kombinatorischen immuntherapeutischen oder chemotherapeutischen Regimen scheinen IDO1-Inhibitoren jedoch als immunometabolische Adjuvantien zu wirken (117).

Überraschenderweise zeigten die jüngsten Ergebnisse der ECHO-301-Studie (die erste große Phase-3-Studie), dass Epacadostat, ein IDO1-selektiver

Enzyminhibitor, das krankheitsfreie Überleben zusätzlich zur Anti-PD1-Immune-Checkpoint-Inhibitor-Therapie bei metastasierten Melanompatienten nicht verbessern konnte (86). Aufgrund der negativen Ergebnisse der ECHO-301-Studie bei Melanompatienten sowie in der Pankreaskarzinomkohorte der ECHO-203-Studie wurden mehrere Studien mit dem IDO-Inhibitor Epacadostat gestoppt. Weitere Studien mit verschiedenen anderen IDO-Inhibitoren wurden angehalten oder eingestellt (87). Obwohl die Forscher Gründe für die enttäuschenden Ergebnisse der Studien vorgebracht haben, erscheint die Rolle von IDO1 als Schlüsselakteur in der Immunevasion von Tumoren im Immunsystem weiterhin nicht geklärt. Eine generell immunmodulierende Rolle von IDO1 bei Krebserkrankungen bleibt durch drei wichtige Tatsachen in Frage gestellt: 1. Die IDO1-Expression kann bei Krebspatienten mit einem günstigen Outcome einhergehen, wie an unserer Patientenkohorte zu sehen ist. 2. IDO-Knock-out-Mäuse zeigen keine offensichtlichen Anzeichen von Autoimmunität (108) und 3. durch das Versagen eines selektiven IDO1-Blockers in einer Phase-3-Studie. Es wird deutlich, dass die IDO1-Biologie bis heute noch immer nicht vollständig verstanden ist.

Auf lange Sicht müssen wir unser Verständnis über die funktionelle Rolle von IDO1 in der Tumor-Mikroumgebung von Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom nach neoadjuvanter Radiochemotherapie weiter verbessern. Hoffentlich können wir dann auch endgültig die Frage beantworten, ob IDO1 ein Freund oder Feind von tumorinfiltrierenden CD8+-Lymphozyten ist und seine genaue Rolle im komplexen Orchester der tumorbedingten Immunevasion bei diesen Patienten definieren.

5. Zusammenfassung

Jährlich erkranken mehr als 60.000 Menschen in Deutschland an Darmkrebs, ein Drittel der Tumoren ist im Rektum lokalisiert. Bei kolorektalen Karzinomen ist das vom American Joint Committee on Cancer bzw. der Union Internationale Contre le Cancer (AJCC/UICC-TNM) eingeführte TNM-System der internationale Standard für die pathologische Tumorklassifikation. Diese Klassifikation liefert jedoch nur eine begrenzte prognostische Information und sagt den Nutzen bestimmter Therapien nicht genau voraus (20). Mit Ausnahme der Mikrosatelliteninstabilität lieferten neuere molekulare Analysen von Rektumkarzinomen keine neuen genetischen Marker (118). Im Gegensatz dazu ist die lokale adaptive Immunreaktion ein zuverlässiger und relevanter Parameter zur Vorhersage von Rezidivrisiko und Überleben. Die Art, Dichte und Lokalisation infiltrierender Lymphozyten beeinflusst die Entwicklung von menschlichen kolorektalen Karzinomen (95). Basierend auf diesen Ergebnissen, wurde ein sogenannter „Immunoscore“ etabliert, der genauere Vorhersagen zum Outcome für Patienten mit kolorektalem Karzinom liefern kann als das TNM-System (23). Doch die Ergebnisse sind keinesfalls eindeutig. Der Einfluss tumorinfiltrierender Immunzellen bleibt weiterhin komplex und vielschichtig. Auch eine neoadjuvante Strahlentherapie und/oder Chemotherapie kann diese Immunantwort möglicherweise beeinflussen. In dieser Studie untersuchten wir daher die prognostische Rolle von Indoleamine-2,3-Dioxygenase (IDO1), einem immunmodulierenden Enzym, und infiltrierenden zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8+) in lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinomen des unteren und mittleren Drittels nach neoadjuvanter Behandlung, um weitere Erkenntnisse über den prognostischen Wert hinsichtlich Überlebensraten und in Bezug auf klinisch-pathologische Parameter zu gewinnen.

