

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Kombination einer CpG-Oligonukleotid-Dendritische Zell-
Vakzine mit 5-Fluorouracil in der Therapie eines murinen
Kolonkarzinommodells**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sebastian Beck

aus München

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Gunther Hartmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Frank Kolligs
Prof. Dr. med. Hans Arnholdt

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Stefan Endres

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

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2019

Meinen Kindern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---------------------------------|---|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 | Allgemeiner Hintergrund 1 |
| 1.2 | Immunstimulatorische Oligodesoxynukleotide 2 |
| 1.2.1 | Definition und historischer Hintergrund 2 |
| 1.2.2 | Wirkung von CpG-Oligodesoxynukleotiden auf das Immunsystem 5 |
| 1.2.3 | Zelluläre Effekte immunstimulatorischer CpG-ODN 6 |
| 1.2.4 | <i>Toll-like</i> -Rezeptoren und CpG-ODN 7 |
| 1.2.5 | Therapeutisches Potenzial und erste <i>in vivo</i> -Ergebnisse mit CpG-ODN 11 |
| 1.3 | Die dendritische Zelle und ihr Einsatz als Tumorstoffe 13 |
| 1.3.1 | Immunbiologie 13 |
| 1.3.2 | Dendritische Zellen in der Therapie maligner Erkrankungen 18 |
| 1.4 | Herkömmliche onkologische Therapieverfahren des Kolonkarzinoms .. 21 |
| 1.4.1 | Das Zytostatikum 5-Fluorouracil 24 |
| 1.4.2 | Chemische Struktur von 5-Fluorouracil (5-FU) 24 |
| 1.4.3 | Bioaktivierung und Wirkungsmechanismus von 5-Fluorouracil 25 |
| 1.4.4 | Pharmakokinetik und Elimination 27 |
| 1.5 | Fragestellung 28 |
| 1.5.1 | Dosisfindung des Chemotherapeutikums 5-Fluorouracil 28 |
| 1.5.2 | Effekt der Kombination aus Vakzine und Chemotherapie 28 |
| 1.5.3 | Etablierung eines orthotopen Tumormodells mit Ausbildung eines Langzeitgedächtnis durch die Vakzine. 28 |
| 2. Material und Methoden | 29 |
| 2.1 | Material 29 |
| 2.1.1 | Geräte 29 |
| 2.1.2 | Medikamente 29 |
| 2.1.3 | Chemikalien und Reagenzien 30 |
| 2.1.4 | Materialien für Zellkultur 30 |
| 2.1.5 | Zytokine 30 |
| 2.1.6 | Zellkulturmedien 31 |
| 2.1.7 | Antikörper 32 |
| 2.1.8 | Oligodesoxynukleotid 32 |
| 2.1.8 | Chemotherapeutikum 33 |
| 2.1.9 | Zelllinien 34 |
| 2.2 | Zellulär-immunologische Methoden 34 |
| 2.2.1 | Zellkultur 34 |

| | | |
|----------------------|---|-----------|
| 2.2.1.1 | Allgemeine Kulturbedingungen | 34 |
| 2.2.1.2 | Bestimmung der Zellzahl und Vitalität | 35 |
| 2.2.1.3 | Bestrahlung von Tumorzellen | 35 |
| 2.2.1.4 | Kultivierung der Colon-26-Tumorzelllinie | 35 |
| 2.2.1.5 | Herstellung einer Colon-26-Zell/ <i>Matrigel</i> ®-Suspension | 35 |
| 2.2.1.6 | Kultivierung der modifizierten X63AG8.653-Zelllinie | 36 |
| 2.2.1.7 | Kultivierung muriner dendritischer Zellen aus dem Knochenmark... | 37 |
| 2.2.1.8 | Reifeinduktion und Antigen-Beladung dendritischer Zellen | 37 |
| 2.2.2 | Zellisolation | 37 |
| 2.2.2.1 | Präparation muriner Knochenmarkszellen | 37 |
| 2.2.2.2 | Anreicherung dendritischer Vorläuferzellen mittels biomagnetischer Depletion | 38 |
| 2.3 | Tierversuche | 40 |
| 2.3.1 | Mäuse und Haltungsbedingungen | 40 |
| 2.3.2 | Tumormodelle | 40 |
| 2.3.2.1 | Subkutaner Tumormodell | 40 |
| 2.3.2.2 | Orthotoper Tumormodell | 42 |
| 2.4 | Analyse-Verfahren | 43 |
| 2.4.1 | Phasenkontrastmikroskopie | 43 |
| 2.4.2 | Enzyme-linked immunosorbent assay | 43 |
| 2.4.3 | Durchflusszytometrie | 43 |
| 2.4.3.1 | Allgemeines Funktionsprinzip | 43 |
| 2.4.3.2 | Nachweis von Oberflächenmolekülen | 44 |
| 2.4.4 | Statistische Auswertung | 45 |
| 3. Ergebnisse | | 46 |
| 3.1 | Chemotherapie mit 5-Fluorouracil im murinen Colon-26-Tumormodell. | 46 |
| 3.1.1 | Wirksamkeit verschiedener Dosierungen von 5-Fluorouracil und Dosisoptimierung..... | 46 |
| 3.1.2 | Verträglichkeit <i>in vivo</i> verschiedener Dosierungen von 5-Fluorouracil | 49 |
| 3.2 | Effektive Kombination von Immuntherapie und Chemotherapie im murinen Colon-26-Tumormodell | 50 |
| 3.2.1 | Kombinationstherapie aus Immun- und Chemotherapie | 50 |
| 3.2.2 | Kein erhöhtes Nebenwirkungspotential der Kombination aus Immun- und Chemotherapie im Vergleich zur Vakzine | 54 |
| 3.3 | Vakzine-induzierte Gedächtnisantwort auch im orthotopen murinen Colon-26-Tumormodell wirksam..... | 55 |

| | |
|---|-----------|
| 4. Diskussion | 59 |
| 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse..... | 59 |
| 4.2 Wahl des Chemotherapeutikums und dessen optimale Dosierung..... | 60 |
| 4.2.1 Chemotherapie mit 5-Fluorouracil und <i>Leucovorin</i> ®..... | 60 |
| 4.2.2 Dosierung von 5-Fluorouracil und <i>Leucovorin</i> ®..... | 61 |
| 4.3 Kombination von Immuntherapie und Chemotherapie im murinen Colon-26-Tumormodell..... | 62 |
| 4.3.1 Therapieprotokoll der Immun-Chemotherapie-Kombination..... | 62 |
| 4.3.2 Toxizität der Kombinationstherapie..... | 64 |
| 4.4 Das orthotope murine Colon-26-Tumormodell..... | 65 |
| 4.4.1 Tumorinduktion | 65 |
| 4.4.2 Induktion eines systemischen Immungedächtnisses mit 5-Fluorouracil..... | 68 |
| 5. Zusammenfassung | 70 |
| 6. Literaturverzeichnis | 72 |
| 7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme | 87 |
| 8. Danksagung | 90 |
| 9. Veröffentlichungen | 91 |

1. Einleitung

1.1 Allgemeiner Hintergrund

Auch heute noch gehört das kolorektale Karzinom zu den Malignomen mit der höchsten Inzidenz in westlich geprägten Ländern. In der Geschlechterverteilung folgt es dem Mammakarzinom der Frau an zweiter Stelle, beim Mann nimmt es Platz drei nach dem Bronchial- und Prostatakarzinom ein. Zusammengenommen muss das kolorektale Karzinom mit einem Lebenszeitrisko in der Allgemeinbevölkerung von 6% immer noch als die häufigste maligne Neoplasie eingestuft werden. Allein in Deutschland versterben etwa 30 000 Menschen pro Jahr an den Folgen des kolorektalen Karzinoms; trotz des verbesserten Vorsorgeprogrammes mit zunehmender Akzeptanz und auch der immer effektiveren Therapien (Schalhorn et al., 2006).

Im Jahre 2003 wurde von der World Health Organisation bereits prognostiziert, dass bei zunehmender durchschnittlicher Lebenserwartung und der Altersabhängigkeit der malignen Erkrankungen, die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms und die damit verbundene Anzahl an Todesfällen weltweit um etwa 50 % innerhalb der folgenden 20 Jahre zunehmen würde (World Health Organisation, 2003).

Trotz vorhandener multimodaler therapeutischer Ansätze muss konstatiert werden, dass nur in einem geringen Prozentsatz eine Heilung erreicht werden kann. Für eine Heilung sind insbesondere die frühzeitige Diagnosestellung und der daraus resultierende niedrige Metastasierungsgrad (sofern bereits vorhanden) von Bedeutung. Obwohl die Früherkennungsprogramme und die diagnostische Methodik in der westlichen Welt in den letzten zwei Jahrzehnten deutliche Fortschritte gemacht haben und uns damit eine immer frühzeitigere Diagnosestellung mit entscheidender Relevanz für die Therapie eröffnet, ist es leider bisher noch immer so, dass die meisten Malignompatienten zu spät zum Arzt kommen. Somit reduzieren sich die kurativen Möglichkeiten drastisch. Die bisherigen Therapieoptionen beinhalten neben dem primären operativen Ansatz die seit langem etablierte und stark Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil-verbesserte Chemotherapie in verschiedenen Protokollen. Ferner die Hormontherapie, die Radiotherapie sowie neuerdings alternative Therapieformen wie den Einsatz der personalisierten Therapie.

Während im Frühstadium bei kolorektalen Karzinomen in bis zu 80 % der Krankheitsfälle durch eine chirurgische Sanierung, gegebenenfalls mit einer kombinierten neo- oder adjuvanten Strahlenbehandlung (beim Rektumkarzinom), eine Heilung erreicht werden kann, ist im metastasierten, das heißt im weit

fortgeschrittenem Stadium der Einsatz von Chemotherapeutika nicht mehr vermeidbar. Dennoch ist eine Heilung des Patienten bedauerlicherweise meist nicht mehr zu erreichen. Das ist der insgesamt eingeschränkten Wirksamkeit der Chemotherapie und der oftmals im Therapieverlauf entstehenden Resistenzentwicklung gegen die Therapeutika geschuldet. Insoweit müssen bei allen Therapien zwei grundlegende Ansätze differenziert werden: Zum einen der kurative Ansatz mit dem Ziel der vollständigen Heilung des Patientin und zum anderen der palliative Therapieansatz, dessen Ziel eine Lebenszeitverlängerung und vor allem auch die Linderung der Symptome und Beschwerden ist. Hier hat insbesondere die Chemotherapie einen hohen Stellenwert. Im Zuge einer Kombination mehrerer therapeutischer Einzelmaßnahmen können die Chemotherapeutika adjuvant, das heißt nach einer chirurgischen Sanierung und/oder Radiatio, zur Behandlung möglicher noch residueller Tumorreste oder auch Metastasen eingesetzt werden. Ebenfalls erfolgt sie neo-adjuvant. Das bedeutet vor einer Operation - beziehungsweise mit einer begleitenden Bestrahlung - mit dem Ziel der Reduktion des Tumolvolumens (Allegra C, 1997). Es ist eine vordringliche Aufgabe medizinischer Forschung, neue Therapieansätze zu entwickeln, um das Nutzen-Risiko-Verhältnis der Therapiemöglichkeiten zu Gunsten des Patienten zu verschieben.

Vor dem Hintergrund von Berichten über immer wieder auftretende Spontanheilungen von zum Teil auch stark fortgeschrittenen Malignomkrankungen, sowie der Thesen der Tumorsurveillance, ergibt sich der moderne Therapie-Ansatz einer gezielten Immunmodulation. Inzwischen hat dieser Ansatz in Form von therapeutischen Antikörpern bereits Einzug in die standardisierte Malignom-Therapie gehalten.

1.2 Immunstimulatorische Oligodesoxynukleotide

Lange galt die Desoxyribonukleinsäure (DNS), aufgebaut aus einer spezifischen Anordnung von Nukleotiden, ausschließlich als Speichermedium der Erbinformation. Heute ist jedoch erwiesen, dass spezielle DNS-Sequenzen für das Immunsystem zusätzlich wichtige funktionelle Eigenschaften übernehmen.

1.2.1 Definition und historischer Hintergrund

Oligodesoxynukleotide (ODN) sind charakterisiert durch kurzkettinge Einzelstrang-(DNS)-Moleküle, bestehend aus bis zu 24 Einzelbausteinen; den Nukleotiden. Diese sind über Phosphatbrücken-Bindungen an den Desoxyeinheiten der jeweiligen

Glykoside miteinander gekoppelt. Als CpG-Motive bezeichnet man nichtmethylierte Cytidin-Guanosin-Dinukleotide (CpG) mit definierten Basensequenzen an den Flanken. Erste dokumentierte Berichte über eine immunmodulierende Funktion von Desoxyribonukleinsäure reichen bis in das Jahr 1866 zurück. Damals beobachtete der Chirurg Professor Busch in Bonn, dass Patienten, welche an multiplen, damals inoperablen Gesichtshautsarkomen oder auch malignen Sarkomen der zervikalen Drüsen litten, eine Tumorregression bei gleichzeitiger Entwicklung eines peritumoralen Erysipels erfuhren (Busch, 1868). Ein hierauf durch denselben Mediziner iatrogen hervorgerufenes Erysipel konnte diesen beobachteten Effekt exemplarisch bei einem Fall einer weiteren Halsdrüsensarkom-Patientin bestätigen.

Eine erste Serie von Therapie-Studien erfolgte durch den New Yorker Chirurg William Coley im Jahre 1891, der diese Beobachtungen fast ein Vierteljahrhundert später wieder aufgriff. Er therapierte Sarkom-Patienten mit inoperablem Befund mittels intratumoralen Injektionen aus Bakterien-Lysaten. Diese Lysate bestanden damals aus hitzeinaktivierten Serratia-Stämmen oder Streptokokken und sind heute als „Coley's Toxin“ bekannt (Coley, 1891). Eine dauerhafte klinische Remission erreichte William Coley dabei bei mehr als 40 % der annähernd 900 von ihm therapierten Patienten. Diese beeindruckenden Ergebnisse konnten jedoch von Kollegen nicht in gleichem Umfang reproduziert werden. Zu damaliger Zeit war für die Herstellung - und somit für die bakteriellen Lysate selbst - keine Standardisierungsmöglichkeit vorhanden. Auch gab es noch kein ausreichendes Wissen über das Immunsystem im Detail. Somit wurde der Ansatz der ersten Immuntherapie von malignen Erkrankungen nicht weiter verfolgt. Nicht zuletzt auch aufgrund der wachsenden Bedeutung anderer tumortherapeutischen Verfahren wie der Chirurgie und der Radiotherapie.

Coley's Entdeckung blieb fast 10 Dekaden unbeachtet. Erst die Arbeitsgruppe um Tokunaga et al. nahm den Gedanken einer Immuntherapie maligner Tumore mit Lysaten aus verschiedenen Bakterien wieder auf. Diese japanische Arbeitsgruppe konnte anhand von Vakzinierungsversuchen mit *Bacille Calmette-Guerin* (BCG) aufzeigen, dass eine verlangsamte Tumorprogression nach der BCG-Impfung durch den hierdurch induzierten stimulativen Effekt auf das Immunsystem zustande kommt (Tokunaga et al., 1984); (Tokunaga et al., 1999). Bei genauerer Betrachtung erwies sich als der hierfür ursächliche Hauptbestandteil die bakterielle DNS. Daraus wurde letzten Endes die Hypothese entwickelt, dass bakterielle DNS als Immunmodulator fungieren kann (Yamamoto et al., 1992b).

In diesem Ansatz konnte anhand weiterer Untersuchungen ein ähnlicher Effekt für kurze Einzelstrang-DNS-Moleküle mit definierten Sequenzen (ODN) aufgezeigt werden (Yamamoto et al., 1992a). Hierbei ist ein zentrales Dinukleotid aus Cytidin-Guanosin

(CG), welches zudem von einer palindrom-artigen Basensequenz flankiert wird, der entscheidende Baustein für diese immunstimulatorische Wirkung. (Yamamoto et al., 1992a). Die flankierenden Basensequenzen ermöglichen es Vertebraten über eine Bildung von Sekundär- oder Tertiärstrukturen die ODN zu erkennen (Tokunaga et al., 1988); (Kuramoto et al., 1992). Unterstützt wird diese These durch den Nachweis, dass eine Aktivierung von natürlichen Killer Zellen (NK-Zellen) durch bestimmte Polynukleotide, wie die selbst paar-bildenden Poly-(dC, dG)-Nukleotide, erfolgte (Tokunaga et al., 1988).

In unabhängigen Experimenten konnte von der amerikanischen Arbeitsgruppe um Pisetsky ein proliferativer und Immunglobulin-(Ig)-sekretorischer Effekt bakterieller DNS auf murine B-Zellen aufzeigen werden (Messina et al., 1991). Weiterhin ließ sich dieser Effekt durch eine leichte Abänderung dieser Poly-(dC, dG)-Nukleotide deutlich mindern. Hierfür war lediglich die Methylierung einer Base, dem Cytosin (C), notwendig (Messina et al., 1993). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde von Pisetsky et al. eine der japanischen Arbeitsgruppe vergleichbare Hypothese formuliert: die immunstimulatorische Wirkung der Polynukleotide basiert auf der Ausbildung von höheren Sekundärstrukturen, abhängig von einer Methylierung dieser Strukturen.

Im Jahre 1995 machten Arthur M. Krieg et al. im Zuge ihrer Antisense-Versuche (gezielte Inhibierung der Protein-Synthese durch Komplementär-Bindung eines Antisense-ODN an die Ribonukleinsäure (RNS)) die Entdeckung, dass eine Stimulation der B-Zell-Proliferation und der Ig-Sekretion durch bakterielle DNS erfolgte. Dies galt gleichermaßen auch für eine synthetisierte ODN, was durch *in vitro* und auch *in vivo* Versuche bestätigt wurde (Krieg et al., 1995). Während weiterer Untersuchungen zur Identifikation von stärkeren immunstimulatorischen ODNs zeigte sich die Notwendigkeit eines C-methylierungsfreien zentralen CG-Dinukleotids. Auch eine Umkehrung zu GC hebt den stimulierenden Effekt auf. Ebenfalls von entscheidender Bedeutung sind die das CG-Dinukleotid flankierenden Basen. Als optimal erwies sich eine Basenzahl von ca. 20. Im Unterschied zu den durch die Arbeitsgruppen um Tokunaga und Pisetsky eingebrachten Erkenntnissen konnten Krieg et al. jedoch belegen, dass der palindromartige Einschluss des CG-Dinukleotides durch Basen nicht vorhanden sein muss. Auch die Ausbildung höherer Strukturen für eine stimulatorische Wirkung von ODNs ist nach Krieg et al. keine Voraussetzung.

Diese wichtigen Erkenntnisse konnten durch mehrere Arbeitsgruppen verifiziert und auf die oben erwähnte Aktivierung der NK-Zelle übertragen werden. Auch hierbei erwiesen sich die CpG-Motive in ODN - und nicht wie anfangs angenommen die Palindromsequenzen - als ursächlich beteiligt (Ballas et al., 1996). Weiter konnte eine Stabilität gegen den Nukleasen-bedingten Abbau der CpG-ODN durch eine

Phosphothioat-Modifikation (Austausch des an der Bindung unbeteiligten Sauerstoff-Atoms durch ein Schwefelatom) der ursprünglichen Phosphodiesterbindung erreicht werden (Eckstein, 1985). Dabei zeigte sich auch eine immunstimulatorische Eigenwirkung dieser Phosphothioat-modifizierten ODN (Krieg, 1996).

Aufgrund dieser Erkenntnisse war es somit möglich, ein Erklärungsmodell für die Differenzierung des Vertebraten-Immunsystems zwischen mikrobieller und humaner DNS und das daraus resultierende zielgerichtete Gefahren-Signal zu erstellen: Sowohl in humaner als auch bakterieller DNS sind CG-Dinukleotide vorhanden. Allerdings ist die statistisch zu erwartende Frequenz dieser CG-Dinukleotide in bakterieller DNS mit 1/16 anzutreffen, wohingegen die der menschlichen DNS lediglich 1/60 beträgt. Zudem weisen die CG-Dinukleotide hier in 80 Prozent der Fälle eine Cytosin-Methylierung auf. Auch die in der Vertebraten-DNS vorkommende Flankierung der CG-Dinukleotide durch definierte Basen (vornehmlich 5`-Cytosin-CG-Guanin-3`) vermag im Gegensatz zu einer zufälligen Basenverteilung eine geringere immunstimulatorische Wirkung auszubilden (Han et al., 1994; Krieg et al., 1998b).

1.2.2 Wirkung von CpG-Oligodesoxynukleotiden auf das Immunsystem

Durch die beachtenswerten Studien der Arbeitsgruppe um Tokunaga et al. hinsichtlich des anti-tumoralen Effektes zuvor beschriebener CpG-Motiv-haltiger Nukleinsäuren angeregt, konnten andere Arbeitsgruppen in Tierversuchen mit ähnlichen Ansätzen zeigen, dass eine systemische CpG-Applikation die Induktion eines T-Helfer (T_H)₁-gerichteten systemischen Zytokinmilieus mit hohen charakteristischen Interferon-(IFN)- γ und Interleukin-(IL)-12-Spiegeln hervorruft (Klinman et al., 1996). Bei lokaler CpG-Gabe konnte die T_H1-Zytokin-Induktion in Lymphknoten des entsprechenden Abflussgebietes mit deutlicher Lymphadenopathie im Intervall zwischen Tag 7 und 10 nachgewiesen werden (Lipford et al., 2000b). Wichtig zu erwähnen sind hierbei auch die numerische Zunahme der dendritischen Zellen (DCs) und deren Wechsel in einen aktivierten Phänotyp. In Infektionsmodellen, in denen unter anderem Mäuse mit intrazellulären Erregern wie *Listerien* und *Leishmanien* in letaler Dosis infiziert wurden, zeigte sich im Zusammenhang mit dieser Zytokin-Induktion neben der prophylaktischen Wirkung einer CpG-DNS-Applikation (Krieg et al., 1998a) ebenfalls deren therapeutisches anti-mikrobielles Potenzial (Zimmermann et al., 1998); (Elkins et al., 1999). Ferner konnten die hierfür verantwortlichen Mechanismen sowohl mit einer Anregung des angeborenen Immunsystems, als auch mit der effektiven Ausbildung der zweiten Hauptkomponente des menschlichen Immunsystems, der adaptiven Immunität, erklärt werden. In den zwischenzeitlich zahlreich durchgeführten

Studien zu dieser Thematik konnte belegt werden, dass CpG-DNS ein sehr starkes Adjuvans für die Induktion sowohl der humoralen, als auch der zellulären Immunantwort mit Antigen-Spezifität darstellt (Chu et al., 1997; Lipford et al., 1997a), (Davis et al., 1998; Moldoveanu et al., 1998), (Sun et al., 1996), (Chelvarajan et al., 1999).

1.2.3 Zelluläre Effekte immunstimulatorischer CpG-ODN

Definierte CpG-ODN-Sequenzen agieren als äußerst potentes Mitogen für B-Zellen annähernd aller Vertebraten. Sie induzieren im Zellzyklus einen raschen Eintritt in die G1-Phase (Hartmann et al., 2000a; Krieg et al., 1995). Zusätzlich wird durch CpG-ODN in B-Zellen sehr schnell die Synthese der Zytokine IL-6 und IL-10 induziert, welche eine Notwendigkeit für die darauffolgende Differenzierung zu IgM-sezernierenden Plasmazellen darstellen (Redford et al., 1998; Yi et al., 1996b). Daneben kommt es durch die CpG-Stimulation zu einer entscheidenden Oberflächenmarker-Expression der ko-stimulatorischen Moleküle *Cluster of differentiation* (CD)80 und CD86 und als Merkmal Antigen-präsentierender Zellen (APCs) der Oberflächenrezeptoren *Major histocompatibility complex* (MHC)-II, CD40 und CD54 (Davis et al., 1998; Hartmann et al., 2000a; Krieg et al., 1995). Dabei ist die Hochregulation von CD40 ein wichtiges Verbindungsglied zur Aktivierung von T-Zellen. Ferner konnte gezeigt werden, dass CpG-DNS durch Genexpression von *c-myc* und *bcl-x_L* den spontanen Zelltod primärer B-Zellen *in vitro* (Yi et al., 1998) und von B-Zell-Lymphomzellen nach B-Zell-Rezeptor-Aktivierung verhindert (Wang et al., 1997; Yi et al., 1996a).

Auch die Oberflächen-Expression der ko-stimulatorischen Moleküle wie MHC-Klasse I und II, CD40, CD80 sowie CD86 auf unreifen Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen wird durch die Stimulation mit CpG-ODN gesteigert. Zeitgleich werden Zytokine verstärkt ausgeschüttet; vornehmlich entsprechend einem T_H1-Milieu wie IFN- α , Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und IL-12 (Jakob et al., 1998; Lipford et al., 1997b; Sparwasser et al., 2000a; Sparwasser et al., 2000b). Hierbei kann eine zytotoxische Immunantwort auf T-Zell-Ebene in Abwesenheit von T-Helferzellen ausgelöst werden, indem eine Umwandlung oben genannter unreifer in professionelle APCs erfolgt (Vabulas et al., 2000). Durch CpG-ODN lässt sich auch in Monozyten und Makrophagen eine verstärkte IL-12-Ausschüttung bewirken (Chace et al., 1997) und es kann die zytotoxische Aktivität in Abhängigkeit von Immunglobulinen gesteigert werden.

Im Unterschied zum murinen Immunsystem konnte gezeigt werden, dass humane Zellen myeloider Abstammung, zum Beispiel Monozyten und aus Monozyten

generierte DCs, hoch sensitiv gegenüber dem Stimulanz Lipopolysaccharid (LPS), einem Zellmembranbestandteil gramnegativer Bakterien, reagieren, jedoch lediglich indirekt auf das von CpG-ODN induzierte Zytokin-Milieu (Hartmann et al., 1999a; Hartmann et al., 1999b). Die Wirkung von CpG-ODN als ein direkter Stimulus für die Ausreifung (Hartmann et al., 1999b) und die Ausschüttung von IFN Typ I in der Quantität einer Virusinfektion (Krug et al., 2001a) sowie das Überleben *in vitro* (Hartmann et al., 1999b) konnte nur in Bezug auf die plasmazytoide dendritische Zelle (PDC) als eine Untergruppe humaner DCs nachgewiesen werden (Bauer et al., 2001a). Die IL-12-Produktion in PDCs kann weiter durch die CpG-DNS in Verbindung mit CD40-Ligation synergistisch gesteigert werden (Krug et al., 2001b).

Auf der Grundlage, dass in den primären Beobachtungen von Tokunaga die lytische Aktivität und IFN- γ -Produktion muriner NK-Zellen durch DNS mykobakteriellen Ursprungs gesteigert wird, verifizierten viele Folgestudien zum einen diese Ergebnisse für das murine Immunsystem und zum anderen dehnten sie dabei die Erkenntnisse auf das menschliche System aus (Yamamoto et al., 1994). NK-Zellen nach Stimulation durch CpG galten als die einzigen IFN- γ -produzierenden Zellen der lymphozytären Untergruppe in menschlichen mononukleären Zellen der peripheren Blutes (PBMC) (Bohle et al., 1999; Kranzer et al., 2000). Die Form der Aktivierung von murinen NK-Zellen wird einerseits durch Zytokine (von APCs sezerniert) sekundär vermittelt (Ballas et al., 1996; Cowdery et al., 1996), andererseits besteht ein direkter Effekt von CpG-DNS auf die NK-Zell-Aktivierung (Gursel et al., 2002; Iho et al., 1999; Verthelyi et al., 2001).

Eine ähnliche Konstellation besteht auch in der T-Zell-Aktivierung durch CpG-DNS. Erste Versuche von Sun et al. beschreiben die indirekte Aktivierung von T-Zellen durch das von CpG-stimulierten APCs sezernierte IFN Typ I (Sun et al., 1998). Andere Arbeitsgruppen konnten bei aufgereinigten T-Zellen über eine T-Zell-Rezeptor (TZR)-Beteiligung eine primäre Aktivierung durch CpG belegen. Das lässt den Schluss einer ko-stimulatorischen Wirkung von CpG-DNS auf T-Zellen zu (Bendigs et al., 1999; Iho et al., 1999).

1.2.4 *Toll-like*-Rezeptoren und CpG-ODN

Das Immunsystem teilt sich in zwei Bestandteile auf; die angeborene sowie die erworbene Immunantwort. Sieht man das jeweilige Teilsystem als Komponente einer gemeinsamen Abwehr-Methodik, so nimmt die angeborene Immunität Erkennungs- und auch Aktivierungsfunktion für die folgende adaptive Immunantwort an. Beide Systeme zeigen ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal in der Vorgehensweise, wie

mögliche Pathogene von wirtseigenen Antigenen diskriminiert werden. Betrachtet man die Entwicklungsgeschichte dieser Abwehrformen, so erkennt man eine zeitlich deutlich frühere Evolution der angeborenen Immunität. Diese kommt in jedem Mehrzeller vor. Eine genetisch festgelegte Spezifität der Erkennungsmechanismen dieser angeborenen Immunität besteht aufgrund der Interaktion von B-Zell-Rezeptoren (BZRs) und TZRs, die im Unterschied zum erworbenen Immunsystem keimbahnkodiert sind. Hierin begründet sich auch die unter Selektionsdruck entstandene Pathogen-Spezifität mit der Entwicklung eines entsprechend vorteilhaften Rezeptoren-Pools. Eine Limitation besteht aber in der Größe des Genoms, da hierdurch die Menge der für die Rezeptoren kodierenden Gene begrenzt ist. Aufgrund der für die äußerst große Anzahl an zum einen sehr unterschiedlichen und auch sich ständig verändernden Pathogenen, zum anderen aufgrund der genom-bedingten Kapazitätsgrenze der Rezeptoren, bestand die Notwendigkeit, übergeordnete Rezeptoren mit einer Erkennungsmöglichkeit von bestimmten, immer wiederkehrenden Erkennungsmerkmalen der pathogenen Mikroorganismen auszubilden. Hierbei ist die genetische Stabilität dieser Erkennungsmotive sehr hoch; nicht zuletzt deshalb weil diese Strukturen oft eine zentrale Funktion einnehmen (Medzhitov, 2001). Der Name *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) etablierte sich für diese hochkonservierten Motive, die entsprechenden Rezeptoren der pathogen-erkennenden Zellen werden als *Pattern-recognition-Rezeptoren* (PRRs) bezeichnet.

Im Gegensatz zu den Rezeptoren mit Antigen-Spezifität der erworbenen Immunantwort weist die Gruppe der PRRs etliche entscheidende Unterschiede auf. Viele Effektorzellen der angeborenen Immunität, hier sind vor allem die APCs wie primär die Makrophagen, Monozyten und DCs, aber auch die B-Zellen zu nennen, haben PRRs mit einer Spezifität für eine Subpopulation. Weiter folgt eine sofortige Antwort auf Zellebene nach einer Stimulation der Rezeptoren. In die Familie der PRRs gruppiert man in heutiger Zeit die *Lektin-Rezeptoren* (Banchereau et al., 2000), die *Scavenger-Rezeptoren* (Peiser et al., 2002) und auch die *Toll-like-Rezeptoren* (TLRs) (Barton et al., 2002).

In dieser Gruppe der PRRs nimmt die Familie der TLRs bisher den Platz der am besten erforschten Familie ein. Ursprünglich konnten Experimente mit der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* eine Einheit von Rezeptoren aufdecken, die neben einer essentiellen Rolle in der Embryonalentwicklung der Fliege (Belvin et al., 1996; Hashimoto et al., 1988) auch entscheidend in der angeborenen Immunantwort gegen Pilzinfektionen mitwirken (Lemaitre et al., 1996). Diese Rezeptoren-Familie werden *Toll-Rezeptoren* genannt. Der Arbeitsgruppe um Janeway war es möglich, ein humanes Protein mit homologer Struktur zu dem *Toll-Rezeptor* von *Drosophila* zu

identifizieren (Medzhitov et al., 1997b). Das Äquivalent dieses hTLR4 wurde letztlich im murinen System als Rezeptor für LPS entdeckt, als aufgrund einer Punktmutation im Gencode des mTLR4 zwei Maus-Mutanten eine ansonsten als tödlich zu wertende LPS-Gabe ohne Schaden überlebten (Poltorak et al., 1998).

Im folgenden sind im murinen System mehr als 13 *Toll-like*-Rezeptoren entdeckt worden (Lauw et al., 2005; Wei et al., 2011). Ebenso konnten mindestens 10 dieser Rezeptoren beim Menschen detektiert werden (Chuang et al., 2001; Hemmi et al., 2000; Rock et al., 1998), auch deren jeweilige Agonisten wurden identifiziert. Jedoch nicht nur externe Stimulanzien lösen eine Reaktion an diesen Rezeptoren aus. Auch zelleigene Bestandteile können diese Rezeptoren aktivieren. Hierzu ist neben den Hitzeschockproteinen (Ohashi et al., 2000) auch Fibronectin (Okamura et al., 2001) und Chromatin (Leadbetter et al., 2002) in der Lage. Ist TLR4 für den Erkennungsmechanismus von LPS gramnegativer Bakterien und TLR2 für Lipoproteine sowie Glycolipide jeweils differentier Bakterienstämme verantwortlich, so werden über den TLR5 gramnegative Bakterien anhand des externen Membranbestandteils Flagellin identifiziert.

