

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Tumorimmuntherapie mit CpG-Oligonukleotiden als *Toll-like*-
Rezeptor-9-Liganden: Auswirkungen auf die Präsenz
intratumoraler Immunzellen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Michaela Golić aus München

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

2. Berichterstatter:

Mitberichtersteller: Prof. Dr. rer. nat. Heiko Hermeking

Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Zimmermann

Mitbetreuung durch die

promovierten Mitarbeiter:

Dr. med. David Anz

PD Dr. med. Dr. rer. nat. Carole Bourquin

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h. c. Maximilian Reiser, FACR,
FRCR

Tag der mündlichen Prüfung:

21. Januar 2010

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 TUMORERKRANKUNGEN | 2 |
| 1.2 DIE KOMPONENTEN DES IMMUNSYSTEMS | 3 |
| 1.2.1 DAS ANGEBORENE IMMUNSYSTEM | 3 |
| 1.2.2 DAS ERWORBENE IMMUNSYSTEM | 3 |
| 1.3 ZELLULÄRE GRUNDLAGEN DER TUMORIMMUNOLOGIE | 4 |
| 1.3.1 ANTITUMORALE EFFEKTORZELLEN | 4 |
| 1.3.2 TUMORINDUZIERTER IMMUNSUPPRESSION | 6 |
| 1.4 TUMORIMMUNOTHERAPIE MIT LIGANDEN VON <i>TOLL-LIKE</i>-REZEPTOREN | 8 |
| 1.4.1 DIE FAMILIE DER <i>TOLL-LIKE</i> -REZEPTOREN | 8 |
| 1.4.2 <i>TOLL-LIKE</i> -REZEPTOR 9 | 8 |
| 1.4.3 <i>TOLL-LIKE</i> -REZEPTOR 3 | 12 |
| 1.4.4 <i>TOLL-LIKE</i> -REZEPTOR 4 | 12 |
| 1.4.5 <i>TOLL-LIKE</i> -REZEPTOR 7 | 13 |
| 1.5 AUFGABENSTELLUNG | 13 |
| | |
| 2. MATERIAL UND METHODEN | 15 |
| | |
| 2.1 GERÄTE, CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN | 16 |
| 2.1.1 GERÄTE | 16 |
| 2.1.2 CHEMIKALIEN | 17 |
| 2.1.3 MATERIALIEN UND LÖSUNGEN FÜR DIE ZELLKULTUR | 18 |
| 2.1.4 LIGANDEN FÜR <i>TOLL-LIKE</i> -REZEPTOREN | 19 |
| 2.1.5 SONSTIGE REAGENZIEN | 20 |
| 2.1.6 MATERIALIEN UND LÖSUNGEN FÜR DIE IMMUNHISTOLOGIE | 20 |
| 2.1.7 ANTIKÖRPER | 21 |
| 2.2 METHODEN | 23 |
| 2.2.1 ZELLULÄR-IMMUNOLOGISCHE METHODEN | 23 |
| 2.2.2 TIEREXPERIMENTELLE METHODEN | 25 |
| 2.2.3 IMMUNHISTOLOGISCHE METHODEN | 26 |
| 2.2.4 DURCHFLUSSZYTOMETRIE | 34 |
| 2.3 STATISTISCHE ANALYSE | 36 |
| | |
| 3. ERGEBNISSE | 37 |
| | |
| 3.1 EINFLUSS DER PERITUMORALEN THERAPIE MIT CPG-OLIGONUKLEOTIDEN AUF DIE PRÄSENZ INTRATUMORALER IMMUNZELLEN | 38 |
| 3.1.1 TUMORWACHSTUM | 38 |
| 3.1.2 INTRATUMORALE T-ZELLEN | 42 |
| 3.1.3 INTRATUMORALE NATÜRLICHE KILLERZELLEN | 63 |
| 3.1.4 INTRATUMORALE B220-POSITIVE ZELLEN | 65 |
| 3.1.5 INTRATUMORALE MYELOIDE ZELLEN | 68 |
| 3.1.6 VERSTÄRKT VASKULARISATION IM TUMORGEWEBE | 77 |
| 3.2 EINFLUSS DER THERAPIE MIT ANDEREN <i>TOLL-LIKE</i>-REZEPTOR-LIGANDEN AUF DIE PRÄSENZ INTRATUMORALER IMMUNZELLEN | 78 |
| 3.2.1 VERMINDERTE ANZAHL INTRATUMORALER CD3-POSITIVER ZELLEN | 79 |
| 3.2.2 VERMINDERTE ANZAHL INTRATUMORALER FOXP3-POSITIVER ZELLEN | 80 |

| | |
|---|------------|
| 4. DISKUSSION | 83 |
| 4.1 ÜBERSICHT ÜBER DIE IM RAHMEN DER VORLIEGENDEN ARBEIT GEWONNENEN ERGEBNISSE | 84 |
| 4.2 PERITUMORALE APPLIKATION VON CPG-OLIGONUKLEOTIDEN INHIBIERT DAS TUMORWACHSTUM | 85 |
| 4.3 EINFLUSS DER CPG-OLIGONUKLEOTIDE AUF INTRATUMORALE EFFEKTORZELLEN UND DIE VASKULARISATION IM TUMORGEWEBE | 88 |
| 4.4 PERITUMORALE APPLIKATION VON CPG-OLIGONUKLEOTIDEN REDUZIERT DIE ANZAHL INTRATUMORALER REGULATORISCHER T-ZELLEN | 91 |
| 4.5 PERITUMORALE APPLIKATION VON CPG-OLIGONUKLEOTIDEN UND IHR EINFLUSS AUF MYELOIDE ZELLEN | 93 |
| 5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK | 99 |
| 6. LITERATURVERZEICHNIS | 103 |
| 7. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND AKRONYME | 117 |
| 8. DANKSAGUNG | 121 |
| 9. VERÖFFENTLICHUNGEN | 123 |
| 10. LEBENSLAUF | 127 |

1. Einleitung

1.1 Tumorerkrankungen

Tumorerkrankungen stellen in einer technisch hochentwickelten Industrienation wie der Bundesrepublik Deutschland im 21. Jahrhundert die zweithäufigste Todesursache dar (26% aller Sterbefälle, Quelle: Statistisches Bundesamt Deutschland, Sterbefälle 2007). Global betrachtet spielen Tumorerkrankungen jedoch eine untergeordnete Rolle, da weltweit Infektionen für die meisten Todesfälle verantwortlich sind. Interessanterweise lassen sich beide Erkrankungsgruppen auf ein zumindest partielles Versagen des Immunsystems zurückführen, dessen Funktionen in zwei große Bereiche aufgeteilt wird. Zum einen schützt das Immunsystem den eigenen Körper vor eindringenden Mikroorganismen und zum anderen dient das Immunsystem der Erkennung und Unterscheidung von nativen und verändert körpereigenen Zellen. Spezifische Oberflächenmoleküle an der Zellmembran körpereigener Zellen fungieren dabei als Erkennungsmerkmal für das Immunsystem. Neben körperfremden Zellen wie beispielsweise Bakterien und Parasiten werden auch pathologisch veränderte eigene Zellen, etwa Tumorzellen oder virusinfizierte Zellen, als nicht körpereigen betrachtet. Eine Tumorzelle entsteht aus einer körpereigenen Zelle, die sich beispielsweise infolge einer Mutation in den Regulationsgenen des Zellzyklus durch ein verstärktes Zellwachstum auszeichnet. Durch das mutierte Genom der Tumorzelle verändert sich auch ihr Proteinexpressionsprofil, was sich unter anderem in einer veränderten Expression von Oberflächenmolekülen auf der Zellmembran widerspiegeln kann. So kann eine Tumorzelle als verändert erkannt und vom Immunsystem bekämpft werden. Doch da Tumorzellen auch Mechanismen entwickeln um dieser Immunantwort zu entkommen, ergeben sich komplexe Wechselwirkungen des Tumors mit dem Immunsystem. Durch Erforschen dieser Mechanismen und Wechselwirkungen entstehen Angriffspunkte für eine antitumorale Therapie, was das hohe Potential der Immuntherapie bei der Behandlung von Tumoren erklärt. Die vorliegende Arbeit versucht einen Beitrag zum Verständnis der Immuntherapie mit Liganden von *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs) zu leisten und somit der Weiterentwicklung dieses Therapieansatzes hilfreich zu sein.

1.2 Die Komponenten des Immunsystems

1.2.1 Das angeborene Immunsystem

Ursprünglich hat sich das Immunsystem entwickelt um Infektionen erkennen und bekämpfen zu können. Dabei besteht es bei Vertebraten aus einer angeborenen und einer erworbenen Komponente. Das angeborene Immunsystem ist der evolutionär ältere Teil und bedient sich mehrerer Familien von Rezeptoren, die sogenannte pathogen-assoziierte Moleküle erkennen. Zu diesen *pattern-recognition*-Rezeptoren gehören beispielsweise TLRs, *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD), Mannoserezeptoren, *retinoic-inducible gene 1* (RIG-1) ähnliche Proteine und Typ-C lectine wie *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin* (DC-SIGN). Eine Aktivierung dieser Rezeptoren führt unter anderem zur Synthese bestimmter Zytokine, die für eine Verhinderung der Infektionsausbreitung benötigt werden. Manchmal vermag das angeborene Immunsystem alleine eine Infektion zu bekämpfen, allerdings wird dabei keine Gedächtnisantwort dieser Immunreaktion gebildet, da es dafür der Zellen des erworbenen Immunsystems bedarf.

1.2.2 Das erworbene Immunsystem

Das erworbene Immunsystem reift erst im Laufe des Lebens zu seiner vollen Funktionsfähigkeit heran. Es besteht aus hochentwickelten B- und T-Zellen, die spezifisch Eindringlinge und Gefahren für den Körper bekämpfen. Zudem bilden diese Zellen Gedächtnisfunktionen aus um Schutz vor einer Reinfektion bieten zu können. Das erworbene Immunsystem kann nochmals in eine humorale und eine zelluläre Komponente unterteilt werden. B-Zellen sind mit ihrer Antikörperbildung hauptverantwortlich für die Induktion einer humoralen Immunantwort. Die zelluläre Antwort des erworbenen Immunsystems hingegen wird maßgeblich von antigen-spezifischen T-Zellen getragen, die es vermögen mit intrazellulären Erregern infizierte Zellen abzutöten.

1.3 Zelluläre Grundlagen der Tumorimmunologie

1.3.1 Antitumorale Effektorzellen

1.3.1.1 Zusammenspiel von dendritischen Zellen und T-Zellen

Dendritische Zellen spielen eine zentrale Rolle in der Regulation von Immunität und Toleranz (Liu et al., 2001; Steinman et al., 2003; Steinman and Nussenzweig, 2002) und sind wichtige Zellen für die Immuntherapie von Tumoren (Steinman, 2001; Steinman and Dhodapkar, 2001). Sie exprimieren klassischerweise das Oberflächenantigen *Cluster of differentiation* 11c (CD11c) und können in myeloide dendritische Zellen (mDCs) und plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs) unterteilt werden. Bei der Maus können dendritische Zellen im Gegensatz zum Menschen zusätzlich CD4- und / oder CD8-positiv sein.

Unreife dendritische Zellen entwickeln sich im Knochenmark und sind anschließend ubiquitär im nichtlymphatischen Gewebe verteilt, wo sie Antigene aufnehmen und prozessieren (Cella et al., 1997; Schuler et al., 1997). Dabei weisen dendritische Zellen die besondere Fähigkeit der Kreuzpräsentation auf (Huang et al., 1994; Sigal and Rock, 2000; Yewdell et al., 1999). Darunter versteht man den Mechanismus antigenpräsentierender Zellen exogene Antigene auf ihrem *major histocompatibility complex I* (MHC-I-Komplex) präsentieren und somit eine Immunantwort dagegen auslösen zu können. Da die Kreuzpräsentation von Selbstantigenen zu Autoimmunerkrankungen führen würde, sind zusätzlich Gefahrensignale wie mikrobielle Produkte und inflammatorische Zytokine nötig um dendritische Zellen zu aktivieren. Nach dieser Aktivierung durchlaufen dendritische Zellen eine Reifung, was sich durch die vermehrte Expression von MHC-Komplexen und kostimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86 auf der Zellmembran auszeichnet (Banchereau and Steinman, 1998). Im Anschluss an ihre Reifung wandert die dendritische Zelle zu den T-Zell-Arealen sekundärer lymphatischer Organe, wo sie dann als professionelle antigenpräsentierende Zelle naive T-Zellen aktiviert (Schuler et al., 1997). Diese Migration dendritischer Zellen in tumordrainierende Lymphknoten und ihre dortige Interaktion mit zytotoxischen CD8-positiven T-Zellen ist wichtig um eine antigenspezifische zytotoxische T-Zell-Antwort *in vivo* zu induzieren (Bousso and Robey, 2003; Mempel et al., 2004; Miller et al., 2002; Rennert et al., 2001). T-Zellen besitzen als Erkennungsmerkmal das Oberflächenantigen CD3 und exprimieren abhängig von

ihrem Subtyp zusätzlich CD4 (T-Helfer-Zellen) oder CD8 (zytotoxische T-Zellen). CD8-positive T-Zellen sind Effektorzellen, die mit Hilfe ihres T-Zell-Rezeptors MHC-I-Komplexe erkennen und so antigenspezifisch zytotoxisch wirken können. Dendritische Zellen präsentieren klassischerweise diesen CD8-positiven T-Zellen exogene Antigene kreuz. Im Gegensatz zu dendritischen Zellen können alle anderen kernhaltigen Zellen des Körpers nur zelleigene Antigene auf ihrem MHC-I-Komplex präsentieren (Bevan, 1976; Heath and Carbone, 2001). Somit fungiert der MHC-I-Komplex auf den meisten Zellen als Indikator dessen, was eine Zelle an Proteinen synthetisiert. Ist eine Zelle gesund, so synthetisiert sie körpereigene Proteine und präsentiert diese auf ihrem MHC-I-Komplex. Da in diesem Fall meistens zusätzliche immunologische Gefahrensignale und kostimulatorische Moleküle fehlen, wird gegen dieses Antigen Toleranz induziert. Im Falle einer Virusinfektion kann sich virales Genom in die körpereigene Desoxyribonukleinsäure (DNS) einbauen und so von der infizierten Zelle körperfremde Proteine synthetisiert und auf ihrem MHC-I-Komplex präsentiert werden. Im Falle zusätzlicher Gefahrensignale kann die virusinfizierte Zelle direkt von CD8-positiven T-Zellen erkannt und bekämpft werden. Dieses Prinzip kann auch für Tumorzellen gelten wenn diese beispielsweise durch Mutationen in ihrem Gen- und Proteinexpressionsprofil so verändert sind, dass sie körperfremde Proteine auf ihrem MHC-I-Komplex präsentieren und so vom Immunsystem angegriffen werden können. Tatsächlich aber haben viele Tumoren Strategien entwickelt, mit Hilfe derer sie der Erkennung durch das Immunsystem entkommen können. In diesem Sinne kann bei Tumorzellen die Präsentation von Tumorantigenen auf MHC-Komplexen supprimiert sein (Poggi and Zocchi, 2006; Schrier et al., 1983). Um aber auch eine zytotoxische T-Zell-Antwort gegen Tumoren zu initiieren, die sich einer direkten Erkennung durch T-Zellen entziehen, ist für die Immuntherapie von Tumoren die Kreuzpräsentation durch dendritische Zellen wichtig (Huang et al., 1994; Sigal et al., 1999).

1.3.1.2 Natürliche Killerzellen

Für die zelluläre immunologische Tumorantwort werden neben zytotoxischen T-Zellen auch aktivierte natürliche Killerzellen (NK-Zellen) verantwortlich gemacht (Kawarada et al., 2001). So wachsen manche Tumoren in NK-Zell-depletierten Tieren schneller als in Kontrollmäusen (Frey, 1996; Seaman et al., 1987). Zudem sind NK-Zellen für die Verhinderung einer metastatischen Streuung von Tumorzellen wichtig, da sie im Blut zirkulierende Tumorzellen entfernen können (Yang et al., 2006). Auch beim Menschen konnte eine Relevanz von NK-Zellen für eine Tumorkontrolle festgestellt werden (Hsia

et al., 2005; Ishigami et al., 2000; Villegas et al., 2002). In Tumormausmodellen stimuliert die Applikation des TLR3-Liganden *polyribonucleic polyribocytidylic acid* (Poly(I:C)) die NK-Zell-Aktivität im Blut und in der Milz und führt zu einer Reduktion der Tumorzellmasse und einer verminderten Anzahl von Metastasen (Talmadge et al., 1985). NK-Zellen wurden zunächst wegen ihrer Fähigkeit Tumorzellen ohne vorausgehende Sensibilisierung bekämpfen zu können entdeckt; sie erkennen und bekämpfen aber auch virusinfizierte Zellen (Biron et al., 1996; Moretta et al., 1996; Trinchieri, 1989). Dabei erkennen sie den MHC-I-Komplex ihrer Zielzellen, was zu einer Aktivierung oder Inhibition ihres zytolytischen Potentials führt (Karlhofer et al., 1992; Raulet, 1992).

1.3.2 Tumorinduzierte Immunsuppression

1.3.2.1 Tumormilieu

Tumoren haben diverse Strategien entwickelt um einer Erkennung durch das Immunsystem zu entkommen. So können Tumoren beispielsweise über Faktoren wie Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO) und *transforming growth factor β* (TGF β) ein immunsuppressives Milieu induzieren (Ganss and Hanahan, 1998). Das Tumormilieu wird unter anderem für die erschwerte Induktion einer antitumoralen Immunantwort in Mäusen mit großem Tumor verantwortlich gemacht (Gabrilovich, 2004; Hontsu et al., 2004; Yang et al., 2004). Im Rahmen dieses immunsuppressiven Tumormilieus ist beispielsweise der Austritt von Immunzellen aus dem Blut in das Tumorgewebe erschwert. In diesem Sinne werden im Tumorgewebe die endothelialen Zelladhäsionsmoleküle *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1), ICAM-2 und *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) vermindert exprimiert, was mit einer geringeren Tumordinfiltration von Leukozyten und einer Tumorprogression assoziiert ist (Bouma-ter Steege et al., 2004; Piali et al., 1995). Durch die chronische Sekretion angiogenetischer Faktoren werden Endothelzellen im Tumorgewebe permanent stimuliert, was die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen inhibiert (Melder et al., 1996; Zhang and Issekutz, 2001). Zudem kann ein rasches Tumorstadium den interstitiellen Druck im Gewebe erhöhen, was ein Kollabieren intratumoraler Gefäße bedingt (Jain, 2003) und ebenfalls zu einer erschwerten Einwanderung von Immunzellen in das Tumorgewebe führt. Das könnte erklären, warum es in manchen Tumormodellen zwar Evidenz für tumorspezifische T-Zellen gibt, es diesen jedoch nicht gelingt den Tumor zu infiltrieren (Nguyen et al., 2002). Gleichzeitig beeinflusst das

Tumormilieu die Sekretion von Chemokinen und die Expression endothelialer Zelladhäsionsmoleküle dahingehend, dass atypische und immunsuppressive T-Zellen erleichtert ins Tumorgewebe infiltrieren können (Enarsson et al., 2006; Kim et al., 2006; Li et al., 2006). Doch selbst wenn es Immunzellen vermögen den Tumor zu infiltrieren sind sie häufig in ihrer Funktion eingeschränkt. In diesem Sinne wurden sowohl in humanen (Whiteside, 1998) als auch in murinen (Prevost-Blondel et al., 1998; Sotomayor et al., 1999) Tumoren infiltrierende CD8-positive Lymphozyten gefunden, die keine lytische Funktion zeigten. Intratumorale dendritische Zellen sind häufig unreif und können daher keine T-Zellen stimulieren (Gabrilovich et al., 1996; Menetrier-Caux et al., 1998; Vicari et al., 2002b), weshalb viele intratumorale T-Zellen einen naiven Phänotypen aufweisen (Vermi et al., 2003). Somit stellt die inadäquate Tumorantigen-Präsentation dendritischer Zellen einen weiteren Mechanismus dar, mit dem der Tumor eine Erkennung durch das Immunsystem verhindert (Coussens and Werb, 2002). Zudem kann das immunsuppressive Tumormilieu dazu führen, dass dendritische Zellen Antigene präsentieren, gegen die Toleranz anstatt Immunität induziert wird (Steinman et al., 2003). Diese Induktion einer T-Zell-Toleranz ist eine weitere Erklärung für die Unfähigkeit des Immunsystems solide Tumoren zu entfernen (Staveley-O'Carroll et al., 2003; Staveley-O'Carroll et al., 1998; Ye et al., 1994).

1.3.2.2 Regulatorische T-Zellen

Die Aktivierung körpereigener immunsuppressiv wirkender regulatorischer T-Zellen (Tregs) ist ein weiterer wichtiger Mechanismus des Tumors eine Erkennung durch das Immunsystem zu verhindern. Tregs sind eine Subpopulation CD4-positiver T-Zellen, die im Thymus generiert werden und das Oberflächenantigen CD25 exprimieren (Shevach et al., 2001; Zou, 2006). Der Transkriptionsfaktor *forkhead box protein 3* (Foxp3) ist ein spezifischer Marker für diese Zellen (Hori et al., 2003). Tregs vermögen eine immunsuppressive Funktion auszuüben, mit Hilfe der sie die T-Zell-Antwort sowohl *in vitro* als auch *in vivo* inhibieren (Piccirillo and Shevach, 2001; Suri-Payer et al., 1998) und so Autoimmunerkrankungen verhindern können (Asano et al., 1996; Sakaguchi and Sakaguchi, 2005; Stephens and Mason, 2000; Taguchi and Takahashi, 1996). Umgekehrt erschwert die Stimulation von Tregs die Immuntherapie (Piccirillo and Shevach, 2001; Shevach et al., 2001; Suri-Payer et al., 1998), da Tregs T-Zellen und NK-Zellen supprimieren, die für die antitumorale Immunantwort wichtig sind (Hori et al., 2003; Knutson et al., 2007). So kann die Depletion CD4- und CD25-doppeltpositiver T-Zellen durch anti-CD25-Antikörper das Wachstum verschiedener

muriner Tumoren verlangsamen (Golgher et al., 2002; Jones et al., 2002; Tanaka et al., 2002). Grundsätzlich steigt die Anzahl an Tregs während des Tumorwachstums (Curiel et al., 2004; Gabrilovich, 2004; Marshall et al., 2004).

1.4 Tumorimmuntherapie mit Liganden von *Toll-like-Rezeptoren*

1.4.1 Die Familie der *Toll-like-Rezeptoren*

Um Infektionen erkennen zu können, bedient sich das angeborene Immunsystem verschiedener Rezeptorfamilien, die hochkonservierte pathogen-assoziierte Moleküle erkennen, die nicht von körpereigenen Zellen exprimiert werden (Creagh and O'Neill, 2006). Eine der am besten erforschten Gruppen solcher Rezeptorfamilien ist die Familie der TLRs, von der beim Menschen zehn Rezeptoren identifiziert worden sind (Iwasaki and Medzhitov, 2004; Takeda et al., 2003). Jeder TLR hat sein eigenes Zell- und Gewebeverteilungsmuster und bindet mehr oder weniger spezifisch ein pathogen-assoziiertes Molekül, weshalb unterschiedliche Pathogenarten erkannt werden können. Nach Bindung eines pathogen-assoziierten Moleküls kann der entsprechende TLR eine Immunantwort des Wirtes induzieren (Iwasaki and Medzhitov, 2004; Takeda et al., 2003) und somit als Alarmsignal für das Immunsystem fungieren. TLR4 beispielsweise erkennt Lipopolysaccharide (LPS), Moleküle, die nur von gramnegativen Bakterien exprimiert werden. Nach Bindung von LPS führt die Aktivierung von TLR4 zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine durch die Wirtszellen. Die erhöhte Anfälligkeit TLR4-defizienter Mäuse für Infektionen mit gramnegativen Bakterien (Iwasaki and Medzhitov, 2004; Takeda et al., 2003) unterstreicht die wichtige Funktion von TLRs im Rahmen der Immunabwehr.

1.4.2 *Toll-like-Rezeptor 9*

Um das Potential der TLRs für die Tumorthherapie ausnützen zu können, wurden für verschiedene TLRs bereits synthetische Agonisten entwickelt. Ein Vorteil der Therapie mit TLR9-Liganden ist, dass TLR9 beim Menschen das schmalste Expressionsmuster aller TLRs aufweist und somit die besten Voraussetzungen für eine spezifische Therapie bietet. Beim Menschen exprimieren nur B-Zellen und pDCs als einzige Immunzellen im nicht aktivierten Zustand TLR9. Im Gegensatz zu dieser geringen

Anzahl TLR9-exprimierender Zellen beim Menschen exprimieren bei Mäusen B-Zellen, Monozyten und wahrscheinlich alle Subpopulationen dendritischer Zellen TLR9 (Iwasaki and Medzhitov, 2004; Liu, 2005). Aus diesem Grund produziert das murine Immunsystem nach Exposition mit TLR9-Agonisten andere Zytokine und Chemokine als der humane Organismus. Dies erschwert die Übertragung von Ergebnissen aus Mausmodellen auf den Menschen und somit die Vorhersage von Effekten der TLR9-Aktivierung beim Menschen.

1.4.2.1 CpG-Oligonukleotide als Toll-like-Rezeptor-9-Liganden

TLR9 erkennt unmethylierte Cytosin-phosphorothioat-Guanin-Oligodeoxynukleotide (CpG-Dinukleotide, CpG), die relativ häufig in bakterieller und viraler genomischer DNS vorkommen – im Gegensatz zum Genom von Vertebraten, wo diese Dinukleotide nur wenig vorhanden und häufig methyliert sind (Hemmi et al., 2000). Das CpG-Motiv wurde 1995 erstmals beschrieben und im Jahr 2000 wurde TLR9 als Rezeptor für CpG festgestellt. Es gibt speziesspezifische Unterschiede in dem optimalen CpG-Motiv und neben dem CpG-Motiv hängt die immunstimulatorische Aktivität der Oligonukleotide auch noch von anderen Faktoren wie beispielsweise dem Abstand der CpG-Motive zueinander und der Anwesenheit anderer kurzer DNS-Sequenzen ab (Hartmann and Krieg, 2000; Krieg et al., 1995; Yi et al., 1998). Da das Grundgerüst nativer DNS aus Phosphodiestern besteht, die *in vivo* sehr schnell von Nukleasen abgebaut werden, wird für experimentelle Untersuchungen *in vivo* meist synthetisches CpG verwendet, welches ein nukleaseresistentes Grundgerüst aus Phosphorthioat besitzt. Synthetische Oligonukleotide, die ein oder mehrere unmethylierte CpG-Dinukleotide enthalten, aktivieren TLR9 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* und induzieren eine Immunantwort des angeborenen und erworbenen Immunsystems.

1.4.2.2 Prinzip der Tumorimmuntherapie mit CpG-Oligonukleotiden als Toll-like-Rezeptor-9-Liganden

Nach der Reifung dendritischer Zellen steigt ihre Fähigkeit T-Zellen zu stimulieren (Mellman and Steinman, 2001). TLR-Liganden führen im Allgemeinen durch die Induktion von Reifung dendritischer Zellen zur Aktivierung des Immunsystems (Akira et al., 2001; Schnare et al., 2001). CpG im Speziellen induziert sowohl die Reifung unreifer als auch die Aktivierung reifer dendritischer Zellen, die daraufhin Zytokine

produzieren und zu funktionellen antigenpräsentierenden Zellen werden (Sparwasser et al., 1998). Zudem unterstützt CpG die Kreuzpräsentation exogener Antigene auf dem MHC-I-Komplex dendritischer Zellen (Datta et al., 2003). So können dendritische Zellen nach CpG-Applikation Tumorantigene kreuzpräsentieren und in tumordrainierenden Lymphknoten durch Interaktion mit zytotoxischen CD8-positiven T-Zellen eine antigenspezifische zytotoxische T-Zell-Antwort induzieren. Die dort aktivierten zytotoxischen T-Zellen wandern anschließend zum Tumor und bekämpfen diesen (Wakita et al., 2006). Somit führt die CpG-Gabe auch zu einer verstärkten zytotoxischen CD8-positiven T-Zell-Aktivität (Liu et al., 1998; Roman et al., 1997; Weiner et al., 1997), wobei die T-Lymphozyten nicht direkt von CpG aktiviert werden, sondern nur indirekt über die Reifung und Migration dendritischer Zellen (Hartmann et al., 1999; Jakob et al., 1998; Krieg and Wagner, 2000; Sparwasser et al., 1998).

1.4.2.3 Erfolge der Tumorummuntherapie mit CpG-Oligonukleotiden als Toll-like-Rezeptor-9-Liganden

Die intratumorale Injektion von CpG vermittelt bei Mäusen mit relativ kleinen, subkutan wachsenden Tumoren einen Tumorrückgang (Baines and Celis, 2003; Carpentier et al., 2000; Lonsdorf et al., 2003), wobei die intratumorale Gabe der systemischen Applikation überlegen ist (Mastini et al., 2008). Allerdings sind Tumoren häufig für eine peritumorale CpG-Gabe schlecht zugänglich, weshalb in diesen Fällen CpG systemisch appliziert werden muss und so der Effekt einer Monotherapie mit CpG vermindert ist. Vor kurzem konnte jedoch in einem Mausmodell gezeigt werden, dass die systemische Gabe von in Liposomen eingebettetem CpG das Überleben der Tiere deutlich verlängert (Hamzah et al., 2009). Dabei waren die CpG-Liposomen mit einem Peptid verbunden worden, welches zu einer spezifischen Anreicherung der CpG-Liposomen im Tumorgewebe führte, womit der Effekt einer peritumoralen CpG-Applikation imitiert werden konnte. Diese neue Methode weckt Hoffnungen auch beim Menschen systemisch appliziertes CpG noch erfolgreicher einsetzen zu können. Beim Menschen aktiviert die Monotherapie mit TLR9-Agonisten NK-Zellen und induziert eine T-Zell vermittelte Zytokinantwort bei Patienten mit B-Zell-Lymphomen (Friedberg et al., 2005; Link et al., 2006). Objektive Antworten auf eine Monotherapie mit CpG wurden auch bei einigen Patienten mit Melanomen (Pashenkov et al., 2006) und anderen malignen Tumoren gesehen, allerdings ist die Häufigkeit objektiver Antworten relativ gering. Daher ist nun der Fokus laufender klinischer Studien auf kombinierte Therapien gerichtet mit dem Ziel die klinische Wirksamkeit der TLR9-Gabe zu erhöhen. Im

Gegensatz zu kleinen Tumoren muss für die Abstoßung großer oder weniger immunogener Tumoren die Gabe von CpG entweder mit einer Tumorimpfung oder mit anderen effizienten antitumoralen Strategien kombiniert werden; dazu gehören beispielsweise monoklonale Antikörper (Davila et al., 2003; Vicari et al., 2002b; Wooldridge et al., 1997), Angiogenese-Inhibitoren (Damiano et al., 2006), Strahlentherapie (Mason et al., 2005), Chirurgie (Ohashi et al., 2006; Weigel et al., 2003) und Chemotherapie (Balsari et al., 2004; Taieb et al., 2006; van der Most et al., 2006).

1.4.2.4 Klinische Anwendung von CpG-Oligonukleotiden als Toll-like-Rezeptor-9-Liganden beim Menschen

CpG wird derzeit beim Menschen in zahlreichen klinischen Studien der Phasen II und III getestet (Krieg, 2007). Dabei wird es sowohl als Adjuvans zu Tumorstoffen (Injektion von Tumorantigenen) als auch in Kombination mit konventioneller Chemotherapie und anderen Therapien untersucht. CpG wurde bereits erfolgreich als Adjuvans von Impfungen gegen Infektionen wie beispielsweise Hepatitis B verwendet (Cooper et al., 2004; Halperin et al., 2003). Tumorstoffe hingegen induzieren beim Menschen trotz guter Ergebnisse in Mausmodellen nur selten objektiv messbare klinische Antworten (Rosenberg et al., 2004), weshalb zusätzliche Adjuvantien wie beispielsweise inkomplettes Freund'sches Adjuvans (IFA) verwendet werden. Die Kombination von CpG und IFA konnte im Rahmen einer Tumorstoffe bei Melanompatienten die Anzahl antigenspezifischer T-Zellen fast zehnfach erhöhen (Speiser et al., 2005). Hinsichtlich der Kombination von Immun- und Chemotherapie konnten zahlreiche Studien bei Mäusen zeigen, dass Immuntherapien Chemotherapeutika verstärken (Eralp et al., 2004; Machiels et al., 2001; Nowak et al., 2003). Vielversprechende Ergebnisse bei Patienten in klinischen Studien der Phase II initiierten weitere klinische Studien zur Erprobung der Kombinationstherapie von CpG und Chemotherapie.

1.4.2.5 Sicherheit der Therapie mit CpG-Oligonukleotiden als Toll-like-Rezeptor-9-Liganden

Neben seiner immunstimulatorischen Wirkung hat CpG auch eine Reihe von Nebenwirkungen, die auf sein chemisches Grundgerüst zurückzuführen sind (Levin, 1999; Monteith and Levin, 1999). Die häufigsten Nebenwirkungen beim Menschen stellen unspezifische Reaktionen an der Einstichstelle wie beispielsweise Erythem und Schwellung und systemische grippeähnliche Symptome dar. CpG induziert nicht grundsätzlich Autoimmunität, allerdings kann es im Mausmodell vorbestehende Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematodes (Hasegawa and Hayashi, 2003) und Multiple Sklerose (Ichikawa et al., 2002) aggravieren.

1.4.3 Toll-like-Rezeptor 3

Der TLR3-Ligand Poly(I:C) ist eine synthetische doppelsträngige Ribonukleinsäure (RNS) (Alexopoulou et al., 2001), die dendritische Zellen aktiviert und deren Reifung induziert (Verdijk et al., 1999). Poly(I:C) war die erste doppelsträngige RNS, die wegen ihrer Fähigkeit immunstimulatorisches Typ-I-Interferon (Typ-I-IFN) zu induzieren klinisch verwendet wurde (Robinson et al., 1976). Dabei wurde ihre potenzielle therapeutische Funktion in Patienten mit Leukämie und HIV-Infektion untersucht, doch führte sie bei manchen Patienten zu toxischen Nebenwirkungen wie Schock, Nierenversagen und Koagulopathien (Robinson et al., 1976). Modifikationen der chemischen Struktur führten zu Poly I:C₁₂U, die mit einer verminderten Toxizität beim Menschen assoziiert ist (Strayer et al., 1994). Bei Brustkrebspatientinnen konnte ein Poly(I:C)-Analogon zusammen mit einer Radiotherapie im Vergleich zur Chemotherapie das krankheitsfreie Überleben verbessern und die Inzidenz von Metastasen reduzieren (Laplanche et al., 2000). Diese Daten bieten eine Grundlage für weitere Untersuchungen von auf doppelsträngiger RNS basierenden Adjuvantien in der Tumorthherapie beim Menschen (Adams et al., 2005).

1.4.4 Toll-like-Rezeptor 4

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das Immunsystem auch für die antitumorale Wirkung von Chemotherapien und Bestrahlungen wichtig ist (Apetoh et al., 2007). Dabei spielt TLR4 auf dendritischen Zellen eine entscheidende Rolle, da er das von nekrotischen Tumorzellen sezernierte Alarmprotein *high-mobility-group box 1* (HMGB1)

bindet und anschließend so zu einer effizienten Prozessierung und Kreuzpräsentation von Tumorantigenen beiträgt, was in der Folge zu einer tumorspezifischen T-Zell-Antwort führt. Patientinnen mit Brustkrebs, die ein funktionsloses TLR4-Allel tragen, erleiden nach Chemo- oder Strahlentherapie schneller ein Rezidiv als Patientinnen mit einem normalen TLR4-Allel (Apetoh et al., 2007). Dies unterstreicht die hohe Relevanz von TLR4 im Rahmen einer antitumoralen Therapie und weckt Hoffnungen für den therapeutischen Einsatz von TLR4-Agonisten wie beispielsweise Monophosphoryllipid A oder LPS. Monophosphoryllipid A wurde bereits als Adjuvans für Vakzine entwickelt (Baldrige et al., 2004).

1.4.5 *Toll-like*-Rezeptor 7

Der synthetische TLR7-Agonist Imiquimod wurde für die topische Behandlung von Genitalwarzen, aktinischen Keratosen und Basalzellkarzinomen entwickelt und von der *Food and Drug Administration* (FDA, Arzneimittelzulassungsbehörde der USA) zugelassen (Burns and Brown, 2005). Über TLR7 können außerdem einzelsträngige RNS-Oligonukleotide, die ein bestimmtes immunstimulatorisches Motiv enthalten, dendritische Zellen aktivieren, die Produktion von Interferon- α induzieren und eine antigenspezifische T-Zell-Antwort auslösen (Bourquin et al., 2007; Hornung et al., 2005). Ein entscheidender Unterschied von TLR7 im Vergleich zu TLR9 ist sein weites Expressionsmuster auf humanen Immunzellen (Hornung et al., 2002), weshalb Therapien mit TLR7-Agonisten beim Menschen höhere Effizienz zeigen könnten als die Behandlung mit TLR9-Agonisten. Aus diesem Grund stellt die Tumorthherapie mit TLR7-Agonisten einen vielversprechenden Ansatz dar.

1.5 Aufgabenstellung

Im Tumormausmodell erzielt die Monotherapie mit CpG einen T-Zell-vermittelten Tumorrückgang (Baines and Celis, 2003; Lonsdorf et al., 2003), beim Menschen jedoch ist eine Tumorthherapie mit CpG häufig ineffektiv. Es werden Hoffnungen daran gesetzt, durch ein besseres Verständnis der Wirkmechanismen des CpG eine Verbesserung des Therapieerfolges herbeizuführen. Mit diesem Ziel sollte in der vorliegenden Arbeit in verschiedenen murinen Tumormodellen der Tumorrückgang nach CpG-Applikation reproduziert und anschließend das Immunzellinfiltrat der Tumoren histologisch und durchflusszytometrisch untersucht werden. Dabei wurde

zum einen auf eine Charakterisierung intratumoraler Effektorzellen wie T-Zellen, dendritische Zellen, NK-Zellen und mononukleäre Zellen und zum anderen auf eine Beschreibung intratumoraler Suppressorzellen wie Tregs Wert gelegt. Zusätzlich wurde Perforin als funktioneller Marker untersucht. Abschließend wurde eruiert, ob sich die gewonnenen Ergebnisse über intratumorale T-Zellen und Tregs auch nach Therapie mit anderen TLR-Liganden reproduzieren lassen.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte, Chemikalien und Reagenzien

2.1.1 Geräte

| | |
|---|--|
| Begasungsbrutschrank | Heraeus (Hanau, D) |
| Bildgestaltung (Illustrator und Photoshop) | Adobe Systems (München, D) |
| Datenverarbeitung (Microsoft Excel) | Microsoft (Unterschleißheim, D) |
| Durchflusszytometer (FACSCalibur) | Becton Dickinson (Heidelberg, D) |
| Eismaschine AF 200 | Scotsman, Enodis (Herborn, D) |
| Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 plus | Zeiss (Jena, D) |
| Glas Pasteur Pipetten 150 mm John | Poulsen Ltd (Wertheim, D) |
| Konfokales Lasermikroskop LSM510 Axiovert 200M | Zeiss |
| Kryostat (Jung CM3000) | Leica (Solms, D) |
| Lichtmikroskop (Axiovert 200M) | Zeiss |
| Digitalkamera des Lichtmikroskops (AxioCam MRm und AxioCam MRc5) | Zeiss |
| Membranpumpe | Vacuubrand (Wertheim, D) |
| Neubauer Zählkammer | Optik Labor Frischknecht (Balgach, D) |
| pH-Meter 330 | WTW (Weilheim, D) |
| Präzisionswaage | Scaltec Instruments, Denver Instrument (Göttingen, D) |
| Schüttler | NeoLab (Heidelberg, D) |
| Sterilbank (Lamin Air HB 2448) | Heraeus |
| Sterilbank (Mikroflow) | Heraeus |
| Vortex Janke & Kunkel | IKA-Labortechnik (Staufen, D) |
| Vortex Genie 2 | Bender & Hobein (Zürich, S) |
| Waage | Sartorius (Göttingen, D) |

| | |
|--|--------------------|
| Wasserbad | GFL (Burgwedel, D) |
| Wasser-Deionisierungsmaschine (Reinstwasser-System Clear) | SG (Hamburg, D) |
| Zentrifuge Multifuge 3L-R | Heraeus |
| Zentrifuge Multifuge 4KR | Heraeus |

Tabelle 1 Geräte

In der linken Spalte werden die Geräte erwähnt, in der rechten Spalte sind Name und Sitz der herstellenden Firma vermerkt. (D, Deutschland).