Evaluiert wurde die Expression von IDO1 und CD8 durch immunhistochemische Färbungen in 106 Tumorgewebeproben von Patienten nach neoadjuvanter Radiochemotherapie und radikaler Tumorresektion. Dabei wurde die durchschnittliche Infiltration von IDO1+- und CD8+-Zellen entlang der Tumorinvasionsfront sowie im Stroma des Tumorzentrums und innerhalb der

neoplastischen Zellen betrachtet und als Gesamtscore berechnet. Von den Tumorproben, die für die Immunhistochemie auswertbar waren, zeigten 100% eine CD8+-Lymphozyteninfiltration und 93,4% eine positive Färbung für IDO1. Der IDO1-Gesamtscore korrelierte positiv mit dem CD8+-Gesamtscore für alle drei Lokalisationen ($p=0,002$, Kendall-tau-b 0,357). Ein Mehr an CD8+-Lymphozyten führte zu einer signifikanten Verschiebung hin zu einem besseren Gesamtüberleben (Kaplan-Meier-Kurve, $p=0,023$), niedrigeren ypT-Kategorien ($p=0,032$) und niedrigeren ypUICC-Stadien ($p=0,047$).

Ein hoher IDO1-Gesamtscore stellte sich als unabhängiger prognostischer Marker für ein verbessertes Rezidivfreies Überleben dar (HR 0,38, $p=0,046$) und ein hoher CD8-Gesamtscore für das Gesamtüberleben (HR 0,16, $p=0,029$).

Anders als andere Arbeiten zuvor, die aber vornehmlich im Tier- und an in-vitro-stimulierten Modellen durchgeführt wurden, zeigten sich bei uns Vorteile im Überleben durch einen hohen IDO-Anteil. Wir sind uns der Tatsache bewusst, dass immunhistochemische Studien keine funktionellen Rückschlüsse auf das lokale Wirken von IDO1-Expression und Lymphozyteninfiltration erlauben, sondern lediglich eine Momentaufnahme im komplexen Zusammenspiel der Tumormikroumgebung sind. Dennoch konnten wir mit dieser Arbeit eindeutig zeigen, dass die Analyse des lokalen Immunphänotyps ein hilfreiches Instrument sein kann, um Prognosen und vor allem adjuvante Therapieansätze für Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom nach neoadjuvanter Radiochemotherapie besser abschätzen und langfristig an unterschiedlichen Immunprofilen orientieren zu können.

6. Literaturverzeichnis

1. Schollbach J, Kircher S, Wiegering A, Seyfried F, Klein I, Rosenwald A, et al. Prognostic value of tumour-infiltrating CD8+ lymphocytes in rectal cancer after neoadjuvant chemoradiation: is indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO1) a friend or foe? *Cancer immunology, immunotherapy* : CII. 2019.
2. Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RGS, Barzi A, et al. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(3):177-93.
3. Krebs in Deutschland für 2013/2014. 11. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin. Krebs in Deutschland für 2013/2014. 11. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland eV (Hrsg) Berlin, 2017.
4. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Kurzversion 2.0, 2017, AWMF , Registrierungsnummer: 021/007OL hwl-odlk-kaa.
5. Wittekind C MHAW-V, Weinheim 2010. TNM Klassifikation maligner Tumoren.
6. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. *New England Journal of Medicine*. 1988;319(9):525-32.
7. G. H. Innere Medizin. 2019.
8. onkopedia.de. Leitlinien Rektumkarzinom. 2018.
9. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1,2019, AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL. 2019.
10. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology*. 2010;17(6):1471-4.
11. <http://www.mysurgery.de/viszeralchirurgie/unterer-gi-trakt/rektum-ca/mdIWAf>. mysurgery.de (Internet). Würzburg 2015. Available from <http://www.mysurgery.de/viszeralchirurgie/unterer-gi-trakt/rektum-ca/> 2015 [
12. Heald RJ, Ryall RD. Recurrence and survival after total mesorectal excision for rectal cancer. *Lancet (London, England)*. 1986;1(8496):1479-82.
13. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rodel C, Wittekind C, Fietkau R, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2004;351(17):1731-40.
14. Kapiteijn E, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Putter H, Steup WH, Wiggers T, et al. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2001;345(9):638-46.
15. Bosset JF, Collette L, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radosevic-Jelic L, et al. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2006;355(11):1114-23.
16. Sauer R, Liersch T, Merkel S, Fietkau R, Hohenberger W, Hess C, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: results of the German CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after

a median follow-up of 11 years. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(16):1926-33.

