

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. E. Weihe)
und dem Medizinischen Zentrum für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. J. A. Werner)
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



Immunologisch basierte Wirkmechanismen der O₃/O₂-PP-Tumorthherapie

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Naturwissenschaften
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Annette Rossmann

aus Diez a. d. Lahn

Marburg, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
30.10.2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. H. Schäfer

Referenten: PD Dr. M. Bette, Prof. Dr. R. Mandic

Korreferent: Prof. Dr. S. Bauer

Diese Arbeit wurde in wesentlichen Teilen in folgender Publikation veröffentlicht:

Rossmann A, Mandic R, Heinis J, Hoeffken H, Kuessner O, Kinscherf R, Weihe E, Bette M (2014). "Intraperitoneal oxidative stress in rabbits with papillomavirus-associated head and neck cancer induces tumoricidal immune response that is adoptively transferable." Clin Cancer Res **20**(16):4289-301.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches.....	1
1.2 Das VX2-Tumormodell des weißen Neuseelandkaninchens	2
1.3 Ozon	3
1.3.1 Medizinische Anwendung von Ozon.....	3
1.3.2 Ozon: oxidativer Stressor und Immunmediator.....	4
1.4 Das Immunsystem	6
1.4.1 Die angeborene und adaptive Immunantwort.....	6
1.4.2 Tumormimmunologie	7
1.4.2.1 Faktoren der <i>Immunosurveillance</i>	9
1.4.3 Tumormimmuntherapie.....	11
1.4.3.2 Adoptiver Zelltransfer in der Tumortherapie	12
1.5 ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinase.....	12
1.5.1 Die ErbB-Rezeptorfamilie und ihre Liganden.....	13
1.5.2 ErbB-induzierte Signalwege	15
1.5.3 Physiologische Bedeutung der ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinase	16
1.5.4 Bedeutung der ErbB-Rezeptoren und Liganden in der Tumorbologie	17
1.5.4.1 Bedeutung der ErbB-Familie bei HNSCC.....	17
1.6 Zielsetzung der Arbeit	18
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Allgemein benötigte Materialien	20
2.1.1 Geräte.....	20
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.3 Chemikalien.....	21
2.1.4 Puffer	21
2.1.5 Software	21
2.2 Methoden.....	22
2.2.1 Tierversuche.....	22
2.2.1.1 Benötigte Materialien.....	22
2.2.1.2 Versuchstiere	22
2.2.1.3 Tierversuchsdesign	23
2.2.1.4 Herstellung der VX2-Tumorzellsuspension	26
2.2.1.5 Aurikuläre Tumorzellinokulation	27

2.2.1.6	Therapeutische Intervention.....	27
2.2.1.7	Ablation des Primärtumors	28
2.2.1.8	Analysen	29
2.2.1.8.1	Blutparameter	29
2.2.1.8.2	PET-CT.....	29
2.2.1.9	Isolation und adoptiver Transfer peripherer Blutleukozyten.....	30
2.2.2	Gewebepräparation	31
2.2.2.1	Benötigte Materialien.....	31
2.2.2.2	Probenaufarbeitung für molekularbiologische Analysen.....	31
2.2.2.3	Probenbehandlung für histologische Analysen	32
2.2.2.4	Herstellung von Gewebeschnitten.....	32
2.2.3	Histologische Färbungen.....	32
2.2.3.1	Benötigte Materialien.....	32
2.2.3.2	Giemsa-Färbung	33
2.2.3.3	Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung.....	34
2.2.3.4	Immunhistochemische Färbungen für die Hellfeldmikroskopie	34
2.2.3.5	Quantifizierung der CD3-positiven T-Zellen im Tumor	36
2.2.4	Molekularbiologische Methoden	36
2.2.4.1	Benötigte Materialien.....	36
2.2.4.2	RNA-Extraktion.....	37
2.2.4.3	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren.....	38
2.2.4.4	Bestimmung der RNA-Qualität	38
2.2.4.5	Reverse Transkription	39
2.2.4.6	Polymerasekettenreaktion	40
2.2.4.7	Agarose Gelelektrophorese.....	41
2.2.4.8	Gelextraktion	42
2.2.4.9	Quantitative PCR (qPCR).....	43
2.2.4.9.1	Primerdesign.....	43
2.2.4.9.2	Bestimmung optimaler Primer-Konzentrationen.....	43
2.2.4.9.3	Oligonukleotid-Primerpaare für die qPCR.....	44
2.2.4.9.4	Bestimmung der Amplifikationseffizienz.....	45
2.2.4.9.5	qPCR	46
2.2.4.9.6	Expressionsanalyse mittels RT^2 -Profiler.....	48
2.2.5	Klonierung von cDNA-Fragmenten für die <i>in situ</i> Hybridisierung.....	49
2.2.5.1	Benötigte Materialien.....	49
2.2.5.2	Oligonukleotid-Primerpaare zur Klonierung von cDNA-Sonden.....	50
2.2.5.3	Synthese der cDNA-Matrize.....	50
2.2.5.4	Ligation des Inserts in einen bakteriellen Transkriptionsvektor	50
2.2.5.5	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	51
2.2.5.6	Transformation des Transkriptionsvektors in <i>E. coli</i>	52

2.2.5.7 Klonierung von Vektor+Insert-positiven E. Coli Bakterien	52
2.2.5.8 Analyse des Inserts im Plasmidvektor	53
2.2.5.9 Plasmidaufreinigung	53
2.2.6 <i>In situ</i> Hybridisierung	56
2.2.6.1 Benötigte Materialien.....	56
2.2.6.2 Synthese radioaktiv markierter Sonden.....	57
2.2.6.3 Entparaffinieren	58
2.2.6.4 Prähybridisierung	58
2.2.6.5 Hybridisierung	59
2.2.6.6 Posthybridisierung	59
2.2.6.7 Detektion der mRNA im Gewebeschnitt durch Röntgenfilm-Autoradiogramme	59
2.2.6.8 Detektion der mRNA im Gewebeschnitt durch Entwicklung mit Fotoemulsion	60
2.2.6.9 Auswertung der <i>in situ</i> Hybridisierungen	60
2.2.7 Statistische Auswertung	61
3 Ergebnisse	62
3.1 Auswirkung der O ₃ /O ₂ -PP-Behandlung auf das Körpergewicht	62
3.2 Einfluss der O ₃ /O ₂ -PP-Behandlung auf die VX2-Tumorentwicklung (<i>Teilversuch 1</i>).....	63
3.3 Einfluss der O ₃ /O ₂ -PP-Behandlung auf die VX2-Tumormetastasierung	65
3.4 Blutparameter im Verlauf der O ₃ /O ₂ -PP-Behandlung.....	67
3.5 Immunologische Charakteristika im VX2-Tumorgewebe	69
3.5.1 Tumordinfiltrierende T-Lymphozyten	69
3.5.2 Expressionsprofil immunassoziierter Gene im Tumorgewebe nach O ₃ /O ₂ -PP-Behandlung 71	
3.5.2.1 <i>Pattern-Recognition Receptors</i>	71
3.5.2.2 Gene der Signaltransduktion.....	72
3.5.2.3 Entzündungsregulatorische Moleküle.....	74
3.5.2.4 Gene der Antigenpräsentation und co-stimulatorischer Oberflächenproteine	75
3.5.2.5 Gene spezifischer T-Zell-Subpopulationen	76
3.6 Funktioneller Nachweis einer erworbenen immunologischen Toleranz gegen den VX2-Tumor durch adoptiven Zelltransfer	77
3.6.1 Experimenteller Ansatz zur Tumorsektion durch adoptiven Zelltransfer (<i>Teilversuch 2a</i>)	78
3.6.2 Experimenteller Ansatz zur Tumorsemission durch adoptiven Zelltransfer (<i>Teilversuch 2b</i>)80	
3.6.3 Expressionsprofil immunassoziierter Gene im Tumorgewebe nach adoptivem Leukozyten-Transfer	82
3.6.3.1 <i>Pattern-Recognition Receptors</i>	82
3.6.3.2 Gene der Signaltransduktion.....	83
3.6.3.3 Entzündungsregulatorische Moleküle.....	84
3.6.3.4 Gene der Antigenpräsentation und co-stimulatorischer Oberflächenproteine	84
3.6.3.5 Gene spezifischer T-Zell-Subpopulationen	85
3.7 Funktioneller Nachweis einer erworbenen immunologischen Toleranz gegen den VX2-Tumor nach Reimplantation des VX2-Tumors (<i>Teilversuch 3</i>).....	86

3.8 Wirkung der O ₃ /O ₂ -PP-Behandlung auf wachstumsregulatorische Mechanismen der VX2-Tumorregression.....	87
3.8.1 Expression von ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinasen im VX2-Tumorgewebe.....	88
3.8.2 Histomorphologische Zuordnung der ErbB mRNA innerhalb des VX2-Tumors.....	90
3.9 Nachweis der Expression Papillomavirus-spezifischer Gene im VX2-Tumor.....	93
4 Diskussion	95
4.1 Die antitumorogene Wirkung der O ₃ /O ₂ -PP-Behandlung	95
4.1.1 Mögliche Aktivierungswege des Ozons zur Generierung einer tumoriziden Immunantwort 96	
4.1.2 Auswirkung der O ₃ /O ₂ -PP-Behandlung auf Zellen des Immunsystems	100
4.1.3 Intratumoraler, immunregulatorischer Effekt der O ₃ /O ₂ -PP-Behandlung	102
4.2 Änderung der Expression der ErbB-Familie innerhalb regressiver Tumoren	113
4.3 Die mögliche Relevanz des Shope papilloma-Virus innerhalb des VX2-Tumors	116
Zusammenfassung.....	118
Fazit	119
Summary	120
Conclusion	121
Literaturverzeichnis	122

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Resonanzstruktur des Ozonmoleküls [eigene Darstellung].....	3
Abb. 1.2: Die angeborene und adaptive Immunantwort	6
Abb. 1.3: <i>Cancer Immunoediting</i>	8
Abb. 1.4: Direkte und indirekte Reaktionen der Tumorzell-Erkennung.....	10
Abb. 1.5: ErbB-Rezeptoren	14
Abb. 1.6: ErbB-Signalwege.	16
Abb. 2.1: Experimenteller Ablauf des Teilversuches 1	24
Abb. 2.2: Experimenteller Ablauf des Teilversuches 2	25
Abb. 2.3: MRT-Aufnahme des Musculus Quadriceps.....	26
Abb. 2.4: Aurikuläre Tumorzellinokulation	27
Abb. 2.5: Operative Entfernung eines Primärtumors.....	29
Abb. 2.6: Sequenzabgleich des PCR-Amplikons	45
Abb. 2.7: Sequenzierung des Plasmid-Inserts	55
Abb. 3.1: Auswirkung der O ₃ /O ₂ -PP-Behandlung auf das Körpergewicht	62
Abb. 3.2: Entwicklung des Tumolvolumens	63
Abb. 3.3: Wahrscheinlichkeit für eine (a) Tumorprogression [TP] und (b) Tumorregression [TR].	64
Abb. 3.4: 3D rekonstruierte PET-CT Analyse.....	65
Abb. 3.5: Metastasierung des VX2-Tumors.....	66
Abb. 3.6: Veränderung der Blutparameter unmittelbar vor und nach der therapeutischen Intervention	68
Abb. 3.7: Immunhistochemische Färbung und Quantifizierung von CD3-positiven Zellen	70
Abb. 3.8: CD3-positive Zellen im progressiven (a,b) und regressiven (c,d) Tumorgewebe.....	70
Abb. 3.9: Quantifizierung CD3-positiver Zellen.....	71
Abb. 3.10: Expression von <i>Pattern-Recognition Receptors</i>	72
Abb. 3.11: Differentielle Expressionsspiegel von Genen der Signaltransduktion	73
Abb. 3.12: Differentielle Expressionsspiegel entzündungsregulatorischer Moleküle.....	74
Abb. 3.13: Differentielle Expressionsspiegel von Genen der Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung durch kostimulatorische Signale.....	75
Abb. 3.14: Differentielle Expressionsspiegel von T-Zell-spezifischen Genen.....	76
Abb. 3.15: Körpertemperatur [°C] im Verlauf des AZTs.....	78
Abb. 3.16: Tumorentwicklung nach AZT (Teilversuch 2a).....	79
Abb. 3.17: Wahrscheinlichkeit für eine Tumorprogression [TP] (a) und Tumorregression [TR] (b) nach AZT (Teilversuch 2a).....	79
Abb. 3.18: Tumorentwicklung nach AZT (Teilversuch 2b).....	81
Abb. 3.19: Wahrscheinlichkeit für die Tumorprogression [TP] (a) und Tumorregression [TR] (b) (Teilversuch 2b).....	81
Abb. 3.20: Expression von <i>Pattern-Recognition Receptors</i>	82
Abb. 3.21: Differentielle Expressionsspiegel von Proteinen der Signaltransduktion.....	83
Abb. 3.22: Differentielle Expressionsspiegel entzündungsregulatorischer Moleküle	84
Abb. 3.23: Gene der Antigenpräsentation und co-stimulatorischer Oberflächenproteine	85
Abb. 3.24: Differentielle Expressionsspiegel von T-Zell spezifischen Genen	86
Abb. 3.25: Tumorentwicklung nach VX2-Reimplantation	87

Abb. 3.26: Expression von Mitgliedern der ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinasen (Teilversuch 1)	88
Abb. 3.27: Expression von Mitgliedern der ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinasen (Teilversuch 2)	89
Abb. 3.28: Histologische Darstellung von EGFR mRNA im progressiv wachsenden Primärtumor nach Sham-Behandlung.....	90
Abb. 3.29: Histologische Darstellung von EGFR mRNA im regressiven Primärtumor nach O ₃ /O ₂ -PP-Behandlung	91
Abb. 3.30: ErbB2-Expression im progressiven Primärtumor eines Sham-behandelten Tieres.....	91
Abb. 3.31: ErbB2-Expression im regressiven Primärtumor eines O ₃ /O ₂ -PP-behandelten Tieres.....	92
Abb. 3.32: ErbB3-Expression im progressiven Primärtumor eines Sham-behandelten Tieres.....	92
Abb. 3.33: ErbB3-Expression im regressiven Primärtumor eines O ₃ /O ₂ -PP-behandelten Tieres.....	92
Abb. 3.34: Expression von E5-mRNA im VX2-Karzinom.....	93
Abb. 4.1: Modell für mögliche Wirkmechanismen des O ₃ /O ₂ -Gasgemisches innerhalb der Peritonealhöhle	97
Abb. 4.2: Entzündungsabhängige Tumorregression	103

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Ermittlung optimaler Primer-Konzentrationen.....	43
Tab. 2.2: Oligonukleotid-Primerpaare für die qPCR	44
Tab. 2.3: Bewertungsparameter der Oligonukleotid-Primerpaare	46
Tab. 2.4: Oligonukleotid-Primerpaare für die Klonierung von cDNA Sonden	50
Tab. 3.1: Auftreten von Metastasen in Lunge und zervikalen Lymphknoten	66
Tab. 3.2: Blutparameter im Verlauf der therapeutischen Intervention	67

Abkürzungsverzeichnis

Adapt. Protein	Adapter Protein
AR	Amphiregulin
ATP	Adenosintriphosphat
AZT	Adoptiver Zelltransfer
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
BTC	Betacellulin
Casp.	Caspase
C3	<i>Complement component 3</i>
CCL2, -3	<i>chemokine (C-C motif) ligand 2, -3</i>
CCR	Chemokine (C-C motif) Rezeptor
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i>
chem.at.	Chemoattractant
C-Jun	<i>C-Jun transcription factor</i>
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRPV	<i>Cottontail rabbit Papillomavirus</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
CXCR	Chemokine (C-X-C motif) Rezeptor
DAMPs	<i>Damage/Danger-associated molecular patterns</i>
DC	Dendritische Zellen
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
E. coli	Escherichia coli
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EPGN	Epigen
EPR	Epiregulin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FDG	2-[¹⁸ F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HB-EGF	<i>Heparin-binding EGF-like growth factor</i>
HCT	Hämatokrit
HE	Hämalaun-Eosin
HER	<i>human epidermal growth factor receptor related receptor</i>
HGB	Hämoglobin
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HPV	humanes Papillomavirus

HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HSP	Hitzeschock-Proteine
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
IDO	Indolamine 2,3-dioxygenase
IFN γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
i.m.	Intramuskulär
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRAK1	<i>Interleukin 1 receptor-associated kinase 1-like</i>
IRF1	<i>Interferon regulatory factor 1</i>
i.v.	Intravenous
KG	Körpergewicht
KIR	<i>killer-cell immunoglobulin like</i> -Rezeptoren
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCH	mittleres korpuskuläres Hämoglobin
MCV	mittleres Erythrozyteneinzelvolumen
MDA-5	Melanoma Differentiation-Associated protein 5
MHC	Major Histocompatibility Complex
MICA, MICB	<i>MHC class I-related chain molecules A, B</i>
Min.	Minute
MRT	Magnetresonanztomographie
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88-like</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NFKB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NFKBIA	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells inhibitor alpha</i>
NK	Natürliche Killerzellen
NKG2D	natural-killer group 2, member D
NLR	NOD-like-Rezeptor
NLRP3	NOD-like receptor family pyrin domain containing
NRG	Neuregulins
NOD1, 2	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein</i>
NZW	New Zealand White
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PET-CT	Positronen-Emissions-Tomographie - Computer Tomographie
p.i.	post injectionem
qPCR	quantitative PCR
Rb	Retinoblastom
RBC	Red blood cells (Erythrozyten)
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBL	periphere Blutleukozyten
PBMCs	periphere mononukleäre Blutzellen
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>

PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PLT	<i>platelets</i> (Thrombozyten)
pro.inf.	proinflammatorisch
PRR	<i>Pattern-Recognition Receptor</i>
RIG-1	<i>retinoic acid inducible gene 1</i>
RLR	RIG-1-like Rezeptor
RORC	<i>retinoic acid receptor related orphan receptor C</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
s.c.	Subcutan
SE	<i>standard error</i>
Sek.	Sekunde
STAT1	<i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>
Std.	Stunde
sup.	Immunsuppressiv
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEA	Triethanolamin
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TH	T-Helferzelle
TILs	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
TLR	Toll like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Transkript. Faktor	Transkriptionsfaktor
TRAF6	<i>TNF receptor-associated factor 6</i>
TRAIL	<i>Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
Treg	regulatorische T-Zellen
TSA	Tyramid-Signalamplifikation
TYK2	<i>Tyrosine kinase 2-like</i>
WBC	<i>White blood cells</i> (Leukozyten)

1. Einleitung

1.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches

Tumoren im Kopf- und Halsbereich umfassen Tumoren in der Mundhöhle, im Pharynx (Nasopharynx, Oropharynx, Hypopharynx), im Larynx sowie in den Nasennebenhöhlen und Speicheldrüsen. Plattenepithelkarzinome sind mit 90 % die am häufigsten vorkommende histologische Form von Tumoren im Kopf- und Halsbereich, welche international unter dem Begriff *Head and Neck Squamous Cell Carcinomas* (HNSCCs) zusammengefasst werden. Sie stellen weltweit die sechsthäufigste Tumorerkrankung dar. (Bose P. et al. 2013) Trotz neuer und verbesserter Behandlungsstrategien in der Chirurgie, Radiotherapie und Chemotherapie beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate bezogen auf Europa und USA lediglich 40 % (Boyle P. and Levin B. 2008).

Bedeutende Risikofaktoren für HNSCCs stellen Alkohol- und insbesondere Tabakkonsum dar. So können 80 % der HNSCCs mit Tabakkonsum in Verbindung gebracht werden. Raucher besitzen im Vergleich zu Nicht-Rauchern ein 10-fach höheres Risiko an HNSCCs zu erkranken, das in Verbindung mit chronischem Alkoholkonsum nochmals erheblich ansteigt. (Bose P. et al. 2013) Noch dazu werden Ernährungsfaktoren, Noxen und unzureichende Mundhygiene als Ursachen für die Entstehung von HNSCC diskutiert (Boyle P. and Levin B. 2008). Ein weiteres Risikopotential verbirgt sich hinter doppelsträngigen, zirkulären DNA-Viren, die zu den humanen Papillomaviren (HPV) gehören, welche Epithelzellen infizieren. HPV-16, eines der Hochrisiko-Viren, scheint die größte Bedeutung in HPV-assoziierten HNSCCs zu besitzen. (Chung C.H. and Gillison M.L. 2009; Rautava J. and Syrjanen S. 2012)

Die HPV-induzierte Onkogenese der HNSCCs wird durch die Produkte der HPV-Onkogene E5, E6 und E7 ausgelöst. Demnach führen die E5, E6 und E7 Onkoproteine zu einer Inaktivierung von Kontrollmechanismen des Zellzyklus sowie zu einer verringerten Apoptoserate (Feller L. et al. 2010; Rautava J. and Syrjanen S. 2012).

Das Onkoprotein E6 wird für eine p21 (*cyclin dependent kinase* (CDK)-Inhibitor 1) Inhibition sowie eine proteasomale Degradation des Tumorsuppressorgens p53 verantwortlich gemacht, die mit einer Inhibierung der p53-abhängigen Apoptose einhergehen (Feller L. et al. 2010; Rautava J. and Syrjanen S. 2012). Das

Onkoprotein E7 bindet das Retinoblastom (Rb) - Tumorsuppressorprotein und verhindert dadurch einen Zellzyklusarrest. Daneben induziert es eine Proliferation durch Inhibierung der CDK-Inhibitoren p21 und p27. (Rautava J. and Syrjanen S. 2012) E5 weist ebenfalls eine Hemmung der Tumorsuppressoren p21 und p27 auf. Darüber hinaus bewirkt es eine verstärkte *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR)-induzierte Proliferation und zeigt durch die Herunterregulation der *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-Klasse I eine bedeutende Rolle bei der Abschwächung einer immunbasierten Tumorbekämpfung. (Venuti A. et al. 2011; Rautava J. and Syrjanen S. 2012)

1.2 Das VX2-Tumormodell des weißen Neuseelandkaninchens

Das aurikuläre VX2-Karzinom des weißen Neuseelandkaninchens (NZW) stellt ein geeignetes Tumortiermodell für HNSCC-Erkrankungen dar, welches in der experimentellen Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde immer häufiger Anwendung findet (Van Es R.J. et al. 2000; Mandic R. et al. 2002). Die sich entwickelnden soliden VX2-Tumoren ähneln humanen HNSCCs in ihrer Morphologie, dem Wachstumsverhalten sowie in einer überwiegenden lymphogenen Metastasierung (Van Es R.J. et al. 2000; Dunne A.A. et al. 2002; Sapundzhiev N. et al. 2005). Histologisch zeigt der VX2-Tumor, vergleichbar mit HNSCC, einen sehr geringen Differenzierungsgrad (Georges E. et al. 1985; Sapundzhiev N. et al. 2005; Kreuter K.A. et al. 2008). Darüber hinaus besitzt der VX2-Tumor, analog zu HPV-induzierten HNSCCs, eine virale Ätiologie, die des Shope cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) (Georges E. et al. 1985; Sapundzhiev N. et al. 2005; Hu J. et al. 2007). 1933 zeigten Richard E. Shope und E. Weston Hurst, dass natürlich vorkommende Warzen wilder Waldkaninchen (*Sylvilagus floridanus*) durch die Infektion mit einem Shope papillomavirus induziert werden können (Shope R.E. and Hurst E.W. 1933). Das tumorigene Potential dieses Warzenvirus wurde durch die Übertragung auf domestizierte Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) und die darauf folgende Bildung von Plattenepithelkarzinomen ermittelt (Rous P. and Beard J.W. 1935).

In den vergangenen Jahren wurde das aurikuläre VX2-Tumormodell in verschiedenen Studien zur Validierung von möglichen Diagnose- und Therapieverfahren von HNSCC genutzt. Demnach diente das Tumormodell der Untersuchung der kontrastmittelgestützten Magnetresonanztomographie (MRT) als Diagnosewerkzeug für Lymphknotenmetastasen (Lee K.C. et al. 2007). Auch für Untersuchungen von verschiedenen Therapieverfahren wie Chemotherapie (Dunne

A.A. et al. 2004), chirurgische Therapie (Sapundzhiev N. et al. 2005; Wiegand S. et al. 2013) sowie arterieller Embolisierungstherapie (Van Es R.J. et al. 1999) fand das Tiermodell bereits Anwendung.

Neben den klassischen Therapieansätzen wurde auch ein alternativer Ansatz auf seine Wirksamkeit hin geprüft. Schulz und Kollegen verwendeten ein intraperitoneal appliziertes Ozon-Sauerstoffgemisch als Therapeutikum und konnten eine effektive antitumorogene Wirkung auf den aurikulären VX2-Tumor nachweisen (Schulz S. et al. 2008). Die Ursache für diese antitumorogene Wirkung des oxidativen Gases schien eine Beeinflussung des Immunsystems zu sein. Hinweis hierfür war eine bestehende Toleranz von Ozon-Sauerstoff-behandelten Tieren mit remittierenden Tumoren gegenüber einer erneuten Implantation von VX2-Tumorzellen. Diese medizinische Wirkung des Ozons machte das Gas interessant für den Einsatz in der Tumorthherapie.

Im Folgenden wird kurz auf das reaktive Gas Ozon sowie seine bisherige medizinische Bedeutung eingegangen. Anschließend folgen die Erläuterung immunologischer Vorgänge innerhalb des Tumorgeschehens sowie die Beschreibung gängiger Tumormimmuntherapien.

1.3 Ozon

Ozon ist ein gasförmiges, zyklisches Molekül, bestehend aus drei Sauerstoffatomen, welches aufgrund seiner chemischen Instabilität in der Luft zu dimerem Sauerstoff zerfällt. (Abb. 1.1) (Soret J. 1864)

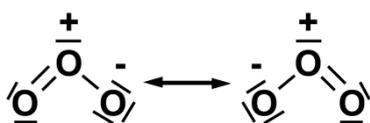


Abb. 1.1: Resonanzstruktur des Ozonmoleküls [eigene Darstellung]

Kommt Ozon mit biologischen Flüssigkeiten wie Plasma in Kontakt, reagiert es umgehend in einer Oxidation mit Elektronendonatoren (bspw. mehrfach ungesättigten Fettsäuren, Antioxidantien) und Thiolgruppen mit SH-Gruppen (bspw. reduziertes Glutathion, Albumin). Es können jedoch auch Enzyme, DNA und RNA oxidiert werden. (Bocci V.A. 2006)

1.3.1 Medizinische Anwendung von Ozon

Aufgrund seiner oxidativen Eigenschaften zeigt Ozon viruzide, fungizide als auch bakterizide Wirkungen (Elvis A.M. and Ekta J.S. 2011). Aus diesem Grund findet

das Gas in therapeutischer Dosierung vielseitig Anwendung in Medizin und Forschung. Hierzu zählt die Behandlung von Karies und Wurzelkanalinfektionen in der Zahnheilkunde (Almaz M.E. and Sonmez I.S. 2013; Halbauer K. et al. 2013; Shilpa Reddy A. et al. 2013). Auch wird es zum Behandeln bakteriell infizierter Wunden genutzt (Shah P. et al. 2011). Eine weitere extrakorporale Methode stellt die Autohämotherapie dar, bei der nach Blutentnahme das Blut extern mit Ozon behandelt und wieder in den Patienten injiziert wird (Foglieni C. et al. 2011; Borrelli E. et al. 2012). Neben der äußerlichen Anwendung erfolgt die therapeutische Ozon-Applikationen über die Insufflation des Gases in das Rektum (Leon O.S. et al. 1998; Barber E. et al. 1999; Al-Dalain S.M. et al. 2001; Leon Fernandez O.S. et al. 2008; Fernández Iglesias A. et al. 2011) oder die Peritonealhöhle (Schulz S. et al. 2003; Zamora Z.B. et al. 2005; Madej P. et al. 2007; Guven A. et al. 2008; Guven A. et al. 2009; Aslan M.K. et al. 2012; Gul H. et al. 2012; Uysal B. et al. 2012; Bakkal B.H. et al. 2013) sowie intraartikulär (Vaillant J.D. et al. 2013) und intramuskulär (Lin Q. et al. 2011).

1.3.2 Ozon: oxidativer Stressor und Immunmediator

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxid und Wasserstoffperoxid sind Nebenprodukte des normalen Sauerstoffmetabolismus und besitzen eine wichtige Bedeutung in Zellsignalwegen und für die Homöostase. Ein Ungleichgewicht zwischen der ROS Produktion und dem zellulären antioxidativen Abwehrsystem führt zu oxidativem Stress. (De Marchi E. et al. 2013; Nathan C. and Cunningham-Bussel A. 2013) Ozon, das man ebenfalls zur Gruppe der ROS zählt, scheint durch die eigene stark oxidative Eigenschaft, das körpereigene antioxidative Abwehrsystem zu stimulieren und somit einer Schädigung des Gewebes durch weitere pathophysiologische ROS entgegenzuwirken. Zahlreiche *in vivo* Untersuchungen bekräftigen die erhöhte protektive Wirkung von Ozon bei Erkrankungen, welche mit oxidativem Stress assoziiert werden, wie Sepsis (Schulz S. et al. 2003; Madej P. et al. 2007), Zystitis (Tasdemir C. et al. 2013), Rheumatischer Arthritis (Vaillant J.D. et al. 2013), Diabetes mellitus (Al-Dalain S.M. et al. 2001), nekrotisierender Enterokolitis (Guven A. et al. 2009), Toxin-induzierte Nieren- (Barber E. et al. 1999), Leber- (Leon Fernandez O.S. et al. 2008; Gul H. et al. 2012), Lungen- (Leon O.S. et al. 1998; Bakkal B.H. et al. 2013) und Ösophagus-Schädigungen (Guven A. et al. 2008) sowie Ischämie-Reperfusionsschäden der Nieren (Fernández Iglesias A. et al. 2011), Ovarien (Uysal B. et al. 2012) und der Leber (Aslan M.K. et al. 2012). Die Ozonbehandlungen scheinen darüber hinaus einen persistenten Einfluss zu haben.