2.1.2 Chemikalien

| | |
|---------------------------------|---|
| Aceton | Merck (Darmstadt, D) |
| Bovines Serum-Albumin (BSA) | Roth (Karlsruhe, D) |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Serva (Heidelberg, D) |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Sigma-Aldrich (Seelze, D) |
| Erythrozytenlyse-Puffer | Becton Dickinson (Heidelberg, D) |
| Hämalaun | Merck |
| Isofluran | Abbott (Ludwigshafen, D) |
| Isopropanol | Apotheke Klinikum Innenstadt (München, D) |
| Natriumacid | Sigma-Aldrich |
| Natriumchlorid | Roth |
| Natriumhydroxid | Merck |
| Natriumnitrit | Merck |
| Naphtol AS-Bi Phosphat | Sigma-Aldrich |
| N,N-Dimethylformamid | Sigma-Aldrich |
| Neufuchsin | Sigma-Aldrich |
| Propidiumjodid | Becton Dickinson |
| Salzsäuren (1- und 3- normale) | Apotheke Klinikum Innenstadt |

| | |
|--|--|
| Tetramisolhydrochlorid | Sigma-Aldrich |
| To-Pro-3-Iodid (Topro-3) | Molecular Probes, Invitrogen (Paisley, UK) |
| Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan (TRIS) | Roth |
| Trypan-Blau | Sigma-Aldrich |
| Trypsin | PAA (Pasching, A) |
| Wasser, destilliertes | Braun (Kronberg, D) |

Tabelle 2 Chemikalien

In der linken Spalte werden die Chemikalien erwähnt, in der rechten Spalte sind Name und Sitz der herstellenden Firma vermerkt. (A, Österreich, UK, Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland).

2.1.3 Materialien und Lösungen für die Zellkultur

Als fertige Lösungen wurden verwendet:

| | |
|---|----------------------|
| <i>Dulbecco's modified eagle medium</i> (DMEM) ohne Glutamin, <i>high glucose</i> | PAA |
| <i>Hanks' balanced salt solution</i> (HBSS) mit Kalzium und Magnesium | Gibco, Invitrogen |
| <i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS) ohne Kalzium und Magnesium | PAA |
| <i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI) 1640 Medium ohne Glutamin | Biochrom (Berlin, D) |

Tabelle 3 Fertige Lösungen

In der linken Spalte werden die fertigen Lösungen erwähnt, in der rechten Spalte sind Name und Sitz der herstellenden Firma vermerkt.

Als Zusätze wurden verwendet:

| | |
|---------------------------|---------------------------------|
| Fötale Kälberserum* (FCS) | Gibco, Invitrogen (Paisley, UK) |
| L-Glutamin | PAA |
| Penicillin | PAA |

| | |
|--------------|-----|
| Streptomycin | PAA |
|--------------|-----|

Tabelle 4 Zusätze für Zellkultur

In der linken Spalte werden die Zusätze erwähnt, in der rechten Spalte sind Name und Sitz der herstellenden Firma vermerkt.

*FCS wurde vor Gebrauch 30 Minuten im Wasserbad bei 56 ° C inaktiviert und in 50 ml Röhren bei -20°C gelagert.

Aus den Fertiglösungen wurden folgende Medien selbst hergestellt:

| | |
|-----------------|---|
| RPMI-Vollmedium | 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 10 Vol% FCS in RPMI 1640 Medium |
| DMEM-Vollmedium | 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 10 Vol% FCS in DMEM Medium |

Tabelle 5 Selbsthergestellte Medien

In der linken Spalte wird das hergestellte Medium erwähnt, in der rechten Spalte sind die einzelnen Bestandteile vermerkt.

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

2.1.4 Liganden für *Toll-like*-Rezeptoren

| | |
|--|---|
| CpG 1826 5' TCCATGACGTTTCCTGACGTT 3' | Coley (Langenfeld, D) |
| LPS | Sigma-Aldrich |
| 4-Amino-2-(Ethoxymethyl)- α,α - Dimethyl-1H-Imidazo[4,5-c]Quinoline- 1Ethanol (R848) | Alexis Biochemicals (San Diego, CA, USA) |
| Poly(I:C) | Invivogen (Toulouse, F) |

Tabelle 6 Liganden für TLRs

In der linken Spalte werden die *Toll-like*-Rezeptor-Liganden erwähnt, in der rechten Spalte sind Name und Sitz der herstellenden Firma vermerkt. (F Frankreich, USA, Vereinigte Staaten von Amerika).

2.1.5 Sonstige Reagenzien

| | |
|--|---------------------|
| DNase I | Roche (Mannheim, D) |
| N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]- N,N,N-Trimethylammonium- Methylsulfat (DOTAP) liposomal transfection reagent | Roche |
| Kollagenase D | Roche |

Tabelle 7 Sonstige Reagenzien

In der linken Spalte werden die Reagenzien erwähnt, in der rechten Spalte sind Name und Sitz der herstellenden Firma vermerkt.

2.1.6 Materialien und Lösungen für die Immunhistologie

Materialien für die Immunhistologie:

| | |
|----------------------------|--|
| Deckgläser 24x24 mm | Menzel-Gläser (Braunschweig, D) |
| Eindeckmedium Immumount | Thermo electron (Langenselbold, D) |
| Eindeckmedium Vectarshield | Vector Laboratories (Orton Southgate, UK) |

| | |
|--|---------------------------------|
| Immersionsöl | Zeiss (Jena, D) |
| Objektträger (SuperFrost) 25 × 75 × 1 mm | Menzel Gläser (Braunschweig, D) |
| Serum (Esel-, Maus- und Ziegen Serum) | Chemicon (Hampshire, UK) |

Tabelle 8 Materialien für Immunhistologie

In der linken Spalte werden die Materialien erwähnt, in der rechten Spalte sind Name und Sitz der herstellenden Firma vermerkt.

Lösungen für die Immunhistologie:

| | |
|--|--|
| Alkalische Phosphatase (AP)-Puffer | 100 mM TRIS und 100 mM Natriumchlorid in destilliertem Wasser |
| Entwicklungspuffer | 10 mM TRIS und 100 mM Natriumchlorid in destilliertem Wasser |
| Neufuchsinlösung | 5 g Neufuchsin-Pulver in 100 ml 2 N Salzsäure |
| <i>TRIS-buffered-saline</i> (TBS)-Puffer | 10 mM TRIS und 150 mM Natriumchlorid in destilliertem Wasser, pH 7,5 |

Tabelle 9 Lösungen für Immunhistologie

In der linken Spalte wird die hergestellte Lösung erwähnt, in der rechten Spalte sind die einzelnen Bestandteile vermerkt.

2.1.7 Antikörper

Immunhistologische primäre Antikörper:

| Spezifität | Spezies | Isotyp | Klon | Firma | Fixierung in Aceton | Verdünnung (1:x) IHC | Verdünnung (1:x) IF |
|------------|--------------|--------|--------|-----------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| CD3 | Ratte | IgG2a | KT3 | Dako-Cytomation | Ja | 1000 | - |
| CD3 | Ratte | IgG2a | KT3 | AbD serotec | Ja | 1000 | 300 |
| CD3e | syr. Hamster | IgG2κ | 500 A2 | BD Pharmingen | Ja | - | 50 |
| CD4 | Ratte | IgG2aκ | RM 4-5 | BioLegend | Ja | 3000 | 750 |
| CD8a | Ratte | IgG2aκ | 53-6.7 | BD Pharmingen | Ja | 100 | - |

| | | | | | | | |
|----------|--------------|----------------|---------------|---------------------------|----|-------|----|
| CD11c | arm. Hamster | IgG1 λ | HL3 | BD Pharmingen | Ja | 50 | 50 |
| CD31 | Rat | IgG2a κ | MEC 13.3 | BioLegend | Ja | 10000 | - |
| CD103 | arm. Hamster | IgG | 2E7 | BioLegend | Ja | - | 50 |
| B220 | Ratte | IgG2a κ | RA3-6B2 | BD Pharmingen | Ja | 3000 | - |
| F4/80 | Ratte | IgG2b | Cl: A3-1 | AbD serotec | Ja | 500 | - |
| Foxp3 | Ratte | IgG2a κ | FJK-16s | eBioscience | Ja | - | 30 |
| Ly-6G | Ratte | IgG2a κ | 1A8 | BD Pharmingen | Ja | 4000 | - |
| Perforin | Ratte | IgG2a | KM 585 (P1-8) | Kamiya Biomedical Company | Ja | 50 | 50 |

Tabelle 10 Primäre Antikörper für die Immunhistologie

Abkürzungen: Arm = armenisch, IF = Immunfluoreszenz, IHC = Immunhistochemie, Ly-6G = *lymphocyte antigen 6 complex, locus G*, Syr = syrisch. Falls keine Angabe über eine bestimmte Verdünnung gemacht wird, liegen hierzu keine Erfahrungswerte vor, Verdünnung in TBS.

Immunhistologische sekundäre Antikörper und Reagenzien:

| Spezies | anti | Spezies | Art | Markierung | Firma | Verdünnung (1:x) |
|--------------|------|--------------|----------------------------------|-----------------|-------------------------|------------------|
| Esel | anti | Ratte | F(ab') ₂ Fragment | Biotin | Jackson Immuno Research | 800 |
| Maus | anti | Hamster | IgG1 κ und IgG2b κ | Biotin | BD Pharmingen | 300 |
| Maus | anti | Ratte | IgG Gesamtmolekül | Rhodamine Red X | Jackson Immuno Research | 100 |
| Ziege | anti | arm. Hamster | IgG Gesamtmolekül | Cy5 | Jackson Immuno Research | 50 |
| Ziege | anti | Maus | Fab Fragment | keine | Jackson Immuno Research | 50 |
| Ziege | anti | Ratte | Fab Fragment | Biotin | Jackson Immuno Research | 200 |
| Ziege | anti | syr. Hamster | F(ab') ₂ Fragment | Cy3 | Jackson Immuno Research | 600 |
| Streptavidin | - | - | - | AP | Jackson Immuno Research | 1000 |

| | | | | | | |
|-------------------|---|---|---|-----------|------------|-----|
| Strept- avidin | - | - | - | Alexa 488 | Invitrogen | 300 |
|-------------------|---|---|---|-----------|------------|-----|

Tabelle 11 Sekundäre Antikörper und Reagenzien für Immunhistologie

Abkürzungen: AP = Alkalische Phosphatase, Cy3 = Cyanin 3, Cy5 = Cyanin 5, F(ab')₂ = variabler Teil eines Antikörpers, Fitc = Fluorescein-Isocyanat, H+L = *heavy and light chains*, Verdünnung in TBS.

Durchflusszytometrische Antikörper:

| Spezifität | Spezies | Isotype | Klon | Firma | Markierung |
|------------|-----------------|------------------|----------|-------|------------|
| Isotyp | Ratte | IgM κ | R4-22 | BD | FITC |
| Isotyp | Ratte | IgG1 κ | R3-34 | BD | PE |
| Isotyp | arm. Hamster | IgG1 κ | A19-3 | BD | APC |
| CD3e | arm. hamster | IgG1 κ | 145-2C11 | BD | PE |
| CD11b | Ratte | IgG2b κ | M1/70 | BD | FITC |
| CD11c | arm. Hamster | IgG1 λ 2 | HL3 | BD | APC |
| CD49b | Ratte | IgM κ | DX5 | BD | FITC |
| B220 | Ratte | IgG2a κ | RA3-6B2 | BD | PE |

Tabelle 12 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Abkürzungen: APC = Allophycocyanin, BD = Becton Dickinson, FITC = Fluorescein-Isocyanat, PE = Phycoerythrin.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellulär-immunologische Methoden

2.2.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Zellkultur erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei einer Temperatur von 37° C, 95% Luftfeuchtigkeit und einem 5%-igen CO₂-Luftgemisch. Alle Experimente mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in einem Lamin Air Flow oder einer Mikroflow durchgeführt.

2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde der Trypanblauausschlusstest durchgeführt. Dabei werden tote Zellen blau angefärbt, wohingegen lebende Zellen den Farbstoff ausschließen. Durch Auszählen geeigneter Verdünnungen werden die Zellzahlen in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

2.2.1.3 Zelllinien

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden die murine Melanomlinie B16 (C57BL/6) und die murine Kolonkarzinomlinie C26 verwendet. Letztere wurde über die Firma Cell Lines Service (Heidelberg, D) bezogen und war ursprünglich durch Injektion kanzerogener Substanzen in eine Maus generiert worden (Griswold and Corbett, 1975).

2.2.1.4 Kultivierung der Tumorzellen

Die C26-Kolonkarzinomzelllinie wurde in DMEM-Vollmedium kultiviert und regelmäßig lichtmikroskopisch auf Anzeichen von Zelluntergang oder mikrobieller Verunreinigung inspiziert. Dreimal wöchentlich wurden die Zellen gesplittet, wobei das Kulturmedium abgeschüttet und die adhärenen Zellen mit einem Zellschaber von der Flaschenoberfläche gelöst wurden. Danach konnten die Tumorzellen durch mehrmaliges Spülen der Flasche mit Vollmedium geerntet werden. Nach Zentrifugation (390 g, 7° C, 5 Minuten) wurden die Zellen zur Einzelzellsuspension durch eine 20-Gauge-Kanüle (20G-Kanüle) gezogen und im Verhältnis 1:2 gesplittet. Abschließend wurden die Zellen erneut in Kulturflaschen ausgesät und mit dem für die Flaschen entsprechenden Volumen an Vollmedium versorgt. Vor geplanter Tumorinduktion wurden die Zellen zusätzlich am Vortag gesplittet. Die B16-Zellen wurden auf gleiche Weise kultiviert bis auf folgende Unterschiede im Ernten der Zellen: Nach Abschütten des Kulturmediums wurde die Flasche mit PBS gespült und 1-fach Trypsin auf die Zellen pipettiert. Nach Schütteln der Flasche und Inkubation im Brutschrank für einige Minuten waren die adhärenen Zellen von der Flaschenoberfläche gelöst. Danach konnten die Tumorzellen durch mehrmaliges Spülen der Flasche mit Vollmedium geerntet und im Verhältnis 1:4 gesplittet werden. Daraufhin wurden auch diese Zellen erneut in Kulturflaschen ausgesät und mit dem für die Flaschen entsprechenden Volumen an Vollmedium versorgt.

2.2.2 Tierexperimentelle Methoden

2.2.2.1 Mäuse und Haltungsbedingungen

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden von der Firma Harlan Winkelmann (Borchen, D) bezogen. Dabei handelte es sich um Weibchen des BALB/c- und des C57BL/6-Stammes, weit verbreiteten Inzuchtlinien, mit einem Mindestalter von vier Wochen. Die Mäuse wurden mindestens eine Woche akklimatisiert, ehe sie für Versuche herangezogen wurden. Alle Tierversuche wurden im Tierstall der Medizinischen Klinik Innenstadt durchgeführt, wobei maximal acht Mäuse je Käfig gehalten wurden und mittels einer Zeitschaltuhr ein zwölf-stündiger Hell-Dunkel-Rhythmus gewährt werden konnte. Alle Tierversuche waren von der Regierung von Oberbayern genehmigt und unterlagen den Vorschriften des Tierschutzgesetzes.

2.2.2.2 Tumorinduktion

Für Tumorversuche mit der C26-Kolonkarzinomzelllinie wurden stets weibliche BALB/c-Mäuse verwendet, die mindestens fünf Wochen alt waren. Die zu injizierenden Tumorzellen wurden wie beim *splitten* geerntet, allerdings wurde die Flasche mit HBSS gespült. Nachdem die Zellen abzentrifugiert (300 g, 7° C, 7 Minuten) und durch eine 20G-Kanüle gezogen worden waren, stellte man sie auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml HBSS ein. Jeder Maus wurden unter Kurzzeitbetäubung mit Isofluran 250.000 Tumorzellen subkutan in die rechte Flanke injiziert. Nach ungefähr sieben Tagen waren die Tumoren erstmals palpabel. Als Maß für die Tumorgöße wurde dreimal wöchentlich aus dem Produkt des längsten Tumordurchmessers und des darauf senkrechten Durchmessers die Tumorphäche berechnet. Auf gleiche Weise wurden Tumoren der B16-Melanomzelllinie induziert, allerdings wurden in diesem Fall weibliche C57BL/6-Mäuse verwendet, die Tumorzellen in PBS geerntet und diese nach der Zentrifugation nicht durch eine Kanüle gezogen. Außerdem wurden hierbei 1 Mio Tumorzellen injiziert.

2.2.2.3 Stimulierung der Mäuse mit Toll-like-Rezeptor-Liganden

Im Falle der Applikation von CpG bedeutete das die peritumorale subkutane Injektion von 100 μ g CpG in 100 μ l PBS. Poly(I:C) hingegen wurde in einer Menge von 250 μ g intraperitoneal injiziert. Die Stimulierung mit R848 erfolgte subkutan in die zum Tumor

kontralaterale Seite mit 20 μg R848 in 100 μl 0,9%-iger Natriumchloridlösung. LPS wurde mit 1% BSA versetzt und in einer Dosierung von 5 μg LPS in 100 μl 0,9%-iger Natriumchloridlösung subkutan in die zum Tumor kontralaterale Flanke gespritzt. Die Tiere wurden nur bei Bedarf betäubt.

2.2.2.4 Töten der Mäuse und Organentnahme

Für Versuchsbeendigungen oder zur Vermeidung unnötigen Leidens bereits geschwächter Mäuse während eines Versuches wurden die Tiere durch zervikale Dislokation unter Isoflurananästhesie getötet. Anschließend erfolgte bei Bedarf die Entnahme von Milz und / oder Tumor.

2.2.3 Immunhistologische Methoden

2.2.3.1 Präparation von Geweben für immunhistologische Färbungen

Nach dem Töten einer Maus wurde das gewünschte Organ entnommen, in Alufolie gewickelt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend konnte das Gewebe bei -80°C gelagert werden. Zur histologischen Begutachtung wurden am Kryostat (Kammertemperatur -25°C , Objektträgertemperatur -22°C) 5 μm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Objektträger aufgezogen und konnten dann sofort gefärbt oder wiederum bei -80°C zwischengelagert werden. Zwischengelagerte Objektträger mussten zwei Stunden vor der Färbung aus dem Gefrierschrank entnommen werden, um zuvor bei Raumtemperatur trocknen zu können.

2.2.3.2 Immunhistochemie

Mittels Immunhistochemie können Antigene auf Zellen oder im Gewebe durch an Antikörper gebundene Enzyme sichtbar gemacht werden. Bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methode ist das Enzym Alkalische Phosphatase für diese chemische Farbreaktion verantwortlich. Die immunhistochemische Färbung begann mit der Fixierung des Gewebeschnittes in Aceton für zehn Minuten. Anschließend wurden die Gewebe für fünf Minuten mit TBS benetzt und danach das TBS mit einer an eine Membranpumpe angeschlossenen Pasteur-Pipette aus Glas abgesaugt. Nach Absaugen des TBS wurde das Gewebe für eine Stunde mit einem unkonjugierten Primärantikörper inkubiert, der für das Antigen spezifisch war, das letzten Endes in

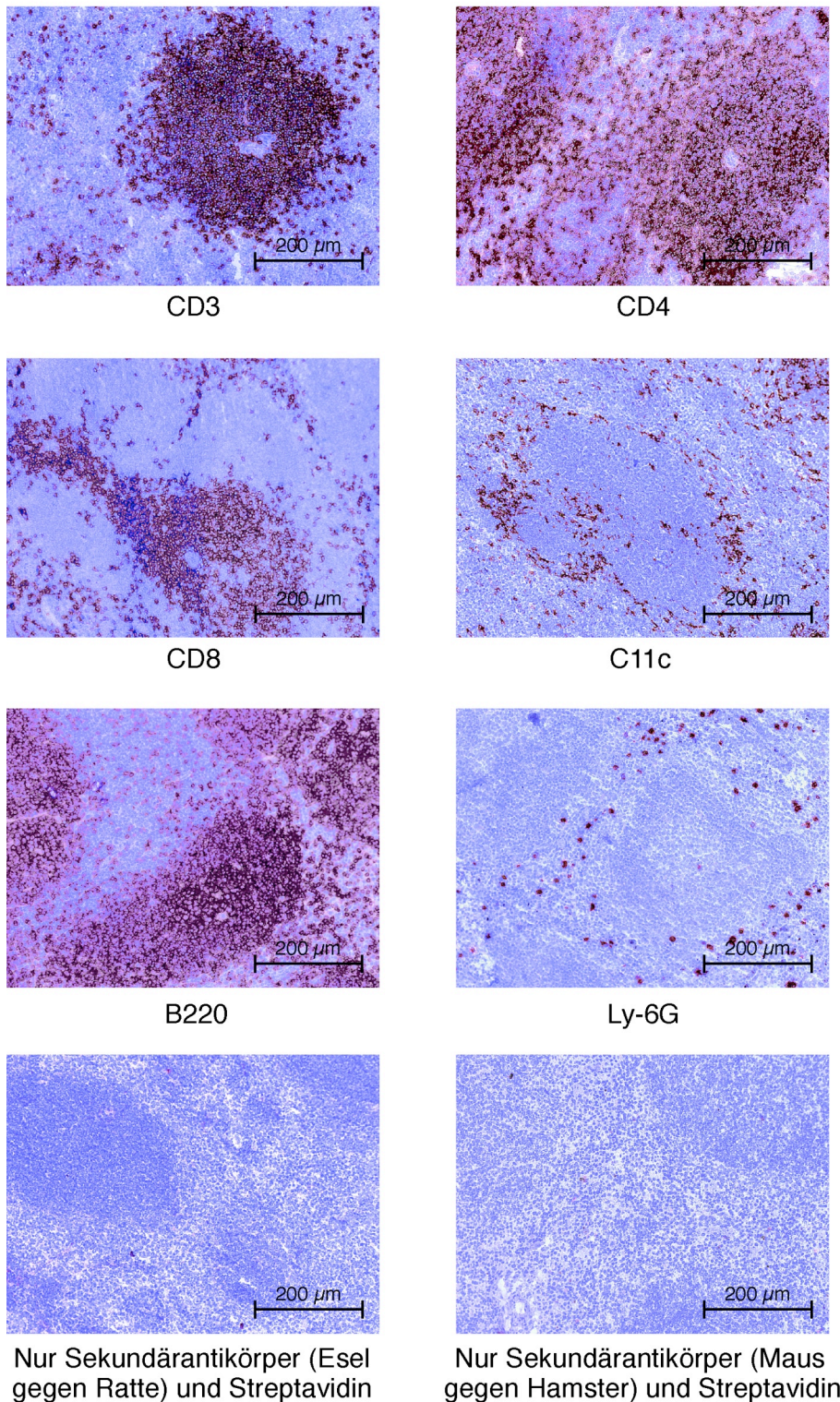
dieser Färbung sichtbar gemacht werden wollte. Die verwendeten Primärantikörper wurden ihrer Konzentration entsprechend in TBS verdünnt. Nach 60 Minuten wurde der Primärantikörper abgesaugt und das Gewebe dreimal mit TBS gewaschen. Anschließend wurde für 45 Minuten ein Biotinkonjugierter Sekundärantikörper aufgetragen, der den F_c-Teil des Primärantikörpers bindet. Die Sekundärantikörper mussten spezifisch gegen den F_c-Teil der Spezies gerichtet sein, aus der der Primärantikörper stammt. Alle Sekundärantikörper wurden in TBS mit 10% Serum der Tierspezies, in der der Antikörper generiert wurde, verdünnt, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Das Serum war zuvor 1:10 in TBS verdünnt worden. Nach der Inkubation des Sekundärantikörpers wurde dieser abgesaugt und das Gewebe gewaschen und für weitere 20 Minuten mit AP-konjugiertem Streptavidin inkubiert. Streptavidin bindet dabei an Biotin. Anschließend wurde das Gewebe dreimal mit TBS gewaschen und abschließend mit destilliertem Wasser benetzt. Nun konnte der Objektträger mit den Gewebeschnitten für 20 Minuten auf einen Schüttler in eine mit Alufolie umschlossene Küvette mit Farbentwicklerlösung gestellt werden.

Diese Entwicklerlösung wurde auf einem Schüttler vor jeder Färbung neu hergestellt. Dafür wurden 25 ml AP-Puffer und 70 ml Entwicklungspuffer in einem Becherglas gemischt und unter dem Abzug 70 mg Levamisol hinzugegeben. Alle nun folgenden Schritte wurden dann weiterhin unter dem Abzug vorgenommen: In einem Eppendorf-Röhrchen wurden 40 mg Natriumnitrit erst mit 500 μ l destilliertem Wasser und daraufhin mit 200 μ l Neufuchsinlösung bis zum Aufschäumen vermischt und in das Becherglas zugegeben. Danach wurde in einem weiteren Eppendorf-Röhrchen 50 mg Naphthol-AS-BI-Phosphat mit 600 μ l Dimethylformamid gemischt und ebenfalls in das Becherglas pipettiert. Abschließend musste der pH-Wert mit Salzsäure auf 8,6 - 8,8 eingestellt werden. Nun konnte die Lösung in eine Küvette filtriert und für eine Färbung verwendet werden. Nachdem die Gewebe 20 Minuten in der Entwicklerlösung gefärbt wurden, mussten sie mit destilliertem Wasser gewaschen, für 20 Sekunden mit Hämalaun gegengefärbt und gleich darauf für einige Minuten mit Leitungswasser gewaschen werden. Zum Schluss wurden die Objektträger mit einem wasserlöslichen Eindeckmedium (Immumount-Medium) eingedeckt und konnten nach ein paar Minuten Trockenzeit unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden.

Zur Etablierung der immunhistochemischen Färbung für die vorliegende Arbeit wurden murine Milzen als Testorgane verwendet, da sie leicht verfügbar und zugleich reich an

Immunzellen sind. Dazu wurde diversen Mäusen – unabhängig von Mausstamm, Alter, Geschlecht und Vorbehandlung – die Milz entnommen. Abbildung 1 zeigt beispielhaft die Färbung muriner Milzen mit Antikörpern gegen CD3, CD4, CD8, CD11c, B220 und Ly-6G. Dabei sind CD3, CD4 und CD8 typische Oberflächenmarker für T-Zellen, wohingegen dendritische Zellen über ihren klassischen Oberflächenmarker CD11c dargestellt werden. Mit B220 wurden B-Zellen und mit Ly-6G neutrophile Granulozyten erfasst. Für die Negativkontrolle wurden die Gewebe nur mit einem Sekundärantikörper und Streptavidin gefärbt. In den dargestellten Färbungen können die jeweiligen Zellpopulationen in den für sie typischen Arealen der Milz dargestellt werden: T-Zellen ummanteln klassischerweise als periarterielle Lymphozytenscheide die Zentralarterien der Milz und interagieren dort mit dendritischen Zellen. Die Lymphfollikel der Milz hingegen, die sogenannten Milzknötchen, bestehen typischerweise aus B-Lymphozyten. Periarterielle Lymphozytenscheide und Milzknötchen bilden zusammen die weiße Pulpa der Milz.

Färbung diverser Zellen in der Milz

**Abbildung 1 Immunhistologische Färbung diverser Immunzellen in murinen Milzen**

Gewebeschnitte muriner Milzen nach Färbung von CD3, CD4, CD8, CD11c, B220 und Ly-6G und dazugehörige Negativkontrollen. Positive Zellen erscheinen rot, Kerngegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Das gefärbte Antigen ist unter dem jeweiligen Bild vermerkt. Vergrößerung 200-fach.

2.2.3.3 Lichtmikroskopie und Quantifizierung von Immunzellinfiltraten in Tumorgewebe

Immunhistochemische Aufnahmen von Tumoren wurden unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Die Auszählung von Zellen erfolgte unter Verwendung eines 20-fach vergrößernden Objektivs der numerischen Apertur 0,4 und eines 40-fach vergrößernden Objektivs der numerischen Apertur 0,75. Als „positiv“ wurde eine Zelle betrachtet, wenn sich ihre Oberflächenfärbung deutlich zirkulär präsentierte und gleichzeitig auf einen Kern bezog (Abbildung 2A). Es wurden nur Gesichtsfelder ausgezählt, in denen reines Tumorgewebe ohne Nekrose- und Bindegewebeareale vorzufinden war. In Abbildung 2B wird beispielhaft ein nekrotisches Tumoreal gezeigt, das nicht ausgezählt wurde. In vielen erfolgreich therapierten Tumoren war es auf Grund der geringen TumorgroÙe nicht immer möglich, eine größere Anzahl an Gesichtsfeldern auszuzählen. Digitalisierte Aufnahmen wurden mit einer Digitalkamera aufgezeichnet.

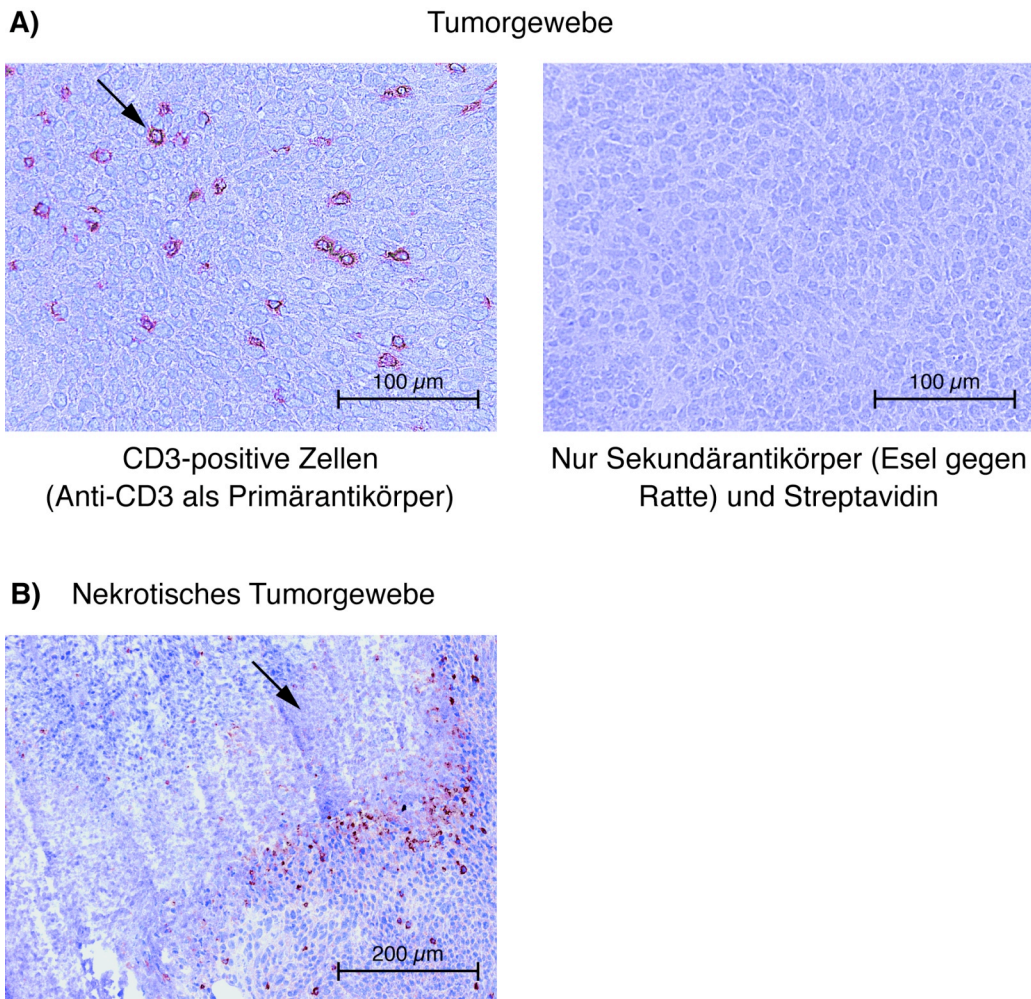


Abbildung 2 Immunhistochemische Färbungen von Tumoren

A: In Gewebeschnitten muriner Tumoren wurde das Antigen CD3 durch Farbreaktion mit Neufuchsin rot dargestellt. Das Gewebe wurde mit Hämalaun gegengefärbt. Links dargestellt sind intratumorale CD3-positive Zellen, der Pfeil markiert beispielhaft eine CD3-gefärbte Zelle. Rechts daneben wird die dazugehörige Negativkontrolle gezeigt, bei der kein Primärantikörper aufgetragen wurde. Vergrößerung 400-fach. **B:** Gewebeschnitt eines murinen Tumors nach Färbung mit CD3. Positive Zellen erscheinen rot, Kerngegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Es wird ein Nekroseareal dargestellt, welches durch einen Pfeil verdeutlicht wird. Vergrößerung 200-fach.

2.2.3.4 Immunfluoreszenz

Neben der Immunhistochemie, mit Hilfe derer man Antigene im Lichtmikroskop erkennen kann, gibt es auch die Möglichkeit Antigene im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Dafür benötigt man die Immunfluoreszenz, bei der mit Antikörpern gearbeitet wird, an die ein Fluorochrom gekoppelt ist. Fluorochrome sind Moleküle, die in einer charakteristischen Wellenlänge leuchten, wenn man sie in einer für sie typischen Wellenlänge anregt. Das Vorgehen bei der Immunfluoreszenzfärbung glich dem der immunhistochemischen Färbung bis zum Schritt des Primärantikörpers. Dann

wurden entweder Fluorochrom-gekoppelte oder Biotin-gekoppelte Sekundärantikörper verwendet. Im Falle des Einsatzes Fluorochrom-gekoppelter Sekundärantikörper war die Färbung dann nach dessen 45-minütiger Inkubation beendet. Die Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper hingegen mussten noch mit einem Fluorochrom-gekoppelten Streptavidin abgegriffen werden. In beiden Fällen wurde das Gewebe nach dem letzten Inkubationsschritt dreimal mit TBS gewaschen. Zur Färbung von Zellkernen wurde das Gewebe anschließend für zehn Minuten mit TOPRO-3 gegengefärbt. TOPRO-3 wurde als 1 mM-Lösung in DMSO bei -20° C gelagert und vor seiner Anwendung als Kernfärbung im Verhältnis 1:3 mit TBS verdünnt. Abschließend wurde das Gewebe wiederum dreimal mit TBS gewaschen und danach mit Vectarshield Eindeckmedium eingedeckt. Danach wurden die Objektträger bei -20° C gelagert. Bei allen Immunfluoreszenzfärbungen musste darauf geachtet werden, dass die Objektträger während der Inkubation mit Fluorochromen mit Alufolie abgedeckt wurden, um ein Ausbleichen der Fluorochrome zu verhindern.

Mit der Immunfluoreszenz können auch zwei Antigene gleichzeitig sichtbar gemacht werden. Dabei ist die Verwendung von Fluorochromen, die in verschiedenen Wellenlängen leuchten, eine essenzielle Voraussetzung. Zudem müssen für beide Antigene Primärantikörper unterschiedlicher Spezies verwendet werden. Für diese Doppelfärbung wurde das Gewebe gleichzeitig mit beiden Primärantikörpern inkubiert. Nach dem Waschen wurden wiederum gleichzeitig zwei Sekundärantikörper zugegeben, die gegen die jeweilige Spezies der Primärantikörper gerichtet sind. An einen Sekundärantikörper war bereits ein Fluorochrom gekoppelt. Der andere, Biotin-konjugierte Sekundärantikörper wurde mit einem Fluorochrom-gekoppelten Streptavidin abgegriffen, welches in einem weiteren Inkubationsschritt zugefügt wurde.

Einen Sonderfall stellt die Doppelfärbung von zwei Antigenen dar, bei denen beide Primärantikörper aus der Ratte stammen. In diesem Fall können F(ab)-Fragmente als Abgreifsysteme verwendet werden. Dabei wurde das Gewebe zunächst nur mit einem Primärantikörper inkubiert und anschließend mit gegen Ratte gerichteten F(ab)-Fragmenten aus der Ziege abgegriffen, an die ein Biotin gekoppelt ist. Während der 20-minütigen Inkubation lagerten sich die F(ab)-Fragmente so komplett um den Primärantikörper, dass dieser später für den gegen den zweiten Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper keine freien Bindungsstellen mehr aufwies. Anschließend wurde das Biotin-konjugierte F(ab)-Fragment und somit das erste

Antigen durch ein Fluorochrom-gekoppeltes Streptavidin sichtbar gemacht. Daraufhin wurde das Gewebe mit dem zweiten Primärantikörper aus der Ratte inkubiert und anschließend mit einem gegen Ratten-IgG gerichteten Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper abgegriffen. Hierbei bestand nun keine Gefahr mehr, dass auch der erste Primärantikörper erkannt wird, da dieser durch die bereits gebundenen F(ab)-Fragmente abgeschirmt war. Eine weitere Besonderheit bei dieser Färbung war, dass das gesamte Gewebe unmittelbar nach der Fixierung mit 10%-igem Ziegen Serum (in TBS verdünnt) geblockt wurde (30 Minuten). Dies dient der Herabsetzung unspezifischer Bindungen der Sekundärantikörper. Weiterhin gilt es bei der beschriebenen Methode Kreuzreaktionen des in der Ziege generierten und gegen Ratten-IgG gerichteten F(ab)-Fragments zu verhindern. Daher musste endogenes Maus-IgG zusätzlich für zwei Stunden mit gegen Maus gerichteten F(ab)-Fragmenten aus der Ziege geblockt werden. Anschließend konnte dann die Inkubation mit dem ersten Primärantikörper beginnen. Mit der F(ab)-Fragment-Methode konnte Gewebe auch dreifach gefärbt werden, wobei das dritte Antigen von einem Primärantikörper abgegriffen werden musste, der nicht aus der Ratte kam. Dieser Primärantikörper wurde dann zusammen mit dem zweiten Primärantikörper aus der Ratte inkubiert.

2.2.3.5 Konfokale Lasermikroskopie

Durch konfokale Lasermikroskopie wird das von Fluorochromen emittierte Licht in digitale Signale umgewandelt, so dass ein Bild entsteht, in dem die zuvor mit Antikörpern gefärbten Antigene farblich erscheinen. Bei Verwendung verschiedener Fluorochrome ist es notwendig, diese in ihren unterschiedlichen Wellenlängen anzuregen, damit sie in den für sie typischen Farben leuchten. In diesem Fall können mehrere Antigene gleichzeitig dargestellt werden. Da aufgrund der im Mikroskop vorhandenen Lochblende immer nur emittiertes Licht einer ganz bestimmten Ebene erfasst wird, bezeichnet man diese Form der Mikroskopie als konfokal. So ermöglicht es diese Methode verschiedene Ebenen beispielsweise einer einzigen Zelle zu untersuchen.

2.2.4 Durchflusszytometrie

2.2.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (englisch *flow cytometry*“ oder *fluorescence-activated cell sorting*, FACS) können Oberflächenantigene von Zellen dargestellt und quantifiziert werden. Dazu werden diese Antigene mit Antikörpern gefärbt, an die ein Fluorochrom gebunden ist. Anschließend werden die Zellen in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln hintereinander durch einen Laserstrahl geführt. Dabei führen Zelleigenschaften wie Größe und intrazelluläre granuläre Bestandteile zu einer Lichtstreuung, die von Detektoren erfasst wird. Das Licht, welches in der Verlaufsrichtung des Laserstrahls streut, wird als Vorwärtsstreulicht (englisch *forward scatter*, FSC) bezeichnet und wird durch die Größe der beleuchteten Zelle bestimmt. Das seitlich abgelenkte Licht wird Seitwärtsstreulicht (englisch *side scatter*, SSC) genannt und entsteht durch die intrazelluläre Granularität der Zelle.

