

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. Stefan Endres



**Dendritische Zellen und CpG-Oligodesoxynukleotide in
Kombination mit Chemotherapie in einem murinen
Kolonkarzinommodell**

Dissertation

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

vorgelegt von

Susanne Sara Maria Schreiber
aus Lauingen (Donau)

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Mitberichtersteller: Priv. Doz. Dr. med. vet. habil. Robert Kammerer
Priv. Doz. Dr. med. Christian Rust

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Carole Bourquin

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

Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.2012

Meiner Familie in Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	5
2.1	Das Immunsystem	7
2.1.1	Das angeborene Immunsystem	7
2.1.2	Das erworbene oder adaptive Immunsystem	8
2.2	Dendritische Zellen	9
2.2.1	Antigenaufnahme und Prozessierung	11
2.2.2	Maturierung und Differenzierung	12
2.2.3	DC-Subpopulationen	13
2.2.3.1	Myeloide DC.....	13
2.2.3.2	Plasmazytoide DC.....	14
2.3	Toll-like-Rezeptoren	15
2.3.1	Entdeckung der <i>Toll-like</i> -Rezeptoren	15
2.3.2	Rolle der <i>Toll-like</i> -Rezeptoren im Immunsystem	15
2.3.3	Liganden der <i>Toll-like</i> -Rezeptoren	16
2.3.4	Molekulare Struktur der <i>Toll-like</i> -Rezeptoren	18
2.3.5	Signaltransduktion durch <i>Toll-like</i> -Rezeptoren	18
2.3.6	Expressionsmuster von TLR9	20
2.4	Antitumorale Immuntherapie.....	21
2.4.1	Vakzinierungskonzepte	21
2.4.2	DC-Vakzinierung gegen Tumore	22
2.4.3	CpG-Oligodesoxynukleotide.....	24
2.4.3.1	Antitumorale Wirkung bakterieller Lysate.....	24
2.4.3.2	Entdeckung der immunstimulatorischen Wirkung mikrobieller DNA	25
2.4.3.3	CpG als Adjuvans bei Vakzinierungen.....	25
2.4.3.4	Antitumorale Therapieansätze	26
2.5	Therapie des kolorektalen Karzinoms.....	27
2.5.1	Chemotherapie beim metastasierten CRC.....	28
2.5.1.1	5-Fluorouracil	29
2.5.1.2	Irinotecan	29
2.6	Vorarbeiten aus der eigenen Abteilung	30
3	FRAGESTELLUNG	33

4	MATERIAL UND METHODEN	37
4.1	Reagenzien, Chemikalien und Geräte	39
4.1.1	Geräte	39
4.1.2	Chemikalien, Reagenzien und Puffer	39
4.1.3	Reagenziensätze zur Bestimmung von Zytokinen mittels ELISA (Sets)	40
4.1.4	Materialien, Lösungen und Medien für die Zellkultur	40
4.1.5	Wachstumsfaktor, Zytokin und Oligodesoxynukleotid	41
4.1.6	Antikörper und DynaBeads®	42
4.1.7	Tumorzelllinie	42
4.1.8	Zytostatika	43
4.1.9	Software	43
4.2	Zellkultur	44
4.2.1	Allgemeine Kulturbedingungen	44
4.2.2	Murine Kolokarzinomzelllinie C26	44
4.2.3	Dendritische Zellen	45
4.2.3.1	DC-Generierung aus murinem Knochenmark	45
4.2.3.2	Antigenbeladung und Aktivierung der generierten, unreifen DC <i>in vitro</i>	46
4.2.3.3	Ernte Antigen-beladener, aktivierter DC zur Immunisierung <i>in vivo</i>	47
4.3	Tierexperimentelle Methoden	48
4.3.1	Mäuse und Haltungsbedingungen	48
4.3.2	Tumorinduktion	49
4.3.3	Immunisierung mit syngenem DC	50
4.3.4	Applikation von CpG 1826	50
4.3.5	Chemotherapie	50
4.3.6	Tötung von Versuchstieren	51
4.3.7	Aufbau und zeitlicher Ablauf der Experimente im C26-Modell	51
4.3.8	Organentnahme und Aufbereitung tierischen Materials	54
4.3.8.1	Peripher-venöses Blut	54
4.3.8.2	Milz	54
4.3.8.3	Knochenmark	55
4.4	Durchflusszytometrie	56
4.4.1	Allgemeines Funktionsprinzip	56
4.4.2	Bestimmung von Oberflächenmolekülen	57
4.4.3	Durchflusszytometrischer Nachweis hämatopoetischer Vorläuferzellen	57
4.4.4	Automatisierte Blutbildanalyse	59
4.4.5	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>	60
4.5	Morphologische Methoden	61

4.5.1	Differenzialblutbild	61
4.5.2	Histologie.....	61
4.6	Statistische Analyse.....	62
5	ERGEBNISSE	63
5.1	Immuntherapie mit DC und CpG ist wirksamer zur Behandlung muriner C26-Tumore als Chemotherapie.....	65
5.1.1	Immuntherapie mit DC und CpG induziert effizientere Tumorrückbildung als Chemotherapie	65
5.1.2	Nach Immuntherapie mit DC und CpG leben tumortragende Mäuse länger als nach Chemotherapie.....	68
5.2	Im C26-Modell ist Immuntherapie mit DC und CpG ohne Effektivitätsverlust mit Chemotherapie kombinierbar	70
5.2.1	Potente, antitumorale Wirkung der Immuntherapie mit DC und CpG bleibt bei Kombination mit 5-FU bestehen	70
5.2.2	Immuntherapie mit DC und CpG kann im C26-Modell effizient mit Irinotecan kombiniert werden.....	72
5.2.3	Immuntherapie-vermittelte Zytokinproduktion wird von eingesetzten Zytostatika unterschiedlich beeinflusst	73
5.2.4	5-FU-Applikationen beeinträchtigen durch DC und CpG induzierte, protektive Gedächtnisimmunität nicht.....	75
5.3	CpG schützt vor Chemotherapie-assoziiertes Toxizität.....	77
5.3.1	Bei Kombination mit CpG werden vom murinen Organismus deutlich höhere 5-FU-Dosen toleriert	78
5.3.1.1	Chemoprotektive Effekte sind CpG-vermittelt und unabhängig vom C26-Modell reproduzierbar	78
5.3.1.2	CpG-vermittelter Überlebensvorteil bei Kombination mit 5-FU nur in engem therapeutischen Bereich nachweisbar	79
5.3.2	5-FU wirkt auch bei zeitgleicher CpG-Applikation auf periphere Blutzellen stark zytotoxisch	81
5.3.3	Proliferationssteigernde Wirkung von CpG auf murine Splenozyten bleibt bei Kombination mit 5-FU bestehen	84
5.3.3.1	Nach Kombination mit CpG ist die Gesamtzellzahl in der murinen Milz höher als nach alleiniger Therapie mit 5-FU.....	84
5.3.3.2	CpG schützt lymphozytäre Zellreihen in der Milz vor Chemotherapie-bedingter Zytotoxizität.....	85
5.3.3.3	CpG fördert in der Milz die hämatopoetische Regeneration nach 5-FU-Therapie	88

5.3.4	Kombination mit CpG ermöglicht eine raschere Regeneration von 5-FU-induzierter Myelotoxizität	90
5.3.4.1	Fünf Tage nach Ende der Behandlung mit 5-FU und CpG zeigt Knochenmark Inseln regenerierenden Gewebes	90
5.3.4.2	Im Knochenmark schützt CpG vor allem myeloische Populationen vor Chemotherapie-bedingter Toxizität.....	93
6	DISKUSSION	95
6.1	Tumor und Immunsystem.....	97
6.2	Einflüsse von Chemotherapie auf das Immunsystem	98
6.3	Argumente für Kombination von Immuntherapie und Zytostatika.....	100
6.3.1	Synergistische Effekte bei Kombination von Immun- und Chemotherapie.....	101
6.3.2	Induktion immunogenen Zelltods durch bestimmte Zytostatika.....	102
6.4	Kombination von Immuntherapieprotokollen mit Zytostatika in der Literatur....	105
6.4.1	Intratumorale Applikation unreifer DC nach systemischer Chemotherapie	105
6.4.2	Vorteile des Einsatzes reifer DC zur Tumorstimulation	106
6.4.3	Kombination von CpG und Chemotherapie.....	107
6.5	Zytostatika hier ohne negativen Einfluss auf Immuntherapie-induzierten, antitumoralen Effekt	107
6.6	Substanz-assoziierte Toxizität als limitierender Faktor dosisintensiver Chemotherapieprotokolle	108
6.7	Proliferatorische CpG-Effekte auf die murine Milz.....	109
6.8	Mögliche Mechanismen der CpG-vermittelten Chemoprotektion	110
6.8.1	Mobilisierung hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen im murinen Knochenmark.....	110
6.8.1.1	Mobilisierende Effekte des angeborenen Immunsystems auf hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen	110
6.8.1.2	CpG-vermittelte Mobilisierung sehr unreifer, pluripotenter HSC	111
6.8.2	Gesteigerte Aktivierung verbliebener neutrophiler Granulozyten	112
7	AUSBLICK	115
8	LITERATURVERZEICHNIS	119
9	APPENDIX	149
9.1	Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme.....	151

9.2	Veröffentlichungen	155
9.3	Lebenslauf Fehler! Textmarke nicht definiert.	
9.4	Danksagung	157

1 ZUSAMMENFASSUNG

Obwohl mit antitumorale Immuntherapie in zahlreichen präklinischen Arbeiten aussichtsreiche Ergebnisse erzielt wurden, sind die Möglichkeiten ihrer Prüfung als Monotherapie im Rahmen klinischer Studien sehr begrenzt. Daher ist die Untersuchung kombinierter Ansätze aus Immuntherapie und etablierten Zytostatika von besonderer Wichtigkeit für die Entwicklung neuartiger, klinisch anwendbarer Behandlungskonzepte.

Die vorliegende Arbeit untersucht die antitumorale Wirkung einer Kombination aus Chemotherapie und Immuntherapie mit einer Vakzine aus *in vitro* Antigen-gepulsten und mit Cytidin-Guanosin-(CG)-Dinukleotid-haltigen Oligodesoxynukleotiden (CpG) aktivierten, dendritischen Zellen (DC) sowie peritumoral verabreichtem CpG-Bolus in einem murinen Kolonkarzinommodell (C26). Tumortragenden Mäusen wurde viermal in wöchentlichen Abständen die Immuntherapie, eine Chemotherapie mit 5-Flourouracil (5-FU) und Leucovorin (LV) oder Irinotecan, oder eine Kombination beider Therapien appliziert.

Hinsichtlich antitumorale Wirksamkeit und Überlebensverlängerung ließen sich mit dem Immuntherapieprotokoll signifikant bessere Ergebnisse erzielen als mit einem der beiden Zytostatika. Eine Kombination der Immuntherapie mit 5-FU oder Irinotecan beeinträchtigte diese gute, antitumorale Effektivität nicht, verringerte aber interessanterweise die Chemotherapie-assoziierte Toxizität signifikant. 5-FU hatte auch keinen negativen Einfluss auf die wenige Stunden nach Applikation der Immuntherapie erwartungsgemäß hohen, systemischen Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine Interleukin (IL)-12p70 und IL-6. Bei Prüfung der Immuntherapie-induzierten Gedächtnisimmunität in einem Tumor-Reinduktionsexperiment waren Tiere, die initial mit einer Kombination aus Immuntherapie und 5-FU behandelt worden waren, sogar am besten vor erneuter Tumorbildung geschützt. Somit ist die Immuntherapie mit DC und CpG im murinen C26-Modell konventioneller Chemotherapie überlegen und kann zudem ohne Beeinträchtigung ihrer antitumoralen Effektivität mit etablierten Zytostatika kombiniert werden.

Mit der Charakterisierung der beobachteten Protektion vor Chemotherapie-assoziierte Toxizität bei zeitgleicher Immuntherapie, beschäftigt sich der letzte Teil dieser Arbeit. Es handelt sich um ein vom C26-Modell unabhängiges, CpG-vermitteltes Phänomen. Bei Kombination mit CpG zeigte sich die Chemotherapie-induzierte Zytotoxizität in Milz und Knochenmark deutlich gemindert. Mögliche Mechanismen des CpG-vermittelten Überlebensvorteils sind eine raschere Regeneration des hämatopoetischen Kompartiments nach Chemotherapie oder eine gesteigerte Aktivierung relevanter Effektorzellen der angeborenen Immunität in der Phase der Therapie-bedingten Neutropenie.

2 EINLEITUNG

2.1 Das Immunsystem

Bei allen multizellulären Organismen entwickelten sich im Rahmen der Evolution Verteidigungsstrategien zum Schutz gegen eindringende Pathogene. Eine zentrale Eigenschaft sämtlicher Immunsysteme stellt die Fähigkeit zur raschen Aktivierung aus dem Ruhezustand nach Detektion bestimmter Schlüsselmerkmale infektiologischer Prozesse dar [Reis e Sousa, 2001]. Säugetiere besitzen zwei komplementäre Abwehrsysteme, das sogenannte angeborene und das erworbene oder adaptive Immunsystem, deren Effektoren in enger wechselseitiger Kooperation stehen.

2.1.1 Das angeborene Immunsystem

Beim angeborenen Immunsystem handelt es sich um eine evolutorisch sehr alte Form der Abwehr, die bei allen Tieren und sogar Pflanzen vorhanden ist. Seine Funktion besteht zunächst in der raschen, Antigen-unspezifischen Detektion mikrobiellen Materials als *körperfremd*. Zu den zentralen Effektorzellen zählen reine Fresszellen wie Granulozyten, die professionell Antigen-präsentierenden Zellen (APC) wie Makrophagen und DC sowie die sogenannten angeborenen Lymphozyten wie natürliche Killerzellen (NK-Zellen), natürliche Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) und $\gamma\delta$ T-Zellen. APC binden über verschiedene Keimbahn-kodierte Rezeptoren, die als *pattern-recognition receptors* (PRR) zusammengefasst werden, sogenannte *pathogen-associated molecular pattern* (PAMP), bei denen es sich um stark konservierte Moleküle handelt, die im Säugerorganismus physiologischerweise nicht vorkommen und die daher auf die Anwesenheit eines Pathogens hindeuten [Janeway, 2002]. In Abhängigkeit vom Ort der Detektion kategorisiert das angeborene Immunsystem pathogenes Material als intra- oder extrazellulär. Daraufhin sezernierte Zytokine und Interferone (IFN) ermöglichen bereits eine erste Begrenzung der Infektionsausbreitung. Insgesamt garantiert diese erste Stufe des Säugerimmunsystems schnelle Handlungsfähigkeit beim Auftreten von Infektionen oder Entzündungen. Die induzierte Abwehr ist allerdings weder spezifisch noch beinhaltet sie die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, das den Organismus bei wiederholtem Kontakt mit demselben Pathogen optimal schützen könnte. Daher ist die Ausbreitung der Immunaktivierung vom angeborenen auf das erworbene Immunsystem, für das genau diese beiden Eigenschaften charakteristisch sind, von elementarer Wichtigkeit.

2.1.2 Das erworbene oder adaptive Immunsystem

Ein Grundprinzip der adaptiven Immunität stellt die Antigen-spezifität dar. Während das Rezeptorrepertoire des angeborenen Immunsystems mit den Keimbahn-kodierten PRR insgesamt relativ klein ist, zeichnet sich das adaptive Immunsystem durch eine enorme Rezeptordiversität aus. Um diese zu gewährleisten, werden im Laufe der lymphozytären Entwicklung zunächst verschiedene, für die variablen Antigenbindungsstellen lymphozytärer Rezeptoren kodierende Gensegmente somatisch rekombiniert. Im Anschluss an die Genexpression werden zudem jeweils zwei verschiedene, sogenannte variable Domänen gepaart. Obgleich jeder Lymphozyt nur Rezeptoren einer einzigen Antigen-spezifität exprimiert, hält das T- und B-Zell-Repertoire des adaptiven Immunsystems dank somatischer Diversifikation für praktisch jedes mögliche Antigen eine spezifische Abwehrzelle bereit, die nach Erkennung „ihres“ Antigens rasch selektioniert und zu klonaler Proliferation angeregt wird. Im Rahmen der folgenden Differenzierung entstehen Effektorzellen, die entweder gezielt eingedrungene Pathogene oder infizierte Körperzellen eliminieren oder das immunologische Gedächtnis bilden.

Antigen-spezifische T-Lymphozyten, die auf die Erkennung infizierter oder maligne entarteter Körperzellen spezialisiert sind, erkennen Antigene, die im Kontext der verschiedenen Moleküle des sogenannten Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) präsentiert werden. MHC-I-Moleküle, die von allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden, komplexieren intrazellulär synthetisierte Peptide. Neben körpereigenen Proteinen präsentieren Virus-infizierte Zellen auf diese Weise virales Material. Über MHC-II-Moleküle präsentieren professionelle APC mittels Endozytose aus dem Extrazellulärraum aufgenommenes, körperfremdes Material auf ihrer Zelloberfläche. Neben den als erstes Signal („*signal one*“) bezeichneten Antigen-MHC-Komplexen benötigen T-Lymphozyten für ihre suffiziente Aktivierung und Differenzierung zu Effektorzellen jedoch noch ein zweites, sogenanntes kostimulatorisches Signal („*signal two*“), das von derselben APC ausgesandt werden muss. So erklärt sich die enge Verknüpfung angeborener und erworbener Immunität und die zentrale Rolle der DC als Mittler zwischen beiden Systemen.

2.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) leiten sich von hämatopoetischen Stammzellen ab und wandern vom Knochenmark in die Peripherie aus [Manz, 2001; Wu, 2001; den Brok, 2005]. Neben dem Blut kommen sie im Interstitium fast aller Organe sowie an sämtlichen biologischen Grenzflächen des Organismus vor, wie der Epidermis, wo sie nach ihrem Erstbeschreiber Paul Langerhans als Langerhans-Zellen bezeichnet werden [Langerhans, 1868], oder den Schleimhäuten von Respiration beziehungsweise Gastrointestinaltrakt. Sie sind hier typischerweise dicht unter dem jeweiligen Oberflächenepithel zu finden [Holt, 1990; Maric, 1996; Romani N, 2005].

In vitro können DC unter anderem durch Differenzierung aus monozytären Zellen des peripheren Bluts nach deren Stimulation mit Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierendem Faktor (GM-CSF) und IL-4 [den Brok 2005] oder aus Knochenmarksvorläuferzellen, wie in Kapitel 4.2.3.1 ausführlich beschrieben, gewonnen werden.

Neben ihrer Größe und der durch irreguläre Dendriten geprägten Morphologie besitzen DC weitere charakteristische Eigenschaften wie das hohe Oberflächenexpressionsniveau von MHC-II-Komplexen und dem Integrin CD11c sowie die Expression diverser Rezeptoren zur Antigenaufnahme. Die folgende Abbildung zeigt die typische Morphologie reifer DC (Abb. 2.1).

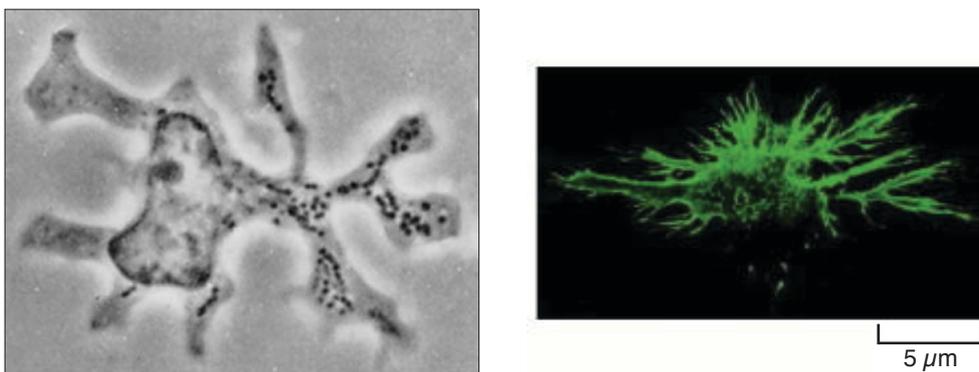


Abb. 2.1: Typische Morphologie dendritischer Zellen.

Die bezeichnenden, langen Zellfortsätze (Dendriten) sind bei voll maturierten DC am ausgeprägtesten. Links phasenkontrastmikroskopische Aufnahme einer aus der murinen Milz isolierten DC (4500-fache Vergrößerung). Abbildung aus der 1973 veröffentlichten Arbeit, in der Steinman und Cohn die Bezeichnung „dendritische Zelle“ prägten [Steinman, 1973]. Rechts immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach Färbung mit einem Fluorochrom-gekoppelten monoklonalen Antikörper gegen ein Antigen auf der DC-Oberfläche [Alberts, 2002].

DC fungieren als zentrale Mittler zwischen angeborener und erworbener Immunität, wobei sowohl T- als auch B-Zell-vermittelte, Antigen-spezifische Immunität des adaptiven Immunsystems durch DC induziert, koordiniert und reguliert wird [Steinman, 1991; Banchereau, 2000].

Analog zu B- und T-Lymphozyten müssen auch DC zunächst aus einem Ruhezustand aktiviert werden [Reis e Sousa, 2001]. Während und nach ihrer Aktivierung nehmen sie in dreierlei Hinsicht Einfluss auf die Ausbildung einer spezifischen, T-Zell-vermittelten Immunantwort. Für die Wandlung angeborener in adaptive Immunität muss im Rahmen einer Infektion typischerweise in peripheren Geweben vorkommendes, antigenes Material zunächst für das lymphatische System zugänglich gemacht werden [Steinman, 2006]. Zu diesem Zweck werden unreife DC nach Aufnahme antigenen Materials in der Peripherie aktiviert und wandern in lymphatische Organe. Nach dieser Migration und ihrer Ausdifferenzierung sind die nun reifen DC schließlich in der Lage, B- und vor allem T-Lymphozyten zu stimulieren [Banchereau, 1998]. Die Zunahme der Peptid-Präsentation in MHC-II-Komplexen auf der Oberfläche reifer DC optimiert die Antigenpräsentation für CD4⁺ T-Zellen. Zudem gewährleisten ihre gesteigerten kostimulatorischen Fähigkeiten durch Hochregulation entsprechender Oberflächenmoleküle, dass T-Zellen neben ihrem spezifischen Antigen auch das für eine effiziente Aktivierung notwendige, oben erwähnte „*signal two*“ erhalten. Schließlich triggern DC-Aktivierung und -Maturierung auch die Produktion diverser Zytokine, wie IL-12, IL-18 oder IL-10, was eine Polarisation der jeweils induzierten T-Zell-Immunität zur Folge hat [Reis e Sousa, 2001].

DC sind auch von entscheidender Bedeutung für die Induktion humoraler Immunität durch Aktivierung naiver B-Lymphozyten und B-Gedächtniszellen [Caux, 1997; Jego, 2003]. Darüber hinaus spielen sie eine wichtige Rolle innerhalb des angeborenen Immunsystems, da sie in der Lage sind, sogenannte Lymphozyten des angeborenen Immunsystems, wie NK-, NKT- und $\gamma\delta$ T-Zellen zu aktivieren. Diese Zellen töten Virus-infizierte oder maligne entartete Körperzellen schnell und effektiv und synthetisieren zudem relevante Zytokine wie Typ-II Interferon, ohne jedoch eine Gedächtnisimmunität auszubilden. Durch die Interaktion mit diesen Zellen werden DC wiederum zur Produktion von TNF- α und IL-12 sowie zur Maturierung angeregt [Fernandez, 1999; Kadowaki, 2001; Mellman, 2001].

2.2.1 Antigenaufnahme und Prozessierung

Neben Aufnahme antigenen Materials mittels Phagozytose oder Endozytose beinhaltet der Vorgang der Antigenpräsentation intrazelluläre Prozessierung und schließlich Präsentation der Peptide auf der Zelloberfläche der APC im Kontext von MHC-I- oder MHC-II-Komplexen [Inaba, 1998; Mellman 2001].

Eine primäre Aufgabe von DC in peripheren Geweben liegt in der kontinuierlichen Aufnahme von Material aus dem Extrazellulärraum. Durch ihre bevorzugte Lokalisation in der Nähe biologischer Grenzflächen kommen sie nicht nur mit körpereigenem Material und zahlreichen, harmlosen Umweltantigenen in Kontakt, sondern nehmen im Rahmen einer Infektion beziehungsweise eines inflammatorischen Prozesses auch rasch Antigene der verursachenden Pathogene auf und präsentieren diese. Daraus erklärt sich die immer wiederkehrende Bezeichnung dieser Zellpopulation als Wächter („*sentinel*“).

Interessanterweise zeigen die in peripheren Geweben lokalisierten, sogenannten unreifen DC zwar eine sehr hohe Aktivität in Bezug auf die Aufnahme antigenen Materials, können aber aufgrund ihres relativ geringen Oberflächenexpressionsniveaus an MHC-I- und MHC-II-Komplexen sowie an kostimulatorischen Molekülen T-Zellen nicht adäquat aktivieren [Romani, 1989; Pure, 1990]. Aus der Antigen-spezifischen Interaktion einer unreifen DC mit einem T-Lymphozyten resultiert entweder dessen Anergie oder Depletion oder seine Differenzierung in eine IL-10-sezernierende, sogenannte regulatorische T-Zelle [Jonuleit, 2000; Dhodapkar, 2001; Steinman, 2003]. Dieser Prozess ist unter anderem für die Aufrechterhaltung der sogenannten zentralen, immunologischen Toleranz von Bedeutung, wobei DC im Thymus die unverzügliche Depletion neu generierter, autoreaktiver T-Lymphozyten induzieren [Brocker, 1999].

Wie bereits erwähnt nehmen DC in der Peripherie auch diverse Antigene auf, gegen die keine Immunantwort ausgebildet werden soll, weil es sich dabei entweder um körpereigenes, beim Zellumsatz proliferierender Gewebe anfallendes Material oder um harmlose Umweltantigene handelt, die sich chronisch im Bereich der Epithelien von Respirations- oder Gastrointestinaltrakt finden [Huang, 2000; Vermaelen, 2001]. Die mangelnde Fähigkeit unreifer DC zur Induktion adaptiver Immunität garantiert somit zudem periphere immunologische Toleranz gegenüber körpereigenem und physiologisch vorkommendem Umweltmaterial [Mellman 2001; Roncarolo, 2001].

2.2.2 Maturierung und Differenzierung

Der Kontakt mit sogenannten Gefahrensignalen, zu denen neben den im Kapitel 2.3 ausführlich beschriebenen, sogenannten *Toll-like*-Rezeptor (TLR)-Liganden und zahlreichen anderen mikrobiellen Produkten auch agonistischer CD40-Ligand (CD40L), proinflammatorische Zytokine, Fc γ -Rezeptoren sowie nekrotische Zellen mit ihren charakteristischen Bestandteilen gehören, führt zu weitreichenden Veränderungen der DC [Sparwasser, 1998; Gallucci, 1999; Hartmann, 1999]. Insgesamt befähigen diese als Maturierung bezeichneten Prozesse die Zellen durch Optimierung ihrer Antigen-präsentierenden Fähigkeiten zur Aktivierung insbesondere T-Zell-vermittelter, adaptiver Immunität. DC entwickeln unter anderem das Vollbild ihrer dendritischen Morphologie durch Vermehrung und Verlängerung der Zellfortsätze zur Verbesserung ihrer Interaktionsfähigkeit mit T-Zellen. Zudem verlieren sie die für unreife DC charakteristischen endo- und phagozytotischen Rezeptoren und verändern ihr Oberflächenexpressionsprofil zugunsten einer deutlich höheren Dichte an MHC-I- und MHC-II-Komplexen, einer gesteigerten Exposition klassisch kostimulatorischer Moleküle, wie der strukturverwandten Glykoproteine CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2), die mit CD28 auf T-Lymphozyten interagieren, sowie diverser T-Zell-Adhäsionsmoleküle, wie CD48 und CD58 [Mellman 2001]. Die Hochregulation der CD40-Expression auf DC stellt ein weiteres wichtiges, kostimulatorisches Signal für CD40L-exprimierende T-Zellen bereit, wobei durch diese Interaktion T-Lymphozyten und DC wechselseitig aktivierende Signale erhalten. Um die präsentierten Antigene möglichst vielen T-Lymphozyten zugänglich zu machen und eine rasche Selektion des jeweils spezifisch reaktiven T-Zellklons zu gewährleisten, migrieren DC nach Kontakt mit einem Gefahrensignal im Rahmen des sogenannten *homings* aus der Peripherie in lymphatische Organe [Randolph, 2005]. Diverse mikrobielle Produkte und inflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder IL-1 induzieren diesen komplexen Prozess, der auch mit Veränderungen der Expression von Chemokinrezeptoren auf ihrer Oberfläche einhergeht [De Smedt, 1996; Cumberbatch, 1997a; Cumberbatch, 1997b; Cyster, 1999]. In lymphatischen Organen finden sich DC vor allem in den sogenannten T-Zell-Arealen [Steinman 2006]. Reife DC sind in Abhängigkeit des Stimulus, der den Reifungsprozess eingeleitet hat, zur Induktion unterschiedlicher Formen von adaptiver Immunität fähig, haben aber die Fähigkeit, Antigene aufzunehmen und zu prozessieren weitgehend verloren.

2.2.3 DC-Subpopulationen

Seit der Erstbeschreibung der DC durch Steinman und Cohn [Steinman 1973] wurde deutlich, dass im Organismus zahlreiche verschiedene DC-Subpopulationen existieren mit jeweils unterschiedlicher Lokalisation und spezialisierten Funktionen innerhalb des Immunsystems [Shortman, 2002; Shortman, 2007]. Eine genaue Charakterisierung der einzelnen Entitäten sowie ihrer Differenzierung aus Vorläuferzellen erwies sich aufgrund der jeweils geringen Zellzahl und kurzen Lebensdauer als schwierig. Mittlerweile werden sowohl im humanen als auch im murinen System grundsätzlich myeloide (mDC) beziehungsweise klassische (cDC) von plasmazytoiden DC (pDC) unterschieden, wobei beide Populationen wiederum diverse Subtypen umfassen [Ueno, 2011]. Aufgrund der Komplexität der verschiedenen Untergruppen beschränkt sich die vorliegende Arbeit auf eine grobe Skizzierung der grundsätzlichen, funktionellen und immunphänotypischen Charakteristika von mDC und pDC insgesamt.

2.2.3.1 Myeloide DC

Diese Population repräsentiert den oben beschriebenen, klassischen Prototyp einer APC, da gewebeständige mDC im unreifen Zustand in der Peripherie effizient Antigene aufnehmen und auf immunologische Gefahrensignale hin in lymphatische Organe einwandern, um dort mit naiven T-Lymphozyten zu interagieren, wie in den Kapiteln 2.2.1 und 2.2.2 ausführlich beschrieben [Bell, 1999]. Insgesamt gehören DC in peripheren Geweben vor allem dieser Gruppe an. Ihre bekanntesten Vertreter sind die ebenfalls bereits erwähnten Langerhanszellen der Epidermis [Schuler, 1985; Romani, 2003].

Reife mDC der Maus exprimieren typischerweise neben den α -Integrinuntereinheiten CD11b und CD11c die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 sowie MHC-II. CD4, CD8 und CD205 werden von verschiedenen mDC-Subtypen exprimiert [Shortman 2002].

In Abhängigkeit vom aktivierenden Gefahrensignal können reife mDC sowohl T_H1 - als auch T_H2 -Immunantworten induzieren [Steinman 2006]. So reagieren mDC auf zahlreiche mikrobielle Stimuli, wie diverse TLR-Liganden, oder auf CD40L mit der Produktion großer Mengen des proinflammatorischen Zytokins IL-12, wodurch die Entwicklung von $CD4^+$ T-Zellen zu IFN- γ -produzierenden T_H1 -Zellen gefördert und zelluläre Immunität induziert wird [Lanzavecchia, 2001]. Kommen mDC hingegen mit

verschiedenen Allergenen oder mit Material extrazellulärer Parasiten wie Eiern des Trematoden *Schistosoma mansoni* in Kontakt, fördern sie die Entwicklung naiver CD4⁺ T-Zellen zu T_H2-Zellen, die unter anderem IL-4, IL-5, und IL-13 produzieren und so humorale Immunität induzieren [Kadowaki, 2007].

Umfassende Kenntnisse über den Einfluss der einzelnen mDC-Subtypen sowie der verschiedenen Aktivierungssignale auf die induzierte T-Zell-Immunität sind für das Design antitumoraler Vakzinierungsprotokolle in jedem Fall von äußerster Wichtigkeit, da nur die Induktion T_H1-vermittelter Immunität potente, antitumorale Wirkung entfaltet [Banchereau, 2005].

2.2.3.2 Plasmazytoide DC

Bereits vor mehr als 25 Jahren war für das humane System erstmals die Existenz spezieller Leukozyten gezeigt worden, die auf bestimmte virale Infektionen mit der Produktion großer Mengen an Typ-I Interferonen, wie IFN- α , - β und - ω , reagieren. Diese Zellen wurden zunächst deskriptiv als Interferon-produzierende Zellen (IPC) bezeichnet [Ronblom, 1983; Perussia, 1985; Fitzgerald-Bocarsly, 1993]. Endozytotische und phagozytotische Aktivität sind bei dieser Subpopulation im Ruhezustand signifikant geringer ausgeprägt als bei klassischen mDC. Die MHC-II⁺ Zellen sind jedoch in der Lage, allogene CD4⁺ und CD45RA⁺ naive T-Zellen in vergleichbarer Weise zur Proliferation anzuregen [Grouard, 1997]. Daher wurden die IPC schließlich definitiv als Untergruppe der DC-Population eingeordnet und aufgrund ihrer im Ruhezustand rundlichen Form ohne Dendriten als *plasmazytoide* DC (pDC) bezeichnet [Cella, 1999; Siegal, 1999]. Aufgrund ihres Immunphänotyps (Lineage⁻ CD4⁺ CD11c⁻ IL3R α ⁺) sind sie eindeutig markier- und isolierbar [Grouard 1997; Olweus, 1997]. Im Rahmen viraler Infektionen produzierte Typ-I Interferone fungieren für die pDC einerseits als autokrine Überlebensfaktoren und wirken andererseits zusammen mit ebenfalls induziertem TNF- α an ihrer funktionellen Entwicklung mit, unter anderem durch Erhöhung der Oberflächenexpression von MHC-II-Komplexen und der kostimulatorischen Moleküle CD86 und CD80 [Kadowaki, 2000]. Mit der Reifung erhalten pDC schließlich auch eine klassisch dendritische Morphologie und prozessieren und präsentieren antigenes Material, wohingegen ihre Fähigkeit zur Interferonproduktion deutlich abnimmt [Siegal 1999].

Zu Beginn des vergangenen Jahrzehnts wurde auch die den humanen pDC entsprechende Population im murinen System identifiziert. Hierbei handelt es sich um

CD11c^{lo-int} B220⁺ Zellen, die ebenfalls große Mengen an Typ-I Interferonen produzieren und neben Milz und Lymphknoten auch im peripheren Blut zu finden sind [Asselin-Paturel, 2001; Bjorck, 2001; Nakano, 2001; O'Keeffe, 2002; O'Keeffe, 2003].

2.3 *Toll-like*-Rezeptoren

2.3.1 Entdeckung der *Toll-like*-Rezeptoren

Die Nomenklatur *Toll-like* rührt daher, dass die *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) der Säuger evolutorisch stark konservierte Strukturen zeigen, die in hohem Maß mit dem bei *Drosophila melanogaster* entdeckten *Toll*-Protein übereinstimmen [Anderson, 2000]. Wie bereits seit den frühen 1980-er Jahren bekannt, fungiert *Toll* dort als maternales Effektorgen, dessen Genprodukt für die Ausbildung der dorsoventralen Achse während der frühen Embryonalentwicklung von *Drosophila* essenziell ist [Anderson, 1985; Hashimoto, 1988]. Die Relevanz des *Toll*-Proteins für die Immunabwehr des Insekts wurde erst rund zehn Jahre später entdeckt. So induziert der aus den Experimenten zur Embryonalentwicklung bekannte *Toll*-Signaltransduktionsweg bei einer Pilzinfektion die rasche Steigerung der Transkriptionsrate des antifungalen Peptids *Drosomycin* [Lemaitre, 1996]. Wenig später wurde mit *18-wheeler* ein *Toll*-verwandtes Molekül entdeckt, das in sehr ähnlicher Weise die Immunabwehr von *Drosophila* im Fall einer bakteriellen Infektion vermittelt [Williams, 1997]. 1997 gelang es der Gruppe von Charles A. Janeway Jr. schließlich ein strukturell homologes Protein zu *Drosophilas Toll* aus dem humanen System zu klonieren. Die Ergebnisse der funktionellen Charakterisierung ließen auf eine Rolle im vertebralen Immunsystem schließen, da die konstitutive Expression des Proteins in einer humanen Monozytenzelllinie *in vitro* zur Produktion proinflammatorischer Zytokine führte [Medzhitov, 1997].

2.3.2 Rolle der *Toll-like*-Rezeptoren im Immunsystem

Wie im Kapitel 2.1.1 beschrieben, erfolgt die Pathogenerkennung im angeborenen Immunsystem der Vertebraten über eine Reihe Keimbahn-kodierter Rezeptoren (PRR), die jeweils für eine Vielzahl mikrobieller Pathogene spezifische, molekulare Muster (PAMP) erkennen. Im angeborenen Immunsystem der Säugetiere nehmen in diesem

Zusammenhang die TLR eine zentrale Rolle bei der Detektion mikrobiellen Materials ein. Es handelt sich hierbei um eine Familie von Transmembranproteinen, die über *nuclear factor-κB* (NF-κB)- und *IFN-regulatory factor* (IRF)-abhängige Signalwege eine Aktivierung der angeborenen Immunität induzieren. TLR erkennen unter anderem Lipide, Carbohydrate, Peptide und Nukleinsäurestrukturen, die von verschiedensten Mikroorganismen exprimiert werden. Einige TLR befinden sich an der Zelloberfläche (TLR1, 2, 4, 5 und 6), andere werden auf der Membran endozytotischer Vesikel exprimiert (TLR3, 7, 8 und 9) [Trinchieri, 2007]. Mittlerweile wurden insgesamt 13 strukturhomologe Membranproteine beschrieben [Chang, 2010]. In Bezug auf Funktionalität und Expressionsmuster bestehen jedoch Spezies-spezifische Unterschiede. Während sowohl im humanen als auch im murinen System TLR1 bis TLR9 exprimiert werden, war TLR10 bislang nur in humanen Zellen nachweisbar und TLR11 bis TLR13 werden wohl nur im murinen Organismus exprimiert [Chaturvedi, 2009].

Mittlerweile sind neben der TLR-Familie noch weitere PRR bekannt, die an der Erkennung und Aufnahme mikrobiellen Materials beteiligt sind und bei der Induktion angeborener Immunität mit TLR zusammenwirken können [Trinchieri 2007]. Zu diesen weiteren PRR zählen die membranständigen *C-type lectin-like* Moleküle, wie Mannose- oder β-Glycanrezeptoren [McGreal, 2005; Brown, 2006], sowie die *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD)-like-Rezeptoren (NLR) und die *retinoic-acid-inducible gene-1* (RIG-I)-like-Rezeptoren. Bei den letzten beiden Rezeptorfamilien handelt es sich um zytosolische Moleküle, die im Zytoplasma befindliches, mikrobielles Material erkennen [Creagh, 2006].

2.3.3 Liganden der *Toll-like*-Rezeptoren

1998 konnte gezeigt werden, dass TLR4 im murinen System entscheidend an der Detektion von Lipopolysaccharid (LPS), einem Bestandteil der äußeren Zellwand Gram-negativer Bakterien, beteiligt ist [Poltorak, 1998]. Mittlerweile sind auch für die meisten anderen bekannten TLR Liganden identifiziert worden (Übersicht in Tab. 2.1).

Neben diversen Strukturen mikrobiellen Ursprungs, den sogenannten exogenen Liganden, binden einige TLR auch endogenes Material, das vor allem von geschädigten Zellen freigesetzt wird, wie Hitzeschockproteine, Bestandteile intrazellulärer Matrix, Chromatin sowie fragmentierte Säuger-DNA und -RNA. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass TLR nicht nur PAMP sondern auch

sogenannte *stress/damage-associated molecular pattern* (DAMP) erkennen [Seong, 2004]. Somit spielen TLR wohl auch eine wichtige Rolle bei der Regulation inflammatorischer Prozesse sowie bei der Entstehung verschiedener Autoimmunerkrankungen [Marshak-Rothstein, 2006].

Tab. 2.1: Toll-like-Rezeptoren und ihre Liganden.

Toll-like-Rezeptor	Exogene Liganden	Herkunft	Endogene Liganden (sofern bekannt)
TLR1+TLR2	Triacyl-Lipopeptide	Bakterien	
TLR2	Lipopeptide; Lipoarabinomanan	Gram-pos. Bakterien; Mycobakterien	HSP60, HSP70, HSP96, HMGB1
TLR3	doppelsträngige RNA	Viren	doppelsträngige RNA
TLR4	LPS; Paclitaxel; <i>Fusion protein</i>	Gram-neg. Bakterien; Pflanzen; Viren	HSP22, HSP60, HSP70, HSP96, HMGB1
TLR5	Flagellin	Bakterien	
TLR6+TLR2	Diacyl-Lipopeptide; Zymosan	Bakterien; Hefen	
TLR7 (TLR8)	einzelsträngige RNA; Imidazoquinoline	Viren; synthetische Moleküle	einzelsträngige RNA
TLR9	unmethylierte CpG-Motive in DNA	Bakterien, Viren, synthetische Oligonukleotide	DNA
TLR10	unbekannt; (Korezeptor von TLR2?)		
TLR11	unbekannt; <i>Profilin-like</i> Protein	uropathogene <i>E. coli</i> ; <i>Toxoplasma gondii</i>	
TLR12	unbekannt		
TLR13	unbekannt	Vesikuläres Stomatitisvirus	

E. coli (*Escherichia coli*), HMGB-1 (*High mobility group box protein-1*), HSP (*Heat shock protein*), LPS (Lipopolysaccharid). Daten –mit Ausnahme der Daten zu TLR13– modifiziert aus Übersichtsartikel von Z. L. Chang [2010]. Daten zu TLR13 publiziert durch Shi et al. [2011]. Originalreferenzen sind unter anderem in Übersichtsartikeln von S. Akira und K. Takeda [2004] und Ishii et al. [2006] aufgeführt.

2.3.4 Molekulare Struktur der *Toll-like*-Rezeptoren

TLR der Säugetiere sind wie die Genprodukte der *Toll*-Familie bei *Drosophila melanogaster* Typ-I Transmembranproteine. Ihre extrazellulären Domänen enthalten stets zahlreiche Leucin-reiche Regionen (LRR) und zeigen eine molekulare Divergenz, passend zu den Anforderungen an die Detektion verschiedener Liganden. Die zytoplasmatischen Abschnitte hingegen sind hoch konserviert und stimmen in bemerkenswertem Ausmaß mit dem intrazellulären Teil des IL-1-Rezeptors (IL-1R) überein [Gay, 1991]. Aus diesem Grund werden die intrazellulären Domänen als „*Toll*/IL-1-Rezeptor homologe Regionen“ (TIR) bezeichnet. Solche TIR-Domänen sind bei allen Mitgliedern der TLR-Familie vorhanden, wo ihnen eine Schlüsselrolle bei der Signaltransduktion zukommt [Akira, 2001; Takeda, 2003].

2.3.5 Signaltransduktion durch *Toll-like*-Rezeptoren

Voraussetzung für die TLR-vermittelte Signaltransduktion ist die Dimerisierung zweier TLR-Moleküle, entweder als Heterodimere wie für TLR2 mit TLR1 beziehungsweise TLR6 bereits seit mehreren Jahren bekannt oder wie TLR3, TLR4, TLR5 und TLR9 als Homodimere [Ozinsky, 2000; O'Neill, 2007]. Vor allem Zusammenschlüsse unterschiedlicher Rezeptoren ermöglichen eine Erweiterung des detektierbaren PAMP-Repertoires [Ozinsky 2000]. Innerhalb der endosomal lokalisierten Subgruppe von TLR7, TLR8 und TLR9, deren Mitglieder alle einzelsträngige Oligonukleotide erkennen, führt die Bildung unterschiedlicher Dimere zu komplexen Interferenzen [Wang, 2006].

Zu Beginn der Signalkaskade nimmt das Genprodukt des *myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88) als Adaptorprotein an den bereits erwähnten zytoplasmatischen TIR-Domänen der TLR eine zentrale Rolle ein [Medzhitov, 1998]. MyD88 war bereits aus dem IL-1- und IL-18-*signalling* bekannt, wo es mit den zytoplasmatischen Domänen der jeweiligen Rezeptoren einen Komplex bildet und Serin-Threonin-Proteinkinasen aus der Familie der IL-1R-assozierten Kinasen (IRAK) rekrutiert [Muzio, 1997; Wesche, 1997; Adachi, 1998]. Hinweise auf die Schlüsselfunktion von MyD88 in der TLR-vermittelten Signaltransduktion ergaben sich aus diversen *knock-out*-Experimenten. So zeigten *MyD88*^{-/-} Mäuse erhebliche Defizite in der Reaktion auf mikrobielles Material, das normalerweise rasch über verschiedene Mitglieder der TLR-Familie detektiert wird, die daraufhin eine geeignete Immunantwort initiieren [Takeuchi, 2000a; Takeuchi, 2000b; Edelson, 2002].

Sowohl für *Drosophila Toll* als auch für IL-1R bei Säugern konnte relativ früh gezeigt werden, dass beide Rezeptormoleküle nach ihrer Aktivierung gesteigerte Transkriptionsraten diverser Gene über den NF- κ B-Signalweg induzieren [Belvin, 1996]. Das von Janeways Gruppe erstmals charakterisierte humane *Toll*-Homolog aktiviert ebenfalls diese Kaskade [Medzhitov 1997]. Mittlerweile weiß man jedoch, dass MyD88 diverse Signalwege induzieren und so weitere Transkriptionsfaktoren aktivieren kann, wie die JUN N-terminale Kinase (JNK), p38 oder verschiedene Mitglieder der IRF-Familie [O'Neill 2007]. Interessanterweise waren MyD88^{-/-} Mäuse, die bei LPS-Stimulation keine Zytokine produzieren und daher als „Endotoxin-resistent“ gelten, dennoch in der Lage, Interferon-abhängige Gene und die funktionelle Reifung von DC zu induzieren [Kawai, 1999; Kaisho, 2001; Kawai, 2001]. Somit können über TLR4 auch unabhängig von MyD88 Signale subzellulär vermittelt werden. Wie mittlerweile auch für TLR3 gezeigt, nutzt TLR4 ein weiteres Adaptormolekül, *TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β* (TRIF; auch mit TICAM1 bezeichnet), das über die Aktivierung von IRF3 die Expression von IFN- β induziert [Oshiumi, 2003; Yamamoto, 2003]. Mit *MyD88-adaptor-like-protein* (MAL; auch mit TIRAP bezeichnet) und *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM; auch mit TICAM2 bezeichnet) sind zwei weitere Adaptormoleküle bekannt, die über TIR-Domänen verfügen und an MyD88-unabhängigen Signaltransduktionswegen beteiligt sind [Fitzgerald, 2001; Horng, 2001; Fitzgerald, 2003]. Während MAL neben TLR4 auch an der TLR2-vermittelten Signaltransduktion beteiligt ist, spielt TRAM, das mit TRIF interagiert, ausschließlich bei der Signaltransduktion nach TLR4-Aktivierung eine Rolle [O'Neill 2007]. TLR3 ist der einzige TLR, dessen Signaltransduktion ausschließlich MyD88-unabhängig abläuft [Matsumoto, 2008].

Da sich die vorliegende Arbeit mit therapeutischen Einsatzmöglichkeiten immunstimulatorischer CpG-Oligodesoxynukleotide (CpG) beschäftigt, die über TLR9 erkannt werden, beschränkt sich die folgende Abbildung (Abb. 2.2) auf die Signaltransduktion der endosomal lokalisierten TLR-Subgruppe TLR7, TLR8 und TLR9.