Hinsichtlich des Erkennens von CpG-ODN konnten Hemmi et al. nachweisen, dass bei Mäusen die zelluläre Immunantwort durch TLR9 ausgelöst wird (Hemmi et al., 2000). Bei ihren *in-vitro* Studien mit Mäusen, die kein TLR9 bilden konnten, blieb eine Proliferation von Splenozyten (CpG-ODN Stimulation) und Makrophagen (TNF-Alpha, IL-6, IL-12) vollständig aus.

Desgleichen fehlte eine Auswirkung auf DCs, die normalerweise als APCs stimulierend auf CpG-ODN wirken, indem sie eine Ausschüttung von IL-12 fördern. Somit blieb auch die Hoch-Regulierung zusätzlich stimulativer Oberflächen-Moleküle aus.

Zudem zeigte sich bei den TLR9 defizitären Mäusen in einem *in vivo*-Versuch, dass sich durch eine CpG-DNS-Gabe kein Schocksyndrom auslösen ließ, welches ansonsten tödlich verlaufen wäre. Ferner konnte auch die T_H1 -gerichtete Immunantwort nicht festgestellt werden. Die Beziehung zwischen CpG-DNS und TLR9 wurde bereits für das humane System beschrieben. In einer Studie der Autoren Bauer et al. aus dem Jahr 2001 konnte nach Transfektion des TLR9 auf menschliche „nonresponder-cells“ kein stimulatorischer Effekt erzielt werden (Bauer et al., 2001b).

Allerdings gibt es einen nicht unerheblichen Unterschied hinsichtlich der Verteilung von TLR9 auf die unterschiedlichen Zellarten im humanen und murinen System. Im menschlichen Immunsystem befindet sich TLR9 auf B-Zellen und auf plasmazytoiden dendritischen Zellen. Die Rezeptoren für TLR9 bei Mäusen sind dagegen auf Monozyten und Makrophagen lokalisiert.

Daraus ergeben sich unterschiedliche Aktivierungsmöglichkeiten der Zellen der humanen oder murinen Immunsysteme. Das ist auch der Grund dafür, dass Immunreaktionen von Mensch und Maus unterschiedlich ausfallen und die Erkenntnisse aus Studien mit einem Mausmodell nicht ohne weiteres auf die menschliche Spezies übertragbar sind.

Desgleichen ist diejenige Basen-Sequenz der CpG-ODN, die zu einer größtmöglichen Stimulierung führt, abhängig davon, bei welcher Spezies sie eingesetzt wird. Diverse Studien ermittelten einerseits Wirkprofile von ODN-Sequenzen (5'-GACGTT-3') im murinen System, die sich bei der Anwendung beim Menschen als wirkfrei erwiesen (Krieg et al., 1995; Rankin et al., 2001; Yi et al., 1996b). Andererseits führte die Kernsequenz 5'-GTCGTT-3' zu einer Aktivierung menschlicher Immunzellen, während sie bei Mäusen ohne Wirkung blieb (Hartmann et al., 2000b).

Indem die TLR induzierten Signaltransduktions-Wege verfolgt und analysiert wurden, konnten auf molekularer Ebene die Mechanismen detektiert werden, die für eine entsprechende Genexpression zur Sicherstellung einer adäquaten Immunantwort des Organismus relevant sind. Der Autorengruppe um Rock et al. gelang es zum einen aufzudecken, dass multiple, leucinreiche Sequenzabschnitte in der Ektodomäne charakteristisch sind. Zum anderen fanden sie ebenfalls eine *Toll*-homologe Domäne im Bereich des Zytoplasma (Rock et al., 1998). Dabei erwies sich eine Region innerhalb des Zytoplasmas als relevant für eine funktionierende Signal-Transduktion des betreffenden TLR. Da diese Region dem Interleukin-1-Rezeptor (IL-1R) ähnlich war, wurde sie als *Toll*/IL-1R-Domäne (TIR) bezeichnet. Gemeinsam mit dem Adapter-Protein *myeloid differentiation marker 88* (MyD88) bewirkt TIR eine Aktivierung der IL-1R assoziierte Kinase (IRAK).

Im Verlauf des Weges der Signal-Transduktion kommt es weiterhin zu einer Aktivierung des *tumor necrosis factor receptor-associated factor 6* (TRAF6) und zur Auslösung von Kaskaden von Proteinkinasen. Die Endstrecke der Aktivierung bilden *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) und c-Jun im Inneren des Zellkerns (Aderem et al., 2000; Akira, 2001). Diese beiden sind schlussendlich für die Expression spezifischer Gene und somit für die Synthese proinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-12, TNF- α) verantwortlich. Die Expression der spezifischen Gene in den unterschiedlichen Zellarten hängt wiederum von der Aktivierung durch TLR ab. Eine weitere Möglichkeit der Genaktivierung besteht über einen MyD88-unabhängigen Signaltransduktions-Weg, welcher durch LPS moduliert wird (Kaisho et al., 2001; Kawai et al., 1999; Kawai et al., 2001).

Bei dieser Variante sind Adapter-Moleküle wie beispielsweise *TIR domain-containing adapter inducing IFN- β* (TRIF) (Oshiumi et al., 2003) oder auch *TIR domain-containing adapter protein* (TIRAP) beteiligt (Horng et al., 2002).

1.2.5 Therapeutisches Potenzial und erste *in vivo*-Ergebnisse mit CpG-ODN

Die Zusammenschau der bisherigen Erkenntnisse hinsichtlich des Stimulations-Potentials von CpG-ODN auf die unterschiedlichen menschlichen Immunzellen lässt eine klinische Verwendung sinnvoll erscheinen. Gründe hierfür sind:

- CpG-ODN ruft eine koordinierte Immun-Reaktion hervor, die der physiologischen Reaktion ähnlich ist. Daher ist diese der Stimulation durch einzelne Zytokine (z.B. IFN- α , IL-1) überlegen.
- CpG-ODN kann prophylaktisch und therapeutisch als Impf-Adjuvans verwendet werden. Es ist in der Lage professionelle APCs selektiv zu aktivieren. Somit löst CpG-ODN eine Immunreaktion auf zellulärer Ebene aus und veranlasst die Produktion von Antikörpern.
- CpG-ODN induziert eine T_H1-gerichtete Immunreaktion. Dies unterstützt die Abwehr von intra-zellulären Erregern.
- CpG-ODN birgt das Potential auch maligne Neoplasien durch die Auslösung einer körpereigenen Immunabwehr zu bekämpfen.

Am Mausmodell konnte in diversen Untersuchungen bewiesen werden, dass es bei einer gleichzeitigen Applikation von Impfstoff und CpG-ODN zu einer Verstärkung der Immunantwort gegen HBsAg kam. Dieser therapeutische Ansatz zeigte sich anderen Vakzine-Adjuvanzen hinsichtlich der Parameter: Serokonversion, der Induktionsgeschwindigkeit und der Erreichung eines hohen Antikörper-Titers überlegen. Ferner war die CTL-Reaktion in qualitativer und quantitativer Hinsicht ausgeprägter (Lipford et al., 2000a). Diese Ergebnisse konnten durch klinische Studien reproduziert werden.

Eine gleichzeitige Applikation von CpG-ODN und Alum erwies sich im murinen System als hocheffektiv und nebenwirkungsarm. Dabei ist Alum das einzige Vakzine-Adjuvans, welches bisher für die klinische Anwendung zugelassen ist (Weeratna et al., 2000). Die Kombination mit CpG-ODN erwies sich auch bei Primaten als vorteilhaft. Als in Indonesien bei einer Population von Menschenaffen eine Hepatitis B Epidemie auszubrechen drohte, wurden mehr als 100 Tiere durch diesen therapeutischen Ansatz erfolgreich immunisiert. Das ist von daher bemerkenswert, da die Impfung mit einer

herkömmliche Vakzine gegen diese Erkrankung erfolglos blieb (Davis et al., 2000). Die hier gewonnenen Erkenntnisse führten zur Initiierung von klinischen Hepatitis B-Impfstudien mit CpG-ODN/Adjuvantien-Kombinationen. Schetter et al. konnten belegen, dass es durch diese Kombinationen zu einem höheren und schnelleren Anstieg des Antikörper-Titers kam. Dadurch gelang es sogar bei 9 von 10 Patienten, die immunsupprimiert waren, einen zufriedenstellenden Schutz gegen Hepatitis B zu erreichen (Schetter, 2003).

Mit Hilfe von CpG-ODN ist es möglich, einen IFN- α /T_H1-vermittelten Schutz gegen chronische Infektionskrankheiten durch intra-zelluläre Einzeller und Parasiten zu generieren. Dies ließ sich am Mausmodell durch die Anwendung bei künstlich hervorgerufenen septischen Erkrankungen durch verschiedene Bakterienarten nachweisen. Dies ist insofern bemerkenswert, da das Immunsystem der Maus in der Regel nicht auf einen Stimulus durch verschiedene Bakterienarten reagiert. Trotzdem konnte im murinen Immunsystem durch CpG-ODN eine Anschoppung neutrophiler Granulozyten beobachtet werden. Diese ging mit einer erhöhten Phagozytose-Aktivität an der Stelle der herbeigeführten Infektion einher (Weighardt et al., 2000). Ein weiterer Fortschritt in der Erforschung des Potentials von CpG-ODN war der Nachweis, dass es möglich ist, eine bereits etablierte T_H2-gerichtete Immunreaktion in eine T_H1-Antwort zu transformieren (Heeg et al., 1998). Dies ist bei Erkrankungen wie beispielweise *Leishmania major* von Bedeutung, da diese T_H2-induziert sind. Durch den Ansatz einer kurativen T_H1-Reaktion konnte hier bei Mäusen ein letaler Ausgang verhindert werden (Zimmermann et al., 1998). CpG-ODN führt zur Verstärkung beider Komponenten des Immunsystems (humoral und zell-vermittelt). Daher wirkte es auch bei jungen Nagetieren, deren Immunantwort in der Regel T_H2 basiert ausfällt (Weeratna et al., 2001). Die Erkenntnis über die Möglichkeit eine T_H2-Reaktion in eine T_H1-Reaktion umzuwandeln, eröffnet neue Chancen CpG-ODN in der Asthmatherapie, bei allergischen Erkrankungen und bei Desensibilisierungen einzusetzen, da hier zumeist eine T_H2-vermittelte Pathologie zugrunde liegt (Kline et al., 1998).

Für die Therapie maligner Tumoren lässt sich das Potential von CpG-ODN dahingehend nutzen, dass Infektionen wie bereits beschrieben unter Umständen einen anti-tumoralen Effekt auslösen können.

Heute geht man allgemein davon aus, dass ein aktiviertes Immunsystem die Proliferation maligner Tumoren verhindern kann (Shankaran et al., 2001). Der Benefit durch eine prophylaktische Applikation von CpG-ODN (Dow et al., 1999; Wickstrom, 1997) und auch durch eine therapeutische Gabe ist am Mausmodell hinreichend belegt (Carpentier et al., 1999; Dow et al., 1999).

Diverse Studien konnten sogar nachweisen, dass die Ausbildung einer immunologischen Gedächtnisantwort nach erfolgter Remission einer Neoplasie einer neuerlich (künstlich herbeigeführten) Tumorproliferation bei Mäusen begegnen konnte (Carpentier et al., 2000; Heckelsmiller et al., 2002b).

Klinische Untersuchungen zum therapeutischen Ansatz maligne Tumoren durch die Applikation von CpG-ODN zu behandeln sind derzeit der Erprobungsphase I/II zuzurechnen.

Im murinen System ist ein synergistischer Effekt der Kombination von CpG-ODN mit monoklonalen Antikörpern bereits belegt. Derzeit gibt es bereits zahlreiche dieser Antikörper, die die Zulassung für den klinischen Einsatz erlangt haben. Das Verständnis der Verstärkung der ADCC (zellgebundene Zytotoxizität) durch die Applikation von CpG-ODN geht auf Studien von Wooldridge et al. zurück, die die tumorschädigende Wirkung nachwiesen (Wooldridge et al., 1997). Zudem fördert CpG-ODN die Expression definierter Ziel-Antigene (z.B. CD20), was beispielsweise für die Bekämpfung des primären malignen B-Zell-Lymphoms genutzt werden kann (Jahrsdorfer et al., 2001).

Daher werden im Rahmen klinischer Forschungsvorhaben hinsichtlich der CpG-ODN/Antikörper-Therapien klinische Phase I/II-Studien intensiv vorangelerben (Schetter, 2003).

Auch der Einsatz als Adjuvans bei Vakzine-Therapiestrategien im Rahmen der Behandlung maligner Tumoren ist dabei, sich zu etablieren. Diverse Studien beschreiben eine Induktion einer antigenspezifischen Immunreaktion durch die Applikation von CpG. Dabei besteht die Möglichkeit das Antigen auf verschiedene Art und Weise aufzubereiten; beispielsweise als Tumorpeptid, als Tumorprotein oder als komplette Tumorzelle (Brunner et al., 2000; Heckelsmiller et al., 2002a; Heckelsmiller et al., 2002b).

1.3 Die dendritische Zelle und ihr Einsatz als Tumorstakzine

1.3.1 Immunbiologie

Obwohl dendritische Zellen bereits 1868 von einem Studenten der Medizin, einem Herrn Langerhans, detailliert als Zellen dermalen Ursprungs mit dendritisch geformten Zellausläufern beschrieben wurden, rückte diese Zellart erst 1973 in den Fokus der Wissenschaft. Es ist den Autoren Steinman und Cohn geschuldet, dass die Bedeutung und Funktion dieses dermalen Zelltyps naturwissenschaftlich untersucht wurde. Die Betrachtung unter dem Phasen-Kontrast-Mikroskop bestätigte die dendritische

Morphologie der Langerhans-Zellen (LCs). Ebenfalls konnte der Beweis geführt werden, dass das dendritische Zellsystem, welches in der Milz von Mäusen entdeckt worden war, mit dem System der LC in der Haut identisch war. (Schuler et al., 1997).

In neuerer Zeit ist das Potential dendritischer Zellen eine effiziente und zielgerichtete Immunreaktion zu initiieren und zu modulieren, wissenschaftlich anerkannt. Es wird ihnen sogar eine Schlüsselfunktion hinsichtlich der Koordination der angeborenen und der erworbenen Immunabwehr zugesprochen (Bell et al., 1999; Steinman, 1991).

Noch nicht ausgereiften DCs kommt die Funktion von Wächtern des Immunsystems zu (Banchereau et al., 1998). Sie kommen netzwerkartig in fast allen peripheren Gewebearten vor. Dort nehmen sie extrazelluläre Bestandteile durch Endo- und Phagozytose auf. Diese werden sodann prozessiert und in Peptidform mittels MHC-Molekülen präsentiert. Somit kann gesagt werden, dass DCs zur Analyse ihrer Umgebung beitragen. Werden Antigene auf diese Art präsentiert, so können sie durch T-Zellen identifiziert werden (Svensson et al., 1997). Eine DC wandert nach einem Gefahrensignal-Kontakt wie beispielsweise IFN- α , IFN- γ , LPS oder IL-1 β in den nächstgelegenen Lymphknoten aus, der der Drainage des umliegenden Gewebes dient. Dort kommt es zur Interaktion mit dem T-Zell-System und es werden T-Zellarale gebildet. Es erfolgt die Induktion einer Toleranzentwicklung gegen das entsprechende Antigen und die Einleitung einer spezifischen T-Zell-Immunreaktion. Für die Initiierung einer adaptiven Immunreaktion ist nicht nur die Antigenerkennung durch die beschriebene Präsentation notwendig (Signal I), sondern auch die T-Zell-Aktivierung mittels ko-stimulatorischer Moleküle der DC (Signal II). Beispiele für die Kostimulantien sind CD80 oder CD86. Allerdings ist die Exprimierungsrate bei noch nicht ausgereiften DCs für diese ko-stimulatorischen Oberflächenmoleküle zumeist so gering, so dass nach Ansicht der Autoren Dhodapkar et al. ein Großteil der Toleranzentwicklung durch das erste Signal ausgelöst wird (Dhodapkar et al., 2001). Nach abgeschlossenem Reifungsprozess der DC mit entsprechender Hochregulation der ko-stimulatorischen Oberflächenmoleküle (Signal II) entsteht erst eine effektive T-Zell-vermittelte Immunreaktion (Shortman et al., 2001).

Janeway stellte die Hypothese auf, dass eine Verknüpfung zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität bestehe. Auf welche Art und Weise sich diese Verbindung jedoch darstellte, blieb lange Zeit unklar. Erst die Erforschung und Charakterisierung der PRPs machte die genaueren Zusammenhänge klar. Medzhitov et al. zeigten 1997, dass die Stimulierung durch mikrobielle Zellbestandteile einen Aktivierungsvorgang auslöste, der eine Ausreifung der DC in Gang setzte, welche wiederum die Induktion der Immunreaktion nach sich zog (Medzhitov et al., 1997a). Matzinger et al. konnten ein Jahr später zeigen, dass der

Reifeprozess von DCs auch durch endogen bedingte Faktoren ausgelöst werden konnte. Beispiele dafür sind nekrotische Zellbestandteile, intrazelluläre Stressproteine und durch eine übermäßige Erhitzung der Zelle entstehende Hitze-Schock-Proteine (HSPs) (Matzinger, 1998). Bemerkenswert dabei ist, dass Zellen bei der Apoptose diese stimulierenden Signale nicht ausgeben, obwohl die Prozessierung und Präsentation der Antigene ähnlich verläuft (Gallucci et al., 1999).

Im Zuge des Reifungsprozesses durchlaufen DCs mehrere Stadien des Phänotyps und verändern ihre Funktion. Die nachfolgende Tabelle stellt einen Vergleich zwischen unreifen und reifen DC dar (Tabelle 1)

| Unreife DC | Reife DC |
|--|---|
| MHC-II intrazellulär | MHC-II auf der Oberfläche |
| Endozytose | - |
| Wenige kostimulierende Moleküle (CD80, CD86) | Viele kostimulierende Moleküle (CD80, CD86) |
| Wenige T-Zell-aktivierende Moleküle (CD40) | Viele T-Zell-aktivierende Moleküle (CD40) |
| Kein CD83 | Viel CD83 |
| Kein IL-12 | IL-12-Sekretion |

Tabelle 1: Veränderung der Merkmale von DCs während des Reifungsprozesses

Durch diese Auflistung des Potentials ausgereifter DCs wird die große Bedeutung dieser Zellart für das Immunsystem deutlich. Im Vergleich zu weiteren APCs (z.B. B-Zellen, Makrophagen) ermöglichen sie eine Steigerung der Oberflächenexpression der MHC-Komplexe um den Faktor zehn bis hundert. Zudem bilden Oberflächenmoleküle wichtige Adhäsionsmoleküle, Beispiele hierfür sind: CD11c, *Intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1, ICAM-2, *Lymphocyte function-associated antigen* (LFA)-3. Weiter tragen auch die Kostimulatoren CD80 und CD86 zur Aktivierung des T-Zellsystems bei (Inaba et al., 1997; McLellan et al., 1995). Reis e Sousa et al. ergänzten die Liste der von ausgereiften DCs sezernierten Stimulatoren des angeborenen und des adaptiven Immunsystems um das Zytokin IL-12 (Reis e Sousa et al., 1997).

Im menschlichen Organismus wird zwischen 3 Subtypen von DCs differenziert: erstens gewebeständige DCs im Interstitium des dermalen und lymphatischen Gewebes, zweitens die eigenständigen Langerhans-Zellen der Haut, die über spezifische Marker (CD1a, Langerin) verfügen sowie sogenannte *Birbeck Granula*, die für die Prozessierung der Antigene zuständig sind (Caux et al., 1997).

Im peripheren Blutkreislauf sind zwei weitere CD-Modifikationen anzutreffen, die sich durch ihre differierende Expression von CD11c unterscheiden lassen. Sie verfügen zudem über weitere spezifische Marker, daher wird der Ursprung in verschiedenen Vorläuferzellen vermutet. Beispielsweise wird bei CD11c-negativen DCs ausschließlich die Expression von lymphoiden Markern nachgewiesen. CD11c-positive DCs dagegen exprimieren auch Marker myeloiden Ursprungs. Die Hypothese der beiden unterschiedlichen CD-Modifikationen im Blut wird durch die Überlegung gestützt, dass evolutionsbedingt unterschiedliche Wachstumsfaktoren und Transkriptionsfaktoren für eine funktionelle Spezialisierung des Immunsystems notwendig sind (Spits et al., 2000). Diese Differenzierung findet ihre Entsprechung in dem differierenden Zytokinprofil und TLR-Expressionsmuster der beiden Modifikationen (Hornung et al., 2002; Kadowaki et al., 2001; Krug et al., 2001b). Durch diese stattgehabte Differenzierung entstand faktisch eine Spezialisierung, die im Verlauf der Entwicklungsgeschichte die Erkennung verschiedener Pathogene ermöglichte (Shortman et al., 2002).

Die Unterscheidung der DCs des Blutkreislaufs mittels ihres CD11c-Expressions-Musters in zwei Subtypen führte zu einer detaillierten *in vitro*-Analyse ihres Potentials. Myeloide dendritische Zellen (MDCs) sind CD11c-positiv, sie kommen gemeinsam mit weiteren Vorläuferzellen des Blutsystems beim Menschen über den gesamten Körper verteilt vor. Man unterscheidet hier unterschiedliche Zelltypen, Beispiele sind: CD34+ Stammzellen (Caux et al., 1997), CD14+ Monozyten (Romani et al., 1994) oder CD11c+ Vorläufer-Zellen (Ito et al., 1999). Diese können sich mit Hilfe von spezifischen Wachstumsfaktoren wie beispielsweise *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) zu MDCs entwickeln. Als weiterer Differenzierungs-Stimulus gelten Zytokine wie IL-4 oder TNF- α .

CD40L, LPS und mikrobielle DNS gelten als potentester Stimulus, um den Reifungsprozess von unreifen MDCs in Gang zu setzen. MDCs werden somit in die Lage versetzt, quantitativ viel IL-12 zur Verfügung zu stellen, welches die Umwandlung von naiven CD4+ T-Zellen in INF- γ -produzierende T_H1-Zellen veranlasst (Guermontprez et al., 2002).

MDCs sind *in vitro* relativ leicht zu generieren, da ihre Vorläufer-Zellen zahlreich vorhanden und leicht verfügbar sind. Daher ist es nicht verwunderlich, dass der Einsatz

als Impfadjuvanz derzeit intensiv im Rahmen von klinischen Studien erforscht wird. Dabei werden unterschiedliche Vakzinierungs-Strategien für einen Einsatz bei verschiedenen Tumorentitäten erprobt (Fong et al., 2000).

PDCs sind DC-Vertreter der lymphoiden Zellreihe. Sie wurden Mitte des 20. Jahrhunderts von K. Lennert und W. Remmele, zwei deutschen Pathologen, im Rahmen ihrer Untersuchungen entdeckt. Da sie morphologisch eine T-Form aufweisen, wurden sie T-assoziierte Plasmazelle genannt (Lennert et al., 1958). Die heutige offizielle Bezeichnung ist plasmazytoide T-Zelle (PTZ). Diese Namensänderung geht auf Feller et al. zurück, die im Jahre 1983 den bis dahin auf ihnen unentdeckten und T-Helfer-Zell-eigenen Marker CD4 nachwiesen (Feller et al., 1983).

Facchetti et al. machten 1988 darauf aufmerksam, dass PTZs im Gegensatz zu T-Zellen nicht über den Oberflächenmarker CD3 verfügen. Stattdessen exprimieren sie andere Oberflächenmarker aus der Zellreihe der myeloischen Monozyten. Daher bezeichneten Facchetti et al. diesen Zelltypus als plasmazytoiden Monozyten (Facchetti et al., 1988).

1994 beschrieben Steinman et al. die CD11c⁺ Subtypen der ursprünglichen DC im peripheren Blutsystem und charakterisierten sie anhand ihrer Fähigkeit zur CD4-Oberflächenexpression (O'Doherty et al., 1994). Weitere Studien machten deutlich, dass die plasmazytoiden Monozyten mit den DC-Vorläuferzellen (CD4 positiv, CD11c negativ) im peripheren Blut identisch sind (Grouard et al., 1997).

Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde diese Zellart neuerlich in plasmazytoide dendritische Zelle umbenannt. Histologisch ist sie in Schnitten der Tonsille in unmittelbarer Nachbarschaft zu Lymphknoteneintrittsorten anzutreffen, den sogenannten *hohen endothelialen Venolen* (HEV). Hieraus können eine Isolierung und anschließende *in vitro*-Kultivierung problemlos vorgenommen werden. Dabei dient das Zytokin IL-3 dazu, die plasmazytoiden dendritischen Zellen zu differenzieren und weiter die Zytokin-Rezeptorkette IL-3-Rezeptor α (CD123) dazu, diese Zellen heute zu identifizieren. Das Verfahren dazu geht auf Untersuchungen von Olweus et al. zurück, der CD123 auf der PDC entdeckte (Olweus et al., 1997). Durch die Zugabe von CD40L reifen PDCs aus und lassen sich beispielsweise durch CpG-ODN zu einer erheblichen IFN-Typ I-Produktion anregen. Auf diese Art und Weise kann die Immunreaktion in Richtung der T_H2-Antwort gesteuert werden.

1.3.2 Dendritische Zellen in der Therapie maligner Erkrankungen

Neoplasien haben differenzierte Strategien entwickelt, um sich der Erkennung durch das menschliche Immunsystem zu entziehen, obwohl sie durchaus über viele spezifische Fremdartigene verfügen, die eigentlich eine Immunreaktion auslösen müssten. Ein Grund für das Ausbleiben einer antigenspezifischen T-Zell-Reaktion kann beispielsweise die Fehlfunktion einer dendritischen Zelle als tumorinfiltrierende Zellart sein. Diese Fehlfunktion kann wiederum darin begründet sein, dass keine kostimulatorischen Moleküle wie CD80 oder CD86 vorhanden sind. Derart funktionsgeschädigte DCs wurden bei Kolonkarzinomen und bei Basaliomen nachgewiesen (Chaux et al., 1993). Dieser Umstand würde das Ausbleiben einer angemessenen Immunreaktion erklären.

Ito et al. stellten bei Untersuchungen regionaler Lymphknoten von Patienten mit malignen dermalen Melanomen oder Mammakarzinomen fest, dass nicht nur die Qualität der DCs verändert war, sondern auch deren Quantität erheblich reduziert war. Dies wurde auf die von den Tumoren selbst induzierte Herstellung von Zytokinen wie zum Beispiel *Transforming-growth-factor- β -1* (TGF- β -1) zurückgeführt (Ito et al., 2006). Für diese These spricht, dass mittlerweile nachgewiesen werden konnte, dass Zytokine für die DC-Apoptose im Wächter-Lymphknoten von Tumorpatienten, die an einem kleinzelligen Bronchial-Karzinom erkrankt waren, verantwortlich sind, (Ito et al., 2006). Weitere Studien untersuchten die Wirkungsweise der Zytokine IL-10 und *Vascular-endothelial-growth-factor* (VEGF) und kamen zu dem Erkenntnis, dass diese die Proliferation der DCs hemmen und auch ihre Funktionalität einschränken (Alleva et al., 1994; Dummer et al., 1995; Gabilovich et al., 1996). IL-10 wird beispielsweise dafür verantwortlich gemacht, dass die DC ihre Aufgabe als APC nicht wahrnehmen kann. Somit resultiert faktisch eine antigenspezifische Anergie. Dies wiederum kommt einer Toleranzentwicklung gegenüber der bösartigen Neoplasie gleich (Enk et al., 1997; Enk et al., 1994; Steinbrink et al., 1999; Vendetti et al., 2000). Bei malignen Haut-Melanomen unterbleibt dadurch die Migration von dermalen LCs in die regionalen Lymphknoten, es unterbleibt sogar eine Immunreaktion, induziert durch die nicht ausgereifte DC. (Adler et al., 1998; Lucas et al., 1999; Steinbrink et al., 1999). Nur wenn die DC bereits einen ausreichenden Ausreifungsgrad erreicht hat, entwickeln sie eine Resistenz gegen die tumorinduzierte Zytokin-Hemmung und kann ihrer eigentlichen Aufgabe nachkommen (Steinbrink et al., 1997).

Daher stellen die *in vitro*-Kultivierung von DCs und additiv dazu ein Verfahren, welches deren Reifungsprozess unterstützt, eine vielversprechende Möglichkeit dar, im Rahmen eines Vakzinierungsansatzes die Therapie bei malignen Melanomen der Haut zu optimieren. Der breiten Anwendung dieser Behandlungsstrategie sind allerdings

derzeit noch Grenzen gesetzt. Zum einen kann die peptidspezifische Immuntherapie noch nicht bei jedem Betroffenen angewendet werden, da die individuell kultivierten DCs mit den entsprechenden HLA-Antigenen versehen sein müssen. Zusätzlich müssen für jede Tumorart die *tumor-associated antigens* (TAA) identifiziert sein. Diese Peptide sind für jede Entität spezifisch und müssen als Zielstruktur präsentiert werden. Diese Voraussetzung ist zumeist deshalb nicht gegeben, weil Malignome die Eigenschaft besitzen, sich durch Flucht-Mutationen der *tumor-surveillance* zu entziehen.

Vor dem Hintergrund des genetischen Veränderungspotentials maligner Neoplasien besteht für eine effektive Immuntherapie die Notwendigkeit, eine große Zahl relevanter TAA als Zielstrukturen zur Verfügung zu haben (Kufe, 2000). Daher liegt der Fokus der heutigen Tumorforschung auf der Detektion von weiteren TAA und auf der Entwicklung von methodischen Ansätzen, die eine zielführende Antigenbeladung von APCs ermöglichen. Zeitgleich wird auch die Suche nach zusätzlichen potentiellen Quellen für relevante Antigene fortgesetzt.

Ein favorisierter therapeutischer Ansatz besteht darin, die entartete Zelle in ihrer Gesamtheit als Vakzine zu verwenden. Hiervon verspricht man sich den Vorteil, dass somit alle Tumorproteine und Tumorpeptide, deren Antigenstrukturen wichtig sein könnten, sicher in dem Präparat enthalten sind und zudem auch noch in einer Konfiguration vorliegen, die für das jeweilige Individuum spezifisch ist. Daher kann auf eine zeit- und kostenintensive Aufbereitung des Vakzinepräparates verzichtet werden. Zusätzlich kann RNS aus solchen Präparationen gewonnen werden. Versuche in einem Tumormodel mit minder immunogenem Potential zeigen, dass durch diesen therapeutischen Ansatz eine deutliche Reduzierung von pulmonalen Filiae erreicht werden konnte (Boczkowski et al., 1996; Koido et al., 2000). Auch ist es möglich, die benötigte RNS im Labor aus cDNA zu transkribieren. hierfür wäre nur eine geringe Anzahl an ursprünglichen Tumorzellen als Quelle notwendig.

Werden nicht komplette Tumorzellen aufbereitet, sondern Lysate der Tumorzellen verwendet, ist ebenfalls eine DC-Beladung derselben auf die gleiche Weise möglich. Die Autoren Nestle et al. verfolgten diese Strategie bei Tumorpatienten mit fortgeschrittenen Melanomen mit hohem Metastasierungsgrad. Sie verwendeten eine entsprechende DC-Vakzine, welche mit IL-4 und GM-CSF kultiviert worden war. Damit gelang es, eine antigenspezifische zytotoxische T-Zell-Antwort zu induzieren (Nestle et al., 1998).

Die Autorengruppe um Rieser et al. verabreichten Patienten mit einem metastasierenden Nierenzellkarzinom eine einzige Injektion mit *in vitro* aufbereiteten DCs. Diese waren voll ausgereift und zudem mit körpereigenem Tumorlysat gepulst.

Damit konnte eine verzögerte Immunantwort ausgelöst und nachgewiesen werden. Seitens der Autoren wird jedoch darauf hingewiesen, dass die therapeutische Effizienz des Verfahrens sehr stark davon abhängt, in welchem Stadium der Tumor sich befindet und welche Dynamik er aufweist (Rieser et al., 1999).

Studien am Mausmodell gaben Hinweis darauf, dass auch die Form der Darreichung der DC-Vakzine von Bedeutung ist. Die besten Resultate hinsichtlich des Auslösens einer T_H1 -gerichteten Immunreaktion ließen sich erreichen, wenn die DC intranodal appliziert wurden. Bei einer intravenösen Gabe oder einer subkutaner Applikation fiel die Immunantwort deutlich schwächer aus. Wenn die DC-Vakzine durch die systemische Gabe von IL-12 unterstützt wurde, konnten additive günstige Effekte erzielt werden (Tatsumi et al., 2001). Shimizu et al. wiesen ähnliche Resultate für das Zytokin IL-2 nach (Shimizu et al., 1999). Im Rahmen von klinischen Studien konnte bei Tumorpatienten mit Hautmelanomen nur durch eine Kombination von Peptid-Vakzinierung und additiver IL-2-Applikationen eine Immunreaktion ausgelöst werden. Die alleinige Anwendung der Peptidvakzine blieb wirkungslos (Rosenberg et al., 1998). Vor diesem Hintergrund scheint die Überlegung sinnvoll, vollständige Tumorzellen *in vitro* mit Gensequenzen für spezifische Zytokine wie beispielsweise IL-2 oder auch IL-12 zu transfizieren. Dies erhöht die Chancen, eine optimale Immunreaktion auslösen zu können.