Zellpopulationen können bereits anhand dieser beiden Eigenschaften durchflusszytometrisch unterschieden und dann spezifisch hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften untersucht werden. Dabei regen zwei Laserstrahlen (Anregungswellenlänge 488 nm und 635 nm) das Antikörper-gebundene Fluorochrom zur Emission von charakteristischen Lichtquanten an, die daraufhin von Detektoren erfasst werden. Die Fluoreszenz ist dabei proportional zur Anzahl der je Zelle gebundenen Antikörper und damit zur Anzahl der markierten Antigene. Eine Zelle kann mit verschiedenen Fluorochromen, die in unterschiedlichen Farben leuchten, markiert sein. Filter trennen das gesammelte Licht nach Wellenlängenbereichen auf und lenken es zu den entsprechenden Detektoren. So können die Signale verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe bei einer Mehrfachfärbung getrennt aufgenommen und ausgewertet werden. Allerdings können die Lichtfilter die verschiedenen Fluoreszenzintensitäten nicht vollständig auftrennen, da sich die Spektren der eingesetzten Farbstoffe zum Teil überlappen. Diese Überlappungen können jedoch elektronisch kompensiert werden. Hierzu werden bei jedem Versuch Kontrollproben hergestellt, bei denen jeweils nur eine Oberflächeneigenschaft mit einem bestimmten Fluorochrom angefärbt ist, während die anderen Fluorochrome, gebunden an geeignete unspezifisch bindende Isotypen-Antikörper, als Negativkontrolle dienen.

2.2.4.2 Gewinnung einer Einzelzellsuspension aus murinen Tumoren für durchflusszytometrische Untersuchungen

Zur Gewinnung einer Einzelzellsuspensionen wurden die Tumoren in einer Petrischale mechanisch mit Skalpellern zerkleinert und anschließend zentrifugiert (400 g, 21° C, 2 Minuten). Nach Resuspension in 10 ml kaltem HBSS und wiederholter Zentrifugation (400 g, 21° C, 2 Minuten) wurden auf die zerkleinerten Tumoren 3 ml Kollagenase (Konzentration 1 mg/ml in RPMI) und 3 ml DNase (Konzentration 0,05 mg/ml in RPMI) zugegeben und das Gemisch für 20 Minuten unter gelegentlichem Aufschütteln in ein Wasserbad bei 37° C gestellt. Danach wurden die Tumoren erneut zentrifugiert (400 g, 21° C, 5 Minuten) und zweimalig mit kaltem HBSS gewaschen. Nach einer Inkubation der Tumorzellen mit 5 ml 2 mM EDTA in PBS bei 37° C für 20 Minuten und anschließenden Zentrifugation (400 g, 21° C, 5 Minuten) wurde der Überstand aufgehoben und die Zellen wiederum mit HBSS gewaschen. Auch der Überstand des zweiten Waschvorganges wurde aufgehoben und zu dem ersten Überstand hinzugegeben. Die Tumoren wurden nochmals für 20 Minuten bei 37° C mit 3 ml Kollagenase (Konzentration 1 mg/ml in RPMI) und 3 ml DNase (Konzentration 0,05 mg/ml in RPMI) versetzt und anschließend auf Eis abgekühlt und durch Kanülen absteigender Dicke von 20G bis 27G gepresst. Die nun gewonnene Zellsuspension wurde mit den aufgehobenen Überständen gemischt und zentrifugiert (400 g, 21° C, 5 Minuten). Abschließend wurden die Zellen noch zweimal mit HBSS gewaschen, bevor sie in HBSS resuspendiert und durch ein Zellstrainersieb (40 µm) filtriert wurden.

Danach wurden die Zellen gezählt und – falls auf Grund der geringen Zellzahl überhaupt möglich – auf eine Konzentration von 18×10^6 Zellen/ml eingestellt. Für die durchflusszytometrische Untersuchung wurden 50 µl Zellsuspension mit bis zu drei verschiedenen Antikörpern (jeweils 0,75 µl) für 15 Minuten auf Eis unter Lichtausschluss inkubiert und daraufhin mit PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurden die nun gefärbten Zellen in 300 µl PBS resuspendiert. Kurz vor der durchflusszytometrischen Untersuchung wurde Propidiumjodid (50 µg/ml) in einer Verdünnung von 1:300 dazugegeben. Zur Kontrolle wurde eine Milz einer untherapierten tumortragenden Maus mitgefärbt.

2.2.4.3 Gewinnung einer Milzzellsuspension für durchflusszytometrische Untersuchungen

Die Milz war nach der Organentnahme in PBS transportiert und anschließend durch ein Zellstrainersieb (40 μm) filtriert worden. Danach wurden die Milzzellen zentrifugiert (390 g, 7° C, 5 Minuten) und mit 3 ml Erythrozytenlyse-Puffer versetzt. Nach fünf Minuten wurde die Lyse durch Zugabe von 40 ml PBS und anschließender Zentrifugation (390 g, 7° C, 5 Minuten) gestoppt. Nun wurden die übrigen Zellen auf eine Konzentration von 40×10^6 Zellen/ml PBS eingestellt und jeweils 50 μl nach dem oben beschriebenen Protokoll für die FACS-Auswertung gefärbt.

2.2.4.4 Darstellung und Auswertung in der Durchflusszytometrie

Die Auswertung durchflusszytometrischer Ergebnisse erfolgte mit der Software FlowJo (Tree Star, OR, USA). Informationen über Zellgröße, Granularität oder Fluoreszenzintensität wurden in der vorliegenden Arbeit in Relation zueinander in Form eines Punktediagramms dargestellt. Dabei können zwei verschiedene Eigenschaften einer Zelle gleichzeitig dargestellt werden. Jede Zelle der analysierten Population ist dabei als Punkt eingezeichnet, dem in der Abszisse und in der Ordinate die Intensität der entsprechenden Fluoreszenz zugeordnet ist. Häufig wird in der Durchflusszytometrie eine definierte Zellpopulation auf bestimmte Eigenschaften hin untersucht. Dies wird durch das Setzen von Analysefenstern (englisch „*gates*“) ermöglicht, die den Bereich definieren, der im Weiteren analysiert werden soll.

2.3 Statistische Analyse

Alle gezeigten Daten werden als Einzelwerte oder als Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Für eine statistische Analyse der Mittelwerte wurde der parameterfreie Mann-Whitney-U-Test mit Hilfe des Computerprogramms SPSS (SPSS, Chicago, IL, USA) angewandt. Als signifikant wurde ein p-Wert $\leq 0,05$ betrachtet, was mit einem Sternsymbol (*) verdeutlicht wurde. Zwei Sterne (**) entsprachen einem $p \leq 0,01$ und drei Sterne (***) einem $p \leq 0,001$. Die Abkürzung n.s. steht für „nicht signifikant“.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss der peritumoralen Therapie mit CpG-Oligonukleotiden auf die Präsenz intratumoraler Immunzellen

3.1.1 Tumorwachstum

In der vorliegenden Arbeit wurde das intratumorale Immunzellinfiltrat nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden histologisch und durchflusszytometrisch untersucht. Dabei wurde mit verschiedenen Tumor- und Mausmodellen gearbeitet. Die meisten Ergebnisse der histologischen und durchflusszytometrischen Analyse beziehen sich auf drei Tierexperimente, wobei das Therapieregime, die Tumorart und der genetische Hintergrund der Mäuse variierten (Tabelle 13). Allen Versuchen ist eine subkutane Injektion von Tumorzellen in die murine Flanke an Tag 0 gemein. Anschließend wurden die Mäuse jedes Versuches in unterschiedliche Therapiegruppen aufgeteilt, wobei eine Gruppe stets keine Therapie erhielt und somit als Kontrolle fungierte. Die anderen Mäuse erhielten nach unterschiedlichen Zeitschemata je Therapie 100 µg CpG subkutan peritumoral injiziert. Bei Tumorversuch „A“ gab es zusätzlich noch eine dritte Gruppe, in der die Mäuse 10 µg CpG plus 50 µg DOTAP subkutan peritumoral erhielten. Bei Versuchsende wurden die Tiere getötet und ihre Tumoren für histologische oder durchflusszytometrische Untersuchungen entnommen. Dabei war es notwendig im Verlauf des Versuches den beginnenden Effekt der Therapie zu erkennen und dann die Mäuse für die Tumorentnahme zu töten; im Falle eines zu langen Abwartens des Therapieerfolgs bestand die Gefahr einer Komplettremission der Tumoren, was eine histologische Untersuchung dieser unmöglich gemacht hätte.

| Experiment | Mausstamm | Tumormodell | Mäuse Kontrollgruppe | Mäuse CpG-Gruppe | Mäuse CpG + DOTAP-Gruppe | Therapie (Tage) | Versuchsende (Tag) |
|------------|-----------|-------------|----------------------|------------------|--------------------------|------------------|--------------------|
| A | BALB/c | C26 | 4 | 4 | 4 | 8, 10, 12 und 14 | 16 |
| B | BALB/c | C26 | 4 | 4 | - | 8, 11 und 14 | 15 |
| C | C57BL/6 | B16 | 7 | 7 | - | 8 und 11 | 13 |

Tabelle 13 Protokolle der Tierexperimente

Die Tage beziehen sich auf Tage nach Tumorinduktion.

Ziel des Tierexperimentes „A“ war es Tumoren für die histologische Untersuchung zu gewinnen. Die dritte Gruppe mit therapeutischer Gabe von CpG+DOTAP wurde dem Versuch hinzugefügt, um den Einfluss von DOTAP auf den Therapieverlauf und die Präsenz intratumoraler Immunzellen beurteilen zu können. Das kationische Lipid DOTAP, eine DNS-komplexierende Substanz, wirkt über eine Verstärkung der TLR9-vermittelten Interferon- α -Produktion (IFN α -Produktion) dendritischer Zellen immunstimulierend (Asselin-Paturel et al., 2005; Honda et al., 2005b). Im vorliegenden Versuch sollte ein möglicher synergistischer Effekt der Kombination von CpG mit DOTAP untersucht werden. Der Tumorgrößenverlauf der einzelnen Gruppen (Abbildung 3) zeigt ein tendenziell verlangsamtes Tumorwachstum der CpG-Gruppe im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen. Interessant war die CpG+DOTAP-Gruppe, die in ihrem Tumorgrößenverlauf ein schnelleres Tumorwachstum als die Kontrollgruppe aufwies. Bezüglich des Tumorgrößenwachstums der einzelnen Mäuse fielen die CpG-therapierten Tieren durch ein langsames und zum Teil stagnierendes Wachstum auf. Fast alle Mäuse der anderen Gruppen zeigten ein stetiges Wachstum. Der Versuchsaufbau des Experimentes „B“ glich dem des Versuches „A“, jedoch fehlte hierbei die weitere DOTAP-Gruppe. Im Experiment „B“ sollten die Ergebnisse des Tierexperimentes „A“ mit einer anderen Methode, der durchflusszytometrischen Untersuchung, reproduziert und ergänzt werden. Auch in diesem Versuch unterschieden sich die Gruppen sowohl in ihren Mittel- als auch in ihren Einzelwerten voneinander (Abbildung 3). Fast alle Tumoren der CpG-therapierten Mäuse sind kleiner

als die der Kontrollgruppe und stagnierten in ihrem Wachstum. Bei einer Maus ist der Tumor im Verlauf der Therapie kleiner geworden. Auch in Versuch „C“ stand die peritumorale CpG-Therapie im Mittelpunkt, allerdings wurde diesmal mit C57BL/6 ein anderer Mausstamm und mit B16-Zellen eine andere Tumorzelllinie verwendet. Dadurch konnten die aus den anderen beiden Experimenten gewonnenen Daten nochmals an Hand eines anderen Tumormausmodells evaluiert werden. Der Erfolg der Therapie wird auch hier wieder an den Mittel- und Einzelwerten des Tumorgrößenverlaufs (Abbildung 3) ersichtlich. Außer einem Tumor waren in der Kontrollgruppe alle Tumoren deutlich größer als in der CpG-behandelten Gruppe.

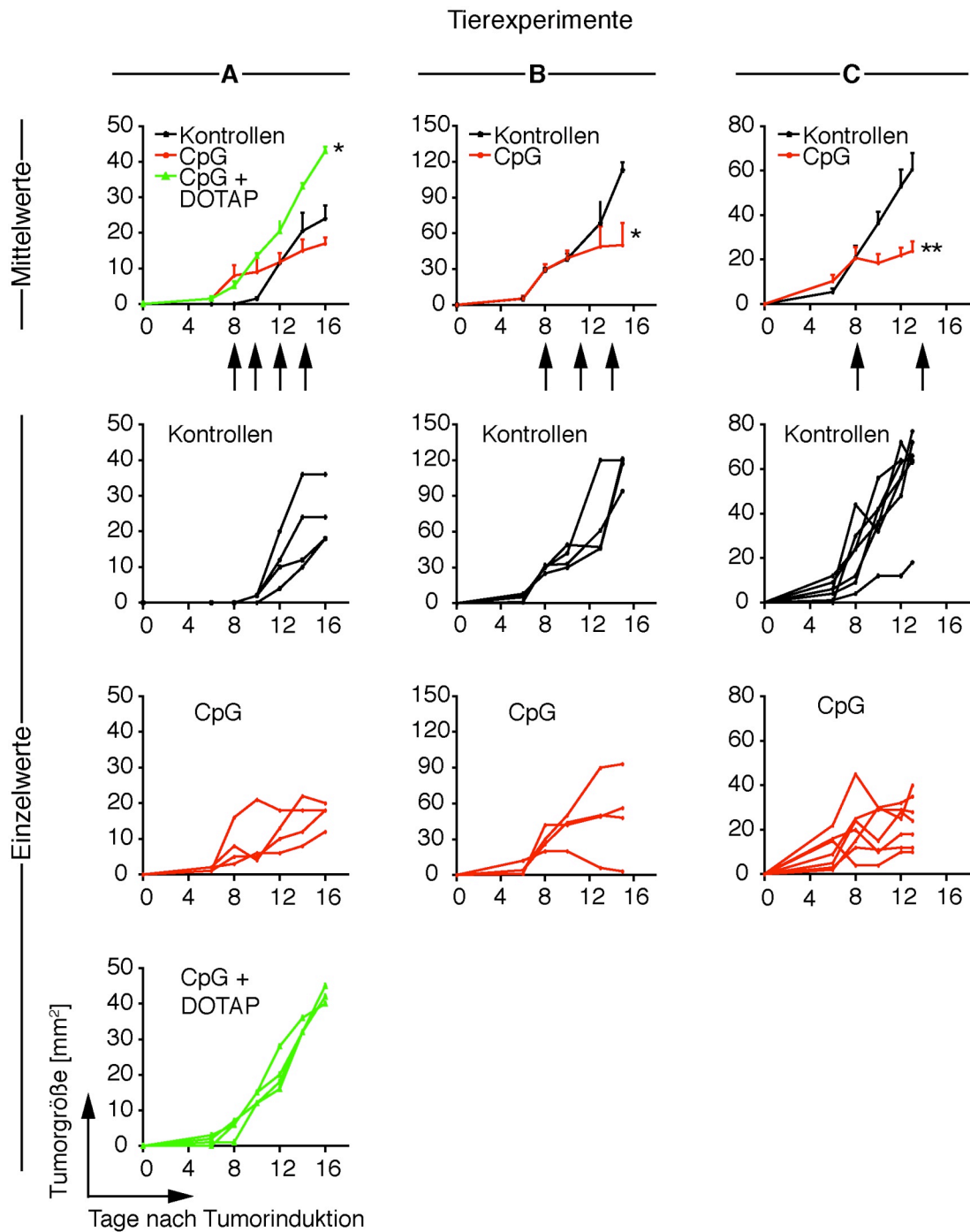


Abbildung 3 Tumorgößenwachstum nach Behandlung mit CpG

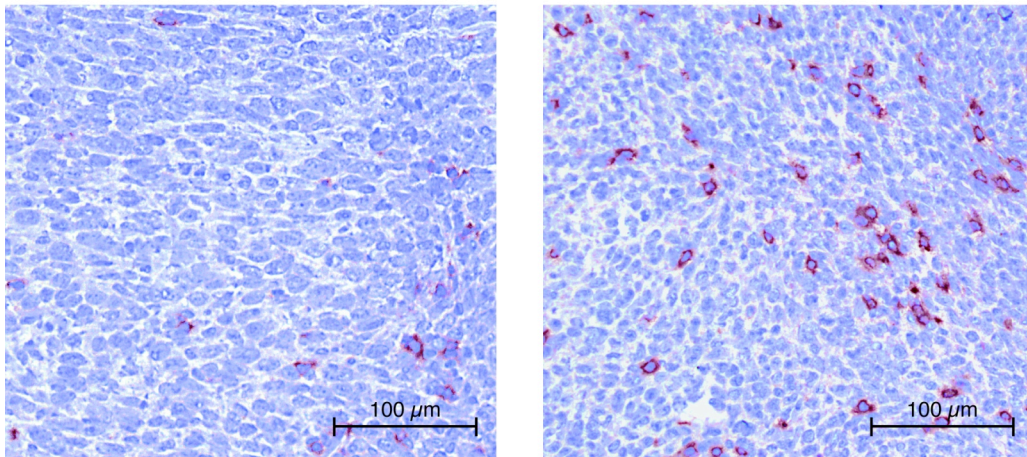
Dargestellt sind die Mittelwerte des Tumorgößenwachstums der Therapiegruppen und die Einzelwerte des Tumorgößenwachstums der einzelnen Mäuse je Gruppe im Rahmen der Tierexperimente A bis C (A linke Spalte; B mittlere Spalte; C rechte Spalte). Auf der Abszisse sind die Tage nach Tumorinduktion aufgezeichnet, die Ordinate spiegelt die Tumorgroße wieder. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte der Therapie.

3.1.2 Intratumorale T-Zellen

3.1.2.1 Intratumorale CD3-positive Zellen

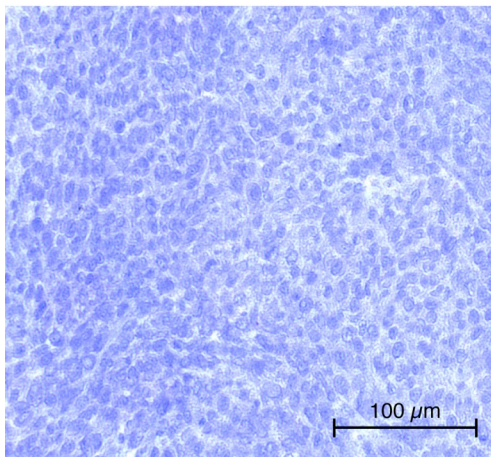
Das Oberflächenantigen CD3 ist ein klassischer Marker für T-Zellen. Da das Vorhandensein aktivierter T-Zellen als eine wichtige Bedingung für eine antitumorale Immunantwort angesehen wird, wurde bei der Untersuchung von Tumoren nach CpG-Applikation mit der Bestimmung intratumoraler CD3-positiver Zellen begonnen. Dazu wurden Gewebeschnitte von C26-Tumoren (Tierexperiment „A“) mit einem Antikörper gegen CD3 immunhistologisch gefärbt. Teilweise fand sich in den CpG-behandelten Tumoren schon augenscheinlich eine starke Infiltration CD3-positiver Zellen (Abbildung 4). Um das Ergebnis quantitativ greifbar zu machen, wurden die CD3-positiven Zellen in zehn Gesichtsfeldern je Tumor bei 200-facher Vergrößerung gezählt (Abbildung 5A). Gerade bei erfolgreich therapierten Tumoren war es auf Grund der geringen Tumorgöße nicht immer möglich, zehn Gesichtsfelder auszuzählen. Es bestätigte sich die Akkumulation CD3-positiver Zellen in zwei CpG-behandelten Tumoren. Die Tendenz der gesteigerten intratumoralen Infiltration CD3-positiver Zellen nach CpG-Applikation konnte in einem ähnlich angelegten Versuch im selben Tumormodell ein zweites Mal immunhistologisch reproduziert werden (Daten nicht gezeigt). Im B16-Tumormodell (Tierexperiment „C“) war die vermehrte Präsenz intratumoraler CD3-positiver Zellen signifikant (Abbildung 5B). In mit CpG+DOTAP behandelten Tumoren konnte kein Unterschied in der Präsenz intratumoraler CD3-positiver Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe dargestellt werden.

Intratumorale CD3-positive Zellen



Kontrolle

CpG



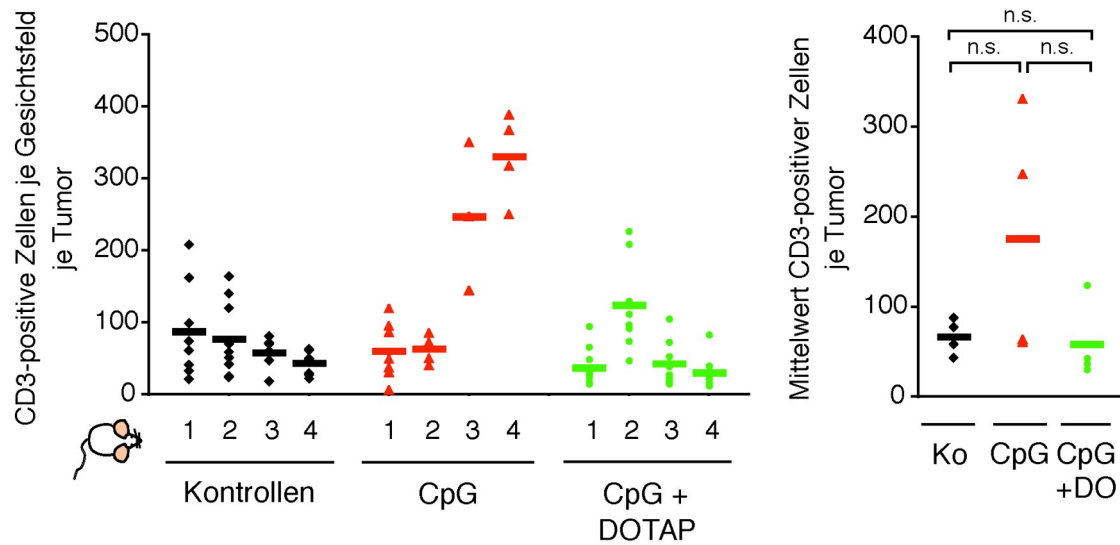
Nur Sekundärantikörper (Esel gegen Ratte) und Streptavidin

Abbildung 4 Immunhistochemische Färbung von CD3-positiven Zellen in C26-Tumoren nach Behandlung mit CpG

In Gewebeschnitten von C26-Tumoren wurde das Antigen CD3 durch Farbreaktion mit Neufuchsin rot dargestellt. Das Gewebe wurde mit Hämalaun gegengefärbt. Dargestellt sind Gewebeschnitte eines unbehandelten (links) und eines CpG-behandelten Tumors (rechts). Unten wird eine histologische Negativkontrolle gezeigt. Vergrößerung 200-fach.

Einzel- und Mittelwerte intratumoraler CD3-positiver Zellen

A) C26-Tumormodell



B) B16-Tumormodell

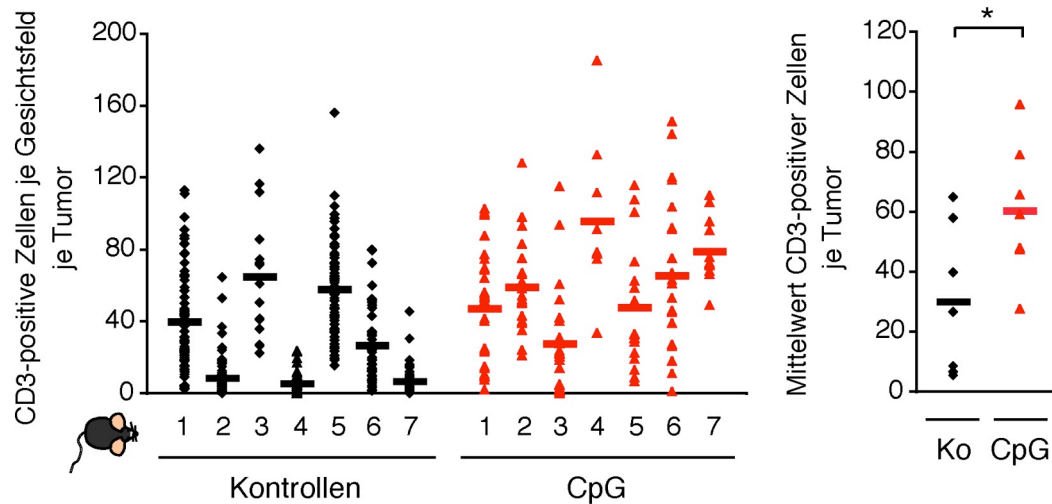


Abbildung 5 Quantifizierung von CD3-positiven Zellen in C26- und B16-Tumoren nach Behandlung mit CpG

A) Links dargestellt ist die Anzahl der intratumoralen CD3-positiven Zellen je Gesichtsfeld in C26-Tumoren. Die Ordinate gibt die Anzahl der positiven Zellen je Gesichtsfeld wieder. Entlang der Abszisse sind die individuellen Tumoren aufgelistet, wobei die Zahlen unterhalb der Abszisse die Mausnummern wiedergeben. Jedes Symbol (◆, ▲ oder ●) entspricht der Zahl positiver Zellen eines Gesichtsfeldes. Der horizontale Balken (—) entspricht dem Mittelwert positiver Zellen je Gesichtsfeld in einem Tumor. Rechts dargestellt sind die Mittelwerte der CD3-positiven Zellen je Gesichtsfeld je Tumor in Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit. Jedes Symbol (◆, ▲ oder ●) entspricht dem Mittelwert positiver Zellen je Gesichtsfeld je Tumor. Der horizontale Balken (—) entspricht dem Mittelwert positiver Zellen je Gesichtsfeld je Gruppe. Auszählung der Gesichtsfelder bei 200-facher Vergrößerung. **B)** Ergebnisse der CD3-Zellinfiltration im B16-Tumormodell. Auszählung der Gesichtsfelder bei 630-facher Vergrößerung.

Die intratumoralen CD3-positiven Zellen wurden auch mit einer weiteren Methode, dem FACS, bestimmt. Dafür wurde aus C26-Tumoren (Tierexperiment „B“) eine Einzelzellsuspension hergestellt, die mit Fluoreszenzantikörpern markiert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht wurde. Bei Betrachtung der CD3-positiven Zellen innerhalb der Tumoren konnte die Tendenz einer vermehrten Präsenz dieser Zellen in den CpG-therapierten Tumoren bestätigt werden (Abbildung 6).

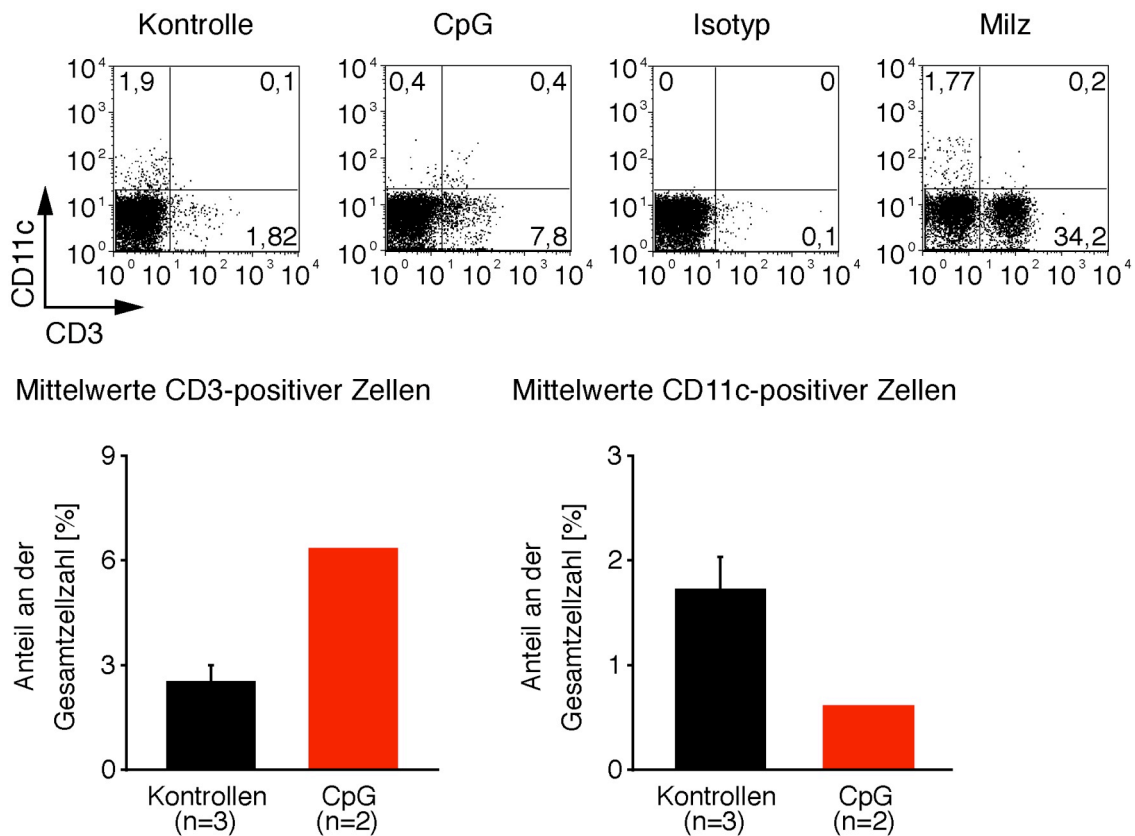


Abbildung 6 Durchflusszytometrische Analyse von CD3- und CD11c-positiven Zellen in C26-Tumoren nach Behandlung mit CpG

Dargestellt sind vier repräsentative Punktediagramme, in denen auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität für CD3 und auf der Ordinate die Fluoreszenzintensität für CD11c aufgetragen ist. Die Zahlen in den Ecken der Diagramme entsprechen dem prozentualen Anteil der Zellen dieses Quadranten an der Gesamtzellzahl. Die Anzahl der CD3-positiven Zellen ergibt sich aus der Summe der Zahlen der beiden rechten Quadranten, die Anzahl der CD11c-positiven Zellen aus der Summe der Zahlen der beiden oberen Quadranten. Die Ergebnisse wurden unten in Balkendiagrammen graphisch dargestellt. n steht für die Zahl der untersuchten Tumoren je Gruppe.

3.1.2.2 Intratumorale CD8-positive Zellen

CD8-positive zytotoxische T-Zellen sind Effektorzellen, die für die antitumorale Immunität verantwortlich sind. Sie wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Nächstes untersucht. Dazu wurden C26-Tumoren (Tierexperiment „A“) immunhistologisch gegen CD8 gefärbt (Abbildung 7) und lichtmikroskopisch analysiert. Dabei fiel in Gewebeschnitten von zwei der vier CpG-behandelten Tumoren eine massive Ansammlung CD8-positiver Zellen auf.

Intratumorale CD8-positive Zellen

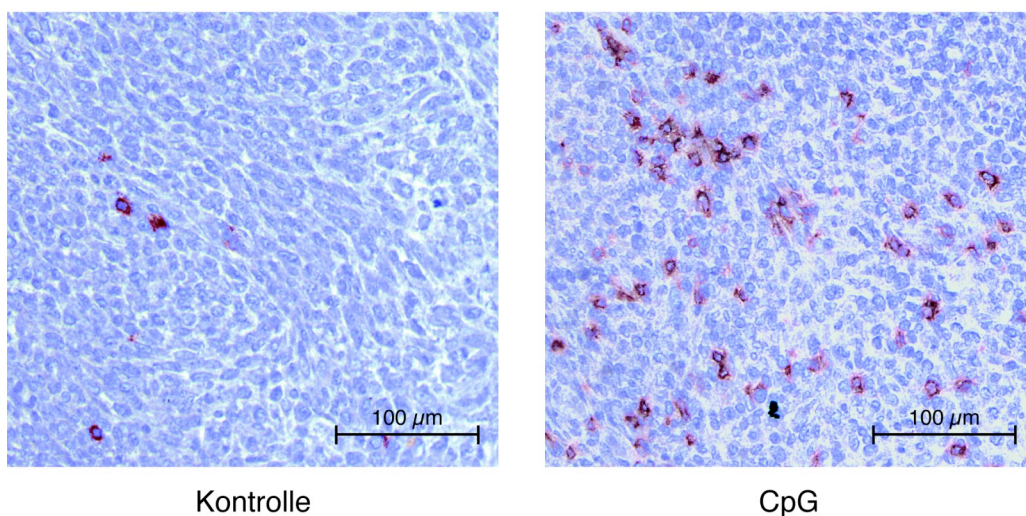


Abbildung 7 Immunhistochemische Färbung von CD8-positiven Zellen in C26-Tumoren nach Behandlung mit CpG

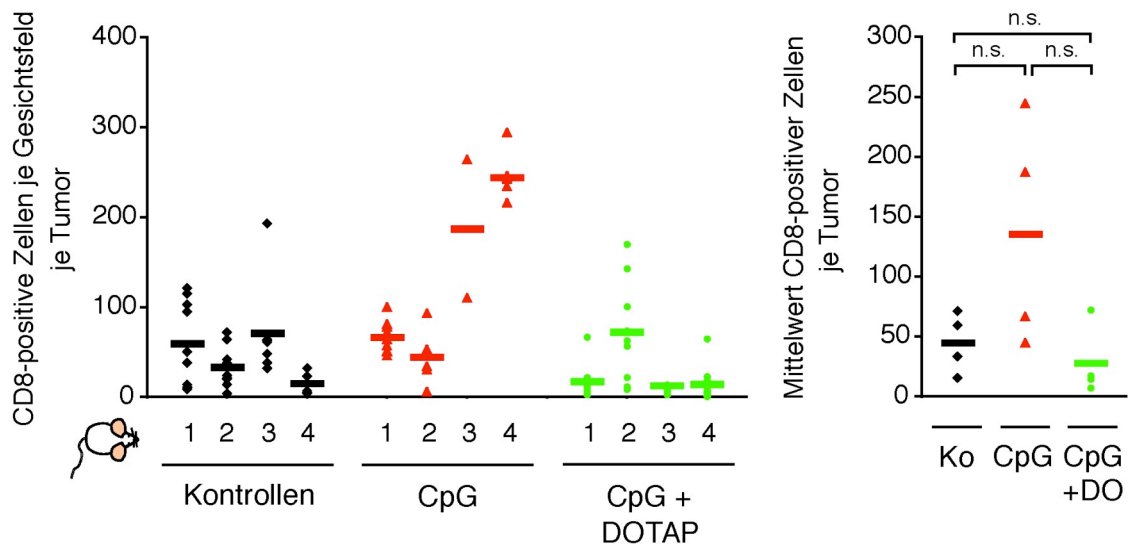
In Gewebeschnitten von C26-Tumoren wurde das Antigen CD8 durch Farbreaktion mit Neufuchsin rot dargestellt. Das Gewebe wurde mit Hämalaun gegengefärbt. Dargestellt sind Gewebeschnitte eines unbehandelten (links) und eines CpG-behandelten Tumors (rechts). Vergrößerung 200-fach.

Anschließend wurden die CD8-positiven Zellen in zehn Gesichtsfeldern je Tumor bei 200-facher Vergrößerung gezählt (Abbildung 8A). Tendenziell waren in den CpG-behandelten Tumoren vermehrt CD8-positive Zellen präsent. Dieses Ergebnis konnte in einem ähnlich angelegten Versuch im selben Tumormodell ein zweites Mal immunhistologisch reproduziert werden (Daten nicht gezeigt). Auch im B16-Tumormodell konnte nach CpG-Therapie ein tendenzieller Anstieg der intratumoralen CD8-positiven Zellen immunhistochemisch beobachtet werden (Tierexperiment „C“, Abbildung 8B). Tumoren, die mit CpG+DOTAP behandelt worden waren, zeigten bezüglich intratumoraler CD8-positiver Zellen keinen Unterschied zur unbehandelten

Gruppe. Die Therapie mit CpG+DOTAP hatte bereits bezüglich der intratumoralen CD3-positiven Zellen zu keinem Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe geführt.

Einzel- und Mittelwerte intratumoraler CD8-positiver Zellen

A) C26-Tumormodell



B) B16-Tumormodell

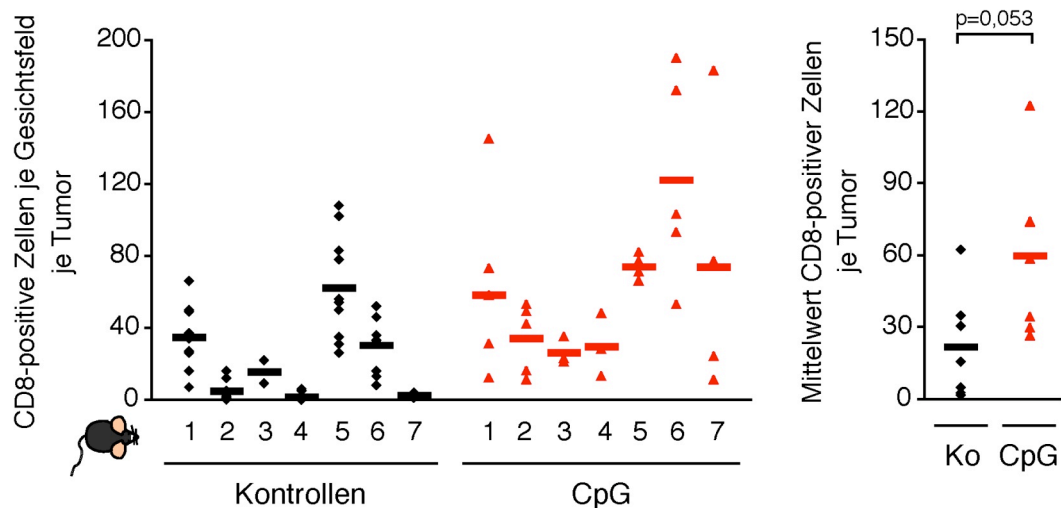


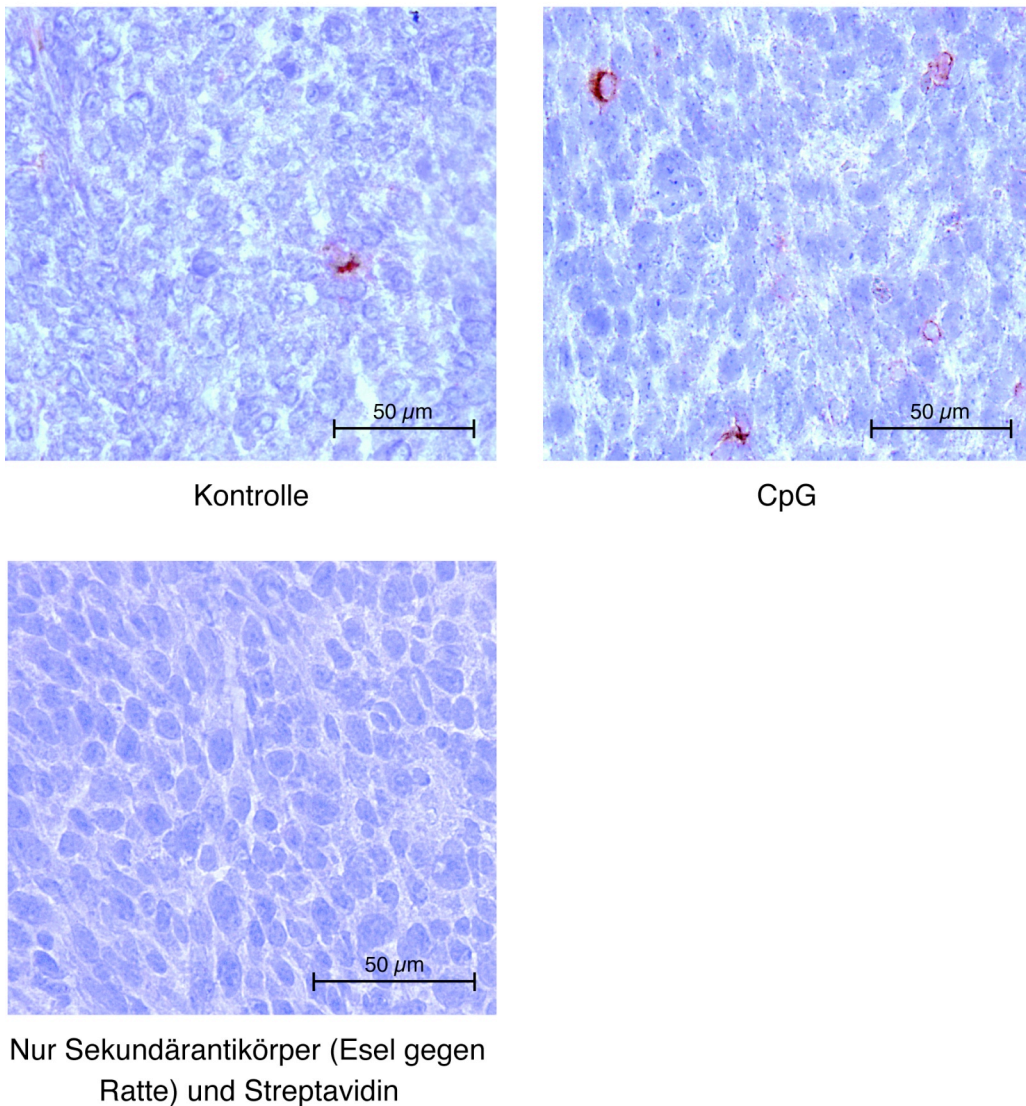
Abbildung 8 Quantifizierung von CD8-positiven Zellen in C26- und B16-Tumoren nach Behandlung mit CpG

A) Links dargestellt ist die Anzahl der CD8-positiven Zellen je Gesichtsfeld in C26-Tumoren. Rechts werden die Mittelwerte der CD8-positiven Zellen je Gesichtsfeld je Tumor in Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit gezeigt. Auszählung der Gesichtsfelder bei 200-facher Vergrößerung. **B)** Ergebnisse der CD8-Zellinfiltration im B16-Tumormodell. Auszählung der Gesichtsfelder bei 200-facher Vergrößerung. (Ausführliche Erläuterung der Graphik siehe Legendentext zu Abbildung 5).

