

Aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie
Direktor: Prof. Dr. Rainer Hofmann
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



Titel der Dissertation:
**Expression und Funktion der Toll-Like Rezeptoren TLR-4 und TLR-9
an Zelllinien des Harnblasenkarzinoms**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Claudia Verena Kesch aus Traunstein

Marburg, 2015

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am 23.02.2015

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr PD Dr. P. Olbert

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. S. Bauer

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie
Direktor: Prof. Dr. Rainer Hofmann
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



Titel der Dissertation:
**Expression und Funktion der Toll-Like Rezeptoren TLR-4 und TLR-9
an Zelllinien des Harnblasenkarzinoms**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Claudia Verena Kesch aus Traunstein

Marburg, 2015

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Tabellenverzeichnis.....	4
Abbildungsverzeichnis.....	4
Abkürzungsverzeichnis.....	5
1. Einleitung.....	8
1.1 Das Harnblasenkarzinom.....	9
1.1.1 Epidemiologie.....	9
1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren.....	9
1.1.3 Klinisches Erscheinungsbild.....	10
1.1.4 Diagnostik.....	10
1.1.5 Grading und Staging.....	11
1.1.6 Therapie.....	12
1.1.6.1 Therapie nicht-invasiver Blasenkarzinome.....	12
1.1.6.2 Therapie muskelinvasiver Blasenkarzinome.....	12
1.2 Bacillus Calmette Guérin.....	14
1.3 Toll-like Rezeptoren und Liganden.....	16
1.3.1 TLR-4 und seine Liganden.....	18
1.3.2 TLR-9 und seine Liganden.....	19
1.4 Toll-like Rezeptoren und Harnblasenkarzinom.....	22
2. Zielsetzung.....	23
3. Material und Methoden.....	24
3.1 Material.....	24
3.1.1 Zelllinien.....	24
3.1.2 Medien, Antibiotika und weitere Substanzen zur Zellkultivierung.....	24
3.1.3 Oligonukleotidsequenzen.....	25
3.1.4 Antikörper.....	25

3.1.5 Chemikalien und Enzyme.....	26
3.1.6 Puffer und Gebrauchslösungen.....	27
3.1.7 Software und Statistik.....	28
3.2 Methoden.....	29
3.2.1 Zellbiologische Methoden.....	29
3.2.1.1 Zellkulturtechniken.....	29
3.2.1.2 Zellstimulation und Vorbereitung der mRNA- und Protein- Extraktion.....	30
3.2.1.3 Zellproliferations-Assay.....	31
3.2.1.4 Invasions-Assay.....	31
3.2.1.5 Untersuchung der Aufnahme von CpG-ODN.....	33
3.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	33
3.2.2.1 RNA-Isolation.....	33
3.2.2.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese).....	34
3.2.2.3 Real-Time-PCR.....	34
3.2.3 Biochemische Methoden.....	35
3.2.3.1 Proteinisolation.....	35
3.2.3.2 Proteinkonzentrations-Messung.....	36
3.2.3.3 Western Blotting.....	36
3.2.4 Immunzytologie.....	37
4. Ergebnisse.....	39
4.1 Expression von Toll-like Rezeptoren.....	39
4.1.1 TLR-4 und TLR-9 mRNA-Expression.....	39
4.1.1.1 TLR-4 mRNA-Expression.....	39
4.1.1.2 TLR-9 mRNA-Expression.....	40
4.1.2 Immunzytologischer TLR-4-Nachweis.....	40
4.1.3 TLR-9-Nachweis mittels Western Blot.....	42
4.2 Expression von Zytokinen in nicht-stimulierten Zelllinien.....	43
4.2.1 Zytokinexpression der Zelllinie T24.....	43
4.2.2 Zytokinexpression der Zelllinie BFTC.....	44
4.2.3 Zytokin- und Angiogenesefaktorexpression der Zelllinie UMUC3.....	44
4.2.4 Zytokin- und Angiogenesefaktorexpression der Zelllinie RT112.....	45
4.3 LPS-Effekte auf die Zelllinien T24 und BFTC.....	46

4.3.1 Auswirkung der LPS-Stimulation auf die Zytokinexpression.....	46
4.3.2 Auswirkungen der LPS-Stimulation auf die Zellproliferation.....	47
4.4 CpG-ODN-Effekte auf die Zelllinien UMUC3 und RT112.....	48
4.4.1 CpG-ODN-Aufnahme in das Zellinnere mit und ohne Interferin.....	48
4.4.2 Auswirkung der CpG-ODN-Stimulation auf die Zytokinexpression....	50
4.4.2.1 Auswirkung der CpG-ODN-Stimulation auf die Zytokinexpression der Zelllinie UMUC3.....	50
4.4.2.2 Auswirkung der CpG-ODN-Stimulation auf die Zytokinexpression der Zelllinie RT112.....	50
4.4.3 Auswirkung der CpG-ODN-Stimulation auf die Zellproliferation.....	53
4.4.4 Auswirkung der CpG-ODN-Stimulation auf die Zellinvasion.....	55
5. Diskussion.....	56
5.1 TLR-Expression und Zytokinexpressionsmuster.....	56
5.2 TLR-4 und LPS.....	58
5.3 TLR-9 und CpG-ODN.....	61
5.4 Resümee.....	68
Zusammenfassung.....	69
Summary.....	71
Literaturverzeichnis.....	73
Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	88
Danksagung.....	89
Publikationen.....	90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - 2009 TNM-Klassifikation der Harnblasenkarzinome.....	11
Tabelle 2 - Substanzen zur Zellkultivierung.....	24
Tabelle 3 - Primer-Sets für RT-PCR.....	25
Tabelle 4 - CpG-Oligonukleotidsequenzen.....	25
Tabelle 5 - Antikörper.....	25
Tabelle 6 - Chemikalien und Enzyme.....	26
Tabelle 7 - Puffer und Gebrauchslösungen.....	27
Tabelle 8 - Software.....	28

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Toll-like Rezeptoren und ihre Signalwege.....	17
Abbildung 2 - Schematische Darstellung des Invasions-Assay.....	32
Abbildung 3 - TLR-4 mRNA-Expression.....	39
Abbildung 4 - TLR-9 mRNA-Expression.....	40
Abbildung 5 - Immunzytologischer TLR-4-Nachweis.....	41
Abbildung 6 - TLR-9-Nachweis mittels Western Blot.....	42
Abbildung 7 - Zytokinexpression der Zelllinie T24.....	43
Abbildung 8 - Zytokinexpression der Zelllinie BF7C.....	44
Abbildung 9 - Zytokinexpression der Zelllinie UMUC3.....	44
Abbildung 10 - Zytokinexpression der Zelllinie RT112.....	45
Abbildung 11 - Auswirkungen der LPS-Stimulation auf die Zytokinexpression.....	46
Abbildung 12 - Auswirkungen der LPS-Stimulation auf die Zellproliferation.....	47
Abbildung 13 - CpG-ODN-Aufnahme in das Zellinnere mit und ohne Interferin.....	49
Abbildung 14 - Auswirkung der CpG-ODN-Stimulation auf die Zytokinexpression der Zelllinie UMUC3.....	51
Abbildung 15 - Auswirkung der CpG-ODN-Stimulation auf die Zytokinexpression der Zelllinie RT112.....	52
Abbildung 16 - Auswirkungen der CpG-ODN-Stimulation auf die Zellproliferation der Zelllinie UMUC3.....	54
Abbildung 17 - Auswirkungen der CpG-ODN-Stimulation auf die Zellproliferation der Zelllinie RT112.....	54
Abbildung 18 - Auswirkungen der CpG-ODN-Stimulation auf die Zellinvasion.....	55

Abkürzungsverzeichnis

Δ	Delta
A	Ampere
AP-1	“activator protein 1”
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninicsäure
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
bzw	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	“Complementary” Desoxyribonukleinsäure
CD	“Cluster of Differentiation”
cm ²	Quadratcentimeter
Co ₂	Kohlenstoffdioxid
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
CT	Computertomographie
ct	“Threshold cycle“
Cu	Kupfer
Cy3	“Cyanine 3”
DAPI	Diamidino-phenylindole
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dCTP	Deoxycytidintriphosphat
dGTP	Deoxyguanosintriphosphat
d.h.	Das heißt
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
dNTP	Deoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Deoxythymidintriphosphat
ECL	“Enhanced chemiluminescence”
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EORTC	“European Organisation for Research and Treatment of Cancer“
FGFR3	“Fibroblast growth factor receptor 3“
g	Gramm
µg	Mikrogramm

GSTM1	“Glutathione S-transferase Mu 1“
H ₂ O	Wasser
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Chlorwasserstoff
ICAM-1	“Intercellular Adhesion Molecule 1“
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Int	Interferin
IRAK	“IL-1 receptor associated kinase“
IRF	“IFN-regulatory factor“
kDa	Kilodalton
µl	Mikroliter
LBP	“Lipopolysaccharide binding protein“
Log ₂	Binärer Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharid
M	molare Masse
µm	Mikrometer
MAPK	“Mitogen-activated protein kinase“
MCP-1	“Monocyte chemotactic protein-1“
MD-2	“Myeloid differentiation factor-2“
MHC	“Major histocompatibility complex“
min	Minuten
miRNA	Micro RNA
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	“Messenger“ RNA
MyD88	“Myeloid differentiation primary response gene 88“
NaCl	Natriumchlorid
NAT2	N-acetyltransferase 2
NF-κB	“Nuclear Factor-Kappa B“
NK	“Natural killer“
nm	Nanometer
ODN	“Oligodeoxynucleotides“

PAMP	“Pathogen-associated molecular pattern“
PBS	“Phosphate Buffered Saline”
PIGF	“Placenta growth factor”
pmol	Picomol
PTO	“Phosphorothioate“
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
(RT)-PCR	(“Real-time” (Echtzeit))-Polymerasen-Kettenreaktion
s	Sekunden
SDS	“Sodium dodecyl sulfate“
siRNA	“Small interfering” RNA
TBS	“Tris Buffered Saline”
TBS-T	“Tris Buffered Saline – Tween”
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF	“Transforming growth factor“
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TIRAP	“Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein“
TLR	“Toll-like“ Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAF	“TNF receptor associated factor“
TRAIL	“Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand”
TRAM	“TRIF-related adaptor molecule“
TRIF	“Toll-IL-1-Rezeptor domain-containing adapter inducing interferon-β”
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUR	Transurethrale Resektion
U	Umdrehungen
UICC	“Union Internationale Contre le Cancer“
V	Volt
VEGF(A)	“Vascular endothelial growth factor (A)“
WHO	“World Health Organization“
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Das Harnblasenkarzinom ist eine der häufigsten malignen Tumorerkrankungen weltweit. 75%-85% der Patienten werden noch in nicht-muskelinvasiven Stadien diagnostiziert. Für einen Teil dieser Patienten stellt die Dispositionsprophylaxe mittels Bacillus Calmette Guérin (BCG) -Instillation nach transurethraler Resektion (TUR) eine effektive Therapie dar und wird allgemein empfohlen.

Bis heute ist der Wirkungsmechanismus von BCG nicht vollständig geklärt, aber es ist bekannt, dass Bestandteile von BCG mit Toll-like Rezeptoren (TLR), unter ihnen TLR-4 und TLR-9, interagieren und dass CpG-ODN, ein TLR-9-Agonist, *in vitro* und in Tierversuchen dem BCG sogar überlegen ist. Trotzdem gibt es bisher nur wenige Untersuchungen zur Existenz und Funktionalität von Toll-like Rezeptoren auf Harnblasenkarzinomzellen selbst.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Expression von TLR-4 und TLR-9 an verschiedenen Zelllinien des Harnblasenkarzinoms zu untersuchen und zu überprüfen, ob eine Stimulation dieser Rezeptoren durch den spezifischen Liganden zu Veränderungen im Zytokinexpressionsmuster, in der Zellproliferation und in der Zellinvasion führt.

1.1 Das Harnblasenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Harnblasenkarzinom repräsentiert eine der häufigsten onkologischen Entitäten weltweit. Die globale, altersstandardisierte, jährliche Inzidenz beträgt 10.1 pro 100 000 für Männer und 2.5 pro 100 000 für Frauen. Die altersstandardisierte Gesamtmortalität beträgt 2.0 pro 100 000/Jahr (Ferlay J). Das mediane Diagnosealter liegt bei 72 Jahren (Ries et al., 2003). Bei schätzungsweise 75-85% der Patienten wird ein Karzinom diagnostiziert, das auf die Mukosa (Ta und Tis) oder Submukosa (T1) beschränkt ist (Babjuk et al., 2011).

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Risikofaktoren werden in angeborene Risikofaktoren und extern zugeführte Karzinogene eingeteilt.

Als angeborene Risikofaktoren konnten die langsam acetylierende NAT2-Genvariante und der GSTM1-null-Genotyp, sowie acht weitere, mit dem Harnblasenkarzinom assoziierte Gensequenzvarianten identifiziert werden. Eine Mutation im FGFR3-Onkogen findet sich häufig bei nicht-invasiven low-grade Karzinomen. Es wird vermutet, dass genetische Prädisposition weniger einen eigenständigen Risikofaktor darstellt, sondern vielmehr die Anfälligkeit auf externe Karzinogene beeinflusst (Guey et al., 2010; Kiemeney et al., 2010; Kiemeney et al., 2008; Rothman et al., 2010).

Den Hauptrisikofaktor stellt Zigarettenrauch dar, welcher für schätzungsweise 50% der Harnblasenkarzinome verantwortlich gemacht werden kann. Zigarettenrauch enthält aromatische Amine. Diese werden renal eliminiert und üben einen unmittelbar karzinogenen Effekt auf das Urothel aus. Circa 20% der Erkrankungen stehen in Verbindung mit einer beruflichen Karzinogen-Exposition gegenüber aromatischen Aminen, polyzyklischen aromatischen Kohlenstoffen und chlorierten Kohlenwasserstoffen (Freedman et al., 2011).

Trinkwasserverschmutzung mit Arsen kann ebenfalls zur Karzinomentstehung beitragen. Die Rolle von im Trinkwasser enthaltenen Desinfektionsmitteln, wie Chlor und Trihalomethan, wird kontrovers diskutiert (Fernandez et al., 2012).

Weitere Risikofaktoren sind chronische Harnretention, Harnleiterdilatation und chronische Harnblasenentzündung. Ein Sonderfall ist hier die chronische Entzündung ausgelöst durch Schistosomiasis, welche für einen nicht unerheblichen Teil der

Harnblasenkarzinome in Afrika verantwortlich gemacht werden kann (Zaghloul, 2012). Bei den Harnblasenkarzinomen, die in der Folge chronischer Entzündungen entstehen, handelt es sich zumeist um Plattenepithelkarzinome (Michaud, 2007).

Erhöhte Inzidenzraten konnten auch nach Radiotherapie im kleinen Becken oder der Verabreichung von Cyclophosphamid und der Langzeiteinnahme von Pioglitazonen gefunden werden (MacKenzie et al., 2011).

1.1.3 Klinisches Erscheinungsbild

Patienten mit Harnblasenkarzinom haben zumeist nur unspezifische Symptome. Häufig findet sich eine Makrohämaturie. Auch Mikrohämaturie oder Dysurie können auf ein Karzinom hinweisen (Shephard et al., 2012).

1.1.4 Diagnostik

Die Diagnose des Harnblasenkarzinoms wird mit der Zystoskopie und der histologischen Untersuchung hierbei gewonnener Biopsien gestellt.

Mittels intravenöser Urographie können Füllungsdefekte oder eine Dilatation der oberen Harnwege dargestellt werden und somit Hinweise auf einen Urotheltumor geben. Alternativ dazu zeigen sich muskel-invasive Tumoren und Tumoren der oberen Harnwege auch in der CT-Urographie (Purysko et al., 2012). Im transabdominellen Ultraschall können intraluminal Masses in der Harnblase dargestellt werden (Silva-Ramos et al., 2012). Wird ein Harnblasenkarzinom mittels solcher Bildgebung diagnostiziert, kann gegebenenfalls auf die Zystoskopie verzichtet werden.

Urin-Zytologie hat eine hohe Sensitivität in der Diagnostik von high-grade Tumoren und Tis und kann bei deren Diagnose äußerst hilfreich sein, negative Ergebnisse schließen das Vorhandensein eines gut differenzierten Tumors aber nicht aus.

Es existieren eine Reihe molekularer Urintests mit zumeist hoher Sensitivität und eher niedriger Spezifität, die bisher allerdings nicht in der Routinediagnostik verwendet werden (Lokeshwar et al., 2005).

Jeder Patient, bei dem ein Blasenkarzinom diagnostiziert wird, erhält eine transurethrale Resektion des Blasentumors. Diagnostisch wird hierdurch ein differenziertes Grading und Staging ermöglicht, da im Gegensatz zu zystoskopisch gewonnenen Zangenbiopsie auch tiefer gelegene Schichten der Harnblasenwand erreicht werden. Für niedrig

maligne Tumoren kann die transurethrale Resektion bereits therapeutisch sein (Richterstetter et al.).

1.1.5 Grading und Staging

Harnblasenkarzinome werden nach der in Tabelle 1 dargestellten UICC 2009 TNM Klassifikation der Harnblasenkarzinome eingeteilt. Ta, Tis und T1 Tumore werden unter dem Begriff der nicht-invasiven Blasenkarzinome zusammengefasst. Ta Tumore werden im WHO Grading von 2004 in die vier prognostisch bedeutsamen Kategorien Urothelpapillom (komplett benigne Läsion), papilläre urotheliale Neoplasie mit niedrig malignem Potential, papilläres Urothelkarzinom low-grade und papilläres Urothelkarzinom high-grade unterteilt (Sauter et al.).

Tab. 1 – 2009 TNM-Klassifikation der Harnblasenkarzinome (vereinfacht)(Sobin et al.)			
T	Primärtumor	N	regionäre Lymphknoten (LK)
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden	Nx	regionäre LK können nicht beurteilt werden
T0	kein Anhalt für Primärtumor	N0	keine regionären LK-metastasen
Ta	nicht-invasives papilläres Karzinom	N1	Metastase(n) in solitärem LK des kleinen Beckens
Tis	Carcinoma in situ („flat tumor“)	N2	Metastase(n) in multiplen LKs des kleinen Beckens
T1	Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe		
T2	Tumor infiltriert Muskulatur	M	Fernmetastasen
T3	Tumor infiltriert perivesikales Fettgewebe	Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
T4	Tumor infiltriert Prostata, Uterus, Vagina, Becken- oder Bauchwand	M0	keine Fernmetastasen
		M1	Fernmetastasen

1.1.6 Therapie

1.1.6.1 Therapie nicht-invasiver Blasenkarzinome

Bei schlecht differenziertem Tumor, Fehlen von Muskelgewebe im Präparat und Verdacht auf inkomplette Erstresektion besteht die Indikation zur Nachresektion in Form einer zweiten TUR innerhalb von 2-6 Wochen (Divrik et al., 2006).

Adjuvante Therapien werden in Abhängigkeit des individuellen Kurz- und Langzeit-Rekurrenz- und Progredienz-Risikos durchgeführt. Dieses kann mit Hilfe des EORTC Punktesystems bestimmt werden. Es basiert auf den wichtigsten klinischen und pathologischen Faktoren: Anzahl der Tumoren, Tumorgöße, vorangegangene Rekurrenz-Rate, T-Stadium, gleichzeitig bestehendes Tis und Tumorgrad (Sylvester et al., 2006).

Rezidive sind bei TaT1 Tumoren häufig, Progredienz in ein muskelinvasives Karzinom wird in einer begrenzten Anzahl von Fällen beschrieben. Eine adjuvante Therapie sollte daher für alle Patienten in Erwägung gezogen werden. Einmalige, unmittelbare Chemotherapie-Instillation mit z.B. Mitomycin C, Epirubicin oder Doxorubicin reduziert das Rezidiv-Risiko signifikant und wird als alleinige intravesikale Maßnahme für low-risk Patienten empfohlen (Sylvester et al., 2004).

Für intermediate- und high-risk Patienten besteht die Option einer intravesikalen BCG-Therapie über mindestens ein Jahr oder einer weiteren Chemotherapie. Therapeutisch gesehen ist die BCG-Therapie überlegen, die Chemotherapie allerdings nebenwirkungsärmer. Ein Einfluss der BCG-Instillation auf das Progressionsrisiko wird kontrovers diskutiert (Bohle et al., 2003; Jarvinen et al., 2009; Malmstrom et al., 2009; Sylvester et al., 2010).

Einen Sonderfall bildet das Tis. Hier herrscht kein Konsens darüber, ob eine direkt aggressive Zystektomie der konservativen BCG-Instillation vorzuziehen ist (Sylvester et al., 2005).

1.1.6.2 Therapie muskelinvasiver Blasenkarzinome

Patienten mit einem lokalisierten, invasiven Karzinom, d.h. $T \geq 2$, N0, M0 können zunächst eine neoadjuvante Cisplatin-haltige Chemotherapie erhalten. Dies gilt nicht für Patienten mit einem Performance-Status ≥ 2 und/oder beeinträchtigter Nierenfunktion.

Der neoadjuvanten Therapie sollte die radikale Zystektomie folgen, welche anderen Therapieformen nach wie vor überlegen ist (Grossman et al., 2003). Für nicht operable Patienten wird eine externe Radiochemotherapie empfohlen (Shelley et al., 2002).

Patienten mit metastasiertem Blasenkarzinom sollten ein Cisplatin-haltiges Chemotherapieschema erhalten (von der Maase et al., 2005). Ist dies aufgrund eines Performance-Status ≥ 2 oder einer eingeschränkten Nierenfunktion nicht möglich, wird ein Carboplatin-haltiges Schema empfohlen (De Santis et al., 2009).

1.2. Bacillus Calmette-Guérin

Bacillus Calmette-Guérin stellt eine attenuierte Form des bovinen Tuberkulose Bacillus *Mycobacterium bovis* dar. Anfang des 20. Jahrhunderts wurde es ursprünglich als Impfstoff gegen Tuberkulose entwickelt.

1976 wurde BCG erstmalig in der Immuntherapie des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms mit Erfolg eingesetzt (Morales et al., 1976). Seither gilt BCG bis heute als Standardtherapeutikum in der Rezidivprophylaxe für intermediate- und high-risk nicht-muskelinvasive Harnblasenkarzinome. Die Rezidivrate nach TUR wird mittels intravesikaler BCG-Instillation signifikant reduziert (Shelley et al., 2012). Im Gegensatz zur Chemotherapie zeigt sich unter BCG auch eine verminderte Progression (Sylvester et al., 2002). Allerdings ist die BCG-Therapie nicht immer erfolgreich und noch existieren keine Marker, die einen Therapieerfolg vorhersehbar machen. Ungefähr ein Drittel der Patienten spricht nicht auf die Therapie mit BCG an (Merz et al., 1995). Ein Drittel der Patienten, die initial auf die Therapie ansprechen, entwickelt später ein Rezidiv mit schlechter Prognose (Catalona et al., 1987; Herr et al., 1989).

Die Wirkungsmechanismen der BCG-Therapie sind komplex und ebenfalls noch nicht eindeutig geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass BCG zunächst über Fibronectin attachment protein an die Blasenwand bindet (Zhao et al., 2000). Die Interaktion von BCG und Urothelzellen wird für mehrere wichtige immunologische Veränderungen verantwortlich gemacht. Durch die Sekretion von Chemokinen scheinen Makrophagen und Th-1-Zellen rekrutiert und aktiviert zu werden. Über die Sekretion von Zytokinen, wie beispielsweise IL-2 und IFN γ induzieren Th-1-Zellen wahrscheinlich die Proliferation und die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen und Lymphokin-aktivierter-Killerzellen (Schenk-Braat and Bangma, 2005). Aber auch die Tumorzellen an sich sind vermutlich aktiv in den Wirkungsmechanismus involviert. BCG bindet an die Tumorzellen und wird teilweise von diesen sogar phagozytiert (Becich et al., 1991). Es verändert den Phänotyp der Tumorzellen durch Induktion von Adhäsions-Molekülen, wie MHC-II und ICAM-1 (Ikeda et al., 2002). Tumorzellen selbst sind zur Antigenpräsentation fähig und sezernieren Zytokine, deren Level durch BCG-Stimulation verändert wird (de Reijke et al., 1993; Lattime et al., 1992; Prescott et al., 2000). Außerdem unterdrückt BCG dosisabhängig direkt das Tumorzellwachstum (Jackson et al., 1994).

In wissenschaftlichen Untersuchungen rücken Toll-like Rezeptoren (TLRs) zunehmend in den Fokus der Immunantwort gegenüber Mykobakterien, bzw. BCG. So konnte gezeigt werden, dass BCG über TLR-2 und TLR-4 die Zytokinsekretion dendritischer Zellen stimuliert (Tsuji et al., 2000). Selbige Rezeptoren sind zumindest bei Mäusen essentiell für die CD4⁺-Lymphozyten-Aktivierung und INF γ -Sekretion nach BCG-Stimulation (Heldwein et al., 2003).

Aber auch TLR-9 scheint eine Bedeutung in der Immunantwort auf BCG zu haben. So wurde die IL-12 Antwort auf BCG-Stimulation in den dendritischen Zellen von TLR2/4/9-knockout-Mäusen komplett unterdrückt. Dies geschah jedoch nicht bei alleinigem Knockout eines der drei Rezeptoren (von Meyenn et al., 2006).

Auch Urothelzellen selbst exprimieren Toll-like Rezeptoren. Eine Studie konnte die Expression von TLR-2, TLR-3, TLR-4 und TLR-9 nachweisen und beschreibt einen Anstieg in der Expression von MyD88 (einem TLR Adapter Protein) und in der Sekretion von IL-6 und IL-8 (Miyazaki et al., 2006). Im Widerspruch dazu wurden in einer anderen Studie zwar ebenfalls Toll-like Rezeptoren bei der Untersuchung normaler Urothelzellen und Harnblasenkarzinomzellen nachgewiesen, eine Zytokinsekretion nach BCG-Stimulation konnte allerdings nur bei einigen Karzinomzelllinien festgestellt werden (Ayari et al., 2011).

1.3 Toll-like Rezeptoren und Liganden

Toll wurde zum ersten Mal in der Taufliege *Drosophila* beschrieben. Zunächst wurde *Drosophila* Toll als Transmembran-Rezeptor identifiziert, der für die Entwicklung embryonaler *Drosophilae* benötigt wird (Hashimoto et al., 1988). Erstaunlicherweise zeigte sich, dass der Signalweg von *Drosophila* Toll große Ähnlichkeit mit dem IL-1 Signalweg der Säugetiere aufweist. Über diesen wird NF- κ B aktiviert, ein Transkriptionsfaktor, der für viele Aspekte der Entzündungs- und Immunantwort verantwortlich ist. Dies legte die Vermutung nahe, dass auch Toll in die Regulation der Immunantwort involviert ist (Belvin and Anderson, 1996). So konnte gezeigt werden, dass Fliegenmutanten, denen verschiedene Komponenten des Toll-Signalweges fehlten, nicht mehr zur adäquaten Antwort auf Pilzinfektionen fähig waren. Damit wurde die Teilhabe von Toll an der Immunantwort erwachsener *Drosophilae* bestätigt (Lemaitre et al., 1996). Nicht lange nach dieser Entdeckung wurde ein *Drosophila* Toll entsprechender humaner Rezeptor identifiziert (Medzhitov et al., 1997), der heutige TLR-4.

Seither konnte beim Menschen eine Familie von bisher 11 Rezeptor-Genen, deren Struktur Ähnlichkeiten mit *Drosophila* Toll aufweist, nachgewiesen werden. Ihre Genprodukte werden als Toll-like Rezeptoren bezeichnet und zur TLR-IL-1 Superfamilie gezählt. Sie erkennen sogenannte Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). PAMPs sind festgelegte molekulare Muster, die sich in vielen Bakterien, Viren, Protozoen und Pilzen finden. Die bekanntesten unter ihnen sind LPS und Lipoteichoic Säure (TLR-4), Peptidoglykane, Lipoproteine und Zymosan (TLR-2, TLR-1, TLR-6), unmetylierte bakterielle oder virale CpG-DNA (TLR-9) und virale RNA (TLR-7, TLR-8, TLR-9) (Adams, 2009; Akira et al., 2006).

Toll-like Rezeptoren besitzen eine Leucin-reiche Ektodomäne zur Erkennung der PAMPs und eine intrazytoplasmatische Domäne, welche die Rekrutierung von Adaptorproteinen wie MyD88, TIRAP, TRIF und TRAM steuert.

Die meisten TLRs befinden sich auf der Zelloberfläche. Eine Ausnahme stellen TLR-3, TLR-7, TLR-8 und TLR-9 dar. Sie befinden sich in Endosomen und werden von internalisierten Pathogenen aktiviert (Kawai and Akira, 2007; Latz et al., 2004). Manche TLRs, z.B. TLR-2, werden nach Liganden-Bindung selbst internalisiert (Underhill et al., 1999).

