

**Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik - Großhadern
der Ludwig – Maximilians - Universität München
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h.c. K.-W. Jauch**

**Charakterisierung der Immunantwort bei Magenkarzinompatienten:
Einfluss von Helicobacter pylori auf die Induktion einer
tumorspezifischen Immunantwort**

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

Vorgelegt von

Irene Heimbeck

aus München

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Rudolf Hatz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann
Priv. Doz. Dr. Marion Subklewe
Priv. Doz. Dr. Udo Kammer

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 15.04.2010

Erklärung:

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Doktorschrift ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, das benutzte Schrifttum vollständig erwähnt habe und dass die Doktorschrift noch von keiner Fakultät abgelehnt worden ist.

München, den 15.04.2010

Irene Heimbeck

Die in dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Klinischen Forschung Chirurgie der Universität München, Großhadern von mir eigenständig durchgeführt und ausgewertet.

Die Daten der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Rahmen vorgestellt und publiziert:

Originalarbeiten:

1. N.K. van den Engel, H. Winter, D.Rüttinger, **I. Shau**, M. Schiller, B. Mayer, T.Moudgil, G. Meimarakis, M. Stolte, K.W. Jauch, BA. Fox , RA. Hatz, Characterization of immune responses in gastric cancer patients: A possible impact of H. pylori to polarize a tumor-specific type 1 response? Clin Immunol. 2006 Sep;120(3):285-96.
2. **I. Shau**, Charakterisierung der Immunantwort bei Magenkarzinompatienten: Einfluss von Helicobacter pylori auf die Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort, Doktorandenkolloquium der Klinischen Forschung Chirurgie, Klinikum Großhadern unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. K. -W. Jauch am 03.05.2005.
3. **I. Shau**, N. K. van den Engel, T. Seher, T. Moudgil, BA. Fox, H. Winter, RA. Hatz, Examination of tumor-specific cytokine release of isolated T cells from Helicobacter pylori-infected gastric cancer patients. 2nd International Conference Strategies for Immune Therapy, Würzburg, 02.03.2004

Abstracts für Kongressbeitrag (Poster oder Vortrag):

4. N.K. van den Engel, **I. Shau**, B. Mayer, T. Seher, T. Moudgil, B.A. Fox, K.-W. Jauch, H. Winter, R.A. Hatz. Comparison of tumor-specific immune responses in patients with Helicobacter pylori (H.p.) positive versus H.p. negative gastric adenocarcinoma. International Society for Biological Therapy of Cancer (iSBTc) Washington DC, Oktober 2003
5. **I.Shau**, N. K. van den Engel, T. Seher, T. Moudgil, BA. Fox, H. Winter, RA. Hatz, Examination of tumor-specific cytokine release of isolated T cells from Helicobacter pylori- infected gastric cancer patients. 2nd International Conference Strategies for Immune Therapy, Würzburg, 02.03.2004

6. N.K. van den Engel, H. Winter, **I. Shau**, T. Seher, T. Moudgil, B.A. Fox, K.-W. Jauch, R.A. Hatz. Helicobacter pylori induziert tumorspezifische Typ-1 polarisierte T-Zellen bei Patienten mit Magenkarzinom. 121. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Berlin April 2004

7. H. Winter, N.K. van den Engel, **I. Shau**, M. Schiller, T. Moudgil, D. Rüttinger, K.-W. Jauch, B.A. Fox, R.A. Hatz. Analysis of tumor-infiltrating lymphocytes from Helicobacter pylori positive and negative gastric cancer patients. J. Immunother. 27:S61, 2004
(International Society for Biological Therapy of Cancer (iSBTc), San Francisco Oktober 2004)

8. N.K. van den Engel, H. Winter, G. Meimarakis, C. Fernsebner, C. Fischer, M. Schiller, **I. Shau**, M. Stolte, N. Lehn, K.W. Jauch, R.A. Hatz. Histological analysis of tumor tissue from Helicobacter pylori positive and negative gastric cancer patients: Role of the immune system for the better survival of H.p. positive patients post-gastrectomy. 5. Helicobacter pylori-Workshop der DGHM-Fachgruppen, Herrsching am Ammersee März 2005

**Diese Arbeit widme ich meinem Vater,
Dr. Marcus Gen-Chain Chau**

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	13
1.1	Das Magenkarzinom	13
1.2	<i>Helicobacter pylori</i>	16
1.3	Pathogenetische Zusammenhänge zwischen <i>Helicobacter pylori</i> und dem Magenkarzinom.....	18
1.4	Polarisierung einer Immunantwort durch T-Lymphozyten.....	20
1.5	Einfluss dendritischer Zellen auf Immunzellen	23
1.6	Das Zytokinmilieu in <i>Helicobacter pylori</i> infiziertem Gewebe.....	25
1.7	Bedeutung einer Typ-I Immunantwort bei Tumorregression.....	26
1.8	Zielsetzung	27
2.	Material und Methoden	28
2.1	Prospektive klinische Studie.....	28
2.2	Gewinnung von Patientenmaterial.....	29
2.3	Determinierung von <i>Helicobacter pylori</i>	32
2.3.1	Histologischer Nachweis von <i>Helicobacter pylori</i>	32
2.3.2	Mikrobiologischer Nachweis von <i>Helicobacter pylori</i>	32
2.3.3	Serologischer Nachweis von <i>Helicobacter pylori</i>	32
2.4	Pathologischer Befund und Patientenstatus zum Zeitpunkt der Operation	33
2.5	Zellkultur	34
2.5.1	Zellkulturbedingungen	34
2.5.2	Gewinnung von autologen Tumorzellen aus dem Primärtumor (Tu–Sto)	36
2.5.3	Gewinnung von Tumor infiltrierenden Lymphozyten (TIL) aus dem Primärtumor	37

2.5.4	Gewinnung von autologen Tumorzellen aus Lymphknotenmetastasen (LN-Tu).....	38
2.5.5	Gewinnung von T-Lymphozyten aus einem tumorfreien Lymphknoten (LN-T cell)	38
2.6	Charakterisierung der Tumorzellen	40
2.6.1	Immunhistochemische Zytospin-Analyse der Karzinomzellen	40
2.6.2	Charakterisierung der Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie	43
2.7	Charakterisierung von T-Lymphozyten.....	46
2.7.1	Durchflusszytometrische Bestimmung des prozentualen Anteils CD4 und CD8 positiver Lymphozyten in den T-Zell-Cloids	46
2.7.2	Bestimmung des HLA-Genotyps aus T-Lymphozyten.....	48
2.8	Cytokine Release Assay	50
2.9	Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA).....	52
2.9.1	Prinzip der Messmethode	52
2.9.2	Protokoll ELISA	53
2.9.3	Auswertung der ELISA Daten.....	54
2.10	Immunhistochemische Analyse von tumorinfiltrierenden dendritischen Zellen ..	55
2.10.1	Kryostatschnitte.....	55
2.10.2	Immunhistochemische Färbung.....	55
2.10.3	Versuchsauswertung und Statistik.....	59
3.	Ergebnisse	60
3.1	Prospektive klinische Studie - Patientendaten.....	60
3.1.1	Patientenrekrutierung	60
3.1.2	Gewebeaufarbeitung	60
3.1.3	Nachweis von <i>Helicobacter pylori</i>	62
3.2	Charakterisierung der Magenkarzinomzellen	66
3.2.1	Immunhistochemische Zytospin-Analyse der Karzinomzellen.....	66

3.2.2	Magenkarzinom-Zellbank	67
3.2.3	Bestimmung der HLA Expression auf etablierten Tumorzelllinien mittels Durchflusszytometrie	68
3.3	Charakterisierung der T-Zell-Cloids.....	70
3.4	Cytokine Release Assay (CRA)	73
3.5	Tumordinfiltrierende dendritische Zellen	79
4.	Diskussion.....	82
4.1	Eigenschaften von T-Lymphozyten im Mikromilieu von Magenkarzinomgewebe	82
4.2	Der Immunmechanismus tumorreaktiver T-Lymphozyten im Magenkarzinom...	86
4.3	Die Rolle von Interferon- γ bei einer tumorspezifischen Immunantwort.....	89
4.4	<i>Helicobacter pylori</i> und dendritische Zellen	92
4.5	Tumorescape-Mechanismen.....	93
4.6	Tumorvakzine	95
4.6.1	Effekte von Tumorvakzinen	95
4.6.2	Vakzine aus Bestandteilen von <i>Helicobacter pylori</i>	96
5.	Zusammenfassung	97
6.	Literaturverzeichnis	99
7.	Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme	114
8.	Abbildungsverzeichnis	117
9.	Tabellenverzeichnis	119

10.	Anhang	121
11.	Lebenslauf.....	124
12.	Danksagung	126

1. Einleitung

1.1 Das Magenkarzinom

Das Magenkarzinom ist eine der häufigsten Krebserkrankungen in den industrialisierten Ländern. Es tritt vor allem zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr auf, wobei der Anteil der Neuerkrankungen bei Männern gegenüber Frauen mit 1,5 zu 1 leicht überwiegt. 10% aller Magenkarzinome werden jedoch bereits bei Patienten diagnostiziert die jünger als 40 Jahre sind. Zu den Ländern mit hoher Prävalenz für das Magenkarzinom gehören Japan, Kolumbien, Finnland, Österreich und die Bundesrepublik Deutschland. Jährlich erkranken in Europa mehr als 192.000 Menschen an einem malignen Magentumor, 15.000 Menschen davon alleine in Deutschland [1]. Die Mortalität in der Bundesrepublik beträgt derzeit 13.000 Menschen pro Jahr, damit steht das Magenkarzinom in der Todesursachenstatistik bei Frauen an fünfter, bei Männern an sechster Stelle (Quelle: Tumorregister München; <http://www.tumorregister-muenchen.de/>).

Das Magenkarzinom ist definiert als ein maligner epithelialer Tumor des Magens. Die WHO unterscheidet folgende histologische Typen: Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom, undifferenziertes Karzinom und ein nicht klassifizierbares Karzinom. Nach Laurén wird unter pathobiologischen Gesichtspunkten ein mehr umschrieben wachsendes Karzinom vom Intestinaltyp (Adenokarzinom) und ein diffuses Karzinom (entdifferenziertes Karzinom, Siegelringkarzinom) unterschieden [2]. Zwei Drittel der Magenkarzinome sind im Antrum lokalisiert, wobei in den letzten 20 Jahren eine Zunahme des Kardiakarzinoms zu registrieren ist.

Nur bei distalen Tumoren mit ausreichendem Sicherheitsabstand zum gesunden Restgewebe ist eine 4/5 Magenresektion möglich, ansonsten ist der Regeleingriff zur kurativen Therapie die Gastrektomie in Kombination mit der Entfernung des großen und kleinen Netzes und der Lymphknoten am Truncus coeliacus bis zur Leber und zum Milzhilus [2, 3]; je nach Lage und Infiltration des Karzinoms müssen auch benachbarte Organe (Milz, Pankreasschwanz, linker Leberlappen, Querkolon, distaler Ösophagus) mitreseziert werden [4]. Trotz standardisierter Operationstechniken sowie adjuvanter und neoadjuvanter chemotherapeutischer Behandlungskonzepte mit 5-Fluorouracil und Cisplatin [5], sind die Überlebenschancen eher enttäuschend. Ein Benefit der gastrektomierten Patienten durch eine postoperative Radiochemotherapie muss sich noch zeigen [6].

Einleitung

Die Prognose hängt entscheidend vom Stadium des Tumors ab. Aufgrund tumornaher Lymphwege, die sich bereits in der Mukosa unterhalb der Basalmembran befinden, ist eine sehr frühe lymphogene Metastasierung möglich. Beim Magenfrühkarzinom beträgt die 5-Jahresüberlebensrate 90-95%, beim fortgeschrittenen Karzinom nur 30% [7, 8]. Da zum Zeitpunkt der Diagnosestellung über 50% aller Magenkarzinome inkurabel sind, leben nach fünf Jahren insgesamt noch weniger als 10% der Patienten. Mehr als 50% der kurativ an Magenkarzinom behandelten Patienten erleiden ein Tumorrezidiv innerhalb von fünf Jahren.

Die Ätiopathogenese des Magenkarzinoms ist multifaktoriell. Unter den genetischen Faktoren scheint die Blutgruppe A eine Rolle zu spielen, des Weiteren geht das Lynch-Syndrom (Mutation von Reparaturgenen auf Chromosom zwei, drei oder sieben; HNPCC) mit einer erhöhten Prädisposition einher [9]. Weiterhin steht eine Nitrosaminbildung durch bakterielle Fehlbesiedlung bei chronisch atrophischer Gastritis und Achlorhydrie zur Diskussion [10].

Umweltfaktoren wie Ernährungsgewohnheiten spielen in der Prävalenz des Magenkarzinoms eine wichtige Rolle. Gesalzene und geräucherte Speisen scheinen sich aufgrund des erhöhten Nitrosamingehalts ungünstig auszuwirken, ebenso eine Exposition durch Benzpyrene, Aflatoxine, Alkohol und Nikotin [11, 12]. Obst und frisches Gemüse zeigen durch Entgegenwirken eines Mangels an Vitamin A, C und E einen protektiven Effekt [13]. In den westlichen Ländern, insbesondere in den USA ist seit ca. 40 Jahren aufgrund verbesserter hygienischer Lebensbedingungen und ausgewogenerer Ernährung eine kontinuierliche Abnahme der Ersterkrankung an einem Magenkarzinom zu registrieren [14].

Es gibt verschiedene Risikoerkrankungen, bei denen gehäuft mit dem Auftreten eines Magenkarzinoms gerechnet werden muss, dazu zählen die Perniziöse Anämie bei Autoimmun - Gastritis, Morbus Ménetriér und die proliferierende chronisch atrophische Gastritis. Patienten, welche an den Hautkrankheiten Dermatomyositis und Sklerodermie erkrankt sind, weisen diese gehäuft als paraneoplastisches Syndrom bei einem Adenokarzinom des Magens auf [15]. Auch die Acanthosis nigricans kann Hinweis auf ein Magenkarzinom sein [16]. Als obligate Präkanzerosen werden das tubuläre und villöse Adenom des Magens, sowie die dysplastische Umwandlung von Magen zellen angesehen [17]. Als Risikofaktoren umstritten sind dagegen der polypentragende Magen, der teilresezierte Magen und die banale chronisch atrophische Gastritis [18, 19].

Im Jahr 1994 hat die Weltgesundheitsorganisation (WHO) das Bakterium *Helicobacter pylori* in die Gruppe der definitiven Karzinogene zur Entstehung eines Magenkarzinoms eingeordnet [20]. Der Grund dafür sind verschiedene epidemiologische Studien, welche

Einleitung

einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Inzidenz der *Helicobacter pylori* Infektion und der Inzidenz eines Magenkarzinoms gezeigt hatten [21].

1.2 *Helicobacter pylori*

Dr. Robin Warren und Dr. Barry Marshall erhielten 2005 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin für ihre Entdeckung des Bakteriums *Helicobacter pylori* in der Magenschleimhaut als Ursache für peptische Magengeschwüre. Bereits 1982 hatten die zwei australischen Wissenschaftler durch einen Selbstversuch von Marshall die Infektionsgenese eines Magengeschwürs bewiesen und mit ihrer Publikation dieser These für Aufsehen gesorgt [22]. Die Erstbeschreibung des Bakteriums erfolgte jedoch bereits 1875 durch deutsche Wissenschaftler. Aufgrund fehlgeschlagener Versuche, durch Anzucht die Existenz des Bakteriums zu beweisen, waren diese Arbeiten allerdings bald wieder in Vergessenheit geraten.

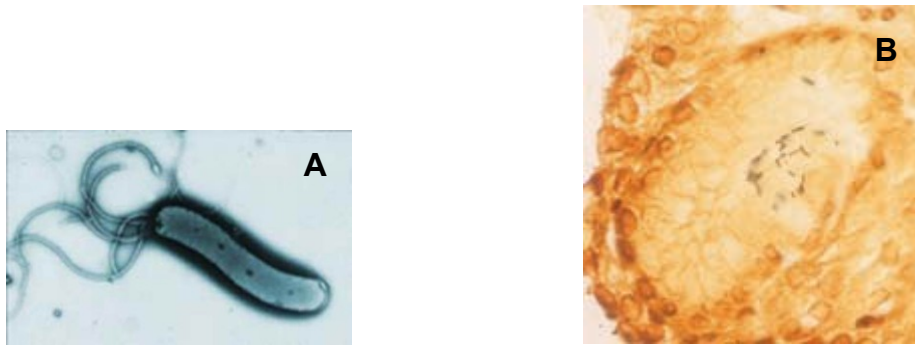


Abbildung 1: Zwei verschiedene histologische Darstellungen des gramnegativen Bakteriums *Helicobacter pylori*. (Quelle: Bayerisches Ärzteblatt, Ausgabe 03/2006)
Abbildung **A** zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme von *Helicobacter pylori*. Zu sehen sind der spiralförmige Körperaufbau sowie fünf Flagellen an der Hinterseite des Bakteriums, welche zur Fortbewegung dienen. In Abbildung **B** ist eine Silberfärbung von Magenmukosazellen abgebildet. Die im Zentrum sichtbaren länglichen Strukturen zeigen eine Kolonie von *Helicobacter pylori*.

Helicobacter pylori (*H. pylori*) ist ein spiralförmiges, gramnegatives Bakterium mit einem Durchmesser von 0,5 μm und einer Länge von drei μm (Abbildung 1). Es besitzt vier bis sechs Flagellen zur Fortbewegung und ist mikroaerophil, d.h. es benötigt wenig Sauerstoff, da es aus Methan generierten Wasserstoff als Energiequelle nutzt. Mit seinen Flagellen und seiner Spiralförmigkeit bohrt es sich in die Mukosazelle des Magens und in metaplastische Zellen des Duodenums ein. Durch das Enzym Urease, welches an der Oberfläche des Bakteriums anlagert, spaltet es Harnstoff in Bicarbonat und Ammoniak. Das Ammoniak umgibt das Bakterium wie eine Wolke und neutralisiert die Magensäure, wodurch das Bakterium in diesem sonst für pathogene Keime tödlichen Milieu überleben kann. Gleichzeitig zerstört es durch das Ammoniak sowie durch weitere pathogene Enzyme wie Protease, Katalase und Phospholipase die Mukosazelle und löst eine starke mukosaassoziierte und systemische B- und T-Zell Immunantwort als Entzündungsreaktion aus [23, 24]. Eine fortschreitende erosive

Einleitung

Schädigung der Mukusschicht bis in die Lamina muscularis propria führt schließlich zu einem Magenulkus bzw. Ulkus duodeni [25].

Weitere Antigene des Bakteriums wie das „Neutrophil-Activating-Protein“ (HP-NAP), das „vacuolating cytotoxin“ (VacA), das „CagA“ Protein, Hitzeschockproteine und Peptidoglycane, welche durch einen nadelartigen Fortsatz in die Mukosazelle injiziert werden, passieren das entzündlich veränderte Magenepithel und induzieren die Infiltration und Aktivierung von Makrophagen, Leukozyten und Granulozyten [26, 27, 28, 29, 30].

Trotz der induzierten, *H. pylori* spezifischen Immunreaktion kann das Bakterium in der Regel nicht vom eigenen Immunsystem aus dem Magen eliminiert werden. Eine lebenslange Besiedlung mit dem Keim ist die Folge, die zu einer chronischen Entzündung der Magenmukosa führt (B-Gastritis) [31, 32].

Der Übertragungsweg von *H. pylori* ist fäkal-oral. Mit Hilfe von nichtinvasiven Methoden wie Urease-Schnelltest, C13-Harnstoff-Atemtest, Stuhltest und der Antikörperbestimmung im Patientenserum, sowie der mikrobiellen Kultur aus einem Magenschleimhautbiopsat als Goldstandard und der histologischen Färbung kann das Bakterium nachgewiesen werden [33, 34]. Die chronische bakterielle Gastritis, das Ulkus ventriculi und das Ulkus duodeni können durch eine *H. pylori* Eradikationstherapie zur Heilung gebracht werden [35]. Diese Therapie besteht aus einer Standardkombination mit zwei Antibiotika (z.Zt. Clarythromycin und Amoxycillin) und einem Protonenpumpenhemmer in doppelter Standarddosis (Pantoprazol, Omeprazol oder Esomepromazol).

Die infektiologische Onkogenese der Entstehung eines MALT Lymphoms auf den Boden einer *H. pylori* Infektion des Magens war lange Zeit umstritten. Molekularbiologische Untersuchungen und klinische Therapiestudien, welche eine erfolgreiche antiinfektiöse Therapie des B-Zell Lymphoms vor allem im Frühstadium zeigten, haben jedoch das pathophysiologische Konzept belegt [36, 37]. Anders verhält sich die Sachlage in der Fragestellung, in wieweit eine *H. pylori* Infektion mit der Entstehung eines Magenkarzinoms zusammenhängt.

1.3 Pathogenetische Zusammenhänge zwischen *Helicobacter pylori* und dem Magenkarzinom

Wie bereits erwähnt, wurde *H. pylori* als Gruppe I Karzinogen bei der Entstehung eines malignen Magentumors eingestuft. Epidemiologische Studien in Regionen mit einer hohen Prävalenz für das Magenkarzinom zeigten eine positive Korrelation zur *H. pylori* Infektion [38]. Ein gehäuftes Auftreten eines Magenkarzinoms bei miteinander verwandten Personen, welche allesamt zusätzlich *H. pylori* infiziert waren, deuten eine Karzinogenese durch *H. pylori* bei familiärer Disposition an [39].

Verschiedene Mechanismen werden diskutiert, wie *H. pylori* an der Genese des Magentumors beteiligt sein könnte. Eine erhöhte Produktion freier Radikale in der Nähe des Bakteriums und eine gleichzeitig erhöhte Anzahl atypischer Bakterium-Wirtszellen wird als Indiz für einen karzinogenen Einfluss gedeutet. *H. pylori* induziert außerdem die Produktion des proinflammatorischen Tumor- Nekrose Faktors α (TNF- α). Dieses Zytokin verändert Zelladhäsionsmoleküle, wodurch die Wanderung mutierter Epithelzellen erleichtert sein soll [40]. Andere epidemiologische Daten wiederum stellen eine feste Beziehung des Bakteriums zur Tumorentstehung in Frage. So zeigen klinische Studien, dass nur 1% aller *H. pylori* infizierten Personen im Laufe des Lebens ein Magenkarzinom entwickelt [41, 42, 43, 44]. Bei etwa 20 % der Magenkarzinompatienten findet sich keine Infektion mit *H. pylori* [43, 45, 46].

In einer retrospektiven Analyse untersuchten Lee und Mitarbeiter das Überleben von *H. pylori* positiven und *H. pylori* negativen Magenkarzinompatienten [47, 48]. Sie fanden eine verbesserte Überlebenschance bei Tumorpatienten, welche vor dem chirurgischen Eingriff *H. pylori* positiv getestet worden waren. In einer prospektiven klinischen Studie verglichen Meimarakis und Mitarbeiter das Überleben *H. pylori* positiver und *H. pylori* negativer Magenkarzinompatienten nach makroskopischer und histopathologischer Entfernung des Tumors im Gesunden (R0-Resektion) [49]. 166 kurativ behandelte Patienten wurden in einem Follow-up von 53 Monaten auf ihr tumorfreies Überleben in Korrelation mit einer stattgefundenen (125 Patienten) bzw. ausgebliebenen *H. pylori* Infektion (41 Patienten) untersucht. Das tumorfreie Überleben war in der *H. pylori* positiven Patientengruppe hochsignifikant besser und zeigte damit in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Lee einen signifikanten Überlebensvorteil für Patienten mit präoperativ positivem *H. pylori* Status (siehe Abbildung 2). Basierend auf diesen Untersuchungen konnte *H. pylori* neben den etablierten Prognosefaktoren Tumorinvasion und Lymphknotenstatus als unabhängiger prognostischer Faktor identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

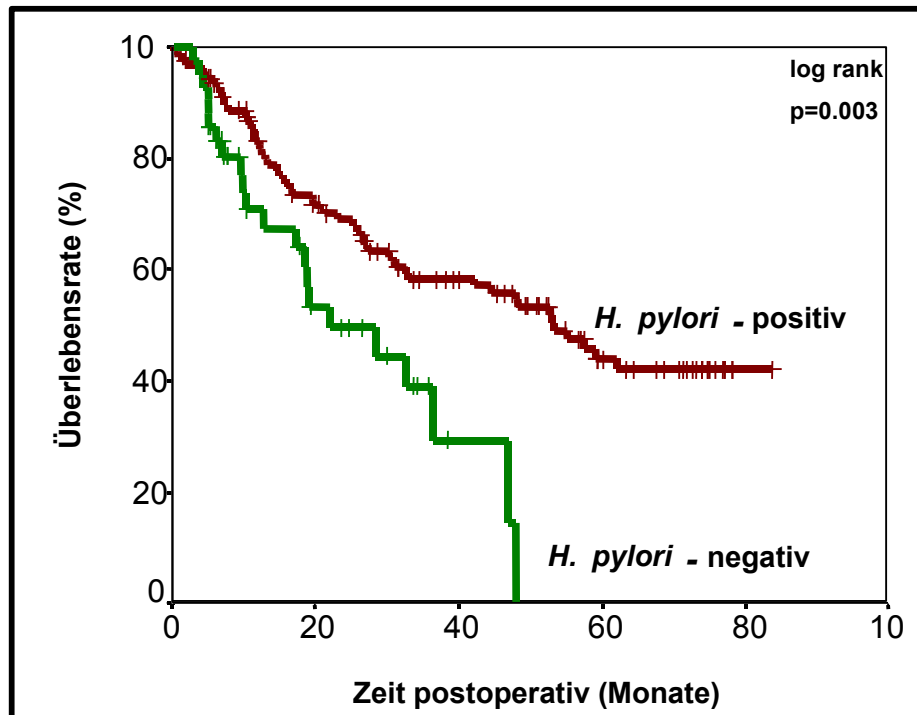


Abbildung 2: Graphik aus der prospektiven klinischen Studie von Meimarakis und Mitarbeitern. Dargestellt ist die Überlebensrate nach Gastrektomie von *H. pylori* positiven (rote Kurve) bzw. *H. pylori* negativen Patienten (grüne Kurve). Der letzte *H. pylori* negative Patient starb 48 Monate nach Gastrektomie. Das tumorfreie Überleben war in der *H. pylori* positiven Patientengruppe dagegen hochsignifikant erhöht.

Wie aber hängt das verbesserte Outcome eines Magenkarzinompatienten mit der *H. pylori* Infektion zusammen? Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass eine Infektion durch *H. pylori* entscheidend die zelluläre Immunität beeinflusst. So stellten Hatz und Mitarbeiter dar, dass Patienten mit *H. pylori*-assoziierter Gastritis eine signifikante Zunahme an CD4⁺ und CD45RO⁺ Lymphozyten in der Lamina propria vorweisen [50]. Whitney und Mitarbeiter beschrieben eine gesteigerte Infiltration von Makrophagen in die Magenschleimhaut bei Kindern mit einer *H. pylori* Infektion [51]. Aktivierte Makrophagen sezernieren Zytokine wie IL-12, IL-1, IL-6, TNF- α sowie Chemokine wie IL-8. Die im Rahmen der Infektion freigesetzten Zytokine schaffen ein sogenanntes Typ-I Zytokinmilieu, welches insbesondere die zelluläre Immunität aktiviert und die humorale Immunität hemmt.

1.4 Polarisierungen einer Immunantwort durch T-Lymphozyten

T-Lymphozyten können nach ihrer Funktion in unterschiedliche Gruppen unterteilt werden: Naive (antigenunerfahrene) T-Zellen, T-Helferzellen (Th), zytotoxische T-Zellen (Tc), T-Suppressorzellen und T-Gedächtniszellen. Charakteristisch für T-Helferzellen ist die Expression des Oberflächenmoleküls und Corezeptors CD4 (CD4⁺ T-Zellen), zytotoxische T-Zellen exprimieren den Corezeptor CD8 (CD8⁺ T-Zellen). Mit Hilfe des T-Zell Rezeptors (TCR) und des CD8 Corezeptors interagieren CD8⁺ T-Lymphozyten mit dem MHC-I-Komplex einer antigenpräsentierenden Körperzelle. CD4⁺ T-Lymphozyten stehen mit Hilfe ihres CD4 - Corezeptors mit dem MHC-II-Komplex auf der Zelloberfläche von Immunzellen in Wechselwirkung.

Ein direkter Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen und der Einfluss von IL-6 fördert die Reifung von CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten aus ihren naiven Vorläuferzellen (siehe 1.5). Werden naive CD4⁺ T-Lymphozyten durch ein Antigen stimuliert, produzieren sie Interleukin-2 (IL-2). IL-2 fördert daraufhin die Reifung weiterer CD4⁺ T-Lymphozyten und eine Polarisierung dieser T-Lymphozyten in zwei Gruppen: sogenannte Th1- Zellen, welche IFN- γ , IL-2 und TNF- β produzieren und sogenannte Th2- Zellen, welche IL-4 bilden. Diese Polarisierung der Th-Lymphozyten hängt seinerseits von dem Vorhandensein spezifischer Lymphokine im Immunmilieu ab; ist viel IL-4 vorhanden, so liegt der Schwerpunkt in der Bildung von Th2-Zellen. IL-12 hingegen fördert die Ausbildung von Th1-Zellen (Abbildung 3) [52].

Polarisierung einer Immunantwort

Th1- Zellen induzieren die zelluläre Immunantwort, Th2- Zellen eine humorale Immunantwort [53, 54]. Typ-I T-Lymphozyten sezernieren IFN- γ , TNF- β und IL-2. Typ-II T-Lymphozyten sezernieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13. Typ-I -oder Typ-II- Zytokine induzieren und unterstützen jeweils die Entwicklung von Lymphozyten mit einem entsprechenden Phänotyp, wohingegen sie die Entwicklung der T-Zellen zu dem entgegengesetzten Phänotyp unterdrücken. Entsprechend wird in Anwesenheit von IFN- γ selektiv die Expansion von Typ-I-Zellen induziert und die Expansion von Typ-II-Zellen inhibiert. Die Typ-II-Zytokine IL-4 und IL-10 hemmen die Expansion von Typ-I-Zellen [55, 56]. Durch dieses Phänomen der reziproken Hemmung polarisierter T-Zellen kommt es zur Ausprägung charakteristischer Zytokinprofile bei immunologischen Antworten. Entsprechend kommt es bei dem

Einleitung

Zusammentreffen von T-Zellen und Tumorantigen-präsentierenden dendritischen Zellen in Anwesenheit von Typ-II-Zytokinen in den entsprechenden Tumorstimulations-drainierenden Lymphknoten zur Ausbildung von Typ-II polarisierten T-Zellen. Die Typ-II-Zytokine stammen von den Tumorzellen selbst, von IL-4 sezernierenden NK-Zellen oder von IL-6 sezernierenden dendritischen Zellen [57, 58, 59]. Die Sekretion von IFN- γ durch NK Zellen oder von IL-12 durch dendritische Zellen induziert eine Typ-I-Immunantwort und unterdrückt eine Typ-II-Immunantwort [60, 61].

Auch die Quantität des Antigens während der Zellstimulation beeinflusst die Entwicklung des Phänotyps. Hohe Antigenkonzentrationen induzieren vornehmlich eine Typ-I-Antwort, wohingegen eine geringe Menge von Antigen eine Typ-II-Antwort unterstützt [62].

Wird ein Antigen in Abwesenheit entsprechender Kostimulation präsentiert, so wird eine Typ-II-Immunantwort induziert. Hierdurch wird die Freisetzung von IL-12 durch Antigen-präsentierende Zellen geblockt, eine Typ-I-Antwort unterdrückt und eine Typ-II-Antwort etabliert. Eine Antigenpräsentation in Abwesenheit inflammatorischer Zytokine hat ebenfalls eine Typ-II-Antwort zur Folge [63].

Major Histocompatibility Complex

Der Major Histocompatibility Complex-I (MHC-I) besteht aus einer schweren α - Kette mit einer α_1 , α_2 und α_3 Domäne und einer leichten β -Kette [64, 65, 66]. Es wird von allen kernhaltigen Körperzellen an der Zelloberfläche exprimiert.

Von einem MHC-I-Komplex spricht man bei einer Anlagerung eines Peptides an die α - Kette und das β_2 -Mikroglobulin zu einem Trimer. Diese Peptide stammen von körpereigenen und körperfremden (z.B. viralen) zytosolischen Proteinen, welche in Proteasomen in kleine Fragmente zerlegt und mittels des TAP (transporter associated with antigen processing) in das endoplasmatische Retikulum geschleust werden. In diesem Kompartiment werden sie an „leere“ MHC-I-Moleküle gebunden und anschließend an die Zelloberfläche zur Präsentation gegenüber den zirkulierenden CD8⁺T-Effektorzellen transportiert.

Nach einem interzellulären Kontakt zwischen dem CD8-Corezeptor, T-Zell Rezeptor und MHC-I-Komplex einer zytotoxischen T-Zelle kommt es zur Ausbildung einer Rezeptor-Verdichtung (sogenannte immunologische Synapse), die ganz wesentlich zur Aktivierung der CD8⁺ T-Zelle zu einem zytotoxischen T-Lymphozyt beiträgt. Eine einmalig aktivierte zytotoxische T-Zelle kann nun ihrerseits MHC-I-Moleküle auf der Oberfläche kernhaltiger Körperzellen erkennen, sobald diese das antigene Peptidfragment exprimieren, mit dem die zytotoxische T-Zelle aktiviert wurde. Dabei hängt die Aktivität dieser zytotoxischen T-Zelle auch von der Menge des ihr präsentierten Antigens ab; ist das Angebot und die Wirkung des

Einleitung

antigenen Peptids auf die zytotoxische T-Zelle hoch genug, tötet diese die antigen-positive Zelle. Diesen Prozess nennt man zellvermittelte Zytotoxizität. Wird der zytotoxischen T-Zelle hingegen wenig Antigen präsentiert, so kann diese, anstatt die antigen-positive Zelle anzugreifen, in einen inaktiven, also anergischen Zustand übergehen. $\text{IFN-}\gamma$ ist eines der Zytokine, welche die Hochregulation und die Antigenpräsentation von MHC-I-Komplexen stimuliert [65, 66, 67, 68].

Das MHC-Klasse-II-Molekül befindet sich auf B-Lymphozyten, Makrophagen und antigenpräsentierenden Zellen. Es besitzt zwei transmembrane Glykoproteine in Form einer α -Kette und β -Kette mit jeweils einer α_1 , α_2 , bzw. einer β_1 und β_2 Domäne. MHC-II präsentiert Antigene extrazellulären Ursprungs, die durch Endozytose aufgenommen wurden. Dendritische Zellen präsentieren über MHC-II die Antigenfragmente den CD4^+ T-Lymphozyten. Die CD4^+ T-Zellen können nun ihrerseits B-Zellen zur Antikörperproduktion aktivieren oder Makrophagen dazu veranlassen, die phagozytierten Erreger im Phagolysosom zu vernichten.

Maligne transformierte Zellen exprimieren als kernhaltige Körperzellen in der Mehrheit einen MHC-I-Komplex, sie können aber auch wie z.B. beim B-Zell-Lymphom MHC-II auf ihrer Oberfläche tragen oder zum Schutz gegen die körpereigene Immunabwehr die MHC-Expression herunterregulieren. Die MHC-I positiven Tumorzellen stellen das Ziel einer T-Zell vermittelten Immunantwort dar [69, 70].

1.5 Einfluss dendritischer Zellen auf Immunzellen

Dendritische Zellen stellen die effizienteste heterogene Gruppe zur Präsentation von Antigenen in der Natur dar [71, 72]. Aus CD34⁺ Knochenmarkstammzellen stammend, werden sie in 3 verschiedene Subtypen unterteilt: Langerhans-Zellen, interstitielle dendritische Zellen und plasmazytoide dendritische Zellen. Während Langerhans Zellen und interstitielle dendritische Zellen vornehmlich in Haut bzw. ortständigem Gewebe lokalisiert sind, werden plasmazytoide dendritische Zellen in T-Zell-Arealen lymphoider Organe, dem Thymus und in der peripheren Zirkulation gefunden [73]. Im Gewebe angesiedelte dendritische Zellen befinden sich in einem naiven Stadium und reagieren auf die Stimulation durch körpereigene oder körperfremde Antigene mit der Triggerung proinflammatorischer Mediatoren und wandern in Richtung regionaler Lymphknoten [74, 75]. Nach Antigenaufnahme und Antigenprozessierung stimulieren sie weitere Immunzellen, vornehmlich T-Lymphozyten [76]. Durch ihre hohe Dichte an akzessorischen Molekülen und Oberflächenmolekülen, wie CD80, CD86, CD40 sowie MHC-I und MHC-II interagieren sie mit naiven Lymphozyten [77]. Mittels der Sekretion von IL-12 wird in unreifen T-Lymphozyten die Ausbildung einer Typ-I-Polarisierung und eine Produktion von IFN- γ induziert [78, 79]. Neben Förderung einer Th-1 und Tc-1 tumorspezifischen Immunantwort [80, 81] leisten dendritische Zellen in der Tumorbekämpfung einen wichtigen Beitrag durch die Aufnahme apoptotischer Tumorzellen und der darauf folgenden Sezernierung von IL-1 β und TNF- α und Tumorantigenpräsentation gegenüber zytotoxischen T-Zellen [76]. Abbildung 3 gibt einen Überblick über die Interaktionen verschiedener Immunzellen nach Antigenkontakt.