3.1.2.2.1 Vermehrte Aktivierung intratumoralen Perforins

Perforin ist ein in intrazellulären Granula gespeichertes Effektormolekül, das unter anderem in zytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen gebildet wird. Nach Aktivierung dieser Zellen und Kontakt mit dem Fremdartigen der Zielzelle orientiert sich das Perforin zur Kontaktstelle hin und wird ausgeschüttet. Dies führt zur Apoptoseinduktion in der Zielzelle. Um den funktionellen Status der intratumoralen T-Zellen nach CpG-Applikation beurteilen zu können, wurden für die vorliegende Arbeit Tumoren des BALB/c-Modells (Tierexperiment „A“) hinsichtlich ihrer Perforinexpression untersucht. Dazu wurden die Tumoren mit einem Antikörper gegen Perforin immunhistologisch gefärbt und anschließend lichtmikroskopisch betrachtet (Abbildung 9).

Intratumorale Perforin-positive Zellen

**Abbildung 9 Immunhistologische Färbung von Perforin-positiven Zellen in C26-Tumoren nach Behandlung mit CpG**

In Gewebeschnitten von C26-Tumoren wurde das Antigen Perforin durch Farbreaktion mit Neufuchsin rot dargestellt. Das Gewebe wurde mit Hämalaun gegengefärbt. Dargestellt sind Gewebeschnitte eines unbehandelten (links) und eines CpG-behandelten Tumors (rechts). Unten wird eine histologische Negativkontrolle gezeigt. Vergrößerung 400-fach.

Um Unterschiede in der Perforinexpression zwischen untherapierten und CpG-behandelten Tumoren feststellen zu können, wurden die Perforin-positiven Zellen in jeweils 20 Gesichtsfeldern je Tumor in 400-facher Vergrößerung gezählt (Abbildung 10). Dabei konnte eine tendenziell vermehrte Anzahl Perforin-positiver Zellen in den CpG-therapierten Tumoren festgehalten werden.

Einzel- und Mittelwerte intratumoraler Perforin-positiver Zellen

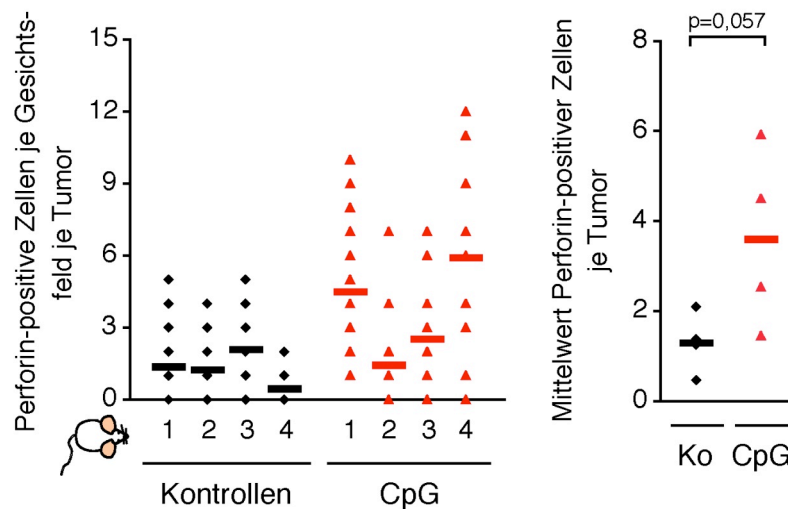
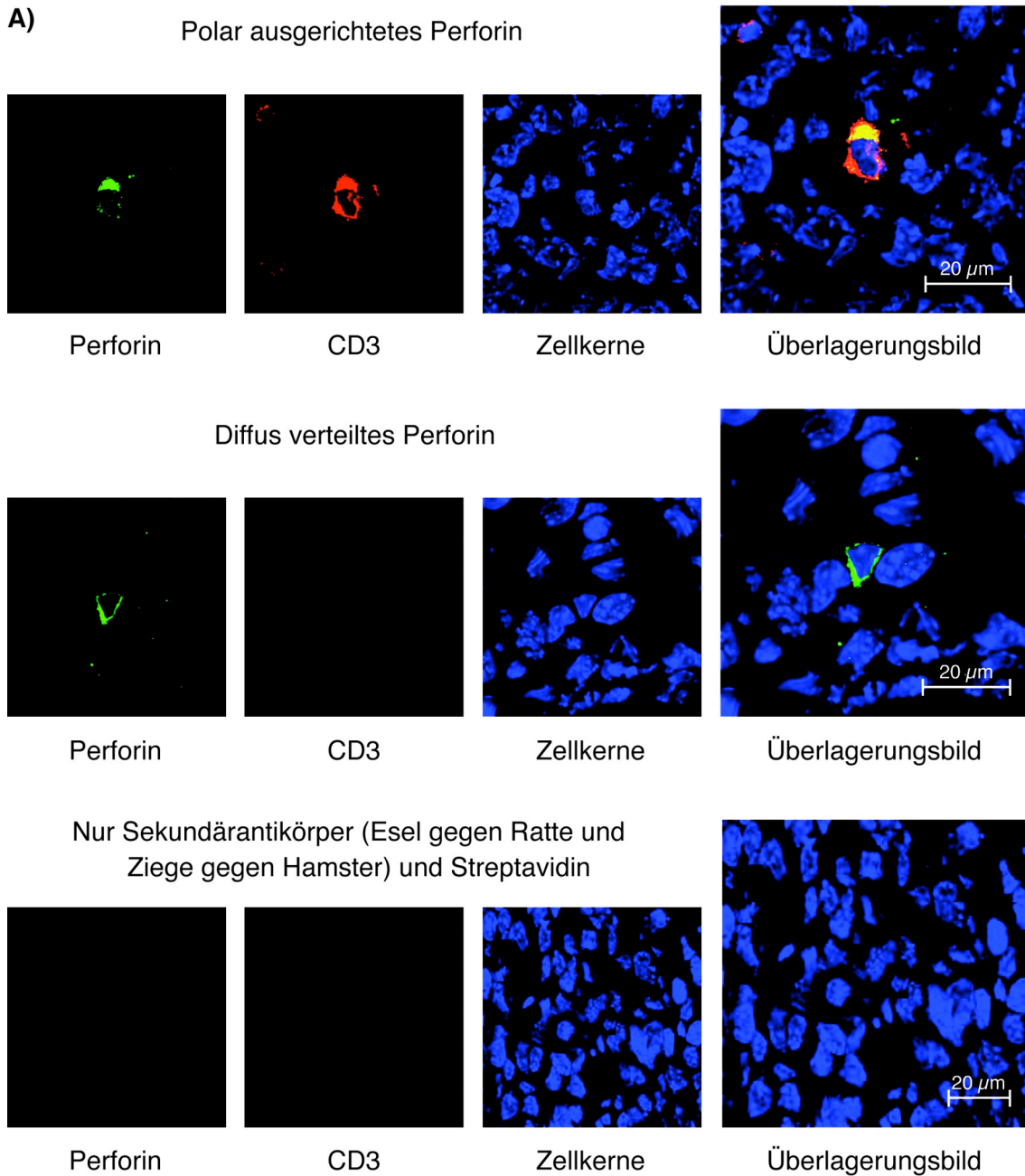


Abbildung 10 Quantifizierung von Perforin-positiven Zellen in C26-Tumoren nach Behandlung mit CpG

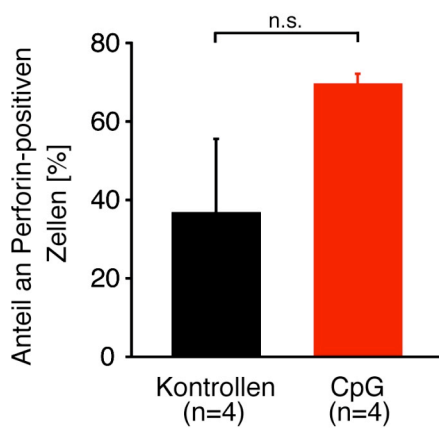
Links dargestellt ist die Anzahl der Perforin-positiven Zellen je Gesichtsfeld je Tumor. Rechts werden die Mittelwerte der Perforin-positiven Zellen je Gesichtsfeld je Tumor in Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit gezeigt. Auszählung der Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung. (Ausführliche Erläuterung der Graphik siehe Legendentext zu Abbildung 5).

Anschließend wurden die Perforin-exprimierenden Zellen fluoreszenzmikroskopisch weiter charakterisiert und die räumliche Verteilung des Perforins genauer untersucht. Hierzu wurden die C26-Tumoren (Tierexperiment „A“) mit Fluoreszenzantikörpern gegen Perforin und CD3 gefärbt und unter dem konfokalen Lasermikroskop betrachtet (Abbildung 11A). Zur Quantifizierung einer Aussage wurde jedes Gesichtsfeld eines Tumors bei 630-facher Vergrößerung gescannt und das resultierende Bild anschließend ausgewertet. Dabei wurde zunächst der Anteil der CD3-positiven Zellen an den Perforin-positiven Zellen je Tumor bestimmt. Dabei zeigte sich in den CpG-therapierten Tumoren ein tendenziell vermehrter Anteil Perforin-positiver Zellen, der zugleich CD3-positiv ist (Abbildung 11B). Anschließend sollte festgestellt werden, ob das Perforin diffus über die ganze Zelle verteilt oder polar ausgerichtet ist. Im nicht aktivierten Zustand ist das Perforin diffus über die gesamte Zelle verteilt. Eine polare Ausrichtung des Perforins spricht für einen Aktivierungszustand der Zelle, in der sich das Perforin zur Zielzelle hin konzentriert und kurz vor der Entleerung aus den Speichervesikeln steht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde von einer polaren Ausrichtung des Perforins ausgegangen, wenn sich die maximale Konzentration des Perforins auf weniger als 1/3 des Kernumfanges verteilte. Es zeigte sich in CpG-therapierten Tumoren innerhalb der CD3- und Perforin-doppeltpositiven Zellen ein

vermehrter Anteil der Zellen, in denen sich das Perforin polar ausrichtet (Abbildung 11C), was auf einen gesteigerten Anteil aktivierter Perforin-positiver Zellen in CpG-behandelten Tumoren hindeutet.



B) Mittelwerte CD3- und Perforin-doppelpositiver Zellen



C) Mittelwerte des polar ausgerichteten Perforins in CD3-positiven Zellen

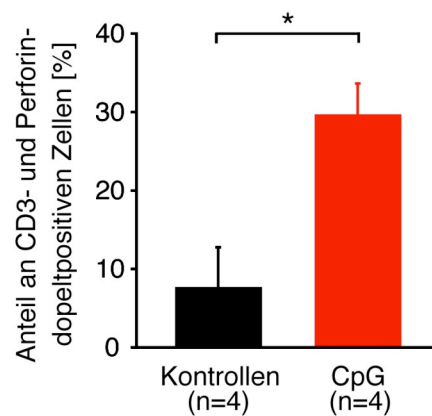


Abbildung 11 Immunfluoreszenzfärbung und Quantifizierung von CD3 und Perforin in C26-Tumoren nach Behandlung mit CpG

A) Dargestellt sind Immunfluoreszenzfärbungen von Perforin (grün), CD3 (rot) und Zellkernen (blau). Die Überlagerungsbilder aller Farbkanäle sind rechts abgebildet, wobei die Doppelfärbung von CD3 und Perforin gelb erscheint. Es werden ein polar ausgerichtetes (oben) und ein diffus verteiltes Perforins (Mitte) gezeigt. Unten ist eine histologische Negativkontrolle dargestellt. Vergrößerung 630-fach. **B)** Das Balkendiagramm gibt die Mittelwerte des prozentualen Anteils der CD3-positiven Zellen an den Perforin-positiven Zellen je Gruppe wieder. Die Werte werden auf der Ordinate abgelesen, die Gruppen sind entlang der Abszisse aufgelistet. n steht für die Zahl der untersuchten Tumoren je Gruppe. **C)** Dargestellt sind die Mittelwerte des prozentualen Anteils des polar ausgerichteten Perforins an den gesamten CD3- und Perforin-doppelt positiven Zellen je Gruppe. Die Ordinate gibt den prozentualen Anteil wieder. Entlang der Abszisse sind die Gruppen aufgelistet. n steht für die Zahl der untersuchten Tumoren je Gruppe.

3.1.2.3 Intratumorale CD4-positive Zellen

Als Nächstes sollte der Einfluss der CpG-Gabe auf die intratumorale Präsenz CD4-positiver T-Zellen untersucht werden. Es wurden die Tumoren des BALB/c-Modells (Tierexperimentes „A“) immunhistologisch mit Antikörpern gegen CD4 gefärbt und anschließend im Lichtmikroskop beurteilt (Abbildung 12).

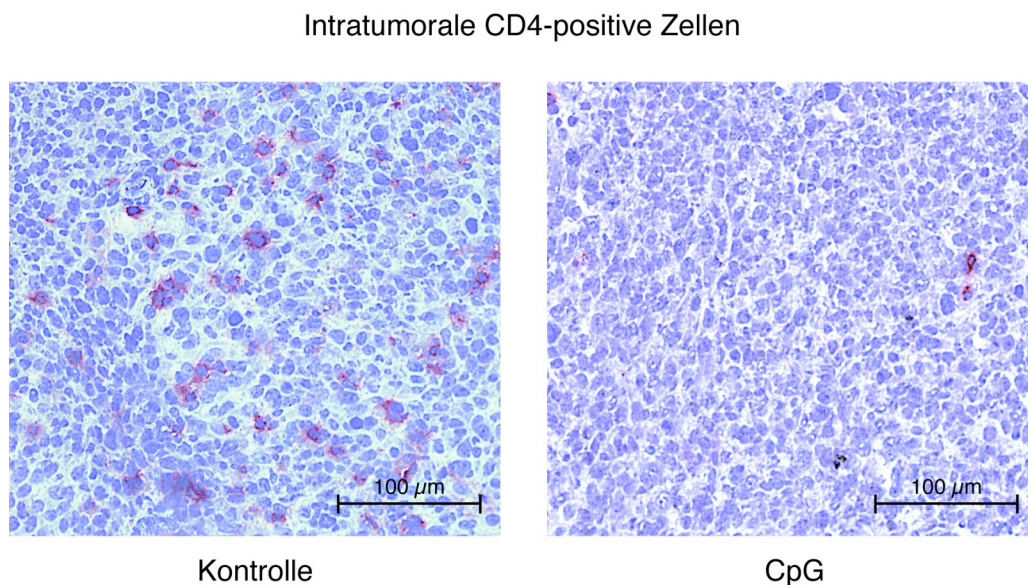


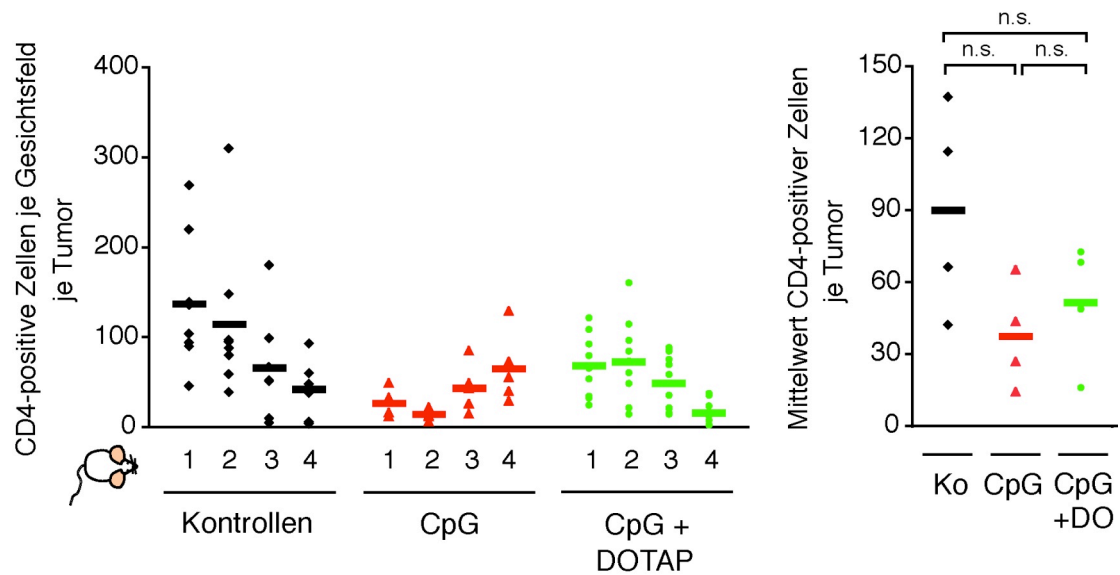
Abbildung 12 Immunhistochemische Färbung von CD4-positiven Zellen in C26-Tumoren nach Behandlung mit CpG

In Gewebeschnitten von C26-Tumoren wurde das Antigen CD4 durch Farbreaktion mit Neufuchsin rot dargestellt. Das Gewebe wurde mit Hämalaun gegengefärbt. Dargestellt sind Gewebeschnitte eines unbehandelten (links) und eines CpG-behandelten Tumors (rechts). Vergrößerung 200-fach.

Daraufhin wurden die CD4-positiven Zellen in zehn Gesichtsfeldern jedes Tumors bei 200-facher Vergrößerung gezählt (Abbildung 13A). In fast allen therapierten Tumoren war die Anzahl der CD4-positiven Zellen im Vergleich zu den Tumoren der untherapierten Gruppe erniedrigt. Bemerkenswert war hier außerdem die Ähnlichkeit der CpG+DOTAP-Gruppe zu der reinen CpG-Gruppe – im Gegensatz zur Anzahl der intratumoralen CD3- und CD8-positiven Zellen (siehe oben), wobei die CpG+DOTAP-Gruppe stets Ergebnisse erzielte, die der Kontrollgruppe ähnlich waren. Das Ergebnis der Tendenz einer verminderten Anzahl intratumoraler CD4-positiver Zellen nach CpG-Applikation konnte in einem ähnlich angelegten Versuch im selben Tumormodell ein zweites Mal immunhistologisch reproduziert werden (Daten nicht gezeigt). Bei den Tumoren des B16-Tumormodells (Tierexperiment „C“) jedoch konnte kein Unterschied zwischen unbehandelter und CpG-therapierter Gruppe festgestellt werden (Abbildung 13B).

Einzel- und Mittelwerte intratumoraler CD4-positiver Zellen

A) C26-Tumormodell



B) B16-Tumormodell

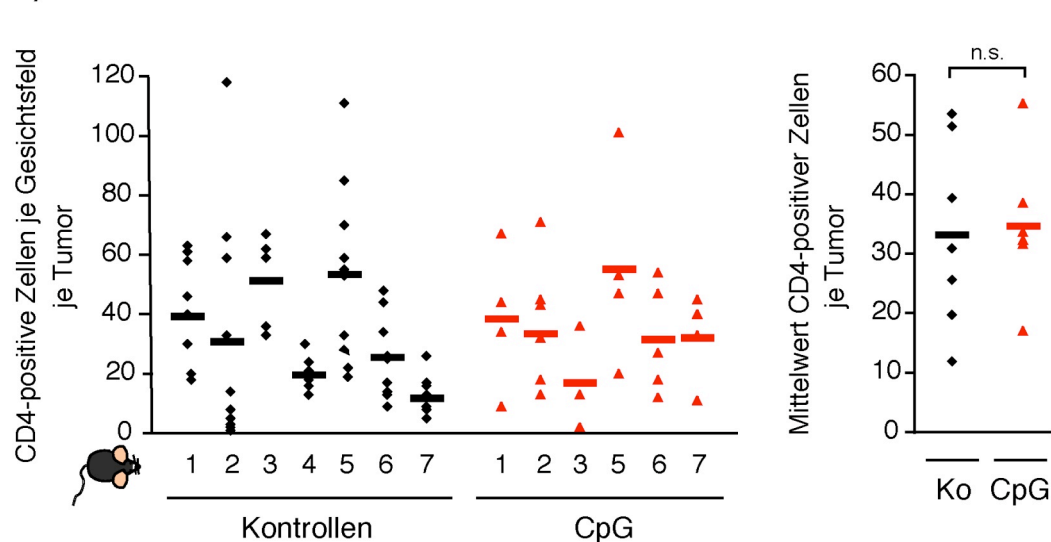


Abbildung 13 Quantifizierung von CD4-positiven Zellen in C26- und B16-Tumoren nach Behandlung mit CpG

A) Links dargestellt ist die Anzahl der CD4-positiven Zellen je Gesichtsfeld in C26-Tumoren. Rechts werden die Mittelwerte der CD4-positiven Zellen je Gesichtsfeld je Tumor in Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit gezeigt. Auszählung der Gesichtsfelder bei 200-facher Vergrößerung. **B)** Ergebnisse der CD4-Zellinfiltration im B16-Tumormodell. Auszählung der Gesichtsfelder bei 200-facher Vergrößerung. (Ausführliche Erläuterung der Graphik siehe Legendentext zu Abbildung 5).

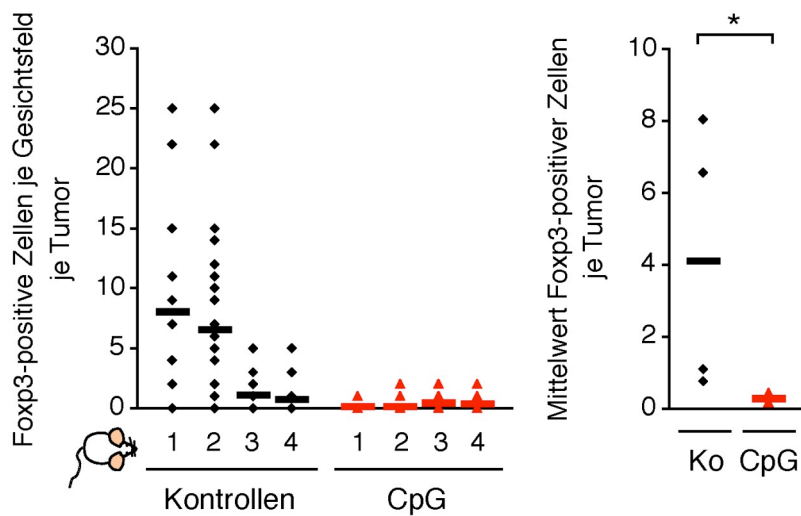
3.1.2.3.1 Verminderte Anzahl intratumoraler Foxp3-positiver Zellen

Das Oberflächenantigen CD4 kann auf unterschiedlichen Zelltypen wie regulatorischen T-Zellen, T-Helferzellen und murinen dendritischen Zellen vorhanden sein kann. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit auf eine weitere Charakterisierung der CD4-positiven Zellen Wert gelegt.

Der Transkriptionsfaktor Foxp3 ist ein klassischer Marker für Tregs. Diese Zellen vermitteln Toleranz und vermögen so beispielsweise bei Tumorerkrankungen die T-Zellaktivierung zu supprimieren. Für eine erste Charakterisierung der CD4-positiven Zellen wurden C26-Tumoren (Tierexperiment „A“) mit einem Fluoreszenzantikörper gegen Foxp3 gefärbt. Danach wurden die Foxp3-positiven Zellen in allen Gesichtsfeldern bei 400-facher Vergrößerung gezählt. Dabei fiel in allen vier CpG-behandelten Tumoren eine Reduktion der Foxp3-positiven Zellen auf (Abbildung 14A). Im B16-Tumormodell (Tierexperiment „C“) konnte in den CpG-therapierten Tumoren die Tendenz einer intratumoralen Abnahme der Anzahl Foxp3-positiver Zellen festgestellt werden (Abbildung 14B). Hier imponierten in den behandelten Tumoren vor allem die fehlenden Akkumulationen Foxp3-positiver Zellen.

Einzel- und Mittelwerte intratumoraler Foxp3-positiver Zellen

A) C26-Tumormodell



B) B16-Tumormodell

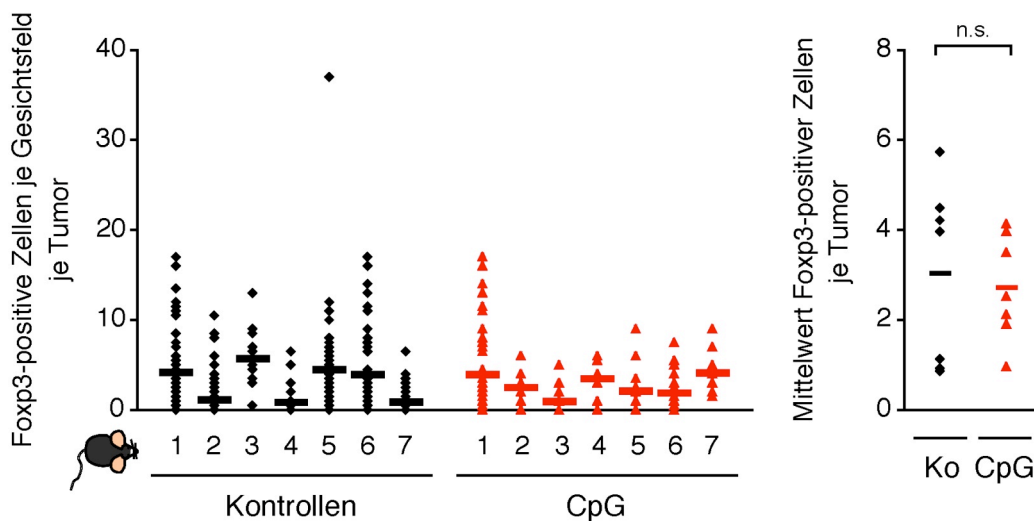


Abbildung 14 Quantifizierung von Foxp3-positiven Zellen in C26- und B16-Tumoren nach Behandlung mit CpG

A) Links dargestellt ist die Anzahl der Foxp3-positiven Zellen je Gesichtsfeld in C26-Tumoren. Rechts werden die Mittelwerte der Foxp3-positiven Zellen je Gesichtsfeld je Tumor in Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit gezeigt. Auszählung der Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung. **B)** Ergebnisse der Foxp3-Zellinfiltration im B16-Tumormodell. Auszählung der Gesichtsfelder bei 630-facher Vergrößerung. (Ausführliche Erläuterung der Graphik siehe Legendentext zu Abbildung 5).

Betrachtet man nun bei diesen Tumoren den Anteil der Foxp3-positiven Zelle an den gesamten CD3-positiven Zellen, so erkennt man bei den CpG-behandelten Tumoren einen höchstsignifikant reduzierten Anteil Foxp3-positiver Zellen an den gesamten CD3-positiven Zellen (Abbildung 15).

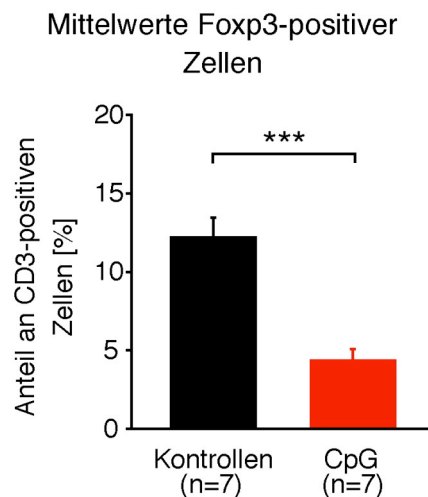
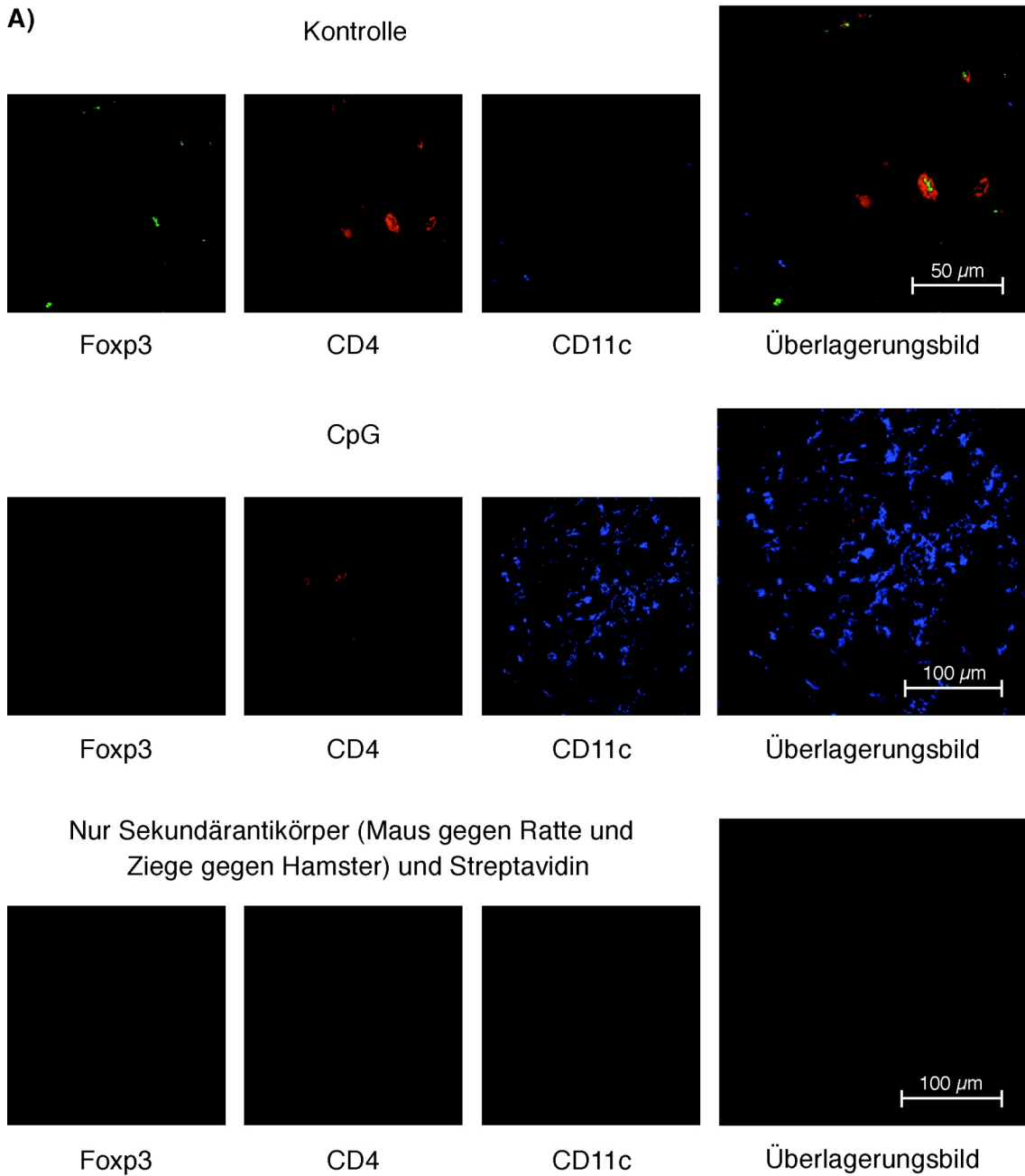


Abbildung 15 Quantifizierung des Anteils der Foxp3-positiven Zellen an den gesamten CD3-positiven Zellen in B16-Tumoren nach Behandlung mit CpG

Das Balkendiagramm gibt die Mittelwerte des prozentualen Anteils der Foxp3-positiven Zellen an den CD3-positiven Zellen je Gruppe wieder. Die Werte werden auf der Ordinate abgelesen, die Gruppen sind entlang der Abszisse aufgelistet. n steht für die Zahl der untersuchten Tumoren je Gruppe.

Als Nächstes sollte der Einfluss der CpG-Applikation auf den Anteil von Tregs an den gesamten CD4-positiven Zellen untersucht werden. Für diese Charakterisierung intratumoraler CD4-positiver Zellen wurde mit BALB/c-Mäusen im C26-Tumormodell ein Tierexperiment „D“ durchgeführt, das dem Tierexperiment „A“ sehr ähnlich ist. Der Therapieeffekt in diesem Versuch konnte an dem deutlich verlangsamten Tumorgößenwachstum der CpG-behandelten Gruppe verdeutlicht werden (Daten nicht gezeigt). Bei der immunhistologischen Untersuchung der Tumoren konnte eine Reduktion von CD4- und Foxp3-positiven Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Nun wurden diese Tumoren mit Fluoreszenzantikörpern gegen CD4, Foxp3 und CD11c dreifach gefärbt (Abbildung 16A). Anschließend wurden bei 400-facher Vergrößerung am konfokalen Lasermikroskop mindestens zehn Bilder je Tumor gescannt und der Anteil der CD4- und Foxp3-doppeltpositiven Zellen an den gesamten CD4-positiven Zellen bestimmt. Dabei konnte in den CpG-behandelten Tumoren ein tendenziell verminderter Anteil CD4- und Foxp3-doppeltpositiver Zellen an den gesamten CD4-positiven Zellen festgestellt werden (Abbildung 16B).



B) Mittelwerte CD4- und Foxp3-doppeltpositiver Zellen

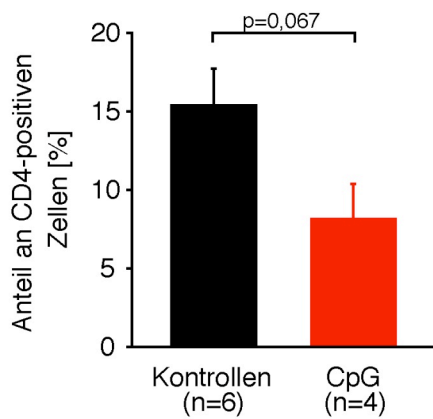
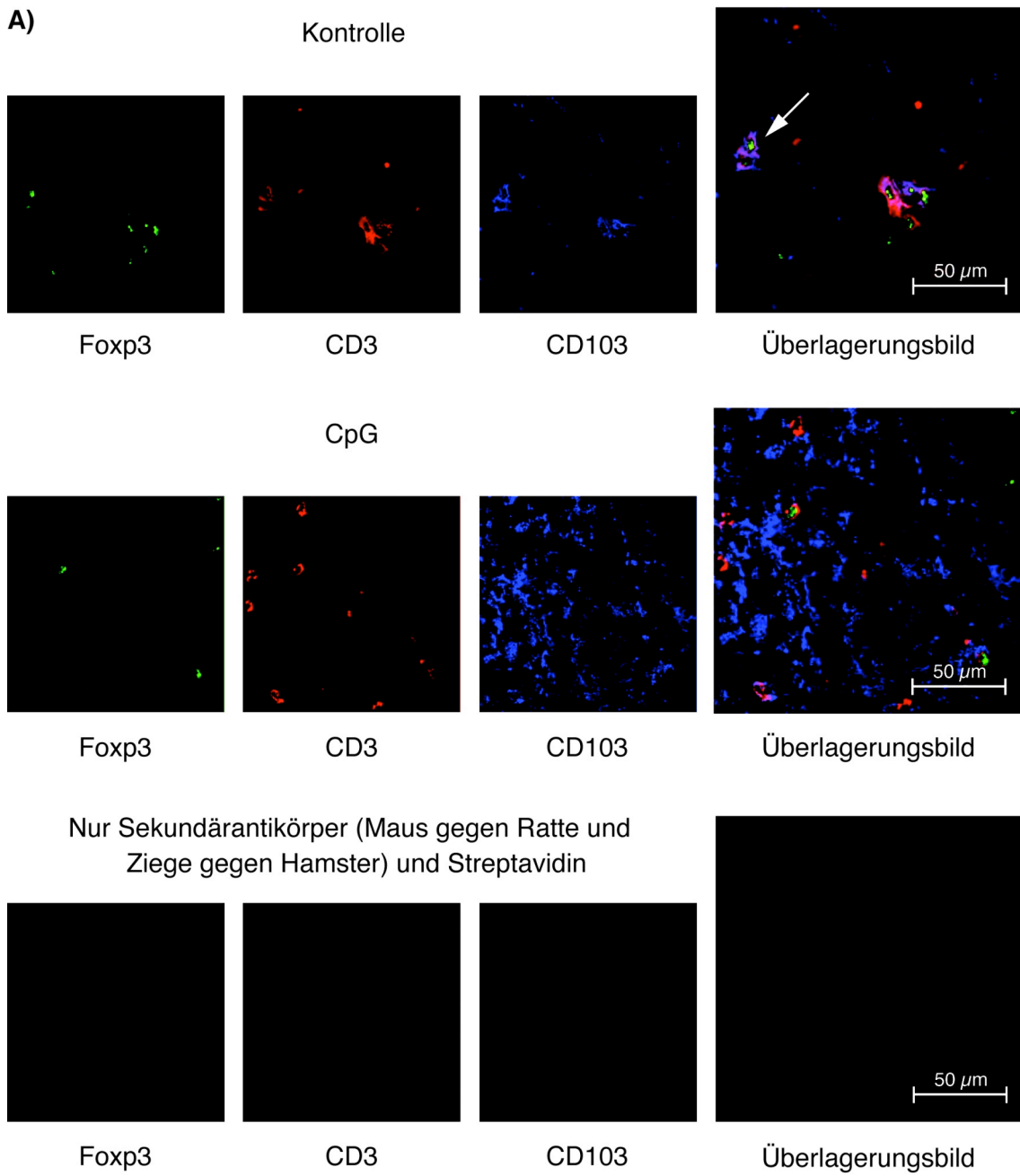


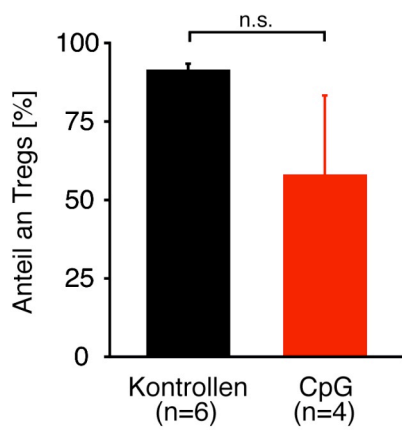
Abbildung 16 Immunfluoreszenzfärbung und Quantifizierung von CD4, Foxp3 und CD11c in C26-Tumoren nach Behandlung mit CpG

A) Dargestellt sind Immunfluoreszenzfärbungen von Foxp3 (grün), CD4 (rot) und CD11c (blau). Die Überlagerungsbilder aller Farbkanäle sind rechts abgebildet. Es werden Ausschnitte aus einem Kontrolltumor (oben) und einem CpG-therapierten Tumor (Mitte) gezeigt. Unten ist eine histologische Negativkontrolle dargestellt. Vergrößerung 630-fach. **B)** Das Balkendiagramm gibt die Mittelwerte des prozentualen Anteils der CD4- und Foxp3-doppeltpositiven Zellen an den gesamten CD4-positiven Zellen je Gruppe wieder. Die Werte werden auf der Ordinate abgelesen, die Gruppen sind entlang der Abszisse aufgelistet. n steht für die Zahl der untersuchten Tumoren je Gruppe.