Demnach hatten auch präventive Ozon-Applikationen positive Effekte bei strahleninduzierten Lungenschäden (Bakkal B.H. et al. 2013), renaler Ischämie (Barber E. et al. 1999) und septischem Schock (Zamora Z.B. et al. 2005). Die antioxidative Wirkung von Ozon zeigt sich in den Zielorganen durch eine Steigerung der Aktivität von antioxidativen Enzymen wie Superoxiddismutase (Leon O.S. et al. 1998; Barber E. et al. 1999; Guven A. et al. 2008; Gul H. et al. 2012; Uysal B. et al. 2012; Bakkal B.H. et al. 2013; Tasdemir C. et al. 2013), Katalase (Zamora Z.B. et al. 2005) und Glutathionperoxidase (Guven A. et al. 2008; Gul H. et al. 2012; Uysal B. et al. 2012; Tasdemir C. et al. 2013). Des Weiteren kommt es zur Erhöhung des Antioxidans Glutathion (Leon O.S. et al. 1998) und zur Abnahme von Malondialdehyd, ein Produkt der Lipidperoxidation (Zamora Z.B. et al. 2005; Guven A. et al. 2008; Aslan M.K. et al. 2012; Gul H. et al. 2012; Uysal B. et al. 2012; Bakkal B.H. et al. 2013; Tasdemir C. et al. 2013).

Neben den Effekten von Ozon auf das antioxidative System bewirkt es als oxidativer Stimulus im Organismus immunmodulatorische Effekte (Sagai M. and Bocci V. 2011). Die Wirkungen auf das Immunsystem müssen für den Organismus nicht zwangsläufig pathologische Auswirkungen haben. Der Einfluss des Ozons auf den Status des Immunsystems kann in einer therapeutischen Verbesserung der genannten Erkrankungen resultieren. Demnach führt eine rektale (Guven A. et al. 2009) und intraperitoneale (Bakkal B.H. et al. 2013) Ozonbehandlung zu einer Reduktion des proinflammatorischen Zytokins Tumornekrosefaktor (TNF)- α im Serum (Zamora Z.B. et al. 2005), in den Zielgeweben (Leon Fernandez O.S. et al. 2008; Vaillant J.D. et al. 2013) sowie in der Peritonealflüssigkeit (Uysal B. et al. 2012). Die intraperitoneale Ozon-Applikation hat zudem einen hemmenden Einfluss auf die Interleukin-1 β Konzentration im Serum (Bakkal B.H. et al. 2013). Daneben führt die Exposition humaner epidermaler Keratinozyten mit Ozon zu einer höheren Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-1a (Mccarthy J.T. et al. 2013).

Neben der therapeutisch gewünschten Wirkung von Ozon ist das Gas durch seine Lungentoxizität gekennzeichnet (Mudway I.S. and Kelly F.J. 2000; Al-Hegelan M. et al. 2011). Demnach führt Ozon in der Atemluft zur Schädigung des Lungengewebes und Reaktionen des angeborenen und adaptiven Immunsystems (Al-Hegelan M. et al. 2011). Zu diesen Reaktionen gehören eine gesteigerte Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF α , IL-1 β und IL-6 (Li Z. et al. 2011) sowie eine vermehrte Rekrutierung von immunologischen Zellen wie neutrophilen Granulozyten und alveolären Makrophagen in das Lungengewebe (Li Z. et al. 2013).

Infolge dieser inflammatorischen Prozesse wird Ozon mit verschiedenen respiratorischen Erkrankungen, wie Asthma und chronisch obstruktive Lungenerkrankung, in Verbindung gebracht (Khatri S.B. et al. 2009; Halonen J.I. et al. 2010).

1.4 Das Immunsystem

1.4.1 Die angeborene und adaptive Immunantwort

Das Immunsystem wird in das angeborene und adaptive Immunsystem unterteilt. Die angeborene Immunantwort umfasst lösliche Faktoren wie Komplementfaktoren und zahlreiche zelluläre Komponenten, einschließlich der Granulozyten (Basophilen, Eosinophilen und Neutrophilen), Mastzellen, dendritischen Zellen (DC), Makrophagen und natürlichen Killerzellen (NK) (Abb. 1.2) (Dranoff G. 2004).

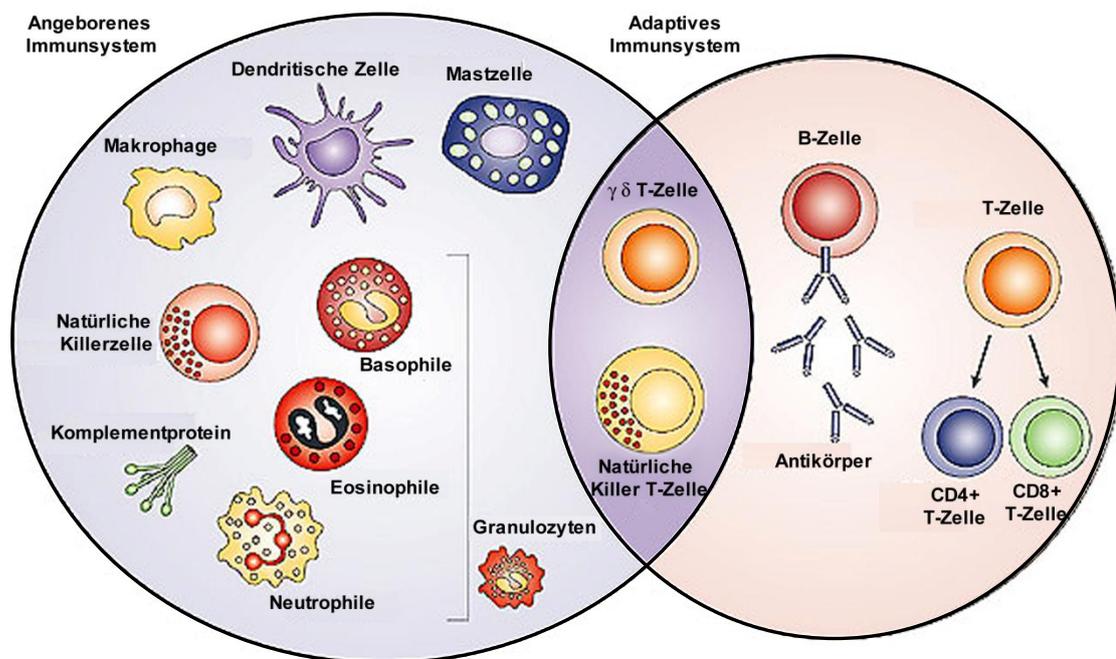


Abb. 1.2: Die angeborene und adaptive Immunantwort

Die angeborene Immunantwort reagiert als erste Instanz gegen Infektionen. Sie besteht aus Komplementfaktoren und zellulären Komponenten einschließlich der Granulozyten (Basophilen, Eosinophilen und Neutrophilen), Mastzellen, dendritischen Zellen (DC), Makrophagen und natürlichen Killerzellen. Die adaptive Immunantwort besteht aus Antikörpern, B-Zellen, CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten. Natürliche Killer T-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen sind zytotoxische Lymphozyten, welche die Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort ausmachen. *Abkürzung: CD: Cluster of differentiation.* (Modifiziert nach Dranoff G, 2004) [Die Nutzung der Abbildung erfolgte nach Genehmigung durch den Verlag *Nature Publishing Group.*]

Sie stellt die erste Abwehrreaktion gegen Infektionen dar und kann mikrobielle Bestandteile durch ihre *Pattern-Recognition Receptors* und anderen

Zelloberflächenmolekülen unverzüglich erkennen und dadurch eine inflammatorische Reaktion auslösen. (Dranoff G. 2004)

Die adaptive Immunantwort zeigt eine langsamere, aber wesentlich spezifischere Reaktion auf Keime und Antigene, vermittelt durch B- sowie CD (*Cluster of Differentiation*) 4+ und CD8+ T-Lymphozyten. Die Antikörper der B-Lymphozyten und T-Zell-Rezeptoren der T-Lymphozyten werden, passend an mikrobielle Proteine bzw. prozessierte, präsentierte Peptide, synthetisiert. (Dranoff G. 2004) Während einer Infektion bilden sich B- und T-Gedächtniszellen, die nach einer erneuten Infektion proliferieren und eine gezielte Immunreaktion auslösen (Mcheyzer-Williams L.J. and Mcheyzer-Williams M.G. 2005; Masopust D. and Schenkel J.M. 2013). Natürliche Killer (NK) T-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen stellen zytotoxische Lymphozyten dar, welche die Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort ausmachen (Abb. 1.2) (Dranoff G. 2004; Holtmeier W. and Kabelitz D. 2005; Pilonis K.A. et al. 2012).

Zum Schutz vor Krebs spielt ein intaktes Immunsystem eine zentrale Rolle. Diese als Theorie der Immunüberwachung (*Immunosurveillance*) zuerst von Thomas und Burnet formulierte Hypothese geht davon aus, dass neoplastische Zellen unmittelbar nach Entstehung durch das körpereigene Immunsystem eliminiert werden. (Burnet F. 1971; Thomas L. 1982) Bereits entstandene Tumoren können durch Reaktivieren einer tumorspezifischen „*Immunosurveillance*“ möglicherweise therapiert werden. Dieser, als Tumorummunologie bezeichnete Zweig der Immunologie ist zunehmend Gegenstand aktueller Forschungen.

1.4.2 Tumorummunologie

Der Prozess der Krebsentstehung (Karzinogenese) hat zahlreiche Ursachen, zu denen genetische Mutationen und äußere Faktoren wie Strahlung und virale Infektionen zählen (Abb. 1.3). Werden die entstandenen transformierten Zellen nicht durch Vorgänge einer intrinsischen Tumorsuppression, wie Reparatur-Mechanismen, Seneszenz und Apoptose eliminiert, stellt das angeborene und adaptive Immunsystem den letzten Schutzmechanismus dar (Abb. 1.3) (Dranoff G. 2004; Schreiber R.D. et al. 2011; Vesely M.D. et al. 2011). Die Detektion der Tumorzellen ist durch die Akkumulation von verschiedenen genetischen und epigenetischen Veränderungen möglich, die in einer Expression von Neoantigenen, Differenzierungsantigenen, Mutationsantigenen und onkoviralen Proteinen resultieren, welche auf den MHC-Klasse I Molekülen der Tumorzellen selbst

präsentiert werden können (Bellovin D.I. et al. 2013; Chen D.S. and Mellman I. 2013). Trotz der Expression dieser Antigene weisen die meisten Tumoren einen progressiven Verlauf auf und umgehen die vom Immunsystem gesteuerte Zerstörung (Gajewski T.F. et al. 2013).

Eine Ursache scheint die Fähigkeit von Tumorzellen zu sein, sich vor der Immunantwort zu schützen. Ein erst kürzlich diskutiertes Kennzeichen von Krebs (*Hallmark of cancer*) stellt die aktive „*Immunevasion*“ der Tumorzellen dar, welche als „*Immunoediting*“ bezeichnet wird (Hanahan D. and Weinberg R.A. 2011).

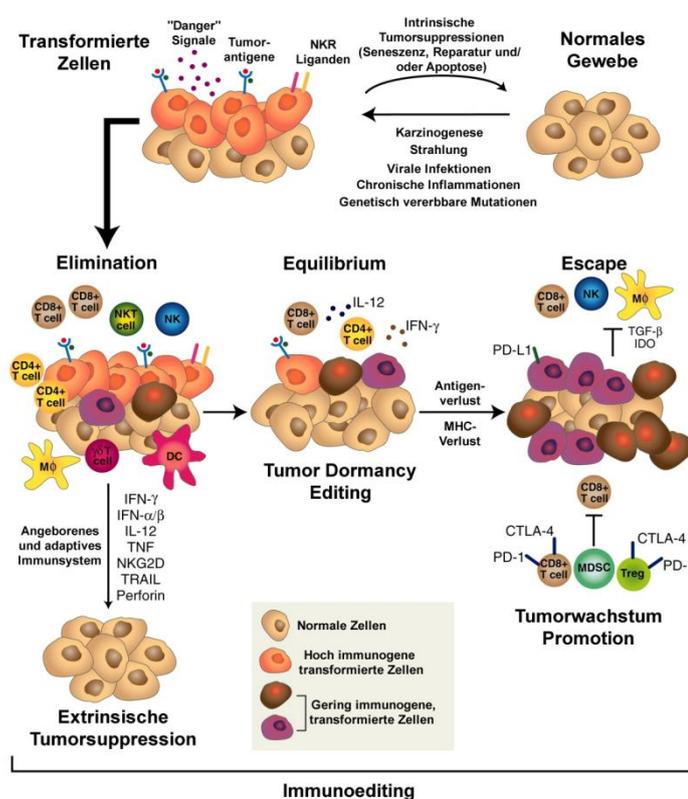


Abb. 1.3: Cancer Immunoediting

Cancer Immunoediting stellt einen extrinsischen Tumorsuppressor-Mechanismus dar, der nach zellulärer Transformation und Versagen intrinsischer Tumorsuppressor-Mechanismen ausgelöst wird. Er besteht aus drei aufeinanderfolgenden Phasen: „*Elimination*“, „*Equilibrium*“ und „*Escape*“. In der Phase der „*Elimination*“ arbeiten adaptives und angeborenes Immunsystem zusammen, um entwickelnde Tumoren, lange bevor sie klinisch manifest sind, zu zerstören. Wenn die Phase beendet ist und die Gesamtheit der Tumorzellen eliminiert ist, stellt diese Phase den Endpunkt des Prozesses dar. Sobald wenige Zellen überleben, gehen diese in die Phase

„*Equilibrium*“ über, in der die Proliferation durch immunologische Mechanismen unterbunden wird. Die Phase „*Equilibrium*“ ist ein Prozess des adaptiven Immunsystems, in dem T-Zellen, IL-12 und IFN γ involviert sind. Sie kann einerseits einen Endpunkt repräsentieren, bei dem das Tumorwachstum verborgener Tumorzellen zu Lebzeiten unterbunden wird. Andererseits können die Tumorzellen (1) aufgrund von Antigenverlust für das adaptive Immunsystem unerkannt bleiben, (2) eine Unempfindlichkeit gegenüber immunologischen Abwehrmechanismen ausbilden, und/oder (3) ein immunsuppressives Tumormikromilieu induzieren. Diese Tumorzellen können in die „*Escape*“ Phase übergehen, in der das Tumorwachstum nicht länger durch das Immunsystem blockiert wird. Der Tumor wird klinisch manifest. *Abkürzungen:* CTLA-4: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4; IDO: Indolamine 2,3-dioxygenase; IFN: Interferon; IL: Interleukin; NKG2D: natural-killer group 2, member D; NKR: NK Zellrezeptor; PD-L1: Programmed death-ligand 1; PD-1: Programmed cell death protein 1; TNF: Tumornekrosefaktor; TRAIL: Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand. (modifiziert nach Schreiber R.D. et al. 2011) [Die Nutzung der Abbildung erfolgte mit freundlicher Genehmigung von Robert D. Schreiber.]

Dieser Prozess enthält neben der beschriebenen „Elimination“ (*Immunosurveillance*) die Phasen „Gleichgewicht“ (*Equilibrium*) und „Entkommen“ (*Escape*). Wird die Gesamtheit der transformierten Zellen beseitigt, stellt die Phase der „Elimination“ den Endpunkt des Prozesses dar. Sobald jedoch Tumorzellen die Immunabwehr überleben, können diese in die „Gleichgewichtsphase“ (*Equilibrium*) übergehen. Hierbei hemmt das adaptive Immunsystem ein verstärktes Tumorzellwachstum. Jedoch führt dies nicht zur vollständigen Beseitigung der Tumorzellen. Die unerkannten Zellen gehen in die „Escape-Phase“ über. In dieser Phase weisen Tumorzellen Veränderungen und Mutationen auf, die das Immunsystem daran hindern diese Zellen zu detektieren und zu beseitigen. Zu diesen Modifikationen zählen der Antigenverlust, eine defekte Antigenprozessierung und -präsentation, eine Verringerung der Sensitivität gegenüber Immun-Effektormechanismen sowie eine Stimulierung des immunsuppressiven Zustandes innerhalb der Tumormikro-umgebung. (Abb. 1.3) (Kim R. et al. 2007; Schreiber R.D. et al. 2011; Vesely M.D. et al. 2011; Lakshmi Narendra B. et al. 2013)

1.4.2.1 Faktoren der *Immunosurveillance*

In der Phase der „Elimination“ kommt es zum Erkennen und Beseitigen des Tumorgewebes durch das angeborene und adaptive Immunsystem (Abb. 1.4), was in einer Wiederherstellung des normalen, physiologischen Gewebes resultiert.

Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen Tumorzellen über Rezeptoren, die unter funktionellen Gesichtspunkten als Gruppe der *Pattern-Recognition Receptors* (PRRs) bezeichnet werden. PRRs binden tumorspezifische Oberflächenmoleküle (Abb. 1.4 a). (Dranoff G. 2004) Zu diesen Zelloberflächenmolekülen zählen stressabhängig exprimierte Gene, wie MICA und MICB, welche als Liganden für NKG2D Rezeptoren der NK-Zellen und spezifischen CD8+ T-Lymphozyten fungieren (Bauer S. et al. 1999; Zafirova B. et al. 2011). NK-Zellen erkennen mit ihren „*killer-cell immunoglobulin like*“ Rezeptoren (KIR) Tumorzellen mit verminderter MHC-Klasse I-Expression und töten diese durch zytotoxische Granula (Dranoff G. 2004; Thielens A. et al. 2012; Leone P. et al. 2013). DC verwenden den CD36 und das $\alpha_v\beta_5$ Integrin, um apoptotische Tumorzellen zu phagozytieren (Nouri-Shirazi M. et al. 2000). Auch können Hitze-Schock-Proteine, welche von nekrotisierenden Zellen freigesetzt werden über Scavenger-Rezeptoren oder CD91, von DC und Makrophagen aufgenommen werden. (Abb. 1.4 a) (Dranoff G. 2004)

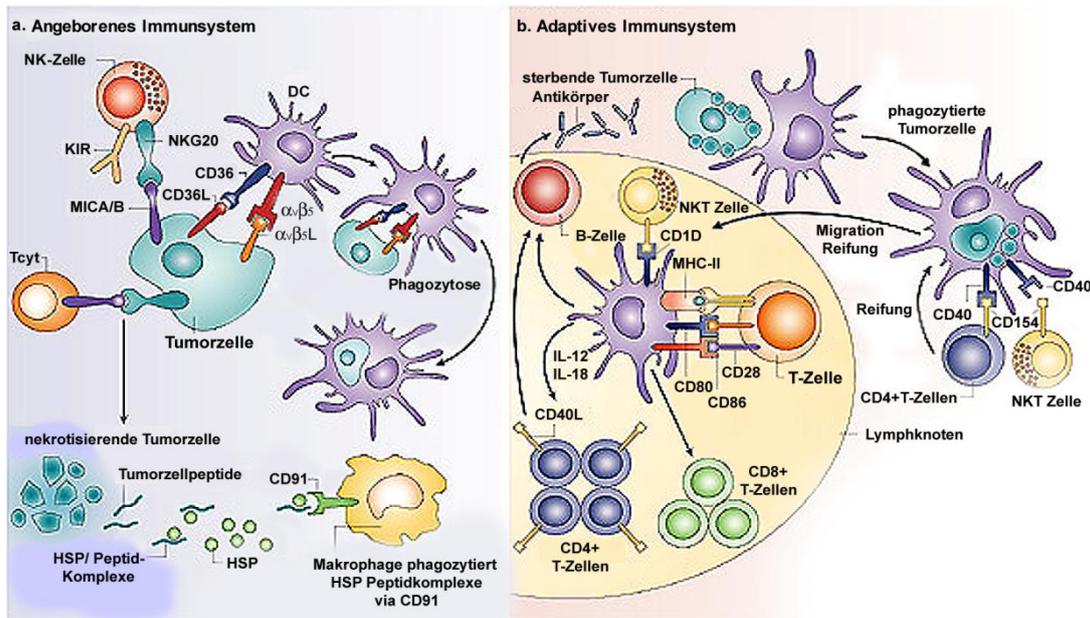


Abb. 1.4: Direkte und indirekte Reaktionen der Tumorzell-Erkennung.

a) Immunzellen der angeborenen Immunantwort erkennen Tumorzellen durch *Pattern-Recognition Receptors* (PRRs) und anderen Oberflächenmolekülen. Tumorzellen exprimieren stress-induzierte Gene, wie *MHC class I-related chain molecules A, B* (MICA, MICB), welche durch *natural-killer group 2-* (NKG2) Rezeptoren von NK-Zellen, Makrophagen und einigen T_{Cyt} erkannt werden. NK-Zellen benutzen ebenfalls eine Kombination aus inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren, wie „*killer-cell immunoglobulin like*“ Rezeptoren (KIR), um Tumorzellen mit verminderten MHC-Klasse I Molekülen zu detektieren. Dendritische Zellen (DC) phagozytieren apoptotische Tumorzellen durch CD36 und $\alpha\beta_5$. Makrophagen und DC verwenden auch Scavenger-Rezeptoren und CD91, um Hitzeschock-Proteine (HSP) in Kombination mit Peptiden von nekrotisierenden Tumorzellen zu verdauen. **b)** Immunzellen der adaptiven Immunantwort werden durch „cross-priming“ durch antigenpräsentierende Zellen (APC) stimuliert. Da Tumorzellen größtenteils ihre MHC-Klasse I Moleküle herunterregulieren rufen sie keine T-Zell-Antwort hervor. Stattdessen phagozytieren DC apoptotische Tumorzellen oder Debris, migrieren zu regionalen Lymphknoten und präsentieren die Tumor-Bestandteile auf CD1d für NKT-Zellen und auf MHC-Klasse I und MHC-Klasse II Molekülen für CD4+ und CD8+-Zellen. Reife DC exprimieren co-stimulatorische Moleküle, wie CD80/86, um die T-Zell-Aktivierung zu steigern. DC sezernieren Interleukin (IL12) und IL18, um die T-Helfer-1 (TH1) CD4+ T-Zell-Antwort und zytotoxische CD8+-T-Zellen zu stimulieren. Aktivierte CD4+ T-Zellen und NKT Zellen exprimieren CD40-Liganden, welche an CD40 von DC binden und deren Reifung hervorrufen. CD4+ T-Zellen und DC können darüber hinaus B-Zellen aktivieren und zur Antikörper-Freisetzung stimulieren. (Modifiziert nach Dranoff G. 2004) [Die Nutzung der Abbildung erfolgte nach Genehmigung durch den Verlag *Nature Publishing Group*.]

Das adaptive Immunsystem nutzt für das Erkennen der Tumorzellen einen indirekten Weg über die Antigenpräsentation (Abb. 1.4 b). Tumorzellen mangelt es meist an der Expression von wichtigen co-stimulatorischen Molekülen, wie CD80/86, welche für die T-Lymphozyten-Antwort notwendig sind (Dranoff G. 2004). Daneben weisen sie größtenteils eine Herunterregulation der MHC-Klasse I auf (Restifo N.P. et al. 2012). Infolgedessen sind für die T-Zell-Aktivierung DC notwendig, welche nach Phagozytose von Tumorzellen zu den regionalen Lymphknoten migrieren, um dort Tumorbestandteile auf CD1d für NKT-Zellen und auf MHC-Klasse I und MHC-

Klasse II Molekülen für CD8+ und CD4+- Zellen zu präsentieren. Des Weiteren sezernieren DC Interleukin (IL)-12 und IL-18, um die T-Helfer-1 (TH1) CD4+-Zellen und zytotoxische CD8+-T-Zellen zu stimulieren. Aktivierte CD4+ T-Zellen und NKT Zellen exprimieren CD40-Liganden, welche an CD40 von DC binden und deren Reifung hervorrufen. CD4+ T-Zellen können darüber hinaus die Produktion von Antikörpern und deren Antwort gegen mutierte Tumorzell-assoziierte Genprodukte fördern. (Abb. 1.4 b) (Dranoff G. 2004)

1.4.3 Tumorimmuntherapie

Aufgrund der zentralen Rolle des Immunsystems bei der Proliferation und Eradikation von Tumorgewebe stellt es einen wesentlichen Angriffspunkt für Tumortherapien dar. Hierbei steht das Ziel im Vordergrund die *Immunosurveillance* gegenüber dem Primärtumor und Metastasen zu reaktivieren und das möglicherweise immunsuppressive Mikromilieu zu inhibieren. (Zigler M. et al. 2013) Tumorimmuntherapien können in drei Hauptkategorien eingeteilt werden (Rosenberg S.A. et al. 2008):

1) Passive Immunisierung: Hierzu zählt zum einen die Verabreichung von Zytokinen, wie der T-Zell Wachstumsfaktor IL-2, der *in vivo* zu einer Aktivierung von tumor-spezifischen T-Zellen führt und somit eine Tumorregression hervorrufen kann (Tarhini A.A. et al. 2007; Schwartzentruber D.J. et al. 2011). Zum anderen werden monoklonale Antikörper verabreicht, wie anti-EGFR (Markovic A. and Chung C.H. 2012; Brand T.M. et al. 2013), anti-CTLA4 (Maker A.V. et al. 2005; Wang X.Y. et al. 2011) und anti-*Transforming Growth Factor* (TGF)- β (Bhola N.E. et al. 2013; Morris J.C. et al. 2014; Neuzillet C. et al. 2014), welche protumorigene Proteine binden und inhibieren.

2) Aktive Immunisierung: Bei diesem Ansatz werden Krebspatienten durch eine Tumorstimmulierung gegen ihre autologen Tumorzellen, basierend auf tumor-spezifischen Antigenen, Liganden oder Rezeptoren immunisiert (Galluzzi L. et al. 2012; Senovilla L. et al. 2013; Vacchelli E. et al. 2013; Zigler M. et al. 2013).

3) Zellbasierte Immuntherapie: Hierzu zählt der adoptive Zelltransfer (AZT), welcher die autologe, allogene oder syngene Übertragung von *in vivo* stimulierten Leukozyten, in Kombination mit Wachstumsfaktoren, umfasst (Gattinoni L. et al. 2006; Rosenberg S.A. et al. 2008; Kirkwood J.M. et al. 2012; Restifo N.P. et al. 2012; Devaud C. et al. 2013; Zigler M. et al. 2013).

1.4.3.2 Adoptiver Zelltransfer in der Tumorthherapie

Der AZT umfasst die Isolation und Reinfusion von T-Lymphozyten zur Behandlung von Karzinomen. Ziel des AZT ist es, die intrinsische unzureichende Immunreaktion gegen das Tumorgewebe zu steigern, indem *in vitro* tumorreaktive T-Zellen reaktiviert und vervielfältigt werden und nach Transfer die körpereigene Immunantwort gegen den Tumor stimulieren. Ist der AZT erfolgreich zeigt sich eine Immunzell getriggerte Tumorregression. (Kalos M. and June C.H. 2013) Der AZT kann durch drei verschiedene Methoden erfolgen (Yee C. 2013):

Tumorerfiltrierende Lymphozyten (TILs)-Therapie:

1) Anreicherung von TILs durch den T-Zell-Wachstumsfaktor IL-2 innerhalb einer entnommenen Tumorbiopsie.

Antigenspezifische T-Zell Therapien:

2) genetischer Transfer von T-Zell-Rezeptor-erkennenden Tumorantigen-stammenden MHC-Klasse I und II Molekülen oder chimärische Antigenrezeptoren auf entnommene periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs)

3) Anreicherung von endogenen Antigen-spezifischen T-Zellen von PBMCs durch *in vitro*-Stimulation mit antigen-präsentierenden Zellen und anschließender Selektion oder Klonen.

Nach diesen *ex vivo* Behandlungen erfolgt, nach Depletion der Lymphozyten, die Reinfusion der angereicherten T-Zellen (Yee C. 2013). Dies resultiert in einer klonalen Repopulation mit antitumorigenen T-Zellen (Rosenberg S.A. et al. 2008).

1.5 ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinasen

ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinasen werden ubiquitär in zahlreichen Zelltypen exprimiert (Kruser T.J. and Wheeler D.L. 2010). Sie spielen eine bedeutende Rolle bei Zellwachstum, -entwicklung und -differenzierung (Kundu S.K. and Nestor M. 2012) und sind infolgedessen wichtige Rezeptoren während der Tumorentstehung und Proliferation.

Die folgenden Kapitel erläutern den Aufbau und die Funktion von ErbB-Rezeptoren sowie ihre Relevanz bei HNSCC.