Obwohl unterschiedliche Liganden an Toll-like Rezeptoren binden, scheinen die TLRs gemeinsame Signalwege zu besitzen. Diese sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

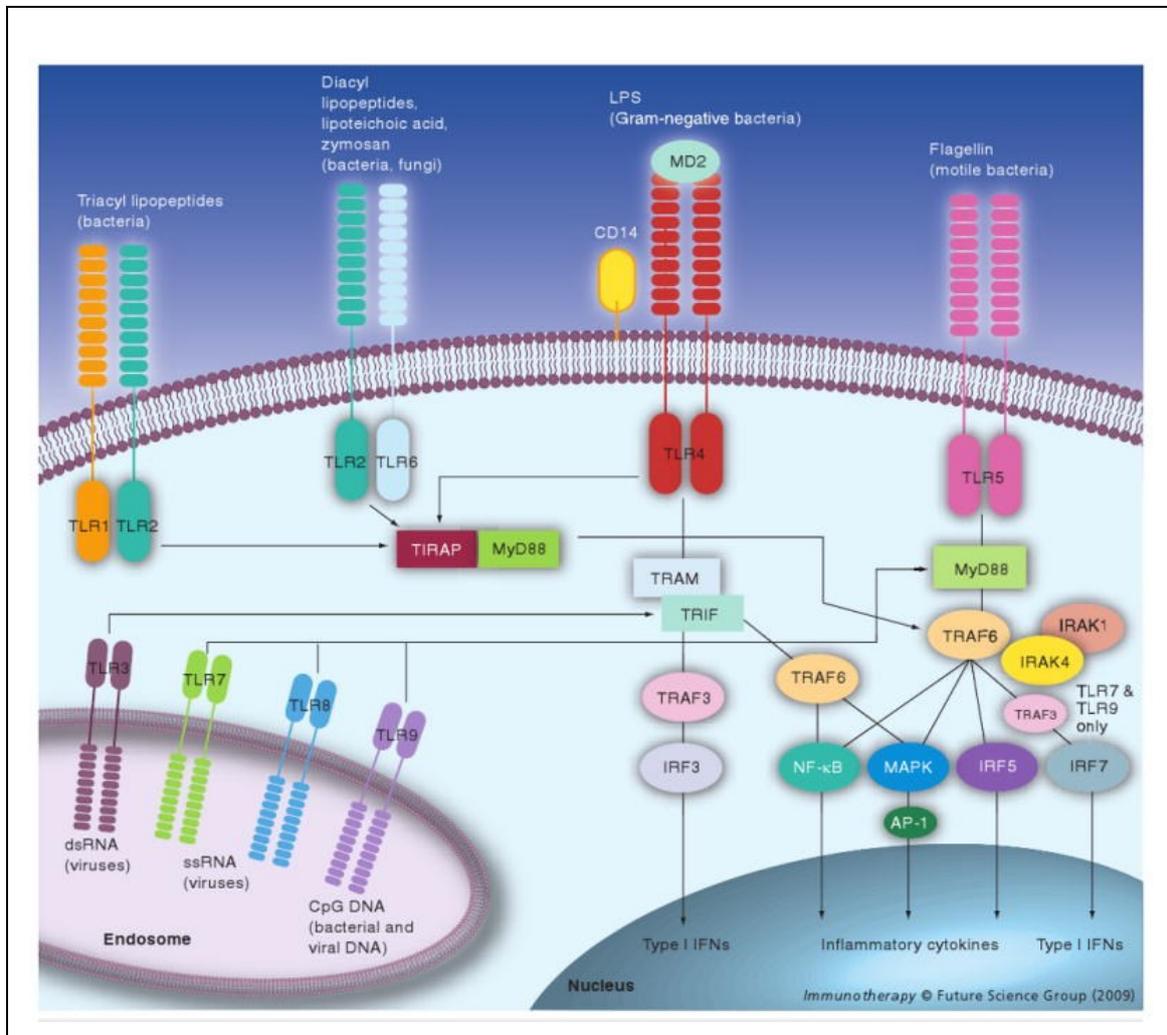


Abb. 1 – Toll-like Rezeptoren und ihre Signalwege (Adams, 2009)

TLRs erkennen mikrobielle Produkte, endogene Liganden und synthetische Agonisten entweder direkt oder mit Hilfe unterstützender Moleküle wie CD14 und MD2. Nach Dimerisierung der Rezeptoren (bzw. Heterodimerisierung im Falle von TLR-2/TLR-6 und TLR-1/TLR-6) wird das Signal über Adapterproteine (MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM) weitergeleitet. Aktivierung von NF-κB, AP-1 und IRFs induziert die Expression von Genen, die inflammatorische Zytokine codieren, Typ 1 IFN Genen und IFN-induzierbaren Genen.

Am Ende der Signalkaskade steht zumeist die Transkription von Typ 1 IFN Genen und proinflammatorischen Zytokinen wie TNFα, IL-1 und IL-6 (Kawai and Akira, 2007), wobei je nach Typ der TLR-aktivierten Zellen unterschiedliche Zytokine ausgeschüttet werden.

TLRs werden präferentiell von Immunzellen exprimiert, wie z.B. Monozyten, Neutrophilen, Makrophagen, dendritischen Zellen, T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen (McGettrick and O'Neill, 2007) und steuern in diesen Zellen die Immunantwort gegenüber Pathogenen. Allerdings konnten TLRs auch in Keratinozyten (Kopp and Medzhitov, 2003) und epithelialen Zellen des Verdauungs-, Urogenital- und Respirationstrakts nachgewiesen werden (Guillot et al., 2005; Schaefer et al., 2005; Vora et al., 2004). Immer häufiger werden TLRs auch in Tumorzellen nachgewiesen. So zum Beispiel in Magen- und Kolonkarzinomzellen, in HCC-, Ovar-, Cervix-, Mamma-, Prostata- und Lungenkarzinomzellen, sowie in Melanomzellen und Zellen von Hirntumoren (Yu and Chen, 2008). Auch konnte für einige dieser Zellen bereits ein direkter Effekt nach TLR-Stimulation nachgewiesen werden. Dennoch ist die biologische Funktion von TLRs auf Tumorzellen noch lange nicht vollständig verstanden.

1.3.1 TLR-4 und seine Liganden

TLR-4 wurde als erster menschlicher Toll-like Rezeptor entdeckt (Medzhitov et al., 1997) und kurz darauf wurde LPS als wichtiger TLR-4-Ligand identifiziert: Mutationen im TLR-4-Gen zweier Mausstämme konnten für die mangelnde Immunantwort dieser gegenüber LPS verantwortlich gemacht werden (Poltorak et al., 1998; Qureshi et al., 1999).

Neben LPS scheinen aber noch weitere PAMPs in der Lage zu sein, TLR-4 zu stimulieren, so zum Beispiel das Fusionsprotein des Respiratory-syncytial-virus (RSV), das Mouse-mamma-tumor-virus (MMTV) (Kurt-Jones et al., 2000; Rassa et al., 2002). Aber auch endogene Moleküle wie Hitze-Schock-Proteine, Hyaluronsäure und β -Defensin interagieren wohl mit TLR-4 (Biragyn et al., 2002; Ohashi et al., 2000; Termeer et al., 2002). LPS ist aber vermutlich der potenteste TLR-4-Ligand.

LPS stellt eine wichtige strukturelle Komponente der äußeren Membran gram-negativer Bakterien dar. Es besteht aus drei Teilen: Dem inneren Lipid A, der Oligosaccharid-Kernregion und dem äußeren Polysaccharid (Miller et al., 2005; Raetz and Whitfield, 2002). Dabei stellt Lipid A den Teil dar, der mit TLR-4 interagiert.

Zur Erkennung von LPS durch TLR-4 werden häufig zusätzliche Proteine, einschließlich LBP, CD14 und MD-2 benötigt (Gioannini and Weiss, 2007; Miyake, 2007). Am besten ist die Reaktion von TLR-4-exprimierenden Immunzellen auf LPS-

Stimulation untersucht. Diese stellt eine Schlüsselrolle im Pathomechanismus der bakteriellen Sepsis dar (Beutler and Rietschel, 2003). TLR-4 wird aber zum Beispiel auch von Urothelzellen exprimiert und reguliert die Immunantwort bei bakteriellen Blasenentzündungen (Kagan and Medzhitov, 2006; Poltorak et al., 1998; Termeer et al., 2002; Yamamoto et al., 2002). So konnte durch LPS vermittelte TLR-4-Aktivierung in Blaszellen eine signifikante Erhöhung der proinflammatorischen IL-6-Antwort gezeigt werden (Song et al., 2007). Außerdem konnten diverse Tumorzellen gefunden werden, die TLR-4 exprimieren und unterschiedlich auf LPS-Stimulation reagieren. LPS inhibierte das Wachstum in TLR-4-positiven Zellen von Hypophysentumoren, induzierte eine IL-6-Produktion (Tichomirowa et al., 2005) und zeigte antitumorale Effekte gegenüber Glioblastoma multiforme (Chicoine et al., 2007). In Ratten hatte die Aktivierung von TLR-4 sowohl im Prostata-Tumor- als auch im Melanommodell inhibierende Effekte (Andreani et al., 2007). Für andere Zelllinien werden allerdings wiederum negative Effekte berichtet. So reagierte eine Kolonkarzinomzelllinie der Maus auf LPS-Stimulation mit signifikanter Erhöhung der Zytokine IL-6 und IL-12. Das Tumorstadium wurde hier nicht durch TLR-4-Aktivierung, sondern im Gegenteil durch TLR-4-Blockade aufgehalten (Huang et al., 2005a). Die TLR-4-Aktivierung menschlicher Lungenkarzinomzellen verstärkte die Produktion der immunsuppressiven Zytokine TGF β und VEGF, sowie des proangiogenetischen Chemokins IL-8 und induziert eine Resistenz gegenüber TNF α - oder TRAIL-induzierter Apoptose (He et al., 2007). Auch in Melanomzellen wurde über TLR-4 die IL-8-Produktion, sowie die Zelladhäsion verstärkt (Molteni et al., 2006). In HCC-Zellen verstärkte LPS das invasive Potential und die epitheliale-mesenchymale Transition (Jing et al., 2012). Diese Beispiele legen dar, dass die Rolle von TLR-4 auf Tumorzellen zwar widersprüchlich ist, in jedem Fall eine Ligandenbindung aber tumorbiologisch relevante Prozesse nach sich zieht.

1.3.2 TLR-9 und seine Liganden

TLR-9 ist ein intrazellulärer Toll-like Rezeptor. Dies bedeutet, dass aktivierende Pathogene zunächst internalisiert werden müssen. Nach Aktivierung erfolgt wie auch bei anderen TLRs die Signalweiterleitung über das Adapterprotein MyD88 (siehe Abbildung 1). Auf zellulärer Ebene initiiert die Aktivierung von TLR-9 in der Folge eine Kaskade von Antworten des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Am

besten ist diese in plasmazytoiden dendritischen Zellen erforscht. Diese werden zur Sekretion von Typ 1 Interferon und von co-stimulatorischen Molekülen wie CD80 oder CD86 aktiviert und lösen dadurch eine Reihe weiterer Effekte aus, die in einer ausgeprägten, zellvermittelten Th-1-Antwort resultieren (Krieg, 2004, 2006). Gleichzeitig wird die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen verstärkt und damit eine Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität potentiell verstärkt (Krieg, 2004).

Aktiviert wird TLR-9 durch unmethylierte Cytosin-Posphat-Guanin-Oligodeoxynucleotide (CpG-ODNs). Diese finden sich häufig in bakterieller DNA. Im Genom von Säugetieren finden sie sich im Gegensatz dazu eher selten und sind dann am Cytosin-Ende methyliert, was ein Fehlen der immunstimulativen Aktivität erklärt (Hemmi et al., 2000).

In Abhängigkeit ihrer immunologischen Effekte können CpG-ODNs in drei verschiedene Klassen eingeteilt werden: CpG-A, das über IFN α effektiv NK-Zellen stimuliert; CpG-B, das nur eine mäßige IFN α -Produktion induziert, dafür aber die antigen-spezifische Immunantwort verstärkt; und CpG-C, welches die stimulatorischen Fähigkeiten von CpG-A und CpG-B vereinigt (Vollmer et al., 2004; Wooldridge and Weiner, 2003). Außerdem erwies sich das immunstimulatorische Potential von CpG-Motiven als Spezies-spezifisch. So haben Motive, die in Mäusen eine Immunantwort stimulieren, teilweise andere Effekte auf den menschlichen Organismus und umgekehrt (Krieg, 2008).

CpG-ODN vermittelte TLR-9-Stimulation wird heutzutage als Immunotherapeutikum für eine Vielzahl von Erkrankungen untersucht z.B. als Monotherapeutikum für entzündliche Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Karzinome, wie auch in Kombination mit anderen Therapiemethoden oder als Adjuvans in Impfstoffen.

Folgend soll aber ausschließlich ein Überblick über die CpG-ODN-vermittelten Effekte auf Tumorzellen gegeben werden. In mehreren Phase-I-Studien wurde bereits, unter anderem bei Patienten mit kutanem T-Zell-Lymphom, Non-Hodgkin-Lymphom, metastasierendem Melanom, Basalzellkarzinom, fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom und rezidivierendem Glioblastom, die Verträglichkeit und Sicherheit von CpG-ODN getestet. Untersuchungen einzelner Karzinomzelllinien zeigen aber, dass die biologische Funktion von TLR-9 auf den Tumorzellen individuell sehr unterschiedlich sein kann.

Multiple Myelomzellen reagierten auf CpG-ODN-Behandlung mit IL-6-Sekretion und einem Anstieg der Zellproliferation (Xu et al., 2010). In HeLa- (Zevixkarzinom) und

A549- (Lungenkarzinom) Zellen induzierte CpG-ODN die Sekretion von MCP-1 und erhöhte das Zellüberleben (Droemann et al., 2005). Gliomzellen schienen mit ansteigender Malignität mehr TLR-9 zu exprimieren. Die Stimulation hatte keinen Einfluss auf die Proliferation, erhöhte aber die Invasionsfähigkeit (Wang et al., 2010). In HCC-Zellen erhöhte CpG-ODN die Zellproliferation sowie die Produktion Apoptose-inhibierender Faktoren (Tanaka et al., 2010). Dagegen wurde die Zellproliferation in Brustkrebszellen bei gleichzeitig gesteigerter Invasion aufgehalten (Ilvesaro et al., 2008; Merrell et al., 2006). Auch in TLR-9-exprimierenden Prostatakarzinomzellen fand sich eine gesteigerte CpG-ODN-vermittelte Invasion (Ilvesaro et al., 2007). Zusammenfassend scheint die CpG-ODN-Behandlung in der Tumorzelle direkt das Invasionsverhalten zu fördern, aber völlig unterschiedliche Auswirkungen auf das Zellüberleben, bzw. die Zellproliferation zu haben.

1.4 Toll-like Rezeptoren und Harnblasenkarzinom

Die Verbindung zwischen BCG und seinen immunmodulatorischen Eigenschaften durch Toll-like Rezeptor-Stimulation stellt die Untersuchung der biologischen Funktion spezifischer TLR-Liganden mehr und mehr in den Fokus.

Bekannt ist, dass ein TLR-2-Agonist im Harnblasenkarzinom-Mausmodell das Tumorstadium, vermutlich über eine IFN γ -induzierte Th-1-Antwort und eine reduzierte Vaskularisation, verringert (Codolo et al., 2012).

Auch der TLR-9-Agonist CpG-ODN zeigte im Mausmodell antineoplastische Aktivität (Hegele et al., 2004), sowie einen Anstieg der Zytokine IL-10, TGF β , IL-12, IFN γ , wobei die Tumorzelllinie (MB49) an sich *in vitro* kein TLR-9 exprimiert und CpG-ODN auch keinen direkten Einfluss auf das Zellüberleben hatte (Olbert et al., 2009). Im direkten Vergleich von BCG und CpG-ODN im Mausmodell erwies sich CpG-ODN sogar als überlegen (Mangsbo et al., 2008).

Die Expression von Toll-like Rezeptoren auf Harnblasenzellen selbst und ihre Reaktion auf Stimulation ist nur wenig untersucht. Eine Studie berichtete in der Zelllinie T24 von einer Steigerung der IL-6-Expression nach LPS-Stimulation (Qian et al., 2009). Eine weitere Studie untersuchte die TLR-Expression in vier Zelllinien und fand eine Expression von TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-7 und TLR-9. In einem Teil der Zellen führte eine Stimulation mit den jeweiligen Agonisten dieser Rezeptoren zur erhöhten IL-8- Sekretion (Ayari et al., 2011).

2. Zielsetzung

Bis heute ist die komplexe Wirkungsweise von BCG nicht eindeutig geklärt. Auch existieren keine Marker, mit deren Hilfe ein Therapieversagen prognostiziert werden kann.

Es ist bekannt, dass Bestandteile von BCG mit Toll-like Rezeptoren, unter ihnen TLR-4 und TLR-9, interagieren und dass CpG-ODN, ein TLR-9-Agonist, in Tierversuchen dem BCG sogar überlegen ist. Trotzdem gibt es bisher nur wenige Untersuchungen zur Existenz und Funktionalität von Toll-like Rezeptoren auf Harnblasenkarzinomzellen selbst. Detailliertes Wissen hierüber ist essentiell, um die Wirkung bereits klinisch bewährter und potentiell in der Zukunft verwendbarer Immunotherapeutika vollständig begreifen und abschätzen zu können.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher anhand exemplarisch gewählter Blasenkarzinomzelllinien folgende Fragen untersucht werden:

1. Exprimieren Blasenkarzinomzellen Toll-like Rezeptoren 4 und 9?
2. Wie wirkt sich eine Stimulation dieser Rezeptoren auf die Zytokinexpression, die Zellproliferation und die Zellinvasion aus?

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

Es wurde mit folgenden humanen Harnblasenkarzinom-Zelllinien gearbeitet:

T24, HT, BFTC-905, 5637 (alle: DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen u. Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland), sowie EJ28, HU456, UMUC3, RT4, RT112, TCC-SUP, MGHU4 (alle freundlicherweise von der Klinik für Urologie und Kinderurologie der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main, Direktor: Prof. Dr. A. Haferkamp, zur Verfügung gestellt).

3.1.2 Medien, Antibiotika und weiter Substanzen zur Zellkultivierung

Alle Substanzen, die zur Zellkultivierung benützt wurden, sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 2 – Substanzen zur Zellkultivierung

RPMI 1640 Without L-Glutamine	(PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria)
RPMI 1640 With L-Glutamine, Without	(PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria)
Phenol Red	
Trypsin-EDTA	(PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria)
Fetal Bovine Serum	(PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria)
Stable Glutamine (200mM) L-Alanyl-L-	(PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria)
Glutamine	
Penicillin/Streptomycin (100x)	(PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria)
PBS	(PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria)

3.1.3 Oligonukleotidsequenzen

Alle Oligonukleotidsequenzen wurden synthetisiert von biomers.net GmbH, Ulm, Germany. In Tabelle 3 sind die verwendeten Primer-Sets aufgeführt, in Tabelle 4 die CpG-ODN-Sequenzen.

Tab. 3 – Primer-Sets für RT-PCR (+, vorwärts / -, rückwärts)	
β-actin: + 5'-tat cca ggc tgt gct atc cct gta c-3' - 5'-ttc atg agg tag tca gtc agg tcc c-3'	TLR-9: + 5'-gcc tac agg tgc tgc gtc tcc c-3' - 5'-cct tgg cct tgg aaa aga agc c-3'
IL-6: + 5'-gga gaa gat tcc aaa gat gta gcc g-3' - 5'-cat cca tct ttt tca gcc atc ttt g-3'	TLR-4: + 5'-cca gca ttc caa ttt gaa aca aat g-3' - 5'-gag agg tcc agg aag gtc aag ttt c-3'
IL-8: + 5'-ctg att tet gca gct ctg tgt gaa g-3' - 5'-tca aaa act tet cca caa ccc tct g-3'	VEGF-A: + 5'-gaa gtt cat gga tgt cta tca gcg c-3' - 5'-gca ttc aca ttt gtt gtg ctg tag g-3'
TNFα: + 5'-ctt gtt cct cag cct ctt ctc ctt c-3' - 5'-cta caa cat ggg cta cag gct tgt c-3'	PIGF: + 5'-ttg tct gct ggg aac ggc tc-3' - 5'-aga acg gat ctt tag gag ctg cat g-3'
INFB: + 5'-atg aga tgc tcc aga aca tct ttg c-3' - 5'-agg tgc aga ctg ctc atg agt ttt c-3'	

Tab. 4 – CpG-Oligonukleotidsequenzen	
ODN 2216 = CpG-A 5'-g*g gg gac gat cgt cg* g*g g g*g-3'	ODN 2006 = CpG-B 5'-t*c g t*c g t*t*t*g t c*g t t*t t g*t c g*t *t-3'
ODN 2216 = CpG-A Cy3 5'-g*g gg gac gat cgt cg* g*g g g*g-3' 5'Mod.: Cy3	*entspricht einem PTO

3.1.4 Antikörper

Tabelle 5 listet alle verwendeten Antikörper auf.

Tab. 5 – Antikörper	
Primärantikörper:	
Anti-Human TLR9, Isotyp: Kaninchen Ig	(Abgent, San Diego, USA)
Anti-Human TLR4, Isotyp: Maus Ig	(Abcam plc, Cambridge, UK)
Anti-Human β-actin, Isotyp: Maus Ig	(Abcam plc, Cambridge, UK)
Sekundärantikörper:	
Anti-Maus Ig, Ziege	(Thermo Scientific, Rockford, USA)
Anti-Kaninchen Ig, Ziege	(Thermo Scientific, Rockford, USA)
Anti-Maus Ig, Kaninchen	Bestandteil des Catalyzed Signal Amplification (CSA) System K 1500 (Dako, Carpinteria, USA)

3.1.5 Chemikalien und Enzyme

Verwendete Chemikalien und Enzyme sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tab.6 – Chemikalien und Enzyme	
APS	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany)
Bromophenol Blue	(SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, USA)
Catalyzed Signal Amplification (CSA) System K 1500	(Dako, Carpinteria, USA)
Chloroform	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany)
Citronensäure	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany)
DAPI (4',6-Diamidine-2'-Phenylindole) dihydrochloride)	(Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
DNase I, RNase-free	(Fermentas Life Science, St. Leon-Rot, Germany)
dNTP Mix , 10mM each (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	(Fermentas Life Science, St. Leon-Rot, Germany)
Entellan® neu Schnelleindeckmittel für die Mikroskopie	(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
Eosin	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany)
Ethanol 70% und 96%	(Otto Fischar GmbH, Saarbrücken, Germany)
Ethanol 90% und 50%	selbst hergestellt
Ethanol absolute	(Otto Fischar GmbH, Saarbrücken, Germany)
Formaldehyd	(Otto Fischar GmbH, Saarbrücken, Germany)
Glycerol	(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
Glycin	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany)
Guanidine Hydrochloride	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany)
INTERFERin® siRNA Transfection Reagent	(Polyplus-transfection SA, Illkirch, France)
Isopropanol	(SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, USA)
Kristallviolett	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany)
Lipopolysaccharide (LPS)	(SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, USA)
Magermilchpulver	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany)
Mayers Hämalaunlösung	(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
(β)-Mercaptoethanol	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany)
Methanol	(SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, USA)
NaCl	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany)
Paraffin (Histo-Comp)	(Vogel, Gießen, Germany)
peqGOLD TriFast™ for the Extraction of RNA, DNA and Proteins	(peqlab, Erlangen, Germany)
Pierce® BCA Protein Assay Kit	(Thermo Scientific, Rockford, USA)
Pierce® ECL Plus Western Blotting Substrate	(Thermo Scientific, Rockford, USA)
Random Hexamer Primer (mixture of single stranded random hexanucleotides with 5' -and 3' hydroxyl ends)	(Fermentas Life Science, St. Leon-Rot, Germany)
RevertAid™ Reverse Transkriptase (+5x Buffer)	(Fermentas Life Science, St. Leon-Rot, Germany)
RiboLock™Rnase Inhibitor	(Fermentas Life Science, St. Leon-Rot, Germany)

Rotiphorese®Gel 30	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany)
Saccharose	(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
Salzsäure 25%	(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
SDS (Natriumlaurylsulfat)	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany)
TACS™ XTT Cell Proliferation Assay containing XTT Reagent, XTT Activator	(TREVIGEN®, Gaithersburg, USA)
10x TBS Roti®stock	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany)
TEMED	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany)
Thermo Scientific Absolute QPCR SYBER Green Fluorescein Mix	(ABgene®UK, Epsom, UK)
Tris	(ACROS, New Jersey, USA)
Tween®-20	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany)
Wasserstoffperoxide 30%	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany)
Xylol	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany)

3.1.6 Puffer und Gebrauchslösungen

Verwendete Puffer und Gebrauchslösungen sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tab. 7 – Puffer und Gebrauchslösungen	
<p>Blotting-Puffer in 1 l H₂O:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 3,03 g Tris - 14,41 g Glycin - 200 ml Methanol - 1 g SDS <p>Citratlösung in 1 l H₂O:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2,1 g Citronensäure <p>Laemmli-Puffer (4x) in 100 ml H₂O:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 3 g Tris (pH 6,8 mit HCl adjustiert) - 8 g SDS - 40 ml Glycerol <p>Laufpuffer in 1 l H₂O:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 3,03 g Tris - 14,41 g Glycin - 1 g SDS <p>Sammelgel-Mix (pro Gel):</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1,33 ml Rotiphorese®Gel 30 - 6,57 ml H₂O - 100 µl SDS 10% (= 10 g in 100 ml H₂O) - 2 ml Sammelgel-Puffer - 100 µl APS 10% (= 10 g in 100 ml H₂O) - 10 µl TEMED 	<p>Sammelgel-Puffer:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 61,00 g Tris (pH 6,8 mit HCl adjustiert) <p>1xTBS-T in 1 l H₂O (Western Blotting):</p> <ul style="list-style-type: none"> - 100 ml 10x TBS - 1 ml Tween-20 <p>TBS-T in 1 l H₂O (Immunzytologie):</p> <ul style="list-style-type: none"> - 7,88 g Tris (pH 7,6 mit HCl adjustiert) - 17,5 g NaCl - 1 ml Tween-20 <p>Trenngel-Mix (pro Gel):</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2,66 ml Rotiphorese®Gel 30 - 3,87 ml H₂O - 100 µl SDS 10% (= 10 g in 100 ml H₂O) - 3,3 ml Trenngel-Puffer - 50 µl APS 10% (= 10 g in 100 ml H₂O) - 10 µl TEMED <p>Trenngel-Puffer in 1 l H₂O:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 136,28 g Tris (pH 8,8 mit HCl adjustiert) - 300 g Sacharose

3.1.7 Software und Statistik

Die verwendete Software ist in Tabelle 8 aufgelistet. Alle statistischen Berechnungen wurden mit GraphPad Prism durchgeführt.

Tab. 8 – Software	
FluorChem 8900 Software	(Alpha Innotech, ProteinSimple, Santa Clara, USA)
GraphPad Prism	(GraphPad Prism Software, Inc., La Jolla, USA)
iQ5 Optical System Software	(Bio-Rad, Hercules, USA)
Microsoft Office 2010	(Microsoft Cooperation, Redmond, USA)
Wasabi! Imaging Software	(Hamamatsu Photonic System Corporation, Bridgewater, USA)
MR Grab 1.0	(Zeiss, Oberkochen, Germany)
AxioVision Viewer Software	(Zeiss, Oberkochen, Germany)

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Zellkulturtechniken

Die Zellkultivierung erfolgte im Brutschrank (HeraCell, Thermo Scientific, Rockford, USA) bei 37°C in einer Wasserdampf gesättigten 5%-CO₂-Atmosphäre. Das Zellwachstum wurde mit einem Lichtmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Germany) überprüft. Die Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank (LaminAir® HB2448, Thermo Scientific, Rockford, USA) durchgeführt. Diese wurde vor Beginn der Arbeit mit 70% Ethanol desinfiziert, ebenso wie sämtliche Materialien, die in die Werkbank eingebracht wurden. Verbrauchsmaterial, welches nicht vom Werk keimfrei geliefert wurde, wurde vor Gebrauch autoklaviert (Tuttnauer, Hauppauge, USA) (121°C, 20 min). Die in der Zellkultur verwendeten Medien, Puffer, Lösungen und Stimulanzien wurden je nach Produkt bei -20°C bis 4°C gelagert und vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht. Als Basisnährmedium wurde für alle vier Zelllinien RPMI 1640 Without L-Glutamine mit Zusatz von 10% Fetal Bovine Serum, 1% Stable Glutamine und 1% Penicillin/Streptomycin verwendet.