Die vermehrte Präsenz Foxp3-positiver Zellen in untherapierten Tumoren warf die Frage auf, wie diese Zellen in den Tumor gelangen. Möglicherweise spielt dabei das auf manchen T-Zellen vorhandene Integrin CD103 eine Rolle. CD103 ist ein Rezeptor für das auf Epithelzellen exprimierte E-Cadherin und kann somit als ein *homing*-Faktor angesehen werden. In den nächsten Versuchen sollte die Expression von CD103 auf T-Zellen im Allgemeinen (CD3-positive Zellen) und regulatorischen T-Zellen im Speziellen (Foxp3-positive Zellen) untersucht werden. Dabei wurden in den C26-Tumoren des Tierexperimentes „D“ die Antigene CD3, Foxp3 und CD103 mit Fluoreszenzantikörpern farbig dargestellt (Abbildung 17A). Daraufhin wurden bei 400-facher Vergrößerung sämtliche Foxp3-positive Zellen am konfokalen Lasermikroskop gescannt und anschließend auf das Vorhandensein von CD103 hin überprüft. Es zeigte sich, dass sowohl in der Kontroll- als auch in der CpG-Gruppe CD103 allgemein von Tregs vermehrt exprimiert wird im Vergleich zu CD3-positiven und Foxp3-negativen T-Zellen (Abbildung 17B+C). Dies konnte auch in einem B16-Tumor reproduziert werden (Daten nicht gezeigt). Zudem führte die CpG-Gabe zu einer tendenziell verminderten Expression von CD103 sowohl auf Tregs (Abbildung 17B) als auch auf Foxp3-negativen T-Zellen (Abbildung 17C).



B) Mittelwerte CD103-positiver Tregs



C) Mittelwerte CD103-positiver und Foxp3-negativer T-Zellen

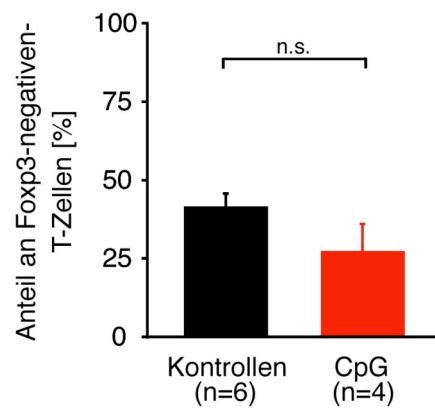


Abbildung 17 Immunfluoreszenzfärbung und Quantifizierung von CD3, Foxp3 und CD103 in C26-Tumoren nach Behandlung mit CpG

A) Dargestellt sind Immunfluoreszenzfärbungen von Foxp3 (grün), CD3 (rot) und CD103 (blau). Die Überlagerungsbilder aller Farbkanäle sind rechts abgebildet, wobei die Doppelfärbung von CD3 und CD103 magenta erscheint. Es werden Ausschnitte aus einem Kontrolltumor (oben) und einem CpG-therapierten Tumor (Mitte) gezeigt. Unten ist eine histologische Negativkontrolle dargestellt. Der Pfeil markiert eine CD3-, Foxp3- und CD103- dreifachpositive Zelle. Vergrößerung 630-fach. **B)** Das Balkendiagramm gibt die Mittelwerte des prozentualen Anteils der CD103-positiven Zellen an den CD3- und Foxp3-doppeltpositiven Zellen (Treg) je Gruppe wieder. Die Werte werden auf der Ordinate abgelesen, die Gruppen sind entlang der Abszisse aufgelistet. n steht für die Zahl der untersuchten Tumoren je Gruppe. **C)** Dargestellt sind die Mittelwerte des prozentualen Anteils der CD103-positiven Zellen an den CD3-positiven und zugleich Foxp3-negativen Zellen je Gruppe. Die Ordinate gibt den prozentualen Anteil wieder. Entlang der Abszisse sind die Gruppen aufgelistet. n steht für die Zahl der untersuchten Tumoren je Gruppe.

3.1.2.3.2 Verminderte Anzahl intratumoraler CD4-positiver dendritischer Zellen

Dendritische Zellen nehmen auf Grund ihrer Funktion als antigenpräsentierende Zellen eine zentrale Rolle in der Vermittlung einer adaptiven Immunantwort ein. Die dendritischen Zellen der Maus können neben ihrem typischem Oberflächenantigen CD11c zusätzlich auch CD4-positiv sein. Daher wurden im Rahmen der weiteren Charakterisierung CD4-positiver Zellen die dendritischen Zellen untersucht. Dafür wurde die oben beschriebene CD4-, Foxp3- und CD11c-Dreifachfärbung der C26-Tumoren aus Tierexperiment „D“ (Abbildung 16A) nochmals unter einem anderen Gesichtspunkt ausgewertet. Bei den in 400-facher Vergrößerung am konfokalen Lasermikroskop gescannten Bildern (mindestens zehn je Tumor) wurde der Anteil der CD4- und CD11c-doppeltpositiven Zellen an den gesamten CD4-positiven Zellen bestimmt (Abbildung 18). Dabei konnte in den CpG-therapierten Tumoren ein verminderter Anteil CD4- und CD11c-doppeltpositiver Zellen an den gesamten CD4-positiven Zellen festgestellt werden.

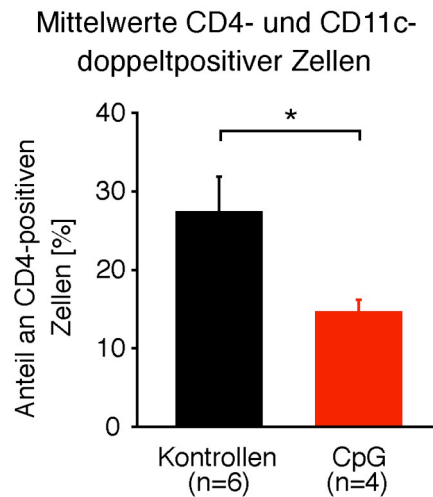


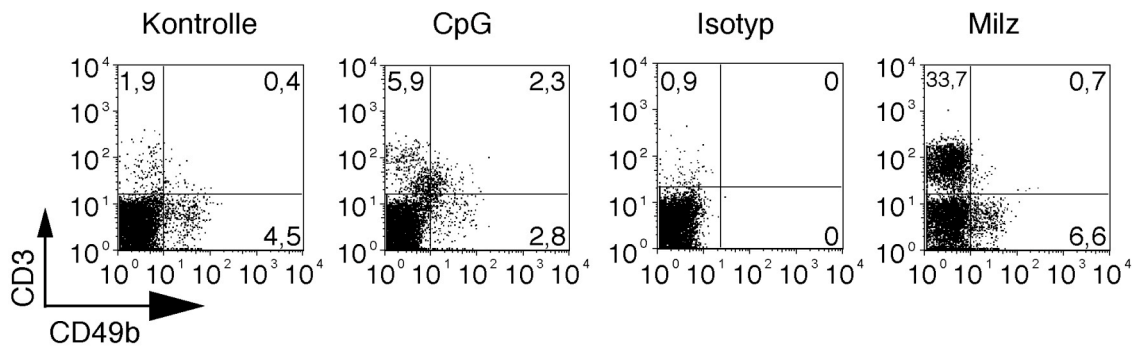
Abbildung 18 Quantifizierung des Anteils CD4- und CD11c-doppeltpositiver Zellen an den gesamten CD4-positiven Zellen in C26-Tumoren nach Behandlung mit CpG

Das Balkendiagramm gibt die Mittelwerte des prozentualen Anteils der CD4- und CD11c-doppeltpositiven Zellen an den gesamten CD4-positiven Zellen je Gruppe wieder. Die Werte werden auf der Ordinate abgelesen, die Gruppen sind entlang der Abszisse aufgelistet. n steht für die Zahl der untersuchten Tumoren je Gruppe.

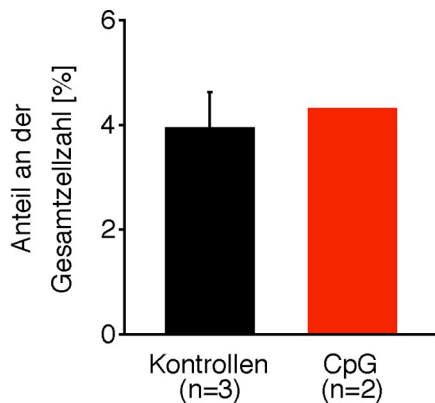
3.1.3 Intratumorale natürliche Killerzellen

NK-Zellen gehören zu den Zellen des angeborenen Immunsystems und besitzen keine antigenspezifischen Rezeptoren. Sie sind in der Lage abnormale Zellen wie beispielsweise Tumorzellen zu erkennen und abzutöten. Auf Grund ihres zytotoxischen antitumoralen Potentials wurden die intratumoralen NK-Zellen nach CpG-Applikation untersucht. Gleichzeitig wurden auch die natürlichen Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) analysiert. NKT-Zellen exprimieren sowohl einen T-Zell-Rezeptor als auch einige NK-Zell-Marker wie beispielsweise CD161 (Fujii et al., 2007). Der T-Zell-Rezeptor unterscheidet sich allerdings von dem klassischer T-Zellen dahingehend, dass er nicht mit Peptidantigenen auf den typischen MHC-Komplexen interagiert. Er erkennt vielmehr Glykolipide wie beispielsweise α -Galactosylceramid (Fujii et al., 2007). Neue Ergebnisse zeigen, dass an der Generierung einer antitumoralen T-Zell-Antwort NKT-Zellen beteiligt sind (Zaini et al., 2007). Aufgrund methodischer Probleme (kein passender histologischer Antikörper) wurden für die vorliegende Arbeit NK-Zellen nicht histologisch, sondern mittels FACS dargestellt. Für diese Untersuchung wurden aus den C26-Tumoren des Tierexperimentes „B“ Einzelzellsuspensionen hergestellt, diese dann mit Fluoreszenzantikörpern gegen CD49b und CD3 markiert und danach durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung 19). CD49b ist ein Integrin, das von den meisten NK- und NKT-Zellen exprimiert wird. NKT-Zellen sind zusätzlich noch CD3-

positiv. Es konnte kein Unterschied in der Präsenz intratumoraler CD49b-positiver Zellen in der CpG-behandelten Gruppe im Vergleich zur untherapierten Gruppe festgestellt werden. Betrachtet man hingegen die NKT-Zellen, so erkennt man in den CpG-therapierten Tumoren einen tendenziellen Anstieg dieser Population.



Mittelwerte CD49b-positiver Zellen



Mittelwerte CD49b- und CD3-doppelpositiver Zellen

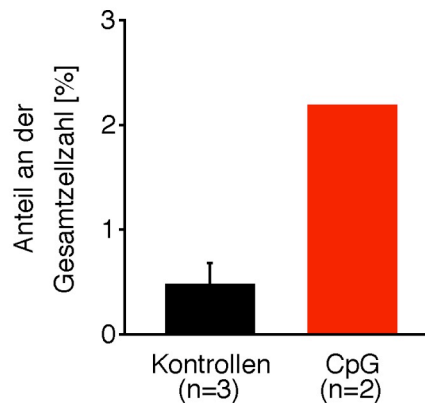


Abbildung 19 Durchflusszytometrische Analyse von CD49b- und CD3-positiven Zellen in C26-Tumoren nach Behandlung mit CpG

Dargestellt sind vier repräsentative Punktediagramme, in denen auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität für CD49b und auf der Ordinate die Fluoreszenzintensität für CD3 aufgetragen ist. Die Zahlen in den Ecken der Diagramme entsprechen dem prozentualen Anteil der Zellen dieses Quadranten an der Gesamtzellzahl. Die Anzahl der CD49b-positiven Zellen ergibt sich aus der Summe der Zahlen der beiden rechten Quadranten, die Anzahl der CD49b- und CD3-doppelpositiven Zellen entspricht der Zahl im rechten oberen Quadranten. Die Ergebnisse wurden unten in Balkendiagrammen graphisch dargestellt. n steht für die Zahl der untersuchten Tumoren je Gruppe.

3.1.4 Intratumorale B220-positive Zellen

Sowohl B-Zellen als auch pDCs werden mit einer immunmodulatorischen Funktion in Verbindung gebracht. Mit einer Färbung des Oberflächenantigens B220 können beide Zelltypen erfasst werden, da B220 von B-Zellen in allen Stadien ihrer Entwicklung exprimiert wird und auch pDCs B220-positiv sind. Für die vorliegende Arbeit sollte der Einfluss der peritumoralen CpG-Applikation auf die intratumoralen B220-positiven Zellen untersucht werden. Hierzu wurden die Tumoren des BALB/c-Modells (Tierexperiment „A“) mit einem Antikörper gegen B220 immunhistochemisch gefärbt und unter dem Lichtmikroskop beurteilt (Abbildung 20).

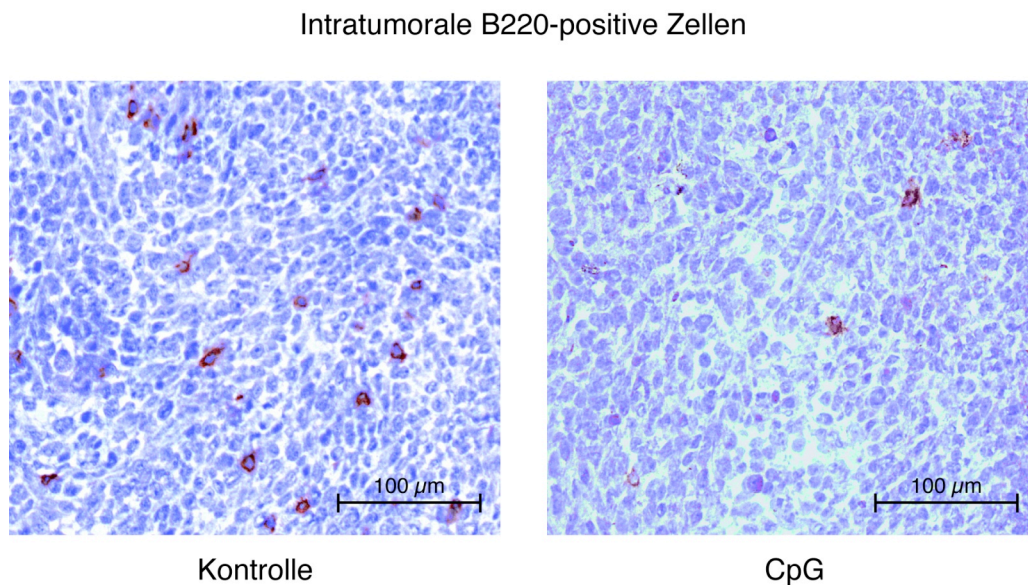


Abbildung 20 Immunhistochemische Färbung von B220-positiven Zellen in C26-Tumoren nach Behandlung mit CpG

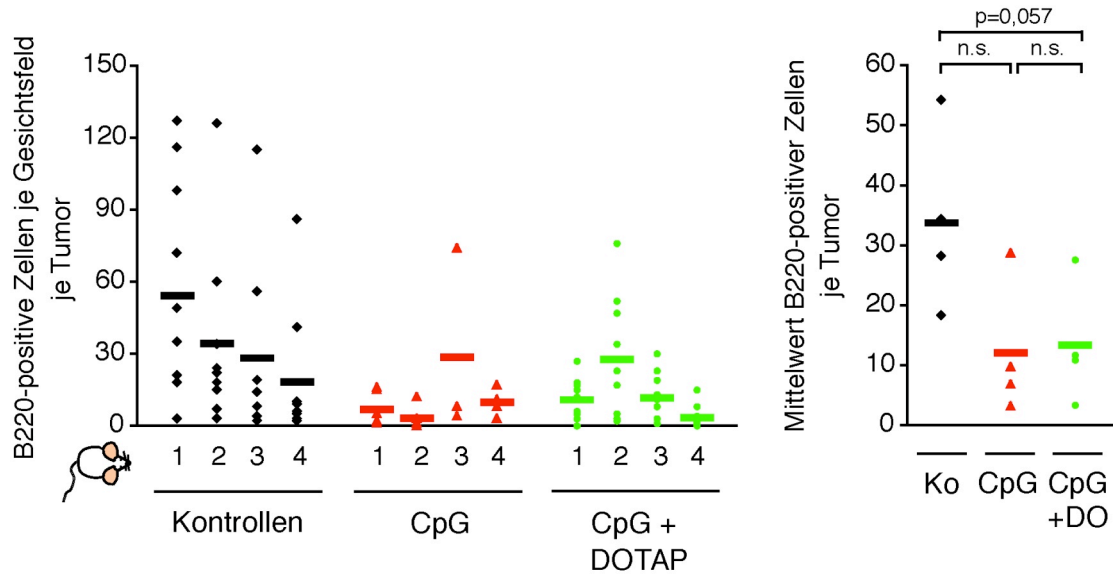
In Gewebeschnitten von C26-Tumoren wurde das Antigen B220 durch Farbreaktion mit Neufuchsin rot dargestellt. Das Gewebe wurde mit Hämalaun gegengefärbt. Dargestellt sind Gewebeschnitte eines unbehandelten (links) und eines CpG-behandelten Tumors (rechts). Vergrößerung 200-fach.

Für eine quantitative Aussage wurden die B220-positiven Zellen in zehn Gesichtsfeldern bei 200-facher Vergrößerung gezählt (Abbildung 21A). Dabei konnte in den CpG-therapierten Tumoren eine tendenzielle Abnahme intratumoraler B220-positiver Zellen festgestellt werden. Bezüglich dieser Zellpopulation wies die CpG+DOTAP-Gruppe ein der reinen CpG-Gruppe ähnliches Verteilungsmuster auf, wie sie es bisher nur bei den intratumoralen CD4-positiven Zellen getan hat. Die Tendenz einer verminderten intratumoralen Präsenz B220-positiver Zellen nach CpG-Applikation

konnte in einem ähnlich angelegten Versuch im C26-Tumormodell ein zweites Mal immunhistologisch reproduziert (Daten nicht gezeigt) und auch in den Tumoren des B16-Tumormodells (Tierexperiment „C“) immunhistochemisch gezeigt werden (Abbildung 21B).

Einzel- und Mittelwerte intratumoraler B220-positiver Zellen

A) C26-Tumormodell



B) B16-Tumormodell

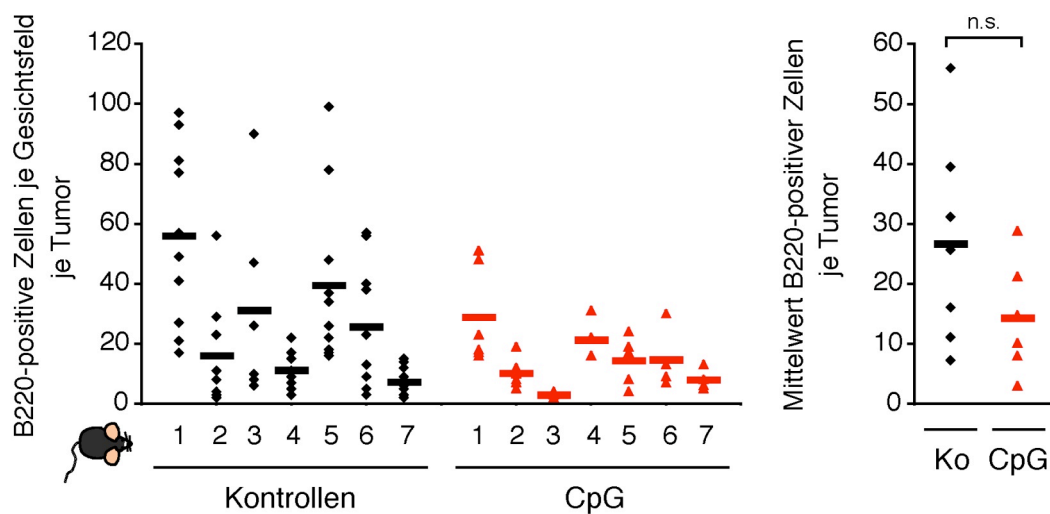


Abbildung 21 Quantifizierung von B220-positiven Zellen in C26- und B16-Tumoren nach Behandlung mit CpG

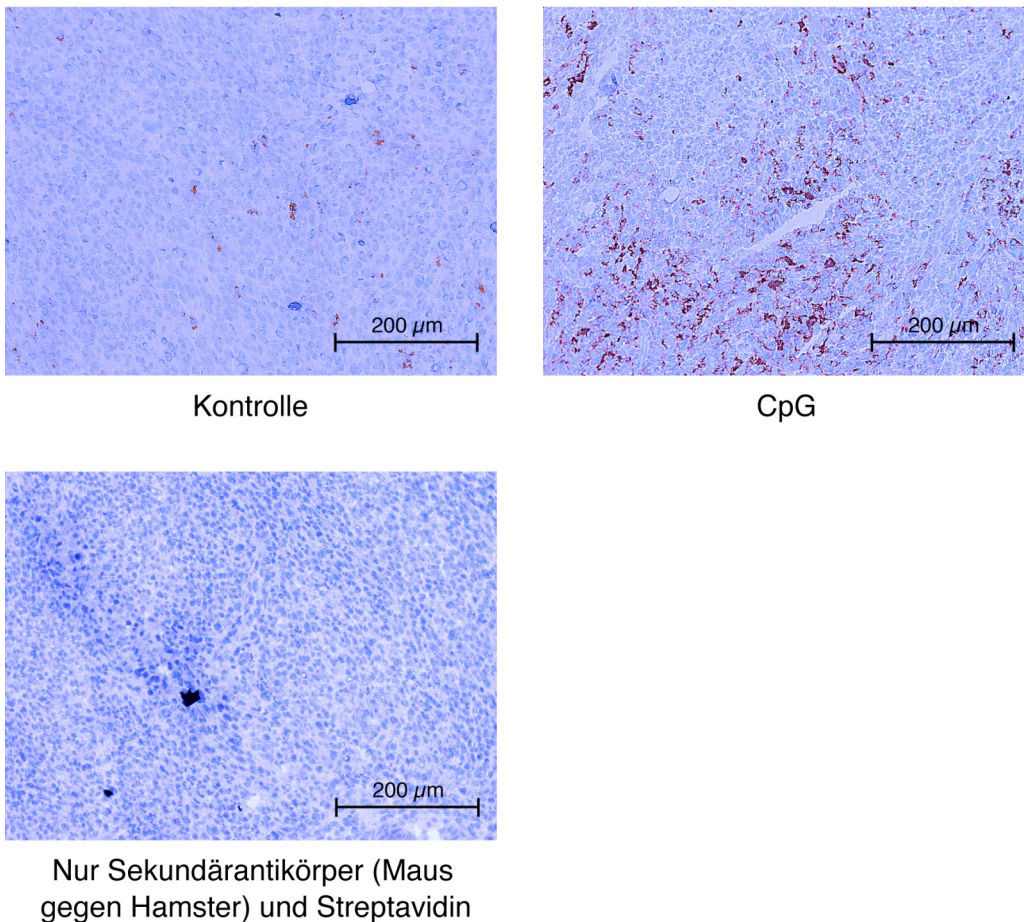
A) Links dargestellt ist die Anzahl der B220-positiven Zellen je Gesichtsfeld in C26-Tumoren. Rechts werden die Mittelwerte der B220-positiven Zellen je Gesichtsfeld je Tumor in Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit gezeigt. Auszählung der Gesichtsfelder bei 200-facher Vergrößerung. **B)** Ergebnisse der B220-Zellinfiltration im B16-Tumormodell. Auszählung der Gesichtsfelder bei 200-facher Vergrößerung. (Ausführliche Erläuterung der Graphik siehe Legendentext zu Abbildung 5).

3.1.5 Intratumorale myeloide Zellen

3.1.5.1 Intratumorale CD11c-positive Zellen

CD11c ist der klassische Oberflächenmarker für dendritische Zellen. Diese besitzen die Fähigkeit der Kreuzpräsentation von Antigenen, was bedeutet, dass sie exogen aufgenommene Fremdantigene auf ihrem MHC-I-Komplex präsentieren können. Über diese Kreuzpräsentation bringen dendritische Zellen CD8-positive zytotoxische T-Zellen mit Tumorantigenen in Kontakt. Auf Grund ihrer wichtigen Funktion im Rahmen einer Tumorimmuntherapie sollte in der vorliegenden Arbeit die Präsenz intratumoraler dendritischer Zellen nach CpG-Gabe untersucht werden. Daher wurden C26-Tumoren (Tierexperiment „A“) mit einem Antikörper gegen CD11c immunhistochemisch gefärbt und anschließend lichtmikroskopisch analysiert (Abbildung 22). In der CpG-Gruppe fielen dabei die starken Infiltrationen des Tumors mit CD11c-positiven Zellen auf.

Intratumorale CD11c-positive Zellen

**Abbildung 22 Immunhistochemische Färbung von CD11c-positiven Zellen in C26-Tumoren nach Behandlung mit CpG**

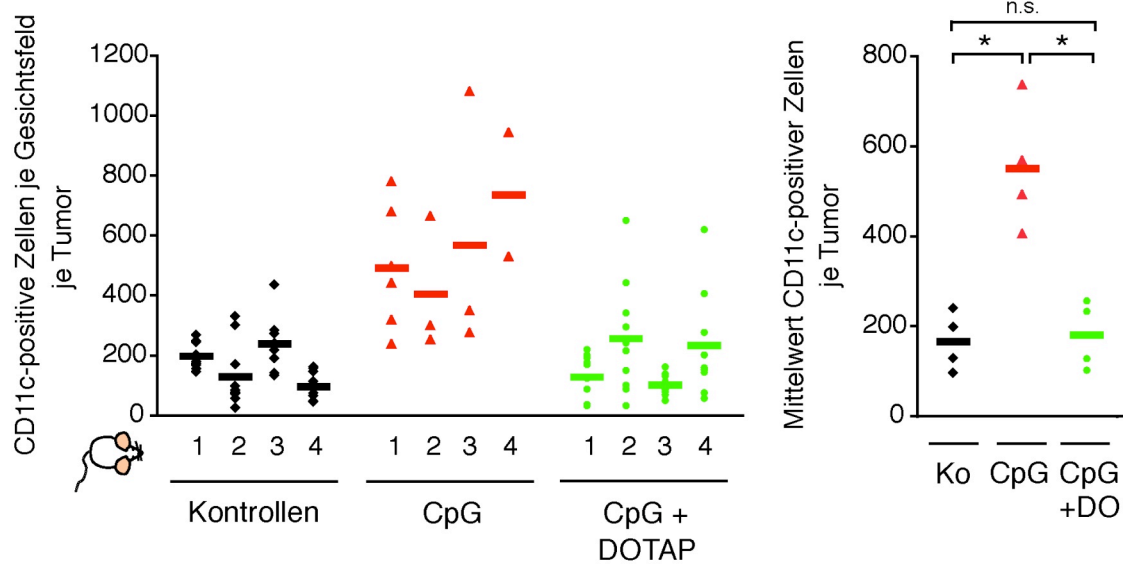
In Gewebeschnitten von C26-Tumoren wurde das Antigen CD11c durch Farbreaktion mit Neufuchsin rot dargestellt. Das Gewebe wurde mit Hämalaun gegengefärbt. Dargestellt sind Gewebeschnitte eines unbehandelten (links) und eines CpG-behandelten Tumors (rechts). Unten wird eine histologische Negativkontrolle gezeigt. Vergrößerung 200-fach.

Anschließend wurden die CD11c-positiven Zellen in zehn Gesichtsfeldern bei 200-facher Vergrößerung lichtmikroskopisch gezählt (Abbildung 23A). Es zeigte sich in den CpG-therapierten Tumoren eine massive Akkumulation von mehr als dreifach so vielen intratumoralen dendritischen Zellen im Vergleich zur Kontroll- und CpG+DOTAP-Gruppe. Dieses Ergebnis konnte allerdings in einem ähnlich angelegten Versuch im selben Tumormodell kein zweites Mal immunhistologisch reproduziert werden – im Gegenteil, dort waren sogar deutlich weniger CD11c-positive Zellen in den CpG-behandelten Tumoren vorhanden (Daten nicht gezeigt). Auch mit den B16-Tumoren (Tierexperiment „C“) konnte das Ergebnis nicht bestätigt werden. Nach Auszählen von zehn Gesichtsfeldern bei 200-facher Vergrößerung war kein Unterschied in der Anzahl

intratumoraler dendritischer Zellen zwischen der CpG-behandelten und der untherapierten Gruppe festzuhalten (Abbildung 23B).

Einzel- und Mittelwerte intratumoraler CD11c-positiver Zellen

A) C26-Tumormodell



B) B16-Tumormodell

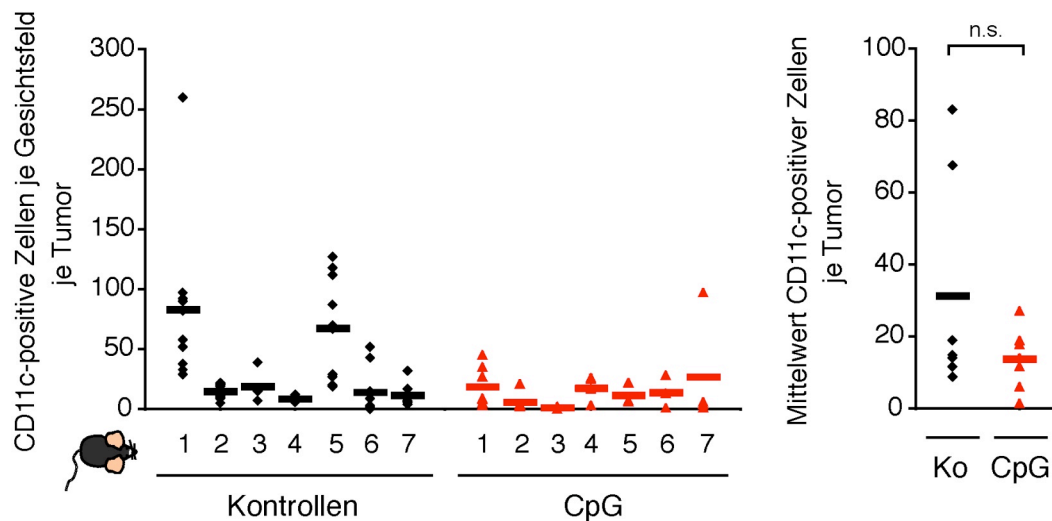


Abbildung 23 Quantifizierung von CD11c-positiven Zellen in C26- und B16-Tumoren nach Behandlung mit CpG

A) Links dargestellt ist die Anzahl der CD11c-positiven Zellen je Gesichtsfeld in C26-Tumoren. Rechts werden die Mittelwerte der CD11c-positiven Zellen je Gesichtsfeld je Tumor in Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit gezeigt. Auszählung der Gesichtsfelder bei 200-facher Vergrößerung. **B)** Ergebnisse der CD11c-Zellinfiltration im B16-Tumormodell. Auszählung der Gesichtsfelder bei 200-facher Vergrößerung. (Ausführliche Erläuterung der Graphik siehe Legendentext zu Abbildung 5).

Es gibt verschiedene Subpopulationen dendritischer Zellen. mDCs sind durch das Vorhandensein der Oberflächenantigene CD11c und CD11b gekennzeichnet und gleichzeitig B220-negativ, pDCs hingegen sind positiv für CD11c und B220, dafür aber CD11b-negativ. In der vorliegenden Arbeit wurden nun die dendritischen Zellen genauer charakterisiert. Dazu dienten Tumoren des C26-Tumormodells (Tierexperiment „B“), aus denen eine Einzelzellsuspension gewonnen werden konnte. Anschließend wurde diese mit Fluoreszenzantikörpern gegen CD11c, CD11b und B220 markiert und daraufhin durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung 24). Mittels FACS zeigte sich in den CpG-therapierten Tumoren die Tendenz der Verminderung intratumoraler CD11c-positiver Zellen (Abbildung 6). Auch die mDCs und pDCs waren in den CpG-behandelten Tumoren tendenziell vermindert vorhanden (Abbildung 24).

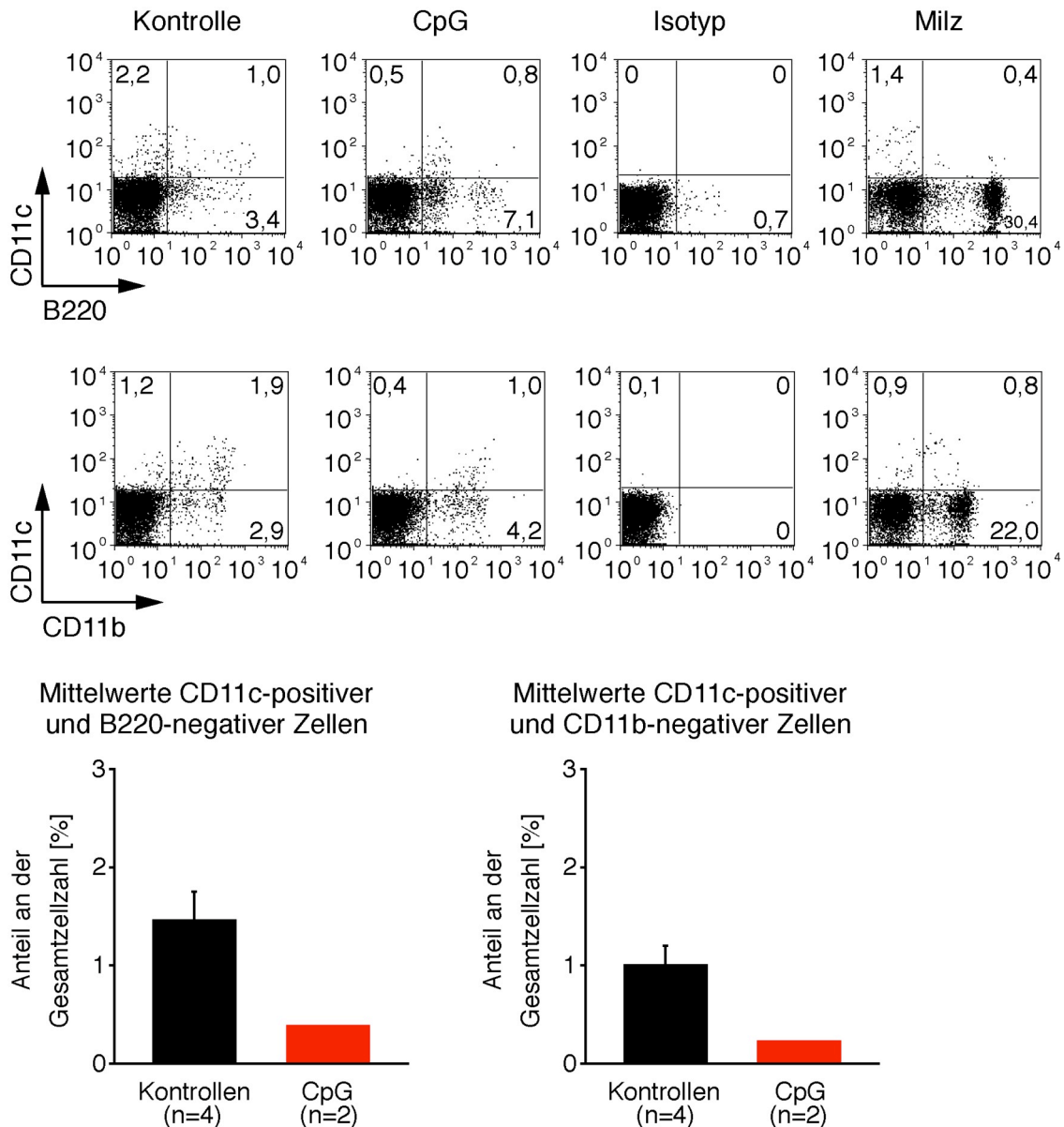


Abbildung 24 Durchflusszytometrische Analyse von CD11c-positiven, CD11b-positiven und B220-positiven Zellen in C26-Tumoren nach Behandlung mit CpG

Dargestellt sind acht repräsentative Punktediagramme, in denen auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität für B220 bzw. CD11b und auf der Ordinate die Fluoreszenzintensität für CD11c aufgetragen ist. Die Zahlen in den Ecken der Diagramme entsprechen dem prozentualen Anteil der Zellen dieses Quadranten an der Gesamtzellzahl. Die Anzahl der CD11c-positiven Zellen ergibt sich aus der Summe der Zahlen der beiden oberen Quadranten, die Anzahl der myeloiden bzw. plasmazytoiden dendritischen Zellen entspricht der Zahl im linken oberen Quadranten. Die Ergebnisse wurden unten in Balkendiagrammen graphisch dargestellt. n steht für die Zahl der untersuchten Tumoren je Gruppe.

3.1.5.2 Intratumorale Ly-6G-positive Zellen

Ly-6G ist ein Antigen, das am häufigsten von reifen Granulozyten exprimiert wird. Granulozyten sind Leukozyten des angeborenen Immunsystems, deren Funktion vor allem in der Abwehr von unspezifischen Krankheitserregern wie Bakterien, Pilzen und Parasiten liegt. Für die vorliegende Arbeit sollte der Einfluss der CpG-Gabe auf intratumorale Granulozyten untersucht werden. Hierzu wurde in C26-Tumoren (Tierexperiment „A“) das Antigen Ly-6G immunhistochemisch gefärbt und die Gewebeschnitte anschließend lichtmikroskopisch untersucht (Abbildung 25).

Intratumorale Ly-6G-positive Zellen

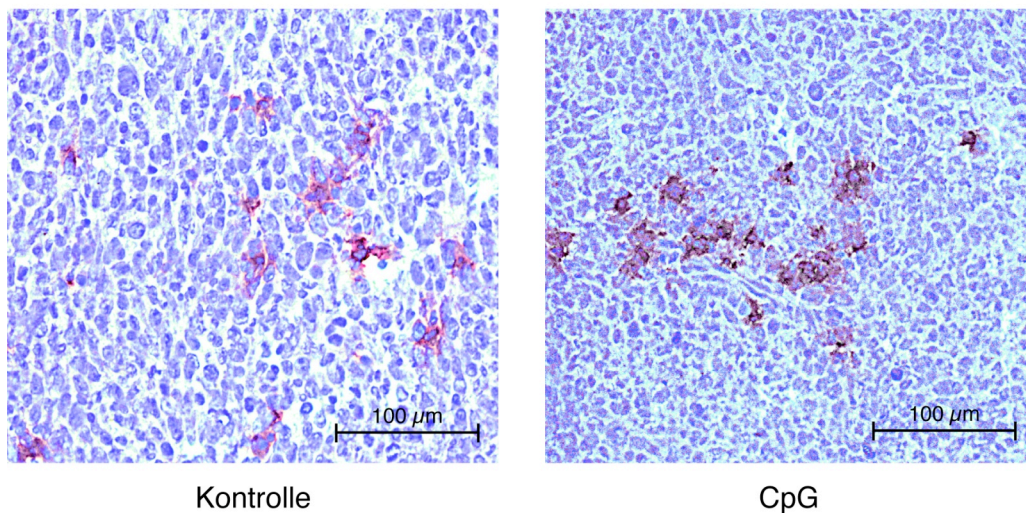


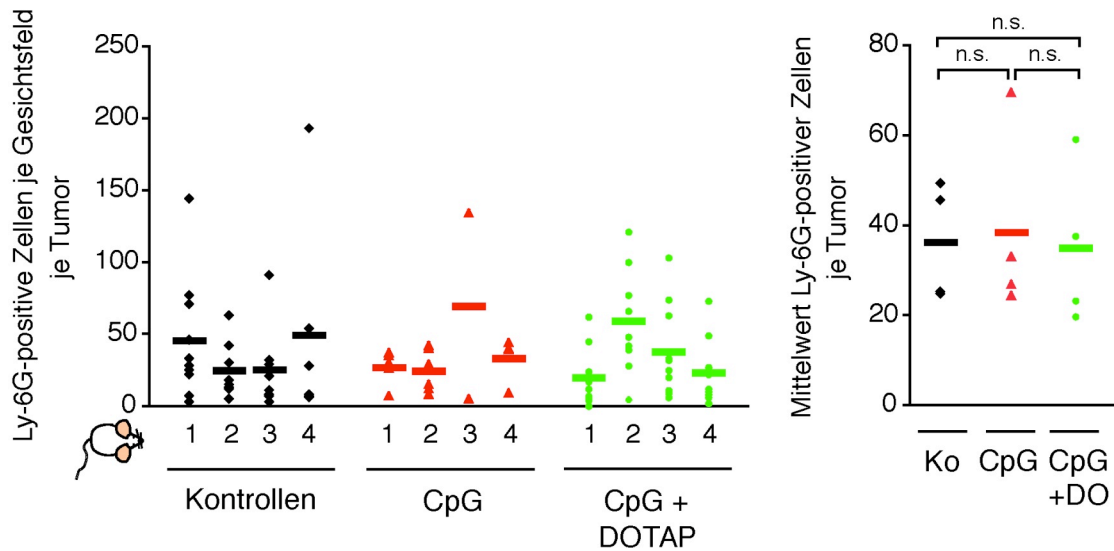
Abbildung 25 Immunhistochemische Färbung von Ly-6G-positiven Zellen in C26-Tumoren nach Behandlung mit CpG

In Gewebeschnitten von C26-Tumoren wurde das Antigen Ly-6G durch Farbreaktion mit Neufuchsin rot dargestellt. Das Gewebe wurde mit Hämalaun gegengefärbt. Dargestellt sind Gewebeschnitte eines unbehandelten (links) und eines CpG-behandelten Tumors (rechts). Vergrößerung 200-fach.