Alternativ zu der therapeutischen Intention, APCs mit relevanten Antigenen zu beladen, verfolgen einige Wissenschaftler den Ansatz, eine Verschmelzung der Tumorzelle mit der körpereigenen APCs zu erreichen. Gong et al. konnten am Mausmodell zeigen, dass sich DCs mit MC38-Tumorzellen fusionieren ließen. In einer weiteren klinischen Studie wurde eine Fusion von körpereigenen DCs mit Zellen eines primären Mammakarzinoms erreicht. Auf diese Weise konnte in beiden Fällen eine T-Zell-Proliferation erreicht (Gong et al., 2000) und sogar im Falle des MC38-Karzinom-Modells eine protektive und auch therapeutische Wirkung erzielt werden (Gong et al., 1997).

Die genannten klinischen Studien geben eindeutig Hinweis darauf, dass die Effektivität von DC-Vakzinierungsstrategien mit dem Stadium des Tumors, in dem die Therapie begonnen wird, korreliert.

Candido et al. fanden in ihrer Studie am Mausmodell letztendlich den fehlenden *link* für eine Erklärung hierfür; sie erkannten die Bedeutung des Levels der *in situ*-Tumorapoptose für den Wirkungsgrad der DC-Vakzine. Sie steigerten bei ihren Versuchstieren den Tumor-Apoptoseindex mit Hilfe von $TNF-\alpha$ und erreichten dadurch eine höhere Effizienz der intratumoralen DC-Vakzine (Candido et al., 2001).

Gallucci et al. kamen in ihrer Studie jedoch zu einem anderen Resultat. Sie fanden keine Unterschiede der DC-Aktivierung in Abhängigkeit davon, ob die betroffenen Zellen vital oder apoptotisch waren. Allerdings galt das nicht für Zellen, die beispielsweise durch Viren infiziert, gestresst oder nekrotisch waren. Diese wirkten als Stimulatoren der DC-Aktivierung (Gallucci et al., 1999).

Klinisch wurden DC-Vakzinierungsstrategien bisher überwiegend bei metastasierenden malignen Melanomen erprobt. Aber dieser therapeutische Ansatz wird auch zunehmend bei anderen Tumorentitäten verfolgt, allerdings ist es bis dato noch nicht gelungen, die klinischen Remissions-Raten dadurch nachweislich zu erhöhen. Eine methodische Vergleichbarkeit der Studien ist jedoch nur eingeschränkt möglich, sie variieren hinsichtlich der TAAs, des Grades der Ausdifferenzierung der DC, in Bezug auf die Art und Weise der Antigen-Beladung und hinsichtlich des Applikationsprotokolls.

Daher sollten die Verfahren standardisiert und evaluiert werden. Nur so können evidenzbasierte Erkenntnisse gesammelt werden, die zu einer Modifikation und kontinuierlichen Verbesserung der DC-Vakzinierung führen.

1.4 Herkömmliche onkologische Therapieverfahren des Kolonkarzinoms

Malignome des unteren Gastrointestinaltraktes nehmen bei Männern den dritten Rang der Tumorerkrankungen nach dem Bronchial- und dem geschlechtsspezifischen Prostatakarzinom ein. Bei weiblichen Patienten folgen sie dem Mammakarzinom. Das Risiko, zeitlebens an einem Malignom des unteren Gastrointestinaltraktes zu erkranken, beträgt ungefähr 6 %; das entsprechende Mortalitätsrisiko liegt bei etwa 2,5 bis 3 %. (Schalhorn et al., 2006). Die häufigste Lokalisation der Kolonkarzinome sind das Rektosigmoid (mindestens 55 %) sowie das Colon ascendens. Im Krankheitsverlauf kommt es bei 60 % der Patienten zu einer häufig bereits frühzeitigen Metastasierung. Das Erkrankungsrisiko ist bei einer positiven Familienanamnese für kolorektale Malignome oder auch eine Adenom-Historie besonders erhöht. Auch zählt die chronisch entzündliche Darmerkrankung Colitis ulcerosa zu den prädisponierenden Faktoren. Aber vor allem die Polyposissyndrome, wie beispielsweise die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) mit autosomal-dominantem Erbgang, zeigen ein Risiko bis zu 100 % für eine Karzinomentwicklung. Auch das *Lynch-Syndrom* (hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom = HNPCC), ebenfalls autosomal-dominant vererbt, bringt ein gleichstark erhöhtes Karzinomrisiko mit sich. Bei diesen Erkrankungen sind frühzeitige und engmaschige endoskopische Kontrollen obligat. Sollte die Polyposis-

Erkrankung nicht beherrschbar sein, wird hierdurch sogar eine prophylaktische Kolektomie notwendig. Mit Hilfe eines mittlerweile gut etablierten Vorsorgeprogrammes konnten sowohl die Zahl der Neuerkrankungen um fast 25 % als auch die Morbidität und Mortalität durch ein kolorektales Karzinom deutlich reduziert werden. Hierbei ist ein wichtiger Prognose-bestimmender Faktor das primäre Tumorstadium (abhängig von TNM-Stadien und *Grading*) und konsekutiv auch die Operabilität. Somit variiert die 5-Jahresüberlebensrate zwischen 5 % und bis zu 90 % (Schalhorn et al., 2006). Eine Chance auf Heilung ist letztlich nur durch eine komplette chirurgische und durch den Pathologen bestätigte Resektion des Primärtumors im Sinne einer R0-Resektion möglich. Bei der Operation wird auch das entsprechende Abflussgebiet mit Lymphgefäßen, Lymphknoten und Blutgefäßversorgung (*en bloc*-Resektion) einbezogen. Trotz initial erfolgreicher R0-Resektion des Malignoms kommt es bei rund der Hälfte der Patienten zu einem Rezidivtumor. Daher ist es das Ziel neoadjuvanter Maßnahmen, ein Malignom in bessere, operable Stadien zu führen (*Downgrading*). Hier wurde die Effizienz beim Kolonkarzinom allerdings bisher nicht nachgewiesen (Jehle et al., 2003). Zudem werden adjuvante systemische Chemotherapien bei fortgeschrittenen, also prognostisch ungünstigeren Tumorstadien eingesetzt, um die Möglichkeiten zu verbessern und die gewünschten Heilungschancen durch eine Elimination von eventuellen Mikrometastasen zu erhöhen. Hierbei besteht aber das Problem des fehlenden Vorhersagewertes für die Indikation der Chemotherapie, so dass neben den Patienten mit Indikation zur Chemotherapie doch einige Patienten ohne Notwendigkeit einer solchen mitbehandelt werden. Diese wären bereits durch die alleinige Operation geheilt und werden somit zwangsläufig übertherapiert. Vor diesem Hintergrund ist natürlich das jeweilige Toxizitätsprofil der Chemotherapeutika von entscheidender Relevanz.

Ausgangsbasis der Mehrzahl aller Therapieansätze ist immer noch eine kombinierte Therapie aus 5-Fluoruracil (5-FU), einem Nukleinsäure-Analogen mit hemmender Wirkung für die Synthese des Pyrimidingrundgerüsts, und Folinsäure. Aufgrund der meist besseren Erfolge in Bezug auf die Remission (es werden Raten von 20 bis 40 % erreicht) überwiegen heute statt klassisch dosierter Protokolle mit Bolus- oder Kurzinfusions-Applikation (Protokolle nach *Poon* bzw. *Mayo*, *Machover*, *Münchener Protokoll*) die Hochdosisprotokolle mit wöchentlicher, kontinuierlicher 24-Stunden-Infusion des 5-FU (Protokolle nach *Ardalan* bzw. *AIO*).

Inzwischen konnte durch die Entwicklung neuer Applikationsformen, hier sei die oral einzunehmende Form mit dem Tegafur-Uracil (*UFT*®) und Capecitabin genannt, eine nebenwirkungsärmere und nicht zuletzt hierdurch die Patienten-Compliance fördernde adjuvante Chemotherapie etabliert werden (Pitot et al., 2001). Oxaliplatin, eine

Diaminocyclohexan-Platinverbindung, als zweite Substanzklasse zum Standardregime, bestehend aus 5-FU und *Leucovorin*® (LV), hinzugefügt, hat sich in der adjuvanten Therapie mit einem lebensverlängerndem Effekt gezeigt (Andre et al., 2004). Dennoch sind die mittlerweile erreichten 15 % Steigerung der 5-Jahres-Überlebensrate unter adjuvanter Chemotherapie noch immer nicht zufriedenstellend.

Nach geprüfter Inoperabilität des Primärtumors oder der Filiae (dies definiert unter anderem eine palliative Situation) ist die Indikation für eine Chemotherapie mit palliativer Intention gegeben. Hier ist eine Kombination der bereits lange etablierten Therapeutika 5-FU und LV mit dem Topoisomerase-I-Inhibitor Irinotecan, oder auch Oxaliplatin als derzeitiger Goldstandard anzusehen. Diese beiden Präparate haben auch einen hohen Stellenwert in der neoadjuvanten Chemotherapie einer als primär inoperabel zu wertenden hepatischen Metastasierung (Folprecht et al., 2004). Obwohl sich das Outcome der Patienten durch die Therapiemöglichkeiten in der letzten Dekade wesentlich verbessert hat, werden Patienten bei metastasiertem kolorektalem Karzinom weiter hauptsächlich einem palliativen Therapieregime zugeführt. Dies geschieht mit der Intention, den progressionsfreien Zeitraum zu verlängern, malignombedingte Symptome zu reduzieren und vor allem die Lebensqualität zu erhöhen. Anhand von Maus-Studien konnte die Abhängigkeit der Chemotherapeutika wie 5-FU von der Tumormasse dargestellt und die Differenzierung der Tumor-Charakteristika verbessert werden. Die Effektivität der Chemotherapie kann in Abhängigkeit von diesen Parametern stark vermindert sein (Van Laar et al., 1996).

Neben den Ansätzen der letztlich wenig spezifischen klassischen Chemotherapie versucht man durch bessere Kenntnisse in der Stimulation von Wachstumsprozessen und durch neue Einsichten der Zyklusregulation in Normal- und Tumorzellen, zielgerichtete Therapien, die sich spezifische Eigenschaften von Tumorzellen zu Nutze machen, zu etablieren.

Als Beispiel hierfür konnten sich in der Behandlung des Mammakarzinoms monoklonale Antikörper fest etablieren. Durch sie und somit dem therapeutischen Einbezug des patientenspezifischen Immunsystems, können deutliche Erfolge erreicht werden. Analog hierzu wird in der palliativen Zweitlinientherapie für das Kolonkarzinom der Antikörper Cetuximab mit der Zielstruktur *Epidermal growth factor receptor* (EGFR), einem vom Tumor vermehrt ausgebildeten Rezeptor für einen Wachstumsfaktor, eingesetzt. Diese Antikörperbehandlung kann für sich oder additiv mit dem Chemotherapeutikum Irinotecan angewendet werden; zum Teil kann hierdurch die Problematik der vom Tumor ausgebildeten Resistenz gegen Irinotecan durchbrochen werden. Für einen weiteren Antikörper, Bevacizumab, konnte in Verbindung mit Irinotecan und der Standardchemotherapie 5-FU/LV ein

Überlebensvorteil nachgewiesen werden (Folprecht et al., 2004; Hurwitz et al., 2004). Die Wirkung des Antikörpers wird über eine Inhibition der Tumor-Neoangiogenese nach Blockade des *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) erreicht (Tebbutt et al., 2002). Hier zeigt sich der mögliche zukünftige Stellenwert der aktiven spezifischen Immunisierung (ASI) unter anderem unter Zuhilfenahme autologer Tumorzellen. Daneben können tumorspezifische Antigene in einem weiteren immunmodulatorischen Therapieansatz herangezogen werden. Hierbei macht man sich eine Unterrepräsentation beziehungsweise das Fehlen dieser Antigene im patienteneigenen, gesunden Gewebe im Vergleich zu dem malignen Gewebe, zu Nutze. Eine klinische Studie, randomisiert bei Patienten nach operativer Versorgung eines Stadium II-Kolonkarzinoms vorgenommen, zeigte eine deutliche klinische Verbesserung unter Einsatz einer autologen Tumorzellvakzine (Hanna et al., 2001). Bedauerlicherweise blieb die Hinzunahme von *Bacillus Calmette Guerin* (BCG) als Adjuvans in einer Vakzinierungsstrategie mit bestrahlten spezifischen Tumorzellen in Bezug auf die 5-Jahresüberlebensrate bei Patienten mit kolorektalem Karzinom im Stadium II sowie III weit hinter den Erwartungen zurück (Harris et al., 2000).

1.4.1 Das Zytostatikum 5-Fluorouracil

Das Zytostatikum 5-FU ist der Gruppe der Antimetaboliten von Pyrimidin, einem heteroaromatischen Diazin, zuzuordnen. Für Uracil, einer Pyrimidin-Base, beobachtete man erstmals eine starke Aufnahme in Ratten-Hepatomzellen (Heidelberger et al., 1957; Rutman et al., 1954). Eine inhibitorische Wirkung auf das Hepatoma-Wachstum konnte für den Antimetaboliten 5-FU, der der gleichen Verstoffwechslung wie Uracil folgt, nachgewiesen werden (Diasio et al., 1989; Naguib et al., 1985). Hierauf gründete sich die weitere Entwicklung des Zytostatikums.

1.4.2 Chemische Struktur von 5-Fluorouracil (5-FU)

5-FU ist ein Nukleinbasen-Analogon; es hat Ähnlichkeit zu Uracil wie auch zu Thymin. Hierfür wurde bei Uracil ein Wasserstoffatom an Position 5 gegen Fluor ersetzt (Abb. 1) (Rudy et al., 1973).

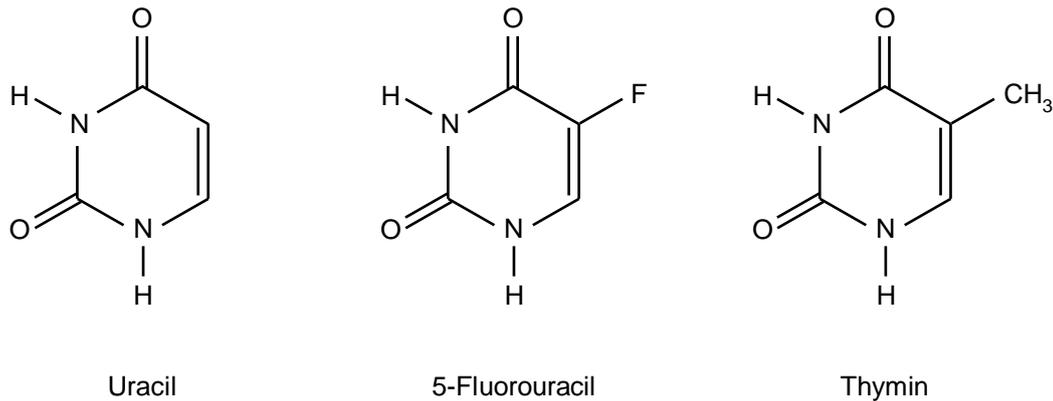


Abb. 1: Strukturformel

Durch Austausch eines Uracil-Wasserstoffatoms an Position 5 gegen ein Fluoratom ist 5-FU ein Analogon der zwei Nukleinbasen Uracil und Thymin.

1.4.3 Bioaktivierung und Wirkungsmechanismus von 5-Fluorouracil

Für die weitere Wirkungsentfaltung in der Zelle ist primär die Aufnahme von 5-FU und ein Umwandeln in die aktiven Nukleotide notwendig. (Pizzorno et al., 1997). Für eine Überführung in Fluorouridinmonophosphat (FUMP) gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten; beiden liegt die Phosphorylierung mit Ribose zugrunde. Hier beinhaltet der bevorzugte Weg den direkten Transfer von Ribosephosphat mit Hilfe der Orotatphosphoribosyltransferase. Substrat ist hierbei das Phosphoribosylpyrophosphat (Reyes, 1969). In einem zweiten Weg überträgt das Enzym Uridinphosphorylase die Ribose. Das Substrat ist hierbei Ribose-1-Phosphat. FUMP wird darauf folgend durch Phosphorylierung mit Hilfe der Uridinkinase gebildet. (Schwartz et al., 1985). Betrachtet man 5-FU kann dessen Wirkung durch drei verschiedene Bioaktivierungsmöglichkeiten erklärt werden. Ausgangspunkt hierbei ist jeweils FUMP (Abb. 2):

1. FUMP wird mittels der Nukleotidkinase durch Phosphorylierung über Fluorouridindiphosphat (FUDP) als Zwischenschritt in Fluorouridintriphosphat (FUTP) überführt. Aufgrund der gleichwertigen Substrateigenschaft im Vergleich zu dem eigentlichen Substrat Uridintriphosphat (UTP), steht es mit diesem in Konkurrenz in Hinblick auf deren RNS-Einbau durch die RNS-Polymerase. Eine Abhängigkeit von der jeweiligen Konzentration ist hierbei gegeben (Pizzorno et al., 1997). Wurde FUTP erfolgreich in die nukleare RNS eingebaut, wird die Funktion dieser mit Inhibition des Wechsels in ribosomale RNS gestört und es kann der Zelltod eintreten (Wilkinson et al., 1975).
2. In einem zweiten Weg folgt Fluorodesoxyuridinmonophosphat (FdUMP) der Reduktion durch die Ribonukleotidreduktase dem Substrat FUMP. Hierdurch

wird ein Enzym, die Thymidilatsynthetase, inhibiert. Auch hier überwiegt der Effekt in Abhängigkeit von der Konzentration gegenüber dem natürlich vorkommenden Substrat Desoxyuridinmonophosphat (dUMP) (Santi et al., 1974). Die Thymidilatsynthetase fungiert als Schlüsselenzym in der Herstellung von Desoxythymidinmonophosphat (dTMP), einem Vorläufer in der DNS-Synthese. Das Wirkprinzip beruht auf einer ternären Komplexbildung, wobei sowohl FdUMP als auch Methylentetrahydrofolat je einen Cofaktor darstellen (Lipp, 1999).

- Die Stabilität der DNS wird durch den Einbau von Fluorodesoxyuridintriphosphat (FdUTP), das Produkt nach Phosphorylierung von FdUMP, mit Hilfe der DNS-Polymerase gestört. Die Folge ist ein möglicher Zelluntergang. Dieser Effekt generiert jedoch nur eine geringere Wirkung des 5-FU, da DNS-Reparatur-Mechanismen ein Ausschleusen von FdUTP fördern.

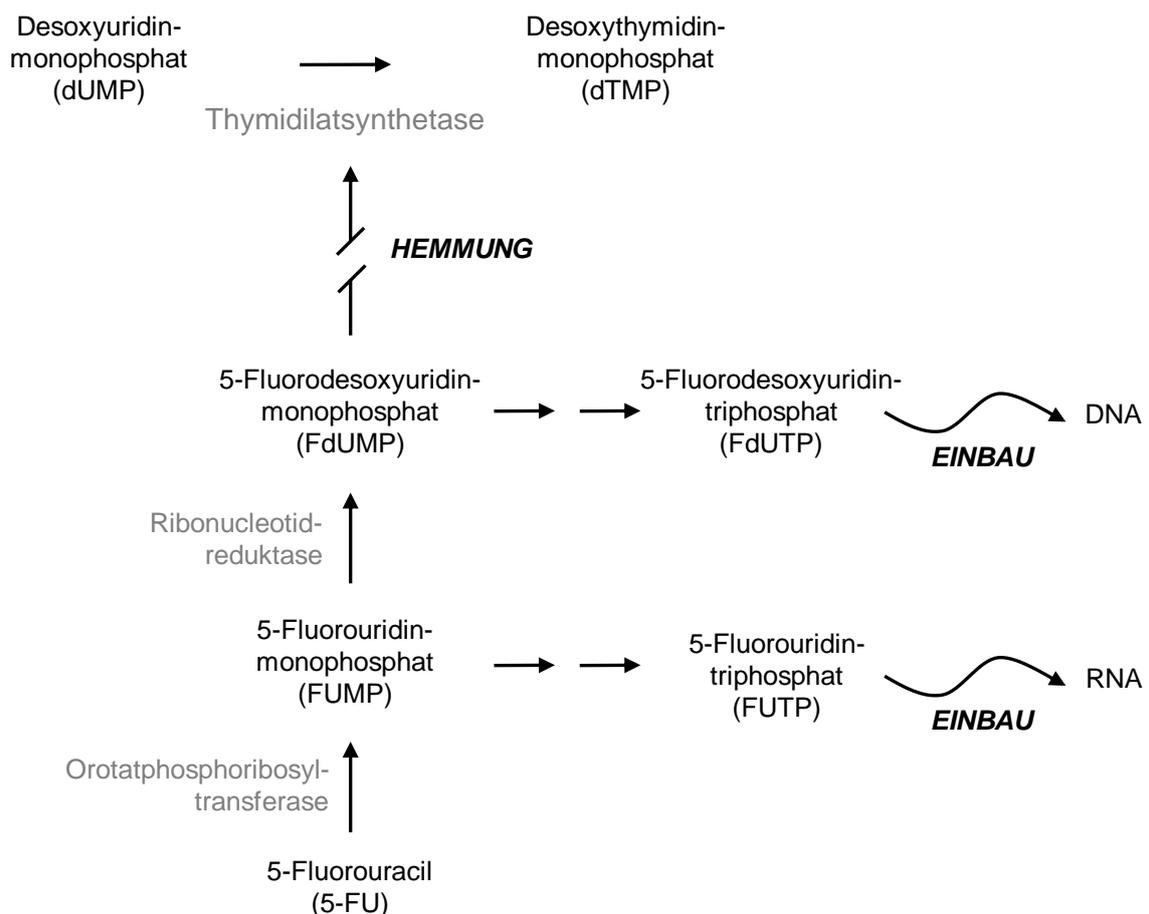


Abb. 2: Bioaktivierung und Wirkungsmechanismus von 5-Fluorouracil

5-FU wird nach Umwandlung in FdUTP und FUTP zum einen als falscher Metabolit in die RNS eingebaut, hemmt aber auch als Komplex-Cofaktor FdUMP die Thymidilatsynthetase bei der Bildung von DNA. Abgewandelt nach (Kaiser, 2003).

1.4.4 Pharmakokinetik und Elimination

5-FU hat im humanen und auch im murinen System eine Eliminationshalbwertszeit von 6 bis zu 20 Minuten (Collins et al., 1980; Peters et al., 1993). Allerdings zeigt sich eine Ausweitung der Halbwertszeit bei Nukleotiden, die intrazellulär synthetisiert wurden (Finan et al., 1987). Der Abbau von 5-FU zu α -Fluoro- β -Alanin (FBAL) und weiter zu N-Cholyl-FBAL erfolgt initial über eine Inaktivierung zu Dihydrofluorouracil (FUH2) mit Hilfe der Dihydropyrimidin-dehydrogenase (DPDH) (Abb. 3).

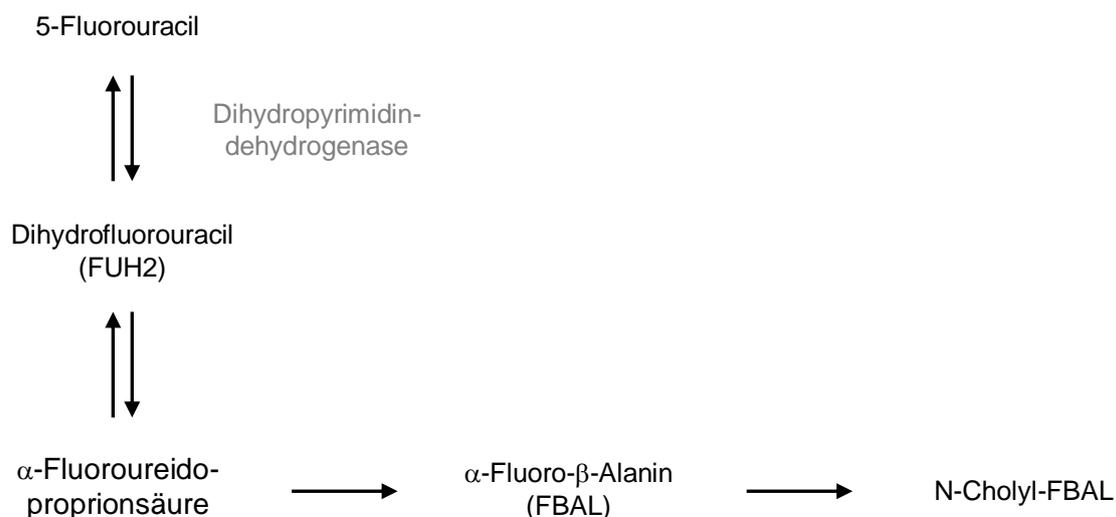


Abb. 3: Metabolische Inaktivierung von 5-Fluorouracil

Das Schlüsselenzym Dihydropyrimidin-dehydrogenase kann durch individuell schwankende konstitutive Aktivität beim Abbau von 5-FU zu einem unterschiedlichen Spitzenspiegel führen. Abgewandelt nach (Kaiser, 2003).

Hierbei haben die jeweiligen Abbauprodukte keine bedeutende pharmakologische Relevanz. Sie weisen jedoch jeweils unterschiedliche Eliminationswege bei längeren Halbwertszeiten auf. 60 bis zu 90 % einer parenteral applizierten Dosis werden innerhalb eines Tages renal eliminiert. Hier lässt sich der Metabolit FBAL im Urin nachweisen, wobei auch fast 5% in der ursprünglichen Form ausgeschieden werden. Dagegen ist die biliäre Elimination mit 2 bis 3 % sehr gering (Lipp, 1999). Hier muss allerdings die individuelle Aktivität der DPDH klinisch beachtet werden, da es eine deutliche Schwankungsbreite gibt. Trotz identischer Dosis von 5-FU kann eine relevante Differenz sowohl im Spitzenspiegel als auch in der *Area under the curve* (AUC) auftreten. Daher sollte vor Therapiebeginn die individuelle Aktivität bestimmt und im Verlauf ein therapeutisches Drug-Monitoring (TDM) vorgenommen werden. Hierdurch wird der therapeutische Bereich von 5-FU sichergestellt (Diasio et al., 1989).

1.5 Fragestellung

1.5.1 Dosisfindung des Chemotherapeutikums 5-Fluorouracil

In der vorliegenden Arbeit soll zunächst untersucht werden, ob das Standard-Chemotherapeutikum 5-FU nach einem etablierten Protokoll an der Maus eine Kombinationsmöglichkeit mit einer Vakzine darstellt. In vorhergehenden Studien konnte aufgezeigt werden, dass die Vakzine-Behandlung mit peritumorale Gabe von CpG-ODN und kontralateraler Koinjektion mit eben genannten Immunstimulans von spezifisch gepulsten und durch CpG-ODN aktivierten DCs eine wirkungsvolle Immunantwort auslösen kann (Heckelsmiller et al., 2002a). Da hierfür ein funktionierendes Immunsystem Voraussetzung ist und mit einer Immunsuppression als Nebenwirkung der Chemotherapie zu rechnen ist, soll in einem ersten Ansatz folgende Frage geklärt werden: Welche ist die im Tierexperiment günstigste Dosierung von 5-FU.

1.5.2 Effekt der Kombination aus Vakzine und Chemotherapie

Mit der oben ermittelten Dosierung von 5-FU wird der Versuch einer Kombination aus dem bereits etablierten Vakzine-Ansatz und der Chemotherapie unternommen. Dies dient zur Klärung der Frage nach der prinzipiell fortbestehenden Wirksamkeit der Vakzine bei gleichzeitiger Chemotherapie und dem Nebenwirkungspotenzial der Kombinationsbehandlung.

1.5.3 Etablierung eines orthotopen Tumormodells mit Ausbildung eines Langzeitgedächtnis durch die Vakzine.

Das aufgrund seiner guten Praktikabilität benutzte subkutane Colon-26 (C26)-Tumormodell berücksichtigt nicht das organspezifische Umgebungsmilieu in der Behandlung der Tumoren. Daher stellt sich die Frage nach der Etablierung eines orthotopen Tumormodells und der Übertragung der Vakzine-Behandlung auf dieses.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

| | |
|----------------------------------|---|
| Automatische Wippe (Desaga DE24) | Fa. Sarstedt-Gruppe (Nümbrecht, D) |
| Begasungsbrutschrank | Fa. Haereus (Hanau, D) |
| <i>Dynal-MPC®</i> | Fa. Invitrogen Dynal AS (Oslo, N) |
| Eismaschine | Fa. Ziegra (Isernhagen, D) |
| ELISA-Reader MRX | Fa. Dynatech-Labroratories (San Diego, USA) |
| FACSCalibur | Fa. Becton Dickinson (San Jose, CA, USA) |
| Falcon Cellstrainer | Fa. Becton Dickinson (San Jose, CA, USA) |
| Lamin Air (HB 244 8) | Fa. Heraeus (Hanau, D) |
| Mikroskop (Axiovert 25) | Fa. Zeiss (Jena, D) |
| pH-Meter | Fa. WTW (Weilheim, D) |
| Vortexer | Fa. Janke & Kunkel (Staufen, D) |
| Waage (SBC 21) | Fa. Scaltex Instruments (Heiligenstadt, D) |
| Zentrifuge (5417R) | Fa. Eppendorf (Hamburg, D) |
| Zentrifuge Sepatech Omnifuge | Fa. Heraeus (München, D) |

2.1.2 Medikamente

| | |
|---|-----------------------------------|
| Atipamezol (<i>Antisedan®</i>) | Fa. Pfizer (Karlsruhe, D) |
| Aqua ad injectabilia | Fa. B. Braun (Melsungen, D) |
| Buprenorphin (<i>Temgesic®</i>) | Fa. Essex Pharma (München, D) |
| Flumazenil (<i>Anexate®</i>) | Fa. Hoffmann-La Roche (Basel, CH) |
| Isofluran 1-Chlor-2,2,2-Trifluorethyl-Difluormethylether (<i>Forene®</i>) | Fa. Abbott (Wiesbaden, D) |
| Medetomidin (<i>Dormitor®</i>) | Fa. Pfizer (Karlsruhe, D) |
| Midazolam (<i>Dormicum®</i>) | Fa. Hoffmann-La Roche (Basel, CH) |
| Naloxon (<i>Naloxon-Ratiopharm®</i>) | Fa. Ratiopharm (Ulm, D) |
| Natrium-Chlorid (NaCl) 0,9 % | Baxter (Lessines, B) |

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

| | |
|---|---|
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| <i>Dynabeads</i> ® Schaf anti-Ratte IgG | Fa. Invitrogen Dynal AS (Oslo, N) |
| Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA) | Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| FACSFlow | Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D) |
| FACSSafe | Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D) |
| OrthoMune® Lyse-Reagenz | Fa. Ortho-Clinical Diagnostics (Neckarsgmünd, D) |
| Trypan-Blau | Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Trypsin-EDTA | Fa. PAA (Linz, A) |

2.1.4 Materialien für Zellkultur

Von den Firmen Becton Dickinson (Le Pont de Claix, F), Bibby Sterilin (Stone, Staffordshire, UK), Corning (Corning NY, USA), Falcon (Heidelberg, D) und Greiner (Frickhausen, D) wurden die für die Zellkultur notwendigen Plastikverbrauchsmaterialien erworben.

| | |
|---|--------------------------------------|
| <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (DMEM) | Fa. PAA (Linz, A) |
| Fötales Kälberserum (FCS) | Fa. GibcoBRL (Paisley, GB) |
| G418 Geneticin-Sulfat | Fa. GibcoBRL (Paisley, GB) |
| <i>Hank's balanced salts solution</i> (HBSS) Medium | Fa. GibcoBRL (Paisley, GB) |
| L-Glutamin | Fa. PAA (Linz, A) |
| <i>Matrigel</i> ® Basement Membran Matrix | Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D) |
| Penicillin | Fa. PAA (Linz, A) |
| <i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS) | Fa. PAA (Linz, A) |
| <i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI) 1640 Medium | FA. Biochrom AG (Berlin, D) |
| Streptomycin | Fa. PAA (Linz, A) |

2.1.5 Zytokine

| | |
|---|----------------------------|
| Muriner <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> (mGM-CSF) | Fa. Roche (Mannheim, D) |
| Murines Interleukin 4 (IL-4) | Fa. PeproTech (London, GB) |

2.1.6 Zellkulturmedien

In der Zellkultur wurden folgende Medien und Puffer in der vorliegenden Arbeit eingesetzt:

RPMI-Vollmedium:

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

Kryo-Medium:

50 Vol % DMEM-Vollmedium
40 Vol % FCS
10 Vol % DMSO

Erythrozyten-Lysepuffer:

OrthoMune® Lyse-reagenz
in PBS

DMEM-Vollmedium:

100 IU/ ml Penicillin
100 µg/ ml Streptomycin
1,5 mM L-Glutamin
10 Vol% FCS
in DMEM-Medium

TE-Puffer:

10 mM Tris-Chlorid
1 mM EDTA
ph 8,0
in Wasser

Eine Inaktivierung der Komplementfaktoren wurde durch vorherige Wärmebehandlung des verwendeten FCS bei einer Temperatur von 56°C über 30 Minuten erreicht.