1.5.1 Die ErbB-Rezeptorfamilie und ihre Liganden

Die ErbB-Familie der Rezeptor-Tyrosinkinase schließt vier Mitglieder ein (Holbro T. and Hynes N.E. 2004; Scaltriti M. and Baselga J. 2006; Seshacharyulu P. et al. 2012):

- 1) ErbB1/HER1 (*human epidermal growth factor receptor related receptor*) /EGFR (*epidermal growth factor receptor*)
- 2) ErbB2/HER2/Neu
- 3) ErbB3/HER3
- 4) ErbB4/HER4

Die Bezeichnung ErbB leitet sich ab vom *Avian erythroblastosis oncogene B*, ein onkogenes Retrovirus, das mit diesen Rezeptoren in Verbindung steht. *Neu* leitet sich vom neu-Onkogen ab, welches in Ratten durch Ethylnitrosoharnstoff induziert werden kann (Roskoski R., Jr. 2013). Die ErbB-Rezeptoren sind in der Zellmembran verankert und besitzen eine übereinstimmende Struktur, bestehend aus einer extrazellulären, cysteinreichen N-terminalen Ligandenbindungsdomäne, einer kurzen hydrophoben Transmembran-Helixdomäne und einer intrazellulären, zytoplasmatischen hochkonservierten C-terminalen Tyrosinkinase-Domäne mit zahlreichen Phosphorylierungsstellen (Abb. 1.5) (Holbro T. and Hynes N.E. 2004; Hynes N.E. and Lane H.A. 2005; Scaltriti M. and Baselga J. 2006; Seshacharyulu P. et al. 2012; Roskoski R., Jr. 2013). Funktionell weisen die ErbB-Rezeptoren Unterschiede auf. ErbB1 und ErbB4 besitzen eine aktive Tyrosinkinasedomäne und bekannte Liganden. ErbB3 kann ebenfalls verschiedene Liganden binden, jedoch besitzt dieser Rezeptor keine aktive Tyrosinkinaseaktivität, da es keine Adenosintriphosphat (ATP)-Bindung eingehen kann. Er kann somit kein Signal durch Proteinphosphorylierung in die Zelle weitergeben und geht nach Aktivierung durch einen Liganden eine Heterodimerisierung mit anderen ErbB-Rezeptoren ein, welche eine aktive Tyrosinkinasedomäne aufweisen. (Baselga J. and Swain S.M. 2009; Kruser T.J. and Wheeler D.L. 2010) ErbB2 ist ein sogenannter „*orphan-receptor*“, welcher die charakteristische Eigenschaft besitzt, keinen endogenen Liganden zu binden. Die Aktivierung von ErbB2 wird ebenfalls durch die Bildung eines Heterodimers, mit einem der anderen ErbB-Rezeptoren, hervorgerufen. (Hynes N.E. and Lane H.A. 2005; Seshacharyulu P. et al. 2012)

Die extrazellulären Domänen von ErbB1, -3 und -4 können zwei individuelle Konformationen einnehmen, eine geschlossene, inaktive und eine offene, aktive

Konformation. Die geschlossene Konformation liegt vor, wenn keine Ligandenbindung besteht. Die Bindung eines Liganden stabilisiert die offene Form und ermöglicht die Bildung aktiver Homo- und Heterodimere und hält aktive Rezeptorsignale aufrecht. (Abb. 1.5) (Baselga J. and Swain S.M. 2009; Seshacharyulu P. et al. 2012)

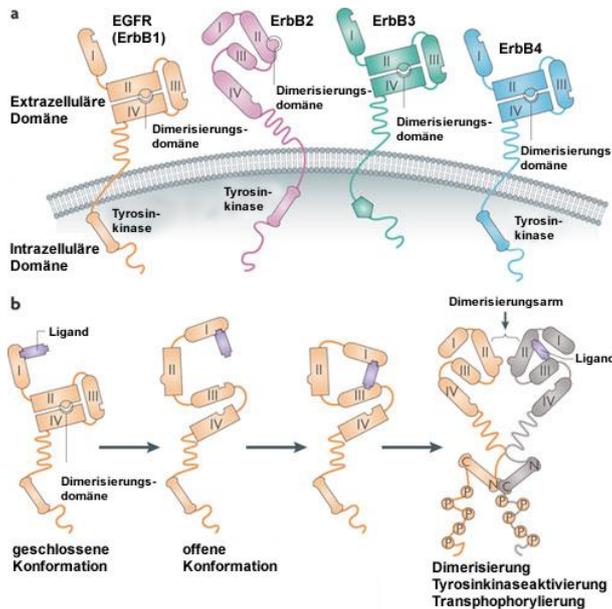


Abb. 1.5: ErbB-Rezeptoren

a) Jeder der vier Rezeptoren der ErbB-Familie besteht aus drei Domänen: extrazelluläre Domäne, α-Helix-Transmembran-Domäne und intrazelluläre Protein-Tyrosinkinase-Domäne. EGFR, ErbB3 und ErbB4 befinden sich im inaktiven Zustand in einer geschlossenen Konformation, bei der die Dimerisierungsdomäne nicht mit ErbB Partnern interagieren kann. ErbB2 besitzt keine bekannten Liganden. Dieser Rezeptor befindet sich ausschließlich in der aktiven, offenen Konformation, so dass er jederzeit eine Dimerisierung eingehen kann. b) Konformationsänderung nach Ligandenbindung. Sobald Liganden an EGFR, ErbB3 und ErbB4 binden kommt es zu einer Auf-faltung der Rezeptoren, was eine

Dimerisierung der Rezeptoren ermöglicht. (modifiziert nach Baselga J. and Swain S.M., 2009) [Die Nutzung der Abbildung erfolgte nach Genehmigung durch den Verlag *Nature Publishing Group*.]

ErbB-Rezeptoren können durch eine gesteigerte Expression sowie durch spezifische Liganden aktiviert werden. Die Liganden schließen 11 verschiedene lösliche Wachstumsfaktoren ein (Linggi B. and Carpenter G. 2006), die in Abhängigkeit von ihrer ErbB-Bindungsspezifität in drei Gruppen unterteilt werden können (Holbro T. and Hynes N.E. 2004; Hynes N.E. and Lane H.A. 2005):

- 1) *Epidermal growth factor* (EGF), *Amphiregulin* (AR), *Transforming growth factor-alpha* (TGF- α) und *Epigen* (EPGN) binden spezifisch an ErbB1
- 2) *Betacellulin* (BTC), *Heparin-binding EGF-like growth factor* (HB-EGF) und *Epiregulin* (EPR) binden spezifisch an ErbB1 und ErbB4
- 3) *Neuregulin 1–4* (NRG):
 - 3a) NRG-1 und NRG-2 binden ErbB3 und ErbB4
 - 3b) NRG-3 und NRG-4 binden ErbB4

Die ErbB-Liganden stellen Typ I/ *Singlepass* Transmembranproteine dar, welche in der Plasmamembran liegen. Sie bestehen aus einer N-terminalen Proregion, einem

EGF-Motiv, welcher für die Rezeptor-Bindung entscheidend ist, einer juxtamembran-ständigen Domäne, einer hydrophoben Transmembrandomäne und einem C-Terminalen Abschnitt. Zur Freisetzung löslicher Liganden wird die Ektodomäne der Transmembranproteine durch ADAM (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) - Metalloproteasen auf der Zelloberfläche abgespalten (=Ectodomain-Shedding). Diese löslichen Liganden können ErbB-Rezeptoren derselben Zelle (autokrin), der benachbarten Zellen (parakrin), oder von weit entfernten Zellen, durch Transport über die Blutbahnen (endokrin), binden. Des Weiteren ist eine juxtakrine Signalübertragung möglich, bei der der membran-gebundene Ligand die ErbB-Rezeptoren der benachbarten Zellen bindet. (Harris R.C. et al. 2003; Singh A.B. and Harris R.C. 2005; Higashiyama S. et al. 2008; Staruschenko A. et al. 2013)

1.5.2 ErbB-induzierte Signalwege

Die Ligandenbindung der ErbB-Rezeptoren induziert eine Formation von Homo- und Heterodimeren, was zu einer Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinasedomäne führt und anschließend eine Phosphorylierung von spezifischen Tyrosinresten am cytoplasmatischen C-terminalen Ende der ErbB-Rezeptoren bewirkt. Diese phosphorylierten Tyrosinreste bilden eine Bindungsstelle für eine Reihe von Signalmolekülen. Zu diesen Signalmolekülen gehören Phospholipase Cy (PLC γ), Cbl Proto-oncogen/E3 Ubiquitin Proteinligase (Cbl), *Growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2), die intrazelluläre Tyrosinkinase Src, *GTPase-activating proteins* (GAP), Crk, Nck und p85. Der Shc- oder Grb2-aktivierte Ras/Raf/Mitogen-activated Proteinkinase (MAPK) Signalweg wird, ebenso wie der Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt Signalweg, über alle vier Rezeptoren aktiviert. Sie stellen die zwei intrazellulären Hauptsignalwege dar. (Abb. 1.6) (Holbro T. and Hynes N.E. 2004; Hynes N.E. and Lane H.A. 2005; Zhang H. et al. 2007; Kruser T.J. and Wheeler D.L. 2010; Seshacharyulu P. et al. 2012)

Die Stimulation der zyttoplasmatischen Signalwege resultiert in einer Übertragung des Signals in den Zellkern, in welchem zahlreiche Transkriptionsfaktoren aktiviert werden. Zu den bisher beschriebenen ErbB-getriggerten Transkriptionsfaktoren gehören: C-Jun, c-fos und c-myc, NF- κ B, Zinkfinger Transkriptionsfaktoren, wie der Faktor Sp1, Ets, *Forkhead* Transkriptionsfaktoren (Fox) und *signal transducer and activator of transcription* (Stat). Durch diese Transkriptionsfaktoren können ErbB-Signalwege biologische Mechanismen hervorrufen, einschließlich der Zellproliferation, der Differenzierung, der Angiogenese, der Adhäsion, der Migration und

der Invasion. (Abb. 1.6) (Holbro T. et al. 2003; Holbro T. and Hynes N.E. 2004; Hynes N.E. and Lane H.A. 2005; Zhang H. et al. 2007; Kruser T.J. and Wheeler D.L. 2010; Seshacharyulu P. et al. 2012)

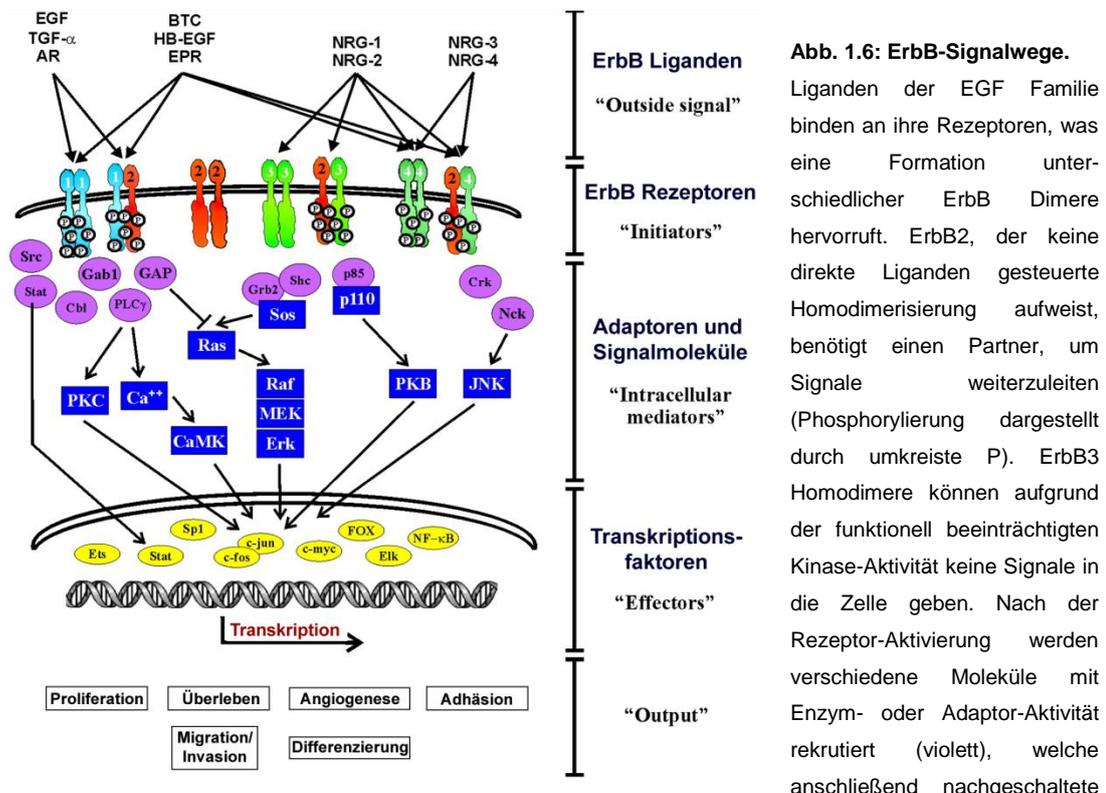


Abb. 1.6: ErbB-Signalwege.
Liganden der EGF Familie binden an ihre Rezeptoren, was eine Formation unterschiedlicher ErbB Dimere hervorruft. ErbB2, der keine direkte Liganden gesteuerte Homodimerisierung aufweist, benötigt einen Partner, um Signale weiterzuleiten (Phosphorylierung dargestellt durch umkreiste P). ErbB3 Homodimere können aufgrund der funktionell beeinträchtigten Kinase-Aktivität keine Signale in die Zelle geben. Nach der Rezeptor-Aktivierung werden verschiedene Moleküle mit Enzym- oder Adaptor-Aktivität rekrutiert (violett), welche anschließend nachgeschaltete

Signalkomponenten (dunkelblau) aktivieren. Diese führen letztendlich zu einer Aktivierung verschiedener nukleärer Transkriptionsfaktoren (gelb). Transkribierte Gene, und folglich synthetisierte Proteine, zeigen eine bedeutende Rolle bei der Proliferation, Angiogenese, Migration/Invasion, Adhäsion, Differenzierung und beim Überleben der Zellen.

Abkürzungen: AR: Amphiregulin; BTC: Betacellulin; CaMK: Calcium/calmodulin-dependent protein kinase; EGF: Epidermal growth factor; EPR: Epiregulin; Erk: extracellular signal-regulated kinases; Fox: Forkhead Transkriptionsfaktoren; GAP: GTPase-activating proteins; Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2; HB-EGF: Heparin-binding EGF-like growth factor; NF-κB: nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells; NRG: Neuregulin; PKC, B: Proteinkinase C, B; PLCγ: Phospholipase Cy; Stat: signal transducer and activator of transcription; TGF-α: Transforming growth factor-alpha (Modifiziert nach Holbro T. and Hynes N.E. 2004) [Die Nutzung der Abbildung in Dissertationen wird durch das Copyright Clearance Center legitimiert.]

1.5.3 Physiologische Bedeutung der ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinasen

ErbB-Rezeptoren sind bei der Entwicklung von zahlreichen Organen unerlässlich. EGFR, der bekannteste dieser Tyrosinkinase-Familie, ist insbesondere für die Erhaltung von Haut und Plattenepithelien mitverantwortlich (Eccles S.A. 2011). Demzufolge zeigen EGFR-Knockout-Experimente bei Mäusen Abnormalitäten in der Proliferation und Differenzierung epithelialer Zellen in Haut, Lunge, Verdauungstrakt und Plazenta sowie neuronale Schädigungen, die bei allen EGFR-Knockout-

Stämmen spätestens 20 Tage postnatal zum Tod führen. Der Phänotyp bei ErbB2-, ErbB3-, ErbB4- und NRG1-defizienten Mäusen beweist die bedeutende Rolle der ErbB-Rezeptor-Heterodimere und die essentielle Funktion während der Kardiogenese (Citri A. and Yarden Y. 2006). Daneben macht die gesteigerte Expression der ErbB-Rezeptoren und Liganden innerhalb der Brustdrüse die Bedeutung dieser Rezeptoren während ihrer Entwicklung, Reifung und Involution deutlich (Eccles S.A. 2011). Im Gegensatz zu den starken Beeinträchtigungen durch Mutationen des EGFR-Rezeptors zeigen sich nach Knockout der EGFR-Rezeptor-Liganden EGF und AR keine signifikanten phänotypischen Veränderungen. Nach Knockout von TGF- α zeigen sich geringfügige Abnormalitäten der Augen und Haarfollikel. Nach Triple-Knockout von EGF, AR und TGF- α ist ausschließlich eine Abnormalität des Dünndarms zu erkennen, was auf eine gegenseitige Kompensation der ErbB-Liganden hindeutet. (Citri A. and Yarden Y. 2006)

1.5.4 Bedeutung der ErbB-Rezeptoren und Liganden in der Tumorbiologie

Neben der Bedeutsamkeit bei physiologischen Vorgängen sind ErbB-Rezeptoren, darunter insbesondere EGFR und ErbB2, durch Mutationen und Überexpression an der Progression zahlreicher Tumoren wie HNSCC, Mamma-, Ovarial- und nichtkleinzelligem Lungenkarzinom involviert (Holbro T. and Hynes N.E. 2004). Eine erhöhte Expression korreliert mit einer weitaus schlechteren Prognose (Kruser T.J. and Wheeler D.L. 2010; Mitsudomi T. and Yatabe Y. 2010; Yewale C. et al. 2013). Eine gesteigerte Expression (Wilson K.J. et al. 2009) sowie ein stimuliertes Ectodomain-Shedding (Higashiyama S. et al. 2008) der EGF-Familie, hauptsächlich von TGF α , AR und HB-EGF wird mit einer schlechten Prognose und Resistenz gegenüber Chemotherapeutika in Zusammenhang gebracht (Wilson K.J. et al. 2009).

1.5.4.1 Bedeutung der ErbB-Familie bei HNSCC

Bei der Entwicklung und Progression von HNSCC besitzt ErbB1/EGFR innerhalb der ErbB-Familie die größte Relevanz. Bei bis zu 90 % aller HNSCCs wird eine Überexpression des EGFR nachgewiesen (Rogers S.J. et al. 2005). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass der EGF-Rezeptor als prognostischer Faktor dient, der mit zunehmender Tumorgroße, steigendem Risiko für Rezidive sowie sinkender Therapiesensitivität einhergeht (Chung C.H. et al. 2006; Koontongkaew S. 2013). Aufgrund der Relevanz einer EGFR-Überexpression bei HNSCCs und der damit assoziierten schlechten Prognose, stellt dieser Rezeptor ein vielversprechendes

therapeutisches Ziel dar (Rogers S.J. et al. 2005; Yewale C. et al. 2013). In diesem Zusammenhang finden monoklonale Antikörper, welche EGFR binden und so die Ligand-Rezeptor-Interaktion und nachfolgende Signalkaskaden inhibieren, sowie Tyrosinkinase-Inhibitoren, welche die intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität des EGFR hemmen, Anwendung bei der Therapie von HNSCCs (Holbro T. et al. 2003; Goerner M. et al. 2010; Seshacharyulu P. et al. 2012; Yewale C. et al. 2013). Neben EGFR zeigen ErbB2 und ErbB3, welche insbesondere bei Ovarien- und Mammakarzinomen eine Rolle spielen (Rogers S.J. et al. 2005; Baselga J. and Swain S.M. 2009; Gutierrez C. and Schiff R. 2011), ebenfalls signifikant erhöhte Expressionen bei HNSCCs, welche mit einer Tumorprogression korrelieren (Rogers S.J. et al. 2005; Goerner M. et al. 2010; Silva S.D. et al. 2010; Chu F. et al. 2011; Takikita M. et al. 2011; Ettl T. et al. 2012). Demgegenüber zeigt die Expression von ErbB4, im Unterschied zu den anderen drei ErbB-Mitgliedern, bisher keinen nennenswerten Zusammenhang zu progressivem Tumorwachstum (Xia W. et al. 1999; Rogers S.J. et al. 2005; Baselga J. and Swain S.M. 2009).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die zugrundeliegenden immunologischen Reaktionen sowie Änderungen im Expressionsmuster von Wachstumsfaktor-Rezeptoren im regressiven VX2-Tumor nach intraperitonealer Applikation eines Ozon-Sauerstoffgemischs (O_3/O_2 -PP) zu charakterisieren. Die Grundlage hierfür bot die tierexperimentelle Studie von Schulz et al., 2008, in der durch eine O_3/O_2 -PP-Therapie eine tumorizide Antwort auf den VX2-Tumor des Kaninchens nachgewiesen wurde und erste Hinweise auf einen Immunsystem-abhängigen Wirkmechanismus erhoben werden konnten.

Um Probenmaterial von remittierenden Tumoren zu gewinnen und histologisch sowie molekularbiologisch mit progressiven Tumoren zu vergleichen, sollte in einem ersten Teilversuch die O_3/O_2 -PP-Behandlung erneut angewendet werden. Damit einhergehend wurde die Reproduzierbarkeit der Tumorthherapie überprüft. Zum Nachweis des Erwerbs einer immunologischen Toleranz gegen den VX2-Tumor wurde in einem zweiten Teilversuch ein adoptiver Zelltransfer von PBL geheilter Tiere auf tumorkranke Empfängertiere durchgeführt. Als weiterer funktioneller Ansatz sollte anhand von Retransplantationsexperimenten der Erwerb einer möglichen Resistenz gegen den VX2-Tumor in bereits geheilten Tieren erbracht werden.

Zur Untersuchung intratumoral ablaufender Immunreaktionen wurde immun-histochemisch eine quantitative Analyse der Präsenz tumorinfiltrierender T-Lymphozyten durchgeführt. Darüber hinaus wurde molekularbiologisch der Nachweis immunologisch relevanter Gene der angeborenen sowie erworbenen Immunität erbracht. Der Vergleich dieser Analyseparameter zwischen regressiven und progressiven VX2-Tumoren sollte Informationen über Art und Umfang der, für die Tumorregression, relevanten Immunvorgänge liefern.

Darüber hinaus erfolgte eine Analyse der Regulation von Rezeptor-Tyrosinkinasen der ErbB-Familie, da diese, in gleicher Weise wie bei humanen HNSCC-Tumoren, welche in bis zu 90 % der Fälle eine Überaktivierung des EGFR-Signalweges aufweisen, eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese und Progression des VX2-Tumors spielen könnten. Hierbei sollte die Frage beantwortet werden, ob die angewandte O_3/O_2 -PP-Behandlung eine Herunterregulation dieser Wachstumsfaktor-Rezeptoren hervorrufen und damit eine Tumorremission begünstigen kann.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemein benötigte Materialien

Im Folgenden werden die allgemein benötigten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Puffer und Softwares in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet. Die Materialien, welche methodenspezifisch verwendet wurden, sind am Anfang des jeweiligen Kapitels aufgelistet.

2.1.1 Geräte

Autoklav	Fedegari Autoclavi Spa (Albuzzano, Italien)
Inkubatoren & Öfen:	
Inkubationsofen	WTB Binder Labortechnik (Reiskirchen)
Inkubationsofen	Heraeus (Hanau)
Magnetrührer MR-80	Heidolph Instruments GmbH (Schwabach)
pH-Meter 766	Knick Elektronische Messgeräte (Berlin)
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences GmbH (Fernwald)
Präzisionspipetten von den Firmen:	
Eppendorf (Hamburg)	
Gilson (Middleton, USA)	
Sartorius Weighing Technology GmbH (Rosbach v.d.H.)	
Reinstwasseranlage X-CAD	TKA Wasseraufbereitung (Niederelbert)
Sterilbanken:	
Sterilbank Uniflow 1800	UniEquip Laborgeräte (Planegg)
Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Vortex REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH (Schwabach)
Waagen:	
Analysewaage SBC-33	Scaltec Instruments (Denver, USA)
Präzisionswaage 440-47N	Kern & Sohn GmbH (Balingen-Frommern)
Präzisionswaage Sartorius PT310	Sartorius AG (Göttingen)
Wasserbad Julabo 5	Julabo Labortechnik GmbH (Seelbach)
Zentrifugen:	
Labofuge 400R	Heraeus (Hanau)
Sprout Mini-Zentrifuge	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf)

Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
Universalzentrifuge Multifuge 3L-R	Heraeus (Hanau)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Menzel-Glaser (Romont, Schweiz)
Kryoröhrchen	Nunc GmbH & Co. KG (Wiesbaden)
Kulturröhrchen	BD (Franklin Lakes, USA)
Objektträger	Roth (Karlsruhe)
Rasierklinge	Apollo Herkenrath GmbH & Co. KG (Solingen)
Reagiergefäße	Sarstedt (Nümbrecht)

Sonstige Plastik- und Glaswaren von den Firmen:

Greiner (Deisenhofen)
 Menzel-Gläser (Romont, Schweiz)
 Sarstedt (Nümbrecht)
 Roth (Karlsruhe)

2.1.3 Chemikalien

Eindeckmedium Fluka Eukitt®	Sigma-Aldrich GmbH (Seelze)
Essigsäure	Merck KGaA (Darmstadt)
Ethanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Isopentan	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Isopropanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA (Darmstadt)
Dinatriumphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Xylol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

2.1.4 Puffer

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

(50mM): 6,5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 2,5 mM KCl, 140 mM NaCl; pH 7,25

2.1.5 Software

BLAST	NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA)
Endnote X4	Thomson Reuters (New York, USA)
Experion Software	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
GraphPad Prism 4.0	GraphPad Software (San Diego, USA)
ImageJ	NIH (National Institute of Health, Bethesda, USA)
MCID Elite TM 7.0	Imaging Research Inc. (St. Catharines, Kanada)
Photoshop 7.0	Adobe Systems Incorporated (San Jose, USA)
SPOT Image Analysis 3.4.	Diagnostics Instruments inc. (Seoul, Korea)
Word, Excel, PowerPoint	Microsoft (Redmond, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Tierversuche

2.2.1.1 Benötigte Materialien

Geräte:

MedozonIP Gerät	Herrmann Apparatebau GmbH (Kleinwallstadt)
Neubauer Zählkammer	W. Schreck (Hofheim)
PET-CT; GE Discovery LS system	GE Healthcare (Pittsburgh, USA)
Vet abc™ Animal Blood Counter	ABX Diagnostics (Göttingen)

Medikamente:

Ketavet® (Ketaminhydrochlorid)	Pharmacia GmbH (Erlangen)
Robinul® (Glycopyrroniumbromid)	Riemser Arzneimittel AG (Greifswald)
Rompun® (Xylazinhydrochlorid)	Bayer Vital GmbH (Leverkusen)
Suprarenin® (Epinephrin)	Sanofi Aventis (Frankfurt)
Temgesic® (Buprenorphinhydrochlorid)	Essex Pharma (München)
T61 (Embutramid)	Intervet Deutschland GmbH (Unterschleißheim)

Verbrauchsmaterial:

Einweg-Injektionsspritzen Norm-Ject	Henke-Sass, Wolf GmbH (Tuttlingen)
Vasofix R Branülen	Braun Melsungen AG (Melsungen)
EDTA Monovetten	Sarstedt (Nümbrecht)
Normkanülen BD Microlance™	BD Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Multifly Kanülen-Set	Sarstedt (Nümbrecht)

Chemikalien, Lösungen und Puffer:

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Zellkulturmedium	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
NaCl-Lösung (0,9 % (w/v) in ddH ₂ O)	Braun Melsungen AG (Melsungen)
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Lysepuffer	1,55 M NH ₄ Cl, 100 mM KHCO ₃ , 10mM EDTA

2.2.1.2 Versuchstiere

Als etabliertes Tiermodell für HNSCC wurde das aurikuläre VX2-Tumormodell des weißen Neuseelandkaninchens (Iffa Credo New Zealand White Rabbit, NZWR) verwendet. Die Tiere wurden von Charles River WIGA (Sulzfeld) bezogen.

Alle Kaninchen wurden unter gleichen Bedingungen gehalten. Sie wurden in Einzelkäfigen bei 50 - 60 % Luftfeuchtigkeit, 20 - 22 °C Raumtemperatur und einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus mit freiem Zugang zu Wasser und Trockenfutter

gehalten. Die Kaninchen waren alle männlichen Geschlechts und zu Beginn des Versuchs im Alter zwischen einem halben und einem Jahr und hatten ein durchschnittliches Gewicht von 2,0 - 3,0 kg. Vor Versuchsbeginn konnten sich die Tiere mindestens 2 Wochen in der neuen Umgebung akklimatisieren.

Die tierexperimentellen Versuche wurden durch das Regierungspräsidium in Gießen genehmigt (Kennzeichen V 54-19 c 20-15(1) MR, Nr. 34/2011 und V 54 - 19 c 20 15 h 01 MR 20/26 Nr. 89/2012).

2.2.1.3 Tierversuchsdesign

Das tierexperimentelle Versuchsvorhaben wurde in 3 Teilversuche aufgeteilt.

Im Teilversuch 1 wurde ein aurikulärer VX2-Tumor gesetzt und die Tiere der therapeutischen Intervention des O₃/O₂-PP bzw. der Sham-Behandlung unterzogen (Abb. 2.1). Aufbauend auf diesen Teilversuch wurden die überlebenden Tiere entsprechend ihrem Krankheitsverlauf als Spendertiere (Teilversuch 2) oder als Empfängertiere einer erneuten VX2-Zellinokulation (Teilversuch 3) eingesetzt.

Im Teilversuch 2 wurde aus geheilten bzw. tumorkranken Tieren aus Teilversuch 1 periphere Blutleukozyten (PBL) isoliert und durch einen adoptiven Zelltransfer in Tiere übertragen, denen ein VX2-Tumor implantiert wurde (Abb. 2.2).

Im Teilversuch 3 wurde O₃/O₂-PP-behandelten, geheilten Tieren des Teilversuchs 1 erneut ein aurikulärer VX2-Tumor gesetzt. Als Kontrolle wurden bisher unbehandelte Tiere eingesetzt, die erstmals eine VX2-Tumorzellinokulation verabreicht bekamen.

Am Versuchsende oder bei Erreichen eines „*human endpoint*“ Abbruchkriteriums, wie Kachexie (Gewichtsverlust von 20 %), wurden die Tiere euthanasiert. Hierzu wurden die Tiere durch die Gabe von 5 mg/kg Rompun und 70 mg/kg Ketamin (*i.m.*) anästhesiert und anschließend mittels einer Injektion von 0,5 ml T61 (Embutramid) (*i.v.*) in die laterale Ohrvene getötet.