Subkultivierung

Aus Kulturgefäßen mit konfluenten Zellen wurde das Nährmedium abgesaugt. Zum Entfernen aller Medienreste wurde mit PBS gespült. Anschließend wurde eine Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben und das Kulturgefäß, bis ein Ablösen der Zellen beobachtet werden konnte, in den Brutschrank gestellt. Hierauf wurde das Trypsin durch Zugabe von Nährmedium inaktiviert und das Trypsin-Medium-Zell-Gemisch in ein Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation (Biofuge Stratos, Thermo Scientific, Rockford, USA) für 4 min bei 1400 U/min, 22°C wurde der Überstand abgesaugt und das verbliebene Zellpellet mit Medium resuspendiert. Zur Zellerhaltung wurde nun ein Teil der Zellen in einem neuen Kulturgefäß ausgesät und wiederum bis zur Konfluenz weiter kultiviert. Bei Bedarf wurde verbrauchtes Medium durch frisches ersetzt.

Zellzahlbestimmung

Für Versuche, bei denen eine bestimmte Zellzahl benötigt wurde, wurde bis zur Resuspension des Zellpellets identisch verfahren. Dann wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.2.1.2 Zellstimulation und Vorbereitung der mRNA- und Protein-Extraktion

Zellen, deren mRNA- und Protein-Expression später detaillierter untersucht werden sollten, wurden in Abhängigkeit von ihrer Wachstumsgeschwindigkeit mit einer Dichte von $2,5-3,0 \cdot 10^4$ Zellen/cm² ausgesät. Die jeweils gewählte Dichte wurde für die einzelnen Zelllinien beibehalten. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel und anschließend die Stimulation mit 1 µg/ml LPS oder einer CpG-ODN-INTERFERin® Mischung. INTERFERin®, ein kationisches, amphiphiles Lipid, wurde zur Transfektion von siRNA und miRNA entwickelt. In dieser Arbeit sollte durch Zugabe von INTERFERin® die Aufnahme von CpG-ODN in das Zellinnere begünstigt werden. Hierzu wurde zunächst CpG-ODN in einer Konzentration von 2,5 pmol/µl in RPMI 1640 Without L-Glutamine gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 37,5 µl/ml INTERFERin®. Bei den verwendeten Konzentrationen wurde hierbei das vom Hersteller empfohlene Mengenverhältnis von INTERFERin® zu Nukleinsäure berücksichtigt. Um die Komplexbildung zwischen CpG-ODN und INTERFERin® zu ermöglichen, wurde bei diesen Arbeitsschritten auf Mediumzusätze (FBS, Stable Glutamine, Penicillin/Streptomycin) verzichtet. Die CpG-ODN-INTERFERin® Suspension wurde für 10 s gevortext und anschließend für 10 bis maximal 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die in ihrem Basismedium ausgesäten Zellen mit der Suspension stimuliert, wobei eine Endkonzentration von 0,25 pmol/µl CpG-ODN erreicht wurde.

Zellen, die mit CpG-ODN und INTERFERin® stimuliert wurden, inkubierten für weitere 6 Stunden im Brutschrank, Zellen, die mit LPS behandelt wurden, für 24 Stunden. Alle Kontrollzellen erhielten, abgesehen von der Stimulation mit LPS oder CpG-ODN, eine identische Behandlung.

Nach der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und die Kulturgefäße auf Eis gelagert. TriFast™, ein Fertigreagenz zur Extraktion von DNA, RNA und Proteinen, wurde auf die Zellen pipettiert. Hierauf wurde das Reagenz-Zellen-Gemisch aus dem Kulturgefaß geschabt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Sofern nicht unmittelbar die Isolation von RNA oder Proteinen folgte, wurden die Proben bei -20°C gelagert.

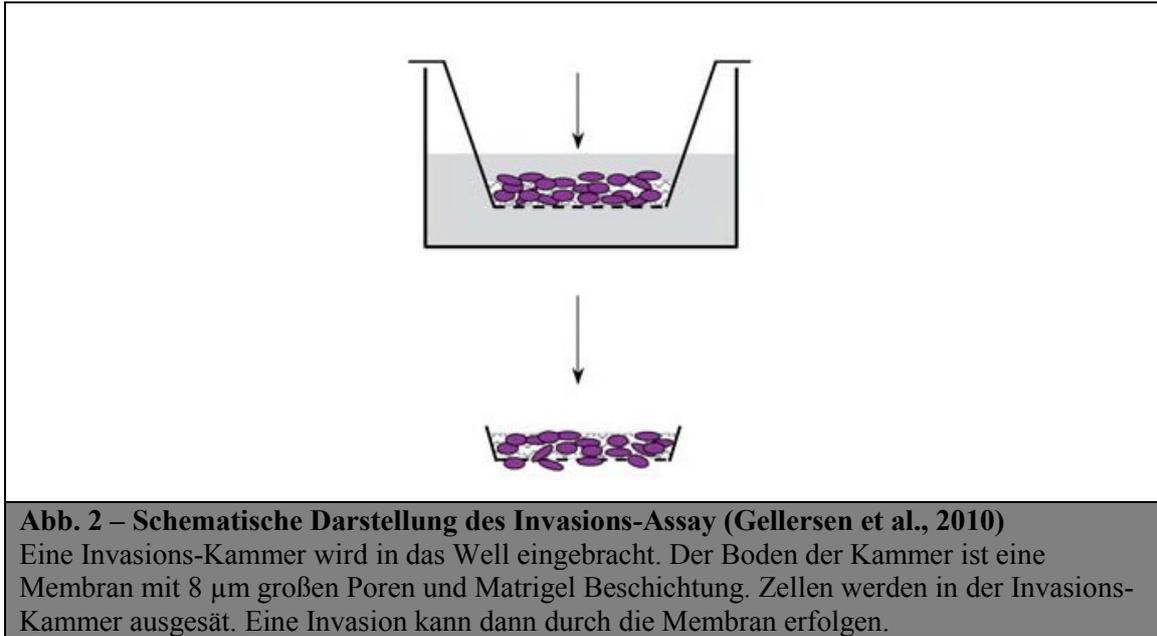
3.2.1.3 Zellproliferations-Assay

Die Zellproliferation wurde mit Hilfe des TACS® XTT-Kit bestimmt. Dessen Prinzip beruht darauf, dass XTT, ein leicht gelbliches Tetrazolium-Salz, durch das Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System in den Mitochondrien metabolisch aktiver Zellen zu Formazan reduziert wird. Die Absorption der nun orangefarbenen Formazanlösung kann dann bei 490 nm im Mikroplattenleser gemessen werden. Die Reaktion wird durch PMS (N-methyl dibenzopyrazin methyl sulfat), das im XTT Aktivator enthalten ist, optimiert. In dieser Arbeit wurden die Zellen zunächst in einer 96-Well Platte ausgesät. In den einzelnen Versuchen wurde jeweils mit der gleichen Zellzahl pro Well gearbeitet. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Zellen, wie unter 3.2.1.2. beschrieben, mit LPS bzw. komplexiertem CpG-ODN-INTERFERin® stimuliert. Stimulation mit freiem CpG-ODN erfolgte in einer Konzentration von 2,5 pmol/μl also verglichen mit der INTERFERin® Gruppe in 10-fach höherer Konzentration. Die verwendeten LPS- und CpG-ODN-Konzentrationen entsprachen generell den in anderen Arbeiten verwendeten Größenordnungen (Ayari et al., 2011; Merrell et al., 2006).

LPS-behandelte Zellen inkubierten für 48 Stunden, CpG-ODN- oder CpG-ODN-INTERFERin®-behandelte Zellen für 24 Stunden im Brutschrank. Nun wurde sämtliche Flüssigkeit aus den Wells abgesaugt. Ein Mischung aus XTT-Aktivator, XTT-Reagenz und RPMI 1640 With L-Glutamine, Without Phenol Red im Verhältnis 1:50:100 wurde vorbereitet. Hiervon wurde in jedes Well 500 μl pipettiert. Bei diesem Arbeitsschritt wurde farbloses Medium verwendet, um Interferenzen mit der photometrischen Messung zu vermeiden. Nach weiteren 4 Stunden Inkubation in Brutschrank wurde dann im Mikroplattenleser (MultiskanFK Thermo Scientific, Rockford, USA) die Absorption bei 490 nm gemessen.

3.2.1.4 Invasions-Assay

Die Zellinvasion wurde mit BD BioCoat™ Matrigel Invasion Chambers (BD, Franklin Lakes, USA) gemessen. Hierbei werden in eine 24-Well Platte zusätzliche Wells, sogenannte Invasions-Kammern, eingebracht. Diese besitzen nach dem Prinzip der Boyden-Kammer eine Membran mit 8 μm großen Poren. Zusätzlich ist diese Membran mit Matrigel, einer *in vitro* Basalmembran-Rekonstruktion beschichtet. Um die Invasion zu messen, werden die Zellen gezählt, die diese Membran durchdringen. Das Prinzip ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.



Die bei -20°C gelagerten Platten und Kammern wurden zunächst bei Raumtemperatur abgetaut. Um die Matrigel-Membran aufzuweichen, wurden sowohl obere, als auch untere Wells mit RPMI 1640 Without L-Glutamine befüllt und für 2 Stunden im Brutschrank erwärmt. Das verwendete Medium wurde anschließend abgesaugt. Nun wurde in die oberen Wells eine in jedem Well identische Zellzahl ausgesät. Als Nährmedium wurde RPMI 1640 Without L-Glutamine mit Zusatz von 1% Stable Glutamine und 1% Penicillin/ Streptomycin verwendet. Es folgte die Stimulation mit CpG-ODN, welches mit einer Konzentration von $2,5 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ ebenfalls den oberen Wells zugeführt wurde. Die unteren Wells wurden mit dem Basismedium RPMI 1640 Without L-Glutamine mit Zusatz von 10% Fetal Bovine Serum, 1% Stable Glutamine und 1% Penicillin/ Streptomycin befüllt.

Die Inkubation im Brutschrank erfolgte für 24 Stunden. Anschließend wurden die oberen Wells aus der Platte entnommen und das Medium entleert. Zellen im Inneren der Wells, welche die Membran nicht durchdringen konnten, wurden mit einem Wattestäbchen entfernt. Dann wurden die Wells zum Anfärben der Zellen für 5 min in Kristallviolett, gelöst in Formaldehyd, gegeben. Danach wurde mit Wasser gespült, die Innenseite der Wells erneut gesäubert und die Wells wurden zum Trocknen gelegt.

Die durch die Matrigel-Membran gedrunenen Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop gezählt.

3.2.1.5 Untersuchung der Aufnahme von CpG-ODN

UMUC3 (mit einer Dichte von $2,5 \cdot 10^4$ Zellen/cm²) und RT112 (mit einer Dichte von $2,0 \cdot 10^4$ Zellen/cm²) Zellen wurden in einem Chamber-Slide™ System (Sarstedt; Newton, USA) ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel und die Stimulation der Zellen mit Cy3-makiertem CpG-A mit und ohne INTERFERin®. Die Stimulation mit INTERFERin® erfolgte wie unter 3.2.1.2 beschrieben, die Stimulation mit Cy3-CpG-ODN erfolgte hier mit einer Konzentration von 0,25 pmol/μl, so dass letztendlich beide Kammern mit der identischen CpG-A-Konzentration behandelt wurden. Nach 6 Stunden wurden Medium und Kammerwände entfernt und der Objektträger für 15 min in einem DAPI-Methanol Gemisch (1 μg/ml) gebettet und danach getrocknet. DAPI ist ein Farbstoff, der zur Anfärbung von Zellkernen, bzw. Nukleinsäuren, verwendet wird. Auf den trockenen Objektträger wurde mit Schnelleindeckmittel für die Mikroskopie ein Deckglas geklebt. Anschließend wurde die Lage der Zellkerne sowie die Aufnahme von CpG-A ins Innere der Zelle unter dem Fluoreszenzmikroskop studiert.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 RNA-Isolation

RNA wurde aus dem Zell-TriFast™-Gemisch isoliert, dessen Herstellung unter 3.2.1.2 beschrieben ist. Chloroform, in einer Menge von 20% der schon im Röhrchen vorhandenen Flüssigkeit, wurde hinzu pipettiert. Die Mischung wurde intensiv geschüttelt und gevortext, so dass ein milchiges Homogenat entstand. Durch 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und anschließende Zentrifugation (Biofuge fresco, Thermo Scientific, Rockford, USA) (10 min, 12000 g, 4°C) teilte sich das Homogenat in eine untere, rötliche, organische Phase, eine weißliche Interphase und eine obere, farblose, wässrige Phase. RNA war nun ausschließlich in der wässrigen Phase enthalten, DNA in der organischen Phase und der Interphase und Proteine nur in der organischen Phase. Die wässrige Phase wurde nun in ein neues Röhrchen überführt, die Interphase verworfen und die organische Phase bei -20°C gelagert, um daraus gegebenenfalls Proteine zu isolieren. Um die RNA aus der wässrigen Phase auszufällen, wurde eine identische Menge eiskalten Isopropanols zugefügt, gut geschüttelt und gevortext, 15 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (10 min, 12000 g, 4°C). Hierdurch formte sich am Boden des Röhrchens ein RNA-haltiges Pellet. Der

Überstand wurde vorsichtig abgekippt und das Pellet zweimal mit eiskaltem 75% Ethanol gewaschen. Hierzu wurde das Pellet, nach Zufügen des Ethanols, durch Klopfen vom Röhrchenrand gelöst. Dann wurde wiederum zentrifugiert (10 min, 12000 g, 4°C) und der Überstand vorsichtig entfernt. Nachdem durch Lufttrocknen alle am Pellet vorhandenen Ethanolreste verdampft waren, wurde das Pellet mit destilliertem Wasser resuspendiert. Nach Lagerung bei -20°C für mindestens 24 Stunden erfolgte dann die Bestimmung des RNA-Gehalts mit dem Spectrophotometer (GeneQuant 1300, Fisher Scientific, Pittsburgh, USA).

3.2.2.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Zur Transkription der RNA in cDNA wurde 1µg RNA pro Probe verwendet. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Um eventuelle DNA-Kontamination zu vermeiden, wurden zunächst die RNA, 1µl DNase und Wasser zu einem Gesamtvolumen von 11,5 µl vermischt und für 30 min bei 37°C und 5 min bei 75°C im Thermo Cycler (PTC-200, MJ Research, St. Bruno, Canada) inkubiert. Als nächstes wurde den Proben 1µl Random Primer zugeführt und erneut für 5 min bei 65°C inkubiert. Es folgten 4µl 5*Puffer, 2µl dNTPs, 0,5µl RNase-Inhibitor und 1µl Reverse Transkriptase pro Probe, wobei Negativ-Kontrollen anstelle der Reversen Transkriptase Wasser zugeführt wurde. Nach weiteren 10 min bei 25°C und 60 min bei 42°C wurden die Proben schließlich für 10 min auf 70°C erhitzt, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren.

3.2.2.3 Real-Time-PCR

Mit der Polymerase-Ketten-Reaktion wurden nun selektiv cDNA-Abschnitte amplifiziert und quantifiziert. Hierbei lagern sich Primer komplementär an den Randbereich der zu amplifizierenden Sequenz an, welche dann durch eine thermostabile Polymerase dupliziert wird. Nun folgen Zyklen der DNA-Denaturierung, Anlagerung der Primer und DNA-Synthese, wodurch eine exponentielle Vermehrung der Zielsequenz erreicht wird. Durch Messung der Fluoreszenzintensität eines in doppelsträngiger DNA interkalierenden Farbstoffes, hier SYBR Green, kann während der PCR kontinuierlich die Produktmenge quantifiziert werden. Der Punkt, an dem das Fluoreszenzsignal signifikant höher ist als der Fluoreszenzhintergrund, wird als Ct-Wert (Threshold-Cycle) bezeichnet. Je mehr Matrizen-DNA zu Beginn der Reaktion bereits vorhanden ist, desto weniger Zyklen werden benötigt, um diesen Punkt zu erreichen.

In eine 96-Well Platte wurden pro Well 1µl Probe, 12,5µl SYBR Green, 11µl H₂O und jeweils 0,25µl Vorwärts- und Rückwärts-Primer der unter 3.1.3 aufgeführten Primerpaare pipettiert. Konditionen im Cycler (IQ™5 Bio-Rad, Hercules, USA) waren wie folgt:

Zyklus 1: 15 min auf 95°C

Zyklus 2: 44 mal 15 s auf 95°C, 15 s auf 55°C, 30 s auf 72°C

Zyklus 3: 30 s auf 95°C, 30 s auf 60°C

Zyklus 4: Temperaturerhöhung von 55°C auf 95°C in Schritten von 0,5°C à 10 s

Als Referenz-mRNA für alle PCR-Reaktionen diente β-actin. Relative Veränderungen der mRNA-Expression wurden mit der ΔCt-Methode ermittelt. Unterschiede in der mRNA-Expression stimulierter und nicht stimulierter Zellen wurden mit dem ΔΔCt-Wert dargestellt. Um die Validität der Ct-Werte zu garantieren, wurde für jede Probe eine Melting-Curve-Analyse durchgeführt. Einige wenige Proben wiesen in dieser Analyse eindeutig einen spezifischen Peak auf, selbiger wurde aber durch unspezifische Peaks überlagert. Für diese Proben wurde ein Ct-Wert angenommen, der dem niedrigsten real detektierbaren Ct-Wert des jeweiligen Primerpaares abzüglich 0,01 entsprach. So konnte eine statistische Auswertung auch dieser Proben gewährleistet werden.

3.2.3 Biochemische Methoden

3.2.3.1 Proteinisolation

Die Röhrenchen mit der organischen Phase aus 3.2.2.1. wurden bei RT abgetaut. 100% Ethanol, in einer Menge von 30% der schon im Röhrenchen vorhandenen Flüssigkeit, wurde hinzu pipettiert. Nach 3-minütiger Inkubation bei RT und Zentrifugation (5 min, 2000 g, 4°C) wurde der Überstand in ein 2 ml Röhrenchen überführt, mit 1,3 ml Isopropanol vermischt und zentrifugiert (20 min, 12000 g, 4°C). Anschließend wurde der Überstand verworfen. Das nun im Röhrenchen verbleibende Protein-Pellet wurde dreimal gewaschen. Zweimal mit einer 0.3 M Guanidin Hydrochlorid 95% Ethanol-Lösung und einmal mit 100% Ethanol. Es wurde jeweils für 20 min bei RT inkubiert, dann zentrifugiert (5 min, 8000 g, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Protein-Pellet wurde anschließend für 10 min bei RT getrocknet und hierauf mit Hilfe von Ultraschall-Zertrümmerung (Labsonic U, Braun, Melsungen, Germany) in 100 µl Laemmli-Puffer gelöst.

3.2.3.2 Proteinkonzentrations-Messung

Das BCA-Protein Assay wurde benutzt, um die Proteinkonzentration zu bestimmen. Hier wird die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine in alkalischem Medium (Biuretreaktion) kombiniert mit der Bestimmung von Kupferkationen (Cu^{1+}) durch Bicinchoninic Säure (BCA). Chelatbildung zweier BCA-Moleküle mit einem Kupferkation ergibt ein lila-farbenes Reaktionsprodukt. Die Absorption dieses wasserlöslichen Komplexes kann bei 562 nm gemessen werden und ist zur Proteinkonzentration nahezu linear.

Zunächst wurden aus bovinem Serumalbumin und H_2O Verdünnungsreihen sogenannte Standardproben mit bekannter Proteinkonzentration zwischen 0-2000 $\mu\text{g/ml}$ hergestellt. Als Nächstes wurde das BCA-Arbeitsreagenz vorbereitet, indem BCA-Reagenz A und BCA-Reagenz B im Verhältnis 50:1 miteinander vermischt wurden. Im nächsten Schritt wurden jeweils 25 μl der Standardproben und der Testproben in eine 96-Well-Platte pipettiert und mit 200 μl des Arbeitsreagenz versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C wurde die Absorption im Mikroplattenleser gemessen. Mit den Werten der Standardprobe wurde eine Standardkurve erstellt und so die Proteinkonzentration der Testproben bestimmt.

3.2.3.3 Western Blotting

Hierbei handelt es sich um eine Technik zur Detektion spezifischer Proteine. Denaturierte Proteine werden mittels Gelelektrophorese nach Länge der Polypeptide aufgetrennt und anschließend auf eine Membran überführt. An das Zielproteine erfolgt die spezifische Bindung eines Primärantikörpers, an welchen sich wiederum mehrere Sekundärantikörper binden, die schließlich durch ein Chemilumineszenz detektiert werden.

Zuerst wurden die Proteinproben mit je 2 μl Bromophenol-Blue und β -Mercaptoethanol gemischt und dann für 30 min bei 37°C und 10 min bei 85°C inkubiert.

8% Polyacrylamid-Gel wurde ins Gelglas (Bio-Rad, Herkules, USA) gegossen. Das Glas wurde zu 4/5 mit Trenngel-Mix befüllt und nach dessen Polymerisation mit Sammelgel-Mix aufgefüllt. Mit Kämmen (Bio-Rad, Herkules, USA) wurden im Sammelgel Taschen zum Laden der Proteinproben geformt. Die beladenen Gele wurden in die mit Laufpuffer befüllte Elektrophorese-Kammer (Bio-Rad, Herkules, USA) gestellt und zunächst für 30 min an 60 V angeschlossen. Dann wurde die Spannung auf 120 V erhöht und zwar so lange, bis Bromophenol-Blue an das Ende des Trenngels lief.

Die aufgetrennten Proteine wurden im Elektrobloetter (Bio-Rad, Herkules, USA) von dem Polyacrylamid-Gel auf eine Polyvinylidene Fluoride (PVDF) Membran (Millipore, Bedford, USA) übertragen. Dabei wurde die PVDF-Membran vor Gebrauch mit Methanol aktiviert und dann in Blotting-Puffer gewaschen. Filterpapier (Schleicher&Schuell GmbH, Dassel, Germany) wurde ebenfalls in Blotting-Puffer eingelegt. Drei Lagen Filterpapier, die PVDF-Membran und das Gel, gefolgt von weiteren drei Lagen Filterpapier, wurden auf dem Blotter (Bio-Rad, Hercules, USA) platziert und mit 200 ml Blotting-Puffer übergossen. Mit einer Stromstärke von 0,08 A pro Gel wurde für 90 min geblottet.

Hierauf wurde die Membran für eine Stunde bei RT mit TBS-T-Milch 5% (= 5 g Milchpulver in 100 ml TBS-T) geblockt und dann für eine Nacht bei 4°C in, in Milch gelöstem Primärantikörper (anti-TLR-9-Antikörper, Verdünnung 1:250), inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit TBS-T für 10 min wurden ungebundene Primärantikörper von der Membran entfernt. Es folgte die Inkubation im Dunklen mit in Milch gelöstem Sekundärantikörper für 2 Stunden bei RT und erneut dreimaliges Waschen mit TBS-T. Zur Detektion der Proteinbande wurde die Membran für 3 min in ECL gebettet und dann im Imager (FluorChem™ 8900 Alpha Innotech, ProteinSimple, Santa Clara, USA) fotografiert.

3.2.4 Immunzytologie

Die Immunzytologie wurde mit dem DAKO® Catalyzed Signal Amplification (CSA) System durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine extrem sensitive immunzytologische Färbemethode zur Sichtbarmachung spezifischer Proteine. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass im ersten Schritt der primäre Maus-Antikörper (hier TLR-4) mit einem biotinylierten, sekundären Antikörper detektiert wird. Im nächsten Schritt bindet ein Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex via Streptavidin an den biotinylierten, sekundären Antikörper. Die Peroxidase katalysiert nun die Anlagerung von biotinyliertem Phenol. Sie amplifiziert damit die Anzahl der Biotinmoleküle, an die das folgende Reagenz, nämlich Streptavidin-Peroxidase, binden kann. Abschließend wird das Präparat mit Diaminobenzidintetrahydrochlorid gefärbt, welches dem untersuchten Antigen eine bräunliche Farbe verleiht.

Zunächst wurden die Zellen in Paraffin geblockt. Ein Zellpellet, hergestellt wie unter Punkt 3.2.1.1. beschrieben, wurde für 30 min in 4% gepuffertes Formaldehyd gebettet. Nach Zentrifugation (10 min, 1000 U/min, RT) wurden der Überstand verworfen und

zur Sichtbarmachung Eosin auf das Pellet getropft. Es folgte die Dehydratation der Zellen, indem das Pellet jeweils für 10 min zweimal in H₂O, einmal in 50% Ethanol, einmal in 70% Ethanol, einmal in 90% Ethanol, einmal in 100% Ethanol und zweimal in Xylol gebettet wurde. Zwischen den einzelnen Schritten wurde zentrifugiert (10 min, 1000 U/min, RT) und der Überstand wurde verworfen. Nun wurde das Zellpellet mit einem Schaber in ein Gläschen überführt und zweimal mit 60°C heißem Paraffin übergossen und anschließend für 30 min bei gleicher Temperatur im Brutschrank gelagert. Nach Entfernung des überschüssigen Paraffins wurde das Paraffin-Zellpellet zum Ausblocken in ein Ausgießschälchen überführt. Der Paraffin-Zellblock wurde bei -20°C gelagert und später in noch kaltem Zustand im Mikrotom (RM2155, Leica Microsystem GmbH, Wetzlar, Germany) geschnitten. Der Schnitt wurde in 30% Ethanol aufgefangen und dann in ein warmes Wasserbad (Medax GmbH, Neumünster, Germany) überführt. Hier wurde der Schnitt mit dem Objektträger aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur zum Trocknen gelegt.

Vor dem Färben wurde der Objektträger für 30 min bei 60°C im Brutschrank aufgewärmt und die Probe wurde anschließend rehydriert und entparaffiniert. Hierzu wurde der Objektträger dreimal 10 min in Xylol, zweimal 5 min in 100% Ethanol, zweimal 5 min in 96% Ethanol, zweimal 5 min in 70% Ethanol und zweimal 5 min in H₂O gebettet. Anschließend wurde das Präparat für 20 min im Dampfgerät (MultiGourmet, Braun, Melsungen, Germany) mit Citratlösung behandelt und nach Abkühlen bei RT für 5 min mit TBS-T gewaschen.

Nun wurde die Färbung nach oben beschriebenem Prinzip streng nach Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei eine Primärantikörperkonzentration von 1:100 verwendet wurde.

Nachdem die gefärbten Präparate getrocknet waren, erfolgte die Gegenfärbung. Hierzu wurde das Präparat für 20 s in Hämaun gebadet und anschließend unter fließenden, lauwarmen Wasser 5 min gebläut. Es folgte die Dehydratation, indem das Präparat zweimal für 2 min in 70% Ethanol, zweimal 2 min in 96% Ethanol, zweimal 2 min in 100% Ethanol und dreimal 5 min in Xylol gebettet wurde. Zuletzt wurde ein Deckgläschen mit Schnelleindeckmittel auf dem Objektträger befestigt.

4. Ergebnisse

4.1 Expression von Toll-like Rezeptoren

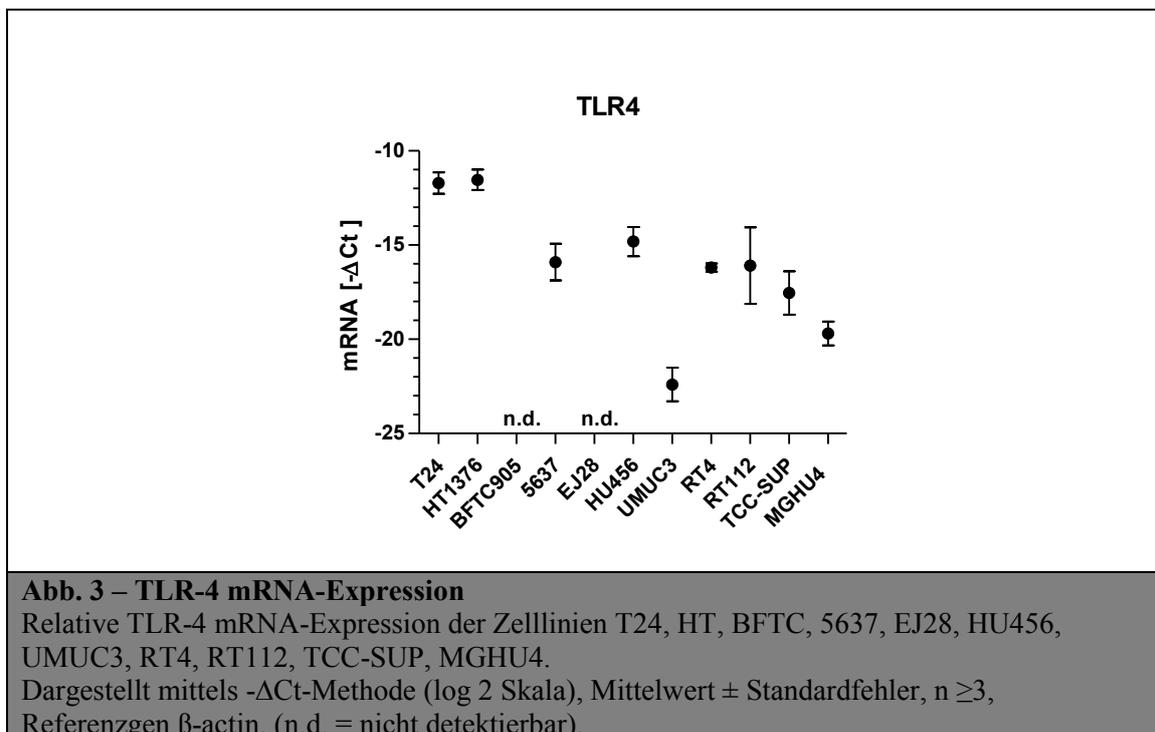
Zunächst sollte untersucht werden, inwieweit die Harnblasenkarzinomzelllinien T24, HT, BFTC-905, 5637, EJ28, HU456, UMUC3, RT4, RT112, TCC-SUP und MGHU4 TLR-4 und TLR-9 mRNA exprimieren. Dies wurde mittels RT-PCR bestimmt. Exemplarisch wurden 4 Zelllinien für alle weiteren Versuche gewählt. An ihnen wurde die Toll-like Rezeptor-Expression auch auf Proteinebene untersucht. Für TLR-4 erfolgte dabei aus methodischen Gründen der Nachweis mittels Immunzytologie und für TLR-9 mittels Western Blot.