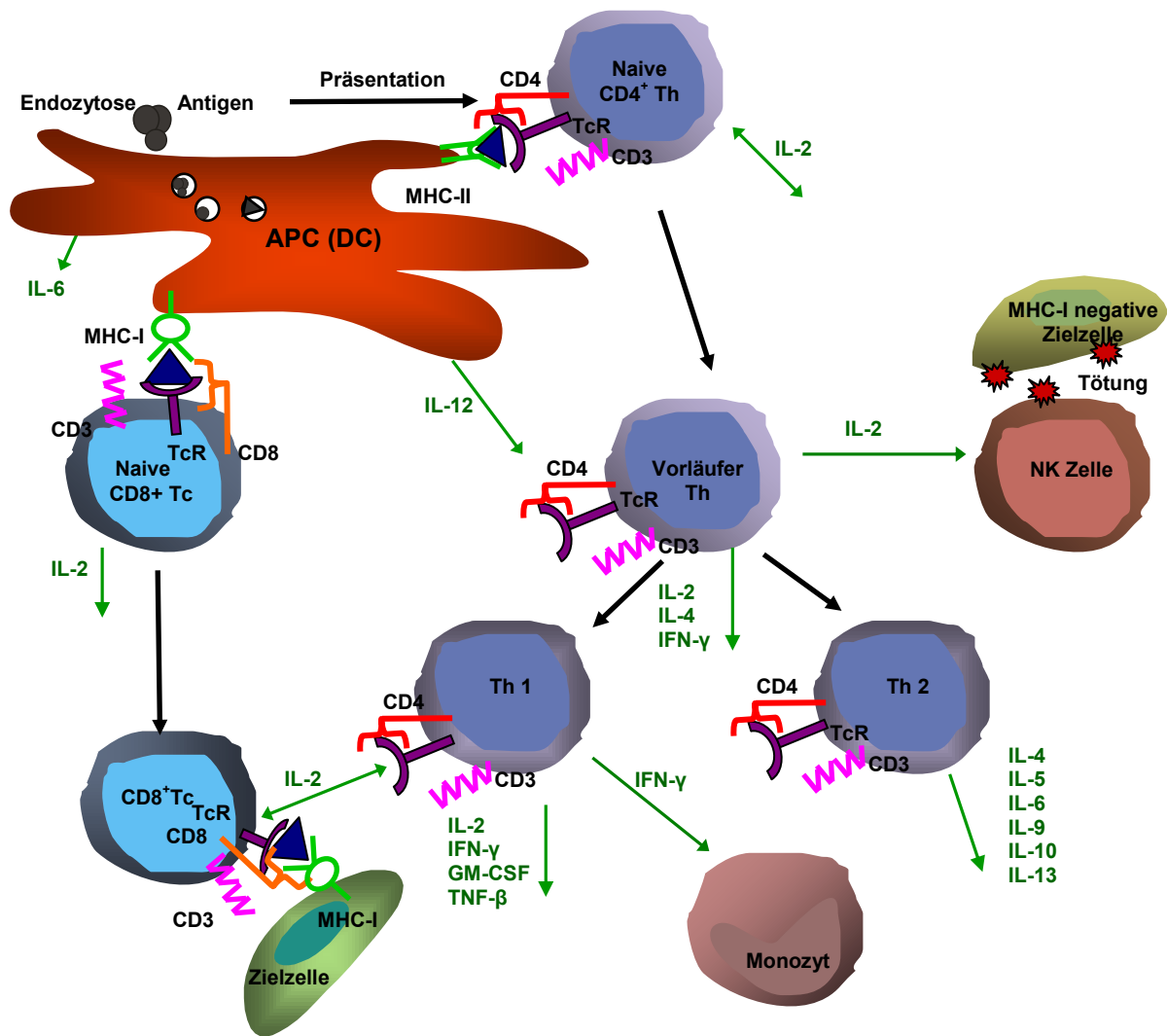


Abbildung 3: Zellinteraktionen im Immunsystem. Zu sehen sind verschiedene Mechanismen wie Zell-Zell Interaktion zwischen Antigen präsentierenden Zellen (APC), T-Lymphozyten in verschiedenen Differenzierungsstufen, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Monozyten, sowie die Sezernierung verschiedener Zytokine. Die Immunzellen werden durch den Einfluss verschiedener Zytokine, Interferone und Mediatoren sowohl stimuliert, als auch durch Rückkopplungsmechanismen reguliert.

1.6 Das Zytokinmilieu in *Helicobacter pylori* infiziertem Gewebe

Verschiedene Studien belegen eine Verschiebung des Zytokinmilieus in der Magenmukosa in Richtung Typ-I-Milieu nach Kontakt mit *H. pylori*. So wurde in Arbeiten von Bamford und Mitarbeitern sowie von Sommer und Mitarbeitern gezeigt, dass frisch isolierte CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten aus der Magenmukosa von Patienten mit einer *H. pylori* positiven Gastritis vornehmlich IFN- γ und nur geringe Mengen an IL-4 und IL-5 produzieren [82, 83]. RT-PCR-Analysen aus Magenmukosa-Biopsien *H. pylori* infizierter Patienten zeigten eine, im Vergleich zu *H. pylori* negativen Patienten erhöhte Expression der Typ-I-Zytokine IFN- γ , IL-12, IL-8 und IL-17. Kein Unterschied fand sich hingegen in der Expression der Typ-II-Zytokine IL-4 und IL-10 [84]. Hafsi und Mitarbeiter untersuchten die Reaktion humaner dendritischer Zellen nach 48 stündigem in vitro Kontakt mit *H. pylori*. Es zeigte sich in hohem Maße eine Reifung und Aktivierung der dendritischen Zellen sowie eine Th-1-Effektor Antwort nach Inkubation mit den bakteriellen Membranproteinen [85].

1.7 Bedeutung einer Typ-I-Immunantwort bei Tumorregression

Die Bedeutung einer Typ-I-Immunantwort konnte bei einer Vielzahl von Krankheiten wie etwa Entzündungskrankheiten oder viralen Erkrankungen wie Hepatitis C gezeigt werden. Des Weiteren spielt eine Typ-I-Immunantwort eine wichtige Rolle in der körpereigenen Zellabwehr maligner Tumore [55, 86]. So wiesen Winter und Mitarbeiter einen Zusammenhang therapeutischer Effizienz tumor-spezifischer T-Zellen mit der Produktion des Typ-I-Zytokins $\text{IFN-}\gamma$ auf [87]. Zytokinprofile in tumordrainierenden Lymphknoten verschiedener Tumore wurden untersucht, dabei konnte eine Tumorregression bei einer Immunabwehr durch CD8^+ , $\text{IFN-}\gamma$ sezernierenden T-Lymphozyten festgestellt werden [88, 89, 90].

Obwohl auch in Magenkarzinomgewebe tumorinfiltrierende T-Lymphozyten entdeckt wurden, ist noch wenig über ihre Spezifität oder Funktion bekannt [91, 92]. Analysen von Lymphozyten-Subpopulationen in Magenkarzinomgewebe beinhalteten bislang keine Untersuchungen zu tumorspezifischen Immunreaktionen bei Patienten mit Magenkarzinom [93, 94, 95]. Auch die Rolle dendritischer Zellen in der Reaktion von Immunzellen auf Magenkarzinomgewebe ist noch wenig erforscht.

1.8 Zielsetzung

In der in 1.3 erwähnten prospektiven klinischen Studie wurde eine Infektion mit *H. pylori* als ein unabhängiger prognostischer Faktor für die Überlebenswahrscheinlichkeit von Magenkarzinompatienten nach Gastrektomie identifiziert. Da bei Patienten mit einer *H. pylori* Infektion ein Typ-I-Zytokinmilieu im Magen nachgewiesen werden konnte, wäre eine Induktion tumorspezifischer, Typ-I polarisierter T-Lymphozyten durch *H. pylori* eine mögliche Erklärung für das verbesserte Überleben bei *H. pylori* positiven Magenkarzinompatienten.

Die in dieser Dissertation zu verfolgenden drei Hauptaufgaben sind:

1. Der Nachweis einer Induktion tumorspezifischer T-Zellen bei Magenkarzinompatienten in Primärtumorgewebe und tumor-assoziierten Lymphknoten.
2. Die Darstellung der Ausprägung einer tumorspezifischen Immunantwort bei *Helicobacter pylori* positiven und negativen Magenkarzinompatienten in Richtung Typ-I oder Typ-II Polarisierung.
3. Untersuchungen zu Präsenz und Aktivierung Antigen-präsentierender dendritischer Zellen in Tumorgewebe *Helicobacter pylori* positiver und negativer Patienten.

2. Material und Methoden

2.1 Prospektive klinische Studie

Im Zeitraum Januar 2002 bis Juni 2003 wurde ein Kollektiv aus 32 Patientinnen und Patienten aufgrund der Diagnose eines Magenkarzinoms im Klinikum Großhadern in München, Deutschland subtotal oder total gastrektomiert.

Diese Patienten wurden in eine klinische prospektive Studie mit dem Titel "Untersuchungen über Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort bei Helicobacter positiven und negativen Patienten mit Magenkarzinom – eine prospektive klinische Studie" aufgenommen. Diese Studie wurde zuvor von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität (Ethikantrag Nummer 240/01) genehmigt.

Patientenaufklärung, Einverständniserklärung

Jeder dieser Magenkarzinompatienten bekam im Vorfeld der Operation das freiwillige Angebot, an dieser Studie teilzunehmen. Sie/Er wurde durch einen bevollmächtigten Arzt ausführlich über Inhalt und Ablauf dieser Studie informiert und aufgeklärt. Durch Unterzeichnung der Einverständniserklärung willigte jeder Proband in die Teilnahme an der Studie ein (siehe Anhang). Die von den Magenkarzinompatienten gesammelten Materialien und Daten wurden unter der Bezeichnung „GC -Nummer...“ oder „CA-Nummer...“ registriert und in der Klinischen Forschung Chirurgie Großhadern aufbewahrt.

2.2 Gewinnung von Patientenmaterial

Sofort nach Entnahme des Magens bzw. des Magenteilresektats im Operationssaal wurde das Organ in das angrenzende Pathologiegebäude gebracht und durch einen Pathologen ein Stück makroskopisch sichtbares Tumorgewebe von der Außenseite des Magens entnommen. Der Magen wurde dabei nicht eröffnet, um eine Kontamination mit Mikroorganismen aus dem Mageninneren zu vermeiden. Der Tumor wurde sofort folgendermaßen verarbeitet:

TUMOR
1 Stück Tumor in einen 50 ml Falcon® Röhrchen, Firma BD, Heidelberg mit 30 ml RPMI –1640 2x Gentamycin (100 µg/ml) ↓ Zellkultur

Anschließend wurde der Magen entlang der großen Krümmung eröffnet und jeweils ein Stück Tumorgewebe, ein Stück Mukosa aus dem Corpus und ein Stück Mukosa aus dem Antrum möglichst tumorfern entnommen. Die Verteilung dieser Gewebeproben wurde folgendermaßen vorgenommen:

TUMOR	
1 Stück Tumor in ein Port-a-germ® pylori-Gefäß ↓ <i>Helicobacter pylori</i> Determinierung	1 Stück Tumor in ein 50 ml Falcon® Tube ↓ Transport in das Labor auf Eis ↓ Befestigung und Einbettung des Gewebestückes mit TissueTek® auf eine kreisförmige, 1 cm große Korkplatte ↓ Langsames Eintauchen des Gewebes in flüssigen Stickstoff bis das Tissue Tek® das Gewebe fest umschlossen hat. ↓ Aufbewahrung bei –40°Celsius ↓ Kryoschnitt

CORPUS, ANTRUM		
1 Stück Corpus/ 3 Stück Antrum jeweils in ein Port-a-germ® pylori ↓ <i>Helicobacter pylori</i> Determinierung	1 Stück Corpus/ 1 Stück Antrum in 3,7% neutrales Formalin (Warthin- Starry, M. Stolte, Bayreuth) ↓ <i>Helicobacter pylori</i> Determinierung	1 Stück Corpus/ 1 Stück Antrum jeweils in ein 50 ml Falcon® Tube ↓ Befestigung und Einbettung des Gewebestückes mit TissueTek® auf eine kreisförmige, 1cm große Korkplatte ↓ Langsames Eintauchen des Gewebes in flüssigen Stickstoff bis das Tissue Tek® das Gewebe fest umschlossen hat. ↓ Aufbewahrung bei -40° Celsius ↓ Kryoschnitt

Wenn bei Präparation ein Lymphknoten isoliert werden konnte, wurde dieser aus dem Magengewebe exzidiert und zur Zellisolation weiterverarbeitet bzw. mit dem gleichen Verfahren wie bei Tumorgewebe kryokonserviert.

Gewinnung von PBMC und Blutplasma

Zur Gewinnung von mononukleären Zellen im peripheren Blut (PBMC) sowie Blutplasma wurden am Tage vor der Operation oder während der Operation dem Patienten 40 ml Vollblut entnommen. Dazu wurden zwei 20 ml Spritzen mit je 1 ml Na(Li)-Heparin (B. Braun, Melsungen AG, Deutschland) zur Gerinnungshemmung verwendet. Das Vollblut wurde in zwei 50 ml Röhren gegeben und für sieben Minuten bei 405 x g, 21° C zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma abpipettiert, in 1 ml Röhren verteilt und bei -40° C eingefroren.

Das restliche Blut wurde mit jeweils 25 ml HBSS verdünnt und vorsichtig auf 10 ml Ficoll pipettiert. Für die Zelltrennung wurde 20 Minuten bei 814 x g, 20° C sowie einer Beschleunigung bzw. Verlangsamung auf niedrigster Beschleunigungsstufe zentrifugiert.

Die so erzeugte Interphase (mit den mononukleären Zellen/PBMC) zwischen Ficoll und HBSS wurde abpipettiert und in ein frisches 50 ml Tube gegeben. Nach Zugabe von 40 ml HBSS wurden die Zellen 15 Minuten bei 405 x g, 18° C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, die restliche Zellsuspension nach Zugabe von 45 ml HBSS 10 Minuten bei 353

Material und Methoden

x g, 18° C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde resuspendiert, in 10 ml HBSS aufgenommen, gezählt und letztmalig acht Minuten bei 405 x g, 18° C zentrifugiert. Zur Aufbewahrung der PBMC wurden diese resuspendiert und nach Zugabe von Einfriermedium in Kryoröhrchen verteilt; in ein Kryoröhrchen wurden ca. 5-6 x 10⁶ Zellen gegeben. Die Röhrchen wurden für 18 Stunden in einem Bad aus 90%igem Ethanol bei -80° C eingefroren, danach erfolgte eine Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff.

Gewinnung von Blutserum

Zur Gewinnung von Blutserum des Patienten wurde während der Operation 2 x 10 ml Blut mittels zwei Serumröhrchen (Serum Primavette® Z, KABE Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland) entnommen. Nach 30 minütiger Gerinnungszeit bei Raumtemperatur wurden die Serumröhrchen für 15 Minuten bei 405 x g und 4° C zentrifugiert. Das als Überstand gewonnene Blutserum wurde in ca. 10 Aliquots verteilt und bei -20° C eingefroren. Nach Sammlung mehrerer Serumproben wurden die Aliquots zur *H. pylori* Bestimmung gekühlt versandt.

2.3 Determinierung von *Helicobacter pylori*

Um bei den jeweiligen Magenkarzinompatienten eine stattgefundene Infektion mit dem Bakterium *H. pylori* nachweisen zu können, wurden an kooperierende Institute die gewonnenen Biopsien von Tumor, Corpus und Antrum sowie Serum des Patienten verschickt. Sowohl histologische, als auch mikrobiologische und serologische Untersuchungen wurden vorgenommen. Wenn in allen drei Untersuchungen kein Kontakt mit dem Bakterium nachgewiesen wurde, wurde der Patient als *H. pylori* negativ eingestuft. Im Falle eines direkten oder indirekten Nachweises des Bakteriums galt der Patient als *H. pylori* positiv.

2.3.1 Histologischer Nachweis von *Helicobacter pylori*

Zur histologischen Untersuchung auf *H. pylori* wurden Gewebeproben aus Corpus und Antrum des Patienten in Formalin konserviert und an das kooperierende Institut für Pathologie, Professor Dr. M. Stolte, Klinikum Bayreuth, Preuschwitzer Str. 101, 95445 Bayreuth verschickt.

2.3.2 Mikrobiologischer Nachweis von *Helicobacter pylori*

Für den mikrobiellen Nachweis von *H. pylori* wurden Proben aus Tumorgewebe, Corpus und Antrum in Port-a-germ Gefäßen an die Abteilung Mikrobiologie und Hygiene Professor Kist, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Hermann-Herder-Straße 11, 79104 Freiburg i. Br. gesandt. Weitere Antrum Proben wurden zum direkten Nachweis des Bakteriums an Professor Dr. N. Lehn, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg, Franz-Josef-Strauß-Allee 11, 93059 Regensburg und an das Max-von-Pettenkofer Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Pettenkoferstraße 9a, 80336 München gesandt.

2.3.3 Serologischer Nachweis von *Helicobacter pylori*

Eine serologische Untersuchung des Patientenserums auf *H. pylori* IgA und IgG Antikörper erfolgte in den Instituten von Professor Kist in Freiburg und dem Max-von-Pettenkofer Institut in München.

2.4 Pathologischer Befund und Patientenstatus zum Zeitpunkt der Operation

Von jedem Magenkarzinompatienten dieser klinischen Studie wurden sowohl persönliche Daten wie Alter und Geschlecht, als auch klinische Daten wie der Gastrektomie-Operationsbericht und der Verlauf von Tumormarkern CEA, CA 19-9, CA 72-4 und CA 50 gesammelt. Die Informationen zur postoperativen Tumorklassifizierung nach UICC (Union Internationale Contre Le Cancer) 2002 und der histologische Befund gemäß der Laurén Klassifikation für das Magenkarzinom 1965 wurden den jeweiligen Arztbriefen entnommen. Tabelle 1 und 2 zeigen die Klassifizierung des Magenkarzinoms nach dem TNM Stadium bzw. nach Laurén:

Tabelle 1: Klassifizierung des Magenkarzinoms nach TNM Stadium

T _{is}	Carcinoma in situ, auf die Lamina epithelialis mucosae beschränkt
T ₁	Tumor infiltriert die Lamina propria mucosae oder max. bis zur Submucosa
T ₂	Tumor infiltriert die Muscularis propria
T ₃	Tumor penetriert die Serosa
T ₄	Tumor infiltriert benachbarte Strukturen
N ₁	Metastasen in perigastrischen Lk < 3 cm entfernt vom Primärtumor
N ₂	Metastasen in perigastrischen Lk > 3 cm entfernt vom Primärtumor oder entlang der großen Gefäße
M ₁	Fernmetastasen oder Befall nicht regionärer Lk

Tabelle 2: Klassifizierung des Magenkarzinoms nach Laurén

Karzinom vom Intestinalen Typ:	Mit überwiegend Drüsen, meist polypös
Karzinom vom Diffusen Typ:	Mit infiltrativem Wachstum in der Magenschleimhaut

2.5 Zellkultur

2.5.1 Zellkulturbedingungen

Die Zellkultur wurde unter sterilen Arbeitsbedingungen betrieben. Folgende Materialien, Lösungen und Geräte standen zur Verarbeitung des Patientenmaterials (Tabellen 3-5) zur Verfügung:

Tabelle 3: Materialien zur Zellkultur

Materialart	Herkunft
Sterile Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Costar®, Corning, NY, USA
Sterile Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Deutschland
Einmalskapell Größe 22	Feather, Osaka, Japan
BD Tube 15 ml, 50 ml	Blue Max™, Falcon, BD, Heidelberg
Tube 1 ml, 2 ml	Nunc, A/S, Roskilde, Dänemark
Kryoröhrchen	Simport, Quebec, CA
FACS-Röhrchen	BD Bioscience, Erembodegem, Belgien
T-25, T-50 Zellkulturflaschen	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Sterile Petrischalen	Corning, New York, USA
100 µm Nylon Netzfilter	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
Neubauer Zählkammer	Blue Max™, Falcon, BD, Heidelberg
24 Well Platten	Corning, New York, USA
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA

Tabelle 4: Medien, Puffer und Lösungen zur Zellkultur

Medien, Puffer, Lösungen	Zusammensetzung	Herkunft
Medium	RPMI-1640, 2x Gentamycin (100 µg/ml)	Cambrex BioScience, Verviers, Belgien
Spezialmedium für Tumorzellen: Complete Medium (CM)	RPMI 1640 + 0,1 mM nichtessentielle Aminosäuren + 1 mM Pyruvat, + 2 mM L-Glutamin, +50 µg/ml Gentamicin +50 µM 2- Mercaptoethanol +10% FCS	Cambrex BioScience Cambrex BioScience Cambrex BioScience Cambrex BioScience Sigma Gibco, NY, United States
Spezialmedium für Lymphozyten	X-Vivo-15 +Interleukin-2 (1200, 3000, 6000 IE)	Cambrex BioScience Proleukin, Chiron, Ratingen
HBSS	0,05% in PBS	Cambrex BioScience
Trypsin		PAN Biotech GmbH, Aldenbach
Phosphate Buffered Saline (PBS)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ in Aqua. Dest. (pH 7,3)	Merck, Darmstadt
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid	Sigma
FACS-Puffer	0.2% NaN ₃ , 1% BSA in PBS	Sigma Biomol, Hamburg, Deutschland
RNAse freies, destilliertes Wasser		Millipore, Billerica, USA
Ficoll 1.077g/ml Hypaque, RT		Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norwegen
HBSS mit Phenolrot, RT		Cambrex BioScience
Einfriermedium	90% FCS, 10%DMSO (Dimethyl-Sulfoxid)	Sigma
Dreifach-Enzymlösung: Desoxyribonuklease-I Kollagenase Hyaluronidase	0,02 mg/ml 0,25 mg/ml 0,1 mg/ml In RPMI1640 steril filtriert	Sigma Sigma Sigma
Trypanblau		Merck
TissueTek®		O.C.T. Compound, Sakura, Zoeterwoude, Niederlande

Tabelle 5: Zellkultur-Geräte

Geräteart	Herkunft/Firma
Arbeitsbank	Gelaire®, BSB 6A, Flow Laboratories GmbH, Meckenheim
Brutschrank	US-AUTO-Flow®, NuAir, Phymouth, Minnesota, USA 37 °C/ 5% CO ₂ , mit internem Wasserbad *
Gefrierschrank –40°Celsius	Linde, München, Deutschland
Gefrierschrank –80°Celsius	Colora, Lorch, Deutschland
Gefriertank mit flüssigem Stickstoff	Air Liquide Kryotechnik GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Mikroskop	IDO 3, Zeiss
Zentrifuge	Rotixa/ PR, Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge	Zentrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg
Vortexgerät	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf
Handpipetten 2 µl, 10 µl, 100 µl und 1000 µl Eppendorf	Eppendorf
Elektrorührer	IKA, Combimag, RCO, Staufen, Deutschland
Waagen, geeicht	Balance FX-40, A&D Elektronik, Frankfurt am Main und PL 1200, Mettler, Giessen

* internes Wasserbad: gefüllt mit Aqua dest. (Fresenius, Bad Homburg) und Sigmaclean® (water bath treatment, Sigma, Steinheim)

2.5.2 Gewinnung von Tumorzellen aus dem Primärtumor (Tu-Sto)

Verarbeitung von frischem Tumorgewebe

Die Verarbeitung der Tumorstücke erfolgte unter sterilen Bedingungen in der Zellkultur-Werkbank. Das Tumorgewebe wurde in eine große Petrischale gegeben. Mit Hilfe von zwei Skalpelln wurde der makroskopisch sichtbare Tumoranteil vom übrigen mitentfernten Gewebe getrennt und in etwa 2 x 2 mm große Stücke zerkleinert. Nach Zugabe von wenigen Millilitern RPMI 1640 wurden die kleinsten Tumorstücke (Durchmesser 1 mm) abpipetiert, in Röhrchen verteilt und für 10 Minuten bei 180 x g zentrifugiert. Anschließend wurde diese Tumorsuspension mit ca. 5 ml Complete Medium in T-25 Zellkulturflaschen gegeben und im Brutschrank kultiviert. Die größeren Tumorstücke wurden zusammen in RPMI 1640 und zweifach Gentamycin sowie der Dreifach-Enzym-Lösung in ein 50 ml Tube gegeben. Ein Gramm Gewebe wurde mit mindestens 25 ml Lösung versetzt.

Der Verdauungsprozess fand über Nacht bei Raumtemperatur statt; zur homogenen Verteilung des Tumor-Enzymgemisches wurde das nach Zugabe eines Rührfisches mit Parafilm versiegelte Röhrchen auf einen Rührer gestellt. Am nächsten Tag wurde die Suspension durch ein 100 µm poriges Nylonnetz gefiltert und in einem 50 ml Tube 10 Minuten bei 180 x g und 18° C zentrifugiert. Nach Verwerfung des Überstandes wurden die Zellen in fünf ml RPMI 1640 mit 2x Gentamycin resuspendiert und gezählt. Nach erneutem Abzentrifugieren wurden 2×10^6 Tumorzellen mit Complete Medium in T-25 Zellkulturflaschen in Kultur gegeben. 2-3 x 10^6 Tumorzellen wurden jeweils als frisch verdaute Tumorzellen in ein Kryoröhrchen mit 300 µl Einfriermedium eingefroren.

Etablierung von Tumorzelllinien

Die in T-25-Zellkulturflaschen befindlichen Tumorzellen wurden wöchentlich mit frischem Complete Medium gefüttert und deren Wachstumsverhalten unter dem Mikroskop kontrolliert. Sobald die Kulturflasche konfluent bewachsen war, wurde die Kultur in die jeweils nächstgrößere (T 75) Zellkulturflasche expandiert.

Zur Passagierung der Tumorzellen wurden nach Entfernung des Complete Medium die Zellen für ca. zwei Minuten mit 1 mM EDTA in PBS benetzt. Der Ablösungsvorgang der Zellen wurde durch Zugabe von Complete Medium gestoppt, nach Zentrifugierung der Zellsuspension wurden die Zellen weiterkultiviert bzw. weggefroren. Falls die Tumorzellen sich unter EDTA Gabe nur schwer ablösten, wurde nach einem Waschvorgang Trypsin zur Passagierung verwendet.

2.5.3 Gewinnung von Tumor infiltrierenden T- Lymphozyten (TIL) aus dem Primärtumor

Tumorgewebe-Verarbeitung

Gleichzeitig zur Verarbeitung des frischen Tumorgewebes zur Tumorzellisolierung (siehe 2.5.2) erfolgte eine Isolierung der das Tumorgewebe infiltrierenden Lymphozyten. Zur Anzüchtung der TIL wurden zum Einen die unbehandelten kleinen Tumorgewebestücke in das leukozytenspezifische Nährmedium X-Vivo 15 mit 200 Units/ml Interleukin-2 (1200 IE) zur Wachstumsstimulierung gegeben, gleichmäßig in eine 24-Well Platte verteilt und bei 37° C kultiviert. Des Weiteren wurde ein Teil des über Nacht verdauten Tumorgewebes mit X-Vivo 15 und 200 Units/ml Interleukin-2 in eine weitere 24 Well Platte gegeben. Ca. $0,5 \times 10^6$ Lymphozyten wurden dabei in einem Well kultiviert.

Kultivierung der Tumor infiltrierenden Lymphozyten

Als Anzeichen für den Verbrauch der Nährflüssigkeit durch die Lymphozyten diente ein makroskopisch sichtbarer Farbumschlag des X-Vivo 15 von dunkelorange zu gelb. Die im Nährmedium in Form von sogenannten „Clolds“ (verschiedene T-Zellklone) nicht adhärent wachsenden T-Lymphozyten wurden daraufhin bei 259 x *g* in 8 Minuten 19° C von der Flüssigkeit getrennt und nach Resuspendierung die Passage in das nächstgrößere Kultivierungsgefäß (T 25) mit X-Vivo 15 und 200 Units/ml Interleukin-2 gegeben bzw. mit jeweils 6×10^6 Leukozyten pro Kryogefäß eingefroren.

2.5.4 Gewinnung von autologen Tumorzellen aus Lymphknotenmetastasen (LN-Tu)

Ein durch den Tumor makroskopisch sichtbar befallener Lymphknoten wurde nach operativer Entnahme auf gleiche Weise wie ein Primärtumor verarbeitet und kultiviert. Durch Gabe von Complete Medium wurden Tumorzellen aus dem Lymphknoten zur Gewinnung einer „LN-Tu“ Lymphknotenmetastasen-Tumorzelllinie kultiviert. Zur Anzucht von „LN-T-Zellen“ wurde das verarbeitete Gewebe mit X-Vivo 15 und 200 Units/ml Interleukin-2 genährt.

2.5.5 Gewinnung von T-Lymphozyten aus einem tumorfreien Lymphknoten (LN-Tcell)

Mit wenigen Millilitern RPMI 1640 2x Gentamycin wurde der Lymphknoten in eine Petrischale gegeben und mittels eines Skalpell durchtrennt. Durch makroskopische Begutachtung wurde ein Tumorbefall ausgeschlossen. Mit Hilfe des Stempels einer 10 ml-Einmalspritze wurde das Gewebe anschließend zerdrückt, bis eine homogene Zell-Suspension entstand. Diese Suspension wurde durch ein 100 µm poriges Nyloonsieb in einen 50 ml Tube gefiltert und vom RPMI 1640 bei 259 x *g* für 10 Minuten und 18° C getrennt. Zur Anzucht der Lymphozyten („LN-Tcells“) wurden jeweils 1×10^6 Zellen / Well einer 24-Well Platte mit X-Vivo 15 und 200 Units/ml Interleukin-2 kultiviert.

Abbildung 4 verdeutlicht noch einmal das Prozedere zur Aufarbeitung gewonnener Proben eines Magenkarzinompatienten:

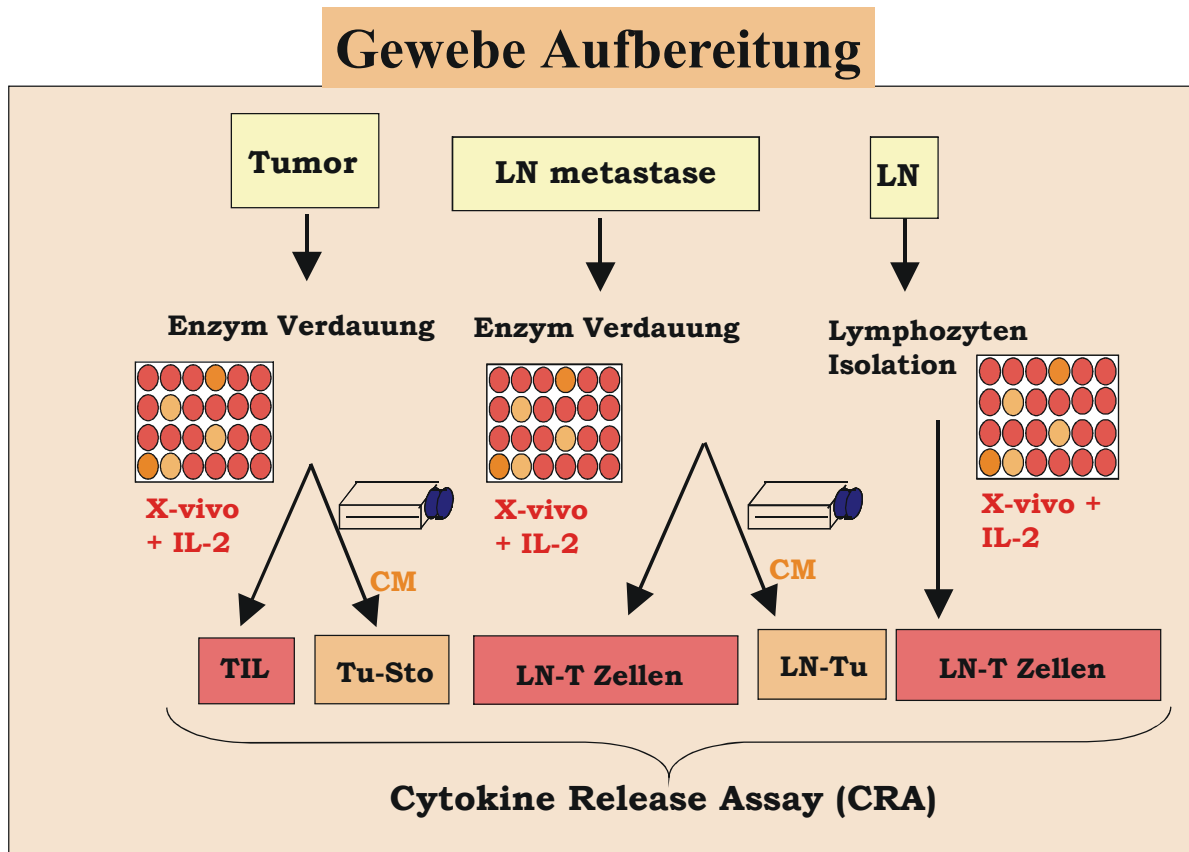


Abbildung 4: Prozedere der Aufbereitung von Patientenmaterial. Schematisch dargestellt ist die Aufarbeitung des gewonnenen Patientengewebes (Primärtumor, Lymphknotenmetastase, Lymphknoten) zur Vermehrung von Tumorzellen und T-Lymphozyten.

2.6 Charakterisierung der Tumorzellen

Tumorzellen und T-Lymphozyten wurden voneinander isoliert kultiviert, damit die Zellen ohne „Fremdeinfluss“ des Interaktionspartners sich vermehren konnten. Im Folgenden wurden Charakteristika beider Zellarten in verschiedenen Untersuchungen analysiert, welche zur Differenzierung einer spezifischen Immunantwort der T-Lymphozyten nötig waren. In einer, aus einem Magentumor gewonnenen Primärkultur, wurden methodenbedingt neben den Karzinomzellen in geringem Umfang auch andere Zellen wie etwa Fibroblasten, Muskelzellen und Immunzellen mitkultiviert. Um den prozentualen Anteil der Karzinomzellen und damit die „Reinheit“ der erwünschten Tumorzelllinie ausmachen zu können, wurde das gezüchtete Gewebe mit einer Reihe von Antikörpern, welche für die jeweiligen Zellarten spezifisch sind, in einer Zytopsin-Färbung charakterisiert.

Um herausfinden zu können, ob eine antigenspezifische Aktivierung über MHC-Klasse I durch CD8-positive T-Zellen bzw. MHC-Klasse II durch CD4 positive T-Zellen möglich ist, wurde weiterhin die HLA-Expression auf den Tumorzelllinien in einer durchflusszytometrischen Analyse bestimmt. Da sich bekanntermaßen HLA-Klasse I-Moleküle auf allen kernhaltigen Körperzellen und einigen Tumorzellen befinden, während HLA-Klasse II-Isotypen hauptsächlich in Zellmembranen phagozytischer Zellen verankert sind, wurde eine MHC Klasse-I-Expression auf den Karzinomzellen erwartet.

2.6.1 Immunhistochemische Zytospin-Analyse der Karzinomzellen

Folgende Substanzen wurden zur indirekten Immunperoxidasefärbung verwendet:

Tabelle 6: Materialien zur Immunperoxidasefärbung

Substanz	Herkunft
Azeton	Fluka, Hannover
AB Serum	Biotest, Dreieich
H ₂ O ₂	Merck
Biotin-Avidin Blocking- Kit	Vector Laboratoires, Burlingame, USA
Mayers Hämalaunlösung	Merck
Kaisers Glyceringelatine	Merck
AEC-Färbelösung (Endkonzentration): 50 mg 3-Amino-9-ethylcarbazol + 5 ml N,N-Dimethylformamide in 200 ml Aqua dest + 2 ml 10 M Natriumacetat (pH 4,9) + 100 µl 30% H ₂ O ₂	Sigma Fluka B.Braun, Melsungen Merck Merck

AEC-Färbelösung

Kurz vor Anfärbung der Objektträger wurde die AEC-Färbelösung angesetzt. Dazu wurden 50 mg Aminoethylcarbazol abgewogen und in 5 ml N,N-Dimethylformamid gelöst. Außerdem wurden in einem, mit 200 ml Aqua dest gefüllten Glaskolben 2 ml 10 M Natriumacetat Stammlösung gegeben. Anschließend wurde das Natriumacetat/Aqua destillata Gemisch der AEC/N,N-Dimethylformamidlösung zugefügt. Danach wurden 100 µl 30%iges H₂O₂ zugegeben.

Zur Immunperoxidasefärbung standen folgende Antikörper zur Verfügung:

Tabelle 7: Primärantikörper, Isotypkontrollen, Peroxidaseantikörper und Verdünnung der Arbeitslösung zur Immunperoxidasefärbung

Primärantikörper	Konzentration	Oberflächenmarker	Herkunft
KL1	3 µg/ml 1:100	Zytokeratin	Immunotech, Marseille, Frankreich
Ber-Ep4	5 µg/ml 1:100	Epithelzellen	Dako, Glostrup
alpha-smooth muscle actin	0,7 µg/ml 1:100	glatte Muskelzellen	Dako
Vim 3B4	0,6 µg/ml 1:35	Vimentin	Dako
T200	4,5 µg/ml 1:100	Leukozyten	Dako
CD31	2 µg/ml 1:100	Endothelzellen	Immunotech
CD68	5 µg/ml 1:100	Makrophagen	Serotec, Düsseldorf
CD209 DCSign	1,25 µg/ml 1:100	native dendritische Zellen	Cambrex BioScience
Isotypkontrolle	Konzentration	Marker	Herkunft
MOPC-21	10 µg/ml 1:100	IgG1	Sigma
UPC-10	2 µg/ml 1:100	IgG2a	Sigma
Sekundärantikörper	Konzentration	Marker	Herkunft
Peroxidase-konjugierter Antikörper	1/200 in 10%AB Serum in PBS	Hase Anti-Maus IgG	Dako

Zytospin und indirekte Immunperoxidasefärbung

Die Tumorzellen wurden zweimal in PBS gewaschen und anschließend in PBS auf 1×10^6 Zellen/ml resuspendiert. Mittels einer Zytocentrifuge (Shandon Cytospin 2) wurden 100 µl Zellsuspension auf einen Objektträger aufgetragen. Für die Positivkontrolle der Anfärbung wurden Gefrierschnitte einer gesunden Magenmukosa angefertigt. Die Zellen und das Gewebe wurden über Nacht luftgetrocknet. Nach 10 minütiger Fixierung mit Azeton und kurzer Trocknungszeit wurden zur Verhinderung einer unspezifischen Bindung der Antikörper auf den Zelloberflächen die Objektträger in einer feuchten Kammer mit 10%igem humanem AB-Serum in PBS für 20 Minuten inkubiert. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurde für drei Minuten 0,3% H₂O₂ in PBS hinzupipetiert. Nach 3 x 5 Minuten Waschvorgang in PBS wurden die Zellen mit 100 µl des jeweiligen Primärantikörpers bzw.

der Isotypkontrolle beschichtet (siehe Tabelle 7). Jeder Antikörper wurde in 10% AB Serum in PBS verdünnt. Nach 60 Minuten Inkubationszeit folgte ein weiterer Waschvorgang in PBS. Anschließend wurden pro Objektträger 100 μ l des Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpers (in 10% AB Serum in PBS) aufgetragen und 30 Minuten inkubiert. Zur Anfärbung des Gewebes wurden die Objektträger für acht Minuten in die frisch angesetzte AEC -Färbelösung gegeben, anschließend erfolgte nach gründlicher Spülung mit Leitungswasser eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun (ca. 3 Sekunden). Die Objektträger oder Präparate wurden mikroskopisch bei 200facher Vergrößerung untersucht. Pro Objektträger wurden 20 Areale von jeweils 0,11 mm² ausgezählt.