2.1.7 Antikörper

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende für die Zellseparation notwendigen Antikörper eingesetzt:

| Bezeichnung | Spezifität | Klon | Herkunft |
|--------------------|------------|---------|------------------|
| Anti-CD4 (L3T4) | CD4 | H129.19 | BD/Pharmingen |
| Anti-CD8a (Ly-2) | CD8a | 53-6.7 | BD/Pharmingen |
| Anti-CD45/B220 | CD45/B220 | RA3-6B2 | BD/Pharmingen |
| Anti-Ly-6G/C (GR1) | Ly-6G/C | RB6-8C5 | BD/Pharmingen |
| Anti-MHC II | MHC II | NIMR-4 | Southern Biotech |

Tabelle 2: Für Zellseparation verwendete unkonjugierte monoklonale Antikörper.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende für die Durchflusszytometrie notwendigen Antikörper eingesetzt:

| Bezeichnung | Spezifität | Fluoreszenz | Klon | Herkunft |
|------------------|------------|-------------|--------|------------------|
| Anti-CD80 (B7-1) | CD80 | RPE | 1G10 | Southern Biotech |
| Anti-CD86 (B7-2) | CD86 | FITC | GL1 | BD/Pharmingen |
| Anti-MHC II | MHC II | APC | NIMR-4 | Southern Biotech |

Tabelle 3: Verwendete monoklonale FACS-Antikörper.

2.1.8 Oligodesoxynukleotid

Die Her- sowie Bereitstellung der Phosphorothioat-modifizierten ODN 1826-Lösungen erfolgte dankenswerterweise durch Coley Pharmaceutical Group (Wellesley, MA, USA). Hierbei wurde eine Endotoxinfreiheit gewährleistet. Für den weiteren Gebrauch

des lyophilisierten ODN wurde eine Stocklösung der Konzentration 15-20 mg/ml durch Lösung in Tris-EDTA (TE)-Puffer und anschließender steriler Filtration mit 0,2 µm Maschengröße hergestellt. Die Sicherstellung der richtigen Konzentrationen wurde durch ein mit 100 µl PBS geeichtes Photometer erreicht. Für die Absorptionsmessung musste die Konzentration ODN-Lösung bis zu 0,5 - 100 µg/ml durch Hinzugabe von PBS verdünnt sowie hiervon ein 100 µl-Volumen in eine gereinigte Messküvette überführt werden. Nach Absorption-Messung bei 260 nm konnte die Massenkonzentration und Molarität nach folgender Formel berechnet werden.

$$\frac{\text{Absorption (260 nm)} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{0,027} = \text{Konzentration } (\mu\text{g/ml})$$

$$\frac{\text{Absorption (260 nm)} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 100}{1,5 \times nA + 0,71 \times nC + 1,2 \times nG + 0,84 \times nT} = \text{Molarität } (\mu\text{M})$$

mit n_x = Anzahl der Basen vom Typ x im Oligodesoxynukleotid
(A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin)

Die Messungen wurden jeweils in Duplikaten angefertigt. Als Arbeitslösung diente eine Konzentration von 1 mg/ml; hergestellt durch entsprechende Verdünnung der Stocklösung. Die aliquotierte Arbeitslösung und die Stocklösung wurden bei -20 °C gelagert. Das subkutan (s. c.) applizierte Volumen der Arbeitslösung lag bei den *in vivo*-Anwendungen bei je 100 µl (entsprechend 100 µg ODN) pro Injektion und Versuchstier.

| Bezeichnung | Nukleotid-Sequenz |
|--------------|--|
| CpG-ODN 1826 | 5' TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT 3' |

Die Verknüpfung durch Phosphorothioate-Modifikation am 3'-Ende der Base ist durch Groß-Buchstaben dargestellt, die CpG-Dinukleotide sind jeweils fett gedruckt.

2.1.8 Chemotherapeutikum

| | |
|-------------------------------|--------------------------------|
| 5-Fluorouracil Lederle (5-FU) | Fa. Wyeth-Lederle (Münster, D) |
| <i>Leucovorin</i> ® (LV) | Fa. Wyeth-Lederle (Münster, D) |

2.1.9 Zelllinien

| Zelllinie | Zellart | Herkunft | Referenz |
|--------------------------|--------------------------------------|--|----------------------|
| Colon-26 | murine Kolon-Adenokarzinom-Zelllinie | Cell Lines Service, Heidelberg, D | (Salup et al., 1985) |
| X63AG8.653 (modifiziert) | murine Myelom-Zelllinie | Prof. T. Brocker, Institut für Immunologie, LMU München, D | k. A. |

Colon-26-Zelllinie:

Die murine Colon-26-Zelllinie, kommerziell von *Cell Lines Service* Heidelberg erworben, stellt ein *in vitro*-etabliertes Kolon-Adenokarzinom dar. Durch rektale Applikation von N-nitroso-N-methylurethan wurde es ursprünglich in Balb/c-Mäusen induziert (Chiodoni et al., 1999). *In vitro* kann sie als Monolayer kultiviert werden. Der maligne Charakter ist durch das Wachstum auf einfachem Softagar wie auch auf einer Monolayerschicht aus Fibroblasten und insbesondere durch das Bilden eines aggressiven aplastischen Karzinoms nach Zell-Injektion in thymuslose Nacktmäuse gekennzeichnet.

Modifizierte X63AG8.653-Zelllinie:

Die Zelllinie X63AG8.653 wurde für die *in-vitro*-Produktion von murinem *Granulocyte macrophage-colony stimulating factor*-haltigem Überstand eingesetzt. Die Zelllinie wurde dankenswerterweise von Prof. Thomas Brocker (Institut für Immunologie, LMU München) überlassen. Als kommerziell von *American Type Culture Collection* (ATCC) zu erwerbende Zelllinie ist sie für eine Hybridisierung einsetzbar. Sie ist als ursprüngliche murine Balb/c-Myelom-Zelllinie ohne Immunglobulin-Produktion. Die modifizierte Zelllinie hatte eine stabile Transfektion mit einem mGM-CSF-Gen sowie einem Gen für eine G418 Genitacin-Sulfat-Resistenz als Selektionsmedium.

2.2 Zellulär-immunologische Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

In der Zellkultur wurde ein Begasungsbrutschrank mit einer Luftfeuchtigkeit von 95% bei konstanter Temperatur von 37°C sowie einem Luftgemisch mit einem Kohlendioxid-Anteil von 5 % eingesetzt. Alle Arbeiten mit Zellen, sowohl *in vitro* als auch bei der

Vorbereitung der *in vivo*-Versuche, wurden in einem *Laminar-airflow*-System oder geschlossenen Systemen unter sterilen Arbeitsbedingungen vorgenommen.

2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Die Lebendzellzahl wurde mit Hilfe des Trypanblau-Ausschlusstests ermittelt. Hierbei werden avitale Zellen blau angefärbt; vitale Zellen nehmen keinen Farbstoff auf. In einer Neubauer-Zählkammer konnte so nach entsprechender Verdünnung lichtmikroskopisch durch Auszählung die jeweilige Zellzahl ermittelt werden.

2.2.1.3 Bestrahlung von Tumorzellen

Eine Bestrahlung der als Antigenquelle für die DC-Ausreifung eingesetzten Colon-26-Tumorzellpopulationen wurde jeweils in ihren Zellkulturflaschen mit einer Gesamtdosis von 100 Gray vorgenommen. Hierfür wurde eine Röntgenbestrahlungsanlage für Forschungszwecke (Institut für Immunologie, LMU München, D) eingesetzt. Hierdurch wurde das Potenzial einer weiteren Zellteilung ausgeschlossen.

2.2.1.4 Kultivierung der Colon-26-Tumorzelllinie

Die Kultivierung der Tumorzelllinie erfolgte in DMEM-Vollmedium in einem Kulturflaschenvolumen von 25 ml. Eine mikrobielle Belastung oder Zeichen des Zelluntergangs wurde durch engmaschige lichtmikroskopische Inspektion ausgeschlossen. Ein Medium-Wechsel erfolgte dem Tumorzell-Wachstum entsprechend jeden zweiten bis dritten Tag. Eine Kontamination der Zelllinie mit Mykoplasmen wurde ausgeschlossen. Ein Ernten der Zellen erfolgte durch Abpipettieren des Mediums, Überschichtung der Zellen mit Trypsin-EDTA (2 ml) und Schwenken für eine Dauer von bis zu 5 Minuten (in Abhängigkeit der Zellschicht-Dichte). Nach weitestgehendem Ablösen der Zellen vom Kulturflaschenboden erfolgte ein rasches Abstoppen der Reaktion mit gekühltem Vollmedium, sowie ein Verdünnen Zellsuspension mit 50 ml DMEM-Vollmedium. Nach anschließender Zentrifugation (20°C, 400 g, 6 Minuten) konnten die Zellen in die notwendige Verdünnung gebracht werden.

2.2.1.5 Herstellung einer Colon-26-Zell/Matrigel®-Suspension

Zur Herstellung der Colon-26-Zell/*Matrigel*®-Suspension wurde ein zusatzfreies *HANKS* Medium verwendet. Primär erfolgte ein zweimaliges Waschen der Colon-26-

Tumorzellen in den Kulturflaschen mit je 10 ml *HANKS* Medium und anschließend ein möglichst verlustfreies Lösen vom Kulturflaschenboden mittels Zellschaber in 5 ml *HANKS* Medium. Die jeweils folgenden Arbeitsschritte wurden für den Vitalitätserhalt unter Einsatz von *Matrigel*[®] mit vorgekühlten Materialien auf Eis durchgeführt. Nach Zellzählung und Sicherstellung einer Vitalität der Zellen von über 95 % durch Trypanblaufärbung wurde eine Konzentration von 1 Millionen Zellen pro ml hergestellt und hiervon jeweils 200 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach Abzentrifugation (350 g, 5 Minuten) und Abnahme des Überstandes erfolgte bei 4°C ein Resuspendieren der Zellen in 50 µl *Matrigel*[®] *Basement Membran Matrix*.

Matrigel[®] *Basement Membran Matrix* ist eine Basalmembran-Präparation aus einer murinen Sarkom-Zelllinie mit den Hauptkomponenten Kollagen VI, Heparan-Sulfat, Proteoglykan, Entaktin, Nidogen sowie verschiedenen Zytokinen wie TGF-β, *Fibroblast growth factor*, *Tissue plasminogen activator* und weiteren natürlich in oben genannten Tumorzellen vorkommenden Molekülen. Die bei 4°C in flüssigem Zustand befindliche Lösung polymerisiert bei Raumtemperatur innerhalb einer Minute zu einem biologisch aktiven basalmembranartigen Matrix-Material.

Die einzelne C26-Zell/*Matrigel*[®]-Suspension wurde anschließend verlust- und blasenfrei in jeweils eine 0,5 ml *Micro-Fine*[™] +U40 *Insulinspritze* eingefüllt und bis zur zeitnahen Applikation auf Eis gelagert.

2.2.1.6 Kultivierung der modifizierten X63AG8.653-Zelllinie

Die Kultur der X63AG8.653-Zelllinie (modifiziert nach Prof. Brocker, Institut für Immunologie, LMU München) erfolgte in DMEM-Vollmedium ohne die Selektionssubstanz G418 Genticin-Sulfat. Der Überstand wurde von den X63AG8.653-Zellen durch Abzentrifugieren dieser gewonnen, sobald eine deutlichere Gelbfärbung des Mediums ein entsprechendes Zellwachstum und somit auch mGM-CSF-Produktion anzeigte. Mittels *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) wurde die mGM-CSF-Konzentration darin bestimmt und ebenso mit der biologische Aktivität *in vitro* korreliert. Hierbei zeigte eine *Fluorescence-activated cell sorter* (FACS)-Analyse eine hochregulierte MHC-II-Expression auf aus dem Knochenmark generierten DCs. Hierfür wurden Konzentrationen von 2,5 %, 5 %, 10 % und 20 % des mGM-CSF-haltigen Überstandes getestet. Die Aufbewahrung des aliquotierten Überstandes erfolgte bei -20°C. Die Lagerung der X63AG8.653-Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff mit Einsatz eines Kryo-Mediums. Bei der erneuten Anzucht wurde zunächst G418 Genticin-Sulfat als Selektionsmedium in einer Dosierung von 1 mg/ml beigegeben. Die weitere Kultur erfolgte dann ohne G418 Genticin-Sulfat, um eine Kontamination des Überstandes

durch G418 Genitocin-Sulfat auszuschließen. Eine erneute Konzentrationsbestimmung von mGM-CSF und erneute Austestung der biologischen Aktivität war für jeden Produktions-Ansatz des Zytokines notwendig.

2.2.1.7 Kultivierung muriner dendritischer Zellen aus dem Knochenmark

Die unreifen DCs wurden in RPMI-Vollmedium über eine Dauer von 6 Tagen kultiviert. Dem RPMI-Vollmedium wurde zur Entdifferenzierung der DC-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark mGM-CSF sowie IL-4 in einer Konzentration von 200 U/ml und 20 ng/ml zugegeben. Das mGM-CSF wurde initial kommerziell von Roche Mannheim bezogen. In späteren Experimenten wurde es in Form von Überstand der X63AG8.653-Zelllinien-Kultur, der das Zytokin in entsprechender Konzentration und biologischer Aktivität enthielt, beigegeben. Ein Mediumwechsel inklusive der Zytokine wurde jeden 2. Tag durchgeführt.

2.2.1.8 Reifeinduktion und Antigen-Beladung dendritischer Zellen

Das Zytokin-Milieu, bestehend aus IL-4 und mGM-CSF, entdifferenzierte die myeloiden DC-Vorläuferzellen innerhalb von 6 Tagen zu unreifen DCs in Bezug auf eine effiziente Antigenpräsentation und die volle kostimulatorische Kapazität. An Tag 7 wurden der Kultur bestrahlte und dadurch teilungsunfähige C26-Tumorzellen im Verhältnis 1 : 5 (DC : Tumorzelle) als Quelle für das benötigte Antigen beigegeben und sie wurde für weitere 12 Stunden kultiviert. Zur endgültigen Ausreifung und Aktivierung der mit C26-Tumorzellen kokultivierten DCs über zusätzlich 24 Stunden wurde das ODN 1826 in der Konzentration 6 µg/ml zugefügt. Hierdurch konnte eine deutliche Expression der Aktivierungsmarker CD 80 und CD 86 und des Reifemarkers MHC II erreicht werden. Dies wurde für jeden Kultivierungs-Ansatz anhand FACS-Messungen verifiziert.

2.2.2 Zellisolation

2.2.2.1 Präparation muriner Knochenmarkszellen

Das Generierungsprotokoll für murine myeloide DCs wurde in geringer Abwandlung wie in der Literatur beschrieben eingesetzt (Inaba et al., 1992). Eine feminine Balb/c Maus im Alter zwischen 6 und 8 Wochen wurde in *Forene*®-Inhalationsnarkose (Isofluran, 1-Chlor-2,2,2-Trifluorethyl-Difluormethylether) und somit leidensfrei mittels Exartikulation im Bereich der Halswirbelsäule euthanasiert. Es folgte für die Präparation der langen Röhrenknochen Tibia und Femur eine Fixierung der Maus und

mehrfache Desinfektion der kompletten unteren Körperhälfte mit Ethanol. Nach Entfernen von Fell, Cutis und Muskulatur durch sterile Einmal-Skalpelle und Scheren konnte jeder unversehrte und somit nicht kontaminierte Knochen in eine Kulturschale mit Vollmedium unter sterilen Bedingungen eines *Laminar-airflow*-Systems überführt werden. Die anschließenden Schritte fanden jeweils gekühlt auf Eis statt. Einem mechanischen Nachreinigen folgte ein kurzes Eintauchen der unversehrten Knochen in Ethanol. Nach Überführen in frisches Vollmedium wurde zunächst beidseitig knapp subepiphysär der Knochen eröffnet und mittels Einführen einer Injektionskanüle (25 G) die Knochenmarkszellen mit fraktioniert 10 ml frischem Vollmedium in ein neues steriles Tube (50 ml) durch ein Nylonsieb (Maschengröße 70 μm) ausgespült. Ein Nachspülen des Nylonsiebes mit 10 ml Vollmedium verminderte den Zellverlust. Nach anschließender Zentrifugation (400 g für 5 Minuten bei 4°C) und Abnehmen des Überstandes folgte die Lyse der Erythrozyten. Hierfür wurden die in 20 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendierten Zellen für 10 Minuten inkubiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation (350 g für 5 Minuten bei 4°C) und das vorsichtige Wiederaufnehmen der Zellen in frisches Vollmedium (2 ml). Durch Zellzählung und Vitalitätsprüfung in einer 1:100-Verdünnung konnte für die weitere Verwendung der Zellsuspensionen eine Zellviabilität von mindestens 95% sichergestellt werden.

2.2.2.2 Anreicherung dendritischer Vorläuferzellen mittels biomagnetischer Depletion

Für die Gewinnung von unreifen dendritischen Vorläuferzellen wurde die Methode der magnetischen Depletion an der Knochenmark-Zellsuspension angewandt. Hierfür wurden in summa 6 $\mu\text{l}/10^6$ Ziel-Zellen Ratte-anti-Maus-Antikörper, zusammengesetzt aus 40 % anti-CD45R, 30 % anti-Ly6G, sowie 10 % anti-MHC-II, 10 % anti-CD4 und 10 % anti-CD8, diese jeweils unkonjugiert, für die Markierung von B-Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten sowie T-Lymphozyten verwendet. Nach einer Inkubationsphase von 30 Minuten (wieder auf Eis vorgenommen), sowie einem anschließenden Waschgang wurden den so markierten Zellen ≥ 4 magnetische Ziege-anti-Ratte *Dynabeads*® je Zelle beigefügt: Diese *Dynabeads*® sind uniforme, 4,5 μm messende Polymer-Kügelchen mit eingebettetem magnetischem Material (Fe^2O^3 , Fe^3O^4). Die Depletion der nochmals unter kontinuierlichem Schwenken für 30 Minuten bei 6 °C inkubierten Zellen konnte durch den Einsatz des Zellseparator *Dynal-MPC*® aufgrund seines starken Magnetfeldes erreicht werden. Die ungebundenen Zellen können hierbei leicht in Suspension abpipettiert werden, da die mit Selektions-Antikörpern und magnetischen Partikeln behafteten Zellen der Magneten-zugewandten Wand des in den *Dynal-MPC*® eingeführten Arbeitsgefäßes anheften. Nach Überführen der unmarkierten Zellfraktion in ein anderes Arbeits-Röhrchen mit neuem

Vollmedium wurden diese Arbeitsschritte der Depletionen drei weitere Male durchgeführt, bis keine aufgrund des Fe-Anteils makroskopisch gut sichtbaren Magnetpartikel mehr auffindbar waren. Die Ausbeute der somit gewonnenen DC-Vorläuferzellen aus der initial eingesetzten Zellsuspension ließ sich nach Zellzählung mit ungefähr 20 bis 25 % beziffern. Zur weiteren Kultivierung wurden diese in eine mittelgroße Kulturflasche zu jeweils 5 Millionen Zellen mit 25 ml RPMI-Vollmedium und Differenzierungs-Zytokinen (mGM-CSF und IL-4) überführt.

2.3 Tierversuche

2.3.1 Mäuse und Haltungsbedingungen

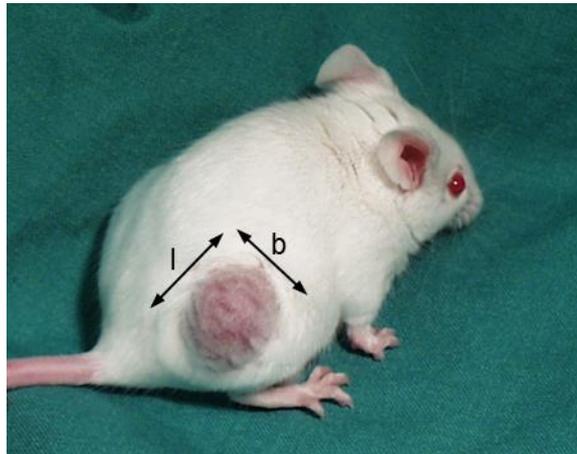
In der vorliegenden Arbeit wurden die vorgenommenen Versuche an Balb/c Mäusen, einer bekannten Inzuchtlinie mit ausgeprägter T_H2 -Immunantwort und einer durchschnittlichen Lebenserwartung von 575 Tagen unter konventionellen Haltungsbedingungen (Storer, 1966), durchgeführt. Der kommerzielle Bezug der Versuchstiere erfolgte im Alter zwischen 6 und 8 Wochen und einem durchschnittlichem Körpergewicht von 18 bis 20 g über die Firma Harlan Winkelmann, Borcheln. Eine Akklimatisierung der Versuchstiere von einer Woche an die jeweiligen Umgebungsbedingungen wurde eingehalten. Für die Haltung konnte der Tierstall, geführt von der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der Ludwig-Maximilians-Universität München, Campus Innenstadt, Ziemssenstraße, benutzt werden. Dieser entsprach den entsprechenden hygienischen Anforderungen und war nicht frei zugänglich. Die Tierpflege inklusive Versorgung mit Futter in Pelletform und frei zugänglichem Wasser wurde durch ein tierpflegerisch ausgebildetes Personal sichergestellt. Eine maximale Versuchstieranzahl pro Käfig wurde in der Regel mit 6 Stück eingehalten und ein Hell/Dunkel-Wechsel von 12 Stunden für die Simulation eines Tagesverlaufes automatisch geregelt. Die Versuche wurden soweit möglich in Hell-Phasen durchgeführt. Die Versuchstiere wurden durch Exartikulation der Halswirbelsäule unter Inhalationsnarkose bei Erreichen des jeweiligen Versuchsendpunktes oder Abbruchkriterien getötet. Bei Langzeitversuchen oder Überleben des Tieres wurden diese spätestens 12 Monate nach Versuchsbeginn im Alter von circa 14 Monaten euthanasiert. Die Beantragung der Tierversuchsvorhaben erfolgte schriftlich entsprechend dem Tierschutzgesetz der Bundesrepublik Deutschland (BGB1 1986), §8 Absatz 1, an die Regierung von Oberbayern, die Genehmigung wurde erteilt.

2.3.2 Tumormodelle

2.3.2.1 Subkutanes Tumormodell

Jeder Maus wurden zur Induktion der Colon-26-Tumore 2×10^5 Tumorzellen subkutan in die Flankenregion injiziert. Dies geschah unter *Forene*®-Inhalationsnarkose mittels Applikation eines 200 µl-Volumen der vitalen Tumorzell-Suspension. Hierdurch konnte eine ausreichend analgetische und auch muskelrelaxierende Wirkung erreicht werden, so dass Stress oder Leiden der Versuchstiere vermieden und eine Verletzungsgefahr minimiert wurde. Durch den raschen Wirkungsverlust nach Inhalationsende war eine Antagonisierung der Isofluran®-Narkose nicht notwendig. Für die Herstellung der

Tumorzellsuspension wurden *in vitro* wachsende Tumorzellen der Linie Colon-26 verwendet. Nachdem die noch nicht lückenlos wachsenden Tumorzellen in der Kulturflasche zweimalig mit *HANKS* Medium zum Entfernen von avitalen Zellen gewaschen und durch ein vorsichtiges Lösen der Zellen mittels Zellschaber mobilisiert wurden, folgte eine 7 minütige Zentrifugation der Zellsuspension bei 350 g. In frisches zusatzfreies *HANKS* Medium überführt, wurden die so gewonnenen Tumorzellen auf Eis resuspendiert. Um etwaige verfälschende Immunreaktionen in den Tierversuchen durch immunmodulierende Substanzen des Vollmediums zu vermeiden, wurde nicht supplementiertes *HANKS* Medium eingesetzt. Durch die Vitalitätsprüfung mit Trypanblau während der Zellzählung konnte eine durchschnittliche Vitalität von über 95 % für die zur Tumorinduktion verwendete Zellsuspension sichergestellt werden. Die Größenmessung der Tumore erfolgte dreimal wöchentlich mittels Schubleere als Flächenmaß (maximale Tumurlänge x maximale Tumorbreite, jeweils in mm) (Abb. 4). Bei dem verwendeten Tumormodell war eine Tiefenmessung aufgrund der Größenveränderung im Therapieverlauf oft nicht möglich. Somit wurde hierauf zur Vermeidung einer inadäquaten Belastung der Versuchstiere bewusst verzichtet.



S. Beck, Abteilung für Klinische Pharmakologie, 2002

Abb. 4: Subkutan induzierter Colon-26-Tumor

Nach subkutaner Injektion von 2×10^5 vitaler Tumorzellen in die Flanke von Balbc Mäusen wuchs der Tumor in den meisten Fällen einzeln solide, in Einzelfällen als paariger Tumor. Die Größe wurde als Fläche mit Länge (l) x Breite (b) regelmäßig gemessen.

Endpunkte für jeden Versuch stellten sowohl das Erreichen oder Überschreiten eines entsprechenden Flächenmaßes des Tumors von 400 mm^2 , wie auch eine Gewichtsreduktion der Versuchstiere auf unter 18 g Körpergewicht, dar. Als weitere

Abbruchkriterien wurden Verhaltensauffälligkeiten der Mäuse, Tumorulzerationen oder offensichtliches Leiden definiert.

2.3.2.2 Orthotopes Tumormodell

Für die Tumor-Induktion im orthotopen Tumormodell wurden die C26-Zellen in einer oben beschriebenen *Matrigel*[®]-Suspension appliziert, um die intraperitoneale Aussaat der Tumorzellen zu verhindern. Abgeändert nach Wilmanns et al. (Wilmanns et al., 1992) wurde 13 bis 24 Wochen alten Balb/c Mäusen nach chirurgischer Eröffnung der Bauchhöhle mittels Einmalskalpell und steriler Schere und anschließender extrakorporaler Darstellung des Zökums jeweils 2×10^5 C26-Zellen in 50 μ l *Matrigel*[®]-Suspension (wie oben beschrieben) intramural in das Zökum injiziert. Der chirurgische Zugang für die Inokulation erfolgte bei den Mäusen unter strengen sterilen Bedingungen in einer intraperitoneal applizierten Narkose bestehend aus 0,5 mg/kg Körpergewicht (KG) Medetomidin (*Dormitor*[®]), 5,0 mg/kg KG Midazolam (*Dormicum*[®]) und 0,05 mg/kg KG *Fentanyl*. Zur Antagonisierung der Narkose waren 2,5 mg/kg KG Atipamezol (*Antisedan*[®]), 0,5 mg/kg KG Flumazenil (*Anexate*[®]) und 1,2 mg/kg KG *Naloxon-Ratiopharm* vorgesehen. Eine Beatmung der Mäuse musste aufgrund der gewählten Narkose nicht vorgenommen werden. Während des gesamten Operationszeitraumes und der Aufwachphase der Versuchstiere wurde die Körpertemperatur mittels Heizdecke konstant gehalten.

Nach Vorbereiten der sterilen Operationsbedingungen und gesichertem vollem Wirkungseintritt der Narkose wurde die mediane Laparotomie durch eine etwa 1,5 cm lange Inzision entlang der Mittellinie schichtweise (Bauchdecke und Peritoneum) vorgenommen. Das Zökum wurde nach extrakorporal mobilisiert und die Injektion der C26-Zell/*Matrigel*[®]-Suspension durchgeführt, wobei ein intraperitonealer Austritt durch Polymerisierung des *Matrigel*[®] verhindert wurde. Nach dem Zurückverlegen des Zökums in die Bauchhöhle wurden Peritoneum und Bauchhaut getrennt mit 7/0 multifilem resorbierbarem Nahtmaterial verschlossen und die Wunde zum Schutz mit geeignetem Verbandsmaterial verklebt. Für die Analgesie der Maus in der postoperativen Phase wurde 0,05 - 0,1 mg/kg KG Buprenorphin (*Temgesic*[®]) subkutan verabreicht. Die Operationszeit war mit 20 Minuten angesetzt, die Narkosezeit betrug etwa 45 Minuten und war zu jedem Zeitpunkt antagonisierbar.

2.4 Analyse-Verfahren

2.4.1 Phasenkontrastmikroskopie

Der *in-vitro*-Kulturverlauf wurde täglich mit dem Verfahren der Phasenkontrastmikroskopie kontrolliert, wobei die Morphologie der jeweiligen Zellen bei 10- bis 100-facher Vergrößerung beurteilt und auf Zelluntergang, mikrobiellen Befall oder sonstige Verunreinigungen überprüft wurde.

2.4.2 Enzyme-linked immunosorbent assay

Der Zytokinnachweis in den Überständen der X63AG8.653-Kultur zur Herstellung von mGM-CSF wurde anhand eines ELISA entsprechend der Hersteller-Anleitung durchgeführt. Die Bestimmung des Gesamt-mGM-CSF erfolgte unter Zuhilfenahme eines ELISA-Kits zur Selbst-Beschichtung. Das Untersuchungsprinzip beruht auf einer spezifischen Antikörper-Bindung des Ziel-Zytokines; in der vorliegenden Arbeit mGM-CSF im Kulturmedium-Überstand. Die Vertiefungen einer 96-well-Elisa-Platte wurden hierfür mit dem entsprechenden Antikörper über Nacht beschichtet und am Folgetag mit einem Reagenz (FCS) zum Blockieren von unspezifischen Bindungen behandelt. Danach konnte eine Standardreihe mit definierter Menge an Protein sowie der zu analysierende Medium-Überstand in einer Verdünnungsreihe einpipettiert werden. Das ungebundene Zytokin wurde mittels Waschen eliminiert. Das gebundene Zytokin wurde markiert, indem ein mit einem anderen Epitop reagierender, Biotin-gekoppelter Antikörper hinzugegeben wurde. In einem nächsten Schritt folgte die Inkubation der zu testenden Proben mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase. Hierbei entsteht eine starke Bindung der Streptavidin- und Biotin-Moleküle. Ein weiterer zugegebener Farbstoff kann durch die Meerrettichperoxidase in einer zu quantifizierenden Reaktion katalysiert werden. Diese Reaktion ist proportional abhängig zur Menge des Ziel-Zytokines und wird mit Phosphorsäure abgestoppt. In einem ELISA-Reader wird nun die Absorption durch den umgesetzten Farbstoff bei 450 nm Wellenlänge entsprechend der Herstellerangaben gemessen und im Verhältnis zu der Standardreihe ausgewertet.

2.4.3 Durchflusszytometrie

2.4.3.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Mittels FACS-Durchflusszytometrie können Zellen anhand ihres Phänotypus differenziert und somit auch ihre Anzahl ermittelt werden. Um dies zu ermöglichen, werden die charakterisierenden Oberflächenantigene der Ziel-Zellen mit spezifischen

Antikörpern, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, markiert. Durch einzelnes Vorbeiführen dieser markierten Zellen in einem laminar strömenden Flüssigkeitsstrahl erzeugt eine zwischengeschaltete Laserstrahleinheit mit spezifischer Wellenlänge eine Streuung des Lichtes anhand Form, Größe, Oberflächenbeschaffenheit und intrazellulärer Granularität. Diese Lichtstreuung kann durch zwei Linsen, eine in Richtung des Laserstrahls für das Vorwärtsstreulicht, eine zweite im rechten Winkel hierzu angeordnet für das Seitwärtsstreulicht, gebündelt und photometrisch gemessen werden. Im Untersuchungsablauf erfolgen eine primäre Einordnung der zu untersuchenden Zellpopulation anhand der Zellgröße (Vorwärtsstreulicht) und intrazelluläre granuläre Bestandteile (Seitwärtsstreulicht). Danach kann der Fluoreszenzcharakter entsprechend der Antikörpermarkierung untersucht werden. Je nach verwendetem Gerät können zwei oder mehr differente Laserstrahle mit unterschiedlicher Wellenlänge das entsprechende Chromophor der spezifischen Antikörper zur Abgabe von Lichtquanten anregen. Diese, gebündelt von weiteren Linsen, werden nach Wellenlängen gefiltert und aufgetrennt sowie zur Detektion weitergeleitet. Sie ermöglichen letztlich eine quantitative Analyse mehrerer gleichzeitig verwendeter Fluoreszenzfarbstoffe. Die detektierte Fluoreszenzstärke ist hierbei direkt proportional zur Menge der jeweiligen zellgebundenen Antikörper und entspricht somit den gesuchten Oberflächenstrukturen.