4.1.1 TLR-4 und TLR-9 mRNA-Expression

4.1.1.1 TLR-4 mRNA-Expression

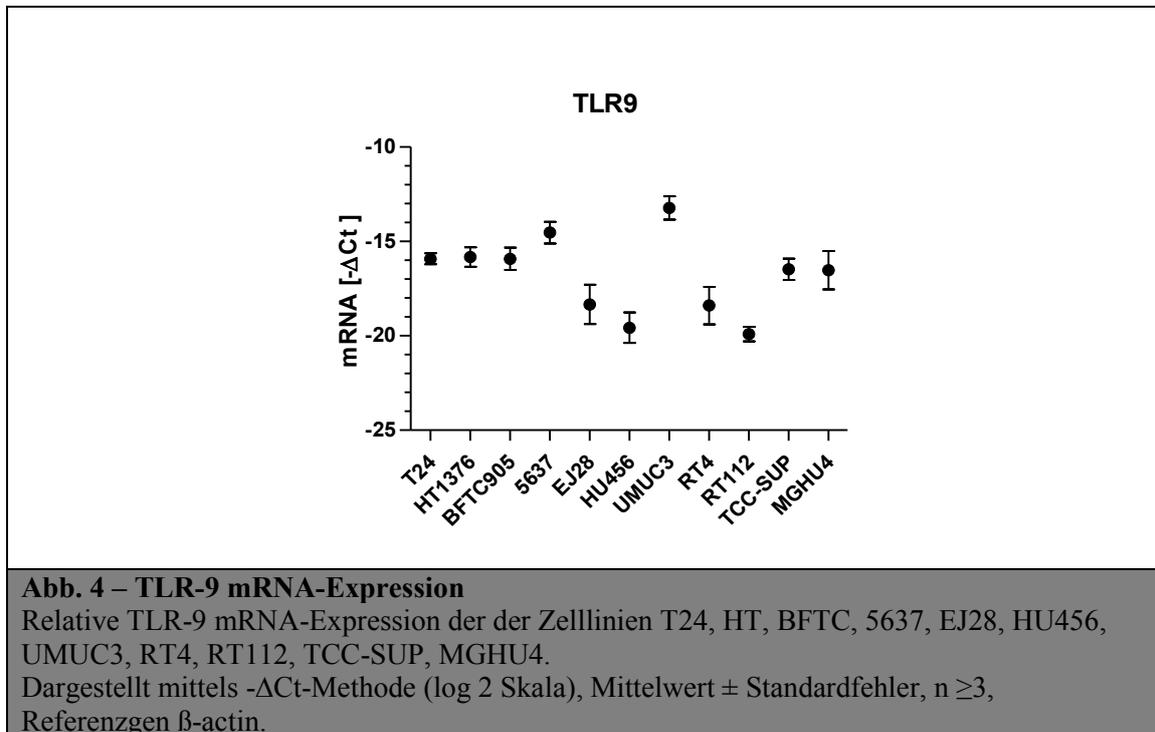
Mittels RT-PCR wurde die TLR-4 mRNA-Expression der Zelllinien bestimmt. Zwei der untersuchten Zelllinien, BFTC und EJ28, exprimierten keine TLR-4 mRNA. Alle anderen untersuchten Zelllinien exprimierten TLR-4 mRNA, allerdings auf sehr unterschiedlichem Niveau. T24 und HT exprimierten am meisten TLR-4 mRNA.

Für alle weiteren Untersuchungen wurden exemplarisch die Zelllinien T24 und BFTC gewählt (Abbildung 3).



4.1.1.2 TLR-9 mRNA-Expression

Die TLR-9 mRNA-Expression wurde ebenfalls mittels RT-PCR untersucht. Alle untersuchten Zelllinien exprimierten TLR-9, UMUC3 auf sehr hohem Niveau, RT112 auf niedrigem Niveau. Diese beiden Zelllinien wurden daher exemplarisch für weitere Untersuchungen gewählt (Abbildung 4).



4.1.2 Immunzytologischer TLR-4-Nachweis

Die Expression von TLR-4 auf Proteinebene wurde immunzytologisch nachgewiesen.

Untersucht wurden die Zelllinien T24, BFTC, UMUC3 und RT112.

Die TLR-4-Proteinexpression entsprach der mRNA-Expression. In den Zelllinien T24, UMUC3 und RT112 konnte TLR-4 detektiert werden. In der Zelllinie BFTC konnte kein TLR-4 nachgewiesen werden (Abbildung 5).

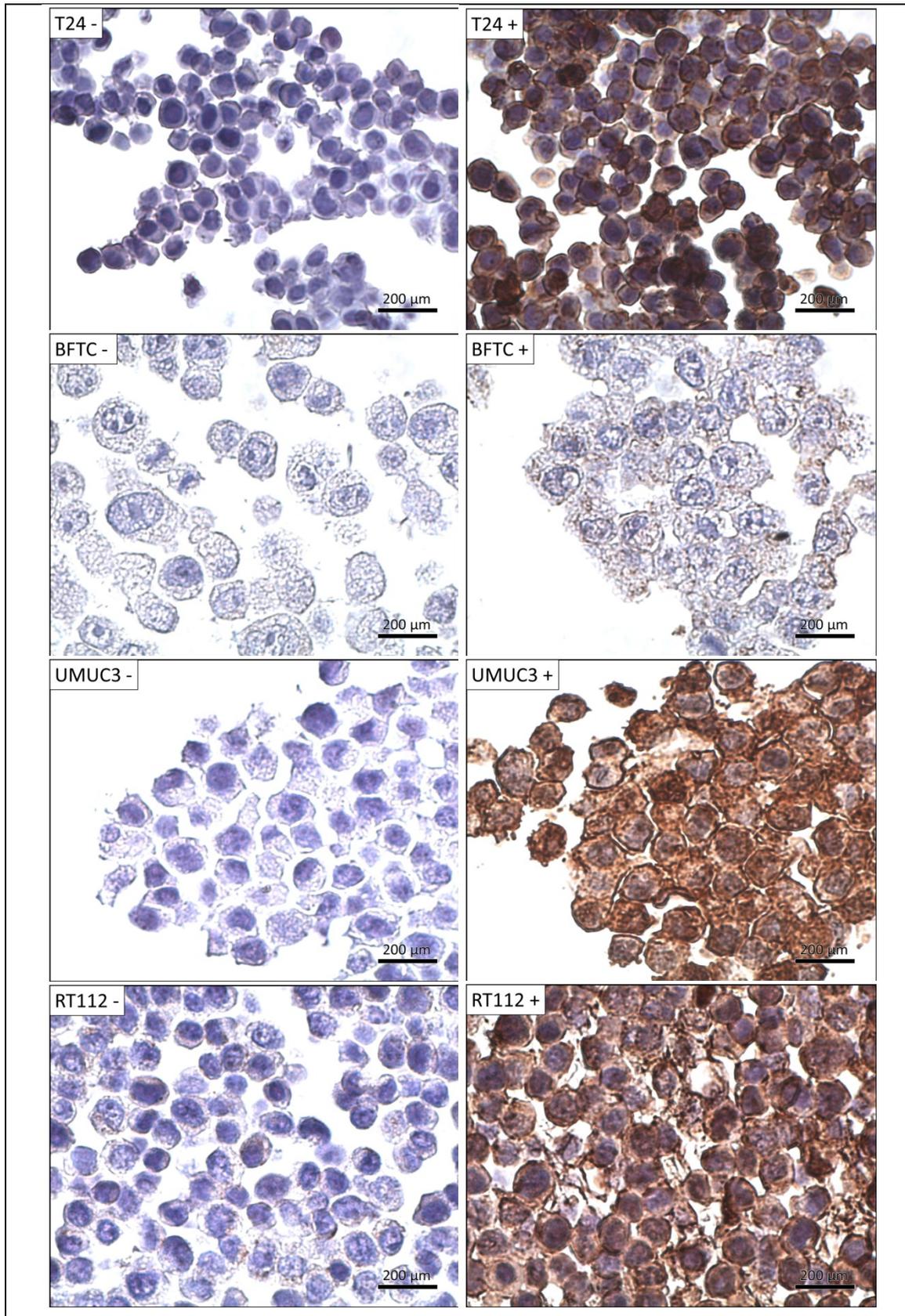


Abb. 5 – Immunzytologischer TLR-4-Nachweis

Immunfärbung der Zelllinien T24, BFTC, UMUC3 und RT112.

“-“ = Färbung ohne Primärantikörper Anti-TLR-4, “+“ = Färbung mit Primärantikörper Anti-TLR-4.

4.1.3 TLR-9-Nachweis mittels Western Blot

Die Expression von TLR-9 auf Proteinebene wurde mittels Western Blot untersucht.

Die TLR-9-Proteinexpression entsprach ebenfalls der mRNA-Expression.

Alle vier untersuchten Zelllinien wiesen eine positive Bande im Bereich von 130 kDA auf. Dies entspricht in Übereinstimmung mit den Angaben des Herstellers der TLR-9-Bande. Für RT112 ließ sich im Vergleich mit den anderen Zelllinien aber nur eine deutlich schwächere Bande nachweisen. Daraus kann gefolgert werden, dass diese Zelllinie weniger TLR-9 exprimierten. Für UMUC3 konnte die stärkste Bande detektiert werden. Die Bande für T24 stellte sich ein wenig schwächer dar, als die für BFTC.

Zur Kontrolle wurde β -actin nachgewiesen. Für alle vier Zelllinien konnten hier ähnlich starke Banden detektiert werden (Abbildung 6).

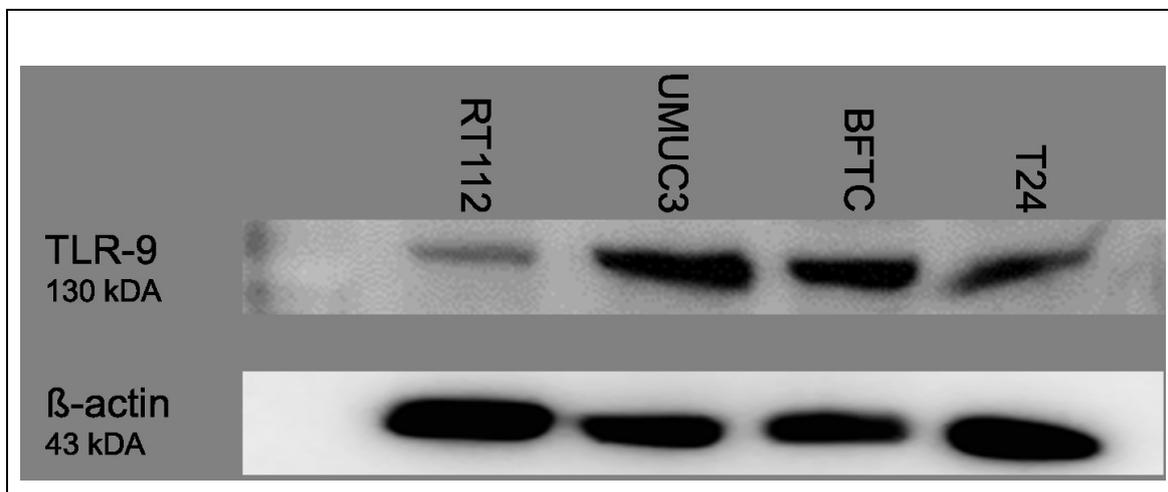


Abb. 6 – TLR-9-Nachweis mittels Western Blot

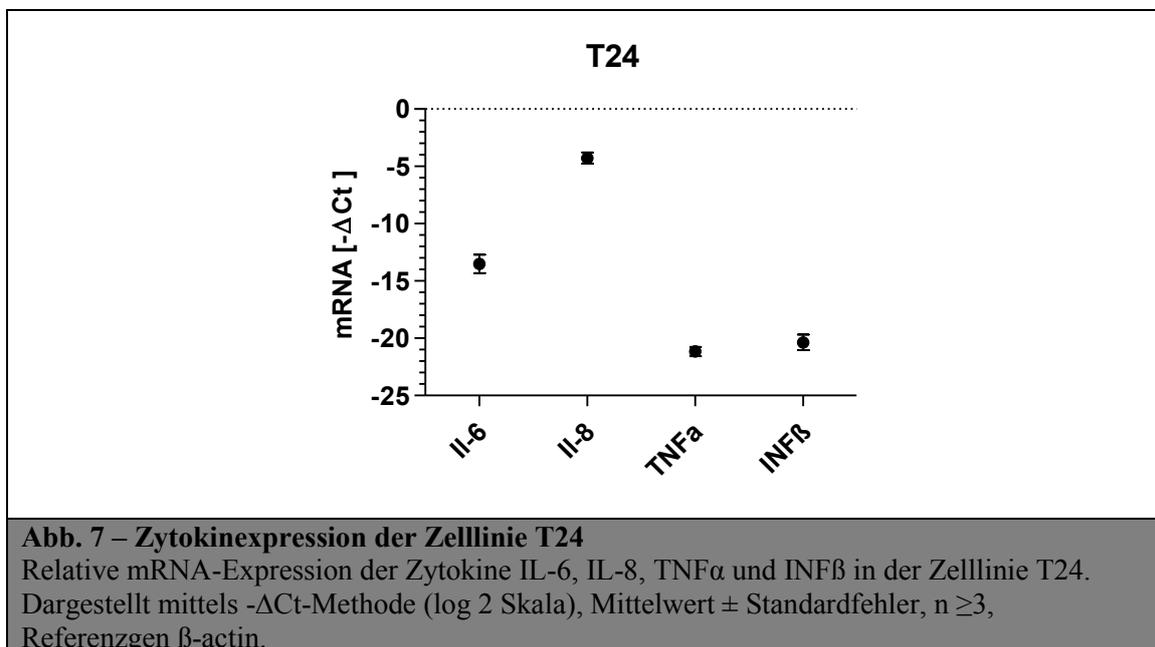
In allen vier Zelllinien konnte auf einer Höhe von 130 kDA eine Bande mit unterschiedlicher Dichte nachgewiesen werden. Dies entspricht dem Molekulargewicht von TLR-9. Auf Höhe von 43 kDA, entsprechend dem Molekulargewicht von β -actin, konnte in allen Zelllinien eine Bande mit ähnlicher Dichte detektiert werden.

4.2 Expression von Zytokinen in nicht-stimulierten Zelllinien

Nachdem die Expression von Toll-like Rezeptoren untersucht und nachgewiesen wurde, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob nicht-stimulierte Zellen Zytokin mRNA exprimieren und es wurde das Level selbiger bestimmt.

4.2.1 Zytokinexpression der Zelllinie T24

Die Harnblasenkarzinomzelllinie T24 exprimierte IL-8 auf hohem Niveau. Auch IL-6 wurde deutlich exprimiert. TNF α und INF β wurden zwar exprimiert, allerdings auf sehr niedrigem Niveau am Rande der Nachweisgrenze (Abbildung 7).



4.2.2 Zytokinexpression der Zelllinie BFTC

Die Harnblasenkarzinomzelllinie BFTC produzierte ebenfalls am meisten IL-8 mRNA. Auch IL-6, TNF α und INF β wurden auf niedrigem Niveau exprimiert (Abbildung 8).

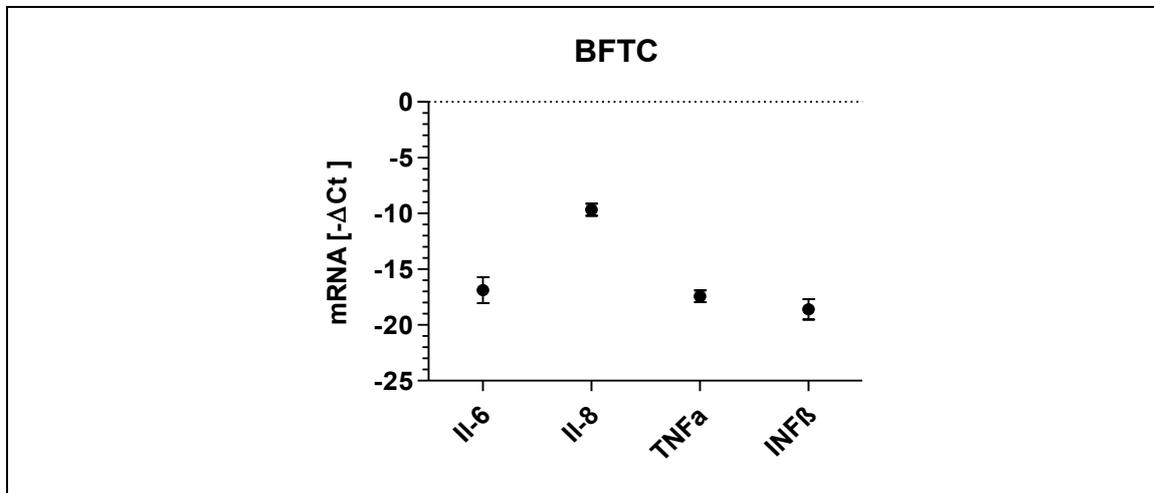


Abb. 8 – Zytokinexpression der Zelllinie BFTC

Relative mRNA-Expression der Zytokine IL-6, IL-8, TNF α und INF β in der Zelllinie BFTC. Dargestellt mittels $-\Delta\text{Ct}$ -Methode (log 2 Skala), Mittelwert \pm Standardfehler, $n \geq 3$, Referenzgen β -actin.

4.2.3 Zytokinexpression der Zelllinie UMUC3

Die Harnblasenkarzinomzelllinie UMUC3 exprimierte viel IL-8 und wenig TNF α und INF β . Die Expression von IL-6 befand sich am Rande der Nachweisgrenze.

Die beiden Angiogenesefaktoren, VEGF-A und PIGF, wurden auf verhältnismäßig hohem Niveau exprimiert, wobei mehr VEGF-A exprimiert wurde (Abbildung 9).

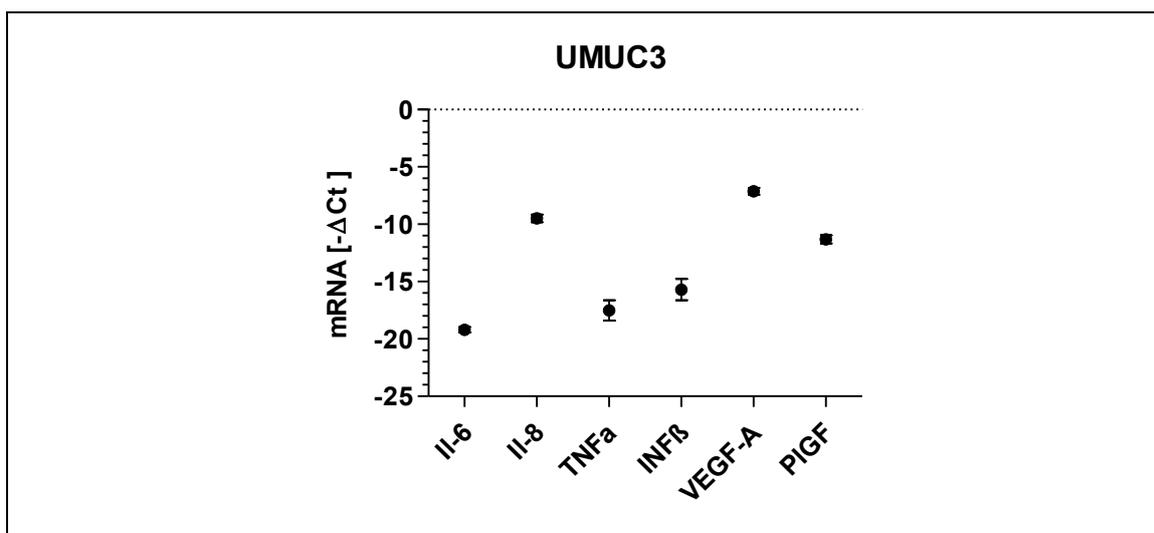
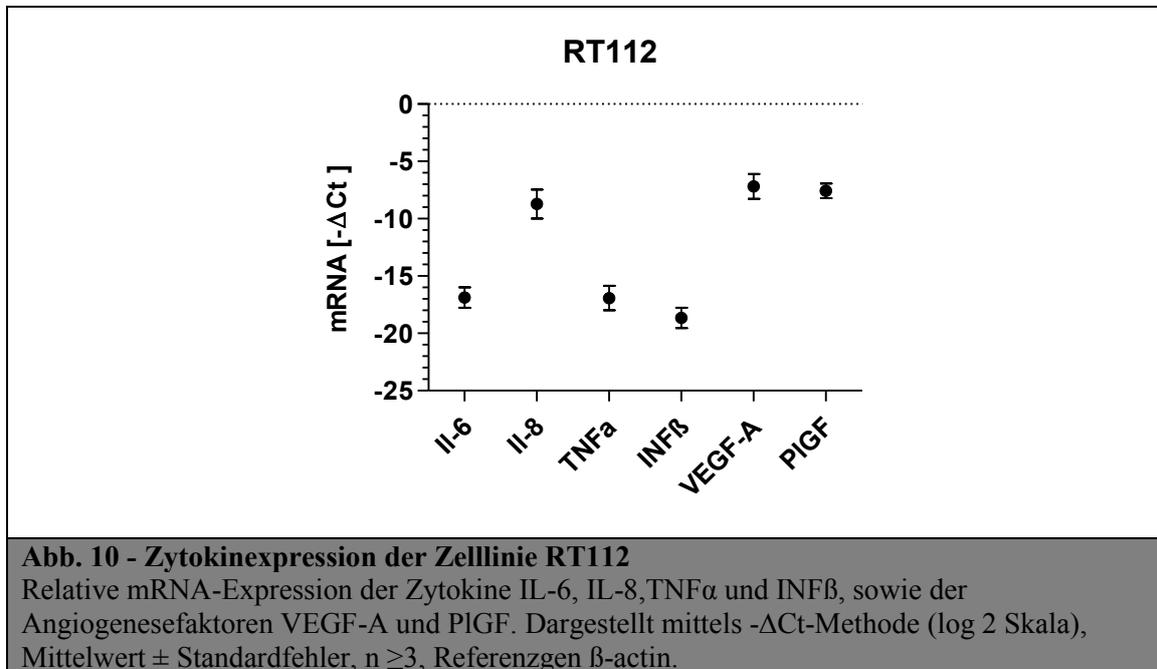


Abb. 9 – Zytokinexpression der Zelllinie UMUC3

Relative mRNA-Expression der Zytokine IL-6, IL-8, TNF α , INF β , sowie der Angiogenesefaktoren VEGF-A und PIGF. Dargestellt mittels $-\Delta\text{Ct}$ -Methode (log 2 Skala), Mittelwert \pm Standardfehler, $n \geq 3$, Referenzgen β -actin.

4.2.4 Zytokinexpression der Zelllinie RT112

Die Harnblasenkarzinomzelllinie RT112 exprimierte IL-8 auf relativ hohem Niveau, IL-6, TNF α und INF β auf eher niedrigem Niveau. Die Angiogenesefaktoren VEGF-A und PlGF wurden ebenfalls eher auf hohem Niveau exprimiert (Abbildung 10).

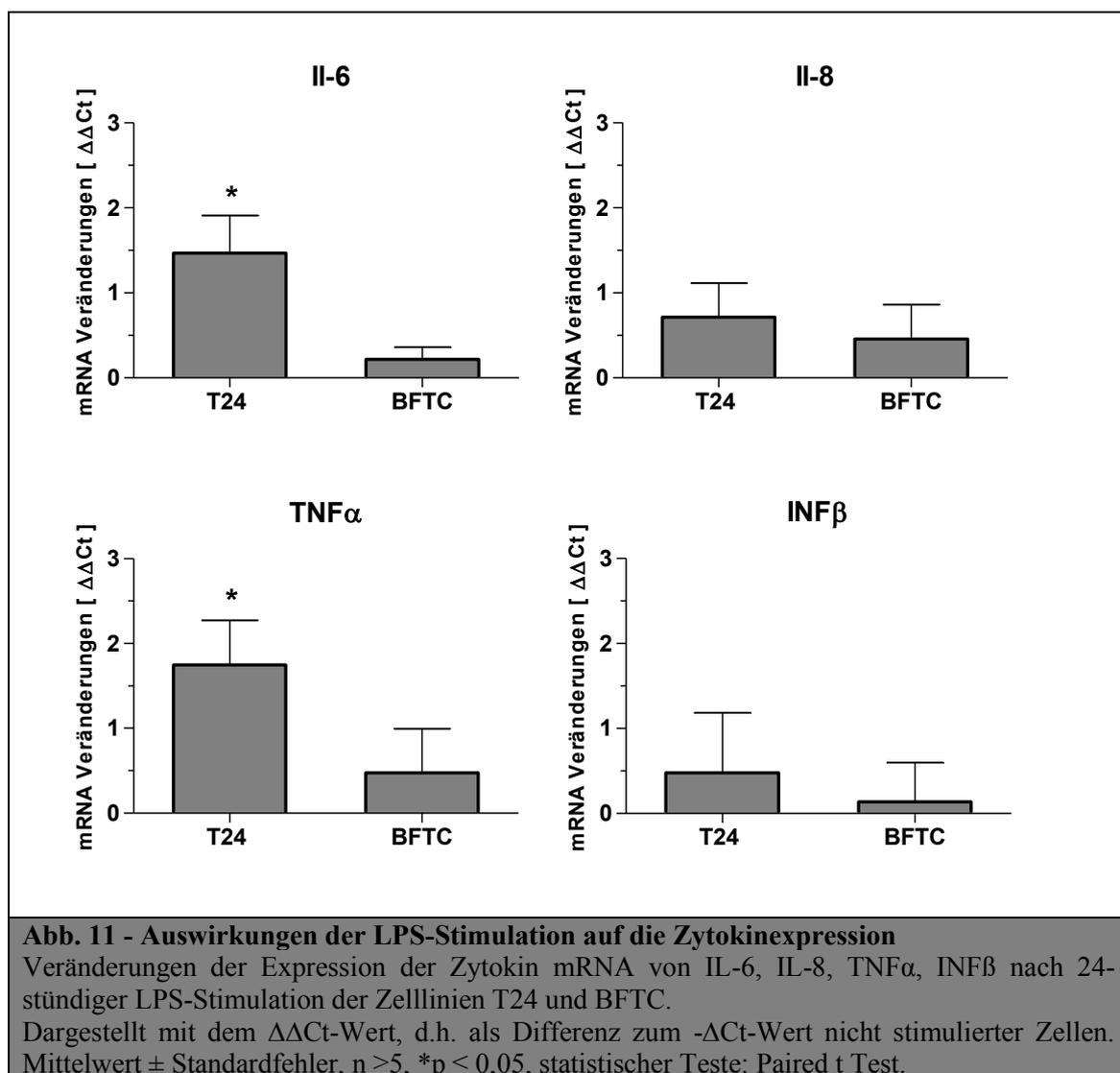


4.3 LPS-Effekte auf die Zelllinien T24 und BFTC

Zur Untersuchung der durch LPS-Stimulation ausgelösten Effekte wurden die Zelllinien T24 und BFTC ausgewählt, da hier die Unterschiede in der TLR-4-Expression, wie unter Punkt 4.1.1.1 beschrieben, sehr deutlich waren. BFTC exprimierte überhaupt keine TLR-4 mRNA, T24 auf mittlerem Niveau.