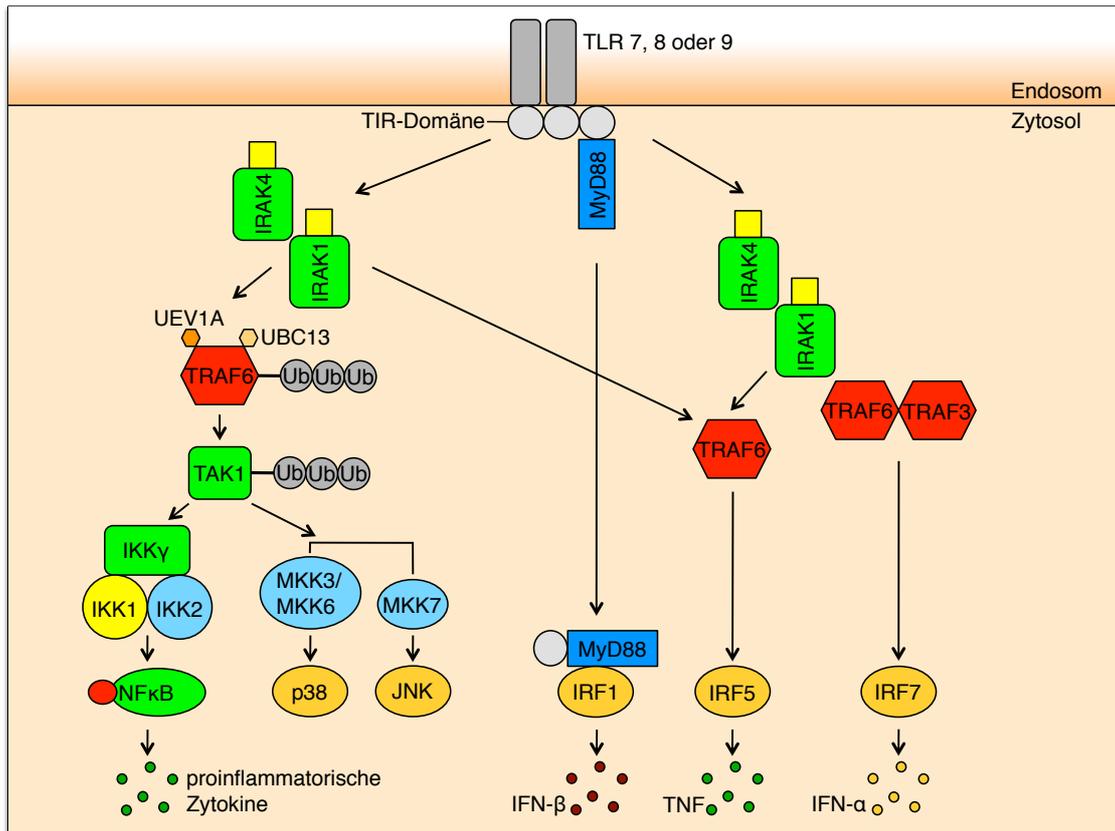


Abb. 2.2: MyD88-vermittelte Signaltransduktion der endosomalen TLR7-9.

MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) interagiert direkt mit den TIR (*Toll/IL-1R*-Domänen) der homodimerisierten TLR (*Toll-like*-Rezeptoren) und rekrutiert zunächst IRAK4 (IL-1R-assozierte Kinase 4) und unmittelbar daraufhin IRAK1. Die nächste molekulare Zielstruktur dieses Signalwegs ist TRAF6 (Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziierter Faktor 6). Die folgende Rekrutierung von TAK1 (*transforming growth factor β -aktivierende Kinase 1*) und der ubiquitinierenden Faktoren UEV1A (*Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1*) und UBC13 (*Ubiquitin-conjugating enzyme 13*) vermittelt aktivierende Modifikationen von TRAF6 und TAK1, wodurch einerseits der IKK (Inhibitor der κ B-Kinase)-Komplex und im Anschluss NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) sowie andererseits p38 und JNK (JUN N-terminale Kinase) über vorgeschaltete Kinasen aktiviert werden. MyD88-IRAK4-vermittelt werden zudem über TRAF6 und TRAF3 verschiedene Mitglieder der IRF (*IFN-regulatory factor*)-Familie aktiviert. Des Weiteren scheint die Bindung von MyD88 eine Voraussetzung für die Wanderung von IRF1 zum Nukleus [Chen, 2005; Kaisho, 2006; O'Neill 2007; Chang, 2010]. Abbildung adaptiert nach *The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling* [O'Neill 2007].

2.3.6 Expressionsmuster von TLR9

Bis vor einigen Jahren war die gängige Meinung, von humanen Leukozyten exprimierten TLR9 im Ruhezustand nur B-Lymphozyten und pDC [Iwasaki, 2004]. Neuere Arbeiten berichteten jedoch über TLR9-Expression auch in aktivierten Neutrophilen, in T-Lymphozyten und NK-Zellen, im Endothel des Lymphgefäßsystems von Haut und Respirationstrakt sowie in Keratinozyten [Hayashi, 2003; Li, 2004; Girart,

2007; Miller, 2007; Fitzner, 2008; Pegu, 2008]. Humane mDC exprimieren jedoch auch nach heutigem Kenntnisstand kein TLR9 [Schreibelt, 2010]. Das murine unterscheidet sich vom humanen System hinsichtlich des TLR9-Expressionsmusters in DC. So wird TLR9 in der Maus nicht nur in pDC sondern auch in mDC exprimiert [Mazzoni, 2004]. Diese Unterschiede erschweren die Extrapolation von Ergebnissen aus Mausversuchen für die therapeutische Anwendung von TLR9-Agonisten als Adjuvantien bei DC-Vakzinierungskonzepten im humanen System.

2.4 Antitumorale Immuntherapie

Unter dem Begriff Immuntherapie werden generell Konzepte verstanden, das Immunsystem, das gerade bei der Tumorbekämpfung ein vielversprechendes Instrument darstellt, zu therapeutischem Nutzen zu manipulieren [Steinman, 2004]. Aus Mausexperimenten ist bereits relativ lange bekannt, dass Tumore vom körpereigenen Immunsystem erkannt werden können, woraufhin immunologische Abstoßung induziert wird. C3H-He-Mäuse waren nach Fadenligatur subkutan induzierter syngener Sarkome bei erneuter Induktion derselben Zellen vor Tumorbildung geschützt [Foley, 1953]. Erhöhte Tumorinzidenzen bei immundefizienten und alternden Individuen weisen ebenfalls auf die wichtige Rolle des Immunsystems bei Entwicklung und Kontrolle von Tumorerkrankungen hin [Dighe, 1994; Euvrard, 2003].

Es gibt zahlreiche unterschiedliche Strategien, die Abwehr des Organismus gegen entartetes Gewebe zu verbessern. Mit mikrobiellem Material oder Zytokinen ist die Induktion einer unspezifischen Immunaktivierung möglich. Immunologische Effektoren, wie Antikörpermoleküle oder T-Zellen, fungieren als Antigen-spezifische, adoptive Immuntherapie. Vakzinierungen stellen schließlich eine Form Antigen-spezifischer, aktiver Immuntherapie dar. Da auf diese Weise prinzipiell sowohl therapeutische als auch protektive T-Zell-Immunität induzierbar ist, handelt es sich hierbei um einen sehr vielversprechenden Ansatz [Pardoll, 1998; Gilboa, 1999; Finn, 2003].

2.4.1 Vakzinierungskonzepte

Es wurden mittlerweile zahlreiche, unterschiedliche Konzepte therapeutischer Vakzinierungen entwickelt, bei denen unter anderem autologe oder allogene Tumorzellen, Peptide, Proteine oder DNA als Antigenquellen getestet wurden [Davis,

2003; Finn, 2003; Hsueh, 2003; Sondak, 2003; Antonia, 2004]. Allerdings beruht der Erfolg derartiger Ansätze stets auf der zufälligen Begegnung des applizierten, antigenen Materials mit DC im tumortragenden Organismus, worauf eine Aktivierung des adaptiven Immunsystems folgt. Kommt dieser Kontakt nicht zustande, bleibt die Entwicklung einer Immunantwort aus. Trifft das Antigen auf ungeeignete, zum Beispiel ruhende DC, kann, wie bereits beschrieben, immunologische Toleranz resultieren [Steinman 2003]. Daher kommt dem Konzept der Vakzinierung mit Antigen-beladenen, aktivierten DC eine zentrale Bedeutung zu [Banchereau 2005].

2.4.2 DC-Vakzinierung gegen Tumore

Prinzipiell sollen DC bei diesem Ansatz nach Beladung mit Tumor-assoziierten Antigenen aufgrund ihrer Eigenschaften als APC die Induktion einer spezifisch gegen das Tumorgewebe gerichteten T-Zell-Antwort *in vivo* garantieren.

Eine wichtige Voraussetzung für die Realisierung auf DC-Vakzinierungen basierender, klinischer Studien bildete die Definition der Methodik zur Generierung autologer DC *ex vivo* in großer Zahl [Caux, 1992; Romani, 1994; Sallusto, 1994]. Von grundlegender Bedeutung für das Design klinischer Studien waren zudem die Ergebnisse diverser, relevanter Arbeiten zum Thema aus dem murinen System. Hier war unter anderem gezeigt worden, dass *ex vivo* generierte, Antigen-beladene, reife DC *in vivo* zur Induktion Antigen-spezifischer T-Zell-Immunität mit T-Effektor- und T-Gedächtniszellen fähig sind, wobei bei entsprechender Antigen-Beladung Tumor-spezifische Immunität resultierte [Inaba, 1990; Celluzzi, 1996; Zitvogel, 1996]. Vakzinierung mit unreifen DC induzierte hingegen immunologische Toleranz, die nach allogener Transplantation zu einer Verminderung der Abstoßungsreaktion führte [Fu, 1996].

Die folgende Abbildung (Abb. 2.3) zeigt Generierung und Applikationsmodus der in den meisten klinischen Studien gängigen, antitumoralen DC-Vakzinen.

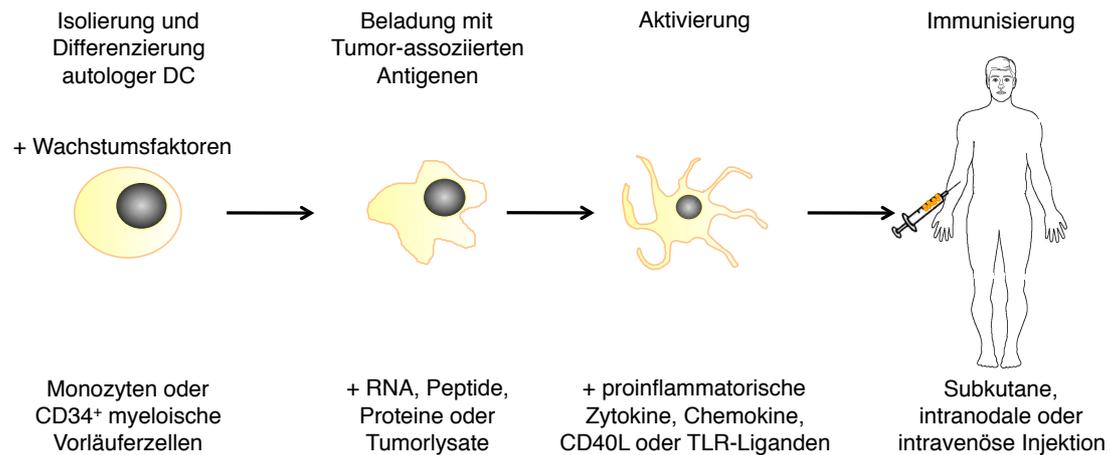


Abb. 2.3: Generierung einer antitumoralen Vakzine mit *ex vivo* beladenen DC.

DC werden *ex vivo* aus autologen Monozyten oder CD34⁺ myeloischen Vorläuferzellen nach deren Inkubation mit verschiedenen Wachstumsfaktoren gewonnen. Die zunächst noch unreifen DC werden mit Tumorantigenen beladen, mit Hilfe geeigneter Stimuli zur Reifung angeregt und aktiviert und schließlich als Vakzine injiziert.

Untersuchungen zur Verträglichkeit aus bislang durchgeführten, klinischen Studien zeigten außer lokalen Reaktionen an der Injektionsstelle und leichtem Fieber keine höhergradigen Nebenwirkungen [Tacken, 2007].

Nach initial großem Optimismus in Bezug auf das antitumorale Potential von DC-Vakzinen, kann ihr tatsächlicher Stellenwert für den klinischen Einsatz aktuell immer noch nicht definitiv bewertet werden [Zhong, 2007]. Limitierend für einen durchschlagenden, therapeutischen Erfolg antitumoraler DC-Vakzinierungen sind unter anderem die zum Zeitpunkt ihrer klinischen Anwendung meist große Tumorlast und das immunsuppressive Mikromilieu in Tumoren und ihrer Umgebung [Gilboa, 2007]. Daher wird weiterhin intensiv an der Optimierung von DC-Vakzinierungsprotokollen gearbeitet. Um die verschiedenen Konzepte besser vergleichen zu können, ist eine Liste sämtlicher bislang durchgeführter, klinischer Studien mit antitumoralen DC-Vakzinen online abrufbar [<http://www.mmri.mater.org.au/>].

Im April 2010 wurde von der *U. S. Food and Drug Administration* (FDA) mit Sipuleucel-T (PROVENGE[®]) erstmals eine DC-basierte Vakzinierungstherapie zur Tumorbehandlung zugelassen. Es handelt sich hierbei um eine Vakzine aus autologen, mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC), die mittels Leukapherese gewonnen und *ex vivo* mit dem rekombinanten Fusionsprotein PA2024 inkubiert werden. PA2024 besteht aus Prostata-spezifischer saurer Phosphatase (PAP) und GM-CSF. Während der Inkubationsphase nehmen die im Leukapherisat enthaltenen

APC PA2024 auf und präsentieren nach erfolgreicher Prozessierung Teile des Proteins auf ihrer Zelloberfläche. Nach Reinfusion waren bei einem Großteil der behandelten Patienten signifikant höhere Antikörpertiter gegen PA2024 und PAP als vor der Behandlung sowie die Proliferation PA2024- und PAP-spezifischer T-Zellen nachweisbar [Kantoff, 2010]. Sipuleucel-T wurde zur Behandlung des kastrationsrefraktären, metastasierten Prostatakarzinoms bei nicht oder wenig symptomatischen Patienten zugelassen, nachdem eine doppelblinde, Plazebo-kontrollierte, multizentrische Phase-III Studie in dieser Gruppe eine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens gezeigt hatte [Kantoff 2010].

Eine weitere, vielversprechende Methode, effektive, antitumorale Immunität zu induzieren, bietet der therapeutische Einsatz von Cytidin-Guanosin-(CG)-Dinukleotid-haltigen Oligodesoxynukleotiden (CpG). Die potent immunmodulatorisch wirksamen Moleküle sollen im folgenden Kapitel genauer charakterisiert werden.

2.4.3 CpG-Oligodesoxynukleotide

2.4.3.1 Antitumorale Wirkung bakterieller Lysate

1893 publizierte der New Yorker Chirurg William B. Coley die antitumorale Wirkung einer Therapie mit *Streptococcus pyogenes* bei Patienten mit inoperablen Sarkomen. Er injizierte zunächst Kulturen lebender Bakterien direkt ins Tumorgewebe und induzierte auf diese Weise ein peritumorales Erysipel [Coley, 1893]. Im Verlauf entwickelte Coley sein Protokoll weiter und untersuchte die Wirkung einer Mischung Hitze-inaktivierter Bakterien aus *Streptococcus pyogenes* und *Serratia marcescens*. Die antitumorale Effektivität dieser Präparation, die heute als „Coley`s Toxin“ bezeichnet wird, war mit der lebender Streptokokken vergleichbar. Trotz vielversprechender Ergebnisse wurde Coley`s Methode von vielen zeitgenössischen Kollegen angezweifelt und nicht zuletzt auch durch die Entwicklung von Chemo- und Strahlentherapie mehr und mehr in den Hintergrund gedrängt [Starnes, 1992; McCarthy, 2006]. Nachdem Erkenntnisse der modernen Immunologie aus jüngerer Zeit die Richtigkeit seiner Theorie bestätigt haben, gilt W. B. Coley heute allgemein als Begründer der modernen, antitumoralen Immuntherapie.

Mittlerweile wurden auch andere Mikroorganismen im Hinblick auf ihre Fähigkeiten zur Induktion klinischen Tumoransprechens untersucht. So hat sich die 1976 von Morales eingeführte, intravesikale Instillation von *Bacille Calmette-Guérin* (BCG) in der Therapie

oberflächlicher Stadien des Urothelkarzinoms der Harnblase etabliert, da durch dieses Verfahren die intrinsisch hohe Rezidivrate der Blasenkarzinome deutlich gesenkt werden konnte [Morales, 1976].

2.4.3.2 Entdeckung der immunstimulatorischen Wirkung mikrobieller DNA

Tokunaga und Yamamoto analysierten in den 1980-er Jahren die BCG-Präparationen, die zur Therapie des superfiziellen Harnblasenkarzinoms erfolgreich klinisch eingesetzt wurden. Zunächst identifizierten sie die BCG-DNA als antitumoral wirksamen Bestandteil der Präparation und konnten in Folgeexperimenten deren immunstimulatorische Wirkung nachweisen [Tokunaga, 1984; Tokunaga, 1988; Tokunaga, 1992]. In weiterführenden Arbeiten definierten die beiden Wissenschaftler relevante Charakteristika immunstimulatorisch aktiver, bakterieller DNA [Yamamoto, 1992a; Yamamoto, 1992b]. A. M. Krieg zeigte schließlich die essenzielle Bedeutung eines zentralen Cytidin-Guanosin (CG)-Motivs mit unmethyliertem Cytidinrest für die immunstimulatorische Aktivität eines DNA-Oligonukleotids und charakterisierte den optimal stimulatorisch wirksamen Basenkontext [Krieg, 1995]. CpG-Dinukleotide kommen im Genom von Vertebraten insgesamt deutlich seltener vor als im bakteriellen Genom und sind fast immer methyliert, wohingegen diese epigenetische Modifikation bei Mikroben kaum auftritt [Bird, 1987]. Die eben beschriebenen Beobachtungen ließen darauf schließen, dass sich im Immunsystem von Vertebraten im Laufe der Evolution die Fähigkeit zur Erkennung unmethylierter CG-Dinukleotid-Motive in DNA-Fragmenten als Gefahrensignal ausgebildet hatte [Krieg 1995; Krieg, 2001a]. Als Rezeptor für CpG konnte schließlich TLR9 identifiziert werden [Hemmi, 2000].

2.4.3.3 CpG als Adjuvans bei Vakzinierungen

CpG zeigte bereits in diversen Mausmodellen herausragende Effektivität bei der Induktion von T_H1 -Immunität [Chu, 1997; Lipford, 1997; Roman, 1997]. Selbst bei gemeinsamer Applikation mit Adjuvantien wie Alum oder *incomplete Freund's adjuvant* (IFA), die ihrerseits eher T_H2 -Immunantworten fördern, oder bei Vakzinierung sehr junger oder älterer Mäuse bleibt die Tendenz zur Induktion von T_H1 -betonter Immunität bestehen [Brazolot Millan, 1998; Davis, 1998; Weeratna, 2000; Alignani, 2005; Sugai,

2005]. Eine Optimierung der Adjuvanswirkung auch bei schwach immunogenen Antigenen lässt sich bei gemeinsamer Applikation von CpG mit anderen Adjuvantien oder durch Präparation der immunstimulatorischen Oligodinukleotide in Lipid-haltigen Emulsionen oder sogenannten Mikro- oder Nanopartikeln erzielen [Krieg, 2001b]. CpG entfaltet seine Adjuvanswirkung auch bei inhalativer, konjunktivaler, vaginaler, rektaler und sogar transkutaner Applikation der experimentellen Vakzinen [McCluskie, 2000; Gallichan, 2001; Berry, 2004; Kwant, 2004; Nesburn, 2005].

Vor einigen Jahren wurde CpG (unter anderem CPG 7909) erstmals in randomisierten, klinischen Phase-I Studien als Adjuvans bei der Hepatitis B-Vakzinierung mit rekombinantem *hepatitis B surface antigen* (HBsAg) untersucht. Sowohl in Kombination mit dem üblicherweise als Adjuvans gebräuchlichen Alum als auch allein entwickelten die Probanden, denen CpG injiziert worden war, früher protektive Level an spezifischen Anti-HBs-Antikörpern und erreichten insgesamt höhere Titer als mit der herkömmlichen Vakzine [Halperin, 2003; Cooper, 2004]. Eine ähnlich gesteigerte Effektivität erbrachte auch der Zusatz von CpG zu einer bereits zugelassenen Vakzine gegen *Bacillus anthracis* [Rynkiewicz, 2005]. Diese Ergebnisse machen CpG als Adjuvans besonders für den Einsatz bei immunsupprimierten Patienten interessant, die bei Vakzinierungen häufig keine suffiziente, immunologische Reaktion ausbilden. Tatsächlich konnte durch Zugabe von CpG (CPG 7909) zur kommerziell erhältlichen HBV-Vakzine *Engerix B*[®] bei HIV-infizierten HBV-Impfversagern eine signifikante Erhöhung ihrer Anti-HBs-Antikörpertiter und die Induktion spezifischer T-Zell-Immunität beobachtet werden, die über mehr als ein Jahr anhielt [Cooper, 2005].

2.4.3.4 Antitumorale Therapieansätze

Antitumorale Aktivität von CpG war bereits vor mehreren Jahren in diversen Mausmodellen gezeigt worden [Krieg, 2004 (Review)]. Bei kleineren Tumoren kann CpG als Monotherapie bereits ausreichen, um eine T-Zell-vermittelte Abstoßung etablierter Tumore zu induzieren. Bei größerer Tumorlast bedarf es für einen kurativen Ansatz häufig der Kombination mit einem etablierten Therapieansatz, wie konventioneller Chemotherapie, monoklonaler Antikörper, Strahlentherapie oder Chirurgie. Ergebnisse aus ersten klinischen Studien zeigten sowohl bei Lymphomen als auch bei soliden Tumoren durch gezielte TLR9-Aktivierung Potential für die Aktivierung von NK-Zellen und DC *in vivo*. Aktivierte DC schaffen ein T_H1-artiges Zytokin- und Chemokinmilieu und können unter anderem durch Hochregulation der

Expression kostimulatorischer Moleküle Tumor-induzierte T-Zell-Toleranz in effektive, zytotoxische T-Zell-Immunität wandeln [Hartmann, 2003; Friedberg, 2005; Link, 2006].

Auch die initial als kontraproduktiv angesehene Kombination von CpG und Chemotherapie hat sich bereits in mehreren experimentellen Modellen als sehr effizient erwiesen (vgl. Kapitel 6.4.3). 2005 wurden die vielversprechenden Daten der ersten randomisierten Phase-II Studie zur Kombination von subkutan appliziertem CpG 7909 (PF-3512676) mit einer Taxan/Platin-haltigen *first-line* Chemotherapie bei Patienten mit neu diagnostiziertem, irresektablen Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC; Stadium IIIb/IV nach AJCC) veröffentlicht. Überraschenderweise konnten die signifikant höhere Ansprechrate sowie der Trend zu einer Verlängerung des Gesamtüberlebens in der Kombinationsgruppe aus der Phase-II Studie [Manegold, 2008] in der nachfolgenden Phase-III Studie nicht reproduziert werden. Hier führte die Kombination derselben Chemotherapie mit PF 3512676 bei höherer Toxizität weder zu einer Verlängerung des progressionsfreien noch des Gesamtüberlebens verglichen mit der Standardtherapie, so dass die Studie vorzeitig beendet wurde [Hirsh, 2008]. Trotz dieses unerwarteten Rückschlags gibt es derzeit eine Vielzahl weiterer laufender klinischer Phase-I/II Studien, die Kombinationen von CpG mit konventionellen Tumortherapien bei verschiedenen soliden Tumoren und Hämoblastosen untersuchen. Genauere Informationen zu den einzelnen klinischen Prüfungen sind online abrufbar [<http://www.clinicaltrials.gov/>].

2.5 Therapie des kolorektalen Karzinoms

Kolorektale Karzinome (CRC) gehören in den westlichen Industrienationen zu den häufigsten Tumoren und zu den häufigsten tumorbedingten Todesursachen. Global variiert die Inzidenz ungefähr um den Faktor zehn, wobei die meisten Neuerkrankungen in Nordamerika, Westeuropa, Australien und Japan zu verzeichnen sind [Parkin, 1999]. Neben individueller, genetisch bedingter Suszeptibilität sind diese Unterschiede wohl vor allem durch verschiedene Ernährungsgewohnheiten bedingt. CRC treten zu ungefähr 90 % nach dem 50. Lebensjahr auf und betreffen beide Geschlechter ungefähr gleich häufig [Parkin, 2005; Center, 2009].

70 bis 80 % der CRC werden in lokalisierten Stadien diagnostiziert und in kurativer Intention chirurgisch reseziert. Bei lokal fortgeschrittenen Stadien folgt der Tumorsektion eine adjuvante Systemtherapie. Trotz kurativer Initialbehandlung

entwickeln im Verlauf bis zu 50 % aller CRC-Patienten eine disseminierte Tumorerkrankung, die erneut systemischer Behandlung bedarf [Saunders, 2006]. Während der letzten Dekade ermöglichte die Verfügbarkeit neuer Substanzen eine signifikante Verlängerung des medianen Gesamtüberlebens dieser Patientengruppe durch systemische Therapie im Vergleich zu *best supportive care*.

Aktuell stehen zur zytostatischen Therapie fortgeschrittener kolorektaler Karzinome das Fluoropyrimidin 5-Fluorouracil (5-FU), seine oral applizierbaren *prodrugs* Capecitabine (Xeloda®) und UFT (Tegafur/Uracil), der Topoisomerase I-Inhibitor Irinotecan und das Alkylans Oxaliplatin zur Verfügung. Zudem kommen mit Bevacizumab und Cetuximab beziehungsweise Panitumumab monoklonale Antikörper gegen *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und gegen *epithelial growth factor receptor* (EGFR) zum Einsatz.

2.5.1 Chemotherapie beim metastasierten CRC

Bislang konnte kein allgemeingültiger Goldstandard definiert werden, wie die wirksamen Zytostatika kombiniert beziehungsweise sequenziell angewendet werden sollten, um optimale Therapieerfolge zu erzielen. Eine Analyse der Ergebnisse mehrerer aktueller Phase III-Studien zeigte jedoch eine deutliche Korrelation des medianen Gesamtüberlebens mit dem Prozentsatz an Patienten, die im Krankheitsverlauf alle drei zytostatisch aktiven Substanzen erhalten hatten [Grothey, 2004; Goldberg, 2007]. Eine Kombination aus zwei der drei aktiven Zytostatika in der *first-line* Therapie erhöhte die Wahrscheinlichkeit, dass im Verlauf alle drei Substanzen appliziert wurden, war aber an sich keine Voraussetzung für ein verlängertes medianes Gesamtüberleben [Grothey, 2005]. Patienten, die entweder *first-line* FOLFIRI und *second-line* FOLFOX oder beide Schemata in umgekehrter Reihenfolge erhalten hatten, erzielten in einer Studie mit einem medianen Überleben von 21 Monaten eines der besten Ergebnisse vor Integration der monoklonalen Antikörper in die Therapieprotokolle [Tournigand, 2004]. So gilt die Applikation eines der etablierten Doublet-Schemata (FOLFIRI beziehungsweise FOLFOX oder XELOX) –mittlerweile wenn möglich in Kombination mit einem monoklonalen Antikörper– aktuell als Goldstandard in der *first-line* Behandlung des metastasierten CRC [Schmiegel, 2008].

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit 5-FU und Irinotecan zur zytostatischen Behandlung muriner C26-Tumore eingesetzt wurden, werden nur diese beiden Substanzen näher vorgestellt.

2.5.1.1 5-Fluorouracil

Die tumorinhibitorische Aktivität von 5-FU wurde vor gut 50 Jahren erstmals beschrieben [Heidelberger, 1957]. Bei dem Pyrimidinanalogon handelt es sich um eine der ersten „gerichtet“ wirkenden Substanzen in der Onkologie, da Uracil von malignen Zellen im Rahmen der DNA-Synthese öfter verwendet wird als von normalem Gewebe [Rutman, 1954]. Das Enzym Thymidilatsynthetase (TS) katalysiert physiologischerweise die Umwandlung von Desoxyuridinmonophosphat (dUMP) zu Desoxythymidinmonophosphat (dTMP) durch Übertragung einer Methylgruppe von 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat. Nach der intrazellulären Umwandlung aus 5-FU führt das zytotoxisch aktive Fluorodesoxyuridinmonophosphat (FdUMP) zur Ausbildung eines äußerst stabilen, inhibitorischen Komplexes zwischen 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat und der TS [Santi, 1987]. Da so kein dTMP mehr gebildet werden kann, kommen DNA-Synthese und -Reparatur schließlich zum Erliegen. 5-FU ist ein Zellzyklus-spezifisches Zytostatikum, für dessen Wirkung Zellen während der S-Phase besonders suszeptibel sind. Fluorouridintriphosphat (FUTP) wird zudem exzessiv in ribosomale RNA und *messenger*-RNA eingebaut. So interferiert 5-FU auch mit physiologischer RNA-Prozessierung und zellulären Funktionen während der G1-Phase [Kufe, 1981; Glazer, 1982].

Das Ausmaß der TS-Inhibition durch FdUMP hängt von der intrazellulären Menge des Kofaktors 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat ab. Gleichzeitige Applikation von Leucovorin (Folinsäure, 5-Formyl-Tetrahydrofolat, LV) zur Erweiterung des intrazellulären 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat-Pools, optimiert Ausmaß und Dauer der 5-FU-vermittelten TS-Inhibition [Grem, 1997].

2.5.1.2 Irinotecan

Bei diesem Zytostatikum handelt es sich um ein wasserlösliches, semisynthetisch hergestelltes Derivat von Camptothecin aus *Camptotheca acuminata*, einer vor allem in China und Tibet vorkommenden Pflanze [Kunimoto, 1987]. Das selbst nur gering antiproliferativ wirksame Irinotecan wird *in vivo* durch Abspaltung einer Seitenkette über systemisch vorkommende Carboxylasen in den deutlich potenteren Metaboliten SN-38 umgewandelt, der den Großteil der zytostatischen Wirkung vermittelt [Kawato, 1991]. Molekularer Angriffspunkt der zytostatischen Wirkung ist die Topoisomerase I, die von SN-38 äußerst potent inhibiert wird [Liu, 2000]. Topoisomerase I entfernt

Superhelixwindungen, sogenannte *supercoils*, aus dem DNA-Molekül, die bei der für die Replikation notwendigen Entwindung der Doppelhelix auftreten. Zu diesem Zweck werden transiente Einzelstrangbrüche induziert und die Bruchenden nach Entfernung der Superhelixwindung wieder miteinander verknüpft. Irinotecan beziehungsweise SN-38 stabilisiert die Phase der Reaktion, während der die Topoisomerase I nach Induktion des Bruchs das 5'-Ende des DNA-Einzelstrangs gebunden hat und verhindert so die enzymatisch vermittelte Religation der beiden Bruchenden. Ein Zusammentreffen der Replikationsgabel mit einem derartig stabilisierten DNA-Topoisomerase I-Komplex hat einen irreparablen Doppelstrangbruch zur Folge, der nach Aktivierung der Apoptosekaskade zum Zelltod führt [Carboni, 1994; Wang, 1994]. Somit ist die zytotoxische Wirkung von Irinotecan ebenfalls während der S-Phase des Zellzyklus am effektivsten, wobei auch im Rahmen der Transkription langlebige DNA-Topoisomerase I-Komplexe beobachtet werden, die durch Behinderung der Proteinexpression den zellulären Stoffwechsel entscheidend stören können [Liu 2000].

2.6 Vorarbeiten aus der eigenen Abteilung

In mehreren Vorarbeiten aus unserer Abteilung war es gelungen, ein im murinen C26-Modell sehr gut antitumoral wirksames Immuntherapieprotokoll zu etablieren. Durch prophylaktische Vakzinierungen mit syngenen DC, die *in vitro* 48 h mit inaktivierten Tumorzellen kokubiert worden waren, konnte eine spezifische, antitumorale Immunantwort induziert werden. Behandelte Mäuse zeigten bei nachfolgender Injektion vitaler C26-Zellen eine signifikante Verlangsamung des Tumorwachstums und waren teilweise sogar in der Lage die Etablierung der Tumorzellen *in vivo* zu verhindern. Die Zugabe von CpG in der zweiten Hälfte der Kokubationsphase von DC und C26-Zellen steigerte die antitumorale Wirksamkeit der Präparation, so dass auf diese Weise spezifisch gepulste und aktivierte DC bei kleinen, etablierten Tumoren auch therapeutisch wirksam waren [Brunner, 2000].

Weiter gelang es zu zeigen, dass auch *in vivo* appliziertes CpG in murinen Tumormodellen spezifische, antitumorale Immunantworten induzieren kann, wobei der Ort der Injektion für die Ausprägung dieses Effekts relevant war. Während CpG-Injektionen in die unmittelbare Umgebung etablierter Tumore (peritumorales CpG) eine potente Immunstimulation induzierten, war die therapeutische Wirksamkeit bei tumorferner Applikation signifikant geringer. Mit peritumoralem CpG behandelte Tiere

entwickelten auch eine spezifische, CD8⁺ T-Zell-vermittelte Gedächtnisantwort, die sie bei nachfolgenden Injektionen mit denselben Tumorzellen langfristig schützte [Heckelsmiller, 2002a].

Wurden *in vitro* mit Tumorzellen gepulste und mit CpG-aktivierte DC gemeinsam mit einem CpG-Bolus injiziert, konnte endlich auch das Wachstum großer, etablierter Tumore signifikant verlangsamt oder vorübergehend sogar komplett zum Stillstand gebracht werden. Durch die Kombination dieses erweiterten DC-Protokolls mit dem oben beschriebenen, peritumoralen CpG-Bolus waren bei großen, etablierten Tumoren schließlich langfristig anhaltende, rezidivfreie Remissionen möglich [Heckelsmiller 2002a].

3 FRAGESTELLUNG

Wachsende Erkenntnisse über das antitumorale Potential des Immunsystems verstärken während der letzten Jahre das wissenschaftliche Interesse an immuntherapeutischen Strategien zur Tumorbekämpfung. Da eine Prüfung innovativer Behandlungskonzepte im Rahmen klinischer Studien zunächst nur in Kombination mit der Standardtherapie möglich ist, befürchteten Kritiker immunsuppressive Effekte etablierter Zytostatika als limitierend für eine erfolgreiche Kombination beider Therapiemodalitäten. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass Chemotherapie auch immunmodulatorisch wirken kann, was das Potential synergistischer Wirkverstärkung durch geeignete Kombination beider Therapiekonzepte untermauert. Vielversprechend erscheint vor allem eine Anwendung in adjuvanten Behandlungssituationen, in der das Immunsystem durch die Tumorerkrankung nicht nennenswert supprimiert ist. Da kolorektale Karzinome mittlerweile zum Großteil in lokalisierten oder lokal fortgeschrittenen und somit prinzipiell kurativen Stadien diagnostiziert werden, ist gerade bei dieser Tumorentität eine Optimierung adjuvanter Behandlungskonzepte zur Beherrschung bestehender Mikrometastasen von großer Bedeutung.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Effekte bei Kombination einer Immuntherapie aus *in vitro* Antigen-gepulsten, CpG-aktivierten DC und peritumoral appliziertem CpG-Bolus mit Chemotherapie in einem syngenem murinen Kolonkarzinommodell (C26). Die antitumorale Wirksamkeit der eingesetzten Immuntherapie im C26-Modell war in Vorarbeiten aus unserer Abteilung gezeigt worden (vgl. Kapitel 2.6).

Als zytostatische Therapiekomponente wurden mit Irinotecan und 5-FU in Kombination mit Leucovorin (LV) zwei Substanzen ausgewählt, die etablierte Bestandteile aktueller Therapieschemata fortgeschrittener kolorektaler Tumore sind und auch im murinen C26-Modell antitumorale Wirksamkeit zeigen.

Der letzte Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung einer bemerkenswerten Beobachtung, die im Rahmen der Tumorexperimente aufgefallen war. CpG entfaltet 5-FU-assoziiertes Toxizität gegenüber protektive Effekte. Ein derartiger Aspekt der CpG-Wirkung war bislang nicht bekannt.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Reagenzien, Chemikalien und Geräte

4.1.1 Geräte

Begasungsbrutschrank (BD 6220)	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Digitalkamera Mikroskop (AxioCam MRm)	Fa. Zeiss (Jena, D)
Dynal MPC-1 [®]	Fa. Dynal Biotech (Oslo, N)
Eismaschine	Fa. Ziegra (Isernhagen, D)
ELISA-Reader (MRX)	Fa. Dynatech-Laboratories (Guernsey, GB)
FACSCalibur [®]	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Gefrierschrank (-20 °C)	Fa. Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe, D)
Gefrierschrank (-80 °C)	Fa. Thermo Scientific (Waltham, USA)
Mikroskop (Axiovert 25)	Fa. Zeiss (Jena, D)
Kühlschrank (4 °C)	Fa. Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe, D)
Multifuge 3L-R	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Multifuge 4KR	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Neubauer Zählkammer	Fa. Optik Labor Frischknecht (Balgach, D)
Photometer	Fa. Pharmingen Gene Quant
ph-Meter	Fa. WTW (Weilheim, D)
Magnet-Rührer (IKA-Combimag-RCO)	Fa. Janke & Kunkel (Staufen, D)
Magnet-Rührer (IKAmag [®] RH)	Fa. Janke & Kunkel (Staufen, D)
Schüttler (Vibrax)	Fa. Serono Diagnostics (Freiburg, D)
Schüttler (IKA-Vibrax VXR electronic Vx7)	Fa. Janke & Kunkel (Staufen, D)
Sterilbank (Lamin Air [®] HB 2448)	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Sterilbank (Microflow)	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Schwenktisch (Rocky [®])	Fa. Fröbel Labortechnik (Lindau, D)
Sysmex Analyzer	Fa. Sysmex (Norderstedt, D)
Vortex Genie 2 [®]	Fa. Bender & Hobein (Zürich, CH)
Vortex VF2	Fa. Janke & Kunkel (Staufen, D)
Waage (LP 6209)	Fa. Sartorius (Göttingen, D)
Waage (SBC 21)	Fa. Scaltec Instruments (Göttingen, D)
Wasserbad	Fa. GFL (Burgwedel, D)
Wasser-Deionisierungsmaschine	Fa. SG Reinstwasser-Sys. (Hamburg, D)
Zentrifuge (5417 R)	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)

4.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Aqua ad injectabilia	Fa. Braun Melsungen AG (Melsungen, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Serva (Heidelberg, D)
Eosin-Lösung, alkoholisch	Fa. Merck (Darmstadt, D)
Ethanol pro analysi	Fa. Merck (Darmstadt, D)
Ethylen-Diamin-Tetraacetat (Titriplex III [®])	Fa. Merck (Darmstadt, D)
FACSFlow [®]	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
FACSSafe [®]	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Formalin-Lösung (4 Vol%)	Fa. Merck (Darmstadt, D)
Giemsa-Lösung	Fa. Merck (Darmstadt, D)
Heparin-Natrium Braun 25000 I.E./5ml	Fa. Braun Melsungen (Melsungen, D)
Isofluran (Forene [®])	Fa. Abbott (Wiesbaden, D)
Isopropanol (70 Vol%)	Apotheke Innenstadt Universität München

Lyse-Puffer (BD PharmLyse®; 10x)	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Hämatoxylin-Lösung	Fa. Merck (Darmstadt, D)
May-Grünwald-Lösung	Fa. Merck (Darmstadt, D)
Natriumazid (NaN ₃)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Natriumchlorid (NaCl 0,9 Vol%)	Fa. Baxter S. A. (Lessines, B)
Natriumhydroxid (NaOH)	Fa. Merck (Darmstadt, D)
Natriumnitrit (NaNO ₂)	Fa. Merck (Darmstadt, D)
Puffer-Aqua	Fa. Merck (Darmstadt, D)
Paraformaldehyd (PFA)	Fa. Fluka Chemie (Buchs, CH)
Salzsäuren (1- und 3-molare)	Apotheke Innenstadt Universität München
Schwefelsäure (2N H ₂ SO ₄)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
TMB Substrate Reagent Set	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Trypan-Blau	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Trypsin (10x)	Fa. PAA Laboratories (Pasching, A)
Tween 20	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
<u>Fixationspuffer für FACS-Proben</u>	<u>ELISA Waschpuffer</u>
2 % PFA	0,05 % Tween 20
in PBS	in PBS
<u>ELISA Coating-Puffer 1</u>	<u>ELISA Coating-Puffer 2</u>
0,2 M Natriumphosphat	0,1 M Natriumcarbonat
in Wasser	in Wasser
pH 7,0	pH 9,5
<u>ELISA Probenverdünnungslösung</u>	<u>Erythrozyten-Lysepuffer</u>
10 % FCS	BD PharmLyse® (10x) 1:10
in PBS	in PBS
pH 7,0	

4.1.3 Reagenziensätze zur Bestimmung von Zytokinen mittels ELISA (Sets)

Murine IL-6	Fa. Biosource (Camarillo, USA)
Murine IL-12p70	Fa. BD Biosciences (San Diego, USA)

4.1.4 Materialien, Lösungen und Medien für die Zellkultur

Als fertige Lösungen wurden verwendet:

<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (DMEM) high glucose	Fa. PAA Laboratories (Pasching, A)
Fetales Kälberserum* (FCS)	Fa. Gibco, Invitrogen (Paisley, UK)
<i>Hank's balanced salt solution</i> (HBSS)	Fa. Gibco, Invitrogen (Paisley, UK)
<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS; 1x)	Fa. PAA Laboratories (Pasching, A)
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI) 1640 Medium ohne Glutamin	Fa. PAA Laboratories (Pasching, A)

*FCS wurde vor Gebrauch 30 Minuten im Wasserbad bei 56 °C inaktiviert

Als Zusätze wurden verwendet:

L-Glutamin 200 mM	Fa. PAA Laboratories (Pasching, A)
Penicillin (100x)	Fa. PAA Laboratories (Pasching, A)
Streptomycin (100x)	Fa. PAA Laboratories (Pasching, A)

C26-Medium

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

DC-Medium

10% FCS
2 mM L-Glutamin
100 IU/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
in RPMI 1640

Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Barloworld Scientific (Stone, UK), Becton Dickinson (Heidelberg, D), Corning (Corning, USA), Eppendorf (Hamburg, D), Falcon (Heidelberg, D), Gilson (Den Haag, N), Greiner (Frickenhausen, D), Henke-Sass Wolf (Tuttlingen, D), ICN Biomedicals (Irvine, USA) und Sarstedt (Nümbrecht, D) bezogen.

4.1.5 Wachstumsfaktor, Zytokin und Oligodesoxynukleotid

Granulozyten-Makrophagen-
koloniestimulierender Faktor (GM-CSF)
Interleukin-4 (IL-4)
Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid
1826 (CpG 1826)

5´-TCCATGACCGTTTCCTGACCGTT-3´

Fa. Pepro Tech (Rocky Hill, USA)
Fa. Pepro Tech (Rocky Hill, USA)

Fa. Coley Pharmaceutical Group
(Langenfeld, D)

Das verwendete Oligodesoxynukleotid (ODN) CpG 1826 war komplett mit Phosphorothioaten modifiziert und endotoxinfrei, beziehungsweise eine mögliche Endotoxinkontamination lag im *Limulus amoebocytes lysate* (LAL)-Test stets unter der Detektionsgrenze (<0,03 EU/ml; LAL-Test, Fa. BioWhittaker, Walkersville, MD, USA). CpG 1826 wurde für sämtliche Experimente freundlicherweise von der Firma Coley Pharmaceutical Group (Langenfeld, D) bereitgestellt.

Zur Herstellung einer Stammlösung (15-20 mg/ml) wurde CpG 1826 in TE-Puffer (Tris-Hydrochlorid-EDTA-Puffer) gelöst und anschließend photometrisch die genaue ODN-Konzentration ermittelt. Für den experimentellen Einsatz wurde diese Stocklösung als Arbeitslösung in PBS auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt und aliquotiert. Stammlösung und Arbeitslösungen wurden stets bei -20 °C gelagert.

4.1.6 Antikörper und DynaBeads®

Folgende Antikörper und DynaBeads® wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Spezifität	Isotyp	Klon	Hersteller
CD3e	Armenian Hamster IgG1, κ	145-2C11	BD Biosciences
Anti-CD4	Rat (DA) IgG2a,κ	RM4-5	BD Biosciences
CD4 (L3T4)	Rat (LEWIS) IgG _{2b} , κ	GK1.5	BD Biosciences
CD8a (Ly-2)	Rat (LOU/Ws1/M) IgG _{2a} , κ	53-6.7	BD Biosciences
CD11b (Mac-1)	Rat (DA) IgG _{2b} , κ	M1/70	BD Biosciences
CD11c	Armenian Hamster IgG1a, λ2	HL3	BD Biosciences
CD19	Rat (LEWIS) IgG _{2a} , κ	1D3	BD Biosciences
CD45R/B220	Rat IgG _{2a} , κ	RA3-6B2	BD Biosciences
CD49b/PanNK	Rat (LEWIS) IgM, κ	DX5	BD Biosciences
CD80 (B7-1)	Armenian Hamster IgG2, κ	16-10A1	BD Biosciences
CD86 (B7-2)	Rat (Louvain) IgG2a, κ	GL1	BD Biosciences
CD117 (c-Kit)	Rat IgG _{2b} , κ	ACK45	BD Biosciences
Ly6A/E (Sca-1)	Rat (LEWIS) IgG _{2a} , κ	D7	BD Biosciences
Ly6G/C (Gr-1)	Rat IgG _{2b} , κ	RB6-8C5	BD Biosciences
MHC-II	Rat IgG _{2b} , κ	NIMR-4	Southern Biotech
TER-119 (Ly76)	Rat IgG _{2b} , κ	TER-119	BD Biosciences
Isotyp-Kontrollen			BD Biosciences
DynaBeads® Sheep anti-Rat IgG			Dynal Biotech

4.1.7 Tumorzelllinie

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Tumorzelllinie C26 wurde Mitte der 1970-er Jahre als transplantables Tumormodell, unter anderem für Chemotherapiestudien, generiert. Balb/c Mäusen waren zu diesem Zweck sechs Monate lang zweimal wöchentlich Cycasin-ähnliche, karzinogene Substanzen, unter anderem N-Nitroso-N-Methyluretan (NMU), intrarektal appliziert worden. Der im Rahmen der Versuchsreihe 217 Tage nach Beginn der NMU-Instillationen aufgetretene Colontumor Nr. 26 (C26) zeigte sich als subkutan, intraperitoneal und intravenös seriell transplantabel, wobei histologische Eigenschaften und Wachstumskinetik unverändert bestehen blieben. In ihrer ersten Charakterisierung beschrieben Corbett und Griswold C26 als schnell wachsendes, histologisch undifferenziertes Karzinom (G4). Nach Generierung der Zelllinie durchgeführte erste Untersuchungen zur Chemosensibilität zeigten, unter anderem nach Behandlung mit 5-FU, ein verlangsamtes

Tumorwachstum sowie eine Überlebensverlängerung bei C26-Tumore-tragenden Mäusen [Corbett, 1975; Griswold, 1975].

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Tumorversuche wurden C26-Zellen über die Firma Cell Lines Service (Heidelberg, D) bezogen und in unserem Labor auf Mykoplasmenkontamination überprüft. Die Zelllinie war während der gesamten Dauer der Experimente mykoplasmenfrei.

4.1.8 Zytostatika

Folgende Substanzen wurden im Rahmen dieser Arbeit zur zytostatischen Therapie eingesetzt:

Substanz	Stammlösung	Applikationsmodus	Hersteller
5-Fluorouracil (5-FU)	50 mg/ml	intraperitoneal (i. p.)	Teva Generics
Irinotecan	20 mg/ml	intraperitoneal (i. p.)	Pfizer Pharma
Leucovorin (LV)	10 mg/ml	intraperitoneal (i. p.)	Gry Pharma

Vor den einzelnen Therapien wurden die jeweils insgesamt benötigten Mengen an 5-FU beziehungsweise Irinotecan von der zentralen Zytostatikazubereitung der Apotheke des Klinikums der Universität München als entsprechendes Volumen der oben angegebenen, unverdünnten Stammlösungen bezogen. Die Substanzen wurden unmittelbar vor der *in vivo* Applikation mit isotonischer NaCl-Lösung (0,9 Vol%) auf eine für die Therapieapplikation geeignete Konzentration verdünnt.