2.6.2 Charakterisierung der Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie

Grundprinzipien des Messverfahrens

Die Expression von HLA-Molekülen auf der Oberfläche der Tumorzellen sowie das Vorhandensein von CD4⁺ bzw. CD8⁺ Rezeptoren auf den T-Lymphozyten wurde mittels „FACS“ Durchflusszytometrie bestimmt. Die Abkürzung FACS steht für „fluorescent activated cell sorter“. Dabei werden Einzelzellsuspensionen durch eine Messkapillare gepumpt, auf welche ein 488 nm-Argonlaser gerichtet ist. Die Ablenkung des Laserstrahls durch jede erfasste Zelle wird photometrisch auf ihre Fluoreszenzintensität und Streulichtintensität bestimmt und dieser Analogpuls als ein „Ereignis“ durch einen Analog-Digital Wandler in ein digitales Signal konvertiert. Auf diese Weise werden vier Parameter einer jeden Zelle bestimmt: Die Lichtstreuung im Vorwärtsstreulicht (Forward-Scatter, FSC) gibt eine Aussage über die Größe der jeweiligen Zellen. Aussagen über die Zellstruktur liefert das Seitwärtsstreulicht (Side-Scatter, SSC).

Weiterhin werden die Zellen mit Antikörperkonjugaten inkubiert, welche durch definierte Zelloberflächenmarker sich unterschiedlich an die Zellen binden und so zu deren Charakterisierung beitragen. Der Farbstoff Fluorescein Isothiocyanat (FITC) fluoresziert nach Aktivierung durch den Laser grünlich, welches im Fluoreszenz-Kanal 1 bei 520 nm detektiert wird. Die rote Lichtemission von Phycoerythrin (PE) wird dagegen bei 575 nm im Fluoreszenzkanal 2 aufgenommen. Der Farbstoff Propidiumjodid (PI), welcher bei 620 nm die Peak Emission besitzt und zur Abgrenzung der lebenden Zellen von Zelltrümmern und Verunreinigungen dient, wird im Fluoreszenzkanal 3 detektiert. Die graphische Umwandlung der Messergebnisse ist in Abbildung 5 dargestellt:

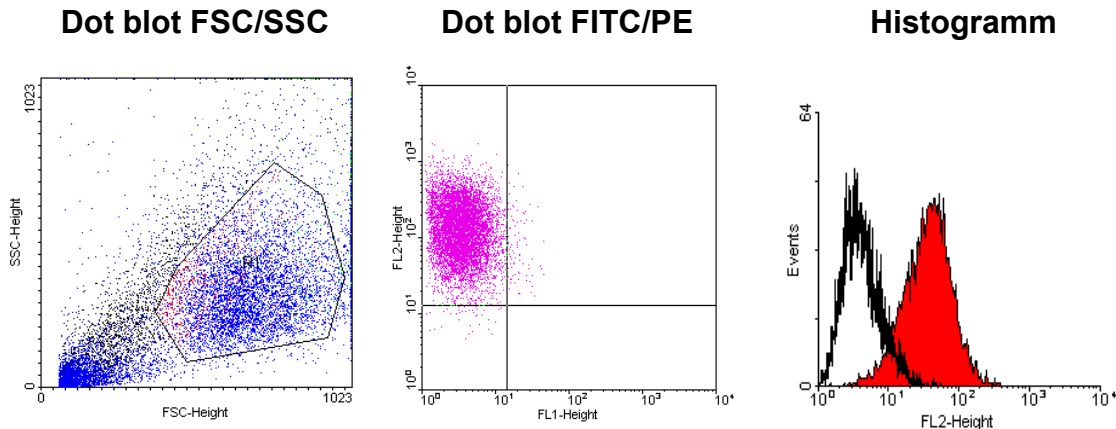


Abbildung 5: Darstellung von Farbmessungen der Zellen nach durchflusszytometrischer Untersuchung. Sowohl die Größe (FSC-Height), als auch die Granularität (SSC-Height) geben Aufschluss über die Zellart (hier blau dargestellt). FL1-Height und FL-2 Height zeigen für jedes erfasste, hier rosa als Dot blot bzw. rot im Histogramm farbig abgebildete Ereignis (Zelle oder Zellbestandteil) an, ob der hinzugegebene Farbstoff gebunden hat, oder nicht.

Allgemeine Darstellungsformen von FSC/SSC und Zweifarbenmessungen in einem sogenannten „Dot blot“ stellen die Grundeinstellungen in einer FACS-Analyse dar. Jedes Ereignis erhält je nach Größe und Farbintensität einen Punkt in einem Diagramm, dessen Achsen den entsprechenden untersuchten Parametern zugeordnet sind. Bei Messung einer einzigen Fluoreszenz werden die Intensitäten gegen die gezählten Ereignisse in einem Histogramm aufgetragen.

Die Messungen wurden an einem FACS-Calibur Durchflusszytometer mit der dazu passenden Software Cell Quest pro (BD BioScience) durchgeführt, die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software WINMDI Version 2.8 (<http://facs.scripps.edu/software.html>).

Untersuchung der Tumorzellen auf ihre HLA-Expression

Die Präparation der Tumorzellen zur FACS-Analyse wurde wie im Folgenden beschrieben durchgeführt: Die etablierten Zelllinien wurden aus den Zellkulturflaschen geerntet und durch Zentrifugieren mit 259 x g für acht Minuten bei 19° C von der Nährlösung getrennt. Anschließend wurde zum Waschen auf Eis gekühltes HBSS zugegeben und die Zellen gezählt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt mit 405 x g für acht Minuten und 4° C wurden jeweils 0,5x10⁶ Tumorzellen/ml FACS Puffer resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen gegeben. Nach Zentrifugieren der FACS-Röhrchen und Resuspendierung wurden abermals die Zellen mit 2 ml FACS-Puffer pro Röhrchen gewaschen und die Flüssigkeit

Material und Methoden

abzentrifugiert. Anschließend wurden je 3-5 μl Antikörper/ 1×10^6 Zellen in folgender Konzentration hinzupipetiert:

Tabelle 8: Liste der Antikörper zur Bestimmung der HLA-Oberflächenmoleküle pro FACS-Röhrchen

Röhrchen	Antikörper	Oberflächenmarker	Firma	Konjugation
1	kein Antikörper	-	-	unkonjugiert
2	mIgG1 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FACS Puffer	Isotypkontrolle zu MHC-I	BD Biosciences	FITC
3	mIgG2a 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FACS Puffer	Isotypkontrolle zu MHC-II	PharMingen, Heidelberg	PE
4	HLA-DR 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FACS Puffer	MHC-II	BD Biosciences	FITC
5	HLA-ABC 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FACS Puffer)	MHC-I	BD Biosciences	PE

Nach 15 Minuten Inkubation im Dunkeln und 4°C wurden unter Vortexen mittels Zugabe von 4 ml kaltem FACS-Puffer nicht gebundene Antikörper herausgewaschen. Die Zellen wurden zentrifugiert, der Überstand abgegossen und in FACS Puffer resuspendiert. Zur Anfärbung abgestorbener Zellen wurden dem zu messenden Röhrchen 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Propidiumjodid in FACS Puffer hinzugefügt. Anschließend wurde im FACS-Gerät gemessen.

2.7 Charakterisierung von T- Lymphozyten

2.7.1 Durchflusszytometrische Bestimmung des prozentualen Anteils CD4 und CD8 positiver Lymphozyten in den T-Zell-Cloids

In der Zellkultur gewachsene T-Zell-Cloids enthalten sowohl CD8 positive, als auch CD4 positive T-Lymphozyten. Da vornehmlich CD8 positive T-Zell-Klone mit den MHC-I exprimierenden Karzinomzellen interagieren, mussten vor einer Untersuchung einer tumorspezifischen Immunantwort der T-Lymphozyten dieser Cloids auf ihren prozentualen Anteil an CD8 positiven T-Zellen untersucht werden, welche im späteren Experiment auf den Kontakt mit den entsprechenden autologen Tumorzellen interagieren sollten.

Die Frequenz der CD8 bzw. CD4 T-Zellen wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. Die Durchführung erfolgte analog der Durchflusszytometrie zur Bestimmung der HLA-Expression der Tumorzellen. Folgende Antikörper wurden zur Detektierung der CD-Oberflächenmoleküle verwendet:

Tabelle 9: Cluster of differentiation (CD)-Antikörper

Röhrchen	Antikörper	Oberflächenmarker	Klon	Konjugation
1	kein Antikörper	-	-	unkonjugiert
2	mIgG1 2,5 µl/ml FACS Puffer	Isotypkontrolle zu CD3	BD Biosciences	PE
3	mIgG1 2,5 µl/ml FACS Puffer	Isotypkontrolle zu CD4/CD8	BD Biosciences	FITC
4	CD 3 2,5 µl/ml FACS Puffer	CD3	BD Biosciences	FITC
5	CD 3 2,5 µl/ml FACS Puffer	CD3	BD Biosciences	PE
6	CD 4 4,0 µl/ml FACS Puffer	CD4	PharMingen	FITC
7	CD 8 2,5 µl/ml FACS Puffer	CD8	BD Biosciences	FITC

Alle in Tabelle 9 gelisteten Antikörper wurden von der Firma BD BioSciences bezogen. Der Messvorgang erfolgte wie auch bei der FACS Analyse der Tumorzellen in einem FACS-Calibur Gerät der Firma BD BioScience, die Datenauswertung bzw. statistische Datenerhebung wurde mit dem Programm WINMDI28 Software ausgeführt.

In den Abbildungen 6 bis 8 sind verschiedene Beispiele für eine T-Lymphozyten-FACS-Auswertung veranschaulicht:

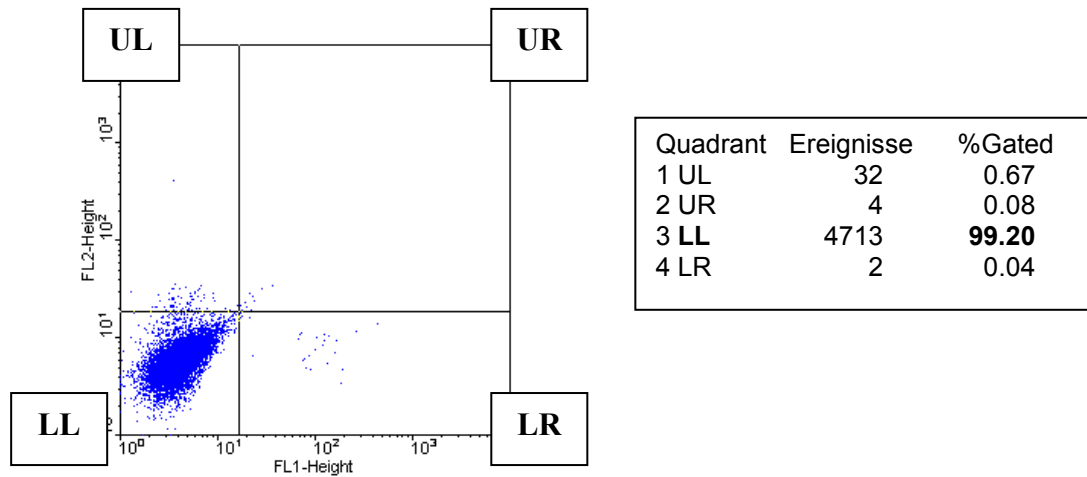


Abbildung 6: Bild einer FACS Darstellung von T-Lymphozyten. Dargestellt sind T-Zellen in einer Negativkontrolle. Die Zellen stellen sich zu über 99% im unteren linken Quadranten dar (LL steht für „lower left“) und zeigen damit keine Farbreaktion, was als Ausgangsbild zu Beurteilung nachfolgender Positiv-Färbungen dient.

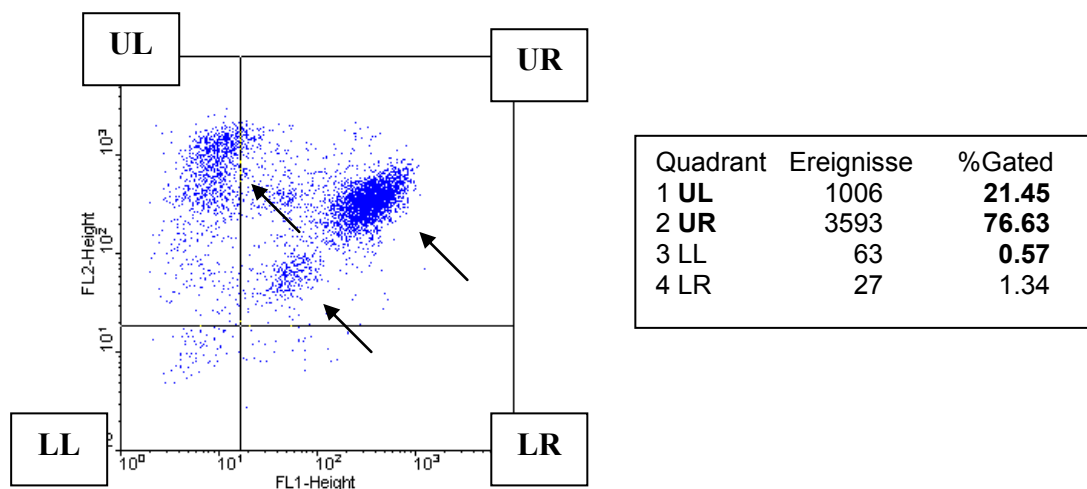


Abbildung 7: Bild einer FACS Auswertung von T-Lymphozyten nach Inkubation mit den Antikörpern CD3 PE und CD8 FITC. Entlang der Y-Achse (FL2) sind CD3 positive Zellen zu sehen, entlang der X-Achse (FL1) CD8 positive Zellen. Insgesamt wird eine prozentuale Verteilung der CD3/CD8 positiven T-Zellen dargestellt. Auffällig ist auch die unterschiedliche Anordnung der T-Zell-Populationen (siehe Pfeile).

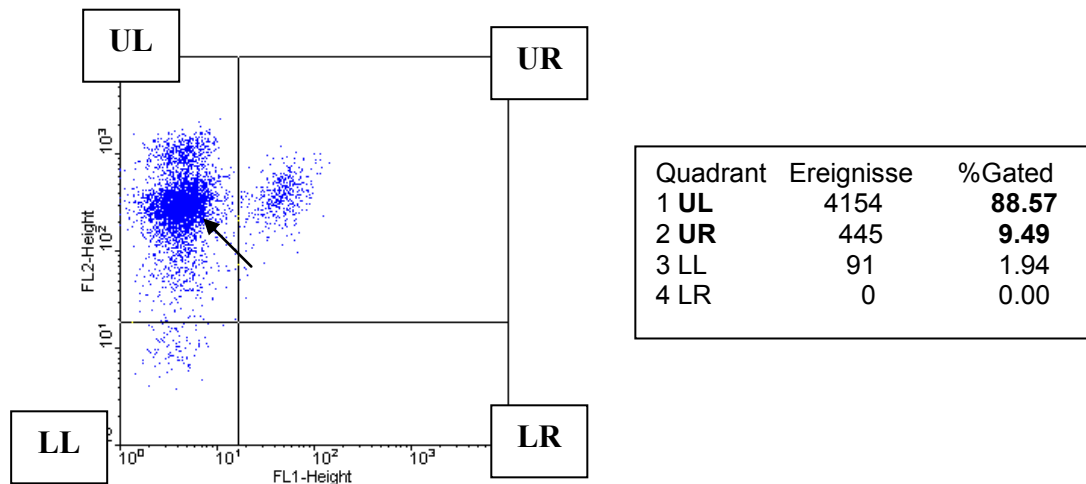


Abbildung 8: Bild einer FACS Auswertung derselben T-Lymphozytenklone wie in Abbildung 7, diesmal nach Inkubation mit den Antikörpern CD3 PE und CD4 FITC. In Prozent ist die Verteilung der CD3 (FL2)/ CD4 (FL1) positiven T-Zellen angegeben. Auch hier ist eine Trennung der T-Zellen in die unterschiedlichen Populationen deutlich, wobei die große Zellpopulation, welche in Abbildung 7 CD3/CD8 positiv war, hier nur mehr CD3 positiv zu sehen ist (siehe Pfeil) und nicht mit dem CD4 Antikörper angefärbt hat. Auf diese Weise ist eine quantitative Unterscheidung von zytotoxischen T-Zellen und T-Helfer Zellen innerhalb einer T-Zellgruppierung möglich.

2.7.2 Bestimmung des HLA-Genotyps aus T-Lymphozyten

In einem Cytokine Release Assay (CRA) wurden sowohl die Magenkarzinomzellen des Patienten als auch allogene Magenkarzinomlinien und Kontrolltumorzellen wie Nierenkarzinomzellen und Melanomzellen eingesetzt. Um genauer auf deren Spezifität eingehen zu können, wurde eine Aufschlüsselung der einzelnen HLA-Allele dieser Zelllinien durchgeführt. Zu untersuchen war, ob es zwischen den unterschiedlichen Zellarten gemeinsame HLA-Allele gibt, wodurch eine Provokation der T-Zellen zur Zytokinausschüttung auch durch fremde Tumorzellen möglich sein könnte. Ein weiterer Grund zur Bestimmung des HLA-Genotyps aus T-Lymphozyten ist der Einsatz der T-Lymphozyten in einem CRA zusammen mit Tumorzellen allogener Zelllinien. Da Primärtumorzellen schlecht in vitro heranwachsen und selten lange genug passagiert werden können, um eine Tumorzelllinie zu bilden, stehen oftmals mehr CD8⁺T-Lymphozyten zu Verfügung als dazugehörige autologe Magenkarzinomzelllinien. Um dennoch eine tumorspezifische Reaktion dieser T-Lymphozyten testen zu können, wird die Eigenschaft der T-Zell-Klone genutzt, verschiedene Antigene erkennen zu können, wie etwa gemeinsame HLA-Allele auf Tumorzellen unterschiedlicher Individuen.

Prinzipiell besitzt jeder Mensch eine einzigartige Kombination von HLA-Allelen auf seinen Körperzellen. Dieses Muster setzt sich allerdings aus einzelnen Allelen zusammen, welche

wiederholt auch bei anderen Menschen auf der Zelloberfläche zu finden sind. T-Lymphozyten des einen Individuums können dann diese gemeinsamen Allele auch bei einem anderen Individuum erkennen und dementsprechend Reaktionen auslösen.

Um CD8⁺T-Lymphozyten neben autologen Tumorzelllinien auch mit allogenen Magenkarzinomzellen, welche gemeinsame HLA-Merkmale mit den T-Zellen hatten, zusammenführen zu können und dadurch eine tumorspezifische Zytokinproduktion zu induzieren, wurde DNA aus den vorhandenen T-Zellen isoliert und anschließend eine Typisierung der HLA-Allele vorgenommen.

Isolierung von DNA

Die Isolierung der DNA und Aufbereitung erfolgte gemäß den Angaben des „QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit“, alle verwendeten Substanzen wurden ebenso aus dem „QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit“ der Firma QIAGEN, Hilden bezogen.

5×10^6 Lymphozyten wurden in einem 1,5 ml Mikrozentrifugen-Tube für fünf Minuten bei $300 \times g$ in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zell-Pellet wurde in PBS bis zu einem Volumen von 200 μ l resuspendiert. Dieser Suspension wurden zunächst 20 μ l QIAGEN Protease und anschließend 200 μ l AL Puffer hinzugefügt. Durch Vortexen des Tubes für 15 Sekunden wurde die Mischung zu einer homogenen Lösung. Danach fand eine Inkubation für 10 Minuten bei 56°C statt. Nach Zugabe von 200 μ l Ethanol 96%, 15 Sekunden Vortexen und Kurz-Zentrifugieren wurde die Mixtur in ein 2 ml Tube, welches eine QIAamp Netz-Säule enthielt pipetiert, Tube und Filter wurden bei $6800 \times g$ für eine Minute zentrifugiert. Die QIAamp Netz-Säule wurde in ein neues 2 ml Tube gegeben, das Filtrat wurde verworfen. Daraufhin wurden 500 μ l AW2 Puffer in die Netz-Säule gegeben und diese bei $20800 \times g$ für drei Minuten zentrifugiert. In ein weiteres 1,5 ml Tube gelegt, wurde der Netz-Säule 200 μ l AE Puffer hinzupipetiert. Nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde bei $6800 \times g$ eine Minute lang zentrifugiert. Die extrahierte DNA wurde 1:100 mit 10 mM TrisCl Puffer verdünnt und anschließend spektrophotometrisch auf ihre Gesamtkonzentration bestimmt (RNA/DNA Calculator Gene Quant pro, Biochrom, Cambridge, England). Die restliche DNA wurde bei -20°C verwahrt.

Nach Gewinnung mehrerer DNA-Proben unterschiedlicher Patienten wurden diese in das Labor von Professor B. Fox, Earle A. Chiles Research Institute, Robert W. Franz Cancer Research Center, Portland, OR, USA gesandt. Dort wurde die Genotypisierung vorgenommen.

2.8 Cytokine Release Assay

Um eine genaue Aussage über die Polarisierung der einzelnen tumorspezifischen T-Zell-Cloids machen zu können, wurde die Sekretion tumorspezifischer Zytokine untersucht.

T-Lymphozyten, welche isoliert vom Magentumor in Kultur gewachsen waren, wurden dazu mit diesen Magenkarzinomzellen zusammengeführt. Die Präsentation des Tumors gegenüber tumorspezifischen T-Zellen stimuliert in den tumorspezifischen T-Zellen die Produktion und Sekretion von Typ -I -und Typ -II-Zytokinen. Wie bereits erwähnt, produzieren zytotoxische T-Zellen für die zelluläre Immunantwort Typ -I -Zytokine wie Interferon γ (IFN- γ), Interferon β und Interleukin-2. Typ-II-T-Lymphozyten produzieren vor allem Interleukin-4, Interleukin-5 (IL-5) und Interleukin-10. In diesen Stimulationsexperimenten wurden für die Typ-I-Immunantwort die Produktion von IFN- γ und für die Typ-II-Immunantwort die Produktion von IL-5 quantifiziert.

Prinzip des Versuchsaufbaus

1×10^6 T-Zellen wurden nach dreimaligen Waschen mit reinem X-vivo 15 mit $0,2 \times 10^6$ autologen Tumorzellen aus der etablierten Magenkarzinomzelllinie bzw. aus autologem, frisch verdautem Tumor oder allogenen Magenkarzinomzelllinien in einer 48-Well Platte in 1 ml X-vivo 15 mit 100 Units IL-2/ml (600 IE) bei 37° C inkubiert. Als Positivkontrolle wurden die T-Zellen mit immobilisiertem Anti CD3 (Othoclone OKT@3) inkubiert, als Negativkontrolle diente Medium ohne Stimulationsfaktoren. Kontrollzelllinien stellten zum einen zwei Nierenzellkarzinomzelllinien (RCC26 und RCC53) dar, welche von Professor Dr. Schendel, Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München, Marchioninistrasse 25, 81377 München zu Verfügung gestellt wurden, sowie die Melanomzelllinien MEL 118 und MEL 119, welche im Earle A. Chiles Research Institute, Robert W. Franz Cancer Research Center, Portland, OR, USA etabliert wurden. Diese Kontrollzellen wurden, soweit möglich, HLA gematcht eingesetzt.

T-Zellen produzieren in einem geringen Maße auch ohne Stimulation unspezifisch Zytokin. Um die Zytokinmenge nach Stimulation der T-Zellen von dieser Hintergrund-Zytokinproduktion abgrenzen zu können, wurde daher der Zytokinwert der unstimulierten T-Zellen im Medium bei Auswertung von den jeweils gemessenen Stimulations- Zytokinwert abgezogen.

Tabelle 10 gibt ein Beispiel für einen Stimulationsansatz eines Patienten „GC100“:

Tabelle 10: Übersicht eines CRA-Stimulationsversuches

Patient GC100	TIL 1	TIL 2	LN Tcell 3	LN Tcell 4	keine T- Zellen	Beschreibung:
Unstimuliert, Medium x- vivo 15 + 100 Units IL-2	1	11	21	31	41	Hintergrund Zytokinexpression
Anti CD3	2	12	22	32	42	Polyklonale unspezifische T-Zell-Stimulation
RCC53	3	13	23	33	43	Nierenzellkarzinom- und Melanomkontrollzelllinien mit definiertem HLA- Expressionsmuster
RCC26	4	14	24	34	44	
MEL 118	5	15	25	35	45	
MEL119	6	16	26	36	46	
GC100 Tu- Sto	7	17	27	37	47	Autologe Tumorzelllinie
GC100 frisch verdauter Tumor	8	18	28	38	48	Enzymatisch frisch verdauter autologer Tumor
GC1 Tu-LN	9	19	29	39	49	Allogene Magenkarzinomzelllinien mit definiertem HLA- Expressionsmuster
GC9 Tu-Sto	10	20	30	40	50	

Nach 20 Stunden wurden die Überstände aus der Well-Platte abpipettiert und nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 110 x g und 4°C das Zytokin enthaltende Medium in 1,5 ml Eppendorf Tubes pipettiert. Bis zur Durchführung des ELISA wurden diese bei -40° C eingefroren.

2.9 Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA)

Die Erfassung der Menge an sezernierten Zytokinen erfolgte mit Hilfe eines „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) der Firma R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt.

2.9.1 Prinzip der Messmethode

Abbildung 9 stellt das Prinzip eines ELISA dar:

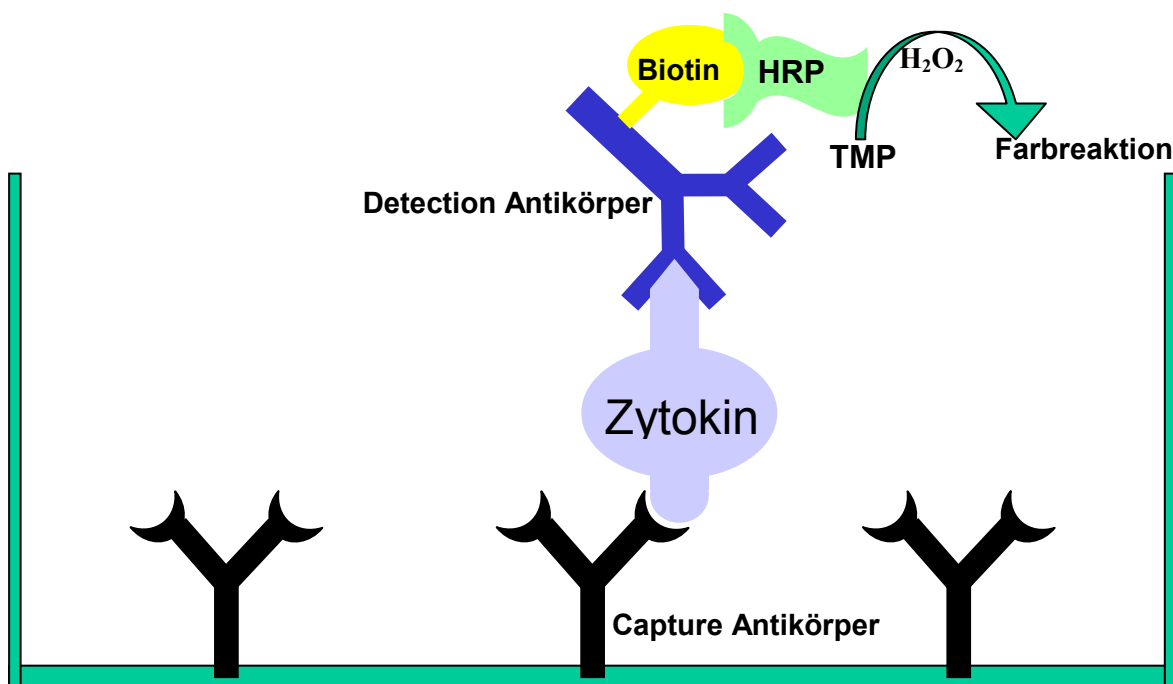


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines ELISA

Nachzuweisende Proteine wie etwa Zytokine werden in einer Suspension in eine 96-Well Platte pipettiert, an deren Boden spezifische „capture“-Antikörper fixiert sind.

Die an diese Antikörper gebundenen Proteine werden anschließend von einem zweiten Antikörper, dem „detection“-Antikörper markiert. An diesem detection-Antikörper ist Biotin gekoppelt, woran sich hinzugegebenes Streptavidin anlagert. Dieses Streptavidin wiederum ist mit einer Horseradish-Peroxidase (HRP) konjugiert. HRP ist in der Lage, das Substrat Tetramethylbenzidine (TMP) in Anwesenheit von H₂O₂ umzusetzen, es erfolgt eine Farbreaktion, welche umso intensiver ausfällt, je mehr HRP vorhanden ist, bzw. nachzuweisendes Protein sich in der Ausgangssuspension befindet.

2.9.2 Protokoll ELISA

ELISA IFN- γ

Precoating

Zur Bestimmung der IFN- γ Sekretion der T-Lymphozyten wurden 96-Well MaxiSorp Platten (Corning, NY, USA) mit monoklonalem anti-IFN- γ Capture Antikörper (R&D) in einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ (100 $\mu\text{l/Well}$) in PBS über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Das weitere Vorgehen erfolgte nach folgendem Protokoll:

Tabelle 11: Protokoll ELISA IFN- γ

	Schritt	Substanz/Lösung	Herkunft	Bemerkung
01.	Waschen	0,05% Tween 20 in PBS	Merck	400 $\mu\text{l/Well}$, 3mal
02.	Blocken	2% BSA in PBS	Gibco/Merck	300 $\mu\text{l/Well}$, 1 Stunde
03.	Waschen	0,05% Tween 20 in PBS	Merck	400 $\mu\text{l/Well}$, 3mal
04.	Zugabe Standard- verdünnungsreihe Probenzugabe	Standard 1% BSA in PBS Überstand aus Koinkubation T-Zelle+Tumorzelle	R&D	Verdünnung in 1:2 Verdünnungsschritten 4000 pg/ml bis 62,5 pg/ml , 100 $\mu\text{l/Well}$, 2 Stunden 100 $\mu\text{l/Well}$, 2 Stunden
05.	Waschen	0,05% Tween 20 in PBS	Merck	400 $\mu\text{l/Well}$, 3mal
06.	Zugabe Detection- Antikörper	Biotinylierter anti- IFN- γ AK 250 ng/ml in 2% heat- inactivated normal goat serum PBS 1% BSA	R&D	100 $\mu\text{l/Well}$, 1,5 Stunden
07.	Waschen	0,05% Tween 20 in PBS	Merck	400 $\mu\text{l/Well}$, 3mal
08.	Zugabe working dilution	Streptavidin-HRP 1:1000 in PBS 1% BSA	PharMingen	100 $\mu\text{l/Well}$, 30 Minuten
09.	Waschen	0,05% Tween 20 in PBS	Merck	400 $\mu\text{l/Well}$, 3mal
10.	Zugabe TMB-Substrat	TMB-Substrat-Set (H_2O_2 + Tetramethylbenzidin)	PharMingen	100 $\mu\text{l/Well}$, ca.30 Minuten in Dunkelheit bis Farbumschlag
11.	Zugabe Stopplösung	1M H_2SO_4		50 μl
12.	Sofortige Messung	Gerätschaft s.u.		

ELISA IL- 5

Zum Nachweis von IL-5 wurde ein anti-human-IL-5 capture Antikörper (R&D) in der Konzentration 2 µg/ml in PBS verwendet. Die Standard-Verdünnungsreihe reichte von 2000 pg/ml bis 31,25 pg/ml. Als detection-Antikörper wurde ein biotinylierter anti-IL-5 Antikörper 250 ng/ml in PBS 1% BSA eingesetzt. Das übrige Prozedere entsprach dem Protokoll des ELISA für IFN- γ .

2.9.3 Auswertung der ELISA-Daten

Die Erfassung der Rohdaten erfolgte bei 450 nm mit dem ELISA-Reader „v max kinetic microplate reader“ (Molecular Devices Cooperation, Menlo Park, USA) anhand der Software SOFTmax™. Die statistische Auswertung erfolgte durch die Software SigmaPLOT 2000 Version 6.0 (URL: <http://www.spss.com/software/science/sigmaplot>)

Eine tumorspezifische Sekretion von IFN- γ und geringer oder nicht vorhandener Sekretion von IL-5 wurde als Typ-I-Immunantwort, eine überwiegende Sekretion von IL-5 bei wenig oder nicht vorhandenem IFN- γ als Typ-II-Immunantwort definiert. Die Expression beider Zytokine galt als gemischte Immunantwort. Zur deutlicheren Polarisierung der Daten in Richtung Typ-I-oder Typ-II-Immunantwort, wurde nach Abzug der nicht spezifischen Hintergrund-Zytokinproduktion für jede Probe die Ratio von IFN- γ zu IL-5 berechnet. Tumorspezifische Antworten mit einer Ratio IFN- γ : IL-5 größer als 2 wurden als Typ-I-Immunantwort festgesetzt, eine Ratio IFN- γ : IL-5 kleiner 0,5 wurde als Typ-II-Immunantwort bewertet. Die Ratio zwischen 0,5 und 2 wurde als eine gemischte Immunantwort angesehen.

2.10 Immunhistochemische Analyse von tumorinfiltrierenden dendritischen Zellen

Tumorgewebe, welches frisch nach operativer Entnahme in TissueTek® eingebettet und bei –80°C konserviert worden war, wurde durch Kryoschnitttechnik auf Objektträger gebracht, diese wurden anschließend immunhistochemisch angefärbt. Als Oberflächenmarker für naive dendritische Zellen diente ein Anti CD209 Antikörper. Um aktivierte dendritische Zellen sichtbar zu machen, wurden diese mit einem Antikörper gegen das CD83 Oberflächenmolekül gefärbt (s.u.). Es wurden die gleiche Anzahl an *H. pylori* positivem und *H. pylori* negativem Tumorgewebe immunhistochemisch untersucht und im direkten Vergleich die Anzahl gefärbter Zellen quantitativ ausgewertet.

2.10.1 Kryostatschnitte

Die Anfertigung der Tumorgewebeschnitte wurde mit dem Gerät Jung Frigocut 2800, Leica, Bensheim durchgeführt. Es wurden jeweils zwei Schnitte auf einen Objektträger aufgetragen, die Dicke des Schnittgewebes betrug 5 µm.

2.10.2 Immunhistochemische Färbung

Zusätzlich zu Tabelle 6 wurden folgende Substanzen zur immunhistochemischen Färbung verwendet:

Tabelle 12: Substanzen zur Immunhistochemie

Substanz	Herkunft
Silberreagenz	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
Verstärker-Reagenz	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
Initiator-Reagenz	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK

Zur Verfügung standen folgende Primär-, Sekundär-, und Tertiärantikörper (Tabelle 13). Alle Antikörper wurden in PBS mit 10% AB Serum verdünnt.

Tabelle13: Antikörper zur Immunhistochemie

Antikörper	Verdünnung	Oberflächenmarker	Herkunft
Anti CD83	1:50	aktivierte dendritische Zelle	Caltac Laboratories, Burlingame, USA
Anti CD209	1:25	naive dendritische Zelle	BD BioSciences
Maus IgG1	1:25	Isotypkontrolle für CD83	BD BioSciences
Maus IgG2b	1:25	Isotypkontrolle für CD209	BD BioSciences
Anti Maus IgG Biotin	1:1000	Sekundärantikörper für CD209	Dako
Anti Maus IgG1	1:50	Sekundärantikörper für CD83 1 nm Gold konjugiert	Amersham Biosciences
Streptavidin HRP	1:1000	Tertiärantikörper	BD BioSciences

AEC-Färbung naiver dendritischer Zellen

Der Nachweis naiver dendritischer Zellen erfolgte in ähnlicher Weise zum Protokoll der Zytospinfärbung (siehe 2.6.1). Der Primärantikörper Anti humanes CD209 (DC Sign) bindet an die Oberfläche der dendritischen Zelle. Ein an Biotin gekoppelter Sekundärantikörper (anti-Maus IgG Biotin) bindet seinerseits an den Primärantikörper. Streptavidin, welches mit HRP (Meerrettich-Peroxidase) verbunden ist, lagert sich an das Biotin an. Durch Hinzugabe von Aminoethylcarbazol und H₂O₂ wird durch die Peroxidase ein rötlicher Farbumschlag ausgelöst.