4.3.1 Auswirkungen der LPS-Stimulation auf die Zytokinexpression

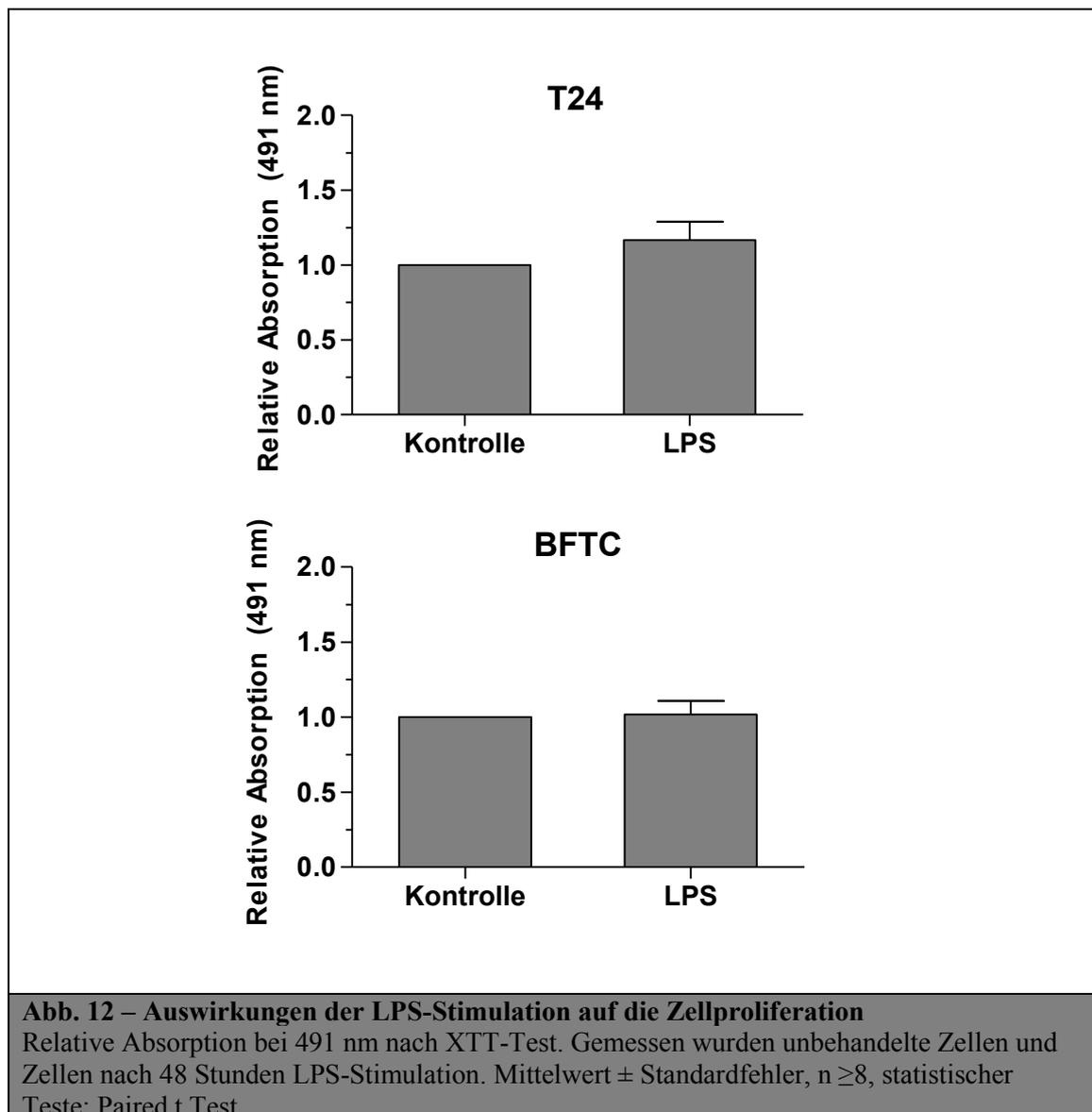
Um die direkte Auswirkung von LPS auf die Zytokinexpression der Blasenzelllinien T24 und BFTC zu untersuchen, wurden diese für 24 Stunden mit LPS stimuliert. Jeweils eine Probe wurde nicht mit LPS stimuliert, ansonsten aber identisch behandelt. Sie diente als Kontrolle, um die Veränderungen in der Zytokinexpression zu ermitteln. Diese Veränderungen sind in Abbildung 11 dargestellt.



Durch LPS-Stimulation wurden die IL-6- und die TNF α -Expression in der TLR-4 reichen Zelllinie T24 signifikant erhöht. Die Expression von IL-8 und INF β erhöhte sich nicht signifikant. In der Zelllinie BFTC, die keine TLR-4 mRNA exprimiert, führte die LPS-Stimulation zu keiner signifikanten Veränderung der Zytokinexpression.

4.3.2 Auswirkungen der LPS-Stimulation auf die Zellproliferation

Die Auswirkungen der LPS-Stimulation auf die Zellproliferation, bzw. auf das Zellüberleben, wurden mit dem XTT-Test untersucht. LPS-Stimulation erfolgte für 48 Stunden. Die Kontrollzellen erhielten abgesehen von der LPS-Stimulation eine identische Behandlung. Wie in Abbildung 12 gezeigt wird, hatte die LPS-Stimulation keine signifikanten Effekte auf die Zellproliferation der Zelllinie T24. Selbiges gilt für die Zelllinie BFTC.



4.4 CpG-ODN-Effekte auf die Zelllinien UMUC3 und RT112

Zur Untersuchung der durch CpG-ODN-Stimulation ausgelösten Effekte wurden die Zelllinien UMUC3 und RT112 ausgewählt. Die Unterschiede in der TLR-9 mRNA-Expression waren bei diesen beiden Zelllinien, wie unter den Punkten 4.1.1.2. beschrieben, sehr deutlich.

Um detaillierten Aufschluss über mögliche CpG-ODN-Effekte zu erhalten, wurde sowohl mit CpG-A, als auch mit CpG-B gearbeitet. Es zeigte sich, dass mögliche Effekte durch Transport der CpG-ODNs mit INTERFERin® in das Zellinnere verstärkt werden konnten. Diese Methode wurde daher, falls erforderlich, zur Effektverstärkung verwendet.

4.4.1 CpG-ODN-Aufnahme in das Zellinnere mit und ohne Interferin

Zunächst wurde untersucht, ob sich die Aufnahme von CpG-ODN in das Zellinnere, also an den Ort, an dem sich die Toll-like Rezeptoren-9 befinden, durch INTERFERin® verstärken lässt.

Hierzu wurde die Aufnahme identischer Konzentrationen CpG-A (0,25 pmol/µl), markiert mit Cy3 mit und ohne INTERFERin® nach 6-stündiger Inkubation mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Um die Orientierung zu erleichtern, wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt.

Durch die Zugabe von INTERFERin® wurde die Aufnahme des Cy3 markierten CpG-A massiv verstärkt. Ein Großteil des CpG-A wurde in das Zellinnere transportiert. Zellen, die nicht mit INTERFERin® behandelt wurden, nahmen zwar auch CpG-A in das Zellinnere auf, allerdings in wesentlich geringeren Mengen. Hier sammelte sich das meiste CpG-A zwischen den Zellen und an der Zellwand an. Vergleicht man die CpG-A Aufnahme der beiden Zelllinien untereinander, zeigen sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen UMUC3 und RT112 (Abbildung 13).

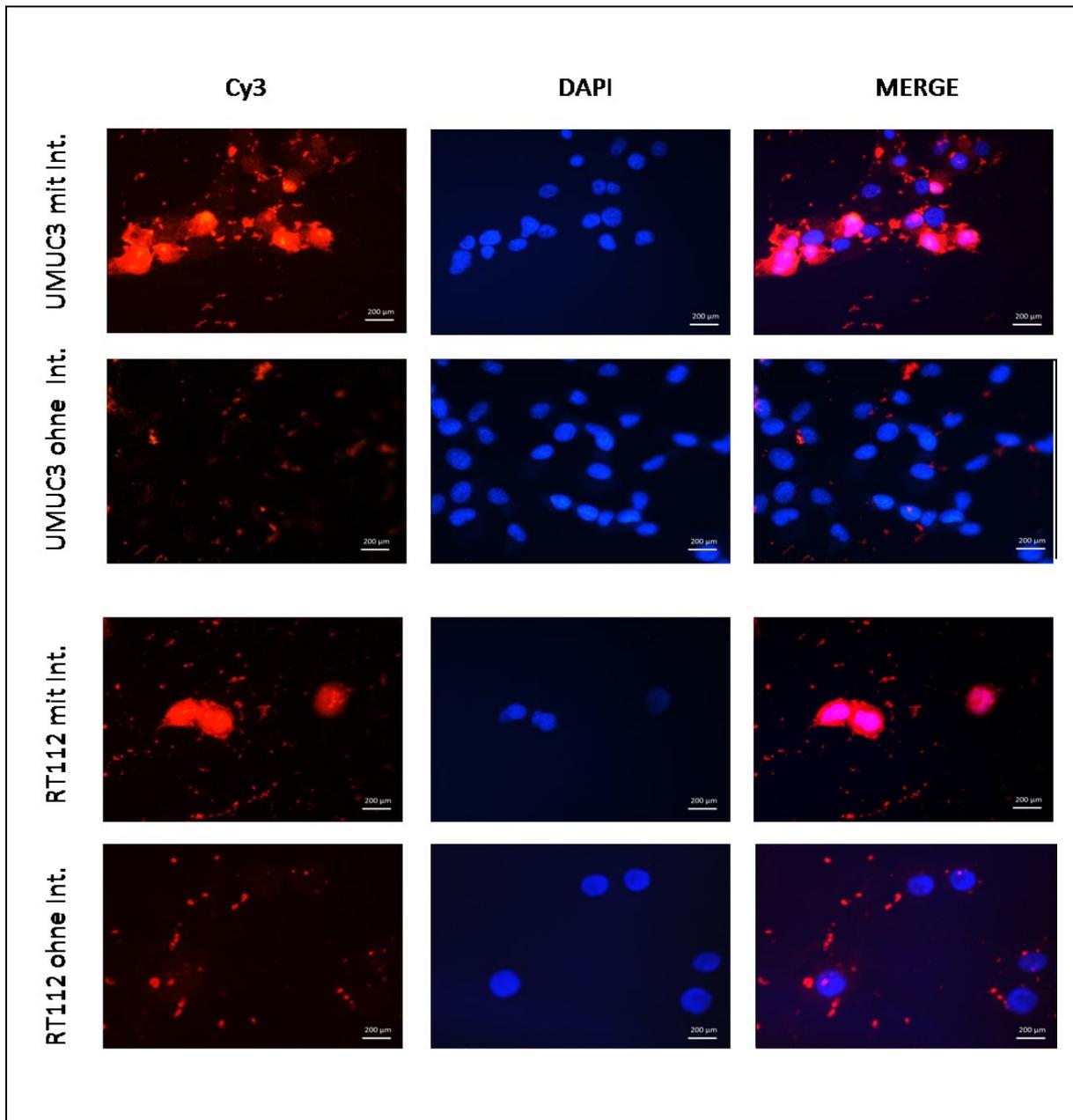


Abb. 13 - CpG-ODN-Aufnahme in das Zellinnere mit und ohne INTERFERin®

Vergleich der Aufnahme von CpG-A, Cy3 markiert, in das Zellinnere der Zelllinien UMUC3 und BFTC mit und ohne INTERFERin®. CpG-A Stimulation mit 0,25 pmol/μl mit und ohne Zusatz von INTERFERin® für insgesamt 6 Stunden.

Links: Cy3 Fluoreszenzaufnahmen; Mitte: DAPI Fluoreszenzaufnahmen; Rechts: Überlagerung der Cy3 und DAPI Fluoreszenzaufnahmen mittels Bildbearbeitungssoftware;

Int. = Interferin;

4.4.2 Auswirkung der CpG-ODN-Stimulation auf die Zytokinexpression

Um die direkte Auswirkung von CpG-ODN auf die Zytokinexpression der Blasenkarzinomzelllinien UMUC3 und RT112 zu untersuchen, wurden diese für 6 Stunden mit CpG-A oder CpG-B stimuliert. Um minimale Effekte zu verstärken, wurde den Proben INTERFERin® beigefügt. Jeweils eine Probe wurde nicht mit CpG-ODN stimuliert, ansonsten aber identisch behandelt, d.h. auch dieser Probe wurde INTERFERin® zugefügt. Sie diente als Kontrolle, um die Veränderungen in der Zytokinexpression zu ermitteln und gleichzeitig potentielle INTERFERin® Effekte zu eliminieren.

4.4.2.1 Auswirkung der CpG-ODN-Stimulation auf die Zytokinexpression der Zelllinie UMUC3

Die Stimulation der TLR-9-reichen Zelllinie UMUC3 führte zu einer signifikanten Erhöhung der Zytokin- und Angiogenesefaktorexpression.

In Kombination mit INTERFERin® bewirkte sowohl CpG-A, als auch CpG-B eine signifikante Erhöhung der IL-8 sowie der INF β mRNA-Expression. CpG-A bewirkte zusätzlich eine signifikante Erhöhung der TNF α mRNA-Expression und der mRNA-Expression der Angiogenesefaktoren VEGF-A und PlGF (Abbildung 14).

4.4.2.2 Auswirkung der CpG-ODN-Stimulation auf die Zytokinexpression der Zelllinie RT112

Stimulation der TLR-9-ärmeren Zelllinie RT112 führte teilweise ebenfalls zu signifikanter Erhöhung der Zytokinexpression, allerdings wurden wesentlich weniger Effekte beobachtet. Alleine die Kombination CpG-B und Interferin führte zu einer signifikanten Erhöhung der mRNA-Expression von IL-8 und TNF α . Einflüsse auf die Angiogenesefaktorexpression konnten nicht beobachtet werden. Die Kombination CpG-A und Interferin bewirkte überhaupt keine signifikanten Veränderungen (Abbildung 15).

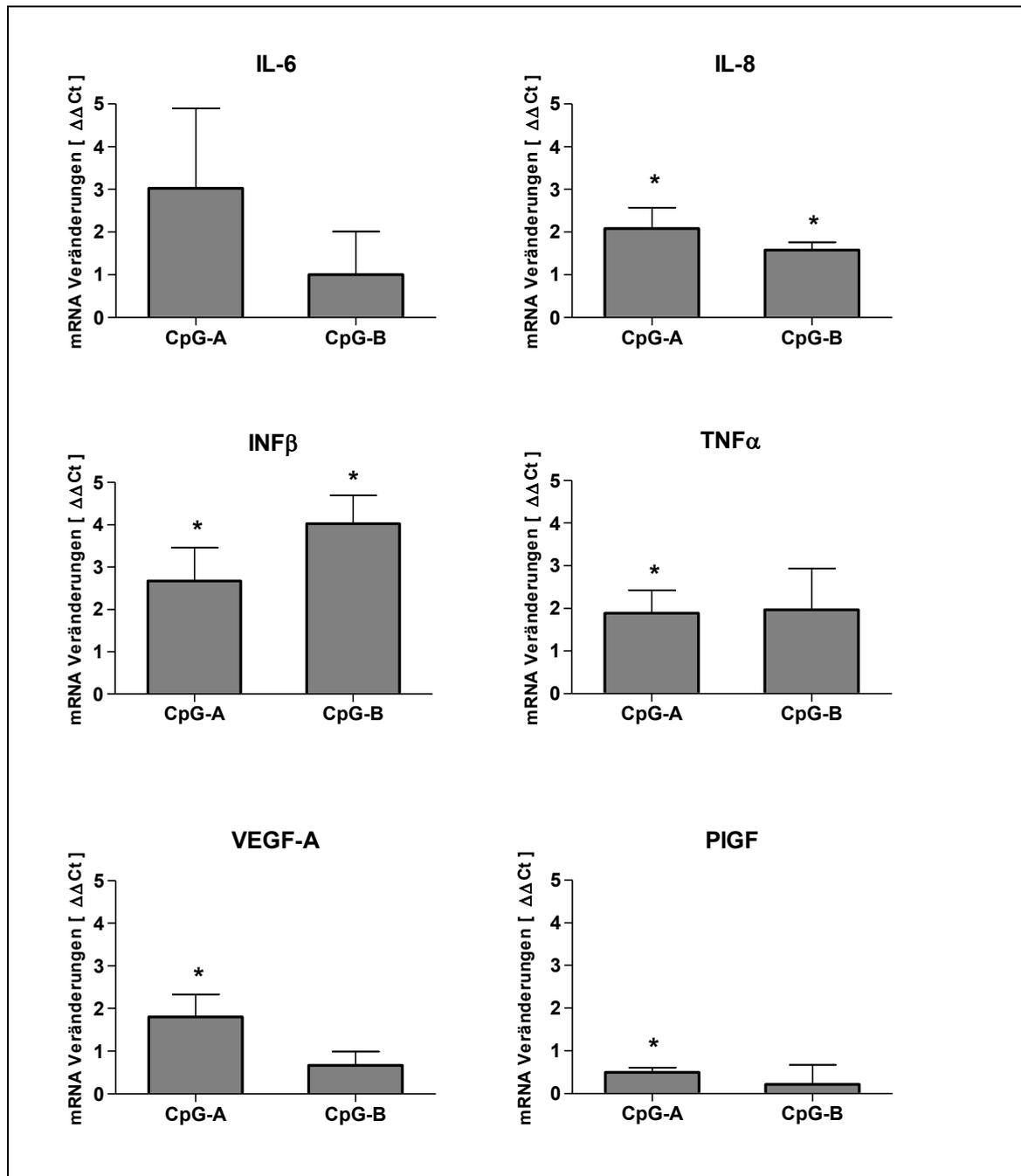


Abb. 14 - Auswirkung der CpG-ODN-Stimulation auf die Zytokinexpression der Zelllinie UMUC3

Veränderungen der Expression der Zytokin mRNA von IL-6, IL-8, TNF α , INF β , VEGF-A und PIGF nach 6-stündiger CpG-A- oder CpG-B -Stimulation (einschließlich Zugabe von INTERFERin®) der Zelllinie UMUC3.

Dargestellt mit dem $\Delta\Delta Ct$ -Wert, d.h. als Differenz zum $-\Delta Ct$ -Wert nicht stimulierter Zellen.

Mittelwert \pm Standardfehler, $n \geq 3$, * $p \leq 0,05$, statistischer Test: Paired t Test.

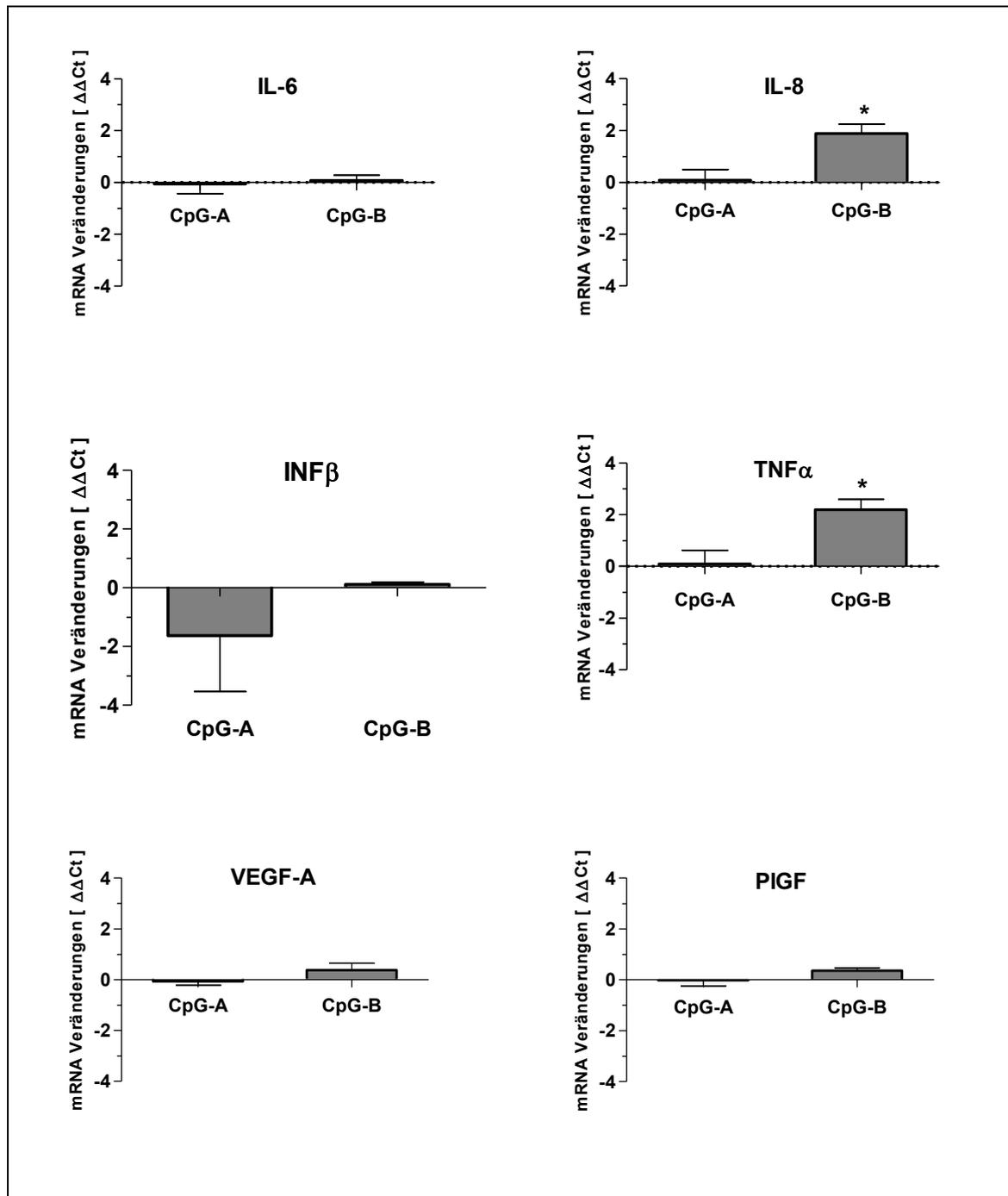


Abb. 15 - Auswirkung der CpG-ODN-Stimulation auf die Zytokinexpression der Zelllinie RT112

Veränderungen der Expression der Zytokin mRNA von IL-6, IL-8, TNF α , INF β , VEGF-A und PIGF nach 6-stündiger CpG-A oder CpG-B Stimulation (einschließlich Zugabe von INTERFERin®) der Zelllinie RT112.

Dargestellt mit dem $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert, d.h. als Differenz zum $-\Delta\text{Ct}$ -Wert nicht stimulierter Zellen. Mittelwert \pm Standardfehler, $n \geq 3$, * $p \leq 0,05$, statistischer Test: Paired t Test.

4.4.3 Auswirkungen der CpG-ODN-Stimulation auf die Zellproliferation

Die Auswirkungen der CpG-ODN-Stimulation auf die Zellproliferation bzw. auf das Zellüberleben wurden mit dem XTT-Test untersucht. CpG-ODN-Stimulation erfolgte für 24 Stunden. Kontrollzellen erhielten abgesehen von der CpG-ODN-Stimulation eine identische Behandlung. Schon in Voruntersuchungen (nicht dargestellt) konnte gezeigt werden, dass CpG-ODN bereits ohne den Zusatz von INTERFERin® wesentliche Veränderungen in der Zellproliferation bewirkt, weshalb in diesem Versuch beide Varianten untersucht wurden. Ohne den Zusatz von INTERFERin® bewirkte CpG-B eine signifikante Minderung der Zellproliferation von UMUC3. Dieser Effekt wurde durch die Zugabe von INTERFERin® nicht wesentlich beeinflusst. Interessanterweise war CpG-A nur unter Zugabe von INTERFERin® in der Lage, die Zellproliferation von UMUC3 zu mindern, hatte dann allerdings von allen untersuchten Behandlungen den größten Effekt.

Die Zellproliferation der Zelllinie RT112 wurde ebenfalls durch CpG-B mit und auch ohne INTERFERin® signifikant gemindert. CpG-A bewirkte auch mit Zugabe von INTERFERin® keine signifikanten Effekte in der Zelllinie RT112 (Abbildung 16 und 17).

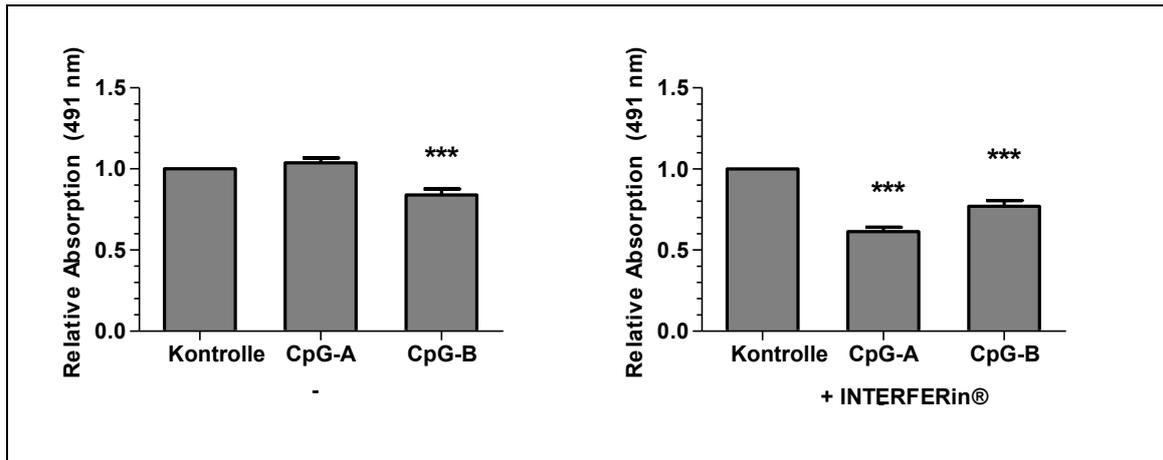


Abb. 16 – Auswirkungen der CpG-ODN-Stimulation auf die Zellproliferation der Zelllinie UMUC3

Relative Absorption bei 491 nm nach XTT-Test. Gemessen wurden unbehandelte Zellen bzw. Zellen unter Zugabe von INTERFERin® und Zellen nach 24 Stunden Stimulation mit CpG-ODN bzw. CpG-ODN und INTERFERin®. Mittelwert \pm Standardfehler, $n \geq 3$, $***p \leq 0,001$, statistischer Teste: Paired t Test.