Zur Optimierung der antitumoralen Aktivität wurde 5-FU in Analogie zu gängigen klinischen Therapieprotokollen bei sämtlichen Experimenten zusammen mit Leucovorin (Folinsäure, LV) verabreicht.

4.1.9 Software

Adobe Creative Suite CS4	Fa. Adobe Systems (San Jose, USA)
CellQuest	Fa. BD Biosciences (San Diego, USA)
EndNote X3	Fa. Thomson Reuters (New York, USA)
FlowJo	Fa. Tree Star Inc. (Ashland, USA)
Microsoft Office 2008	Fa. Microsoft Corp. (Redmond, USA)
PASW Statistics 18.0	Fa. SPSS Inc. (Chicago, USA)

4.2 Zellkultur

4.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen

C26-Zellen und primär für Vakzinierungen aus murinem Knochenmark gewonnene DC wurden in Zellkulturflaschen in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C kultiviert. Das Gasgemisch im Brutschrank bestand aus Raumluft, die mit CO₂ zu einer Endkonzentration von 5 % angereichert war. Die Luftfeuchtigkeit betrug mindestens 95 %. Sämtliche Experimente, die Manipulationen an Kulturzellen erforderten, wurden in einer Sterilbank mit partikelfreiem Einstrom und einer laminar strömenden Luftzirkulation durchgeführt, wodurch annähernd keimfreie Bedingungen garantiert waren. Zellularität und Viabilität der Kulturen wurden mit dem sogenannten Trypanausschlusstest bestimmt. Während lebende Zellen den Farbstoff bei dieser Methode nicht aufnehmen und hell bleiben, färben sich tote Zellen intensiv blau an. Suspensionsproben wurden in einer 0,25 %-igen Trypanblaulösung verdünnt, in einem Neubauer-Hämozytometer ausgezählt und die Gesamtzahl lebender Zellen mittels folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellzahl/ml} = (\text{gezählte Anzahl an Zellen}) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

4.2.2 Murine Kolokarzinomzelllinie C26

Die murine Tumorzelllinie C26 wurde in C26-Medium kultiviert und regelmäßig lichtmikroskopisch auf mikrobielle Verunreinigung sowie Anzeichen für vermehrten Zelluntergang untersucht. Dreimal wöchentlich wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 passagiert. Hierbei wurde dem Tumorzellrasen nach Absaugen des alten Kulturmediums zunächst 2 bis 5 ml 10-fach Trypsinlösung zugesetzt, um die normalerweise stark adhärennten Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Nach ungefähr 2 Minuten Inkubation im Brutschrank konnten die Zellen problemlos aus der Flasche herausgespült werden. Anschließend folgten Zentrifugation (370 x g, 7 Min, 4 °C) und Resuspension in frischem Medium. Wiederholtes Ausspülen der Zellsuspension durch eine Kanüle mit einem Außendurchmesser von 20 Gauge (20 G) führte zur nachhaltigen Vereinzelung der Zellen, was sich als entscheidende Voraussetzung für ein dauerhaft homogenes Wachstum erwiesen hatte.

Wurden C26-Zellen für Tumorinduktionen oder Kokultur zur Antigenbeladung der für die Vakzinierung generierten DC geerntet, wurde der Zellrasen nicht enzymatisch mit Trypsin, sondern mechanisch mit einem Zellschaber vom Flaschenboden entfernt. Auch dieser Prozedur folgten die oben beschriebene Vereinzlung der Zellen mit wiederholtem Ausspritzen durch eine Kanüle (20 G), Zentrifugation sowie Resuspension in 10 ml HBSS und Zählung zur Bestimmung der Gesamtzellzahl. Für Tumorinduktionen wurde die Konzentration der Suspension auf 1×10^6 C26-Zellen/ml eingestellt.

4.2.3 Dendritische Zellen

4.2.3.1 DC-Generierung aus murinem Knochenmark

Mit geringen Modifikationen erfolgte die Generierung muriner DC für die Vakzinierungen im Rahmen der Tumorthapieexperimente wie in der Literatur beschrieben [Inaba, 1992; Brunner 2000]. Acht Tage vor jeder Therapie wurden zwei weiblichen Balb/c-Mäusen im Alter von sechs bis zwölf Wochen Femur- und Tibia-Knochen beider Hinterläufe entnommen und die darin enthaltenen, mononukleären Knochenmarkzellen gewonnen. Nach Zählung der Ausbeute wurde die Konzentration der Suspension auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt und folgende, unkonjugierte Ratte-Anti-Maus-Antikörper in unten angegebener Menge zugegeben, um Monozyten und Granulozyten sowie B- und T-Lymphozyten zu markieren:

Antikörper	Anteil (in %)	Antikörpermenge/10^7 Zellen
Anti-Ly6G/C (Gr-1)	40	12 μ g
Anti-CD45R/B220	30	9 μ g
Anti-MHC-II	10	3 μ g
Anti-CD4	10	3 μ g
Anti-CD8a	10	3 μ g

Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen gewaschen und in 10 ml DC-Medium resuspendiert. Anschließend wurden pro 1×10^7 Knochenmarkzellen mindestens 4×10^7 sogenannte DynaBeads[®] zugegeben und die Suspension erneut für 30 Minuten bei 6 °C unter ständigem Schwenken inkubiert. Bei DynaBeads[®] handelt es sich um Antikörper-gekoppelte, uniforme Polymerkügelchen mit einem Durchmesser von 4,5 μ m, in die ferromagnetisches Material (Fe_2O_3 und Fe_3O_4) eingebettet ist. Die bei der hier beschriebenen DC-Gewinnung eingesetzten DynaBeads[®] waren mit spezifisch gegen die Fc-Regionen sämtlicher IgG-Subklassen der Ratte gerichteten

Schaf-Antikörpern gekoppelt, wodurch sich Bindungen zwischen den Zell-gebundenen, primären Antikörpern und den DynaBeads[®]-gekoppelten, sekundären Anti-IgG-Antikörpern ausbildeten. Nach erfolgreicher Inkubation, einem erneuten Waschschrift und Resuspension in 2 ml DC-Medium konnten die Zellen durch jeweils 2-minütiges Einbringen in das starke Magnetfeld des sogenannten Dynal MPC-1[®] (*magnetic particle concentrator*) in markierte und unmarkierte Zellen aufgetrennt werden. Während die markierten Zellen an der dem Magnetfeld zugewandten Seite des Probenröhrchens haften blieben, konnten die in Suspension verbliebenen, unmarkierten Zellen nach dem Prinzip der negativen Selektion oder Depletion abgesaugt und in ein neues Röhrchen überführt werden. Im Anschluss erfolgten Resuspension der DynaBeads[®]-markierten, abgesetzten Zellen in 2 ml DC-Medium und erneutes Einbringen in das Magnetfeld des Dynal MPC-1[®]. Zur Optimierung der Ausbeute an unmarkierten Zellen wurde dieser Vorgang insgesamt zweimal wiederholt. Die während der verschiedenen Schritte in Suspension verbliebenen Zellen wurden gepoolt. Im letzten Schritt wurden die gepoolten Überstände noch einmal im Dynal MPC-1[®] aufgereinigt, der Überstand in ein frisches Röhrchen überführt und die Zellzahl bestimmt. Nach auf diese Weise durchgeführter, magnetischer Separation verblieben rund 15 bis 20 % der Ausgangszellzahl –wie gewünscht hauptsächlich myeloische Vorläuferzellen– für die Weiterkultivierung.

Die Zellen wurden in einer Konzentration von $0,55 \times 10^6$ Zellen/ml DC-Medium in mittelgroßen Kulturflaschen ausgesäht. Zur Optimierung der Entwicklung von unreifen DC aus myeloischen Vorläuferzellen wurde dem Kulturmedium GM-CSF (200 U/ml) und IL-4 (20 ng/ml) zugesetzt [Brunner 2000].

Nach drei Tagen in Kultur wurde das Mediumvolumen durch erneute Zugabe von GM-CSF- und IL-4-supplementiertem DC-Medium verdoppelt, um während der gesamten Kulturdauer ein optimales Angebot an Nährstoffen und Wachstumsfaktoren zu garantieren.

4.2.3.2 Antigenbeladung und Aktivierung der generierten, unreifen DC *in vitro*

Am sechsten Tag der Kultur mit GM-CSF und IL-4 wurden die aus den myeloischen Progenitorzellen differenzierten, unreifen DC geerntet. Durch ihre rundliche Form, noch ohne für reife DC typische Dendriten, waren die nur leicht adhärent wachsenden Zellen

lichtmikroskopisch gut von ebenfalls in der Kultur vorkommenden, stärker adhären und häufig irregulär geformten, monozytären Zellen zu unterscheiden. Nach der Überführung des abgesaugten Überstands an Kulturmedium in ein 50 ml-Röhrchen wurden die Zellen am Boden der Kulturflasche mit 3 ml eiskaltem PBS bedeckt für einige Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach waren die DC durch mehrmaliges Spülen über den Flaschenboden mit PBS in der Regel gut ablösbar und wurden mit dem Mediumüberstand gepoolt. Waren bei der anschließenden, lichtmikroskopischen Kontrolle noch viele DC am Flaschenboden adhären, wurde der Vorgang so lange wiederholt bis möglichst alle DC abgelöst waren. Es folgten Zentrifugation (370 x g, 7 Min, 4 °C), Resuspension der Zellen in 10 ml DC-Medium und Zählung zur Bestimmung der Gesamtzellzahl.

Zur Antigenbeladung wurden der geernteten DC-Suspension C26-Zellen, die in einer Röntgenbestrahlungsanlage (Institut für Immunologie, LMU München, D) mit 100 Gray bestrahlt worden waren, im Verhältnis 1:6 zugemischt. Diese Strahlendosis führte zu Inaktivierung und Teilungsunfähigkeit der Tumorzellen, jedoch nicht zu ihrer Lyse. Die aus murinem Knochenmark generierten, unreifen DC zeigten zum Zeitpunkt der Kokultur durch die vorausgegangene, sechstägige Kultur in GM-CSF-haltigem Medium eine hohe MHC-II-Expression als Voraussetzung für eine effiziente Antigenpräsentation. Die Mischkultur wurde auf eine Konzentration von 1×10^6 DC/ml eingestellt und in GM-CSF- und IL-4-supplementiertem DC-Medium weiterkultiviert.

24 Stunden später wurde der Kokultur der TLR9-Ligand CpG 1826 (CpG 6 μ g/ml) zugegeben und die beladenen DC so für weitere 24 Stunden aktiviert.

4.2.3.3 Ernte Antigen-beladener, aktivierter DC zur Immunisierung *in vivo*

Am neunten Tag nach Gewinnung der myeloischen Vorläuferzellen erfolgte die Ernte der nun vollständig ausgereiften DC. Um FCS-Rückstände zu entfernen, wurde der Zellrasen nach Absaugen des Mediumüberstands zunächst zweimal mit serumfreiem HBSS gewaschen. Danach wurden die nur leicht adhären DC vorsichtig mit HBSS vom Boden der Kulturflasche abgespült, um Verunreinigungen durch stärker haftende C26-Zellen zu vermeiden, abzentrifugiert (370 x g, 7 Min, 4 °C), gezählt und in HBSS auf eine Konzentration von 1×10^6 -Zellen/ml eingestellt. Unmittelbar vor der Applikation

in vivo wurde den Antigen-beladenen, reifen DC noch 500 $\mu\text{g/ml}$ CpG 1826 als *in vivo* wirkendes Adjuvans beigemischt.

In der folgenden Abbildung sind die einzelnen Schritte bei der Generierung der eingesetzten DC-Vakzine schematisch dargestellt (Abb. 4.1).

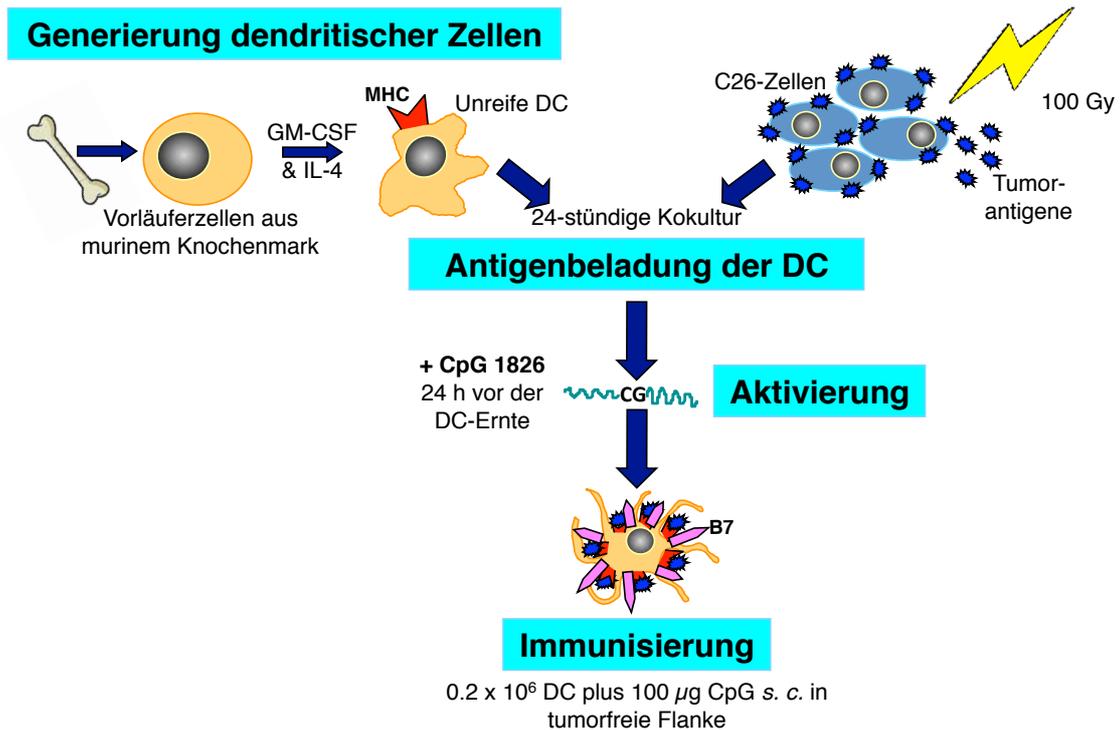


Abb. 4.1: Generierung der zur Immuntherapie muriner C26-Tumore eingesetzten DC-Vakzine.

Nach Generierung unreifer DC aus syngenem Knochenmarkvorläuferzellen durch sechstägige Inkubation mit Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierendem Faktor (GM-CSF) und Interleukin-4 (IL-4) werden die DC über 24 Stunden mit bestrahlten C26-Zellen kokultiert und anschließend mit CpG 1826 weitere 24 Stunden lang aktiviert. Die Kokultur der DC mit teilungsinaktivierten Tumorzellen ermöglicht die Aufnahme von Tumorantigenen aus C26-Zellen, die die DC nach ihrer Reifung und Aktivierung über MHC-II-Komplexe in Verbindung mit kostimulatorischen Molekülen (B7) stabil präsentieren.

4.3 Tierexperimentelle Methoden

4.3.1 Mäuse und Haltungsbedingungen

Für sämtliche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden weibliche Tiere des weit verbreiteten Inzuchtstamms Balb/c verwendet, die mit einem

Mindestalter von vier Wochen von der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen, D) bezogen wurden. Im Gegensatz zum ebenfalls gängigen C57/Bl6 Stamm, für den die Ausbildung proinflammatorischer T_H1-Immunität charakteristisch ist, bilden Balb/c Mäuse eher T_H2-vermittelte Immunantworten aus [Heinzel, 1989; Hsieh, 1995]. Die Tiere wurden erst nach einer mindestens einwöchigen Akklimatisierung für Versuche herangezogen. Die Haltung erfolgte in einem geschlossenen, den Hygieneanforderungen entsprechenden Tierstall der Medizinischen Klinik Innenstadt mit maximal acht Mäusen pro Käfig. Betreuung der Tiere inklusive Fütterung mit Pelletfutter und Wasser *ad libitum* erfolgte durch ausgebildete Tierpfleger. Über eine Zeitschaltuhr war ein zwölfstündiger Hell-Dunkel-Rhythmus geregelt, wobei Manipulationen an den Tieren stets tagsüber durchgeführt wurden. Alle Tierversuche waren von der Regierung von Oberbayern genehmigt worden und unterlagen den Vorschriften des Tierschutzgesetzes.

4.3.2 Tumorinduktion

Tumore wurden bei weiblichen Balb/c Mäusen ab einem Alter von fünf Wochen induziert. 48 und 24 Stunden vor einer geplanten Tumorinduktion wurden die murinen C26-Kolonkarzinomzellen jeweils im Verhältnis 1:2 expandiert, um zum Zeitpunkt der Injektion exponentielles Wachstum und damit verbunden eine optimale Entwicklung der Tumore *in vivo* zu gewährleisten. Unmittelbar vor der Induktion wurden die Zellen geerntet und zeigten beim Trypanausschlusstest stets eine Viabilität von über 90 %. Um Immunaktivierungen *in vivo* durch FCS-Rückstände aus dem Kulturmedium zu vermeiden, wurden die C26-Zellen zur Tumorinduktion in serumfreiem HBSS suspendiert. Jeder Maus wurden schließlich $0,25 \times 10^6$ C26-Zellen in einem Volumen von 250 μ l subkutan (s. c.) in die rechte Flanke injiziert.

Zur Tumorinduktion sowie bei venösen Blutentnahmen wurden die Tiere stets mit dem Inhalationsnarkotikum Isofluran anästhesiert. Diese Substanz zeigt gute hypnotische und muskelrelaxierende Effekte und ist ausreichend analgetisch aktiv. Die Wirkung tritt rasch ein und hält nach Expositionsstopp in der Regel weniger als 60 Sekunden an, was eine Antagonisierung der Anästhesie entbehrlich machte. Obwohl aus dem klinischen Einsatz die atemdepressive Wirkung von Isofluran bekannt ist, blieb die Spontanatmung bei den Mäusen während der Kurznarkose stabil bestehen. Im Fall der Tumorinduktion war die Anästhesie notwendig, um bewegungsbedingte Verletzungen der Versuchstiere zu unterbinden, wäre zur reinen Schmerzvermeidung bei der

Applikation eines Volumens von 250 μ l ins subkutane Fettgewebe über eine dünne Kanüle (27 G) jedoch nicht erforderlich gewesen.

Der Tag der Tumorinduktion wurde als Tag 0 (d0) des folgenden Tumorthherapieexperiments definiert.

4.3.3 Immunisierung mit syngenem DC

Bis zur Applikation wurde die mit CpG gemischte Vakzinierungssuspension zur Homogenisierung wiederholt geschwenkt. Nach gründlicher Desinfektion von Fell und Haut im Bereich der Injektionsstelle mit Ethanol (70 Vol%) wurden jeweils $0,2 \times 10^6$ DC und 100 μ g CpG in 200 μ l HBSS über eine dünne Kanüle (27G) als Bolus in die tumorfreie, sogenannte kontralaterale Flanke injiziert, wo sich nach subkutaner Applikation eine deutliche Quaddel abzeichnete.

4.3.4 Applikation von CpG 1826

Im Rahmen der Tumortherieversuche im C26-Modell wurden zeitgleich mit der DC-Vakzine 100 μ g CpG ins peritumorale Gewebe appliziert. Bei den Experimenten zur Charakterisierung chemoprotektiver CpG-Effekte wurden verschiedene CpG-Dosen (50-200 μ g) zeitgleich mit der Chemotherapie subkutan in die linke Flanke der Versuchstiere injiziert. Die Substanzapplikationen erfolgten stets nach gründlicher Desinfektion von Haut und Fell mit Ethanol (70 Vol%) als Bolus in 100 μ l PBS über eine dünne Kanüle (27G).

4.3.5 Chemotherapie

Beide im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten Zytostatika wurden stets intraperitoneal (i. p.) als Bolus verabreicht. Dieses Administrationsverfahren führt zu einer fast ebenso raschen, systemischen Substanzverteilung im Organismus wie die intravenöse Applikation, ist bei Mäusen allerdings technisch einfacher durchführbar und deutlich weniger belastend für die Versuchstiere. Beide Substanzen wurden in verschiedenen Dosen verabreicht, um ihre optimale, antitumorale Effizienz zu berücksichtigen.

Die gewichtsadaptiert (mg/kg KG) verabreichten Zytostatika wurden in NaCl 0,9 % so vorverdünnt, dass unabhängig von der zu applizierenden Enddosis stets 10 bis 12,5 μ l/g KG von den verschiedenen Arbeitslösungen zu injizieren waren. Um bei der höchsten im Rahmen der Experimente eingesetzten Irinotecandosis (350 mg/kg KG) die Injektion eines zu großen Volumens der Stammlösung (20 mg/ml) zu umgehen, wurde die Gesamtdosis in dieser Behandlungsgruppe zweizeitig im Abstand von zwei Stunden verabreicht.

Zur Optimierung der zytotoxischen Effekte durch Stabilisierung des inhibitorischen Komplexes mit dem Enzym Thymidilatsynthetase wurde 5-FU in allen Experimenten zusammen mit Leucovorin (Folinsäure, LV) verabreicht. 30 Minuten vor der eigentlichen Chemotherapie wurde ein gewichtsunabhängiger LV-Bolus (1000 μ g) intraperitoneal injiziert. Zudem war die Substanz den verschiedenen 5-FU-Verdünnungen stets in einer Konzentration von 5 mg/ml beigemischt, sodass bei gewichtsadaptierter 5-FU-Injektion von je 10 μ l/g KG zusätzlich weitere 50 μ g/g KG Leucovorin appliziert wurden [Van Laar, 1996; van der Wilt, 2001].

4.3.6 Tötung von Versuchstieren

War die Tötung von Versuchstieren für Organentnahmen oder beim Eintritt definierter Versuchsabbruchkriterien im Sinne einer Euthanasierung notwendig, wurden die Mäuse zunächst mit Isofluran anästhesiert und nach Eintritt einer ausreichenden Narkosetiefe tierschutzgerecht durch zervikale Dislokation (Luxation der Halswirbelsäule durch axiale Hyperextension) getötet.

4.3.7 Aufbau und zeitlicher Ablauf der Experimente im C26-Modell

Der therapeutische Effekt der unterschiedlichen Behandlungen wurde anhand von Tumorwachstumskinetik und Überlebenszeit beurteilt. Sechs Tage nach der Tumorinduktion waren in der Regel erstmals tastbare Befunde erfassbar. Oft bildeten sich zunächst mehrere, kleine Tumore aus, die im Verlauf fast immer zu einer einzelnen Masse zusammenwuchsen (Abb. 4.2).



Abb. 4.2: Subkutan im Bereich der rechten Flanke wachsender C26-Tumor (Pfeil).

Palpable Tumore wurden dreimal pro Woche kontrolliert, wobei jeweils Länge und Breite der Tastbefunde in Millimeter (mm) mit Hilfe einer Schublehre ausgemessen wurden. Als Maß für die Tumorgroße diente das errechnete Produkt dieser beiden Werte (mm^2). Auf die Angabe des Tumolvolumens wurde verzichtet, weil die dafür zusätzlich erforderliche Bestimmung der Tiefenausdehnung eine große Belastung für die Versuchstiere bedeutet hätte. Als Abbruchkriterien für die Versuchsführung war das Überschreiten einer Tumorgroße von 225 mm^2 definiert. Wie bereits in früheren Arbeiten beschrieben, lag das Überleben unbehandelter Tiere nach C26-Tumorinduktion zwischen 20 und 30 Tagen [Brunner 2000].

Da für einige Zytostatika, unter anderem auch für 5-FU, eine deutliche Abnahme ihrer antitumoralen Wirkstärke bei großer Tumormasse bekannt ist [Van Laar 1996], wurde die Behandlung in den aktuellen Experimenten im C26-Modell bereits bei kleineren Tumoren als in den zitierten Vorarbeiten begonnen. Die erste Therapie wurde, wenn nicht ausdrücklich anders beschrieben, bereits zehn Tage nach Tumorinduktion appliziert, wenn die subkutan im rechten Flankenbereich wachsenden Tumore ungefähr 30 mm^2 maßen. Nach einem Intervall von fünf Tagen zwischen den ersten beiden Therapien, folgten eine dritte und eine vierte Behandlung im Abstand von jeweils sieben Tagen. Immuntherapie und Zytostatika wurden stets zeitgleich appliziert (Abb. 4.3). Pro Gruppe wurden immer fünf Mäuse therapiert.

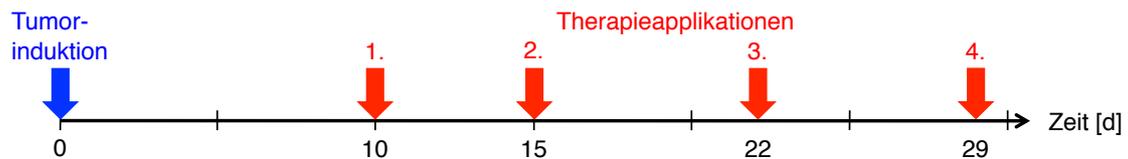


Abb. 4.3: Zeitlicher Ablauf der Tumorthherapieexperimente.

Das im Rahmen der Tumorversuche untersuchte Immuntherapieprotokoll aus C26-gepulsten und CpG-aktivierten, syngen DC sowie zeitgleich appliziertem, peritumoralem CpG-Bolus wird im Folgenden kurz als *Immuntherapie mit DC und CpG* bezeichnet werden (DC plus CpG; Abb. 4.4).

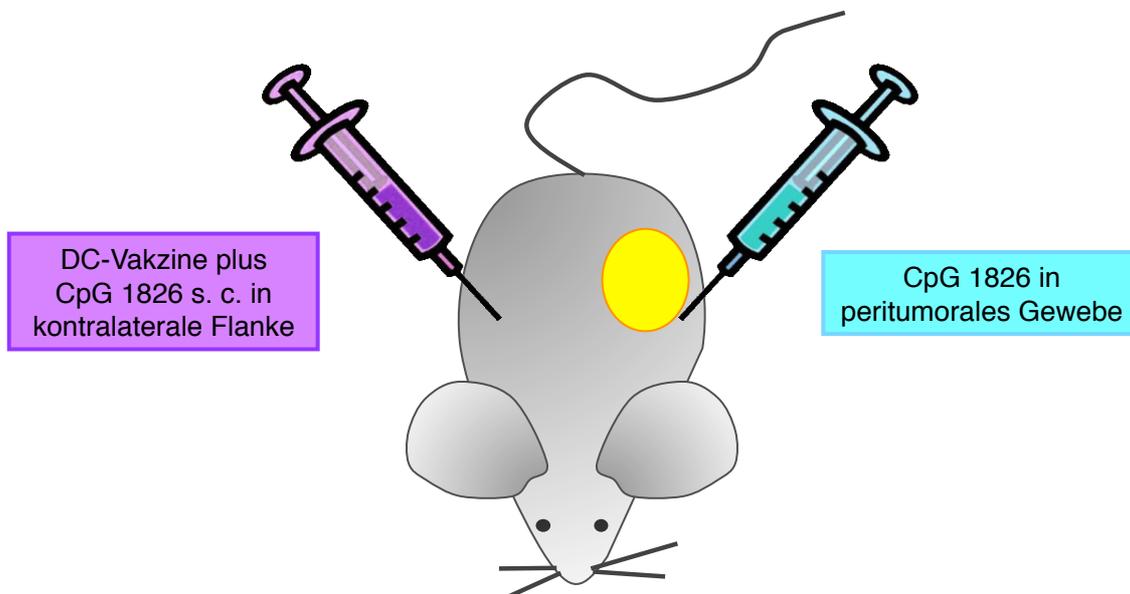


Abb. 4.4: Applikationsmodus der Immuntherapie mit DC und CpG im C26-Modell.

Bei der graphischen Darstellung der mittleren Tumorgößenverläufe der einzelnen Therapiegruppen im Ergebnisteil enden die Graphen jeweils, wenn zwei Mäuse aus einer Gruppe entweder verstorben waren oder die maximal tolerable Tumorgöße von 225 mm^2 überschritten hatten.

4.3.8 Organentnahme und Aufbereitung tierischen Materials

4.3.8.1 Peripher-venöses Blut

Peripher-venöses Blut wurde nach Hyperämieinduktion mittels Wärmeexposition der Versuchstiere unter einer Infrarotlampe aus der murinen Schwanzvene entnommen. Wenn es sich um eine Blutentnahme unmittelbar vor der Tötung der Tiere am Endpunkt eines Versuchs handelte, wurde der retroorbitale Venenplexus punktiert, wobei die Mäuse vorher durch Isofluraninhalation suffizient anästhesiert worden waren.

Für automatisierte Blutbildanalysen und morphologische Differenzierung wurde Vollblut unmittelbar nach der Entnahme in Microvetten[®] (Fa. Sarstedt, Nümbrecht, D) überführt, und mit dem im Gefäß vorgelegten Kalium-EDTA zur Koagulationshemmung gründlich gemischt.

Für die Messung der Konzentration an IL-12p70 und IL-6 im Serum wurde das entnommene Vollblut zentrifugiert (3500 x g, 10 Min) und anschließend der Serumüberstand abgenommen.

4.3.8.2 Milz

Zunächst wurden die getöteten Mäuse fixiert und das Fell im Bereich des Rumpfes großflächig mit Ethanol (70 Vol%) desinfiziert. Anschließend wurden Haut und Peritonealhöhle im Bereich der linken Flanke, etwas unterhalb des Rippenbogens, mit einem kleinen Schnitt eröffnet und die Milz vorsichtig aus ihrer Loge mobilisiert. Nach sorgfältiger Entfernung anhaftender Gewebereste wurde das entnommene Organ unverzüglich in eiskaltes HBSS überführt und zeitnah der Splenozytenvereinzellung zugeführt. Dazu wurde jede Milz mit dem Stempel einer 2 ml-Spritze durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 70 μm gedrückt. Um sicherzugehen, bei diesem Prozess möglichst wenige Zellen zu verlieren, wurde das Sieb wiederholt mit insgesamt 20 ml PBS durchgespült. Die so gewonnene Einzelzellsuspension wurde abzentrifugiert (380 x g, 7 Min, 4 °C) und anschließend in 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert, um enthaltene Erythrozyten effektiv zu lysieren. Danach wurde der Lysierungsprozess durch Zugabe von mindestens 30 ml PBS abgestoppt, die Suspension erneut abzentrifugiert und in 5 ml PBS resuspendiert. Nun wurde durch Zählung einer geeigneten Verdünnung im

Neubauer-Hämozytometer die Gesamtzellzahl eines jeden Organs bestimmt und die Zellen anschließend für die durchflusszytometrische Analyse vorbereitet.

4.3.8.3 Knochenmark

Getötete Mäuse wurden fixiert und ihre gesamte, untere Körperhälfte gründlich mit Ethanol (70 Vol%) desinfiziert. Nach großzügiger Entfernung der Haut im Bereich von Unterleib und Hinterläufen wurden diese durch Luxation des Femurkopfs aus dem Acetabulum vom Rumpf getrennt. Das Gewebe des Bewegungsapparats wurde sorgfältig abpräpariert und Femur und Tibia voneinander getrennt in eiskaltes HBSS überführt. Die eigentliche Knochenmarkgewinnung erfolgte im Anschluss unter einer Sterilbank. Sollten DC für Vakzinierungen generiert werden, wurden der jeweils erforderlichen Zellzahl entsprechend viele Knochen mehrerer, syngener Balb/c Mäuse vorbereitet und die daraus gewonnenen Knochenmarkzellen gepoolt. Nach einer kurzen Desinfektion in Ethanol (70 Vol%) wurden jedem Knochen beide Epiphysen abgetrennt und das Knochenmark mit ungefähr 5 ml RPMI-Vollmedium aus der Diaphyse herausgespült. Um dafür einen ausreichend hohen Druck zu erzeugen, wurde das Medium aus einer 10 ml-Spritze über eine dünne Kanüle (27G) ausgespritzt. Die Markzylinder wurden dann zur Vereinzelung durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 70 μm gedrückt. Um keine Zellen zu verlieren, wurde das Sieb wiederholt mit insgesamt 20 ml RPMI-Vollmedium durchgespült. Im Anschluss daran wurde die so gewonnene Einzelzellsuspension abzentrifugiert (380 x g, 7 Min, 4 °C) und im nächsten Schritt in 1 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert, um in der Suspension enthaltene Erythrozyten zu lysieren. Danach wurde das Gefäß mit mindestens 20 ml PBS aufgefüllt, um den Lyseprozess zu stoppen, die Suspension erneut abzentrifugiert und anschließend nach Resuspension in 5 ml RPMI-Vollmedium im Neubauer-Hämozytometer gezählt. Nach Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden die Knochenmarkzellen entweder zur Generierung Knochenmark-abgeleiteter DC in Kultur genommen oder für die durchflusszytometrische Analyse vorbereitet.

4.4 Durchflusszytometrie

4.4.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Die Durchflusszytometrie ermöglicht Diskriminierung und Quantifizierung suspendierter Zellen anhand verschiedener, zellulärer Eigenschaften. Im *Fluorescence-activated cell sorter* (FACS) werden die zu analysierenden Zellen zunächst im Rahmen der sogenannten hydrodynamischen Fokussierung beim Einsaugen in die Messkammer durch die höhere Fließgeschwindigkeit einer die Suspension umgebenden Trägerflüssigkeit stark beschleunigt. Dadurch werden Aggregate aufgelöst und die Zellen passieren am eigentlichen Analysepunkt einzeln einen Laserstrahl, dessen Licht durch den partikulären Durchfluss gestreut wird. Das Ausmaß an Lichtstreuung entlang des einfallenden Strahls (*forward scatter*, FSC) korreliert mit der Zellgröße. In zum einfallenden Strahl orthogonaler Richtung messbare Streuung (*side scatter*, SSC) wird vor allem durch die intrazelluläre Granularität bedingt. Werden zudem Antikörpergekoppelte Fluorochrome zur Zellmarkierung eingesetzt, so absorbieren diese Laserlicht am Analysepunkt und emittieren langwelligeres Fluoreszenzlicht, das ebenfalls orthogonal zum einfallenden Strahl gemessen wird. Streu- und Fluoreszenzlicht wird über spezielle Lichtfilter nach Wellenlängenbereichen aufgetrennt und bei der Fluoreszenzmessung, je nach Emissionsspektrum der eingesetzten Fluorochrome, zu verschiedenen Detektoren gelenkt. Aus der Lichtstreuung gewonnene Informationen reichen bei der Untersuchung mononukleärer Blut-, Knochenmark- oder Milzzellen bereits aus, um lymphozytäre von myelomonozytären Zellen zu unterscheiden. Durch den Einsatz Antikörpergekoppelter Fluoreszenzfarbstoffe können anhand des Oberflächenexpressionsmusters weiterführende Informationen über die Zusammensetzung einer Probe aus verschiedenen Subpopulationen sowie deren Reifungs- und Aktivierungszustand gewonnen werden.

Sämtliche Messungen wurden an einem mit zwei räumlich getrennten Lasern ausgestatteten FACSCalibur[®]-Durchflusszytometer durchgeführt. Der blaue Argonlaser (488 nm) dieses Geräts ermöglicht die Exzitation von Fluorescein-Isothiocyanat (FITC, Emission bei 518 nm), Phycoerythrin (PE, Emission bei 575 nm) sowie Peridinin-Chlorophyll-A-Protein (PerCP, Emission bei 675 nm). Zur Exzitation von Allophycocyanin (APC, Emission bei 660 nm) ist im FACSCalibur[®] zudem eine rote Laserdiode (635 nm) vorhanden.

4.4.2 Bestimmung von Oberflächenmolekülen

Zur durchflusszytometrischen Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen wurden 2×10^5 bis 2×10^6 Zellen in einem FACS-Röhrchen abzentrifugiert und nach Abnahme des Überstands im rücklaufenden Tropfen resuspendiert. Zur Färbung wurden die Zellen im Anschluss 30 Minuten lang bei 4 °C unter Lichtausschluss mit verschiedenen, monoklonalen Antikörpern inkubiert (0,5 μ l pro Antikörper). Die eingesetzten Antikörper waren entweder direkt mit FITC, PE, PerCP oder APC gekoppelt (direkte Fluoreszenz) oder biotinyliert. In letzteren Fall folgten auf die erste Inkubation zwei Waschschrte mit PBS und anschließend eine weitere Inkubation unter gleichen Bedingungen mit Fluorochrom-gekoppeltem Streptavidin (indirekte Fluoreszenz). Im Anschluss an das Färbeprocedere wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann durchflusszytometrisch analysiert. Im Fall eines zeitlichen Intervalls bis zur Messung wurden die gefärbten Proben nach dem letzten Waschschrte in 200 μ l Fixationspuffer resuspendiert und bei 4 °C, zum Beispiel über Nacht, aufbewahrt. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit der FlowJo[®]-Software.

4.4.3 Durchflusszytometrischer Nachweis hämatopoetischer Vorläuferzellen

Um die Auswirkungen der verschiedenen Behandlungen auf undifferenzierte Zellen genauer charakterisieren zu können, wurden Splenozyten und Knochenmarkzellen für die durchflusszytometrische Analyse mit dem sogenannten *Mouse Lineage Panel*[®] inkubiert. Hierbei handelt es sich um einen Cocktail aus folgenden fünf biotinylierten Antikörpern, die mit für relevante, hämatopoetische Zellreihen spezifischen Markern reagieren:

Bezeichnung	Isotyp	Klon	Hersteller
Anti-CD3e	Armenian Hamster IgG1, κ	145-2C11	BD Biosciences
Anti-CD11b	Rat IgG _{2b} , κ	M1/70	BD Biosciences
Anti-CD45R/B220	Rat IgG _{2a} , κ	RA3-6B2	BD Biosciences
Anti-Ly6G/C (Gr-1)	Rat IgG _{2b} , κ	RB6-8C5	BD Biosciences
Anti-TER-119 (Ly76)	Rat IgG _{2b} , κ	TER-119	BD Biosciences

Auf diese Weise werden neben T- und B-Lymphozyten sämtliche der myelomonozytären und der erythroiden Reihe angehörende Zellen markiert. Nach Zugabe von Fluorochrom-gekoppeltem Streptavidin, das an das Biotin der *panel*-

Antikörper bindet, lassen sich diese Zellen als einheitliche, *Lineage* (Lin)⁺ Population durchflusszytometrisch darstellen. Die Lin⁻ Population aus Zellen, die keinen der Reihen-spezifischen Marker exprimieren, entspricht dem Anteil hämatopoetischer Vorläuferzellen. Dieses Prinzip der Negativselektion wird bereits seit über 20 Jahren erfolgreich zur Aufreinigung und Charakterisierung muriner Stammzellen eingesetzt [Spangrude, 1988; Spangrude, 1990; Morrison, 1994].

Um unreife, Lin⁻ Zellen weiter differenzieren zu können, wurden sie zusätzlich mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern in Bezug auf das Expressionsniveau der Oberflächenmarker c-kit (CD117) und Sca-1 (Ly6A/E) analysiert.

Bei Sca-1 (*stem cell antigen-1*, Ly6A/E) handelt es sich um ein in der Zellmembran verankertes Glycoprotein der murinen Ly6-Superfamilie, von dessen kodierendem Gen, Ly6a, zwei Allele (Ly6a.1 oder Ly6e sowie Ly6a.2) bekannt sind [van de Rijn, 1989]. Verschiedene Forschungsgruppen konnten zeigen, dass die Sca-1⁺ Subpopulation der Lin⁻ Progenitoren aus pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen (HSC) mit langfristigem Selbsterneuerungspotential besteht [Spangrude 1988; Uchida, 1992; Uchida, 1993; Gumley, 1995]. Monoklonale Antikörper gegen dieses Oberflächenmolekül werden daher seit über 20 Jahren erfolgreich bei der FACS-unterstützten Selektion pluripotenter HSC eingesetzt [Aguila, 1997].

Anfang der 1990er-Jahre bestand die gängige Meinung, Lin⁻ und Sca-1⁺ pluripotente HSC exprimierten auch stets die Rezeptor-Thyrosinkinase c-kit (*stem cell factor receptor*, CD117) [Ikuta, 1992; Orlic, 1993], die nach Bindung ihres spezifischen Liganden *steel factor* (SF) essenzielle Signalkaskaden für Proliferationsregulierung, Differenzierung und Überleben hämatopoetischer Zellen induziert [Edling, 2007]. Im Verlauf durchgeführte, genauere Subgruppenanalysen Lin⁻ und Sca-1⁺ Vorläuferzellen erbrachten jedoch, dass langfristig zur Selbsterneuerung fähige, pluripotente HSC zunächst kein c-kit auf ihrer Oberfläche exprimieren [Ogata, 1995; Nishio, 1996; Doi, 1997]. Nach mehrtägiger Kultur primitiver, blastärer, initial c-Kit^{low} Zellen war eine deutliche Zunahme ihrer c-Kit-Oberflächenexpression zu messen. Somit exprimieren in der G₀-Phase des Zellzyklus ruhende HSC offenbar kein durchflusszytometrisch detektierbares c-Kit, wobei die Expression nach ihrer Mobilisierung und ihrem Eintritt in den Zellzyklus rasch ansteigt [Katayama, 1993; Doi 1997].

Der Gruppe von J. R. Keller gelang es schließlich, die Reifung Sca-1⁺ pluripotenter HSC von c-Kit⁻ zu c-Kit⁺ Zellen *in vitro* nachzuvollziehen. Nach genauer Analyse der Sca-1-Oberflächenexpression primitiver, blastärer Zellen postulierte Kellers Gruppe zudem eine Sca-1⁻ und c-Kit⁻ Subpopulation als Vorläufer der Sca-1⁺ Zellen, die

ihrerseits auch zu Koloniebildung fähige, pluripotente HSC enthält. Ihren tiefen Ruhezustand verlassen $c\text{-Kit}^-$ Zellen *in vivo* jedoch nur unter extremem Proliferationsdruck, wie zum Beispiel nach ausgeprägter, hämatopoetischer Toxizität infolge einer Ganzkörperbestrahlung [Klarmann, 2003]. Kellers Modell – bildlich dargestellt in Abb. 4.5– wurde auch den hier beschriebenen Experimenten zu Grunde gelegt.

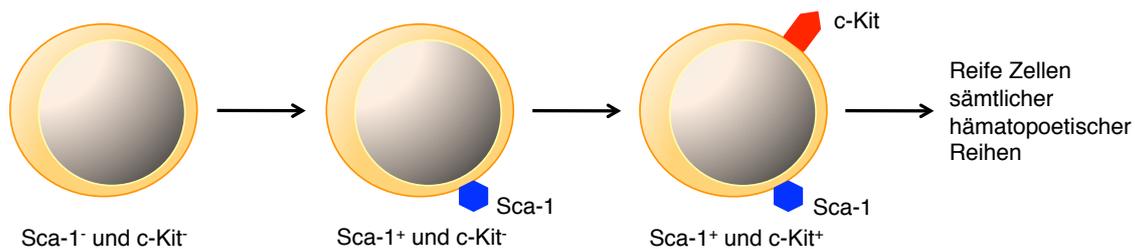


Abb. 4.5: Reifung ruhender, $Sca\text{-}1^-$ und $c\text{-Kit}^-$ hämatopoetischer Stammzellen (Modell).

$Sca\text{-}1^-$ und $c\text{-Kit}^-$ Zellen als undifferenzierteste Population ruhender, hämatopoetischer Stammzellen im murinen Organismus exprimieren während ihrer Reifung zunächst $Sca\text{-}1$ (*stem cell antigen-1*, Ly6A/E) und im weiteren Verlauf schließlich auch $c\text{-Kit}$ (*stem cell factor receptor*, CD117) [Klarmann 2003].

4.4.4 Automatisierte Blutbildanalyse

Hämatologische Profile unterschiedlich therapierter Mäuse wurden mit Hilfe eines elektronischen Zählgeräts erstellt. Dazu wurden mit Kalium-EDTA ungerinnbar gemachte Vollblutproben der Analyse nach dem sogenannten „Coulter-Prinzip“ zugeführt, bei dem Blutzellen durch Impedanzmessung quantifiziert werden. In einer mit NaCl 0,9 % als Trägerlösung befüllten Messkammer befinden sich zwei Elektroden, zwischen denen Strom durch eine kapilläre Öffnung fließt. Die Stromstärke wird unter anderem durch die Größe der Öffnung sowie durch den Salzgehalt der Trägerlösung bestimmt. Wird eine zu analysierende Blutprobe langsam durch diese Öffnung gesaugt, ändert sich beim Durchtritt jeder einzelnen Zelle die Leitfähigkeit und damit der Widerstand, wobei große Zellen eine größere Widerstandsänderung verursachen als kleine. Auf diese Weise sind Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten einer Blutprobe in einem Schritt quantifizierbar.

4.4.5 *Enzyme-linked immunosorbent assay*

Die Quantifizierung von Zytokinen im murinen Serum erfolgte mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Bei dieser Methode wird das zu messende Protein mit Enzym-gekoppelten Antikörpern markiert. Nach enzymatischer Umsetzung eines zunächst farblosen Substrats in ein farbiges Produkt kann im Vergleich mit einer Standardverdünnungsreihe die in der Probe enthaltene Proteinmenge quantifiziert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden kommerziell erhältliche ELISA-Kits verwendet. Die Durchführung der Methode erfolgte den entsprechenden Herstellerprotokollen gemäß. Zunächst wurden geeignete Mikrotiterplatten (96-well) mit einem ersten, sogenannten *capture antibody*, der in *coating*-Puffer verdünnt worden war, durch Inkubation über Nacht bei 4 °C beschichtet (*coating*). Am Folgetag wurde der ungebundene *capture antibody* mit Waschpuffer abgewaschen. Um unspezifische Bindungen während der folgenden Schritte zu verhindern, wurden die Platten im Anschluss über eine Stunde mit proteinhaltiger Probenverdünnungslösung geblockt und erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss wurden jeweils 50 µl der 1:2 in PBS verdünnten Serumproben in Triplikaten sowie die jeweilige Standardreihe mit bekannter Proteinkonzentration auf die Platten aufgetragen und über zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen wurde ein biotinylierter Zweit- oder Detektionsantikörper und ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat, das an das Biotin des Detektionsantikörpers bindet, aufgetragen und die Platten erneut über zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Um ungebundene Reste von Zweitantikörper und Konjugat vollständig zu entfernen, wurden die Platten anschließend siebenmal gewaschen. Dann folgte die Zugabe des Chromogens o-Phenylendiamindihydrochlorid gemischt mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Dieses Substrat wird durch Katalyse der an den Detektionsantikörper gekoppelten Peroxidase so umgesetzt, dass die Intensität der sich entwickelnden Farbe proportional zur in der Probe vorhandenen Proteinmenge ist. Die damit verbundene Extinktion wurde schließlich in einem ELISA-reader bestimmt, wobei die mitgeführte Standardreihe eine genaue Berechnung der in jeder Probe enthaltenen Proteinkonzentration ermöglichte.

4.5 Morphologische Methoden

4.5.1 Differenzialblutbild

Zur Differenzialblutbildanalyse wurde jeweils ein Tropfen peripheren Bluts direkt nach der Entnahme auf einem Objektträger ausgestrichen und getrocknet. Danach wurden die Ausstriche panoptisch nach Pappenheim gefärbt. Dazu wurden die Objektträger zunächst für fünf Minuten mit May-Grünwald-Lösung beschichtet und danach mit Puffer-Aqua abgespült. Es folgten zwei weitere Waschschriffe, in denen die Ausstriche jeweils eine Minute mit Puffer-Aqua beschichtet und anschließend abgespült wurden. Im nächsten Schritt wurden die Ausstriche fünf Minuten lang in einer mit Giemsa-Lösung befüllten Glasküvette gefärbt und im Anschluss gründlich mit *Aqua destillata* abgespült.

Die gefärbten Blutausstriche wurden anschließend lichtmikroskopisch beurteilt.

4.5.2 Histologie

Zur histologischen Beurteilung von murinem Knochenmark wurde jeweils ein Femur pro Maus zunächst direkt nach der Organentnahme 24 Stunden lang in Formalin fixiert. Im Anschluss wurden die Knochen entkalkt und in Paraffin eingebettet. Aus den Paraffinblöcken wurden 7-8 μm dünne, serielle Schnitte angefertigt. Im Anschluss wurden die rehydrierten Paraffinschnitte zunächst fünf Sekunden lang in Hämatoxylin-Lösung gefärbt. Auf einen zehnminütigen Waschschriff in H_2O folgte dann eine weitere fünfminütige Färbung in alkoholischer Eosin-Lösung (0,33 Vol%) (HE-Färbung).