17. van Gijn W, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Kranenbarg EM, Putter H, Wiggers T, et al. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12-year follow-up of the multicentre, randomised controlled TME trial. *Lancet Oncol*. 2011;12(6):575-82.

18. Bosset JF, Calais G, Mineur L, Maingon P, Stojanovic-Rundic S, Bensadoun RJ, et al. Fluorouracil-based adjuvant chemotherapy after preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer: long-term results of the EORTC 22921 randomised study. *The Lancet Oncology*. 2014;15(2):184-90.

19. Sainato A, Cernusco Luna Nunzia V, Valentini V, De Paoli A, Maurizi ER, Lupattelli M, et al. No benefit of adjuvant Fluorouracil Leucovorin chemotherapy after neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced cancer of the rectum (LARC): Long term results of a randomized trial (I-CNR-RT). *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2014;113(2):223-9.

20. Nagtegaal ID, Quirke P, Schmoll HJ. Has the new TNM classification for colorectal cancer improved care? *Nature reviews Clinical oncology*. 2011;9(2):119-23.

21. Mlecnik B, Bindea G, Pages F, Galon J. Tumor immunosurveillance in human cancers. *Cancer metastasis reviews*. 2011;30(1):5-12.

22. Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2005;353(25):2654-66.

23. Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(6):610-8.

24. Ling A, Edin S, Wikberg ML, Oberg A, Palmqvist R. The intratumoural subsite and relation of CD8(+) and FOXP3(+) T lymphocytes in colorectal cancer provide important prognostic clues. *British journal of cancer*. 2014;110(10):2551-9.

25. Dahlin AM, Henriksson ML, Van Guelpen B, Stenling R, Oberg A, Rutegard J, et al. Colorectal cancer prognosis depends on T-cell infiltration and molecular characteristics of the tumor. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2011;24(5):671-82.

26. al. Te. Implications of the tumor immune microenvironment for staging and therapeutics. *Modern Pathology*. 2018;31(2):214-34.

27. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(4):298-306.

28. Halama N, Michel S, Kloor M, Zoernig I, Benner A, Spille A, et al. Localization and density of immune cells in the invasive margin of human colorectal cancer liver metastases are prognostic for response to chemotherapy. *Cancer research*. 2011;71(17):5670-7.

29. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, et al. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *The Journal of pathology*. 2014;232(2):199-209.

30. Galon J, Mlecnik B, Marliot F, Ou F-S, Bifulco CB, Lugli A, et al. Validation of the Immunoscore (IM) as a prognostic marker in stage I/II/III colon cancer: Results of a worldwide consortium-based analysis of 1,336 patients. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(15_suppl):3500-.
31. Pages F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou FS, Bifulco C, et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet (London, England)*. 2018;391(10135):2128-39.
32. Galon J, Pages F, Marincola FM, Angell HK, Thurin M, Lugli A, et al. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *Journal of translational medicine*. 2012;10:205.
33. Galon J, Pages F, Marincola FM, Thurin M, Trinchieri G, Fox BA, et al. The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. *Journal of translational medicine*. 2012;10:1.
34. Moffett JR, Namboodiri MA. Tryptophan and the immune response. *Immunology and cell biology*. 2003;81(4):247-65.
35. Lob S, Konigsrainer A, Rammensee HG, Opelz G, Terness P. Inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase for cancer therapy: can we see the wood for the trees? *Nature reviews Cancer*. 2009;9(6):445-52.
36. Lob S, Konigsrainer A, Zieker D, Brucher BL, Rammensee HG, Opelz G, et al. IDO1 and IDO2 are expressed in human tumors: levo- but not dextro-1-methyl tryptophan inhibits tryptophan catabolism. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2009;58(1):153-7.
37. Thackray SJ, Mowat CG, Chapman SK. Exploring the mechanism of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Biochemical Society transactions*. 2008;36(Pt 6):1120-3.
38. Mellor AL, Munn DH.IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nature Reviews Immunology*. 2004;4:762.
39. Kadoya A, Tone S, Maeda H, Minatogawa Y, Kido R. Gene structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1992;189(1):530-6.
40. Robinson CM, Shirey KA, Carlin JM. Synergistic transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2003;23(8):413-21.
41. Chon SY, Hassanain HH, Gupta SL. Cooperative Role of Interferon Regulatory Factor 1 and p91 (STAT1) Response Elements in Interferon-gamma-inducible Expression of Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase Gene. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(29):17247-52.
42. Brandacher G, Margreiter R, Fuchs D. Implications of IFN-gamma-mediated tryptophan catabolism on solid organ transplantation. *Current drug metabolism*. 2007;8(3):273-82.
43. Mellor AL, Munn DH. Tryptophan Catabolism and Regulation of Adaptive Immunity. *The Journal of Immunology*. 2003;170(12):5809-13.
44. Curti A, TrabANELLI S, Salvestrini V, Baccarani M, Lemoli RM. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology. *Blood*. 2009;113(11):2394-401.

45. Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nature medicine*. 2003;9(10):1269-74.
46. Theate I, van Baren N, Pilotte L, Moulin P, Larrieu P, Renaud JC, et al. Extensive profiling of the expression of the indoleamine 2,3-dioxygenase 1 protein in normal and tumoral human tissues. *Cancer immunology research*. 2015;3(2):161-72.
47. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science (New York, NY)*. 1998;281(5380):1191-3.
48. Mellor AL, Lemos H, Huang L. Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Tolerance: Where Are We Now? *Frontiers in Immunology*. 2017;8.
49. McGaha TL, Huang L, Lemos H, Metz R, Mautino M, Prendergast GC, et al. Amino acid catabolism: a pivotal regulator of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*. 2012;249(1):135-57.
50. Dong J, Qiu H, Garcia-Barrio M, Anderson J, Hinnebusch AG. Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain. *Molecular cell*. 2000;6(2):269-79.
51. Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *The Journal of experimental medicine*. 1999;189(9):1363-72.
52. Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D, et al. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity*. 2005;22(5):633-42.
53. Metz R, Rust S, Duhadaway JB, Mautino MR, Munn DH, Vahanian NN, et al. IDO inhibits a tryptophan sufficiency signal that stimulates mTOR: A novel IDO effector pathway targeted by D-1-methyl-tryptophan. *Oncoimmunology*. 2012;1(9):1460-8.
54. Opitz CA, Litzenburger UM, Sahm F, Ott M, Tritschler I, Trump S, et al. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*. 2011;478(7368):197-203.
55. Terness P, Bauer TM, Rose L, Duffer C, Watzlik A, Simon H, et al. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *The Journal of experimental medicine*. 2002;196(4):447-57.
56. Mezrich JD, Fechner JH, Zhang X, Johnson BP, Burlingham WJ, Bradfield CA. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2010;185(6):3190-8.
57. Jia Y, Wang H, Wang Y, Wang T, Wang M, Ma M, et al. Low expression of Bin1, along with high expression of IDO in tumor tissue and draining lymph nodes, are predictors of poor prognosis for esophageal squamous cell cancer patients. *Int J Cancer*. 2015;137(5):1095-106.
58. Muller AJ, DuHadaway JB, Donover PS, Sutanto-Ward E, Prendergast GC. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nature medicine*. 2005;11(3):312-9.

59. Ge K, DuHadaway J, Du W, Herlyn M, Rodeck U, Prendergast GC. Mechanism for elimination of a tumor suppressor: aberrant splicing of a brain-specific exon causes loss of function of Bin1 in melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(17):9689-94.
60. McKenna ES, Tamayo P, Cho YJ, Tillman EJ, Mora-Blanco EL, Sansam CG, et al. Epigenetic inactivation of the tumor suppressor BIN1 drives proliferation of SNF5-deficient tumors. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2012;11(10):1956-65.
61. Prendergast GC, Muller AJ, Ramalingam A, Chang MY. BAR the door: cancer suppression by amphiphysin-like genes. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1795(1):25-36.
62. Karni R, de Stanchina E, Lowe SW, Sinha R, Mu D, Krainer AR. The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nature structural & molecular biology*. 2007;14(3):185-93.
63. Ozaki Y, Edelstein MP, Duch DS. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase: a mechanism of the antitumor activity of interferon gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1988;85(4):1242-6.
64. Friberg M, Jennings R, Alsarraj M, Dessureault S, Cantor A, Extermann M, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection. *International Journal of Cancer*. 2002;101(2):151-5.
65. Muller AJ, Prendergast GC. Marrying immunotherapy with chemotherapy: why say IDO? *Cancer research*. 2005;65(18):8065-8.
66. Ino K, Yamamoto E, Shibata K, Kajiyama H, Yoshida N, Terauchi M, et al. Inverse Correlation between Tumoral Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression and Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Endometrial Cancer: Its Association with Disease Progression and Survival. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(8):2310-7.
67. Ino K, Yoshida N, Kajiyama H, Shibata K, Yamamoto E, Kidokoro K, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a novel prognostic indicator for endometrial cancer. *British journal of cancer*. 2006;95(11):1555-61.
68. Okamoto A, Nikaido T, Ochiai K, Takakura S, Saito M, Aoki Y, et al. Indoleamine 2,3-Dioxygenase Serves as a Marker of Poor Prognosis in Gene Expression Profiles of Serous Ovarian Cancer Cells. *Clinical Cancer Research*. 2005;11(16):6030-9.
69. Brandacher G, Perathoner A, Ladurner R, Schneeberger S, Obrist P, Winkler C, et al. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. *Clinical Cancer Research*. 2006;12(4):1144-51.
70. Ben-Haj-Ayed A, Moussa A, Ghedira R, Gabbouj S, Miled S, Bouzid N, et al. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase activity and expression in nasopharyngeal carcinoma. *Immunology letters*. 2016;169:23-32.
71. Riesenberger R, Weiler C, Spring O, Eder M, Buchner A, Popp T, et al. Expression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Tumor Endothelial Cells Correlates with Long-term Survival of Patients with Renal Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(23):6993-7002.