Die Markierung von Oberflächenmolekülen kann in verschiedener Art und Weise erfolgen. Zum einen durch das Verfahren der direkten Immunfluoreszenz. Zum anderen durch die indirekte Immunfluoreszenz. Bei der direkten Immunfluoreszenz binden Fluorochrom-gekoppelte Antikörper direkt an die Zielstruktur der Zelloberfläche. Bei der indirekten Immunfluoreszenz stellt die Bindung von unmarkierten Antikörpern an die gesuchten Oberflächenmoleküle einen Zwischenschritt in der Fluorochrom-Markierung dar. Im Anschluss bindet ein zweiter Fluorochrom-gelabelter Antikörper an den Fc-Teil des primären Antikörpers.

2.4.3.2 Nachweis von Oberflächenmolekülen

Für die Detektion und somit Charakterisierung der zu untersuchenden Zelltypen wurden diese mit den Fluoreszenz-gekoppelten spezifischen Antikörpern, gerichtet gegen die entsprechenden Oberflächenmoleküle, nach der direkten Immunfluoreszenz-Methode inkubiert. Hierfür wurden in 100 µl PBS, dem 5 % FCS beigegeben wurden, in einem FACS-Analyseröhrchen die Ziel-Zellen mit einer Anzahl von circa 100.000 pro Ansatz auf Eis suspendiert. Um eine unspezifische Hintergrundfluoreszenz zu vermindern, wurde 10 % Rattenserum beigelegt und für 30 Minuten bei 4°C mit

entsprechend den Zielmolekülen ausgewählten Farbstoff-markierten Antikörpern (FITC-, RPE-, oder APC-gekoppelt, je 5 µl/Tube) in Dunkelheit inkubiert (Tabelle 4). Nach einem Wasch-Schritt (Zugabe von 3 ml PBS, anschließende Zentrifugation für 7 min bei 400 g bei 4°C), dieser entfernt nicht-gebundene Antikörper, wurde der zellfreie Überstand sofort abgenommen. Die Zellen wurden danach in circa 200 µl PBS resuspendiert und ohne größere Verzögerung die Zell-Fluoreszenzintensität in der anschließenden FACS-Messung aufgenommen (*FACSCalibur*) sowie diese im Weiteren unter Verwendung des Programmes *Cell Quest* ausgewertet.

| Fluoreszenzfarbstoff | Exzitation | Emission |
|------------------------------|------------|----------|
| Fluorescein-Isocyanat (FITC) | 494 nm | 518 nm |
| R-Phycoerithrin (RPE) | 565 nm | 578 nm |
| Allophycocyanin (APC) | 650 nm | 660 nm |

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Fluoreszenzfarbstoffe mit den jeweiligen maximalen Exzitations- sowie Emissions-Wellenlängen.

2.4.4 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind jeweils als arithmetisches Mittel angegeben. Die jeweilige statistische Signifikanz, angenommen ab einem p-Wert < 0,05, wurde zum Zeitpunkt des Todes eines ersten Versuchstieres bzw. Erreichen eines definierten Abbruchkriteriums mittels des zweiseitigen Student-t-Tests für unabhängige Stichproben parametrischer Verteilungen ermittelt. Sie ist durch Kennzeichnung mittels einem oder zwei * (je nach Höhe der Signifikanz) oder durch direkte Angabe des jeweiligen p-Wertes angezeigt. Für die rechnerische Analyse inklusive Berechnung der statistischen Signifikanz und die weitere grafische Aufarbeitung der Daten wurden die Programme Microsoft *Excel* sowie Microsoft *PowerPoint* (Microsoft Cooperation, CA, USA) verwendet. Die Auswertung der Signifikanz der Kaplan-Meier-Überlebenskurven erfolgte mit dem Log Rank-Test unter Zuhilfenahme des Programms *SPSS* (SPSS Inc., IL, USA).

3. Ergebnisse

3.1 Chemotherapie mit 5-Fluorouracil im murinen Colon-26-Tumormodell

3.1.1 Wirksamkeit verschiedener Dosierungen von 5-Fluorouracil und Dosisoptimierung

Die alleinige Gabe von 5-FU war lange Zeit der Gold-Standard in der Therapie des fortgeschrittenen kolorektalen Karzinoms. Hiermit konnten jedoch nur geringe Remissionsraten zwischen 10% und 20% erzielt werden. Eine Steigerung dieser Rate auf über 20% konnte durch die Hinzunahme von Folinsäure zu einer Kombinationstherapie mit 5-FU erreicht werden, die zugrunde liegende Modulation der 5-FU-Wirkung begründet sich hierbei auf die gesteigerte Hemmung der DNS-Synthese. Eine Überlebensverlängerung konnte leider nicht in allen Studien gezeigt werden; dennoch gilt 5-Fluorouracil/Folinsäure in verschiedenen Modifikationen als therapeutischer Standard, vor allem aufgrund des klinischen Benefits wie einer Verbesserung des Allgemeinzustandes, Schmerzlinderung, Symptomkontrolle sowie auch oftmals einer Gewichtszunahme.

Im hier eingesetzten murinen Modell der Tumorzelllinie C26 wurde der Tumor subkutan in der rechten Flanke induziert. Die Messung der Tumorgröße sowie die Gewichtsbestimmung erfolgten ab Tag 16 nach Tumorinduktion drei Mal pro Woche. Alle Mäuse der untherapierten Kontrollgruppe verstarben zwischen Tag 33 und Tag 37 nach Tumorinduktion (Abb. 5 A). Der Tumor wuchs innerhalb von drei Wochen auf eine durchschnittliche Größe von 150 mm² an. Hierdurch zeigt sich das aggressive Wachstum der hier eingesetzten Zelllinie.

In wöchentlichem Abstand wurden insgesamt drei intraperitoneale Applikationen von 5-Fluorouracil/Folinsäure in vier verschiedenen Dosierungen verabreicht. Damit sollte in der ersten Versuchsreihe eine Dosisfindung erfolgen, um im weiteren eine optimale Kombination mit der in Vorarbeiten meiner Kollegen etablierten Immuntherapie (Heckelsmiller et al., 2002a) zu ermöglichen. Hierbei sollte eine Dosierung der Chemotherapie gefunden werden, die neben einer antitumoralen Wirksamkeit das geringste Nebenwirkungsprofil aufweist. Bei einer Tumorgröße von im Mittel 65 mm² an Tag 16 nach Tumorinduktion wurde eine 5-Fluorouracil-Dosierung von 100, 50, 25 sowie 12,5 mg/kg KG mit einer jeweils festen Folinsäure-Dosierung von 100 mg/kg KG injiziert. Mit der Einschränkung, dass wegen der geringen Gruppenstärke (n=4) die Kaplan-Meier-Schätzung keine statistische Aussagekraft hat, deutet sich eine

Verbesserung der Überlebenswahrscheinlichkeit der Hochdosis-Gruppe mit 100 mg/kg 5-FU gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe und den Niedrigdosis-Gruppen mit 25 und 12,5 mg/kg 5-FU an. Ein hervorzuhebender Unterschied der Hochdosis-Gruppe zur Gruppe mit 50 mg/kg 5-FU blieb aus. Diese mittlere Dosierung erbrachte ebenfalls wie 25 und 12,5 mg/kg 5-FU keine Verbesserung der Überlebenswahrscheinlichkeit gegenüber der unbehandelten Gruppe oder dieser Gruppen untereinander. Eine komplette Remission wurde lediglich bei einer von vier Mäusen in der Hochdosis-Gruppe beobachtet, in den übrigen Dosierungsgruppen verstarben alle Mäuse zwischen 30 und 49 Tagen an den Folgen des Tumorleidens.

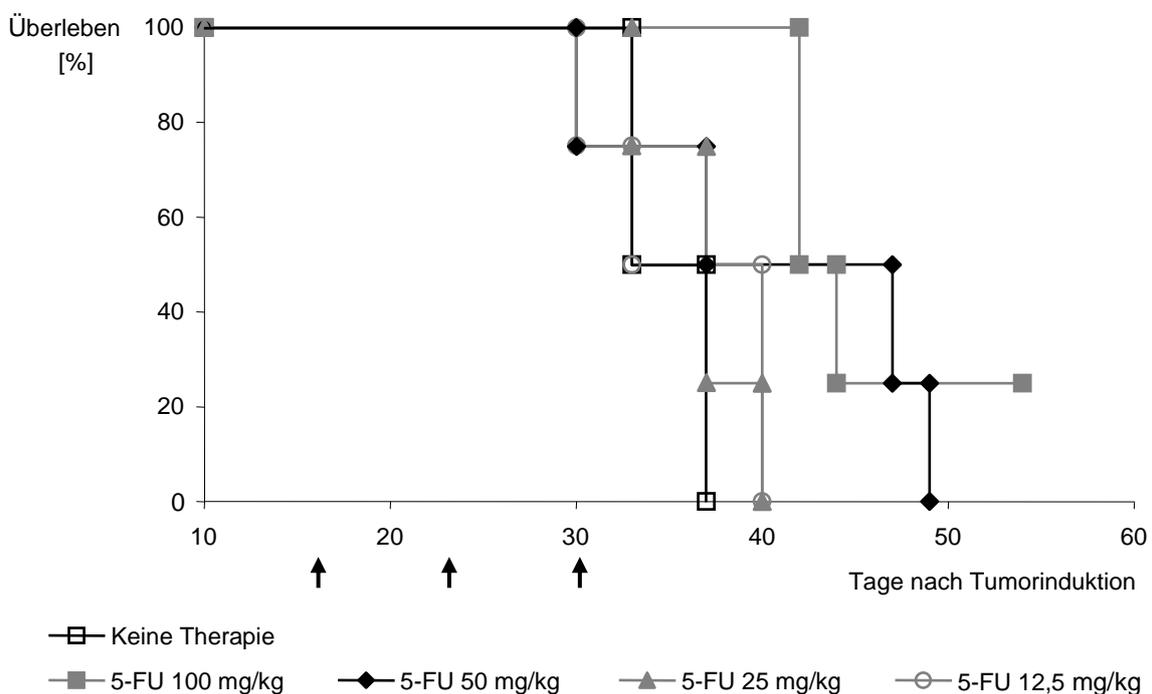


Abb. 5 A: Chemotherapie mit 5-Fluorouracil/Folinsäure im murinen Colon-26-Tumormodel; Überlebensvorteil durch Hochdosis-Chemotherapie.

Die Mäuse erhielten bei einer mittleren Tumorgröße von 65 mm² eine intraperitoneal applizierte Chemotherapie mit der Kombination aus 5-Fluorouracil in verschiedenen Dosierungen und insgesamt jeweils 100 mg/kg Körpergewicht Folinsäure an den mit Pfeilen (↑) gekennzeichneten Tagen 16, 23, und 30 nach Tumorinduktion bzw. blieben als Kontrolle unbehandelt. Die Gruppenstärke betrug jeweils n=4. Mäuse mit einem Überleben bis Tag 50 lebten bis nach Studienende an Tag 100. Aufgezeichnet ist hier die Kaplan-Meier-Kurve der jeweiligen Gruppe.

Betrachtet man die Entwicklung der Tumorgröße unter dem Therapieprotokoll mit 5-Fluorouracil/Folinsäure in den verschiedenen Dosierungen, so lässt sich bei den Dosierungen von 100, 50 und 25 mg/kg 5-FU eine vorübergehende Verlangsamung und ein temporärer Stillstand des Tumorwachstums in den ersten Tagen nach der

jeweiligen Therapie-Applikation erreichen. Gegen Ende des Therapie-freien Intervalls von einer Woche entspricht das Tumorwachstum dem der unbehandelten Kontroll-Gruppe. Dieser Effekt ist bei der ersten Therapie-Applikation am ausgeprägtesten und kann in den Niedrigdosis-Gruppen mit 12,5 mg/kg und 25 mg/kg 5-FU nicht beobachtet werden (Abb. 5 B). Die temporäre Reduktion der Tumorprogression zeigt jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungs-Gruppen bezogen auf die Tumorgöße an Tag 30 mit dem Tod einer ersten Maus. Somit erscheint neben 100 mg/kg 5-FU mit verlängerter Überlebenswahrscheinlichkeit die Dosis von 12,5 und 25 mg/kg 5-FU als niedrigste Dosis mit beobachtetem temporären Effekt auf das Tumorwachstum als eine Möglichkeit der kombinierten Anwendung mit dem etablierten Immuntherapie-Schema.

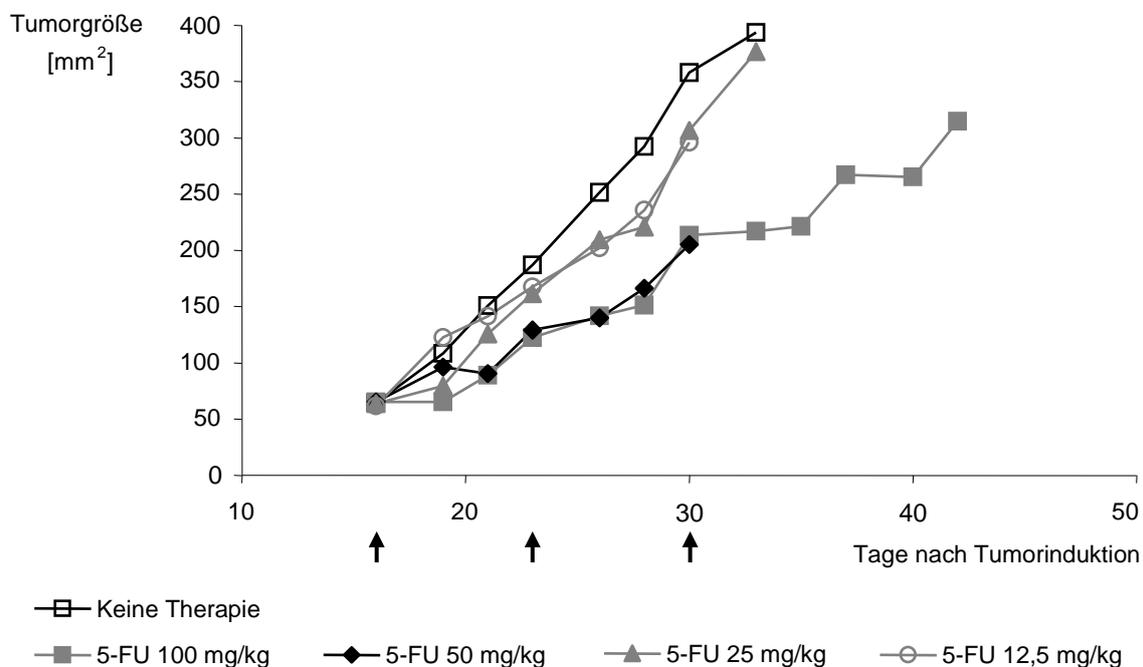


Abb. 5 B: Chemotherapie mit 5-Fluorouracil/Folinsäure im murinen Colon-26-Tumormodel; Temporärer Stillstand der Tumorprogression.

Aufgezeichnet ist hier die mittlere Tumorgöße der jeweiligen Gruppe (n=4) bis die erste Maus der Gruppe starb oder die Tumorgöße 400 mm² erreichte. Die Mäuse erhielten bei einer mittleren Tumorgöße von 65 mm² eine intraperitoneal applizierte Chemotherapie mit der Kombination aus 5-Fluorouracil in verschiedenen Dosierungen und insgesamt jeweils 100 mg/kg Körpergewicht Folinsäure an den mit Pfeilen (↑) gekennzeichneten Tagen 16, 23, und 30 nach Tumorinduktion bzw. blieben als Kontrolle unbehandelt.

3.1.2 Verträglichkeit *in vivo* verschiedener Dosierungen von 5-Fluorouracil

In den Behandlungsgruppen mit 5-FU konnte mit steigender Dosierung des Therapeutikums 5-FU bei den Mäusen Piloerektion, Adynamie, verminderte Nahrungsaufnahme und zum Teil Diarrhoe beobachtet werden. Da dies keine im Verlauf gut zu beurteilende oder quantifizierbare Parameter darstellten, wurde zur Beurteilung der Therapie-Verträglichkeit das Körpergewicht herangezogen. Die hämatotoxische Wirkung von 5-FU im Einzelnen wurde nicht untersucht.

Während die unbehandelte Kontroll-Gruppe initial ab Tag 16 einen geringen gemittelten Anstieg des Körpergewichtes um 0,75 g aufweist, kommt es im Verlauf bis Tag 30 aufgrund der konsumierenden, malignen Erkrankung zu dem deutlichen Gewichtsverlust von 2,75 g. Im Vergleich hierzu wird durch die Hochdosis-Chemotherapie mit 100 und 50 mg/kg 5-FU ein signifikanter akuter Gewichtsverlust jeweils bis 3 Tage nach Therapie-Applikation gemessen (Tag 19, $p=0,017$ und $p=0,032$, Abb. 7). Dieser Effekt konnte in den Niedrigdosis-Gruppen mit 25 und 12,5 mg/kg 5-FU nicht bestätigt werden. Während bei 50 mg/kg 5-FU der Gewichtsverlauf dem der unbehandelten Gruppe mit beginnender Kachexie entspricht, kann bei Einsatz von 100 mg/kg 5-FU ein längerfristiges Stabilisieren des Gewichtsverlaufes beobachtet werden, nicht zuletzt durch die bei einer Maus erreichte komplette Remission. Somit erscheint als höchste 5-FU-Dosierung ohne anfänglichen Gewichtsverlust 25 mg/kg Körpergewicht sinnvoll.

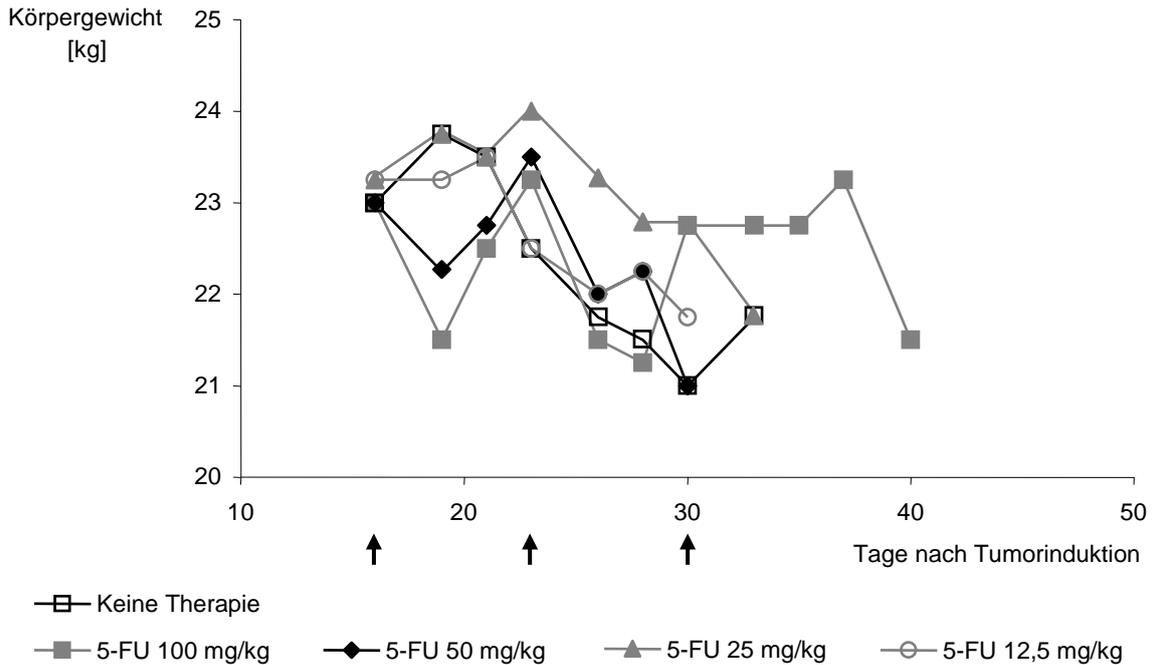


Abb. 5 C: Chemotherapie mit 5-Fluorouracil/Folinsäure im murinen Colon-26-Tumormodell; Optimales Effektivitäts-Nebenwirkungs-Verhältnis von 5-Fluorouracil bei 25 mg/kg Körpergewicht.

Aufgezeichnet ist hier das mittlere Körpergewicht der jeweiligen Gruppe (n=4) bis die erste Maus der Gruppe starb oder die Tumorgöße 400 mm^2 erreichte. Die Mäuse erhielten bei einer mittleren Tumorgöße von 65 mm^2 eine intraperitoneal applizierte Chemotherapie mit der Kombination aus 5-Fluorouracil in verschiedenen Dosierungen und insgesamt jeweils 100 mg/kg Körpergewicht Folinsäure an den mit Pfeilen (\uparrow) gekennzeichneten Tagen 16, 23, und 30 nach Tumorinduktion bzw. blieben als Kontrolle unbehandelt.

3.2 Effektive Kombination von Immuntherapie und Chemotherapie im murinen Colon-26-Tumormodell

3.2.1 Kombinationstherapie aus Immun- und Chemotherapie

In Vorarbeiten durch meine Kollegen Dr. rer. biol. hum. Klaus Heckelsmiller und Dr. Katharina Rall konnte eine Wirksamkeit von immunstimulatorisch wirkenden CpG-Oligonukleotiden in der Behandlung des zuvor beschriebenen murinen C26-Tumormodells gezeigt werden. Hierbei wurde eine Kontrolle kleiner Tumore durch eine wöchentliche Applikation von $100 \mu\text{g}$ CpG-ODN 1826, beginnend bereits 5 Tage nach Tumorinduktion, erreicht, wobei weiter eine strenge Abhängigkeit zum peritumoralen Applikations-Ort sowie von zytotoxischen CD8 T-Zellen besteht (Heckelsmiller et al., 2002b). Ferner wurde durch die Behandlung eine Induktion eines spezifischen Immungedächtnisses erreicht. Größere Tumore konnten im Folgenden

durch die Etablierung einer Vakzine mit DCs und CpG-ODN effektiv kontrolliert und behandelt werden (Heckelsmiller et al., 2002a).

Nach Ermittlung der von den Mäusen am besten tolerierten Dosierung mit noch anzunehmenden therapeutischen Effekt wurde für die Kombinationsbehandlung mit der Vakzine eine Dosierung von 20 mg/kg 5-FU und 100 mg/kg LV gewählt.

14 Tage nach C26-Tumorinduktion erfolgte bei einer Tumorgröße von im Mittel 70 mm² die erste Kombinationsbehandlung. Hierfür wurde eine kontralaterale subkutane Applikation mit C26-gepulsten dendritischen Zellen sowie 100 µg CpG-ODN 1826 vorgenommen. Zudem wurden peritumoral subkutan 100 µg CpG-ODN 1826 injiziert und die Chemotherapie mit intraperitoneal verabreichtem 5-FU und *Leucovorin*® in oben genannter Dosierung durchgeführt. Das Behandlungsregime sah in Anlehnung an die Vorarbeiten weitere Therapien in wöchentlichem Abstand, an Tag 21 und 28, vor.

Während wie erwartet alle 19 Mäuse in der unbehandelten Kontroll-Gruppe und ebenso die Tiere der Chemotherapie-Gruppe bei einer mittlere Überlebenszeit von 38 respektive 36 Tagen ohne signifikanten Unterschied verstarben, konnte eine hochsignifikante Verbesserung der Überlebenswahrscheinlichkeit der Vakzine-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe ($p=0,001$) und der Chemotherapie-Gruppe ($p=0,001$) bestätigt werden. Die mittlere Überlebenszeit verlängerte sich auf 63 Tage (Abb. 6 A).

Mit der Frage nach der Möglichkeit der Kombination von Vakzine und Chemotherapie, insbesondere vor dem Hintergrund einer Wirkungsminderung der Vakzine bei immunsuppressiver Chemotherapie, wurde dies im gleichen Ansatz untersucht. Hierbei führte die Kombinationsbehandlung Vakzine plus Chemotherapie bei einer mittleren Überlebenszeit von 74 Tagen ebenfalls zu einer hochsignifikanten Verbesserung der Überlebenswahrscheinlichkeit ($p=0,001$) gegenüber den Gruppen Kontrolle und Chemotherapie. Ein vollständiger Wirkungsverlust der Vakzine ließ sich unter niedrigdosierter Chemotherapie nicht belegen. Ganz im Gegenteil kam es zu einer signifikanten Verbesserung der Überlebenswahrscheinlichkeit der Kombinationsbehandlungs- gegenüber der Vakzine-Gruppe ($p=0,03$, Abb. 6 A), was auf eine zusätzliche immunstimulatorische Wirkung der Chemotherapie in niedriger Dosierung schließen lässt. Hierbei können Natürliche Killerzellen, eine Elimination von Suppressorzellen und Induktion einer Zytokine-Antwort eine Rolle spielen (Okamoto et al., 1998).

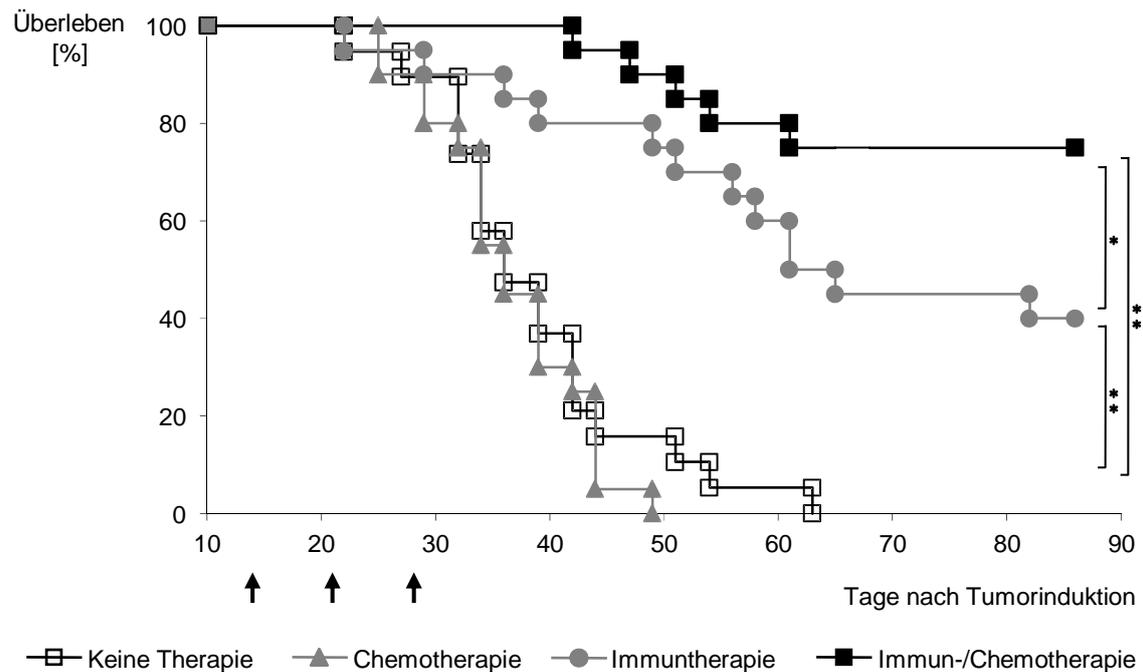


Abb. 6 A: Kombination der Vakzine mit 5-FU-Chemotherapie; Verbesserung des therapeutischen Effekts der Vakzine durch die Kombination.

Die Mäuse erhielten beginnend bei einer mittleren Tumorgöße von 70 mm² an den mit Pfeilen (↑) gekennzeichneten Tagen 14, 21, und 28 nach Tumorinduktion entweder eine intraperitoneal applizierte Chemotherapie in der Dosierung 20 mg/kg Körpergewicht 5-Fluorouracil und 100 mg/kg Körpergewicht Folinsäure (n=20) bzw. blieben als Kontrolle (n=19) unbehandelt. Verschiedene Versuchsansätze mit jeweils gleichen Therapiegruppen wurden zusammengefasst. Weitere Therapiegruppen mit gleichen Therapiezeitpunkten waren die Vakzine (n=20) nach dem etabliertem Protokoll und eine Kombination der Vakzine mit der Chemotherapie in einer Dosierung von 20 mg/kg Körpergewicht 5-Fluorouracil und 100 mg/kg Körpergewicht Folinsäure (n=20). Aufgezeichnet ist hier die Kaplan-Meier-Kurve der jeweiligen Gruppe. Eine hochsignifikante Verbesserung der Überlebenswahrscheinlichkeit zeigte die Vakzine-Gruppe gegenüber der Kontroll- und Chemotherapie-Gruppe, ebenso die Kombination der Vakzine mit der Chemotherapie gegenüber der Kontroll- und Chemotherapie-Gruppe. Weiter führt die Kombination der Vakzine mit der Chemotherapie zu einer signifikanten Verbesserung gegenüber der Vakzine allein.

In der Betrachtung der Tumorgößenentwicklung war der oben genannte Effekt der Kombinationsbehandlung ebenfalls darzustellen. Während die Tumorprogression in der unbehandelten Kontroll- sowie der Chemotherapie-Gruppe ohne Unterschied rasch zu einer lebenslimitierenden Situation führte, konnte durch die alleinige Vakzine entsprechend den Vorarbeiten gegenüber den eben genannten Gruppen eine hochsignifikante Verkleinerung der Tumorgöße erreicht werden (Tag 22, jeweils p=0,001, Abb. 6 B), in 8 von 20 Fällen sogar zu einer Heilung des Malignoms.

Durch die kombinierte Gabe beider Therapien, Vakzine plus Chemotherapie, wurde eine signifikante Verstärkung der Wirkung auf die Tumorprogression gegenüber der

alleinigen Vakzine erreicht (Tag 22, $p=0,045$, Abb. 6 B). Eine Tumorfreiheit und damit eine Heilung erreichten 15 von 20 Tieren. Weiter zeigte sich, dass nach der ersten Therapieeinheit an Tag 14 die stärkste Tumorrogression zu beobachten war, die weiteren Applikationen konnten diese nicht wiederholen.

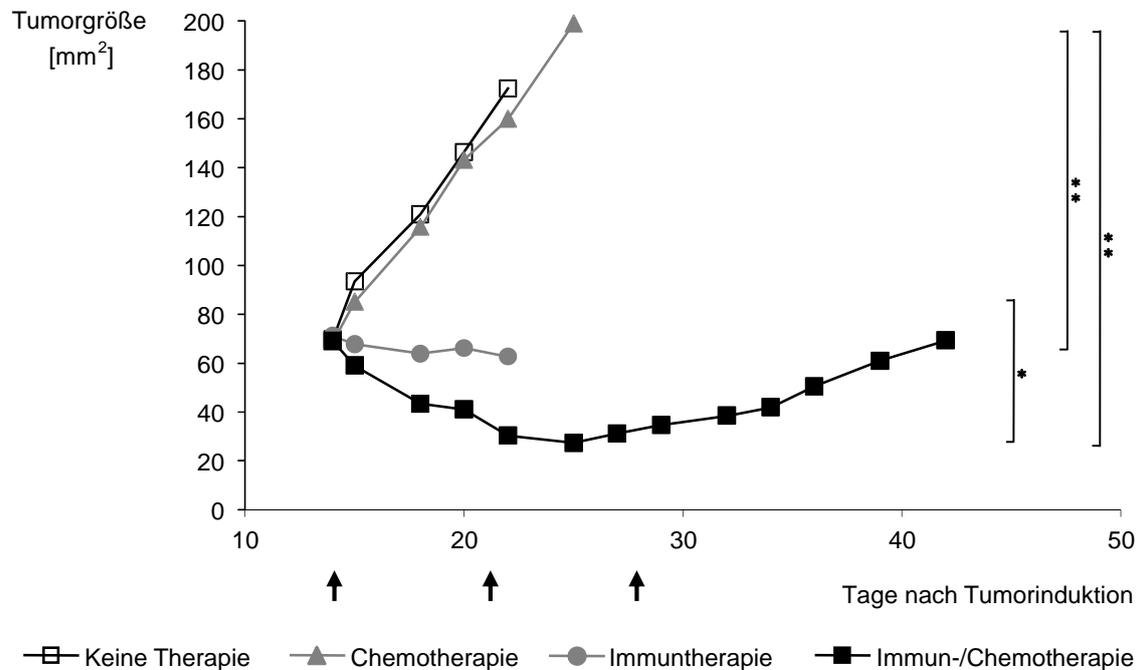


Abb. 6 B: Kombination der Vakzine mit 5-FU-Chemotherapie; Signifikante Tumorgößenreduktion durch die Kombination.

Aufgezeichnet ist hier die mittlere Tumorgöße der jeweiligen Gruppe bis die erste Maus der Gruppe starb oder die Tumorgöße 400 mm^2 erreichte. Verschiedene Versuchsansätze mit jeweils gleichen Therapiegruppen wurden zusammengefasst. Die Mäuse erhielten beginnend bei einer mittleren Tumorgöße von 70 mm^2 an den mit Pfeilen (\uparrow) gekennzeichneten Tagen 14, 21, und 28 nach Tumorinduktion entweder eine intraperitoneal applizierte Chemotherapie in der Dosierung 20 mg/kg Körpergewicht 5-Fluorouracil und 100 mg/kg Körpergewicht Folinsäure ($n=20$) bzw. blieben als Kontrolle ($n=19$) unbehandelt. Weitere Therapiegruppen mit gleichen Therapiezeitpunkten (\uparrow) waren die Vakzine ($n=20$) nach dem etabliertem Protokoll und eine Kombination der Vakzine mit der Chemotherapie in einer Dosierung von 20 mg/kg Körpergewicht 5-Fluorouracil und 100 mg/kg Körpergewicht Folinsäure ($n=20$). An Tag 22 zeigt die Vakzine-Gruppe gegenüber der Kontroll- und Chemotherapie-Gruppe eine hochsignifikante Reduktion der Tumorgöße, ebenso die Kombination der Vakzine mit der Chemotherapie gegenüber der Kontroll- und Chemotherapie-Gruppe. Die Kombination der Vakzine mit der Chemotherapie führt zu einer signifikanten Reduktion gegenüber der Vakzine allein.