Die gefärbten Schnitte wurden lichtmikroskopisch beurteilt.

Die histologische Aufarbeitung des murinen Materials erfolgte freundlicherweise durch das Labor von Herrn Prof. Dr. med. J. Diebold (zum Zeitpunkt der Kooperation: Pathologisches Institut der LMU München), dem ich an dieser Stelle ausdrücklich für die gute und äußerst produktive Zusammenarbeit danken möchte.

4.6 Statistische Analyse

Die Ergebnisse sämtlicher Experimente zur vorliegenden Arbeit sind als arithmetisches Mittel angegeben, wobei die Streuung der Werte durch Berechnung des Standardmessfehlers (*standard error of the mean*, SEM) berücksichtigt wurde. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Versuchsgruppen wurden beim Vergleich mehrerer, parametrisch verteilter Stichproben mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) mit Bonferroni-Korrektur errechnet. Im Fall des Vergleichs zweier Stichproben, für die ebenfalls eine parametrische Verteilung angenommen wurde, kam der zweiseitige Student t-Test zur Anwendung. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten $<0,05$ beziehungsweise $p < 0,01$ angenommen und ist durch Markierung mit * beziehungsweise ** graphisch gekennzeichnet. Bei den Tumorthapieversuchen wurden *log-rank*-Test (Überleben), Mann-Whitney Test (Tumorgröße) sowie *Fisher's exact test* (Tumorinzidenz nach Tumorreinduktion) angewandt.

Sämtliche, statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm PASW Statistics 18.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Die rechnerische Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte mit Hilfe der Programme Microsoft Office 2008 (Microsoft Corp., Redmond, USA) und Adobe Creative Suite CS4 (Adobe Systems, San Jose, USA).

5 ERGEBNISSE

5.1 Immuntherapie mit DC und CpG ist wirksamer zur Behandlung muriner C26-Tumore als Chemotherapie

In unserer Abteilung war das bereits beschriebene, optimierte Immuntherapieschema, bestehend aus einer Vakzine mit *in vitro* Tumorzell-gepulsten und CpG-aktivierten, syngen DC sowie einem simultan, peritumoral applizierten CpG-Bolus, zur Objektivierung seiner therapeutischen Wirkstärke im murinen C26-Modell bereits mit Chemotherapie verglichen worden. Als Zytostatikum war für diese Experimente 5-FU gewählt worden, da der Pyrimidin-Antimetabolit in der klinischen Therapie kolorektaler Karzinome seit Langem erfolgreich eingesetzt wird. 5-FU war in der höchsten Dosis appliziert worden, die von den Mäusen ohne erheblichen Gewichtsverlust toleriert wurde (50 mg/kg), hatte aber im Gegensatz zur Immuntherapie keine nennenswerte Verlangsamung des Tumorwachstums erzielt [Heckelsmiller 2002a].

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst geprüft werden, ob das etablierte Immuntherapieschema zur Behandlung subkutan induzierter, muriner C26-Tumore generell geeigneter ist als konventionelle Chemotherapie. Neben 5-FU wurde mit Irinotecan ein zweites Zytostatikum verwendet, das sich im Rahmen der systemischen Therapie fortgeschrittener, kolorektaler Karzinome als äußerst effizient erwiesen hat [Fuchs, 2006; Saunders 2006].

5.1.1 Immuntherapie mit DC und CpG induziert effizientere Tumorrückbildung als Chemotherapie

Das aus DC-Vakzine und CpG-Bolus bestehende Immuntherapieprotokoll wurde hinsichtlich antitumoraler Effektivität mit verschiedenen Dosen der Zytostatika 5-FU und Irinotecan verglichen (Abb. 5.1).

DC-Vakzine und CpG-Bolus führten bei Applikation nach oben beschriebenen Protokoll bei vier von fünf Mäusen, noch vor Therapieende, zu komplettem, makroskopischen Rückgang der initial subkutan tastbaren C26-Tumore. Zwei Tiere dieser Gruppe blieben dauerhaft tumorfrei. Die Immuntherapie wurde von den Versuchstieren insgesamt ohne Auftreten schwererer Nebenwirkungen gut toleriert.

Trotz des Therapiebeginns bei kleineren Tastbefunden konnten im Gegensatz dazu weder 5-FU noch Irinotecan in Dosisstufen mit moderater Toxizität (5-FU: 50 mg/kg und 75 mg/kg; Irinotecan: 250 mg/kg) das Wachstum der C26-Tumore nachhaltig verlangsamen oder gar zum Stillstand bringen. Während die niedrigste 5-FU-Dosis (50 mg/kg) das Tumorstadium zu keinem Zeitpunkt kontrollieren konnte, führten sowohl die höhere 5-FU-Dosis (75 mg/kg) als auch Irinotecan initial zu einem transienten Wachstumsstopp von ungefähr einer Woche. Danach begannen die Tumore allerdings in beiden Gruppen wieder mit ähnlicher Geschwindigkeit zu wachsen wie bei unbehandelten Kontrolltieren.

Eine weitere Dosisintensivierung von 5-FU (100 mg/kg) führte zwar schnell und ähnlich effektiv wie die Immuntherapie zum Tumorrückgang, wirkte jedoch letal. So starben in dieser Gruppe vier von fünf Mäusen, trotz rückläufiger C26-Tastbefunde, sieben Tage nach der ersten Chemotherapie im Zeitraum der maximalen Ausprägung der 5-FU-induzierten, hämatologischen Toxizität. Drei dieser Tiere waren zum Zeitpunkt ihres Todes makroskopisch in Remission. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich auch für Irinotecan, das bei zwei von insgesamt fünf behandelten Mäusen bereits unmittelbar nach der ersten dosisintensivierten Injektion (350 mg/kg) letal wirkte. Die Tumore der drei restlichen Mäuse aus dieser Gruppe zeigten sich in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit im weiteren Verlauf zwar verlangsamt, eine komplette Remission erreichte dennoch keines dieser Tiere (Daten nicht gezeigt).

Bereits vor Therapieabschluss waren die tastbaren Tumore nach Immuntherapie mit DC und CpG im Mittel signifikant kleiner als nach Chemotherapie mit nicht-letalen 5-FU-Dosen oder mit Irinotecan. Somit zeigt das Immuntherapieprotokoll mit DC und CpG im murinen C26-Modell auch bei kleineren Tumoren eine deutlich bessere, antitumorale Wirkung als Chemotherapie mit 5-FU oder Irinotecan, unabhängig von der jeweils eingesetzten Dosis der Zytostatika.

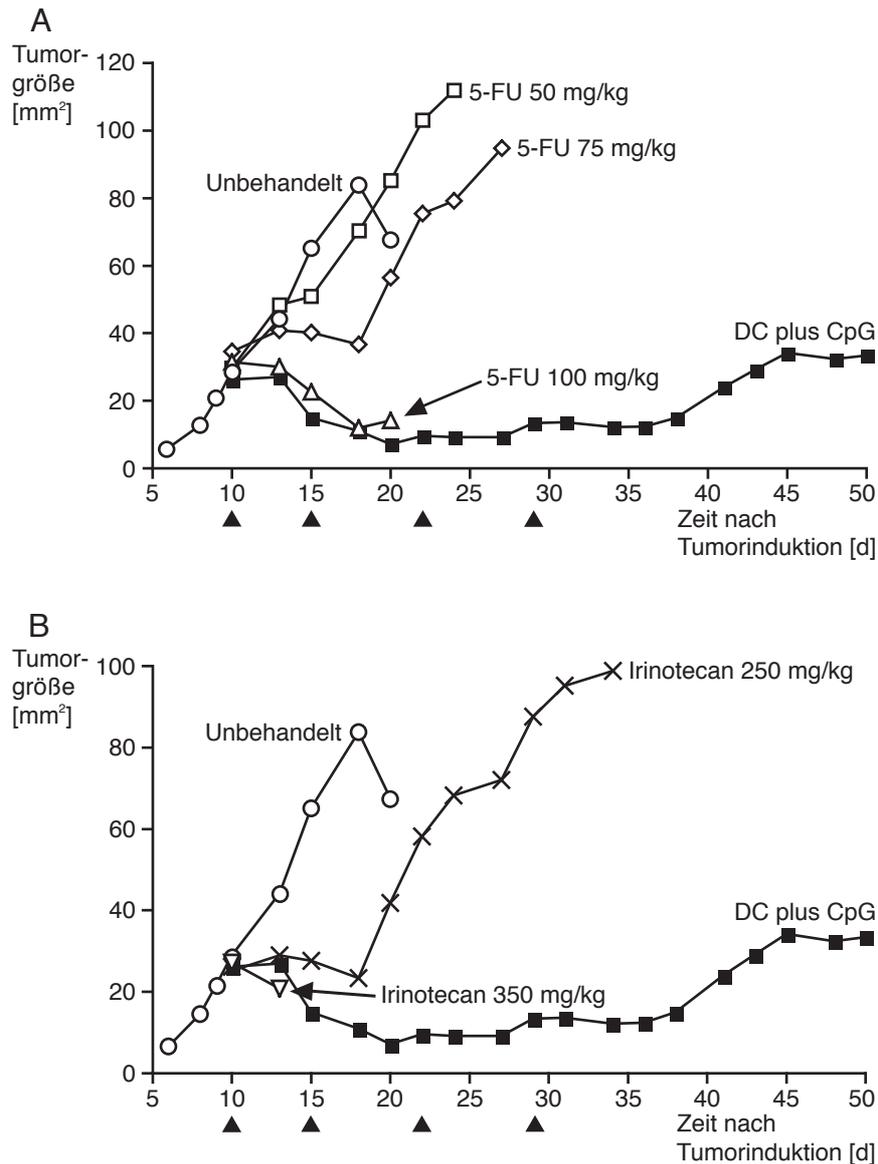


Abb. 5.1: Immuntherapie mit DC und CpG entfaltet im C26-Modell eine effizientere, antitumorale Wirkung als Chemotherapie.

Die Graphen zeigen jeweils den mittleren Tumorgößenverlauf in den einzelnen Therapiegruppen (n=5). Therapiezeitpunkte sind durch schwarze Pfeilspitzen markiert. Die verschiedenen Dosisstufen von 5-FU und Irinotecan wurden der Übersichtlichkeit halber auf zwei Abbildungen verteilt. Für unbehandelte Kontrollen und mit Immuntherapie (DC plus CpG) behandelte Tiere werden in beiden Abbildungen die gleichen Daten gezeigt. **(A)** DC plus CpG führt im Verlauf nicht nur zu signifikanter Verkleinerung der tastbaren Tumorbefunde verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren, sondern auch mit Mäusen, die mit 50 mg/kg 5-FU ($p < 0,02$ für alle Zeitpunkte ab Tag 15) oder mit 75 mg/kg 5-FU ($p < 0,02$ ab Tag 18) behandelt wurden. **(B)** Vergleichbare Ergebnisse mit effizienterer, antitumoraler Wirkung der Immuntherapie zeigt auch der Vergleich von DC plus CpG mit verschiedenen Dosen des Topoisomerase I-Inhibitors Irinotecan (250 mg/kg Irinotecan: $p < 0,02$ ab Tag 20; 350 mg/kg Irinotecan: $p < 0,04$ zwischen Tag 22 und Tag 27; n. s. für spätere Zeitpunkte). Ähnliche Ergebnisse ergaben sich in zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

5.1.2 Nach Immuntherapie mit DC und CpG leben tumortragende Mäuse länger als nach Chemotherapie

Vier von fünf Mäusen überlebten das Immuntherapieprotokoll mit DC und CpG. Zwei von ihnen blieben dauerhaft tumorfrei und konnten in ein Experiment zur Untersuchung der Therapie-induzierten, spezifischen Gedächtnisimmunität eingeschlossen werden. Da Balb/c Mäuse ohne Therapie 21 bis 42 Tage nach C26-Tumorinduktion verstarben, verlängerte die Immuntherapie mit DC und CpG das Gesamtüberleben signifikant verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren (Abb. 5.2).

Im Gegensatz dazu führten weder Chemotherapie mit 5-FU noch mit Irinotecan in einer der verschiedenen Dosierungen zu einer nachhaltigen Verlängerung der Überlebenszeit im Vergleich zu unbehandelten Kontrollmäusen.

Eine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens brachte die Immuntherapie mit DC und CpG nicht nur im Vergleich zu unbehandelten Kontrollmäusen, sondern auch verglichen mit allen 5-FU-Gruppen und der Gruppe, die mit hochdosiertem Irinotecan (350 mg/kg) behandelt worden war. Lediglich zu den Mäusen, die Irinotecan in niedrigerer Dosis (250 mg/kg) erhalten hatten, bestand ein geringerer Unterschied hinsichtlich der Überlebenszeit, da die Tiere dieser Gruppe, bedingt durch den transienten Tumorwachstumsstopp nach Therapiebeginn, etwas, obgleich nicht signifikant, länger überlebten als unbehandelte Kontrollmäuse.

In den Versuchen zur vorliegenden Arbeit war tumorfreies Langzeitüberleben im C26-Modell nur nach Immuntherapie mit DC und CpG zu erreichen. Somit ist das Überleben nach Immuntherapie insgesamt deutlich länger als nach Chemotherapie mit 5-FU oder Irinotecan.

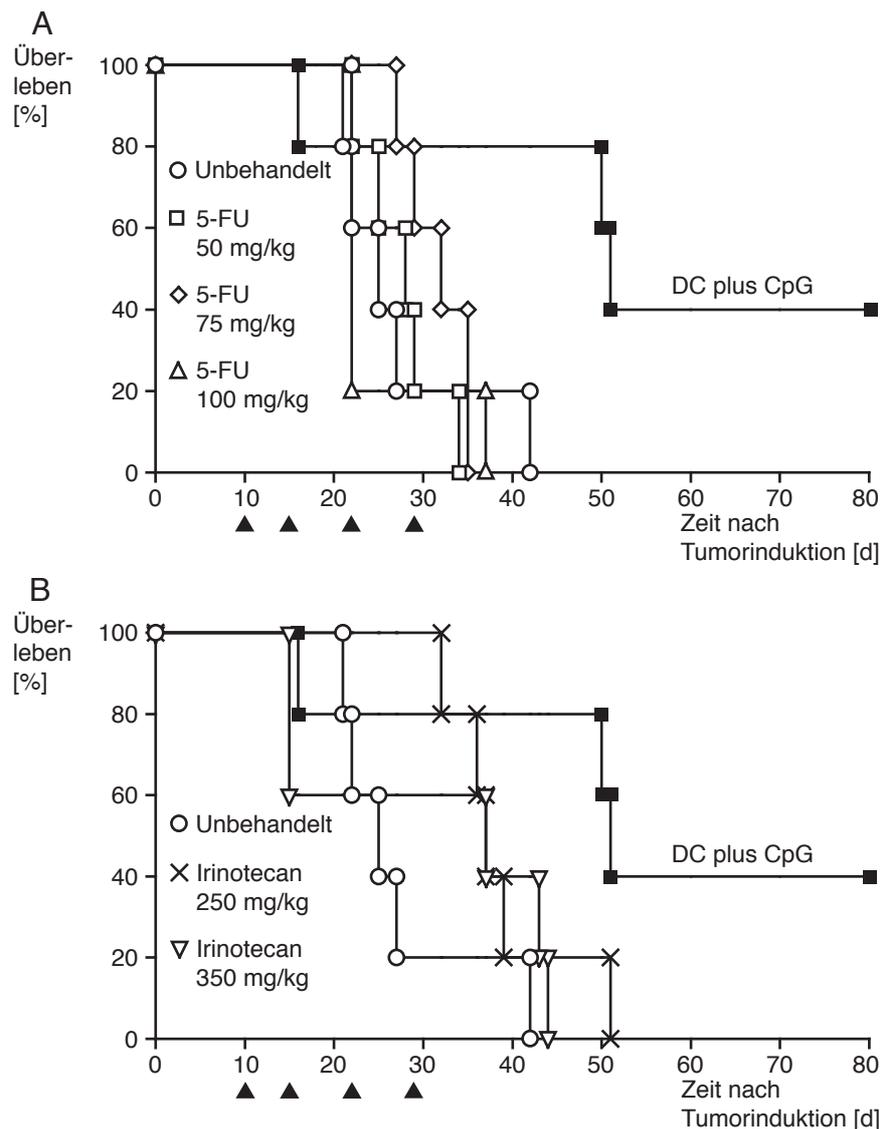


Abb. 5.2: Im C26-Modell überleben Mäuse nach Immuntherapie mit DC und CpG länger als nach Chemotherapie.

Die Abbildung zeigt das prozentuale Überleben in den Therapiegruppen, deren mittlerer Tumorgößenverlauf in Abb. 5.1 dargestellt ist (n=5). Der besseren Übersicht halber wurden auch hier die Daten zu den verschiedenen Dosisstufen von 5-FU und Irinotecan auf zwei Abbildungen aufgeteilt. Markierung der Therapiezeitpunkte durch schwarze Pfeilspitzen. **(A)** Immuntherapie mit DC plus CpG verlängert das Überleben tumortragender Mäuse signifikant, sowohl im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren (p=0.034), als auch im Vergleich zu allen Gruppen, denen 5-FU in verschiedenen Dosen appliziert wurde (50 mg/kg: p=0,034; 75 mg/kg: p=0,043; 100 mg/kg: p=0,040). Chemotherapie mit 5-FU führt in keiner Dosierung zu einer Überlebensverlängerung verglichen mit unbehandelten Tieren. **(B)** Chemotherapie mit Irinotecan verlängert das Überleben ebenfalls nicht signifikant im Vergleich zu untherapierten Kontrollmäusen (250 mg/kg: p=0,1576; 350 mg/kg: p=0,3282). Nach Behandlung mit DC plus CpG ist das Gesamtüberleben signifikant länger als nach Chemotherapie mit 350 mg/kg Irinotecan (p=0,020), wohingegen zum Überleben nach Behandlung mit 250 mg/kg Irinotecan kein statistisch signifikanter Unterschied besteht (p=0,120). Auch für das Überleben ergaben sich ähnliche Daten in zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

5.2 Im C26-Modell ist Immuntherapie mit DC und CpG ohne Effektivitätsverlust mit Chemotherapie kombinierbar

5.2.1 Potente, antitumorale Wirkung der Immuntherapie mit DC und CpG bleibt bei Kombination mit 5-FU bestehen

Bei Kombination mit DC und CpG wurde 5-FU immer in der Dosierung appliziert, für die eine gute, antitumorale Effektivität im C26-Modell gezeigt worden war (100 mg/kg). Auch im hier beschriebenen Experiment wurden die tastbaren Tumorbefunde bereits kurz nach Behandlungsbeginn mit 5-FU deutlich kleiner (Abb. 5.3A). Allerdings starben, wie in den vorigen Versuchen, erneut insgesamt vier der fünf Mäuse, die die dosisintensive 5-FU-Therapie erhalten hatten, makroskopisch praktisch tumorfrei, zwischen zehn und 13 Tagen nach der ersten Injektion aufgrund von Chemotherapiebedingter Toxizität. Immuntherapie mit DC und CpG führte auch im aktuellen Experiment noch vor Abschluss des Protokolls zur kompletten Remission bei vier von fünf behandelten Tieren, die alle langfristig rezidivfrei blieben (Abb. 5.3B).

Die Kombination von Immuntherapie und 5-FU erwies sich erfreulicherweise als ebenso effektiv wie beide Komponenten alleine. So waren bereits fünf Tage nach Therapiebeginn die Tumore sowohl bei Tieren, die nur mit DC und CpG behandelt wurden, als auch in der Kombinationsgruppe mit 5-FU im Mittel signifikant kleiner als bei unbehandelten Kontrolltieren. Besonders interessant war allerdings die Beobachtung, dass die 5-FU-assoziierte Toxizität bei gemeinsamer Applikation mit der Immuntherapie komplett aufgehoben schien. Während vier der fünf Mäuse aus der 5-FU-Monotherapiegruppe trotz guten Ansprechens ihrer Tumore wie erwähnt starben bevor alle vier Injektionen verabreicht worden waren, war das Überleben bei Kombination von 5-FU mit DC und CpG praktisch identisch mit dem nach alleiniger Immuntherapie. In beiden Gruppen überlebten alle fünf Mäuse das Therapieschema. Es starb lediglich jeweils ein Tier, das auf die Behandlung primär nicht angesprochen hatte, ungefähr 40 Tage nach Tumorinduktion. Demzufolge erreichten in beiden Gruppen vier Tiere eine komplette Remission, von denen insgesamt nur eine Maus, die das Kombinationsprotokoll erhalten hatte, im späteren Beobachtungszeitraum ein Rezidiv erlitt.

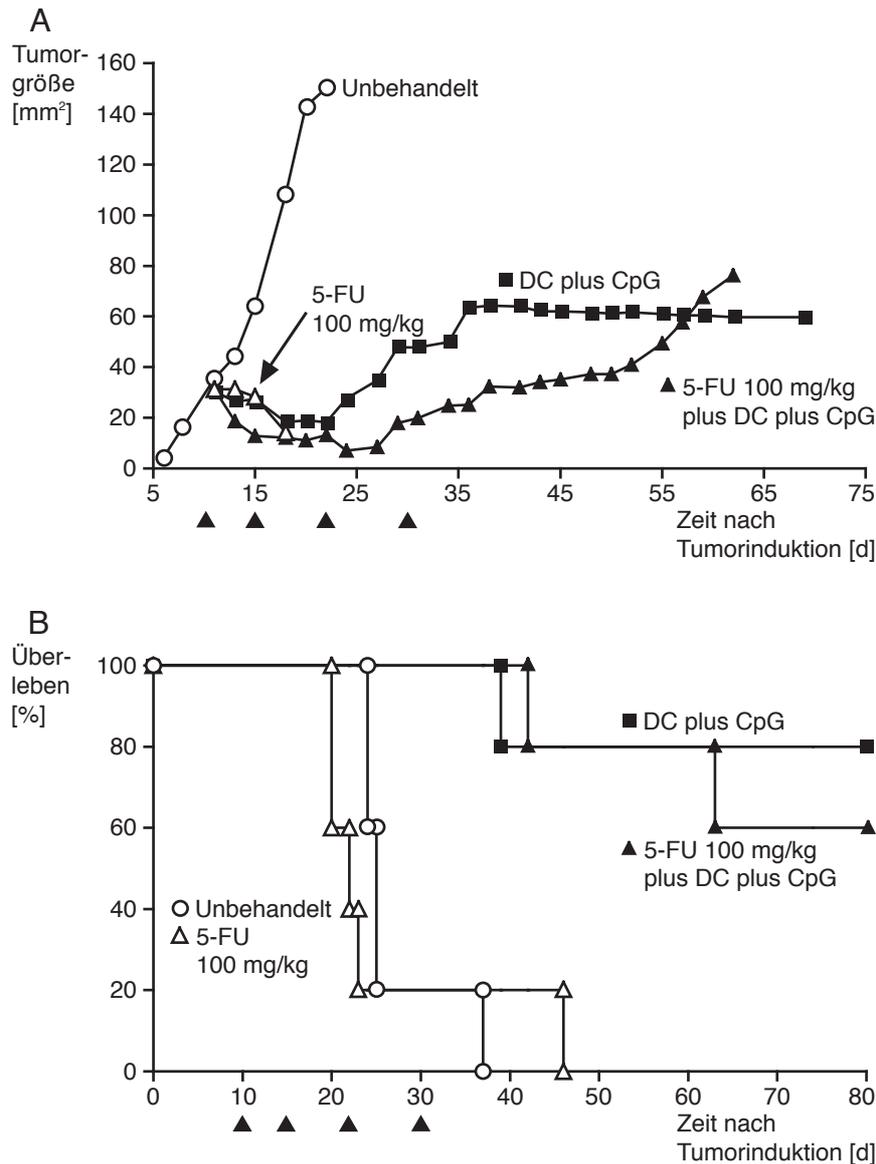


Abb. 5.3: Effiziente, antitumorale Wirkung der Immuntherapie mit DC und CpG bleibt auch bei zeitgleicher Chemotherapie mit 5-FU bestehen.

(A) Die Abbildung zeigt die mittlere Tumorgöße bei den einzelnen Therapiegruppen (n=5) im Zeitverlauf. Therapiezeitpunkte sind durch schwarze Pfeilspitzen markiert. Sowohl die alleinige Immuntherapie mit DC plus CpG als auch ihre Kombination mit 5-FU führt bereits kurze Zeit nach Therapiebeginn zum signifikanten Tumorrückgang verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren (DC plus CpG und 5-FU 100 mg/kg plus DC plus CpG: $p < 0,02$ für sämtliche Zeitpunkte ab Tag 15). (B) Mäuse, die das Immuntherapieprotokoll entweder alleine oder in Kombination mit 5-FU erhalten haben, überleben signifikant länger als die unbehandelte Kontrollgruppe ($p = 0,002$) und auch signifikant länger als Tiere, die nur mit 5-FU therapiert wurden ($p = 0,006$). Sowohl hinsichtlich Tumorrückgang als auch Überleben ergaben sich ähnliche Ergebnisse in zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

Somit kann die Immuntherapie mit DC und CpG ohne Beeinträchtigung ihrer guten, antitumoralen Wirksamkeit mit 5-FU kombiniert werden. Die Ergebnisse zeigen zudem, dass die Immuntherapie bei simultaner Behandlung mit 5-FU vor dessen Substanz-assoziierten Toxizität schützen kann und so langfristig tumorfreies Überleben trotz dosisintensiver Chemotherapie ermöglicht. Ergebnisse einer genaueren Untersuchung dieses protektiven Effekts werden später ausführlich dargelegt.

5.2.2 Immuntherapie mit DC und CpG kann im C26-Modell effizient mit Irinotecan kombiniert werden

Im Experiment zur Untersuchung möglicher Interaktionen zwischen Irinotecan und Immuntherapie aus DC und CpG wurde die Behandlung erst am Tag 15 nach Tumorinduktion bei einer mittleren Tumorgröße von 60 mm² begonnen. Da bei größerer Tumorlast eine schwächere, antitumorale Wirkung der Immuntherapie zu erwarten ist, sollten durch den späteren Therapiebeginn mögliche, geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen besser sichtbar werden. Im Übrigen entsprach der Ablauf des Experiments dem der übrigen TumortheraPIeversuche.

Kombination mit Irinotecan in zwei verschiedenen Dosen (200 mg/kg beziehungsweise 400 mg/kg) hatte keinen Einfluss auf die antitumorale Effizienz des Immuntherapieprotokolls (Abb. 5.4). Simultane Chemotherapie führte weder zu einer Beeinträchtigung der Immuntherapie-induzierten Tumorrückbildung noch zu synergistischen Effekten mit der Immuntherapie. So war das Überleben nach Tumorinduktion sowohl bei Tieren, die nur mit DC und CpG behandelt worden waren, als auch in beiden Gruppen, die zusätzlich Irinotecan in einer der beiden Dosierungen erhalten hatten, ähnlich und signifikant länger als bei unbehandelten Kontrolltieren.

Daraus ergibt sich zusammenfassend, dass die Behandlung mit DC und CpG zur erfolgreichen Therapie muriner C26-Tumore auch mit Irinotecan kombiniert werden kann, ohne die antitumorale Wirksamkeit der Immuntherapie zu beeinträchtigen. Erkenntnisse dieser Art sind gerade für die klinische Therapie fortgeschrittener Tumorleiden essenziell, da in derartigen Situationen, auch während der Prüfung von Immuntherapieprotokollen, oft auf systemische Chemotherapien nicht verzichtet werden kann.

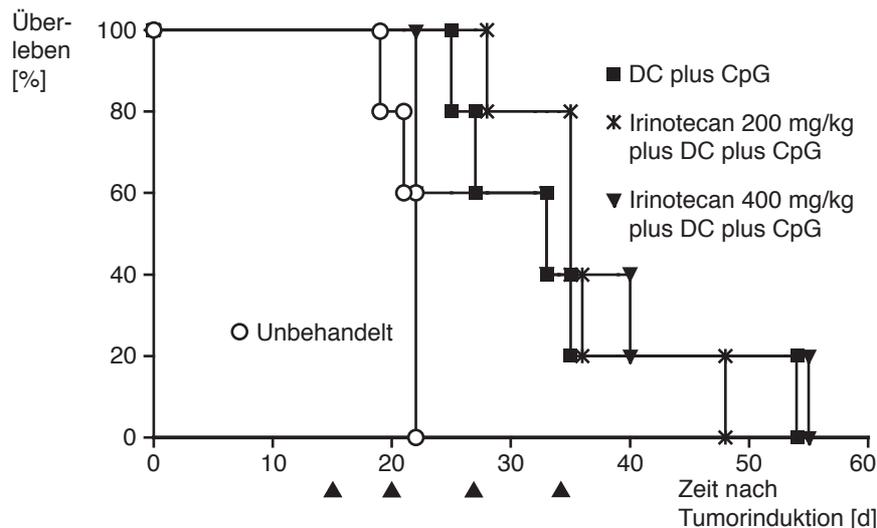


Abb. 5.4: Immuntherapie mit DC und CpG kann im C26-Modell ohne Verkürzung des Gesamtüberlebens mit Irinotecan kombiniert werden.

Die Abbildung zeigt das Überleben in den einzelnen Therapiegruppen (n=5). Zeitpunkte der in diesem Experiment etwas später begonnenen Therapie sind durch schwarze Pfeilspitzen markiert. Sämtliche Gruppen, die mit der Immuntherapie aus DC plus CpG entweder alleine oder in Kombination mit Irinotecan behandelt worden sind, leben ähnlich lange und signifikant länger als die Tiere aus der unbehandelten Kontrollgruppe (DC plus CpG: p=0,003; Irinotecan 200 mg/kg plus DC plus CpG: p=0,003; Irinotecan 400 mg/kg plus DC plus CpG: p=0,029). Ähnliche Ergebnisse ergaben sich in zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

5.2.3 Immuntherapie-vermittelte Zytokinproduktion wird von eingesetzten Zytostatika unterschiedlich beeinflusst

Als Indikator der systemischen Immunstimulation sind kurze Zeit nach Applikation der hier eingesetzten Immuntherapie *in vivo* verschiedene, für eine T_H1-Immunantwort typische und für eine erfolgreiche Tumorabstoßung essenzielle Zytokine im murinen Serum nachweisbar.

Im hier gezeigten Experiment sollte untersucht werden, ob die Zytokinproduktion durch zeitgleich mit der Immuntherapie verabreichte Zytostatika beeinträchtigt wird. Tumortragenden Mäusen wurde zwei Stunden nach der ersten Therapieapplikation am Tag zehn nach Tumorinduktion Blut entnommen und aus dem daraus gewonnenen Serum mittels ELISA die jeweils vorliegende Menge an IL-6 beziehungsweise IL-12p70 bestimmt. Nach Applikation von DC und CpG konnten IL-6 und IL-12p70 erwartungsgemäß in hohen Konzentrationen gemessen werden (Abb. 5.5).

Während die Kombination der Immuntherapie mit 5-FU keine Veränderung der induzierten Zytokinspiegel zur Folge hatte, reduzierte Irinotecan die messbaren Serumspiegel beider Zytokine deutlich.

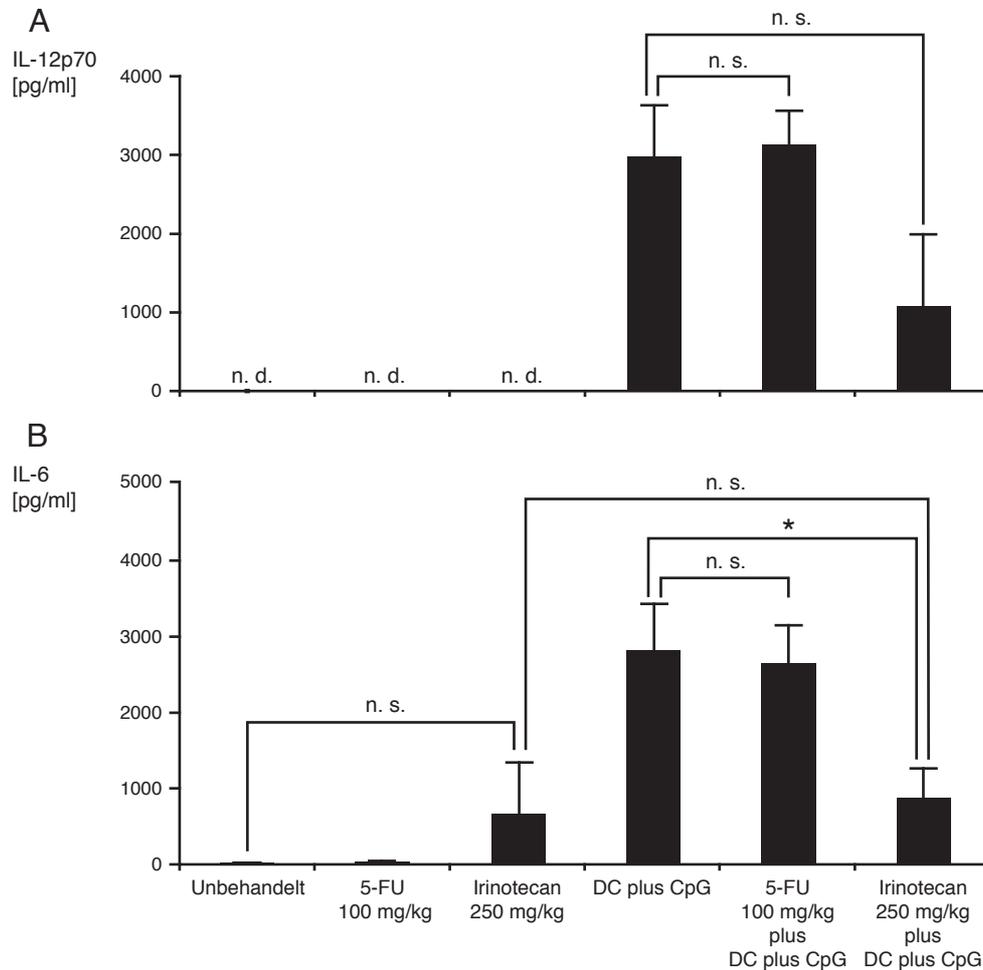


Abb. 5.5: Irinotecan führt bei Kombination mit DC und CpG, anders als 5-FU, zur Verringerung der Immuntherapie-induzierten Zytokinproduktion.

Die Abbildung zeigt Serumspiegel von IL-12p70 (A) und IL-6 (B) bei tumortragenden Mäusen zwei Stunden nach der ersten Applikation von Immuntherapie mit DC plus CpG, Chemotherapie mit 5-FU beziehungsweise Irinotecan oder einer Kombination beider Behandlungen. Graphisch wird jeweils das arithmetische Mittel der Werte von fünf Mäusen pro Therapiegruppe mit dem Standardmessfehler (SEM) gezeigt. **(A)** Die Menge an systemisch messbarem IL-12p70 unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gruppen, die DC plus CpG entweder alleine oder zeitgleich mit 5-FU beziehungsweise Irinotecan erhalten haben (n. d.: nicht detektierbar). **(B)** Bei Kombination der Immuntherapie mit Irinotecan ist IL-6 zwei Stunden nach der Behandlung systemisch in signifikant geringerer Menge nachweisbar als nach Applikation von DC plus CpG alleine (*, $p=0,030$).

Interessanterweise korrelieren die erniedrigten Interleukinspiegel bei Kombination der Immuntherapie mit Irinotecan nicht mit einer schlechteren, therapeutischen Potenz der Kombination im Vergleich zur Immuntherapie alleine. Beide Behandlungen zeigten, wie bereits beschrieben, ähnliche Effizienz hinsichtlich antitumorale Wirkung und Überlebensverlängerung. Daraus ergibt sich, dass entweder auch eine geringere Immunstimulation bereits wirksame, antitumorale Aktivität vermitteln kann oder aber, dass weitere, im vorliegenden Experiment nicht berücksichtigte Vorgänge entscheidend an der Ausbildung der Immunantwort beteiligt sind.

5.2.4 5-FU-Applikationen beeinträchtigen durch DC und CpG induzierte, protektive Gedächtnisimmunität nicht

Vorarbeiten unserer Abteilung haben ergeben, dass Mäuse, die ihren Tumor nach erfolgreicher Immuntherapie mit DC oder CpG abstoßen konnten, langfristig gegen nachfolgende Induktionen mit denselben Tumorzellen geschützt sind. An der Vermittlung dieser protektiven Gedächtnisimmunität sind CD8⁺ T-Zellen entscheidend beteiligt [Brunner 2000; Heckelsmiller, 2002b]. In der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, ob zeitgleich mit der in den Experimenten eingesetzten Immuntherapie aus DC und CpG applizierte Zytostatika die Ausbildung einer spezifischen Gedächtnisantwort beeinträchtigen.

Zu diesem Zweck wurden aus drei verschiedenen Versuchen Mäuse zusammengefasst, die einen etablierten C26-Tumor entweder nach alleiniger Behandlung mit DC und CpG oder nach Kombination des Immuntherapieprotokolls mit 5-FU abgestoßen hatten und langfristig geheilt geblieben waren. Diesen Tieren wurde zwischen 91 und 293 Tagen nach der letzten Behandlung noch einmal die gleiche Menge an C26-Zellen wie bei der initialen Tumorinduktion subkutan in die kontralaterale Flanke inokuliert. Nachfolgend wurde beobachtet, ob die Tiere vor einer erneuten Tumorbildung geschützt waren (Abb. 5.6).

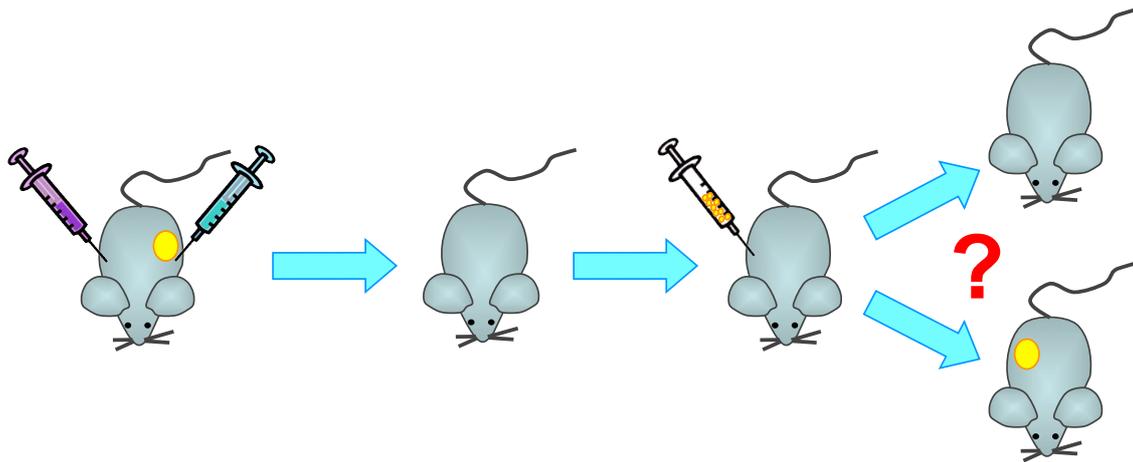


Abb. 5.6: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Prüfung der protektiven Gedächtnisimmunität.

Tab. 5.1: Immuntherapie mit DC und CpG induziert auch bei Kombination mit 5-FU eine lang anhaltende, protektive Gedächtnisimmunität.

Versuchsnummer	Zeit nach Therapieende [d]	Anzahl der Tiere aus verschiedenen Therapiegruppen mit erneuter Tumorbildung im Reinduktionsexperiment		
		Unbehandelt	DC plus CpG	5-FU plus DC plus CpG
Kontrollen	–	4 von 4		
1	91		1 von 2	0 von 2
2	153		2 von 4	0 von 3
3	293		0 von 2	0 von 2
<i>Gesamt</i>		4 von 4	3 von 8	0 von 7

Mäuse, die entweder nach Therapie mit DC plus CpG alleine oder nach Kombination der Immuntherapie mit 5-FU einen C26-Tumor erfolgreich abgestoßen und dauerhaft tumorfrei überlebt haben, sind durch suffiziente Gedächtnisimmunität auch nach erneuter, subkutaner C26-Injektion vor der Bildung eines makroskopisch tastbaren Tumors geschützt. C26-naive Mäuse dienen als Kontrollen. Die Inzidenz erneuter Tumorbildung ist in der Gruppe, die ihren Tumor initial nach Kombination von Immuntherapie und 5-FU abgestoßen hat, signifikant geringer als bei naiven Kontrolltieren ($p=0,003$). In der Gruppe, die nach alleiniger Immuntherapie dauerhaft tumorfrei geblieben ist, ist die Inzidenz erneuter Tumorbildung zwar nicht statistisch signifikant geringer verglichen mit naiven Mäusen ($p=0,071$), jedoch auch nicht signifikant geringer als bei Tieren, die ihren Tumor initial nach Kombination von Immun- und Chemotherapie abgestoßen haben ($p=0,123$).

Die vier naiven Kontrolltiere, denen zeitgleich dieselbe Anzahl an C26-Zellen injiziert worden war, entwickelten alle innerhalb weniger Tage einen makroskopisch tastbaren Tumor. Im Gegensatz dazu waren nach erfolgreicher Immuntherapie mit DC und CpG fünf von acht Mäusen vor erneuter Tumorbildung geschützt (Tab. 5.1). In der Gruppe, die den Tumor initial nach Kombination von Immuntherapie und 5-FU abgestoßen hatte, blieben sogar alle sieben Tiere nach Reinduktion langfristig tumorfrei.

Diesen Ergebnissen zufolge wird die Ausbildung der spezifisch antitumoralen Gedächtnisimmunität, die im Rahmen des Immuntherapieprotokolls mit DC und CpG sehr zuverlässig erfolgt, durch zeitgleiche Chemotherapie mit 5-FU nicht beeinträchtigt.

5.3 CpG schützt vor Chemotherapie-assoziiertes Toxizität

In den im Kapitel 5.2.1 beschriebenen Experimenten war in zwei voneinander unabhängigen Versuchen aufgefallen, dass die Immuntherapie aus DC und CpG in Kombination mit dosisintensivem 5-FU, bei mindestens gleich starker, antitumoraler Potenz, im C26-Modell einen klaren Überlebensvorteil im Vergleich zu alleiniger Chemotherapie bedeutet (Abb. 5.3B).

Es ist bekannt, dass CpG neben zahlreichen immunstimulatorischen Effekten [Krieg, 2002] auch die extramedulläre Hämatopoese steigern [Sparwasser, 1999] sowie hämatopoetische Vorläuferzellen ins periphere Blut mobilisieren kann [Nardini, 2005]. Daher war die Annahme, CpG sei für die Vermittlung der beobachteten Protektion verantwortlich, durchaus nahe liegend.

Der letzte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit einer genaueren Charakterisierung CpG-vermittelter Effekte im murinen Organismus –mit oder ohne zeitgleiche Chemotherapie–, um Einblicke in die Mechanismen zu gewinnen, die der *in vivo* beobachtbaren Protektion zugrunde liegen.

5.3.1 Bei Kombination mit CpG werden vom murinen Organismus deutlich höhere 5-FU-Dosen toleriert

5.3.1.1 Chemoprotektive Effekte sind CpG-vermittelt und unabhängig vom C26-Modell reproduzierbar

Zunächst sollte der im Rahmen der Tumorexperimente beobachtete Effekt unabhängig vom C26-Modell reproduziert werden. Zu diesem Zweck wurden naiven, weiblichen Balb/c Mäusen zweimal im Abstand von fünf Tagen entweder nur 5-FU (100 mg/kg) zusammen mit Leucovorin (LV) intraperitoneal injiziert oder sie erhielten zusätzlich ein subkutanes CpG-Depot (100 µg). Das Überleben der Versuchstiere sollte zunächst von der ersten Substanzapplikation an 20 Tage lang kontrolliert werden, da über diesen Zeitraum hinaus nicht mehr mit dem Auftreten 5-FU-assoziiertes, letaler Toxizität zu rechnen ist [Harrison, 1978]. Im Verlauf bestätigte sich diese Annahme, da die überlebenden Tiere auch nach Ausweitung des Kontrollzeitraums auf 100 Tage nach Behandlungsbeginn sämtlich noch am Leben waren.

In weiterführenden Experimenten zur Analyse der dem beobachteten Überlebensvorteil zugrundeliegenden Mechanismen, wurden die Mäuse nach Substanzapplikationen an Tag 0 und Tag 5 am Tag 10 der Versuche getötet und anschließend peripheres Blut, Milz und Knochenmark untersucht (Abb. 5.7).

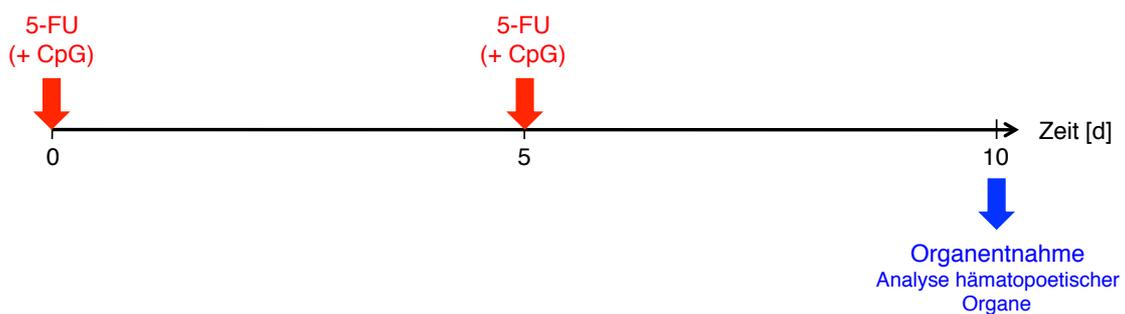


Abb. 5.7: Schematische Darstellung von Aufbau und zeitlichem Ablauf der Experimente zu CpG-vermittelter Protektion vor 5-FU-bedingter Toxizität.

Wie erwartet war 5-FU in der eingesetzten Dosis auch für nicht-tumortragende Tiere toxisch (Abb. 5.8). Alle Mäuse, denen das Zytostatikum alleine verabreicht worden war,

starben innerhalb von 16 Tagen nach der ersten Applikation. Im Gegensatz dazu lag das Gesamtüberleben in der Gruppe, die zusätzlich CpG erhalten hatte, bei 60 %.

Dieses Ergebnis ließ auf protektive Effekte schließen, die wohl CpG-vermittelt auftreten, da im beschriebenen Experiment keine DC im Behandlungsschema enthalten waren.

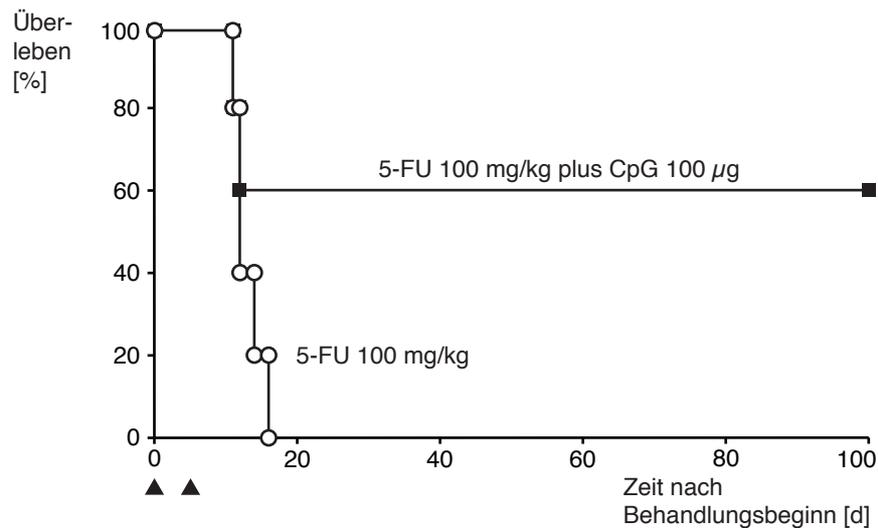


Abb. 5.8: Durch gemeinsame Applikation mit CpG wird dosisintensive Chemotherapie mit 5-FU deutlich besser toleriert.

Die Abbildung zeigt das Überleben in beiden Therapiegruppen (n=5), das insgesamt über 100 Tage beobachtet wurde. Therapiezeitpunkte sind durch schwarze Pfeilspitzen markiert. Trotz 60 %-iger Gesamtüberlebensrate nach Behandlung mit 100 mg/kg 5-FU plus 100 µg CpG besteht hier statistisch kein signifikanter Unterschied zum Überleben nach alleiniger Chemotherapie (p=0.119).