Silber Färbung aktivierter dendritischer Zellen

Der Primärantikörper humanes Anti-CD83, welcher zuvor an exprimierte Oberflächenmoleküle aktivierter dendritischer Zellen gebunden hat, wird durch einen Anti-Maus-IgG Sekundärantikörper detektiert, welcher das Anti-CD83 mit einer 1 nm dicken Goldschicht überzieht. Durch anschließende Zugabe einer Silberreagenzlösung zeigt sich eine Farbreaktion, welche die Ausläufer der dendritischen Zelle silbrig-schwarz erscheinen lässt.

CD 209 – CD83 Doppelfärbung

Beide Färbemethoden konnten am Gewebeschnitt miteinander kombiniert werden. Abbildung 10 zeigt schematisch diese immunhistochemische Doppelfärbung.

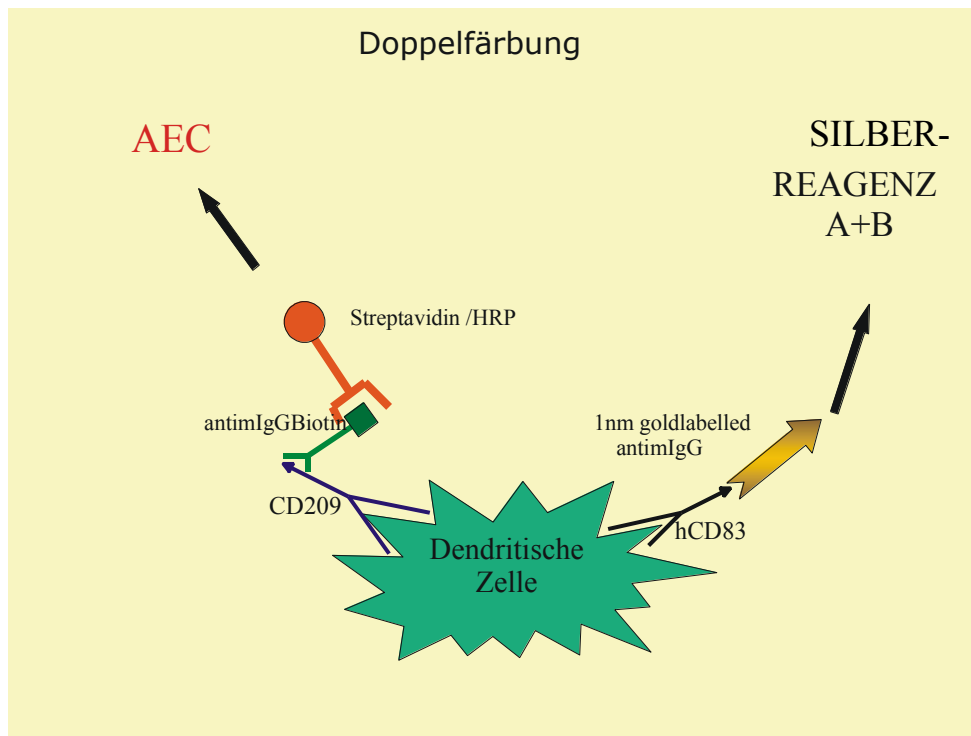


Abbildung 10: Doppelfärbung einer dendritischen Zelle. Kombiniert wurden die AEC-Färbemethode für CD209 positive, naive dendritische Zellen und die Silber-Färbemethode zur Markierung aktivierter, CD83 positiver dendritischer Zellen.

Von jedem Tumorgewebe wurden insgesamt sieben Objektträger angefertigt, diese wurden folgendermaßen gefärbt:

Tabelle 14: Liste der anzufärbenden Objektträger pro Tumorgewebe-Kryoschnitt

Objektträger	Färbemethode	Primärantikörper	Bemerkung
1	AEC	Maus IgG2b	Isotypkontrolle Anti CD209
2	AEC	Anti CD209	Naive dendritische Zelle
3	Silberfärbung	Maus IgG1	Isotypkontrolle Anti CD83
4	Silberfärbung	Anti CD83	Aktivierte dendritische Zelle
5	AEC- Silber- Doppelfärbung	Anti CD209+ Anti CD83	Doppelfärbung
6	AEC- Silber- Doppelfärbung	Maus IgG1+ Anti CD209	Isotypkontrollen der Doppelfärbungen
7	AEC- Silber- Doppelfärbung	Anti CD83+ Maus IgG2b	

Um unter Standardbedingungen die immunhistochemische Doppel-Färbung auszuführen, wurde nach dem in Tabelle 15 dargestellten Protokoll vorgegangen. Alle Antikörper wurden in AB Serum mit 10% PBS verdünnt.

Tabelle 15: Protokoll der immunhistochemischen Färbung dendritischer Zellen

	Schritt	Bemerkung
01.	Fixieren mit Azeton	7 Minuten
02.	3x waschen	à 5 Minuten in PBS
03.	blockieren mit AB Serum 10% PBS	ca. 100 µl/Schnitt; 10 Minuten
04.	3x waschen	à 5 Minuten in PBS
05.	Auftragen von Avidin	ca. 4 Tropfen/Schnitt; 5 Minuten
06.	3x waschen	à 5 Minuten in PBS
07.	Auftragen von Biotin	ca. 4 Tropfen/Schnitt; 5 Minuten
08.	3x waschen	à 5 Minuten in PBS
09.	Auftragen 1. Primärantikörper	(CD83/mlgG1); 60 Minuten
10.	3x waschen	à 5 Minuten in PBS
11.	Überschichten mit 1nm gold labelled anti IgG1	60 Minuten
12.	3x waschen	à 5 Minuten in PBS
13.	Auftragen 2. Primärantikörper	(CD209/mlgG2b); 60 Minuten
14.	3x waschen	à 5 Minuten in PBS
15.	Auftragen anti IgG Biotin Antikörper	30 Minuten
16.	3x waschen	à 5 Minuten in PBS
17.	Auftragen Streptavidin-HRP	30 Minuten
18.	3x waschen	à 5 Minuten in PBS
19.	AEC-Färbelösung	auf Schüttler; 8 Minuten
20.	2x waschen	à 5 Minuten in Leitungswasser
21.	Auftragen Reagenz A+B	A+B 1:1; ca. 60 Minuten unter mikroskopischer Kontrolle, bis eine Silberfärbung zu erkennen ist
22.	3x spülen	à 5 Minuten in destilliertem Wasser
23.	Kern-Gegenfärbung in Hämalaun;	7 Sekunden
24.	In Leitungswasser Farbe abspülen	
25.	In Leitungswasser stehen lassen	10 Minuten
26.	Deckglas mit Glyceringelatine auflegen	

2.10.3 Versuchsauswertung und Statistik

Tumorgewebeschnitte von jeweils fünf *H. pylori* positiven und *H. pylori* negativen Patienten wurden gegeneinander auf rot angefärbte naive dendritische Zellen oder/und silbrig-schwarz angefärbte dendritische Zellen unter dem Mikroskop bei 200 facher Vergrößerung untersucht. Zur statistischen Auswertung wurden pro Gewebe 20 Areale von jeweils 0,11 mm² ausgezählt und mit dem Einstichproben-t-Test ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Prospektive klinische Studie - Patientendaten

3.1.1 Patientenrekrutierung

Im Zeitraum Januar 2002 bis Juni 2003 wurden 13 weibliche und 19 männliche Magenkarzinompatienten bei einer Altersverteilung von 53 bis 80 Jahren in die Studie "Untersuchungen über Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort bei Helicobacter pylori positiven und negativen Patienten mit Magenkarzinom – eine prospektive klinische Studie" aufgenommen. Alle Patienten wurden gastrektomiert sowie einer N2-Lymphknotendissektion unterzogen.

15 Patienten (47%) waren an einem Magenkarzinom des intestinalen Typs erkrankt, 17 Patienten (53%) litten unter einem diffusen Magenkarzinom bzw. wiesen diffus-intestinale Mischformen eines Magenkarzinoms auf. In sieben Fällen wurde der Tumor in der Kardia lokalisiert, 13 Tumore befanden sich im Bereich des Magenkorpus. Das Antrum war in sechs Fällen befallen, bei sechs Patienten erstreckte sich der Tumor über das gesamte Organ.

3.1.2 Gewebeaufarbeitung

Bei 21 Magenkarzinompatienten war eine Aufarbeitung des Gewebes in der Zellkultur erfolgreich, so dass T-Lymphozyten oder /und Karzinomzellen zur weiteren Analyse verwendet werden konnten. In 12 Fällen war das erhaltene Patientenmaterial zu gering oder aufgrund zu weit fortgeschrittener Nekrotisierung des Gewebes kein Tumor oder T-Lymphozyten zu kultivieren. Eine zusätzliche Zellkultur von lokalen Lymphknotenmetastasen wurde bei drei Patienten begonnen.

Während die Methode zur Kultivierung der T-Lymphozyten sich gut etablieren lies, gestaltete es sich als schwierig, Zelllinien aus Magenkarzinomzellen mit mehr als 20 Passagen zu züchten. Lediglich aus einem Primärtumor (GC9 Sto-Tu) konnte eine Zelllinie kultiviert werden, während hingegen drei Zelllinien aus Lymphknotenmetastasen wuchsen (GC1 LN-Tu, GC9 LN-Tu, GC20 LN-Tu). Aus Tumorgewebe des Patienten GC7 konnten für kurze Zeit Magenkarzinomzellen kultiviert werden (5 Passagen, GC7 Tu-Sto).

Die Vermehrung von T-Lymphozyten des jeweiligen Patienten brachte mehrere tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL-) Kulturen oder T-Zell-Kulturen aus Lymphknoten (LN-T-cells) hervor. Nach drei Passagen wurden die stabilsten T-Zell-Kulturen kryokonserviert oder gleich für die Versuche eingesetzt.

Ergebnisse

Einen Überblick über die in Zellkultur gezüchteten Tumorzellen und T-Lymphozyten der jeweiligen Magenkarzinompatienten gibt Tabelle 16 wieder. Grau unterlegt sind jene Magenkarzinompatienten, bei denen kein Gewebe kultiviert werden konnte.

Tabelle 16: Übersicht über die Zellkultur der Tumorzellen und T-Zellen

Patient	etablierte Tumorzelllinie	T-Zell-Cloids (LN/TIL)
GC1	Tu-LN	5 / 1
GC2	-	4 / -
GC3	-	4 / -
GC4	-	3 / -
GC5	-	- / 3
GC6	-	- / -
GC7	Tu-Sto	- / 13
GC8	-	- / 11
GC9	Tu-LN/Tu-Sto	5 / 8
GC10	-	6 / 7
GC11	-	- / 8
GC12	-	6 / 5
GC13	-	- / -
GC14	-	- / 10
GC15	-	- / -
GC16	-	8 / 2
GC17	-	- / -
GC18	-	- / -
GC19	-	- / -
GC20	Tu-LN	4 / 5
GC21	-	- / 1
GC22	-	- / -
GC23	-	- / -
GC24	-	4 / 2
GC25	-	- / -
GC26	-	4 / 2
GC27	-	- / -
GC28	-	- / -
GC29	-	3 / 5
GC30	-	- / 6
GC31	-	- / -
GC32	-	- / 6

Ergebnisse

Abbildung 11 gibt ein Beispiel für die Morphologie von Magenkarzinomzellen bei in vitro Kultivierung. Das Photo zeigt Tumorzellen aus einer Lymphknotenmetastase des Patienten GC1 zum Zeitpunkt der Passage 9.

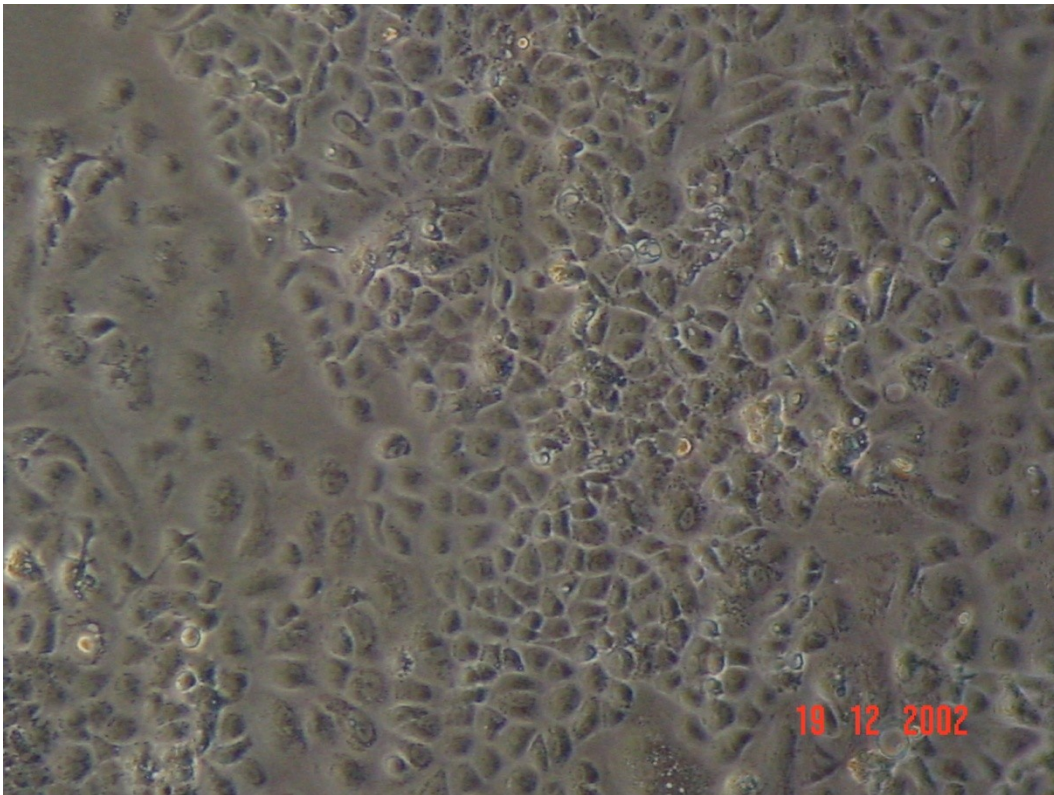


Abbildung 11: Photo einer Kultur von Magenkarzinomzellen aus einer Lymphknotenmetastase des Patienten Nr. GC1 in der Vergrößerung 1/100. Die sich nach der 9. Passage befindlichen Tumorzellen wachsen sowohl in horizontaler Ausrichtung (dunkelgraue Zellen), als auch vertikal (weiß umrandet sichtbare Zellen). Auffällig ist das polymorphe Erscheinungsbild der Karzinomzellen von rundlicher Einzelform bis polygonaler Passform dicht aneinander gereihter Zellen.

3.1.3 Nachweis von *Helicobacter pylori*

Von allen in der Studie erfassten Patienten wurden Gewebeproben und Patientenserum in die kooperierenden Institute (Professor Stolte, Bayreuth; Professor Kist, Freiburg; Professor Lehn, Regensburg; Max von Pettenkofer Institut, München; siehe 2.3) zur histologischen, mikrobiologischen und immunhistochemischen Aufarbeitung versandt.

Die bakteriologischen Untersuchungen umfassten mikroskopische Tests nach Anzucht des Bakteriums auf Spezialnährböden, histologisch wurde Korpus- und Antrumgewebe nach einer „Warthin-Starry“ Anfärbung auf *H. pylori* überprüft. Das Serum des Patienten wurde sowohl auf IgA Antikörpern gegen *H. pylori* zum Nachweis einer frischen Infektion, als auch auf IgG Antikörpern bei stattgefundener oder chronisch aktiver Infektion untersucht.

Ergebnisse

Die Ergebnisse jeweils stattgefundener *H. pylori* Infektionen oder negativer *H. pylori* Nachweise geben Tabelle 17 und 18 wieder. Drei Magenkarzinompatienten (GC9, GC19 und GC23) waren nach diesen Tests *H. pylori* negativ, allerdings konnte nur von einem dieser drei Patienten, GC9, eine Tumorzelllinie gewonnen werden.

Tabelle 17: Nachweis von *Helicobacter pylori* in tumorfreier Mukosa oder in Tumorgewebe

Patient	Bakteriologie					Histologie	
	Pettenkofer	Lehn	Kist			Stolte	
			Antrum	Corpus	Tumor	Antrum	Corpus
GC1	neg	neg	neg	neg		neg	neg
GC2	pos	neg	pos	pos	neg	pos++	pos++
GC3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos+
GC4	pos	neg	pos	pos	neg	pos+++	pos+
GC5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
GC6							
GC7	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
GC8	neg	neg		pos		infiltriert	nicht verwertbar
GC9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
GC10	neg	neg		pos		neg	neg
GC11	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
GC12	pos	neg	pos			pos++	kein Corpus
GC13	neg	neg	neg	neg	neg	neg	kein Corpus
GC14	pos	neg	pos	pos		pos +++	pos+++
GC15	neg	neg	neg	neg	neg	nicht verwertbar	neg
GC16			neg	neg	neg	kein Antrum	neg
GC17	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
GC18	neg	neg	neg	neg	neg	neg	kein Corpus
GC19	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
GC20	neg	neg		pos		neg	(+)
GC21	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
GC22	neg	neg	neg	neg	neg	neg.	kein Corpus
GC23		neg	neg	neg	neg	kein Antrum	neg
GC24	neg		neg	neg	neg	neg	neg
GC25	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
GC26			neg	neg	neg	kein Antrum	neg
GC27	pos	pos ++	pos	pos	pos	(+)	pos++
GC28		neg	neg	neg	neg		neg
GC29	neg					neg	neg
GC30			neg	neg	neg	kein Antrum	neg
GC31	pos		pos	pos	pos	kein Antrum	pos
GC32	neg		neg	neg	neg	kein Antrum	neg

*neg=negativ; pos=positiv

Ergebnisse

Tabelle 18: Serologische Tests zum Nachweis einer akuten oder abgelaufenen *Helicobacter pylori* Infektion

Serologie / Blot				
Patient	Pettenkofer		Kist	
	IgG	IgA	IgG	IgA
GC1	neg	neg	pos (+)	neg
GC2	pos	neg	pos +	pos +
GC3	pos	neg		
GC4	pos	neg	pos +	pos (+)
GC5	pos	pos	pos +	neg
GC6	neg	neg		
GC7	pos	pos	pos +	pos+
GC8	pos		pos +++	
GC9	neg	neg	neg	neg
GC10	pos	neg	pos ++	neg
GC11	pos	pos	pos +	pos +
GC12	pos	neg	pos (+)	pos (+)
GC13	pos	neg	pos ++	pos +
GC14	pos	pos	pos +++	pos +
GC15				
GC16	pos	neg	neg	neg
GC17	pos	neg	pos ++	neg
GC18				
GC19	neg	neg	neg	neg
GC20	pos	pos	pos +++	pos+
GC21	pos	neg	pos ++	neg
GC22	pos	neg	pos ++	pos (+)
GC23	neg	neg	neg	neg
GC24	pos		pos ++	pos +
GC25	pos	neg	pos ++	pos (+)
GC26	pos	neg		
GC27	pos	pos	pos ++	neg
GC28			pos	neg
GC29	pos	neg	pos +	neg
GC30	pos	neg	pos +	neg
GC31	pos	pos	pos ++	pos +
GC32	pos	pos	pos ++	neg

Ergebnisse

Tabelle 19 fasst die Datenerhebung der Magenkarzinompatienten inklusive TNM Stadium und Tumor- Grading zusammen. Die gelb markierten GC Nummern zeigen die etablierten Tumorzelllinien *H. pylori* positiver Patienten auf, türkis hervorgehoben ist die Tumorzelllinie des einzigen *H. pylori* negativen Patienten.

Tabelle 19: Tumorstatus zum Zeitpunkt der Operation und *Helicobacter pylori* Historie

Patient	m/w	Alter (Jahr)	Tumorart (Laurén)	Lokalisation	T	N	Tu-LN/ LN ges*	M	Fernmetastasen**	G	H.p.
GC1	m	74	gemischt	gesamter Magen	pT2	pN2	10/14	M1	Lb	G3	pos
GC2	w	61	gemischt	Corpus	pT3	pN1	01/19	M0		G3	pos
GC4	w	67	diffus	Cardia	pT2	pN2	09/29	Mx		G3	pos
GC5	w	67	diffus Siegelring	Cardia	pT1	pN1	24/24	Mx		G3	pos
GC7	m	79	diffus	gesamter Magen	pT2	pN1	06/33	M0		G3	pos
GC9	m	72	intestinal	Cardia	pT2(b)	pN3	20/38	M0		G3	neg
GC11	m	65	Siegelring	Corpus	pT3	pN2	10/33	Mx		G3	pos
GC12	m	53	Siegelring	Corpus	pT2(b)	pN2	12/19	Mx		G3	pos
GC14	w	69	intestinal	gesamter Magen	pT2 (a)	pN1	03/14	M0		G3	pos
GC20	w	63	intestinal	Corpus	pT3	pN2	15/44	M0		G3	pos
GC21	w	70	intestinal	Cardia	pT2b	pN1	04/34	M1	P	G2- 3	pos
GC24	m	75	diffus	Corpus	pT2b	pN1	03/28	M0		G3	pos
GC25	m	74	intestinal	Corpus	pT2(b)	pN2	03/28	Mx		G3	pos
GC26	m	60	diffus	Antrum	pT2b	pN3	23/25	M0		G3	pos
GC27	w	78	intestinal	gesamter Magen	pT3	pN1	07/20	M0		G3	pos
GC28	m	79	gemischt	gesamter Magen	pT2(b)	pN2	08/13	M0		G3	pos
GC29	m	74	intestinal	Cardia	pT2(b)	pN1	01/21	M0		G2	pos
GC30	m	83	gemischt	Corpus	pT2(b)	pN3	16/21	M0		G3	pos
GC31	w	66	intestinal	Corpus	pT2(b)	pN2	11/31	M0		G3	pos
GC32	m	60	diffus	gesamter Magen	pT2(b)	pN3	30/31	M0		G3	pos

* Anzahl der von Tumor befallenen Lymphknoten im Verhältnis zur Gesamtzahl aller entnommenen Lymphknoten

** Lb= Lebermetastase, P= pulmonale Metastase

3.2 Charakterisierung der Magenkarzinomzellen

3.2.1 Immunhistochemische Zytopspin-Analyse der Karzinomzellen

Einer der Aufgaben der Zellkultur von Primärtumoren war neben der Vermehrung der Karzinomzellen die Ausselektierung anderer Zellarten, welche während der Probenexzision nach Gastrektomie methodenbedingt mitentnommen worden waren. Bei diesem „Fremdgewebe“ handelte es sich zumeist um Fibroblasten, ebenso konnten sich in dieser Mischkultur aber auch Muskelzellen und vereinzelte Immunabwehrzellen wie Leukozyten, Makrophagen und dendritische Zellen befinden. Ziel war es daher, durch die Kultivierung des Gewebes mit Complete medium, welches gezielt Nährstoffe für Tumorzellen anbot, andere Zellen in einen Mangelzustand versetzte und diese „verhungern“ lies, sowie durch sorgfältige mikroskopische Kontrolle und darauf folgender gezielter Trypsinierung und Passagierung der Karzinomzellen eine Monokultur an Tumorzellen zu gewinnen.

Um den prozentualen Anteil dieser Karzinomzellen überprüfen zu können, wurden die Tumorzelllinien durch immunhistochemische Anfärbung auf verschiedene Oberflächenmarker von Gewebszellen untersucht: So wurde Vimentin zum Nachweis von Fibroblasten ausgewählt. Vimentin ist ein Typ-3 Intermediärfilament aus der Gruppe der Desmine und damit ein Element des Zytoskeletts. Es kommt im Zytoplasma aller Zellen mesenchymaler Herkunft wie z.B. Fibroblasten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen vor. A-actin ist ein Bestandteil des Kontraktionsapparates von Muskelzellen, die Untereinheit α -smooth muscle actin ist spezifisch für glatte Muskelzellen. Zur positiven Anfärbung von epithelialen Tumorzellen wurden die zwei Antikörper KL1 und Ber-Ep4 gewählt. KL1 ist ein Marker für 20 bekannte Zytokeratine (Panzytokeratin). Zytokeratine werden von epithelialen Zellen gebildet und repräsentieren als Intermediärfilamente den wichtigsten Teil des Zytoskeletts. Das epitheliale Adhäsionsmolekül EpCAM (Antikörper: Ber-Ep4) wird insbesondere von Plattenepithelkarzinomen exprimiert. Zur Abgrenzung von Lymph- und Blutgefäßen wurde der Oberflächenmarker CD31 eingesetzt. Außerdem wurden verschiedene Marker zum Nachweis von Zellen des Immunsystems (CD45 für Leukozyten, CD68 für Makrophagen, CD209 für dendritische Zellen) benutzt.

Zytopspinpräparate von drei Tumorzelllinien *H. pylori* positiver Patienten, sowie von einer Tumorzelllinie des *H. pylori* negativen Patienten wurden mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert und mikroskopisch bei 200facher Vergrößerung untersucht. Pro Objektträger wurden 20 Areale von jeweils $0,11 \text{ mm}^2$ ausgezählt und die jeweilige Anzahl an gefärbten Zellen dokumentiert. Das Ergebnis ist in Tabelle 20 dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 20: Immunhistochemische Bestimmung der Expression von Fibroblasten-, Epithelial- und Leukozyten-Marker in Primärkulturen von Magenkarzinom-Zelllinien

Patient	GC1	GC7	GC9	GC20
Zelllinie	LN-Tu	Tu-Sto	Tu-Sto	LN-Tu
Prozent der insgesamt ausgezählten Zellen				
Fibroblastenmarker				
Vimentin (Vim 3B4)	85	-**	<5	80
α-smooth muscle actin	nt*	-**	-**	-**
Epithelialzellmarker				
Panzytokeratin (KL1)	10	>90	nt*	-**
EpCAM (Ber-Ep4)	<5	80	>80	<5
Andere Marker				
CD45 (T200) (Leukozyten)	-**	nt*	-**	-**
CD68 (Makrophagen)	-**	nt*	<5	-**
CD209 (dendritische Zellen)	nt*	nt*	-**	-**
CD31 (Endothelzellen)	-**	-**	-**	-**

*nt =nicht getestet

** - =keine positiven Zellen gezählt

Die Zelllinien GC1 und GC20 waren zum einen gering EpCAM positiv, zum anderen aber auch positiv für den Fibroblastenmarker Vimentin. Dies kann dadurch erklärt werden, dass beide Metastasengewebe aus Lymphknoten stammen, welche charakteristischerweise in ihrem anatomischen Aufbau aus lymphoretikulärem Gewebe bestehen und in dem Fibrozyten einen großen Anteil haben. Die beiden Zelllinien GC7 und GC9 aus primären Magengeweben zeigen hingegen den charakteristischen Anteil an epithelialen Markern (KL1 und EpCAM positiv), daher dürften diese Kulturen hauptsächlich aus Karzinomzellen bestehen.

3.2.2 Magenkarzinom-Zellbank

In Kooperation mit Professor Fox in Portland, OR, USA wurde eine HLA-Typisierung der Patienten durchgeführt. Die isolierte DNA wurde aus T-Lymphozyten der Patienten GC1, GC7, GC8 und GC9 isoliert. In Tabelle 21 sind die HLA-Profile der Magenkarzinompatienten sowie die der Kontrollzelllinien dargestellt. Dabei ist zu sehen, dass das Allel HLA A2 sowohl in zwei der vier getesteten etablierten Tumorzelllinien (GC1 und GC9), als auch in drei Kontrollzelllinien (RCC26, RCC53 und MEL118) zu finden ist. Allerdings gibt es insgesamt nur maximal zwei übereinstimmende Allele, welche sich sowohl in Magenkarzinomzelllinien als auch in Kontrollzelllinien befinden (HLA-Allele A3 und B7 in GC7 und MEL103, HLA-Allele A2 und B7 in GC9 und MEL118). Die Melanomzelllinien MEL 103, MEL 104, MEL 118

Ergebnisse

und MEL 119, welche als Kontrollen bei den Versuchen dienten, wurden von Professor Fox, die Nierenzellkarzinomlinien RCC26 und RCC53 von Frau Professor Schendel, Helmholtz Zentrum München zur Verfügung gestellt.

Tabelle 21: HLA Profile von Patienten und Kontrollzelllinien

Magenkarzinompatient	HLA-Allele						
GC1	A2	A32	B60	B51		DR13	DR14
GC7	A1	A3	B7	B37		DR4	DR13
GC8	A68		B27	B35		DR13	DR15
GC9	A2	A31	B7	B62		DR13	DR16
Kontrollzelllinien							
RCC26	A2	A33	B51	B41	C15, C17		
RCC53	A2	A25	B18	B15	C03, C12		
MEL103	A3	A11	B7	B18		DR17	DR7
MEL104	A24	A30	B13	B62		DR4	DR7
MEL118	A2	A30	B7/B63	B7/B15		DR1	DR8
MEL119	A1	A2	B8	B72	CW8	DR17	DR8

3.2.3 Bestimmung der HLA-Expression auf etablierten Tumorzelllinien mittels Durchflusszytometrie

Tumorspezifische Antigene können von T-Lymphozyten nur dann erkannt werden, wenn sie zuvor aufbereitet und auf den von MHC-Klasse-I oder von MHC-Klasse-II codierten Proteinkomplexen auf der Tumorzelloberfläche präsentiert werden. Dieser Vorgang ist seinerseits notwendig, damit die T-Lymphozyten antigenspezifisch aktiviert werden und eine spezifische Immunantwort gegen die Tumorzelle ausbilden können. Ziel war es daher, festzustellen, ob auf den Tumorzellen die Expression von MHC-Klasse I oder von MHC-Klasse-II vorhanden ist. Diese HLA-Expression auf den Tumorzelllinien wurde durchflusszytometrisch bestimmt (siehe 2.6.2).

Das Ergebnis der Durchflusszytometrie zeigte eine geringe MHC-Klasse-I Expression auf den Magenkarzinomzellen, wohingegen MHC-Klasse-II in keinem Falle exprimiert wurde (Abbildung 12). Auch nach Inkubation mit IFN- γ (20 ng/ml) für 20 Stunden konnte keine MHC-Klasse-II Expression erzeugt werden (Bilder nicht gezeigt). Daher war eine tumorspezifische Aktivierung von CD4⁺ T-Lymphozyten durch die Tumorzellen unwahrscheinlich. Für die darauf folgenden Versuche wurde deshalb hauptsächlich die tumorspezifische Immunantwort von T-Zell Clonds mit hohem Anteil an CD8 untersucht.

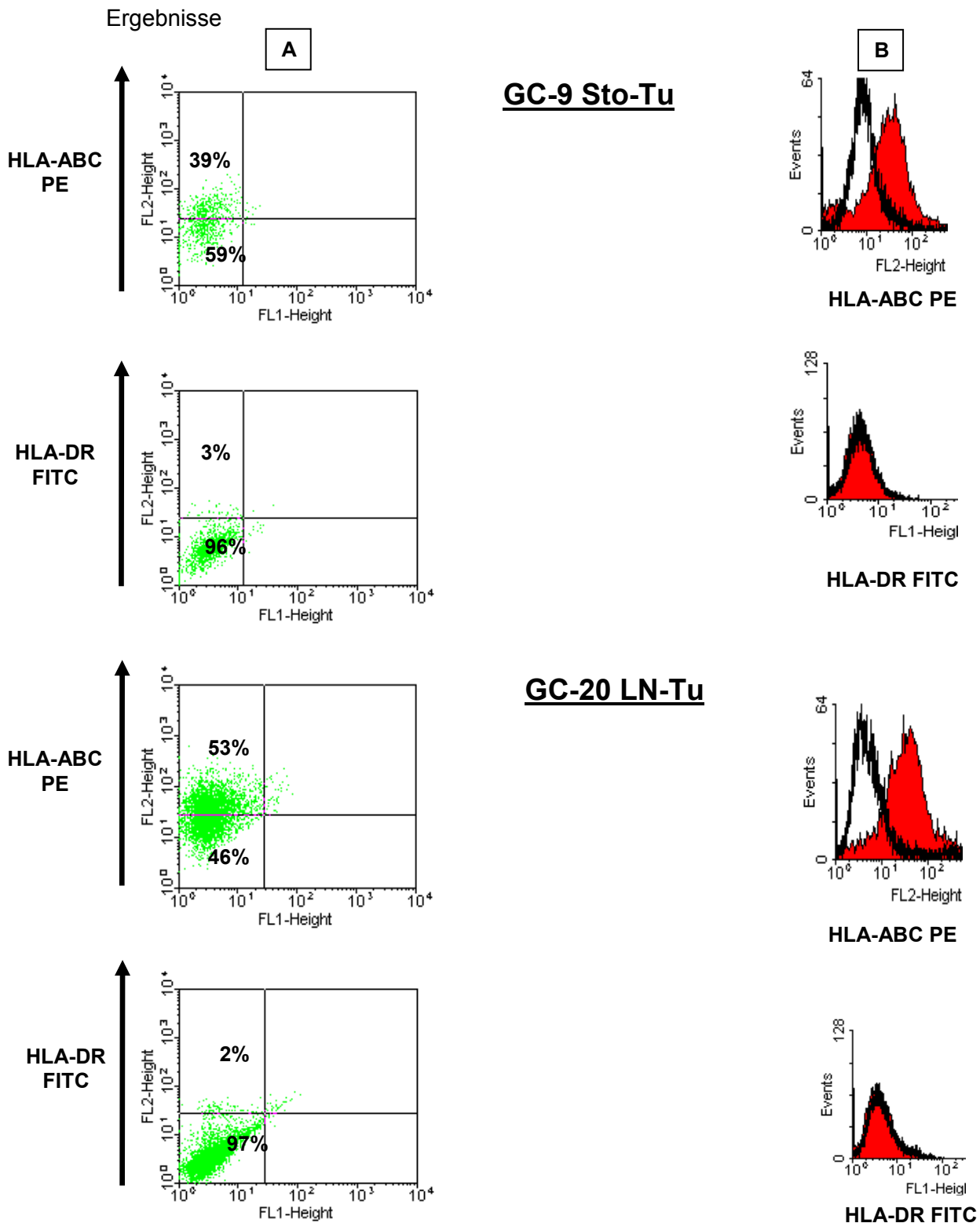


Abbildung 12: Durchflusszytometrische Analyse einer MHC-Klasse-I oder-II Expression auf Magenkarzinomzellen. In den dot plots (linke Spalte A) geben die Prozentzahlen den jeweiligen Anteil HLA-ABC bzw. HLA-DR positiv fluoreszierender Magenkarzinomzelllinien an. Positive Events liegen in der linken oberen Ecke der dot plot Graphik. Deutlich erkennbar ist, dass sich auf den etablierten Magenkarzinomzelllinien positive events bei der Antikörperfärbung mit HLA-ABC für MHC-Klasse-I, aber nicht bei der HLA-DR Antikörperfärbung für MHC-Klasse-II darstellen, hier an den Zelllinien GC9 und GC20 gezeigt. In den Histogrammen (rechte Spalte B) ist die Fluoreszenzintensität von MHC-I-PE, bzw. MHC-II-FITC Antikörper durch eingefärbte Kurven, das Fluoreszenzmuster der Isotypkontrollen durch offene Kurven dargestellt. Auch hier zeigt sich ein positives Signal auf den Magenkarzinomzelllinien nur für HLA-ABC, die HLA-DR Expression gibt kein Signal außerhalb des Bereichs der Isotypkontrolle.

3.3 Charakterisierung der T-Zell Cloids

In der FACS Analyse der etablierten Tumorzelllinien konnte ausschließlich eine Expression von MHC-I-Oberflächenmarkern auf Magenkarzinomzellen nachgewiesen werden. Die T-Zell Cloids hingegen bestanden durch die Kulturbedingungen aus einer Mischung von verschiedenen Klonen CD8/CD4 positiver T-Lymphozyten. Um eine Interaktion von CD8⁺T-Zellen mit den Tumorzellen messen zu können, musste davor mit Hilfe der Durchflusszytometrie das Verhältnis der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in den T-Zell Cloids bestimmt werden (siehe 2.7.1). In Abbildung 13 sind zwei T-Zell Cloids beispielhaft für die heterogene Verteilung von CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen in der Cloid-Population dargestellt. Der T-Zell-Cloid GC24 LN6 wies in der FACS Analyse eine große Mehrheit an CD8⁺T-Lymphozyten auf (85%), der T-Zell-Cloid GC26 LN1 bestand vorwiegend aus CD4⁺ T-Zellen (82%).