3.2.2 Kein erhöhtes Nebenwirkungspotential der Kombination aus Immun- und Chemotherapie im Vergleich zur Vakzine

Um analog zu Punkt 3.1.2 (siehe oben) die Verträglichkeit der verschiedenen Therapien und indirekt auch den Therapieerfolg darzustellen, ist das Gewicht der Versuchstiere der entsprechenden Gruppen gegenüber gestellt. Hierbei sieht man wie erwartet einen initial konstanten Gewichtsverlauf in der Kontrollgruppe mit einer Reduktion aufgrund beginnender Tumorkachexie im Verlauf bis an Tag 22 und in der reinen Chemotherapie-Gruppe einen bis auf einen initial passageren posttherapeutischen Gewichtsverlust identischen Verlauf, ein signifikanter Unterschied kann nicht dargestellt werden (Tag 15 $p=0,66$ und Tag 22 $p=0,36$, Abb. 6 C). Ebenso ohne Signifikanz im Vergleich zur Kontroll- und Chemotherapiegruppe ist der mittelfristige Gewichtsverlauf an Tag 22 in der Vakzine-Gruppe ($p=0,095$ und $p=0,43$). Jedoch kann am ersten, posttherapeutischen Tag 15 eine starke, vorübergehende Erniedrigung des Gewichts von 1,5 g in der Vakzine-Gruppe festgestellt werden, dies mit signifikante Unterschied gegenüber der unbehandelten und chemotherapeutisch behandelten Gruppe ($p=0,031$ und $p=0,014$, Abb. 6 C). Noch ausgeprägter ist dieser Effekt durch die Kombination der beiden Therapien, Vakzine plus Chemotherapie. Der posttherapeutische (Tag 15) Körpergewichtsverlust beträgt hierbei 1,9 g mit signifikantem Unterschied wiederum zur Kontroll- und Chemotherapiegruppe ($p=0,002$ und $p=0,001$). An Tag 22 kann dieses Gewichtsverhalten nicht mehr mit entsprechender Signifikanz aufgezeigt werden ($p=0,48$ und $p=0,68$). Verglichen mit der Vakzine kann weder am ersten (Tag 15) noch am zweiten posttherapeutischen Tag 22 eine signifikanter Gewichtsunterschied festgestellt werden ($p= 0,12$ und $p=0,078$).

Betrachtet man den Einzelgewichtsverlauf der entsprechenden Gruppen, so sieht man neben dem bereits oben genannten, langfristigen Gewichtsverlust aufgrund der einsetzenden Tumorkachexie in der unbehandelten und nur chemotherapeutisch behandelten Gruppe ein konstantes bis ansteigendes Gewicht jeweils bei Behandlung mit Vakzine und der Kombination dieser mit Chemotherapie (nicht grafisch dargestellt). Weiter zeigt sich auch kein posttherapeutischer Verlust von Körpergewicht nach der dritten Therapie in der Kombinationsgruppe.

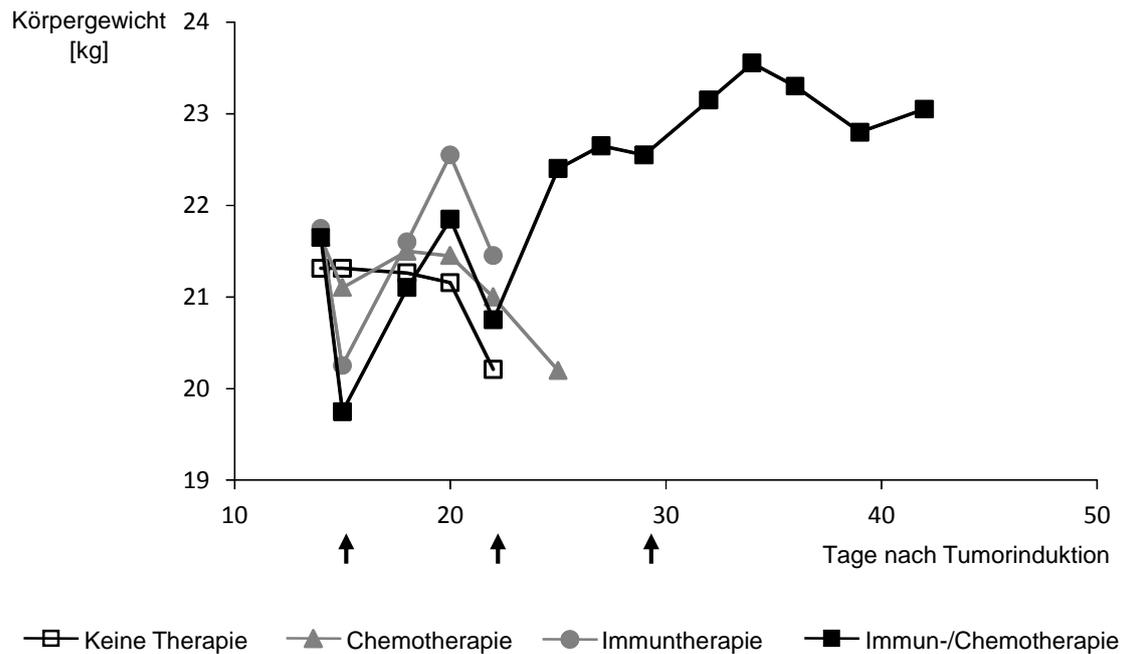


Abb. 6 C: Kombination der Vakzine mit 5-FU-Chemotherapie: Passagerer signifikanter posttherapeutischer Körpergewichtsverlust im Zuge der Vakzine.

Aufgezeichnet ist hier das mittlere Körpergewicht der jeweiligen Gruppe bis die erste Maus der Gruppe starb oder die Tumorgroße 400 mm^2 erreichte. Verschiedene Versuchsansätze mit jeweils gleichen Therapiegruppen wurden zusammengefasst. Die Mäuse erhielten bei einer mittleren Tumorgroße von 70 mm^2 an den mit Pfeilen (\uparrow) gekennzeichneten Tagen 14, 21, und 28 nach Tumorinduktion entweder eine intraperitoneal applizierte Chemotherapie in der Dosierung 20 mg/kg Körpergewicht 5-Fluorouracil und 100 mg/kg Körpergewicht Folinsäure ($n=20$) bzw. blieben als Kontrolle ($n=19$) unbehandelt. Weitere Therapiegruppen waren die Vakzine ($n=20$) nach dem etabliertem Protokoll und eine Kombination der Vakzine mit der Chemotherapie in einer Dosierung von 20 mg/kg Körpergewicht 5-Fluorouracil und 100 mg/kg Körpergewicht Folinsäure ($n=20$).

3.3 Vakzine-induzierte Gedächtnisantwort auch im orthotopen murinen Colon-26-Tumormodell wirksam

In Vorarbeiten wurde bereits eine antigenspezifische, systemische CD8-abhängigen T-Zell-Antwort mit Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses gegenüber einer Tumor-Reexposition im gleichen murinen subkutanen Tumormodell nachgewiesen (Heckelsmiller et al., 2002a; Heckelsmiller et al., 2002b). In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob das bereits gesehene immunologische Verhalten ebenfalls in einem orthotopen, die Tumorentität exakter abbildenden Gewebe darstellbar ist. Hierfür wurden aus den entsprechenden Vorversuchen mit der Vakzine-Therapie die langzeitüberlebenden Versuchstiere in eine posttherapeutische und eine

Kontrollgruppe zusammengelegt. Die Vorversuchsbehandlung erfolgte in Form der Vakzine mit kontralateral applizierten, C26-gepulsten dendritischen Zellen und CpG-ODN 1826 sowie peritumorale, subkutane Injektion von CpG-ODN 1826 im Vorfeld mit einem Abstand von 90 bis 165 Tagen, die Kontrollgruppe ohne Behandlung bildete ein ähnliches Altersspektrum ab. Eine Chemotherapie kam in dieser Versuchsreihe nicht zum Einsatz.

Als Tumormodell für die Tumor-Reexposition wurde ein orthotopes Modell ausgewählt und in der Arbeitsgruppe etabliert. Es wurden C26-Tumorzellen operativ mittels Zugang über eine mediane Laparotomie intramural in das Zökum appliziert. Eine intraperitoneale Aussaat wurde durch Verwendung einer geeigneten Applikationsmethode mit einer *Matrigel*®-Zellsuspension verhindert. Die Mäuse tolerierten den invasiven Eingriff problemlos, der postoperative kurz- und mittelfristige Verlauf gestaltete sich unkompliziert. Der dokumentierte Gewichtsverlauf ergab zu keinem Zeitpunkt den Hinweis einer übermäßigen Belastung der Versuchstiere (siehe Abb. 7 B).

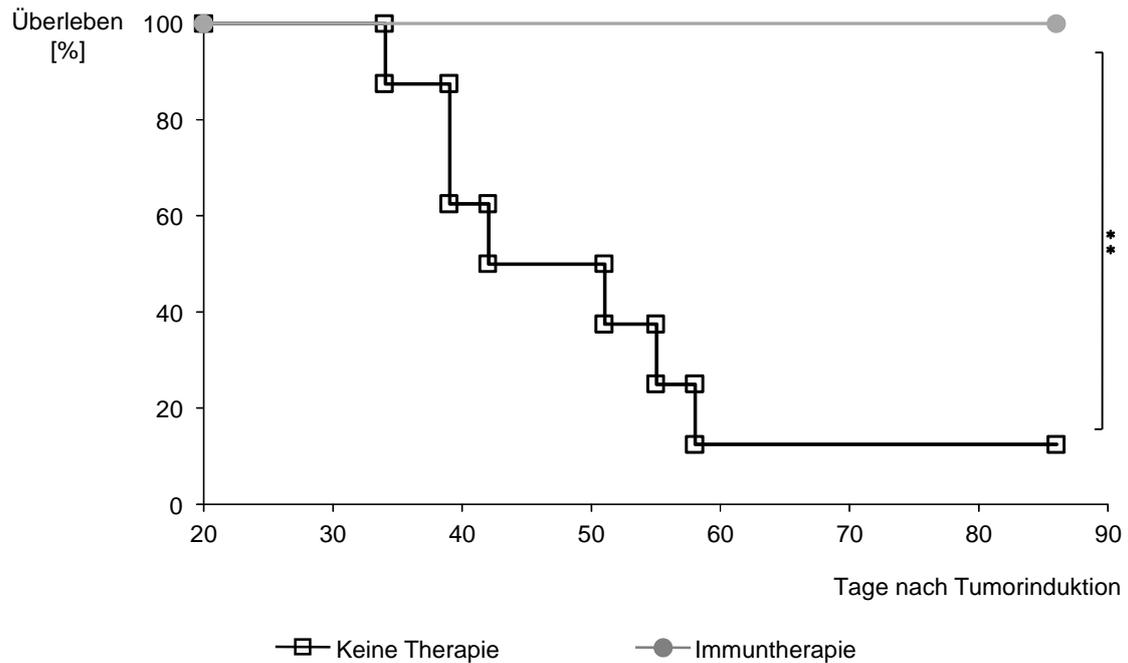


Abb. 7 A: Überleben unter Transfer der Langzeitimmunantwort in das orthotope Colon-26-Tumormodell

Die Mäuse, die in den entsprechenden Vorversuchen unter der Vakzine-Therapie mit kontralateral applizierten, C26-gepulsten dendritischen Zellen und CpG-ODN 1826 sowie peritumoraler, subkutaner Injektion von CpG-ODN 1826 den Tumor abstießen, erhielten 90 bis 165 Tage nach erster Tumorinduktion eine orthotope Reexposition mit gleicher Tumorentität Colon-26 mittels operativem Zugang über eine mediane Laparotomie und intramural Applikation in das Zökum (n=6). Als Kontrolle (n=8) wurde eine dem Alter entsprechende Versuchstiergruppe ohne Vorbehandlung mit Colon-26-Tumorzellen in gleicher Weise orthotop der Tumor induziert. Aufgezeichnet ist hier die Kaplan-Meier-Kurve der jeweiligen Gruppe.

Während erwartungsgemäß alle Mäuse in der Reexpositionsgruppe überlebten und somit den Tumor abstießen, führte die Tumormasse mit hochsignifikantem Unterschied in der Kontrollgruppe bei sieben von acht Tieren innerhalb von 34 bis 58 Tagen zum Tod ($p=0,002$, Abb. 7 A). Auf Autopsie-Ergebnisse wurde verzichtet.

Anhand des Gewichtsverlaufes zeigte sich ein gleiches aggressives Verhalten des orthotop induzierten Tumors gegenüber dem subkutanen Modell. Auch hierbei führt die konsumierende Erkrankung ab dem 16 Tag nach Tumorinduktion zu einem messbaren Gewichtsverlust, der im Untersuchungszeitraum bis zum Tode der ersten Maus an Tag 34 jedoch keine Signifikanz gegenüber der Reexpositionsgruppe aufweist ($p=0,052$, Abb. 7 B).

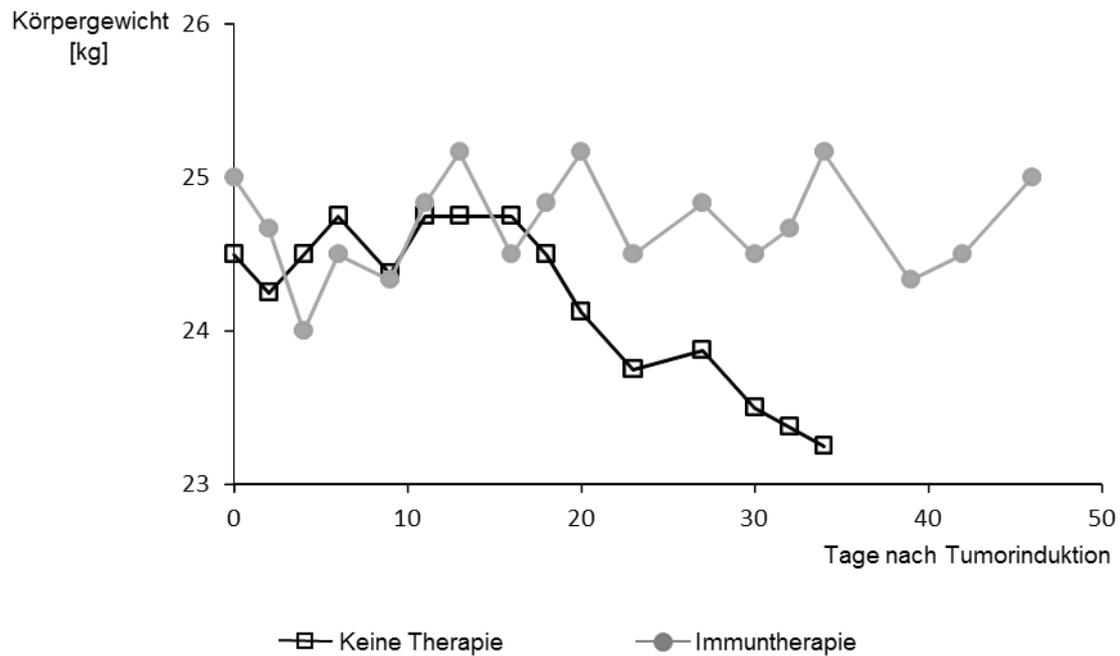


Abb. 7 B: Gewichtsverlauf unter Transfer der Langzeitimmunantwort in das orthotope Colon-26-Tumormodell.

Abgebildet ist das mittlere Körpergewicht der jeweiligen Gruppe, bis die erste Maus der Gruppe starb. Mäuse, die in den entsprechenden Vorversuchen unter der Vakzine-Therapie den Tumor abstießen, erhielten 90 bis 165 Tage nach erster Tumorinduktion eine orthotope Reexposition mit gleicher Tumorentität Colon-26 mittels operativem Zugang über eine mediane Laparotomie und intramuraler Injektion von Tumorzellen in das Zökum (n=6, Immuntherapie). Als Kontrolle (n=8, keine Therapie) wurde eine dem Alter entsprechende Versuchstiergruppe ohne Vorbehandlung mit Colon-26-Tumorzellen in gleicher Weise orthotop mit Tumorzellen injiziert.

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnte die Effektivität einer Vakzine, bestehend aus dendritischen Zellen und CpG-ODN, in Kombination mit der bisher als Standard geltenden Chemotherapie mit 5-Fluorouracil und Folinsäure aufgezeigt werden. Ferner ist hierfür nur eine niedrige Dosierung der Chemotherapie mit geringstem Nebenwirkungsprofil notwendig.

Daneben konnte in einem unabhängigen Ansatz eine Ergebnisübertragung der etablierten Vakzinierungsstrategie mit dendritischen Zellen und CpG-ODN im Hinblick auf eine systemische antitumorale Langzeit-Immunantwort von einem syngenem subkutanen murinen Kolonkarzinom-Modell auf ein orthotopes Modell erfolgen.

In einem ersten Schritt wurde die für unseren therapeutischen Ansatz bestmögliche Dosierung der Chemotherapie mit 5-FU und *Leucovorin*® gesucht, wobei als Zieldosierung die mit dem geringsten Nebenwirkungsspektrum in Verbindung mit noch bestehender Wirksamkeit festgesetzt wurde. Ab einer Dosierung von 25 mg/kg Körpergewicht 5-FU wurde zwar keine Verlängerung des Überlebens festgestellt, es kam jedoch zu einer temporären Verlangsamung der Tumorprogression. Der akute posttherapeutische Gewichtsverlust als Parameter der Verträglichkeit zeigte in dieser Dosierung keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. In Therapiegruppen mit höheren 5-FU-Dosierungen konnte keine bessere therapeutische und gleichzeitig nebenwirkungsärmere Dosis gefunden werden, so dass für die weitere Kombination mit einer Vakzine die 5-FU-Dosierung bis 25 mg/kg Körpergewicht sinnvoll erscheint. Die 5-FU-Dosierung von 20 mg/kg Körpergewicht wurde letztlich aus verschiedenen Erwägungen im Mausmodell gewählt, untermauernde Daten wurden hierfür nicht erhoben.

Durch die Kombination der etablierten Vakzine mit der Chemotherapie in der zuvor festgelegten Dosierung konnte ein effektiver therapeutischer Ansatz verifiziert werden. Es zeigte sich neben der bereits bekannten Verlängerung des Überlebens durch die Vakzinierung allein ein zusätzlicher Effekt durch Aufnahme der Chemotherapie in die Behandlungsstrategie. Das Überleben wurde zusätzlich verlängert, die Tumorprogression wurde vermindert. Ein Gewichtsverlust, der als temporäre Nebenwirkung der Vakzine anzusehen ist, verstärkte sich nicht unter der Kombination mit der Chemotherapie. Ferner kam es im Verlauf der Mehrfachbehandlung sogar zu einer konstanten Gewichtszunahme.

Das Ausbilden eines immunologischen Langzeitgedächtnisses gegenüber einer Tumor-Reexposition, die in Vorarbeiten im gleichen murinen subkutanen Tumormodell nachgewiesen werden konnte, wurde in dieser Arbeit auf ein orthotopes Colon-26-Tumormodell übertragen. Anzunehmen ist auch hier eine antigenspezifische systemische CD8-abhängige T-Zell-Antwort, hierfür wurden jedoch keine eigenen Daten erhoben.

4.2 Wahl des Chemotherapeutikums und dessen optimale Dosierung

4.2.1 Chemotherapie mit 5-Fluorouracil und *Leucovorin*®

In Abhängigkeit des Krankheitsstadiums und der Komorbidität des Patienten ist heute in den Behandlungsprotokollen für das Kolonkarzinom ein wesentlicher Bestandteil der Einsatz des Antimetaboliten 5-Fluorouracil mit der verstärkend modulierenden Wirkung durch Folinsäure. Eingesetzt werden hierfür weitestgehend Hochdosisprotokolle mit wöchentlichen 24-Stunden-Infusionen von 5-FU über Pumpensysteme (Protokoll nach *Ardalan* bzw. *AIO*), die im Vergleich zu den ersten Bolus-Kurzinfusions-Protokollen (nach *Poon* bzw. *Mayo*, *Machover*, *Münchner Protokoll*) zu einer höheren Remissionsrate führten. Durch Kombinationen mit neueren Substanzklassen wie Inhibitoren der Thymidylatsynthase, auch DACH-Platinsalze genannt, sowie den Inhibitoren der Topoisomerase I und einer Gruppe unterschiedlicher fluorierter Pyrimidine ließ sich die Effektivität der chemotherapeutischen Behandlung des kolorektalen Karzinoms nochmals deutlich steigern, dies jedoch unter Inkaufnahme eines verstärkten Nebenwirkungsprofil.

Neben der bekannten immunsuppressiven Wirkung einer Chemotherapie ist auch immer wieder ein verstärkender Effekt verschiedener Chemotherapeutika auf die antitumorale Wirkung einer Immuntherapie beschrieben worden. So wird durch Cyclophosphamid die antitumorale Immunantwort durch Unterdrückung regulierender T-Zellen und Verstärkung einer T_H1 -Immunantwort (Ghiringhelli et al., 2004; Machiels et al., 2001) moduliert. Andererseits können humane Kolonkarzinom-Zellen durch Medikamente wie 5-FU oder Irinotecan für die lytische Aktivität von zytotoxischen T-Zellen sensitiviert werden (Bergmann-Leitner et al., 2001). Diese wiederum spielen eine wichtige Rolle in der antitumoralen Wirkung von peritumoral applizierten CpG-ODN (Heckelsmiller et al., 2002b). Ebenso ist die zytotoxische Aktivität der CTL durch verschiedene Chemotherapeutika wie Daunorubicin, Vinorelbine, Cisplatin, 5-FU und weitere erhöht. Hingegen weisen Docetaxel,

Vincristine, Oxaliplatin oder Doxorubicin einen negativen Effekt auf die CTL-Aktivität auf (Markasz et al., 2008).

Aufgrund der gut etablierten, langjährig angewandten Protokolle mit 5-FU/Folinsäure und der Praktikabilität des Chemotherapeutikums sowie guten Verfügbarkeit für unsere Versuche wurde 5-FU/Folinsäure als chemotherapeutisches Agens für unsere Kombinationstherapie gewählt. Für das Modell des murinen C26-Kolonkarzinoms wurde entsprechend der Literatur ein gängiges, hocheffektives Applikations-Protokoll von 5-FU/Folinsäure gewählt (van der Wilt et al., 1992), welches neben der Praktikabilität auch eine geringste Belastung der Tiere darstellte.

4.2.2 Dosierung von 5-Fluorouracil und *Leucovorin*®

Die im murinen C26-Kolonkarzinom angewandten Therapieprotokolle mit 5-FU/Folinsäure beinhalten zum Erreichen einer Effektivität durch die Monotherapie stets eine maximale Dosierung des Chemotherapeutikums mit aber noch tolerablem Nebenwirkungsprofil, insbesondere auf das Immunsystem. Für den Ansatz der Kombination von klassischer Chemotherapie und der in Vorarbeiten etablierten Immuntherapie ist diese Chemotherapie-assoziierte Immunsuppression von entscheidender Rolle (Harris et al., 1976; Mokyry et al., 1987). Hier zeigt sich *in vitro* eine verminderte Entwicklung von CTLs durch Kontakt zu 5-FU in der Sensitivierungsphase der Zellen (Correale et al., 2003). Dies kann somit zu einer verminderten T-Zell-Antwort führen. Auch DCs zeigen sich durch verschiedene Chemotherapeutika in ihrer verfügbaren Zahl und Funktion deutlich negativ beeinflusst (Markowicz et al., 2002). Auch die Dosis des Chemotherapeutikums ist für den Einfluss auf die Immuntherapie von entscheidender Bedeutung (Chen et al., 2013). Mit dem Ziel der Arbeit, eine effektive Therapiekombination aus Vakzine und Chemotherapie aufzuzeigen, sind diese immunmodulatorischen Nebenwirkungen der Chemotherapie von entscheidender Rolle. Daher galt es in unserem Ansatz, eine möglichst niedrige, aber dennoch wirksame Dosierung von 5-FU/Folinsäure zu ermitteln.

In einer ersten Dosierungs-Findungs-Studie zeigte sich erwartungsgemäß ein temporärer, therapeutischer Effekt auf die Größenprogression des murinen C26-Kolonkarzinoms in allen Dosierungen von 25 mg/kg Körpergewicht bis zu 100 mg/kg Körpergewicht 5-FU. Eine Verbesserung der Überlebenswahrscheinlichkeit konnte nur in der Hochdosis-Gruppe gezeigt werden. Bestätigt durch die Literatur ist in großen, etablierten murinen C26-Tumoren auch in der Maximaldosierung von 100 mg/kg 5-FU keine Heilung der Tumore möglich (Van Laar et al., 1996). Es zeigt sich jedoch ein

deutlicher, jeweils posttherapeutischer Gewichtsverlust im Sinne eines relevanten Nebenwirkungspotentials.

Während bei 50 mg/kg 5-FU der Gewichtsverlauf dem der unbehandelten Gruppe mit beginnender Tumorkachexie entspricht, kann bei Einsatz von 100 mg/kg 5-FU ein längerfristiges Stabilisieren des Gewichtsverlaufes beobachtet werden, nicht zuletzt durch die bei einer Maus erreichte komplette Remission.

Somit erscheint als höchstmögliche 5-FU-Dosierung mit dem niedrigsten Nebenwirkungsprofil bzw. der besten Verträglichkeit 25 mg/kg Körpergewicht sinnvoll.

4.3 Kombination von Immuntherapie und Chemotherapie im murinen Colon-26-Tumormodell

4.3.1 Therapieprotokoll der Immun-Chemotherapie-Kombination

In Vorarbeiten mit bereits bei Therapiebeginn sehr großen C26-Kolonkarzinomen konnte eine wirksame Immuntherapie mit spezifisch aktivierten DCs und dem Immunstimulanz CpG-ODN dargestellt werden (Heckelsmiller et al., 2002a). Diese Therapieform startet an Tag 14 nach Tumorinduktion und wird in einem wöchentlichen Protokoll mit geringen, aber dennoch am temporär verminderten Körpergewichtsverlauf der Versuchstiere sichtbaren Nebenwirkungen gut toleriert. Die grundlegende Frage dieser Arbeit bestand in der Kombinationsmöglichkeit der bereits etablierten Vakzine mit einer Chemotherapie. Hierbei fand das Chemotherapeutikum 5-FU, das zur Zeit der experimentellen Anfertigung der hier vorliegenden Arbeit mit großer Erfahrung sowohl im humanen wie auch im murinen System eingesetzt wurde, seinen Gebrauch. Wie bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt war eine Kombination von zwei Therapieansätzen, im Einzelnen eine Immuntherapie mit CpG-ODN oder DCs und eine Chemotherapie, bei anderen Tumorentitäten wirksam und konnte den einzelnen Effekt sogar potenzieren (Tanaka et al., 2002; Tong et al., 2001; Weigel et al., 2003). In den eingesetzten Therapieprotokollen wurde jedoch ein kürzeres Behandlungsschema verwendet oder aber eine Vorbehandlung mit der Chemotherapie gewählt.

Basierend auf den Erkenntnissen, dass auch Chemotherapeutika wie 5-FU und Cisplatin einen immunmodulatorischen Effekt wie eine gesteigerte Aktivierung von NK-Zellen und *lymphokine-activated-killer* (LAK)-Zellen und Produktion von IFN γ , TNF α/β , IL-1 β , IL-6 und IL-12 *in vitro* und *in vivo* zeigen, verfolgten wir den Ansatz einer gleichzeitigen Kombination der jeweiligen Therapien.

Ein vollständiger Wirkungsverlust der Vakzine ließ sich unter niedrigdosierter Chemotherapie nicht belegen. Im Gegensatz hierzu kam es zu einer signifikanten Verbesserung der Überlebenswahrscheinlichkeit der Versuchstiere, die kombiniert behandelt wurden im Vergleich zu der Vakzine-Gruppe ($p=0,031$) (Abb. 8). Dieser Effekt scheint auf eine zusätzliche immunstimulatorische Wirkung der Chemotherapie in niedriger Dosierung zurückzuführen zu sein. Hierbei können NK-Zellen, eine Elimination von Suppressorzellen sowie die Induktion einer Zytokine-Antwort eine Rolle spielen (Okamoto et al., 1998). In neueren Arbeiten wurde anhand des aktuell im humanen System etablierten Chemotherapie-Protokolls FOLFIRI mit Irinotekan und 5-FU/Folinsäure gezeigt, dass dieses in Kombination mit einer DC-Vakzine eine antigenspezifische, T_H1 -gerichtete und zytotoxische T-Zell-Antwort generiert und hierbei die DC-Vakzine den 14 Tage post-chemotherapeutischen immunsuppressiven Effekt durch regulatorische T-Zellen und Knochenmarks-gereiften Suppressorzellen antagonisiert (Kim et al., 2010).

Betrachtet man das Wachstumsverhalten der Tumore anhand der einzelnen Tiere unter der jeweiligen Therapie mit den entsprechenden wöchentlichen Applikationen, so ist ein maximaler Effekt nach der ersten Gabe der Kombinationstherapie an Tag 14 zu verzeichnen (Daten nicht gezeigt). Die weiteren Therapieapplikationen an Tag 21 und 28 können diesen Effekt nicht wiederholen. Da die Gruppenkurven nahezu parallel verlaufen, ist eine initial vorhandene Aktivierung des immuntherapeutischen Erfolges zu postulieren. Hier können NK-Zellen, die durch 5-FU in ihrer Anzahl und Funktion noch erhöht werden (Okamoto et al., 1998), eine T_H2 -gerichtete Immunantwort verstärkt vermitteln. Zu diesem Effekt hinzu kommt noch eine Verstärkung der lytischen Aktivität der NK-Zelle durch CpG-Oligonukleotide (Wang et al., 2005). Eine $TNF\alpha$ -vermittelte, antitumorale Wirkung in einem DC-Vakzine-Modell ist ebenfalls durch eine Vorbehandlung der Tumorzellen mit 5-FU verstärkt. Entscheidend hierfür ist wiederum die NK-Zelle, während eine Depletion von CD8- oder CD4-Zellen die zytotoxische Aktivität nicht vermindert (Nagasaki et al., 2010). Diese Arbeit benutzte jedoch eine murine MC38-Kolonkarzinom-Zelllinie als Antigen, so dass einschränkend zu sagen ist, dass im Gegensatz zur C26-Tumorzelle, die MC38-Linie einen stärkeren Effekt auf die DC-vermittelte, antigenspezifische Immunantwort hat. Ein wichtiges Zytokin hierbei ist IL-10 mit seiner immuninhibitorischen Wirkung.

Daneben kann auch, wie Steinmann et al. beschreibt, die Hemmung einer auf den Tumor gerichteten Immunantwort durch den Tumor selbst erreicht werden. Ein Fehlen einer Immunreaktion von tumorspezifischen T-Zellen und DCs wird induziert und die Toleranzinduktion im peripheren Gewebe somit imitiert. Hierbei spielen DCs eine zentrale Rolle. Das vermehrte Auftreten apoptotischer Tumorzellen kann die Toleranz

des Immunsystems gegenüber dem Tumor durchbrechen. Sofern die DC durch fremdes Antigen nicht aktiviert wird, präsentiert sie den T-Zellen anhaltend Selbstantigen nach Aufnahme aus avitalen und apoptotischen Zellen (Steinman et al., 2003). Bei einer Reaktion dieser wird ein Apoptosevorgang eingeleitet. Erst der Kontakt mit mehr Fremdanitgenen oder auch ein entsprechender Entzündungsreiz durchbricht ihre Eigenschaften der Toleranzentwicklung durch entsprechende Aktivierung der DC.

4.3.2 Toxizität der Kombinationstherapie

In der Therapie von Malignomen mit einem Chemotherapeutikum ist ein limitierender Faktor das Nebenwirkungsprofil. Dies kann neben allgemeinen körperlichen Beschwerden wie Unwohlsein, Inappetenz, Fatigue und vielen mehr auch zu ernsthaften Komplikationen aufgrund der starken Hämatotoxizität und einer damit einhergehenden Immunsuppression führen. Ein mukosaler Schaden, ebenfalls eine typische Komplikation, insbesondere von 5-FU, kann zusätzlich eine große Eintrittspforte für entsprechende Pathogene darstellen. Hierbei ist häufig eine Besiedelung mit *Candida albicans*, die auch zum Teil mit einer systemischen Infektion einhergeht. Daneben kommt es durch bakterielle Infektionen immer wieder zu schwerwiegenden Entzündungen bis hin zu septischen Krankheitsbildern. Um diese unerwünschten Nebenwirkungen zu vermeiden, ist man versucht, mit der geringsten, aber dennoch wirksamen Dosis zu arbeiten. In dieser Arbeit wurde, wie oben bereits beschrieben, eine 5-FU Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht gewählt. Hierbei zeigte sich eine fast parallel zu den unbehandelten, tumortragenden Mäusen verlaufende Gewichtskurve. Allenfalls eine geringe, nicht signifikante Gewichtsreduktion gegenüber der alleinigen Immuntherapie-Gruppe trat nach der ersten Therapieeinheit auf. Dieser Effekt wurde bei der zweiten Verabreichung bereits durch die beginnende Tumorkachexie überdeckt. Weiter wurde eine Irritation der Nahrungs- oder Flüssigkeitsaufnahme in keinem relevanten Ausmaß verzeichnet, das Verhalten war in allen Versuchsgruppen gleich.