72. Ishio T, Goto S, Tahara K, Tone S, Kawano K, Kitano S. Immunoactivative role of indoleamine 2,3-dioxygenase in human hepatocellular carcinoma. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2004;19(3):319-26.
73. Soliman HH, Minton SE, Han HS, Ismail-Khan R, Neuger A, Khambati F, et al. A phase I study of indoximod in patients with advanced malignancies. *Oncotarget*. 2016;7(16):22928-38.
74. Prendergast GC, Malachowski WP, DuHadaway JB, Muller AJ. Discovery of IDO1 Inhibitors: From Bench to Bedside. *Cancer research*. 2017;77(24):6795-811.
75. Liu X, Shin N, Koblisch HK, Yang G, Wang Q, Wang K, et al. Selective inhibition of IDO1 effectively regulates mediators of antitumor immunity. *Blood*. 2010;115(17):3520-30.
76. Beatty GL, O'Dwyer PJ, Clark J, Shi JG, Bowman KJ, Scherle PA, et al. First-in-Human Phase I Study of the Oral Inhibitor of Indoleamine 2,3-Dioxygenase-1 Epcadostat (INCB024360) in Patients with Advanced Solid Malignancies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2017;23(13):3269-76.
77. Zakharia Y, McWilliams R, Shaheen M, Grossman K, Drabick J, Milhem M, et al. Abstract CT117: Interim analysis of the Phase 2 clinical trial of the IDO pathway inhibitor indoximod in combination with pembrolizumab for patients with advanced melanoma. *Cancer research*. 2017;77(13 Supplement):CT117-CT.
78. Jha GG, Gupta S, Tagawa ST, Koopmeiners JS, Vivek S, Dudek AZ, et al. A phase II randomized, double-blind study of sipuleucel-T followed by IDO pathway inhibitor, indoximod, or placebo in the treatment of patients with metastatic castration resistant prostate cancer (mCRPC). *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(15_suppl):3066-.
79. Bahary N, Wang-Gillam A, Haraldsdottir S, Somer BG, Lee JS, O'Rourke MA, et al. Phase 2 trial of the IDO pathway inhibitor indoximod plus gemcitabine / nab-paclitaxel for the treatment of patients with metastatic pancreas cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(15_suppl):4015-.
80. Fox E, Oliver T, Rowe M, Thomas S, Zakharia Y, Gilman PB, et al. Indoximod: An Immunometabolic Adjuvant That Empowers T Cell Activity in Cancer. *Frontiers in oncology*. 2018;8(370).
81. Hamid O, Bauer TM, Spira AI, Olszanski AJ, Patel SP, Wasser JS, et al. Epcadostat plus pembrolizumab in patients with SCCHN: Preliminary phase I/II results from ECHO-202/KEYNOTE-037. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(15_suppl):6010-.
82. Smith DC, Gajewski T, Hamid O, Wasser JS, Olszanski AJ, Patel SP, et al. Epcadostat plus pembrolizumab in patients with advanced urothelial carcinoma: Preliminary phase I/II results of ECHO-202/KEYNOTE-037. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(15_suppl):4503-.
83. Lara P, Bauer TM, Hamid O, Smith DC, Gajewski T, Gangadhar TC, et al. Epcadostat plus pembrolizumab in patients with advanced RCC: Preliminary phase I/II results from ECHO-202/KEYNOTE-037. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(15_suppl):4515-.
84. Gangadhar TC, Hamid O, Smith DC, Bauer TM, Wasser JS, Olszanski AJ, et al. Epcadostat plus pembrolizumab in patients with advanced melanoma and