Teilversuch 1:

In diesem Versuch erhielten 21 NZW-Kaninchen zur Induktion eines aurikulären VX2-Tumors eine VX2-Tumorzellinokulation in die Subkutis eines Ohres (Abb. 2.1). Die Tumorgöße wurde täglich mit einer digitalen Schieblehre gemessen und beim Überschreiten des Tumolvolumens von > 2500 mm³ die therapeutische bzw. Sham-Intervention begonnen. Bei 3 Tieren bildeten sich keine soliden Tumoren mit einem Volumen von > 2500 mm³ aus. Alle anderen Tiere wurden zufällig in 2 Gruppen

eingeteilt: 10 Tiere erhielten eine O₃/O₂-Pneumoperitoneum- (O₃/O₂-PP-) Behandlung, weitere 8 Tiere wurden einer Sham-Behandlung unterzogen.

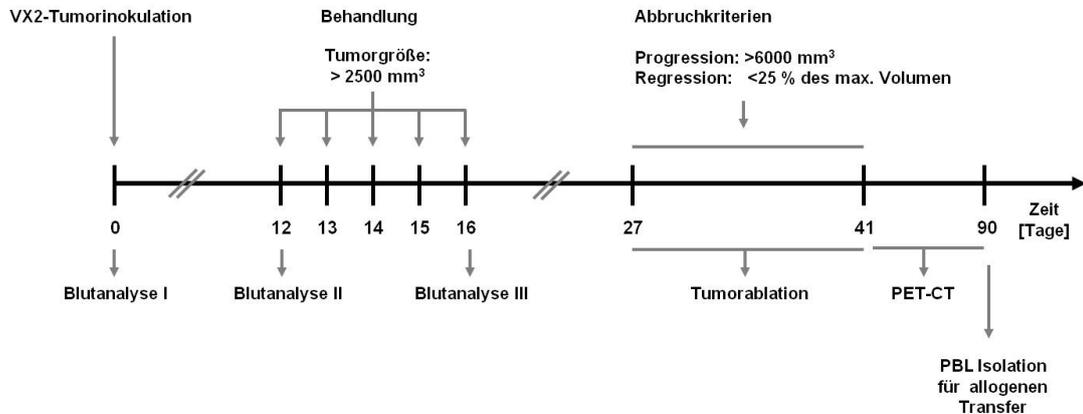


Abb. 2.1: Experimenteller Ablauf des Teilversuches 1

An Tag 0 wurde eine Blutprobe entnommen und die VX2-Tumorzellsuspension injiziert. Die 5-tägige O₃/O₂-PP-Behandlung bzw. die Sham-Behandlung sowie die Entnahme von Blutproben unmittelbar vor der ersten und direkt nach der letzten Behandlung begannen, sobald der Tumor ein Volumen von > 2500 mm³ erreicht hatte. Durch tägliche Volumenmessung wurde das Tumorstadium dokumentiert, bis das Volumen eines der beiden Abbruchkriterien erreicht hatte. Zu diesem Zeitpunkt wurde der Tumor operativ entfernt. Die Beobachtung des Tieres wurde bis Tag 90 fortgesetzt. Zur Diagnose von Metastasen wurde die PET-CT (Positronen-Emissions-Tomographie/Computer Tomographie) durchgeführt.

Das Volumen der Tumoren wurde weiterhin täglich gemessen und bei Erreichen der definierten Volumina (siehe Abb. 2.1) – basierend auf vorherigen Erfahrungen – chirurgisch abgenommen.

Der Zeitpunkt, an dem ein Abbruchkriterium erreicht wurde, wurde als der jeweilige Zeitpunkt der individuellen Heilung bzw. der finalen Tumorerkrankung eingestuft. Um die Entstehung von Metastasen auch nach Tumorablation feststellen zu können, wurden die Tiere über einen weiteren Zeitraum bis Tag 90 untersucht. Wenn möglich wurde an den Tieren eine PET-CT Analyse durchgeführt, um entstehende Metastasen bereits in diesem Zeitraum zu erfassen.

Teilversuch 2:

In diesem Teilversuch sollte analysiert werden, ob die, durch die O₃/O₂-PP-induzierte erworbene Tumoresistenz durch PBL auf Empfängertiere übertragen werden kann. Als Spender dienten einerseits 3 O₃/O₂-PP-behandelte Tiere aus Teilversuch I, bei denen der Primärtumor remittiert (< 25% des individuellen Maximums) war und die nach Tag 75 keine Metastasen sowie keine vergrößerten

Wächterlymphknoten aufwiesen. Als weiteres wurden 3 Sham-behandelte Tiere aus Teilversuch I verwendet, die ein progressives Wachstum des aurikulären Tumors ($> 6000 \text{ mm}^3$) aufwiesen. Der adoptive Transfer erfolgte 84 (± 7) Tage nach VX2-Zellinjektion.

Die aus den Spendertieren isolierten PBL wurden in einem adoptiven Transfer auf 2 Gruppen von Empfänger-Kaninchen übertragen:

a) Die erste Empfängertier-Gruppe (n=11) erhielt parallel zur aurikulären PBL-Injektion eine VX2-Tumorinokulation in das kontralaterale Ohr. Sechs dieser Empfängertiere erhielten die PBL von Sham-behandelten Tieren und 5 Empfängertiere die PBL von O_3/O_2 -PP-behandelten Tieren (Abb. 2.2 a).

b) Die zweite Gruppe (n=12) erhielt zunächst eine VX2-Tumorinokulation (Tag 0). Nach Erreichen einer Tumorgöße von 2500 mm^3 wurden 2 dieser Tiere PBL von Sham-behandelten Tieren verabreicht und 4 der Tiere PBL von O_3/O_2 -PP-behandelten Tieren (Abb. 2.2 b). Bei den anderen Tieren bildete sich kein solider Tumor mit einem Volumen von $> 2500 \text{ mm}^3$ aus.

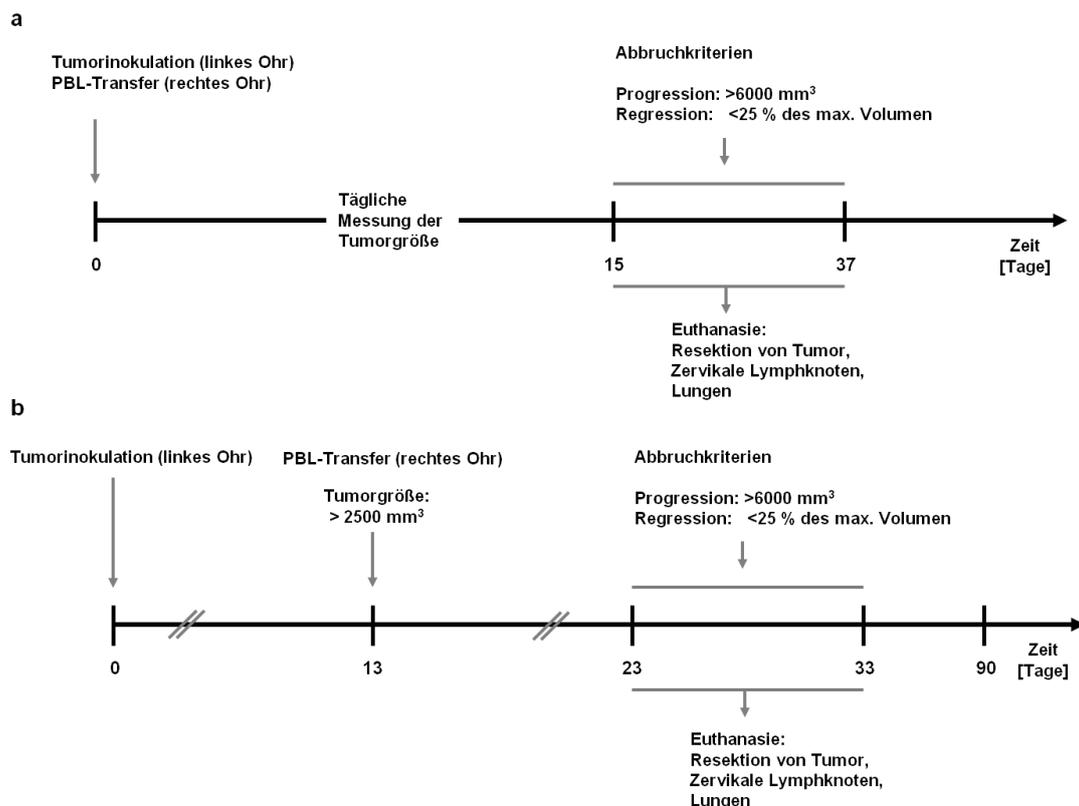


Abb. 2.2: Experimenteller Ablauf des Teilversuches 2

An Tag 84 (± 7) wurden den O_3/O_2 -PP-behandelten, geheilten und den Sham-behandelten, kranken Kaninchen aus Teilversuch I Blutproben entnommen und die PBL isoliert (siehe Abb. 2.1)

a) An Tag 0 wurden die PBL in die rechte Ohrvene der ersten Versuchsgruppe (n=11) injiziert: 6 der Tiere erhielten PBL von Sham-behandelten, kranken Kaninchen und 5 von O₃/O₂-behandelten, geheilten Kaninchen. Gleichzeitig wurde s.c. die VX2-Tumorzellsuspension in das kontralaterale Ohr verabreicht. Sobald ein Abbruchkriterium erreicht wurde, wurden die Tiere euthanasiert und der Tumor, zervikale Lymphknoten und Lungenproben reseziert.

b) Die zweite Versuchsgruppe (n=12) erhielt an Tag 0 eine VX2-Tumorzellsuspension in das linke Ohr. Nach Erreichen einer Tumorgöße von 2500 mm³ wurden die PBL in das rechte Ohr inokuliert. 2 der Tiere erhielten PBL von Sham-behandelten, kranken Kaninchen und 4 von O₃/O₂-behandelten, geheilten Kaninchen. Nach Erreichen der Abbruchkriterien wurden die Tiere euthanasiert und der Tumor, zervikale Lymphknoten und Lungenproben reseziert.

Teilversuch 3:

Zur Untersuchung einer dauerhaften VX2-Tumorresistenz erhielt eine Gruppe von O₃/O₂-PP-behandelten, geheilten Tieren (n=3) achtzehn Monate nach Abschluss des Teilversuchs I eine monoaurikuläre VX2-Tumorzell-Inokulation (s.c.). Als Kontrolle dienten 4, bisher unbehandelte Tiere, welche erstmals eine VX2-Tumorzell-Inokulation verabreicht bekamen. Anschließend erfolgte eine Beobachtung über 14 Tage.

2.2.1.4 Herstellung der VX2-Tumorzellsuspension

Zur VX2-Tumorinduktion im Bereich der Ohrmuschel wurden hochmaligne VX2-Zellen benötigt, welche durch wiederholte intramuskuläre (*i.m.*) *in vivo*-Passagen im Kaninchen selber hergestellt wurden. Hierzu wurde einem NZW-Spendertier die aufbereitete Vitalzellsuspension, bestehend aus aufgetauten VX2-Zellen aus einem Gefrierstock, in jeden der beiden M. Quadrizeps injiziert (300 µl Zellsuspension pro Quadrizeps).

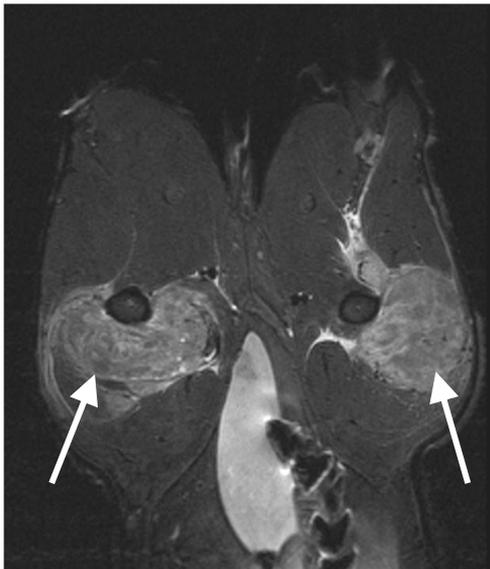


Abb. 2.3: MRT-Aufnahme des Musculus Quadriceps

MRT-Aufnahme der Hinterläufe eines Spenderkaninchens 15 Tage nach Inokulation der Tumorzellsuspension. Die hellen Bereiche innerhalb des Musculus Quadriceps, angrenzend an den Femur (mit weißen Feilen gekennzeichnet) stellen die progressiven VX2-Tumore dar.

Nach 14-18 Tagen wurde eine Magnetresonanztomographie (MRT) durchgeführt, um festzustellen, ob eine adäquate Tumorgröße erreicht wurde (Abb. 2.3). Stellte sich dies heraus, wurde das Tier narkotisiert, unter CO₂ euthanasiert, die Tumoren im Bereich der Hinterläufe entnommen und eine VX2-Tumorzellsuspension hergestellt. Hierzu wurde das Tumorgewebe mit sterilen Skalpellern zerkleinert, gesiebt und mit DMEM aufgenommen. Nach Zentrifugation (4 °C; 5 Min.; 3500 U/Min.) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in DMEM auf 5×10^7 Zellen/ml resuspendiert.

Die erhaltene Tumorzellsuspension wurde in eine 1 ml Injektionsspritze aufgenommen und erneut in den M. Quadrizeps eines Spendertiers injiziert. Nach drei solcher hintereinandergeschalteten *in vivo* Passagen erhielt man eine hinreichend maligne VX2-Tumorzellsuspension für die erfolgreiche Induktion aurikulärer Tumoren.

2.2.1.5 Aurikuläre Tumorzellinokulation

Zunächst wurden die Tiere mit 5 mg/kg KG Rompun[®] *i.m.* sediert und die, aus dem Spendertier frisch gewonnene VX2-Tumorzellsuspension (200 µl pro Injektion) im Bereich des mittleren Drittels der rechten Ohrmuschel lateral der Ohrarterie injiziert (Abb. 2.4). Hierzu wurde mit einer Normkanüle *s.c.* zunächst eine kleine Lufttasche gespritzt, in welche die VX2-Tumorzellsuspension eingebracht wurde. Das Tumorstadium wurde täglich mit Hilfe einer digitalen Schieblehre dokumentiert. Um Tag 13 (± 2) nach Tumorzellinokulation wurde die Größe eines soliden Primärtumors von $> 2500 \text{ mm}^3$ erreicht. Ab diesem Zeitpunkt wurde die therapeutische Intervention gestartet.



Abb. 2.4: Aurikuläre Tumorzellinokulation

Tumorzellinokulation lateral der Ohrarterie. (Pfeil markiert Ohrarterie)

2.2.1.6 Therapeutische Intervention

Die therapeutische Intervention beinhaltete die Insufflation eines O₃/O₂-Gasgemisches in das Peritoneum, die 5-mal in täglichem Abstand zueinander durchgeführt wurde. Vor Beginn der Intervention wurden die Tiere mit 0,1 ml/kg

Körpergewicht (KG) Robinul® (s.c.) sowie einer Mischung aus 5 mg/kg KG Rompun® und 70 mg/kg KG Ketavet® (i.m.) anästhesiert. Die Erzeugung und das Einbringen des O₃/O₂-Gasgemisches in das Peritoneum wurden über das MedozonIP-Gerät vorgenommen. Dieser Ozongenerator erlaubt die zu insufflierende Menge an Ozon exakt zu dosieren und verfügt über einen eingebauten Drucksensor, der die Zufuhr des O₃/O₂-Gasgemisches abschaltet, sobald ein intraabdominaler Druck von 40 mbar überschritten wird. Die Insufflation des Gases in das Peritoneum erfolgte über ein Schlauchsystem und einer Vasofix R Braunüle und beinhaltete ein Gesamtvolumen von 80 ml/kg KG O₃/O₂-Gasgemisch mit 50 µg reinem O₃ pro ml Gasgemisch (entspricht 2,5 % O₃ und 97,5 % O₂).

Die Sham-behandelten Tiere wurden anästhesiert, die Braunüle implantiert, jedoch wurde kein O₃/O₂-Gasgemisch insuffliert.

2.2.1.7 Ablation des Primärtumors

Als Kriterien für die Einstufung einer Heilung oder einer unheilbaren Tumorerkrankung wurden durch folgende Grenzwerte der Tumorumfänge festgelegt:

Geheilt wurden Tiere eingestuft, bei denen der Tumor remittierte und sich das Tumorgewebe letztendlich auf unter 25 % des jeweils individuellen maximalen Volumens verringert hatte. Als unheilbar krank wurden Tiere eingestuft, bei denen der Tumor progressiv wuchs und ein Tumorumfang von über 6000 mm³ erreicht hatte. Diese Abbruchkriterien basierten auf Beobachtungen vorheriger Versuche, die zeigten, dass nach Erreichen des oben eingesetzten Tumorumfanges das Tier, im Falle der Regression, geheilt war oder im Falle einer Progression durch Blutungen, lokale Infektionen im Tumorbereich oder an Lungenmetastasen in den nächsten Monaten verstarb.

Vor der operativen Entnahme der Tumoren wurden die Tiere mit Robinul 5 ml/ kg KG, s.c. und mit Rompun 5 mg/kg in Kombination mit Ketamin 70 mg/kg, i.m. anästhesiert. Für eine Reduktion von Blutungen, die von Kapillaren ausgingen wurde um den Tumorbereich Suprarenin® injiziert (Abb. 2.5b). Um starken Blutungen vorzubeugen wurde die Ohrarterie proximal des Tumors ligiert (Abb. 2.5c) und der Tumor mit einem Skalpell von der Adventitia abgehoben (Abb. 2.5d).

Die zurückbleibende Wunde wurde mit Kompressen abgedrückt, bis die Blutungen vollständig gestoppt waren. Zur postoperativen Schmerzbehandlung wurde den

Tieren direkt nach der OP und für weitere 2 Tage alle 12 Stunden 0,025 mg/kg KG das Opioid Temgesic® s.c. verabreicht.



Abb. 2.5: Operative Entfernung eines Primärtumors

- a) Desinfizierter Tumorbereich
- b) Injektion des vaso-konstriktiven Suprarenins in das anliegende Gewebe
- c) Proximale Ligatur der Ohrarterie
- d) Ablation des Primärtumors

2.2.1.8 Analysen

2.2.1.8.1 Blutparameter

Zur Bestimmung der Blutparameter erfolgte eine Abnahme arterieller Blutproben von der zentralen aurikulären Arterie des linken tumorfreien Ohres. Für die Ermittlung eines Basiswertes wurde die erste Blutentnahme vor Tumorinokulation durchgeführt. Die weiteren Messungen erfolgten kurz vor und direkt nach der 5-tägigen O₂/O₃-PP- / Sham-Behandlung. Die Bestimmung der Blutparameter erfolgte in einem für Kaninchenblut kalibrierten Autoanalyzer (Vet abc™ Animal Blood Counter). Bestimmt wurden die Konzentrationen von Leukozyten, Erythrozyten, Blutplättchen, Hämoglobin, Hämatokrit, mittleres Erythrozyteneinzelvolumen, mittleres, korpuskuläres Hämoglobin, mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration.

2.2.1.8.2 PET-CT

Die Positronen-Emissions-Tomographie (GE Advance NXi PET) in Kombination mit der Computer-Tomographie (GE Lightspeed® Plus Multislice CT scanners) stellt ein bildgebendes Verfahren dar, bei dem die anatomische Aufnahme des CT-Geräts mit den Stoffwechsellinformationen aus der PET kombiniert wird. Eines der

Einsatzgebiete der PET-CT ist die Diagnose unterschiedlicher Tumorerkrankungen, bei der man sich die erhöhte Stoffwechselrate und den damit verbundenen gesteigerten Glukoseverbrauch von Tumorzellen und Tumormetastasen zu Nutze macht. Als Tracer wird radioaktiv-markiertes 2-[18F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) eingesetzt, das nach der Phosphorylierung in glucoseabhängigen Zellen als FDG-6-Phosphat nicht weiter verstoffwechselt wird und sich anreichert. Mittels der PET-Analyse können Anreicherungen des radioaktiv markierten Moleküls detektiert werden, die im Körper ggf. vorhandene Tumoren und Metastasen markieren. Für das PET-CT wurden die Kaninchen mit Robinul 5 ml/kg KG, s.c. und mit Rompun 5 mg/kg KG in Kombination mit Ketamin 70 mg/kg KG, *i.m.* narkotisiert. Anschließend wurden 0,05 mCi/kg KG radioaktiv markierte FDG in die laterale Ohrvene des tumorfreien Ohrs injiziert. Nach 30 (\pm 5) Min. nach der FDG-Injektion erfolgte die Analyse der narkotisierten Tiere im PET-CT Gerät.

2.2.1.9 Isolation und adoptiver Transfer peripherer Blutleukozyten

Zur Gewinnung der peripheren Blutleukozyten (PBL) diente arterielles EDTA-Blut, das aus der zentralen Ohrarterie des tumorfreien Ohrs gewonnen wurde. Drei ml davon wurden in 90 ml Lysepuffer aufgenommen und 10 Min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch 10 Min. bei 1000 xg und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 40 ml $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ freiem PBS resuspendiert und 10 Min. bei RT inkubiert. Nach der Zentrifugation (1000 xg, 10 Min., RT) wurde der Waschvorgang mit PBS einmal wiederholt. Abschließend wurde das Gemisch 5 Min. bei 1000 xg und RT zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml physiologischer NaCl-Lösung aufgenommen. Nach der Färbung eines Aliquots der Zellsuspension mit Trypanblau (1:5 Verdünnung) und Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer wurde die Lösung für den Transfer auf 1 ml $5 \cdot 10^6$ Zellen verdünnt.

Die PBL-Lösung eines Spendertieres wurde über die laterale Ohrvene in zwei Empfängertieren transferiert. Diese Injektion erfolgte einerseits parallel zu der Inokulation einer Tumorzellsuspension (siehe 2.2.1.5) in das kontralaterale Ohr. Andererseits wurde die PBL-Lösung transferiert, sobald der zuvor aurikulär inokulierte VX2-Tumor eine Größe von $> 2500 \text{ mm}^3$ erreicht hatte.

Vor und nach der PBL-Injektion wurde die Körperkerntemperatur der Empfängertiere rektal gemessen, um eine mögliche Graft-versus-Host Reaktion gegen die PBL einstufen zu können.

2.2.2 Gewebepräparation

Proben des Tumorgewebes wurde durch Ablation gewonnen; Lymphknoten und Lungengewebe bei der Sektion des euthanasierten Tiers entnommen. Alle Gewebeproben wurden unmittelbar nach ihrer Präparation, abhängig von den Anforderungen der jeweils vorgesehenen Analyse, aufgearbeitet und gelagert.

2.2.2.1 Benötigte Materialien

Geräte:

Kryostat CM 3050S	Leica Microm Laborgeräte (Walldorf)
Rotationsmikrotom HM 325	Leica Microm Laborgeräte (Walldorf)
TissueTek Paraffin-Ausbett-Station	Sakura Finetik (Zoeterwoude, Niederlande)
TissueTek Paraffin-Einbett-Automat	Sakura Finetik (Zoeterwoude, Niederlande)

Chemikalien, Lösungen und Puffer:

RNA-Later (R0901)	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Paraffin	Vogel Histo-Comp (Gießen)
TissueTek O.T.C. Einbettmedium	Sakura Finetik (Zoeterwoude, Niederlande)
TESAP (3-(Triethoxysilyl)- Propylamin)	Merck Schuchardt GmbH (Hohenbrunn)
Formaldehyd	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Kupfer-II Acetat	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Pikrinsäure	Riedel-de Haen (Seelze)
Eisessig	Merck KGaA (Darmstadt)
Bouin Hollande (BH) Stammlösung:	0,04M Kupfer-II Acetat, 4 % (w/v) Pikrinsäure, 60 % (v/v) H ₂ O
Bouin Hollande Gebrauchslösung:	100 Teile BH-Stammlösung, 10 Teile 37 % Formaldehyd, 1 Teil Eisessig (CH ₃ COO ⁻)
PFA-Lösung:	4 % (w/v) Formaldehydlösung in PBS; pH 7,2 – 7,4
Adhäsionsbeschichtete Objektträgern:	Objektträger (Roth (Karlsruhe)) beschichtet mit 2 % TESAP (Triethoxyilyl-propylamin) in Aceton und bei 42 °C getrocknet.

2.2.2.2 Probenaufarbeitung für molekularbiologische Analysen

Gewebeproben, bei denen eine RNA-Extraktion vorgenommen werden sollte, wurden mittels eines Skalpell zerkleinert und in RNA-Later (100µl/mg Gewebe) aufgenommen. Um eine vollständige Durchdringung des Gewebes mit dem RNA-stabilisierenden Reagenz zu gewährleisten, wurden die Proben bei 4 °C über Nacht aufbewahrt und anschließend bei -70°C gelagert.

Gewebeproben, die für molekularbiologische histologische Analysen, wie der *in situ* Hybridisierung benötigt wurden, wurden direkt nach der Entnahme in TissueTek

eingebettet und in Isopentan auf Trockeneis möglichst schnell und gleichmäßig eingefroren. Die Lagerung dieser Gewebeblöcke erfolgte bei -80 °C.

2.2.2.3 Probenbehandlung für histologische Analysen

Gewebeproben für histologische Analysen wurden in eine Fixierlösung überführt (Bouin Hollande oder PFA-Lösung) und bei Raumtemperatur über 48 Std. auf einem Schüttler fixiert. Zum anschließenden Auswaschen des jeweiligen Fixierungsmittels wurden die Proben in Einbettkassetten überführt und in 70 %-igem Isopropanol für mindestens 1 Woche gelagert. In diesem Zeitraum erfolgte ein mehrmaliger Wechsel der 70 %-igen Isopropanol-Lösung. Anschließend erfolgte mittels eines Einbettautomaten eine Entwässerung und Überführung der Proben in flüssiges Paraffin (je 1 Std. 70 %, 80 %, 96 %, 3 x 100 % Isopropanol, 3x Xylol bei 40 °C, 3 x 1 Std. Paraffin bei 60 °C). Im Anschluss wurden die Proben an der Ausbettstation in Metallformen in die gewünschte Schnittposition gelegt, flüssiges Paraffin hinzugegeben, das dann auf einer Kühlplatte zu einem Paraffinblock abgekühlt wurde.

2.2.2.4 Herstellung von Gewebeschnitten

Die Paraffinblöcke wurden zunächst gekühlt und anschließend in ein Rotationsmikrotom eingespannt. Es wurden 7 µm dicke Serienschnitte angefertigt, die direkt nach dem Schnitt im Wasserbad (42 °C) gestreckt und auf silanisierte Objektträger aufgebracht wurden. Durch die anschließende Inkubation der Objektträger mit den noch feuchten Gewebeschnitten im Umluftofen (60 °C) wurden die Paraffinschnitte an die Objektträger fixiert.

Das in Tissue Tek eingefrorene Gewebe wurde am Kryostat bei ca. -20 °C noch im gefrorenen Zustand in 14 µm dicke Gewebescheiben geschnitten und auf silanisierte Objektträger aufgezogen. Diese wurden nach 30 Min. Trocknung an der Luft bei -70 °C gelagert.

2.2.3 Histologische Färbungen

2.2.3.1 Benötigte Materialien

Geräte:

Mikroskop AX70

Olympus (Hamburg bzw. Tokio, Japan)

Mikroskop BX40

Olympus (Hamburg bzw. Tokio, Japan)

SPOT Kamera

Diagnostics Instruments inc. (Seoul, Korea)

Antikörper:

anti-CD3 Antikörper	Biozol (Eching)
Donkey-anti-mouse Sekundär-Antikörper	Dianova (Hamburg)

Chemikalien, Lösungen und Puffer:

Ammonium Nickelsulfat	Fluka (Bucks, Schweiz)
Avidin-Biotin Blocking Kit	Boehringer (Ingelheim)
BSA (<i>bovine serum albumin</i>)	<i>PAA Laboratories GmbH</i> (Pasching, Österreich)
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Eosin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Hämatoxylin (Hämalaun)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Natriumcitrat	Merck KGaA (Darmstadt)
2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol (Tris)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Tyramid	PerkinElmer (Rodgau)
Zitronensäure (C ₆ H ₈ O ₇)	Merck KGaA (Darmstadt)
DAB-Nickel-Färbelösung:	100 mg DAB, 600 mg 0,08 % Ammonium Nickelsulfat, 800 ml PBS; filtrieren
Giemsa-Färbelösung:	20ml Giemsa-Stammlösung in 180ml H ₂ O <i>filtrieren</i>
NaCl-Lösung:	5M NaCl
Natrium-Citrat-Puffer:	1,8mM Zitronensäure (C ₆ H ₈ O ₇), 8,2mM Natriumcitrat; pH 6.0
PBS-ICC:	9,5mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O, 40,5mM NaHPO ₄ x H ₂ O, 153mM NaCl; pH 7,45
TN-Puffer:	150mM NaCl, 100mM Tris/HCL

2.2.3.2 Giemsa-Färbung

Die Giemsa-Färbung dient als histologische Übersichtsfärbung, die für die Lokalisation von Blutzellen aber auch pathologisch veränderter Zellen (z.B. Tumorzellen) besonders geeignet ist. Zur Färbung wurden die Paraffinschnitte zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (je 5 Min. 2 x Xylol, 2 x 100 %, 96 %, 90 %, 80 %, 70 % Isopropanol, ddH₂O). Die Giemsa-Stammlösung wurde filtriert und anschließend 1:100 mit ddH₂O verdünnt. Die Paraffinschnitte wurden mit dieser Lösung 30 - 60 Min. eingefärbt. Die Giemsa-Lösung enthält als dreifach-Farbstoffkombination Azur-Eosin-Methylenblau, von denen Azur-Eosin für die Rottöne und Methylenblau für die Blautöne der histologischen Färbung beitragen. Zur Differenzierung der Rottöne diente mit Essigsäure versetztes ddH₂O, zu der der Blautöne diente 96 % iges Isopropanol. Eine der Färbung anschließenden Dehydrierung wurde in 3 x 5 Min. 100 % igen Isopropanol und 3 x 5 Min. Xylol durchgeführt. Danach wurden die Präparate mit dem Eindeckmedium und einem Deckgläschen abgedeckt.