5.3.1.2 CpG-vermittelter Überlebensvorteil bei Kombination mit 5-FU nur in engem therapeutischen Bereich nachweisbar

Im nächsten Schritt sollte die Toxizität der 5-FU-Behandlung gesteigert werden, um das protektive CpG-Potential stärker zum Tragen kommen zu lassen. Aus diesem Grund wurde die Zytostatikadosis auf jeweils 120 mg/kg 5-FU pro Applikation erhöht. Im Übrigen war das Behandlungsschema mit dem oben beschriebenen identisch. Während alle Mäuse, die kein schützendes CpG erhalten hatten, nun innerhalb von zehn bis zwölf Tagen nach der ersten 5-FU-Therapie Toxizitäts-bedingt verstarben, war die Überlebensrate bei gleichzeitiger CpG-Applikation (je 100 µg) mit 60 % signifikant höher (Abb. 5.9A). Die CpG-vermittelten Effekte zeigten sich allerdings stark

von der applizierten Dosis abhängig. So überlebten bei zeitgleicher Injektion einer niedrigeren CpG-Dosis ($50 \mu\text{g}$) nur 40 % der Tiere die letale Chemotherapie. Eine Steigerung der verabreichten CpG-Menge auf $150 \mu\text{g}$ pro Injektion brachte keine weitere Verbesserung der Langzeitüberlebensrate mit sich.

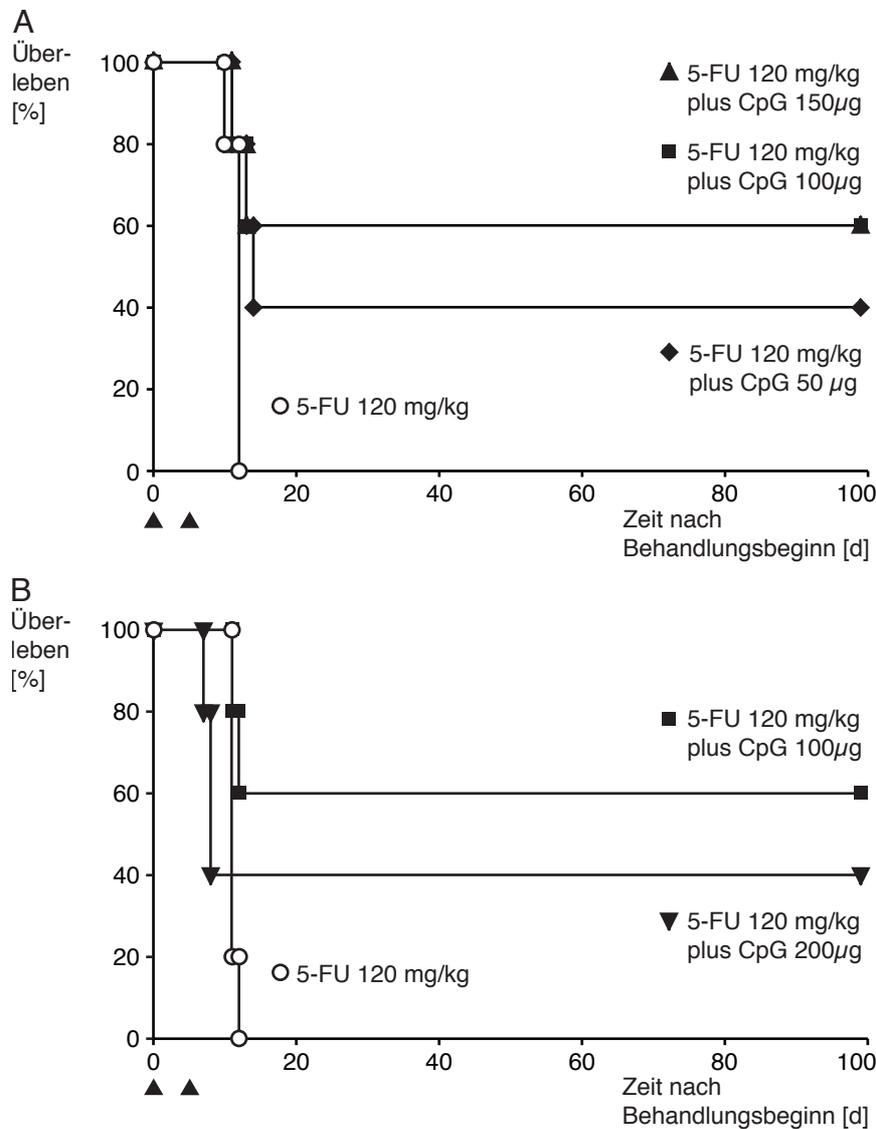


Abb. 5.9: Die beobachteten, protektiven Effekte bei Kombination mit 5-FU vermittelt CpG nur in einem engen therapeutischen Bereich.

Die Abbildung zeigt jeweils das prozentuale Überleben in den einzelnen Behandlungsgruppen ($n=5$), das insgesamt ebenfalls über 100 Tage beobachtet wurde. Therapiezeitpunkte sind durch schwarze Pfeilspitzen markiert. **(A)** Durch zeitgleiche Injektion von $100 \mu\text{g}$ CpG wird die hoch dosierte 5-FU-Therapie (120 mg/kg) signifikant besser überlebt ($p=0,047$). Weder eine niedrigere noch eine höhere CpG-Dosis ($50 \mu\text{g}$ beziehungsweise $150 \mu\text{g}$) vermitteln in Kombination mit 5-FU in derselben Dosierung einen signifikanten Unterschied verglichen mit dem Überleben nach Chemotherapie alleine (jeweils $p=0,126$). **(B)** Auch bei zeitgleicher Applikation mit $200 \mu\text{g}$ CpG unterscheidet sich die Überlebensrate nicht signifikant von der nach alleiniger Chemotherapie mit 5-FU (120 mg/kg ; $p=0,863$). Das signifikant verbesserte Gesamtüberleben nach 5-FU-Therapie (120 mg/kg) bei zeitgleicher Applikation von $100 \mu\text{g}$ CpG ist reproduzierbar ($p=0,030$).

Die Dosisabhängigkeit der chemoprotektiven CpG-Effekte konnte in einem weiteren Experiment bestätigt werden. Bei Kombination der Chemotherapie mit je 200 μg CpG lag die Gesamtüberlebensrate ebenfalls nur bei 40 % (Abb. 5.9B). In diesem Versuch starben die drei aus der Kombinationsgruppe nicht überlebenden Mäuse sogar früher als die Tiere, die 5-FU alleine erhalten hatten.

Insgesamt ergibt sich somit eine geringe therapeutische Breite zur Nutzung der CpG-vermittelten, chemoprotektiven Effekte.

5.3.2 5-FU wirkt auch bei zeitgleicher CpG-Applikation auf periphere Blutzellen stark zytotoxisch

Bei der klinischen Anwendung von 5-FU ist neben gastrointestinalen Nebenwirkungen vor allem die hämatologische Toxizität bedeutsam, da das proliferatorisch aktive, hämatopoetische Gewebe im Knochenmark sehr empfindlich auf die Substanz reagiert. Im peripheren Blut führt eine Behandlung mit 5-FU meist nach kurzer Zeit zu Leuko- und Thrombopenie. Da CpG die Produktion diverser Zytokine induziert, denen neben immunstimulierender auch hämatopoetische Wirkung zugeschrieben wird, sollte das periphere Blut behandelter Tiere im Hinblick auf mögliche, CpG-vermittelte Effekte bei gemeinsamer Applikation mit 5-FU untersucht werden.

In einem analog zu den beschriebenen Überlebensexperimenten aufgebauten Versuch wurden den Mäusen fünf Tage nach der zweiten Substanzapplikation (Tag 10) Blutproben entnommen und Blutbildanalysen, inklusive morphologischer Differenzierung, durchgeführt.

Während 5-FU zum Zeitpunkt der Untersuchung auf Erythrozyten im peripheren Blut keine toxische Wirkung entwickelt hatte, waren Leukozyten und Thrombozyten erwartungsgemäß massiv reduziert. Nach Kombination von Chemotherapie und CpG zeigten sich die beiden Zellpopulationen in annähernd gleicher Weise vermindert (Abb. 5.10A).

CpG alleine hatte keine Auswirkung auf Leukozyten- und Thrombozytenzahlen, induzierte aber eine im Vergleich zu naiven Kontrolltieren deutlich ausgeprägte Anämie. Dieser Effekt war auch bei Kombination von CpG mit 5-FU nachweisbar, da in dieser Gruppe die Erythrozytenzahlen deutlich niedriger waren als bei Tieren, die nur Chemotherapie erhalten hatten.

Die morphologische Differenzierung bestätigte die Ergebnisse aus der automatischen Blutbildanalyse (Abb. 5.10B). Sämtliche Ausstriche 5-FU-behandelter Mäuse zeigten eine extreme Leukopenie, unabhängig davon ob zeitgleich CpG injiziert worden war oder nicht. Die leukozytären Zellen, die sich in Ausstrichen dieser Tiere vereinzelt auffinden ließen, waren sämtlich lymphozytären Ursprungs, was als ausgeprägte, medikamentös induzierte Neutropenie gedeutet werden muss.

Interessante Befunde ergaben sich bei der Beurteilung der Präparate aus der Gruppe, der nur CpG appliziert worden war. Neben einer deutlichen Heterochromasie des erythrozytären Kompartiments fiel hier vor allem die ungewöhnliche Morphologie zahlreicher lymphozytärer Zellen auf. Diese Zellen waren aufgrund einer deutlichen Zytoplasmavermehrung im Vergleich zu klassischen, ruhenden Lymphozyten stark vergrößert. Ihr Zytoplasma erschien stark basophil und feingranuliert. Die Zellkerne waren unregelmäßig geformt und das Chromatin viel aufgelockerter und heller als das Heterochromatin eines ruhenden Lymphozytenkerns. Diese Veränderungen wurden insgesamt als Hinweis auf eine erhöhte Aktivität der lymphozytären Zellen interpretiert. Klassischerweise treten solche „atypischen Lymphozyten“ bei diversen viralen Infektionen, wie EBV-, CMV- oder HIV-Infektionen auf. Im Zusammenhang mit wiederholten CpG-Applikationen ist dieser Befund am ehesten morphologisches Korrelat der allgemeinen Immunstimulation durch den potenten TLR9-Liganden.

Insgesamt konnte im vorliegenden Experiment jedoch keine CpG-vermittelte Verringerung der 5-FU-induzierten Toxizität auf das periphere Blut detektiert werden.

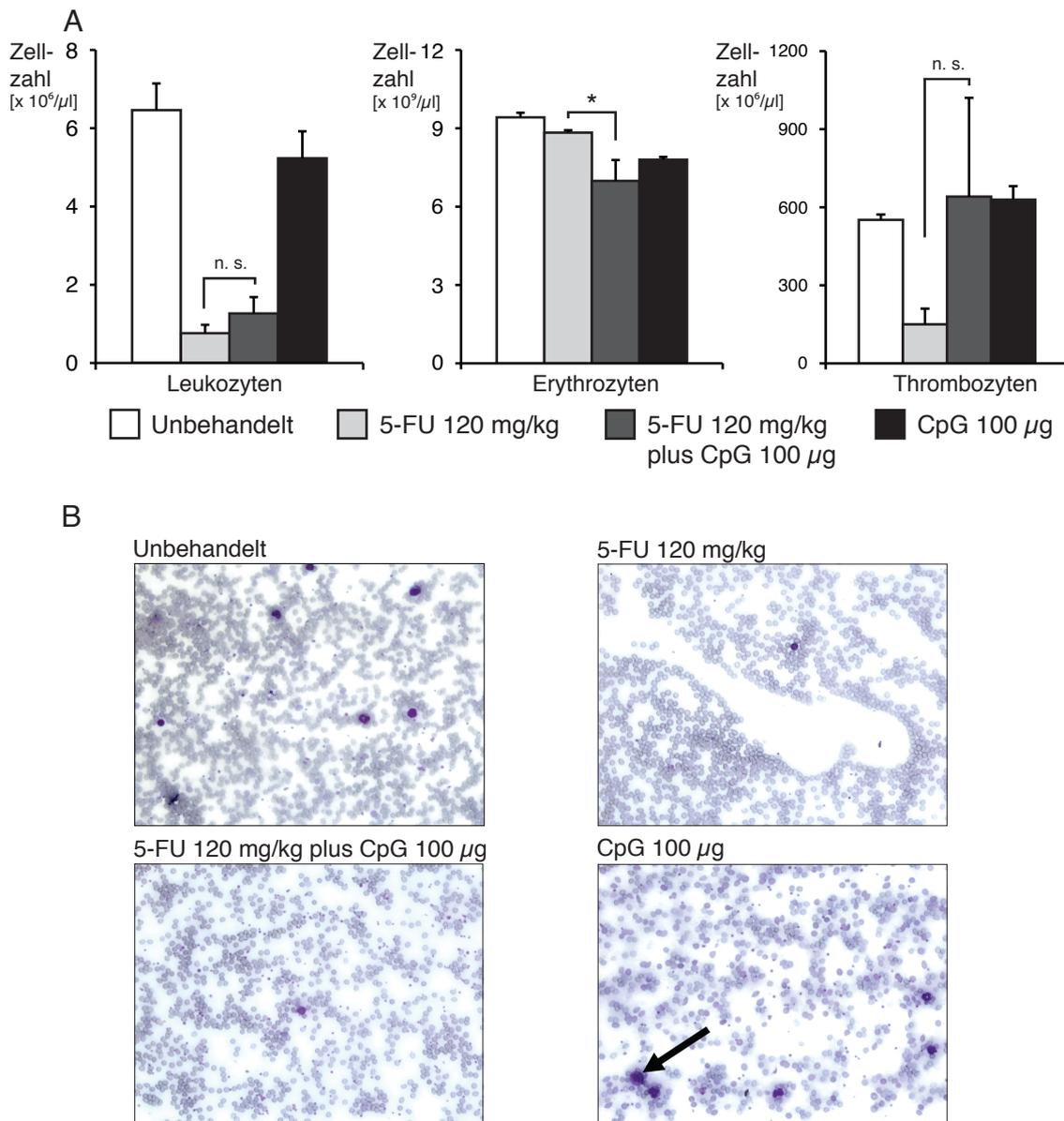


Abb. 5.10: 5-FU-induzierte Toxizität auf periphere Blutzellen bleibt auch bei gleichzeitiger CpG-Applikation bestehen.

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Blutanalyse an Tag 10 des Versuchs nach Substanzapplikationen an Tag 0 und Tag 5. **(A)** Gezeigt werden jeweils die mittleren Blutzellzahlen aus der automatischen Blutbildanalyse für die einzelnen Therapiegruppen (n=4; außer 5-FU 120 mg/kg plus CpG 100 µg: n=3) mit dem Standardmessfehler (SEM). Chemotherapie mit 5-FU (120 mg/kg) führt zum massiven Abfall von Leukozyten- und Thrombozytenzahlen verglichen mit naiven Tieren (Leukozyten: p=0,001; Thrombozyten: p=0,016). Nach Kombination von Chemotherapie und CpG (100 µg) sind beide Zellpopulationen in vergleichbarer Weise vermindert. Wiederholte CpG-Injektionen lösen eine signifikante Reduktion der Erythrozyten verglichen mit naiven Kontrolltieren aus (*, p=0,003). Nach Kombination von CpG mit 5-FU sind die Erythrozytenzahlen ebenfalls signifikant niedriger als nach Chemotherapie alleine (p=0,041). **(B)** Die ausgewählten Abbildungen zeigen einen für die jeweilige Behandlungsgruppe repräsentativen Ausschnitt aus einem panoptisch nach Pappenheim gefärbten Blutaussstrichpräparat (200-fache Vergrößerung). Chemotherapie mit 5-FU (120 mg/kg) führt mit oder ohne gleichzeitige CpG-Applikation (100 µg) zu ausgeprägter Neutropenie. Nach alleiniger CpG-Gabe sind in den Ausstrichen vermehrt sogenannte „atypische Lymphozyten“ als morphologisches Korrelat der systemischen Immunstimulation zu finden (Pfeil). Vergleichbare Beobachtungen ergaben sich in zwei unabhängigen Experimenten.

5.3.3 Proliferationssteigernde Wirkung von CpG auf murine Splenozyten bleibt bei Kombination mit 5-FU bestehen

Bereits vor mehreren Jahren wurden stimulierende Effekte von CpG auf die extramedulläre Blutbildung in der murinen Milz beschrieben. Hohe, systemisch applizierte CpG-Dosen führen, als makroskopisch sichtbares Korrelat, innerhalb weniger Tage zur Ausbildung einer deutlichen Splenomegalie [Sparwasser 1999; Heikenwalder, 2004]. Daher erschien eine Untersuchung des Milzkompartiments zur näheren Charakterisierung der chemoprotektiven CpG-Effekte durchaus vielversprechend.

Der Versuch war analog zum vorher beschriebenen aufgebaut. Nach Substanzapplikationen an Tag 0 und Tag 5 wurden die Mäuse an Tag 10 des Experiments getötet und ihre Milzen zur Analyse entnommen.

5.3.3.1 Nach Kombination mit CpG ist die Gesamtzellzahl in der murinen Milz höher als nach alleiniger Therapie mit 5-FU

Erwartungsgemäß waren die Milzen der Kontrollgruppe, die nur CpG erhalten hatte, stark vergrößert. Die Splenozytenzahl pro Organ hatte sich im Vergleich zu gleichaltrigen, naiven Balb/c Mäusen im Mittel ungefähr verdreifacht (Abb. 5.11). Die gute Reproduzierbarkeit publizierter Ergebnisse unterstreicht die Funktionalität des für die Versuche verwendeten CpG (CpG 1826).

Wiederholte 5-FU-Applikationen hingegen führten zu einer beträchtlichen Reduktion der Splenozytenzahl verglichen mit unbehandelten Tieren, die mit einer makroskopisch sichtbaren Organverkleinerung einherging. Dieser Effekt beruht auf der allgemeinen Zytotoxizität des Chemotherapeutikums und ist im splenischen Kompartiment wegen des hohen Anteils kurzlebiger Leukozyten besonders stark ausgeprägt. Zeitgleiche CpG-Injektionen wirkten den 5-FU-bedingten Effekten auf die Milz deutlich entgegen. So war die mittlere Zellzahl pro Organ nach Kombination von 5-FU und CpG deutlich höher als nach alleiniger Chemotherapie. Die Milzen aus dieser Gruppe entsprachen makroskopisch in etwa denen gleichaltriger Tiere, die nicht behandelt worden waren.

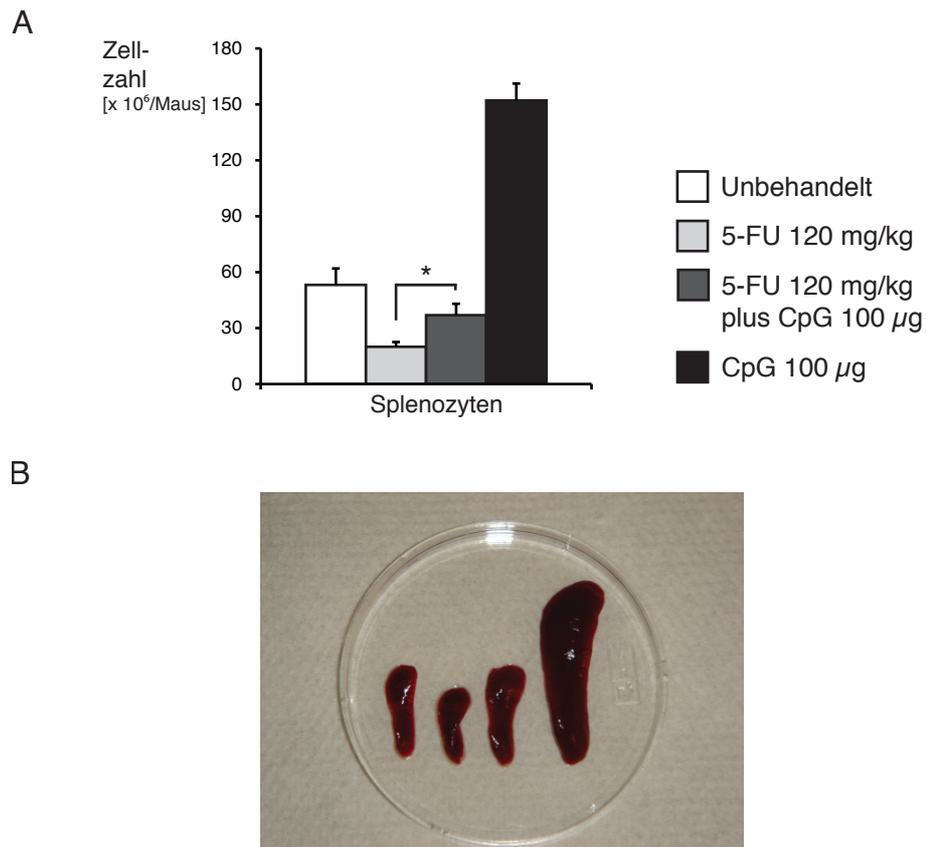


Abb. 5.11: Nach zeitgleicher CpG-Applikation sind Splenozytenzahlen höher als nach Chemotherapie mit 5-FU alleine.

(A) Die Abbildung zeigt jeweils die mittlere Splenozytenzahl pro Gruppe (Unbehandelt und CpG 100 µg: n=3; 5-FU 120 mg/kg plus CpG 100 µg: n=4; 5-FU 120 mg/kg: n=5), die durch Auszählung geeignet verdünnter Zellsuspensionen in einem Neubauer-Hämozytometer bestimmt wurde, mit dem Standardmessfehler (SEM). Zeitpunkt der Analyse war Tag 10 des Versuchs nach Substanzapplikationen an Tag 0 und Tag 5. CpG-Injektionen (100 µg) induzieren eine massive Proliferation des Milzgewebes. Chemotherapie mit 5-FU (120 mg/kg) vermindert die Zellzahlen im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren signifikant ($p=0,017$). Nach Kombination von 5-FU 120 mg/kg mit CpG 100 µg sind die Splenozytenzahlen signifikant höher als nach alleinigen 5-FU-Gaben (*, $p=0,028$). **(B)** Die Abbildung zeigt repräsentative Organe aus den verschiedenen Behandlungsgruppen, die in gleicher Abfolge wie unter Abb. 5.11A angeordnet sind und deren Größe gut mit den Ergebnissen der Splenozytenzählung korreliert. Vergleichbare Ergebnisse und Beobachtungen ergaben sich in zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

5.3.3.2 CpG schützt lymphozytäre Zellreihen in der Milz vor Chemotherapie-bedingter Zytotoxizität

Zur detaillierteren Analyse wurden die Splenozyten unterschiedlich vorbehandelter Tiere nach ihrer Zählung mit Subgruppen-spezifischen Markern gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht.

Zeitgleich mit 5-FU verabreichtes CpG wirkte in der Milz vor allem auf Lymphozyten protektiv. So waren B-Zellen, deren Zahl nach alleiniger Chemotherapie verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren noch signifikant reduziert war, bei kombinierter Anwendung von 5-FU und CpG zum gleichen Zeitpunkt beinahe auf physiologisch normalem Niveau (Abb. 5.12). CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, deren Zahlen durch Chemotherapie mit 5-FU ebenfalls deutlich vermindert wurden, reagierten in ähnlicher Weise auf eine Kombination von 5-FU und CpG wie B-Lymphozyten.

Bei NK-Zellen konnte CpG seine protektiven Effekte bei Kombination mit 5-FU nur bedingt entfalten. So war die Zahl der NK-Zellen in der Milz nach Kombination beider Substanzen im Mittel zwar höher als bei Mäusen, die 5-FU alleine erhalten hatten, im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren war die Population allerdings immer noch deutlich dezimiert. Die Subpopulation der NKT-Zellen zeigte sich bei zeitgleicher Applikation des TLR9-Liganden mit 5-FU susceptibler für CpG-Effekte als die NK-Population insgesamt.

Die verschiedenen myeloischen Populationen in der Milz, wie Granulozyten oder mDC und pDC, reagierten alle sehr empfindlich auf 5-FU. Zeitgleiche CpG-Applikationen konnten diese Zellen nicht effektiv vor der Chemotherapie-assoziierten Zytotoxizität schützen. Demzufolge lagen die Zahlen der einzelnen myeloischen Zellreihen bei simultaner CpG-Gabe nur unwesentlich über den im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren drastisch reduzierten Werten nach alleiniger 5-FU-Behandlung. Bei pDC war die beste CpG-vermittelte Protektion zu beobachten. So war ihre Zellzahl fünf Tage nach der letzten Behandlung mit 5-FU und CpG signifikant höher als nach alleiniger Chemotherapie, wenn auch immer noch deutlich niedriger als bei gleichaltrigen, therapienaiven Kontrolltieren.

Die nach systemischen CpG-Gaben bekannte, massive Expansion des Milzkompartiments wirkte bei gemeinsamer Applikation mit 5-FU der Zytostatika-bedingten Toxizität entgegen. Das Ausmaß der so vermittelten Chemoprotektion war bei den verschiedenen splenischen Subpopulationen unterschiedlich ausgeprägt. Von zeitgleich mit 5-FU appliziertem CpG profitierten in der Milz mit B-, T- und NKT-Zellen vor allem die lymphozytären Zellreihen.

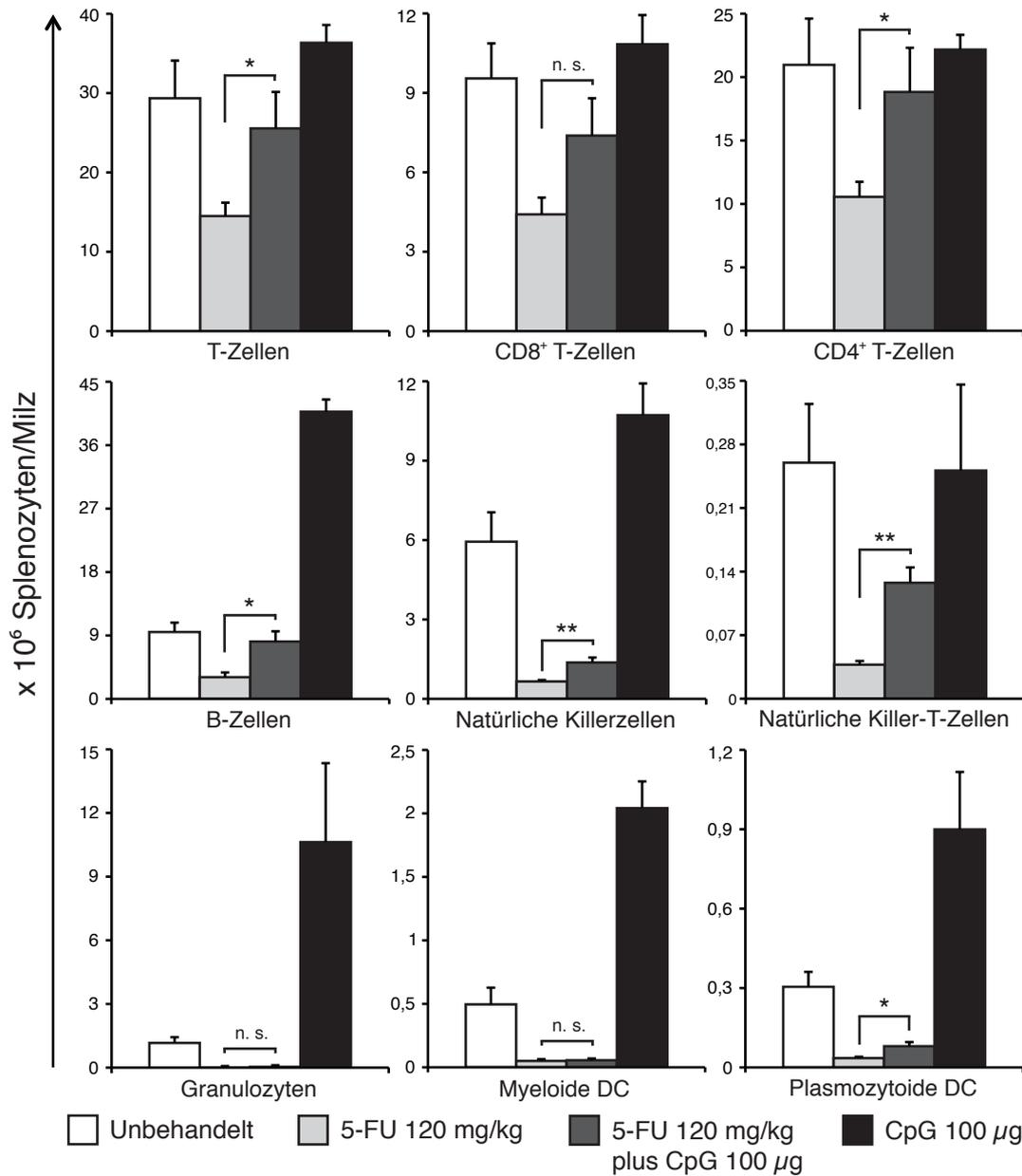


Abb. 5.12: Kombination mit CpG schützt in der Milz vor allem lymphozytäre Zellen vor zytotoxischen 5-FU-Effekten.

Die Abbildung zeigt jeweils die mittlere Zellzahl der einzelnen splenischen Subpopulationen in den verschiedenen Therapiegruppen (Unbehandelt und CpG 100 µg: n=3; 5-FU 120 mg/kg plus CpG 100 µg: n=4; 5-FU 120 mg/kg: n=5) nach durchflusszytometrischer Analyse mit dem Standardmessfehler (SEM). Nach Kombination von 5-FU und CpG sind B- und T-Lymphozyten signifikant weniger reduziert als nach alleiniger Chemotherapie (B-Zellen {CD19⁺ CD3⁻}: *, p=0,011; T-Zellen {CD3⁺ CD19⁻}: *, p=0,043). CD4⁺ T-Lymphozyten werden durch CpG besser vor 5-FU-bedingter Zytotoxizität geschützt als CD8⁺ T-Zellen (CD4⁺ T-Zellen {CD4⁺ CD3⁺}: *, p=0,043; CD8⁺ T-Zellen {CD8a⁺ CD3⁺}: n. s., p=0,076). Bei NK- und NKT-Zellen sind die protektiven CpG-Effekte zwar geringer ausgeprägt, ihre Zahlen nach Kombination von 5-FU und CpG aber ebenfalls signifikant höher als nach alleiniger Chemotherapie (NK-Zellen {FSC⁺ PanNK⁺}: **, p=0,005; NKT-Zellen {PanNK⁺ CD3⁺}: **, p=0,001). Myeloische Populationen (Granulozyten: CD11b⁺ Ly6G/C⁺; myeloide DC: CD11b⁺ CD11c⁺; plasmazytoide DC: CD11c⁺ B220⁺) reagieren sämtlich äußerst empfindlich auf 5-FU und werden durch zeitgleich appliziertes CpG nicht nennenswert geschützt. Die Zahl plasmazytoider DC ist nach Kombination von 5-FU und CpG zwar signifikant höher als nach alleiniger 5-FU-Behandlung (*, p=0,020), im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren jedoch weiterhin massiv reduziert.

5.3.3.3 CpG fördert in der Milz die hämatopoetische Regeneration nach 5-FU-Therapie

Vor dem Hintergrund der bekannten, positiven CpG-Effekte auf die extramedulläre Hämatopoese sollte in einem weiteren Schritt mittels Durchflusszytometrie analysiert werden, ob die Zahl hämatopoetischer Vorläuferzellen in der Milz auch bei zeitgleicher Chemotherapie CpG-induziert zunimmt.

Undifferenzierte *Lineage*⁻ (Lin⁻) Vorläuferzellen nahmen nach CpG-Applikation um ein Vielfaches mehr zu als differenzierte *Lineage*⁺ (Lin⁺) Splenozyten. Wiederholte 5-FU-Gaben verringerten die Anzahl sowohl von Lin⁺ als auch von Lin⁻ Zellen deutlich. Nach Kombination von Chemotherapie und CpG waren beide Populationen deutlich weniger reduziert als nach alleiniger 5-FU-Behandlung (Abb. 5.13). In Bezug auf die Zellzahl bestand nach zeitgleicher Applikation von 5-FU und CpG bei beiden Populationen kein großer Unterschied zu unbehandelten Kontrolltieren mehr, wobei die protektiven CpG-Effekte bei unreifen Lin⁻ Zellen stärker ausgeprägt waren als bei differenzierten Lin⁺ Zellen.

Die Subpopulationen innerhalb der undifferenzierten Lin⁻ Zellen reagierten sehr ähnlich wie die Lin⁻ Zellen insgesamt. Nach CpG-Applikationen zeigten alle drei analysierten Subpopulationen (Sca-1⁻ c-Kit⁻, Sca-1⁺ c-Kit⁻ sowie Sca-1⁺ c-Kit⁺ Zellen) eine massive Zunahme ihrer Zahl. Chemotherapie mit 5-FU führte hingegen stets zu einer deutlichen Zytoreduktion. Bei gleichzeitiger Anwendung von 5-FU und CpG war die Anzahl der sehr frühen Vorläufer (Sca-1⁻ c-Kit⁻ und Sca-1⁺ c-Kit⁻ Zellen) um ein Vielfaches höher als nach alleiniger 5-FU-Behandlung und lag sogar über den Werten unbehandelter Kontrolltiere. Weniger stark ausgeprägt zeigten sich die protektiven CpG-Effekte bei Sca-1⁺ c-Kit⁺ Zellen.

CpG vermittelt also auch bei zeitgleicher Applikation mit 5-FU eine Steigerung der extramedullären Hämatopoese in der murinen Milz. Interessanterweise zeigten sich mit Sca-1⁻ c-Kit⁻ und Sca-1⁺ c-Kit⁻ Zellen vor allem die sehr unreifen, ruhenden, pluripotenten hämatopoetischen Stammzellpopulationen suszeptibel für CpG-vermittelte, chemoprotektive Effekte.

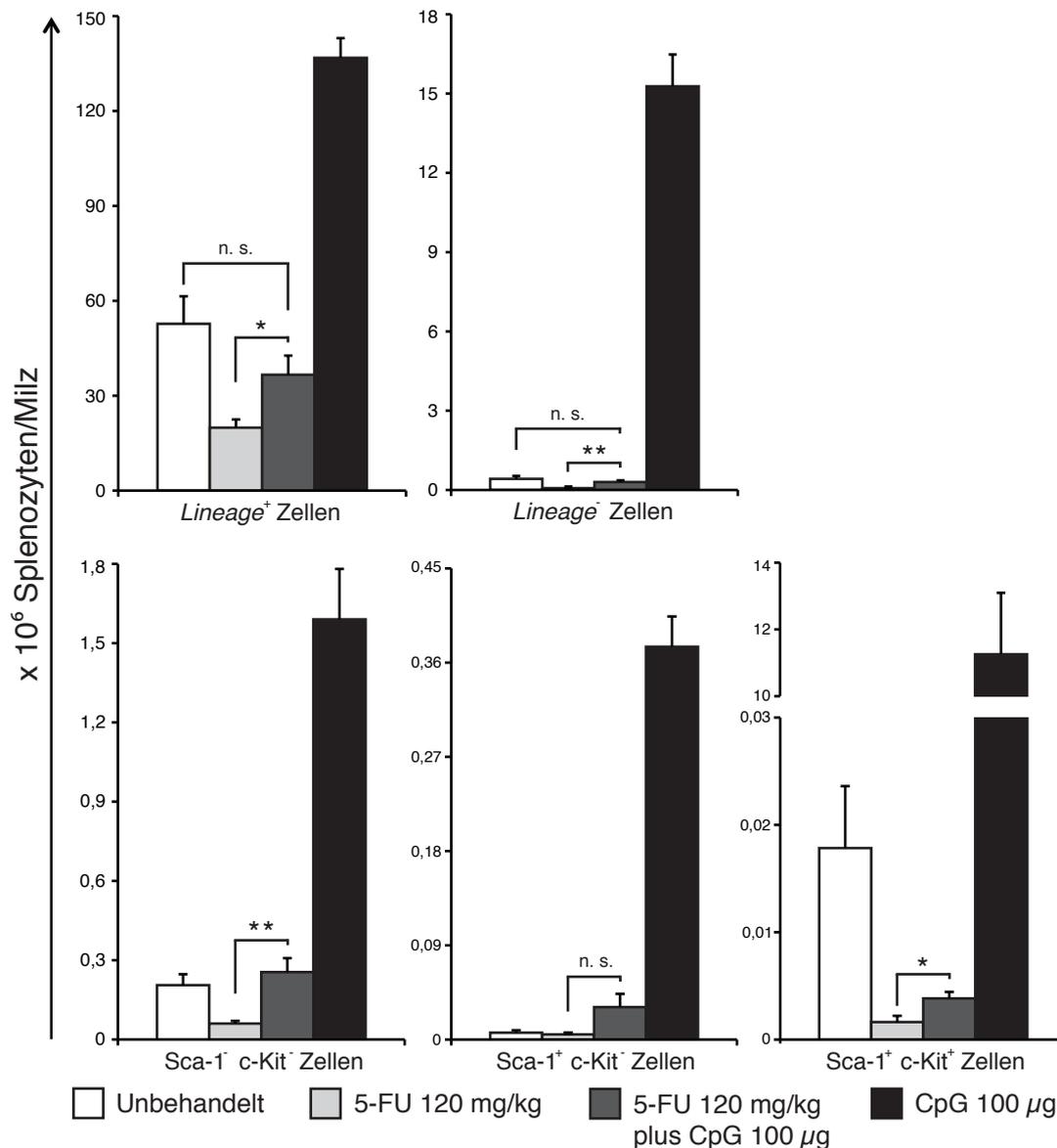


Abb. 5.13: Zeitgleich mit 5-FU appliziertes CpG fördert in der murinen Milz hämatopoetische Regeneration nach Chemotherapie.

Die Abbildung zeigt jeweils die mittlere Zahl der einzelnen Zellpopulationen in den verschiedenen Therapiegruppen (Unbehandelt und CpG 100 µg: n=3; 5-FU 120 mg/kg plus CpG 100 µg: n=4; 5-FU 120 mg/kg: n=5) nach durchflusszytometrischer Analyse mit dem Standardmessfehler (SEM). Wiederholte CpG-Applikationen führen zu massiver Zunahme der Zellzahl in der murinen Milz, wobei die hämatopoetischen Progenitorzellen (*Lineage*⁻ Zellen {FSC⁺ Lin⁻}) CpG-vermittelt deutlich stärker expandieren als differenzierte Splenozyten (*Lineage*⁺ Zellen {FSC⁺ Lin⁺}). Bei gemeinsamer Anwendung von CpG mit 5-FU sind sowohl undifferenzierte als auch reife Milzzellen signifikant weniger reduziert als nach alleiniger Chemotherapie (*Lineage*⁺ Zellen: *, p=0,028; *Lineage*⁻ Zellen: **, p=0,005) und liegen in ähnlicher Zahl vor wie bei unbehandelten Kontrolltieren. Die verschiedenen Differenzierungsstufen innerhalb der unreifen *Lineage*⁻ Zellen reagieren ähnlich wie die Vorläuferpopulation insgesamt. Vor allem *Sca-1*⁻ *c-Kit*⁻ und *Sca-1*⁺ *c-Kit*⁺ Zellen sind nach Kombination von 5-FU und CpG signifikant weniger reduziert als nach alleiniger Chemotherapie (*Sca-1*⁻ *c-Kit*⁻ Zellen: **, p=0,005; *Sca-1*⁺ *c-Kit*⁺ Zellen: *, p=0,036). Bei *Sca-1*⁻ *c-Kit*⁻ Zellen wirken sich die protektiven CpG-Effekte bei zeitgleicher Chemotherapie mit 5-FU weniger stark aus (*Sca-1*⁺ *c-Kit*⁻ Zellen: n. s., p=0,053).

5.3.4 Kombination mit CpG ermöglicht eine raschere Regeneration von 5-FU-induzierter Myelotoxizität

Neben der Milzanalyse sollte auch im Knochenmark, dem Hauptsitz des hämatopoetisch aktiven Gewebes, nach möglichen CpG-vermittelten Einflüssen auf Zellzahl, zytologische Zusammensetzung und Histomorphologie bei Kombination des TLR9-Liganden mit 5-FU geforscht werden. Daher wurden Tieren aus den oben beschriebenen Experimenten nach ihrer Tötung an Tag 10 des Versuchs neben der Milz auch beide Hinterläufe zur Knochenmarkanalyse entnommen.

5.3.4.1 Fünf Tage nach Ende der Behandlung mit 5-FU und CpG zeigt Knochenmark Inseln regenerierenden Gewebes

Die ausgeprägte Myelotoxizität von hochdosierten 5-FU-Bolusinjektionen [Harrison 1978; Schuetz, 1984; Macdonald, 1999] spiegelte sich in der Zählung der Knochenmarkzellen je eines Femurs zum Analysezeitpunkt gut wider, da die mittlere Zellzahl nach Applikation einer kumulativen 5-FU-Dosis von 240 mg/kg, im Vergleich zu unbehandelten Kontrollmäusen, drastisch erniedrigt war (Abb. 5.14A). CpG induzierte im Knochenmark im Gegensatz zu den Ergebnissen aus der Splenozytenzählung keine nennenswerte Änderung der Zellzahl im Vergleich zu gleichaltrigen, naiven Tieren. Nach Kombination beider Substanzen war die mittlere Zellzahl ebenfalls stark vermindert und nur unwesentlich höher als nach alleiniger Chemotherapie.

Neben den Daten aus der Zellzählung sollten auch mögliche Auswirkungen der unterschiedlichen Behandlungen auf die Gewebearchitektur des hämatopoetisch aktiven Knochenmarks geprüft werden. In einem analog aufgebauten Versuch erhielten die Tiere 5-FU in einer etwas niedrigeren Dosierung (je 100 mg/kg an Tag 1 und Tag 5), um mögliche, protektive CpG-Effekte bei Kombination mit einer weniger myelotoxischen Chemotherapie besser sichtbar zu machen. Nach der Organentnahme an Tag 10 wurde je ein Femur der histologischen Beurteilung zugeführt. Die notwendige, technische Aufarbeitung des Materials erfolgte freundlicherweise durch das Labor von Herrn Prof. Dr. med. J. Diebold (zum Zeitpunkt der Kooperation: Pathologisches Institut der LMU München), dem ich an dieser Stelle ausdrücklich für die gute, äußerst produktive Kooperation sowie für die Bereitstellung der Bilder danken möchte.

In konventioneller HE-Färbung zeigte sich die Knochenmarkarchitektur nach zweimaliger CpG-Injektion mikroskopisch weitgehend unverändert im Vergleich zu gleichaltrigen, naiven Kontrolltieren. Nach Behandlung mit einer kumulativen 5-FU-Dosis von 200 mg/kg war das hämatopoetisch aktive Gewebe zum Untersuchungszeitpunkt hingegen komplett destruiert (Abb. 5.14B). Zwischen den Knochenbälkchen waren in den Präparaten chemotherapierter Mäuse neben Fettmark lediglich ausgedehnte Einblutungen zu sehen. Nach Kombination von 5-FU und CpG zeigten sich zum gleichen Zeitpunkt neben Arealen mit zerstörter Gewebearchitektur interessanterweise immer wieder Inseln mit vitaler Hämatopoese.

Diese Beobachtungen bilden eine interessante Ergänzung der Ergebnisse, da sie eine CpG-vermittelte Fähigkeit zu beschleunigter Regeneration hämatopoetisch aktiven Knochenmarkgewebes nach Chemotherapie anzeigen.

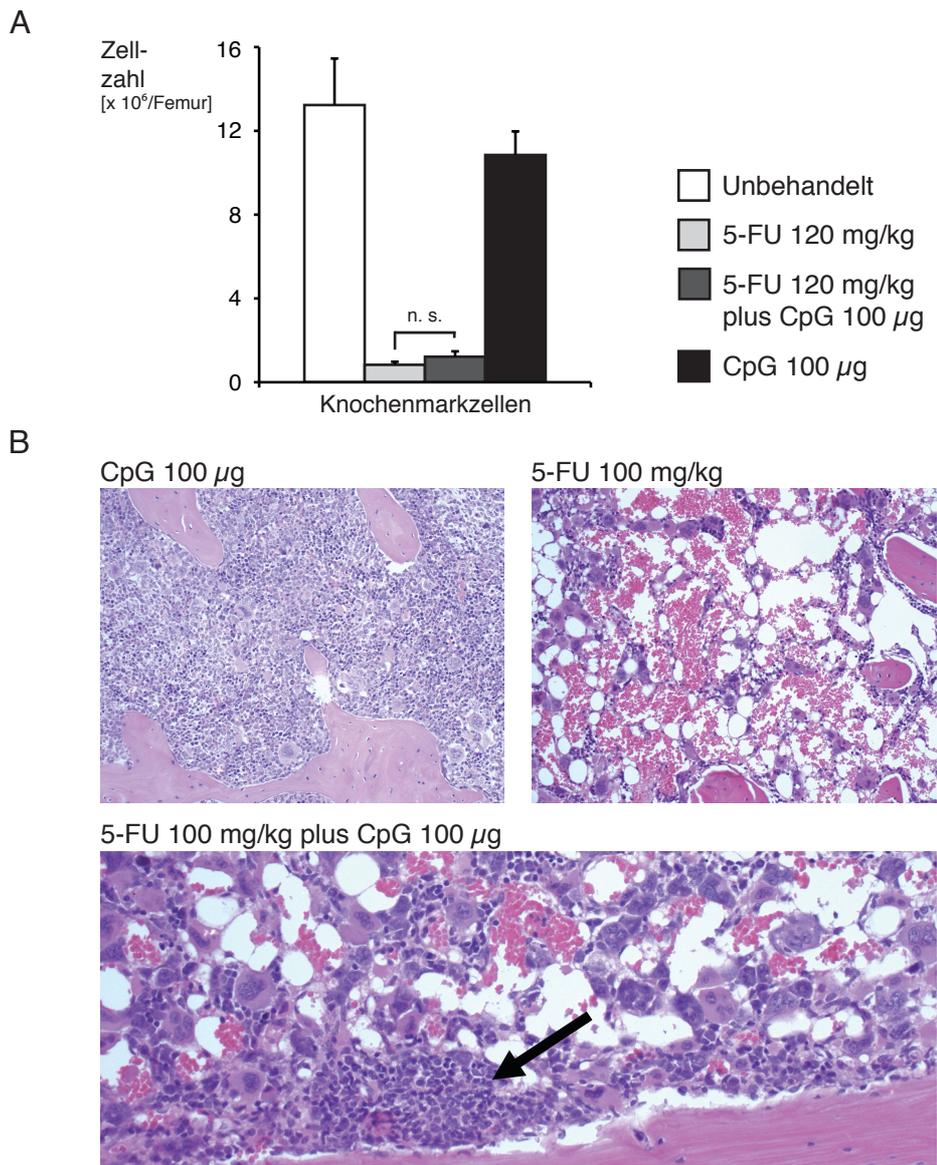


Abb. 5.14: Zeitgleich appliziertes CpG ermöglicht eine frühere Regeneration vom 5-FU-induzierten toxischen Knochenmarkschaden.

(A) Die Abbildung zeigt von den verschiedenen Gruppen (Unbehandelt und CpG 100 µg: n=3; 5-FU 120 mg/kg plus CpG 100 µg: n=4; 5-FU 120 mg/kg: n=5) jeweils die mittlere Zahl an Knochenmarkszellen pro Femur, die durch Auszählung geeignet verdünnter Zellsuspensionen in einem Neubauer-Hämozytometer bestimmt worden war, mit dem Standardmessfehler (SEM). Zeitpunkt der Analyse war Tag 10 des Versuchs nach Substanzapplikationen an Tag 0 und Tag 5. Hochdosiertes 5-FU induziert erwartungsgemäß eine drastische Reduktion der Knochenmarkszellen, die auch bei Kombination der Chemotherapie mit CpG nur minimal weniger ausgeprägt ist (n. s., p=0,211). Vergleichbare Ergebnisse ergaben sich in drei voneinander unabhängigen Experimenten. (B) Die Abbildung zeigt aus einem analog aufgebauten Experiment für die jeweiligen Therapiegruppen repräsentative histologische Knochenmarkpräparate nach HE-Färbung (200-fache Vergrößerung für 5-FU 100 mg/kg und für CpG 100 µg; 400-fache Vergrößerung für 5-FU 100 mg/kg plus CpG 100 µg). Im Gegensatz zu dem nach Chemotherapie mit 5-FU völlig zerstörten, hämatopoetischen Gewebe, kommen nach Kombination von 5-FU mit CpG zum Analysezeitpunkt neben zerstörten Arealen immer wieder Inseln mit vitaler Hämatopoese zur Darstellung (Pfeil).