Es gab viele Versuche, diese Nebenwirkungen der Chemotherapie mit 5-FU zu begrenzen und zu reduzieren. Es zeigt sich, dass durch das Darmmilieu selbst bereits ein Einfluss auf die mukosalen Nebenwirkungen ausgeübt wird. So kann einem mukosalen Schaden durch eine Strahleneinwirkung bereits prophylaktisch durch den Einsatz von LPS, einem TLR4-Liganden, über einen PGE2-vermittelten Mechanismus reduziert werden (Riehl et al., 2000). Einen ähnlichen Effekt bietet das *Lactobacillus*-Probiotikum als TLR2-Ligand (Ciorba et al., 2012). Über einen NF- κ B-Aktivierung wirkt

sich Flagellin und CBLB502, ein TLR5-Ligand, günstig auf einen mukosalen Strahlenschaden aus (Burdelya et al., 2008; Vijay-Kumar et al., 2008). Dennoch ist deren aller klinischer Einsatz durch die eigene Toxizität limitiert.

CpG-ODN als TLR9-Ligand kann zum einen eine Radio- und Chemotherapeutikum-Sensitivierung bewirken (Mason et al., 2006), zum anderen aber auch eine Verminderung eines Strahlenschadens (Sparwasser et al., 1999; Zhang et al., 2011). Betrachtet man die Wirkung auf hämatopoetische Vorläuferzellen (HPCs), so ist nach Gabe von CpG-ODN eine erhöhte Zahl von *Colony-forming units* (CFU) zu verzeichnen. Interessanterweise zeigte sich ein Zusammenhang mit dem murinen *Keratinocyte-derived chemokine* (mKC), welches ein funktionelles Homolog zum humanen IL-8 darstellt, bei dessen Produktion unter anderem intestinale Zellen beteiligt sind. Eine Antagonisierung von mKC durch entsprechende Antikörper vermindert den beschriebenen CpG-ODN-assoziierten Effekt auf die HPC (Nardini et al., 2005). Auch zeigen Arbeiten von Pedersen et al. und Lee et al., dass CpG-ODN via TLR9 im intestinalen Epithel zur Homöostase beitragen (Lee et al., 2007; Pedersen et al., 2005).

Inwieweit eine lokale Applikation von CpG-ODN die beschriebenen Nebenwirkungen beherrschen kann oder aber eine enterale Gabe des CpG-ODN die antitumorale Wirkung, wie in unserem Therapieprotokoll beschrieben, entfalten kann, ist noch nicht geklärt.

4.4 Das orthotope murine Colon-26-Tumormodell

4.4.1 Tumorinduktion

Dem sehr praktikablen, subkutanen C26-Tumormodell mit der oben beschriebenen therapeutischen Option der Kombination aus Immun- und Chemotherapie ist natürlich eine Grenze der Übertragbarkeit allein schon dadurch gesetzt, dass orthotope Tumore, hier also von der Darmmukosa ausgehend, eine abweichende Zellumgebung haben. Ähnlich wie im Immunsystem der Haut ist auch das darmeigene Immunsystem mit Besonderheiten ausgestattet, die einer Pathogeninvasion oder auch darmassoziierten Karzinogenen erfolgreich entgegenzutreten können. Sowohl dem Darm als auch der Haut ist eine besondere Zellpopulation, die auch als residente T-Zellen, intraepitheliale Lymphozyten bezeichnet werden, eigen. Im Vergleich zum peripheren Blut sieht man innerhalb dieser Gruppe eine deutlich höhere Anzahl an $\gamma \delta$ -T-Zellen mit einer starken Interaktionsfähigkeit zu NK-Zellen. Daneben unterscheidet sich aber auch die Zusammensetzung der DC-Subtypen je nach Organ. Ein Subtyp mit besonderer

immuninduktiver Potenz konnte nur in mukosalem, lymphatischem Gewebe identifiziert werden (Anjuere et al., 1999; Iwasaki et al., 2001). Für einen immuntherapeutischen Erfolg sind daneben auch noch die Anzahl potenter DCs entscheidend. Gravierende Unterschiede zeigen sich im Tumorrandbereich oder bei metastasierten Tumoren im Vergleich zum nicht pathologischen Darmgewebe mit einem dreimal bzw. 18-mal höherem Vorkommen (Schwaab et al., 2001).

Der Gedanke einer lokalen, immunmodulatorischen Therapie mit Verstärkung der chemotherapeutischen Wirkung konnte bereits früh in klinischen Studien mit dem Einsatz von OK-432 als bakterieller Stimulus gezeigt werden. Durch endoskopische, intratumorale Injektion des Lyophilisat aus *Streptococcus pyogenes* in das kolorektale Tumorgewebe ließ sich die Konzentration von 5-FU hierin erhöhen. Eine Invasion von Makrophagen erfolgte, was eine Stimulation des mukosalen Immunsystems darstellt (Amano et al., 2000).

Eine orthotope Tumorinduktion mit der C26-Tumorzelllinie imitiert am besten die Morphologie, das biologische Verhalten und die Umgebungsfaktoren eines kolorektalen Tumors. Untersuchungen an einem derartigen Modell scheinen für das Verständnis und den Erfolg therapeutischer Optionen unabdingbar. Wir entwickelten daher in Anlehnung an andere murine Tumormodelle ein orthotopes Tumormodell mit immunkompetenten Tieren für die C26-Tumorzelllinie (Wilmanns et al., 1992). Für die Tumorinduktion standen prinzipiell zwei Möglichkeiten zur Verfügung: die intramurale, zökale Injektion einer Tumorzell-Suspension, die zuvor *in vitro* aus einer entsprechenden Tumorzelllinie gewonnen wurde, daneben die Implantation eines *ex vivo* generierten Tumorpartikels eines subkutan induzierten Tumors der entsprechenden Linie. Hierbei erschien die Heterogenität des Tumors mit anzunehmender Kotransplantation von Stromazellen und nekrotischen Anteilen hinsichtlich der Konstanz des Modells von großem Nachteil. Insbesondere kann ein anzunehmender Verlust des Invasions- und Metastasierungspotenzials der *in vitro* generierten Tumorzellen nach mehreren Populationspassagen durch regelmäßige, unabhängige Kontrollen des Malignitätspotenzials unseres subkutanen Tumormodells ausgeschlossen werden.

Ein generelles Problem im orthotopen Modell, insbesondere mit der Fragestellung der therapeutischen Wirkung in den verschiedenen Therapieintervallen, ist sicherlich die Messung der Tumorgröße. Verschiedene Gedanken wie Ultraschall- oder Computertomographie-gestützte Diagnostik wurden überprüft, jedoch aufgrund fehlender Praktikabilität und Umsetzbarkeit wieder verlassen. Auch die *post mortem* Messung der Tumore schien nicht sinnvoll, da die notwendige Versuchstierzahl für entsprechende Studien zu groß sind. Der Einsatz eines Surrogat-Tumor wie ein

gleichzeitig subkutan induziertes C26-Malignom kann nicht für die korrekte Darstellung des Verhaltens der orthotopen Tumore herangezogen werden aufgrund lokaler Unterschiede im Immunsystem und nicht zuletzt auch auf die Therapeutika-Sensitivität (Wilmanns et al., 1992). Im Zeitraum der experimentellen Arbeit und Datenerhebung der hier gezeigten Studien war die endoskopische Technik noch nicht als Möglichkeit einer orthotopen Tumorinduktion und in der Folge einer Behandlung ausreichend etabliert. Dies hat sich jedoch zwischenzeitlich geändert. Vielversprechende Ansätze bleiben derzeit jedoch weiter experimentell, stellen jedoch für die hier zuvor etablierte Immuntherapie - es bedarf einer wiederholten peritumoralen DC- und CpG-Injektion - eine richtungsweisende Methodik dar (Becker et al., 2006; Becker et al., 2005; Bhullar et al., 2011; Donigan et al., 2009; Haughn et al., 2006).

Um bereits prätherapeutisch eine Immunstimulation zu vermeiden, war in dem hier angewandten, orthotopen Tumormodell mit einem Laparotomie-Zugang ein möglichst keimfreies Arbeiten unter sterilen Operationsbedingungen vorgesehen. Insbesondere wurde eine Verletzung des Darmes nach intraluminal sicher ausgeschlossen. Eine Kontamination mit der physiologische Darmflora hätte entsprechende immunologische Reaktionen und ggf. eine Verfälschung der Ergebnisse zur Folge. Die Wunden wurden mit sterilem Verbandsmaterial solange als möglich bedeckt, die Wundheilung erfolgte rasch und unkompliziert. Durch ein permanentes, visuelles Monitoring der Versuchstiere am operativen Tag konnte eine relevante, systemische Infektion bei normalem Verhalten ausgeschlossen werden.

Aufgrund der sehr geringen Größe des operativen Situs wurde das kleinst mögliche Besteck benützt. Insbesondere für die intramurale Zökum-Injektion der Tumorzellsuspension wurde eine Insulinspritze mit einer 30 ½ G-Injektionsnadel verwendet. Das injizierte Volumen war mit 50 µl geringst möglich. Ein bekanntes Problem hierbei ist jedoch der Austritt der Tumorzellsuspension durch den Stichkanal nach Rückzug der Kanüle und dadurch die rein technisch bedingte, erhöhte Wahrscheinlichkeit der intraperitonealen Metastasierung. Umgangen wurde diese Problematik durch einen langen, intramuralen Stichkanal und vor allem durch den Einsatz von *Matrigel*® als Suspensionsstabilisator. *Matrigel*® liegt bei 4 °C in flüssiger Form vor und ist somit gut injizierbar, geht bei Körpertemperatur sehr rasch in einen gelförmigen Zustand über. Das kommerziell erwerbliche *Matrigel*® zeigt eine sehr große Ähnlichkeit zu einer Basalmembran sowohl in seiner Struktur, Zusammensetzung und in seinen physikalischen Eigenschaften als auch in der Möglichkeit, funktionelle Charakteristika dieser *in vivo* zu bewahren (Katz et al., 1992; Kleinman et al., 1987; Kleinman et al., 1982; McGuire et al., 1989). Neben der Ähnlichkeit zu einer Basalmembran und damit günstigen Effekten auf die

Tumorinduktion ist die Zusammensetzung des *Matrigel*[®] mit einem Anteil an TGF- β und dessen immuninhibierenden Effekt unter anderem auf PDCs in *Peyer Plaques* nicht optimal (Contractor et al., 2007). Dass PDCs, wenn sie auch nur einen geringen prozentualen Anteil im Tumorgewebe neben MDCs ausmachen und durch CpG-ODN 1826 nicht in der Zahl zunehmen, jedoch zur Produktion von IFN- α - dieses hat eine starke antitumorale Wirkung im humanen System - angeregt werden können, wurde in einer folgenden Dissertation meines Kollegen Dr. Phillip Schneider gezeigt.

4.4.2 Induktion eines systemischen Immungedächtnisses mit 5-Fluorouracil.

Wie in Vorarbeiten gezeigt, wird durch die Vakzine eine langfristige, Ag-spezifische und CD8-T-Zell-vermittelte Gedächtnisantwort induziert (Heckelsmiller et al., 2002b). Diese Induktion erlischt trotz begleitender Chemotherapie mit 5-FU nicht (Bourquin et al., 2006). Diese Daten wurden jedoch an einem subkutanen Tumormodell erhoben und lassen sich, wie bereits diskutiert, nicht direkt auf die spezielle Mikroumgebung des Darmes mit seinen Eigenheiten des Immunsystems übertragen. Ferner legt eine Arbeit mit einer DNS-Vakzine nahe, dass entgegen der allgemein angenommenen CD8-T-Zell-vermittelten, antitumoralen Antwort im orthotopen Modell der Therapieerfolg doch CD4-T-Zell-vermittelt ist (Plunkett et al., 2004; Sugiura et al., 2008). Ein *pathway* hierfür scheint *Fas-FasL*-vermittelt zu sein (Sugiura et al., 2008). Dies erscheint vor allem vor dem Hintergrund der hemmenden Wirkung von CpG-ODN auf eine *HepG2*-Tumorzell-induzierte Apoptose von *Jurkat*-Zellen *in vitro* über einen *Fas-FasL-pathway* (Zheng et al., 2011) interessant. Auch das Chemotherapeutikum 5-FU erreicht eine bis zu 6-fache Steigerung der *FasL*-Proteins und somit durch den entsprechend aktivierten *pathway* eine Apoptose-Steigerung in humanen *HT29*-Kolonkarzinom-Zellen (Micheau et al., 1997). Wie bereits zuvor durch Steinmann et al. beschrieben, kann durch das vermehrte Auftreten von apoptotischen Tumorzellen die Toleranz des Immunsystems gegenüber dem Tumor durchbrochen und tolerogene Eigenschaften des Tumormilieus durch entsprechende Aktivierung der DC überwunden werden (Steinman et al., 2003). In diesem Modell zeigt sich jedoch die Gedächtnis-Antwort nach Ag-spezifischen CD8-T-Zell vermittelter Induktion, so dass entweder auch diese Art der Immunantwort oder aber eine weitere neben der CD4-T-Zell-vermittelten (Sugiura et al., 2008) bestehen muss. Hierbei können NK-Zellen eine Rolle spielen. Es wurde gezeigt, dass in einem Melanom-Modell ein Schutz vor Metastasen nach *ex vivo*-Stimulation von invarianten Natürlichen Killer T-Zellen durch α -Galactosylceramid (α GalCer) gepulsten DCs bestand, indem diese nach autologer Transplantation zu

einer verstärkten antitumoralen Antwort der NK-Zellen führten, auch unabhängig von einer gleichzeitigen α GalCer-Exposition (Molling et al., 2008). In einem anderen Tumor-Modell eines murinen GL261-Gliomas wurde durch Depletionsversuche ebenfalls eine entscheidende Rolle von NK-Zellen neben der von CD8-T-Zellen in der Langzeit-Gedächtnisantwort bewiesen (Alizadeh et al., 2010).

Für die Studien wurden aus den Vorversuchen mit der etablierten Vakzine die Tiere mit einer Komplettremission des Tumor nach 90 bis 165 Tagen in dem bereits diskutierten, orthotopen Tumormodell einer Re-Exposition mit C26-Zellen zugeführt. Hierbei wurde neben dem sterilem Setting auch auf ein tierexperimentell einwandfreies Vorgehen mit Vermeiden einer übermäßigen Belastung geachtet. Entsprechend dem subkutanen Tumormodell zeigte sich eine langfristige Gedächtnisantwort und eine daraus anzunehmende komplette Tumorremission in der posttherapeutischen Gruppe, wohingegen fast alle unbehandelten Kontroll-Tiere an dem auch im orthotopen Modell aggressiv wachsenden Tumor innerhalb von 34 bis 58 Tagen verstarben. Der Gewichtsverlauf der Versuchstiere und die kurze Überlebenszeit nach orthotoper C26-Reexposition entsprachen den des subkutanen Tumormodells.

Interessanterweise beinhaltet das für die intramurale Zökum-Injektion der Tumorzellsuspension eingesetzte *Matrigel*® das T_H1 -hemmende Zytokin TGF- β , dessen Ausschüttung die tolerogene Wirkung der Tumore auf das Immunsystem bewirkt (Alleva et al., 1994; Chouaib et al., 1997; Tada et al., 1991). Die Langzeitgedächtnisantwort scheint in diesem Setting potent genug zu sein, um den immunsuppressiven Zytokin-vermittelten Effekt zu nihilieren.

5. Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom ist eines der häufigsten Malignome in den Ländern der westlichen Welt. Neben den klassischen Therapieverfahren Operation, Chemo- und Strahlentherapie stehen mittlerweile neuere Ansätze der Immuntherapie zur Verfügung.

Eine Aufgabe der hier vorliegenden Arbeit bestand darin, in einem murinen Tumormodell den in vorausgegangenen Studien bereits gezeigten, therapeutischen Effekt einer Vakzine aus kontralateral applizierten, C26-gepulsten dendritischen Zellen und CpG-ODN 1826 sowie peritumoraler, subkutaner Injektion von CpG-ODN 1826 mit einer gleichzeitigen intraperitonealen Gabe des Chemotherapeutikums 5-Fluorouracil zu bestätigen. In der Folge sollte neben einem optimalen Therapieprotokoll ein orthotopes Tumormodell mit einem Organ-spezifischen Umgebungsmilieu etabliert werden.

In einem ersten Schritt wurde die für die genannte Fragestellung optimale Dosis des Chemotherapeutikums 5-Fluorouracil mit einer angemessenen antitumoralen Wirksamkeit bei gleichzeitig geringst möglichem Nebenwirkungsprofil, hier gemessen am Gewichtsverlauf, ermittelt. Hierdurch sollte die immunsuppressive Wirkung einer Chemotherapie als eine wesentliche Beeinflussung der Vakzine minimiert bzw. sogar ein potenzieller immunmodulatorischer Effekt des Chemotherapeutikums dargestellt werden. Es fand sich eine Dosierung von 25 mg/kg Körpergewicht als im ersten Behandlungszyklus noch wirksam gemessen an dem Parameter Tumorgroße. Jedoch blieb bei dieser Dosierung ein positiver Effekt auf das Überleben aus. Das Gewichtsverhalten als ein Indikator für unerwünschte Wirkungen der Therapie zeigte keinen signifikanten Unterschied zur unbehandelten Kontrollgruppe. Die so ermittelte Dosierung wurde nochmals aufgrund verschiedener Überlegungen am Mausmodell geringfügig reduziert, unter anderem um die immunsuppressive Wirkung der Chemotherapie auf die immuntherapeutische Komponente der Kombinationstherapie zu minimieren.

Die etablierte Chemotherapie wurde in verschiedenen Ansätzen mit der Vakzine kombiniert. Diese Kombinationstherapie führte zu einer signifikanten Verbesserung des Überlebens im Vergleich zu der unbehandelten Gruppe, zur Chemotherapie alleine und zur bereits sehr effektiven Vakzine allein. Weiter stellte sich die erste Therapieeinheit am Tag 14 nach Tumorinduktion als die Entscheidende heraus. Eine Erklärung bieten die Beteiligung von Natürlichen Killer Zellen, ein eigener immunmodulatorischer Effekt von 5-Fluorouracil sowie ein gegenseitiges günstiges Beeinflussen der Chemotherapie

und der Vakzine. Hierfür wurden in der vorliegenden Arbeit keine Untersuchungen getätigt. Durch verschiedene Publikationen anderer Arbeitsgruppen wurde dies in der Zeit nach meiner Datenerhebung jedoch belegt.

Ein wesentlicher Bestandteil eines effektiven Immunsystems ist die Entwicklung einer Immungedächtnisantwort, die bereits für die Vakzine bestätigt werden konnte. In der vorliegenden Arbeit war ein negativer Einfluss hierauf durch den Einsatz der kombinierten Chemotherapie nicht darzustellen. Dies kann entweder aufgrund des definitiven Fehlens eines negativen oder aber Vorhandenseins eines kompensierenden Chemotherapie-Effektes zustande kommen. Zur Klärung der Frage ist eine Quantifizierung der CD8-abhängigen T-Zell-Antwort notwendig. Ein orthotopes Tumormodell hat für die entsprechende Tumorentität eine höhere Organspezifität und kann somit die verschiedenen Beziehungen exakter abbilden. Ein erster Transfer der durch die Vakzine etablierten Immungedächtnisantwort in ein solches orthotopes Tumormodell erfolgte. Die Frage nach dem Einfluss der Chemotherapie auf die Vakzine-Behandlung in diesem orthotopen Tumormodell war nicht Teil der Untersuchung, ist jedoch aufgrund der Chemotherapie-Sensitivität des Intestinums mit eventuell erhöhtem Nebenwirkungsprofil von Interesse und müsste in weiteren Versuchen geklärt werden.

Wie diese Arbeit zeigt, ist ein multimodaler Ansatz, bestehend aus klassischen Chemotherapeutika und Antigen-spezifischen, CpG-modulierten Strategien der zellbasierten Vakzine in der Tumorthherapie eines experimentellen Kolonkarzinoms wirksam. Die Befunde können zur Translation dieser experimentellen Kombinationstherapie in die klinische Anwendung beitragen.

6. Literaturverzeichnis

- Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000; 406:782-7.
- Adler AJ, Marsh DW, Yochum GS, Guzzo JL, Nigam A, Nelson WG, Pardoll DM. CD4+ T cell tolerance to parenchymal self-antigens requires presentation by bone marrow-derived antigen-presenting cells. *J Exp Med* 1998; 187:1555-64.
- Akira S. [Toll-like receptors and innate immune system]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 2001; 46:562-6.
- Alizadeh D, Zhang L, Brown CE, Farrukh O, Jensen MC, Badie B. Induction of anti-glioma natural killer cell response following multiple low-dose intracerebral CpG therapy. *Clin Cancer Res* 2010; 16:3399-408.
- Allegra C GJ. Antimetabolites. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds). *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 5th Edition. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA. 1997; 432-52.
- Alleva DG, Burger CJ, Elgert KD. Tumor-induced regulation of suppressor macrophage nitric oxide and TNF-alpha production. Role of tumor-derived IL-10, TGF-beta, and prostaglandin E2. *J Immunol* 1994; 153:1674-86.
- Amano M, Sekimoto M, Monden T, Tomita N, Ohue M, Haba A, Sakita I, Tamaki Y, Monden M. Selective augmentations of intratumoral 5-fluorouracil concentration by local immunotherapy with OK-432 and fibrinogen. *Dis Colon Rectum* 2000; 43:402-7.
- Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 2004; 350:2343-51.
- Anjuere F, Martin P, Ferrero I, Fraga ML, del Hoyo GM, Wright N, Ardavin C. Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse. *Blood* 1999; 93:590-8.
- Ballas ZK, Rasmussen WL, Krieg AM. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol* 1996; 157:1840-5.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:767-811.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392:245-52.
- Barton GM, Medzhitov R. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2002; 14:380-3.
- Bauer M, Redecke V, Ellwart JW, Scherer B, Kremer JP, Wagner H, Lipford GB. Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells. *J Immunol* 2001a; 166:5000-7.
- Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001b; 98:9237-42.
- Becker C, Fantini MC, Neurath MF. High resolution colonoscopy in live mice. *Nature protocols* 2006; 1:2900-4.

- Becker C, Fantini MC, Wirtz S, Nikolaev A, Kiesslich R, Lehr HA, Galle PR, Neurath MF. In vivo imaging of colitis and colon cancer development in mice using high resolution chromoendoscopy. *Gut* 2005; 54:950-4.
- Bell D, Chomarot P, Broyles D, Netto G, Harb GM, Lebecque S, Valladeau J, Davoust J, Palucka KA, Banchereau J. In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med* 1999; 190:1417-26.
- Belvin MP, Anderson KV. A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996; 12:393-416.
- Bendigs S, Salzer U, Lipford GB, Wagner H, Heeg K. CpG-oligodeoxynucleotides co-stimulate primary T cells in the absence of antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 1999; 29:1209-18.
- Bergmann-Leitner ES, Abrams SI. 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* 2001; 50:445-55.
- Bhullar JS, Subhas G, Silberberg B, Tilak J, Andrus L, Decker M, Mittal VK. A novel nonoperative orthotopic colorectal cancer murine model using electrocoagulation. *J Am Coll Surg* 2011; 213:54- 60; discussion -1.
- Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med* 1996; 184:465-72.
- Bohle B, Jahn-Schmid B, Maurer D, Kraft D, Ebner C. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs induce IL-12, IL-18 and IFN-gamma production in cells from allergic individuals and inhibit IgE synthesis in vitro. *Eur J Immunol* 1999; 29:2344-53.
- 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; 118:2790-5.
- Brunner C, Seiderer J, Schlamp A, Bidlingmaier M, Eigler A, Haimerl W, Lehr HA, Krieg AM, Hartmann G, Endres S. 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* 2000; 165:6278-86.
- Burdelya LG, Krivokrysenko VI, Tallant TC, Strom E, Gleiberman AS, Gupta D, Kurnasov OV, Fort FL, Osterman AL, Didonato JA et al. An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models. *Science* 2008; 320:226-30.
- Busch. Niederrheinische Gesellschaft für Natur- und Heilkunde in Bonn. Aus der Sitzung der medizinischen Section vom 13. November 1867. *Berliner Klinische Wochenschrift* 23. März 1868; S. 137 f.
- Candido KA, Shimizu K, McLaughlin JC, Kunkel R, Fuller JA, Redman BG, Thomas EK, Nickoloff BJ, Mule JJ. Local administration of dendritic cells inhibits established breast tumor growth: implications for apoptosis-inducing agents. *Cancer Res* 2001; 61:228-36.
- Carpentier AF, Chen L, Maltonti F, Delattre JY. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice. *Cancer Res* 1999; 59:5429-32.
- Carpentier AF, Xie J, Mokhtari K, Delattre JY. Successful treatment of intracranial gliomas in rat by oligodeoxynucleotides containing CpG motifs. *Clin Cancer Res* 2000; 6:2469-73.

- Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Durand I, Cella M, Lanzavecchia A, Banchereau J. 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* 1997; 90:1458-70.
- Chace JH, Hooker NA, Mildenstein KL, Krieg AM, Cowdery JS. Bacterial DNA-induced NK cell IFN-gamma production is dependent on macrophage secretion of IL-12. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 84:185-93.
- Chaux P, Hammann A, Martin F, Martin M. Surface phenotype and functions of tumor-infiltrating dendritic cells: CD8 expression by a cell subpopulation. *Eur J Immunol* 1993; 23:2517-25.
- Chelvarajan RL, Raithatha R, Venkataraman C, Kaul R, Han SS, Robertson DA, Bondada S. CpG oligodeoxynucleotides overcome the unresponsiveness of neonatal B cells to stimulation with the thymus-independent stimuli anti-IgM and TNP-Ficoll. *Eur J Immunol* 1999; 29:2808-18.
- Chen G, Emens LA. Chemoimmunotherapy: reengineering tumor immunity. *Cancer Immunol Immunother* 2013; 62:203-16.
- Chiodoni C, Paglia P, Stoppacciaro A, Rodolfo M, Parenza M, Colombo MP. Dendritic cells infiltrating tumors cotransduced with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and CD40 ligand genes take up and present endogenous tumor-associated antigens, and prime naive mice for a cytotoxic T lymphocyte response. *J Exp Med* 1999; 190:125-33.
- Chouaib S, Asselin-Paturel C, Mami-Chouaib F, Caignard A, Blay JY. The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction. *Immunology today* 1997; 18:493-7.
- Chu RS, Targoni OS, Krieg AM, Lehmann PV, Harding CV. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med* 1997; 186:1623-31.
- Chuang T, Ulevitch RJ. Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1518:157-61.
- Ciorba MA, Riehl TE, Rao MS, Moon C, Ee X, Nava GM, Walker MR, Marinshaw JM, Stappenbeck TS, Stenson WF. Lactobacillus probiotic protects intestinal epithelium from radiation injury in a TLR-2/cyclo-oxygenase-2-dependent manner. *Gut* 2012; 61:829-38.
- Coley WB. II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Ann Surg* 1891; 14:199-220.
- Collins JM, Dedrick RL, King FG, Speyer JL, Myers CE. Nonlinear pharmacokinetic models for 5-fluorouracil in man: intravenous and intraperitoneal routes. *Clin Pharmacol Ther* 1980; 28:235-46.
- Contractor N, Louten J, Kim L, Biron CA, Kelsall BL. Cutting edge: Peyer's patch plasmacytoid dendritic cells (pDCs) produce low levels of type I interferons: possible role for IL-10, TGFbeta, and prostaglandin E2 in conditioning a unique mucosal pDC phenotype. *J Immunol* 2007; 179:2690-4.
- Correale P, Aquino A, Giuliani A, Pellegrini M, Micheli L, Cusi MG, Nencini C, Petrioli R, Prete SP, De Vecchis L et al. 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* 2003; 104:437-45.
- Cowdery JS, Chace JH, Yi AK, Krieg AM. Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *J Immunol* 1996; 156:4570-5.

- Davis HL, Suparto, II, Weeratna RR, Jumintarto, Iskandriati DD, Chamzah SS, Ma'ruf AA, Nente CC, Pawitri DD, Krieg AM et al. CpG DNA overcomes hyporesponsiveness to hepatitis B vaccine in orangutans. *Vaccine* 2000; 18:1920-4.
- Davis HL, Weeratna R, Waldschmidt TJ, Tygrett L, Schorr J, Krieg AM. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol* 1998; 160:870-6.
- Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 2001; 193:233-8.
- Diasio RB, Harris BE. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin Pharmacokinet* 1989; 16:215-37.
- Donigan M, Norcross LS, Aversa J, Colon J, Smith J, Madero-Visbal R, Li S, McCollum N, Ferrara A, Gallagher JT et al. Novel murine model for colon cancer: non-operative trans-anal rectal injection. *J Surg Res* 2009; 154:299-303.
- Dow SW, Fradkin LG, Liggitt DH, Willson AP, Heath TD, Potter TA. Lipid-DNA complexes induce potent activation of innate immune responses and antitumor activity when administered intravenously. *J Immunol* 1999; 163:1552-61.
- Dummer W, Becker JC, Schwaaf A, Leverkus M, Moll T, Brocker EB. Elevated serum levels of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma. *Melanoma Res* 1995; 5:67-8.
- Eckstein F. Nucleoside phosphorothioates. *Annu Rev Biochem* 1985; 54:367-402.
- Elkins KL, Rhinehart-Jones TR, Stibitz S, Conover JS, Klinman DM. Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria. *J Immunol* 1999; 162:2291-8.
- Enk AH, Jonuleit H, Saloga J, Knop J. Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 1997; 73:309-16.
- Enk AH, Saloga J, Becker D, M BPM, Knop J. Induction of hapten-specific tolerance by interleukin 10 in vivo. *J Exp Med* 1994; 179:1397-402.
- Facchetti F, de Wolf-Peeters C, Mason DY, Pulford K, van den Oord JJ, Desmet VJ. Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin. *Am J Pathol* 1988; 133:15-21.
- Feller AC, Lennert K, Stein H, Bruhn HD, Wuthe HH. Immunohistology and aetiology of histiocytic necrotizing lymphadenitis. Report of three instructive cases. *Histopathology* 1983; 7:825-39.
- Finan PJ, Chisholm EM, Woodhouse L, Giles GR. The relationship between plasma pharmacokinetics and tissue metabolites of 5-fluorouracil (5-FU) in patients with colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 1987; 13:349-53.
- Folprecht G, Kohne CH. The role of new agents in the treatment of colorectal cancer. *Oncology* 2004; 66:1-17.
- Fong L, Engleman EG. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:245-73.
- Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2:1096-103.
- Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 1999; 5:1249-55.

- Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, Parcellier A, Cathelin D, Garrido C, Chauffert B, Solary E, Bonnotte B, Martin F. 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* 2004; 34:336-44.
- Gong J, Avigan D, Chen D, Wu Z, Koido S, Kashiwaba M, Kufe D. Activation of antitumor cytotoxic T lymphocytes by fusions of human dendritic cells and breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:2715-8.
- Gong J, Chen D, Kashiwaba M, Kufe D. Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Nat Med* 1997; 3:558-61.
- Grouard G, Riscoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 1997; 185:1101-11.
- Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:621-67.
- Gursel M, Verthelyi D, Gursel I, Ishii KJ, Klinman DM. Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligodeoxynucleotide. *J Leukoc Biol* 2002; 71:813-20.
- Han J, Zhu Z, Hsu C, Finley WH. Selection of antisense oligonucleotides on the basis of genomic frequency of the target sequence. *Antisense Res Dev* 1994; 4:53-65.
- Hanna MG, Jr., Hoover HC, Jr., Vermorken JB, Harris JE, Pinedo HM. Adjuvant active specific immunotherapy of stage II and stage III colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: first randomized phase III trials show promise. *Vaccine* 2001; 19:2576-82.
- Harris J, Sengar D, Stewart T, Hyslop D. The effect of immunosuppressive chemotherapy on immune function in patients with malignant disease. *Cancer* 1976; 37:1058-69.
- Harris JE, Ryan L, Hoover HC, Jr., Stuart RK, Oken MM, Benson AB, 3rd, Mansour E, Haller DG, Manola J, Hanna MG, Jr. Adjuvant active specific immunotherapy for stage II and III colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: Eastern Cooperative Oncology Group Study E5283. *J Clin Oncol* 2000; 18:148-57.
- Hartmann G, Krieg AM. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* 2000a; 164:944-53.
- Hartmann G, Krieg AM. CpG DNA and LPS induce distinct patterns of activation in human monocytes. *Gene Ther* 1999a; 6:893-903.
- Hartmann G, Weeratna RD, Ballas ZK, Payette P, Blackwell S, Suparto I, Rasmussen WL, Waldschmidt M, Sajuthi D, Purcell RH et al. Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 2000b; 164:1617-24.
- Hartmann G, Weiner GJ, Krieg AM. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999b; 96:9305-10.
- Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988; 52:269-79.
- Haughn C, Uchal M, Raftopoulos Y, Rossi S, Santucci T, Torpey M, Pollice A, Yavuz Y, Marvik R, Bergamaschi R. Development of a total colonoscopy rat model with endoscopic submucosal injection of the cecal wall. *Surgical endoscopy* 2006; 20:270-3.