Bei der Auszählung der intratumoralen Ly-6G-positiven Zellen in zehn Gesichtsfeldern bei 200-facher Vergrößerung konnte kein Unterschied zwischen der CpG-, der CpG+DOTAP- und der untherapierten Gruppe festgestellt werden (Abbildung 26A). In den B16-Tumoren (Tierexperiment „C“) zeigte sich immunhistochemisch das gleiche Ergebnis (Abbildung 26B).

Einzel- und Mittelwerte intratumoraler Ly-6G-positiver Zellen

A) C26-Tumormodell



B) B16-Tumormodell

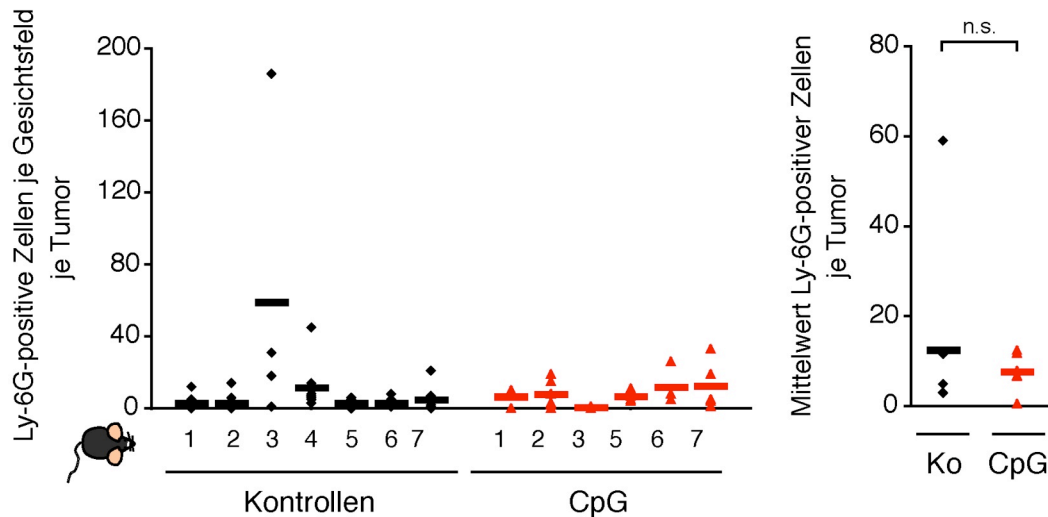


Abbildung 26 Quantifizierung von Ly-6G-positiven Zellen in C26- und B16-Tumoren nach Behandlung mit CpG

A) Links dargestellt ist die Anzahl der Ly-6G-positiven Zellen je Gesichtsfeld in C26-Tumoren. Rechts werden die Mittelwerte der Ly-6G-positiven Zellen je Gesichtsfeld je Tumor in Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit gezeigt. Auszählung der Gesichtsfelder bei 200-facher Vergrößerung. **B)** Ergebnisse der Ly-6G-Zellinfiltration im B16-Tumormodell. Auszählung der Gesichtsfelder bei 200-facher Vergrößerung. (Ausführliche Erläuterung der Graphik siehe Legendentext zu Abbildung 5).

3.1.5.3 Intratumorale F4/80-positive Zellen

Makrophagen sind phagozytierende Leukozyten, die typischerweise das Oberflächen-glykoprotein F4/80 exprimieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte auch die Beeinflussung der intratumoralen Makrophagen durch CpG-Applikation untersucht werden. Dazu wurden die Tumoren des C26-Tumormodells (Tierexperiment „A“) mit einem Antikörper gegen F4/80 immunhistochemisch gefärbt (Abbildung 27A) und die positiven Zellen in zehn Gesichtsfeldern bei 400-facher Vergrößerung gezählt (Abbildung 27B). Dabei konnte kein Unterschied in der Präsenz intratumoraler F4/80-positiver Zellen zwischen der CpG-behandelten und der untherapierten Gruppe festgestellt werden.

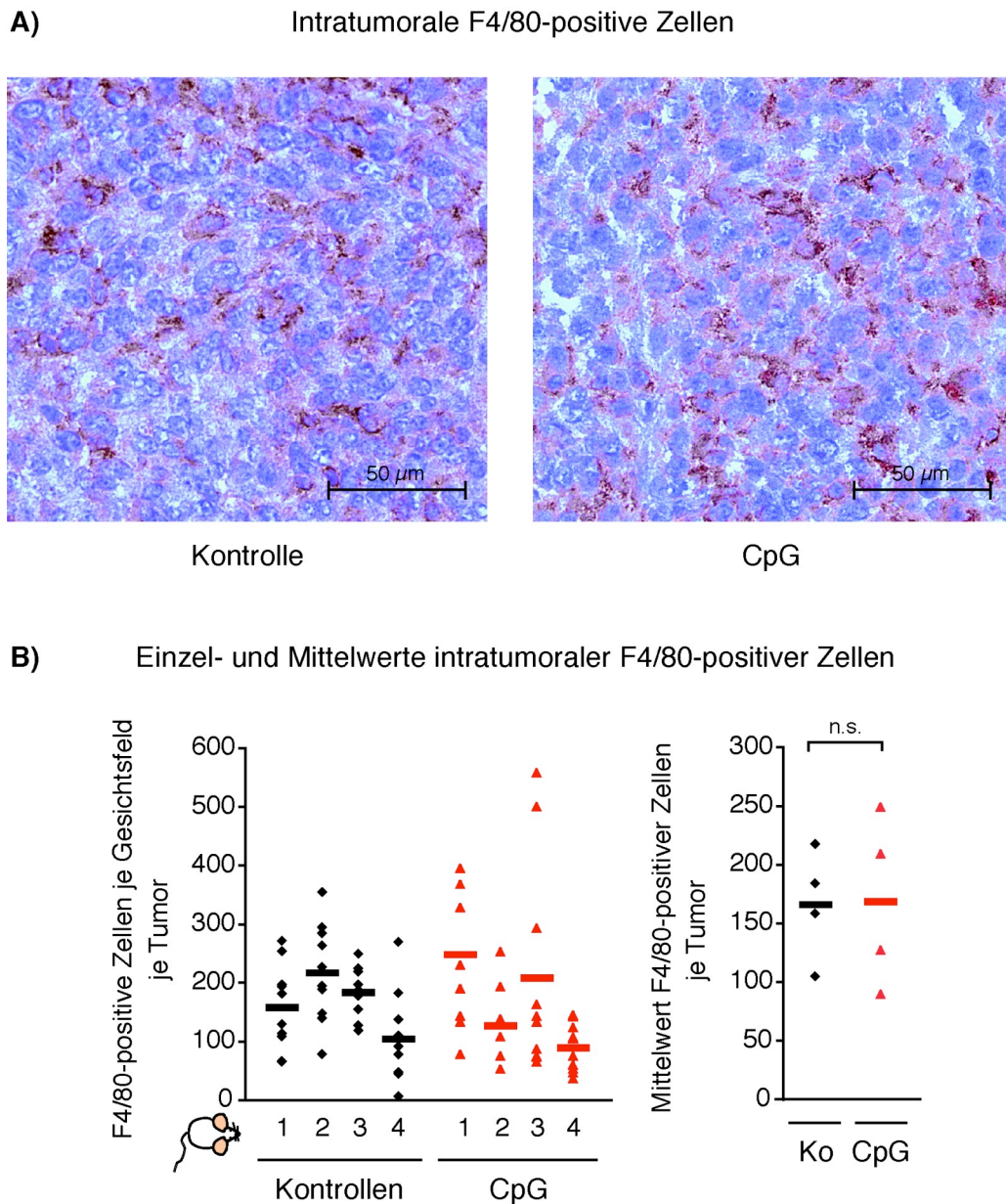


Abbildung 27 Immunhistochemische Färbung von F4/80-positiven Zellen in C26-Tumoren nach Behandlung mit CpG

A) In Gewebeschnitten von C26-Tumoren wurde das Antigen F4/80 durch Farbreaktion mit Neufuchsin rot dargestellt. Das Gewebe wurde mit Hämalaun gegengefärbt. Dargestellt sind Gewebeschnitte eines unbehandelten (links) und eines CpG-behandelten Tumors (rechts). Vergrößerung 400-fach. **B)** Links dargestellt ist die Anzahl der F4/80-positiven Zellen je Gesichtsfeld je Tumor. Rechts werden die Mittelwerte der F4/80-positiven Zellen je Gesichtsfeld je Tumor in Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit gezeigt. Auszählung der Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung. (Ausführliche Erläuterung der Graphik siehe Legendentext zu Abbildung 5).

3.1.6 Verstärkte Vaskularisation im Tumorgewebe

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte auch der Frage nachgegangen werden, welchen Einfluss CpG auf die Vaskularisation im Tumorgewebe ausübt. Dafür wurden C26-Tumoren (Tierexperiment „A“) immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen CD31 gefärbt (Abbildung 28). CD31 ist ein Transmembran-Glykoprotein, das zur Gruppe der Adhäsionsmoleküle gehört und hauptsächlich von Endothelzellen exprimiert wird. Nach CpG-Therapie erkennt man lichtmikroskopisch eine deutlich vermehrte Gefäßbildung in den CpG-therapierten Tumoren.

Intratumorale CD31-positive Zellen

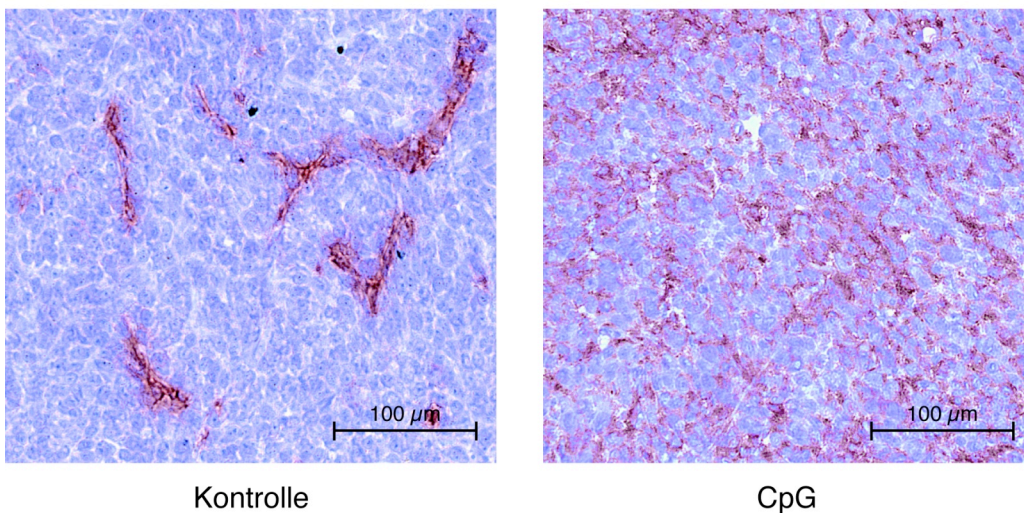


Abbildung 28 Immunhistochemische Färbung von CD31-positiven Zellen in C26-Tumoren nach Behandlung mit CpG

In Gewebeschnitten von C26-Tumoren wurde das Antigen CD31 durch Farbreaktion mit Neufuchsin rot dargestellt. Das Gewebe wurde mit Hämalaun gegengefärbt. Dargestellt sind Gewebeschnitte eines unbehandelten (links) und eines CpG-behandelten Tumors (rechts). Vergrößerung 200-fach.

3.2 Einfluss der Therapie mit anderen *Toll-like*-Rezeptor-Liganden auf die Präsenz intratumoraler Immunzellen

Abschließend sollte untersucht werden, ob sich ein Teil der gewonnenen Daten über intratumorale Immunzellen nach CpG-Applikation auch für Tumoren reproduzieren lässt, die mit anderen TLR-Liganden behandelt wurden. Dafür wurde ein Tierversuch durchgeführt, in dem R848 als ein Ligand für TLR7, Poly(I:C) als ein Ligand für TLR3 und LPS als ein Ligand für TLR4 verwendet wurden. Es gab vier Therapiegruppen (Kontroll-, R848-, LPS- und Poly(I:C)-Gruppe) zu je 6 Mäusen. Nach Therapieinduktion eines C26-Tumors an Tag 0 erhielten die Mäuse jeweils an Tag 8 und Tag 11 die für ihre Gruppe bestimmte Therapie (20 µg R848 subkutan in die zum Tumor kontralaterale Flanke bzw. 5 µg LPS subkutan in die zum Tumor kontralaterale Flanke bzw. 250 µg Poly(I:C) intraperitoneal). Die Mäuse der Kontrollgruppe erhielten keine Therapie. An Tag 14 wurden die Mäuse getötet und ihr Tumor für histologische Untersuchungen entnommen. Anhand der Tumorgrößenkurven erkennt man, dass keine der drei Therapieformen einen Einfluss auf das Tumorwachstum hatte (Abbildung 29).

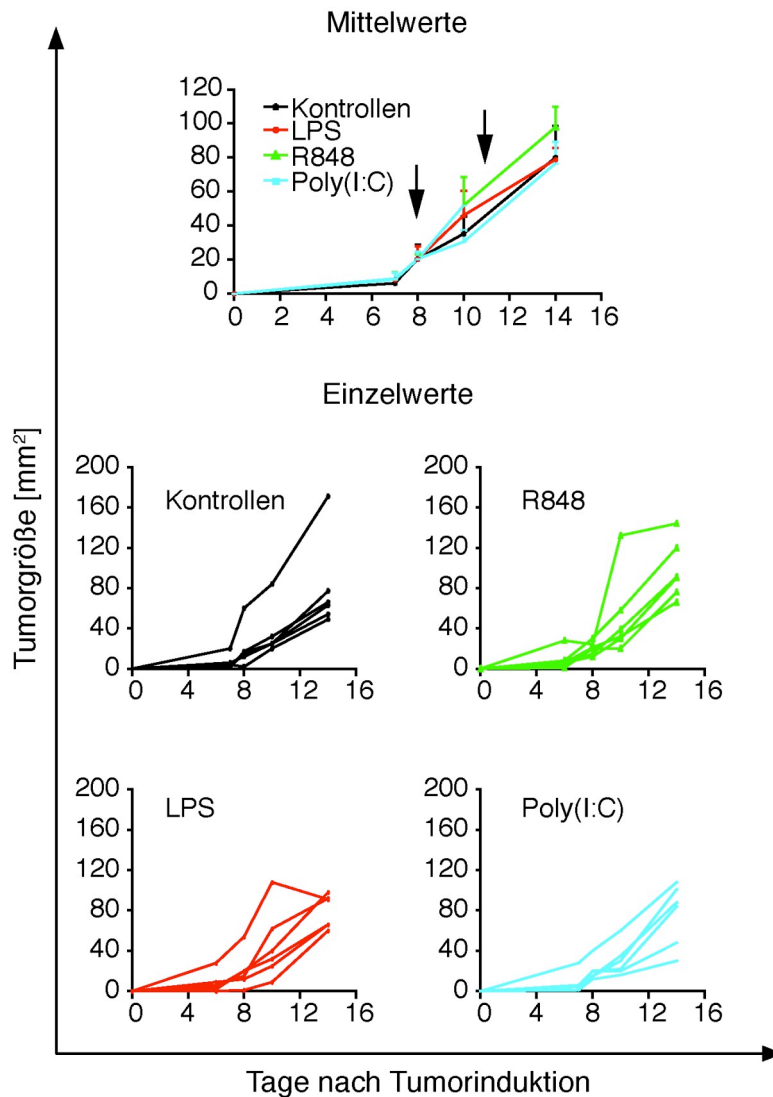


Abbildung 29 Mittelwerte und Einzelwerte des Tumorgößenwachstums bei BALB/c-Mäusen mit C26-Tumoren in Abhängigkeit von der Therapie

Dargestellt sind die Mittelwerte des Tumorgößenwachstums der Therapiegruppen und die Einzelwerte des Tumorgößenwachstums der einzelnen Mäuse je Gruppe. Auf der Abszisse sind die Tage nach Tumorinduktion aufgezeichnet, die Ordinate spiegelt die Tumorgöße wieder. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte der Therapie.

3.2.1 Verminderte Anzahl intratumoraler CD3-positiver Zellen

In den mit unterschiedlichen TLR-Liganden behandelten Tumoren wurde zunächst die intratumorale Präsenz CD3-positiver Zellen als Maß für die Gesamtheit aller T-Zellen im Tumor untersucht. Nach Färbung der Tumoren mit Fluoreszenzantikörpern gegen CD3 wurden in sämtlichen Gesichtsfeldern bei 400-facher Vergrößerung die positiven Zellen gezählt (Abbildung 30). Dabei fiel in den mit R848 und Poly(I:C) stimulierten Gruppen eine im Vergleich zur Kontrollgruppe verminderte Anzahl intratumoraler CD3-

positiver Zellen auf. In den Tumoren, die mit LPS behandelt worden waren, zeigte sich die Tendenz einer verringerten Anzahl intratumoraler CD3-positiver Zellen.

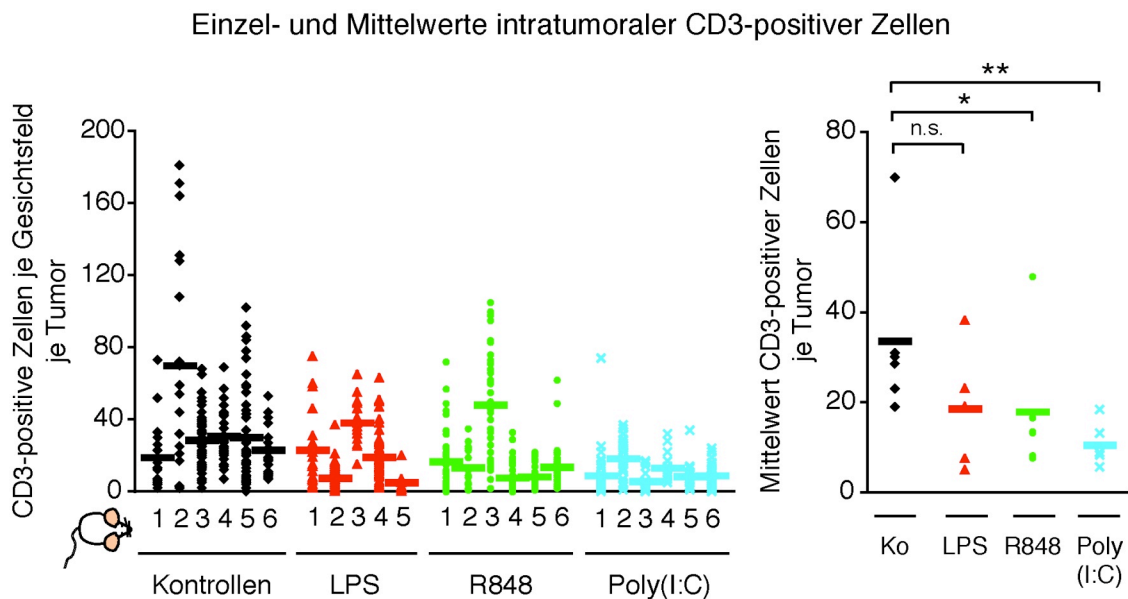


Abbildung 30 Quantifizierung von CD3-positiven Zellen in C26-Tumoren in Abhängigkeit von der Therapie

A) Links dargestellt ist die Anzahl der intratumoralen CD3-positiven Zellen je Gesichtsfeld in C26-Tumoren. Die Ordinate gibt die Anzahl der positiven Zellen je Gesichtsfeld wieder. Entlang der Abszisse sind die individuellen Tumoren aufgelistet, wobei die Zahlen unterhalb der Abszisse die Mausnummern wiedergeben. Jedes Symbol (◆, ▲, ● oder ✕) entspricht der Zahl positiver Zellen eines Gesichtsfeldes. Der horizontale Balken (—) entspricht dem Mittelwert positiver Zellen je Gesichtsfeld in einem Tumor. Rechts dargestellt sind die Mittelwerte der CD3-positiven Zellen je Gesichtsfeld je Tumor in Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit. Jedes Symbol (◆, ▲, ● oder ✕) entspricht dem Mittelwert positiver Zellen je Gesichtsfeld je Tumor. Der horizontale Balken (—) entspricht dem Mittelwert positiver Zellen je Gesichtsfeld je Gruppe. Auszählung der Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung.

3.2.2 Verminderte Anzahl intratumoraler Foxp3-positiver Zellen

Für eine Analyse der intratumoralen Foxp3-positiven Zellen wurden die mit unterschiedlichen TLR-Liganden behandelten Tumoren mit einem Immunfluoreszenz-Antikörper gegen Foxp3 gefärbt. Anschließend wurden in sämtlichen Gesichtsfeldern bei 400-facher Vergrößerung die positiven Zellen gezählt (Abbildung 31). Dabei konnte in den mit R848 und Poly(I:C) behandelten Tumoren eine intratumorale Abnahme der Anzahl Foxp3-positiver Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Die LPS-therapierten Tumoren zeigten die Tendenz einer intratumoralen Verminderung der Anzahl Foxp3-positiver Zellen.

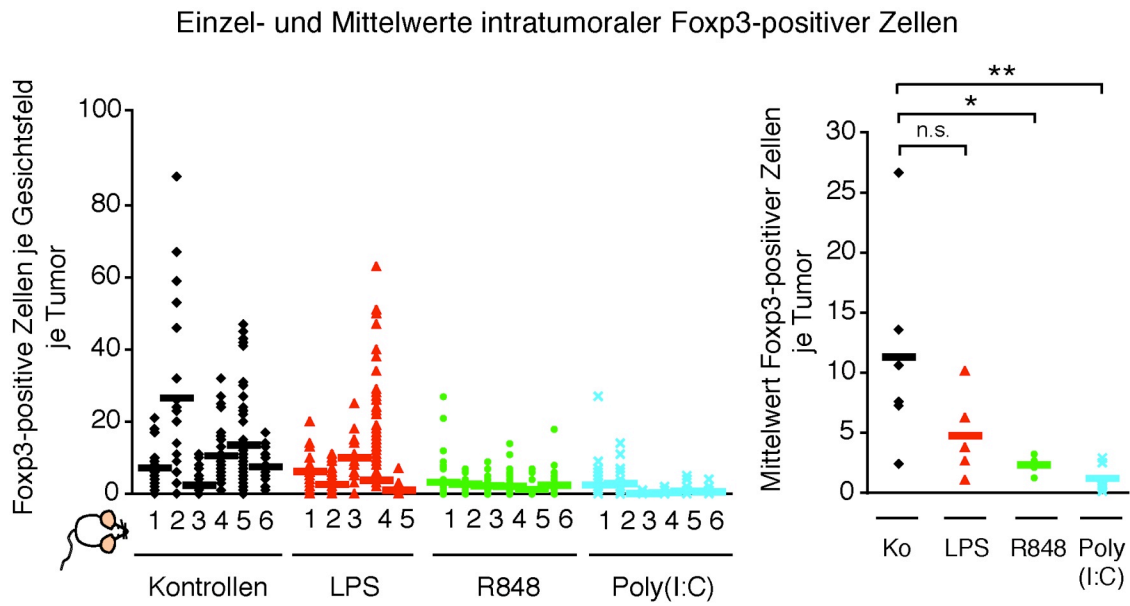


Abbildung 31 Quantifizierung von Foxp3-positiven Zellen in C26-Tumoren in Abhängigkeit von der Therapie

Links dargestellt ist die Anzahl der Foxp3-positiven Zellen je Gesichtsfeld je Tumor. Rechts werden die Mittelwerte der Foxp3-positiven Zellen je Gesichtsfeld je Tumor in Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit gezeigt. Auszählung der Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung. (Ausführliche Erläuterung der Graphik siehe Legendentext zu Abbildung 30).

4. Diskussion

4.1 Übersicht über die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse

| | CpG-Gabe | CpG+ DOTAP-Gabe | LPS-Gabe | R848-Gabe | Poly(I:C)-Gabe |
|--|----------|-----------------|----------|-----------|----------------|
| Einfluss auf intratumorale... | | | | | |
| CD3-positive Zellen | ↑* | ↔ | ↓ | ↓* | ↓** |
| CD8-positive Zellen | ↑ | ↔ | | | |
| Perforin-positive Zellen | ↑ | | | | |
| Aktivierte Perforin-positive T-Zellen | ↑* | | | | |
| CD4-positive Zellen | ↓ | ↓ | | | |
| Foxp3-positive Zellen | ↓* | | ↓ | ↓* | ↓** |
| Foxp3-positive Zellen, Anteil an CD4-positiven Zellen | ↓ | | | | |
| Foxp3-positive Zellen, Anteil an T-Zellen | ↓*** | | | | |
| Expression von CD103 auf Tregs | ↓ | | | | |
| CD4- und CD11c-doppelt-positive Zellen, Anteil an CD4-positiven Zellen | ↓* | | | | |

| | | | | | |
|-----------------------|-------|---|--|--|--|
| NK-Zellen | ↔ | | | | |
| NKT-Zellen | ↑ | | | | |
| CD11c-positive Zellen | ↔ ↑ * | ↔ | | | |
| mDCs | ↓ | | | | |
| pDCs | ↓ | | | | |
| B220-positive Zellen | ↓ | ↓ | | | |
| CD31-positive Zellen | ↑ | | | | |
| Ly-6G-positive Zellen | ↔ | ↔ | | | |
| F4/80-positive Zellen | ↔ | | | | |

Tabelle 14 Zusammenfassung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

Es werden die Einflüsse verschiedener TLR-Liganden (erste Zeile) auf die Präsenz intratumoraler Immunzellen (erste Spalte) dargestellt. ↑ steht für eine Zunahme der Anzahl intratumoraler Zellen, ↓ für eine Abnahme. Signifikante Ergebnisse sind mit einem bis drei * vermerkt.

4.2 Peritumorale Applikation von CpG-Oligonukleotiden inhibiert das Tumorwachstum

Die vorliegende Arbeit sollte zu einem besseren Verständnis der antitumoralen Wirkmechanismen von CpG beitragen und so letzten Endes den Weg für einen besseren Therapieerfolg bereiten. Daher wurde zunächst einmal der in der Literatur bereits geschilderte Tumorrückgang durch eine Monotherapie mit CpG im Mausmodell reproduziert (Baines and Celis, 2003; Lonsdorf et al., 2003) um anschließend das Immunzellinfiltrat des Tumor histologisch und durchflusszytometrisch untersuchen zu können. Für einen Großteil der gewonnenen Ergebnisse dieser Arbeit wurde das Therapieschema der peritumoralen Injektion von CpG in den murinen C26- und B16-

Tumormodellen angewandt. Um das primäre Ziel der Arbeit zu erreichen – den Vergleich von therapiertem und untherapiertem Tumorgewebe – war es unabdingbar Mausversuche durchzuführen, in denen der therapeutische Erfolg des CpG offensichtlich ist. Aus diesem Grund variierten die Zeitpunkte und Anzahlen der Therapien in den verschiedenen Tierexperimenten, da es stets darum ging möglichst effizient therapierte Tumoren untersuchen zu können. Gleichzeitig ergab sich die Schwierigkeit den bestmöglichen Zeitpunkt für die Entnahme und nachfolgende Untersuchung der Tumoren zu bestimmen, da einerseits im Tumorgrößenverlauf ein Trend in Richtung verlangsamtes Tumorwachstum sichtbar sein sollte, gleichzeitig aber bei zu langem Abwarten die Gefahr einer Komplettremission des Tumors bestand, was eine histologische oder durchflusszytometrische Beurteilung des Gewebes unmöglich gemacht hätte. Daher sind zum Teil auch die Endpunkte der Tierversuche unterschiedlich festgesetzt worden.

In allen für die vorliegende Arbeit durchgeführten Tumorversuchen war die immunstimulatorische Wirkung des CpG erkennbar, was sich in einem verlangsamten und zum Teil stagnierenden Wachstum widerspiegelt. In wenigen Fällen verkleinerten sich die therapierten Tumoren. Die Mittelwerte der Tumorgrößen waren in den Tierexperimenten „B“ und „C“ in der CpG-Gruppe signifikant verringert. Diese Ergebnisse waren zu erwarten, da sie Resultaten früherer Publikationen entsprechen: Schon 1999 konnten Carpentier et al. zeigen, dass die tägliche peritumorale Injektion von CpG bei Tumoren einer Neuroblastomzelllinie zur Inhibition des Tumorwachstums und teilweiser Eradikation von Tumoren führt, wobei dieser Effekt abhängig von NK-Zellen ist (Carpentier et al., 1999). Zwei Jahre später bestätigten Kawarada et al. bei mehreren Tumormodellen diese Beobachtung und machten dabei neben den NK-Zellen auch noch die zytotoxischen CD8-positiven T-Zellen für den CpG-vermittelten antitumoralen Effekt verantwortlich (Kawarada et al., 2001). Weitere Erfolge der peritumoralen Applikation von CpG konnten auch im Tumormodell mit B16-Melanomzellen (Ballas et al., 2001) und im C26-Kolonkarzinommodell (Heckelsmiller et al., 2002b) gezeigt werden. Trotzdem sind auch in Mausmodellen Fälle beschrieben, in denen die alleinige peritumorale Injektion von CpG nicht zum gewünschten Erfolg führte (Furumoto et al., 2004; Garbi et al., 2004). Daher sollte nun in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal systematisch der Einfluss von CpG auf alle tumorimmunologisch relevanten intratumoralen Zellpopulationen untersucht werden. Zudem unterstreichen die Daten der vorliegenden Arbeit die Wirksamkeit einer peritumoralen CpG-Therapie

und unterstützen einen Einsatz dieser Applikationsform auch beim Menschen, was mit Hilfe neuer Applikationsmethoden ermöglicht werden könnte. So können beispielsweise systemisch applizierte CpG-Liposomen mit einem Peptid verbunden werden, welches zu einer spezifischen Anreicherung der CpG-Liposomen im Tumorgewebe führt und somit den Effekt einer peritumoralen CpG-Gabe imitiert (Hamzah et al., 2009). Bisher hat beim Menschen der schlechte Zugang zum Tumor eine peritumorale CpG-Gabe verhindert und die systemische Applikation erfordert, die weniger effektiv war.

Im Tierexperiment „A“ gab es neben der CpG- und der Kontrollgruppe noch eine weitere Therapiegruppe, in der die Mäuse CpG+DOTAP erhielten. Es ist bereits bekannt, dass das kationische Lipid DOTAP immunstimulierend wirkt, da es die TLR-9-vermittelte IFN α -Produktion dendritischer Zellen verstärkt (Asselin-Paturel et al., 2005; Honda et al., 2005a). Erstaunlicherweise verbesserte die Kombination von CpG+DOTAP die Therapie nicht, sondern verschlechterte sie sogar: Die Tumoren dieser Gruppe wuchsen noch schneller als die der Kontrollgruppe. Das steht im Widerspruch zu einer bereits veröffentlichten Publikation, in der für die Applikation eines Komplexes aus kationischen Lipiden und immunstimulatorischer DNS eine antitumorale Wirkung nachgewiesen konnten, die im Mausmodell zu Tumorrückgang führte (Rudginsky et al., 2001). Dies könnte im ersten Moment dazu verleiten technische Fehler bei der Applikation des Kation-DNS Komplexes in dem für die vorliegende Arbeit durchgeführten Versuch verantwortlich zu machen, zumal die CpG+DOTAP-behandelten Mäuse bei der histologischen Beurteilung einiger intratumoraler Immunzellen ein Bild boten, das dem unbehandelten Tumoren glich: Die Präsenz intratumoraler CD3-, CD8- und CD11c-positiver Zellen zeigt keinen Unterschied zur Kontrollgruppe. Allerdings sind die intratumoralen CD4- und B220-positiven Zellen in den CpG+DOTAP-behandelten Tumoren im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt und somit gleicht dieses Ergebnis der Beobachtung, die in den CpG-therapierten Tumoren desselben Versuches gemacht wurde. Dies zeigt, dass die Kombination von CpG+DOTAP nicht zu einer völligen Wirkungslosigkeit des CpG geführt hat, sondern lediglich zu einer Abschwächung, welche zwar nicht mehr einen klinischen Therapieerfolg vollbringen konnte, aber dennoch die Einwanderung von Immunzellen in den Tumor partiell beeinflusste.

4.3 Einfluss der CpG-Oligonukleotide auf intratumorale Effektorzellen und die Vaskularisation im Tumorgewebe

Für eine effektive Tumorbekämpfung im Rahmen einer Tumormimmuntherapie müssen tumorantigenspezifische T-Zellen das Tumorgewebe infiltrieren, nachdem sie im Lymphknoten durch dendritische Zellen aktiviert worden sind (Wakita et al., 2006). Viele untherapierte Tumoren weisen allerdings keine Zeichen einer Bekämpfung durch das Immunsystem, wie beispielsweise eine Tumordinfiltration mit T-Zellen, auf (Nagorsen et al., 2003). Trotzdem führt der alleinige adoptive Transfer antigenspezifischer T-Zellen zu keiner vermehrten Einwanderung dieser Zellen in den Tumor, sondern es wird die zusätzliche Applikation von CpG benötigt damit die T-Zellen das Tumorgewebe infiltrieren (Garbi et al., 2004). Dies verdeutlicht, dass eine effektive Tumorthherapie ein proinflammatorisches Milieu benötigt, das es Effektorzellen erlaubt aus Gefäßen auszutreten und den Tumor zu bekämpfen (Ganss and Hanahan, 1998; Ganss et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, ob die alleinige Gabe von CpG im Rahmen einer Tumorthherapie zu einer vermehrten Präsenz intratumoraler T-Zellen im Allgemeinen (CD3-positive Zellen) und zytotoxischer T-Zellen im Speziellen (CD8-positiver Zellen) führt. Es ist bereits bekannt, dass die CpG-Applikation zu einer verstärkten Aktivität zytotoxischer T-Zellen im murinen System führt (Chu et al., 1997; Davis et al., 1998; Lipford et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit konnten in den CpG-therapierten Tumoren tendenziell vermehrt intratumorale CD3-positive Zellen festgestellt werden. In einem Versuch war der Anstieg der intratumoralen T-Zellen signifikant. Dieser Anstieg korrelierte mit einem verlangsamten Tumorwachstum bzw. Tumorrückgang, was die Hypothese stützt, T-Zellen seien für eine klinische Tumorkontrolle wichtig. Das wird von der Tatsache untermauert, dass das intratumorale T-Zellinfiltrat in den Tumoren, die klinisch erfolglos mit CpG+DOTAP behandelt worden waren, keinen Unterschied zur Kontrollgruppe zeigte. In den Tumoren, die erfolglos mit den TLR-Liganden R848, LPS und Poly(I:C) therapiert worden waren, zeigte sich intratumoral sogar eine Verminderung CD3-positiver Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Bezüglich der intratumoralen CD8-positiven Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit ein Anstieg in den CpG-therapierten Tumoren festgestellt werden. Diese Zunahme war nicht signifikant, was allerdings durch die kleine Gruppengröße bedingt sein könnte. Das Ergebnis entspricht Erwartungen aus der Literatur, da CD8-positive Zellen

hauptverantwortlich für die Tumoreradikation gemacht werden (Wakita et al., 2006). Zudem wurden bereits in der Literatur vereinzelt histologische Bilder veröffentlicht, in denen der Effekt einer erfolgreichen CpG-Therapie mit einer gesteigerten Infiltration CD8-positiver T-Zellen in den Tumor assoziiert ist (Kunikata et al., 2004). Auch Garbi et al. zeigten 2004 histologische Bilder von Tumorantigen exprimierenden Geweben, auf denen man vermehrte CD4- und CD8-positiv T-Zellinfiltrate in den Geweben erkennen konnte, die frühzeitig mit CpG und aktivierten T-Zellen behandelt worden waren (Garbi et al., 2004). Bisher war hierbei jedoch keine quantitative Auswertung erfolgt, so dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit nun erstmals durch Auszählung definierter intratumoraler Gesichtsfelder eine systematische Analyse diverser tumorinfiltrierender Immunzellen, hier CD8-positiver T-Zellen, durchgeführt wurde.

Im Zusammenhang mit den CD8-positiven Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit das Effektormolekül Perforin untersucht. Schon lange ist bekannt, dass Perforin für die Bekämpfung von Tumoren essenziell ist (van den Broek et al., 1996). Auch zytotoxische T-Zellen bedienen sich des Perforins als Effektormolekül, jedoch weiß man aus Tumorstudien beim Menschen, dass intratumorale Lymphozyten wenig zytotoxische Effektorproteine wie beispielsweise Perforin und Granzym exprimieren (Appay et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit konnten tendenziell vermehrt Perforin-positiv Zellen in den CpG-therapierten Tumoren festgestellt werden, das Ergebnis war fast signifikant. Trotzdem ist die absolute Anzahl Perforin-positiv Zellen selbst in den CpG-behandelten Tumoren sehr niedrig, was dazu verleiten könnte den Perforin-vermittelten Effekt auf die Inhibition des Tumorwachstums in den Hintergrund zu stellen. Die Tatsache aber, dass zytotoxische CD8-positiv T-Zellen als Träger von Effektormolekülen für das Töten der Zielzelle nur 2-10 Minuten benötigen (Matter, 1979) und dann bereits nach 6 Minuten wieder andere Zielzellen töten können (Poenie et al., 1987), lässt das in dieser Arbeit gewonnene Ergebnis in einem anderen Licht erscheinen. Denn da in einem histologischen Bild immer nur Momentaufnahmen festgehalten werden, sind Rückschlüsse auf die Häufigkeit der Verwendung eines so dynamischen Proteins wie des Perforins nur schwer möglich. Zudem können möglicherweise auch wenige Perforin-positiv Zellen für einen antitumoralen Effekt ausreichen. Da sowohl in humanen (Whiteside, 1998) als auch in murinen (Prevost-Blondel et al., 1998; Sotomayor et al., 1999) Tumoren infiltrierende CD8-positiv Lymphozyten gefunden wurden, die bezüglich ihrer lytischen Funktion infunktionell waren, wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich das polar ausgerichtete Perforin als

Marker für den Aktivierungszustand der Zelle untersucht. Dabei zeigte sich in den CpG-behandelten Tumoren eine signifikante Zunahme intratumoraler aktivierter Perforin-positiver Zellen. Das Ergebnis bezog sich auf CD3-positive Zellen und berücksichtigt man dabei, dass in CpG-behandelten Tumoren auch tendenziell vermehrt CD3-positive Zellen vorhanden waren, so erscheint in den CpG-therapierten Tumoren die absolute Anzahl polar ausgerichteter Perforin-positiver Zellen nochmals höher. Zudem weisen Untersuchungen von humanen Kolonkarzinomen auf einen wichtigen Stellenwert des Perforins hin: Bei Patienten mit einer guten Prognose konnte vermehrt intratumorales Perforin nachgewiesen werden im Vergleich zu Patienten mit einer schlechteren Prognose (Le Gouvello et al., 2008).