5.3.4.2 Im Knochenmark schützt CpG vor allem myeloische Populationen vor Chemotherapie-bedingter Toxizität

Knochenmarkszellen unterschiedlich vorbehandelter Tiere wurden nach ihrer Zählung, analog zum Vorgehen bei der Milzanalyse, mit Subgruppen-spezifischen Markern gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht.

Mit Ausnahme der neutrophilen Granulozyten ($CD11b^+ Ly6G/C^+$) nahm die Zahl der übrigen myeloischen Zellen ($CD11b^+ Ly6G/C^-$) im Knochenmark CpG-vermittelt deutlich zu (Abb. 5.15). Chemotherapie mit 5-FU induzierte erwartungsgemäß eine massive Verminderung der Zellularität sämtlicher untersuchter Populationen im Vergleich zu gleichaltrigen, naiven Kontrolltieren. Während neutrophile Granulozyten auch nach zeitgleicher Applikation von 5-FU mit CpG zum Untersuchungszeitpunkt im Knochenmark fast nicht mehr nachweisbar waren, nahm die Zahl der übrigen myeloischen Zellen nach Kombination beider Substanzen im Vergleich zu den Werten nach alleiniger Chemotherapie deutlich zu. Die Analyse weiterer myeloischer Subpopulationen erbrachte, dass nach Kombination der zytostatischen 5-FU-Behandlung mit CpG zum Untersuchungszeitpunkt deutlich mehr mDC ($CD11b^+ CD11c^+$) messbar waren als nach alleiniger Chemotherapie. pDC ($CD11c^+ B220^+$) hingegen nahmen CpG-vermittelt nicht nennenswert zu. So entsprach ihre Zahl nach Kombination beider Substanzen in etwa dem Wert nach alleiniger Chemotherapie.

Auch die nach 5-FU-Behandlung stark verminderte Zahl an B-Lymphozyten ($FSC^+ B220^+$) war nach Kombination der Chemotherapie mit CpG deutlich höher.

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse das Potential von CpG, bei zeitgleicher Applikation mit 5-FU der Zytostatika-assoziierten Myelotoxizität entgegenzuwirken.

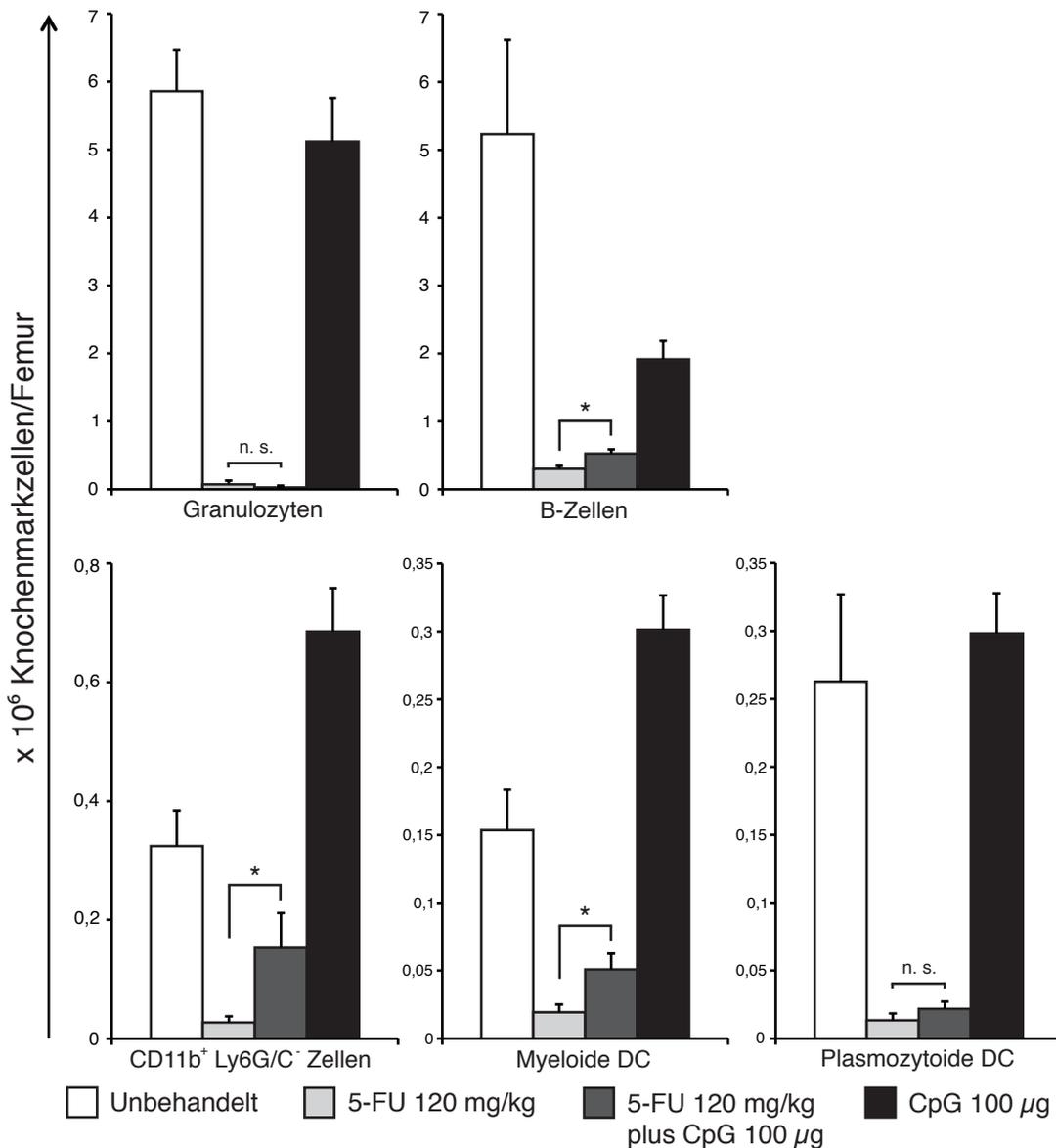


Abb. 5.15: CpG-vermittelte Chemoprotektion wirkt im murinen Knochenmark anders als in der Milz vor allem auf das myeloische Kompartiment.

Die Abbildung zeigt für die verschiedenen Therapiegruppen (Unbehandelt und CpG 100 µg: n=3; 5-FU 120 mg/kg plus CpG 100 µg: n=4; 5-FU 120 mg/kg: n=5) jeweils die mittlere Zellzahl verschiedener Subpopulationen aus dem Knochenmark nach durchflusszytometrischer Analyse mit dem Standardmessfehler (SEM). Nach Behandlung mit 5-FU ist die Zellzahl aller analysierten Populationen massiv reduziert. Während neutrophile Granulozyten (CD11b⁺ Ly6G/C⁺) auch nach Kombination der Chemotherapie mit CpG zum Zeitpunkt der Analyse im Knochenmark fast nicht mehr nachgewiesen werden können, liegen die übrigen myeloischen Zellen insgesamt (CD11b⁺ Ly6G/C⁻) sowie die Subpopulation der myeloiden DC (CD11b⁺ CD11c⁺) nach Kombination von 5-FU mit CpG in signifikant höheren Zahlen vor als nach alleiniger Chemotherapie (myeloische Zellen außer Granulozyten {CD11b⁺ Ly6G/C⁻): *, p=0,043; myeloide DC: *, p=0,036). Plasmazytoide DC (CD11c⁺ B220⁺) sind hingegen auch nach Applikation beider Substanzen beinahe ebenso stark reduziert wie nach alleiniger Behandlung mit 5-FU (n. s., p=0,294). B-Zellen (FSC⁺ B220⁺) im Knochenmark, die Chemotherapie-vermittelt ebenfalls drastisch reduziert werden, sind nach Kombination von 5-FU und CpG in signifikant höherer Zahl messbar (*, p=0,019).

6 DISKUSSION

6.1 Tumor und Immunsystem

Das Immunsystem eines tumortragenden Organismus im Rahmen einer Vakzinierung spezifisch gegen entartetes Gewebe einzusetzen, ist ein sehr vielversprechender Ansatz. Berichte über spontane Tumorremissionen nach klonaler Expansion bestimmter, Tumor-infiltrierender T-Zellen, vor allem beim malignen Melanom, jedoch auch bei einer Reihe anderer Malignome, bestätigen das im körpereigenen Immunsystem vorhandene, antitumorale Potential [Ferradini, 1993; Halliday, 1995; Kerr, 1998; Zorn, 1999a; Zorn, 1999b; Inoue, 2000; Robinson, 2001; Miura, 2002; Iihara, 2004]. Eine exakte Charakterisierung der zugrunde liegenden Mechanismen ist aufgrund der Seltenheit dieses Phänomens bislang nicht gelungen. Für die Entwicklung optimaler Immuntherapiestrategien sind umfassende Kenntnisse über die natürlichen Interaktionen zwischen Immunsystem und Tumor jedoch unerlässlich.

Die initial geltende Theorie der *immunosurveillance*, der Wächterfunktion des Immunsystems [Burnet, 1970; Smyth, 2001], wurde mit zunehmender Kenntnis über die komplexe Beziehung zwischen Immunsystem und Tumor etwas weiter gefasst und das Konzept des sogenannten *immunoediting* entwickelt [Dunn, 2004b]. Darunter wird ein dynamischer Prozess während der frühen Tumorentstehung zusammengefasst, der neben der reinen Tumorprotektion auch relevante Einflüsse des Immunsystems auf die Immunogenität entstehender Malignome berücksichtigt. Zunächst greifen nach diesem Modell die Mechanismen der klassischen, antitumoralen Überwachung. Sich entwickelnde Tumore werden durch angeborene, unspezifische Immunität erkannt und idealerweise sofort zerstört. Im Fall einer unvollständigen Elimination geht der Prozess in ein Äquilibrium über, in dem das Tumorstadium zunächst noch immunologisch kontrolliert ist. Die Elimination immunogener Tumorzellen erzeugt jedoch einen Selektionsdruck auf das Tumorgewebe, unter dem schließlich solche Varianten am stärksten proliferieren, die sich der immunologischen Kontrolle entziehen oder die antitumorale Immunität supprimieren. Die letzte Phase ist schließlich entweder von aktiver Immunsuppression durch das Tumorgewebe oder von immunologisch unkontrolliertem Wachstum wenig immunogener Varianten gekennzeichnet [Dunn, 2004a; Dunn 2004b; Zitvogel, 2006]. Eine zentrale Rolle bei der Interaktion zwischen Immunsystem und Tumoren im Rahmen der einzelnen Phasen des *immunoediting* konnte Typ-II Interferon (IFN- γ) sowie den Typ-I Interferonen (IFN- α und IFN- β) zugeordnet werden. Während IFN- γ direkt auf die Immunogenität der Tumorzellen

Einfluss nimmt [Kaplan, 1998], vermitteln IFN- α und IFN- β ihre antitumorale Aktivität vor allem durch Stimulation des hämatopoetischen Gewebes [Dunn, 2005].

T-Zellen sowie IFN- γ und IL-12 spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der residuellen Erkrankung. Weitere Hinweise für die zentrale Bedeutung eines funktionell intakten, körpereigenen Immunsystems bei der Kontrolle entarteter Zellen ergeben sich aus zahlreichen, empirischen Beobachtungen. So ist eine dauerhafte, medikamentöse Immunsuppression, zum Beispiel zur Prävention von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation, mit einem deutlich höheren Risiko der Entwicklung bestimmter Malignome (vor allem Lymphome) verbunden [Buell, 2005]. Einer französischen Gruppe gelang es –ähnlich wie für das maligne Melanom bereits länger bekannt [Clark, 1989; Clemente, 1996]– auch bei Kolonkarzinompatienten eine Korrelation zwischen Überleben und Vorkommen Tumor-infiltrierender T-Zellen sowie Lokalisation und Dichte der Infiltrate zu zeigen. Auf diese Weise waren gezieltere, prognostische Aussagen in Bezug auf Rezidivwahrscheinlichkeit und Gesamtüberleben der Patienten möglich, als bei Anwendung klassischer, histopathologischer *Staging*-Kriterien [Galon, 2006; Mlecnik, 2011]. Eine während der Phase der monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) vorhandene, T-Zell-vermittelte Immunantwort gegen die autologen, prä-malignen Zellen war nach Progression der Erkrankung zum malignen multiplen Myelom interessanterweise nicht mehr nachweisbar [Dhodapkar, 2003]. Insgesamt ist somit davon auszugehen, dass das aus der Arbeit in zahlreichen Mausmodellen abgeleitete Konzept des *immunoediting* grundsätzlich auf das humane System extrapoliert werden kann [Dunn, 2006; Swann, 2007]. Die Möglichkeit, das im körpereigenen Immunsystem vorhandene, antitumorale Potential optimal zu stimulieren, würde völlig neue Perspektiven in der Tumorthherapie eröffnen.

6.2 Einflüsse von Chemotherapie auf das Immunsystem

Konventionell wird Chemotherapie bei der Behandlung systemischer Tumorerkrankungen eingesetzt, um zügig potente, zytotoxische Effekte zu erzielen. Da die gängigen Zytostatika bevorzugt rasch proliferierendes Gewebe ungeachtet der Dignität schädigen, stellt die Myelotoxizität mit unterschiedlich stark ausgeprägten leukopenen Phasen eine mit moderner Chemotherapie fast regelhaft assoziierte, häufig dosislimitierende Nebenwirkung dar [Marangolo, 2006]. Von den antiproliferativen

Effekten zahlreicher Zytostatika besonders stark betroffen ist die Population der T-Lymphozyten, was nicht nur die Entfaltung antitumoraler Effekte behindert, sondern intermittierend auch eine schwere, generalisierte Immundefizienz nach sich ziehen kann [Mackall, 1999]. Der Purin-Antimetabolit Fludarabin führt beispielsweise zu einer deutlichen Abnahme der Zahl sämtlicher T-Zell-Subpopulationen, was das Auftreten schwerer, opportunistischer Infektionen zur Folge haben kann [Wijermans, 1993]. Bei Applikation des Pyrimidin-Antimetaboliten 5-FU während der Sensibilisierungsphase der Zell-vermittelten Immunantwort ist *in vitro* eine deutlich eingeschränkte Bildung Antigen-spezifischer, zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) zu beobachten [Correale, 2003]. Neben ihren Auswirkungen auf T-Lymphozyten führen verschiedene Zytostatika zu einer normalerweise zwar reversiblen, aber dennoch intermittierend signifikanten Abnahme von Anzahl und Funktionalität der DC im behandelten Organismus [Markowicz, 2002]. Zudem wurde vermutet, dass die im Rahmen von Chemotherapien häufig erforderliche, systemische Steroidapplikation die Ausbildung einer anhaltenden, antitumoralen Immunantwort stark beeinträchtigt. Insgesamt wurden diese Nebeneffekte bei systemischer Behandlung mit Zytostatika lange Zeit als limitierend für eine erfolgreiche Kombination von Immun- und Chemotherapie angesehen [Harris, 1976; Mokyr, 1987; Zitvogel, 2008].

Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass Chemotherapie neben der reinen Immunsuppression auch immunmodulatorische Wirkung entfalten kann [Ehrke, 1989]. So konnte bei verschiedenen, humanen Tumorzelllinien *in vitro* eine gesteigerte Expression von MHC-I-Komplexen und Tumor-assoziierten Antigenen nach Inkubation mit diversen Zytostatika beobachtet werden [Maas, 1991; AbdAlla, 1995; Aquino, 1998; Fisk, 1998]. Zudem werden häufig proapoptotische Signalwege induziert [Friesen, 1999; Micheau, 1999]. Durch immunmodulatorische Effekte konnte *in vitro* unter anderem auch eine gesteigerte Suszeptibilität verschiedener Tumorzelllinien für die lytische Wirkung Antigen-spezifischer CTL gezeigt werden [Fisk 1998; Bergmann-Leitner, 2001]. Nach Applikation von Gemcitabine konnte eine Verstärkung der spezifischen, zellulären, antitumoralen Immunität beobachtet werden. So induziert der Pyrimidin-Antimetabolit unter anderem eine Verstärkung der APC-vermittelten Kreuzpräsentation Tumor-assoziiertes Antigene für CD8⁺ T-Zellen. Zudem werden Durchsetzung des Tumorgewebes mit Tumor-infiltrierenden T-Zellen sowie klonale Expansion spezifischer T-Zellen und ihre Differenzierung zu Effektorzellen gefördert [Nowak, 2003].

Mittlerweile besonders ausführlich untersucht sind die immunmodulatorischen Effekte von Cyclophosphamid, nachdem in diversen Arbeiten von positiven Effekten auf Immuntherapieprotokolle durch Applikation niedriger Dosen des Alkylans berichtet worden war [Glaser, 1979; Bass, 1998]. Die immunmodulatorische Wirkung konnte sowohl im murinen als auch im humanen System beobachtet werden [Lutsiak, 2005; Ghiringhelli, 2007]. Als mögliche, diesen Effekten zugrunde liegende Mechanismen gelten aktuell neben der Unterstützung von *homing* und homöostatischer Proliferation im lymphozytären Kompartiment eine Verschiebung des Zytokinprofils zugunsten T_H1-typischer Immunität sowie die Depletion *forkhead box P3* (FOXP3)⁺ regulatorischer T-Zellen [Brode, 2008].

Zur Untersuchung ihrer immunmodulatorischen Effekte wurden die verschiedenen Chemotherapeutika meist in subtherapeutischer Dosis eingesetzt. So definiert Machiels Zytostatikadosen, die gerade leichte Zytopenien induzieren, als optimal zur Induktion immunmodulierender Effekte [Machiels, 2001]. Da ein zu prüfender Therapieansatz, wie bereits erwähnt, bis zum Beleg seiner Wirksamkeit nur in Verbindung mit der etablierten Therapie eingesetzt werden darf, ist die Kombination eines innovativen, immuntherapeutischen Protokolls mit Chemotherapie in subtherapeutischer Dosis für die klinische Erprobung problematisch.

Umso erfreulicher sind daher die Ergebnisse der hier präsentierten Versuchsreihe, die zeigen, dass die Kombination einer Immuntherapie aus DC und CpG mit konventioneller Chemotherapie –auch beim Einsatz therapeutischer Zytostatikadosen– ohne Beeinträchtigung der antitumoralen Effekte der Immuntherapie möglich ist.

6.3 Argumente für Kombination von Immuntherapie und Zytostatika

Trotz aussichtsreicher Daten, vor allem aus experimentellen, präklinischen Arbeiten, waren die Ergebnisse klinischer Tumorstudien bislang häufig enttäuschend. Ein wesentlicher Grund hierfür liegt wohl darin, dass aus ethischen Gründen immuntherapeutische Ansätze, solange ihre Wirksamkeit noch nicht ausreichend bestätigt ist, nur bei „austherapierten“ Patienten Anwendung finden dürfen.

Zahlreiche, meist präklinische Versuchsreihen ergaben, dass Immuntherapieprotokolle zwar bei kleiner Tumormasse häufig effektiv sind, eine Kontrolle großer Tumormassen in

der Regel auf diese Weise jedoch nicht möglich ist [Pardoll, 1998; Rosenberg, 2001]. Die Ergebnisse früher klinischer Studien bestätigten diese Beobachtungen weitgehend [Yu, 2002]. Somit dürften die besten Effekte aus Immuntherapieprotokollen beim Einsatz im adjuvanten *Setting* erzielt werden. Aus dieser Erkenntnis heraus ist die Kombination immunologischer Behandlungsstrategien mit konventionellen Therapieverfahren wie Chemo- oder Radiotherapie umso wichtiger und in jedem Fall unverzichtbar.

Zudem ist die Analyse kombinierter Ansätze, zum Beispiel klassische Tumorstoffe und immunmodulierendes Zytostatikum, von herausragender Bedeutung, da ohne supportive Immunmodulation häufig Tumor-induzierte, tolerogene Mechanismen die Effektivität eingesetzter, immuntherapeutischer Protokolle beeinträchtigen [Machiels 2001].

6.3.1 Synergistische Effekte bei Kombination von Immun- und Chemotherapie

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Kombination der im murinen C26-Modell antitumoral äußerst wirksamen Immuntherapie aus DC und CpG mit konventioneller Chemotherapie in therapeutischer Dosis im Hinblick auf möglicherweise negative Einflüsse der Zytostatika auf die Effektivität des Vakzinierungsprotokolls zu untersuchen.

Chemotherapie kann in Abhängigkeit von der eingesetzten Substanz durchaus zur Verstärkung Immuntherapie-vermittelter, antitumoraler Effekte führen. So steigert Cyclophosphamid, wie bereits oben erwähnt, die antitumorale Aktivität von Immuntherapieprotokollen durch Suppression regulatorischer T-Zellen [Ghiringhelli, 2004; Lutsiak 2005]. Gleichzeitig kann eine signifikante Verstärkung T_H1 -vermittelter, antitumoraler Immunität nachgewiesen werden [Liu, 2007]. Synergistische Effekte mit antitumoralen DC-Vakzinen waren beim Einsatz von Cyclophosphamid sowohl nach Applikation hoher als auch niedriger Dosen des Zytostatikums nachweisbar [Tong, 2001; Holtl, 2005; Song, 2005]. Bereits sehr früh zeigte sich zudem die kritische Bedeutung der zeitlichen Abfolge von Antigeninjektion und Cyclophosphamid-Applikation [Hengst, 1980].

Sowohl durch die Applikation von Cyclophosphamid als auch von Paclitaxel und Doxorubicin konnte eine signifikante Verstärkung der antitumoralen Effekte einer

GM-CSF-sezernierenden und das Protoonkogen *neu* exprimierenden Tumorstammzellen gezeigt werden, wobei der beobachtete, synergistische Effekt nicht direkt zytolytisch vermittelt war. Für Cyclophosphamid und Paclitaxel konnte in der zitierten Arbeit eine Zunahme von Anzahl und Funktionalität Antigen-spezifischer CTL gezeigt werden. Auch bei diesem Versuchsansatz war der Zeitpunkt der Chemotherapie entscheidend für die Entfaltung der synergistischen Wirkung [Machiels 2001].

6.3.2 Induktion immunogenen Zelltods durch bestimmte Zytostatika

Ein zentrales Ziel in der Tumorthherapie sollte sein, durch Chemotherapie eine immunogene Form des Zelltods im entarteten Gewebe zu induzieren. Auf diese Weise könnte das körpereigene Immunsystem als *bystander*-Effekt zur Eradikation Zytostatika-resistenter Tumorzellen und Tumorstammzellen beitragen [Steinman 2004; Lake, 2006; Zitvogel 2006]. Problematisch in diesem Zusammenhang sind zum einen die immunsuppressiven Nebenwirkungen vieler Chemotherapeutika sowie zum anderen die Apoptose als überwiegende Form des Zytostatika-induzierten Zelltods. Apoptose wurde lange Zeit als immunologisch inert oder sogar tolerogen angesehen [Steinman 2004; Zitvogel, 2004]. Apoptotische Zellen können jedoch unter Umständen auch eine Immunantwort triggern [Hirschowitz, 2004; Blachere, 2005]. Von entscheidender Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Apoptose-induzierende Substanz.

Zitvogel und Kroemer konnten zeigen, dass Anthrazykline eine immunogene Form der Apoptose induzieren, die ohne supportives Adjuvans eine effektive, DC-vermittelte, antitumorale CTL-Immunantwort auslösen kann. Für die Immunogenität apoptotischer Zellen sind neben der Aktivierung verschiedener Caspasen weitere, zunächst noch nicht näher definierte Faktoren relevant [Casares, 2005].

In einer weiterführenden Arbeit wurde die Kotranslokation von Calreticulin und der Disulfidisomerase ERp57 vom endoplasmatischen Retikulum auf die Zelloberfläche als eine entscheidende Voraussetzung für die effiziente Aufnahme antigenen Materials aus apoptotischen Tumorzellen durch DC nach Anthrazyklin-Behandlung identifiziert [Obeid, 2007; Panaretakis, 2008]. Calreticulin wurde bereits erfolgreich als immunologisches Adjuvans in chimären Konstrukten zusammen mit Tumorantigenen in viralen Vektoren eingesetzt [Hsieh, 2004; Cheng, 2006]. Zudem war bereits einige

Jahre früher über die Induktion Tumor-spezifischer Immunität durch aus Tumorgewebe isolierten Calreticulin-Präparationen berichtet worden. Da das Protein intrazellulär unter anderem als Chaperon fungiert, war dieser Effekt jedoch auf die mit Calreticulin assoziierten Proteine zurückgeführt worden [Basu, 1999]. Da durch exogen zugeführtes, rekombinantes Calreticulin die Immunogenität auch bei sterbenden Zellen mit inhibiertem Proteasom erhöht werden konnte, können jedoch nicht allein Komplexe aus Calreticulin und Tumor-spezifischen Antigenen für die beobachtbaren, adjuvanten Effekte verantwortlich sein. Andererseits zeigten Experimente mit Ecto-Calreticulin exprimierenden, lebenden Zellen, dass die Calreticulin-Exposition alleine nicht ausreicht, um DC zur Maturierung anzuregen und eine spezifische, antitumorale Immunantwort auszulösen [Obeid 2007]. Es musste somit weitere Signale geben, die apoptotische Tumorzellen immunogen werden lassen.

Zitvogel und Kroemer konnten wenig später zeigen, dass die Freisetzung von *high mobility group box protein-1* (HMGB-1) als Gefahrensignal aus sterbenden Tumorzellen sowie die Funktionalität des TLR4-MyD88-Signalwegs in DC ebenfalls für die Induktion einer antitumoralen Immunantwort nach Radiatio oder Chemotherapie erforderlich sind [Apetoh, 2007]. Bei HMGB-1 handelt es sich primär um ein Chromatin-bindendes, nukleäres Protein, das nach seiner passiven Freisetzung aus nekrotischen Zellen [Scaffidi, 2002] potente Eigenschaften als Adjuvans *in vivo* besitzt [Rovere-Querini, 2004]. Es wird aber auch aktiv von APC als proinflammatorisches Zytokin in den Extrazellulärraum sezerniert [Gardella, 2002]. Seine Mediatorfunktion bei der Letalität im späten Verlauf der Gram-negativen Sepsis ist schon länger bekannt [Wang, 1999]. Mit HMGB-1 als spezifischem TLR4-Liganden definierten Zitvogel und Kroemer ein zweites Signal, das neben der Oberflächenexposition von Calreticulin und ERp57 von sterbenden Tumorzellen ausgesandt und von DC erkannt werden muss, um adjuvante Immuneffekte nach Chemotherapie oder Radiatio auszulösen. Treffen diese Faktoren zusammen, können DC antigenes Material aus apoptotischen Tumorzellen aufnehmen, TLR4-MyD88-abhängig effizient prozessieren und für CD8⁺ CTL auf MHC-I-Molekülen kreuzpräsentieren [Apetoh 2007; Obeid 2007]. Neben ionisierender Strahlung konnte in den oben beschriebenen Versuchsreihen für Anthrazykline und Oxaliplatin die Fähigkeit zur Induktion einer immunogenen Form des Zelltods gezeigt werden [Apetoh 2007].

Im weiteren Verlauf ihrer Arbeit konnten Zitvogel und Kroemer schließlich noch einen dritten Faktor charakterisieren, der für die Erkennung apoptotischer Tumorzellen durch körpereigene DC erforderlich ist. Sie zeigten, dass aus sterbenden Tumorzellen in den

Extrazellulärraum freigesetztes Adenosintriphosphat (ATP) den purinergen P2RX₇-Rezeptor der DC aktiviert, wodurch das sogenannte NLRP3/ASC/Caspase-1-Inflammasom in Gang gesetzt und schließlich IL-1 β produziert wird [Ghiringhelli, 2009]. In Makrophagen fungiert das Inflammasom –ein zytosolischer, multimerer Proteinkomplex– als zentraler Sensor für molekulare Strukturen, die auf die Anwesenheit von Pathogenen oder Zellschädigungen hinweisen [Di Virgilio, 2007; Martinon, 2007; Eisenbarth, 2008]. Als Reaktion auf ein derartiges Gefahrensignal interagieren *NOD-like receptor family pyrin domain containing-3 protein* (NLRP3 beziehungsweise NALP3), das Adaptormolekül *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* (ASC), *Cardinal (CARD-containing protein, CARD8)* und das Effektormolekül Caspase-1 (Casp1) zur Bildung des Inflammasoms. Dieser Proteinkomplex induziert die Aktivierung von Casp1, die zur Maturation von pro-IL-1 β benötigt wird [Martinon, 2002; Agostini, 2004]. Schließlich folgt somit als Reaktion auf einen inflammatorischen Stimulus durch TLR-Aktivierung und einen P2RX₇-Agonisten, zum Beispiel extrazelluläres ATP oder Uratkristalle, über die proteolytische Aktivierung von Casp1, die Sekretion von IL-1 β [Mariathasan, 2006; Martinon, 2006; Sutterwala, 2006]. Mittlerweile ist für zahlreiche bakterielle, aber auch endogene Moleküle bekannt, dass sie das NLRP3-Inflammasom stimulieren und so die proteolytische Aktivierung von Casp1 induzieren [Kanneganti, 2006a; Kanneganti, 2006b; Mariathasan 2006; Ogura, 2006]. IL-1 β vermittelt als kostimulatorisches Zytokin das *priming* IFN- γ -produzierender, Tumorantigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen, was Zitvogel und Kroemer als entscheidende Komponente der Inflammasom-induzierten, antitumoralen Aktivität identifizierten [Ghiringhelli 2009]. Für die Immunogenität der durch Radio- oder Chemotherapie mit Anthrazyklinen oder Oxaliplatin induzierten Apoptose sind sowohl P2RX₇ als auch NLRP3 und Casp1 unverzichtbar [Ghiringhelli 2009].

Diese Ergebnisse zeigen insgesamt die Relevanz der Wahl des Zytostatikums für Erfolg oder Misserfolg einer kombinierten Behandlung aus Immun- und Chemotherapie. Nun ist es von kritischer Bedeutung herauszufinden, welche Zytostatika immunogene Apoptoseformen induzieren können und welche humane Tumorentitäten immunogene Signale nach Radio- oder Chemotherapie aussenden.

6.4 Kombination von Immuntherapieprotokollen mit Zytostatika in der Literatur

6.4.1 Intratumorale Applikation unreifer DC nach systemischer Chemotherapie

Bei einer Reihe präklinischer Arbeiten in verschiedenen Tiermodellen wurden direkt intratumoral injizierte, unreife, syngene DC im Wechsel mit systemischer Chemotherapie verabreicht, wobei die erste Zytostatikaapplikation zeitlich stets vor der ersten Vakzinierung durchgeführt wurde. Dieser Ansatz dient dem Zweck, durch zytolytische Effekte der Chemotherapie zunächst vermehrt antigenes Material aus den Tumoren freizusetzen, das die im Verlauf intratumoral injizierten, unreifen DC in Form Tumor-assoziiierter Antigene aufnehmen, prozessieren und nach ihrer Reifung schließlich naiven T-Zellen präsentieren können. Auf diese Weise sollte die erfolgreiche Induktion einer potenten, Tumor-spezifischen T-Zell-Antwort, unter Umgehung des normalerweise vor einer Vakzinierung notwendigen *ex vivo primings* der DC, möglich gemacht werden [Tong 2001; Tanaka, 2002; Shin, 2003; Yu, 2003; Choi, 2005; Song 2005]. In den Experimenten gelang es, sowohl systemische, Antigen-spezifische Immunantworten, als auch potente Antigen-spezifische Gedächtnisimmunität zu induzieren. Nachdem in eine Tumormanifestation DC injiziert worden waren, verschwanden auch alle an anderen Körperstellen induzierten Tumore derselben Spezifität. Zudem blieben Mäuse, die ihre Tumore nach Applikation des jeweils eingesetzten Schemas abgestoßen hatten, auch nach erneuter Injektion derselben Tumorzellen langfristig tumorfrei.

Bei Kombination von Strahlen- oder Kryotherapie mit anschließender, intratumoraler DC-Applikation konnten in präklinischen Tiermodellen ähnliche synergistische beziehungsweise additive Effekte erzielt werden [Teitz-Tennenbaum, 2003; Machlenkin, 2005; Udagawa, 2006].

6.4.2 Vorteile des Einsatzes reifer DC zur Tumorstimmung

Ein entscheidender Unterschied der hier diskutierten Experimente zu den oben beschriebenen Arbeiten besteht darin, dass in den Versuchen zur vorliegenden Arbeit *ex vivo* zur Reifung gebrachte DC bei der Vakzinierung zur Anwendung kamen.

Unreife DC können naive, allogene CD4⁺ T-Zellen nicht zu klonaler Expansion anregen und induzieren statt ihrer Differenzierung zu proinflammatorischen T_H1-Zellen, eine Differenzierung zu nicht proliferierenden, IL-10-produzierenden, regulatorischen T-Zellen [Jonuleit 2000]. Da Tumor-assoziierte Antigene in einem tumortragenden Organismus meist von unreifen DC kreuzpräsentiert werden, sind die natürlich vorkommenden, Tumor-spezifischen CTL in der Regel nicht ausreichend aktiviert. Aus diesem Grund ist die Induktion einer systemischen, T-Zell-vermittelten, antitumoralen Immunantwort normalerweise nicht zu erwarten [Matzinger, 1994; Fuchs, 1996].

Die Überlegenheit von Vakzinierungsprotokollen mit reifen DC in Bezug auf Expansion IFN- γ -produzierender CD8⁺ T-Zellen sowie Induktion Tumor-spezifischer CTL wurde mehrfach gezeigt. Eine Versuchsreihe, in der Patienten mit fortgeschrittenem malignen Melanom simultan sowohl unreife als auch reife, mit unterschiedlichen, Melanom-typischen Peptiden gepulste DC in verschiedene Lymphknotenregionen injiziert wurde, bestätigte die bessere Effektivität reifer DC im direkten Vergleich innerhalb eines Organismus. [Jonuleit, 2001]. In einem murinen Tumormodell war nach *in vivo* Applikation unterschiedlicher DC-aktivierender Substanzen, unter anderem verschiedener TLR-Liganden, eine deutliche Zunahme der Aktivität Tumor-spezifischer CTL zu beobachten, die die Voraussetzung für eine Eradikation bereits etablierter Tumore darstellte [van Mierlo, 2004]. Die gemeinsame Applikation einer Vakzine aus Antigen-gepulsten, LPS-gereiften DC mit den myelosuppressiven Substanzen Doxorubicin oder Melphalan nahm bei tumortragenden Mäusen weder negativen Einfluss auf Expansion und Differenzierung Antigen-spezifischer T-Zellen nach Vakzinierung noch auf die Effektivität der Tumor-spezifischen, CTL-vermittelten Immunantwort [Casati, 2005]. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der hier diskutierten Experimenten konnte somit gezeigt werden, dass eine durch Vakzinierung mit reifen DC induzierte, Antigen-spezifische T-Zell-Immunantwort in tumortragenden Organismen bei Kombination mit bestimmten Zytostatika nicht funktionell beeinträchtigt wird.

6.4.3 Kombination von CpG und Chemotherapie

Synergistische Effekte waren in diversen Tumormodellen auch bei gemeinsamer Anwendung von CpG mit unterschiedlichen Zytostatika oder Strahlentherapie zu beobachten. So induzierte CpG sowohl in Kombination mit Cyclophosphamid als auch mit Topotecan eine deutliche Überlebensverlängerung tumortragender Tiere in einem murinen Rhabdomyosarkommodell verglichen mit Chemotherapie alleine. Die antitumoralen CpG-Effekte waren ebenfalls überwiegend T-Zell-vermittelt [Weigel, 2003]. Eine signifikante Verzögerung des Tumorwachstums durch Kombination von CpG mit Topotecan im Vergleich zu Chemotherapie alleine konnte auch in einem weiteren murinen Tumormodell gezeigt werden, wobei hier für Therapieerfolg und vor allem Verträglichkeit die zeitliche Abfolge der Applikation der einzelnen Komponenten entscheidend war. Topotecan wirkte auf CpG-aktivierte DC und Makrophagen nur leicht immunsuppressiv, was sich in einer nur geringfügig niedrigeren IL-12-Konzentration im Serum nach Kombinationstherapie im Vergleich zu alleiniger CpG-Applikation zeigte [Balsari, 2004]. Wenig später konnte eine ausgeprägte, therapeutische Synergie auch bei Kombination von CpG mit Gemcitabine in einem Pankreaskarzinommodell nachgewiesen werden. T-Lymphozyten waren in dieser Arbeit durch die Verwendung von Nacktmäusen als entscheidende zelluläre Komponente bei der Umsetzung der CpG-Effekte ausgeschlossen. Stattdessen könnte in diesem Modell die von den Autoren nachgewiesene hohe TLR9-Expression im exokrinen Pankreasgewebe direkt zur effektiven, antitumoralen Wirkung von CpG beigetragen haben [Pratesi, 2005].

6.5 Zytostatika hier ohne negativen Einfluss auf Immuntherapie-induzierten, antitumoralen Effekt

Beim Großteil der oben zitierten, präklinischen Versuchsanordnungen wurden die Zytostatika nur über einen Zeitraum von wenigen Tagen verabreicht. Im Gegensatz dazu beinhalteten die Experimente zur vorliegenden Arbeit –wie im klinischen Alltag üblich– zyklische Therapieapplikationen über mehrere Wochen. Obgleich ein so prolongiertes Behandlungsschema die Funktionalität des Immunsystems wohl deutlich stärker beeinträchtigen dürfte, entfaltete in unseren Versuchen weder die Kombination mit 5-FU noch mit Irinotecan einen negativen Einfluss auf die exzellente, therapeutische Aktivität der eingesetzten Immuntherapie mit DC und CpG. Eine weitere Steigerung ihrer antitumoralen Effektivität durch Kombination mit 5-FU oder Irinotecan

konnte jedoch nicht beobachtet werden. Möglicherweise wurde bei den aktuellen Experimenten der Beitrag der Zytostatika an der antitumoralen Wirkung der Kombination durch die starke Effektivität der Immuntherapie maskiert, da synergistische Effekte von Immun- und Chemotherapie in der Literatur vor allem bei Verwendung allein weniger gut wirksamer Immuntherapieprotokolle zu dokumentieren waren.

Die erfolgreich durchgeführten Tumorreinduktionsversuche mit Tieren, die einen Tumor nach protokollgerechter Applikation von Immuntherapie und 5-FU abgestoßen hatten, zeigen zudem klar, dass auch die Ausbildung einer lang anhaltenden, protektiven Immunität nach Behandlung mit DC und CpG durch Kombination mit zyklisch verabreichtem, hochdosierten 5-FU nicht negativ beeinflusst wird.

6.6 Substanz-assoziierte Toxizität als limitierender Faktor dosisintensiver Chemotherapieprotokolle

Chemotherapie-assoziierte Toxizität betrifft unter physiologischen Bedingungen vor allem ständig proliferierende Gewebe, wie Schleimhäute und hämatopoetisch aktives Knochenmark. Mukositis und mikrobielle Infektionen in der Phase Therapie-bedingter Neutropenie stellen im klinischen Alltag der modernen Hämato-Onkologie potenziell lebensbedrohlich verlaufende Komplikationen einer Tumorbehandlung dar. Um vor allem bei kurativen Therapiekonzepten hämatologischer Erkrankungen die zur dauerhaften Heilung notwendige Dosisintensität der Behandlung zu gewährleisten, werden mittlerweile verschiedene Substanzen zur Verbesserung der Chemotherapieverträglichkeit eingesetzt. So erhalten Patienten nach Applikation stark myelotoxischer Protokolle zur Primärprophylaxe infektiöser Komplikationen Breitbandantibiotika sowie antivirale und antifungale Substanzen. Rekombinanter Granulozyten-koloniestimulierender Faktor (G-CSF, Filgrastim) wird zudem seit rund 20 Jahren erfolgreich zur Verkürzung der kritischen, neutropenen Phase nach dosisintensiven Zytostatikatherapien eingesetzt. Zur Mukositisprophylaxe bei myeloablativen Chemotherapien steht seit einiger Zeit rekombinanter Keratinozytenwachstumsfaktor (KGF, Palifermin) zur Verfügung.

Gerade vor dem Hintergrund der klinischen Relevanz dosislimitierender Toxizität ist der im Rahmen der hier diskutierten Experimente beobachtete Effekt, dass Mäuse eine dosisintensive 5-FU-Behandlung durch Kombination der Chemotherapie mit CpG

signifikant länger überleben, besonders interessant. Bemerkenswert ist auch der Aspekt, dass die bessere Verträglichkeit bei zeitgleicher CpG-Applikation keinen negativen Einfluss auf die antitumorale 5-FU-Wirkung nach sich zieht, da die Tumore bei den Experimenten im C26-Modell in beiden Behandlungsgruppen stets gleich gut angesprochen hatten.

6.7 Proliferatorische CpG-Effekte auf die murine Milz

Die Eigenschaft bakterieller DNA, wie auch synthetischer CpG-Oligodesoxynukleotide, aus murinem Milzgewebe isolierte B-Lymphozyten *in vitro* sehr effektiv zur Proliferation anzuregen, war bereits früh publiziert worden [Messina, 1991; Krieg 1995]. Die Forschungsgruppen von H. Wagner und A. Aguzzi konnten jedoch unabhängig voneinander zeigen, dass die nach Applikation hoher, kumulativer CpG-Dosen *in vivo* beobachtbare, massive Splenomegalie nicht durch eine gesteigerte B-Zell-Proliferation zu erklären ist. So wies Aguzzis Gruppe durchflusszytometrisch nach, dass die CpG-vermittelte Zellvermehrung in der murinen Milz erythroide und myeloische Zellreihen deutlich stärker betrifft als das lymphozytäre Kompartiment [Heikenwalder 2004]. Bereits einige Jahre früher hatte Wagners Gruppe in histologischen Präparaten vergrößerter Milzen nach systemischer CpG-Applikation eine deutliche Zunahme großer, unreifer Blasten beobachtet. Die durchflusszytometrisch B220⁺ CD3⁻ Zellen konnten bei genauerer Untersuchung als größtenteils myeloische Vorläufer identifiziert werden, da sie im sogenannten *soft agar colony assay* nach Zugabe verschiedener myeloischer Wachstumsfaktoren zu effizienter Kolonibildung fähig waren. Sämtliche Effekte waren streng vom Vorliegen eines CpG-Motivs innerhalb der verwendeten Oligodesoxynukleotide abhängig und korrelierten mit der eingesetzten Dosis. Diese Beobachtungen wurden als Hinweis auf eine CpG-induzierte Steigerung der extramedullären Hämatopoese in der murinen Milz interpretiert [Sparwasser 1999].

In den Experimenten zur vorliegenden Arbeit konnten diese proliferatorischen CpG-Effekte auf die murine Milz gut reproduziert werden. Bei Kombination mit 5-FU wirkte CpG der Chemotherapie-assoziierten Zytoreduktion im splenischen Kompartiment effektiv entgegen. Interessanterweise zeigte die durchflusszytometrische Analyse der splenischen Leukozyten in den hier diskutierten Experimenten jedoch CpG-vermittelt vor allem lymphozytäre Subpopulationen in der Milz vor 5-FU-bedingter Zytotoxizität geschützt.

6.8 Mögliche Mechanismen der CpG-vermittelten Chemoprotektion

Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beschriebene, CpG-vermittelte Chemoprotektion sind prinzipiell verschiedene Ursachen denkbar. Möglicherweise gelingt dem murinen Organismus bei zeitgleicher Applikation von CpG eine raschere, hämatopoetische Regeneration nach Chemotherapie mit 5-FU. Ein derartiger Effekt könnte durch Mobilisierung primitiver Vorläuferzellen aus dem Ruhezustand und Triggerung ihrer Differenzierung zu immunologischen Effektorzellen vermittelt werden.

6.8.1 Mobilisierung hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen im murinen Knochenmark

6.8.1.1 Mobilisierende Effekte des angeborenen Immunsystems auf hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen

Im Ruhezustand bleiben hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen (HSPC), unter anderem durch Wirkung diverser Adhäsionsmoleküle wie N-Cadherin, VCAM-1 (*vascular adhesion molecule-1*, CD106) oder CXCL12 (*stromal derived factor-1*, SDF-1), in der sogenannten „Stammzellnische“ [Levesque, 2001; Zhang, 2003; Sugiyama, 2006]. Für die Aufrechterhaltung dieses Zustands sind zudem diverse Chemokine, Wachstumsfaktoren und Hormone verantwortlich, die bei Bedarf jedoch auch eine verstärkte Freisetzung primitiver Progenitoren in die Blutbahn vermitteln können [Schulz, 2009]. Eine derartige Mobilisierung tritt physiologischerweise in Stresssituationen des Organismus, wie Infektion oder Gewebeschädigung auf [Kassirer, 1999; Massberg, 2007; Welner, 2007].

Verschiedene Komponenten des angeborenen Immunsystems können auf die HSPC-Mobilisierung direkt regulierend einwirken. So stellen beispielsweise diverse Proteinspaltprodukte der Komplementkaskade essenzielle Modulatoren einer effizienten HSPC-Mobilisierung dar [Molendijk, 1986; Reca, 2007]. Auch verschiedene von Granulozyten sezernierte Substanzen, wie das zur Subfamilie der CXC-Chemokine zählende IL-8 oder die proteolytischen Enzyme Neutrophilen-Elastase und Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9, Gelatinase-B), induzieren eine verstärkte Mobilisierung hämatopoetischer Progenitoren [Levesque, 2003a; Levesque, 2003b].

Bei Untersuchungen des Oberflächenexpressionsniveaus primitiver, muriner HSPC konnte unter anderem die Expression von TLR2 und TLR4 nachgewiesen werden, deren Aktivierung den Eintritt ruhender Vorläuferzellen in den Zellzyklus triggert [Nagai, 2006]. Eine derartige Pathogen-vermittelte Stimulation des hämatopoetischen Kompartiments kann im Fall einer Infektion kurzfristig den notwendigen Nachschub an Effektoren des angeborenen Immunsystems sichern.

Für das humane System konnte gezeigt werden, dass CD34⁺ hämatopoetische Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut konstitutiv TLR9 exprimieren. Auf Stimulation mit CpG reagierten diese Zellen mit einer Zeit- und Dosis-abhängigen Steigerung ihrer IL-8-Expression [Kim, 2005].

6.8.1.2 CpG-vermittelte Mobilisierung sehr unreifer, pluripotenter HSC

In den Experimenten zur vorliegenden Arbeit waren in der Milz sowohl nach alleiniger CpG-Applikation, als auch nach Kombination von CpG mit 5-FU durchflusszytometrisch mehr hämatopoetische Progenitorzellen (Lin⁻ Zellen) messbar als nach alleiniger Chemotherapie (Abb. 5.13). Obgleich CpG im murinen Knochenmark zum Analysezeitpunkt zu keiner Zunahme der Zellzahl der Lin⁻ Population insgesamt geführt hatte, wurden auch hier die unreifen Progenitorzellen nach dem Expressionsmuster der für pluripotente, hämatopoetische Stammzellen typischen Oberflächenmarker Sca-1 und c-Kit genauer analysiert (Daten nicht gezeigt).

Nach Applikationen von 5-FU, CpG oder einer Kombination aus beiden Substanzen war in unseren Experimenten im Knochenmark eine Abnahme der Zellzahl ruhender Sca-1⁻ c-Kit⁻ Zellen im Vergleich zu unbehandelten Tieren zu beobachten, wohingegen die Zahl der im Reifungsprozess unmittelbar folgenden Sca-1⁺ c-Kit⁻ Zellen deutlich zugenommen hatte. Sca-1⁺ c-Kit⁺ Zellen waren nur nach alleiniger CpG-Applikation massiv vermehrt. In Zusammenschau mit den oben dargestellten Erkenntnissen aus der Literatur könnte diese Verschiebung in unseren Versuchen eine Mobilisierung sehr unreifer, pluripotenter HSC widerspiegeln. Ein solcher Prozess ist einerseits durch mobilisierende CpG-Effekte und andererseits durch den Proliferationsdruck der myelotoxischen 5-FU-Behandlung denkbar, zumal eine relative Anreicherung primitiver HSPC im Knochenmark nach Behandlung mit 5-FU bereits seit längerem bekannt ist [Randall, 1997]. In der Milz führten wiederholte 5-FU-Applikationen zu keiner Zunahme

der Zellzahlen einzelner, unreifer Subpopulationen. Nach Kombination von Zytostatikum und CpG waren hier jedoch sowohl die sehr unreifen Sca-1⁻ c-Kit⁻ Progenitoren als auch Sca-1⁺ c-Kit⁺ Zellen in deutlich höherer Zahl nachweisbar, als nach alleiniger Chemotherapie. Im Knochenmark konnte nach Kombination beider Substanzen im Gegensatz dazu –zumindest zum gewählten Analysezeitpunkt– keine Synergie beider Einzelkomponenten beobachtet werden, da die Zellzahlen der unterschiedlich undifferenzierten Vorläuferzellen nach Kombination beider Substanzen nie nennenswert über dem Wert nach alleiniger Chemotherapie lagen. Somit konnte in unseren Experimenten im Knochenmark, anders als in der Milz, durchflusszytometrisch kein CpG-vermittelter, chemoprotektiver Effekt auf HSPC gezeigt werden.