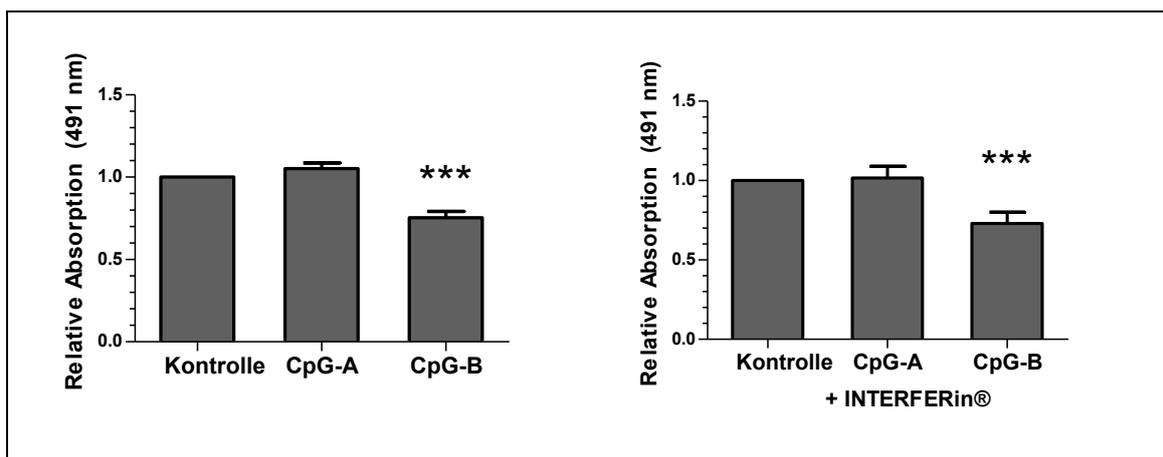
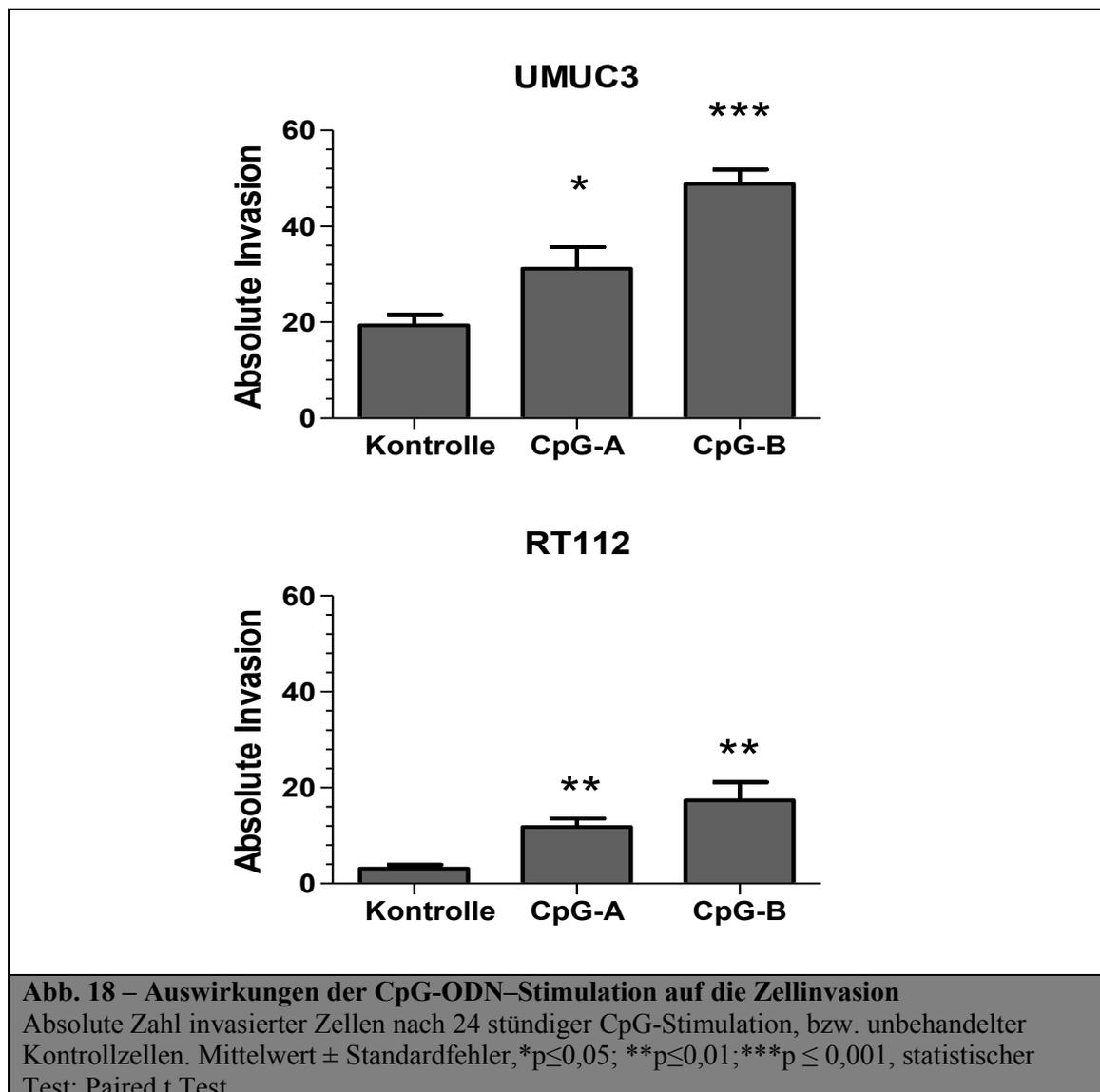


Abb. 17 – Auswirkungen der CpG-ODN-Stimulation auf die Zellproliferation der Zelllinie RT112

Relative Absorption bei 491 nm nach XTT-Test. Gemessen wurden unbehandelte Zellen bzw. Zellen unter Zugabe von INTERFERin® und Zellen nach 24 Stunden Stimulation mit CpG-ODN bzw. CpG-ODN und INTERFERin®. Mittelwert \pm Standardfehler, $n \geq 3$, $***p \leq 0,001$, statistischer Teste: Paired t Test.

4.4.4 Auswirkung der CpG-ODN-Stimulation auf die Zellinvasion

Auswirkungen der CpG-ODN-Stimulation auf die Zellinvasion wurden im Matrigel-Invasions-Assay untersucht. Bereits in Voruntersuchungen (nicht dargestellt) zeigte sich, dass die reine Stimulation mit CpG-ODN das Invasionsverhalten der Zellen schon enorm beeinflusste und dieser Effekt sich durch Zugabe von INTERFERin® nicht mehr wesentlich veränderte. Daher wurde in diesem Versuch auf die Zugabe von INTERFERin® verzichtet. CpG-ODN-Stimulation erfolgte für 24 Stunden. Kontrollzellen wurden, abgesehen von der Stimulation, identisch behandelt. Beide CpG-Motive, also sowohl CpG-A als auch CpG-B verstärkten die Invasion der Zelllinie UMUC3 signifikant. Selbiges gilt für die Zelllinie RT112. Die durch CpG-B ausgelösten Effekte waren jeweils stärker, als die durch CpG-A ausgelösten Effekte (Abbildung 18).



5. Diskussion

Das Verständnis von Existenz und Funktionalität der Toll-like Rezeptoren an Harnblasenkarzinomzellen kann essentiell sein, um die Wirkung bereits verwendeter und vielleicht zukünftiger Immuntherapeutika vollständig begreifen und abschätzen zu können. In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob Blasenkarzinomzellen Toll-like Rezeptoren 4 und 9 exprimieren und sich eine Stimulation selbiger auf Zytokinexpression, Zellproliferation und Invasionsverhalten auswirkt.

5.1 TLR-Expression und Zytokinexpressionsmuster

Zunächst wurden 11 Blasenkarzinomzelllinien hinsichtlich ihrer TLR-4 und TLR-9 mRNA-Expression untersucht. TLR-4 mRNA konnte in 9 Zelllinien nachgewiesen werden. Zwei Zelllinien exprimierten keine TLR-4 mRNA. TLR-9 wurde auf unterschiedlichen Levels in allen untersuchten Zelllinien exprimiert. Für alle weiteren Untersuchungen wurden die Zelllinie T24, als Beispiel für starke TLR-4 mRNA-Expression, die Zelllinie BFTC, als Beispiel ohne detektierbare TLR-4 mRNA-Expression, die Zelllinie UMUC3, als Beispiel für starke TLR-9 mRNA-Expression, und die Zelllinie RT112, als Beispiel für schwache TLR9 mRNA-Expression, ausgewählt.

In diesen Zelllinien wurde die TLR-Expression auch auf Proteinebene untersucht. Aufgrund unterschiedlicher Anwendbarkeitsbereiche der eingesetzten Antikörper wurde die TLR-4-Expression mittels Immunzytologie und die TLR-9-Expression mittels Western Blot analysiert. In Übereinstimmung mit den detektierten TLR-4 mRNA-Expressionslevels, wurde in der Zelllinie T24 eine ausgeprägte Immunfärbung nachgewiesen, während sich die Zelllinie BFTC nicht stärker färbte als die Negativkontrolle. Im Western Blot zeigte sich, passend zu den TLR-9 mRNA-Expressionslevels, die stärkste Bande für UMUC3 und die schwächste Bande für RT112.

Toll-like Rezeptoren wurden bisher schon in einer Vielzahl von Tumorzellen nachgewiesen. So zum Beispiel in Magen- und Kolonkarzinomzellen, in HCC-, Ovar-, Cervix-, Mamma-, Prostata- und Lungenkarzinomzellen, sowie in Melanomzellen und Zellen von Hirntumoren (Yu and Chen, 2008).

Ayari wies immunhistologisch neben weiteren Toll-like Rezeptoren TLR-4 und TLR-9 an den Blasenkarzinomzelllinien MGH-U3, RT4, 5637 und T24 nach (Ayari et al., 2011). So kann zusammenfassend mit den Ergebnissen dieser Arbeit gesagt werden, dass Blasenkarzinomzellen Großteils TLR-4 und TLR-9 exprimieren, das Expressionsmuster aber individuell sehr unterschiedlich sein kann.

Um Veränderungen im Zytokinexpressionsmuster nach TLR-Stimulation detektieren zu können, wurde als Erstes die Zytokinexpression unbehandelter Zellen charakterisiert. Alle vier Zelllinien exprimierten mRNA der Zytokine IL-6, TNF α und INF β auf vergleichbaren Levels und IL-8, im Vergleich zu den restlichen Zytokinen auf einem deutlich höheren Level. UMUC3 und RT112 exprimierten die Wachstumsfaktoren VEGF-A und PlGF, die beiden anderen Zelllinien wurden hierauf nicht untersucht. Auf die Bedeutung dieser Zytokine und Wachstumsfaktoren für die unmittelbare Tumorumgebung wird im Folgenden eingegangen.

5.2 TLR-4 und LPS

Zur Untersuchung der LPS-Effekte wurden exemplarisch die Zelllinien T24 als Zelllinie mit deutlicher TLR-4-Expression und BFTC als Zelllinie ohne nachgewiesene TLR-4-Expression gewählt. LPS-Stimulation verstärkte in der Zelllinie T24 die Expression der Zytokine IL-6 und TNF α signifikant, hatte aber keinen Einfluss auf die Expression von IL-8 und INF β . In der TLR-4-negativen Zelllinie BFTC konnte durch LPS-Stimulation keine Veränderung des Zytokinexpressionsmusters induziert werden. In beiden Zelllinien hatte LPS nach 48-stündiger Stimulation keinen Effekt auf die Zellproliferation. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Berichten über LPS-induzierte IL-6-Sekretionssteigerung in T24 (Qian et al., 2009). Die von Ayari berichtete Steigerung der IL-8-Sekretion stellte sich in dieser Arbeit nicht signifikant dar (Ayari et al., 2011). Da in der TLR-4-negativen Zelllinie BFTC keine Veränderungen induziert wurden, scheinen die beobachteten Effekte tatsächlich TLR-4 vermittelt zu sein.

Da kein direkter Effekt der LPS-Stimulation auf die Zellproliferation beobachtet werden konnte, fällt es schwer, anhand der vorliegenden Ergebnisse zu beurteilen, ob eine TLR-4-Stimulation therapeutisch günstige oder ungünstige Effekte auf Harnblasenkarzinomzellen hat.

TLR-4-Agonisten befinden sich als additiver Bestandteil des Hepatitis-B-Impfstoffes FendrixTM, sowie des Humanen Papillomavirus Impfstoffes CervarixTM bereits heute in klinischer Anwendung und als Bestandteil von Impfstoffen gegen das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom, sowie gegen das maligne Melanom in klinischer Prüfung (Adams, 2009).

Die hierbei erzielten, therapeutisch günstigen Effekte sind aber wohl vor allem auf die TLR-4-vermittelte Aktivierung des Immunsystems zurückzuführen. So bedingt eine LPS-Stimulation von Makrophagen eine Sekretion von Chemokinen und proinflammatorischen Zytokinen, wie zum Beispiel TNF α und Interleukin-1 β , welche die lokale und systemische Entzündungsantwort koordinieren (Bjorkbacka et al., 2004). TLR-4-Aktivierung an dendritischen Zellen bewirkt eine IL-12-Sekretion, die wichtiger Bestandteil der anti-Tumor-Immunität ist (Kadowaki et al., 2001). Außerdem induziert eine TLR-4-Aktivierung die Reifung dendritischer Zellen, sowie die Antigenpräsentation und spielt dadurch eine Schlüsselrolle in der erworbenen

Immunantwort (Schreibelt et al., 2010). Reife, dendritische Zellen präsentieren Lymphozyten-Antigene und können zusätzlich aber auch tumor-spezifische NK-Zellen und NKT-Zellen aktivieren (Steinman and Banchereau, 2007). Umgekehrt unterstützen TLR-stimulierte NK-Zellen die Aktivierung und Reifung dendritischer Zellen (Andrews et al., 2003) und helfen, die durch dendritische Zellen vermittelte, anti-Tumor-Immunantwort zu verstärken (Pham et al., 2010).

Huang konnte andererseits zeigen, dass es die TLR-4-Aktivierung durch LPS Tumorzellen ermöglicht, der Immunantwort zu entkommen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit wies Huang in der TLR-4-exprimierenden Kolonkarzinomzelllinie MC26, neben weiteren Zytokinen, eine signifikante IL-6-Sekretion durch LPS-Stimulation nach. Interessanterweise inhibierte der Überstand dieser Zellen signifikant die T-Zell-Proliferation, sowie die NK-Zell-Zytotoxizität, ein Effekt, der durch Zugabe eines neutralisierenden IL-6-Antikörpers aufgehoben werden konnte. Außerdem verstärkte eine TLR-4-Aktivierung die Resistenz der MC26 Zellen gegenüber zytotoxischen T-Lymphozyten. Diese *in vitro* Ergebnisse konnten *in vivo* verifiziert werden, indem gezeigt wurde, dass eine Blockade des TLR-4-Signals das Überleben im MC26-Maus-Modell signifikant verlängert (Huang et al., 2005).

Ein ähnlicher immunsuppressiver Effekt konnte auch an TLR-4-positiven Lungenkarzinomzellen durch LPS-Stimulation hervorgerufen werden (Liu et al., 2006). Des Weiteren wurde über IL-6 berichtet, dass es in der Lage ist, das Wachstum von Blasenkarzinomzellen *in vitro* zu fördern (Okamoto et al., 1997), ein Effekt, der mit den hier hervorgerufenen Steigerungen der IL-6-Expression allerdings nicht zu beobachten war. Auch TNF α ist ein Zytokin, dem, vor allem in niedrigen Dosen, tumorfördernde Eigenschaften zugesprochen werden (Szlosarek et al., 2006) und das in einer nicht-malignen Ratten-Urothel-Zelllinie eine Zelltransformation induzierte (Okamoto and Oyasu, 1997).

Zusammenfassend zeigt dies, dass die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Studien es nicht erlauben, den therapeutischen Effekt der TLR-4-Aktivierung zu beurteilen. Weitere Untersuchungen in einem immunkompetenten Organismus sind unabdingbar. Denkbar ist, dass hierbei anti-Tumor-Aktivität durch TLR-4-vermittelte Immunzell-Aktivierung und Immunsuppression durch TLR-4-vermittelte Tumorzell-Aktivierung als Gegenspieler fungieren, wobei die TLR-4-Expression der Tumorzelle ein Marker

dafür sein könnte, welcher der beiden Effekte überhand gewinnt. Auch könnte untersucht werden, ob es möglich ist, unerwünschte, vor allem wahrscheinlich IL-6-vermittelte, Effekte zu unterdrücken, ohne gleichzeitig die Immunzell-Aktivierung negativ zu beeinflussen.

5.3 TLR-9 und CpG-ODN

Zur Untersuchung der CpG-ODN-Effekte wurde, wie dargestellt, exemplarisch eine Zelllinie mit starker TLR-9-Expression, nämlich UMUC3, und RT112, eine Zelllinie mit schwacher TLR-9-Expression, gewählt.

TLR-9 befindet sich im Unterschied zu TLR-4 nachweislich intrazellulär. Daher wurde zunächst die Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem CpG-ODN in das Zellinnere untersucht. Verglichen wurde die Aufnahme von reinem CpG-ODN mit der Transfektion von CpG-ODN mittels INTERFERin®. INTERFERin® ist ein Produkt, dessen Transfektions-Effekt auf sogenannter Lipofektion beruht. Hierbei handelt es sich um eine Methode, bei der kationische Lipide mit DNA bzw. RNA interagieren, anschließend mit der Zellmembran fusionieren und dadurch die intrazelluläre Aufnahme der DNA, bzw. RNA begünstigen (Felgner et al., 1987).

Die Aufnahme von CpG-ODN durch Lipofektion wurde bereits an dendritischen Zellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Lipofectamine (einem weiteren Produkt zur Lipofektion) die Aufnahme von CpG-ODN signifikant verstärkt (Liang et al., 2003) und damit einhergehend auch die funktionellen Effekte, wie z.B. Zytokinproduktion und Immunstimulation verstärkt (Kim et al., 2011). Im Unterschied hierzu wurde in dieser Arbeit INTERFERin® verwendet, da dieses Produkt laut Hersteller im Vergleich zu anderen Produkten äußerst geringe Zelltoxizität hervorruft. Wie erwartet wurde die Aufnahme von CpG-ODN durch INTERFERin® massiv verstärkt. Nachfolgend wurde diese Methode daher immer dann angewandt, wenn durch CpG-ODN alleine keine signifikanten oder nur gering-signifikante Effekte erzielt werden konnten. Bei der Beurteilung der in dieser Arbeit untersuchten CpG-ODN-Effekte sollte dies berücksichtigt werden.

Bei der Untersuchung der CpG-ODN-Effekte auf die Zytokinproduktion konnten allein mit CpG-ODN keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden (Ergebnisse hier nicht gezeigt). Es wurde daher ausschließlich mit INTERFERin® gearbeitet.

Die CpG-A-Stimulation führte hierbei in der Zelllinie UMUC3 zu einer signifikanten Steigerung der IL-8-, TNF α -, INF β -, VEGF-A- und PlGF-Expression. CpG-B führte in derselben Zelllinie hingegen nur zu einer signifikanten Steigerung der IL-8- und INF β -Expression. In der TLR-9-ärmeren Zelllinie RT112 bewirkte eine CpG-A-Stimulation

überhaupt keine signifikanten Veränderungen. CpG-B-Stimulation führte zu einer signifikanten Steigerung der Expression von IL-8 und TNF α .

Die Zellproliferation wurde durch CpG-ODN deutlich beeinflusst. Schon ohne Signalverstärkung durch INTERFERin® konnte CpG-B in beiden untersuchten Zelllinien die Zellproliferation signifikant verringern, ein Effekt, der durch Signalverstärkung nicht wesentlich verändert wurde. Erstaunlicherweise bewirkte CpG-A nur in Kombination mit INTERFERin® und auch nur in der TLR-9-reichen Zelllinie UMUC3 eine signifikante Minderung der Zellproliferation.

Dem gegenüber stehen die Ergebnisse der Invasions-Experimente. Beide der untersuchten CpG-ODN-Motive verstärkten ohne Signalverstärkung durch INTERFERin® in beiden Zelllinien die Zellinvasion signifikant.

Zur Beurteilung des therapeutischen Potenzials der erzielten Effekte ist es sinnvoll, die untersuchten Endpunkte Zytokinproduktion, Zellproliferation und Zellinvasion zunächst separat zu betrachten.

Die Veränderungen der Zytokinsekretion variieren deutlich in Abhängigkeit von verwendetem CpG-Motiv und TLR-9-Expression, wobei am häufigsten die signifikante Erhöhung von IL-8 beobachtet wurde.

Dies stimmt mit den Ergebnissen von Ayari überein, der eine schwache IL-8-Induktion in CpG-ODN-behandelten T24 Zellen beobachten konnte (Ayari et al., 2011). Auch in anderen Zelllinien, wie zum Beispiel in der Prostatakarzinomzelllinie PC-3 (Di et al., 2009), in Odontoblasten (He et al., 2012) und in neutrophilen Granulozyten (Jozsef et al., 2006) wurde eine signifikante Erhöhung der IL-8-Produktion nach CpG-ODN-Stimulation nachgewiesen. Überexpression von IL-8 ist bei Melanom, Mamma-, Ovar-, Magen- und Prostatakarzinom mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, verstärktem Tumorwachstum und erhöhter Rezidivrate assoziiert (Xie, 2001). Inoue konnte demonstrieren, dass IL-8 die Neovaskularisation, das Tumorwachstum und die Metastasierung des Blasenkarzinoms begünstigt (Inoue et al., 2000). Dementsprechend bewirkte eine Antikörper-vermittelte Blockade eine signifikante Minderung des Wachstums des Blasenkarzinoms (Mian et al., 2003).

Die CpG-ODN induzierte IL-8-Sekretion kann therapeutisch gesehen somit als ungünstig beurteilt werden.

In neutrophilen Granulozyten konnte, ebenso wie in der vorliegenden Arbeit, auch eine erhöhte TNF α -Sekretion nach CpG-Stimulation nachgewiesen werden (Jozsef et al., 2006). Selbiges gilt für Makrophagen (Lim et al., 2006). Die Auswirkungen einer erhöhten TNF α -Sekretion auf die unmittelbare Tumorumgebung sind, wie bereits bei den Auswirkungen einer LPS-Stimulation beschrieben, eher negativ zu sehen.

Auch eine erhöhte INF β -Sekretion konnte bereits in anderen Zelllinien nachgewiesen werden. Plasmazytoide dendritische Zellen sekretieren INF β nach CpG-A-Stimulation (Guiducci et al., 2006), myeloide dendritische Zellen und Makrophagen sekretieren INF β nach CpG-B-Stimulation (Colonna, 2007). Interferonen des Typs I, zu denen auch INF β gehört, wird generell ein antiangiogenes Potential und dadurch ein therapeutisch günstiger Effekt für Tumoren zugeschrieben.

Dies steht im Widerspruch zur erhöhten Sekretion der proangiogenen Faktoren VEGF-A und PlGF. VEGF-A interagiert mit Endothelzellen und bewirkt unter anderem eine erhöhte vaskuläre Permeabilität, verstärkte Angiogenese, Endothelzellwachstum, Zellmigration und verminderte Apoptose. VEGF-A und andere proangiogene Faktoren wurden als wichtige prognostische Marker des Blasenkarzinoms identifiziert (Donmez et al., 2009; Pignot et al., 2009). Eine erhöhte Sekretion ist daher als therapeutisch ungünstig zu sehen.

Die in dieser Arbeit gefundenen CpG-ODN-Effekte auf die Zytokinsekretion der untersuchten Blasenkarzinomzelllinien entsprechen also weitgehend der CpG-ODN-induzierten Sekretion, die auch in anderen malignen und non-malignen Zellen hervorgerufen wird. Das Muster der Zytokinsekretion ist jedoch äußerst inhomogen. Eine höhere TLR-9-Expression scheint in einer erhöhten Zytokinsekretion zu resultieren, wobei sich diese in Abhängigkeit von dem verwendeten CpG-Motiv deutlich unterscheiden kann. Die einzelnen, sekretierten Zytokine haben sowohl therapeutisch günstige als auch ungünstige Effekte, so dass die möglichen Auswirkungen der gesamten Zytokinsekretion nicht zusammenfassend beurteilt werden können.

Wie bereits einleitend erwähnt, ist die Datenlage zur Zellproliferation nach CpG-ODN-Stimulation äußerst kontrovers. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit wies Merrell eine verminderte Zellproliferation in Mammakarzinom-Zellen nach (Merrell et al., 2006). Eine Beobachtung, die auch in Neuroblastomzellen gemacht wurde, wobei sich hier erst ein Effekt nach Lipofektion des CpG-ODN in den Intrazellularraum zeigte (Brignole et al., 2010). Auch in einer non-malignen (Xu et al., 2010) Endothelzelllinie bewirkte die TLR-9-Stimulation einen Rückgang der Zellproliferation, welche durch Lipofektion noch weiter verstärkt wurde (Damiano et al., 2007).

Die meisten untersuchten, malignen und non-malignen Zellen reagieren in ihrem Proliferationsverhalten nach CpG-ODN-Stimulation jedoch genau gegenteilig. Multiple Myelomzellen (Xu et al., 2010), Zervixkarzinom- und Lungenkarzinomzellen (Droemann et al., 2005), ebenso wie HCC-Zellen (Tanaka et al., 2010) proliferieren nach CpG-ODN-Stimulation verstärkt. Selbiges gilt für Prostata-Epithelzellen (Kundu et al., 2008) und periphere mononukleäre Blutzellen (Brignole et al., 2010).

Die Faktoren, die letztendlich entscheiden, ob eine Zelle mit verminderter oder verstärkter Zellproliferation auf die CpG-ODN-Stimulation reagiert, sind bisher allerdings nur wenig erforscht.

Die verminderte Zellproliferation der hier untersuchten Blasenkarzinomzellen ist therapeutisch eindeutig günstig. Zu beachten ist, dass der Effekt in Abhängigkeit von TLR-9-Expression und verwendetem CpG-Motiv unterschiedlich ausgeprägt ist und mittels Lipofektion generell verstärkt wird.

Eine verstärkte Invasion nach CpG-ODN-Stimulation, wie sie in dieser Arbeit beobachtet wurde, wurde bereits in einer Reihe anderer maligner und non-maligner Zelllinien beschrieben. Ösophaguskarzinom-, Magenkarzinom- und Kolonkarzinomzellen (Kauppila et al., 2012) reagierten wie auch Lungenkarzinomzellen (Ren et al., 2007), Gliomzellen (Wang et al., 2010) und Makrophagen (Ilvesaro et al., 2008) mit verstärkter Invasion auf CpG-ODN-vermittelte TLR-9 Stimulation.

Merrell untersuchte verschiedene CpG-Motive an Mammakarzinomzellen. Wie bei den hier untersuchten Blasenkarzinomzellen zeigte sich, dass sowohl CpG-A als auch CpG-B das Invasionsverhalten signifikant verstärken, der Effekt bei CpG-B-Stimulation allerdings deutlich ausgeprägter ist (Merrell et al., 2006).

Interessanterweise wurde in einer Reihe von Arbeiten, einhergehend mit einer gesteigerten Invasion, eine erhöhte Matrix-Metalloproteinase-13-(MMP-13) Expression und Aktivität nachgewiesen. Dies wurde für Kolonkarzinomzellen (Rath et al., 2011), mesenchymale Stammzellen (Nurmenniemi et al., 2010), Prostatakarzinomzellen (Ilvesaro et al., 2007) und Mammakarzinomzellen (Merrell et al., 2006) demonstriert. Gleichzeitig wurde durch gezielte Blockade der MMP-13 mittels Antikörper die verstärkte Invasion inhibiert. Dadurch konnte gezeigt werden, dass MMP-13 wohl eine essentielle Rolle im Signalweg der TLR-9-vermittelten Invasion führt. MMP-13 gehört zur Familie der Zink-Metalloendopeptidasen, welche als proteolytische Enzyme verantwortlich für die Degeneration der extrazellulären Matrix sind. Matrix-Metalloproteinasen wurden in unterschiedlichen Tumorarten mit invasivem Tumorwachstum, Metastasierung und Neovaskularisation assoziiert (Kessenbrock et al., 2010). Weiterhin konnte MMP-13 zwar in Blasenkarzinomzellen nachgewiesen werden, nicht aber in gesundem Urothel (Bostrom et al., 2000). Wu inhibierte die Expression von MMP-13 in Blasenkarzinomzellen mittels mRNA und erzielte dadurch eine signifikante Minderung von Zellmigration und -invasion (Wu et al., 2013).

MMP-13 scheint sich also generell ungünstig auf das Blasenkarzinom auszuwirken. Die hier dargestellten Zusammenhänge legen die Vermutung nahe, dass die verstärkte Invasion der Blasenkarzinomzellen nach TLR-9-Aktivierung auf verstärkter MMP-13-Aktivität beruht. Zugleich zeigt dies aber auch, dass es möglich erscheint, diesen negativen Effekt mittels MMP-13-Blockade gezielt auszuschalten, ohne günstige therapeutische Effekte der CpG-ODN-Stimulation dabei zu beeinflussen.

CpG-ODN wird seit einigen Jahren im Zusammenhang mit Infektionskrankheiten, entzündlichen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen, aber eben auch als anti-Tumor-Therapeutikum bereits in einer Vielzahl klinischer Studien untersucht. So wurde es zum Beispiel als Monotherapie gegen das kutane T-Zell-Lymphom (Kim et al., 2010) und das therapierefraktäre Non-Hodgkin-Lymphom (Link et al., 2006) getestet und erzielte in mehreren Studien große Erfolge in der Therapie des malignen Melanoms (Hofmann et al., 2008; Molenkamp et al., 2007; Pashenkov et al., 2006). Auch Studien zur Therapie des Nierenzellkarzinoms (Thompson et al., 2009) und des rezidivierenden Glioblastoms (Carpentier et al., 2006) lieferten vielversprechende Ergebnisse.

Des Weiteren wurde der Einsatz von CpG-ODN als Adjuvans in Impfstoffen gegen diverse Tumore getestet. Studien zur Behandlung von Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom wurden hierbei erfolgreich durchgeführt (Krieg, 2008). CpG-ODN wurde aber auch als Adjuvans in Impfstoffen gegen das maligne Melanom getestet.

Einen dritten Forschungsschwerpunkt im Einsatz von CpG-ODN in der anti-Tumor-Therapie stellt die Kombination mit etablierten Therapiemethoden dar. Mehrere Studien bestätigten den additiven Effekt von CpG-ODN und dem mononukleären Antikörper Rituximab in der Therapie des Non-Hodgkin-Lymphoms (Friedberg et al., 2005; Leonard et al., 2007). Andererseits konnte trotz vielversprechender Voruntersuchungen in einer Phase-III-Studie, welche die Kombination von CpG-ODN und Chemotherapie in der Behandlung des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms untersuchte, keine Verbesserung im Vergleich zur Standardtherapie erzielt werden (Manegold et al., 2012). Ebenfalls untersucht wurde die Kombination von intratumoraler CpG-Injektion und Bestrahlung zur Therapie des B-Zell-Lymphoms (Kim et al., 2012).

All diese Beispiele zeigen, wie weit fortgeschritten die klinische Anwendung von CpG-ODN in der Tumorthherapie bereits ist.