- select solid tumors: Updated phase 1 results from ECHO-202/KEYNOTE-037. *Annals of Oncology*. 2016;27(suppl_6).
85. Perez RP, Riese MJ, Lewis KD, Saleh MN, Daud A, Berlin J, et al. Epacadostat plus nivolumab in patients with advanced solid tumors: Preliminary phase I/II results of ECHO-204. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(15_suppl):3003-.
 86. Muller AJ, Manfredi MG, Zakharia Y, Prendergast GC. Inhibiting IDO pathways to treat cancer: lessons from the ECHO-301 trial and beyond. *Seminars in immunopathology*. 2019;41(1):41-8.
 87. Companies Scaling Back IDO1 Inhibitor Trials. *Cancer Discov*. 2018;8(7):Of5.
 88. NCT03322384 Cgl. Phase I/II Trial of Epacadostat Intralesional SD101 Radiotherapy in Patients With Lymphoma <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03322384>.
 89. Liu M, Wang X, Wang L, Ma X, Gong Z, Zhang S, et al. Targeting the IDO1 pathway in cancer: from bench to bedside. *Journal of hematology & oncology*. 2018;11(1):100.
 90. Andersen MH, Svane IM. Indoleamine 2,3-dioxygenase vaccination. *Oncoimmunology*. 2015;4(1).
 91. Iversen TZ, Engell-Noerregaard L, Ellebaek E, Andersen R, Larsen SK, Bjoern J, et al. Long-lasting disease stabilization in the absence of toxicity in metastatic lung cancer patients vaccinated with an epitope derived from indoleamine 2,3 dioxygenase. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014;20(1):221-32.
 92. Ogino S, Noshio K, Irahara N, Meyerhardt JA, Baba Y, Shima K, et al. Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(20):6412-20.
 93. Brandacher G, Perathoner A, Ladurner R, Schneeberger S, Obrist P, Winkler C, et al. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(4):1144-51.
 94. Schmiegel W, Buchberger B, Follmann M, Graeven U, Heinemann V, Langer T, et al. *Zeitschrift fur Gastroenterologie*. 2017;55(12):1344-498.
 95. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science (New York, NY)*. 2006;313(5795):1960-4.
 96. Church SE, Galon J. Regulation of CTL Infiltration Within the Tumor Microenvironment. *Advances in experimental medicine and biology*. 2017;1036:33-49.
 97. Lob S, Konigsrainer A, Schafer R, Rammensee HG, Opelz G, Terness P. Levo- but not dextro-1-methyl tryptophan abrogates the IDO activity of human dendritic cells. *Blood*. 2008;111(4):2152-4.
 98. Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends in immunology*. 2013;34(3):137-43.

99. Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, et al. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer research*. 1998;58(16):3491-4.
100. Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P, Boon T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nature reviews Cancer*. 2014;14(2):135-46.
101. Galluzzi L, Buque A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer cell*. 2015;28(6):690-714.
102. Frey B, Rückert M, Deloch L, Rühle PF, Derer A, Fietkau R, et al. Immunomodulation by ionizing radiation—impact for design of radio-immunotherapies and for treatment of inflammatory diseases. *Immunological Reviews*. 2017;280(1):231-48.
103. Pages F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(35):5944-51.
104. Godin-Ethier J, Hanafi LA, Piccirillo CA, Lapointe R. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human cancers: clinical and immunologic perspectives. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(22):6985-91.
105. Ferdinande L, Decaestecker C, Verset L, Mathieu A, Moles Lopez X, Negulescu A, et al. Clinicopathological significance of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 expression in colorectal cancer. *British journal of cancer*. 2012;106(1):141-7.
106. Gao YF, Peng RQ, Li J, Ding Y, Zhang X, Wu XJ, et al. The paradoxical patterns of expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in colon cancer. *Journal of translational medicine*. 2009;7:71.
107. Baban B, Chandler P, McCool D, Marshall B, Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression is restricted to fetal trophoblast giant cells during murine gestation and is maternal genome specific. *Journal of reproductive immunology*. 2004;61(2):67-77.
108. de Faudeur G, de Trez C, Muraille E, Leo O. Normal development and function of dendritic cells in mice lacking IDO-1 expression. *Immunology Letters*. 2008;118(1):21-9.
109. Monjazeb AM, Kent MS, Grossenbacher SK, Mall C, Zamora AE, Mirsoian A, et al. Blocking Indolamine-2,3-Dioxygenase Rebound Immune Suppression Boosts Antitumor Effects of Radio-Immunotherapy in Murine Models and Spontaneous Canine Malignancies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2016;22(17):4328-40.
110. van Baren N, Van den Eynde BJ. Tumoral Immune Resistance Mediated by Enzymes That Degrade Tryptophan. *Cancer immunology research*. 2015;3(9):978-85.
111. Spranger S, Spaapen RM, Zha Y, Williams J, Meng Y, Ha TT, et al. Up-Regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the Melanoma Tumor Microenvironment Is Driven by CD8(+) T Cells. *Science translational medicine*. 2013;5(200):200ra116.