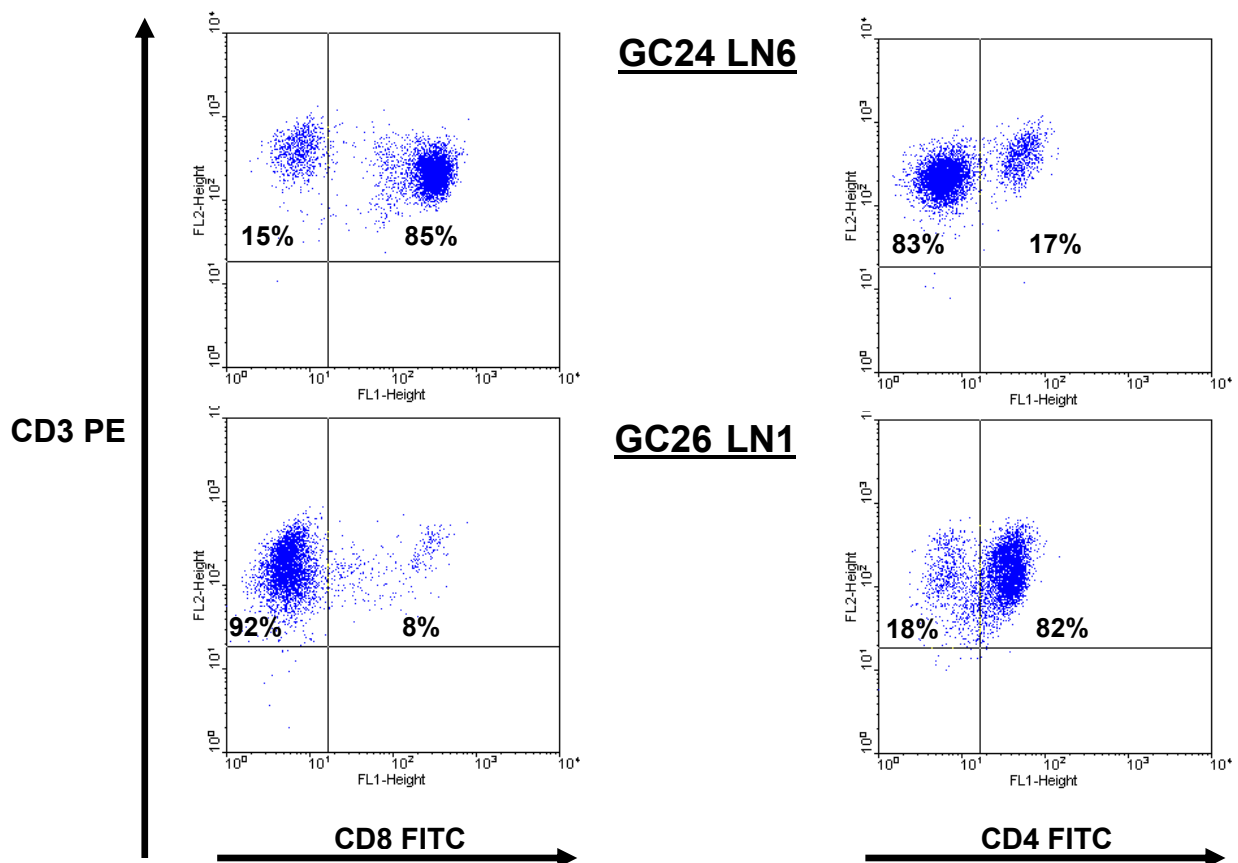


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von CD3 und CD4/8 Corezeptoren auf T-Lymphozyten. Die Prozentzahlen geben den jeweiligen Anteil CD3/CD8 bzw. CD3/CD4 positiv fluoreszierender T-Zell-Cloids an.

Ergebnisse

60 T-Zell-Clonds wurden insgesamt auf ihre Oberflächenmarker CD3, CD4 und CD8 untersucht. Tabelle 22 illustriert die prozentuale Verteilung der CD4 und CD8 positiven T-Zell-Clonds.

Tabelle 22: Verteilung von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen (CD3⁺) in T-Zell-Clonds von Magenkarzinompatienten

GC	TIL/LN	Clond	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	GC	TIL/LN	Clond	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)
3	LN	3u.4	98	2.0	16	LN	3	81	4.1
4	TIL	5	2.1	87	16	LN	5	7.8	56
5	LN	1	3.0	97	20	LN	2	34	42
7	TIL	10	0.9	96	20	TIL	3	45	44
7	TIL	12	0.0	1.3	20	TIL	4	49	39
7	TIL	14	93	0.1	20	LN	5	13	75
7	TIL	36	2.7	63	20	LN	6	6.1	81
8	TIL	1	33	1.4	24	LN	1	20	82
8	TIL	2	57	0.5	24	LN	2	56	44
8	TIL	3	0.0	55	24	LN	3	4.5	95
8	TIL	5	6	5.6	24	TIL	4	4.7	93
8	TIL	6	0.8	81	24	TIL	5	2.5	85
8	TIL	6	1.1	77	24	LN	6	85	17
8	TIL	7	1.4	58	26	LN	1	8.3	82
9	TIL	1	5.8	88	26	LN	2	39	58
9	TIL	2	11	85	26	LN	3	18	47
9	TIL	3	93	7.0	26	TIL	4	73	2.9
9	TIL	4	63	32	26	LN	6	33	50
9	TIL	5	1.4	96	27	TIL	1	19	35
9	TIL	6	4.2	9.9	27	TIL	2	37	34
9	TIL	8	10	16	27	TIL	3	40	7.3
9	TIL	8	3.3	72	27	TIL	4	57	34
9	TIL	9	20	29	27	LN	5	19	75
9	TIL	10	3.8	2.6	27	LN	6	77	9.5
9	TIL	11	45	12	28	TIL	3	7	93
9	TIL	12	1.8	93	29	TIL	2	85	3
9	TIL	13	16	45	29	TIL	4	95	5
10	LN	7	21	70	29	TIL	5	99	1.8
11	TIL	4	3.6	55	29	LN	8	89	8
12	TIL	4	2.1	97	30	TIL	1	72	27
12	TIL	5	2.4	62	30	TIL	5	63	20
12	TIL	7	0.4	59	30	TIL	6	75	24
14	TIL	1	7.6	91	32	TIL	1	87	7
14	TIL	8	20	2	32	TIL	6	75	2
14	TIL	9	35	16					

Ergebnisse

Die T-Zell-Cloids zeigten eine heterogene Mischung aus CD4⁺ und CD8⁺ Zellen. In ca. 40% der getesteten Cloids (30 Stück) überwog der Anteil der CD8⁺Zellen (grün hervorgehoben), die restlichen Cloids (39 Stück, rosa hervorgehoben) wiesen mehr CD4⁺ T-Zellen auf. Blau untermalt sind diejenigen Cloids, welche in den Cytokine-Release Assays eingesetzt wurden. Ab dem Patienten Nr. GC9 wurden T-Zell-Cloids für den CRA verwendet, welche mindestens 45% CD8⁺ T-Zellen enthielten.

3.4 Cytokine Release Assay (CRA)

Im Cytokine Release Assay wurde die tumorspezifische Zytokinfreisetzung isolierter T-Zell-Cloids von Magenkarzinompatienten bestimmt. T-Zellen wurden mit autologen Tumorzellen, frisch enzymatisch verdaulichem Tumorgewebe oder fremden Kontrolltumorzellen stimuliert. Die Tumorzelllinien waren zum Zeitpunkt des CRA mindestens zwei bis fünf Passagierungen unterzogen worden. Als Positivkontrolle dienten anti-CD3-stimulierte T-Zellen. Nach 20 Stunden wurde der Kulturüberstand abgenommen und die Konzentration der Zytokine Interferon γ und Interleukin-5 mit ELISA gemessen.

Tumorspezifische Zytokinproduktion

Da von GC7, GC9 und GC20 sowohl T-Zell-Cloids, als auch autologe Tumorzelllinien etabliert werden konnten, wurden die tumorspezifischen T-Zellen dieser Patienten überprüft. In den folgenden Abbildungen sind Beispiele für unterschiedliche tumorspezifische Zytokinproduktionen der getesteten T-Lymphozyten dargestellt. Eine tumorspezifische Interferon- γ und Interleukin-5 Zytokinproduktion wurde als Typ-I bzw. Typ-II-Immunantwort gewertet. Wenn sowohl Interferon- γ als auch Interleukin-5 sezerniert wurden, galt dies als eine gemischte Typ-I/Typ-II-Immunantwort.

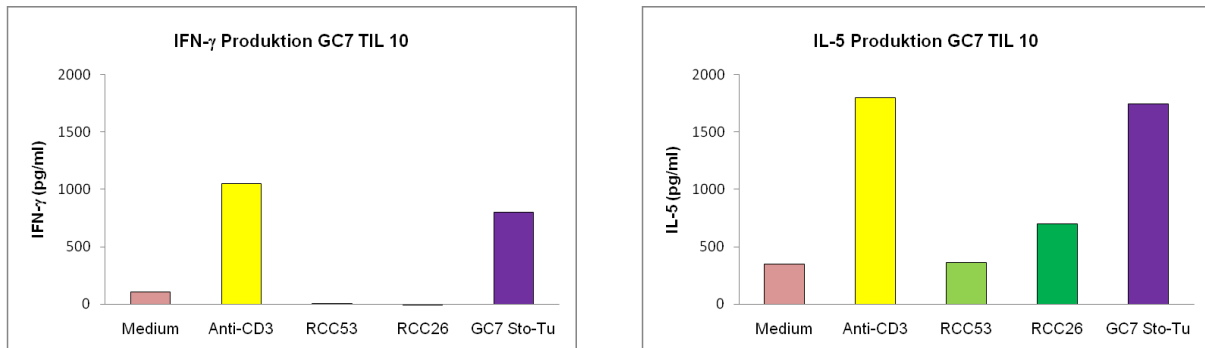


Abbildung 14: IFN- γ und IL-5 Produktion GC7 TIL 10

Abbildung 14 präsentiert die Höhe an sezerniertem Zytokin in einem CRA, in dem T-Zellen des Cloids GC7 TIL 10 mit der autologen Tumorzelllinie GC7 Sto-Tu inkubiert worden waren. Als Kontrollzelllinien dienten zwei Nierenzellkarzinom-Zelllinien (RCC53, RCC26). Der T-Zell-Cloid produzierte nach Stimulation mit der autologen Tumorzelllinie sowohl IFN- γ als auch IL-5 (gemessene Werte der Zytokine nach Abzug der Hintergrundproduktion im jeweiligen Medium). Die Zytokinproduktion der Zelllinie war tumorspezifisch, da die Zytokinproduktion der Kontrollzelllinien deutlich geringer ausfiel (IFN- γ Produktion: GC7 Sto-Tu: 810 pg/ml versus RCC26 2 pg/ml; IL-5 Produktion: 1750 pg/ml versus RCC26: 700 pg/ml). Damit geben diese T-Lymphozyten eine gemischte Typ-I/Typ-II-Immunantwort wieder.

Ergebnisse

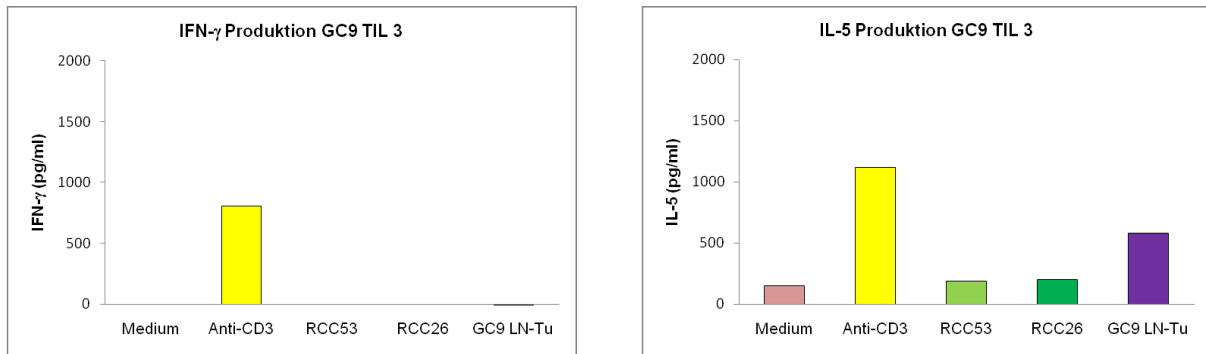


Abbildung 15: IFN- γ und IL-5 Produktion GC9 TIL 3

Der T-Zell-Clond GC9 TIL3 (Abbildung 15) zeigte eine starke tumorspezifische Sekretion von IL-5, aber nicht von IFN- γ nach Stimulation mit der autologen Magenkarzinom-Lymphknotenmetastase. Die T-Zellen sezernierten ca. drei- bis viermal mehr IL-5 nach Inkubation mit dem autologen Tumor als nach alleiniger Inkubation mit Medium bzw. den Kontrollzellen der Nierenzellkarzinome RCC53 und RCC26. Die produzierte Menge von IFN- γ lag unterhalb des cut offs (2 x Hintergrundproduktion). Daher gibt dieser T-Zell-Clond eine Typ-II-Immunantwort wieder. Interessanterweise kam diese Typ-II-Immunantwort von dem einzigen *H. pylori* negativen Patienten.

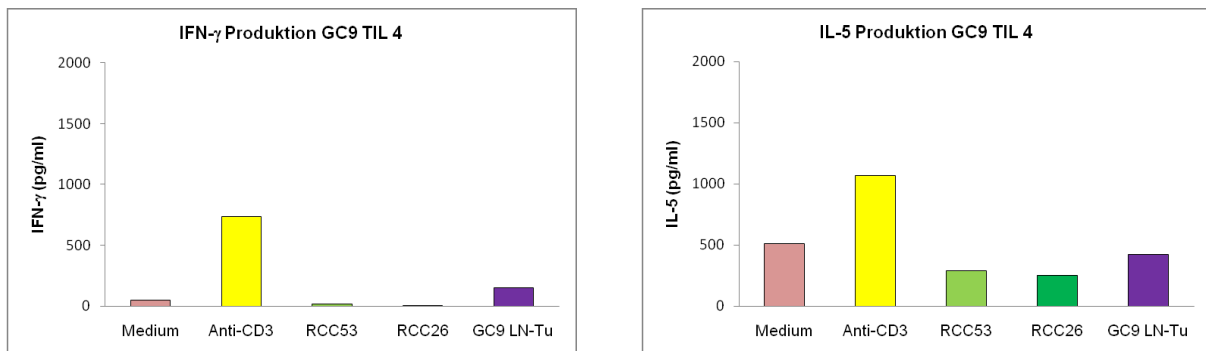


Abbildung 16: IFN- γ und IL-5 Produktion GC9 TIL 4

Die T-Zellen des Clonds GC9 TIL 4, welche mit den gleichen Tumor- und Kontrollzellen wie der Clond GC9 TIL 3 inkubiert worden waren, ergaben nach Inkubation der T-Zellen mit Medium und den Nierenkarzinomzellen ebenfalls eine höhere IL-5 -als IFN- γ Produktion (Abbildung 16). Nach Abzug des Mediumwertes war allerdings IL-5 nicht tumorspezifisch. Hier zeigte sich also eine eher in Richtung Typ-I gehende Immunantwort.

Ergebnisse

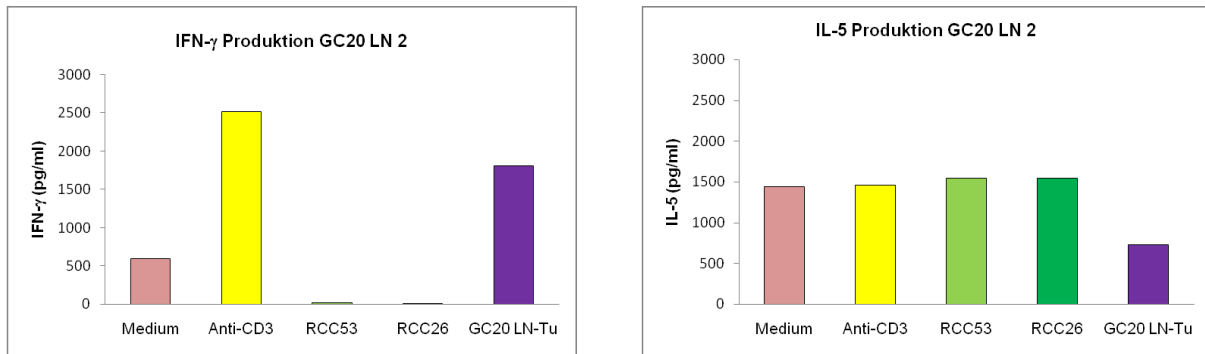


Abbildung 17: IFN- γ und IL-5 Produktion GC20 LN 2

Der Clod GC20 LN 2 (Abbildung 17) zeigte eine sehr hohe tumorspezifische IFN- γ Produktion. IL-5 wurde sowohl nach Inkubation mit den autologen Magenkarzinomzellen, als auch mit dem Medium und den Kontrollzellen unspezifisch sezerniert. Dieser Clod weist somit eine Typ-I-Polarisierung auf. Die anderen beiden Clods des *H. pylori* positiven Patienten GC20, GC20 TIL 3 und GC20 TIL 4, zeigten nach Inkubation mit dem GC 20 LN-Tu hingegen sowohl eine deutliche tumorspezifische IFN- γ - Produktion wie auch IL-5-Produktion mit vergleichbar hoher Zytokinmenge. Die Kontrolltumoren RCC53 und RCC26 produzierten wiederum nur geringe Mengen an Zytokin weit unter dem cut off level. Im Vergleich zum Clod GC20 LN 2 zeigen sie damit eine gemischte Typ-I/Typ-II-Immunantwort (nicht dargestellt).

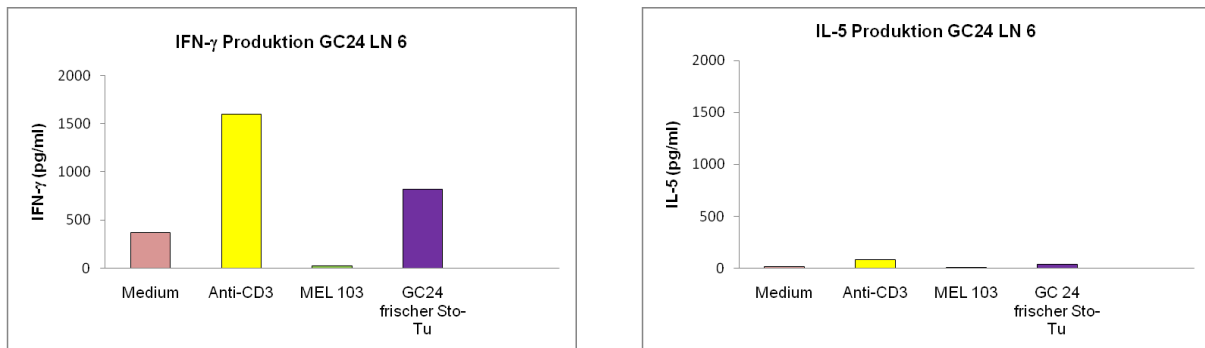


Abbildung 18: IFN- γ und IL-5 Produktion in GC24 LN 6

Da keine Tumorzelllinien vorhanden waren, wurden im CRA des Patienten GC24 die T-Lymphozyten erstmals mit autologen Tumorzellen, welche frisch nach enzymatischer Verdauung gewonnen worden waren, inkubiert (Abbildung 18). Die Zellen dieses Patienten, wie auch die des Patienten GC30 (s.u.) wurden nicht phänotypisiert, daher war nicht bekannt, welche Kontrollzelllinien übereinstimmende Allele mit dem Magenkarzinom hatten. Als Kontrollzelllinien wurden hierauf MEL103, bzw. RCC53, MEL118 und MEL119 ausgewählt, welche große Teile an Allel-Komponenten abdeckten. Es zeigte sich eine deutliche tumorspezifische Typ-I-Immunantwort mit hohen IFN- γ -Zytokinwerten, die

Ergebnisse

Kontrollzellen der Melanomzelllinie MEL103 zeigten keine spezifisch messbare Zytokinproduktion. IL-5 wurde im Vergleich zu IFN- γ nur sehr wenig produziert.

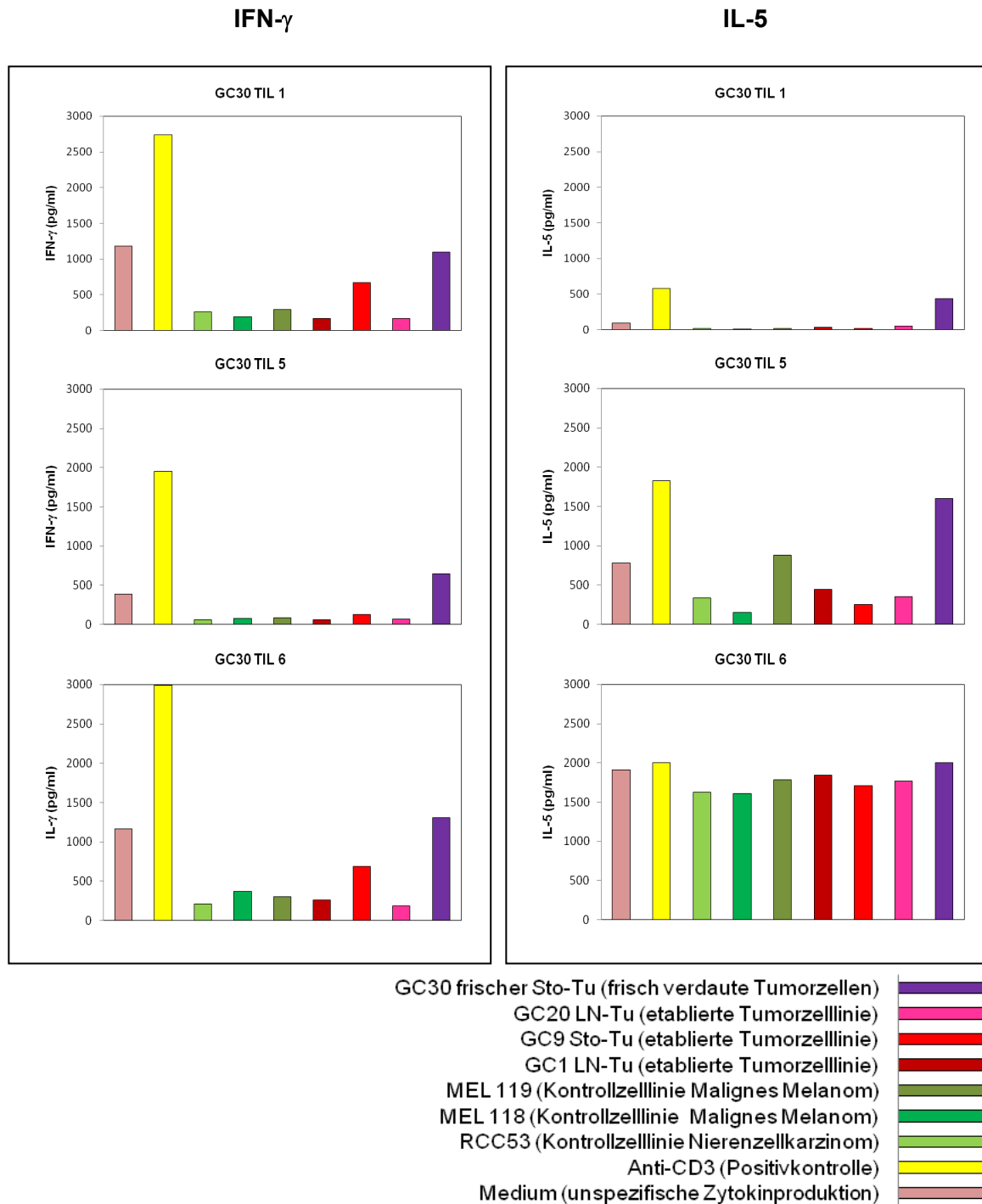


Abbildung 19: IFN- γ und IL-5 Produktion in GC30 TIL 1, GC30 TIL 5 und GC30 TIL 6

Generell zeigte sich bei frisch verdauten Tumorzellen die Tendenz, im Vergleich zu den etablierten Tumorzelllinien nach Inkubation mit autologen T-Zellen konstant hohe Zytokinwerte zu produzieren. Dies ist auch bei Patient GC30 in den Abbildung 19, sichtbar.

Ergebnisse

T-Zell Cloids des Patienten GC30 wurden sowohl mit frischen Magenkarzinomzellen nach enzymatischer Verdauung, als auch mit allogenen Magenkarzinom-Zelllinien inkubiert. Kontrollzelllinien waren Nierenkarzinomzellen und Zellen aus Melanomen. Je nach Cloid zeigte sich ein unterschiedliches Bild an IFN- γ und IL-5 Zytokinproduktion: In allen drei Cloids war der Hintergrund- Zytokinwert annähernd gleich hoch oder höher als der Zytokinwert in den Kontrollzelllinien, damit zeigten diese keine spezifische IFN- γ und IL-5 Produktion. Ein deutliches Ansprechen der T-Zellen zeigte sich dagegen bei Inkubation mit dem frischen allogenen Primärtumor GC30. Die T-Zell-Cloids GC30 TIL 1 und GC30 TIL 5 sezernierten deutlich mehr sowohl IFN- γ als auch IL-5 als die Kontrollzelllinien oder die Zelllinien der allogenen Magentumore GC1 LN-Tu, GC9 Sto-Tu, GC20 LN-TIL1. Allerdings war der Medium-Wert höher als die IFN- γ Produktion. Der T-Zell-Cloid GC30 TIL 6 sezernierte ebenfalls große Mengen an IFN- γ und IL-5, hohe IL-5 Werte zeigten aber auch die Kontrollzelllinien und allogenen Magenkarzinomzelllinien. Zusammenfassend zeigte sich in den Cloids des Patienten GC30 eine tumorspezifische, gemischte Typ-I/Typ-II-Immunantwort.

Nicht alle CRA mit autologen Zellen zeigten eine tumorspezifische Immunantwort. Zum Beispiel zeigte keiner der LN Cloids des Patienten GC1 eine tumorspezifische Zytokinproduktion nach Inkubation mit der autologen Lymphknotenmetastase (nicht dargestellt).

Insgesamt wurden in den CRA 38 Cloids von *H. pylori* positiven Patienten und 5 Cloids des einzigen *H. pylori* negativen Patienten getestet. 17 Cloids der *H. pylori* positiven Patienten zeigten keine tumorspezifische Zytokinproduktion, 12 Cloids waren gemischt Typ-I/Typ-II polarisiert, zwei Cloids produzierten nur spezifisch IFN- γ , sieben Cloids nur spezifisch IL-5.

Drei Cloids des *H. pylori* negativen Patienten hatten kein tumorspezifisches Zytokin sezerniert, ein Cloid war grenzwertig Typ-II polarisiert und ein Cloid zeigte eine alleinige Typ-II-Zytokinproduktion.

Um nun in den gemischten Immunantworten eine Typ-I/ Typ-II-Polarisierung weiter differenzieren zu können, wurde für jeden gemischten Cloid die Ratio der tumorspezifischen IFN- γ : IL-5 Sekretion gebildet. Eine Ratio größer als zwei wurde als eine Typ-I-Antwort gewertet, bei einer Ratio kleiner 0,5 dominierte die Typ-II-Antwort. Ratios zwischen 0,5 und 2 galten als kombinierte Typ-I/Typ-II-Immunantwort. Die Ratios sind in Tabelle 23 gezeigt.

Ergebnisse

Tabelle 23: IFN- γ : IL-5 Ratio in tumorspezifischen T-Zell-Cloids

TIL	Ratio IFN- γ / IL-5	Immunantwort	Tumor	Stimulus
GC7 TIL 10	0,500	gemischt	autolog	GC7 Sto-Tu
GC9 TIL 3	0,002	Typ II	autolog	GC9 LN-Tu
GC20 TIL 3	0,850	gemischt	autolog	GC20 LN-Tu
GC20 TIL 4	5,410	Typ I	autolog	GC20 LN-Tu
GC27 TIL 4	2,870	Typ I	autolog	frischer GC27 Sto-Tu
GC29 TIL 2	2,800	Typ I	allogen	frischer GC30 Sto-Tu
GC29 TIL 4	1,720	gemischt	allogen	frischer GC30 Sto-Tu
GC29 TIL 5	0,730	gemischt	allogen	frischer GC30 Sto-Tu
GC30 TIL 1	3,820	Typ I	autolog	frischer GC30 Sto-Tu
GC30 TIL 5	0,320	Typ II	autolog	frischer GC30 Sto-Tu
GC30 TIL 6	1,660	gemischt	autolog	frischer GC30 Sto-Tu
GC32 TIL 1	1,320	gemischt	allogen	GC1 LN-Tu
LN	Ratio IFN- γ / IL-5	Immunantwort	Tumor	Stimulus
GC24 LN 6	7,910	Typ I	autolog	frischer GC24 Sto-Tu

Von den 13 T- Zell-Cloids zeigten zwei Cloids eine Typ-II-Immunantwort, sechs Cloids eine gemischte Immunantwort und fünf Cloids eine Typ-I-Immunantwort nach tumorspezifischer Stimulierung. Damit scheint die Mehrheit der tumorspezifischen T-Zellen Zytokine in Richtung einer gemischten oder Typ-I-Polarisierung zu produzieren, dies veranschaulicht auch noch einmal Abbildung 20:

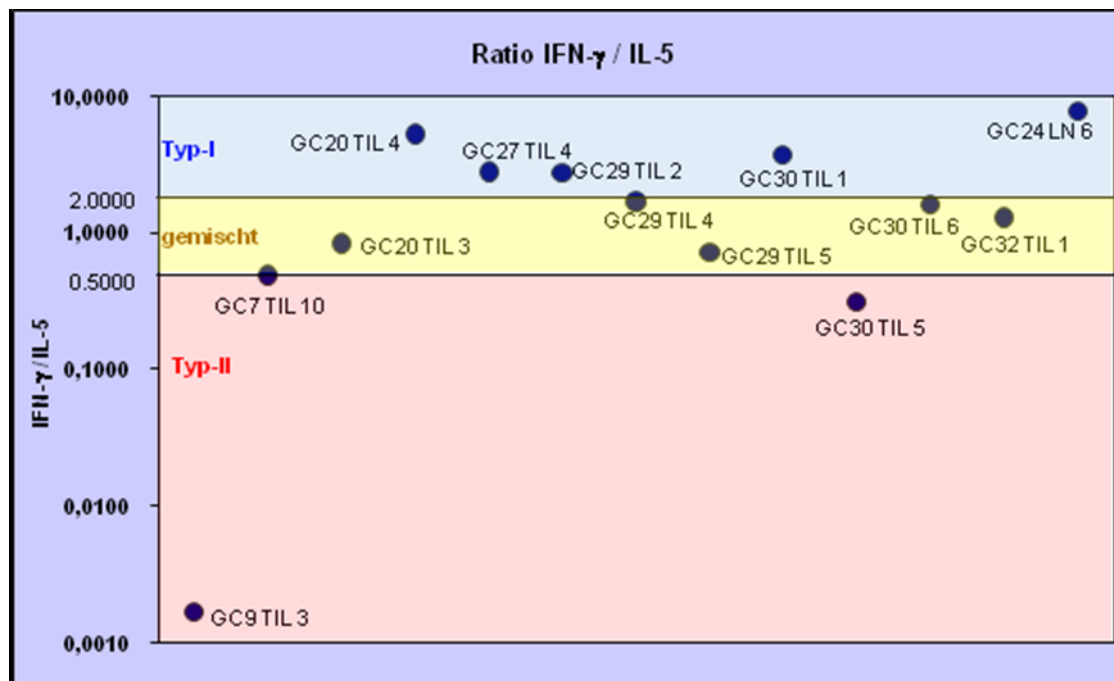


Abbildung 20: Polarisierung der tumorspezifischen Zytokinproduktion von T-Zellen nach Bildung der Ratio von IFN- γ zu IL-5-Produktion. Alle im roten Bereich auftretenden T-Zell-Cloids weisen eine Polarisierung in Richtung Typ-II-Immunantwort auf; die Mehrheit der T-Zell-Cloids ist im blauen Bereich dargestellt und polarisiert in Richtung Typ-I-Immunantwort.

3.5 Tumorinfiltrierende dendritische Zellen

In den zuvor vorgestellten Versuchen wurde gezeigt, dass eine Infektion mit *H. pylori* als Stimulus dienen kann zur Erschaffung eines tumorspezifischen Zytokinmilieus durch T-Zellen nach Tumorkontakt. Nun wurden Immunzellen der unspezifischen Abwehr, dendritische Zellen, auf ihr Verhalten nach Infektion der Magenmukosa durch *H. pylori* untersucht.

dendritische Zellen spielen durch ihre Funktion in der Präsentation von Antigenfragmenten eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen T-Lymphozyten und deren Spezifizierung auf ein Pathogen. Des Weiteren ist bekannt, dass durch eine Infektion der Magenmukosa mit *H. pylori* ein Typ-I-Zytokinmilieu geschaffen wird, welches insbesondere im lokalen Bereich die zelluläre Immunabwehr stimuliert. In Kombination ergab sich die Annahme, dass auch andere Immunabwehrzellen wie dendritische Zellen selbst durch das von *H. pylori* begünstigte Zytokinmilieu aktiviert werden. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde die Anzahl aktivierter dendritischer Zellen in *H. pylori* positivem und *H. pylori* negativem Magenkarzinomgewebe analysiert. Ziel war es herauszufinden, ob in Magenkarzinomgewebe, welches durch *H. pylori* infiziert worden war, mehr antigenpräsentierende dendritische Zellen zu finden sind als in *H. pylori* freien Tumorgewebe.

In einer immunhistochemischen Analyse wurden dendritische Zellen in Magenkarzinomgewebe mit den Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD209/CD83 inkubiert. CD209 wird auf naiven dendritischen Zellen exprimiert, während CD83 auf reifen dendritischen Zellen vorkommt. In einer CD209/CD83 Doppelfärbung wurde Magenkarzinomgewebe von fünf *H. pylori* positiven und fünf *H. pylori* negativen Patienten ausgewählt, immunhistochemisch angefärbt und die Anzahl der dendritischen Zellen ausgewertet. Die Abbildungen 21 und 22 zeigen Ausschnitte aus immunhistochemischen Färbungen.

Ergebnisse

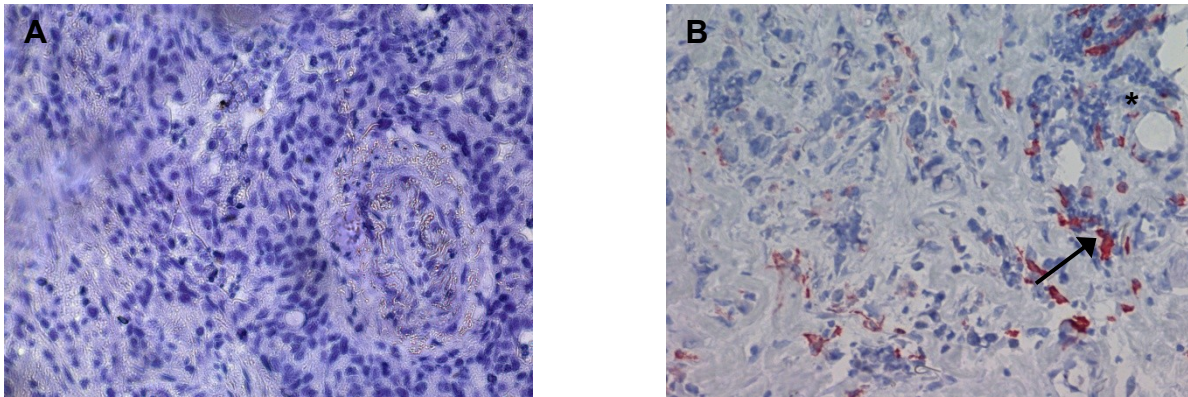


Abbildung 21: Immunhistochemische AEC-Färbung zum Nachweis dendritischer Zellen in Magenkarzinomgewebe des Patienten CA 446, Vergrößerung 1:200. In Abbildung **A** ist die Negativkontrolle für anti CD209 mit der Anfärbung durch den Isotyp-Antikörper Maus IgG2b dargestellt. Es sind keine positiv gefärbten dendritischen Zellen zu sehen, das Zellgewebe zeigt nur eine unspezifische gräuliche Hintergrundfarbe zu dunkleren bläulich gefärbten einzelnen Zellverbänden. Abbildung **B** zeigt die AEC-Färbung, rot hervortretend stellen sich Anti-CD209 markierte dendritische Zellen dar (siehe Pfeil). Es zeigt sich eine relativ gleichmäßige Verteilung der dendritischen Zellen innerhalb eines Verbandes aus Karzinomzellen. Die normalerweise homogene Struktur einer Magenmukosa ist hier vollständig aufgehoben, die Anordnung der Karzinomzellen ist chaotisch mit unterschiedlicher Zellgröße und Ansätzen von Gefäßneubildungen (siehe *)

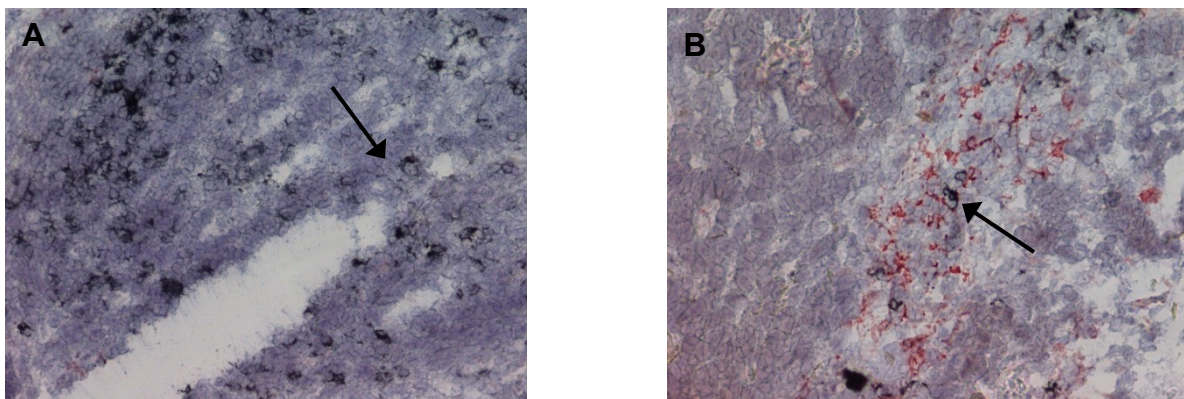


Abbildung 22: Immunhistochemische Silber-Färbung dendritischer Zellen in Magenkarzinomgewebe des Patienten CA 446, Vergrößerung 1:200. In Abbildung **A** sind Anti CD83 positive, reife dendritische Zellen schwarz-silbrig markiert (siehe Pfeil). Abbildung **B** zeigt die immunhistochemische AEC/Silber-Doppelfärbung dendritischer Zellen. Ein roter Körper markiert eine dendritische Zelle, schwarze Ausläufer an der Zelle zeigen dazu die reife, aktivierte Form an.