2.2.3.3 Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung

Für die HE-Färbung wurden die Paraffinschnitte zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (je 5 Min. 2 x Xylol, 2 x 100 %, 96 %, 90 %, 80 %, 70 % Isopropanol, ddH₂O). Anschließend erfolgte die Inkubation der Schnitte in Hämalaun, die je nach gewünschter Färbeintensität zwischen 5 und 10 Min. dauerte. Zum Bläuen der Schnitte wurden diese 10 Min. unter fließendes Wasser gehalten. Daraufhin erfolgte eine kurze Inkubation in ddH₂O, dann ca. 1 Min. Eosin und wieder ddH₂O. In der aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %) wurde die Färbung kurz differenziert. Die Dehydrierung wurde in 3 x 5 Min. 100 % igen Isopropanol und 3 x 5 Min. Xylol durchgeführt. Abschließend wurden die Präparate mit dem Eindeckmedium und einem Deckgläschen abgedeckt.

2.2.3.4 Immunhistochemische Färbungen für die Hellfeldmikroskopie

Zunächst wurden die Gewebeschnitte entparaffiniert, indem sie 3 x jeweils 10 Min. in Xylol und abschließend in absoluten Isopropanol inkubiert wurden. Mit einer 30-minütigen Inkubation der Schnitte in Methanol mit 0,15 % H₂O₂ wurden mögliche, endogen im Gewebeschnitt vorhandene Peroxidasen inaktiviert. Die Rehydrierung der Schnitte erfolgte in einer Reihe absteigender Isopropanol-Konzentrationen (absoluter Isopropanol 10 Min., Isopropanol 96 %, 80 %, 70 % jeweils 5 Min.) und einer anschließenden Inkubation in ddH₂O für 2 x 5 Min.

Die Schnitte wurden daraufhin in Natrium-Citrat-Puffer für 15 Min. bei 92 – 95 °C inkubiert. Dieser Schritt dient der Antigendemaskierung (Antigen-Retrieval). Durch die Fixation der Gewebe mit Formaldehyd können Aminosäuren miteinander vernetzt werden, indem quervernetzende Hydroxymethylenbrücken entstehen. Somit können Antikörper-Bindungsstellen maskiert und nicht detektiert werden (Werner M. et al. 2000). Durch das Erhitzen der Schnitte kommt es zu einer Denaturierung der Antigene und Freilegung der Antikörper-Bindungsstellen.

Für die darauf folgende Absättigung freier, unspezifischer Bindungsstellen auf den Objektträgern wurden diese zunächst 30 Min. in PBS mit 5 % BSA und anschließend 5 Min. in PBS mit 1 % BSA inkubiert.

Daraufhin wurde die Blockade von endogen vorkommendem Avidin und Biotin durchgeführt, bei der die Schnitte 20 Min. mit einer 30 %-igen Avidin und anschließend 30 %-igen Biotin-Lösung (in PBS+ 1 % BSA) (Avidin-Biotin Blocking Kit) inkubiert wurden. Der primäre Maus-spezifische anti-CD3 Antikörper wurde in

einer 1:1000 Verdünnung (in PBS+1 % BSA) auf die Schnitte gegeben und 2 Std. bei 37 °C inkubiert. Nachdem die Schnitte in ddH₂O (3 x 5 Min.), PBS (10 Min.) und PBS mit 0,5 % BSA gewaschen wurden, folgte eine 45-minütige Inkubation mit dem biotinyliertem Sekundär-Antikörper (1:200 verdünnt in PBS mit 1 % BSA) bei 37 °C. Danach schlossen sich drei Waschschriffe an: ddH₂O (3 x 5 Min.), PBS (10 Min.) und PBS mit 0,5 % BSA (nur wenige Sekunden inkubieren).

Bei der Streptavidin-Biotin-Methode wird die starke Affinität von Streptavidin zu Biotin genutzt, um Komplexe aus enzymmarkierten Avidin-Biotin-Verbindungen mit dem biotinylierten Sekundär-AK zu bilden. Hierfür erfolgte eine 30-minütige Inkubation der Schnitte mit Streptavidin und biotinylierten Enzymen (1:50 verdünnt in PBS mit 1 % BSA) bei 37 °C.

Um die Signale der Färbung zu erhöhen wurde im Anschluss eine Tyramid-Signal-amplifikation (TSA) durchgeführt. Das Biotin-markierte Tyramid des Reagenz stellt eine phenolische Verbindung dar, welche durch die HRP aktiviert wird. Nach der Aktivierung wandelt es sich in ein kurzlebige, freies Radikal um, welches kovalente Bindungen mit Tyrosinresten anliegender Proteinen eingeht, die sich in unmittelbarer Nähe der HRP und infolgedessen des Primärantikörpers befinden. Durch die Biotin-Markierung kann das gebundene Tyramid anschließend durch die Streptavidin-Peroxidase-Komplexe detektiert werden.

Für die TSA-Reaktion wurden die Objektträger nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper gewaschen (3 x 5 Min. ddH₂O) und im TN-Puffer (3 x 5 Min.) aufgenommen. Tyramid 1:50 verdünnt in Amplifizierungspuffer wurde auf die Schnitte aufgetropft und 10 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger mit TN-Puffer (2 x 5 Min.), ddH₂O (3 x 5 Min.), PBS (10 Min.) und PBS mit 0,5 % BSA gewaschen. Der abschließende Detektionsschritt erfolgte durch eine erneute Inkubation mit AB-Komplex (30 Min. bei 37 °C). Nach dem Waschen der Objektträger (ddH₂O (3 x 5 Min.), PBS (10 Min.)) folgte die Färbung mit der DAB-Nickel-Färbelösung. Die Schnitte wurden in der Lösung 5 Min. vorinkubiert. Durch die Zugabe von 112 µl H₂O₂ wurde die Farbreaktion gestartet. Hierbei dient DAB als Elektronenlieferant der, am Sekundär-Antikörper gebundenen Meerrettich-peroxidase. Es generiert durch die Oxidation ein dunkelfarbiges, polymerisches Oxidationsprodukt. H₂O₂ katalysiert die Reaktion und wird zu H₂O reduziert. Die Sensitivität der Reaktion wird durch die Zugabe von Nickel erhöht (Adams J.C. 1981). Nach Ablauf von 8 Min. wurde die Reaktion durch ddH₂O gestoppt (3 x 5 Min.). Durch eine aufsteigende Alkoholreihe (5 Min. 70 %, 80 %, 96 %, 100 % Ethanol) wurden die Schnitte durchgewaschen.

abs. Isopropanol) wurden die Schnitte dehydriert, daraufhin dreimal 10 Min. in Xylol inkubiert, wonach sie abschließend mit Depex und Deckgläschen eingedeckt wurden.

2.2.3.5 Quantifizierung der CD3-positiven T-Zellen im Tumor

Die quantitative Analyse der CD3-positiven T-Zellen im Bereich des Tumors, welche durch die Methode der Immunhistochemie detektiert wurden, erfolgte am Lichtmikroskop AX 70. Mit Hilfe der SPOT RT Slider Kamera wurden die ausgewählten Tumorbereiche digitalisiert. Die automatische Quantifizierung der CD3-positiven T-Zellen erfolgte mit dem MCID Image System, wobei zuerst die minimale Färbeintensität und Größe der immunhistochemisch positiven Signale definiert wurden. Signale, welche weniger als 10 Pixel aufwiesen, wurden als falsch positive Ergebnisse ausgeschlossen. Für eine statistische Aussagekraft wurden pro Tumor mindestens 10 Tumorbereiche digitalisiert. Die Daten wurden als Anzahl CD3-positiven T-Zellen pro mm² Tumorgewebe berechnet.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 Benötigte Materialien

Geräte und Verbrauchsmaterial:

Experion™ Automated	
Electrophoresis System:	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Experion™ Automated Electrophoresis Station	
Experion™ priming Station	
Experion™ Vortex Station	
Nanodrop ND-2000	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Precellys-Homogenator	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Thermocycler:	
ABI PRISM 7900HT System	Applied Biosystems (Darmstadt)
Gene Amp PCR System 9700	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Peltiert Thermal Cycler PTC-200	MJ Research (Watertown, USA)
GelDoc100	BIO-RAD (München bzw. Hercules, USA)
Gelschlitten	Kodak / Integra Biosciences (Fernwald)
Pufferkammern	Kodak / Integra Biosciences (Fernwald)
Spannungsquellen	BIO-RAD (München bzw. Hercules, USA)
Thermodrucker Video Copy Processor	Mitsubishi Electric (Tokio, Japan)

Chemikalien, Puffer und Verbrauchsmaterial:

Bromphenolblau	SERVA Feinbiochemica Gmbh Heidelberg
DNase	Qiagen GmbH (Hilden)
Ethidiumbromid	Merck KGaA (Darmstadt)
Experion RNA Analysis Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
KAPA 2G Fast Ready Mix	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
NucleoSpin-Geextraktions-Kit	Macherey&Nagel GmbH & Co. KG (Düren)
Precellys Keramik-Kit	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Power SybrGreen PCR Master Mix	Applied Biosystems (Darmstadt)
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
<i>RT</i> ² Profiler PCR Array;	
PANZ-052ZA-24 for rabbit	SABiosciences (Hilden)
<i>RT</i> ² first strand Kit	SABiosciences (Hilden)
<i>RT</i> ² SYBR Green qPCR Master Mix	SABiosciences (Hilden)
First Strand cDNA-Synthesis Kit	Roche (Basel, Schweiz)
TAE (Tris-Acetat-EDTA):	40mM Tris-Base; 2mM EDTA

2.2.4.2 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion aus Tumorgewebe erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen).

Das Kit enthält neben den RNeasy Mini Spin Columns folgende Lösungen:

- *Buffer RLT*
- *Buffer RW1*
- *Buffer RPE*
- *RNase-free Water*

Bei dieser Methode wird eine Silica-basierte Membran genutzt, welche einen Anionentauscher bildet, der in Gegenwart hoher Salz-Konzentrationen, die in dem Gewebehomogenat vorliegende RNA absorbiert.

Zunächst wurde das Tumorgewebe, das in RNA-Later aufbewahrt wurde, steril mit einer Klinge auf Eis zerkleinert, damit eine möglichst homogene Masse des Tumors entstand. Anschließend wurden ca. 30 mg des Tumorphomogenats in ein Precellys-Röhrchen überführt und mit 200 µl Lysepuffer (*RLT Buffer*), welcher mit β-Mercaptoethanol versetzt war, gemischt. Der *RLT Buffer* beinhaltet eine hohe Konzentration von Guanidinthiocyanat, welches die Bindung der RNA an die Silica-Membran fördert, RNasen inaktiviert, Zellen lysiert und Proteine denaturiert.

Das Gewebe wurde im Precellys-Homogenator bei 6000 rpm 20 Sek. homogenisiert. Danach wurden weitere 400 µl *RLT Buffer* zugefügt, durchmischt und in ein 1,5 ml *Collection-Tube* überführt. Daraufhin wurden 3 Min. bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in ein frisches *Collection-Tube* über-

führt. Mit der Zugabe des gleichen Volumens Ethanol (70 %) wurde die RNA ausgefällt und gleichzeitig geeignete Bindungseigenschaften der RNA an die Silica-Membran der RNeasy Mini spin Säule erreicht. Die Lösung wurde in ein RNeasy mini spin column gegeben und 15 Sek. bei ≥ 8000 xg zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule durch folgende Waschschriffe von Kontaminanten (z.B. Polysaccharide, DNA, Proteine) befreit:

Die Säule wurde mit 350 μ l *RW1-Buffer* gewaschen. Daraufhin wurde ein DNase Verdau durchgeführt, um die noch vorhandene genomische DNA enzymatisch abzubauen. Hierfür wurde die DNase, verdünnt in einem Puffer, auf die Säule gegeben und 15 Min. inkubiert. Dann wurde die Säule wiederum mit 350 μ l *RW1-Buffer* gewaschen, indem bei 8000 xg 15 Sek. zentrifugiert wurde. Der Durchfluss wurde verworfen und die Prozedur nochmals wiederholt. Anschließend wurde die Säule mit 500 μ l *RPE-Buffer* gewaschen, indem sie 15 Sek. bei 8000 xg zentrifugiert wurde. Um die Reste der Puffer zu entfernen wurde die Säule 1 Min. zentrifugiert. Die RNA wurde abschließend mit RNase freiem Wasser von der Säule eluiert und nach der Konzentrationsmessung durch den Nanodrop bei -70 °C gelagert.

2.2.4.3 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Mit Hilfe des Nanodrops, einem Spektrophotometer wurden Konzentrationen von RNA und Plasmid-DNA bestimmt. Bei dieser Messung werden Nukleinsäuren einem UV-Licht ausgesetzt, welches sie aufgrund ihrer aromatischen Ringe absorbieren. Das Photometer misst diese Absorption und kann so auf die Konzentration rückschließen. Bei der Messung wurde zunächst 1 μ l ddH₂O als Blindwert gemessen. Darauf folgten die Messungen der verschiedenen Proben ebenfalls in Volumina von 1 μ l.

Um die Reinheit von RNA und DNA zu bestimmen wurde der A260/A280 Quotient verwendet, welcher bei reiner RNA 2,0 und reiner DNA 1,8 beträgt. Ein geringerer Quotient ist ein Hinweis auf Verunreinigungen mit Proteinen, Phenolen oder anderen Kontaminationen, welche bei 280 nm absorbieren.

Ein weiterer Quotient, der auf die Reinheit von Nukleinsäuren hinweist ist der 260/230 Quotient, welcher im Rahmen zwischen 1,8 und 2,2 liegen sollte.

2.2.4.4 Bestimmung der RNA-Qualität

Die Qualität der gewonnen RNA wurde mit dem automatischen Gelelektrophorese-System Experion von Bio-Rad bestimmt. Hierbei wird durch die Kapillarelektro-

phorese von bis zu 11 Proben ein virtuelles Gel erstellt und mit Hilfe des 28S/18S Verhältnisses die RNA-Qualität bestimmt. Diese Methode beruht auf der Annahme, dass die Qualität der ribosomalen RNA (rRNA) die der mRNA widerspiegelt. Liegt eine intakte RNA vor, sind im Gel zwei voneinander getrennte Banden, die 28S- und 18S-Bande rRNA zu sehen. Ein 2:1-Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der 28S- und 18S-rRNA-Bande ist darüber hinaus ein Zeichen dafür, dass die mRNA nicht abgebaut ist.

Das Experion RNA StdSens Analysis Kit besteht aus folgenden Materialien und Reagenzien:

- *Experion™ Automated Electrophoresis Station*
- *Experion™ priming Station*
- *Experion™ Vortex Station*
- *RNA StdSens* (Chips für die RNA-Auftrennung)
- *Cleaning chip* (Chip für die Elektronenreinigung)
- *Experion electrode cleaner*
- *RNA gel* (Polymer-Matrix)
- *RNA StdSens stain* (Fluoreszenzfarbstoff)
- *RNA StdSens loading buffer* (Puffer für die Probenaufbereitung)
- *RNA ladder* (Standard, welcher 8 RNA Fragmente von 200 – 6.000 Nukleotide beinhaltet)
- *Spin filters* (Für die Filterung der Reagenzien)

Zu Beginn der RNA-Analyse wurden die Elektroden der *Automated Electrophoresis Station* mit Hilfe des *Cleaning chips* und dem *Experion electrode cleaner* entsprechend dem Handbuch gereinigt, um Kontaminationen auszuschließen. Anschließend wurden die Reagenzien vorbereitet, indem das *Polyacrylamid-Gel* durch einen *Spin Filter* zentrifugiert (10 Min., 1500 x g) wurde (G-Lösung) und 65 µl dieses filtrierte Gels mit 11 µl *RNA StdSens stain* gemischt wurde (GS-Lösung). Des Weiteren mussten 2 µl RNA (5 ng/µl bis 500 ng/µl), sowie 1,3 µl *RNA ladder* 2 Min. bei 70 °C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt werden. Nach dem „Primen“ des Chips in der *priming Station* mit 9 µl GS-Lösung wurden die Wells mit Puffer (5 µl G- bzw. GS-Lösung), RNA- und Lader (jeweils 1 µl) beladen. Darauf folgten das Vortexen in der eigens für den Chip konstruierten *Vortex Station* und die Messung in der *Automated Electrophoresis Station*. Als Voraussetzungen für die RNA-Proben zur weiteren Verwendung war, dass der ermittelte Qualitäts-Index (RQI), einen Wert von 7-10 betragen musste.

2.2.4.5 Reverse Transkription

Für die Umschreibung der RNA in komplementäre DNA (cDNA = complementary DNA) wurde das First Strand cDNA-Synthesis Kit verwendet.

Das Kit beinhaltet folgende Reagenzien:

- *Transcriptor Reverse Transcriptase* 20 U/μl
- *Transcriptor RT Reaction Buffer*, 5x concentrated: 250 mM Tris/HCL, 150 mM KCl, 40 mM MgCl₂
- *Protector RNase Inhibitor* 40 U/μl
- *dNTP Mix* 10 mM
- *Anchored Oligo (dT)₁₈ Primer* 50 μM
- *Random Hexamer Primer* 600 μM
- *Water, PCR Grade*

Zur reversen Transkription wird die Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, und Oligonukleotid-Primer benötigt. Hierbei handelt es sich einerseits um „*random hexamer*“-Primer, welche aus sechs zufällig zusammengesetzten Nukleotiden bestehen und die gesamte RNA (somit neben messenger-RNA (mRNA) auch Transfer-RNA (tRNA) und ribosomale RNA (rRNA)) hybridisieren können. Andererseits handelt es sich um Oligo(dT)-Primer, bestehend aus 16-18 Desoxythymidinen, die an das Poly-A Enden der mRNA-Sequenz binden.

Zur cDNA-Synthese wurden zunächst 0,5 μl „*random hexamer*“-Primer, 0,5 μl Oligo(dT)-Primer, sowie 1 μg Gesamt-RNA addiert und mit ddH₂O auf ein Volumen von 13 μl gebracht. Anschließend folgte eine Inkubation im Thermocycler von 10 Min. bei 65 °C, was eine Anlagerung der Primer an die komplementären DNA-Bereiche bewirkt. Dem Gemisch wurden auf Eis 4 μl *Transcriptor RT Reaction Buffer*, 0,5 μl *Protector RNase Inhibitor*, 2 μl *dNTP Mix* und 0,5 μl *Transcriptor Reverse Transcriptase* hinzugefügt. Danach folgte eine 1-stündige Inkubation bei 50 °C, 10 Min. bei 95 °C und abschließend eine Kühlung bei 4 °C.

2.2.4.6 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) stellt eine Methode zur selektiven Amplifikation von genomischer DNA oder cDNA dar, bei der eine thermostabile DNA Polymerase I aus einem DNA Einzelstrang einen Doppelstrang synthetisiert, indem Desoxynukleosidtriphosphate (dGTP, dTTP, dCTP, dATP) anhand des komplementären Stranges aneinandergesetzt und miteinander verknüpft werden. Für den Start der Polymerasekettenreaktion benötigt die Polymerase eine Hydroxylgruppe. Diese wird durch Primer, kurzen doppelsträngigen DNA-Stücken (18-30 Basen) mit ihrem 3'OH-Ende zur Verfügung gestellt. Das verwendete Primerpaar besteht aus einem *forward* und einem *reverse* Primer, welches die zu amplifizierende DNA Sequenz am 3' sowie am 5' Ende der DNA eingrenzt. Beim PCR-Prozess sind neben der cDNA, den Primern, der DNA-Polymerase und den Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP), eine Pufferlösung, sowie Mg²⁺-Ionen als Cofaktor für die DNA-Polymerase nötig.

Für die folgenden Experimente wurde der KAPA 2G Fast Ready Mix verwendet, welcher eine KAPA2G™ Fast DNA Polymerase beinhaltet. Diese hat, wie die natürlich vorkommende Taq-Polymerase (*Thermus aquaticus*), eine 5' - 3' Polymerase und 5' - 3' Exonuclease-Aktivität. Die PCR Produkte besitzen abschließend einen *Poly-Desoxyadenosin-Schwanz* am 3' Ende.

Die exponentielle Amplifikation der Zielsequenz wird durch thermische Zyklen im Thermocycler hervorgerufen. Zunächst wird bei 95 °C der DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge denaturiert. Anschließend folgt die Primer-spezifische Annealingtemperatur, bei der die Primer an die komplementäre DNA-Sequenz hybridisieren. Bei einer Temperatur von 72 °C wird das Wirkungsoptimum der Taq - Polymerase erreicht und die Elongation des Komplementärstranges in 5'-3'-Richtung hervorgerufen. Die Zielsequenz wird dabei exponentiell amplifiziert.

Die PCR diente in dieser Arbeit der Überprüfung der Expression verschiedener Gene in bestimmten Geweben, der Bestimmung der optimalen Primerkonzentration für die qPCR sowie der Generation von DNA-Matrizen für spezifische Ribosonden.

Ein PCR-Ansatz bestand aus folgenden Agenzien:

Reagenz	Menge
cDNA	2 µl
2x KAPA Mix	12,5 µl
Primer (forward/reverse)	je 1,5 µl (10mM)
ddH ₂ O	ad 20 µl

Ein Amplifikationszyklus beinhaltete die folgenden Schritte:

	Temperatur	Zeit	
Aktivierung der Taq-Polymerase	95 °C	2 Min.	
Amplifikationszyklus	95 °C	10 Sek.	} 25 - 40 Zyklen
	Primerspezifisch	15 Sek.	
	72°C	10 Sek.	
	72°C	8 Min.	
	4°C	∞	

2.2.4.7 Agarose Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese können Moleküle unter Einfluss eines elektrischen Felds durch ein Agarosegel voneinander getrennt werden. Dadurch können Nukleinsäurefragmente, welche aufgrund ihrer Phosphatgruppen eine negative Ladung aufweisen, nach ihrer Größe im Netz aus Agarose-Polymeren aufgetrennt werden. Die Fragmentgröße kann durch den Vergleich mit einer DNA-Leiter, einem Fragmentgemisch mit bekannten logarithmisch voneinander getrennten Fragmentgrößen, bestimmt werden.

Die Konzentration der Agarose wurde in Abhängigkeit von der zu erwartenden Fragmentgröße des amplifizierten Templates bestimmt. Bei einer Länge von 80 bis 250 bp, die bei qPCR-Analysen üblich sind, wurde ein 2 %-iges Agarosegel hergestellt. Betrug die Länge der cDNA-Fragmente um 1000 bp, wurde ein 1 %-iges Gel verwendet. Für die Visualisierung der DNA-Fragmente wurde der TAE-Puffer, in dem die Agarose durch Erhitzen gelöst war, mit Ethidiumbromid (0,5 µg/µl) versetzt. Das Gel wurde in eine Gelkammer gefüllt und nach dem Erstarren in die Gelelektrophorese-Apparatur mit Laufpuffer (TAE-Puffer) gegeben. Die Kämme wurden entfernt und die daraus resultierenden Geltaschen mit 1 kb DNA-Leiter sowie den einzelnen PCR-Proben beladen. Mit einer Spannung von ca. 10V/cm² Gelgröße wurden die Proben aufgetrennt. Abschließend konnten die DNA-Banden unter UV-Licht visualisiert werden. Ethidiumbromid interkaliert in die Nukleinsäuren, verändert dabei sein Absorptionsspektrum und emittiert nach Anregung mit UV-Licht im orange-roten Bereich (590nm).

2.2.4.8 Gelextraktion

Durch die elektrophoretische Auftrennung wurde das amplifizierte DNA-Fragment in einer Bande separiert und konnte mit Hilfe eines Skalpells unter dem UV-Licht herausgeschnitten werden. Zur Extraktion der DNA aus dem Gel wurde das NucleoSpin-Gelextraktions-Kit verwendet.

Das Kit enthält folgende Lösungen und Materialien:

- *Binding Buffer NT1*
- *Wash Buffer NT3*
- *Elution Buffer NE*
- *NucleoSpin® Gel + PCR Clean-up Columns*
- *Collection Tubes*

Zur Extraktion wurde das herausgeschnittene Agarosegel mit *NT1 Binding Buffer* versetzt (200 µl/ 100 mg Gel) und 5 - 10 Min. bei 50 °C gelöst. Danach wurde diese Lösung in ein *NucleoSpin® Gel Columns* gegeben, zentrifugiert (30 Sek., 11.000 xg) und der Durchfluss entfernt. Mit 700 µl *Wash Buffer NT3* wurde die Säule gewaschen (30 Sek., 11.000 xg) und anschließend durch Zentrifugieren (1 Min., 11.000 xg) vom Puffer befreit und getrocknet. Abschließend folgte die Freisetzung der DNA durch die Inkubation mit 15 - 30 µl *Elution Buffer NE* (1 Min.) und einer Zentrifugation bei 11.000 xg für 1 Min.

Nach der Extraktion wurde die Konzentration der aufgereinigten cDNA mit Hilfe des Nanodrops photometrisch bestimmt und das Gelextrakt bei -20 °C gelagert.

2.2.4.9 Quantitative PCR (qPCR)

2.2.4.9.1 Primerdesign

Zum Designen geeigneter Primerpaare wurde zunächst aus der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) die mRNA des jeweiligen Zielproteins des Kaninchens (*Oryctolagus cuniculus*) recherchiert. Für die jeweilige mRNA Sequenz wurde anschließend mittels Primer-BLAST ein geeignetes Primerpaar gesucht. Hierbei wurden folgende Kriterien für die Primer bestimmt:

- minimale/maximale Basenpaaranzahl (18 - 25 bp)
- Sequenzlänge des Amplikons (80 bis 250 bp)
- Annealingtemperatur (58 - 64 °C; Optimal 60 °C)
- Bevorzugung von Sequenzen, welche Exon-Exon-Bindungen überbrücken
- Guanin und Cytosin (GC)-Gehalt von 40 - 60 %
- Hohe Spezifität der Primer zur gewählten mRNA und geringe Homologie mit anderen Sequenzbereichen zur Vermeidung von Fehlhybridisierungen
- Möglichst geringe Komplementarität innerhalb des Primers selbst und zu dem anderen Primer zur Umgehung der Synthese von Primerdimeren

Die anschließende Synthese der Oligonukleotide wurde durch die Firma Invitrogen GmbH (Darmstadt) durchgeführt.

2.2.4.9.2 Bestimmung optimaler Primer-Konzentrationen

Zur Bestimmung von geeigneten Primer-Konzentrationen wurde eine PCR (siehe 2.2.4.6) mit verschiedenen Ansätzen durchgeführt, in denen die Konzentrationen des *forward*- und *reverse*-Primer zwischen 50 und 900 nM variierten (Tab. 2.1). Als Templat dienten hierbei 2 µl cDNA, die aus isolierter RNA des VX2-Tumorgewebes synthetisiert wurden.

Tab. 2.1: Ermittlung optimaler Primer-Konzentrationen

Primerkonzentration		forward Primer [nM]		
		50	300	900
reverse Primer [nM]	50	50/50	50/300	50/900
	300	300/50	300/300	300/900
	900	900/50	900/300	900/900

Die Annealing Temperatur der Primer betrug 60 °C; es wurden 40 Amplifikationszyklen gefahren. Nach Ablauf der PCR wurde eine Gelelektrophorese (siehe 2.2.4.7) durchgeführt und die Kombination der Primer-Konzentrationen gewählt, bei der die

cDNA-Bande mit der höchsten DNA-Konzentration im Agarosegel zu sehen war, ohne dass Primer-Dimere sichtbar vorlagen.

2.2.4.9.3 Oligonukleotid-Primerpaare für die qPCR

Tab. 2.2: Oligonukleotid-Primerpaare für die qPCR

	Orientierung	Start-Stop	GenBank Nr.	eingesetzte Konzentration	Sequenz
ErbB1	<i>forward</i>	93-109	XM_002713867.1	300 nM	5' GGCCTGACAGCTACGAGG 3'
	<i>reverse</i>	194-176		300 nM	5' GTGGCATTATGGACAACG 3'
ErbB2	<i>forward</i>	888-911	XM_002719343.1	300 nM	5' GACCACCTGTCCCTACAACCTACCT 3'
	<i>reverse</i>	1011-993		900 nM	5' GGGCTTGCTGCATTCTCA 3'
ErbB3	<i>forward</i>	1241-1259	XM_002711067.1	1000 nM	5' TTTCCAACCTCACGACCAT 3'
	<i>reverse</i>	1368-1349		1000 nM	5' GATACGCCAGCACTAATCT 3'
ErbB4	<i>forward</i>	759-777	XM_002712564.1	900 nM	5' CAATGCGAAGTACACCTAT 3'
	<i>reverse</i>	938-920		900 nM	5' GTGCCAATACCATCACAAG 3'
ShopeE5	<i>forward</i>	96-115	NC_001541.1	300 nM	5' AAAGGTGTCATGGTTGCACG 3'
	<i>reverse</i>	290-271		300 nM	5' ACCTCCGGCACTACTGATTC 3'
GAPDH	<i>forward</i>	503-522	NM_001082253.1	300 nM	5' GATTGTCAGCAACGCATCCT 3'
	<i>reverse</i>	695-676		300 nM	5' GGCAGGGATGATGTTCTGGG 3'

Zur Bestimmung der Expression relevanter Gene innerhalb des Tumorgewebes durch die qPCR wurden die aufgelisteten Oligonukleotid-Primerpaare ausgewählt (Tab. 2.2). Die Überprüfung der Sequenzspezifität erfolgte mittels Sequenzierung durch die Firma SeqLab (*Sequence Laboratories Göttingen GmbH*) und Sequenzabgleich durch die *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) Datenbank (Abb. 2.6).