112. Gajewski TF, Louahed J, Brichard VG. Gene signature in melanoma associated with clinical activity: a potential clue to unlock cancer immunotherapy. *Cancer journal (Sudbury, Mass)*. 2010;16(4):399-403.
113. Netter J, Douard R, Durdux C, Landi B, Berger A, Taieb J. Advances in management of adjuvant chemotherapy in rectal cancer: Consequences for clinical practice. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*. 2016;40(5):546-52.
114. Sørensen RB, Berge-Hansen L, Junker N, Hansen CA, Hadrup SR, Schumacher TNM, et al. The Immune System Strikes Back: Cellular Immune Responses against Indoleamine 2,3-dioxygenase. *PLOS ONE*. 2009;4(9):e6910.
115. Sorensen RB, Hadrup SR, Svane IM, Hjortso MC, Thor Straten P, Andersen MH. Indoleamine 2,3-dioxygenase specific, cytotoxic T cells as immune regulators. *Blood*. 2011;117(7):2200-10.
116. Vacchelli E, Aranda F, Eggermont A, Sautes-Fridman C, Tartour E, Kennedy EP, et al. Trial watch: IDO inhibitors in cancer therapy. *Oncoimmunology*. 2014;3(10):e957994.
117. Prendergast GC, Mondal A, Dey S, Laury-Kleintop LD, Muller AJ. Inflammatory Reprogramming with IDO1 Inhibitors: Turning Immunologically Unresponsive 'Cold' Tumors 'Hot'. *Trends in cancer*. 2018;4(1):38-58.
118. Benson AB, 3rd, Bekaii-Saab T, Chan E, Chen YJ, Choti MA, Cooper HS, et al. Localized colon cancer, version 3.2013: featured updates to the NCCN Guidelines. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*. 2013;11(5):519-28.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modulierung der Immunantwort durch IDO1

Abbildung 2: Flussdiagramm zur Veranschaulichung der Studienpopulation

Abbildung 3: Bestimmung der CD8+-Lymphozyten-Infiltration an drei verschiedenen Lokalisationen

Abbildung 4: Bestimmung der IDO1-Expression an der Invasionsfront

Abbildung 5: Auswertung der intraepithelialen CD8+-Infiltration

Abbildung 6: Beispiele für IDO low und IDO high Expression

Abbildung 7: Stichprobenartige Untersuchung IDO1-positiv-gefärbter Stromazellen (Abdruck mit freundlicher Genehmigung Patholog. Institut der Universität Würzburg/Dr. S. Kircher)

Abbildung 8: Gesamtüberleben in Bezug auf die Höhe des CD8+-Gesamtscores

Abbildung 9: Rezidivfreies Überleben in Bezug auf die Höhe des CD8+-Gesamtscores

Abbildung 10: Gesamtüberleben in Bezug auf die Höhe des IDO1-Gesamtscores

Abbildung 11: Rezidivfreies Überleben in Bezug auf die Höhe des IDO1-Gesamtscores

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Amsterdam-Kriterien

Tabelle 2: Revidierte Bethesda-Kriterien

Tabelle 3: TNM-Klassifikation

Tabelle 4: UICC-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms

Tabelle 5: Nachsorgeschema gemäß aktueller S3-Leitlinie

Tabelle 6: Arbeitsprotokoll Immunhistochemische IDO1-Färbung

Tabelle 7: Klinische Patientendaten und Tumorcharakteristika

Tabelle 8: Verteilung der CD8+-Lymphozyten in den verschiedenen Sublokalisationen innerhalb eines Präparats