Hellrot gefärbte Elemente markierten die dendritischen Zellen, silbrig-schwarz angefärbt waren dendritische Zellen in einem reifen, aktivierten Zustand. Die Kontroll-Objektträger Färbungen ergaben im Gegensatz dazu keine angefärbten Zellbestandteile bzw. nur einen unspezifischen grauen „Background“ des Zellgewebes. Als Doppelfärbung zeigten sich mit einem roten Zellkörper und silbrig-schwarzen Ausläufern aktivierte dendritische Zellen im direkten Vergleich zur Gesamtpopulation der dendritischen Zellen im Gewebe. Pro

Ergebnisse

untersuchtes Gewebe wurden 20 Areale von jeweils 0,11 mm² bei 200 facher Vergrößerung ausgezählt. Das Ergebnis ist in Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24: Immunhistochemische Doppelfärbung dendritischer Zellen in *H. pylori* positivem und *H. pylori* negativem Tumorgewebe.

Tumor H.p.-	CD209	CD209/CD83	Tumor H.p.+	CD209	CD209/CD83
Ca 394*	748	0	Ca 410	809	3
Ca 415	791	0	Ca 430	510	5
Ca 421	1131	2	Ca 438	429	3
Ca 436	436	0	Ca 446	730	9
Ca 444	622	2	Ca 449	725	73
t-Test	Mittelwert: 745,6	Mittelwert: 0,8	t-Test	Mittelwert: 640,6	Mittelwert: 18,6
	SD: 256,8	SD: 0,49		SD: 162,3	SD: 13,6

* "Ca" bezeichnet neben „GC Nr.“ eine alternative Nummerierung zur Archivierung von Daten der Magenkarzinompatienten in der klinischen Studie

In der AEC-Einfachfärbung (CD209) zeigte sich nach Auszählung der dendritischen Zellen in *H. pylori* positivem Gewebe kein signifikanter Unterschied zur Anzahl dendritischer Zellen in *H. pylori* negativen Gewebe. In der Doppelfärbung hingegen nahm die Summe aktivierter dendritischer Zellen bei *H. pylori* positivem Tumorgewebe gegenüber *H. pylori* negativem Gewebe deutlich zu. Abbildung 23 stellt die statistische Auswertung mit dem Einstichproben t-Test dar. Die Auszählung der CD209/CD83 positiven dendritischen Zellen ergibt eine signifikant höhere Anzahl an Zellen pro Gesichtsfeld in *H. pylori* positiven Patienten im Vergleich zu *H. pylori* negativen Patienten ($p=0,008$). Dies ist ein Hinweis darauf, dass das Bakterium neben T-Lymphozyten auch die Aktivierung anderer Immunzellen wie antigenpräsentierender Zellen beeinflussen kann und damit entscheidend zu einer Anti-Tumor Immunantwort beitragen kann.

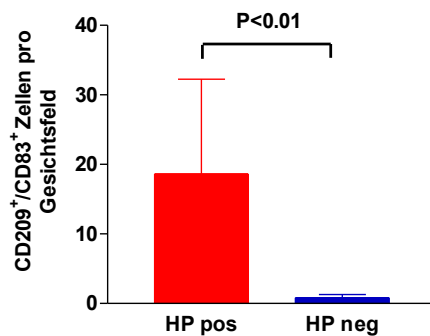


Abbildung 23: Statistischer Vergleich zwischen der Anzahl CD209/CD83 positiv gefärbter dendritischer Zellen pro Gesichtsfeld von *H. pylori* positiven Patienten und *H. pylori* negativen Patienten. Die Zahl der CD209⁺/CD83⁺ dendritischen Zellen *H. pylori* positiver Patienten ist signifikant höher als die Zahl CD209⁺/CD83⁺ dendritischen Zellen *H. pylori* negativer Patienten ($P<0.01$).

4. Diskussion

4.1 Eigenschaften von T-Lymphozyten im Mikromilieu von Magenkarzinomgewebe

Das Magenkarzinomgewebe stellt weit mehr als eine Ansammlung genetisch, phänotypisch und funktionell pathologisch veränderter Zellen dar. Er kann darüber hinaus als ein komplexes Gewebe definiert werden, dessen zelluläre und strukturelle Komponenten miteinander in Kommunikation stehen und sich gegenseitig beeinflussen. Die für Tumorwachstum, Invasion und Metastasierung entscheidenden Vorgänge wie Stromareaktion, Angiogenese und Ab- und Umbau extrazellulärer Matrix werden nicht nur durch die Tumorzellen selbst, sondern auch durch infiltrierende Entzündungszellen gesteuert. Tumordinfiltrierende Lymphozyten bilden mit ortständigen Zellen das Mikromilieu eines soliden Tumors [96]. Eine zelluläre Immunantwort gegen solide Tumore erfordert die Infiltration dieser spezifischen Lymphozyten ins Tumormikromilieu und die zytotoxische Attacke durch direkte Zell-Zell-Konjugation [97]. Die molekularen Mechanismen eines antigenspezifischen Tumorkillings sind bereits gut erforscht. So setzen zytotoxische T-Zellen mittels Exozytose das Protein Perforin und die Serumprotease Granzyme B in den Spalt zwischen Tumorzelle und Immuneffektorzelle frei. Perforin baut daraufhin Poren in die Tumorzellwand ein, Granzyme B dringt dadurch bis zum Nukleus der Tumorzelle vor und setzt durch Proteolyse schwere, für die Tumorzelle tödliche Schäden [98]. Die zellulären Mechanismen, welche eine direkte Tötung einer Tumorzelle auslösen, sind wenig bekannt und Target zahlreicher laufender Studien. So stellen Knutson und Mitarbeiter dar, dass Anti-Tumor-Therapien, welche auf Immunzellen basieren, sich auf die Auslösung einer zytotoxischen T-Zell-Antwort fokussieren, da diese zytotoxischen T-Zellen die Tumorzelle direkt töten können. Andererseits werden die Effekte einer Th1-Zelle für die Anti-Tumor-Forschung immer interessanter, da diese Zytokine sezernieren, welche sogenannte death receptors auf der Tumorzelloberfläche aktivieren und so die Apoptose der Tumorzelle einleiten [99]. In verschiedenen Experimenten konnten nach Aufbereitung von Gewebe unterschiedlicher Tumorentitäten Lymphozyten isoliert werden, die als Tumordinfiltrierende Lymphozyten (TIL) bezeichnet wurden [69]. Diese TIL stellen einen elementaren Baustein in der zellvermittelten Bekämpfung körpereigenen Tumorgewebes durch das Immunsystem dar. Sie besitzen verschiedene Mechanismen, mit welchen sie Tumorzellen angreifen und zerstören können. Wie oben beschrieben, wirken TIL direkt zytolytisch auf Tumorgewebe durch Sezernierung von Perforinen. Winter und Mitarbeiter konnten im Mausmodell außerdem demonstrieren, dass T-Zellen und Tumorzellen Chemokine produzieren, welche

Diskussion

Makrophagen aktivieren und damit auch indirekt eine Rolle bei der T-Zell vermittelten Tumorregression spielen [100]. In Experimenten zur Erforschung immuntherapeutischer Vorgänge in Melanomgewebe zeigten sie weiterhin, dass nach adoptivem Transfer tumorspezifischer T-Zellen Makrophagen in die Region der etablierten pulmonalen Metastasen wandern [101]. Diese Beobachtung stimmte mit weiteren Studienergebnissen überein, in denen eine große Anzahl von T-Lymphozyten und Makrophagen im Bereich von Tumoren zu finden war [102, 103]. Dudley und Mitarbeitern gelang ein entscheidender Schritt bei der Immuntherapie menschlicher Melanome; sie isolierten und kultivierten T-Zellen aus TIL-Verbänden und expandierten diese *in vitro*, bevor sie die tumorreaktiven T-Zellen wieder in Patienten transferierten. In 2 von 13 Fällen wurde eine komplette Tumorregression erreicht [90]. Die gleiche Arbeitsgruppe demonstrierte in einem ähnlichen Versuchsansatz, dass ein Transfer autologer tumorspezifischer T-Zellen nach einer lymphozytenzerstörenden Chemotherapie eine Regression von metastasiertem Melanom bewirken kann [104].

Der adoptive Transfer von sensibilisierten T-Lymphozyten ist eine effektive Methode, um eine Regression von Tumoren zu vermitteln [105, 106]. T-Zellen aus Lymphknotenmetastasen wurden in einem murinen Modell für Melanom auf ihre Fähigkeit zur adoptiven Immuntherapie untersucht. Meijer und Mitarbeiter impften Mäuse mit autologen und HLA-B7 genmodifizierten Melanomzellen bzw. Nierenzellkarzinomzellen. Nach Metastasenbildung in den Lymphknoten wurden LN-T-Zellen isoliert, mit anti-CD3 und IL-2 expandiert und reinfundiert. Eine objektive Tumorregression konnte nicht beobachtet werden, gleichwohl zeigte sich eine tumorspezifische Zytokinexpression ohne toxische Reaktionen gegen das gesunde Gewebe [107].

Aber welche Mechanismen bewirken eine erfolgreiche Aktivierung eines T-Lymphozyten gegen das Tumorgewebe? Aus welchen Gründen erreichen T-Zellen gegenüber bestimmten Tumorzellen eine Tumorregression, während hingegen sie in anderen Tumorgeweben scheitern? Zwei elementare Faktoren für eine effektive Tumorbekämpfung stellen die Anzahl und die Persistenz der tumorreaktiven T-Lymphozyten dar. Piersma und Mitarbeiter bewiesen, dass eine hohe Anzahl von intraepithelialen TIL in Cervixkarzinom im Frühstadium der Tumorerkrankung eine Lymphknotenmetastasierung verhindern kann [108]. Santin und Shu erklärten übereinstimmend, dass eine hohe Konzentration von Antigen-erfahrenen T-Zellen in dem Tumorgewebe eine wichtige lokale Barriere gegen die Tumorausbreitung darstellt [109], und dass die Persistenz multipler T-Zellen essentiell für eine Tumorregression zu sein scheint [110]. Mapara und Mitarbeiter stellten zur Diskussion, dass die schlechte Überlebensrate von Magenkarzinompatienten in Zusammenhang mit der ungenügenden Anzahl magenkarzinomspezifischer T-Zellen steht [111]. TIL, welche in der adoptiven Immuntherapie transferiert wurden, proliferierten extensiv in den ersten Tagen nach

Transfer, gingen kurz danach aber zu Grunde, ohne einen therapeutischen Effekt erzielt zu haben. Der Grund schien in einer Induktion der Telomerase und der darauf folgenden rapiden Kürzung der Telomerenlänge pro Zellteilung zu liegen [112].

Daraus ist zu folgern, dass der Differenzierungsgrad und der Replikationsverlauf der individuellen TIL-Klontypen mit entscheidend sind für eine effektive Präsenz im Zielgewebe [113]. Die Arbeitsgruppe um Zhou detektierte T-Zellklone, welche über einem Monat nach Transfer im Melanomgewebe persistierten und eine komplette Tumorregression bewirkten [114]. Huang und Mitarbeiter konnten sogar einen Klontyp über 15 Monate nach Transfer im peripheren Blut isolieren. Interessant dabei war auch eine hohe Expression von kostimulatorischen Markern CD28 und CD27 durch diese T-Zellen, da diese Moleküle zum Einen wichtig sind zur Steigerung des Aktivitätsgrades von T-Zellen durch Stimulation der Interleukinausschüttung (CD28) und zum Anderen eine Rolle spielen in der Anpassung von T-Zellklonen an das jeweilige Pathogen durch Hypermutation (CD27) [113]. In dieser Dissertationsarbeit stellte sich die Frage, ob die zu untersuchenden T-Zellen tumorspezifisch sind, oder ob sie ohne ein spezielles Priming im Gewebe existieren. Dazu konnten 49 TIL von 15 Magenkarzinompatienten gewonnen werden (siehe Tabelle 22). Wenngleich die Lösung dieser TIL aus dem Tumorgewebe und die Kultivierung in den meisten Fällen gut funktioniert haben, so zeigte sich doch im Verlauf dieser Arbeit, dass die T-Zell-Cloids in ihrem Wachstum stark variierten. Die TIL-Zellklone wurden durch die Zellkultur nach Isolierung aus dem Gewebeverband gewissermaßen vorselektiert, so dass nur T-Zell-Cloids mit einem höheren Aktivitätsgrad weiter eingesetzt wurden. Einige Cloids wuchsen sehr schnell, bildeten einen bereits makroskopisch sichtbaren großen Zellverband und konnten gut passagiert werden, andere T-Zell-Cloids gingen nach wenigen Passagen zugrunde und waren damit einem Cytokine Release Assay nicht mehr verfügbar.

Doch eine Präsenz spezifischer T-Zellen in genügender Anzahl reicht alleine nicht aus, um eine effiziente immunologische Kontrolle von Tumoren zu erreichen. Einige Studien wiesen zum Beispiel nach, dass transferierte T-Zellen, welche eine hohe Aktivität gegen den Tumor besitzen, im unvorbehandelten Organismus keine Persistenz zeigen [115]. Eine Reihe von Tumoren sind zwar potentiell immunogen, zeigen aber keine Stimulation einer effektiven Anti-Tumor-Immunantwort *in vivo*. Entartete Zellen können in der Lage sein, antigenspezifische Signale an T-Zellen zu senden, ohne dadurch die volle Aktivierung der T-Zellen zu induzieren [116].

Bei der Charakterisierung und Erforschung des Verhaltens tumorspezifischer T-Lymphozyten in Primärtumorgewebe und in Lymphknotenmetastasen ist zu bedenken, dass es sich hierbei nicht um einzelne monoklonale T-Zellpopulationen handelt, sondern vielmehr um eine nur schwer auseinander zu haltende Anzahl unterschiedlicher T-Zell-Subtypen mit unterschiedlichen Eigenschaften und Zielfunktionen. So zeigten Santin und Mitarbeiter zum

Diskussion

Beispiel, dass TIL mehr CD8⁺T-Zellen besitzen, welche ein Typ-I-Zytokin- und HLA-DR-Oberflächen-Muster exprimieren als Lymphozyten aus Tumor drainierenden Lymphknoten (LN-T Zellen) oder aus der Blutzirkulation (PBL) [109]. CD4⁺ Zellen dominierten in PBL und regionalen Lymphknotenmetastasen. Am Beispiel des Nierenzellkarzinoms zeigten Angevin und Mitarbeiter, dass TIL Typ-I-Zytokine produzieren, aber auch unter dem Einfluss von Zytokinen wie IL-10 und IL-6 im Tumorversorgungssystem stehen, welche die Immunantwort herunterregulieren können [117]. In dieser Dissertation wurden ebenfalls die TIL und LN-T Zellen auf ihre CD8⁺ oder CD4⁺ Expression untersucht. Hier konnte die von Santin dargestellte Polarisation nicht gezeigt werden. Die prozentuale Verteilung der CD8⁺ TIL und der CD4⁺ TIL war mit 25 CD8⁺ TIL gegen 26 CD4⁺ TIL gleich. Die LN-T Zellen waren zwar mehrheitlich CD8⁺ positiv, allerdings waren insgesamt weniger LN-T-Zellen gewonnen worden, so dass keine Aussage zum Verhältnis von CD8⁺ / CD4⁺ TIL versus LN-T-Zellen getroffen werden kann. Wurden von einem GC-Patienten sowohl TIL als auch LN-T-Zellen isoliert, so ergab sich kein einheitliches Bild über die Verteilung von CD8⁺ / CD4⁺ auf den Zellen; TIL und LN-T-Zellen waren entweder alle CD8⁺ positiv oder CD4⁺ positiv, oder aber in Variation einmal CD8⁺ und dann CD4⁺ positiv (siehe Tabelle 22).

4.2 Der Immunmechanismus tumorreaktiver T-Lymphozyten im Magenkarzinom

T-Lymphozyten, welche eine Typ-I-Immunantwort induzieren, spielen eine entscheidende Rolle bei der Tumorabstoßung. Diese Hypothese wird durch klinische Studien unterstützt, welche eine deutlich höhere Ansprechrate in Tumorpatienten fanden, welche mit TIL behandelt wurden und eine gp100 spezifische IFN- γ Sekretion zeigten [118]. Weitere Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass die Effektivität eines adoptiven T-Zell-Transfers mit tumorspezifischer Freisetzung von IFN- γ assoziiert ist [89, 101, 119, 120], eine tumorspezifische Freisetzung von Typ-II-Zytokinen wie IL-5 jedoch mit einer Tumorprogression korreliert.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, gibt es einen positiven Zusammenhang zwischen therapeutisch wirksamen tumorspezifischen T-Zellen und einem Typ-I-Phänotyp. Dieser Phänotyp besteht aus CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen, welche MHC-Klasse-I oder MHC-Klasse-II restringiert nach Antigenerkennung zu zytotoxischen T-Zellen, T-Helferzellen oder T-Suppressorzellen differenzieren.

Naive CD8⁺ T-Zellen werden in Untergruppen unterteilt: Tc1-Zellen sezernieren IL-2 und IFN- γ ; Tc2-Zellen produzieren wie T-Helferzellen IL-4, IL-5 und IL-10 [121]. Nach Antigenaufnahme führt die Produktion von Typ-I-Zytokinen wie IL-2, IFN- γ und TNF- β zu einer zellulären Immunität, während Typ-II-Zytokine (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 und IL-13) assoziiert sind mit der Antikörperproduktion [119].

CD8⁺ T-Zellen sind eine der wichtigsten Komponenten in der zellulären Immunität. Neben der, in dieser Dissertation fokussierten Aufgabe der Eliminierung von Tumorzellen, spielen sie eine Schlüsselrolle in der Lyse von Zellen, welche mit Viren, Protozoen, Bakterien und Pilzen infiziert wurden [122]. Sie vermitteln Transplantatabstoßung und Gewebedestruktionen, welche bei den Autoimmunkrankheiten EAE, multiple Sklerose, Psoriasis vulgaris, insulinabhängigem Diabetes mellitus sowie bei rheumatoider Arthritis gesehen werden [123].

In zahlreichen Studien wurde eine Überlegenheit der CD8⁺ T-Zellen gegenüber den CD4⁺ Lymphozyten in der Tumorbekämpfung bewiesen. So zeigten Cervixkarzinom-Patientinnen mit negativem Lymphknotenbefall und guten prognostischen Parametern eine signifikant höhere Anzahl an CD8⁺ TIL, eine höhere CD8⁺/CD4⁺ T-Zell-Ratio und höhere CD8⁺/regulatorische T-Zellen-Ratio in Gewebe und peripheren Blut [108]. Der adoptive Transfer tumorreaktiver T-Zellen nach medikamentös induzierter Lymphodepletion in Patienten mit metastasierendem Melanom führte in vivo zu einer klonalen Expansion von T-Zellen, die sowohl eine tumorspezifische Zytotoxizität als auch antigen-spezifische Typ I-

Zytokinsekretion aufwiesen [90]. Eine schwache Antitumor Aktivität zeigt sich hingegen bei T-Zellen mit einem tumorspezifischen Zytokinmuster des Typs II (IL-4, IL-10) [119]. Hu und Mitarbeiter demonstrierten, dass CD8 und nicht CD4 Zellen eine Tumorregression vermitteln [124]. Darüber hinaus wurden in Patienten mit progressiv-wachsendem Tumor eine tumorspezifische Typ-II-Zytokinantwort gefunden [107]. Patienten mit malignem Melanom oder Nierenzellkarzinom wiesen einen Tumorprogress bei gleichzeitiger Typ-II polarisierter Zytokinexpression auf [125].

Die in dieser Dissertationsarbeit durchgeführten Cytokine Release Assays zeigten ein sehr unterschiedliches Ergebnis an Typ-I/Typ-II polarisierter Zytokinproduktion. Einige T-Zellen zeigten eine eindeutige Typ-I-Polarisierung, andere T-Zellen wiederum keine tumorspezifische Immunantwort, ein Großteil der gemessenen Zytokinproduktion ergab eine gemischte Typ-I/Typ-II-Immunantwort. Zu der Gruppe der nicht-tumorspezifisch gewerteten T-Zellen gehörten auch die LN-T-Zellen des Patienten GC1. Obwohl die Höhe der Zytokinmessungen ein eindeutig negatives Ergebnis zeigte, kann streng genommen dieser CRA-Versuch nicht in Vergleich zu den übrigen CRAs gesetzt werden. Die in diesem Assay eingesetzten T-Zell-Clonds wurden nicht auf ihre CD4/CD8 Oberflächenmarker getestet. Falls die CD4⁺ positiven T-Zellen im CRA dominiert haben, konnte keine Interaktion mit dem MHC-I positiven Tumor (FACS Daten nicht gezeigt) stattfinden und so keine tumorspezifische Immunantwort ausgebildet werden.

Ein wichtiger, aber in der Gesamtinterpretation der CRAs letztlich doch untergeordneter Aspekt ist die eindeutige Typ-II-Polarisierung des T-Zell-Clonds GC9 TIL 3, da diese Immunantwort von dem einzigen *H. pylori* negativen Patienten stammt. Dieses Ergebnis könnte zwar einen Hinweis darauf geben, dass eine *H. pylori*-Negativität tatsächlich eine Typ-II-Polarisierung der Immunantwort zur Folge haben kann, zur Untermauerung dieser These wären allerdings mehr Experimente mit Gewebe weiterer *H. pylori* negativen Patienten nötig gewesen. Diese konnten bedauerlicherweise nicht durchgeführt werden, da keine weitere Kultivierung von Magenkarzinomzellen *H. pylori* negativer Patienten gelang.

Nach Bildung einer Ratio von IFN- γ / IL-5 zeigten einige T-Zellen, welche bei alleiniger Auswertung der Zytokinmenge noch als gemischt Typ-I / Typ-II-Immunzellen galten, nunmehr eine Typ-I-Polarisierung. Dies macht deutlich, dass es sich bei dem tumorspezifischen Zytokinmilieu nicht um einen streng definierten Zustand im Sinne eines reinen Typ-I - oder reinen Typ-II-Immunmilieus handelt, sondern dass die Übergänge zwischen diesen beiden Polarisierungen fließend sind. Es geht nicht um einen festen Zustand eines Immunmilieus, sondern vielmehr um einen aktiven dynamischen Vorgang, in dem auch durchaus ein „switchen“ zwischen Typ-I und Typ-II-Polarisierung denkbar ist. Hier kommt dann die Bedeutung einer „stimulierenden“ Reaktion wie die Infektion mit *H. pylori* zu

Diskussion

tragen. Die Reaktion auf die Invasion des Bakteriums in die Magenmukosa kann den entscheidenden Schwerpunkt auf die Ausbildung eines Typ-I-Immunmilieus, und damit die Ausbildung eines therapeutisch wirksameren tumorspezifischen Immunmilieus setzen.

4.3 Die Rolle von Interferon- γ bei einer tumorspezifischen Immunantwort

Eine Vielzahl von Wirkungen des IFN- γ auf verschiedene Zellen des Immunsystems und vor allem auf tumorspezifische T-Zellen und ihre Interaktion mit der Tumorzelle wurden beschrieben. In virusinfizierten Zellen wird die virale Replikation durch IFN- γ gehemmt [126]. Eine Wirkung von IFN- γ auf Monozyten zeigt sich in der Differenzierung zu Makrophagen und der Reifung von Antigenpräsentierenden Zellen [127]. Auch die Aktivität von natürlichen Killerzellen wird durch das Zytokin gesteigert.

IFN- γ koordiniert diverse zelluläre Programme zur Transkription immunologisch relevanter Gene. Eine große Anzahl von Genen wird durch IFN- γ hochreguliert, darunter das von ICAM-I (ein vaskuläres Zelladhäsionsmolekül) [128], MIP-1 α , MIP-1 β [129] oder Monozyten chemoattractant [130]. IFN- γ fördert die Expression von Zellrezeptoren für Tumornekrosefaktoren [131]. Außerdem reguliert es die Expression des Oberflächenrezeptors Fas hoch und erhöht die Fas-vermittelte Apoptose in Magenkarzinom-, Lungenkarzinom- und Larynxkarzinomzelllinien [132].

IFN- γ wird von Th1 Lymphozyten, CD8⁺ zytotoxischen Lymphozyten und natürlichen Killerzellen, sowie B-Zellen, und antigenpräsentierenden Zellen sezerniert [133]. Die IFN- γ Produktion durch antigenpräsentierende Zellen (Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen) ist wichtig für die Selbststimulation und die Aktivierung von benachbarten dendritischen Zellen. In der Frühphase einer Infektionsbekämpfung wird IFN- γ von NK-Zellen und Antigenpräsentierenden Zellen sezerniert [134], wohingegen T-Lymphozyten die Hauptquelle von IFN- γ in der adaptiven Immunantwort sind [135, 136].

IFN- γ beeinflusst außerdem die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen in Richtung eines Th1 Phänotyps [137]. Es hemmt das Wachstum von Th2 Populationen, seine eigene Produktion wird wiederum durch IL-4 inhibiert. Diese reziproke Hemmung verstärkt die Polarisierung von Typ-I- und Typ-II-Immunantworten [55, 138, 139, 140, 141]. Nakamura und Mitarbeiter dokumentierten, dass eine Typ-I-Zytokin-Ausschüttung mit IFN- γ und GM-CSF eine Antigen-Wiedererkennung in vivo fördert, während hingegen Typ-II-Zytokine wie IL-10 die Interaktion und die funktionelle Aktivität von Subpopulationen von T-Effektorzellen supprimiert [56, 142].

Die Interaktion von IFN- γ mit anderen Zytokinen wie IFN- α , IFN- β , TNF- α [134], sowie mit den Interleukinen IL-12 und IL-18 [143, 144, 145] stellt weitere Regulationsmechanismen für eine ausgewogene Reaktion der im Immunsystem beteiligten Zellen dar. Eine IFN- γ induzierte, spezifische zytotoxische Immunität gegen neoplastische Zellen wird durch direkte und indirekte Mechanismen gefördert [146]. Fallarino und Mitarbeiter zählen zu den ersten

Diskussion

Wissenschaftlern, welche zeigen konnten, dass IFN- γ direkt das Tumorstadium hemmen kann [147].

In einer Studie von Dighe spielte endogen produziertes IFN- γ eine wichtige Rolle in der Vermittlung einer, durch Lipopolysaccharide induzierten Reduktion von Fibrosarkomen in Mäusen. Fibrosarkom-Zellen, welche keinen IFN- γ Rezeptor besaßen, zeigten eine erhöhte Tumorigenität im Vergleich zu den Kontrollzellen [148]. Auch Hung und Mitarbeiter bewiesen, dass Effektor-T-Zellen tumorspezifisch IFN- γ sezernieren, und dass IFN- γ einen entscheidenden Faktor für eine T-Zell vermittelte Tumorstadium darstellt [149]. Shankaran und Mitarbeiter demonstrierten an Hand des karzinogen-induzierten Sarkoms und des spontanen epithelialen Karzinoms in ihrer Studie, dass Lymphozyten und IFN- γ zusammen einer Ausbreitung des Primärtumors vorbeugen und Tumorzellen mit reduzierter Immunogenität ausselektieren [150]. Durch indirekte Mechanismen, wie die Induktion der Angiogenese-Inhibitoren IP10 und Mig hemmt IFN- γ das Wachstum maligner Zellen, da durch mangelnde Vaskularisierung die Versorgung des Tumors unterbunden wird; des weiteren wirken IP10 und Mig chemotaktisch auf CD8⁺ T-Zellen.

IFN- γ induziert die Antigenverarbeitung und verstärkt die Antigenpräsentation sowie die Expression von MHC-I und MHC-II-Molekülen bei Tumorzellen und antigenpräsentierenden Zellen [151, 152, 153]. Die Anzahl der Epitope, welche von CD8⁺ T-Zellen in Kombination mit MHC-I erkannt werden, werden erhöht [154]. Weiterhin induziert IFN- γ in den Zielzellen den Eintritt in die G1-Phase des Zellzyklus und löst Apoptose in den Tumorzellen aus [155].

Nach Interaktion mit der Zielzelle werden viele Effektorzellen apoptotisch, erleiden den sogenannten „Aktivierungs-Induzierten-Zelltod“ [151]. Ein Teil der Effektorzellen entwickelt sich jedoch zu Gedächtniszellen, aus denen bei erneuter Antigenkonfrontation innerhalb weniger Stunden aktivierte Effektorzellen rekrutiert werden können [156]. In Kombination mit den Chemotherapeutika Carboplatin und Paclitaxel, kann IFN- γ signifikant das Überleben bei Ovarialkarzinom im Stadium FIGO III/IV fördern [157, 158].

In dieser Dissertation zeigten die meisten Magenkarzinompatienten eine positive Anamnese für *H. pylori*. Folgt man der Theorie, dass eine *H. pylori* Infektion eine Typ-I-Immunantwort stimuliert, wäre zu erwarten gewesen, dass in den CRAs häufiger eine alleinige IFN- γ -Produktion dominiert. Beobachtet wurden allerdings mehr gemischte Typ-I-/Typ-II-Immunantworten durch eine gleichzeitige Produktion von IFN- γ und IL-5 durch die T-Zell-Cloids bzw. ein Überwiegen von IFN- γ erst nach Bildung der Ratio von IFN- γ zu IL-5. Daher wäre für zukünftige Arbeiten neben dem Nachweis einer absoluten Menge an IFN- γ auch interessant, wie hoch der Anteil IFN- γ produzierender tumorspezifischer T-Zellen in den T-Zell-Cloids ist und wieviele der T-Zellen überhaupt IFN- γ produzieren. Eine Möglichkeit, den Anteil der IFN- γ bildenden T-Zellen aus den T-Zell-Cloids feiner zu

Diskussion

selektionieren, wäre ein intrazellulärer Nachweis von IFN- γ in den T-Zellen mittels Durchflusszytometrie.

Eine Methode zum Nachweis einzelner IFN- γ produzierender T-Zellen wäre der sogenannte Elispot Assay (Enzym-linked immunospot Assay), in welchem die Anzahl von aktivierten T-Zellen anhand ihrer Zytokinausschüttung (in diesem Fall IFN- γ) als „Spots“ sichtbar würde.

4.4 *Helicobacter pylori* und dendritische Zellen

Verschiedene experimentelle Studien zeigen eine Aktivierung dendritischer Zellen nach Kontakt mit einem *H. pylori* assoziierten Antigen. So demonstrierten Rathinavelu und Mitarbeiter, dass das *H. pylori* Außenmembranprotein 18 in dendritischen Zellen eine höhere Expression des kostimulatorischen Moleküls B7 (CD80 und CD8) bewirkte. Die dendritischen Zellen sezernierten IL-12 und initiierten durch die Produktion von IFN- γ eine Th-1 Immunantwort [159]. Die Inkubation dendritischer Zellen mit *H. pylori* Urease A und B ergab in der Studie von Volant und Mitarbeitern eine gesteigerte IL-12 Produktion. Eine noch höhere IL-12 Sekretion zeigte sich nach Inkubation mit dem ganzen Bakterium, die höchste Sekretionsrate ergab sich nach Inkubation der dendritischen Zellen mit Fragmenten der Außenmembran von *H. pylori* [160]. Eine FACS Analyse von Reifungsmarkern für dendritische Zellen wie CD80, CD83, CD86, und HLA-DR zeigte in der Arbeit von Kranzer und Mitarbeitern eine Hochregulierung nach Stimulation mit *H. pylori* bzw. *H. pylori* Lipopolysaccharid [161].

Die in dieser Dissertation durchgeführte CD209/CD83 Doppelfärbung von dendritischen Zellen im Magenkarzinomgewebe wies einen höheren Anteil aktivierter dendritischer Zellen bei *H. pylori* positiven Patienten auf als in *H. pylori* negativem Gewebe. Analog zum Modell der Stimulierung Typ-I spezifischer T-Zellen im Magengewebe nach *H. pylori* Infektion kann die These gestellt werden, dass *H. pylori* einen inflammatorischen Prozess im Magengewebe auslöst, durch den antigenpräsentierende dendritische Zellen spezifisch aktiviert werden, und dass unter dem Einfluss einer stattgefundenen *H. pylori* Infektion neben T-Lymphozyten auch für dendritische Zellen ein günstigeres Milieu zur spezifischen Bekämpfung von Tumorzellen entstehen kann. Dies könnte sich positiv auf die Abwehr des Immunsystems gegen den Tumor auswirken: aktivierte dendritische Zellen könnten nach Aufnahme des Tumorantigens sowohl direkt die Bildung von naiven CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen fördern, als auch durch Stimulierung einer IFN- γ Produktion ebenfalls eine Typ-I-Immunantwort von T-Zellen induzieren bzw. zur Aufrechterhaltung eines Typ-I-Immunmilieus beitragen.

4.5 Tumorescape-Mechanismen

Insbesondere in Kombination mit adjuvanten Chemotherapeutika wurden mittlerweile verschiedenste Immuntherapien neoplastischer Erkrankungen entwickelt, welche spezifische zelluläre Immunantworten gegen Tumorantigene in Patienten induzieren. Dennoch korreliert eine in situ Präsenz dieser Antigen-spezifischen T-Zellen nur selten mit dem klinischen Verlauf. Der Grund dafür liegt in der Tatsache, dass das Mikromilieu des Tumors immunologisch nicht inert ist, sondern sich wesentlich an der Modulation von zellulären Immunantworten beteiligt. Dabei wurden sowohl direkte als auch indirekte Mechanismen der Immunmodulation identifiziert.

Die Induktion einer sogenannten immunologischen Toleranz ist ein wesentlicher und effektiver Mechanismus, mit dem Tumore sich vor einem immunologischen Angriff schützen. Durch Mutationen, Verlust Tumor-assoziiertes Antigen oder von MHC-Komplexen können sich Tumorzellen der Kontrolle durch Effektorzellen entziehen [162]. Eine inadäquate Funktion tumorantigenpräsentierender dendritischer Zellen kann eine Aktivierung tumorspezifischer Immunzellen verhindern [163].

Weitere „Schwachstellen“ des Immunsystems in der Tumorbekämpfung liegen in einer möglichen Anergie des Immunsystems aufgrund eines Mangels an Kostimulation, einer Ignoranz vorhandener Tumorantigene aufgrund der Abschirmung des Tumorgewebes, sowie Immundeprivation. Die Immundeprivation beschreibt die Umwandlung einer für den Organismus destruktiven in eine nicht-destruktive Immunantwort durch Umwandlung der Polarisierung antigenspezifischer T-Zellen. In tierexperimentellen Untersuchungen zeigten Winter und Mitarbeiter, dass Immundeprivation bei einer Vielzahl von Tumoren nachzuweisen ist. Stark immunogene Tumore induzieren eine therapeutisch wirksame Typ-I-Immunantwort, wohingegen gering immunogene Tumore eine therapeutisch unwirksame Typ-II-Immunantwort induzieren [75].

Auch für das Magenkarzinom wurden verschiedene Mechanismen beschrieben, durch welche eine entartete Zelle ihrer Erkennung durch das Immunsystem entkommen kann und daher nicht eliminiert wird. Hirata und Mitarbeiter stellten in ihren Untersuchungen fest, dass durch Genmutation in Mikrosatelliten von Magenkarzinommetastasen und durch Methylierung die Oberflächenexpression des HLA-Klasse I Antigens stark herabgesetzt wurde. Ebenso wurden Bestandteile der Antigen-Prozessierungseinheit (antigen processing machinery APM) durch Mutationen in kodierenden Mikrosatellitensequenzen inaktiviert [164]. In Untersuchungen mit Magenkarzinomzellen, welche aus Peritonealflüssigkeit isoliert wurden, stellten Fukumoto und Mitarbeiter die Vermutung auf, dass diese Zellen durch Herunterregulierung der IL-2-Genexpression in perifokalen Immunzellen der Entdeckung leichter entgehen können [165]. Trotz deutlicher Hinweise für die Induktion einer

Diskussion

tumorspezifischen zellulären Immunantwort durch den Nachweis Magenkarzinom-spezifischer T-Zellen [166], tumorspezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten [167, 168] und einer positiven Korrelation zwischen der Anzahl tumorinfiltrierender dendritischer Zellen und der Prognose des Patienten [169], fanden sich in einer Vielzahl von Studien auch bei Patienten mit Magenkarzinom Zeichen einer Immunsuppression. Untersuchungen im peripheren Blut von Patienten mit Magenkarzinom ergaben eine auffallend niedrige Anzahl reifer und unreifer dendritischer Zellen, CD3⁺ und CD4⁺ T-Zellen sowie NK-Zellen [170]. Falk und Mitarbeiter haben nachgewiesen, dass in der Milz von Magenkarzinompatienten die Anzahl von CD4⁺ Lymphozyten sowie die proliferative Aktivität von B-Zellen reduziert ist [94]. Morisaki und Mitarbeiter fanden im Tumorgewebe von Patienten mit einem Magenkarzinom eine im Vergleich zu normalem Gewebe deutlich gesteigerte Expression und Freisetzung der immunsupprimierenden Typ-II-Zytokine IL-10 und TGF- β [171]. Weitere Hinweise für eine beim Magenkarzinom bestehende Immundeviation mukosaler Typ-I polarisierter T-Zellen zu Typ-II polarisierten T-Zellen zeigten Zhang und Mitarbeiter, welche die Polarisierung gastraler T-Zellen bei Magenkarzinompatienten untersuchten [172].

Anhand dieser Beispiele wird deutlich, dass die Bekämpfung eines Malignoms durch die Zellen des Immunsystems ohne eine vorherrschende „Richtungsgebung“ oftmals nur zeitlich begrenzt und letztendlich unzureichend vonstatten geht. Gleichzeitig ist hieraus auch zu folgern, dass die effektivste Chance zur erfolgreichen Tumorthherapie darin besteht, dass die Immunzellen von vornherein in die richtige Immun-Richtung polarisiert werden und bei Tumorentstehung spezifisch gegen das entartete Gewebe aktiv werden. An diesem Punkt greift das Konzept der therapeutischen Vakzinierung von Malignompatienten zur Tumorbehandlung an.