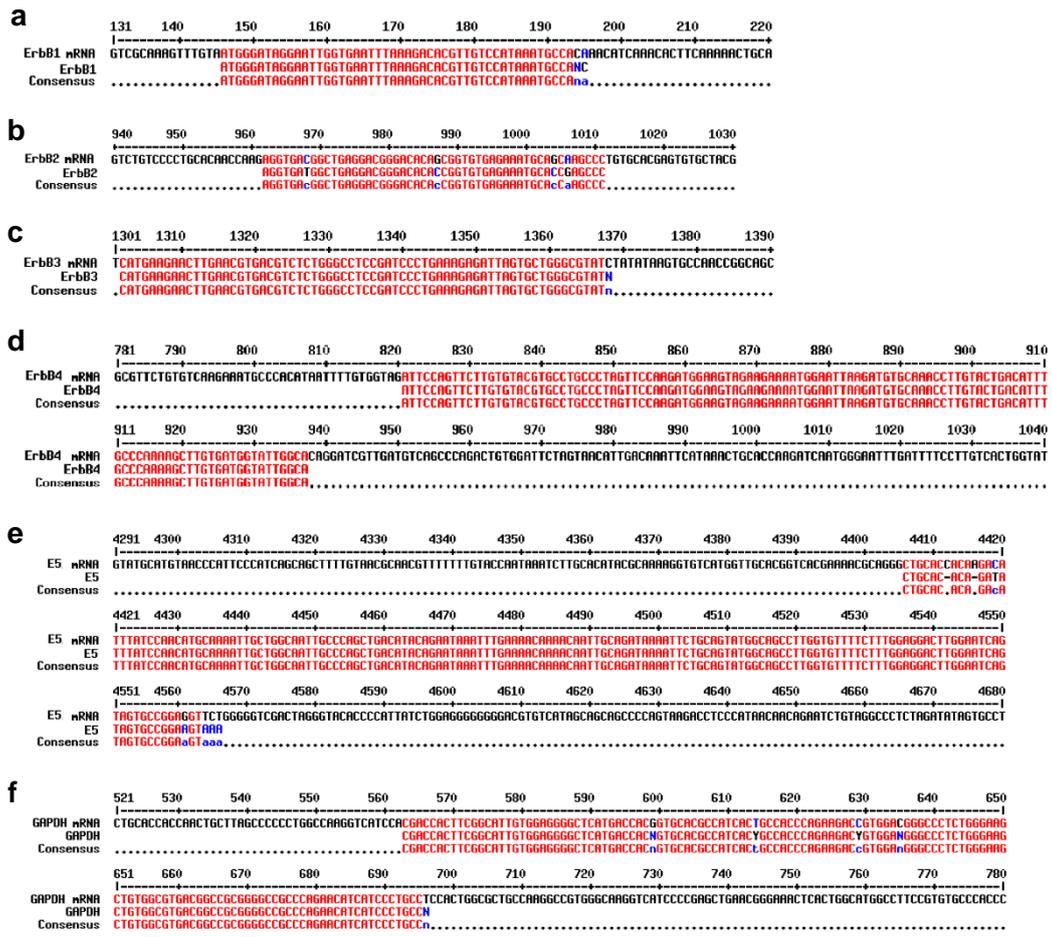


Abb. 2.6: Sequenzabgleich des PCR-Amplikons

Die obere Sequenz zeigt die *NCBI Reference Sequence*, mit der die sequenzierten Template (a) ErbB1, (b) ErbB2, (c) ErbB3, (d) ErbB4, (e) ShopeE5 und (f) GAPDH verglichen wurden. Für die Sequenzierung wurden die Gen-spezifischen *forward*-Primer verwendet. Als Programm diente Multalin von Florence Corpet (Corpet F. 1988).

2.2.4.9.4 Bestimmung der Amplifikationseffizienz

Zur Bestimmung der Amplifikationseffizienz der Oligonukleotid-Primerpaare wurde die betreffende DNA mittels einer Gelextraktion (siehe 2.2.4.8) aus dem Agarosegel isoliert, die Konzentration bestimmt (siehe 2.2.4.3) und über das Molekulargewicht die Stückzahl des Amplikons pro μl berechnet (angewendete Formel: $n/\mu\text{l} = (\mu\text{g}/\mu\text{l})/1.66 \times 10^{-18} \mu\text{g}$). Die Ausgangslösung wurde anschließend auf 5×10^7 Moleküle Amplikon/ μl eingestellt und zwei Konzentrationsreihen in 10er Schritten bis 5 Moleküle Amplikon/ μl hergestellt. Um nicht-spezifische Bindungen der dsDNA an die Tubes zu verhindern wurde die Amplikonlösung mit *E. coli* tRNA (100 ng/ μl) verdünnt. Die zwei Verdünnungsreihen wurden anschließend, einschließlich einer Kontrolle (ddH₂O) in einem qPCR-Lauf (siehe 2.2.4.9.5) gemessen.

Durch Herstellung der Verdünnungsreihe war einerseits, durch Bildung einer Standardkurve die Effizienz der Primer messbar:

$$E = 10^{-1/\text{Steigung} - 1}$$

Die Effizienz liegt im bestmöglichen Fall bei 1,0. Bei einer Effizienz von 1,0 wird die Anzahl des Templates in jeden Amplifizierungszyklus verdoppelt.

Andererseits konnte eine absolute Quantifizierung der Gene durchgeführt werden, indem die Ct-Werte der jeweiligen Proben anhand der Standardkurve in absolute Mengen der cDNA-Moleküle umgerechnet werden konnten.

Mit Hilfe der folgenden Geradengleichung wurde die Anzahl der cDNA-Moleküle berechnet:

$$y = \text{Steigung} \cdot x + t$$

Tab. 2.3: Bewertungsparameter der Oligonukleotid-Primerpaare

Auflistung der ausgewählten Oligonukleotid-Primerpaare mit der jeweiligen Effizienz, der Geradengleichung der Standardkurve sowie dem Determinationskoeffizient.

	Effizienz	Geradengleichung	Determinationskoeffizient
ErbB1	E= 0,99	y = -3,354 x + 40,444	R ² = 0,998
ErbB2	E= 0,99	y= -3,372 x + 41,381	R ² = 0,999
ErbB3	E=1,00	y= -3,222 x + 39,292	R ² = 0,999
ErB4	E= 0,97	y= -3,395 x + 41,722	R ² = 0,999
Shope E5	E= 0,94	y= -3,472 x + 43,879	R ² = 0,998
GAPDH	E= 0,96	y= -3,422 x + 39,185	R ² = 0,995

Der Determinationskoeffizient R² stellt den linearen Korrelationsfaktor zwischen den CT-Werten (y) und dem dekadischen Logarithmus der cDNA-Anzahl dar (x). R² liegt zwischen 0 (kein linearer Zusammenhang) und 1 (perfekter linearer Zusammenhang).

2.2.4.9.5 qPCR

Zur Validierung ausgewählter Kandidatengene in Tumoren von O₃/O₂-PP- bzw. Sham-behandelten Tieren wurde die Methode der qPCR durchgeführt. Bei dieser Methode wird - entsprechend zu der PCR (siehe 2.2.4.6) - spezifische DNA-Stränge durch sich wiederholende thermische Zyklen amplifiziert. Allerdings kann hierbei die Menge der amplifizierten DNA zusätzlich quantifiziert werden. Die Quantifizierung erfolgt dabei mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes (hier: SYBR Green), welcher in die

doppelsträngige DNA interkaliert, wodurch die Fluoreszenz dieses Farbstoffes ansteigt. Nach jedem Zyklus wird die Fluoreszenzintensität gemessen. Die DNA-Menge wird anhand des Ct-Wertes (*cycle threshold*) bestimmt. Dieser Wert beschreibt den Schwellenwert zum Beginn des exponentiellen Anstiegs der Fluoreszenz. Durch den Vergleich der Ct-Werte verschiedener Proben untereinander können Unterschiede in der vorliegenden Menge an DNA für ein bestimmtes Gen - abhängig von den verwendeten Primern (Tab. 2.3) - berechnet werden.

Die qPCR wurde in 96-Well-Platten im ABI 7900HT gemessen. Die Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt. Daneben wurde eine Nicht-Templat-Kontrolle mit ddH₂O analysiert, um mögliche Verunreinigungen oder die Bildung von Primer-Dimeren erkennen zu können.

Jede Reaktion bestand aus folgenden Komponenten:

Reagenz	Menge (µl)
Power SybrGreen 2xMix	10 µl
forward primer	Spezifische Konzentration
reverse primer	Spezifische Konzentration
cDNA	2 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

Das qPCR-Protokoll beinhaltete die folgenden Schritte:

	Temperatur	Zeit	
Aktivierung der Taq-Polymerase	95 °C	10 Min.	
Amplifikationszyklus	95 °C	15 Sek.	} 40 Zyklen
	60 °C	60 Sek.	
Dissoziationskurve	95 °C	15 Sek.	
	60 °C	15 Sek.	
	95 °C	15 Sek.	

Die Dissoziationskurve dient der Ermittlung von Verunreinigungen mit genomischer DNA oder Primer-Dimeren. Hierbei wird die Temperatur von 60 °C auf 95 °C erhöht, wodurch der DNA-Doppelstrang zu zwei Einzelsträngen denaturiert, sobald der spezifische Schmelzpunkt des DNA-Moleküls erreicht wird. Dieser Schmelzpunkt ist unter anderem von dem GC-Gehalt der amplifizierten Sequenz abhängig. SYBR Green wird durch die Denaturierung freigesetzt und die Fluoreszenz nimmt abrupt ab. Liegen Primer-Dimere vor, ist ein vorzeitiger Peak zu erkennen, da diese einen geringeren Schmelzpunkt aufweisen.

Im Anschluss an den qPCR-Lauf wurde der optimale Schwellenwert (*threshold*) ermittelt und die *Baseline* zum Ausschluss von Hintergrundfluoreszenz definiert. Die Ct-Werte der Proben wurden zur absoluten Quantifizierung der Gene genutzt.

2.2.4.9.6 Expressionsanalyse mittels RT^2 -Profiler

Der RT^2 Profiler PCR Array besteht aus einem kommerziellen Set zahlreicher Primerpaare für die qPCR, die bereits in den Wells einer 96-Well Platte vorliegen. Jedes Set an Primerpaaren dient der Analyse spezifischer funktioneller Gruppen von Genen. Der hier verwendete RT^2 Profiler PCR Array (PANZ-052ZA-24 for rabbit) diente der Analyse von Genen des angeborenen und adaptiven Immunsystem. Der Array beinhaltet 84 Gene, die bei der angeborenen und adaptiven Immunantwort verstärkt exprimiert werden sowie 5 konstant exprimierte Haushaltsgene (*housekeeping genes*), die der Normalisierung der Daten dienen. Des Weiteren verfügt der Array über eine DNA-Kontrolle zur Detektion von Kontaminationen mit genomischer DNA, 3 Reverse-Transkriptions-Kontrollen zur Messung der Effizienz der reversen Transkription sowie 3 positive PCR-Kontrollen, bestehend aus einer vordosierten artifiziellen DNA-Sequenz zur Messung der Effizienz der Taq-Polymerase.

Um die aus den Tumoren extrahierte RNA (siehe 2.2.4.2 - 2.2.4.4) im RT^2 Profiler PCR Array analysieren zu können wurde diese mit dem RT^2 first strand Kit in cDNA umgeschrieben. Das RT^2 first strand Kit beinhaltete folgende Reagenzien:

- Buffer GE
- 5x Buffer BC3
- Control P2
- RE3 Reverse Transcriptase Mix
- RNase-free water (H_2O)
- 2x RT^2 SYBR Green Mastermix

Um sicher zu gehen, dass die cDNA-Proben für den RT^2 Profiler PCR Array keine Kontaminationen genomischer DNA beinhalten, wurden zunächst mögliche genomische DNA-Kontaminanten eliminiert, indem die aufgereinigten RNA-Proben (1 μ g) mit 2 μ l *Genomic-DNA-Elimination (GE) Buffer* und H_2O in einem 10 μ l-Ansatz 5 Min. bei 42 °C im Thermocycler inkubiert wurde. Nach Abkühlen auf 4 °C wurde dieser Mix mit 10 μ l Reverse-Transkriptions-Mix versetzt, welcher aus 4 μ l 5x Buffer BC3, 1 μ l Control P2 und 2 μ l RE3 Reverse Transcriptase Mix zusammengesetzt war. Es folgte eine Inkubation bei 42 °C (15 Min.) und darauf bei 95 °C (5 Min.). Dem Reaktionsansatz wurden abschließend 91 μ l H_2O addiert. Zur Herstellung des RT^2 PCR-Mix wurden 102 μ l der cDNA Synthese Reaktion, 1248 μ l H_2O und 1350 μ l RT^2 SYBR Green Mastermix zusammengeführt. 25 μ l des Reaktion-Mixes wurden in jedes der 96 Wells des RT^2 Profiler PCR Arrays pipettiert und nach Zentrifugation (1 Min., 1000 xg) die qPCR gestartet. Der Amplifikationszyklus entsprach der generellen qPCR (siehe 2.2.4.9.5). Zur Auswertung wurden

alle 84 Ct-Werte mit den durchschnittlichen Ct-Werten der Haushaltsgene normalisiert und mittels SABioscience PCR Array Data Analysis ausgewertet.

2.2.5 Klonierung von cDNA-Fragmenten für die *in situ* Hybridisierung

2.2.5.1 Benötigte Materialien

Geräte und Verbrauchsmaterial:

Schüttelinkubator Ceromat H	B.Braun Biotech International (Melsungen)
Photometer Ultrospec 3000	Amersham Biosciences GmbH (Freiburg)
Nanodrop ND-2000	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)

Thermocycler:

Gene Amp PCR System 9700	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Peltiert Thermal Cycler PTC-200	MJ Research (Watertown, USA)

Bunsenbrenner Fireboy Plus	Integra Biosciences GmbH (Fernwald)
QIAprep Spin Miniprep Kits	Qiagen GmbH (Hilden)

Chemikalien, Lösungen und Puffer:

Ampicillin	Sigma-Aldrich GmbH (Seelze)
Bactotryptone	BD Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Bacto Hefe Extrakt	MoBio Laboratories (Carlsbad, USA)
Calciumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt)
Glucose	Sigma-Aldrich GmbH (Seelze)
Glycerin	Sigma-Aldrich GmbH (Seelze)
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Kaliumacetat	Merck KGaA (Darmstadt)
Kaliumchlorid (KCL)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Konz. HCl	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Manganchlorid	Applichem GmbH (Darmstadt)
Magnesiumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck KGaA (Darmstadt)
Natriumcitrat	Merck KGaA (Darmstadt)
NEB10 β E. coli-Bakterien	
3-(N-Morpholino)propanesulfonic Säure	Sigma-Aldrich GmbH (Seelze)
pGEM [®] -T Vector System I	Promega GmbH (Mannheim)
Rapid Ligation Puffer	Promega GmbH (Mannheim)
Rubidiumchlorid	Applichem GmbH (Darmstadt)
Tris-HCl	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
LB-Medium	1 % Bactotryptone (10 g/l), 0,5 % Bacto Hefe Extrakt (5 g/l), 10 % NaCl (10 g/l), H ₂ O ad 1l; pH 7,4, <i>autoklaviert</i> , Selektionszusatz 50 μ g/ml

	Ampicillin
LB-Agar	15 g Bacto-Agar / 1l LB-Medium (<i>autoklaviert</i>), Selektionszusatz: 50 µg/ml Ampicillin, 1 mM IPTG, 40 µl/ml X-Gal 60 °C <i>warmen = flüssigen LB-Agar steril in Petrischalen füllen, 2-3h bei 37°C trocknen, bei 4°C lagern</i>
SOC-Medium	2 % Bactotryptone, 0,5 % Bacto Hefe Extrakt, 10 mM NaCl, H ₂ O ad 950 ml; pH 7,0 <i>autoklaviert, kühl lagern</i> <i>vor Gebrauch hinzugeben:</i> 2,5 mM Kaliumchlorid, 10 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Magnesiumsulfat-Heptahydrat, 20 mM Glucose
TFB1 – Puffer	30 mM Kaliumacetat, 10 mM Calciumchlorid, 50 mM Manganchlorid, 100 mM Rubidiumchlorid, 15 % (v/v)Glycerin; pH- Wert 5,8
TFB2 – Puffer	10 mM 3-(N-Morpholino)propanesulfonic Säure (MOPS), 75 mM Calciumchlorid, 10 mM Rubidiumchlorid, 15 % (v/v) Glycerin; pH 6,5, <i>steril filtrieren. Lagerung max. 2 Wochen bei 4 °C</i>

2.2.5.2 Oligonukleotid-Primerpaare zur Klonierung von cDNA-Sonden

Geeignete Oligonukleotid-Primepaare für die Klonierung von cDNA-Sonden wurden, wie in 2.2.4.9.1 erläutert, recherchiert und designt (Tab. 2.4). Die Sequenzlänge des Amplikons sollte hierbei ca. 1000 bp betragen.

Tab. 2.4: Oligonukleotid-Primerpaare für die Klonierung von cDNA Sonden

	GenBank Nr.	Orientierung	Start-Stop	Sequenz	Produkt
ErbB1	XM_002713867.1	<i>forward</i>	528-547	5' CGGAGCCAACAAGACCGGGC 3'	988 bp
		<i>reverse</i>	1515-1496	5' TTGGAGGGAGCGCAGTCCCA 3'	
ErbB2	XM_002719343.1	<i>forward</i>	527-546	5' ACAACCAGCTGGCCCTCACG 3'	974 bp
		<i>reverse</i>	1500- 1481	5' TGGCTGATTGCCGCTGTGCA 3'	
ErbB3	XM_002711067.1	<i>forward</i>	539-558	5' ACAATGGCCGGAGCTGTCCC 3'	855 bp
		<i>reverse</i>	1393-1374	5' ACAGCTGCCGTTGGCACTT 3'	
ErbB4	XM_002712564.1	<i>forward</i>	469-489	5' AGCTCAGGATGTGGGCGTTGC 3'	1026 bp
		<i>reverse</i>	1494-1475	5' GCGGCATGACAGGCACTGGT 3'	

2.2.5.3 Synthese der cDNA-Matrize

Für die Synthese einer einsträngigen cDNA-Matrize wurde zunächst aus dem Zielgewebe RNA extrahiert (siehe 2.2.4.2), mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgewandelt (siehe 2.2.4.5) und mit den spezifisch designten Oligonukleotid-Primerpaaren (Tab. 2.4) eine PCR (siehe 2.2.4.6) durchgeführt. Das synthetisierte Templat wurde im Agarosegel aufgetrennt und aus dem Gel isoliert (siehe 2.2.4.8). Anschließend erfolgte eine Ligation des gereinigten cDNA-Fragments in den pGEM®T-Vektor.

2.2.5.4 Ligation des Inserts in einen bakteriellen Transkriptionsvektor

Als bakterieller Transkriptionsvektor zur Klonierung von PCR-Produkten in *E. coli* Bakterien diente der pGEM®-T Vektor. Dieser 3 kb große Klonierungsvektor entsteht aus einem pGEM®-5Zf(+) Vektor, welcher mit EcoRV geschnitten und mit

einem 3'-terminalen Thymidin-Überhang an den Insertionsstellen versehen wird. Das zu ligierende Insert, das durch die PCR generiert wurde, besitzt einen komplementären Adenosin-Überhang, der durch die Transferase-Aktivität der *Taq*-Polymerase gebildet wurde. Bei der eigentlichen Ligation wird mit Hilfe der Ligase der Thymidin-Überhang des Vektors mit dem komplementären Adenosin-Überhang des Inserts verknüpft und so das Insert in den pGEM®-T Vektor inseriert.

Der Ligationsansatz beinhaltete 5 µl 2x Rapid Ligation Puffer, welcher mit 1 µl pGEM-T-Vektor und 1 µl T4 DNA Ligase versetzt wurde. Das Insert wurde nach der folgenden Berechnung in einem 3:1-Verhältnis zum Vektor eingesetzt:

$$\text{Insert(ng)} = \frac{\text{Vektor (=50 ng)} \times \text{Insertlänge (kb)}}{\text{pGEM-Vektor (=3 kb)}} \times \text{molares Verhältnis Insert : Vektor}$$

Abschließend wurde der Ansatz mit ddH₂O auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt und für eine Stunde bei RT oder bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Um den so generierten Vektor-Insert Komplex zu vervielfältigen, wurde dieser in kompetente Bakterien transformiert. Die Synthese chemisch kompetenter Bakterien wird im Folgenden erläutert.

2.2.5.5 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Die Voraussetzung für die Transformation eines Inserts ist die Fähigkeit von Bakterien cDNA, welche frei im Medium vorliegt, aufnehmen zu können. Die Rubidiumchlorid-Methode ist eine chemisch basierte Möglichkeit diese Fähigkeit hervorzurufen, indem Chlorid-Ionen an die Zellmembran der Bakterien angelagert werden. Dadurch wird ihre negative Ladung reduziert und ihre Permeabilität erhöht (Chen I. and Dubnau D. 2004). Auf diese Weise verringern sich die abstoßenden Kräfte zwischen dem negativ geladenen Plasmid und der Zellmembran, so dass bei einem kurzen Hitzeschock bei 37 - 42 °C die Membran permeabilisiert wird und die Plasmide in die Zellen penetrieren.

Hierzu wurde eine NEB10ß Zellkultur (*E. coli*) in 2,5 ml LB-Medium angesetzt und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert (Übernachtkultur). Am darauffolgenden Tag wurden 250 ml LB-Medium mit 20 mM Magnesiumsulfat (MgSO₄) versetzt, mit der Übernachtkultur angeimpft und bei 180 rpm und 37 °C inkubiert. Die optische Dichte (OD) wurde durch eine photometrische Messung bei 600 nm alle 30 Min. überprüft, bis durch die Zellvermehrung eine OD von 0,4 bis 0,7 erreicht wurde. Anschließend wurden die Zellen 5 Min. bei 4000 rpm und 4 °C herunterzentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig mit 100 ml eiskaltem TFBI-Puffer resuspendiert, 5 - 10

Min. auf Eis gestellt und dann wiederholt 5 Min. bei 4000 rpm und 4 °C herunterzentrifugiert. Abschließend wurde dieses Pellet mit 10 ml eiskaltem TFB2-Puffer resuspendiert und daraufhin 15 - 20 Min. auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen in Volumina von 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zu max. 3 Monaten gelagert.

2.2.5.6 Transformation des Transkriptionsvektors in E. coli

Für die Transformation wurden 3 µl des pGEMT-Ligations-Ansatzes (siehe 2.2.5.4) in 200 µl chemisch kompetente Bakterien pipettiert und 15 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 2 Min. in einem 42 °C warmen Wasserbad inkubiert, um die Membranpermeabilität zu erhöhen und somit die Plasmid-Diffusion zu forcieren. Eine darauf folgende Inkubation von 2 Min. auf Eis diente dazu, die Zellmembran wieder zu verschließen. Für die Aktivierung der, in den Plasmiden vorhandenen Selektionsenzyme, wurden die Bakterien in 1 ml SOC-Medium in Kulturröhrchen überführt und 1 Std. bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Danach wurden 100 µl der transformierten Kultur auf LB/Ampicillin/IPTG/X-Gal-Platten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Die Anwesenheit des Ampicillins ist ein erster Selektionsschritt von E. coli Zellen, wobei nur E. coli Zellen auf dem Nährboden wachsen können, die eine Resistenz gegenüber Ampicillin aufweisen. Da das Ampicillin-Resistenzgen nur im pGEM®-T Vektor enthalten ist, können ausschließlich Bakterien Kolonien bilden, in welche das Plasmid erfolgreich transformiert werden konnte.

2.2.5.7 Klonierung von Vektor+Insert-positiven E. Coli Bakterien

Zur Identifikation von E. coli Kolonien, die den Vektor+Insert-Komplex besitzen, wurde die Methode des Blau-Weiß-Screenings durchgeführt. Diese Methode basiert auf der Anwesenheit eines *lacZ*-Gens im pGEM®-T, das für die β -Galaktosidase codiert. In dem *lacZ*-Gen ist eine multiple Klonierungsstelle integriert, welche von T7- und SP6-RNA-Polymerase-Promotoren flankiert wird und eine Vielzahl von Restriktionsschnittstellen besitzt. Wird ein Insert mit Hilfe der Ligase erfolgreich in die Klonierungsstelle des Vektors ligiert, wird das β -Galaktosidase-Gen unterbrochen und somit die Verstoffwechslung der Galaktose verhindert. Dadurch ist eine Selektion der E. coli Bakterien möglich, welche das Plasmid einschließlich des Inserts besitzen. Zum Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität in den einzelnen E. coli Kolonien dienen der Laktose-Metabolit IPTG und das β -Galaktosidase Substrat X-Gal, die sich in den LB/Ampicillin/IPTG/X-Gal-Platten befanden. IPTG triggert die

Synthese des LacZ Gens, das für die β -Galaktosidase kodiert und als Reportergen fungiert. X-Gal ist eine organische Verbindung aus Galaktose und 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole, welche nach der enzymatischen Abspaltung der Galaktose durch die β -Galaktosidase zu 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo - einem blauen Produkt - oxidiert. Durch das erfolgreiche Einfügen eines Inserts in die *Multiple Cloning Site* des Vektors wird die Synthese der β -Galaktosidase nicht mehr möglich. Damit ist die Spaltung von X-Gal nicht mehr möglich; eine Blau-Färbung dieser Kolonie bleibt aus. Diese weißen Klone enthalten somit das Plasmid mit integriertem Insert.

2.2.5.8 Analyse des Inserts im Plasmidvektor

Durch die Insert-Analyse wird einerseits untersucht, ob das zu ligierende Gen im Plasmid vollständig vorhanden ist und zusätzlich wird die Richtung, mit der das Genfragment in das Plasmid inseriert ist, herausgefunden.

Hierzu wurden zunächst die Bakterien lysiert, indem 5 μ l einer Übernacht-Kultur (siehe 2.2.5.6) in 20 μ l ddH₂O gegeben und 5 Min. gekocht wurden. Anschließend wurde die Lösung kurz auf Eis gestellt, 2 Min. abzentrifugiert und nach einer weiteren kurzen Inkubation auf Eis wurden 5 μ l des Überstands aufgenommen. Vom Überstand wurde 5 μ l in einer PCR (siehe 2.2.4.6) eingesetzt.

Für die Analyse wurden einerseits Oligonukleotid-Primerpaare verwendet, die spezifisch an die Sequenzen der vom Insert benachbarten RNA-Polymerase-Promotoren T7 und SP6 binden, andererseits die spezifischen Primer, die bei der Amplifikation des Inserts verwendet wurden (siehe 2.2.5.2). Durch die Gelelektrophorese (siehe 2.2.4.7) der Amplifikationsansätze konnten - je nach Bandenmuster - folgende Aussagen getroffen werden:

- Liegt eine Bande vor bei T7 und SP6 oder *forward* und *reverse*- Primer ist das Insert im Plasmid vorhanden.
- Liegt eine Bande vor bei T7 und *forward* oder SP6 und *reverse*- Primer stellt das Produkt aus einer Amplifikation mit T7-Primern die antisense-Sonde dar und mit SP6-Primern die sense-Sonde.
- Liegt eine Bande vor bei T7 und *reverse* oder SP6 und *forward*- Primer stellt das Produkt aus einer Amplifikation mit SP6-Primern die antisense-Sonde dar und mit T7-Primern die sense-Sonde.

2.2.5.9 Plasmidaufreinigung

Die Plasmidpräparation wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits durchgeführt, mit dem kleine Mengen an Plasmid (bis 25 μ g) isoliert werden können.