Ähnlich wie bei der klinischen Anwendung von TLR-4-Agonisten stützt sich der therapeutische Effekt hierbei aber primär auf die immunstimulatorischen Eigenschaften einer TLR-9-Aktivierung und nicht auf direkte Wirkung an der Tumorzelle.

TLR-9-Agonisten aktivieren periphere dendritische Zellen, welche daraufhin Interferon vom Typ I sekretieren und erhöhte Level co-stimulatorischer Moleküle wie CD80 und CD86 exprimieren. Dies wiederum soll eine Reihe sekundärer Effekte induzieren, wie zum Beispiel die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen, die Aktivierung von natürlichen Killerzellen und die Weiterentwicklung der T-Zell-Population, vor allem von Typ 1 T-Helfer-Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten (Krieg, 2004, 2006). Außerdem verstärken TLR-9-Agonisten die Differenzierung von B-Zellen in Antikörper sekretierenden Plasmazellen und damit auch die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (Appay et al., 2006).

Die Arbeitsgruppen von Olbert und Mangsbo untersuchten, wie einleitend erwähnt, die Wirkung von CpG-ODN im Blasenkarzinom-Maus-Modell. Beide Gruppen konnten hierbei ein signifikantes anti-neoplastisches-Potential der intravesikalen CpG-ODN-Instillation nachweisen. Olbert zeigte, dass CpG-ODN zu einer urothelialen und subepithelialen Lymphozyteninfiltration mit sukzessiver Apoptose führt (Olbert et al.,

2009). Mangsbo demonstrierte, dass CpG-ODN nur in immunkompetenten Mäusen eine Tumorregression induzierte und selbige über eine T-Zell-abhängige Immunantwort vermittelt wird. Einhergehend mit der Tatsache, dass die in diesem Modell verwendeten MB49-Zellen kein TLR-9 exprimieren (Olbert et al., 2009), wurden also auch hier alleine die immunstimulatorischen Eigenschaften von CpG-ODN für den therapeutischen Effekt verantwortlich gemacht.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte nun aber gezeigt werden, dass eine Vielzahl von Blasenkarzinomzelllinien funktionellen TLR-9 exprimieren und daher neben den immunstimulatorischen Eigenschaften von CpG-ODN auch die direkten Effekte auf die Tumorzellen berücksichtigt werden müssen. Es wurde erörtert, welche dieser Effekte sich therapeutisch günstig bzw. ungünstig auf die Tumorumgebung auswirken können und wie ungünstige Effekte hypothetisch blockiert werden könnten. Ob diese Effekte aber letztendlich in einem immunkompetenten Organismus auch von Relevanz sind, bleibt zu untersuchen.

5.4 Resümee

Abschließend kann gesagt werden, dass bereits verwendete (BCG) und vielleicht zukünftige Immunotherapeutika (CpG-ODN) des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms, die ihre Wirkung über Toll-like Rezeptoren entfalten, immer auch Einfluss auf die Tumorzellen direkt nehmen, da diese selbst auch funktionelle Toll-like Rezeptoren exprimieren. Die Untersuchungen zu Zytokinexpression, Zellproliferation und Invasion verdeutlichen, dass dies, therapeutisch gesehen, sowohl positive, als auch negative Folgen haben kann. Diese Mechanismen und vor allem ihre Signalwege sollten noch genauer untersucht werden, um die Wirkung von Immunotherapeutika zu optimieren und einen Therapieerfolg vorhersehbarer zu machen.

Zusammenfassung

Das Harnblasenkarzinom ist eine der häufigsten malignen Tumorerkrankungen weltweit. 75%-85% der Patienten werden noch in nicht-muskelinvasiven Stadien diagnostiziert. Für einen Teil dieser Patienten stellt die Dispositionsprophylaxe mittels BCG-Instillation nach TUR eine effektive Therapie dar und wird empfohlen.

Bis heute ist der Wirkungsmechanismus von BCG nicht vollständig geklärt, aber es ist bekannt, dass Bestandteile von BCG mit Toll-like Rezeptoren, unter ihnen TLR-4 und TLR-9, interagieren und dass CpG-ODN, ein TLR-9-Agonist, *in vitro* und in Tierversuchen dem BCG sogar überlegen ist. Trotzdem gibt es bisher nur wenige Untersuchungen zur Existenz und Funktionalität von Toll-like Rezeptoren auf Harnblasenkarzinomzellen selbst.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Expression von TLR-4 und TLR-9 an verschiedenen Zelllinien des Harnblasenkarzinoms zu untersuchen und zu überprüfen, ob eine Stimulation dieser Rezeptoren durch ihren spezifischen Liganden zu Veränderungen im Zytokinexpressionsmuster, in der Zellproliferation und in der Zellinvasion führt.

Alle untersuchten Harnblasenkarzinomzelllinien exprimierten TLR-9 mRNA und zumeist auch TLR-4 mRNA. Exemplarisch wurden für alle weiteren Untersuchungen vier Zelllinien gewählt. An ihnen wurde zunächst die TLR-4- und TLR-9-Proteinexpression mittels Immunzytologie bzw. Western Blot untersucht. Diese zeigte übereinstimmende Ergebnisse mit der mRNA-Expression.

Zur Untersuchung der LPS-Effekte wurden T24 als Zelllinie mit starker TLR-4-Expression und BFTC als Zelllinie ohne TLR-4-Expression gewählt.

LPS induziert eine signifikante IL-6- und TNF α -Antwort in der Zelllinie T24, nicht aber in BFTC. LPS hatte keinen Einfluss auf die Zellproliferation.

Zur Untersuchung der CpG-ODN-Effekte wurden UMUC3 als Zelllinie mit starker TLR-9-Expression und RT112 als Zelllinie mit schwacher TLR-9-Expression gewählt. Es konnte gezeigt werden, dass INTERFERin® die Aufnahme von CpG-ODN in das Zellinnere, also den Ort der TLR-9-Expression, verstärkt. Daher wurde teilweise mit INTERFERin® gearbeitet, um minimale CpG-ODN-Effekte besser charakterisieren zu

können. In der Zelllinie UMUC3 verstärkte CpG-A + INTERFERin® die Expression von IL-8, TNF α , INF β , VEGF-A und PIGF signifikant. CpG-B + INTERFERin® verstärkte nur die Expression von IL-8 und INF β .

In der Zelllinie RT112 hatte CpG-A + INTERFERin® hingegen keine Effekte. CpG-B + INTERFERin® verstärkte die IL-8- und TNF α -Expression signifikant.

Die Zellproliferation der Zelllinie UMUC3 wurde sowohl durch CpG-B alleine, als auch durch CpG-B + INTERFERin®, sowie durch CpG-A + INTERFERin® signifikant vermindert.

Die Zellproliferation der Zelllinie RT112 wurde durch CpG-B und durch CpG-B + INTERFERin® signifikant vermindert.

Beide CpG-Motive verstärkten in beiden Zelllinien die Zellinvasion signifikant, CpG-B hatte hierbei einen noch ausgeprägteren Effekt, als CpG-A.

Dies zeigt, dass BCG und potentiell zukünftige Immuntherapeutika des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms, die ihre Wirkung über Toll-like Rezeptoren entfalten, immer auch Einfluss auf die Tumorzellen direkt nehmen, da diese selbst auch funktionelle Toll-like Rezeptoren exprimieren. Die Untersuchungen zu Zytokinexpression, Zellproliferation und Invasion verdeutlichen, dass dies, therapeutisch gesehen, sowohl positive, als aber auch negative Folgen haben kann. Diese Mechanismen und vor allem ihre Signalwege sollten noch genauer untersucht werden, um die Wirkung von Immuntherapeutika zu optimieren und einen Therapieerfolg vorhersehbarer zu machen.

Summary

Bladder cancer is among the most common malignancies worldwide. The majority (75%-85%) of the patients are diagnosed early, prior to muscle invasive stage. BCG immunotherapy, in addition to transurethral resection, is recommended in high risk non muscle invasive tumors. This is often the only therapy required.

The mechanism of action of BCG has not been fully elucidated. Toll-like receptors, modulators of innate immunity, play a major role in its therapeutic mechanisms. In a mouse model, the TLR-9 ligand CpG-ODN has proven more effective than BCG in treating early stage bladder cancer.

Little is known about the direct effect of TLRs on bladder cancer cells. This work studied the expression of TLR-4 and TLR-9 on various bladder cancer cell lines. On activation of these receptors outcomes measured were cytokine expression, cell viability and cell invasiveness.

The cell lines tested universally expressed TLR-9 mRNA, and most expressed TLR-4 mRNA. From those cell lines and based on their TLR mRNA expression four cell lines were chosen for further investigation. In these cell lines TLR expression was verified using Immunocytology (for TLR-4) and Western Blot (for TLR-9).

T24 cells in which high TLR-4 and BFTC cells in which no TLR-4 expression was detected, were subjected to the TLR-4 agonist LPS. In T24 cells this significantly induced IL-6 and TNF α . There was no effect on BFTC. No impact on cell viability in either cell line.

UMUC3 cells, in which high TLR-9 and RT112 cells, in which low TLR-9 expression was detected, were subjected to the TLR-9 agonists CpG-A and CpG-B. In this work it was demonstrated that INTERFERin[®] increased the uptake of CpG-ODN making it available to intracellular TLR-9. To some extent it enhanced CpG-ODN effects.

In UMUC3 CpG-A boosted with INTERFERin[®] significantly induced IL-8, TNF α , INF β , VEGF-A and PIGF. Whereas CpG-B boosted with INTERFERin[®] only induced IL-8 and INF β . In RT112 no induction was noted in the CpG-A group. However in the CpG-B group both IL-8 and TNF α were induced.

Cell viability of UMUC3 was reduced when exposed to CpG-B alone or in combination with INTERFERin®. However, CpG-A reduced cell viability only when boosted with INTERFERin®. In RT112, only CpG-B reduced viability. This effect was seen with and without INTERFERin®.

Cell invasion in both tested cell lines was increased significantly by CpG-ODN. CpG-B caused the highest increase.

Immunotherapeutics, in current use (BCG) or those being under investigation (CpG-ODN, mycobacterial cell wall-DNA complex) mediate their effect partially via TLR-4 and TLR-9. This means, that a direct effect on the tumor cells has to be taken into concern, because many tumors are expressing functionally active TLRs, too.

Findings in this work suggest these effects to be inhibitory regarding tumor growth and stimulatory regarding metastasis. Further research is needed to verify these effects and their therapeutic relevance in the hope that therapies with BCG and potential future immunotherapeutics become more predictable.

Literaturverzeichnis

- Adams, S., 2009, Toll-like receptor agonists in cancer therapy: Immunotherapy, v. 1, p. 949-64.
- Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, 2006, Pathogen recognition and innate immunity, *Cell*, v. 124: United States, p. 783-801.
- Andreani, V., G. Gatti, L. Simonella, V. Rivero, and M. Maccioni, 2007, Activation of Toll-like receptor 4 on tumor cells in vitro inhibits subsequent tumor growth in vivo, *Cancer Res*, v. 67: United States, p. 10519-27.
- Andrews, D. M., A. A. Scalzo, W. M. Yokoyama, M. J. Smyth, and M. A. Degli-Esposti, 2003, Functional interactions between dendritic cells and NK cells during viral infection, *Nat Immunol*, United States, p. 175-81.
- 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*, United States, p. 1670-8.
- Ayari, C., A. Bergeron, H. LaRue, C. Menard, and Y. Fradet, 2011, Toll-like receptors in normal and malignant human bladders: *J Urol*, v. 185, p. 1915-21.
- Babjuk, M., W. Oosterlinck, R. Sylvester, E. Kaasinen, A. Bohle, J. Palou-Redorta, and M. Roupret, 2011, EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update, *Eur Urol*, v. 59: Switzerland, 2011 European Association of Urology. Published by Elsevier B.V, p. 997-1008.
- Becich, M. J., S. Carroll, and T. L. Ratliff, 1991, Internalization of bacille Calmette-Guerin by bladder tumor cells: *J Urol*, v. 145, p. 1316-24.
- Belvin, M. P., and K. V. Anderson, 1996, A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway: *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 12, p. 393-416.
- Beutler, B., and E. T. Rietschel, 2003, Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin, *Nat Rev Immunol*, v. 3: England, p. 169-76.
- Biragyn, A., P. A. Ruffini, C. A. Leifer, E. Klyushnenkova, A. Shakhov, O. Chertov, A. K. Shirakawa, J. M. Farber, D. M. Segal, J. J. Oppenheim, and L. W. Kwak, 2002, Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2, *Science*, v. 298: United States, p. 1025-9.
- Bjorkbacka, H., K. A. Fitzgerald, F. Huet, X. Li, J. A. Gregory, M. A. Lee, C. M. Ordija, N. E. Dowley, D. T. Golenbock, and M. W. Freeman, 2004, The induction of macrophage gene expression by LPS predominantly utilizes Myd88-independent signaling cascades, *Physiol Genomics*, United States, p. 319-30.

- Bohle, A., D. Jocham, and P. R. Bock, 2003, Intravesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity, *J Urol*, United States, p. 90-5.
- Bostrom, P. J., L. Ravanti, N. Reunanen, V. Aaltonen, K. O. Soderstrom, V. M. Kahari, and M. Laato, 2000, Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in transitional-cell carcinoma of the urinary bladder, *Int J Cancer*, United States, p. 417-23.
- Brignole, C., D. Marimpietri, D. Di Paolo, P. Perri, F. Morandi, F. Pastorino, A. Zorzoli, G. Pagnan, M. Loi, I. Caffa, G. Erminio, R. Haupt, C. Gambini, V. Pistoia, and M. Ponzoni, 2010, Therapeutic targeting of TLR9 inhibits cell growth and induces apoptosis in neuroblastoma, *Cancer Res*, United States, p. 9816-26.
- Carpentier, A., F. Laigle-Donadey, S. Zohar, L. Capelle, A. Behin, A. Tibi, N. Martin-Duverneuil, M. Sanson, L. Lacomblez, S. Taillibert, L. Puybasset, R. Van Effenterre, J. Y. Delattre, and A. F. Carpentier, 2006, Phase 1 trial of a CpG oligodeoxynucleotide for patients with recurrent glioblastoma, *Neuro Oncol*, United States, p. 60-6.
- Catalona, W. J., M. A. Hudson, D. P. Gillen, G. L. Andriole, and T. L. Ratliff, 1987, Risks and benefits of repeated courses of intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy for superficial bladder cancer: *J Urol*, v. 137, p. 220-4.
- Chicoine, M. R., M. Zahner, E. K. Won, R. R. Kalra, T. Kitamura, A. Perry, and R. Higashikubo, 2007, The in vivo antitumoral effects of lipopolysaccharide against glioblastoma multiforme are mediated in part by Toll-like receptor 4, *Neurosurgery*, v. 60: United States, p. 372-80; discussion 381.
- Codolo, G., M. Fassan, F. Munari, A. Volpe, P. Bassi, M. Rugge, F. Pagano, M. M. D'Elis, and M. de Bernard, 2012, HP-NAP inhibits the growth of bladder cancer in mice by activating a cytotoxic Th1 response: *Cancer Immunol Immunother*, v. 61, p. 31-40.
- Colonna, M., 2007, TLR pathways and IFN-regulatory factors: to each its own: *Eur J Immunol*, v. 37, p. 306-9.
- Damiano, V., R. Caputo, S. Garofalo, R. Bianco, R. Rosa, G. Merola, T. Gelardi, L. Racioppi, G. Fontanini, S. De Placido, E. R. Kandimalla, S. Agrawal, F. Ciardiello, and G. Tortora, 2007, TLR9 agonist acts by different mechanisms synergizing with bevacizumab in sensitive and cetuximab-resistant colon cancer xenografts, *Proc Natl Acad Sci U S A*, United States, p. 12468-73.
- de Reijke, T. M., P. C. Vos, E. C. de Boer, R. F. Bevers, W. H. de Muinck Keizer, K. H. Kurth, and D. H. Schamhart, 1993, Cytokine production by the human bladder carcinoma cell line T24 in the presence of bacillus Calmette-Guerin (BCG): *Urol Res*, v. 21, p. 349-52.
- De Santis, M., J. Bellmunt, G. Mead, J. M. Kerst, M. Leahy, P. Maroto, I. Skoneczna, S. Marreaud, R. de Wit, and R. Sylvester, 2009, Randomized phase II/III trial assessing gemcitabine/ carboplatin and methotrexate/carboplatin/vinblastine in

- patients with advanced urothelial cancer "unfit" for cisplatin-based chemotherapy: phase II--results of EORTC study 30986, *J Clin Oncol*, United States, p. 5634-9.
- Di, J. M., J. Pang, X. Y. Pu, Y. Zhang, X. P. Liu, Y. Q. Fang, X. X. Ruan, and X. Gao, 2009, Toll-like receptor 9 agonists promote IL-8 and TGF-beta1 production via activation of nuclear factor kappaB in PC-3 cells, *Cancer Genet Cytogenet*, United States, p. 60-7.
- Divrik, T., Ü. Yildirim, A. ş. Eroğlu, F. Zorlu, and H. Özen, 2006, Is a Second Transurethral Resection Necessary for Newly Diagnosed pT1 Bladder Cancer?: *The Journal of Urology*, v. 175, p. 1258-1261.
- Donmez, G., Y. Sullu, S. Baris, L. Yildiz, O. Aydin, F. Karagoz, and B. Kandemir, 2009, Vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and thrombospondin-1 (TSP-1) expression in urothelial carcinomas, *Pathol Res Pract*, v. 205: Germany, p. 854-7.
- Droemann, D., D. Albrecht, J. Gerdes, A. J. Ulmer, D. Branscheid, E. Vollmer, K. Dalhoff, P. Zabel, and T. Goldmann, 2005, Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9.: *Respir Res*, v. 6, p. 1.
- Felgner, P. L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, and M. Danielsen, 1987, Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 84, p. 7413-7.
- Ferlay J, S. H., Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM., GLOBOCAN 2008v1.2, Cancer Incidence and Mortality worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet].Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 27/08/2012.
- Fernandez, M. I., J. F. Lopez, B. Vivaldi, and F. Coz, 2012, Long-term impact of arsenic in drinking water on bladder cancer health care and mortality rates 20 years after end of exposure, *J Urol*, United States, Inc. Published by Elsevier Inc, p. 856-61.
- Freedman, N. D., D. T. Silverman, A. R. Hollenbeck, A. Schatzkin, and C. C. Abnet, 2011, Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women, *JAMA*, United States, p. 737-45.
- 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*, United States, p. 489-95.
- Gellersen, B., K. Reimann, A. Samalecos, S. Aupers, A.-M. Bamberger, B. Gellersen, K. Reimann, A. Samalecos, S. Aupers, and A.-M. Bamberger, 2010, Invasiveness of human endometrial stromal cells is promoted by decidualization and by trophoblast-derived signals, *Human Reproduction*, p. 862-73.

- Gioannini, T. L., and J. P. Weiss, 2007, Regulation of interactions of Gram-negative bacterial endotoxins with mammalian cells, *Immunol Res*, v. 39: United States, p. 249-60.
- Grossman, H. B., R. B. Natale, C. M. Tangen, V. O. Speights, N. J. Vogelzang, D. L. Trump, R. W. deVere White, M. F. Sarosdy, D. P. Wood, Jr., D. Raghavan, and E. D. Crawford, 2003, Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer, *N Engl J Med*, v. 349: United States, 2003 Massachusetts Medical Society, p. 859-66.
- Guey, L. T., M. Garcia-Closas, C. Murta-Nascimento, J. Lloreta, L. Palencia, M. Kogevinas, N. Rothman, G. Vellalta, M. L. Calle, G. Marenne, A. Tardon, A. Carrato, R. Garcia-Closas, C. Serra, D. T. Silverman, S. Chanock, F. X. Real, and N. Malats, 2010, Genetic susceptibility to distinct bladder cancer subphenotypes, *Eur Urol*, Switzerland, p. 283-92.
- Guiducci, C., G. Ott, J. H. Chan, E. Damon, C. Calacsan, T. Matray, K. D. Lee, R. L. Coffman, and F. J. Barrat, 2006, Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation, *J Exp Med*, United States, p. 1999-2008.
- Guillot, L., R. Le Goffic, S. Bloch, N. Escriou, S. Akira, M. Chignard, and M. Si-Tahar, 2005, Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus, *J Biol Chem*, v. 280: United States, p. 5571-80.
- Hashimoto, C., K. L. Hudson, and K. V. Anderson, 1988, The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein, *Cell*, v. 52: United States, p. 269-79.
- He, W., Q. Liu, L. Wang, W. Chen, N. Li, and X. Cao, 2007, TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance, *Mol Immunol*, v. 44: England, p. 2850-9.
- He, W., Y. Zhang, J. Zhang, Q. Yu, P. Wang, Z. Wang, and A. J. Smith, 2012, Cytidine-phosphate-guanosine oligonucleotides induce interleukin-8 production through activation of TLR9, MyD88, NF-kappaB, and ERK pathways in odontoblast cells, *J Endod*, United States, 2012 American Association of Endodontists. Published by Elsevier Inc, p. 780-5.
- Hegele, A., A. Dalpke, P. Barth, Z. Varga, K. Heeg, R. Hofmann, and P. Olbert, 2004, Antineoplastic effect of immunostimulatory DNA (CpG-ODN) in a murine C57-BL6/MB-49 transitional cell carcinoma model: *Anticancer Res*, v. 24, p. 2225-30.
- Heldwein, K. A., M. D. Liang, T. K. Andresen, K. E. Thomas, A. M. Marty, N. Cuesta, S. N. Vogel, M. J. Fenton, K. A. Heldwein, M. D. Liang, T. K. Andresen, K. E. Thomas, A. M. Marty, N. Cuesta, S. N. Vogel, and M. J. Fenton, 2003, TLR2 and TLR4 serve distinct roles in the host immune response against *Mycobacterium bovis* BCG: *Journal of Leukocyte Biology*, v. 74, p. 277-286.

- 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*, v. 408, p. 740-5.
- Herr, H. W., R. A. Badalament, D. A. Amato, V. P. Laudone, W. R. Fair, and W. F. Whitmore, Jr., 1989, Superficial bladder cancer treated with bacillus Calmette-Guerin: a multivariate analysis of factors affecting tumor progression: *J Urol*, v. 141, p. 22-9.
- Hofmann, M. A., C. Kors, H. Audring, P. Walden, W. Sterry, and U. Trefzer, 2008, Phase 1 evaluation of intravesically injected TLR9-agonist PF-3512676 in patients with basal cell carcinoma or metastatic melanoma, *J Immunother*, United States, p. 520-7.
- Huang, B., J. Zhao, H. Li, K.-L. He, Y. Chen, L. Mayer, J. C. Unkeless, and H. Xiong, 2005a, Toll-Like Receptors on Tumor Cells Facilitate Evasion of Immune Surveillance.
- Huang, B., J. Zhao, H. Li, K. L. He, Y. Chen, S. H. Chen, L. Mayer, J. C. Unkeless, and H. Xiong, 2005b, Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance, *Cancer Res*, United States, p. 5009-14.
- Ikeda, N., I. Toida, A. Iwasaki, K. Kawai, and H. Akaza, 2002, Surface antigen expression on bladder tumor cells induced by bacillus Calmette-Guerin (BCG): A role of BCG internalization into tumor cells: *Int J Urol*, v. 9, p. 29-35.
- Ilvesaro, J. M., M. A. Merrell, L. Li, S. Wakchoure, D. Graves, S. Brooks, E. Rahko, A. Jukkola-Vuorinen, K. S. Vuopala, K. W. Harris, and K. S. Selander, 2008, Toll-like receptor 9 mediates CpG oligonucleotide-induced cellular invasion, *Mol Cancer Res*, v. 6: United States, p. 1534-43.
- Ilvesaro, J. M., M. A. Merrell, T. M. Swain, J. Davidson, M. Zayzafoon, K. W. Harris, and K. S. Selander, 2007, Toll like receptor-9 agonists stimulate prostate cancer invasion in vitro: *Prostate*, v. 67, p. 774-81.
- Inoue, K., J. W. Slaton, S. J. Kim, P. Perrotte, B. Y. Eve, M. Bar-Eli, R. Radinsky, and C. P. Dinney, 2000, Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastasis in human bladder cancer: *Cancer Res*, v. 60, p. 2290-9.
- Jackson, A., A. Alexandroff, D. Fleming, S. Prescott, G. Chisholm, and K. James, 1994, Bacillus-calmette-guerin (bcg) organisms directly alter the growth of bladder-tumor cells: *Int J Oncol*, v. 5, p. 697-703.
- Jarvinen, R., E. Kaasinen, A. Sankila, and E. Rintala, 2009, Long-term efficacy of maintenance bacillus Calmette-Guerin versus maintenance mitomycin C instillation therapy in frequently recurrent TaT1 tumours without carcinoma in situ: a subgroup analysis of the prospective, randomised FinnBladder I study with a 20-year follow-up, *Eur Urol*, Switzerland, p. 260-5.
- Jing, Y. Y., Z. P. Han, K. Sun, S. S. Zhang, J. Hou, Y. Liu, R. Li, L. Gao, X. Zhao, Q. D. Zhao, M. C. Wu, and L. X. Wei, 2012, Toll-like receptor 4 signaling

promotes epithelial-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma induced by lipopolysaccharide, *BMC Med*, v. 10, p. 98.

Jozsef, L., T. Khreiss, D. El Kebir, and J. G. Filep, 2006, Activation of TLR-9 induces IL-8 secretion through peroxynitrite signaling in human neutrophils, *J Immunol*, United States, p. 1195-202.

Kadowaki, N., S. Ho, S. Antonenko, R. W. Malefyt, R. A. Kastelein, F. Bazan, and Y. J. Liu, 2001, Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens: *J Exp Med*, v. 194, p. 863-9.

Kagan, J. C., and R. Medzhitov, 2006, Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling, *Cell*, v. 125: United States, p. 943-55.

Kaupilla, J. H., T. J. Karttunen, J. Saarnio, P. Nyberg, T. Salo, D. E. Graves, P. P. Lehenkari, and K. S. Selander, 2012, Short DNA sequences and bacterial DNA induce esophageal, gastric, and colorectal cancer cell invasion: *APMIS*.

Kawai, T., and S. Akira, 2007, TLR signaling, *Semin Immunol*, v. 19: England, p. 24-32.

Kessenbrock, K., V. Plaks, and Z. Werb, 2010, Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment, *Cell*, United States, 2010 Elsevier Inc, p. 52-67.

Kiemeney, L. A., P. Sulem, S. Besenbacher, S. H. Vermeulen, A. Sigurdsson, G. Thorleifsson, D. F. Gudbjartsson, S. N. Stacey, J. Gudmundsson, C. Zanon, J. Kostic, G. Masson, H. Bjarnason, S. T. Palsson, O. B. Skarphedinsson, S. A. Gudjonsson, J. A. Witjes, A. J. Grotenhuis, G. W. Verhaegh, D. T. Bishop, S. C. Sak, A. Choudhury, F. Elliott, J. H. Barrett, C. D. Hurst, P. J. de Verdier, C. Ryk, P. Rudnai, E. Gurzau, K. Koppova, P. Vineis, S. Polidoro, S. Guarrera, C. Sacerdote, M. Campagna, D. Placidi, C. Arici, M. P. Zeegers, E. Kellen, B. S. Gutierrez, J. I. Sanz-Velez, M. Sanchez-Zalabardo, G. Valdivia, M. D. Garcia-Prats, J. G. Hengstler, M. Blaszkewicz, H. Dietrich, R. A. Ophoff, L. H. van den Berg, K. Alexiusdottir, K. Kristjansson, G. Geirsson, S. Nikulasson, V. Petursdottir, A. Kong, T. Thorgeirsson, N. A. Mungan, A. Lindblom, M. A. van Es, S. Porru, F. Buntinx, K. Golka, J. I. Mayordomo, R. Kumar, G. Matullo, G. Steineck, A. E. Kiltie, K. K. Aben, E. Jonsson, U. Thorsteinsdottir, M. A. Knowles, T. Rafnar, and K. Stefansson, 2010, A sequence variant at 4p16.3 confers susceptibility to urinary bladder cancer, *Nat Genet*, United States, p. 415-9.

Kiemeney, L. A., S. Thorlacius, P. Sulem, F. Geller, K. K. Aben, S. N. Stacey, J. Gudmundsson, M. Jakobsdottir, J. T. Bergthorsson, A. Sigurdsson, T. Blondal, J. A. Witjes, S. H. Vermeulen, C. A. Hulsbergen-van de Kaa, D. W. Swinkels, M. Ploeg, E. B. Cornel, H. Vergunst, T. E. Thorgeirsson, D. Gudbjartsson, S. A. Gudjonsson, G. Thorleifsson, K. T. Kristinsson, M. Mouy, S. Snorraddottir, D. Placidi, M. Campagna, C. Arici, K. Koppova, E. Gurzau, P. Rudnai, E. Kellen, S. Polidoro, S. Guarrera, C. Sacerdote, M. Sanchez, B. Saez, G. Valdivia, C. Ryk, P. de Verdier, A. Lindblom, K. Golka, D. T. Bishop, M. A. Knowles, S. Nikulasson, V. Petursdottir, E. Jonsson, G. Geirsson, B. Kristjansson, J. I. Mayordomo, G. Steineck, S. Porru, F. Buntinx, M. P. Zeegers, T. Fletcher, R.