4.6 Tumorvakzine

4.6.1 Effekte von Tumorvakzinen

Maligne Erkrankungen durch Stimulation des Immunsystems zu kontrollieren ist keine neue Idee. Erste Ansätze wurden bereits zur Bekämpfung des Blasenkarzinoms entwickelt, indem Instillationen des Calmette-Guérin Bacillus bei Blasen-Karzinomen zur Stimulation der Tumor-spezifischen Abwehr eingesetzt wurden [173]. Vakzin-Therapien zur Behandlung maligner Erkrankungen erscheinen aus unterschiedlichen Gründen sinnvoll. Es handelt sich dabei um Verfahren mit geringer systemischer Toxizität, die sowohl gegen Tumor im Primärgewebe, als auch gegen Metastasen eine tumorspezifische Reaktion induzieren sollen. Darüber hinaus soll eine dauerhafte Gedächtnis-Immunität etabliert werden, die Rezidive verhindert [125]. Bestrahlte Tumorzellen oder Tumorzell-Lysate, vor allem aber auch einfacher zu synthetisierende Peptide in Kombination mit verschiedenen Adjuvantien werden zur Vakzinierung von Tumorpatienten eingesetzt [107]. In der Behandlung des malignen Melanoms werden DNA-Vakzine aus isolierter DNA entwickelt [119].

Weiterhin werden dendritische Zellen, welche mit Tumorzell-Lysaten oder Peptiden beladen werden, zur Vakzinierung eingesetzt [125]. Auch der Einsatz fusionierter Zellen aus dendritischen Zellen und Tumorzellen werden gegenwärtig erforscht [174, 175]. In ersten klinischen Studien bei Patienten mit metastasiertem Melanom gelang es, tumorreaktive CD8⁺ Lymphozyten durch die Impfung dieser dendritischen Zellen zu induzieren [176]. Auch Perez-Diez und Mitarbeiter zeigten auf, dass Tumorantigen spezifische Vakzine zur Krebs-Immuntherapie spezifische CD8⁺ Antworten in PBMC und in TIL erzeugen können [177].

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit *H. pylori* eine erhöhte gastrische Typ-I-Zytokin-Sekretion zur Folge hat [178]. Diese Typ-I-Reaktion könnte auch durch eine Impfung von *H. pylori*-Bestandteilen provoziert werden und, neben einem entzündlich reaktiven, auch zu einem tumor-zytotoxischen Immunmilieu führen. Verschiedene Ansätze zur Gewinnung von Bestandteilen aus *H. pylori* zur Verarbeitung zu Impfstoffen sind bereits erfolgt.

4.6.2 Vakzine aus Bestandteilen von *Helicobacter pylori*

Eine immunisierende Potenz konnte bei einer Vielzahl von *H. pylori* Antigenen wie etwa Enzymen (Urease B, Katalase), das VacA Zytotoxin, das heat-shock Protein, Außenmembranvesikel oder Lipoproteine gefunden werden [179, 180]. Sun und Mitarbeitern gelang erfolgreich die Herstellung eines rekombinanten Impfstoffes aus der Kombination des Bakteriums *Salmonella typhimurium* mit dem Gen des *H. pylori* Neutrophilen Aktivierungs Proteins (neutrophil activating protein HP-NAP) [181]. Um die Rolle der Lipopolysaccharide aus *H. pylori* bei der Bildung einer Immunantwort zu untersuchen, impften Taylor und Mitarbeiter Mäuse mit diesem Vakzin und untersuchten die darauffolgende Immunreaktion. Die immunisierten Mäuse bildeten eine spezifische Th-1-Immunantwort, die sich in der Bildung von IFN- γ , IL-2 und IgG2a im Serum zeigte [182].

Auch Yang und Mitarbeitern gelang die Synthese eines oralen Impfstoffes aus der Einführung einer Gensequenz von Urease B aus *H. pylori* in die bakterielle DNA des Bakteriums *Salmonella typhimurium*. Nach oraler Applikation des Vakzins, zeigte sich auch hier eine deutlich erhöhte Produktion von IFN- γ sowie IL-10 [183]. Die Arbeitsgruppe um Rathinavelu stellte fest, dass das Außenmembranprotein 18 die Reifung von dendritischen Zellen induzierte. Diese dendritischen Zellen wiederum stimulierten die Produktion von IL-12 und IFN- γ und damit die Typ-1-Polarisierung [159].

Anhand dieser Beispiele kann demonstriert werden, dass die Vakzinierung mit einem *H. pylori*-Antigen eine Typ-1-Immunreaktion und damit eine entscheidende Voraussetzung zur spezifischen Anti-Tumor-Reaktion bewirken kann. In dieser Dissertationsarbeit konnte die Präsenz tumorspezifischer T-Zellen im Magenkarzinomgewebe nachgewiesen werden. Diese tumorspezifischen T-Zellen zeigten außerdem eine vermehrt Typ-1 gewichtete Immunantwort bei Patienten mit stattgefundener *H. pylori* Infektion unter Berücksichtigung, dass tumorspezifische T-Zellen von *H. pylori* negativen Patienten nur in einem einzigen Experiment zur Verfügung standen.

Die Eigenschaft der Typ-1-Immunreaktion tumorspezifischer T-Zellen könnte in einer neuen, neoadjuvanten Therapie von Magenkarzinompatienten genutzt werden: *H. pylori* negative Magenkarzinompatienten, welche einer kurativen Gastrektomie unterzogen werden, könnten vor dem operativen Eingriff mit einem *H. pylori* Vakzin geimpft werden. Die dadurch induzierte Typ-1-Immunantwort könnte im Verlauf der weiteren Therapie ein effektives Immunmilieu gegen vorhandene Rest-Tumorzellen bzw. Metastasen bewirken und das Outcome der Tumorpatienten entscheidend verbessern.

5. Zusammenfassung

Diese Dissertation beschäftigt sich mit dem Einfluss des Bakteriums *Helicobacter pylori* auf das Immunsystem bei Magenkarzinompatienten.

In einer Analyse von Lee und Mitarbeitern wurde gezeigt, dass Magenkarzinompatienten, welche vor einer Magenresektion positiv auf *H. pylori* getestet worden waren, eine bessere Überlebenswahrscheinlichkeit nach der Operation hatten, als *H. pylori* negative Patienten. In einer prospektiven klinischen Studie von Meimarakis und Mitarbeitern wurde ebenso ein signifikanter Überlebensvorteil für *H. pylori* positive Magenkarzinompatienten nach Gastrektomie dargestellt. Sie identifizierten neben den bekannten Prognoseparametern Invasionstiefe des Tumors und Metastasenbildung in Lymphknoten und übrigen Körpergewebe *H. pylori* als einen weiteren prognostischen Faktor.

Die sich daraus ergebende Schlussfolgerung, dass eine Infektion des Magengewebes mit *H. pylori* ein längeres Überleben von Magenkarzinompatienten nach Entfernung des Tumors bedeuten kann, steht in Widerspruch zur allgemein gültigen Lehrmeinung, die eine *H. pylori* Infektion als Risikofaktor und als Gruppe-I-Karzinogen zur Entstehung eines Magenkarzinoms sieht. Zwei Tatsachen könnten eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen geben: Eine Invasion der Magenmukosa durch *H. pylori* gibt lokalen T-Lymphozyten ein Signal zur Produktion von Zytokinen, welche für ein Typ-I-Immunmilieu charakteristisch sind. Des Weiteren gilt ein Typ-I polarisiertes Immunmilieu als essentiell für eine effektive Tumorbekämpfung durch tumorspezifische T-Lymphozyten und für eine Tumorregression. Es ergibt sich dadurch die Hypothese, dass eine *H. pylori* Infektion eine Bildung von Typ-I polarisierten, tumorspezifischen T-Lymphozyten bewirkt, welche eine verbesserte Immunantwort gegen den Tumor und damit ein verbessertes Überleben der Patienten nach Tumorresektion ermöglicht.

Zielsetzung dieser Doktorarbeit war der Nachweis einer Induktion tumorspezifischer T-Zellen bei Magenkarzinompatienten in Primärtumorgewebe und tumor-assoziierten Lymphknoten, sowie die Darstellung der Ausprägung einer tumorspezifischen Immunantwort bei *H. pylori* positiven und negativen Magenkarzinompatienten in Richtung Typ-I -oder Typ-II-Polarisierung.

Aus Gewebe von Magenkarzinompatienten wurden dazu sowohl Tumorzellen, als auch tumorinfiltrierende T-Lymphozyten und T-Zellen aus Lymphknotengewebe isoliert und in der Zellkultur vermehrt. Die Tumorzellen wurden in einer immunhistochemischen Analyse als Karzinomzellen gekennzeichnet, außerdem wurden sie mittels Durchflusszytometrie durch das Oberflächenmolekül HLA-ABC zur MHC-Klasse I definiert. Bei den T-Zell-Cloids wurde

Zusammenfassung

mittels FACS-Analyse der Anteil an CD8 positiven und CD4 positiven T-Lymphozyten bestimmt.

Clolds mit hohem CD8 Anteil wurden anschließend in einem Cytokine Release Assay mit autologen MHC-I tragenden Tumorzellen oder allogenen Magenkarzinomzelllinien inkubiert und die Zytokinproduktion der T-Zellen nach Kontakt mit dem Tumor in einem ELISA gemessen. Eine Typ-I-Zytokinpolarisierung war gegeben, wenn IFN- γ spezifisch erhöht war; eine dominierende IL-5-Produktion gab Hinweis auf eine Typ-II-Polarisierung. Parallel zu diesen Versuchen wurden Serum- und Histologieproben des Magenkarzinompatienten auf eine *H. pylori* Infektion hin untersucht.

32 Patienten wurden in diese Studie eingeschlossen und von sechs Patienten konnten CRAs mit autologen Tumorzellen und T-Zellen durchgeführt werden. Als Ergebnis zeigte sich bei den *H. pylori* positiven Patienten nach Bildung einer Ratio von IFN- γ zu IL-5 eine mehrheitliche Typ-I-Immunantwort der T-Lymphozyten nach tumorspezifischer Stimulierung, gefolgt von einer gemischten Typ-I / Typ-II-Immunantwort. Die tumorspezifischen T-Zellen des einzigen *H. pylori* negativen Patienten polarisierten deutlich in Richtung einer Typ-II-Immunantwort. Damit konnte zum einen die Präsenz tumorspezifischer T-Zellen in Magenkarzinomgewebe nachgewiesen werden und zum Anderen deren vermehrt Typ-I gewichtete Immunantwort nach *H. pylori* Infektion demonstriert werden.

Als weiteren Ansatz zum Nachweis einer spezifischen Bekämpfung des Magentumors durch Immunzellen in *H. pylori* positivem Gewebe wurde die Anzahl aktivierter dendritischer Zellen im Tumorgewebe *H. pylori* positiver Patienten mit dem Gewebe *H. pylori* negativer Patienten verglichen. Die dendritischen Zellen wurden in einer immunhistochemischen Doppelfärbung markiert und direkt gegeneinander ausgezählt. Ein deutlich höherer Anteil aktivierter dendritischer Zellen in *H. pylori* positivem Gewebe war zu verzeichnen. Dieses Ergebnis lieferte einen weiteren Hinweis darauf, dass *H. pylori* die Aktivität von Immunzellen in Tumorgewebe steigert.

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit liefern einen Beitrag zu aktuellen Untersuchungen neuer Strategien zur adjuvanten Therapie von Magenkarzinompatienten. In Erweiterung bereits etablierter bzw. in Entwicklung stehender Verfahren, durch Vakzinierung von Krebspatienten mit Bestandteilen des Tumors oder mit tumorspezifischen Immunzellen die Immunabwehr gegen das Malignom zu stimulieren, könnte auch ein Impfstoff aus Bestandteilen von *H. pylori* bzw. dem gesamten Bakterium generiert werden. *H. pylori* negative Magenkarzinompatienten würden vor Gastrektomie mit diesem *H. pylori*-Vakzin geimpft werden; die dadurch induzierte Typ-I-Immunantwort könnte postoperativ ein effektives Immunmilieu gegen übriggebliebene Tumorzellen oder Metastasen aufbauen und dadurch das Outcome des Patienten entscheidend verbessern.

6. Literaturverzeichnis

- [1] V. Catalano, R. Labianca, G.D. Beretta, G. Gatta, F. de Braud, E. Van Cutsem, Gastric cancer, *Crit Rev. Oncol. Hematol.* 54 (2005) 209-241.
- [2] M. Vauhkonen, H. Vauhkonen, P. Sipponen, Pathology and molecular biology of gastric cancer, *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 20 (2006) 651-674.
- [3] R.S. Date, K.J. Panesar, D2 gastrectomy -- a safe operation in experienced hands, *Int. J. Clin. Pract.* 59 (2005) 672-674.
- [4] C.J. van de Velde, Resection for gastric cancer in the community, *Semin. Oncol.* 32 (2005) S90-S93.
- [5] O. Bouche, M. Ychou, P. Burtin, L. Bedenne, M. Ducreux, G. Lebreton, J. Baulieux, B. Nordlinger, C. Martin, J.F. Seitz, J.M. Tigaud, E. Echinard, N. Stremsdoerfer, C. Milan, P. Rougier, Adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil and cisplatin compared with surgery alone for gastric cancer: 7-year results of the FFCD randomized phase III trial (8801), *Ann. Oncol.* 16 (2005) 1488-1497.
- [6] J.C. Yao, J.A. Ajani, Therapy of localized gastric cancer: preoperative and postoperative approaches, *Ann. Oncol.* 13 Suppl 4:7-12. (2002) 7-12.
- [7] V. Skoropad, B. Berdov, V. Zagrebina, Clinicopathological features and outcome of surgical treatment of 149 patients with early (pT1) gastric cancer, *Onkologie.* 28 (2005) 247-252.
- [8] T. Yokota, S. Ishiyama, T. Saito, S. Teshima, Y. Narushima, K. Murata, K. Iwamoto, R. Yashima, H. Yamauchi, S. Kikuchi, Lymph node metastasis as a significant prognostic factor in gastric cancer: a multiple logistic regression analysis, *Scand. J. Gastroenterol.* 39 (2004) 380-384.
- [9] P. Watson, B. Riley, The tumor spectrum in the Lynch syndrome, *Fam. Cancer.* 4 (2005) 245-248.
- [10] G.P. Xu, P.J. So, P.I. Reed, Hypothesis on the relationship between gastric cancer and intragastric nitrosation: N-nitrosamines in gastric juice of subjects from a high-risk area for gastric cancer and the inhibition of N-nitrosamine formation by fruit juices, *Eur. J. Cancer Prev.* 2 (1993) 25-36.
- [11] K. Lee, D. Caceres, N. Varela, D.A. Csendes, R.H. Rios, S.L. Quinones, Cytochrome P4501A1 (CYP1A1), glutathione S transferase M1 (GSTM1) polymorphisms and their association with smoking and alcohol consumption as gastric cancer susceptibility biomarkers, *Rev. Med. Chil.* 134 (2006) 1107-1115.

Literaturverzeichnis

- [12] Y. Nishino, M. Inoue, I. Tsuji, K. Wakai, C. Nagata, T. Mizoue, K. Tanaka, S. Tsugane, Tobacco smoking and gastric cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiologic evidence among the Japanese population, *Jpn. J. Clin. Oncol.* 36 (2006) 800-807.
- [13] G.P. Xu, P.J. Song, P.I. Reed, Effects of fruit juices, processed vegetable juice, orange peel and green tea on endogenous formation of N-nitrosoproline in subjects from a high-risk area for gastric cancer in Moping County, China, *Eur. J. Cancer Prev.* 2 (1993) 327-335.
- [14] A. Seoane, X. Bessa, B. Balleste, E. O'Callaghan, A. Panades, F. Alameda, S. Navarro, M. Gallen, M. Andreu, F. Bory, *Helicobacter pylori* and gastric cancer: relationship with histological subtype and tumor location, *Gastroenterol. Hepatol.* 28 (2005) 60-64.
- [15] I. Nakaya, Y. Iwata, Y. Sugiyama, T. Abe, G. Nomura, Dermatomyositis relapse complicated with gastric carcinoma and lupus nephritis five years after the initial diagnosis of dermatomyositis, *Intern. Med.* 41 (2002) 502-503.
- [16] D.F. Munoz, C.C. Garcia, M.I. Monge Romero, G.J. Dios Arrebola, M.A. Soria, Acanthosis nigricans as the initial paraneoplastic manifestation of gastric adenocarcinoma, *Gastroenterol. Hepatol.* 30 (2007) 15-18.
- [17] J.G. Fox, T.C. Wang, Inflammation, atrophy, and gastric cancer, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 60-69.
- [18] X.Y. Chen, R.W. van der Hulst, M.J. Bruno, E.A. van der, S.D. Xiao, G.N. Tytgat, F.J. Ten Kate, Interobserver variation in the histopathological scoring of *Helicobacter pylori* related gastritis, *J. Clin. Pathol.* 52 (1999) 612-615.
- [19] K. Borch, J. Skarsgard, L. Franzen, S. Mardh, J.F. Rehfeld, Benign gastric polyps: morphological and functional origin, *Dig. Dis. Sci.* 48 (2003) 1292-1297.
- [20] E.J. Beswick, G. Suarez, V.E. Reyes, H *pylori* and host interactions that influence pathogenesis, *World J. Gastroenterol.* 12 (2006) 5599-5605.
- [21] K.C. Yang, A. Chu, C.S. Liao, Y.M. Lin, G.M. Wang, Evaluation of the role of H *pylori* infection in pathogenesis of gastric cancer by immunoblot assay, *World J. Gastroenterol.* 12 (2006) 7029-7032.
- [22] B.J. Marshall, J.R. Warren, Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration, *Lancet.* 1 (1984) 1311-1315.
- [23] *Helicobacter pylori* in Peptic Ulcer Disease. Proceedings of a symposium. Brussels, Belgium, 23 September 1993, *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 205:1-60. (1994) 1-60.
- [24] M.J. Blaser, An endangered species in the stomach, *Sci. Am.* 292 (2005) 38-45.

Literaturverzeichnis

- [25] M. Vieth, M. Stolte, Elevated risk for gastric adenocarcinoma can be predicted from histomorphology, *World J. Gastroenterol.* 12 (2006) 6109-6114.
- [26] P. Correa, *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis, *Am. J. Surg. Pathol.* 19 Suppl 1:S37-43. (1995) S37-S43.
- [27] R.A. Hatz, G. Meimarakis, N. Lehn, E. Bayerdorffer, N. Von Jan, G. Enders, Granulocyte activation by *Helicobacter pylori*, *Eur. J. Med. Res.* 1 (1996) 537-542.
- [28] J.E. Crabtree, P. Peichl, J.I. Wyatt, U. Stachl, I.J. Lindley, Gastric interleukin-8 and IgA IL-8 autoantibodies in *Helicobacter pylori* infection, *Scand. J. Immunol.* 37 (1993) 65-70.
- [29] G. Trinchieri, Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity, *Annu. Rev. Immunol.* 13:251-76. (1995) 251-276.
- [30] J. Viala, C. Chaput, I.G. Boneca, A. Cardona, S.E. Girardin, A.P. Moran, R. Athman, S. Memet, M.R. Huerre, A.J. Coyle, P.S. DiStefano, P.J. Sansonetti, A. Labigne, J. Bertin, D.J. Philpott, R.L. Ferrero, Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island, *Nat. Immunol.* 5 (2004) 1166-1174.
- [31] M.F. Dixon, R.M. Genta, J.H. Yardley, P. Correa, Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994, *Am. J. Surg. Pathol.* 20 (1996) 1161-1181.
- [32] K.E. McColl, *Helicobacter pylori* infection and its role in human disease--an overview, *Pharm. World Sci.* 18 (1996) 49-55.
- [33] R.P. Logan, M.M. Walker, ABC of the upper gastrointestinal tract: Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection, *BMJ.* 323 (2001) 920-922.
- [34] C.A. McNulty, J.W. Whiting, Patients' attitudes to *Helicobacter pylori* breath and stool antigen tests compared to blood serology, *J. Infect.* 55 (2007) 19-22.
- [35] G. Treiber, P. Malfertheiner, U. Klotz, Treatment and dosing of *Helicobacter pylori* infection: when pharmacology meets clinic, *Expert. Opin. Pharmacother.* 8 (2007) 329-350.
- [36] P. Farinha, R.D. Gascoyne, *Helicobacter pylori* and MALT lymphoma, *Gastroenterology.* 128 (2005) 1579-1605.
- [37] T. Wundisch, C. Thiede, A. Morgner, A. Dempfle, A. Gunther, H. Liu, H. Ye, M.Q. Du, T.D. Kim, E. Bayerdorffer, M. Stolte, A. Neubauer, Long-term follow-up of gastric MALT lymphoma after *Helicobacter pylori* eradication, *J. Clin. Oncol.* 23 (2005) 8018-8024.
- [38] W. Fischbach, A.O. Chan, B.C. Wong, *Helicobacter pylori* and Gastric Malignancy, *Helicobacter.* 10 Suppl 1:34-9. (2005) 34-39.

Literaturverzeichnis

- [39] A.G. Meining, E. Bayerdorffer, M. Stolte, Helicobacter pylori gastritis of the gastric cancer phenotype in relatives of gastric carcinoma patients, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 11 (1999) 717-720
- [40] S. Tsuji, N. Kawai, M. Tsujii, S. Kawano, M. Hori, Review article: inflammation-related promotion of gastrointestinal carcinogenesis--a perigenetic pathway, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 18 Suppl 1:82-9. (2003) 82-89.
- [41] D. Forman, D.G. Newell, F. Fullerton, J.W. Yarnell, A.R. Stacey, N. Wald, F. Sitas, Association between infection with Helicobacter pylori and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation, *BMJ.* 302 (1991) 1302-1305.
- [42] S. Miehleke, A. Hackelsberger, A. Meining, U. von Arnim, P. Muller, T. Ochsenkuhn, N. Lehn, P. Malfertheiner, M. Stolte, E. Bayerdorffer, Histological diagnosis of Helicobacter pylori gastritis is predictive of a high risk of gastric carcinoma, *Int. J. Cancer.* 73 (1997) 837-839.
- [43] N.J. Talley, A.R. Zinsmeister, A. Weaver, E.P. DiMagno, H.A. Carpenter, G.I. Perez-Perez, M.J. Blaser, Gastric adenocarcinoma and Helicobacter pylori infection, *J. Natl. Cancer Inst.* 83 (1991) 1734-1739.
- [44] J. Parsonnet, G.D. Friedman, D.P. Vandersteen, Y. Chang, J.H. Vogelman, N. Orentreich, R.K. Sibley, Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma, *N. Engl. J. Med.* 325 (1991) 1127-1131.
- [45] M.S. Wu, H.W. Hung, J.T. Wang, C.C. Tseng, C.T. Shun, H.P. Wang, W.J. Lee, J.T. Lin, Helicobacter pylori-seronegative gastric carcinoma: a subset of gastric carcinoma with distinct clinicopathologic features, *Hepatogastroenterology.* 45 (1998) 2432-2436.
- [46] R.A. Hatz, N. Lehn, S. Leyh, M.F. Kaps, E. Bayerdorffer, M. Stolte, F.W. Schildberg, Prevalence of Helicobacter pylori infection in stomach carcinoma, *Chirurg.* 67 (1996) 403-408.
- [47] W.J. Lee, J.T. Lin, W.C. Lee, C.T. Shun, R.L. Hong, A.L. Cheng, P.H. Lee, T.C. Wei, K.M. Chen, Clinicopathologic characteristics of Helicobacter pyloric seropositive gastric adenocarcinomas, *J. Clin. Gastroenterol.* 21 (1995) 203-207.
- [48] W.J. Lee, J.T. Lin, C.T. Shun, W.C. Lee, S.C. Yu, P.H. Lee, K.J. Chang, T.C. Wei, K.M. Chen, Comparison between resectable gastric adenocarcinomas seropositive and seronegative for Helicobacter pylori, *Br. J. Surg.* 82 (1995) 802-805.
- [49] G. Meimarakis, H. Winter, I. Assmann, R. Kopp, N. Lehn, M. Kist, M. Stolte, K.W. Jauch, R.A. Hatz, Helicobacter pylori as a prognostic indicator after curative resection of gastric carcinoma: a prospective study, *Lancet Oncol.* 7 (2006) 211-222.
- [50] R.A. Hatz, G. Meimarakis, E. Bayerdorffer, M. Stolte, T. Kirchner, G. Enders, Characterization of lymphocytic infiltrates in Helicobacter pylori-associated gastritis, *Scand. J. Gastroenterol.* 31 (1996) 222-228.
- [51] A.E. Whitney, T.S. Emory, A.M. Marty, P.A. O'Shea, G.W. Newman, B.D. Gold, Increased macrophage infiltration of gastric mucosa in Helicobacter pylori-infected children, *Dig. Dis. Sci.* 45 (2000) 1337-1342.

Literaturverzeichnis

- [52] R.A. Seder, W.E. Paul, Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells, *Annu. Rev. Immunol.* 12:635-73. (1994) 635-673.
- [53] L.L. Carter, R.W. Dutton, Type 1 and type 2: a fundamental dichotomy for all T-cell subsets, *Curr. Opin. Immunol.* 8 (1996) 336-342.
- [54] M. Croft, L. Carter, S.L. Swain, R.W. Dutton, Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles, *J. Exp. Med.* 180 (1994) 1715-1728.
- [55] T.R. Mosmann, S. Sad, The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more, *Immunol. Today.* 17 (1996) 138-146.
- [56] T. Nakamura, R.K. Lee, S.Y. Nam, E.R. Podack, K. Bottomly, R.A. Flavell, Roles of IL-4 and IFN-gamma in stabilizing the T helper cell type 1 and 2 phenotype, *J. Immunol.* 158 (1997) 2648-2653.
- [57] W.T. von der Weid, A.M. Beebe, D.C. Roopenian, R.L. Coffman, Early production of IL-4 and induction of Th2 responses in the lymph node originate from an MHC class I-independent CD4⁺NK1.1- T cell population, *J. Immunol.* 157 (1996) 4421-4427.
- [58] M. Rincon, J. Anguita, T. Nakamura, E. Fikrig, R.A. Flavell, Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4⁺ T cells, *J. Exp. Med.* 185 (1997) 461-469.
- [59] M. Inoue, M. Minami, Y. Fujii, H. Matsuda, R. Shirakura, T. Kido, Granulocyte colony-stimulating factor and interleukin-6-producing lung cancer cell line, LCAM, *J. Surg. Oncol.* 64 (1997) 347-350.
- [60] T. Schariton-Kersten, L.C. Afonso, M. Wysocka, G. Trinchieri, P. Scott, IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis, *J. Immunol.* 154 (1995) 5320-5330.
- [61] T.M. Schariton, P. Scott, Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4⁺ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice, *J. Exp. Med.* 178 (1993) 567-577.
- [62] N.A. Hosken, K. Shibuya, A.W. Heath, K.M. Murphy, A. O'Garra, The effect of antigen dose on CD4⁺ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model, *J. Exp. Med.* 182 (1995) 1579-1584.
- [63] A.J. McKnight, V.L. Perez, C.M. Shea, G.S. Gray, A.K. Abbas, Costimulator dependence of lymphokine secretion by naive and activated CD4⁺ T lymphocytes from TCR transgenic mice, *J. Immunol.* 152 (1994) 5220-5225.
- [64] T. Decker, S. Stockinger, M. Karaghiosoff, M. Muller, P. Kovarik, IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms, *J. Clin. Invest.* 109 (2002) 1271-1277.

Literaturverzeichnis

- [65] C.H. Chang, J. Hammer, J.E. Loh, W.L. Fodor, R.A. Flavell, The activation of major histocompatibility complex class I genes by interferon regulatory factor-1 (IRF-1), *Immunogenetics*. 35 (1992) 378-384.
- [66] R.A. Seder, R.T. Gazzinelli, Cytokines are critical in linking the innate and adaptive immune responses to bacterial, fungal, and parasitic infection, *Adv. Intern. Med.* 44:353-88. (1999) 353-388.
- [67] S.L. Anderson, T. Shen, J. Lou, L. Xing, N.E. Blachere, P.K. Srivastava, B.Y. Rubin, The endoplasmic reticular heat shock protein gp96 is transcriptionally upregulated in interferon-treated cells, *J. Exp. Med.* 180 (1994) 1565-1569.
- [68] R. Suto, P.K. Srivastava, A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides, *Science*. 269 (1995) 1585-1588.
- [69] Y. Kawakami, X. Wang, T. Shofuda, H. Sumimoto, J. Tupesis, E. Fitzgerald, S. Rosenberg, Isolation of a new melanoma antigen, MART-2, containing a mutated epitope recognized by autologous tumor-infiltrating T lymphocytes, *J. Immunol.* 166 (2001) 2871-2877.
- [70] L. Rivoltini, Y. Kawakami, K. Sakaguchi, S. Southwood, A. Sette, P.F. Robbins, F.M. Marincola, M.L. Salgaller, J.R. Yannelli, E. Appella, Induction of tumor-reactive CTL from peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes of melanoma patients by in vitro stimulation with an immunodominant peptide of the human melanoma antigen MART-1, *J. Immunol.* 154 (1995) 2257-2265.
- [71] R. Hajek, A.W. Butch, Dendritic cell biology and the application of dendritic cells to immunotherapy of multiple myeloma, *Med. Oncol.* 17 (2000) 2-15.
- [72] T.L. Whiteside, C. Odoux, Dendritic cell biology and cancer therapy, *Cancer Immunol. Immunother.* 53 (2004) 240-248.
- [73] M.F. Lipscomb, B.J. Masten, Dendritic cells: immune regulators in health and disease, *Physiol Rev.* 82 (2002) 97-130.
- [74] R.A. Henderson, S.C. Watkins, J.L. Flynn, Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Immunol.* 159 (1997) 635-643.
- [75] Q. Huang, D. Liu, P. Majewski, L.C. Schulte, J.M. Korn, R.A. Young, E.S. Lander, N. Hacohen, The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components, *Science*. 294 (2001) 870-875.
- [76] H. Jonuleit, U. Kuhn, G. Muller, K. Steinbrink, L. Paragnik, E. Schmitt, J. Knop, A.H. Enk, Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions, *Eur. J. Immunol.* 27 (1997) 3135-3142.
- [77] L.H. Stockwin, D. McGonagle, I.G. Martin, G.E. Blair, Dendritic cells: immunological sentinels with a central role in health and disease, *Immunol. Cell Biol.* 78 (2000) 91-102.

Literaturverzeichnis

- [78] C. Heufler, F. Koch, U. Stanzl, G. Topar, M. Wysocka, G. Trinchieri, A. Enk, R.M. Steinman, N. Romani, G. Schuler, Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells, *Eur. J. Immunol.* 26 (1996) 659-668.
- [79] S.E. Macatonia, N.A. Hosken, M. Litton, P. Vieira, C.S. Hsieh, J.A. Culpepper, M. Wysocka, G. Trinchieri, K.M. Murphy, A. O'Garra, Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4⁺ T cells, *J. Immunol.* 154 (1995) 5071-5079.
- [80] D.J. Schendel, Dendritic cell vaccine strategies for renal cell carcinoma, *Expert. Opin. Biol. Ther.* 7 (2007) 221-232.
- [81] H. Strobl, E. Riedl, C. Scheinecker, C. Bello-Fernandez, W.F. Pickl, K. Rappersberger, O. Majdic, W. Knapp, TGF-beta 1 promotes in vitro development of dendritic cells from CD34⁺ hemopoietic progenitors, *J. Immunol.* 157 (1996) 1499-1507.
- [82] K.B. Bamford, X. Fan, S.E. Crowe, J.F. Leary, W.K. Gourley, G.K. Luthra, E.G. Brooks, D.Y. Graham, V.E. Reyes, P.B. Ernst, Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype, *Gastroenterology.* 114 (1998) 482-492.
- [83] F. Sommer, G. Faller, P. Konturek, T. Kirchner, E.G. Hahn, J. Zeus, M. Rollinghoff, M. Lohoff, Antrum- and corpus mucosa-infiltrating CD4⁽⁺⁾ lymphocytes in *Helicobacter pylori* gastritis display a Th1 phenotype, *Infect. Immun.* 66 (1998) 5543-5546.
- [84] F. Luzza, T. Parrello, L. Sebkova, L. Pensabene, M. Imeneo, M. Mancuso, A.M. La Vecchia, G. Monteleone, P. Strisciuglio, F. Pallone, Expression of proinflammatory and Th1 but not Th2 cytokines is enhanced in gastric mucosa of *Helicobacter pylori* infected children, *Dig. Liver Dis.* 33 (2001) 14-20.
- [85] N. Hafsi, P. Volland, S. Schwendy, R. Rad, W. Reindl, M. Gerhard, C. Prinz, Human dendritic cells respond to *Helicobacter pylori*, promoting NK cell and Th1-effector responses in vitro, *J. Immunol.* 173 (2004) 1249-1257.
- [86] M.A. Lowes, G.A. Bishop, K. Crotty, R.S. Barnetson, G.M. Halliday, T helper 1 cytokine mRNA is increased in spontaneously regressing primary melanomas, *J. Invest Dermatol.* 108 (1997) 914-919.
- [87] H. Winter, H.M. Hu, C.H. Poehlein, E. Huntzicker, J.J. Osterholzer, J. Bashy, D. Lashley, B. Lowe, J. Yamada, G. Alvord, W.J. Urba, B.A. Fox, Tumour-induced polarization of tumour vaccine-draining lymph node T cells to a type 1 cytokine profile predicts inherent strong immunogenicity of the tumour and correlates with therapeutic efficacy in adoptive transfer studies, *Immunology.* 108 (2003) 409-419.
- [88] A. Aruga, E. Aruga, M.J. Cameron, A.E. Chang, Different cytokine profiles released by CD4⁺ and CD8⁺ tumor-draining lymph node cells involved in mediating tumor regression, *J. Leukoc. Biol.* 61 (1997) 507-516.

Literaturverzeichnis

- [89] R.J. Barth, Jr., J.J. Mule, P.J. Spiess, S.A. Rosenberg, Interferon gamma and tumor necrosis factor have a role in tumor regressions mediated by murine CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes, *J. Exp. Med.* 173 (1991) 647-658.
- [90] M.E. Dudley, J.R. Wunderlich, P.F. Robbins, J.C. Yang, P. Hwu, D.J. Schwartzentruber, S.L. Topalian, R. Sherry, N.P. Restifo, A.M. Hubicki, M.R. Robinson, M. Raffeld, P. Duray, C.A. Seipp, L. Rogers-Freezer, K.E. Morton, S.A. Mavroukakis, D.E. White, S.A. Rosenberg, Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes, *Science*. 298 (2002) 850-854.
- [91] F. Ichihara, K. Kono, A. Takahashi, H. Kawaida, H. Sugai, H. Fujii, Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers, *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 4404-4408.
- [92] K. Fukuda, S. Tsujitani, Y. Maeta, K. Yamaguchi, M. Ikeguchi, N. Kaibara, The expression of RCAS1 and tumor infiltrating lymphocytes in patients with T3 gastric carcinoma, *Gastric Cancer*. 5 (2002) 220-227.
- [93] C.K. Park, Y.K. Shin, T.J. Kim, S.H. Park, G.H. Ahn, High CD99 expression in memory T and B cells in reactive lymph nodes, *J. Korean Med. Sci.* 14 (1999) 600-606.
- [94] S. Falk, G. Seipelt, H. Muller, H.J. Stutte, Immunohistochemical assessment of splenic lymphocyte and macrophage subpopulations in patients with gastric cancer, *Cancer*. 64 (1989) 1646-1651.
- [95] H. Nakayama, J. Kitayama, T. Muto, H. Nagawa, Characterization of intracellular cytokine profile of CD4⁽⁺⁾ T cells in peripheral blood and tumor-draining lymph nodes of patients with gastrointestinal cancer, *Jpn. J. Clin. Oncol.* 30 (2000) 301-305.
- [96] T.L. Whiteside, The role of death receptor ligands in shaping tumor microenvironment, *Immunol. Invest.* 36 (2007) 25-46.
- [97] K. Tamada, M. Harada, K. Abe, T. Li, H. Tada, Y. Onoe, K. Nomoto, Immunosuppressive activity of cloned natural killer (NK1.1⁺) T cells established from murine tumor-infiltrating lymphocytes, *J. Immunol.* 158 (1997) 4846-4854.
- [98] J.E. Niederhuber: Cancer vaccines: the molecular basis for T cell killing of tumor cells, *Oncologist* 2 (1997) 280-283.
- [99] K.L. Knutson, M.L. Disis: Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy, *Cancer Immunol Immunother.* 54 (2005) 721-728
- [100] H. Winter, N.K. van den Engel, D. Rüttinger, J. Schmidt, M. Schiller, C.H. Poehlein, F. Löhe, B.A. Fox, K.W. Jauch, R.A. Hatz, H.M. Hu: Therapeutic T cells induce tumor-directed chemotaxis of innate immune cells through tumor-specific secretion of chemokines and stimulation of B16BL6 melanoma to secrete chemokines, *J. Transl. Med.* (2007) 5:56.