Das Kit beinhaltet folgende Puffer, Lösungen und Materialien:

- *Buffer P1* mit RNaseA versetzt (beinhaltet Ribonuklease)
- *Buffer P2*
- *Buffer N3* (beinhaltet Guanidin Hydrochlorid)
- *Buffer PB*
- *Buffer PE*
- *Buffer EB*
- *QIAprep Spin Columns*
- *Collection Tubes*

Weißer Bakterienklone wurden mit einer sterilen Öse gepickt und in Kulturröhrchen mit 6 ml LB-Medium und 50 µg/ml Ampicillin überführt. Die Bakterien wurden über Nacht (12-16 Std.) bei 37 °C und 250 rpm vermehrt. Anschließend wurde eine Insert-Analyse durchgeführt, welche das Vorhandensein des Inserts innerhalb des Plasmids sichert (siehe 2.2.5.8). Im Anschluss wurden die Bakterien 3 Min. bei 10.000 xg und RT herunterzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die anschließende Plasmid-DNA-Isolation wurde nach dem Handbuch des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen) durchgeführt. Bei diesem Vorgang wurde das Bakterienpellet mit RNase A enthaltendem *Buffer P1* (250 µl) resuspendiert, um RNA-Verunreinigungen zu beseitigen. Im Anschluss wurden die Bakterien durch alkalische Lyse im *Buffer P2* (250 µl) und *Buffer N3* (350 µl) lysiert und die frei werdende Plasmid-DNA durch Zentrifugation (10 Min., 13.000 rpm) im Überstand isoliert. Dieser wurde anschließend in das *QIAprep Spin Column* gegeben und die DNA in Gegenwart hoher Salzgehalte durch polare Wechselwirkungen mit der Matrix aus Kieselgel (Silicagel) absorbiert. Es folgten eine Zentrifugation (30-60 Sek.) und mehrere Waschgänge mit 0,5 ml *Buffer PB* und 0,75 ml *Buffer PE*, welche der Entfernung von verunreinigenden Proteinen dienten. Abschließend wurde die DNA von der Matrix durch Zugabe von 50 µl *Buffer EB* eluiert (1 Min., 13.000 rpm). Die Konzentration des Plasmids sowie die Kontamination des aufgereinigten Ansatzes mit Proteinen wurden photometrisch, mit dem Nanodrop, gemessen. Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert. Die verbleibenden Bakterienkulturen wurden 1:1 mit 100 % Glycerin, als Frostschutzmittel verdünnt und bei -80 °C gelagert. Zur Bestimmung der Genspezifität des Inserts wurde durch die Firma SeqLab (*Sequence Laboratories* Göttingen GmbH) eine Sequenzierung durchgeführt. (Abb. 2.7)

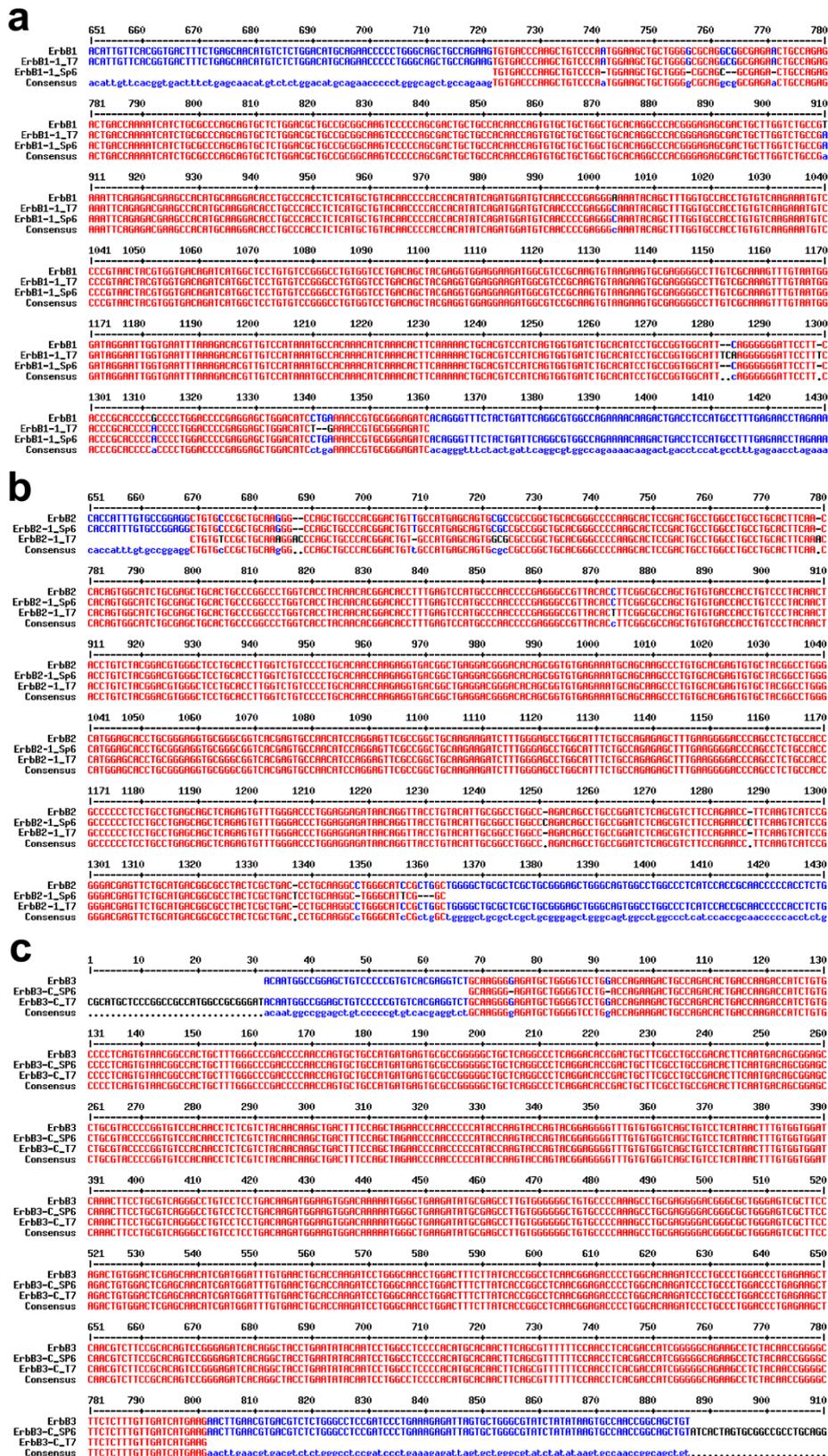


Abb. 2.7: Sequenzierung des Plasmid-Inserts

Die Sequenzierung der Kontrolle der Spezifität des Inserts. Die obere Sequenz zeigt die NCBI Reference Sequence mit der die sequenzierten Inserts (a) Erbb1; b) ErbB2 und c) ErbB3) verglichen wurden. SP6 und T7-

Primer waren die, bei der Sequenzierung eingesetzten Oligonukleotide. Als Programm diente Multalin von Florence Corpet (Corpet F. 1988).

2.2.6 *In situ* Hybridisierung

2.2.6.1 Benötigte Materialien

Geräte und Verbrauchsmaterial:

Hybridisierungsöfen 400 HY-E	Bachofer (Reutlingen)
Mikroskop AX70	Olympus (Hamburg bzw. Tokio, Japan)
SPOT Kamera	Diagnostics Instruments inc. (Seoul, Korea)
Vakuumentrifuge Speedvac	Heraeus (Hanau)
Micro Bio-Spin P30 Säulen	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)

Chemikalien, Lösungen und Puffer:

Denhardt-Lösung	Sigma-Aldrich GmbH (Seelze)
Dextransulfat	Sigma-Aldrich GmbH (Seelze)
Entwickler Developer d-19	Kodak/Integra BioSciences (Woburn, USA)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Fixierier Fixer	Kodak/Integra BioSciences (Woburn, USA)
Formamid	VWR International GmbH (Darmstadt)
Fotoemulsion NTB-2	Kodak/Integra BioSciences (Woburn, USA)
Konz. HCl	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumcitrat	Merck KGaA (Darmstadt)
Netzmittel Mirasol2000Antistatic	Tetenal Photowerk GmbH (Norderstedt)
RNase A	Roche (Basel, Schweiz)
RNase T1	Roche (Basel, Schweiz)
Sonicated Salmon Sperm DNA	Sigma-Aldrich GmbH (Seelze)
TEA (Triethanolamin)	Sigma-Aldrich GmbH (Seelze)
t-RNA	Roche (Basel, Schweiz)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Tris-HCl	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Triton-X100	Sigma-Aldrich GmbH (Seelze)
Natrium-Citrat-Puffer pH 6.0: dH ₂ O	54 ml 0,1 M Zitronensäure (C ₆ H ₈ O ₇), 246 ml 0,1 M Natriumcitrat, 2700 ml
Hybridisierungs-Puffer:	10 mM Tris-HCl (pH 7,7), 0,05 % (w/v) t-RNA, 1x Denhardt-Lösung, 100 mg/ml Sonicated Salmon Sperm DNA, 1 mM EDTA, 50 % (v/v) Formamid, 600 mM NaCl, 10 % (w/v) Dextransulfat
RNase-Puffer:	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 40 µg/ml RNase A, 2000 U RNaseT1
SSC (Stocklösung 20x):	3 mM NaCl, 1,6 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat; pH 6,3

TEA-Lösung: 6,65 ml TEA (Triethanolamin), 493 ml H₂O; 1,5 ml HCl ad pH 8,0

Triton x 0,4 % / PBS: 450 ml ddH₂O, 2 ml Triton-X100, 50 ml 10x PBS

2.2.6.2 Synthese radioaktiv markierter Sonden

Bei der Synthese markierter Sonden durch *in vitro*-Transkription (im vorliegenden Fall radioaktiv) wird durch eine DNA-abhängige RNA-Polymerase der DNA-Strang in einen komplementären RNA-Strang umgeschrieben. Dieser Vorgang erfolgt mit radioaktiv-markierten Nukleotiden, bei denen das Stickstoffmolekül des Purin-Rings des UTPs durch ein Isotop des Schwefels ersetzt wurde (³⁵S-UTP).

Für die ³⁵S-Markierung einer Ribonukleotidsonde wurden 0,5 µg DNA-Matrize (2,5 µl) (siehe 2.2.5.9) und 125 µCurie ³⁵S-UTP (7,5 µl) in einer Vakuumzentrifuge (*SpeedVac*) eingedampft. Anschließend wurde folgender Ansatz erstellt:

NTP-Mix ohne UTP (5mM)	0,5 µl
DTT (100mM)	0,5 µl
Transkriptionspuffer (10x)	0,5 µl
ddH ₂ O	0,25 µl
RNase-Inhibitor	0,25 µl
RNA-Polymerase	0,5 µl

Nach einer 90-minütigen Inkubation bei 37 °C erfolgte durch Zugabe von 0,5 µl RNase-freier-DNase der enzymatische Abbau der DNA, die als Matrize gedient hat (15 Min., 37 °C). Anschließend wurde der Ansatz mit ddH₂O auf 20 µl aufgefüllt.

Um die Fragmentgröße der synthetisierten cRNA auf eine maximale Länge zu reduzieren, wurde eine alkalische Hydrolyse durchgeführt, die sich zu Nutze macht, dass RNA-Fragmente im basischen Milieu in Teilfragmente zerfallen. Die, für die gewünschte Fragmentlänge erforderliche Hydrolysezeit kann anhand folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Hydrolysezeit t(Minuten): } t = \frac{(L_o - L_f)}{(k * L_o * L_f)}$$

L_o = Ausgangslänge DNA-Matrize [kb]

L_f = gewünschte Fragmentlänge [kb]

k = Konstante = 0,11

Die Hydrolyse wurde durch die Zugabe von 20 µl Na₂CO₃ (0,2 M; pH 10,2) zu dem 20 µl Ansatz, der die synthetisierten cRNA enthält, gestartet und bei 60 °C über den berechneten Zeitraum inkubiert. Die Reaktion wurde mit 2 µl 10 %-iger Essigsäure

gestoppt und 28 µl ddH₂O addiert. 1,4 µl des Ansatzes wurde zur nachfolgenden Kontrolle des Einbaus von radioaktiv markierten Nukleotiden in ein Szintillationsröhrchen gegeben (Volumen der Kontrolle). Anschließend erfolgte die Aufreinigung der Ribonukleotidsonden über Micro Bio-Spin P30 Säulen. Hierzu wurden zunächst die Säulen geschüttelt und durch Abzentrifugation des TRIS-Puffer (2 Min., 3,6 rpm) aktiviert. Der Transkriptionsansatz wurde auf die Säulen gegeben und bei 3,6 rpm 4 Min. zentrifugiert. Danach wurde wieder eine Kontrolle von 1,4 µl entnommen und das Volumen des Transkriptionsansatzes (Elutionsvolumen) bestimmt. Die Kontrollen wurden jeweils mit 5 µl Szintillationsflüssigkeit versetzt und die Aktivität im Szintillationsdetektor gemessen. Anschließend konnte der prozentuale Einbau der radioaktiv markierten Nukleotide in die synthetisierte RNA wie folgt berechnet werden:

$$\text{Einbau [\%]} = \frac{\text{dpm nach Aufreinigung} * \text{Elutionsvolumen [\mu l]} * 100}{(\text{dpm vor Aufreinigung} * \text{Elutionsvolumen [\mu l]})}$$

Für die Hybridisierung wurden 50.000 dpm/ pro 1 µl Hybridisierungspuffer verwendet. Das Volumen des benötigten Hybridisierungspuffers wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Volumen Hybridisierungspuffer [\mu l]} = \frac{\text{dpm nach Aufreinigung} * \text{Elutionsvolumen [\mu l]}}{\text{Soll} * \text{Volumen der Kontrolle}}$$

2.2.6.3 Entparaffinieren

Gewebe, welches in Paraffin eingebettet war, wurde zunächst in Xylol (3 x 10 Min.) und abschließend in absoluten Isopropanol (2 x 10 Min.) entparaffiniert. Die Rehydrierung der Schnitte erfolgte in einer Reihe absteigender Isopropanol-Konzentrationen (Isopropanol 96 %, 90 %, 80 %, 70 % jeweils 7 Min.) und einer anschließenden kurzen Inkubation in ddH₂O (1 Min.).

Die Schnitte wurden daraufhin 2 mal 10 Min. in PBS (10 mM, pH 7,4) gewaschen und in einem 0,01 M Natrium-Citrat-Puffer (pH 6,0) für 10 Min. bei 92 – 95 °C erhitzt. Abschließend wurden die Schnitte nochmals in PBS (10 mM, pH 7,4) gewaschen (2 x 10 Min.).

2.2.6.4 Prähybridisierung

Nach dem Entparaffinieren wurden die Schnitte 15 Min. luftgetrocknet. Danach folgte eine 60 minütige Inkubation in 4 % PFA/PBS. Nach dreimaligem Waschen (10 Min.) in PBS wurden die Schnitte 10 Min. in 0,4 % Triton-X 100 in PBS inkubiert

und gleich darauf nochmals 1 x 5 Min. gewaschen. Nach kurzem Dippen in RNase-freiem H₂O wurden die Objektträger in TEA-Puffer für 1 Min. inkubiert und anschließend 10 Min. mit 1,25 ml/500 ml Acetanhydrid versetzt. Danach wurden die Schnitte 10 Min. in PBS gewaschen, kurz in Wasser gedippt und darauf durch kurze Inkubation in 50 % und 70 % Ethanol entwässert. Die Schnitte wurden abschließend 20 Min. luftgetrocknet, worauf die Hybridisierung folgte oder eine Lagerung bei -20 °C.

2.2.6.5 Hybridisierung

Die radioaktiv-markierten Sonden in Hybridisierungspuffer (50 µl) wurden blasenfrei auf die Gewebeschnitte aufgetragen und mit einem Deckgläschen bedeckt. Anschließend wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer (50 % Formamid in PBS) über Nacht bei 60 °C inkubiert.

2.2.6.6 Posthybridisierung

Nach der Hybridisierung wurden die Objektträger in 2 x SSC gedippt, die Deckgläschen vorsichtig entfernt und die Objektträger mit den Gewebeschnitten in frisches 2 x SSC gestellt, 10 Min. bei RT gewaschen und anschließend 15 Min. in 1 x SSC inkubiert. Die Schnitte wurden daraufhin zunächst 30 Min. bei 37 °C und danach 30 Min. bei RT in RNase-Puffer gewaschen. Jeweils 15 Min. wurden die Objektträger in 1 x, 0,5 x und abschließend in 0,2 x SSC bei RT gewaschen. Darauf folgte eine 60-minütige Inkubation der Schnitte in 0,2 x SSC bei 60 °C. Danach wurden die Schnitte jeweils 15 Min. bei RT in 0,2 x SSC und dann in ddH₂O gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte 1 Min. bei RT zunächst in 50 %, dann in 70 % Ethanol gewaschen und luftgetrocknet.

2.2.6.7 Detektion der mRNA im Gewebeschnitt durch Röntgenfilm-Autoradiogramme

Die Anwesenheit der radioaktiven Sonde kann durch Exposition der Gewebeschnitte auf einem Röntgenfilm durch die hervorgerufene Schwärzung überprüft und grob im Gewebe (die Auflösung beträgt > 50 µm) lokalisiert werden. Hierzu wurde der Autoradiographiefilm auf die Gewebeschnitte sowie auf einen Radioaktivstandard gelegt und je nach erwarteter Signalstärke (abhängig von der Menge der hybridisierten Sonden) 24 – 72 Std. exponiert. Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte für 4 Min. in der Entwicklerlösung und wurde durch kurzes Eintauchen in Wasser (30 Sek.) gestoppt. Danach folgte eine 10-minütige Fixierung des Films in

Fixiererlösung. Nach Spülen des Films in fließendem Wasser wurde er 1 Min. mit Netzmittel bedeckt und ca. 60 Min. im Wärmeschrank getrocknet.

2.2.6.8 Detektion der mRNA im Gewebeschnitt durch Entwicklung mit Fotoemulsion

Die Lokalisation der hybridisierten Sonden kann zur besseren histologischen Auflösung außerdem mit einer Fotoemulsion direkt im Gewebeschnitt ermittelt werden. Die radioaktiv markierten Sonden regen hierbei in der Fotoemulsion vorhandene Silbermoleküle an, welche beim Eintauchen in eine Entwicklungslösung, genau wie bei einem Fotopositiv, ausfallen und als schwarze Punkte sichtbar werden. Diese schwarzen Punkte befinden sich dann in der Fotoemulsion direkt oberhalb von Zell- oder Gewebeabschnitten, an denen die Sonden hybridisiert wurden und somit das spezifische Gen exprimiert wird. Die Fotoemulsion NTB-2 wurde hierzu unter Lichtausschluss bei 42 °C verflüssigt und 1:1 mit ddH₂O verdünnt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte in die Fotoemulsion eingetaucht und über Nacht in Kästen luftgetrocknet. Die Objektträger wurden daraufhin in lichtdichte Kästen zusammen mit stark wasserabsorbierenden Silica-Körnern verstaut und 10 - 40 Tage bei 4 °C aufbewahrt. Die Entwicklung der fotoemulsionsbeschichteten Objektträger erfolgte 4 Min. in 16 °C kaltem Entwickler, worauf die Reaktion durch kurzes Eintauchen in Wasser gestoppt wurde. Danach folgte eine 10-minütige Fixierung und Spülen der Objektträger unter fließendem Wasser über Nacht.

Die Gewebeschnitte wurden abschließend mit Hämalaun und Eosin gefärbt (siehe 2.2.3.3) und mit dem Eindeckmedium und einem Deckgläschen abgedeckt.

2.2.6.9 Auswertung der *in situ* Hybridisierungen

Die Analyse der hybridisierten Sonden erfolgte am Lichtmikroskop AX 70. Mit Hilfe der SPOT RT Slider Kamera wurden ausgewählte Gewebebereiche aufgenommen. Die Aufnahmen erfolgten im Hell- und Dunkelfeld, wobei positive Signale in der Fotoemulsion im Hellfeld als schwarze Körnchen über dem Gewebe erscheinen, wohingegen sie im Dunkelfeld als leuchtend weiße Signale erkennbar sind.

2.2.7 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism 4.0 genutzt. Um die Wahrscheinlichkeit der Tumorprogression und -regression der experimentellen Gruppen zu vergleichen wurde die Ergebniszeitanalyse des Kaplan-Meier-Schätzers durchgeführt. Hierzu wurde für die Kalkulation der Wahrscheinlichkeit für die Progression oder Regression die Zeit von der Tumorinokulation (Tag 0) bis zum Erreichen der Abbruchkriterien von Progression (Tumorzvolumen $> 6000 \text{ mm}^3$) oder Regression ($< 25\%$ des maximalen Tumorzvolumens) berechnet.

Die statistische Auswertung der Veränderungen der Blutparameter vor und nach der Behandlung, sowie die der CD3-positiven-T-Zell-Infiltration in progressiven und regressiven Tumoren wurde mit Hilfe des ungepaarten T-Tests mit einer Welch-Korrektur durchgeführt.

Für die Signifikanzberechnung der Genexpression in progressiven Tumoren im Vergleich zur Genexpression in regressiven Tumoren, welche mittels qPCR gemessen wurde, wurde der ungepaarte T-Test durchgeführt.

Die Statistik des RT^2 -Profilers wurde mit Hilfe des Excel basierten *PCR Array Data Analysis Template* (<http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>) ausgewertet. Zur Streuungsanalyse der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Werte wurde der nicht-parametrische, zwei geteilte Mann Whitney Test angewendet. Daneben wurde für die Berechnung der unterschiedlichen Genexpressionen der T-Test genutzt.

Bei der Gesamtheit der Messungen galten die allgemeinen Signifikanzniveaus von $p \leq 0,5$ = signifikant, $p < 0,01$ = hochsignifikant und $p < 0,001$ = höchstsignifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Auswirkung der O₃/O₂-PP-Behandlung auf das Körpergewicht

Bei Eingang der Versuchstiere im hauseigenen Tierstall der Universität Marburg betrug das durchschnittliche Körpergewicht 2,9 kg. In den 4 Wochen (± 4 Tage) der Akklimatisierung bis zum Tag der Injektion der VX2-Zellsuspension stieg das Durchschnittsgewicht stetig auf 3,6 kg an.

Im Zeitraum nach Injektion bis hin zum Behandlungsbeginn (13 (± 2) Tage) nahm das mittlere Gewicht aller Tiere entsprechend der zu erwartenden Gewichtsentwicklung zu, bis es durchschnittlich 3,74 kg erreichte. Eine negative Wirkung des sich entwickelnden aurikulären VX2-Tumors auf das Gewicht der Tiere kann damit zu diesem frühen Zeitpunkt der Tumorentwicklung ausgeschlossen werden.

Die Sham-Behandlung, welche die tägliche Anästhesie mit Robinul[®], Rompun[®] und Ketavel[®] sowie die Injektion einer Kanüle in die Bauchhöhle beinhaltete, hatte keinen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung der Tiere (Abb. 3.1). Dagegen zeigten Tiere der O₃/O₂-PP-Gruppe in Folge der O₃/O₂-Insufflation in die Bauchhöhle einen zwar nicht signifikanten, aber doch deutlich nachweisbaren Rückgang ihres Gewichts um rund 5 % (200 g), über den Zeitraum der 5-tägigen Behandlung. Diese Gewichtsabnahme war transient und die Körpergewichte der O₃/O₂-PP-Gruppe glichen sich denen der Sham-Gruppe innerhalb der folgenden 14 Tage wieder an. (Abb. 3.1)

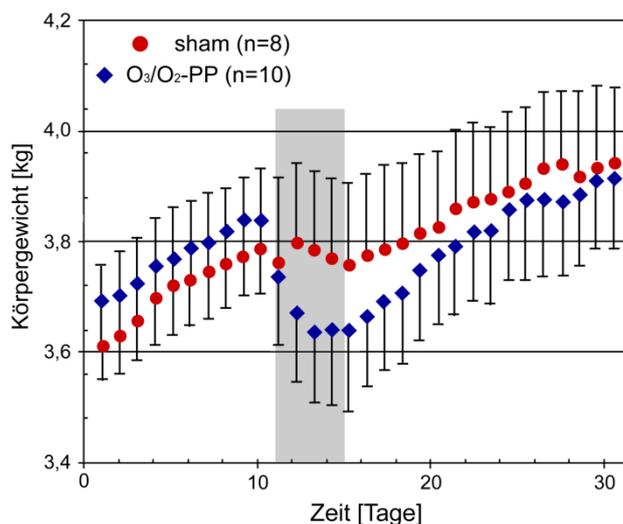


Abb. 3.1: Auswirkung der O₃/O₂-PP-Behandlung auf das Körpergewicht

Darstellung von Mittelwerten (\pm SEM) aller Sham- (n=8) und O₃/O₂-PP-behandelten (n=10) Kaninchen. Der graue Bereich markiert den Zeitraum der 5-tägigen Sham- bzw. O₃/O₂-PP-Behandlung. Zur Analyse der behandlungsabhängigen Körpergewichtsentwicklung wurden die Mittelwerte auf den Zeitpunkt der ersten Behandlung normiert.

3.2 Einfluss der O₃/O₂-PP-Behandlung auf die VX2-Tumorentwicklung (Teilversuch 1)

Zum Untersuchen der Wirkung einer O₃/O₂-PP-Behandlung auf die VX2-Tumorabwehr erhielten 18 Versuchstiere eine aurikuläre VX2-Tumorzellinokulation (Versuchstag 0). Nachdem sich an Tag 13 (± 2) ein solider Tumor mit einem Volumen von über 2500 mm³ entwickelte (Abb. 3.2) wurden die Tiere randomisiert in zwei Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe (n=8) wurde der Sham-Behandlung unterzogen; die andere Gruppe (n=10) erhielt die O₃/O₂-PP Behandlung.

Während der 5-tägigen Behandlung sowie den zwei weiteren Tagen zeigte sich in beiden Versuchsgruppen eine progressive Zunahme des Tumorzvolumens.

In diesem Zeitraum stieg das Tumorzvolumen in der Sham-behandelten Gruppe auf eine Größe von 3800 (± 450) mm³ an. Über die folgenden 7 Tage verringerte es sich auf eine Größe von 2700 (± 500) mm³, bevor es innerhalb der nächsten 14 Tage bei 6 der 8 Versuchstiere progressiv auf ein Volumen von > 6000 mm³ anwuchs. (Abb. 3.2a) Dieses Volumen stellte das Kriterium für eine irreversible Tumorprogression dar und der Tumor wurde chirurgisch abgetragen.

In der O₃/O₂-PP-behandelten Gruppe stieg das Tumorzvolumen bis zu einer Größe von 3350 (± 350) mm³ an. Bei 7 von 10 Tieren zeigte sich dann innerhalb von 14 Tagen ein Rückgang auf ein Volumen < 25% des maximalen Tumorzvolumens. (Abb. 3.2b) Diese Reduktion des Tumorzvolumens stellte das Kriterium für eine sichere Tumorremission dar. Der Tumor wurde chirurgisch abgetragen.

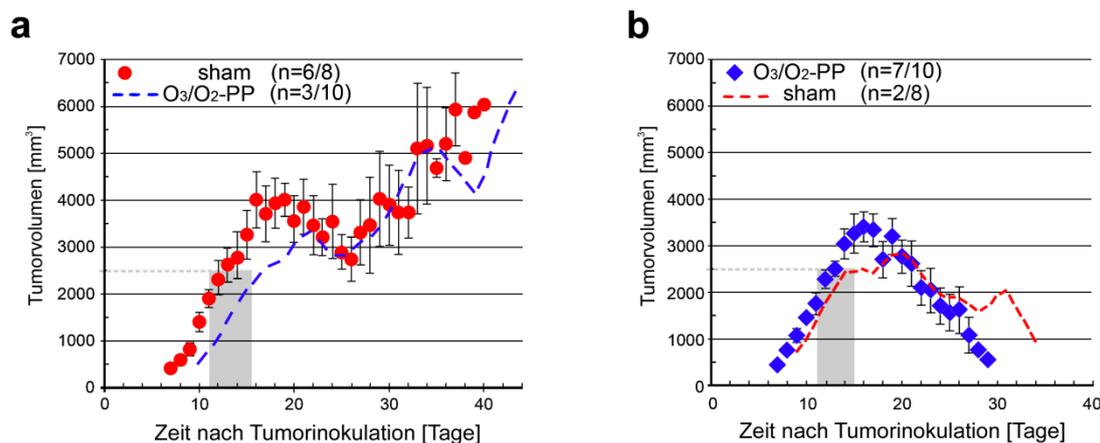


Abb. 3.2: Entwicklung des Tumorzvolumens

Entwicklung des Tumorzvolumens [mm³] nach VX2-Tumorzellinokulation [Tag 0] bei **(a)** Sham-behandelten (rote Markierungen (n=6)) und O₃/O₂-PP-behandelten Tieren (blaue Strichlinie (n=3)), welche ein progressives Tumorzvolumen aufwiesen und **(b)** O₃/O₂-PP-behandelten (blaue Markierungen (n=7)) und Sham-behandelten Tieren (rote Strichlinie (n=2)) mit einem regressiven Tumorverlauf. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Die graue Markierung **(a,b)** zeigt den Zeitraum, in dem ein Tumorzvolumen von 2500 mm³ überschritten wurde und die therapeutische Intervention begann.

Zur statistischen Fragestellung, ob es durch die O₃/O₂-PP-Behandlung zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für eine Tumorremission kommt, wurde der Kaplan-Meier-Schätzer verwendet. Dieser mathematische Test erlaubt es, die Wahrscheinlichkeit einzuschätzen, mit der es innerhalb eines definierten Zeitintervalls zu einer Tumorprogression (Abb. 3.3a) oder -regression (Abb. 3.3b) kommt.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Wahrscheinlichkeit für ein progressives Tumorstadium in der Sham-behandelten Gruppe signifikant höher war, als in der O₃/O₂-PP-behandelten Gruppe ($p = 0,0454$; Abb. 3.3a). Bei 6 der 8 Sham-behandelten Tiere (75 %) kam es zu einer progressiven Tumorentwicklung in einer durchschnittlichen Zeitspanne von 17 (± 3) Tagen. Bei lediglich 3 von 10 O₃/O₂-PP-behandelten Tieren (30 %) kam es, im Vergleich zur Sham-Gruppe, innerhalb eines mittleren Zeitfensters von 20 (± 3) Tagen zu einer verzögerten Tumorprogression. Dementsprechend zeigte die Kaplan-Meier-Analyse eine signifikant erhöhte Wahrscheinlichkeit für eine Tumorremission in der O₃/O₂-PP-behandelten Versuchsgruppe ($p = 0,0482$; Abb. 3.3b). Demnach kam es bei 7 von 10 Tieren (70 %) in einer durchschnittlichen Zeitspanne von 14 (± 1) Tagen zu einer Tumorremission. Dagegen zeigten lediglich 2 Tiere der Sham-Gruppe in einer durchschnittlichen Zeitspanne von 19 (± 5) Tagen eine Spontanremission des Tumors.