- Kumar, G. Matullo, P. Vineis, A. E. Kiltie, J. R. Gulcher, U. Thorsteinsdottir, A. Kong, T. Rafnar, and K. Stefansson, 2008, Sequence variant on 8q24 confers susceptibility to urinary bladder cancer, *Nat Genet*, United States, p. 1307-12.
- Kim, D., S. Kwon, C. S. Ahn, Y. Lee, S. Y. Choi, J. Park, H. Y. Kwon, and H. J. Kwon, 2011, Adjuvant effect of liposome-encapsulated natural phosphodiester CpG-DNA: *BMB Rep*, v. 44, p. 758-63.
- Kim, Y. H., M. Girardi, M. Duvic, T. Kuzel, B. K. Link, L. Pinter-Brown, and A. H. Rook, 2010, Phase I trial of a Toll-like receptor 9 agonist, PF-3512676 (CPG 7909), in patients with treatment-refractory, cutaneous T-cell lymphoma, *J Am Acad Dermatol*, United States, Inc. Published by Mosby, Inc, p. 975-83.
- Kim, Y. H., D. Gratzinger, C. Harrison, J. D. Brody, D. K. Czerwinski, W. Z. Ai, A. Morales, F. Abdulla, L. Xing, D. Navi, R. J. Tibshirani, R. H. Advani, B. Lingala, S. Shah, R. T. Hoppe, and R. Levy, 2012, In situ vaccination against mycosis fungoides by intratumoral injection of a TLR9 agonist combined with radiation: a phase 1/2 study, *Blood*, United States, p. 355-63.
- Kopp, E., and R. Medzhitov, 2003, Recognition of microbial infection by Toll-like receptors, *Curr Opin Immunol*, v. 15: England, p. 396-401.
- Krieg, A. M., 2004, Antitumor applications of stimulating toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides: *Curr Oncol Rep*, v. 6, p. 88-95.
- Krieg, A. M., 2006, Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation, *Nat Rev Drug Discov*, v. 5: England, p. 471-84.
- Krieg, A. M., 2008, Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer, *Oncogene*, v. 27: England, p. 161-7.
- Kundu, S. D., C. Lee, B. K. Billips, G. M. Habermacher, Q. Zhang, V. Liu, L. Y. Wong, D. J. Klumpp, and P. Thumbikat, 2008, The toll-like receptor pathway: a novel mechanism of infection-induced carcinogenesis of prostate epithelial cells: *Prostate*, v. 68, p. 223-9.
- Kurt-Jones, E. A., L. Popova, L. Kwinn, L. M. Haynes, L. P. Jones, R. A. Tripp, E. E. Walsh, M. W. Freeman, D. T. Golenbock, L. J. Anderson, and R. W. Finberg, 2000, Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus: *Nat Immunol*, v. 1, p. 398-401.
- Lattime, E. C., L. G. Gomella, and P. A. McCue, 1992, Murine bladder carcinoma cells present antigen to BCG-specific CD4+ T-cells: *Cancer Res*, v. 52, p. 4286-90.
- Latz, E., A. Schoenemeyer, A. Visintin, K. A. Fitzgerald, B. G. Monks, C. F. Knetter, E. Lien, N. J. Nilsen, T. Espevik, and D. T. Golenbock, 2004, TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome, *Nat Immunol*, v. 5: United States, p. 190-8.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, and J. A. Hoffmann, 1996, The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults, *Cell*, v. 86: United States, p. 973-83.

- Leonard, J. P., B. K. Link, C. Emmanouilides, S. A. Gregory, D. Weisdorf, J. Andrey, J. Hainsworth, J. A. Sparano, D. E. Tsai, S. Horning, A. M. Krieg, and G. J. Weiner, 2007, Phase I Trial of Toll-Like Receptor 9 Agonist PF-3512676 with and Following Rituximab in Patients with Recurrent Indolent and Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma.
- Liang, X., L. Lu, Z. Chen, T. Vickers, H. Zhang, J. J. Fung, and S. Qian, 2003, Administration of dendritic cells transduced with antisense oligodeoxyribonucleotides targeting CD80 or CD86 prolongs allograft survival: Transplantation, v. 76, p. 721-9.
- Lim, E. J., S. H. Lee, J. G. Lee, B. R. Chin, Y. S. Bae, J. R. Kim, C. H. Lee, and S. H. Baek, 2006, Activation of toll-like receptor-9 induces matrix metalloproteinase-9 expression through Akt and tumor necrosis factor-alpha signaling, FEBS Lett, Netherlands, p. 4533-8.
- Link, B. K., Z. K. Ballas, D. Weisdorf, J. E. Wooldridge, A. D. Bossler, M. Shannon, W. L. Rasmussen, A. M. Krieg, and G. J. Weiner, 2006, Oligodeoxynucleotide CpG 7909 delivered as intravenous infusion demonstrates immunologic modulation in patients with previously treated non-Hodgkin lymphoma, J Immunother, United States, p. 558-68.
- Liu, H., M. Komai-Koma, D. Xu, and F. Y. Liew, 2006, Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4+ CD25+ regulatory T cells, Proc Natl Acad Sci U S A, United States, p. 7048-53.
- Lokeshwar, V. B., T. Habuchi, H. B. Grossman, W. M. Murphy, S. H. Hautmann, G. P. Hemstreet, 3rd, A. V. Bono, R. H. Getzenberg, P. Goebell, B. J. Schmitz-Drager, J. A. Schalken, Y. Fradet, M. Marberger, E. Messing, and M. J. Droller, 2005, Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers, Urology, United States, p. 35-63.
- MacKenzie, T., M. S. Zens, A. Ferrara, A. Schned, and M. R. Karagas, 2011, Diabetes and risk of bladder cancer: evidence from a case-control study in New England: Cancer, v. 117, p. 1552-6.
- Malmstrom, P. U., R. J. Sylvester, D. E. Crawford, M. Friedrich, S. Krege, E. Rintala, E. Solsona, S. M. Di Stasi, and J. A. Witjes, 2009, An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus Calmette-Guerin for non-muscle-invasive bladder cancer, Eur Urol, Switzerland, p. 247-56.
- Manegold, C., N. v. Zandwijk, A. Szczesna, P. Zatloukal, J. S. K. Au, M. Blasinska-Morawiec, P. Serwatowski, M. Krzakowski, J. Jassem, E. H. Tan, R. J. Benner, A. Ingrosso, S. J. Meech, D. Readett, and N. Thatcher, 2012, A phase III randomized study of gemcitabine and cisplatin with or without PF-3512676 (TLR9 agonist) as first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer.
- Mangsbo, S. M., C. Nivalga, M. Essand, A. Loskog, and T. H. Totterman, 2008, CpG therapy is superior to BCG in an orthotopic bladder cancer model and generates CD4+ T-cell immunity, J Immunother, v. 31: United States, p. 34-42.

- McGettrick, A. F., and L. A. O'Neill, 2007, Toll-like receptors: key activators of leucocytes and regulator of haematopoiesis, *Br J Haematol*, v. 139: England, p. 185-93.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, Jr., 1997, A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity: *Nature*, v. 388, p. 394-7.
- Merrell, M. A., J. M. Ilvesaro, N. Lehtonen, T. Sorsa, B. Gehrs, E. Rosenthal, D. Chen, B. Shackley, K. W. Harris, and K. S. Selander, 2006, Toll-like receptor 9 agonists promote cellular invasion by increasing matrix metalloproteinase activity, *Mol Cancer Res*, v. 4: United States, p. 437-47.
- Merz, V. W., D. Marth, R. Kraft, D. K. Ackermann, E. J. Zingg, and U. E. Studer, 1995, Analysis of early failures after intravesical instillation therapy with bacille Calmette-Guerin for carcinoma in situ of the bladder: *Br J Urol*, v. 75, p. 180-4.
- Mian, B. M., C. P. N. Dinney, C. E. Bermejo, P. Sweeney, C. Tellez, X. D. Yang, J. M. Gudas, D. J. McConkey, and M. Bar-Eli, 2003, Fully Human Anti-Interleukin 8 Antibody Inhibits Tumor Growth in Orthotopic Bladder Cancer Xenografts via Down-Regulation of Matrix Metalloproteases and Nuclear Factor- κ B: *Clin Cancer Res* p. 3167-75.
- Michaud, D. S., 2007, Chronic inflammation and bladder cancer, *Urol Oncol*, United States, p. 260-8.
- Miller, S. I., R. K. Ernst, and M. W. Bader, 2005, LPS, TLR4 and infectious disease diversity, *Nat Rev Microbiol*, v. 3: England, p. 36-46.
- Miyake, K., 2007, Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors, *Semin Immunol*, v. 19: England, p. 3-10.
- Miyazaki, J., K. Kawai, T. Oikawa, A. Johraku, K. Hattori, T. Shimazui, and H. Akaza, 2006, Uroepithelial cells can directly respond to *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin through Toll-like receptor signalling, *BJU Int*, v. 97: England, p. 860-4.
- Molenkamp, B. G., P. A. van Leeuwen, S. Meijer, B. J. Sluijter, P. G. Wijnands, A. Baars, A. J. van den Eertwegh, R. J. Scheper, and T. D. de Gruijl, 2007, Intradermal CpG-B activates both plasmacytoid and myeloid dendritic cells in the sentinel lymph node of melanoma patients, *Clin Cancer Res*, United States, p. 2961-9.
- Molteni, M., D. Marabella, C. Orlandi, and C. Rossetti, 2006, Melanoma cell lines are responsive in vitro to lipopolysaccharide and express TLR-4, *Cancer Lett*, v. 235: Ireland, p. 75-83.
- Morales, A., D. Eidinger, and A. W. Bruce, 1976, Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors: *J Urol*, v. 116, p. 180-3.
- Nurmenniemi, S., P. Kuvaja, S. Lehtonen, S. Tiuraniemi, I. Alahuhta, R. K. Mattila, J. Risteli, T. Salo, K. S. Selander, P. Nyberg, and P. Lehenkari, 2010, Toll-like

- receptor 9 ligands enhance mesenchymal stem cell invasion and expression of matrix metalloprotease-13, *Exp Cell Res*, v. 316: United States, 2010 Elsevier Inc, p. 2676-82.
- Ohashi, K., V. Burkart, S. Flohe, and H. Kolb, 2000, Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex, *J Immunol*, v. 164: United States, p. 558-61.
- Okamoto, M., K. Hattori, and R. Oyasu, 1997, Interleukin-6 functions as an autocrine growth factor in human bladder carcinoma cell lines in vitro, *Int J Cancer*, v. 72: United States, p. 149-54.
- Okamoto, M., and R. Oyasu, 1997, Transformation in vitro of a nontumorigenic rat urothelial cell line by tumor necrosis factor-alpha: *Lab Invest*, v. 77, p. 139-44.
- Olbert, P. J., A. J. Schrader, C. Simon, A. Dalpke, P. Barth, R. Hofmann, and A. Hegele, 2009, In vitro and in vivo effects of CpG-Oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) on murine transitional cell carcinoma and on the native murine urinary bladder wall, *Anticancer Res*, v. 29: Greece, p. 2067-76.
- Pashenkov, M., G. Goess, C. Wagner, M. Hormann, T. Jandl, A. Moser, C. M. Britten, J. Smolle, S. Koller, C. Mauch, I. Tantcheva-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*, United States, p. 5716-24.
- Pham, T. N., C. Y. Hong, J. J. Min, J. H. Rhee, T. A. Nguyen, B. C. Park, D. H. Yang, Y. K. Park, H. R. Kim, I. J. Chung, H. J. Kim, and J. J. Lee, 2010, Enhancement of antitumor effect using dendritic cells activated with natural killer cells in the presence of Toll-like receptor agonist, *Exp Mol Med*, Korea South, p. 407-19.
- Pignot, G., I. Bieche, S. Vacher, C. Guet, A. Vieillefond, B. Debre, R. Lidereau, and D. Amsellem-Ouazana, 2009, Large-scale real-time reverse transcription-PCR approach of angiogenic pathways in human transitional cell carcinoma of the bladder: identification of VEGFA as a major independent prognostic marker, *Eur Urol*, v. 56: Switzerland, p. 678-88.
- Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler, 1998, Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene: *Science*, v. 282, p. 2085-8.
- Prescott, S., A. M. Jackson, S. J. Hawkyard, A. B. Alexandroff, and K. James, 2000, Mechanisms of action of intravesical bacille Calmette-Guerin: local immune mechanisms: *Clin Infect Dis*, v. 31 Suppl 3, p. S91-3.
- Puryrsko, A. S., H. M. Leao Filho, and B. R. Herts, 2012, Radiologic imaging of patients with bladder cancer: *Semin Oncol*, v. 39, p. 543-58.
- Qian, Y., J. Deng, H. Xie, L. Geng, L. Zhou, Y. Wang, S. Yin, X. Feng, and S. Zheng, 2009, Regulation of TLR4-induced IL-6 response in bladder cancer cells by

- opposing actions of MAPK and PI3K signaling: *J Cancer Res Clin Oncol*, v. 135, p. 379-86.
- Qureshi, S. T., L. Lariviere, G. Leveque, S. Clermont, K. J. Moore, P. Gros, and D. Malo, 1999, Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4): *J Exp Med*, v. 189, p. 615-25.
- Raetz, C. R., and C. Whitfield, 2002, Lipopolysaccharide endotoxins, *Annu Rev Biochem*, v. 71: United States, p. 635-700.
- Rassa, J. C., J. L. Meyers, Y. Zhang, R. Kudaravalli, and S. R. Ross, 2002, Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4, *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99: United States, p. 2281-6.
- Rath, T., J. Stockle, M. Roderfeld, A. Tschuschner, J. Graf, and E. Roeb, 2011, Matrix metalloproteinase-13 is regulated by toll-like receptor-9 in colorectal cancer cells and mediates cellular migration, *Oncol Lett*, p. 483-488.
- Ren, T., Z. K. Wen, Z. M. Liu, Y. J. Liang, Z. L. Guo, and L. Xu, 2007, Functional expression of TLR9 is associated to the metastatic potential of human lung cancer cell: functional active role of TLR9 on tumor metastasis, *Cancer Biol Ther*, United States, p. 1704-9.
- Richterstetter, B. Wullich, K. Amann, L. Haeberle, D. G. Engehausen, P. J. Goebell, F. S. Krause, The value of extended transurethral resection of bladder tumour (TURBT) in the treatment of bladder cancer: *BJU International*, v. 110, p. 76-9.
- Ries, L. A. G., M. E. Reichman, D. R. Lewis, B. F. Hankey, B. K. Edwards, L. A. G. Ries, M. E. Reichman, D. R. Lewis, B. F. Hankey, and B. K. Edwards, 2003, Cancer Survival and Incidence from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program: *The Oncologist*, v. 8, p. 541-552.
- Rothman, N., M. Garcia-Closas, N. Chatterjee, N. Malats, X. Wu, J. D. Figueroa, F. X. Real, D. Van Den Berg, G. Matullo, D. Baris, M. Thun, L. A. Kiemeny, P. Vineis, I. De Vivo, D. Albanes, M. P. Purdue, T. Rafnar, M. A. Hildebrandt, A. E. Kiltie, O. Cussenot, K. Golka, R. Kumar, J. A. Taylor, J. I. Mayordomo, K. B. Jacobs, M. Kogevinas, A. Hutchinson, Z. Wang, Y. P. Fu, L. Prokunina-Olsson, L. Burdett, M. Yeager, W. Wheeler, A. Tardon, C. Serra, A. Carrato, R. Garcia-Closas, J. Lloreta, A. Johnson, M. Schwenn, M. R. Karagas, A. Schned, G. Andriole, Jr., R. Grubb, 3rd, A. Black, E. J. Jacobs, W. R. Diver, S. M. Gapstur, S. J. Weinstein, J. Virtamo, V. K. Cortessis, M. Gago-Dominguez, M. C. Pike, M. C. Stern, J. M. Yuan, D. J. Hunter, M. McGrath, C. P. Dinney, B. Czerniak, M. Chen, H. Yang, S. H. Vermeulen, K. K. Aben, J. A. Witjes, R. R. Makkinje, P. Sulem, S. Besenbacher, K. Stefansson, E. Riboli, P. Brennan, S. Panico, C. Navarro, N. E. Allen, H. B. Bueno-de-Mesquita, D. Trichopoulos, N. Caporaso, M. T. Landi, F. Canzian, B. Ljungberg, A. Tjonneland, F. Clavel-Chapelon, D. T. Bishop, M. T. Teo, M. A. Knowles, S. Guarrera, S. Polidoro, F. Ricceri, C. Sacerdote, A. Allione, G. Cancel-Tassin, S. Selinski, J. G. Hengstler, H. Dietrich, T. Fletcher, P. Rudnai, E. Gurzau, K. Koppova, S. C. Bolick, A. Godfrey, Z. Xu, et al., 2010, A multi-stage genome-wide association study of bladder cancer identifies multiple susceptibility loci, *Nat Genet*, United States, p. 978-84.

- Sauter, G., F. Algaba, M. Amin, and e. al., Tumours of the urinary system: non-invasive urothelial neoplasias. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn I, editors. WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon, France: IARCC Press; 2004.
- Schaefer, T. M., J. V. Fahey, J. A. Wright, and C. R. Wira, 2005, Innate immunity in the human female reproductive tract: antiviral response of uterine epithelial cells to the TLR3 agonist poly(I:C), *J Immunol*, v. 174: United States, p. 992-1002.
- Schenk-Braat, E. A., and C. H. Bangma, 2005, Immunotherapy for superficial bladder cancer: *Cancer Immunol Immunother*, v. 54, p. 414-23.
- Schreibelt, G., J. Tel, K. H. Sliepen, D. Benitez-Ribas, C. G. Figdor, G. J. Adema, and I. J. de Vries, 2010, Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy: *Cancer Immunol Immunother*, v. 59, p. 1573-82.
- Shelley, M. D., J. Barber, T. Wilt, and M. D. Mason, 2002, Surgery versus radiotherapy for muscle invasive bladder cancer, *Cochrane Database Syst Rev*, England, p. CD002079.
- Shelley, M. D., H. Kynaston, J. Court, T. J. Wilt, B. Coles, K. Burgon, M. D. Mason, 2012, A systematic review of intravesical bacillus Calmette-Guérin plus transurethral resection vs transurethral resection alone in Ta and T1 bladder cancer: *BJU International*, v. 88, p. 209-216.
- Shephard, E. A., S. Stapley, R. D. Neal, P. Rose, F. M. Walter, and W. T. Hamilton, 2012, Clinical features of bladder cancer in primary care: *Br J Gen Pract*, v. 62, p. e598-604.
- Silva-Ramos, M., N. Louro, R. Versos, V. Cavadas, and F. Marcelo, 2012, Does 3D Ultrasound Enhance the Diagnosis of Bladder Tumours in Patients with Haematuria?: *ISRN Urol*, v. 2012, p. 158437.
- Sobin, L., M. Gospodarowicz, and C. Wittekind, eds., *TNM classification of malignant tumors (UICC International Union Against Cancer)*. ed 7. New York, NY: Wiley-Blackwell; 2009. p.262-5.
- Song, J., M. J. Duncan, G. Li, C. Chan, R. Grady, A. Stapleton, S. N. Abraham, 2007, A Novel TLR4-Mediated Signaling Pathway Leading to IL-6 Responses in Human Bladder Epithelial Cells: *PLOS Pathogens*, v. 3.
- Steinman, R. M., and J. Banchereau, 2007, Taking dendritic cells into medicine, *Nature*, England, p. 419-26.
- Sylvester, R. J., M. A. Brausi, W. J. Kirkels, W. Hoeltl, F. Calais Da Silva, P. H. Powell, S. Prescott, Z. Kirkali, C. van de Beek, T. Gorlia, and T. M. de Reijke, 2010, Long-term efficacy results of EORTC genito-urinary group randomized phase 3 study 30911 comparing intravesical instillations of epirubicin, bacillus Calmette-Guerin, and bacillus Calmette-Guerin plus isoniazid in patients with

intermediate- and high-risk stage Ta T1 urothelial carcinoma of the bladder, *Eur Urol*, Switzerland, Published by Elsevier B.V, p. 766-73.

- Sylvester, R. J., W. Oosterlinck, and A. P. van der Meijden, 2004, A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage Ta T1 bladder cancer: a meta-analysis of published results of randomized clinical trials, *J Urol*, United States, p. 2186-90, quiz 2435.
- Sylvester, R. J., M. A. van der, and D. L. Lamm, 2002, Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials: *J Urol*, v. 168, p. 1964-70.
- Sylvester, R. J., A. van der Meijden, J. A. Witjes, G. Jakse, N. Nonomura, C. Cheng, A. Torres, R. Watson, and K. H. Kurth, 2005, High-grade Ta urothelial carcinoma and carcinoma in situ of the bladder, *Urology*, United States, p. 90-107.
- Sylvester, R. J., A. P. M. van der Meijden, W. Oosterlinck, J. A. Witjes, C. Bouffouix, L. Denis, D. W. W. Newling, and K. Kurth, 2006, Predicting Recurrence and Progression in Individual Patients with Stage Ta T1 Bladder Cancer Using EORTC Risk Tables: A Combined Analysis of 2596 Patients from Seven EORTC Trials: *European Urology*, v. 49, p. 466-477.
- Szlosarek, P., K. A. Charles, and F. R. Balkwill, 2006, Tumour necrosis factor- α as a tumour promoter, v. 42, p. 745-750.
- Tanaka, J., K. Sugimoto, K. Shiraki, M. Tameda, S. Kusagawa, K. Nojiri, T. Beppu, K. Yoneda, N. Yamamoto, K. Uchida, T. Kojima, and Y. Takei, 2010, Functional cell surface expression of toll-like receptor 9 promotes cell proliferation and survival in human hepatocellular carcinomas: *Int J Oncol*, v. 37, p. 805-14.
- Termeer, C., F. Benedix, J. Sleeman, C. Fieber, U. Voith, T. Ahrens, K. Miyake, M. Freudenberg, C. Galanos, and J. C. Simon, 2002, Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4: *J Exp Med*, v. 195, p. 99-111.
- Thompson, J. A., T. Kuzel, B. J. Drucker, W. J. Urba, and R. M. Bukowski, 2009, Safety and efficacy of PF-3512676 for the treatment of stage IV renal cell carcinoma: an open-label, multicenter phase I/II study, *Clin Genitourin Cancer*, United States, p. E58-65.
- Tichomirowa, M., M. Theodoropoulou, P. Lohrer, L. Schaaf, M. Losa, E. Uhl, M. Lange, E. Arzt, G. K. Stalla, and U. Renner, 2005, Bacterial endotoxin (lipopolysaccharide) stimulates interleukin-6 production and inhibits growth of pituitary tumour cells expressing the toll-like receptor 4, *J Neuroendocrinol*, v. 17: England, p. 152-60.
- Tsuji, S., M. Matsumoto, O. Takeuchi, S. Akira, I. Azuma, A. Hayashi, K. Toyoshima, T. Seya, S. Tsuji, M. Matsumoto, O. Takeuchi, S. Akira, I. Azuma, A. Hayashi, K. Toyoshima, and T. Seya, 2000, Maturation of Human Dendritic Cells by Cell Wall Skeleton of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin: Involvement of Toll-Like Receptors: *Infection and Immunity*, v. 68, p. 6883-6890.

- Underhill, D. M., A. Ozinsky, A. M. Hajjar, A. Stevens, C. B. Wilson, M. Bassetti, and A. Aderem, 1999, The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens: *Nature*, v. 401, p. 811-5.
- Vollmer, J., R. Weeratna, P. Payette, M. Jurk, C. Schetter, M. Laucht, T. Wader, S. Tluk, M. Liu, H. L. Davis, and A. M. Krieg, 2004, Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities: *Eur J Immunol*, v. 34, p. 251-62.
- von der Maase, H., L. Sengelov, J. T. Roberts, S. Ricci, L. Dogliotti, T. Oliver, M. J. Moore, A. Zimmermann, and M. Arning, 2005, Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer, *J Clin Oncol*, United States, p. 4602-8.
- von Meyenn, F., M. Schaefer, H. Weighardt, S. Bauer, C. J. Kirschning, H. Wagner, and T. Sparwasser, 2006, Toll-like receptor 9 contributes to recognition of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin by Flt3-ligand generated dendritic cells: *Immunobiology*, v. 211, p. 557-565.
- Vora, P., A. Youdim, L. S. Thomas, M. Fukata, S. Y. Tesfay, K. Lukasek, K. S. Michelsen, A. Wada, T. Hirayama, M. Ardit, and M. T. Abreu, 2004, Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells, *J Immunol*, v. 173: United States, p. 5398-405.
- Wang, C., S. Cao, Y. Yan, Q. Ying, T. Jiang, K. Xu, and A. Wu, 2010, TLR9 expression in glioma tissues correlated to glioma progression and the prognosis of GBM patients.: *BMC Cancer*, v. 10, p. 415.
- Wooldridge, J. E., and G. J. Weiner, 2003, CpG DNA and cancer immunotherapy: orchestrating the antitumor immune response: *Curr Opin Oncol*, v. 15, p. 440-5.
- Wu, D., J. Ding, L. Wang, H. Pan, Z. Zhou, J. Zhou, and P. Qu, 2013, microRNA-125b inhibits cell migration and invasion by targeting matrix metalloproteinase 13 in bladder cancer, *Oncol Lett*, p. 829-834.
- Xie, K., 2001, Interleukin-8 and human cancer biology: *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 12, p. 375-391.
- Xu, Y., Y. Zhao, H. Huang, G. Chen, X. Wu, Y. Wang, W. Chang, Z. Zhu, Y. Feng, and D. Wu, 2010, Expression and function of toll-like receptors in multiple myeloma patients: toll-like receptor ligands promote multiple myeloma cell growth and survival via activation of nuclear factor-kappaB.: *Br J Haematol*, v. 150, p. 543-53.
- Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, H. Sanjo, S. Uematsu, T. Kaisho, K. Hoshino, O. Takeuchi, M. Kobayashi, T. Fujita, K. Takeda, and S. Akira, 2002, Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4, *Nature*, v. 420: England, p. 324-9.

- Yu, L., and S. Chen, 2008, Toll-like receptors expressed in tumor cells: targets for therapy: *Cancer Immunol Immunother*, v. 57, p. 1271-8.
- Zaghloul, M. S., 2012, Bladder cancer and schistosomiasis: *J Egypt Natl Canc Inst*, v. 24, p. 151-9.
- Zhao, W., J. S. Schorey, M. Bong-Mastek, J. Ritchey, E. J. Brown, and T. L. Ratliff, 2000, Role of a bacillus Calmette-Guerin fibronectin attachment protein in BCG-induced antitumor activity: *Int J Cancer*, v. 86, p. 83-8.

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg

Aumüller, Barth, Bartsch, Baum, Behr, Berger, Bien, Czubayko, Daut, Dodel, Engenhardt-Cabillic, Fuchs-Winkelmann, Görg, Hertl, Hofmann, Hoyer, Klingmüller, Klose, Koolmann, Lill, Lohoff, Maier, Maisch, Moll, Moosdorf, Müller, Neubauer, Oertl, Pagenstecher, Renz, Richter, Rose, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schmidt, Sesterhenn, Sekundo, Teymoortash, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner und Wulff.

Danksagung

Ich danke

Herrn PD Dr. Peter Jochen Olbert und Herrn PD Dr. Jörg Hänze für die stets hervorragende Betreuung,

Herrn Prof. Dr. Rainer Hofmann für die Möglichkeit, meine Arbeit in der Klinik für Urologie und Kinderurologie zu erstellen,

Frau Ecaterina Oplesch und Frau Nadine Zimmer für das Beibringen der laborexperimentellen Techniken und die Unterstützung bei auftretenden Problemen,

meinen Mitdoktoranden für die wissenschaftlich und menschlich bereichernde Zusammenarbeit, insbesondere Markus Henrici für die Vorarbeit zu meinem Thema,

meinen Eltern und meiner Schwester für die immerwährende, bedingungslose Unterstützung.

Publikationen

Vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Kesch C, Hänze J, Henrici M, Kamlah F, Hegele A, Hofmann R, Olbert PJ **V1-1**
Expression and function of TLR4 and TLR9 in human bladder cancer cells
Der Urologe 1.2013; 101

Olbert PJ, Kesch C, Henrici M, Subtil FS, Honacker A, Hegele A, Hofmann R, Hänze J.
TLR4- and TLR9-dependent effects on cytokines, cell viability, and invasion in human bladder cancer cells. Urol Oncol. 2014 Dec 9. pii: S1078-1439(14)00336-6.
doi: 10.1016/j.urolonc.2014.09.016.