Da neben zytotoxischen T-Zellen hauptsächlich noch aktivierte NK-Zellen für eine Tumorantwort verantwortlich gemacht werden (Kawarada et al., 2001), wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch die Präsenz intratumoraler NK-Zellen mittels durchflusszytometrischer Untersuchung analysiert. Dabei konnte kein Unterschied in der intratumoralen Anzahl dieser Zellen zwischen der CpG- und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Einerseits war dieses Ergebnis so nicht zu erwarten, denn es ist bereits bekannt, dass CpG NK-Zellen induziert und ihre Aktivität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* verstärkt (Ballas et al., 1996; Boggs et al., 1997). Andererseits werden NK-Zellen, vor allem in ihrem Zusammenspiel mit dendritischen Zellen in der frühen Entwicklung einer adaptiven Immunantwort, auch immunregulatorische Funktionen zugeschrieben (Kalinski et al., 2005; Piccioli et al., 2002; Zitvogel, 2002). Dies könnte erklären, warum NK-Zellen in den mit CpG-behandelten Tumoren nicht vermehrt vorhanden sind. Außerdem muss den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten die Einschränkung hinzugefügt werden, dass die Gruppengrößen relativ klein waren und der Versuch kein zweites Mal durchgeführt wurde, weshalb keine endgültigen Aussagen über die Präsenz intratumoraler NK-Zellen nach CpG-Gabe möglich sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine vermehrte Vaskularisation von Tumoren nach Applikation von CpG festgestellt werden. Diese verstärkte Vaskularisation kann Voraussetzung für die Tumordinfiltration durch Immunzellen im Rahmen einer Tumorummuntherapie sein. Das passt zu den Erkenntnissen, dass es durch die Gabe von CpG zu einer vermehrten Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM und VCAM am venösen Endothel im Tumorgewebe kommt (Garbi et al., 2004). In Zusammenschau

mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit könnte dies für eine Erleichterung der Extravasation von im Blut befindlichen Zellen nach CpG-Gabe sprechen, was zum Einen das histologische Bild der vermehrten intratumoralen Immunzellinfiltration und zum Anderen das klinische Bild der Tumorkontrolle erklären könnte.

4.4 Peritumorale Applikation von CpG-Oligonukleotiden reduziert die Anzahl intratumoraler regulatorischer T-Zellen

Die durch Treg vermittelte Immunsuppression ist ein wichtiger Mechanismus des Tumors dem Immunsystem zu entkommen und kann für ein Versagen der Immuntherapie verantwortlich gemacht werden (Piccirillo and Shevach, 2001; Shevach et al., 2001; Suri-Payer et al., 1998). Es ist bereits aus der Literatur bekannt, dass die TLR-Aktivierung zu einer Blockade suppressiver Effekte von Tregs führt (Pasare and Medzhitov, 2003), wobei direkte inhibitorische Effekte auf Tregs (Caramalho et al., 2003) von einer indirekten Wirkung über primäre Beeinflussung dendritischer Zellen (Kubo et al., 2004) unterschieden werden. In der vorliegenden Arbeit wurden intratumorale Foxp3-positive Zellen nach CpG-Gabe untersucht. Dabei zeigte sich in einem Tierexperiment eine tendenzielle, in einem anderen Versuch eine signifikante Abnahme intratumoraler Foxp3-positiver Zellen nach CpG-Applikation. In beiden Fällen war dies mit einem verminderten Tumorwachstum bzw. Tumorrückgang assoziiert. Nach Berechnung des Anteils Foxp3-positiver Zellen an den CD3-positiven Zellen konnte in einer CpG-Gruppe eine hochsignifikante Verkleinerung dieser Ratio im Vergleich zur Kontrollgruppe dargestellt werden. In einer anderen CpG-Gruppe konnte ein tendenziell verminderter Anteil von Tregs an den gesamten CD4-positiven Zellen festgehalten werden. Dieses Ergebnis war nicht signifikant, doch berücksichtigt man die Tendenz, dass in den CpG-therapierten Tumoren weniger CD4-positive Zellen vorhanden sind als in unbehandelten Tumoren, kann man von einer Verminderung der absoluten Anzahl intratumoraler Tregs in der CpG-Gruppe ausgehen. Bereits im Jahr 2004 konnten in unbehandelten, humanen Ovarialkarzinomen funktionelle intratumorale Tregs festgestellt werden, deren Anzahl negativ mit Tumorprogression und Patientenüberleben korrelierte. In gesundem Ovarialgewebe hingegen konnten keine Tregs festgestellt werden (Curiel et al., 2004). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit passen in dieses Bild, da die unbehandelten Tumoren schneller wuchsen als die der CpG-Gruppe. Zudem erscheint die Abnahme intratumoraler Tregs nach CpG-Gabe

auf Grund der immunsuppressiven Wirkung von Tregs plausibel obwohl es auch Hinweise gibt, dass TLR9-Liganden die Generierung von Tregs verstärken (Moseman et al., 2004) und deren Proliferation stimulieren (Sutmuller et al., 2006).

Interessanterweise korrelierte in der vorliegenden Arbeit die intratumorale Verminderung von Tregs nicht immer mit einem Therapieerfolg. So kam es auch zu einer intratumoralen Minderung der Anzahl an Tregs bei den Mäusen, die mit den anderen TLR-Liganden LPS, Poly(I:C) and R848 behandelt worden waren und deren Tumoren genauso schnell wuchsen wie die unbehandelten Mäuse. Bei den Mäusen, die mit CpG+DOTAP behandelt worden waren und deren Tumoren sogar noch schneller als die der Kontrollgruppe wuchsen, zeigte sich eine tendenzielle intratumorale Verminderung CD4-positiver Zellen im Vergleich zur unbehandelten Gruppe. Da keine weiteren Doppelfärbungen getätigt wurden, kann man keine definitiven Aussagen über diesen Zelltypus machen, allerdings ist es durchaus möglich, dass auch in diesen Tumoren eine im Vergleich zur Kontrollgruppe verringerte Anzahl intratumoraler Tregs vorzufinden wäre, vor allem wenn man berücksichtigt, dass in den meisten CpG-behandelten Tumoren, in denen eine verminderte Anzahl an Tregs gefunden wurde, auch tendenziell weniger CD4-positiver Zellen vorhanden waren als in der Kontrollgruppe.

Dies wirft Spekulationen darüber auf, in wie weit eine Abnahme intratumoraler Tregs für einen klinischen Therapieeffekt auf das Tumorwachstum relevant ist. Vielleicht muss erst eine bestimmte kritische Masse intratumoraler Tregs erreicht werden, ehe diese Zellen ihre immunsuppressive Wirkung entfalten können. Vorher würde auch eine Abnahme dieser Zellen keinen zusätzlichen Vorteil bringen, wie das in dem Experiment mit den verschiedenen TLR-Liganden der Fall sein könnte. In diesen Tumoren war auch eine intratumorale Abnahme von Effektorzellen (CD3-positiven Zellen) festgestellt worden. Diese Ergebniskonstellation verdeutlicht, dass die Abnahme intratumoraler Tregs nur effizient ist, wenn genügend Effektorzellen vorhanden sind, weshalb zur Evaluation intratumoraler Tregs Ratio-Werte wie der Anteil Foxp3-positiver Zellen an den CD3-positiven Zellen vorgeschlagen werden. Eine niedrige Ratio kann für verhältnismäßig viele intratumorale Effektorzellen bei wenigen intratumoralen Tregs sprechen und so eine gute Voraussetzung für eine Bekämpfung des Tumors darstellen. Auf jeden Fall unterstreichen diese Daten, dass neben Tregs auch andere Faktoren für das Tumorwachstum und die Tumorbekämpfung wichtig sind.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde auch die Expression des Integrins CD103 auf tumorinfiltrierenden T-Zellen und Tregs untersucht. CD103 kann auf Subpopulationen von CD4- und CD8-positiven T-Zellen und manchen dendritischen Zellen exprimiert werden (Andrew et al., 1996; Kilshaw, 1993). Es bindet an E-Cadherin, das von vielen Zelltypen exprimiert wird (Cepek et al., 1993; Geiger and Ayalon, 1992). In der Vergangenheit sind CD103-positive Tregs mit organspezifischer Toleranz und CD103-negative Tregs mit systemischer Toleranz in Verbindung gebracht worden (Huehn et al., 2004; Siegmund et al., 2005). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass intratumorale Tregs mehr als andere intratumorale T-Zellen CD103 exprimieren und dass die Applikation von CpG die Expression von CD103 tendenziell herabsetzt. Die CpG-therapierten Tumoren zeichneten sich klinisch durch ein verlangsamtes oder sogar rückläufiges Tumorwachstum und histologisch durch eine verringerte Anzahl an Tregs im Vergleich zur Kontrollgruppe aus. Auf Grund der Daten lässt sich darüber spekulieren, ob CD103 ein relativ spezifisches und wichtiges Protein für die Extravasation von Tregs aus der Blutbahn in das Tumorgewebe ist und es somit als ein neues molekulares Therapieziel in der Tumormimmuntherapie adressiert werden sollte.

4.5 Peritumorale Applikation von CpG-Oligonukleotiden und ihr Einfluss auf myeloide Zellen

Dendritische Zellen besitzen die besondere Fähigkeit CD8-positiven T-Zellen Antigene kreuzpräsentieren zu können (den Haan and Bevan, 2002; Pooley et al., 2001), was für die Initiierung einer zytotoxischen T-Zell-Antwort gegen Tumoren essenziell ist (Huang et al., 1994; Sigal and Rock, 2000). CpG induziert bekannterweise die Kreuzpräsentation dendritischer Zellen (Datta et al., 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine systematische Analyse intratumoraler CD11c-positiver Zellen nach CpG-Gabe durchgeführt, die keine einheitlichen Ergebnisse erbrachte. In einem Tierexperiment konnte in den CpG-therapierten Tumoren eine signifikant vermehrte Anzahl, in einem anderen Versuch eine tendenziell verminderte Anzahl dendritischer Zellen nachgewiesen werden. In einem dritten Experiment waren keine Unterschiede zwischen der CpG-therapierten und der unbehandelten Gruppe zu vermerken. Diese Ambivalenz der Ergebnisse spiegelt die kontroverse Stellung dendritischer Zellen in der Literatur wieder.

Einerseits wird dendritischen Zellen als antigenpräsentierenden Zellen mit der besonderen Fähigkeit der Kreuzpräsentation eine essenzielle Rolle in der antitumoralen Immunantwort zugesprochen. So führt die Aktivierung des TLR9 auf pDCs zur Produktion von IFN- α und IFN- β , was für die Generierung antigenspezifischer zytotoxischer T-Zellen und Aktivierung von NK-Zellen wichtig ist (Ahonen et al., 2004; Curtsinger et al., 2005; Honda et al., 2005b). Bei Krebspatienten und tumortragenden Mäusen konnte man eine Inaktivierung dendritischer Zellen feststellen (Vicari et al., 2002a), die durch wiederholte Behandlung mit CpG und Anti-Interleukin-10-Antikörpern (Anti-IL-10-AK) reversibel war (Vicari et al., 2002b). Die antitumorale Therapie mit Chemokinen basiert auf der verstärkten Rekrutierung dendritischer Zellen zum Tumor (Guiducci et al., 2004), die dann alleine oder in Kombination mit Injektionen von CpG zu einem Tumorrückgang führt (Furumoto et al., 2004). Dies untermauert die essenzielle Funktion intratumoraler dendritischer Zellen und zeigt, dass CpG die tumorvermittelte Inhibition der Aktivierung dendritischer Zellen durchbrechen kann. Aufgrund dessen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine vermehrte intratumorale Präsenz CD11c-positiver Zellen nach CpG-Gabe erwartet, was auch in einem Tierexperiment mit einem signifikanten Ergebnis gezeigt werden konnte. Dazu passt, dass Heckelsmiller et al. 2002 histologisch eine vermehrte Präsenz dendritischer Zellen in Tumoren nachweisen konnten, die zuvor mit CpG und antigenbeladenen dendritischen Zellen behandelt worden waren (Heckelsmiller et al., 2002a). Der Unterschied zur vorliegenden Arbeit ist, dass hierbei die Mäuse nur mit CpG ohne zusätzlich Applikation von dendritischen Zellen behandelt worden waren. Die Tatsache, dass in den CpG+DOTAP-behandelten Tumoren, welche noch schneller wuchsen als die Kontrollgruppe, kein Unterschied in der Anzahl intratumoraler CD11c-positiver Zellen im Vergleich zur untherapierten Gruppe gezeigt werden konnte, unterstreicht die wichtige Bedeutung dendritischer Zellen für eine klinische Tumorkontrolle.

Andererseits werden dendritischen Zellen selbst aber auch immunsuppressive Eigenschaften zugeschrieben. So ist bereits bekannt, dass unreife dendritische Zellen Toleranz induzieren (Bonifaz et al., 2002; Hawiger et al., 2001; Steinman and Nussenzweig, 2002), beispielsweise über die Produktion von IL-10 und die Induktion von Tregs sowohl bei Mäusen als auch beim Menschen (Jonuleit et al., 2000; Menges et al., 2002). Auch im aktivierten Zustand können dendritische Zellen suppressiv auf das Immunsystem wirken. In diesem Sinne induziert die Injektion von CpG die

Expression des immunregulatorischen Enzymes IDO bei dendritischen Zellen der Milz, was zum Erwerb IDO-abhängiger Treg-Funktionen führt (Mellor et al., 2005). Zudem ist bekannt, dass pDCs nach Stimulation mit CpG bei der Induktion von Tregs beteiligt sind (Bilsborough et al., 2003; Kuwana, 2002; Moseman et al., 2004; Wakkach et al., 2003). Aus diesem Blickwinkel betrachtet könnte man auch eine intratumorale Abnahme dendritischer Zellen nach CpG-Applikation nachvollziehen, was im Rahmen der vorliegenden Arbeit in einem Versuch auch tendenziell gezeigt werden konnte.

So kann man zusammenfassen, dass weitere Charakterisierungen intratumoraler dendritischer Zellen nötig sind um genauere Hinweise über die CpG-Wirkung auf intratumorale dendritische Zellen zu erhalten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte in diesem Zusammenhang in den CpG-behandelten Tumoren eine signifikante Abnahme des Anteils CD4- und CD11c-doppeltpositiver dendritischer Zellen an den gesamten CD4-positiven Zellen festgestellt werden. Berücksichtigt man dabei, dass in den CpG-therapierten Tumoren tendenziell vermindert CD4-positiv Zellen vorzufinden waren, kann die absolute Anzahl intratumoraler CD4- und CD11c-doppeltpositiver Zellen als herabgesetzt betrachtet werden. Somit kann diese Subpopulation dendritischer Zellen möglicherweise auch mit einer gewissen immunsuppressiven Wirkung in Verbindung gebracht werden. Bei einer weiteren Differenzierung intratumoraler dendritischer Zellen müssten auch die pDCs berücksichtigt werden. pDCs sind wichtige Zellen des Abwehrsystems, da sie das meiste Typ-I-Interferon bilden, das essenziell für die Entwicklung einer antiviralen Immunantwort ist (Liu, 2005). Allerdings vermittelt die TLR9-Aktivierung in pDCs nicht nur immunverstärkende, sondern auch immunsuppressive Effekte durch Faktoren wie IDO (Mellor et al., 2005; Wingender et al., 2006) und die Generierung von Tregs (Moseman et al., 2004). So könnte man nachvollziehen, warum pDCs in CpG-therapierten Tumoren möglicherweise vermindert vorhanden sind. Dazu passt auch die in der vorliegenden Arbeit mittels FACS dargestellte Tendenz, dass in den CpG-therapierten Tumoren eine verringerte Anzahl intratumoraler pDCs zu beobachten war. Zusätzlich konnte immunhistochemisch eine tendenzielle Abnahme intratumoraler B220-positiver Zellen nach CpG-Gabe gezeigt werden. Allerdings ist der Marker B220 nicht spezifisch für pDCs, denn auch B-Zellen exprimieren ihn und stellen zugleich die größte Population B220-positiver Zellen. Doch selbst wenn in der vorliegenden Arbeit die intratumoralen B220-positiven Zellen hauptsächlich B-Zellen wären würde auch das Daten in der Literatur entsprechen, die ein verlängertes Überleben von Tumorpatienten

nach Depletion von B-Zellen zeigen (Perricone et al., 2004; Shah et al., 2005; Tan and Coussens, 2007). In der vorliegenden Arbeit fand sich in den CpG-therapierten Tumoren eine tendenziell verminderte Anzahl intratumoraler B220-positiver Zellen und dies war mit einem verlangsamten Tumorwachstum assoziiert.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen ambivalenten Daten über intratumorale dendritische Zellen nach CpG-Applikation können vielleicht auch teilweise mit der dynamischen Funktion dendritischer Zellen erklärt werden. Nach ihrer Entwicklung im Knochenmark sind dendritische Zellen ubiquitär im nichtlymphatischen Gewebe verteilt, wo sie Antigene aufnehmen und prozessieren (Cella et al., 1997; Schuler et al., 1997). So könnte man beispielsweise auf Grund der Physiologie dendritischer Zellen erwarten, dass sie vor allem kurz nach Tumorinduktion zur Antigenaufnahme und –prozessierung massiv im Tumorgewebe vorhanden sind und danach in den Tumor drainierenden Lymphknoten auswandern und T-Zellen aktivieren. In diesem Sinne wären zu einem früheren Zeitpunkt die dendritischen Zellen allgemein in einer höheren Anzahl im Tumor vorhanden als zu einem späteren Zeitpunkt. Da die für diese Arbeit verwendeten Tumoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Tumorinduktion gewonnen worden sind, wäre dies auch eine mögliche Erklärung für die sich zum Teil widersprechenden Ergebnisse. Für eine solche grundlegende Beeinflussung intratumoraler dendritischer Zellen spricht, dass in den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Versuchen die Anzahl intratumoraler CD11c-positiver Zellen auch in den unbehandelten Tumoren zwischen den einzelnen Versuch stark variierte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich die intratumoralen Makrophagen (F4/80-positive Zellen) nach CpG-Gabe untersucht. Es ist bekannt, dass Makrophagen wichtige antitumorale Effektorzellen sind (Klein and Mantovani, 1993) und CpG Makrophagen aktiviert (Chace et al., 1997; Krieg et al., 1995). Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigten keinen Unterschied in der Anzahl F4/80-positiver Zellen zwischen der CpG- und der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis erscheint plausibel, wenn man berücksichtigt, dass tumorassoziierte Makrophagen die Hauptproduzenten von intratumoralem IL-10 sind (Moore et al., 2001), einem immunmodulierenden Molekül, das über die Beeinflussung dendritischer Zellen sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunantwort supprimieren kann. So würde man in den erfolgreich mit CpG therapierten Tumoren auch eine intratumorale Verminderung F4/80-positiver Zellen

nachvollziehen können. Doch Krepler et al. konnten 2004 histologisch zeigen, dass die peritumorale Gabe von CpG zu einem Anstieg intratumoraler Makrophagen führt (Krepler et al., 2004), was den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten im gewissen Sinne widerspricht. Allerdings arbeitete die Arbeitsgruppe um Krepler mit *severe combined immunodeficiency*-Mäusen (SCID-Mäusen), die keine B- und T-Zellen hatten und nur eine verminderte NK-Zell-Aktivität aufwiesen, weshalb es gut möglich ist, dass in diesem Modell die Makrophagen eine andere, kompensatorische Rolle erfüllen und somit auch ihre intratumorale Präsenz verändert ist. Doch es gibt auch andere histologische Daten, die zeigen, dass Makrophagen mit den immunstimulatorischen Molekülen TNF und IL-12 kolokalisieren (Guiducci et al., 2005), was dann wiederum eine erhöhte intratumorale Infiltration dieser Zellen rechtfertigen würde und in einem Widerspruch zu dem in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnis steht. Möglicherweise unterliegen Makrophagen ähnlich wie dendritische Zellen ebenfalls einer funktionellen Dynamik, die von Faktoren wie beispielsweise Tumorgröße und Tumoralter abhängt, was eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse sein könnte. In Zukunft werden weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet nötig sein um Aspekte wie diesen eingehend erörtern zu können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass es kaum Unterschiede in der intratumoralen Präsenz neutrophiler Granulozyten (Ly-6G-positiver Zellen) zwischen den CpG-therapierten und den unbehandelten Tumoren gibt. Neutrophile Granulozyten sind typischerweise verstärkt in nekrotischen Arealen anwesend und da aus der Literatur bereits bekannt ist, dass die erfolgreiche Kombinationstherapie von CpG mit anderen Reagenzien zur Nekrose des Tumors führt (Guiducci et al., 2005), hätte man eine vermehrte Infiltration dieser Zellen in den CpG-behandelten Tumoren erwartet. Allerdings wurden für die Auszählung der intratumoralen Zellen in der vorliegenden Arbeit die histologischen Gesichtsfelder als reines Tumorgewebe definiert, in dem keine Nekrose- und Bindegewebeareale sichtbar sein durften. Dies ist wahrscheinlich die Erklärung dafür, warum in dieser Arbeit nicht vermehrt neutrophile Granulozyten in den CpG-therapierten Tumoren nachzuweisen waren.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Für die Weiterentwicklung des therapeutischen Einsatzes von immunstimulierenden CpG-Oligonukleotiden als *Toll-like*-Rezeptor-9-Liganden in der Tumorthherapie sind genaue Kenntnisse über den Wirkmechanismus notwendig. In der vorliegenden Arbeit wurde auf die Charakterisierung der für den Therapieerfolg verantwortlichen intratumoralen Immunzellen Wert gelegt und erstmals eine systematische Analyse intratumoraler Immunzellen nach peritumorale CpG-Gabe durchgeführt. Die Immuntherapie mit CpG wurde in zwei verschiedenen Tumormausmodellen angewandt und führte in der Mehrzahl der Fälle zu einem Therapieerfolg. Anschließend wurde das intratumorale Immunzellinfiltrat histologisch oder durchflusszytometrisch untersucht und mit dem unbehandelten Tumoren verglichen. Dabei konnten folgende Hauptbefunde erhoben werden: Die Therapie mit CpG induziert eine vermehrte Tumordinfiltration mit T-Zellen. Zudem aktiviert die CpG-Behandlung intratumorale Perforin-positive T-Zellen. Gleichzeitig vermindert die Therapie mit CpG die Einwanderung regulatorischer T-Zellen in den Tumor. Auch der Anteil CD4- und CD11c-doppeltpositiver dendritischer Zellen an der Gesamtpopulation intratumoraler CD4-positiver Zellen ist in den mit CpG behandelten Tumoren verringert.

Die vermehrte Präsenz intratumoraler T-Zellen nach CpG-Applikation unterstreicht die Relevanz dieser Zellen für einen antitumoralen Effekt. Dieser Aspekt konnte in der vorliegenden Arbeit auch in anderer Weise bekräftigt werden, da sich in Tumoren, welche klinisch erfolglos mit anderen *Toll-like*-Rezeptor-Liganden behandelt worden waren, ein vermindertes intratumorales T-Zellinfiltrat zeigte. Der vermehrte Anteil aktivierter Perforin-positiver T-Zellen in CpG-therapierten Tumoren weist auf eine antitumorale Beteiligung dieses Effektormoleküls nach CpG-Gabe hin. In zukünftigen Untersuchungen könnte die Relevanz von Perforin für eine Tumorthherapie mit CpG beispielsweise durch Einsatz von Perforin-Knock-out-Mäusen weiter evaluiert werden. Zusätzlich konnte in CpG-behandelten Tumoren eine Verminderung der Anzahl intratumoraler regulatorischer T-Zellen gezeigt werden. Das entsprach den Erwartungen, da regulatorische T-Zellen eine immunsuppressive Funktion ausüben und sie für eine Tumorprogression mitverantwortlich gemacht werden. Interessanterweise korrelierte die intratumorale Abnahme regulatorischer T-Zellen nicht immer mit einem Therapieerfolg; so verringerte sich die Anzahl intratumoraler regulatorischer T-Zellen auch in den Tumoren, die klinisch erfolglos mit anderen *Toll-like*-Rezeptor-Liganden behandelt worden waren. Da in diesen Tumoren auch die für einen Effekt auf das Tumorwachstum verantwortlichen intratumoralen T-Zellen vermindert waren,

verdeutlichen diese Ergebnisse, dass die Abnahme intratumoraler regulatorischer T-Zellen nur effizient ist, wenn genügend Effektorzellen vorhanden sind. Des Weiteren wurde beobachtet, dass das Integrin CD103 vermehrt von regulatorischen T-Zellen im Vergleich zu anderen T-Zellen exprimiert wird und CpG tendenziell zu einer Herabregulation von CD103 führt. Somit kann CD103 als ein potenzielles molekulares Therapieziel in der Tumorthherapie adressiert werden, bei dessen Blockade möglicherweise eine Migration regulatorischer T-Zellen in den Tumor inhibiert wird. Auch hier sind in Zukunft funktionelle Untersuchungen notwendig, um die Relevanz von CD103 in der Tumorthherapie weiter beurteilen zu können. Bei der immunhistochemischen Analyse intratumoraler dendritischer Zellen nach CpG-Applikation konnten keine einheitlichen Ergebnisse gewonnen werden. Ursprünglich wurden in CpG-therapierten Tumoren vermehrt dendritische Zellen erwartet, doch neue Publikationen beschreiben auch immunsuppressive Funktionen dendritischer Zellen, so dass das konventionelle Bild der dendritischen Zelle als eine für die Immuntherapie nur förderliche Zelle neu überdacht werden sollte. Die in der vorliegenden Arbeit identifizierte Subpopulation dendritischer Zellen (CD4- und CD11c-doppeltpositiv) beispielsweise könnte mit einer gewissen immunsuppressiven Wirkung in Verbindung gebracht werden, da ihr intratumoraler Anteil an den CD4-positiven Zellen nach CpG-Gabe verringert war.

Zusammenfassend unterstreichen die Daten der vorliegenden Arbeit die Wirksamkeit einer peritumoralen CpG-Therapie und unterstützen einen Einsatz dieser Applikationsform auch beim Menschen. Bisher verhinderte beim Menschen der schlechte Zugang zum Tumor eine peritumorale CpG-Gabe und erforderte eine systemische Applikation, die weniger effektiv war. Jedoch können beispielsweise systemisch applizierte CpG-Liposomen mit einem Peptid verbunden werden, welches zu einer spezifischen CpG-Anreicherung im Tumorgewebe führt und somit den Effekt einer peritumoralen CpG-Gabe imitiert. Solche neuen Applikationsmethoden ermöglichen eine lokale CpG-Wirkung im Tumorgewebe und lohnen den Versuchseinsatz beim Menschen.

6. Literaturverzeichnis

- Adams, M., H. Navabi, D. Croston, S. Coleman, Z. Tabi, A. Clayton, B. Jasani, and M.D. Mason. 2005. The rationale for combined chemo/immunotherapy using a Toll-like receptor 3 (TLR3) agonist and tumour-derived exosomes in advanced ovarian cancer. *Vaccine*. 23:2374-8.
- Ahonen, C.L., C.L. Doxsee, S.M. McGurran, T.R. Riter, W.F. Wade, R.J. Barth, J.P. Vasilakos, R.J. Noelle, and R.M. Kedl. 2004. Combined TLR and CD40 triggering induces potent CD8+ T cell expansion with variable dependence on type I IFN. *J Exp Med*. 199:775-84.
- Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2:675-80.
- Alexopoulou, L., A.C. Holt, R. Medzhitov, and R.A. Flavell. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 413:732-8.
- Andrew, D.P., L.S. Rott, P.J. Kilshaw, and E.C. Butcher. 1996. Distribution of alpha 4 beta 7 and alpha E beta 7 integrins on thymocytes, intestinal epithelial lymphocytes and peripheral lymphocytes. *Eur J Immunol*. 26:897-905.
- Apetoh, L., F. Ghiringhelli, A. Tesniere, M. Obeid, C. Ortiz, A. Criollo, G. Mignot, M.C. Maiuri, E. Ullrich, P. Saulnier, H. Yang, S. Amigorena, B. Ryffel, F.J. Barrat, P. Saftig, F. Levi, R. Lidereau, C. Nogues, J.P. Mira, A. Chompret, V. Joulin, F. Clavel-Chapelon, J. Bourhis, F. Andre, S. Delaloge, T. Tursz, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2007. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med*. 13:1050-9.
- Appay, V., C. Jandus, V. Voelter, S. Reynard, S.E. Coupland, D. Rimoldi, D. Lienard, P. Guillaume, A.M. Krieg, J.C. Cerottini, P. Romero, S. Leyvraz, N. Rufer, and D.E. Speiser. 2006. New generation vaccine induces effective melanoma-specific CD8+ T cells in the circulation but not in the tumor site. *J Immunol*. 177:1670-8.
- Asano, M., M. Toda, N. Sakaguchi, and S. Sakaguchi. 1996. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med*. 184:387-96.
- Asselin-Paturel, C., G. Brizard, K. Chemin, A. Boonstra, A. O'Garra, A. Vicari, and G. Trinchieri. 2005. Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *J Exp Med*. 201:1157-67.
- Baines, J., and E. Celis. 2003. Immune-mediated tumor regression induced by CpG-containing oligodeoxynucleotides. *Clin Cancer Res*. 9:2693-700.
- Baldridge, J.R., P. McGowan, J.T. Evans, C. Cluff, S. Mossman, D. Johnson, and D. Persing. 2004. Taking a Toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. *Expert Opin Biol Ther*. 4:1129-38.
- Ballas, Z.K., A.M. Krieg, T. Warren, W. Rasmussen, H.L. Davis, M. Waldschmidt, and G.J. Weiner. 2001. Divergent therapeutic and immunologic effects of oligodeoxynucleotides with distinct CpG motifs. *J Immunol*. 167:4878-86.
- Ballas, Z.K., W.L. Rasmussen, and A.M. Krieg. 1996. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol*. 157:1840-5.
- Balsari, A., M. Tortoreto, D. Besusso, G. Petrangolini, L. Sfondrini, R. Maggi, S. Menard, and G. Pratesi. 2004. Combination of a CpG-oligodeoxynucleotide and a topoisomerase I inhibitor in the therapy of human tumour xenografts. *Eur J Cancer*. 40:1275-81.

- Banchereau, J., and R.M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 392:245-52.
- Bevan, M.J. 1976. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med*. 143:1283-8.
- Bilsborough, J., T.C. George, A. Norment, and J.L. Viney. 2003. Mucosal CD8alpha+ DC, with a plasmacytoid phenotype, induce differentiation and support function of T cells with regulatory properties. *Immunology*. 108:481-92.
- Biron, C.A., H.C. Su, and J.S. Orange. 1996. Function and Regulation of Natural Killer (NK) Cells during Viral Infections: Characterization of Responses in Vivo. *Methods*. 9:379-93.
- Boggs, R.T., K. McGraw, T. Condon, S. Flournoy, P. Villiet, C.F. Bennett, and B.P. Monia. 1997. Characterization and modulation of immune stimulation by modified oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. 7:461-71.
- Bonifaz, L., D. Bonnyay, K. Mahnke, M. Rivera, M.C. Nussenzweig, and R.M. Steinman. 2002. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med*. 196:1627-38.
- Bouma-ter Steege, J.C., C.I. Baeten, V.L. Thijssen, S.A. Satijn, I.C. Verhoeven, H.F. Hillen, J. Wagstaff, and A.W. Griffioen. 2004. Angiogenic profile of breast carcinoma determines leukocyte infiltration. *Clin Cancer Res*. 10:7171-8.
- Bourquin, C., L. Schmidt, V. Hornung, C. Wurzenberger, D. Anz, N. Sandholzer, S. Schreiber, A. Voelkl, G. Hartmann, and S. Endres. 2007. Immunostimulatory RNA oligonucleotides trigger an antigen-specific cytotoxic T-cell and IgG2a response. *Blood*. 109:2953-60.
- Bousso, P., and E. Robey. 2003. Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nat Immunol*. 4:579-85.
- Burns, C.A., and M.D. Brown. 2005. Imiquimod for the treatment of skin cancer. *Dermatol Clin*. 23:151-64, vii.
- Caramalho, I., T. Lopes-Carvalho, D. Ostler, S. Zelenay, M. Haury, and J. Demengeot. 2003. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 197:403-11.
- Carpentier, A.F., L. Chen, F. Maltonti, and J.Y. Delattre. 1999. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice. *Cancer Res*. 59:5429-32.
- Carpentier, A.F., J. Xie, K. Mokhtari, and J.Y. Delattre. 2000. Successful treatment of intracranial gliomas in rat by oligodeoxynucleotides containing CpG motifs. *Clin Cancer Res*. 6:2469-73.
- Cella, M., A. Engering, V. Pinet, J. Pieters, and A. Lanzavecchia. 1997. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature*. 388:782-7.
- Cepek, K.L., C.M. Parker, J.L. Madara, and M.B. Brenner. 1993. Integrin alpha E beta 7 mediates adhesion of T lymphocytes to epithelial cells. *J Immunol*. 150:3459-70.
- Chace, J.H., N.A. Hooker, K.L. Mildenstein, A.M. Krieg, and J.S. Cowdery. 1997. Bacterial DNA-induced NK cell IFN-gamma production is dependent on macrophage secretion of IL-12. *Clin Immunol Immunopathol*. 84:185-93.

- Chu, R.S., O.S. Targoni, A.M. Krieg, P.V. Lehmann, and C.V. Harding. 1997. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med.* 186:1623-31.
- Cooper, C.L., H.L. Davis, M.L. Morris, S.M. Efler, M.A. Adhami, A.M. Krieg, D.W. Cameron, and J. Heathcote. 2004. CPG 7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Engerix-B HBV vaccine in healthy adults: a double-blind phase I/II study. *J Clin Immunol.* 24:693-701.
- Coussens, L.M., and Z. Werb. 2002. Inflammation and cancer. *Nature.* 420:860-7.
- Creagh, E.M., and L.A. O'Neill. 2006. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol.* 27:352-7.
- Curiel, T.J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J.R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M.L. Disis, K.L. Knutson, L. Chen, and W. Zou. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 10:942-9.
- Curtsinger, J.M., J.O. Valenzuela, P. Agarwal, D. Lins, and M.F. Mescher. 2005. Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J Immunol.* 174:4465-9.
- Damiano, V., R. Caputo, R. Bianco, F.P. D'Armiento, A. Leonardi, S. De Placido, A.R. Bianco, S. Agrawal, F. Ciardiello, and G. Tortora. 2006. Novel toll-like receptor 9 agonist induces epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibition and synergistic antitumor activity with EGFR inhibitors. *Clin Cancer Res.* 12:577-83.
- Datta, S.K., V. Redecke, K.R. Prilliman, K. Takabayashi, M. Corr, T. Tallant, J. DiDonato, R. Dziarski, S. Akira, S.P. Schoenberger, and E. Raz. 2003. A subset of Toll-like receptor ligands induces cross-presentation by bone marrow-derived dendritic cells. *J Immunol.* 170:4102-10.
- Davila, E., R. Kennedy, and E. Celis. 2003. Generation of antitumor immunity by cytotoxic T lymphocyte epitope peptide vaccination, CpG-oligodeoxynucleotide adjuvant, and CTLA-4 blockade. *Cancer Res.* 63:3281-8.
- Davis, H.L., R. Weeratna, T.J. Waldschmidt, L. Tygrett, J. Schorr, and A.M. Krieg. 1998. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol.* 160:870-6.
- den Haan, J.M., and M.J. Bevan. 2002. Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo. *J Exp Med.* 196:817-27.
- Enarsson, K., E. Johnsson, C. Lindholm, A. Lundgren, Q. Pan-Hammarstrom, E. Stromberg, P. Bergin, E.L. Bauge, A.M. Svennerholm, and M. Quiding-Jarbrink. 2006. Differential mechanisms for T lymphocyte recruitment in normal and neoplastic human gastric mucosa. *Clin Immunol.* 118:24-34.
- Eralp, Y., X. Wang, J.P. Wang, M.F. Maughan, J.M. Polo, and L.B. Lachman. 2004. Doxorubicin and paclitaxel enhance the antitumor efficacy of vaccines directed against HER 2/neu in a murine mammary carcinoma model. *Breast Cancer Res.* 6:R275-83.
- Frey, A.B. 1996. Role of host antigen receptor-bearing and antigen receptor-negative cells in immune response to rat adenocarcinoma 13762. *J Immunol.* 156:3841-9.
- Friedberg, J.W., H. Kim, M. McCauley, E.M. Hessel, P. Sims, D.C. Fisher, L.M. Nadler, R.L. Coffman, and A.S. Freedman. 2005. Combination immunotherapy with a CpG oligonucleotide (1018 ISS) and rituximab in patients with non-Hodgkin

- lymphoma: increased interferon-alpha/beta-inducible gene expression, without significant toxicity. *Blood*. 105:489-95.
- Fujii, S., K. Shimizu, H. Hemmi, and R.M. Steinman. 2007. Innate Valpha14(+) natural killer T cells mature dendritic cells, leading to strong adaptive immunity. *Immunol Rev*. 220:183-98.
- Furumoto, K., L. Soares, E.G. Engleman, and M. Merad. 2004. Induction of potent antitumor immunity by in situ targeting of intratumoral DCs. *J Clin Invest*. 113:774-83.
- Gabrilovich, D. 2004. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol*. 4:941-52.
- Gabrilovich, D.I., H.L. Chen, K.R. Girgis, H.T. Cunningham, G.M. Meny, S. Nadaf, D. Kavanaugh, and D.P. Carbone. 1996. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med*. 2:1096-103.
- Ganss, R., and D. Hanahan. 1998. Tumor microenvironment can restrict the effectiveness of activated antitumor lymphocytes. *Cancer Res*. 58:4673-81.
- Ganss, R., E. Ryschich, E. Klar, B. Arnold, and G.J. Hammerling. 2002. Combination of T-cell therapy and trigger of inflammation induces remodeling of the vasculature and tumor eradication. *Cancer Res*. 62:1462-70.
- Garbi, N., B. Arnold, S. Gordon, G.J. Hammerling, and R. Ganss. 2004. CpG motifs as proinflammatory factors render autochthonous tumors permissive for infiltration and destruction. *J Immunol*. 172:5861-9.
- Geiger, B., and O. Ayalon. 1992. Cadherins. *Annu Rev Cell Biol*. 8:307-32.
- Golgher, D., E. Jones, F. Powrie, T. Elliott, and A. Gallimore. 2002. Depletion of CD25+ regulatory cells uncovers immune responses to shared murine tumor rejection antigens. *Eur J Immunol*. 32:3267-75.
- Griswold, D.P., and T.H. Corbett. 1975. A colon tumor model for anticancer agent evaluation. *Cancer*. 36:2441-4.
- Guiducci, C., E. Di Carlo, M. Parenza, M. Hitt, M. Giovarelli, P. Musiani, and M.P. Colombo. 2004. Intralesional injection of adenovirus encoding CC chemokine ligand 16 inhibits mammary tumor growth and prevents metastatic-induced death after surgical removal of the treated primary tumor. *J Immunol*. 172:4026-36.
- Guiducci, C., A.P. Vicari, S. Sangaletti, G. Trinchieri, and M.P. Colombo. 2005. Redirecting in vivo elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection. *Cancer Res*. 65:3437-46.
- Halperin, S.A., G. Van Nest, B. Smith, S. Abtahi, H. Whiley, and J.J. Eiden. 2003. A phase I study of the safety and immunogenicity of recombinant hepatitis B surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide adjuvant. *Vaccine*. 21:2461-7.
- Hamzah, J., J.G. Altin, T. Herringson, C.R. Parish, G.J. Hammerling, H. O'Donoghue, and R. Ganss. 2009. Targeted liposomal delivery of TLR9 ligands activates spontaneous antitumor immunity in an autochthonous cancer model. *J Immunol*. 183:1091-8.
- Hartmann, G., and A.M. Krieg. 2000. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol*. 164:944-53.
- Hartmann, G., G.J. Weiner, and A.M. Krieg. 1999. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:9305-10.