Die histologische Beurteilung des murinen Knochenmarks zeigte das hämatopoetische Gewebe fünf Tage nach der letzten 5-FU-Behandlung jedoch nur nach Kombination des Zytostatikums mit CpG in beginnender Regeneration. Nach alleiniger Chemotherapie war die Architektur des hämatopoetisch aktiven Gewebes zum gleichen Zeitpunkt völlig zerstört. Somit scheint CpG doch eine raschere Erholung von Chemotherapie-induzierter, hämatopoetischer Toxizität vermitteln zu können.

Insgesamt ist eine verstärkte Mobilisierung hämatopoetischer Vorläuferzellen in Knochenmark und Milz jedoch wohl nur eine Teilkomponente des beobachteten Überlebensvorteils durch Kombination einer myelotoxischen 5-FU-Therapie mit CpG.

6.8.2 Gesteigerte Aktivierung verbliebener neutrophiler Granulozyten

Neutrophile Granulozyten spielen physiologischerweise als schnell handlungsfähige Effektoren der angeborenen Immunität eine herausragende Rolle in der ersten Phase der Immunaktivierung. Während der Phase Chemotherapie-induzierter Neutropenie stellen vor allem mikrobielle Infektionen im klinischen Alltag eine potenziell tödliche Bedrohung hämato-onkologischer Patienten dar. Daher ist eine Beteiligung neutrophiler Granulozyten am beobachteten Überlebensvorteil bei Kombination einer hochdosierten 5-FU-Behandlung mit CpG im Vergleich zum Überleben nach alleiniger Chemotherapie durchaus denkbar.

Humane und murine neutrophile Granulozyten exprimieren eine Vielzahl der bekannten TLR, darunter auch TLR9, und sind somit in der Lage direkt auf CpG-Applikationen

in vivo zu reagieren [Hayashi 2003; Bellocchio, 2004; Tsuda, 2004]. Die Erkennung bakterieller DNA hat physiologischerweise weitreichende Auswirkungen auf die Funktion neutrophiler Granulozyten. So induzierte die Stimulation mit CpG eine Zunahme der intrazellulären TLR9-Expression humaner neutrophiler Granulozyten im Sinne einer Sensitivierung der Pathogenerkennungsmechanismen [Jozsef, 2004]. CpG spielt offenbar auch eine entscheidende Rolle bei der Wanderung neutrophiler Granulozyten aus der Blutzirkulation in infiziertes Gewebe [El Kebir, 2008]. 60 Minuten nach systemischer CpG-Applikation war bei Ratten eine transiente, moderate Zunahme der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten messbar, was durch eine Mobilisierung der immunologischen Effektoren aus dem Knochenmark vermittelt sein könnte [Jozsef 2004]. In Infektionsmodellen war bei CpG-vorbehandelten Mäusen eine im Vergleich zu Kontrolltieren beschleunigte Akkumulation stärker aktivierter neutrophiler Granulozyten am Infektionsort zu beobachten [Weighardt, 2000; Deng, 2004]. Konsistent mit der Beobachtung einer verstärkten Fähigkeit neutrophiler Granulozyten zur Extravasation in infiziertes Gewebe sezernieren humane neutrophile Granulozyten CpG-vermittelt vermehrt das Chemokin IL-8 [Jozsef, 2006]. Die kurze Lebensdauer neutrophiler Granulozyten durch konstitutive Apoptose zirkulierender Zellen gehört zu den kritischen Regulationsmechanismen einer Entzündungsreaktion [Savill, 1989; Whyte, 1993]. CpG verzögert die Apoptose und ermöglicht so ein verlängertes Überleben aktivierter neutrophiler Granulozyten *in vitro* und *in vivo* [Jozsef 2004; Francois, 2005].

Für das von B. Holzmanns Gruppe verwendete, polymikrobielle Sepsismodell mit operativer Induktion einer septischen Peritonitis bei Mäusen (*colon ascendens stent peritonitis*, CASP-Modell) ist die rasche Progredienz und frühe Mortalität der Versuchstiere 18 bis 48 Stunden nach Induktion bekannt [Zantl, 1998]. Das nach Vorbehandlung mit CpG deutlich verbesserte Überleben war in diesem Modell in erster Linie nicht auf eine verstärkte T_H1-Antwort zurückzuführen, sondern vor allem auf die CpG-vermittelte Aktivierung von Effektoren der angeborenen Immunität und die damit verbunden extrem schnell wirksame immunologische Abwehr. Aus der Peritonealflüssigkeit isolierte neutrophile Granulozyten zeigten nach CpG-Vorbehandlung eine deutliche Hochregulation phagozytischer Rezeptoren sowie eine gesteigerte Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite [Weighardt 2000]. Ähnliche Reaktionen neutrophiler Granulozyten auf CpG konnten auch im humanen System gezeigt werden [Hayashi 2003].

Wenn zeitgleich mit 5-FU appliziertes CpG in den hier diskutierten Experimenten die Funktionalität der wenigen, in Chemotherapie-bedingter Neutropenie verbliebenen

neutrophilen Granulozyten optimiert, so dürfte dies die Immunabwehr der Versuchstiere gegen mikrobielle Pathogene durchaus verbessern. Ein solcher Effekt kann für den klinischen Verlauf der Aplasie von kritischer Bedeutung sein und kommt daher als weitere Teilkomponente des beobachteten Überlebensvorteils durchaus in Betracht.

7 AUSBLICK

Die vorliegende Arbeit zeigt im murinen C26-Modell die erfolgreiche Kombination eines potenten Immuntherapieprotokolls aus DC und CpG mit Chemotherapie ohne Verlust der antitumoralen Effektivität der Immuntherapie. Solche Ergebnisse präklinischer Forschung bilden wichtige Voraussetzungen für die gezielte Entwicklung DC-basierter Vakzinierungsprotokolle für die klinische Erprobung. Die Beschreibung protektiver CpG-Effekte vor 5-FU-assoziiierter Toxizität im Rahmen der Experimente stellt eine weitere interessante Beobachtung dar, die allerdings noch genauerer Charakterisierung der zugrundeliegenden Mechanismen bedarf.

Da TLR9 nach aktuellem Kenntnisstand nur auf murinen, nicht aber auf humanen mDC exprimiert wird, würde die Applikation von CpG, wie in unserem murinen System erfolgreich angewandt, bei humanen mDC nicht zur direkten Aktivierung führen. Aus diesem Grund ist die Untersuchung anderer TLR-Liganden für Maturierung und Aktivierung von DC-Vakzinen für den klinischen Einsatz von entscheidender Bedeutung. So wird das synthetische Imidazoquinolin Imiquimod hauptsächlich über TLR7 erkannt und aktiviert im humanen System daher sowohl mDC als auch pDC [Hemmi, 2002; Schon, 2008]. Diese Substanz ist daher ein vielversprechendes Adjuvans zur Induktion potenter, antitumorale Immunität für den klinischen Einsatz und als Creme zur topischen Behandlung verschiedener (prä-)maligner Hauterkrankungen, wie *Condylomata acuminata* im Anogenitalbereich, aktinischer Keratose und superfiziellem Basalzellkarzinom bereits zugelassen. Zudem wird Imiquimod derzeit in zahlreichen, klinischen Studien allein oder in Kombination mit anderen Therapiemodalitäten bei sehr unterschiedlichen Erkrankungen mit kutaner Beteiligung geprüft. Ergebnisse aus *off-label*-Behandlungen mit Imiquimod zum Beispiel bei M. Bowen, invasivem Plattenepithelkarzinom, Lentigo maligna, kutanen Melanommetastasen oder Mycosis fungoides unterstreichen das therapeutische Potential dieses Therapieansatzes [Ganjian, 2009]. Mit R-848 wurde ein noch potenteres Imidazoquinolin entwickelt, das im humanen System neben TLR7 auch TLR8 aktiviert [Jurk, 2002]. Ergebnisse erster klinischer Studien ergaben jedoch, dass die hohe, immunologische Effektivität dieser Substanz mit ausgeprägten, lokalen und systemischen Nebenwirkungen einhergeht [Pockros, 2007; Szeimies, 2008]. Potente Adjuvanswirkung entfalten auch kurze, immunstimulatorische RNA-Sequenzen (isRNA), die ebenfalls TLR7-abhängig sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Produktion großer Mengen an IFN- α induzieren [Hornung, 2005]. Weiterführende Experimente aus unserer Abteilung zeigten die aktivierenden Effekte von isRNA auf DC mit konsekutiver Induktion Antigen-spezifischer CTL-Immunität [Bourquin, 2007].

Einen weiteren, vielversprechenden Angriffspunkt für die Entwicklung effektiver Immuntherapieprotokolle stellen immuninhibitorische Zielstrukturen wie *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4* (CTLA-4) und *programmed death-1 receptor* (PD-1) oder die immunsuppressiven CD4⁺ CD25⁺ regulatorischen T-Zellen dar. Diese Komponenten des Immunsystems dienen physiologischerweise der Begrenzung exzessiver Immunaktivierungen, um Autoimmunphänomene zu verhindern. Durch Kombination mit Depletion regulatorischer T-Zellen oder CTLA-4-Blockade kann die Effektivität antitumoraler DC-Vakzinen weiter verbessert werden [Saha, 2010].

Erkenntnisse über immunmodulatorische Wirkungen bestimmter Zytostatika, die nicht nur die Freisetzung von Tumorantigenen, sondern auch von immunologischen Gefahrensignalen aus apoptotischen Tumorzellen triggern, bieten zudem neue Perspektiven für die Entwicklung kombinierter Behandlungsprotokolle aus Chemo- und Immuntherapie. Die immunologische Forschung schafft durch das verbesserte Verständnis des Immunsystems die Möglichkeit, immunologische Prozesse zu therapeutischen Zwecken zu beeinflussen. Für die Entwicklung erfolgreicher Kombinationen von Immuntherapie mit Zytostatika ist nun eine weiterführende Analyse der Wechselwirkungen zwischen apoptotischen Tumorzellen und dem Immunsystem von außerordentlicher Bedeutung, um durch gezielten Einsatz von Chemotherapie immunogene Formen des Zelltods zu induzieren. Das Zusammenfügen wissenschaftlicher Erkenntnisse aus Apoptoseforschung, Immunologie und Onkologie ist daher in Zukunft für die Entwicklung innovativer, antitumoraler Therapiekonzepte unerlässlich.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- AbdAlla, E. E., G. E. Blair, R. A. Jones, H. M. Sue-Ling and D. Johnston (1995). "Mechanism of synergy of levamisole and fluorouracil: induction of human leukocyte antigen class I in a colorectal cancer cell line." J Natl Cancer Inst **87**(7): 489-96.
- Adachi, O., T. Kawai, K. Takeda, M. Matsumoto, H. Tsutsui, M. Sakagami, K. Nakanishi and S. Akira (1998). "Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function." Immunity **9**(1): 143-50.
- Agostini, L., F. Martinon, K. Burns, M. F. McDermott, P. N. Hawkins and J. Tschopp (2004). "NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder." Immunity **20**(3): 319-25.
- Aguila, H. L., K. Akashi, J. Domen, K. L. Gandy, E. Lagasse, R. E. Mebius, S. J. Morrison, J. Shizuru, S. Strober, N. Uchida, D. E. Wright and I. L. Weissman (1997). "From stem cells to lymphocytes: biology and transplantation." Immunol Rev **157**: 13-40.
- Akira, S. and K. Takeda (2004). "Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **4**(7): 499-511.
- Akira, S., K. Takeda and T. Kaisho (2001). "Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity." Nat Immunol **2**(8): 675-80.
- Alberts, B. J., A. Lewis, J et al. (2002). Molecular Biology of the Cell. New York, Garland Science.
- Alignani, D., B. Maletto, M. Liscovsky, A. Ropolo, G. Moron and M. C. Pistoiresi-Palencia (2005). "Orally administered OVA/CpG-ODN induces specific mucosal and systemic immune response in young and aged mice." J Leukoc Biol **77**(6): 898-905.
- Anderson, K. V. (2000). "Toll signaling pathways in the innate immune response." Curr Opin Immunol **12**(1): 13-9.
- Anderson, K. V., L. Bokla and C. Nusslein-Volhard (1985). "Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product." Cell **42**(3): 791-8.
- Antonia, S., J. J. Mule and J. S. Weber (2004). "Current developments of immunotherapy in the clinic." Curr Opin Immunol **16**(2): 130-6.
- Apetoh, L., F. Ghiringhelli, A. Tesniere, M. Obeid, C. Ortiz, A. Criollo, G. Mignot, M. C. Maiuri, E. Ullrich, P. Saulnier, H. Yang, S. Amigorena, B. Ryffel, F. J. Barrat, P. Saftig, F. Levi, R. Lidereau, C. Nogues, J. P. Mira, A. Chompret, V. Joulin, F. Clavel-Chapelon, J. Bourhis, F. Andre, S. Delaloge, T. Tursz, G. Kroemer and L. Zitvogel (2007). "Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy." Nat Med **13**(9): 1050-9.
- Aquino, A., S. P. Prete, J. W. Greiner, A. Giuliani, G. Graziani, M. Turriziani, R. De Filippi, G. Masci, E. Bonmassar and L. De Vecchis (1998). "Effect of the combined treatment with 5-fluorouracil, gamma-interferon or folic acid on carcinoembryonic antigen expression in colon cancer cells." Clin Cancer Res **4**(10): 2473-81.

- Asselin-Paturel, C., A. Boonstra, M. Dalod, I. Durand, N. Yessaad, C. Dezutter-Dambuyant, A. Vicari, A. O'Garra, C. Biron, F. Briere and G. Trinchieri (2001). "Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology." Nat Immunol **2**(12): 1144-50.
- Balsari, A., M. Tortoreto, D. Besusso, G. Petrangolini, L. Sfondrini, R. Maggi, S. Menard and G. Pratesi (2004). "Combination of a CpG-oligodeoxynucleotide and a topoisomerase I inhibitor in the therapy of human tumour xenografts." Eur J Cancer **40**(8): 1275-81.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran and K. Palucka (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol **18**: 767-811.
- Banchereau, J. and A. K. Palucka (2005). "Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer." Nat Rev Immunol **5**(4): 296-306.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-52.
- Bass, K. K. and M. J. Mastrangelo (1998). "Immunopotential with low-dose cyclophosphamide in the active specific immunotherapy of cancer." Cancer Immunol Immunother **47**(1): 1-12.
- Basu, S. and P. K. Srivastava (1999). "Calreticulin, a peptide-binding chaperone of the endoplasmic reticulum, elicits tumor- and peptide-specific immunity." J Exp Med **189**(5): 797-802.
- Bell, D., J. W. Young and J. Banchereau (1999). "Dendritic cells." Adv Immunol **72**: 255-324.
- Bellocchio, S., S. Moretti, K. Perruccio, F. Fallarino, S. Bozza, C. Montagnoli, P. Mosci, G. B. Lipford, L. Pitzurra and L. Romani (2004). "TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis." J Immunol **173**(12): 7406-15.
- Belvin, M. P. and K. V. Anderson (1996). "A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway." Annu Rev Cell Dev Biol **12**: 393-416.
- Bergmann-Leitner, E. S. and S. I. Abrams (2001). "Treatment of human colon carcinoma cell lines with anti-neoplastic agents enhances their lytic sensitivity to antigen-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes." Cancer Immunol Immunother **50**(9): 445-55.
- Berry, L. J., D. K. Hickey, K. A. Skelding, S. Bao, A. M. Rendina, P. M. Hansbro, C. M. Gockel and K. W. Beagley (2004). "Transcutaneous immunization with combined cholera toxin and CpG adjuvant protects against Chlamydia muridarum genital tract infection." Infect Immun **72**(2): 1019-28.
- Bird, A. (1987). "CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus." Trend Genet **3**: 342-7.
- Bjorck, P. (2001). "Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice." Blood **98**(13): 3520-6.

- Blachere, N. E., R. B. Darnell and M. L. Albert (2005). "Apoptotic cells deliver processed antigen to dendritic cells for cross-presentation." PLoS Biol **3**(6): e185.
- Bourquin, C., L. Schmidt, V. Hornung, C. Wurzenberger, D. Anz, N. Sandholzer, S. Schreiber, A. Voelkl, G. Hartmann and S. Endres (2007). "Immunostimulatory RNA oligonucleotides trigger an antigen-specific cytotoxic T-cell and IgG2a response." Blood **109**(7): 2953-60.
- Brazolot Millan, C. L., R. Weeratna, A. M. Krieg, C. A. Siegrist and H. L. Davis (1998). "CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15553-8.
- Brocker, T. (1999). "The role of dendritic cells in T cell selection and survival." J Leukoc Biol **66**(2): 331-5.
- Brode, S. and A. Cooke (2008). "Immune-potentiating effects of the chemotherapeutic drug cyclophosphamide." Crit Rev Immunol **28**(2): 109-26.
- Brown, G. D. (2006). "Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor." Nat Rev Immunol **6**(1): 33-43.
- Brunner, C., J. Seiderer, A. Schlamp, M. Bidlingmaier, A. Eigler, W. Haimerl, H. A. Lehr, A. M. Krieg, G. Hartmann and S. Endres (2000). "Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo." J Immunol **165**(11): 6278-86.
- Buell, J. F., T. G. Gross and E. S. Woodle (2005). "Malignancy after transplantation." Transplantation **80**(2 Suppl): S254-64.
- Burnet, F. M. (1970). "The concept of immunological surveillance." Prog Exp Tumor Res **13**: 1-27.
- Carboni, M. C. and S. Coderoni (1994). "Effect of CPT on the DNA cleavage/religation reaction mediated by calf thymus Topoisomerase I: evidence of an inhibition of DNA religation. Inhibition of Topoisomerase I-mediated DNA religation by CPT." Mol Biol Rep **20**(3): 129-33.
- Casares, N., M. O. Pequignot, A. Tesniere, F. Ghiringhelli, S. Roux, N. Chaput, E. Schmitt, A. Hamai, S. Hervas-Stubbs, M. Obeid, F. Coutant, D. Metivier, E. Pichard, P. Aucouturier, G. Pierron, C. Garrido, L. Zitvogel and G. Kroemer (2005). "Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death." J Exp Med **202**(12): 1691-701.
- Casati, A., V. S. Zimmermann, F. Benigni, M. T. Bertilaccio, M. Bellone and A. Mondino (2005). "The immunogenicity of dendritic cell-based vaccines is not hampered by doxorubicin and melphalan administration." J Immunol **174**(6): 3317-25.
- Caux, C., C. Dezutter-Dambuyant, D. Schmitt and J. Banchereau (1992). "GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells." Nature **360**(6401): 258-61.

- Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, I. Durand, M. Cella, A. Lanzavecchia and J. Banchereau (1997). "CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis." Blood **90**(4): 1458-70.
- Cella, M., D. Jarrossay, F. Facchetti, O. Alebardi, H. Nakajima, A. Lanzavecchia and M. Colonna (1999). "Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon." Nat Med **5**(8): 919-23.
- Celluzzi, C. M., J. I. Mayordomo, W. J. Storkus, M. T. Lotze and L. D. Falo, Jr. (1996). "Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity." J Exp Med **183**(1): 283-7.
- Center, M. M., A. Jemal, R. A. Smith and E. Ward (2009). "Worldwide variations in colorectal cancer." CA Cancer J Clin **59**(6): 366-78.
- Chang, Z. L. (2010). "Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways." Inflamm Res **59**(10): 791-808.
- Chaturvedi, A. and S. K. Pierce (2009). "How location governs toll-like receptor signaling." Traffic **10**(6): 621-8.
- Chen, Z. J. (2005). "Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway." Nat Cell Biol **7**(8): 758-65.
- Cheng, W. F., C. N. Lee, Y. N. Su, C. Y. Chai, M. C. Chang, J. M. Polo, C. F. Hung, T. C. Wu, C. Y. Hsieh and C. A. Chen (2006). "Sindbis virus replicon particles encoding calreticulin linked to a tumor antigen generate long-term tumor-specific immunity." Cancer Gene Ther **13**(9): 873-85.
- Choi, G. S., M. H. Lee, S. K. Kim, C. S. Kim, H. S. Lee, M. W. Im, H. Y. Kil, D. H. Seong, J. R. Lee, W. C. Kim, M. G. Lee and S. U. Song (2005). "Combined treatment of an intratumoral injection of dendritic cells and systemic chemotherapy (Paclitaxel) for murine fibrosarcoma." Yonsei Med J **46**(6): 835-42.
- Chu, R. S., O. S. Targoni, A. M. Krieg, P. V. Lehmann and C. V. Harding (1997). "CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity." J Exp Med **186**(10): 1623-31.
- Clark, W. H., Jr., D. E. Elder, D. t. Guerry, L. E. Braitman, B. J. Trock, D. Schultz, M. Synnestvedt and A. C. Halpern (1989). "Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression." J Natl Cancer Inst **81**(24): 1893-904.
- Clemente, C. G., M. C. Mihm, Jr., R. Bufalino, S. Zurrada, P. Collini and N. Cascinelli (1996). "Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma." Cancer **77**(7): 1303-10.
- Coley, W. B. (1893). "The Treatment of Malignant Tumors by Repeated Inoculations of Erysipelas: With a Report of ten Original Cases." Am J Med Sci **205**(5): 487-511.
- Cooper, C. L., H. L. Davis, J. B. Angel, M. L. Morris, S. M. Elfer, I. Seguin, A. M. Krieg and D. W. Cameron (2005). "CPG 7909 adjuvant improves hepatitis B virus

- vaccine seroprotection in antiretroviral-treated HIV-infected adults." AIDS **19**(14): 1473-9.
- Cooper, C. L., H. L. Davis, M. L. Morris, S. M. Efler, M. A. Adhami, A. M. Krieg, D. W. Cameron and J. Heathcote (2004). "CPG 7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Engerix-B HBV vaccine in healthy adults: a double-blind phase I/II study." J Clin Immunol **24**(6): 693-701.
- Corbett, T. H., D. P. Griswold, Jr., B. J. Roberts, J. C. Peckham and F. M. Schabel, Jr. (1975). "Tumor induction relationships in development of transplantable cancers of the colon in mice for chemotherapy assays, with a note on carcinogen structure." Cancer Res **35**(9): 2434-9.
- Correale, P., A. Aquino, A. Giuliani, M. Pellegrini, L. Micheli, M. G. Cusi, C. Nencini, R. Petrioli, S. P. Prete, L. De Vecchis, M. Turriziani, G. Giorgi, E. Bonmassar and G. Francini (2003). "Treatment of colon and breast carcinoma cells with 5-fluorouracil enhances expression of carcinoembryonic antigen and susceptibility to HLA-A(*)02.01 restricted, CEA-peptide-specific cytotoxic T cells in vitro." Int J Cancer **104**(4): 437-45.
- Creagh, E. M. and L. A. O'Neill (2006). "TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity." Trends Immunol **27**(8): 352-7.
- Cumberbatch, M., R. J. Dearman and I. Kimber (1997a). "Interleukin 1 beta and the stimulation of Langerhans cell migration: comparisons with tumour necrosis factor alpha." Arch Dermatol Res **289**(5): 277-84.
- Cumberbatch, M., R. J. Dearman and I. Kimber (1997b). "Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta for migration." Immunology **92**(3): 388-95.
- Cyster, J. G. (1999). "Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs." J Exp Med **189**(3): 447-50.
- Davis, H. L., R. Weeratna, T. J. Waldschmidt, L. Tygrett, J. Schorr and A. M. Krieg (1998). "CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen." J Immunol **160**(2): 870-6.
- Davis, I. D., M. Jefford, P. Parente and J. Cebon (2003). "Rational approaches to human cancer immunotherapy." J Leukoc Biol **73**(1): 3-29.
- De Smedt, T., B. Pajak, E. Muraille, L. Lespagnard, E. Heinen, P. De Baetselier, J. Urbain, O. Leo and M. Moser (1996). "Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo." J Exp Med **184**(4): 1413-24.
- den Brok, M. H., S. Nierkens, C. G. Figdor, T. J. Ruers and G. J. Adema (2005). "Dendritic cells: tools and targets for antitumor vaccination." Expert Rev Vaccines **4**(5): 699-710.
- Deng, J. C., T. A. Moore, M. W. Newstead, X. Zeng, A. M. Krieg and T. J. Standiford (2004). "CpG oligodeoxynucleotides stimulate protective innate immunity against pulmonary Klebsiella infection." J Immunol **173**(8): 5148-55.

- Dhodapkar, M. V., J. Krasovsky, K. Osman and M. D. Geller (2003). "Vigorous premalignancy-specific effector T cell response in the bone marrow of patients with monoclonal gammopathy." J Exp Med **198**(11): 1753-7.
- Dhodapkar, M. V., R. M. Steinman, J. Krasovsky, C. Munz and N. Bhardwaj (2001). "Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells." J Exp Med **193**(2): 233-8.
- Di Virgilio, F. (2007). "Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome." Trends Pharmacol Sci **28**(9): 465-72.
- Dighe, A. S., E. Richards, L. J. Old and R. D. Schreiber (1994). "Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors." Immunity **1**(6): 447-56.
- Doi, H., M. Inaba, Y. Yamamoto, S. Taketani, S. I. Mori, A. Sugihara, H. Ogata, J. Toki, H. Hisha, K. Inaba, S. Sogo, M. Adachi, T. Matsuda, R. A. Good and S. Ikehara (1997). "Pluripotent hemopoietic stem cells are c-kit^{low}." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(6): 2513-7.
- Dunn, G. P., A. T. Bruce, K. C. Sheehan, V. Shankaran, R. Uppaluri, J. D. Bui, M. S. Diamond, C. M. Koebel, C. Arthur, J. M. White and R. D. Schreiber (2005). "A critical function for type I interferons in cancer immunoediting." Nat Immunol **6**(7): 722-9.
- Dunn, G. P., C. M. Koebel and R. D. Schreiber (2006). "Interferons, immunity and cancer immunoediting." Nat Rev Immunol **6**(11): 836-48.
- Dunn, G. P., L. J. Old and R. D. Schreiber (2004a). "The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting." Immunity **21**(2): 137-48.
- Dunn, G. P., L. J. Old and R. D. Schreiber (2004b). "The three Es of cancer immunoediting." Annu Rev Immunol **22**: 329-60.
- Edelson, B. T. and E. R. Unanue (2002). "MyD88-dependent but Toll-like receptor 2-independent innate immunity to Listeria: no role for either in macrophage listericidal activity." J Immunol **169**(7): 3869-75.
- Edling, C. E. and B. Hallberg (2007). "c-Kit--a hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase." Int J Biochem Cell Biol **39**(11): 1995-8.
- Ehrke, M. J., E. Mihich, D. Berd and M. J. Mastrangelo (1989). "Effects of anticancer drugs on the immune system in humans." Semin Oncol **16**(3): 230-53.
- Eisenbarth, S. C., O. R. Colegio, W. O'Connor, F. S. Sutterwala and R. A. Flavell (2008). "Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants." Nature **453**(7198): 1122-6.
- El Kebir, D., L. Jozsef and J. G. Filep (2008). "Neutrophil recognition of bacterial DNA and Toll-like receptor 9-dependent and -independent regulation of neutrophil function." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **56**(1): 41-53.
- Euvrard, S., J. Kanihakis and A. Claudy (2003). "Skin cancers after organ transplantation." N Engl J Med **348**(17): 1681-91.

- Fernandez, N. C., A. Lozier, C. Flament, P. Ricciardi-Castagnoli, D. Bellet, M. Suter, M. Perricaudet, T. Tursz, E. Maraskovsky and L. Zitvogel (1999). "Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo." Nat Med **5**(4): 405-11.
- Ferradini, L., A. Mackensen, C. Genevee, J. Bosq, P. Duvillard, M. F. Avril and T. Hercend (1993). "Analysis of T cell receptor variability in tumor-infiltrating lymphocytes from a human regressive melanoma. Evidence for in situ T cell clonal expansion." J Clin Invest **91**(3): 1183-90.
- Finn, O. J. (2003). "Cancer vaccines: between the idea and the reality." Nat Rev Immunol **3**(8): 630-41.
- Fisk, B. and C. G. Ioannides (1998). "Increased sensitivity of adriamycin-selected tumor lines to CTL-mediated lysis results in enhanced drug sensitivity." Cancer Res **58**(21): 4790-3.
- Fitzgerald, K. A., E. M. Palsson-McDermott, A. G. Bowie, C. A. Jefferies, A. S. Mansell, G. Brady, E. Brint, A. Dunne, P. Gray, M. T. Harte, D. McMurray, D. E. Smith, J. E. Sims, T. A. Bird and L. A. O'Neill (2001). "Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction." Nature **413**(6851): 78-83.
- Fitzgerald, K. A., D. C. Rowe, B. J. Barnes, D. R. Caffrey, A. Visintin, E. Latz, B. Monks, P. M. Pitha and D. T. Golenbock (2003). "LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF." J Exp Med **198**(7): 1043-55.
- Fitzgerald-Bocarsly, P. (1993). "Human natural interferon-alpha producing cells." Pharmacol Ther **60**(1): 39-62.
- Fitzner, N., S. Clauberg, F. Essmann, J. Liebmann and V. Kolb-Bachofen (2008). "Human skin endothelial cells can express all 10 TLR genes and respond to respective ligands." Clin Vaccine Immunol **15**(1): 138-46.
- Foley, E. J. (1953). "Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin." Cancer Res **13**(12): 835-7.
- Francois, S., J. El Benna, P. M. Dang, E. Pedruzzi, M. A. Gougerot-Pocidallo and C. Elbim (2005). "Inhibition of neutrophil apoptosis by TLR agonists in whole blood: involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt and NF-kappaB signaling pathways, leading to increased levels of Mcl-1, A1, and phosphorylated Bad." J Immunol **174**(6): 3633-42.
- Friedberg, J. W., H. Kim, M. McCauley, E. M. Hessel, P. Sims, D. C. Fisher, L. M. Nadler, R. L. Coffman and A. S. Freedman (2005). "Combination immunotherapy with a CpG oligonucleotide (1018 ISS) and rituximab in patients with non-Hodgkin lymphoma: increased interferon-alpha/beta-inducible gene expression, without significant toxicity." Blood **105**(2): 489-95.
- Friesen, C., S. Fulda and K. M. Debatin (1999). "Cytotoxic drugs and the CD95 pathway." Leukemia **13**(11): 1854-8.
- Fu, F., Y. Li, S. Qian, L. Lu, F. Chambers, T. E. Starzl, J. J. Fung and A. W. Thomson (1996). "Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC class

- II+, CD80dim, CD86-) prolong cardiac allograft survival in nonimmunosuppressed recipients." Transplantation **62**(5): 659-65.
- Fuchs, C., E. P. Mitchell and P. M. Hoff (2006). "Irinotecan in the treatment of colorectal cancer." Cancer Treat Rev **32**(7): 491-503.
- Fuchs, E. J. and P. Matzinger (1996). "Is cancer dangerous to the immune system?" Semin Immunol **8**(5): 271-80.
- Gallichan, W. S., R. N. Woolstencroft, T. Guarasci, M. J. McCluskie, H. L. Davis and K. L. Rosenthal (2001). "Intranasal immunization with CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant dramatically increases IgA and protection against herpes simplex virus-2 in the genital tract." J Immunol **166**(5): 3451-7.
- Gallucci, S., M. Lolkema and P. Matzinger (1999). "Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells." Nat Med **5**(11): 1249-55.
- Galon, J., A. Costes, F. Sanchez-Cabo, A. Kirilovsky, B. Mlecnik, C. Lagorce-Pages, M. Tosolini, M. Camus, A. Berger, P. Wind, F. Zinzindohoue, P. Bruneval, P. H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W. H. Fridman and F. Pages (2006). "Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome." Science **313**(5795): 1960-4.
- Ganjan, S., A. J. Ourian, G. Shamtoub, J. J. Wu and J. E. Murase (2009). "Off-label indications for imiquimod." Dermatol Online J **15**(5): 4.
- Gardella, S., C. Andrei, D. Ferrera, L. V. Lotti, M. R. Torrisi, M. E. Bianchi and A. Rubartelli (2002). "The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway." EMBO Rep **3**(10): 995-1001.
- Gay, N. J. and F. J. Keith (1991). "Drosophila Toll and IL-1 receptor." Nature **351**(6325): 355-6.
- Ghiringhelli, F., L. Apetoh, A. Tesniere, L. Aymeric, Y. Ma, C. Ortiz, K. Vermaelen, T. Panaretakis, G. Mignot, E. Ullrich, J. L. Perfettini, F. Schlemmer, E. Tasdemir, M. Uhl, P. Genin, A. Civas, B. Ryffel, J. Kanellopoulos, J. Tschopp, F. Andre, R. Lidereau, N. M. McLaughlin, N. M. Haynes, M. J. Smyth, G. Kroemer and L. Zitvogel (2009). "Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors." Nat Med **15**(10): 1170-8.
- Ghiringhelli, F., N. Larmonier, E. Schmitt, A. Parcellier, D. Cathelin, C. Garrido, B. Chauffert, E. Solary, B. Bonnotte and F. Martin (2004). "CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative." Eur J Immunol **34**(2): 336-44.
- Ghiringhelli, F., C. Menard, P. E. Puig, S. Ladoire, S. Roux, F. Martin, E. Solary, A. Le Cesne, L. Zitvogel and B. Chauffert (2007). "Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients." Cancer Immunol Immunother **56**(5): 641-8.
- Gilboa, E. (1999). "The makings of a tumor rejection antigen." Immunity **11**(3): 263-70.

- Gilboa, E. (2007). "DC-based cancer vaccines." J Clin Invest **117**(5): 1195-203.
- Girart, M. V., M. B. Fuertes, C. I. Domaica, L. E. Rossi and N. W. Zwirner (2007). "Engagement of TLR3, TLR7, and NKG2D regulate IFN-gamma secretion but not NKG2D-mediated cytotoxicity by human NK cells stimulated with suboptimal doses of IL-12." J Immunol **179**(6): 3472-9.
- Glaser, M. (1979). "Regulation of specific cell-mediated cytotoxic response against SV40-induced tumor associated antigens by depletion of suppressor T cells with cyclophosphamide in mice." J Exp Med **149**(3): 774-9.
- Glazer, R. I. and L. S. Lloyd (1982). "Association of cell lethality with incorporation of 5-fluorouracil and 5-fluorouridine into nuclear RNA in human colon carcinoma cells in culture." Mol Pharmacol **21**(2): 468-73.
- Goldberg, R. M., M. L. Rothenberg, E. Van Cutsem, A. B. Benson, 3rd, C. D. Blanke, R. B. Diasio, A. Grothey, H. J. Lenz, N. J. Meropol, R. K. Ramanathan, C. H. Becerra, R. Wickham, D. Armstrong and C. Viele (2007). "The continuum of care: a paradigm for the management of metastatic colorectal cancer." Oncologist **12**(1): 38-50.
- Grem, J. L. (1997). "Mechanisms of Action and Modulation of Fluorouracil." Semin Radiat Oncol **7**(4): 249-59.
- Griswold, D. P. and T. H. Corbett (1975). "A colon tumor model for anticancer agent evaluation." Cancer **36**(6 Suppl): 2441-4.
- Grothey, A. and D. Sargent (2005). "Overall survival of patients with advanced colorectal cancer correlates with availability of fluorouracil, irinotecan, and oxaliplatin regardless of whether doublet or single-agent therapy is used first line." J Clin Oncol **23**(36): 9441-2.
- Grothey, A., D. Sargent, R. M. Goldberg and H. J. Schmoll (2004). "Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil-leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin in the course of treatment." J Clin Oncol **22**(7): 1209-14.
- Grouard, G., M. C. Rissoan, L. Filgueira, I. Durand, J. Banchereau and Y. J. Liu (1997). "The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand." J Exp Med **185**(6): 1101-11.
- Gumley, T. P., I. F. McKenzie and M. S. Sandrin (1995). "Tissue expression, structure and function of the murine Ly-6 family of molecules." Immunol Cell Biol **73**(4): 277-96.
- Halliday, G. M., A. Patel, M. J. Hunt, F. J. Tefany and R. S. Barnetson (1995). "Spontaneous regression of human melanoma/nonmelanoma skin cancer: association with infiltrating CD4+ T cells." World J Surg **19**(3): 352-8.
- Halperin, S. A., G. Van Nest, B. Smith, S. Abtahi, H. Whiley and J. J. Eiden (2003). "A phase I study of the safety and immunogenicity of recombinant hepatitis B surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide adjuvant." Vaccine **21**(19-20): 2461-7.

- Harris, J., D. Sengar, T. Stewart and D. Hyslop (1976). "The effect of immunosuppressive chemotherapy on immune function in patients with malignant disease." Cancer **37**(2 Suppl): 1058-69.
- Harrison, S. D., Jr., E. P. Denine and J. C. Peckham (1978). "Qualitative and quantitative toxicity of single and sequential sublethal doses of 5-fluorouracil in BDF mice." Cancer Treat Rep **62**(4): 533-45.
- Hartmann, E., B. Wollenberg, S. Rothenfusser, M. Wagner, D. Wellisch, B. Mack, T. Giese, O. Gires, S. Endres and G. Hartmann (2003). "Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer." Cancer Res **63**(19): 6478-87.
- Hartmann, G., G. J. Weiner and A. M. Krieg (1999). "CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 9305-10.
- Hashimoto, C., K. L. Hudson and K. V. Anderson (1988). "The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein." Cell **52**(2): 269-79.
- Hayashi, F., T. K. Means and A. D. Luster (2003). "Toll-like receptors stimulate human neutrophil function." Blood **102**(7): 2660-9.
- Heckelsmiller, K., S. Beck, K. Rall, B. Sipos, A. Schlamp, E. Tuma, S. Rothenfusser, S. Endres and G. Hartmann (2002a). "Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy." Eur J Immunol **32**(11): 3235-45.
- Heckelsmiller, K., K. Rall, S. Beck, A. Schlamp, J. Seiderer, B. Jahrsdorfer, A. Krug, S. Rothenfusser, S. Endres and G. Hartmann (2002b). "Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model." J Immunol **169**(7): 3892-9.
- Heidelberger, C., N. K. Chaudhuri, P. Danneberg, D. Mooren, L. Griesbach, R. Duschinsky, R. J. Schnitzer, E. Plevin and J. Scheiner (1957). "Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds." Nature **179**(4561): 663-6.
- Heikenwalder, M., M. Polymenidou, T. Junt, C. Sigurdson, H. Wagner, S. Akira, R. Zinkernagel and A. Aguzzi (2004). "Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration." Nat Med **10**(2): 187-92.
- Heinzel, F. P., M. D. Sadick, B. J. Holaday, R. L. Coffman and R. M. Locksley (1989). "Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets." J Exp Med **169**(1): 59-72.
- Hemmi, H., T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda and S. Akira (2002). "Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway." Nat Immunol **3**(2): 196-200.

- Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda and S. Akira (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." Nature **408**(6813): 740-5.
- Hengst, J. C., M. B. Mokyr and S. Dray (1980). "Importance of timing in cyclophosphamide therapy of MOPC-315 tumor-bearing mice." Cancer Res **40**(7): 2135-41.
- Hirschowitz, E. A., T. Foody, R. Kryscio, L. Dickson, J. Sturgill and J. Yannelli (2004). "Autologous dendritic cell vaccines for non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol **22**(14): 2808-15.
- Hirsh, V. B., M. Rosell, R. Benner, R.J. Readett, D and JH, Schiller (2008). Randomized phase III trial of paclitaxel/carboplatin with or without PF-3512676 as first line treatment of advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). J Clin Oncol. **26**.
- Holt, P. G., M. A. Schon-Hegrad, J. Oliver, B. J. Holt and P. G. McMenamin (1990). "A contiguous network of dendritic antigen-presenting cells within the respiratory epithelium." Int Arch Allergy Appl Immunol **91**(2): 155-9.
- Hotl, L., R. Ramoner, C. Zelle-Rieser, H. Gander, T. Putz, C. Papesh, W. Nussbaumer, C. Falkensammer, G. Bartsch and M. Thurnher (2005). "Allogeneic dendritic cell vaccination against metastatic renal cell carcinoma with or without cyclophosphamide." Cancer Immunol Immunother **54**(7): 663-70.
- Horng, T., G. M. Barton and R. Medzhitov (2001). "TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway." Nat Immunol **2**(9): 835-41.
- Hornung, V., M. Guenther-Biller, C. Bourquin, A. Ablasser, M. Schlee, S. Uematsu, A. Noronha, M. Manoharan, S. Akira, A. de Fougères, S. Endres and G. Hartmann (2005). "Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7." Nat Med **11**(3): 263-70.
- Hsieh, C. J., T. W. Kim, C. F. Hung, J. Juang, M. Moniz, D. A. Boyd, L. He, P. J. Chen, C. H. Chen and T. C. Wu (2004). "Enhancement of vaccinia vaccine potency by linkage of tumor antigen gene to gene encoding calreticulin." Vaccine **22**(29-30): 3993-4001.
- Hsieh, C. S., S. E. Macatonia, A. O'Garra and K. M. Murphy (1995). "T cell genetic background determines default T helper phenotype development in vitro." J Exp Med **181**(2): 713-21.
- Hsueh, E. C. and D. L. Morton (2003). "Antigen-based immunotherapy of melanoma: Canvaxin therapeutic polyvalent cancer vaccine." Semin Cancer Biol **13**(6): 401-7.
- Huang, F. P., N. Platt, M. Wykes, J. R. Major, T. J. Powell, C. D. Jenkins and G. G. MacPherson (2000). "A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes." J Exp Med **191**(3): 435-44.
- Iihara, K., K. Yamaguchi, Y. Nishimura, T. Iwasaki, K. Suzuki and Y. Hirabayashi (2004). "Spontaneous regression of malignant lymphoma of the breast." Pathol Int **54**(7): 537-42.

- Ikuta, K. and I. L. Weissman (1992). "Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(4): 1502-6.
- Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu and R. M. Steinman (1992). "Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor." J Exp Med **176**(6): 1693-702.
- Inaba, K., J. P. Metlay, M. T. Crowley and R. M. Steinman (1990). "Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ." J Exp Med **172**(2): 631-40.
- Inaba, K., S. Turley, F. Yamaide, T. Iyoda, K. Mahnke, M. Inaba, M. Pack, M. Subklewe, B. Sauter, D. Sheff, M. Albert, N. Bhardwaj, I. Mellman and R. M. Steinman (1998). "Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells." J Exp Med **188**(11): 2163-73.
- Inoue, T., K. Yoneda, M. Manabe and T. Demitsu (2000). "Spontaneous regression of merkel cell carcinoma: a comparative study of TUNEL index and tumor-infiltrating lymphocytes between spontaneous regression and non-regression group." J Dermatol Sci **24**(3): 203-11.
- Ishii, K. J., S. Uematsu and S. Akira (2006). "'Toll' gates for future immunotherapy." Curr Pharm Des **12**(32): 4135-42.
- Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2004). "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses." Nat Immunol **5**(10): 987-95.
- Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol **20**: 197-216.
- Jego, G., A. K. Palucka, J. P. Blanck, C. Chalouni, V. Pascual and J. Banchereau (2003). "Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6." Immunity **19**(2): 225-34.
- Jonuleit, H., A. Giesecke-Tuettenberg, T. Tuting, B. Thurner-Schuler, T. B. Stuge, L. Paragnik, A. Kandemir, P. P. Lee, G. Schuler, J. Knop and A. H. Enk (2001). "A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection." Int J Cancer **93**(2): 243-51.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, G. Schuler, J. Knop and A. H. Enk (2000). "Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells." J Exp Med **192**(9): 1213-22.
- Jozsef, L., T. Khreiss, D. El Kebir and J. G. Filep (2006). "Activation of TLR-9 induces IL-8 secretion through peroxynitrite signaling in human neutrophils." J Immunol **176**(2): 1195-202.
- Jozsef, L., T. Khreiss and J. G. Filep (2004). "CpG motifs in bacterial DNA delay apoptosis of neutrophil granulocytes." FASEB J **18**(14): 1776-8.

- Jurk, M., F. Heil, J. Vollmer, C. Schetter, A. M. Krieg, H. Wagner, G. Lipford and S. Bauer (2002). "Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848." Nat Immunol **3**(6): 499.
- Kadowaki, N. (2007). "Dendritic cells: a conductor of T cell differentiation." Allergol Int **56**(3): 193-9.
- Kadowaki, N., S. Antonenko, S. Ho, M. C. Rissoan, V. Soumelis, S. A. Porcelli, L. L. Lanier and Y. J. Liu (2001). "Distinct cytokine profiles of neonatal natural killer T cells after expansion with subsets of dendritic cells." J Exp Med **193**(10): 1221-6.
- Kadowaki, N., S. Antonenko, J. Y. Lau and Y. J. Liu (2000). "Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity." J Exp Med **192**(2): 219-26.
- Kaisho, T. and S. Akira (2006). "Toll-like receptor function and signaling." J Allergy Clin Immunol **117**(5): 979-87; quiz 88.
- Kaisho, T., O. Takeuchi, T. Kawai, K. Hoshino and S. Akira (2001). "Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells." J Immunol **166**(9): 5688-94.
- Kanneganti, T. D., M. Body-Malapel, A. Amer, J. H. Park, J. Whitfield, L. Franchi, Z. F. Taraporewala, D. Miller, J. T. Patton, N. Inohara and G. Nunez (2006a). "Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA." J Biol Chem **281**(48): 36560-8.
- Kanneganti, T. D., N. Ozoren, M. Body-Malapel, A. Amer, J. H. Park, L. Franchi, J. Whitfield, W. Barchet, M. Colonna, P. Vandenabeele, J. Bertin, A. Coyle, E. P. Grant, S. Akira and G. Nunez (2006b). "Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3." Nature **440**(7081): 233-6.
- Kantoff, P. W., C. S. Higano, N. D. Shore, E. R. Berger, E. J. Small, D. F. Penson, C. H. Redfern, A. C. Ferrari, R. Dreicer, R. B. Sims, Y. Xu, M. W. Frohlich and P. F. Schellhammer (2010). "Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer." N Engl J Med **363**(5): 411-22.
- Kaplan, D. H., V. Shankaran, A. S. Dighe, E. Stockert, M. Aguet, L. J. Old and R. D. Schreiber (1998). "Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(13): 7556-61.
- Kassirer, M., D. Zeltser, B. Gluzman, E. Leibovitz, Y. Goldberg, A. Roth, G. Keren, R. Rotstein, I. Shapira, N. Arber and A. S. Berliner (1999). "The appearance of L-selectin(low) polymorphonuclear leukocytes in the circulating pool of peripheral blood during myocardial infarction correlates with neutrophilia and with the size of the infarct." Clin Cardiol **22**(11): 721-6.
- Katayama, N., J. P. Shih, S. Nishikawa, T. Kina, S. C. Clark and M. Ogawa (1993). "Stage-specific expression of c-kit protein by murine hematopoietic progenitors." Blood **82**(8): 2353-60.
- Kawai, T., O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda and S. Akira (1999). "Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin." Immunity **11**(1): 115-22.