- Heckelsmiller K, Beck S, Rall K, Sipos B, Schlamp A, Tuma E, Rothenfusser S, Endres S, Hartmann G. Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy. *Eur J Immunol* 2002a; 32:3235-45.
- Heckelsmiller K, Rall K, Beck S, Schlamp A, Seiderer J, Jahrsdorfer B, Krug A, Rothenfusser S, Endres S, Hartmann G. 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* 2002b; 169:3892-9.
- Heeg K, Sparwasser T, Lipford GB, Hacker H, Zimmermann S, Wagner H. Bacterial DNA as an evolutionary conserved ligand signalling danger of infection to immune cells. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17:464-9.
- Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P, Mooren D, Griesbach L, Duschinsky R, Schnitzer RJ, Plevin E, Scheiner J. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature* 1957; 179:663-6.
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408:740-5.
- Hornig T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 2002; 420:329-33.
- Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002; 168:4531-7.
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350:2335-42.
- Iho S, Yamamoto T, Takahashi T, Yamamoto S. Oligodeoxynucleotides containing palindrome sequences with internal 5'-CpG-3' act directly on human NK and activated T cells to induce IFN-gamma production in vitro. *J Immunol* 1999; 163:3642-52.
- Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1992; 176:1693-702.
- Inaba K, Pack M, Inaba M, Sakuta H, Isdell F, Steinman RM. High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J Exp Med* 1997; 186:665-72.
- Ito M, Minamiya Y, Kawai H, Saito S, Saito H, Nakagawa T, Imai K, Hirokawa M, Ogawa J. Tumor-derived TGFbeta-1 induces dendritic cell apoptosis in the sentinel lymph node. *J Immunol* 2006; 176:5637-43.
- Ito T, Inaba M, Inaba K, Toki J, Sogo S, Iguchi T, Adachi Y, Yamaguchi K, Amakawa R, Valladeau J et al. A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. *J Immunol* 1999; 163:1409-19.
- Iwasaki A, Kelsall BL. Unique functions of CD11b+, CD8 alpha+, and double-negative Peyer's patch dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166:4884-90.
- Jahrsdorfer B, Hartmann G, Racila E, Jackson W, Muhlenhoff L, Meinhardt G, Endres S, Link BK, Krieg AM, Weiner GJ. CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens. *J Leukoc Biol* 2001; 69:81-8.

- Jakob T, Walker PS, Krieg AM, Udey MC, Vogel JC. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J Immunol* 1998; 161:3042-9.
- Jehle EC, Bokemeyer C, Budach W, et al.. Kolonkarzinome, Rektumkarzinom, Analkarzinom. *Interdisziplinäres Tumorzentrum der Eberhard-Karls-Universität Tübingen* 2003.
- Kadowaki N, Antonenko S, Liu YJ. Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c- type 2 dendritic cell precursors and CD11c+ dendritic cells to produce type I IFN. *J Immunol* 2001; 166:2291-5.
- Kaiser N. Einschluss von 5-Fluorouracil (5-FU) in vesikuläre Phospholipidgele: in vitro und in vivo Untersuchungen zur Stabilität, Pharmakokinetik und antitumoralen Wirksamkeit (Dissertation). Freiburg: Albert-Ludwigs-Universität 2003.
- Kaisho T, Takeuchi O, Kawai T, Hoshino K, Akira S. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166:5688-94.
- Katz MA, Barrette T, Krasovich M. Hydraulic conductivity of basement membrane with computed values for fiber radius and void volume ratio. *A J Physiol* 1992; 263:H1417-21.
- Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999; 11:115-22.
- Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt PF, Sato S, Hoshino K, Akira S. 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* 2001; 167:5887-94.
- Kim HS, Park HM, Park JS, Sohn HJ, Kim SG, Kim HJ, Oh ST, Kim TG. Dendritic cell vaccine in addition to FOLFIRI regimen improve antitumor effects through the inhibition of immunosuppressive cells in murine colorectal cancer model. *Vaccine* 2010; 28:7787-96.
- Kleinman HK, Graf J, Iwamoto Y, Kitten GT, Ogle RC, Sasaki M, Yamada Y, Martin GR, Luckenbill-Edds L. Role of basement membranes in cell differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 1987; 513:134-45.
- Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, Robey PG, Tryggvason K, Martin GR. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* 1982; 21:6188-93.
- Kline JN, Waldschmidt TJ, Businga TR, Lemish JE, Weinstock JV, Thorne PS, Krieg AM. Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol* 1998; 160:2555-9.
- Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:2879-83.
- Koido S, Kashiwaba M, Chen D, Gendler S, Kufe D, Gong J. Induction of antitumor immunity by vaccination of dendritic cells transfected with MUC1 RNA. *J Immunol* 2000; 165:5713-9.
- Kranzer K, Bauer M, Lipford GB, Heeg K, Wagner H, Lang R. CpG-oligodeoxynucleotides enhance T-cell receptor-triggered interferon-gamma production and up-regulation of CD69 via induction of antigen-presenting cell-derived interferon type I and interleukin-12. *Immunology* 2000; 99:170-8.
- Krieg AM. An innate immune defense mechanism based on the recognition of CpG motifs in microbial DNA. *J Lab Clin Med* 1996; 128:128-33.

- Krieg AM, Love-Homan L, Yi AK, Harty JT. CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge. *J Immunol* 1998a; 161:2428-34.
- Krieg AM, Wu T, Weeratna R, Efler SM, Love-Homan L, Yang L, Yi AK, Short D, Davis HL. Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998b; 95:12631-6.
- Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995; 374:546-9.
- Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdorfer B, Blackwell S, Ballas ZK, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001a; 31:2154-63.
- Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg AM et al. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* 2001b; 31:3026-37.
- Kufe DW. Smallpox, polio and now a cancer vaccine? *Nat Med* 2000; 6:252-3.
- Kuramoto E, Yano O, Kimura Y, Baba M, Makino T, Yamamoto S, Yamamoto T, Kataoka T, Tokunaga T. Oligonucleotide sequences required for natural killer cell activation. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83:1128-31.
- Lauw FN, Caffrey DR, Golenbock DT. Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. *Trends Immunol* 2005; 26:509-11.
- Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 2002; 416:603-7.
- Lee J, Mo JH, Shen C, Rucker AN, Raz E. Toll-like receptor signaling in intestinal epithelial cells contributes to colonic homeostasis. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23:27-31.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86:973-83.
- Lennert K, Remmele W. [Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinoblasts, lymphoblasts & lymphocytes. *Acta Haematol* 1958; 19:99-113.
- Lipford GB, Bauer M, Blank C, Reiter R, Wagner H, Heeg K. CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. *Eur J Immunol* 1997a; 27:2340-4.
- Lipford GB, Bendigs S, Heeg K, Wagner H. Poly-guanosine motifs costimulate antigen-reactive CD8 T cells while bacterial CpG-DNA affect T-cell activation via antigen-presenting cell-derived cytokines. *Immunology* 2000a; 101:46-52.
- Lipford GB, Sparwasser T, Bauer M, Zimmermann S, Koch ES, Heeg K, Wagner H. Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines. *Eur J Immunol* 1997b; 27:3420-6.
- Lipford GB, Sparwasser T, Zimmermann S, Heeg K, Wagner H. CpG-DNA-mediated transient lymphadenopathy is associated with a state of Th1 predisposition to antigen-driven responses. *J Immunol* 2000b; 165:1228-35.
- Lipp H-P. Adjuvante und palliative Therapie des Kolonkarzinoms. *Krankenhauspharmazie* 1999; 20. Jahrgang:414-34.

- Lucas AD, Halliday GM. Progressor but not regressor skin tumours inhibit Langerhans' cell migration from epidermis to local lymph nodes. *Immunology* 1999; 97:130-7.
- Machiels JP, Reilly RT, Emens LA, Ercolini AM, Lei RY, Weintraub D, Okoye FI, Jaffee EM. 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* 2001; 61:3689-97.
- Markasz L, Skribek H, Uhlin M, Otvos R, Flaberg E, Eksborg S, Olah E, Stuber G, Szekely L. Effect of frequently used chemotherapeutic drugs on cytotoxic activity of human cytotoxic T-lymphocytes. *J Immunother* 2008; 31:283-93.
- Markowicz S, Walewski J, Zajda K, Wiechno PJ, Skurzak HM, Giermek J, Gajkowska A, Krzakowski M, Pienkowski T. Recovery of dendritic cell counts and function in peripheral blood of cancer patients after chemotherapy. *Cytokines Cell Mol Ther* 2002; 7:15-24.
- Mason KA, Neal R, Hunter N, Ariga H, Ang K, Milas L. CpG oligodeoxynucleotides are potent enhancers of radio- and chemoresponses of murine tumors. *Radiother Oncol* 2006; 80:192-8.
- Matzinger P. An innate sense of danger. *Semin Immunol* 1998; 10:399-415.
- McGuire PG, Seeds NW. The interaction of plasminogen activator with a reconstituted basement membrane matrix and extracellular macromolecules produced by cultured epithelial cells. *J Cell Biochem* 1989; 40:215-27.
- McLellan AD, Starling GC, Williams LA, Hock BD, Hart DN. Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 co-stimulatory molecule. *Eur J Immunol* 1995; 25:2064-8.
- Medzhitov R. CpG DNA: security code for host defense. *Nat Immunol* 2001; 2:15-6.
- Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997a; 9:4-9.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997b; 388:394-7.
- Messina JP, Gilkeson GS, Pisetsky DS. Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *J Immunol* 1991; 147:1759-64.
- Messina JP, Gilkeson GS, Pisetsky DS. The influence of DNA structure on the in vitro stimulation of murine lymphocytes by natural and synthetic polynucleotide antigens. *Cell Immunol* 1993; 147:148-57.
- Micheau O, Solary E, Hammann A, Martin F, Dimanche-Boitrel MT. Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to fas-mediated cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:783-9.
- Mokyr MB, Dray S. Interplay between the toxic effects of anticancer drugs and host antitumor immunity in cancer therapy. *Cancer Invest* 1987; 5:31-8.
- Moldoveanu Z, Love-Homan L, Huang WQ, Krieg AM. CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus. *Vaccine* 1998; 16:1216-24.
- Molling JW, Moreno M, de Groot J, van der Vliet HJ, von Blumberg BM, van den Eertwegh AJ, Scheper RJ, Bontkes HJ. Chronically stimulated mouse invariant NKT cell lines have a preserved capacity to enhance protection against experimental tumor metastases. *Immunol Lett* 2008; 118:36-43.

- Nagasaki E, Takahara A, Koido S, Sagawa Y, Aiba K, Tajiri H, Yagita H, Homma S. Combined treatment with dendritic cells and 5-fluorouracil elicits augmented NK cell-mediated antitumor activity through the tumor necrosis factor-alpha pathway. *J Immunother* 2010; 33:467-74.
- Naguib FN, el Kouni MH, Cha S. Enzymes of uracil catabolism in normal and neoplastic human tissues. *Cancer Res* 1985; 45:5405-12.
- Nardini E, Morelli D, Aiello P, Besusso D, Calcaterra C, Mariani L, Palazzo M, Vecchi A, Paltrinieri S, Menard S et al. CpG-oligodeoxynucleotides induce mobilization of hematopoietic progenitor cells into peripheral blood in association with mouse KC (IL-8) production. *J Cell Physiol* 2005; 204:889-95.
- Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998; 4:328-32.
- O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, Swiggard WJ, Betjes M, Bhardwaj N, Steinman RM. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 1994; 82:487-93.
- Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 2000; 164:558-61.
- Okamoto M, Kasetani H, Kaji R, Goda H, Ohe G, Yoshida H, Sato M. cis-Diamminedichloroplatinum and 5-fluorouracil are potent inducers of the cytokines and natural killer cell activity in vivo and in vitro. *Cancer Immunol Immunother* 1998; 47:233-41.
- Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF, 3rd. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2001; 276:10229-33.
- Olweus J, BitMansour A, Warnke R, Thompson PA, Carballido J, Picker LJ, Lund-Johansen F. Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:12551-6.
- Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 2003; 4:161-7.
- Pedersen G, Andresen L, Matthiessen MW, Rask-Madsen J, Brynskov J. Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium. *Clin Ex Immunol* 2005; 141:298-306.
- Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2002; 14:123-8.
- Peters GJ, Lankelma J, Kok RM, Noordhuis P, van Groeningen CJ, van der Wilt CL, Meyer S, Pinedo HM. Prolonged retention of high concentrations of 5-fluorouracil in human and murine tumors as compared with plasma. *Cancer Chemother Pharmacol* 1993; 31:269-76.
- Pitot HC, Goldberg RM. Future directions in adjuvant therapy for stage III colon carcinoma. *Oncology (Williston Park, NY)* 2001; 15:31-6.
- Pizzorno G, Handschumacher RE, Cheng YC. Pyrimidine and Purine Antimetabolites. In: Holland JF, Frei E, Bast RC, Kufe DW, Morton D. L., Weichselbaum RR, (eds.) *Cancer Medicine*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1997:924-48.
- Plunkett T, Graham R, Correa I, Sewell R, Miles D, Burchell J, Taylor-Papadimitriou J. Protection against MUC1 expressing mouse tumours by intra-muscular injection of MUC1 cDNA requires functional CD8+ and CD4+ T cells but does not require the MUC1 tandem repeat domain. *Int J Cancer* 2004; 109:691-7.

- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282:2085-8.
- Rankin R, Pontarollo R, Ioannou X, Krieg AM, Hecker R, Babiuk LA, van Drunen Littelvan den Hurk S. CpG motif identification for veterinary and laboratory species demonstrates that sequence recognition is highly conserved. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2001; 11:333-40.
- Redford TW, Yi AK, Ward CT, Krieg AM. Cyclosporin A enhances IL-12 production by CpG motifs in bacterial DNA and synthetic oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 1998; 161:3930-5.
- Reise Sousa C, Hieny S, Scharon-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, Sher A. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med* 1997; 186:1819-29.
- Reyes P. The synthesis of 5-fluorouridine 5'-phosphate by a pyrimidine phosphoribosyltransferase of mammalian origin. I. Some properties of the enzyme from P1534J mouse leukemic cells. *Biochemistry* 1969; 8:2057-62.
- Riehl T, Cohn S, Tessner T, Schloemann S, Stenson WF. Lipopolysaccharide is radioprotective in the mouse intestine through a prostaglandin-mediated mechanism. *Gastroenterology* 2000; 118:1106-16.
- Rieser C, Ramoner R, Holtl L, Rogatsch H, Papesh C, Stenzl A, Bartsch G, Thurnher M. Mature dendritic cells induce T-helper type-1-dominant immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Urol Int* 1999; 63:151-9.
- Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:588-93.
- Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994; 180:83-93.
- Rosenberg SA, Yang JC, White DE, Steinberg SM. Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response. *Ann Surg* 1998; 228:307-19.
- Rudy BC, Senkowski BZ. Fluorouracil. In: Florey K, (ed.) Analytical Profiles of Drug Substances. New York: Academic Press; 1973:221-44.
- Rutman RJ, Cantarow A, Paschkis KE. Studies in 2-acetylaminofluorene carcinogenesis. III. The utilization of uracil-2-C14 by preneoplastic rat liver and rat hepatoma. *Cancer Res* 1954; 14:119-23.
- Salup RR, Herberman RB, Chirigos MA, Back T, Wiltrout RH. Therapy of peritoneal murine cancer with biological response modifiers. *Journal of immunopharmacology* 1985; 7:417-36.
- Santi DV, McHenry CS, Sommer H. Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. *Biochemistry* 1974; 13:471-81.
- Schalhorn A, Kolligs F, Tympner C, et al. e. Kolonkarzinom. In: Sandler A (ed.) Manual Gastrointestinale Tumore. 7. Auflage. München: Tumorzentrum München; W. Zuckschwerdt Verlag; 2006:117-60.
- Schetter C. Recent progress in the understanding and clinical development of immunostimulatory oligonucleotides. In: Foundation WotPM, ed. Therapeutic oligonucleotides in drug development. Berlin: Berlin-Brandenburg Academy of Sciences; 2003.

- Schuler G, Steinman RM. Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors. *J Exp Med* 1997; 186:1183-7.
- Schwaab T, Weiss JE, Schned AR, Barth Jr RJ. Dendritic Cell Infiltration in Colon Cancer. *J Immunother* 2001; 24:130-7.
- Schwartz PM, Moir RD, Hyde CM, Turek PJ, Handschumacher RE. Role of uridine phosphorylase in the anabolism of 5-fluorouracil. *Biochemical pharmacology* 1985; 34:3585-9.
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001; 410:1107-11.
- Shimizu K, Fields RC, Giedlin M, Mule JJ. Systemic administration of interleukin 2 enhances the therapeutic efficacy of dendritic cell-based tumor vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:2268-73.
- Shortman K, Heath WR. Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells. *Nat Immunol* 2001; 2:988-9.
- Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:151-61.
- Sparwasser T, Hultner L, Koch ES, Luz A, Lipford GB, Wagner H. Immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides cause extramedullary murine hemopoiesis. *J Immunol* 1999; 162:2368-74.
- Sparwasser T, Lipford GB. Consequences of bacterial CpG DNA-driven activation of antigen-presenting cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000a; 247:59-75.
- Sparwasser T, Vabulas RM, Villmow B, Lipford GB, Wagner H. Bacterial CpG-DNA activates dendritic cells in vivo: T helper cell-independent cytotoxic T cell responses to soluble proteins. *Eur J Immunol* 2000b; 30:3591-7.
- Spits H, Couwenberg F, Bakker AQ, Weijer K, Uittenbogaart CH. Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2. *J Exp Med* 2000; 192:1775-84.
- Steinbrink K, Jonuleit H, Muller G, Schuler G, Knop J, Enk AH. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 1999; 93:1634-42.
- Steinbrink K, Wolf M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 1997; 159:4772-80.
- Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:271-96.
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:685-711.
- Storer JB. Longevity and gross pathology at death in 22 inbred mouse strains. *J Gerontol* 1966; 21:404-9.
- Sugiura D, Aida S, Denda-Nagai K, Takeda K, Kamata-Sakurai M, Yagita H, Irimura T. Differential effector mechanisms induced by vaccination with MUC1 DNA in the rejection of colon carcinoma growth at orthotopic sites and metastases. *Cancer Sci* 2008; 99:2477-84.
- Sun S, Cai Z, Langlade-Demoyen P, Kosaka H, Brunmark A, Jackson MR, Peterson PA, Sprent J. Dual function of Drosophila cells as APCs for naive CD8+ T cells: implications for tumor immunotherapy. *Immunity* 1996; 4:555-64.
- Sun S, Zhang X, Tough DF, Sprent J. Type I interferon-mediated stimulation of T cells by CpG DNA. *J Exp Med* 1998; 188:2335-42.

- Svensson M, Stockinger B, Wick MJ. Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. *J Immunol* 1997; 158:4229-36.
- Tada T, Ohzeki S, Utsumi K, Takiuchi H, Muramatsu M, Li XF, Shimizu J, Fujiwara H, Hamaoka T. Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state. *J Immunol* 1991; 146:1077-82.
- Tanaka F, Yamaguchi H, Ohta M, Mashino K, Sonoda H, Sadanaga N, Inoue H, Mori M. Intratumoral injection of dendritic cells after treatment of anticancer drugs induces tumor-specific antitumor effect in vivo. *Int J Cancer* 2002; 101:265-9.
- Tatsumi T, Takehara T, Kanto T, Miyagi T, Kuzushita N, Sugimoto Y, Jinushi M, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M et al. Administration of interleukin-12 enhances the therapeutic efficacy of dendritic cell-based tumor vaccines in mouse hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61:7563-7.
- Tebbutt NC, Cattell E, Midgley R, Cunningham D, Kerr D. Systemic treatment of colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2002; 38:1000-15.
- Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, Furutani Y, Yano O, Kataoka T, Sudo T et al. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst* 1984; 72:955-62.
- Tokunaga T, Yamamoto S, Namba K. 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* 1988; 79:682-6.
- Tokunaga T, Yamamoto T, Yamamoto S. How BCG led to the discovery of immunostimulatory DNA. *Jpn J Infect Dis* 1999; 52:1-11.
- Tong Y, Song W, Crystal RG. Combined intratumoral injection of bone marrow-derived dendritic cells and systemic chemotherapy to treat pre-existing murine tumors. *Cancer Res* 2001; 61:7530-5.
- Vabulas RM, Pircher H, Lipford GB, Hacker H, Wagner H. CpG-DNA activates in vivo T cell epitope presenting dendritic cells to trigger protective antiviral cytotoxic T cell responses. *J Immunol* 2000; 164:2372-8.
- van der Wilt CL, Pinedo HM, Smid K, Cloos J, Noordhuis P, Peters GJ. Effect of folinic acid on fluorouracil activity and expression of thymidylate synthase. *Semin Oncol* 1992; 19:16-25.
- Van Laar JA, Rustum YM, Van der Wilt CL, Smid K, Kuiper CM, Pinedo HM, Peters GJ. 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* 1996; 39:79-89.
- Vendetti S, Chai JG, Dyson J, Simpson E, Lombardi G, Lechler R. Anergic T cells inhibit the antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* 2000; 165:1175-81.
- Verthelyi D, Ishii KJ, Gursel M, Takeshita F, Klinman DM. Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. *J Immunol* 2001; 166:2372-7.
- Vijay-Kumar M, Aitken JD, Sanders CJ, Frias A, Sloane VM, Xu J, Neish AS, Rojas M, Gewirtz AT. Flagellin treatment protects against chemicals, bacteria, viruses, and radiation. *J Immunol* 2008; 180:8280-5.

- Wang XS, Sheng Z, Ruan YB, Guang Y, Yang ML. CpG oligodeoxynucleotides inhibit tumor growth and reverse the immunosuppression caused by the therapy with 5-fluorouracil in murine hepatoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11:1220-4.
- Wang Z, Karras JG, Colarusso TP, Foote LC, Rothstein TL. Unmethylated CpG motifs protect murine B lymphocytes against Fas-mediated apoptosis. *Cell Immunol* 1997; 180:162-7.
- Weeratna RD, Brazolot Millan CL, McCluskie MJ, Davis HL. CpG ODN can re-direct the Th bias of established Th2 immune responses in adult and young mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001; 32:65-71.
- Weeratna RD, McCluskie MJ, Xu Y, Davis HL. CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants. *Vaccine* 2000; 18:1755-62.
- Wei T, Gong J, Rossle SC, Jamitzky F, Heckl WM, Stark RW. A leucine-rich repeat assembly approach for homology modeling of the human TLR5-10 and mouse TLR11-13 ectodomains. *J Mol Model* 2011; 17:27-36.
- Weigel BJ, Rodeberg DA, Krieg AM, Blazar BR. CpG oligodeoxynucleotides potentiate the antitumor effects of chemotherapy or tumor resection in an orthotopic murine model of rhabdomyosarcoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9:3105-14.
- Weighardt H, Feterowski C, Veit M, Rump M, Wagner H, Holzmann B. Increased resistance against acute polymicrobial sepsis in mice challenged with immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides is related to an enhanced innate effector cell response. *J Immunol* 2000; 165:4537-43.
- Wickstrom E. Antisense c-myc inhibition of lymphoma growth. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1997; 7:225-8.
- Wilkinson DS, Tlsty TD, Hanas RJ. The inhibition of ribosomal RNA synthesis and maturation in Novikoff hepatoma cells by 5-fluorouridine. *Cancer Res* 1975; 35:3014-20.
- Wilmanns C, Fan D, O'Brian CA, Bucana CD, Fidler IJ. Orthotopic and ectopic organ environments differentially influence the sensitivity of murine colon carcinoma cells to doxorubicin and 5-fluorouracil. *Int J Cancer* 1992; 52:98-104.
- Wooldridge JE, Ballas Z, Krieg AM, Weiner GJ. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance the efficacy of monoclonal antibody therapy of lymphoma. *Blood* 1997; 89:2994-8.
- World Health Organisation, 2003. (Accessed at <http://www.who.int/cancer/en/>.)
- Yamamoto S, Yamamoto T, Kataoka T, Kuramoto E, Yano O, Tokunaga T. 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* 1992a; 148:4072-6.
- Yamamoto S, Yamamoto T, Shimada S, Kuramoto E, Yano O, Kataoka T, Tokunaga T. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiol Immunol* 1992b; 36:983-97.
- Yamamoto T, Yamamoto S, Kataoka T, Komuro K, Kohase M, Tokunaga T. Synthetic oligonucleotides with certain palindromes stimulate interferon production of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85:775-9.
- Yi AK, Chang M, Peckham DW, Krieg AM, Ashman RF. CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *J Immunol* 1998; 160:5898-906.
- Yi AK, Hornbeck P, Lafrenz DE, Krieg AM. CpG DNA rescue of murine B lymphoma cells from anti-IgM-induced growth arrest and programmed cell death is associated with increased expression of c-myc and bcl-xL. *J Immunol* 1996a; 157:4918-25.

- Yi AK, Klinman DM, Martin TL, Matson S, Krieg AM. Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA. Systemic induction of IL-6 transcription through an antioxidant-sensitive pathway. *J Immunol* 1996b; 157:5394-402.
- Zhang C, Ni J, Gao F, Sun D, Zhou C, Cheng Y, Cai J, Li B. The mechanism for the ameliorative effect of CpG-oligodeoxynucleotides on bone marrow hemopoiesis radiation injury. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011; 109:11-6.
- Zheng J, Fu R, Li J, Wang X. CpG oligonucleotides suppress HepG2 cells-induced Jurkat cell apoptosis via the Fas-FasL-mediated pathway. *J Exp Clin Cancer Res: CR* 2011; 30:48.
- Zimmermann S, Egeter O, Hausmann S, Lipford GB, Rocken M, Wagner H, Heeg K. CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J Immunol* 1998; 160:3627-30.

7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

| | |
|-----------------|--|
| ADCC | Antikörper-vermittelte zellgebundene Zytotoxizität |
| APC | Antigen-präsentierende Zelle |
| ASI | Aktive spezifische Immunisierung |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| AUC | <i>Area under the curve</i> |
| α GalCer | α -Galactosylceramid |
| BCG | <i>Bacille Calmette-Guérin</i> |
| BZR | B-Zell-Rezeptor |
| C | Cytosin-Base |
| C26 | Colon-26-Zelllinie |
| CD | <i>Cluster of differentiation</i> |
| CFU | <i>Colony forming units</i> |
| CG | Cytosin-Guanin |
| CpG | Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid |
| CTL | Zytotoxische T-Lymphozyten |
| DC | Dendritische Zelle |
| DMEM | <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| DPDH | Dihydropyrimidinehydrogenase |
| dTMP | Desoxythymidinmonophosphat |
| dUMP | Desoxyuridinmonophosphat |
| EDTA | Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure |
| EGFR | <i>Epidermal growth factor receptor</i> |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| FACS | <i>Fluorescence-activated cell sorter</i> |
| FAP | Familiäre adenomatöse Polyposis |
| FBAL | α -Fluoro- β -Alanin |
| FCS | Fötale Kälberserum |
| FdUMP | Fluorodesoxyuridinmonophosphat |
| FdUTP | Fluorodesoxyuridintriphosphat |
| FUDP | Fluorouridindiphosphat |
| FUH2 | Dihydrofluorouracil |
| FUMP | Fluorouridinmonophosphat |
| FUTP | Fluorouridintriphosphat |

| | |
|----------------|---|
| g | Zentripetalbeschleunigung der Erde |
| GM-CSF | <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> |
| HBSS | <i>Hank's balanced salts solution</i> |
| HEV | Hohe endotheliale Venolen |
| HPC | Hämatopoetische Vorläuferzelle |
| HNPCC | Hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom |
| HSP | Hitze-Schock-Protein |
| ICAM | <i>Intercellular adhesion molecule</i> |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IL-1R | Interleukin-1-Rezeptor |
| IRAK | IL-1R-assoziierte Kinase |
| KG | Körpergewicht |
| LAK | <i>Lymphokine-activated-killer Zelle</i> |
| LC | Langerhans-Zelle |
| LFA | <i>Lymphocyte function-associated antigen</i> |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LV | <i>Leucovorin</i> ® = Folinsäure |
| MDC | Myeloide dendritische Zelle |
| MHC | <i>Major histocompatibility complex</i> |
| mKC | <i>Murines keratinocyte-derived chemokine</i> |
| MyD88 | <i>Myeloid differentiation factor 88</i> |
| NaCl | Natrium-Chlorid |
| NF- κ B | <i>Nuclear factor kappa B</i> |
| NK-Zelle | Natürliche Killer-Zelle |
| ODN | Oligodesoxynukleotid |
| PAMP | <i>Pathogen-associated molecular pattern</i> |
| PBMC | Mononukleäre Zellen der peripheren Blutes |
| PBS | <i>Phosphate-buffered saline</i> |
| PDC | Plasmazytoide dendritische Zelle |
| PGE2 | Prostaglandin E2 |
| PRR | <i>Pattern-recognition-Rezeptor</i> |
| PTZ | Plasmazytoide T-Zelle |
| RNS | Ribonukleinsäure |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| TAA | <i>Tumor-associated antigen</i> |

| | |
|----------------|--|
| TDM | Therapeutisches Drug-Monitoring |
| TE | Tris-EDTA |
| TGF- β | <i>Transforming growth factor β</i> |
| T _H | T-Helfer |
| TIR | Toll/IL-1R-Domäne |
| TIRAP | <i>TIR domain-containing adapter protein</i> |
| TLR | <i>Toll-like-Rezeptor</i> |
| TNF- α | Tumor-Nekrose-Faktor- α |
| TRAF 6 | <i>TNF-receptor-associated factor 6</i> |
| TRIF | <i>TIR domain-containing adapter inducing IFN-β</i> |
| TZR | T-Zell-Rezeptor |
| UTP | Uridintriphosphat |
| VEGF | <i>Vascular endothelial growth factor</i> |
| 5-FU | 5-Fluoruracil |

8. Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Stefan Endres bedanke ich mich für die Überlassung des Themas und die persönliche Unterstützung sowie die Möglichkeit, in der ebenso engagierten wie freundschaftlichen Atmosphäre der Abteilung zu forschen. Weiter bedanke ich mich für die Unterstützung beim Besuch von Kongressen.

Für die kontinuierliche Betreuung, Motivation und die herausragende Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten möchte ich meinen Betreuern Prof. Dr. Gunther Hartmann und Dr. Klaus Heckelsmiller danken.

Ebenso möchte ich Prof. Dr. Rothenfuß und meiner Frau, Dr. Julia Beck für die tatkräftige Unterstützung in allen Belangen ausdrücklich danken.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meinen Eltern, Drs. Jörg und Erika Beck, und nicht zuletzt bei meiner mittlerweile eigenen Familie für ihre liebevolle Unterstützung während des gesamte Studiums und Zeit der Anfertigung der Dissertation bedanken.

9. Veröffentlichungen

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

1. **Beck S.**
Combined dendritic cell-/CpG oligonucleotide-based immune therapy and chemotherapy in the treatment of murine colon carcinomas.
1st Annual Workshop of the Division of Clinical Pharmacology; Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Ludwig-Maximilians-Universität, 2002
Tutzing, Deutschland
2. **Beck S, Heckelsmiller K, Rall K, Sipos B, Schlamp A, Rothenfusser S, Endres S, Hartmann G.**
Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy.
57. Jahreskonferenz der Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselstörungen, 2002
Bonn, Deutschland

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden internationalen Fachzeitschriften als Originalarbeiten veröffentlicht:

1. Heckelsmiller K, Rall K, **Beck S**, Schlamp A, Seiderer J, Jahrsdörfer B, Krug A, Rothenfusser S, Endres S, Hartmann G.
Peritumoral CpG DNA elicits coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model.
Journal of Immunology 2002 Oct 1; 169(7):3892-9.
2. Heckelsmiller K, **Beck S**, Rall K, Sipos B, Schlamp A, Tuma E, Rothenfusser S, Endres S, Hartmann G.
Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy.
European Journal of Immunology 2002 Nov; 32(11):3235-45.
3. 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.
International Journal of Cancer 2006 Jun 1; 118(11):2790-5.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Sebastian Albrecht Beck, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Kombination einer CpG-Oligonukleotid-Dendritische Zell-Vakzine mit 5-Fluorouracil in der Therapie eines murinen Kolonkarzinommodells“

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

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

Neuburg an der Donau, den 12.12.2019

.....

Sebastian Albrecht Beck