Tabelle 9: Verteilung der IDO1-exprimierenden Zellen in den verschiedenen Sublokalisationen innerhalb eines Präparats

Tabelle 10: Kreuztabelle zur Darstellung der Korrelation zwischen CD8+-Gesamtscore und IDO1-Gesamtscore

Tabelle 11: Kreuztabelle zur Darstellung der Korrelation zwischen stromaler CD8+-Infiltration und stromaler IDO1-Expression

Tabelle 12: Kreuztabelle zur Darstellung der Korrelation zwischen intraepithelialer CD8+-Infiltration und intraepithelialer IDO1-Expression

Tabelle 13: Korrelation des CD8+-Gesamtscores mit klinisch-pathologischen Parametern

Tabelle 14: Korrelation des IDO1-Gesamtscores mit klinisch-pathologischen Parametern

Tabelle 15: Korrelation der intraepithelialen CD8+-Infiltration mit signifikanten klinisch-pathologischen Parametern

Tabelle 16: Korrelation der stromalen IDO1-Expression mit signifikanten klinisch-pathologischen Parametern

Tabelle 17: 2- und 5-Jahres-Überlebensraten.

Tabelle 18: Uni- und multivariate Analyse für das Gesamtüberleben

Tabelle 19: Uni- und multivariate Analyse für das Rezidivfreie Überleben

Tabelle 20: Korrelation der stromalen CD8+-Infiltration im Tumorzentrum mit ausgewählten klinisch-pathologischen Parametern (ypT0-Fälle miteinbezogen)

7.3. Abkürzungsverzeichnis

1-MT	1-Methyltryptophan
5-FU	5-Fluoruracil
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
AhR	Arylhydrocarbon-Rezeptor
AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	Antigen-präsentierende Zellen
CD	Clusters of Differentiation
CD8+	cytotoxic T lymphocyte (zytotoxischer T-Lymphozyt)
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CI	Confidence Interval
CPI	Checkpoint-Inhibitor

CRC	Colorectales Carcinom
CS	Citronensäure
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DC	Dendritische Zellen
DFS	Disease-free survival (Rezidivfreies Überleben)
GAS	interferon-gamma activated sequence
GCN2	general control non-derepressible 2 (-Kinase)
Gy	Gray (Energiedosis)
HAA	3-Hydroxy-Anthranilsäure
HPF	High Power Field
HR	Hazard Ratio
IDO1	Indoleamine-2,3-Dioxygenase
IFN- γ	Interferon gamma
ISRE	interferon stimulated response element
KA	Kynurensäure
kDa	Kilodalton
Kyn	Kynurenin
LARC	locally advanced rectal cancer (lokal fortgeschrittenes Rektumkarzinom)
LPS	Lipopolysaccharide
OS	Overall survival = Gesamtüberleben
PBS	Phosphate-buffered saline
QA	Quinolinic acid (Chinolinsäure)
RCTx	Radiochemotherapie
TDO	Tryptophan-2,3-dioxygenase
TILs	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TME	Totale Mesorektale Exzision
TNM	Tumor-Nodes-Metastasis
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
T _{regs}	regulatorische T-Zellen
Trp	Tryptophan
UICC	Union Internationale Contre le Cancer

Danksagung

Mein Dank gilt der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie der Universität Würzburg unter Direktor Prof. Dr. med. C.-T. Germer sowie meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Ingo Klein für die Vergabe des Promotionsthemas und die Möglichkeit, diese Arbeit in ihrer Abteilung durchzuführen zu können.

Besonders danken möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Stefan Löb: für die umfassende und sehr gute Betreuung, das fortwährende Engagement, die stets vorhandene Motivation und Geduld und den ungebrochenen Optimismus.

Ebenfalls hervorzuheben sind die Mitarbeiter des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg, namentlich Direktor Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald, Dr. med. Stefan Kircher und Sabine Roth, aber auch das gesamte Laborteam, die mich mit konstruktiven Vorschlägen und praktischer Anleitung maßgeblich bei den immunhistochemischen Schnitten, Färbungen und deren Auswertung unterstützt haben.

Danke sage ich allen treuen Freunden und Wegbegleitern, die auf dem langen Weg der Promotion ein offenes Ohr hatten und neue Kraft spendeten.

Der größte Dank gilt meiner Familie: Mein Fels, mein Anker, mein sicherer Hafen. Ihr seid alles für mich.