- Kawai, T., O. Takeuchi, T. Fujita, J. Inoue, P. F. Muhlradt, S. Sato, K. Hoshino and S. Akira (2001). "Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes." J Immunol **167**(10): 5887-94.
- Kawato, Y., M. Aonuma, Y. Hirota, H. Kuga and K. Sato (1991). "Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11." Cancer Res **51**(16): 4187-91.
- Kerr, K. M., S. K. Johnson, G. King, M. M. Kennedy, J. Weir and R. Jeffrey (1998). "Partial regression in primary carcinoma of the lung: does it occur?" Histopathology **33**(1): 55-63.
- Kim, J. M., N. I. Kim, Y. K. Oh, Y. J. Kim, J. Youn and M. J. Ahn (2005). "CpG oligodeoxynucleotides induce IL-8 expression in CD34+ cells via mitogen-activated protein kinase-dependent and NF-kappaB-independent pathways." Int Immunol **17**(12): 1525-31.
- Klarmann, K., M. Ortiz, M. Davies and J. R. Keller (2003). "Identification of in vitro growth conditions for c-Kit-negative hematopoietic stem cells." Blood **102**(9): 3120-8.
- Krieg, A. M. (2001a). "Now I know my CpGs." Trends Microbiol **9**(6): 249-52.
- Krieg, A. M. (2002). "CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects." Annu Rev Immunol **20**: 709-60.
- Krieg, A. M. (2004). "Antitumor applications of stimulating toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides." Curr Oncol Rep **6**(2): 88-95.
- Krieg, A. M. and H. L. Davis (2001b). "Enhancing vaccines with immune stimulatory CpG DNA." Curr Opin Mol Ther **3**(1): 15-24.
- Krieg, A. M., A. K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. A. Koretzky and D. M. Klinman (1995). "CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation." Nature **374**(6522): 546-9.
- Kufe, D. W. and P. P. Major (1981). "5-Fluorouracil incorporation into human breast carcinoma RNA correlates with cytotoxicity." J Biol Chem **256**(19): 9802-5.
- Kunimoto, T., K. Nitta, T. Tanaka, N. Uehara, H. Baba, M. Takeuchi, T. Yokokura, S. Sawada, T. Miyasaka and M. Mutai (1987). "Antitumor activity of 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxy-camptothecin, a novel water-soluble derivative of camptothecin, against murine tumors." Cancer Res **47**(22): 5944-7.
- Kwant, A. and K. L. Rosenthal (2004). "Intravaginal immunization with viral subunit protein plus CpG oligodeoxynucleotides induces protective immunity against HSV-2." Vaccine **22**(23-24): 3098-104.
- Lake, R. A. and R. G. van der Most (2006). "A better way for a cancer cell to die." N Engl J Med **354**(23): 2503-4.
- Langerhans, P. (1868). "Über die Nerven der menschlichen Haut." Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie, und für klinische Medizin: 325-37.

- Lanzavecchia, A. and F. Sallusto (2001). "Regulation of T cell immunity by dendritic cells." Cell **106**(3): 263-6.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart and J. A. Hoffmann (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." Cell **86**(6): 973-83.
- Levesque, J. P., J. Hendy, Y. Takamatsu, P. J. Simmons and L. J. Bendall (2003a). "Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide." J Clin Invest **111**(2): 187-96.
- Levesque, J. P., J. Hendy, I. G. Winkler, Y. Takamatsu and P. J. Simmons (2003b). "Granulocyte colony-stimulating factor induces the release in the bone marrow of proteases that cleave c-KIT receptor (CD117) from the surface of hematopoietic progenitor cells." Exp Hematol **31**(2): 109-17.
- Levesque, J. P., Y. Takamatsu, S. K. Nilsson, D. N. Haylock and P. J. Simmons (2001). "Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor." Blood **98**(5): 1289-97.
- Li, J., Z. Ma, Z. L. Tang, T. Stevens, B. Pitt and S. Li (2004). "CpG DNA-mediated immune response in pulmonary endothelial cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **287**(3): L552-8.
- Link, B. K., Z. K. Ballas, D. Weisdorf, J. E. Wooldridge, A. D. Bossler, M. Shannon, W. L. Rasmussen, A. M. Krieg and G. J. Weiner (2006). "Oligodeoxynucleotide CpG 7909 delivered as intravenous infusion demonstrates immunologic modulation in patients with previously treated non-Hodgkin lymphoma." J Immunother **29**(5): 558-68.
- Lipford, G. B., M. Bauer, C. Blank, R. Reiter, H. Wagner and K. Heeg (1997). "CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants." Eur J Immunol **27**(9): 2340-4.
- Liu, J. Y., Y. Wu, X. S. Zhang, J. L. Yang, H. L. Li, Y. Q. Mao, Y. Wang, X. Cheng, Y. Q. Li, J. C. Xia, M. Masucci and Y. X. Zeng (2007). "Single administration of low dose cyclophosphamide augments the antitumor effect of dendritic cell vaccine." Cancer Immunol Immunother **56**(10): 1597-604.
- Liu, L. F., S. D. Desai, T. K. Li, Y. Mao, M. Sun and S. P. Sim (2000). "Mechanism of action of camptothecin." Ann N Y Acad Sci **922**: 1-10.
- Lutsiak, M. E., R. T. Semnani, R. De Pascalis, S. V. Kashmiri, J. Schlom and H. Sabzevari (2005). "Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide." Blood **105**(7): 2862-8.
- Maas, I. W., E. Boven, H. M. Pinedo, H. M. Schluper and H. J. Haisma (1991). "The effects of gamma-interferon combined with 5-fluorouracil or 5-fluoro-2'-deoxyuridine on proliferation and antigen expression in a panel of human colorectal cancer cell lines." Int J Cancer **48**(5): 749-56.

- Macdonald, J. S. (1999). "Toxicity of 5-fluorouracil." Oncology (Williston Park) **13**(7 Suppl 3): 33-4.
- Machiels, J. P., R. T. Reilly, L. A. Emens, A. M. Ercolini, R. Y. Lei, D. Weintraub, F. I. Okoye and E. M. Jaffee (2001). "Cyclophosphamide, doxorubicin, and paclitaxel enhance the antitumor immune response of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor-secreting whole-cell vaccines in HER-2/neu tolerized mice." Cancer Res **61**(9): 3689-97.
- Machlenkin, A., O. Goldberger, B. Tirosh, A. Paz, I. Volovitz, E. Bar-Haim, S. H. Lee, E. Vadai, E. Tzeval and L. Eisenbach (2005). "Combined dendritic cell cryotherapy of tumor induces systemic antimetastatic immunity." Clin Cancer Res **11**(13): 4955-61.
- Mackall, C. L. (1999). "T-cell immunodeficiency following cytotoxic antineoplastic therapy: a review." Oncologist **4**(5): 370-8.
- Manegold, C., D. Gravenor, D. Woytowicz, J. Mezger, V. Hirsh, G. Albert, M. Al-Adhami, D. Readett, A. M. Krieg and C. G. Leichman (2008). "Randomized phase II trial of a toll-like receptor 9 agonist oligodeoxynucleotide, PF-3512676, in combination with first-line taxane plus platinum chemotherapy for advanced-stage non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol **26**(24): 3979-86.
- Manz, M. G., D. Traver, T. Miyamoto, I. L. Weissman and K. Akashi (2001). "Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors." Blood **97**(11): 3333-41.
- Marangolo, M., C. Bengala, P. F. Conte, M. Danova, P. Pronzato, G. Rosti and P. Sagrada (2006). "Dose and outcome: the hurdle of neutropenia (Review)." Oncol Rep **16**(2): 233-48.
- Mariathasan, S., D. S. Weiss, K. Newton, J. McBride, K. O'Rourke, M. Roose-Girma, W. P. Lee, Y. Weinrauch, D. M. Monack and V. M. Dixit (2006). "Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP." Nature **440**(7081): 228-32.
- Maric, I., P. G. Holt, M. H. Perdue and J. Bienenstock (1996). "Class II MHC antigen (Ia)-bearing dendritic cells in the epithelium of the rat intestine." J Immunol **156**(4): 1408-14.
- Markowicz, S., J. Walewski, K. Zajda, P. J. Wiechno, H. M. Skurzak, J. Giermek, A. Gajkowska, M. Krzakowski and T. Pienkowski (2002). "Recovery of dendritic cell counts and function in peripheral blood of cancer patients after chemotherapy." Cytokines Cell Mol Ther **7**(1): 15-24.
- Marshak-Rothstein, A. (2006). "Toll-like receptors in systemic autoimmune disease." Nat Rev Immunol **6**(11): 823-35.
- Martinon, F., K. Burns and J. Tschopp (2002). "The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta." Mol Cell **10**(2): 417-26.
- Martinon, F., V. Petrilli, A. Mayor, A. Tardivel and J. Tschopp (2006). "Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome." Nature **440**(7081): 237-41.

- Martinon, F. and J. Tschopp (2007). "Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation." Cell Death Differ **14**(1): 10-22.
- Massberg, S., P. Schaerli, I. Knezevic-Maramica, M. Kollnberger, N. Tubo, E. A. Moseman, I. V. Huff, T. Junt, A. J. Wagers, I. B. Mazo and U. H. von Andrian (2007). "Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues." Cell **131**(5): 994-1008.
- Matsumoto, M. and T. Seya (2008). "TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C)." Adv Drug Deliv Rev **60**(7): 805-12.
- Matzinger, P. (1994). "Tolerance, danger, and the extended family." Annu Rev Immunol **12**: 991-1045.
- Mazzoni, A. and D. M. Segal (2004). "Controlling the Toll road to dendritic cell polarization." J Leukoc Biol **75**(5): 721-30.
- McCarthy, E. F. (2006). "The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas." Iowa Orthop J **26**: 154-8.
- McCluskie, M. J. and H. L. Davis (2000). "Oral, intrarectal and intranasal immunizations using CpG and non-CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants." Vaccine **19**(4-5): 413-22.
- McGreal, E. P., J. L. Miller and S. Gordon (2005). "Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors." Curr Opin Immunol **17**(1): 18-24.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt and C. A. Janeway, Jr. (1997). "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity." Nature **388**(6640): 394-7.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, E. Kopp, A. Stadlen, C. Chen, S. Ghosh and C. A. Janeway, Jr. (1998). "MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways." Mol Cell **2**(2): 253-8.
- Mellman, I. and R. M. Steinman (2001). "Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines." Cell **106**(3): 255-8.
- Messina, J. P., G. S. Gilkeson and D. S. Pisetsky (1991). "Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA." J Immunol **147**(6): 1759-64.
- Micheau, O., A. Hammann, E. Solary and M. T. Dimanche-Boitrel (1999). "STAT-1-independent upregulation of FADD and procaspase-3 and -8 in cancer cells treated with cytotoxic drugs." Biochem Biophys Res Commun **256**(3): 603-7.
- Miller, L. S. and R. L. Modlin (2007). "Human keratinocyte Toll-like receptors promote distinct immune responses." J Invest Dermatol **127**(2): 262-3.
- Miura, K., G. Han, M. Sano and Y. Tsutsui (2002). "Regression of congenital fibrosarcoma to hemangiomas with histological and genetic findings." Pathol Int **52**(9): 612-8.
- Mlecnik, B., M. Tosolini, A. Kirilovsky, A. Berger, G. Bindea, T. Meatchi, P. Bruneval, Z. Trajanoski, W. H. Fridman, F. Pages and J. Galon (2011). "Histopathologic-

- based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction." J Clin Oncol **29**(6): 610-8.
- Mokyr, M. B. and S. Dray (1987). "Interplay between the toxic effects of anticancer drugs and host antitumor immunity in cancer therapy." Cancer Invest **5**(1): 31-8.
- Molendijk, W. J., A. van Oudenaren, H. van Dijk, M. R. Daha and R. Benner (1986). "Complement split product C5a mediates the lipopolysaccharide-induced mobilization of CFU-s and haemopoietic progenitor cells, but not the mobilization induced by proteolytic enzymes." Cell Tissue Kinet **19**(4): 407-17.
- Morales, A., D. Eidinger and A. W. Bruce (1976). "Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors." J Urol **116**(2): 180-3.
- Morrison, S. J. and I. L. Weissman (1994). "The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype." Immunity **1**(8): 661-73.
- Muzio, M., J. Ni, P. Feng and V. M. Dixit (1997). "IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling." Science **278**(5343): 1612-5.
- Nagai, Y., K. P. Garrett, S. Ohta, U. Bahrn, T. Kouro, S. Akira, K. Takatsu and P. W. Kincade (2006). "Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment." Immunity **24**(6): 801-12.
- Nakano, H., M. Yanagita and M. D. Gunn (2001). "CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells." J Exp Med **194**(8): 1171-8.
- Nardini, E., D. Morelli, P. Aiello, D. Besusso, C. Calcaterra, L. Mariani, M. Palazzo, A. Vecchi, S. Paltrinieri, S. Menard and A. Balsari (2005). "CpG-oligodeoxynucleotides induce mobilization of hematopoietic progenitor cells into peripheral blood in association with mouse KC (IL-8) production." J Cell Physiol **204**(3): 889-95.
- Nesburn, A. B., T. V. Ramos, X. Zhu, H. Asgarzadeh, V. Nguyen and L. BenMohamed (2005). "Local and systemic B cell and Th1 responses induced following ocular mucosal delivery of multiple epitopes of herpes simplex virus type 1 glycoprotein D together with cytosine-phosphate-guanine adjuvant." Vaccine **23**(7): 873-83.
- Nishio, N., H. Hisha, H. Ogata, M. Inaba, Y. Yamamoto, Y. Amoh, R. Yasumizu, K. Hanada, H. Hamada and S. Ikehara (1996). "Changes in markers, receptors and adhesion molecules expressed on murine hemopoietic stem cells after a single injection of 5-fluorouracil." Stem Cells **14**(5): 584-91.
- Nowak, A. K., R. A. Lake, A. L. Marzo, B. Scott, W. R. Heath, E. J. Collins, J. A. Frelinger and B. W. Robinson (2003). "Induction of tumor cell apoptosis in vivo increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells." J Immunol **170**(10): 4905-13.
- O'Keeffe, M., H. Hochrein, D. Vremec, J. Pooley, R. Evans, S. Woulfe and K. Shortman (2002). "Effects of administration of progenipoietin 1, Flt-3 ligand, granulocyte

- colony-stimulating factor, and pegylated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell subsets in mice." Blood **99**(6): 2122-30.
- O'Keeffe, M., H. Hochrein, D. Vremec, B. Scott, P. Hertzog, L. Tatarczuch and K. Shortman (2003). "Dendritic cell precursor populations of mouse blood: identification of the murine homologues of human blood plasmacytoid pre-DC2 and CD11c+ DC1 precursors." Blood **101**(4): 1453-9.
- O'Neill, L. A. and A. G. Bowie (2007). "The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **7**(5): 353-64.
- Obeid, M., A. Tesniere, F. Ghiringhelli, G. M. Fimia, L. Apetoh, J. L. Perfettini, M. Castedo, G. Mignot, T. Panaretakis, N. Casares, D. Metivier, N. Larochette, P. van Endert, F. Ciccocanti, M. Piacentini, L. Zitvogel and G. Kroemer (2007). "Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death." Nat Med **13**(1): 54-61.
- Ogata, H., W. G. Bradley, M. Inaba, N. Ogata, S. Ikehara and R. A. Good (1995). "Long-term repopulation of hematolymphoid cells with only a few hemopoietic stem cells in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(13): 5945-9.
- Ogura, Y., F. S. Sutterwala and R. A. Flavell (2006). "The inflammasome: first line of the immune response to cell stress." Cell **126**(4): 659-62.
- Olweus, J., A. BitMansour, R. Warnke, P. A. Thompson, J. Carballido, L. J. Picker and F. Lund-Johansen (1997). "Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12551-6.
- Orlic, D., R. Fischer, S. Nishikawa, A. W. Nienhuis and D. M. Bodine (1993). "Purification and characterization of heterogeneous pluripotent hematopoietic stem cell populations expressing high levels of c-kit receptor." Blood **82**(3): 762-70.
- Oshiumi, H., M. Matsumoto, K. Funami, T. Akazawa and T. Seya (2003). "TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction." Nat Immunol **4**(2): 161-7.
- Ozinsky, A., D. M. Underhill, J. D. Fontenot, A. M. Hajjar, K. D. Smith, C. B. Wilson, L. Schroeder and A. Aderem (2000). "The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13766-71.
- Panaretakis, T., N. Joza, N. Modjtahedi, A. Tesniere, I. Vitale, M. Durchschlag, G. M. Fimia, O. Kepp, M. Piacentini, K. U. Froehlich, P. van Endert, L. Zitvogel, F. Madeo and G. Kroemer (2008). "The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death." Cell Death Differ **15**(9): 1499-509.
- Pardoll, D. M. (1998). "Cancer vaccines." Nat Med **4**(5 Suppl): 525-31.
- Parkin, D. M., F. Bray, J. Ferlay and P. Pisani (2005). "Global cancer statistics, 2002." CA Cancer J Clin **55**(2): 74-108.
- Parkin, D. M., P. Pisani and J. Ferlay (1999). "Global cancer statistics." CA Cancer J Clin **49**(1): 33-64, 1.

- Pegu, A., S. Qin, B. A. Fallert Junecko, R. E. Nisato, M. S. Pepper and T. A. Reinhart (2008). "Human lymphatic endothelial cells express multiple functional TLRs." J Immunol **180**(5): 3399-405.
- Perussia, B., V. Fanning and G. Trinchieri (1985). "A leukocyte subset bearing HLA-DR antigens is responsible for in vitro alpha interferon production in response to viruses." Nat Immun Cell Growth Regul **4**(3): 120-37.
- Pockros, P. J., D. Guyader, H. Patton, M. J. Tong, T. Wright, J. G. McHutchison and T. C. Meng (2007). "Oral resiquimod in chronic HCV infection: safety and efficacy in 2 placebo-controlled, double-blind phase IIa studies." J Hepatol **47**(2): 174-82.
- Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton and B. Beutler (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." Science **282**(5396): 2085-8.
- Pratesi, G., G. Petrangolini, M. Tortoreto, A. Addis, S. Belluco, A. Rossini, S. Selleri, C. Rumio, S. Menard and A. Balsari (2005). "Therapeutic synergism of gemcitabine and CpG-oligodeoxynucleotides in an orthotopic human pancreatic carcinoma xenograft." Cancer Res **65**(14): 6388-93.
- Pure, E., K. Inaba, M. T. Crowley, L. Tardelli, M. D. Witmer-Pack, G. Ruberti, G. Fathman and R. M. Steinman (1990). "Antigen processing by epidermal Langerhans cells correlates with the level of biosynthesis of major histocompatibility complex class II molecules and expression of invariant chain." J Exp Med **172**(5): 1459-69.
- Randall, T. D. and I. L. Weissman (1997). "Phenotypic and functional changes induced at the clonal level in hematopoietic stem cells after 5-fluorouracil treatment." Blood **89**(10): 3596-606.
- Randolph, G. J., V. Angeli and M. A. Swartz (2005). "Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels." Nat Rev Immunol **5**(8): 617-28.
- Reca, R., D. Cramer, J. Yan, M. J. Laughlin, A. Janowska-Wieczorek, J. Ratajczak and M. Z. Ratajczak (2007). "A novel role of complement in mobilization: immunodeficient mice are poor granulocyte-colony stimulating factor mobilizers because they lack complement-activating immunoglobulins." Stem Cells **25**(12): 3093-100.
- Reis e Sousa, C. (2001). "Dendritic cells as sensors of infection." Immunity **14**(5): 495-8.
- Robinson, B. W., C. Robinson and R. A. Lake (2001). "Localised spontaneous regression in mesothelioma -- possible immunological mechanism." Lung Cancer **32**(2): 197-201.
- Roman, M., E. Martin-Orozco, J. S. Goodman, M. D. Nguyen, Y. Sato, A. Ronaghy, R. S. Kornbluth, D. D. Richman, D. A. Carson and E. Raz (1997). "Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants." Nat Med **3**(8): 849-54.

- Romani, N., S. Gruner, D. Brang, E. Kampgen, A. Lenz, B. Trockenbacher, G. Konwalinka, P. O. Fritsch, R. M. Steinman and G. Schuler (1994). "Proliferating dendritic cell progenitors in human blood." J Exp Med **180**(1): 83-93.
- Romani, N., S. Holzmann, C. H. Tripp, F. Koch and P. Stoitzner (2003). "Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis." APMIS **111**(7-8): 725-40.
- Romani, N., S. Koide, M. Crowley, M. Witmer-Pack, A. M. Livingstone, C. G. Fathman, K. Inaba and R. M. Steinman (1989). "Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells." J Exp Med **169**(3): 1169-78.
- Romani N, T. S., Pypaert M, Ebersold M, Mellman I, Schuler G, Steinman RM (2005). Dendritic cells. Atlas of blood cells - function and pathology. G. C. Zucker-Franklin D. Milan, Salea Arti Grafiche: 449-78.
- Roncarolo, M. G., M. K. Levings and C. Traversari (2001). "Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells." J Exp Med **193**(2): F5-9.
- Ronnblom, L., U. Ramstedt and G. V. Alm (1983). "Properties of human natural interferon-producing cells stimulated by tumor cell lines." Eur J Immunol **13**(6): 471-6.
- Rosenberg, S. A. (2001). "Progress in human tumour immunology and immunotherapy." Nature **411**(6835): 380-4.
- Rovere-Querini, P., A. Capobianco, P. Scaffidi, B. Valentini, F. Catalanotti, M. Giazoni, I. E. Dumitriu, S. Muller, M. Iannacone, C. Traversari, M. E. Bianchi and A. A. Manfredi (2004). "HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells." EMBO Rep **5**(8): 825-30.
- Rutman, R. J., A. Cantarow and K. E. Paschkis (1954). "Studies in 2-acetylaminofluorene carcinogenesis. III. The utilization of uracil-2-C14 by preneoplastic rat liver and rat hepatoma." Cancer Res **14**(2): 119-23.
- Rynkiewicz, D. (2005). Marked enhancement of antibody response to anthrax vaccine adsorbed with CPG 7909 in healthy volunteers. Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother: Poster.
- Saha, A. and S. K. Chatterjee (2010). "Combination of CTL-associated antigen-4 blockade and depletion of CD25 regulatory T cells enhance tumour immunity of dendritic cell-based vaccine in a mouse model of colon cancer." Scand J Immunol **71**(2): 70-82.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (1994). "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha." J Exp Med **179**(4): 1109-18.
- Santi, D. V., C. S. McHenry, R. T. Raines and K. M. Ivanetich (1987). "Kinetics and thermodynamics of the interaction of 5-fluoro-2'-deoxyuridylate with thymidylate synthase." Biochemistry **26**(26): 8606-13.
- Saunders, M. and T. Iveson (2006). "Management of advanced colorectal cancer: state of the art." Br J Cancer **95**(2): 131-8.

- Savill, J. S., A. H. Wyllie, J. E. Henson, M. J. Walport, P. M. Henson and C. Haslett (1989). "Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages." J Clin Invest **83**(3): 865-75.
- Scaffidi, P., T. Misteli and M. E. Bianchi (2002). "Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation." Nature **418**(6894): 191-5.
- Schmiegel, W., A. Reinacher-Schick, D. Arnold, U. Graeven, V. Heinemann, R. Porschen, J. Riemann, C. Rodel, R. Sauer, M. Wieser, W. Schmitt, H. J. Schmoll, T. Seufferlein, I. Kopp and C. Pox (2008). "[Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008]." Z Gastroenterol **46**(8): 799-840.
- Schon, M. P. and M. Schon (2008). "TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy." Oncogene **27**(2): 190-9.
- Schreibelt, G., J. Tel, K. H. Slieden, D. Benitez-Ribas, C. G. Figdor, G. J. Adema and I. J. de Vries (2010). "Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy." Cancer Immunol Immunother **59**(10): 1573-82.
- Schuetz, J. D., H. J. Wallace and R. B. Diasio (1984). "5-Fluorouracil incorporation into DNA of CF-1 mouse bone marrow cells as a possible mechanism of toxicity." Cancer Res **44**(4): 1358-63.
- Schuler, G. and R. M. Steinman (1985). "Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro." J Exp Med **161**(3): 526-46.
- Schulz, C., U. H. von Andrian and S. Massberg (2009). "Hematopoietic stem and progenitor cells: their mobilization and homing to bone marrow and peripheral tissue." Immunol Res **44**(1-3): 160-8.
- Seong, S. Y. and P. Matzinger (2004). "Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses." Nat Rev Immunol **4**(6): 469-78.
- Shi, Z., Z. Cai, A. Sanchez, T. Zhang, S. Wen, J. Wang, J. Yang, S. Fu and D. Zhang (2011). "A novel Toll-like receptor that recognizes vesicular stomatitis virus." J Biol Chem **286**(6): 4517-24.
- Shin, J. Y., S. K. Lee, C. D. Kang, J. S. Chung, E. Y. Lee, S. Y. Seo, S. Y. Lee, S. Y. Baek, B. S. Kim, J. B. Kim and S. Yoon (2003). "Antitumor effect of intratumoral administration of dendritic cell combination with vincristine chemotherapy in a murine fibrosarcoma model." Histol Histopathol **18**(2): 435-47.
- Shortman, K. and Y. J. Liu (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." Nat Rev Immunol **2**(3): 151-61.
- Shortman, K. and S. H. Naik (2007). "Steady-state and inflammatory dendritic-cell development." Nat Rev Immunol **7**(1): 19-30.
- Siegal, F. P., N. Kadowaki, M. Shodell, P. A. Fitzgerald-Bocarsly, K. Shah, S. Ho, S. Antonenko and Y. J. Liu (1999). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." Science **284**(5421): 1835-7.

- Smyth, M. J., D. I. Godfrey and J. A. Trapani (2001). "A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy." Nat Immunol **2**(4): 293-9.
- Sondak, V. K. and J. A. Sosman (2003). "Results of clinical trials with an allogenic melanoma tumor cell lysate vaccine: Melacine." Semin Cancer Biol **13**(6): 409-15.
- Song, W. and R. Levy (2005). "Therapeutic vaccination against murine lymphoma by intratumoral injection of naive dendritic cells." Cancer Res **65**(13): 5958-64.
- Spangrude, G. J., S. Heimfeld and I. L. Weissman (1988). "Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells." Science **241**(4861): 58-62.
- Spangrude, G. J. and R. Scollay (1990). "A simplified method for enrichment of mouse hematopoietic stem cells." Exp Hematol **18**(8): 920-6.
- Sparwasser, T., L. Hultner, E. S. Koch, A. Luz, G. B. Lipford and H. Wagner (1999). "Immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides cause extramedullary murine hemopoiesis." J Immunol **162**(4): 2368-74.
- Sparwasser, T., E. S. Koch, R. M. Vabulas, K. Heeg, G. B. Lipford, J. W. Ellwart and H. Wagner (1998). "Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells." Eur J Immunol **28**(6): 2045-54.
- Starnes, C. O. (1992). "Coley's toxins in perspective." Nature **357**(6373): 11-2.
- Steinman, R. M. (1991). "The dendritic cell system and its role in immunogenicity." Annu Rev Immunol **9**: 271-96.
- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." J Exp Med **137**(5): 1142-62.
- Steinman, R. M., D. Hawiger and M. C. Nussenzweig (2003). "Tolerogenic dendritic cells." Annu Rev Immunol **21**: 685-711.
- Steinman, R. M. and H. Hemmi (2006). "Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity." Curr Top Microbiol Immunol **311**: 17-58.
- Steinman, R. M. and I. Mellman (2004). "Immunotherapy: bewitched, bothered, and bewildered no more." Science **305**(5681): 197-200.
- Sugai, T., M. Mori, M. Nakazawa, M. Ichino, T. Naruto, N. Kobayashi, Y. Kobayashi, M. Minami and S. Yokota (2005). "A CpG-containing oligodeoxynucleotide as an efficient adjuvant counterbalancing the Th1/Th2 immune response in diphtheria-tetanus-pertussis vaccine." Vaccine **23**(46-47): 5450-6.
- Sugiyama, T., H. Kohara, M. Noda and T. Nagasawa (2006). "Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches." Immunity **25**(6): 977-88.
- Sutterwala, F. S., Y. Ogura, M. Szczepanik, M. Lara-Tejero, G. S. Lichtenberger, E. P. Grant, J. Bertin, A. J. Coyle, J. E. Galan, P. W. Askenase and R. A. Flavell

- (2006). "Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1." Immunity **24**(3): 317-27.
- Swann, J. B. and M. J. Smyth (2007). "Immune surveillance of tumors." J Clin Invest **117**(5): 1137-46.
- Szeimies, R. M., J. Bichel, J. P. Ortonne, E. Stockfleth, J. Lee and T. C. Meng (2008). "A phase II dose-ranging study of topical resiquimod to treat actinic keratosis." Br J Dermatol **159**(1): 205-10.
- Tacken, P. J., I. J. de Vries, R. Torensma and C. G. Figdor (2007). "Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting." Nat Rev Immunol **7**(10): 790-802.
- Takeda, K. and S. Akira (2003). "Toll receptors and pathogen resistance." Cell Microbiol **5**(3): 143-53.
- Takeuchi, O., K. Hoshino and S. Akira (2000a). "Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to Staphylococcus aureus infection." J Immunol **165**(10): 5392-6.
- Takeuchi, O., K. Takeda, K. Hoshino, O. Adachi, T. Ogawa and S. Akira (2000b). "Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades." Int Immunol **12**(1): 113-7.
- Tanaka, F., H. Yamaguchi, M. Ohta, K. Mashino, H. Sonoda, N. Sadanaga, H. Inoue and M. Mori (2002). "Intratumoral injection of dendritic cells after treatment of anticancer drugs induces tumor-specific antitumor effect in vivo." Int J Cancer **101**(3): 265-9.
- Teitz-Tennenbaum, S., Q. Li, S. Rynkiewicz, F. Ito, M. A. Davis, C. J. McGinn and A. E. Chang (2003). "Radiotherapy potentiates the therapeutic efficacy of intratumoral dendritic cell administration." Cancer Res **63**(23): 8466-75.
- Tokunaga, T., H. Yamamoto, S. Shimada, H. Abe, T. Fukuda, Y. Fujisawa, Y. Furutani, O. Yano, T. Kataoka, T. Sudo and et al. (1984). "Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity." J Natl Cancer Inst **72**(4): 955-62.
- Tokunaga, T., S. Yamamoto and K. Namba (1988). "A synthetic single-stranded DNA, poly(dG,dC), induces interferon-alpha/beta and -gamma, augments natural killer activity, and suppresses tumor growth." Jpn J Cancer Res **79**(6): 682-6.
- Tokunaga, T., O. Yano, E. Kuramoto, Y. Kimura, T. Yamamoto, T. Kataoka and S. Yamamoto (1992). "Synthetic oligonucleotides with particular base sequences from the cDNA encoding proteins of Mycobacterium bovis BCG induce interferons and activate natural killer cells." Microbiol Immunol **36**(1): 55-66.
- Tong, Y., W. Song and R. G. Crystal (2001). "Combined intratumoral injection of bone marrow-derived dendritic cells and systemic chemotherapy to treat pre-existing murine tumors." Cancer Res **61**(20): 7530-5.
- Tournigand, C., T. Andre, E. Achille, G. Lledo, M. Flesh, D. Mery-Mignard, E. Quinaux, C. Couteau, M. Buyse, G. Ganem, B. Landi, P. Colin, C. Louvet and A. de

- Gramont (2004). "FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study." J Clin Oncol **22**(2): 229-37.
- Trinchieri, G. and A. Sher (2007). "Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence." Nat Rev Immunol **7**(3): 179-90.
- Tsuda, Y., H. Takahashi, M. Kobayashi, T. Hanafusa, D. N. Herndon and F. Suzuki (2004). "Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." Immunity **21**(2): 215-26.
- Uchida, N., W. H. Fleming, E. J. Alpern and I. L. Weissman (1993). "Heterogeneity of hematopoietic stem cells." Curr Opin Immunol **5**(2): 177-84.
- Uchida, N. and I. L. Weissman (1992). "Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1^{lo} Lin⁻ Sca-1⁺ cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow." J Exp Med **175**(1): 175-84.
- Udagawa, M., C. Kudo-Saito, G. Hasegawa, K. Yano, A. Yamamoto, M. Yaguchi, M. Toda, I. Azuma, T. Iwai and Y. Kawakami (2006). "Enhancement of immunologic tumor regression by intratumoral administration of dendritic cells in combination with cryoablative tumor pretreatment and *Bacillus Calmette-Guerin* cell wall skeleton stimulation." Clin Cancer Res **12**(24): 7465-75.
- Ueno, H., E. Klechevsky, N. Schmitt, L. Ni, A. L. Flamar, S. Zurawski, G. Zurawski, K. Palucka, J. Banchereau and S. Oh (2011). "Targeting human dendritic cell subsets for improved vaccines." Semin Immunol **23**(1): 21-7.
- van de Rijn, M., S. Heimfeld, G. J. Spangrude and I. L. Weissman (1989). "Mouse hematopoietic stem-cell antigen Sca-1 is a member of the Ly-6 antigen family." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(12): 4634-8.
- van der Wilt, C. L., H. H. Backus, K. Smid, L. Comijn, G. Veerman, D. Wouters, D. A. Voorn, D. G. Priest, M. A. Bunni, F. Mitchell, A. L. Jackman, G. Jansen and G. J. Peters (2001). "Modulation of both endogenous folates and thymidine enhance the therapeutic efficacy of thymidylate synthase inhibitors." Cancer Res **61**(9): 3675-81.
- Van Laar, J. A., Y. M. Rustum, C. L. Van der Wilt, K. Smid, C. M. Kuiper, H. M. Pinedo and G. J. Peters (1996). "Tumor size and origin determine the antitumor activity of cisplatin or 5-fluorouracil and its modulation by leucovorin in murine colon carcinomas." Cancer Chemother Pharmacol **39**(1-2): 79-89.
- van Mierlo, G. J., Z. F. Boonman, H. M. Dumortier, A. T. den Boer, M. F. Fransen, J. Nouta, E. I. van der Voort, R. Oeffringa, R. E. Toes and C. J. Melief (2004). "Activation of dendritic cells that cross-present tumor-derived antigen licenses CD8⁺ CTL to cause tumor eradication." J Immunol **173**(11): 6753-9.
- Vermaelen, K. Y., I. Carro-Muino, B. N. Lambrecht and R. A. Pauwels (2001). "Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes." J Exp Med **193**(1): 51-60.
- Wang, H., O. Bloom, M. Zhang, J. M. Vishnubhakat, M. Ombrellino, J. Che, A. Frazier, H. Yang, S. Ivanova, L. Borovikova, K. R. Manogue, E. Faist, E. Abraham, J.

- Andersson, U. Andersson, P. E. Molina, N. N. Abumrad, A. Sama and K. J. Tracey (1999). "HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice." Science **285**(5425): 248-51.
- Wang, J., Y. Shao, T. A. Bennett, R. A. Shankar, P. D. Wightman and L. G. Reddy (2006). "The functional effects of physical interactions among Toll-like receptors 7, 8, and 9." J Biol Chem **281**(49): 37427-34.
- Wang, J. C. (1994). "Appendix. I: An introduction to DNA supercoiling and DNA topoisomerase-catalyzed linking number changes of supercoiled DNA." Adv Pharmacol **29B**: 257-70.
- Weeratna, R. D., M. J. McCluskie, Y. Xu and H. L. Davis (2000). "CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants." Vaccine **18**(17): 1755-62.
- Weigel, B. J., D. A. Rodeberg, A. M. Krieg and B. R. Blazar (2003). "CpG oligodeoxynucleotides potentiate the antitumor effects of chemotherapy or tumor resection in an orthotopic murine model of rhabdomyosarcoma." Clin Cancer Res **9**(8): 3105-14.
- Weighardt, H., C. Feterowski, M. Veit, M. Rump, H. Wagner and B. Holzmann (2000). "Increased resistance against acute polymicrobial sepsis in mice challenged with immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides is related to an enhanced innate effector cell response." J Immunol **165**(8): 4537-43.
- Welner, R. S. and P. W. Kincade (2007). "Stem cells on patrol." Cell **131**(5): 842-4.
- Wesche, H., W. J. Henzel, W. Shillinglaw, S. Li and Z. Cao (1997). "MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex." Immunity **7**(6): 837-47.
- Whyte, M. K., L. C. Meagher, J. MacDermot and C. Haslett (1993). "Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis." J Immunol **150**(11): 5124-34.
- Wijermans, P. W., W. B. Gerrits and H. L. Haak (1993). "Severe immunodeficiency in patients treated with fludarabine monophosphate." Eur J Haematol **50**(5): 292-6.
- Williams, M. J., A. Rodriguez, D. A. Kimbrell and E. D. Eldon (1997). "The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in Drosophila host defense." Embo J **16**(20): 6120-30.
- Wu, L., A. D'Amico, H. Hochrein, M. O'Keeffe, K. Shortman and K. Lucas (2001). "Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors." Blood **98**(12): 3376-82.
- Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda and S. Akira (2003). "Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway." Science **301**(5633): 640-3.
- Yamamoto, S., T. Yamamoto, T. Kataoka, E. Kuramoto, O. Yano and T. Tokunaga (1992a). "Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are

- required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity." *J Immunol* **148**(12): 4072-6.
- Yamamoto, S., T. Yamamoto, S. Shimada, E. Kuramoto, O. Yano, T. Kataoka and T. Tokunaga (1992b). "DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth." *Microbiol Immunol* **36**(9): 983-97.
- Yu, B., S. Kusmartsev, F. Cheng, M. Paolini, Y. Nefedova, E. Sotomayor and D. Gabrilovich (2003). "Effective combination of chemotherapy and dendritic cell administration for the treatment of advanced-stage experimental breast cancer." *Clin Cancer Res* **9**(1): 285-94.
- Yu, Z. and N. P. Restifo (2002). "Cancer vaccines: progress reveals new complexities." *J Clin Invest* **110**(3): 289-94.
- Zantl, N., A. Uebe, B. Neumann, H. Wagner, J. R. Siewert, B. Holzmann, C. D. Heidecke and K. Pfeffer (1998). "Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis." *Infect Immun* **66**(5): 2300-9.
- Zhang, J., C. Niu, L. Ye, H. Huang, X. He, W. G. Tong, J. Ross, J. Haug, T. Johnson, J. Q. Feng, S. Harris, L. M. Wiedemann, Y. Mishina and L. Li (2003). "Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size." *Nature* **425**(6960): 836-41.
- Zhong, H., M. R. Shurin and B. Han (2007). "Optimizing dendritic cell-based immunotherapy for cancer." *Expert Rev Vaccines* **6**(3): 333-45.
- Zitvogel, L., L. Apetoh, F. Ghiringhelli and G. Kroemer (2008). "Immunological aspects of cancer chemotherapy." *Nat Rev Immunol* **8**(1): 59-73.
- Zitvogel, L., N. Casares, M. O. Pequignot, N. Chaput, M. L. Albert and G. Kroemer (2004). "Immune response against dying tumor cells." *Adv Immunol* **84**: 131-79.
- Zitvogel, L., J. I. Mayordomo, T. Tjandrawan, A. B. DeLeo, M. R. Clarke, M. T. Lotze and W. J. Storkus (1996). "Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines." *J Exp Med* **183**(1): 87-97.
- Zitvogel, L., A. Tesniere and G. Kroemer (2006). "Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion." *Nat Rev Immunol* **6**(10): 715-27.
- Zorn, E. and T. Hercend (1999a). "A MAGE-6-encoded peptide is recognized by expanded lymphocytes infiltrating a spontaneously regressing human primary melanoma lesion." *Eur J Immunol* **29**(2): 602-7.
- Zorn, E. and T. Hercend (1999b). "A natural cytotoxic T cell response in a spontaneously regressing human melanoma targets a neoantigen resulting from a somatic point mutation." *Eur J Immunol* **29**(2): 592-601.

9 APPENDIX

9.1 Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

5-FU	5-Fluorouracil
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCG	<i>Bacille Calmette-Guérin</i>
CARD	<i>Caspase recruitment domain</i>
Cardinal	<i>CARD-containing protein (=CARD8)</i>
CASP	<i>Colon ascendens stent peritonitis</i>
Casp1	Caspase-1
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD40L	CD40-Ligand
cDC	Klassische dendritische Zelle
CG	Cytosin-Guanin
c-Kit	<i>Stem cell factor receptor (=CD117)</i>
CpG	Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid
CRC	Kolorektales Karzinom
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
CTLA4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4</i>
CXCL12	<i>Stromal derived factor-1 (=SDF-1)</i>
d	Tag(e)
DAMP	<i>Stress/damage-associated molecular pattern</i>
DC	Dendritische Zelle
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat
dUMP	Desoxyuridinmonophosphat
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
EGFR	<i>Epithelial growth factor receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fa.	Firma
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>

FCS	Fetales Kälberserum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FdUMP	Fluorodesoxyuridinmonophosphat
FUTP	Fluorouridintriphosphat
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FOLFIRI	Polychemotherapie mit Folinsäure, 5-FU und Irinotecan
FOLFOX	Polychemotherapie mit Folinsäure, 5-FU und Oxaliplatin
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
G	Gauge
G-CSF	Granulozyten-koloniestimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBsAg	<i>Hepatitis B surface antigen</i>
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HBV	Hepatitis-B-Virus
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HMGB-1	<i>High mobility group box protein-1</i>
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
HSP	<i>Heat shock protein</i>
HSPC	Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen
IFA	<i>Incomplete Freund's adjuvant</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK	Inhibitor der κ B-Kinase
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
i. p.	Intraperitoneal
IPC	Interferon-produzierende Zelle
IRAK	IL-1R-assoziierte Kinase
IRF	<i>IFN-regulatory factor</i>
isRNA	Immunstimulatorische RNA
JNK	JUN N-terminale Kinase
KG	Körpergewicht
KGF	Keratinozytenwachstumsfaktor

LAL	<i>Limulus amoebocytes lysate</i>
Lin	<i>Lineage</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucin-rich repeat</i>
LV	Leucovorin
MAL	<i>MyD88-adaptor-like protein</i>
MCP	<i>Magnetic particle concentrator</i>
mDC	Myeloide dendritische Zelle
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
Min	Minute(n)
ml	Milliliter
MMP-9	Matrixmetalloproteinase-9 (=Gelatinase-B)
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NaCl	Natriumchlorid
NALP3	Synonym für NLRP3
n. d.	Nicht detektierbar
NF- κ B	<i>Nuclear factor-κB</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NKT-Zelle	Natürliche Killer-T-Zelle
NLR	NOD-like-Rezeptoren
NLRP3	<i>NOD-like receptor family pyrin domain containin-3 protein</i>
NMU	N-Nitroso-N-Methyluretan
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
n. s.	Nicht signifikant
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
ODN	Oligodesoxynukleotid
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PAP	Prostata-spezifische saure Phosphatase
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PD-1	<i>Programmed death-1 receptor</i>
pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein
PRR	<i>Pattern-recognition receptor</i>
RIG-I	Retinoic-acid-inducible gene-I

RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s. c.	Subkutan
Sca-1	Stem cell antigen-1
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SF	<i>Steel factor</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
TAK1	<i>Transforming growth factor-β-aktivierende Kinase</i>
T _H	T-Helfer
TICAM-1	<i>TIR domain-containing adaptor molecule 1 (=TRIF)</i>
TICAM-2	<i>TIR domain-containing adaptor molecule 2 (=TRAM)</i>
TIR	Toll/IL-1-Rezeptor homologe Region
TIRAP	<i>TIR domain-containing adaptor protein (=MAL)</i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRAF	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiierter Faktor
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β</i>
TS	Thymidilatsynthetase
UBC13	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme 13</i>
UEV1A	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1</i>
UFT	Tegafur/Uracil
VCAM-1	<i>Vascular adhesion molecule-1 (=CD106)</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
XELOX	Kombinationschemotherapie mit Xeloda [®] und Oxaliplatin

9.2 Veröffentlichungen

Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgender internationaler Fachzeitschrift als Originalarbeit veröffentlicht:

1. Bourquin C*, **Schreiber S***, Beck S, Hartmann G, Endres S.
Immunotherapy with dendritic cells and CpG oligonucleotides can be combined with chemotherapy without loss of efficacy in a mouse model of colon cancer.
Int J Cancer. 2006 Jun 1; 118(11):2790-5. (JIF 4,4)

* The first 2 authors contributed equally to this work (Co-Erstautorschaft)

Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen auf folgenden Kongressen vorgestellt und als *Abstract* veröffentlicht:

1. Bourquin C, **Schreiber S**, Beck S, Wenk S, Hartmann G, Endres S.
CpG oligonucleotide plus dendritic cell immunotherapy is superior to chemotherapy in a mouse model of colon cancer.
8th International Symposium on Dendritic Cells, Brügge, Belgien, 2004
2. Bourquin C, **Schreiber S**, Beck S, Wenk S, Hartmann G, Endres S.
Immunotherapy with dendritic cells and CpG oligonucleotides can be combined with chemotherapy without loss of efficacy in a mouse model of colon cancer.
2nd Tegernsee Conference on Immunotherapy of Solid Cancer, Rottach-Egern, Deutschland, 2005
3. **Schreiber S**, Diebold J, Sandholzer N, Endres S, Bourquin C.
CpG oligonucleotides protect against toxicity of 5-fluorouracil.
16th European Congress of Immunology, Paris, Frankreich, 2006
4. Endres S, **Schreiber S**, Beck S, Hartmann G, Bourquin C.
TLR9 ligands in tumor models.
Paul-Martini-Workshop, Bonn, Deutschland, 2006
5. Wurzenberger C, **Schreiber S**, Nelson P, Endres S, Bourquin C.
DC vaccination for tumor immunotherapy.
SFB/TR36 Junior Scientist Faculty Retreat 2007, Tutzing, Deutschland

6. **Schreiber S**, Diebold J, Sandholzer N, Endres S, Bourquin C.
CpG oligonucleotides counteract 5-fluorouracil-mediated adverse effects on myeloid cells.
5th International Meeting on "Dendritic Cell Vaccination and other Strategies to tip the Balance of the Immune System", Bamberg, Deutschland, 2007

Weitere Ergebnisse aus wissenschaftlicher Tätigkeit während der Promotionsphase wurden in folgenden internationalen Fachzeitschriften als Originalarbeiten veröffentlicht:

1. Bourquin C, Schmidt L, Hornung V, Wurzenberger C, Anz D, Sandholzer N, **Schreiber S**, Voelkl A, Hartmann G, Endres S.
Immunostimulatory RNA oligonucleotides trigger an antigen-specific cytotoxic T-cell and IgG2a response.
Blood. 2007 Apr 1; 109(7):2953-60. (JIF 10,1)
2. Wurzenberger C, Koelzer HV, **Schreiber S**, Anz D, Vollmar AM, Schnurr M, Endres S, Bourquin C.
Short-term activation induces multifunctional dendritic cells that generate potent antitumor T-cell responses in vivo.
Cancer Immunol Immunother. 2009 Jun; 58(6):901-13. (JIF 3,7)

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Stefan Endres danke ich herzlich für die Aufnahme in die Abteilung für Klinische Pharmakologie, die Überlassung des Dissertationsthemas sowie die exzellente Betreuung. Durch sein kontinuierlich reges Interesse an der wissenschaftlichen Arbeit jedes einzelnen Mitarbeiters und seine Begeisterung für die immunologische Grundlagenforschung war die Arbeitsatmosphäre stets hoch motivierend und freundschaftlich unter den Teamkollegen. Insbesondere möchte ich mich auch für die Unterstützung bei der Aufnahme in das Förderprogramm des Graduiertenkollegs „Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie“ sowie die Möglichkeit zum Besuch internationaler Immunologen-Kongresse 2006 in Paris und 2007 in Bamberg bedanken.

Für die exzellente Anleitung zu wissenschaftlichem Denken und praktischem Arbeiten im Labor sowie die kontinuierlich sehr enge Betreuung sowohl während der experimentellen Phase als auch beim Schreiben der Dissertation möchte ich meiner Arbeitsgruppenleiterin und Betreuerin Frau Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Carole Bourquin herzlich danken. Ferner gilt mein Dank auch Dr. med. David Anz und PD Dr. med. Isabelle Bekerédjian-Ding (Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Heidelberg) für zahlreiche wertvolle Hinweise bei der experimentellen Tätigkeit. Herrn Prof. Dr. med. Joachim Diebold (Pathologisches Institut, Luzerner Kantonsspital) möchte ich an dieser Stelle nochmals ausdrücklich für die histologische Aufarbeitung des murinen Knochenmarks danken.

Meinen Mitdoktoranden Dr. rer. nat. Cornelia Wurzenberger und Dr. med. Andreas Völkel sowie den medizinisch-technischen Assistentinnen Nadja Sandholzer und Susanne Wenk danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die stets freundschaftliche Zusammenarbeit.

Auch allen anderen Kollegen aus der Klinischen Pharmakologie, die hier nicht namentlich erwähnt sind, möchte ich für eine sehr schöne, lehrreiche Zeit im Labor danken.

Schließlich möchte ich meiner ganzen Familie, insbesondere meinem Freund Dr. med. Marcel Lee sowie meiner Schwester Sybille, für ihre liebevolle Unterstützung, ihre Anregungen und ihr unermüdliches Interesse an meinen Tätigkeiten danken.