- Hasegawa, K., and T. Hayashi. 2003. Synthetic CpG oligodeoxynucleotides accelerate the development of lupus nephritis during preactive phase in NZB x NZWF1 mice. *Lupus*. 12:838-45.
- Hawiger, D., K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J.V. Ravetch, R.M. Steinman, and M.C. Nussenzweig. 2001. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med*. 194:769-79.
- Heath, W.R., and F.R. Carbone. 2001. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 19:47-64.
- Heckelsmiller, K., S. Beck, K. Rall, B. Sipos, A. Schlamp, E. Tuma, S. Rothenfusser, S. Endres, and G. Hartmann. 2002a. Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy. *Eur J Immunol*. 32:3235-45.
- Heckelsmiller, K., K. Rall, S. Beck, A. Schlamp, J. Seiderer, B. Jahrsdorfer, A. Krug, S. Rothenfusser, S. Endres, and G. Hartmann. 2002b. Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model. *J Immunol*. 169:3892-9.
- Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, and S. Akira. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 408:740-5.
- Honda, K., Y. Ohba, H. Yanai, H. Negishi, T. Mizutani, A. Takaoka, C. Taya, and T. Taniguchi. 2005a. Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature*. 434:1035-40.
- Honda, K., H. Yanai, H. Negishi, M. Asagiri, M. Sato, T. Mizutani, N. Shimada, Y. Ohba, A. Takaoka, N. Yoshida, and T. Taniguchi. 2005b. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*. 434:772-7.
- Hontsu, S., H. Yoneyama, S. Ueha, Y. Terashima, M. Kitabatake, A. Nakano, T. Ito, H. Kimura, and K. Matsushima. 2004. Visualization of naturally occurring Foxp3+ regulatory T cells in normal and tumor-bearing mice. *Int Immunopharmacol*. 4:1785-93.
- Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 299:1057-61.
- Hornung, V., M. Guenther-Biller, C. Bourquin, A. Ablasser, M. Schlee, S. Uematsu, A. Noronha, M. Manoharan, S. Akira, A. de Fougères, S. Endres, and G. Hartmann. 2005. Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med*. 11:263-70.
- Hornung, V., S. Rothenfusser, S. Britsch, A. Krug, B. Jahrsdorfer, T. Giese, S. Endres, and G. Hartmann. 2002. 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*. 168:4531-7.
- Hsia, J.Y., J.T. Chen, C.Y. Chen, C.P. Hsu, J. Miaw, Y.S. Huang, and C.Y. Yang. 2005. Prognostic significance of intratumoral natural killer cells in primary resected esophageal squamous cell carcinoma. *Chang Gung Med J*. 28:335-40.
- Huang, A.Y., P. Golumbek, M. Ahmadzadeh, E. Jaffee, D. Pardoll, and H. Levitsky. 1994. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science*. 264:961-5.
- Huehn, J., K. Siegmund, J.C. Lehmann, C. Siewert, U. Haubold, M. Feuerer, G.F. Debes, J. Lauber, O. Frey, G.K. Przybylski, U. Niesner, M. de la Rosa, C.A.

- Schmidt, R. Brauer, J. Buer, A. Scheffold, and A. Hamann. 2004. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4⁺ regulatory T cells. *J Exp Med.* 199:303-13.
- Ichikawa, H.T., L.P. Williams, and B.M. Segal. 2002. Activation of APCs through CD40 or Toll-like receptor 9 overcomes tolerance and precipitates autoimmune disease. *J Immunol.* 169:2781-7.
- Ishigami, S., S. Natsugoe, K. Tokuda, A. Nakajo, X. Che, H. Iwashige, K. Aridome, S. Hokita, and T. Aikou. 2000. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer.* 88:577-83.
- Iwasaki, A., and R. Medzhitov. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 5:987-95.
- Jain, R.K. 2003. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* 9:685-93.
- Jakob, T., P.S. Walker, A.M. Krieg, M.C. Udey, and J.C. Vogel. 1998. 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.* 161:3042-9.
- Jones, E., M. Dahm-Vicker, A.K. Simon, A. Green, F. Powrie, V. Cerundolo, and A. Gallimore. 2002. Depletion of CD25⁺ regulatory cells results in suppression of melanoma growth and induction of autoreactivity in mice. *Cancer Immun.* 2:1.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, G. Schuler, J. Knop, and A.H. Enk. 2000. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med.* 192:1213-22.
- Kalinski, P., R.B. Mailliard, A. Giermasz, H.J. Zeh, P. Basse, D.L. Bartlett, J.M. Kirkwood, M.T. Lotze, and R.B. Herberman. 2005. Natural killer-dendritic cell cross-talk in cancer immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther.* 5:1303-15.
- Karlhofer, F.M., R.K. Ribaldo, and W.M. Yokoyama. 1992. MHC class I alloantigen specificity of Ly-49⁺ IL-2-activated natural killer cells. *Nature.* 358:66-70.
- Kawarada, Y., R. Ganss, N. Garbi, T. Sacher, B. Arnold, and G.J. Hammerling. 2001. NK- and CD8(+) T cell-mediated eradication of established tumors by peritumoral injection of CpG-containing oligodeoxynucleotides. *J Immunol.* 167:5247-53.
- Kilshaw, P.J. 1993. Expression of the mucosal T cell integrin alpha M290 beta 7 by a major subpopulation of dendritic cells in mice. *Eur J Immunol.* 23:3365-8.
- Kim, R., M. Emi, and K. Tanabe. 2006. Cancer immunosuppression and autoimmune disease: beyond immunosuppressive networks for tumour immunity. *Immunology.* 119:254-64.
- Klein, E., and A. Mantovani. 1993. Action of natural killer cells and macrophages in cancer. *Curr Opin Immunol.* 5:714-8.
- Knutson, K.L., M.L. Disis, and L.G. Salazar. 2007. CD4 regulatory T cells in human cancer pathogenesis. *Cancer Immunol Immunother.* 56:271-85.
- Krepler, C., V. Wacheck, S. Strommer, G. Hartmann, P. Polterauer, K. Wolff, H. Pehamberger, and B. Jansen. 2004. CpG oligonucleotides elicit antitumor responses in a human melanoma NOD/SCID xenotransplantation model. *J Invest Dermatol.* 122:387-91.
- Krieg, A.M. 2007. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J Clin Invest.* 117:1184-94.

- Krieg, A.M., and H. Wagner. 2000. Causing a commotion in the blood: immunotherapy progresses from bacteria to bacterial DNA. *Immunol Today*. 21:521-6.
- Krieg, A.M., A.K. Yi, S. Matson, T.J. Waldschmidt, G.A. Bishop, R. Teasdale, G.A. Koretzky, and D.M. Klinman. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*. 374:546-9.
- Kubo, T., R.D. Hatton, J. Oliver, X. Liu, C.O. Elson, and C.T. Weaver. 2004. Regulatory T cell suppression and anergy are differentially regulated by proinflammatory cytokines produced by TLR-activated dendritic cells. *J Immunol*. 173:7249-58.
- Kunikata, N., K. Sano, M. Honda, K. Ishii, J. Matsunaga, R. Okuyama, K. Takahashi, H. Watanabe, G. Tamura, H. Tagami, and T. Terui. 2004. Peritumoral CpG oligodeoxynucleotide treatment inhibits tumor growth and metastasis of B16F10 melanoma cells. *J Invest Dermatol*. 123:395-402.
- Kuwana, M. 2002. Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. *Hum Immunol*. 63:1156-63.
- Laplanche, A., L. Alzieu, T. Delozier, J. Berlie, C. Veyret, P. Fargeot, M. Luboinski, and J. Lacour. 2000. Polyadenylic-polyuridylic acid plus locoregional radiotherapy versus chemotherapy with CMF in operable breast cancer: a 14 year follow-up analysis of a randomized trial of the Federation Nationale des Centres de Lutte contre le Cancer (FNCLCC). *Breast Cancer Res Treat*. 64:189-91.
- Le Gouvello, S., S. Bastuji-Garin, N. Aloulou, H. Mansour, M.T. Chaumette, F. Berrehar, A. Seikour, A. Charachon, M. Karoui, K. Leroy, J.P. Farcet, and I. Sobhani. 2008. High prevalence of Foxp3 and IL17 in MMR-proficient colorectal carcinomas. *Gut*. 57:772-9.
- Levin, A.A. 1999. A review of the issues in the pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Biochim Biophys Acta*. 1489:69-84.
- Li, B., A.S. Lalani, T.C. Harding, B. Luan, K. Koprivnikar, G. Huan Tu, R. Prell, M.J. VanRoey, A.D. Simmons, and K. Jooss. 2006. Vascular endothelial growth factor blockade reduces intratumoral regulatory T cells and enhances the efficacy of a GM-CSF-secreting cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 12:6808-16.
- Link, B.K., Z.K. Ballas, D. Weisdorf, J.E. Wooldridge, A.D. Bossler, M. Shannon, W.L. Rasmussen, A.M. Krieg, and G.J. Weiner. 2006. Oligodeoxynucleotide CpG 7909 delivered as intravenous infusion demonstrates immunologic modulation in patients with previously treated non-Hodgkin lymphoma. *J Immunother*. 29:558-68.
- Lipford, G.B., M. Bauer, C. Blank, R. Reiter, H. Wagner, and K. Heeg. 1997. CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. *Eur J Immunol*. 27:2340-4.
- Liu, H.M., S.E. Newbrough, S.K. Bhatia, C.E. Dahle, A.M. Krieg, and G.J. Weiner. 1998. Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides enhance the immune response to vaccine strategies involving granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 92:3730-6.
- Liu, Y.J. 2005. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol*. 23:275-306.
- Liu, Y.J., H. Kanzler, V. Soumelis, and M. Gilliet. 2001. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol*. 2:585-9.

- Lonsdorf, A.S., H. Kuekrek, B.V. Stern, B.O. Boehm, P.V. Lehmann, and M. Tary-Lehmann. 2003. Intratumor CpG-oligodeoxynucleotide injection induces protective antitumor T cell immunity. *J Immunol.* 171:3941-6.
- Machiels, J.P., R.T. Reilly, L.A. Emens, A.M. Ercolini, R.Y. Lei, D. Weintraub, F.I. Okoye, and E.M. Jaffee. 2001. Cyclophosphamide, doxorubicin, and paclitaxel enhance the antitumor immune response of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor-secreting whole-cell vaccines in HER-2/neu tolerized mice. *Cancer Res.* 61:3689-97.
- Marshall, N.A., L.E. Christie, L.R. Munro, D.J. Culligan, P.W. Johnston, R.N. Barker, and M.A. Vickers. 2004. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood.* 103:1755-62.
- Mason, K.A., H. Ariga, R. Neal, D. Valdecanas, N. Hunter, A.M. Krieg, J.K. Whisnant, and L. Milas. 2005. Targeting toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides enhances tumor response to fractionated radiotherapy. *Clin Cancer Res.* 11:361-9.
- Mastini, C., P.D. Becker, M. Iezzi, C. Curcio, P. Musiani, G. Forni, F. Cavallo, and C.A. Guzman. 2008. Intramammary application of non-methylated-CpG oligodeoxynucleotides (CpG) inhibits both local and systemic mammary carcinogenesis in female BALB/c Her-2/neu transgenic mice. *Curr Cancer Drug Targets.* 8:230-42.
- Matter, A. 1979. Microcinematographic and electron microscopic analysis of target cell lysis induced by cytotoxic T lymphocytes. *Immunology.* 36:179-90.
- Melder, R.J., G.C. Koenig, B.P. Witwer, N. Safabakhsh, L.L. Munn, and R.K. Jain. 1996. During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium. *Nat Med.* 2:992-7.
- Mellman, I., and R.M. Steinman. 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell.* 106:255-8.
- Mellor, A.L., B. Baban, P.R. Chandler, A. Manlapat, D.J. Kahler, and D.H. Munn. 2005. Cutting edge: CpG oligonucleotides induce splenic CD19+ dendritic cells to acquire potent indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent T cell regulatory functions via IFN Type 1 signaling. *J Immunol.* 175:5601-5.
- Mempel, T.R., S.E. Henrickson, and U.H. Von Andrian. 2004. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature.* 427:154-9.
- Menetrier-Caux, C., G. Montmain, M.C. Dieu, C. Bain, M.C. Favrot, C. Caux, and J.Y. Blay. 1998. Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood.* 92:4778-91.
- Menges, M., S. Rossner, C. Voigtlander, H. Schindler, N.A. Kukutsch, C. Bogdan, K. Erb, G. Schuler, and M.B. Lutz. 2002. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med.* 195:15-21.
- Miller, M.J., S.H. Wei, I. Parker, and M.D. Cahalan. 2002. Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science.* 296:1869-73.
- Monteith, D.K., and A.A. Levin. 1999. Synthetic oligonucleotides: the development of antisense therapeutics. *Toxicol Pathol.* 27:8-13.

- Moore, K.W., R. de Waal Malefyt, R.L. Coffman, and A. O'Garra. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 19:683-765.
- Moretta, L., M.C. Mingari, D. Pende, C. Bottino, R. Biassoni, and A. Moretta. 1996. The molecular basis of natural killer (NK) cell recognition and function. *J Clin Immunol.* 16:243-53.
- Moseman, E.A., X. Liang, A.J. Dawson, A. Panoskaltis-Mortari, A.M. Krieg, Y.J. Liu, B.R. Blazar, and W. Chen. 2004. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol.* 173:4433-42.
- Nagorsen, D., C. Scheibenbogen, F.M. Marincola, A. Letsch, and U. Keilholz. 2003. Natural T cell immunity against cancer. *Clin Cancer Res.* 9:4296-303.
- Nguyen, L.T., A.R. Elford, K. Murakami, K.M. Garza, S.P. Schoenberger, B. Odermatt, D.E. Speiser, and P.S. Ohashi. 2002. Tumor growth enhances cross-presentation leading to limited T cell activation without tolerance. *J Exp Med.* 195:423-35.
- Nowak, A.K., B.W. Robinson, and R.A. Lake. 2003. Synergy between chemotherapy and immunotherapy in the treatment of established murine solid tumors. *Cancer Res.* 63:4490-6.
- Ohashi, K., G. Kobayashi, S. Fang, X. Zhu, S.J. Antonia, A.M. Krieg, and A.D. Sandler. 2006. Surgical excision combined with autologous whole tumor cell vaccination is an effective therapy for murine neuroblastoma. *J Pediatr Surg.* 41:1361-8.
- Pasare, C., and R. Medzhitov. 2003. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science.* 299:1033-6.
- Pashenkov, M., G. Goess, C. Wagner, M. Hormann, T. Jandl, A. Moser, C.M. Britten, J. Smolle, S. Koller, C. Mauch, I. Tancheva-Poor, S. Grabbe, C. Loquai, S. Esser, T. Franckson, A. Schneeberger, C. Haarmann, A.M. Krieg, G. Stingl, and S.N. Wagner. 2006. Phase II trial of a toll-like receptor 9-activating oligonucleotide in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 24:5716-24.
- Perricone, M.A., K.A. Smith, K.A. Claussen, M.S. Plog, D.M. Hempel, B.L. Roberts, J.A. St George, and J.M. Kaplan. 2004. Enhanced efficacy of melanoma vaccines in the absence of B lymphocytes. *J Immunother.* 27:273-81.
- Piali, L., A. Fichtel, H.J. Terpe, B.A. Imhof, and R.H. Gisler. 1995. Endothelial vascular cell adhesion molecule 1 expression is suppressed by melanoma and carcinoma. *J Exp Med.* 181:811-6.
- Piccioli, D., S. Sbrana, E. Melandri, and N.M. Valiante. 2002. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med.* 195:335-41.
- Piccirillo, C.A., and E.M. Shevach. 2001. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol.* 167:1137-40.
- Poenie, M., R.Y. Tsien, and A.M. Schmitt-Verhulst. 1987. Sequential activation and lethal hit measured by [Ca²⁺]_i in individual cytolytic T cells and targets. *EMBO J.* 6:2223-32.
- Poggi, A., and M.R. Zocchi. 2006. Mechanisms of tumor escape: role of tumor microenvironment in inducing apoptosis of cytolytic effector cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 54:323-33.
- Pooley, J.L., W.R. Heath, and K. Shortman. 2001. Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *J Immunol.* 166:5327-30.

- Prevost-Blondel, A., C. Zimmermann, C. Stemmer, P. Kulmburg, F.M. Rosenthal, and H. Pircher. 1998. Tumor-infiltrating lymphocytes exhibiting high ex vivo cytolytic activity fail to prevent murine melanoma tumor growth in vivo. *J Immunol.* 161:2187-94.
- Raulet, D.H. 1992. Immunology. A sense of something missing. *Nature.* 358:21-2.
- Rennert, P.D., P.S. Hochman, R.A. Flavell, D.D. Chaplin, S. Jayaraman, J.L. Browning, and Y.X. Fu. 2001. Essential role of lymph nodes in contact hypersensitivity revealed in lymphotoxin-alpha-deficient mice. *J Exp Med.* 193:1227-38.
- Robinson, R.A., V.T. DeVita, H.B. Levy, S. Baron, S.P. Hubbard, and A.S. Levine. 1976. A phase I-II trial of multiple-dose polyribonucleic-polyribocytidylic acid in patients with leukemia or solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 57:599-602.
- Roman, M., E. Martin-Orozco, J.S. Goodman, M.D. Nguyen, Y. Sato, A. Ronaghy, R.S. Kornbluth, D.D. Richman, D.A. Carson, and E. Raz. 1997. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat Med.* 3:849-54.
- Rosenberg, S.A., J.C. Yang, and N.P. Restifo. 2004. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med.* 10:909-15.
- Rudjinsky, S., W. Siders, L. Ingram, J. Marshall, R. Scheule, and J. Kaplan. 2001. Antitumor activity of cationic lipid complexed with immunostimulatory DNA. *Mol Ther.* 4:347-55.
- Sakaguchi, S., and N. Sakaguchi. 2005. Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease. *Int Rev Immunol.* 24:211-26.
- Schnare, M., G.M. Barton, A.C. Holt, K. Takeda, S. Akira, and R. Medzhitov. 2001. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2:947-50.
- Schrier, P.I., R. Bernards, R.T. Vaessen, A. Houweling, and A.J. van der Eb. 1983. Expression of class I major histocompatibility antigens switched off by highly oncogenic adenovirus 12 in transformed rat cells. *Nature.* 305:771-5.
- Schuler, G., B. Thurner, and N. Romani. 1997. Dendritic cells: from ignored cells to major players in T-cell-mediated immunity. *Int Arch Allergy Immunol.* 112:317-22.
- Seaman, W.E., M. Sleisenger, E. Eriksson, and G.C. Koo. 1987. Depletion of natural killer cells in mice by monoclonal antibody to NK-1.1. Reduction in host defense against malignancy without loss of cellular or humoral immunity. *J Immunol.* 138:4539-44.
- Shah, S., A.A. Divekar, S.P. Hilchey, H.M. Cho, C.L. Newman, S.U. Shin, H. Nechustan, P.M. Challita-Eid, B.M. Segal, K.H. Yi, and J.D. Rosenblatt. 2005. Increased rejection of primary tumors in mice lacking B cells: inhibition of anti-tumor CTL and TH1 cytokine responses by B cells. *Int J Cancer.* 117:574-86.
- Shevach, E.M., R.S. McHugh, C.A. Piccirillo, and A.M. Thornton. 2001. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol Rev.* 182:58-67.
- Siegmund, K., M. Feuerer, C. Siewert, S. Ghani, U. Haubold, A. Dankof, V. Krenn, M.P. Schon, A. Scheffold, J.B. Lowe, A. Hamann, U. Syrbe, and J. Huehn. 2005. Migration matters: regulatory T-cell compartmentalization determines suppressive activity in vivo. *Blood.* 106:3097-104.
- Sigal, L.J., S. Crotty, R. Andino, and K.L. Rock. 1999. Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature.* 398:77-80.

- Sigal, L.J., and K.L. Rock. 2000. Bone marrow-derived antigen-presenting cells are required for the generation of cytotoxic T lymphocyte responses to viruses and use transporter associated with antigen presentation (TAP)-dependent and -independent pathways of antigen presentation. *J Exp Med.* 192:1143-50.
- Sotomayor, E.M., I. Borrello, E. Tubb, F.M. Rattis, H. Bien, Z. Lu, S. Fein, S. Schoenberger, and H.I. Levitsky. 1999. Conversion of tumor-specific CD4+ T-cell tolerance to T-cell priming through in vivo ligation of CD40. *Nat Med.* 5:780-7.
- Sparwasser, T., E.S. Koch, R.M. Vabulas, K. Heeg, G.B. Lipford, J.W. Ellwart, and H. Wagner. 1998. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol.* 28:2045-54.
- Speiser, D.E., D. Lienard, N. Rufer, V. Rubio-Godoy, D. Rimoldi, F. Lejeune, A.M. Krieg, J.C. Cerottini, and P. Romero. 2005. Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J Clin Invest.* 115:739-46.
- Staveley-O'Carroll, K., T.D. Schell, M. Jimenez, L.M. Mylin, M.J. Tevethia, S.P. Schoenberger, and S.S. Tevethia. 2003. In vivo ligation of CD40 enhances priming against the endogenous tumor antigen and promotes CD8+ T cell effector function in SV40 T antigen transgenic mice. *J Immunol.* 171:697-707.
- Staveley-O'Carroll, K., E. Sotomayor, J. Montgomery, I. Borrello, L. Hwang, S. Fein, D. Pardoll, and H. Levitsky. 1998. Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:1178-83.
- Steinman, R.M. 2001. Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation. *Mt Sinai J Med.* 68:160-6.
- Steinman, R.M., and M. Dhodapkar. 2001. Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future. *Int J Cancer.* 94:459-73.
- Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 21:685-711.
- Steinman, R.M., and M.C. Nussenzweig. 2002. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:351-8.
- Stephens, L.A., and D. Mason. 2000. CD25 is a marker for CD4+ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25+ and CD25- subpopulations. *J Immunol.* 165:3105-10.
- Strayer, D.R., W.A. Carter, I. Brodsky, P. Cheney, D. Peterson, P. Salvato, C. Thompson, M. Loveless, D.E. Shapiro, W. Elsasser, and et al. 1994. A controlled clinical trial with a specifically configured RNA drug, poly(I).poly(C12U), in chronic fatigue syndrome. *Clin Infect Dis.* 18 Suppl 1:S88-95.
- Suri-Payer, E., A.Z. Amar, A.M. Thornton, and E.M. Shevach. 1998. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol.* 160:1212-8.
- Sutmuller, R.P., M.H. den Brok, M. Kramer, E.J. Bennink, L.W. Toonen, B.J. Kullberg, L.A. Joosten, S. Akira, M.G. Netea, and G.J. Adema. 2006. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest.* 116:485-94.

- Taguchi, O., and T. Takahashi. 1996. Administration of anti-interleukin-2 receptor alpha antibody in vivo induces localized autoimmune disease. *Eur J Immunol.* 26:1608-12.
- Taieb, J., N. Chaput, N. Scharz, S. Roux, S. Novault, C. Menard, F. Ghiringhelli, M. Terme, A.F. Carpentier, G. Darrasse-Jeze, F. Lemonnier, and L. Zitvogel. 2006. Chemoimmunotherapy of tumors: cyclophosphamide synergizes with exosome based vaccines. *J Immunol.* 176:2722-9.
- Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira. 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 21:335-76.
- Talmadge, J.E., J. Adams, H. Phillips, M. Collins, B. Lenz, M. Schneider, and M. Chirigos. 1985. Immunotherapeutic potential in murine tumor models of polyinosinic-polycytidylic acid and poly-L-lysine solubilized by carboxymethylcellulose. *Cancer Res.* 45:1066-72.
- Tan, T.T., and L.M. Coussens. 2007. Humoral immunity, inflammation and cancer. *Curr Opin Immunol.* 19:209-16.
- Tanaka, H., J. Tanaka, J. Kjaergaard, and S. Shu. 2002. Depletion of CD4+ CD25+ regulatory cells augments the generation of specific immune T cells in tumor-draining lymph nodes. *J Immunother.* 25:207-17.
- Trinchieri, G. 1989. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol.* 47:187-376.
- van den Broek, M.E., D. Kagi, F. Ossendorp, R. Toes, S. Vamvakas, W.K. Lutz, C.J. Melief, R.M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 1996. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med.* 184:1781-90.
- van der Most, R.G., R. Himbeck, S. Aarons, S.J. Carter, I. Larra, C. Robinson, A. Currie, and R.A. Lake. 2006. Antitumor efficacy of the novel chemotherapeutic agent coramsine is potentiated by cotreatment with CpG-containing oligodeoxynucleotides. *J Immunother.* 29:134-42.
- Verdijk, R.M., T. Mutis, B. Esendam, J. Kamp, C.J. Melief, A. Brand, and E. Goulmy. 1999. Polyribonucleosinic polyribocytidylic acid (poly(I:C)) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells. *J Immunol.* 163:57-61.
- Vermi, W., R. Bonecchi, F. Facchetti, D. Bianchi, S. Sozzani, S. Festa, A. Berenzi, M. Cella, and M. Colonna. 2003. Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas. *J Pathol.* 200:255-68.
- Vicari, A.P., C. Caux, and G. Trinchieri. 2002a. Tumour escape from immune surveillance through dendritic cell inactivation. *Semin Cancer Biol.* 12:33-42.
- Vicari, A.P., C. Chiodoni, C. Vaure, S. Ait-Yahia, C. Dercamp, F. Matsos, O. Reynard, C. Taverne, P. Merle, M.P. Colombo, A. O'Garra, G. Trinchieri, and C. Caux. 2002b. Reversal of tumor-induced dendritic cell paralysis by CpG immunostimulatory oligonucleotide and anti-interleukin 10 receptor antibody. *J Exp Med.* 196:541-9.
- Villegas, F.R., S. Coca, V.G. Villarrubia, R. Jimenez, M.J. Chillón, J. Jareno, M. Zuñil, and L. Callol. 2002. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer.* 35:23-8.
- Wakita, D., K. Chamoto, Y. Zhang, Y. Narita, D. Noguchi, H. Ohnishi, T. Iguchi, T. Sakai, H. Ikeda, and T. Nishimura. 2006. An indispensable role of type-1 IFNs for inducing CTL-mediated complete eradication of established tumor tissue by CpG-liposome co-encapsulated with model tumor antigen. *Int Immunol.* 18:425-34.

- Wakkach, A., N. Fournier, V. Brun, J.P. Breittmayer, F. Cottrez, and H. Groux. 2003. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity*. 18:605-17.
- Weigel, B.J., D.A. Rodeberg, A.M. Krieg, and B.R. Blazar. 2003. CpG oligodeoxynucleotides potentiate the antitumor effects of chemotherapy or tumor resection in an orthotopic murine model of rhabdomyosarcoma. *Clin Cancer Res*. 9:3105-14.
- Weiner, G.J., H.M. Liu, J.E. Wooldridge, C.E. Dahle, and A.M. Krieg. 1997. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:10833-7.
- Whiteside, T.L. 1998. Immune cells in the tumor microenvironment. Mechanisms responsible for functional and signaling defects. *Adv Exp Med Biol*. 451:167-71.
- Wingender, G., N. Garbi, B. Schumak, F. Jungerkes, E. Endl, D. von Bubnoff, J. Steitz, J. Striegler, G. Moldenhauer, T. Tuting, A. Heit, K.M. Huster, O. Takikawa, S. Akira, D.H. Busch, H. Wagner, G.J. Hammerling, P.A. Knolle, and A. Limmer. 2006. Systemic application of CpG-rich DNA suppresses adaptive T cell immunity via induction of IDO. *Eur J Immunol*. 36:12-20.
- Wooldridge, J.E., Z. Ballas, A.M. Krieg, and G.J. Weiner. 1997. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance the efficacy of monoclonal antibody therapy of lymphoma. *Blood*. 89:2994-8.
- Yang, L., L.M. DeBusk, K. Fukuda, B. Fingleton, B. Green-Jarvis, Y. Shyr, L.M. Matrisian, D.P. Carbone, and P.C. Lin. 2004. Expansion of myeloid immune suppressor Gr⁺CD11b⁺ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell*. 6:409-21.
- Yang, Q., S.R. Goding, M.E. Hokland, and P.H. Basse. 2006. Antitumor activity of NK cells. *Immunol Res*. 36:13-25.
- Ye, X., J. McCarrick, L. Jewett, and B.B. Knowles. 1994. Timely immunization subverts the development of peripheral nonresponsiveness and suppresses tumor development in simian virus 40 tumor antigen-transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:3916-20.
- Yewdell, J.W., C.C. Norbury, and J.R. Bennink. 1999. Mechanisms of exogenous antigen presentation by MHC class I molecules in vitro and in vivo: implications for generating CD8⁺ T cell responses to infectious agents, tumors, transplants, and vaccines. *Adv Immunol*. 73:1-77.
- Yi, A.K., M. Chang, D.W. Peckham, A.M. Krieg, and R.F. Ashman. 1998. CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *J Immunol*. 160:5898-906.
- Zaini, J., S. Andarini, M. Tahara, Y. Saijo, N. Ishii, K. Kawakami, M. Taniguchi, K. Sugamura, T. Nukiwa, and T. Kikuchi. 2007. OX40 ligand expressed by DCs costimulates NKT and CD4⁺ Th cell antitumor immunity in mice. *J Clin Invest*. 117:3330-8.
- Zhang, H., and A.C. Issekutz. 2001. Growth factor regulation of neutrophil-endothelial cell interactions. *J Leukoc Biol*. 70:225-32.
- Zitvogel, L. 2002. Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity. *J Exp Med*. 195:F9-14.
- Zou, W. 2006. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 6:295-307.

7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

| | |
|----------------------|--|
| A | Österreich |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| APC | Allophycocyanin |
| Arm | Armenisch |
| BSA | Bovines Serum-Albumin |
| CD | <i>Cluster of differentiation</i> |
| CpG | Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid |
| Cy3 | Cyanin 3 |
| Cy5 | Cyanin 5 |
| D | Deutschland |
| DC-SIGN | <i>Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin</i> |
| DMEM | <i>Dulbecco´s modified eagle medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| DOTAP | N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-Trimethylammonium- Methylsulfat |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| F(ab´) ₂ | Variabler Teil eines Antikörpers |
| FACS | <i>Fluorescence-activated cell sorting</i> |
| F _c -Teil | Konstanter Teil eines Antikörpers |
| FCS | Fötale Kälberserum |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FITC | Fluorescein-Isocyanat |
| Foxp3 | <i>Forkhead box protein 3</i> |
| FSC | <i>Forward scatter</i> |
| G | Gauge |
| GM-CSF | <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> |

| | |
|------------|--|
| HBSS | <i>Hanks' balanced salt solution</i> |
| HIV | <i>Human immunodeficiency virus</i> |
| HMGB1 | <i>High-mobility-group box 1</i> |
| ICAM | <i>Intercellular adhesion molecule</i> |
| IDO | Indolamin-2,3-dioxygenase |
| IF | Immunfluoreszenz |
| IFA | Inkomplettes Freud'sches Adjuvans |
| IFN | Interferon |
| IHC | Immunhistochemie |
| IL | Interleukin |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| Ly-6G | <i>Lymphocyte antigen 6 complex, locus G</i> |
| mDC | Myeloide dendritische Zelle |
| Mio | Million |
| MHC | <i>Major histocompatibility complex</i> |
| NK-Zellen | Natürliche Killerzellen |
| NKT-Zellen | Natürliche Killer-T-Zellen |
| NOD | <i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i> |
| ODN | Oligonukleotide |
| PBS | <i>Phosphate-buffered saline</i> |
| pDC | Plasmozytoide dendritische Zelle |
| PE | Phycoerythrin |
| Poly(I:C) | <i>Polyriboinosinic polyribocytidylic acid</i> |
| RIG-1 | <i>Retinoic acid-inducible protein 1</i> |
| RNS | Ribonukleinsäure |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| RT | Raumtemperatur |

| | |
|---------|---|
| R848 | 4-Amino-2-(Ethoxymethyl)- α,α -Dimethyl-1H-Imidazo[4,5-c]Quinoline-1Ethanol |
| SCID | <i>Severe combined immunodeficiency disorder</i> |
| SSC | <i>Side scatter</i> |
| Syr | Syrisch |
| TBS | <i>TRIS-buffered-saline</i> |
| TGF | <i>Transforming growth factor</i> |
| TLR | <i>Toll-like-Rezeptor</i> |
| TOPRO-3 | To-Pro-3-Iodid |
| Treg | Regulatorische T-Zellen |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan |
| UK | Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland |
| VCAM | <i>Vascular cell adhesion molecule</i> |

8. Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Professor Dr. med. Stefan Endres für eine wunderbare Promotionszeit, in der ich eigenständiges wissenschaftliches Denken und Arbeiten erlernen durfte. Dabei bereiteten die hohe Motivation, der Enthusiasmus und der kollegiale Umgang aller Mitarbeiter ein unvergessliches Arbeitsklima. Zudem bereicherten mich die sozialen Veranstaltungen und Begegnungen mit interessanten Menschen auch persönlich, wofür ich ebenfalls sehr dankbar bin. Ich danke auch für die Möglichkeit der Teilnahme an Kongressen und die allgemeine Unterstützung außerhalb der Promotion.

Mein weiterer Dank gilt meiner Arbeitsgruppenleiterin Frau PD Dr. med. Dr. rer. nat. Carole Bourquin. Ich danke für ihr großes Engagement und die hervorragende Leitung der Arbeitsgruppe „Tumorimmunologie“.

Besonders danke ich Herrn Dr. med. David Anz für die unermüdlich intensive, tatkräftige Betreuung und die Verbesserungsvorschläge für meine Doktorarbeit. Ich danke auch sehr für die zwischenmenschlich stets angenehme Arbeitsatmosphäre, die spürbar zu meiner Freude an der Arbeit beigetragen hat.

Zudem danke ich allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe „Tumorimmunologie“ für die herzliche Zusammenarbeit. Ausdrücklich danke ich Frau Dr. rer. nat. Cornelia Wurzenberger für die ständige Hilfsbereitschaft und die zahlreichen wertvollen Ratschläge.

Ich danke Frau Dr. rer. nat. Susanne Radtke-Schuller (Anatomische Anstalt, Ludwig-Maximilians-Universität) für die Mitbenutzung des Lichtmikroskops mit der Möglichkeit der Bildaufnahme, Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christian Haass (Adolf-Butenandt-Institut, Ludwig-Maximilians-Universität) für die Mitbenutzung des konfokalen Lasermikroskops und Herrn PD Dr. rer. nat. Peter Nelson (Medizinische Poliklinik Innenstadt, Ludwig-Maximilians-Universität) für die Mitbenutzung des Kryostats.

Abschließend danke ich dem Programm Förderung für Forschung und Lehre (Leiter Herr Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Heesemann) der Ludwig-Maximilians-Universität München, das mich im Rahmen meines Promotionsstudiums „Molekulare Medizin“ finanziell und fachlich unterstützte.

9. Veröffentlichungen

Die Ergebnisse meiner Arbeit während der Promotionszeit wurden in Teilen auf folgenden Kongressen vorgestellt und als *Abstract* veröffentlicht:

1. **Golic M**, Kölzer VH, Wurzenberger C, Endres S, Anz D, Bourquin C.
Tumor immunotherapy with CpG oligonucleotides: impact on tumor-infiltrating dendritic cells and lymphocytes.
Dendritic Cell Vaccination and other Strategies to tip the Balance of the Immune System, Bamberg, Deutschland, 2007 (Poster).
2. Kölzer VH, **Golic M**, Wurzenberger C, Endres S, Bourquin C, Anz D.
Tumor immunotherapy with CpG oligonucleotides: impact on regulatory T cells.
World Immune Regulation Meeting I, Davos, Schweiz, 2007 (Poster).
3. Kölzer VH, **Golic M**, Wurzenberger C, Endres S, Bourquin C, Anz D.
CpG oligonucleotide treatment alters the morphological distribution and phenotype of regulatory T cells.
37. Annual Meeting of the German Society of Immunology, Heidelberg, Deutschland, 2007 (Poster).
4. Anz D, Kölzer VH, Poeck H, **Golic M**, Wurzenberger C, Hornung V, Hartmann G, Endres S, Bourquin C.
Inhibition of regulatory T cell function by immunostimulatory RNA.
Symposium Gentianum, 12. Klausurtagung der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München, Frauenchiemsee, Deutschland, 2007 (Vortrag).
5. Kölzer VH, **Golic M**, Wurzenberger C, Endres S, Bourquin C, Anz D.
Influence of CpG based immunotherapy on regulatory T cells.
ice-School, immunology course engadina, Engadina, Schweiz, 2007 (Vortrag).
6. Thaler R, Koelzer VH, **Golic M**, Wurzenberger C, Endres S, Bourquin C, Anz D.
Tumor cells are not the source of CCL22 expression in murine tumors.
World Immune Regulation Meeting II, Davos, Frankreich, 2008 (Poster).

7. Anz D, Thaler R, Koelzer VH, **Golic M**, Wurzenberger C, Nelson P, Endres S, Bourquin C.
Tumor cells are not the source of the high intratumoral levels of the chemokine CCL22.
SFB-TR36 Principles and Applications of Adoptive T Cell Therapy, Berlin, Deutschland, 2008 (Vortrag).

8. Müller W, **Golic M**, Koelzer VH, Endres S, Bourquin C, Anz D.
Expression of CD103 on Treg cells in the bone marrow is regulated by innate immune activation.
World Immune Regulation Meeting III, Davos, Frankreich, 2009 (Poster).

9. Müller W, **Golic M**, Koelzer VH, Endres S, Bourquin C, Anz D.
Expression of CD103 on Treg cells in the bone marrow is decreased in mice bearing a subcutaneous tumor and can be influenced by innate immune activation.
The 3rd Tegernsee Conference, Feldafing, Deutschland, 2009 (Poster).

Die Ergebnisse meiner Arbeit während der Promotionszeit wurden in folgenden internationalen Fachzeitschriften als Originalarbeit veröffentlicht:

1. Bourquin C, Anz D, Zwioerek K, Lanz AL, Fuchs S, Weigel S, Wurzenberger C, von der Borch P, **Golic M**, Moder S, Winter G, Coester C, Endres S.
Targeting CpG oligonucleotides to the lymph node by nanoparticles elicits efficient antitumoral immunity.
Journal of Immunology 2008 Sep 1;181(5):2990-8.
2. In Vorbereitung:
Autoren alphabetisch: Anz D, Bourquin C, Eiber S, Endres S, **Golic M**, Kölzer V, Radtke-Schuller S, Thaler R, Wurzenberger C.
Toll-like receptor agonists prevent tumor infiltration by regulatory T cells.

10. Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Michaela Golić, geboren am 17. Januar 1983 in München

SCHULISCHE AUSBILDUNG, STUDIUM UND PROMOTION

| | |
|---------------------|---|
| 1989 bis 1993 | Grundschule an der Alfonsstraße, München |
| 1993 bis 2002 | Adolf-Weber-Gymnasium München, Abiturnote 1,3 |
| 10/2002 | Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München |
| 09/2004 | Ärztliche Vorprüfung, Note 1,0 |
| 03/2005 | Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes |
| 11/2005 bis 07/2007 | Teilnahme am Promotionsstudiengang „Molekulare Medizin“ der LMU; Thema der Promotion: Tumorummuntherapie mit CpG-Oligonukleotiden als <i>Toll-like</i> -Rezeptor-9-Liganden: Auswirkungen auf die Präsenz intratumoraler Immunzellen; Abteilung für Klinische Pharmakologie (Leitung Prof. Dr. med. S. Endres), Medizinische Klinik Innenstadt, LMU München |
| 10/2007 | Aufnahme in das Mentoring-Programm LMUexcellent der LMU (Leitung Frau Prof. Dr. med. A. C. Muntau) |
| 06/2009 | Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 1,5 |

PRAKTISCHES JAHR

| | |
|---------------------|---|
| 12/2007 bis 01/2008 | Halbes Tertial Kinderchirurgie im Dr. von Haunerschen Kinderspital, LMU München |
| 02/2008 bis 03/2008 | Halbes Tertial Chirurgie im <i>Concord Repatriation General Hospital</i> , Sydney, Australien |
| 04/2008 bis 07/2008 | Tertial Innere Medizin an der <i>Harvard Medical School</i> (<i>Massachusetts General Hospital, Beth Israel Deaconess Medical Center, Mount Auburn Hospital</i>), Boston, MA, USA |
| 08/2008 bis 12/2008 | Tertial Pädiatrie im Dr. von Haunerschen Kinderspital, LMU München |

BERUF

| | |
|---------|---|
| 09/2009 | Beginn als Assistenzärztin im Fach Gynäkologie und Geburtshilfe an der Charité Universitätsmedizin Berlin (Direktor Prof. Dr. med. J. W. Dudenhausen) |
|---------|---|