Literaturverzeichnis

- [101] H. Winter, H.M. Hu, W.J. Urba, B.A. Fox, Tumor regression after adoptive transfer of effector T cells is independent of perforin or Fas ligand (APO-1L/CD95L), *J. Immunol.* 163 (1999) 4462-4472.
- [102] C. Allen, N. Hogg, Monocytes and other infiltrating cells in human colorectal tumours identified by monoclonal antibodies, *Immunology.* 55 (1985) 289-299.
- [103] L. Hakansson, G. Adell, B. Boeryd, F. Sjogren, R. Sjodahl, Infiltration of mononuclear inflammatory cells into primary colorectal carcinomas: an immunohistological analysis, *Br. J. Cancer.* 75 (1997) 374-380.
- [104] S.A. Rosenberg, M.E. Dudley, Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 Suppl 2:14639-45. Epub@2004 Sep@20. (2004) 14639-14645.
- [105] M.J. Arca, J.C. Krauss, A. Aruga, M.J. Cameron, S. Shu, A.E. Chang, Therapeutic efficacy of T cells derived from lymph nodes draining a poorly immunogenic tumor transduced to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, *Cancer Gene Ther.* 3 (1996) 39-47.
- [106] S.Y. Shu, T. Chou, K. Sakai, Lymphocytes generated by in vivo priming and in vitro sensitization demonstrate therapeutic efficacy against a murine tumor that lacks apparent immunogenicity, *J. Immunol.* 143 (1989) 740-748.
- [107] S.L. Meijer, A. Dols, W.J. Urba, H.M. Hu, J.W. Smith II, J. Vetto, W. Wood, T. Doran, Y. Chu, P. Sayaharuban, W.G. Alvord, B.A. Fox, Adoptive cellular therapy with tumor vaccine draining lymph node lymphocytes after vaccination with HLA-B7/beta2-microglobulin gene-modified autologous tumor cells, *J. Immunother.* 25 (2002) 359-372.
- [108] S.J. Piersma, E.S. Jordanova, M.I. van Poelgeest, K.M. Kwappenberg, J.M. van der Hulst, J.W. Drijfhout, C.J. Melief, G.G. Kenter, G.J. Fleuren, R. Offringa, S.H. van der Burg, High number of intraepithelial CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer, *Cancer Res.* 67 (2007) 354-361.
- [109] A.D. Santin, A. Ravaggi, S. Bellone, S. Pecorelli, M. Cannon, G.P. Parham, P.L. Hermonat, Tumor-infiltrating lymphocytes contain higher numbers of type 1 cytokine expressors and DR⁺ T cells compared with lymphocytes from tumor draining lymph nodes and peripheral blood in patients with cancer of the uterine cervix, *Gynecol. Oncol.* 81 (2001) 424-432.
- [110] S. Shu, R.A. Krinock, T. Matsumura, J.J. Sussman, B.A. Fox, A.E. Chang, D.S. Terman, Stimulation of tumor-draining lymph node cells with superantigenic staphylococcal toxins leads to the generation of tumor-specific effector T cells, *J. Immunol.* 152 (1994) 1277-1288.
- [111] M.Y. Mapara, M. Sykes, Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance, *J. Clin. Oncol.* 22 (2004) 1136-1151.
- [112] X. Shen, J. Zhou, K.S. Hathcock, P. Robbins, D.J. Powell, Jr., S.A. Rosenberg, R.J. Hodes, Persistence of tumor infiltrating lymphocytes in adoptive immunotherapy correlates with telomere length, *J. Immunother.* 30 (2007) 123-129.

Literaturverzeichnis

- [113] J. Huang, H.T. Khong, M.E. Dudley, M. El Gamil, Y.F. Li, S.A. Rosenberg, P.F. Robbins, Survival, persistence, and progressive differentiation of adoptively transferred tumor-reactive T cells associated with tumor regression, *J. Immunother.* 28 (2005) 258-267.
- [114] J. Zhou, M.E. Dudley, S.A. Rosenberg, P.F. Robbins, Persistence of multiple tumor-specific T-cell clones is associated with complete tumor regression in a melanoma patient receiving adoptive cell transfer therapy, *J. Immunother.* 28 (2005) 53-62.
- [115] M.E. Dudley, J.R. Wunderlich, J.C. Yang, R.M. Sherry, S.L. Topalian, N.P. Restifo, R.E. Royal, U. Kammula, D.E. White, S.A. Mavroukakis, L.J. Rogers, G.J. Gracia, S.A. Jones, D.P. Mangiameli, M.M. Pelletier, J. Gea-Banacloche, M.R. Robinson, D.M. Berman, A.C. Filie, A. Abati, S.A. Rosenberg, Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma, *J. Clin. Oncol.* 23 (2005) 2346-2357.
- [116] S.E. Townsend, J.P. Allison, Tumor rejection after direct costimulation of CD8⁺ T cells by B7-transfected melanoma cells, *Science.* 259 (1993) 368-370.
- [117] E. Angevin, F. Kremer, C. Gaudin, T. Hercend, F. Triebel, Analysis of T-cell immune response in renal cell carcinoma: polarization to type 1-like differentiation pattern, clonal T-cell expansion and tumor-specific cytotoxicity, *Int. J. Cancer.* 72 (1997) 431-440.
- [118] Y. Kawakami, S. Eliyahu, C.H. Delgado, P.F. Robbins, K. Sakaguchi, E. Appella, J.R. Yannelli, G.J. Adema, T. Miki, S.A. Rosenberg, Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 6458-6462.
- [119] H.M. Hu, W.J. Urba, B.A. Fox, Gene-modified tumor vaccine with therapeutic potential shifts tumor-specific T cell response from a type 2 to a type 1 cytokine profile, *J. Immunol.* 161 (1998) 3033-3041.
- [120] M. Nagoshi, P.S. Goedegebuure, U.L. Burger, N. Sadanaga, M.P. Chang, T.J. Eberlein, Successful adoptive cellular immunotherapy is dependent on induction of a host immune response triggered by cytokine (IFN-gamma and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor) producing donor tumor-infiltrating lymphocytes, *J. Immunol.* 160 (1998) 334-344.
- [121] L. Li, S. Sad, D. Kagi, T.R. Mosmann, CD8Tc1 and Tc2 cells secrete distinct cytokine patterns in vitro and in vivo but induce similar inflammatory reactions, *J. Immunol.* 158 (1997) 4152-4161.
- [122] V. Appay, S.L. Rowland-Jones, The assessment of antigen-specific CD8⁺ T cells through the combination of MHC class I tetramer and intracellular staining, *J. Immunol. Methods.* 268 (2002) 9-19.
- [123] A.L. Cameron, B. Kirby, C.E. Griffiths, Natural killer and natural killer-T cells in psoriasis, *Arch. Dermatol. Res.* 294 (2002) 363-369.

Literaturverzeichnis

- [124] H.M. Hu, C.H. Poehlein, W.J. Urba, B.A. Fox, Development of antitumor immune responses in reconstituted lymphopenic hosts, *Cancer Res.* 62 (2002) 3914-3919.
- [125] S. Paczesny, H. Ueno, J. Fay, J. Banchereau, A.K. Palucka, Dendritic cells as vectors for immunotherapy of cancer, *Semin. Cancer Biol.* 13 (2003) 439-447.
- [126] D. Suri, R. Schilling, A.R. Lopes, I. Mullerova, G. Colucci, R. Williams, N.V. Naoumov, Non-cytolytic inhibition of hepatitis B virus replication in human hepatocytes, *J. Hepatol.* 35 (2001) 790-797.
- [127] C. Mazzon, B. Baldani-Guerra, P. Cecchini, T. Kasic, A. Viola, M. de Bernard, B. Aricò, F. Gerosa, E. Papini, IFN-gamma and R-848 dependent activation of human monocyte-derived dendritic cells by *Neisseria meningitidis* adhesin A, *J. Immunol.* 179 (2007) 3904-3916
- [128] A. Billiau, Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis, *Adv. Immunol.* 62:61-130. (1996) 61-130.
- [129] D.D. Taub, K. Conlon, A.R. Lloyd, J.J. Oppenheim, D.J. Kelvin, Preferential migration of activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta, *Science.* 260 (1993) 355-358.
- [130] M.P. Gil, E. Bohn, A.K. O'Guin, C.V. Ramana, B. Levine, G.R. Stark, H.W. Virgin, R.D. Schreiber, Biologic consequences of Stat1-independent IFN signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 6680-6685.
- [131] M. Tsujimoto, Y.K. Yip, J. Vilcek, Interferon-gamma enhances expression of cellular receptors for tumor necrosis factor, *J. Immunol.* 136 (1986) 2441-2444.
- [132] H. Zheng, R.C. Luo, L.S. Zhang, G.F. Mai, [Interferon-gamma up-regulates Fas expression and increases Fas-mediated apoptosis in tumor cell lines], *Di Yi. Jun. Yi. Da. Xue. Xue. Bao.* 22 (2002) 1090-1092.
- [133] H.A. Young, Regulation of interferon-gamma gene expression, *J. Interferon Cytokine Res.* 16 (1996) 563-568.
- [134] U. Boehm, T. Klamp, M. Groot, J.C. Howard, Cellular responses to interferon-gamma, *Annu. Rev. Immunol.* 15:749-95. (1997) 749-795.
- [135] D.M. Frucht, T. Fukao, C. Bogdan, H. Schindler, J.J. O'Shea, S. Koyasu, IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge, *Trends Immunol.* 22 (2001) 556-560.
- [136] S. Gessani, F. Belardelli, IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance, *Cytokine Growth Factor Rev.* 9 (1998) 117-123.

Literaturverzeichnis

- [137] H. Hochrein, K. Shortman, D. Vremec, B. Scott, P. Hertzog, M. O'Keeffe, Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets, *J. Immunol.* 166 (2001) 5448-5455.
- [138] J.A. Gollob, H. Kawasaki, J. Ritz, Interferon-gamma and interleukin-4 regulate T cell interleukin-12 responsiveness through the differential modulation of high-affinity interleukin-12 receptor expression, *Eur. J. Immunol.* 27 (1997) 647-652.
- [139] T.F. Gajewski, F.W. Fitch, Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones, *J. Immunol.* 140 (1988) 4245-4252.
- [140] M. Kubin, J.M. Chow, G. Trinchieri, Differential regulation of interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor alpha, and IL-1 beta production in human myeloid leukemia cell lines and peripheral blood mononuclear cells, *Blood.* 83 (1994) 1847-1855.
- [141] A. Morinobu, S. Kumagai, Cytokine measurement at a single-cell level to analyze human Th1 and Th2 cells, *Rinsho Byori.* 46 (1998) 908-914.
- [142] A. Aruga, E. Aruga, K. Tanigawa, D.K. Bishop, V.K. Sondak, A.E. Chang, Type 1 versus type 2 cytokine release by Vbeta T cell subpopulations determines in vivo antitumor reactivity: IL-10 mediates a suppressive role, *J. Immunol.* 159 (1997) 664-673.
- [143] T. Fukao, S. Matsuda, S. Koyasu, Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells, *J. Immunol.* 164 (2000) 64-71.
- [144] C.A. Dinarello, IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family, *J. Allergy Clin. Immunol.* 103 (1999) 11-24.
- [145] H. Schindler, M.B. Lutz, M. Rollinghoff, C. Bogdan, The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4, *J. Immunol.* 166 (2001) 3075-3082.
- [146] M.J. Dobrzanski, J.B. Reome, R.W. Dutton, Immunopotentiating role of IFN-gamma in early and late stages of type 1 CD8 effector cell-mediated tumor rejection, *Clin. Immunol.* 98 (2001) 70-84.
- [147] F. Fallarino, T.F. Gajewski, Cutting edge: differentiation of antitumor CTL in vivo requires host expression of Stat1, *J. Immunol.* 163 (1999) 4109-4113.
- [148] A.S. Dighe, E. Richards, L.J. Old, R.D. Schreiber, Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors, *Immunity.* 1 (1994) 447-456.
- [149] K. Hung, R. Hayashi, A. Lafond-Walker, C. Lowenstein, D. Pardoll, H. Levitsky, The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response, *J. Exp. Med.* 188 (1998) 2357-2368.

Literaturverzeichnis

- [150] V. Shankaran, H. Ikeda, A.T. Bruce, J.M. White, P.E. Swanson, L.J. Old, R.D. Schreiber, IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity, *Nature*. 410 (2001) 1107-1111.
- [151] D.P. Carbone, I.F. Ciernik, M.J. Kelley, M.C. Smith, S. Nadaf, D. Kavanaugh, V.E. Maher, M. Stipanov, D. Contois, B.E. Johnson, C.D. Pendleton, B. Seifert, C. Carter, E.J. Read, J. Greenblatt, L.E. Top, M.I. Kelsey, J.D. Minna, J.A. Berzofsky, Immunization with mutant p53- and K-ras-derived peptides in cancer patients: immune response and clinical outcome, *J. Clin. Oncol.* 23 (2005) 5099-5107.
- [152] Q.L. Deveraux, N. Roy, H.R. Stennicke, T. Van Arsdale, Q. Zhou, S.M. Srinivasula, E.S. Alnemri, G.S. Salvesen, J.C. Reed, IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases, *EMBO J.* 17 (1998) 2215-2223.
- [153] K. Krasagakis, C. Garbe, C.C. Zouboulis, C.E. Orfanos, Growth control of melanoma cells and melanocytes by cytokines, *Recent Results Cancer Res.* 139:169-82. (1995) 169-182.
- [154] M. Groettrup, S. Khan, K. Schwarz, G. Schmidtke, Interferon-gamma inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: why?, *Biochimie.* 83 (2001) 367-372.
- [155] J.D. Farrar, K.H. Katz, J. Windsor, G. Thrush, R.H. Scheuermann, J.W. Uhr, N.E. Street, Cancer dormancy. VII. A regulatory role for CD8⁺ T cells and IFN-gamma in establishing and maintaining the tumor-dormant state, *J. Immunol.* 162 (1999) 2842-2849.
- [156] S.M. Kaech, E.J. Wherry, R. Ahmed, Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development, *Nat. Rev. Immunol.* 2 (2002) 251-262.
- [157] B. Melichar, W. Hu, R. Patenia, K. Melicharova, S.T. Gallardo, R. Freedman, rIFN-gamma-mediated growth suppression of platinum-sensitive and -resistant ovarian tumor cell lines not dependent upon arginase inhibition, *J. Transl. Med.* 1 (2003) 5.
- [158] C. Marth, G.H. Windbichler, H. Hausmaninger, E. Petru, K. Estermann, A. Pelzer, E. Mueller-Holzner, Interferon-gamma in combination with carboplatin and paclitaxel as a safe and effective first-line treatment option for advanced ovarian cancer: results of a phase I/II study, *Int. J. Gynecol. Cancer.* 16 (2006) 1522-1528.
- [159] S. Rathinavelu, J.Y. Kao, Y. Zavros, J.L. Merchant, Helicobacter pylori outer membrane protein 18 (Hp1125) induces dendritic cell maturation and function, *Helicobacter.* 10 (2005) 424-432.
- [160] P. Volland, M. Zeitner, N. Hafsi, C. Prinz, Human immune response towards recombinant Helicobacter pylori urease and cellular fractions, *Vaccine.* 24 (2006) 3832-3839.
- [161] K. Kranzer, A. Eckhardt, M. Aigner, G. Knoll, L. Deml, C. Speth, N. Lehn, M. Rehli, W. Schneider-Brachert, Induction of maturation and cytokine release of human dendritic cells by Helicobacter pylori, *Infect. Immun.* 72 (2004) 4416-4423.

Literaturverzeichnis

- [162] K. Kontani, O. Taguchi, T. Narita, M. Izawa, N. Hiraiwa, K. Zenita, T. Takeuchi, H. Murai, S. Miura, R. Kannagi, Modulation of MUC1 mucin as an escape mechanism of breast cancer cells from autologous cytotoxic T-lymphocytes, *Br. J. Cancer*. 84 (2001) 1258-1264.
- [163] I. Fricke, D.I. Gabrilovich, Dendritic cells and tumor microenvironment: a dangerous liaison, *Immunol. Invest.* 35 (2006) 459-483.
- [164] T. Hirata, H. Yamamoto, H. Taniguchi, S. Horiuchi, M. Oki, Y. Adachi, K. Imai, Y. Shinomura, Characterization of the immune escape phenotype of human gastric cancers with and without high-frequency microsatellite instability, *J. Pathol.* 211 (2007) 516-523.
- [165] Y. Fukumoto, M. Ikeguchi, S. Matsumoto, M. Inoue, T. Osaki, K. Fukuda, H. Saito, S. Tatebe, S.I. Tsujitani, Detection of cancer cells and gene expression of cytokines in the peritoneal cavity in patients with gastric cancer, *Gastric. Cancer*. 9 (2006) 271-276.
- [166] K. Stulle, H.P. Vollmers, P. Marquardt, H.K. Muller-Hermelink, Human stomach carcinoma-specific T cells derived from the tumour-draining lymph nodes, *Br. J. Cancer*. 70 (1994) 1053-1059.
- [167] K. Kono, F. Ichihara, H. Iizuka, T. Sekikawa, Y. Matsumoto, Differences in the recognition of tumor-specific CD8⁺ T cells derived from solid tumor, metastatic lymph nodes and ascites in patients with gastric cancer, *Int. J. Cancer*. 71 (1997) 978-981.
- [168] T. Hoshino, N. Seki, M. Kikuchi, T. Kuramoto, O. Iwamoto, I. Kodama, K. Koufuji, J. Takeda, K. Itoh, HLA class-I-restricted and tumor-specific CTL in tumor-infiltrating lymphocytes of patients with gastric cancer, *Int. J. Cancer*. 70 (1997) 631-638.
- [169] A. Takahashi, K. Kono, J. Itakura, H. Amemiya, T.R. Feng, H. Iizuka, H. Fujii, Y. Matsumoto, Correlation of vascular endothelial growth factor-C expression with tumor-infiltrating dendritic cells in gastric cancer, *Oncology*. 62 (2002) 121-127.
- [170] P. Lissoni, F. Brivio, R. Ferrante, L. Vigore, M. Vaghi, E. Fumagalli, R. Bucovec, F. Malugani, L. Fumagalli, Circulating immature and mature dendritic cells in relation to lymphocyte subsets in patients with gastrointestinal tract cancer, *Int. J. Biol. Markers*. 15 (2000) 22-25.
- [171] T. Morisaki, M. Katano, A. Ikubo, K. Anan, M. Nakamura, K. Nakamura, H. Sato, M. Tanaka, M. Torisu, Immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF-beta) genes expression in human gastric carcinoma tissues, *J. Surg. Oncol.* 63 (1996) 234-239.
- [172] X. Zhang, Y. Chen, Y. Liu, X. Zhou, D. Fan, [Local cytokines profile in gastric cancer lesions], *Zhonghua Zhong. Liu Za Zhi*. 24 (2002) 14-16.
- [173] A.E. Chang, H. Yoshizawa, K. Sakai, M.J. Cameron, V.K. Sondak, S. Shu, Clinical observations on adoptive immunotherapy with vaccine-primed T-lymphocytes secondarily sensitized to tumor in vitro, *Cancer Res*. 53 (1993) 1043-1050.

Literaturverzeichnis

- [174] S. Shu, A.J. Cochran, R.R. Huang, D.L. Morton, H.T. Maecker, Immune responses in the draining lymph nodes against cancer: implications for immunotherapy, *Cancer Metastasis Rev.* 25 (2006) 233-242.
- [175] S. Homma, K. Matai, M. Irie, T. Ohno, D. Kufe, G. Toda, Immunotherapy using fusions of autologous dendritic cells and tumor cells showed effective clinical response in a patient with advanced gastric carcinoma, *J. Gastroenterol.* 38 (2003) 989-994.
- [176] P. Romero, J.C. Cerottini, D.E. Speiser, The human T cell response to melanoma antigens, *Adv. Immunol.* 92:187-224. (2006) 187-224.
- [177] A. Perez-Diez, P.J. Spiess, N.P. Restifo, P. Matzinger, F.M. Marincola, Intensity of the vaccine-elicited immune response determines tumor clearance, *J. Immunol.* 168 (2002) 338-347.
- [178] I. Ahlstedt, C. Lindholm, H. Lonroth, A. Hamlet, A.M. Svennerholm, M. Quiding-Jarbrink, Role of local cytokines in increased gastric expression of the secretory component in *Helicobacter pylori* infection, *Infect. Immun.* 67 (1999) 4921-4925.
- [179] J. Keenan, J. Oliaro, N. Domigan, H. Potter, G. Aitken, R. Allardyce, J. Roake, Immune response to an 18-kilodalton outer membrane antigen identifies lipoprotein 20 as a *Helicobacter pylori* vaccine candidate, *Infect. Immun.* 68 (2000) 3337-3343.
- [180] C. Hatzifoti, Y. Roussel, A.G. Harris, B.W. Wren, J.W. Morrow, M. Bajaj-Elliott, Mucosal immunization with a urease B DNA vaccine induces innate and cellular immune responses against *Helicobacter pylori*, *Helicobacter.* 11 (2006) 113-122.
- [181] B. Sun, Z.S. Li, Z.X. Tu, G.M. Xu, Y.Q. Du, Construction of an oral recombinant DNA vaccine from *H pylori* neutrophil activating protein and its immunogenicity, *World J. Gastroenterol.* 12 (2006) 7042-7046.
- [182] J.M. Taylor, M.E. Ziman, J.L. Huff, N.M. Moroski, M. Vajdy, J.V. Solnick, *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide promotes a Th1 type immune response in immunized mice, *Vaccine.* 24 (2006) 4987-4994.
- [183] X.L. Yang, W.C. Liu, W.W. Yang, D. Zhong, Y.H. Liu, J.D. Zhang, J.H. Jiang, S.S. Li, Oral immunization of mice with vaccine of attenuated *Salmonella typhimurium* expressing *Helicobacter pylori* urease B subunit, *Biomed. Environ. Sci.* 18 (2005) 411-418.

7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

AEC	Aminoethylkarbazol
APC	antigen presenting cell / Antigen präsentierende Zelle
BSA	Bovines Serum Albumin
CA	Cancer / Krebs
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CA 50	Carbohydrate-Antigen 50
CA 72-4	Carbohydrate-Antigen 72-4
CD	cluster of differentiation / Differenzierungsfaktor
CEA	Carcinoembryonales Antigen
Cloid	dreidimensionaler Verband aus T-Zellen in einem Nährmedium
CRA	Cytokine Release Assay / Zytokin-Freisetzungs Assay
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DC	dendritic cell / dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ELISA	Enzyme-Linked immuno Sorbent Assay
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorter
FCS	fetal calf serum / fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FL	Fluoreszenz
FSC	Forward Scatter
GC	Gastric Cancer / Magenkarzinom
H.p.	Helicobacter pylori
<i>H. pylori</i>	Helicobacter pylori

Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HLA	Human Leukocyte Antigen / Humane Leukozytenantigene
IE	Internationale Einheit
IFN	Interferon
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
Li	Lithium
LN Tcell	T-Lymphozyt aus einem tumorfreien Lymphknoten
LN-Tu	Tumor aus einer Lymphknotenmetastase
m	männlich
MEL	melanoma / Melanomzellen
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex / Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mm	Millimeter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Na	Natrium
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
PBC	peripher blood cell / periphere Blutzelle

Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

PBMC	peripher blood mononuclear cell / mononukleäre Zelle des peripheren Blutes
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumjodid
RCC	Renal Cell Carcinoma / Nierenzellkarzinom
rpm	rounds per minute / Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Eigenname eines Zellkulturmediums)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SSC	Side-Scatter
Sto-Tu	stomach tumor / Magentumor
Tc	zytotoxischer T-Lymphozyt
TcR	T-Zell-Rezeptor
Th	T-Helferzelle
TIL	Tumor infiltrierende Lymphozyten
TNM	Stadieneinteilung von malignen Tumoren (T=Tumor, N=Nodus (Lymphknoten), M=Metastase)
Tu-LN	von Tumor befallene Lymphknoten
U	Unit
W	weiblich
WHO	World Health Organization / Weltgesundheitsorganisation

8. **Abbildungsverzeichnis**

- Abbildung 1 Zwei verschiedene histologische Darstellungen des gramnegativen Bakteriums *Helicobacter pylori*.
- Abbildung 2 Graphik aus der prospektiven klinischen Studie von Meimarakis und Mitarbeitern
- Abbildung 3 Zellinteraktionen im Immunsystem
- Abbildung 4 Prozedere der Aufarbeitung von Patientenmaterial
- Abbildung 5 Darstellung von Farbmessungen nach durchflusszytometrischer Untersuchung
- Abbildung 6 Bild einer FACS Darstellung von T-Lymphozyten
- Abbildung 7 Bild einer FACS Auswertung von T-Lymphozyten nach Inkubation mit den Antikörpern CD3 PE und CD8 FITC
- Abbildung 8 Bild einer FACS Auswertung derselben T-Lymphozytenklone wie in Abbildung 7, diesmal nach Inkubation mit den Antikörpern CD3 PE und CD4 FITC
- Abbildung 9 Schematische Darstellung eines ELISA
- Abbildung 10 Doppelfärbung einer dendritischen Zelle
- Abbildung 11 Photo einer Kultur von Magenkarzinomzellen aus einer Lymphknotenmetastase des Patienten GC1 in der Vergrößerung 1/100
- Abbildung 12 Durchflusszytometrische Analyse einer MHC Klasse I oder II Expression auf Magenkarzinomzellen
- Abbildung 13 Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von CD3 und CD4/8 Corezeptoren auf T-Lymphozyten
- Abbildung 14 IFN- γ und IL-5 Produktion in GC7 TIL 10
- Abbildung 15 IFN- γ und IL-5 Produktion in GC9 TIL 3
- Abbildung 16 IFN- γ und IL-5 Produktion in GC9 TIL 4
- Abbildung 17 IFN- γ und IL-5 Produktion in GC20 LN 2
- Abbildung 18 IFN- γ und IL-5 Produktion in GC24 LN 6
- Abbildung 19 IFN- γ und IL-5 Produktion in GC30 TIL 1, GC30 TIL 5 und GC30 TIL 6
- Abbildung 20 Polarisierung der tumorspezifischen Zytokinproduktion von T-Zellen nach Bildung der Ratio von IFN- γ zu IL-5-Produktion
- Abbildung 21 Immunhistochemische AEC-Färbung dendritischer Zellen im Magenkarzinomgewebe des Patienten CA446, Vergrößerung 1:200

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 22 Immunhistochemische Silber-Färbung dendritischer Zellen im Magenkarzinomgewebe des Patienten CA 446, Vergrößerung 1:200
- Abbildung 23 Statistischer Vergleich zwischen der Anzahl CD209/CD83 positiv gefärbter dendritischer Zellen pro Gesichtsfeld von *H. pylori* positiven Patienten und *H. pylori* negativen Patienten

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Klassifizierung des Magenkarzinoms nach TNM Stadium
Tabelle 2	Klassifizierung des Magenkarzinoms nach Laurén
Tabelle 3	Materialien zur Zellkultur
Tabelle 4	Medien, Puffer und Lösungen zur Zellkultur
Tabelle 5	Zellkultur-Geräte
Tabelle 6	Materialien zur Immunperoxidasefärbung
Tabelle 7	Primärantikörper, Isotypkontrollen, Peroxidaseantikörper zur Immunperoxidasefärbung
Tabelle 8	Liste der Antikörper zur Bestimmung der HLA-Oberflächenmoleküle pro FACS-Röhrchen
Tabelle 9	Cluster of differentiation (CD)-Antikörper
Tabelle 10	Übersicht eines CRA-Stimulationsversuches
Tabelle 11	Protokoll ELISA IFN- γ
Tabelle 12	Substanzen zur Immunhistochemie
Tabelle 13	Antikörper zur Immunhistochemie
Tabelle 14	Liste der anzufärbenden Objektträger pro Tumorgewebe-Kryoschnitt
Tabelle 15	Protokoll der immunhistochemischen Färbung dendritischer Zellen
Tabelle 16	Übersicht über die Zellkultur der Tumorzellen und T-Zellen
Tabelle 17	Nachweis einer <i>Helicobacter pylori</i> Kultur in tumorfreier Mukosa oder in Tumorgewebe
Tabelle 18	Serologische Tests zum Nachweis einer akuten oder abgelaufenen <i>Helicobacter pylori</i> Infektion
Tabelle 19	Tumorstatus zum Zeitpunkt der Operation und <i>Helicobacter pylori</i> Historie
Tabelle 20	Immunhistochemische Bestimmung der Expression von Fibroblasten-, epitheliale- und Leukozyten Marker auf Primärkulturen von Magenkarzinom-Tumorzelllinien
Tabelle 21	HLA Profile von Patienten und Kontrollzelllinien
Tabelle 22	Verteilung von CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen (CD3 ⁺) in T-Zell-Cloids von Magenkarzinompatienten
Tabelle 23	IFN- γ : IL-5 Ratio in tumorspezifischen T-Zell-Cloids

Tabellenverzeichnis

Tabelle 24	Immunhistochemische Doppelfärbung dendritischer Zellen in <i>Helicobacter pylori</i> positivem und <i>Helicobacter pylori</i> negativem Tumorgewebe
------------	---

10. Anhang

Klinikum der Universität München

- Chirurgische Klinik und Poliklinik – Großhadern
Direktor: Prof. Dr. med. K.-W. Jauch

_____ **LMU**
Ludwig_____ **LMU**
Maximilians—
Universität____
München_____

Klinikum der Universität München • Chirurgische Klinik und Poliklinik – Großhadern
Marchioninistraße 15 • 81377 München

Verantwortliche Prüfleiter und Prüffärzte:

- ┌ **Dr. med. Dominik Rüttinger** ─┐
Dr. med. Hauke Winter
PD Dr. med. Rudolf Hatz

München, den

Ihr Zeichen Unser Zeichen Ansprechpartner Telefon Telefax E-Mail

Patientenaufklärung

Untersuchungen über Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort bei Patienten mit einem Karzinom.

Sehr geehrte Frau,
Sehr geehrter Herr,

Wie mit Ihnen besprochen worden ist, muß wegen Ihrer Erkrankung an einem Tumor ein operativer Eingriff durchgeführt werden. Wir untersuchen im Forschungslabor die Rolle des Immunsystems bei der Bekämpfung bösartiger Tumore. Hierzu benötigen wir Ihre Mithilfe.

Auch wenn seit langem bekannt ist, dass das Immunsystem eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Beseitigung von Tumorzellen übernehmen kann, konnte bislang in nur wenigen klinischen Studien erfolgreich eine Immunisierung gegen einen Tumor durchgeführt werden. Weitere Untersuchungen zur Interaktion von Immunsystem und Tumorzellen sind notwendig, um neue Therapiestrategien zu entwickeln.

Wir würden nach der operativen Entfernung des Tumors einen Teil des Gewebes für wissenschaftliche Untersuchungen verwenden. Im Labor werden aus dem Biopsiematerial die infiltrierten Immunzellen und die Tumorzellen isoliert und weiter immunologisch untersucht.

Für Sie entstehen hierdurch keinerlei Nachteile, d.h. die medizinische Betreuung und operative Therapie sind von Ihrer Zustimmung oder Nicht-Zustimmung vollkommen unabhängig. Durch Ihre Einwilligung Gewebe zur Verfügung zu stellen, tragen sie dazu bei, das medizinische Wissen über den Einfluß des Immunsystems bei der Bekämpfung bösartiger Tumore zu verbessern und unterstützen damit die Entwicklung neuer Therapiestrategien.

Anhang

Zur Überprüfung der Studiendaten nehmen die dafür zuständigen Personen (Prüfärzte) Einblick in Ihre Krankenakte, um die Fehlerfreiheit und Auswertung der Studiendaten sicherzustellen. Die zuständigen Personen sind selbstverständlich zur Vertraulichkeit verpflichtet und müssen sich an die Bestimmungen des Bundesdatenschutzgesetzes halten. Sie können Ihre Zustimmung jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile für sich selbst widerrufen.

Falls Sie jetzt oder später weitere Fragen zu der Studie und Ihrer Teilnahme haben, stehen wir Ihnen selbstverständlich, ebenso wie Ihr behandelnder Arzt, jederzeit zur Verfügung.

Verantwortliche Prüfleiter und Prüfärzte

Dr. med. D. Rüttinger

PD Dr. med. R. Hatz

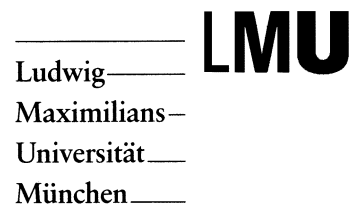
Unterschrift des Patienten

Ort

Datum,



Klinikum der Universität München
Chirurgische Klinik und Poliklinik – Großhadern
Direktor: Prof. Dr. med. K.-W. Jauch



Klinikum der Universität München • Chirurgische Klinik und Poliklinik – Großhadern
Marchioninistraße 15 • 81377 München

Verantwortliche Prüfleiter:

Dr. med. D. Rüttinger
Dr. med. H. Winter
PD Dr. med. R. Hatz

Großes Patientenetikett

München, den

Ihr Zeichen Unser Zeichen Ansprechpartner Telefon Telefax E-Mail

Untersuchungen über Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort bei Patienten mit einem Karzinom.

EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG

Ich habe die Patientenaufklärung zu dieser Studie vollständig gelesen und verstanden. Indem ich diese Erklärung unterzeichne, gebe ich mein freiwilliges Einverständnis zur Teilnahme an der Studie "Untersuchungen über Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort bei Patienten mit einem Karzinom" sowie zur Datenüberprüfung.

Unterschrift Patient

Datum

Unterschrift Prüfarzt

Datum



11. Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Irene Heimbeck

Geburtstag: 30.08.1977
Geburtsort: München, Deutschland
Familienstand: verheiratet
Nationalität: deutsch

Schulbildung

09/1983 - 07/1987 Grund- und Teilhauptschule Wörthsee, Steinebach
09/1987 - 06/1997 Wittelsbacher Gymnasium, München
Abiturnote: 2,00

Berufsausbildung

11/1997 - 12/2005 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München

03/2001 Ärztliche Vorprüfung (Physikum); Note: 4,00
03/2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (1.Staatsexamen); Note: 3,00
09/2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2. Staatsexamen); Note: 2,66
12/2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (3.Staatsexamen); Note: 3,00

05/2006 – 10/2006 Assistenzärztin zur Weiterbildung im Klinikum Landshut, Bereich Hämato-Onkologie

Seit 06/2007 Assistenzärztin in der Asklepios-Fachklinik München-Gauting, wissenschaftliche Mitarbeiterin in der klinischen Kooperationsgruppe „Entzündliche Lungenerkrankungen“, Helmholtz Zentrum München, Gauting

Studienbegleitende Tätigkeiten

Famulaturen:

Lebenslauf

08/2001 Famulatur in der 3. Medizinischen Abteilung
des Krankenhauses München Schwabing
02 – 03/2003 Famulatur in der Dermatologischen Praxis
Professor Schmoeckel, München
08 – 09/2003 Famulatur im Département de Dermatologie,
Hôpital Purpan, Toulouse/ Frankreich

Praktisches Jahr:

10/2004 – 02/2005 1. Terial im Wahlfach Dermatologie in der
Abteilung für Dermatologie, Allergologie
und Umweltmedizin, Krankenhaus München Schwabing
02/2005 – 05/2005 2. Terial im Bereich Innere Medizin in der
Abteilung Hämatologie, Onkologie und Immunologie,
Krankenhaus München Schwabing
05/2005 – 09/2005 3. Terial im Bereich Chirurgie,
Krankenhaus München Neuperlach

Promotion:

experimentelle Doktorarbeit zum Thema:
„Charakterisierung der Immunantwort bei
Magenkarzinompatienten: Einfluss von
Helicobacter pylori auf die Induktion einer tumorspezifischen
Immunantwort.“
Arbeitsgruppe um Prof. Dr. med. Rudolf Hatz,
Klinische Forschung Chirurgie, Klinikum Großhadern

Nebentätigkeiten

Seit 2003 Nachtwache im Schlaflabor der
Neurologischen Abteilung, Klinikum Großhadern
Seit 2006 Mitarbeit in einer Praxis für Onkologie in München

Sonstiges

Sprachen: Englisch: fließend in Wort und Schrift
Französisch: fließend in Wort und Schrift

EDV: Windows XP, Word, Excel, Powerpoint

Hobbies: Jazztanz, Klavierspielen, Volleyball

12. Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Karl-Walter Jauch, Direktor der Klinischen Forschung Chirurgie im Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München, Großhadern danke ich für die Ermöglichung dieser Promotion.

Für die Überlassung des Themas und die stets gute Zusammenarbeit während der Durchführung dieser Dissertation danke ich Herrn Professor Dr. med. Rudolf Hatz aus der Klinischen Forschung Chirurgie im Klinikum der Universität München, Großhadern.

Von Herzen danke ich Frau Dr. rer. nat. Natasja van den Engel aus der Klinischen Forschung Chirurgie im Klinikum der Universität München, Großhadern für die Betreuung meiner Dissertation. Sie war während der gesamten Dauer dieser Doktorarbeit stets für mich da und hat mich in geduldiger und freundschaftlicher Weise unterstützt und beraten. Von der fachlichen Einführung in die experimentelle Medizin hin bis zur Korrektur dieser Dissertationsarbeit hat sie unermüdlich Hilfestellung geleistet und maßgeblich zur Komplettierung dieser Dissertation beigetragen.

Frau Priv. Doz. Dr.rer.biol.hum. Dipl.-Biol. Barbara Mayer und Herrn Dr. med Hauke Winter danke ich besonders für die vielfältige Hilfestellung und den vielseitigen Anregungen während der Durchführung meiner Dissertationsarbeit.

Für die Überlassung von Tumorzelllinien und die fachliche Beratung gilt mein Dank Herrn Professor Bernard Fox aus dem Earle A. Chiles Research Institute, Portland, OR, USA, sowie Frau Professor Dolores Schendel, PhD, Institut für molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München, München-Großhadern.

Meinen Studienkollegen Martin Andrees, Thomas Kaulich und Wolfi Föhre danke ich für die seit Jahren bestehende ehrliche Freundschaft und den Zusammenhalt in den emotionalen Momenten unseres schönen Berufes.

Dr. sc. Hum. M.A. M.Sc. Dipl.Berufspäd. (Univ.) Christian Apfelbacher danke ich für seine Freundschaft, für seine Hilfe bei der statistischen Aufarbeitung dieser Dissertation und für die bereichernden stundenfüllenden Gespräche zu Zweit.

Meinem Ehemann Tobias Heimbeck danke ich für seine einzigartige Liebe und dass er mir immer Rückhalt gibt; für sein ermunterndes Antreiben und außerdem für seine technische Beratung in dieser Dissertation. Dafür, dass es ihn gibt und dass er sein Leben mit mir leben will.

Ich danke meiner Familie, meiner Mutter Marianne Shau-Baumeister und meinen Brüdern Thomas Baumeister und Robert Shau für Ihre Hilfe in allen Lebenssituationen, dafür, dass sie an mich glauben und mich aktiv und mit einer Liebe unterstützen, die weit über den normalen Zusammenhalt einer Familie hinausgeht. Ich bin stolz und froh, meine Mutter und meine Brüder zu haben.