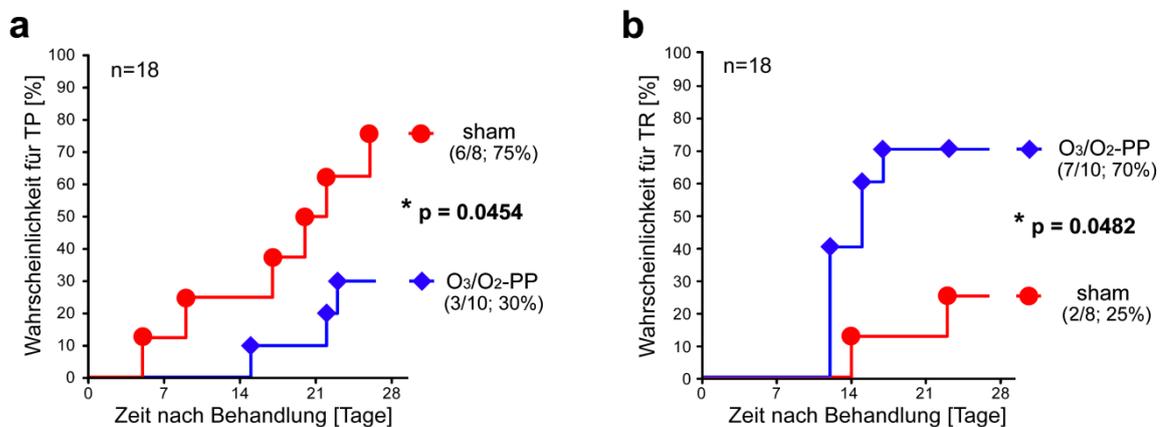


Abb. 3.3: Wahrscheinlichkeit für eine (a) Tumorprogression [TP] und (b) Tumorremission [TR].

Tag 0 wurde als der Zeitpunkt definiert, ab dem ein Tumorstadium von 2.500 mm³ erreicht wurde und die Behandlung der Tiere (n=18) begann. Der Tag der irreversiblen Tumorprogression [TP] wurde definiert als Zeitpunkt, an dem die Tumorstadium erstmals mehr als 6000 mm³ betrug. Der Zeitpunkt der erfolgreichen Tumorremission [TR] wurde als der Tag definiert, an dem ein Rückgang des Tumorstadiums auf < 25 % des individuellen, maximalen Volumens erreicht wurde. Die Anzahl und der prozentuale Anteil der Primärtumoren, welche das Abbruchkriterium für TP bzw. TR erreichten, sind in Klammern dargestellt. Die statistischen Unterschiede wurden mittels des nichtparametrischen Logrank-Test (Kaplan-Meier) berechnet. Die statistische Signifikanz lag bei * $p \leq 0,05$.

3.3 Einfluss der O₃/O₂-PP-Behandlung auf die VX2-Tumormetastasierung

Neben der Entwicklung des aurikulären VX2-Primärtumors wurde die Entstehung von peripheren Metastasen in zervikalen Lymphknoten und in der Lunge untersucht. Die Analyse erfolgte im Verlauf des Tierversuchs mit Hilfe der bildgebenden Methode der PET-CT (Abb. 3.4). Hierbei konnte durch Anreicherung radioaktiv markierter Fluordesoxyglucose in stoffwechselaktiven Geweben die Entwicklung von Metastasen *in vivo* sichtbar gemacht werden. Die PET-CT-Messung erfolgte an Tag 45 (±3) nach der VX2-Tumorzellinokulation.

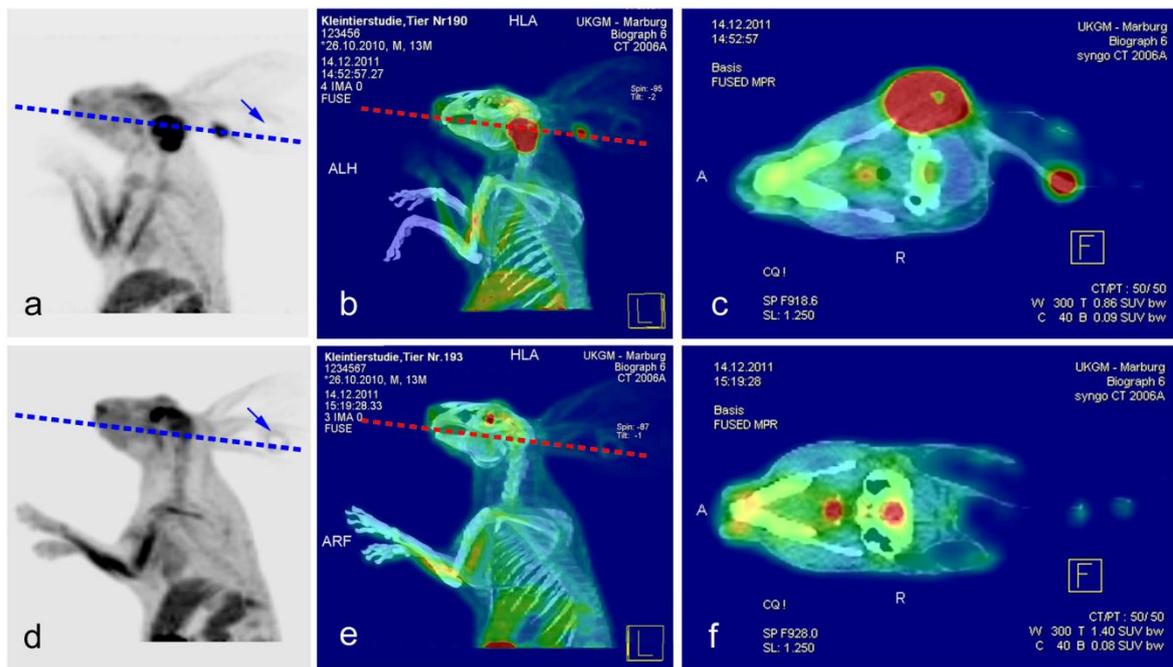


Abb. 3.4: 3D rekonstruierte PET-CT Analyse

(a-f) eines Sham-behandelten Tieres, welches regionale Metastasen am Ohrgrund und am ipsilateralen, Wächterlymphknoten aufwies (a-c) sowie die Analyse eines O₃/O₂-PP-behandelten, tumor- und metastasenfreien Tieres (e-f). Die mit [¹⁸F]-FDG angereicherten Gewebe mit hoher Stoffwechselrate sind als tiefschwarze (a,d) bzw. rote (b,c,e,f) Bereiche sichtbar. Die gestrichelten Linien in a, b, d und e zeigen den, in c und f visualisierten Querschnitt. Die hellen Stellen am Ohr (Pfeil in a,d) markieren die Bereiche, an denen der Tumor chirurgisch abgetragen wurde.

Die Analyse von auftretenden Metastasen (insbesondere Mikrometastasen), die aufgrund der relativ geringen Auflösung der PET-CT Messung nicht sichtbar gemacht werden konnten, erfolgte postmortal, durch Entnahme zervikaler Lymphknoten und Lungengewebe. Nach Fixierung und Einbettung des Gewebes in Paraffin wurden Schnitte angefertigt und diese mit Hämatoxylin / Eosin (HE) gefärbt und auf Metastasen untersucht. (Abb. 3.5)

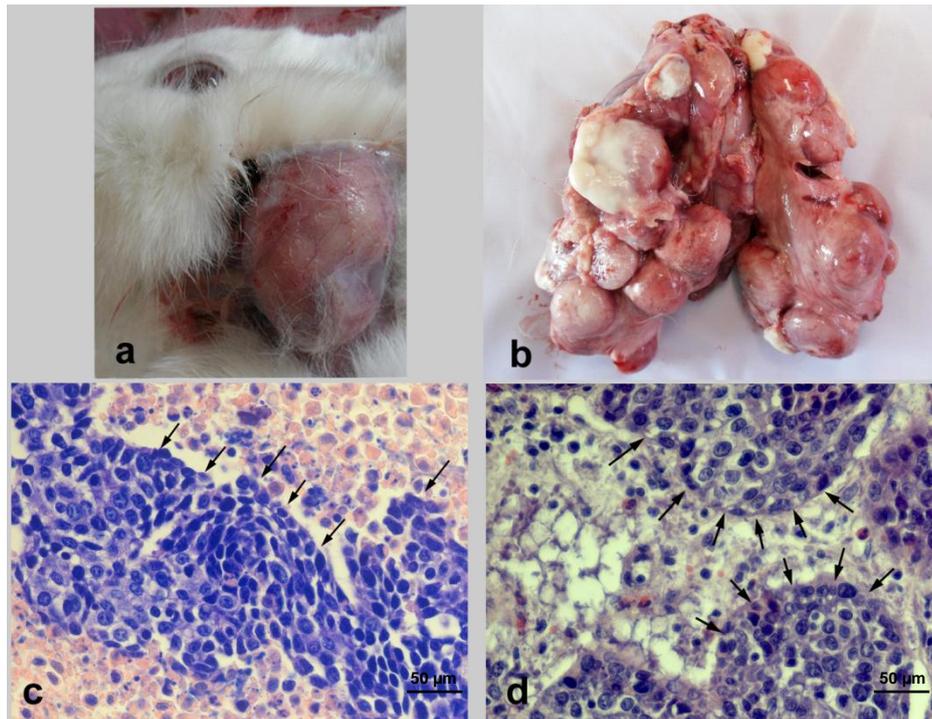


Abb. 3.5: Metastasierung des VX2-Tumors

Makroskopische Aufnahmen (a) eines mit Metastasen befallenen Wächterlymphknotens sowie (b) einer Lunge mit Metastasen. Mikroskopische Detektion von Metastasen (mit Pfeilen markiert) (c) innerhalb des Lymphknoten-Cortex und (d) der Lunge angrenzend an einen Lungenazinus. Färbung: Hämatoxilin / Eosin.

Zusätzlich zur antitumorigenen Wirkung der O_3/O_2 -PP-Behandlung auf den aurikulären VX2-Primärtumor zeigte die Behandlung einen Schutz vor im Krankheitsverlauf typischerweise auftretenden Metastasen in zervikale Lymphknoten (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Auftreten von Metastasen in Lunge und zervikalen Lymphknoten

Die Einteilung erfolgte nach Behandlung der Tiere (O_3/O_2 -PP bzw. Sham-Behandlung) sowie nach dem Wachstumsverlauf des Primärtumors (Progression bzw. Regression). Die Diagnose basiert auf Analysen mit Hilfe des PET-CTs (Abb. 3.4) und auf histologischen Färbungen (Abb. 3.5). Zervikale Lymphknoten wurden nach ihrer ipsilateralen (ipsi.) bzw. kontralateralen (kontra.) Lokalisation in Bezug auf den aurikulären Primärtumor eingeteilt. * = dasselbe Tier.

Behandlung Tumorentwicklung Anzahl	Metastasen				
	Lymphknoten			Lunge	
	ipsi.	kontra.	Frequenz	Total	Frequenz
O_3/O_2-PP Tumorregression n=7	1*	0	14,3 %	1*	14,3 %
O_3/O_2-PP Tumorprogression n=3	3	0	100 %	0	0 %
Sham Tumorregression n=2	0	0	0 %	0	0 %
Sham Tumorprogression n=6	6	0	100 %	1	17 %

In der Gruppe der O_3/O_2 -PP-behandelten Tiere waren 6 von 7 Tieren (86 %) frei von Metastasen; lediglich ein einziges Tier wies Metastasen in den regionalen, ipsilateralen

Lymphknoten sowie in der Lunge auf. Demgegenüber zeigten alle 6 Sham-behandelten Tiere, die einen progressiven Tumorverlauf aufwiesen, Lymphknotenmetastasen. Beide Sham-behandelten Tiere, bei denen der Primärtumor spontan remittierte, waren frei von Metastasen.

Fernmetastasen in der Lunge traten nur in Ausnahmefällen (bei 2 Tieren) auf, so dass davon ausgegangen werden muss, dass der VX2-Tumor per se innerhalb des Beobachtungszeitraums von 90 Tagen nach Tumorzellinokulation noch keine Fernmetastasen entwickelt hatte.

3.4 Blutparameter im Verlauf der O₃/O₂-PP-Behandlung

Für den Nachweis von modulatorischen Effekten der O₃/O₂-PP-Behandlung bei der Tumorregression wurden Blutanalysen (Autoanalyser Vet abcTM Animal Blood Counter) durchgeführt.

Tab. 3.2: Blutparameter im Verlauf der therapeutischen Intervention

Blutbild der Kaninchen, die nach O₃/O₂-PP-Behandlung eine Tumorregression aufwiesen (n=7) und die nach Sham-Behandlung einen progressiven Tumorverlauf zeigten (n=6). Die Blutparameter wurden vor der Tumorzellinokulation (Basiswert) und unmittelbar vor und nach der Behandlung gemessen. Der Basiswert beinhaltet alle Kaninchen unabhängig von ihrer Behandlung (n=13). Die statistisch signifikante Veränderung (fett markiert) zwischen den Werten vor und nach der Behandlung waren *p ≤ 0,05.

Blutparameter	Basis Wert	Behandlung			
		O ₃ /O ₂ -PP		Sham	
		vor	nach	vor	nach
Leukozyten (2,0 - 15,0 x10 ³ /mm ³)	7,5 ± 0,4	7,0 ± 1,4	8,2 ± 0,5*	7,5 ± 0,7	7,4 ± 0,5
Erythrozyten (4,0 - 8,6 x10 ⁶ /mm ³)	6,3 ± 0,1	6,4 ± 0,2	5,9 ± 0,2	6,1 ± 0,1	5,9 ± 0,1
Thrombozyten (120 - 800 x10 ³ /mm ³)	352 ± 33	293 ± 23	345 ± 59	331 ± 22	383 ± 17
Hämoglobin (9,3 - 19,3 g/dl)	12,6 ± 0,2	12,7 ± 0,2	11,8 ± 0,3	12,7 ± 0,1	12,1 ± 0,2
Hämatokrit (30,0 - 53,0 %)	39,5 ± 0,5	39,4 ± 0,9	36,3 ± 1,1	39,2 ± 0,4	37,1 ± 0,4
Mittlere Erythrozyteneinzelvolumen (57 - 90 μm ³)	62,5 ± 0,7	61,6 ± 0,8	61,3 ± 0,7	64,3 ± 1,0	63,9 ± 1,1
Mittleres korpuskuläre Hämoglobin (16,0 - 31,0 pg)	19,9 ± 0,3	19,9 ± 0,3	19,9 ± 0,3	20,9 ± 0,3	20,4 ± 0,4
Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (22,0 - 38,7 g/dl)	31,9 ± 0,1	32,2 ± 0,2	32,5 ± 0,3	32,5 ± 0,1	32,7 ± 0,2

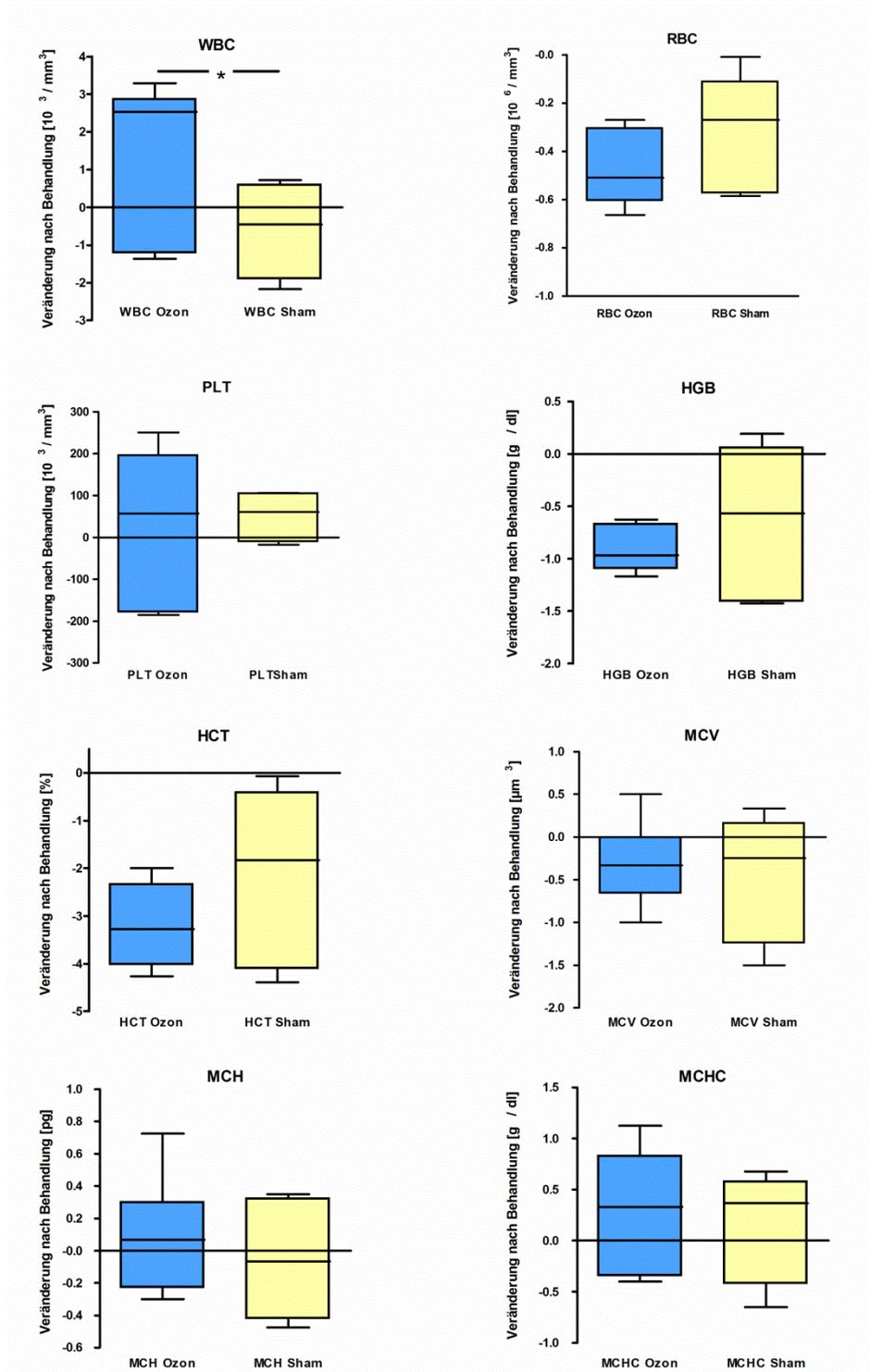


Abb. 3.6: Veränderung der Blutparameter unmittelbar vor und nach der therapeutischen Intervention

Anzahl von Leukozyten (WBC, $10^3/\text{mm}^3$), Erythrozyten (RBC, $10^6/\text{mm}^3$) und Thrombozyten (PLTs, $10^3/\text{mm}^3$), Konzentration von Hämoglobin (HGB, g/dl), Hämatokrit (HCT, %), mittleres Erythrozyteneinzelvolumen (MCV, μm^3), mittleres korpuskuläres Hämoglobin (MCH, pg) sowie Konzentration des mittleren korpuskulären Hämoglobins (MCHC, g/dl). Statistische Unterschiede wurden mit Hilfe des zweigeteilten T-Tests mit Welch-Korrektur ermittelt. Darstellung eines Boxplots mit Median (50. Perzentil), Quartilen (25. Perzentilen) und Max./Min. (75. Perzentil). Die statistische Signifikanz lag bei $*p \leq 0,05$.

In die Untersuchung eingeschlossen waren zum einen der zelluläre Anteil des Blutes (Hämatokrit) sowie die Konzentrationen von Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten. Zum anderen wurden die Hämoglobinkonzentration, das mittlere korpuskuläre Hämoglobin und die mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration ermittelt. Die Blutabnahmen erfolgten 2 – 4 Wochen vor der Behandlung (Basiswert) sowie direkt vor und nach der O₃/O₂-PP- bzw. Sham-Behandlung. Die intraperitoneale Insufflation des O₃/O₂-Gemisches hatte keinen auffälligen Einfluss auf die Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentrationen (Tab. 3.2; Abb. 3.6). Auch die Messungen des Hämoglobins und des Gesamtzellanteils (Hämatokrit) zeigten keine diagnostisch auffälligen Veränderungen. Dahingegen wurde ein signifikanter Anstieg der Leukozyten (WBC (*White Blood Cells*)) bei Tieren nach einer O₃/O₂-PP-Behandlung festgestellt (Tab. 3.2; Abb. 3.6).

3.5 Immunologische Charakteristika im VX2-Tumorgewebe

Die gemessenen Blutparameter weisen auf einen signifikanten Anstieg der Blutleukozyten hin, der auf einen systemischen, immunvermittelten Effekt der O₃/O₂-PP-Behandlung hindeutet. Um nachzuweisen, ob ebenfalls immunabhängige Modifikationen innerhalb des Tumorgewebes nach der O₃/O₂-PP-Behandlung festzustellen sind, wurden immunrelevante Faktoren innerhalb des Tumormikromilieus von regressiven Tumoren gegenüber progressiven Tumoren beurteilt. Hierzu wurde zunächst der Entzündungsstatus der Tumoren bestimmt, indem die Zahl der, den Tumor infiltrierenden T-Lymphozyten quantifiziert wurde. Für eine weiterführende, detaillierte Analyse wurden anschließend zahlreiche, immunrelevante Parameter des angeborenen und adaptiven Immunsystems im Tumorgewebe auf mRNA-Ebene quantifiziert.

3.5.1 Tumordinfiltrierende T-Lymphozyten

Sobald die Tumoren das jeweilige Abbruchkriterium erreicht hatten (> 6000 mm³ bei Progression bzw. < 25 % des individuellen Maximums bei Regression), wurden sie chirurgisch abladiert und tumordinfiltrierende T-Lymphozyten immunhistochemisch mittels eines gegen CD3 gerichteten Antikörper detektiert. CD3 dient als Co-Rezeptor des T-Zellrezeptors und gilt als ein geeignetes Markerprotein für die Detektion jeglicher T-Lymphozyten, unabhängig davon, ob es sich um CD4-positive T-Helferzellen oder CD8-positive zytotoxische T-Zellen handelt. Mit einer computergestützten Bildanalyse wurden die CD3-positiven Signale definiert und deren Anzahl, bezogen auf eine definierte Fläche des Tumors quantifiziert (Abb. 3.7).

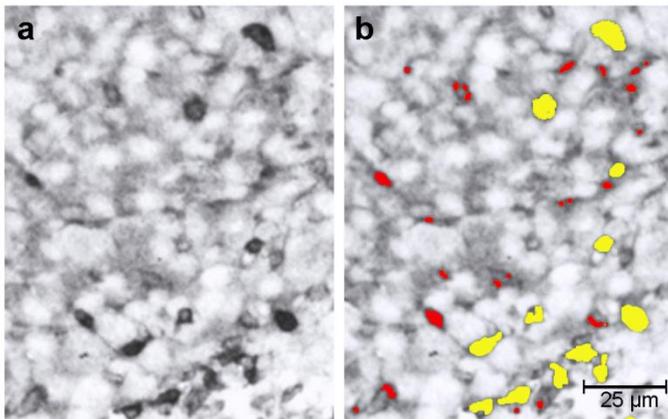


Abb. 3.7: Immunhistochemische Färbung und Quantifizierung von CD3-positiven Zellen

a) Repräsentativer histologischer Nachweis von CD3-positiven Zellen im VX2-Tumorgewebeschnitt
 b) Darstellung der digitalen Quantifizierungsmethode mittels computer- gestützter Bildanalyse. Die gelb gefärbten Punkte stellen CD3-positiv bewertete Signale dar, die jeweils als eine CD3- positive T-Zelle in die Auswertung einfließen. Die roten Bereiche beinhalten weniger als 10 Pixel und werden deshalb als falsch positive Signale ausgeschlossen und nicht in der Auswertung

berücksichtigt.

Die Quantifizierung zeigte eine signifikant höhere Infiltrationsdichte von CD3-positiven T-Lymphozyten in remittierendem Tumorgewebe von O_3/O_2 -PP-behandelten Tieren (Abb. 3.8). Im Vergleich zu progressiv wachsenden Tumoren von Sham-behandelten Tieren war die Anzahl CD3-positiver T-Lymphozyten im remittierenden Tumorgewebe um das 5,6-fache erhöht (Abb. 3.9).

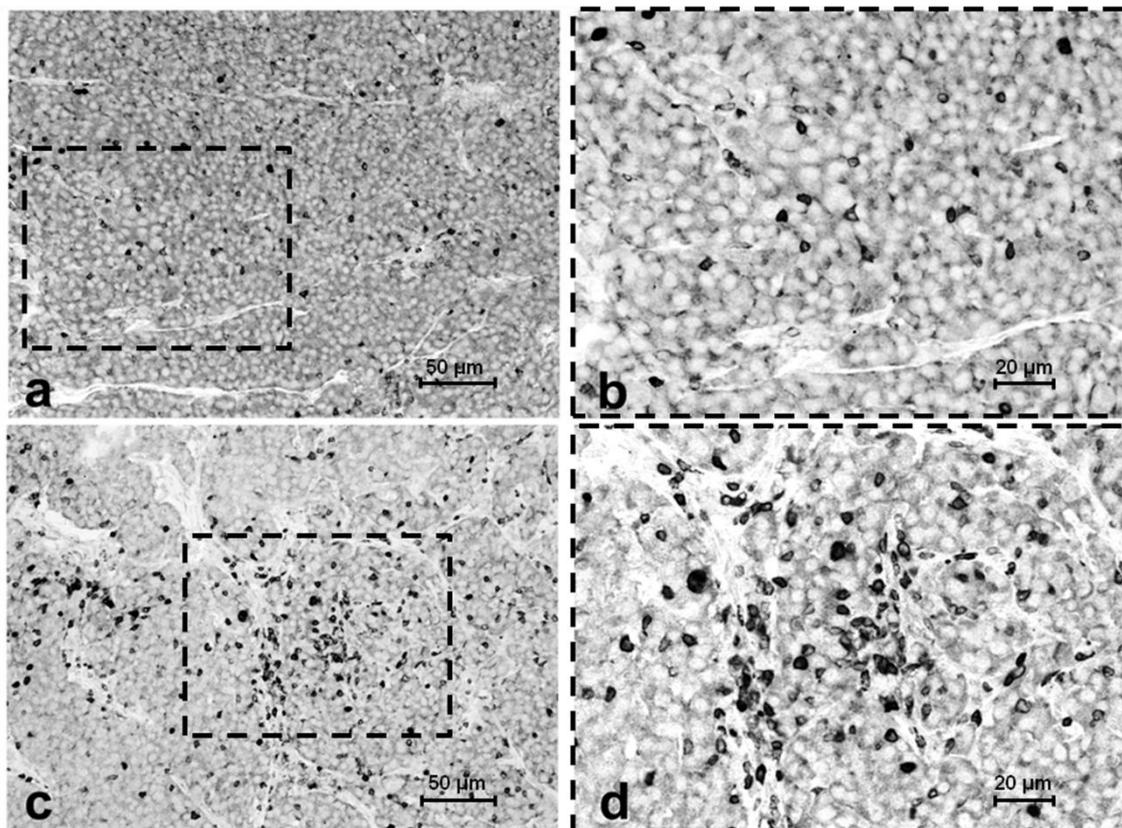


Abb. 3.8: CD3-positive Zellen im progressiven (a,b) und regressiven (c,d) Tumorgewebe

Immunhistochemische Analyse CD3-positiver Zellen. Rechts: Vergrößerung des eingerahmten Bereiches der Bilder a, c.

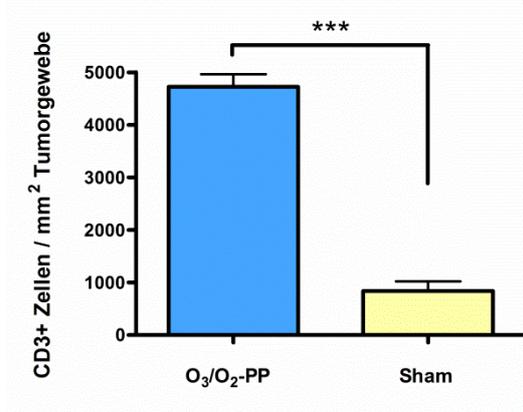


Abb. 3.9: Quantifizierung CD3-positiver Zellen

Anzahl CD3-positiver Zellen pro mm² Tumorgewebe in Regression (nach O₃/O₂-PP Behandlung) und in Progression (nach Sham Behandlung). Statistische Unterschiede wurden mit Hilfe des zweigeteilten T-Tests mit Welch-Korrektur ermittelt. Darstellung von Mittelwerten ± Standardfehler. Statistische Signifikanz lag bei ***p<0,0001.

Diese Akkumulation von tumorinfiltrierenden Lymphozyten deutet auf eine intratumorale T-Zell-getragene Immunantwort hin, welche für den Rückgang der Tumoren von Bedeutung zu sein scheint.

3.5.2 Expressionsprofil immunassoziierter Gene im Tumorgewebe nach O₃/O₂-PP-Behandlung

Für eine umfassende Untersuchung der, im Tumor stattfindenden immunologischen Abläufe wurde aus den remittierenden Tumoren (n=6) O₃/O₂-PP-behandelter Tiere und progressiven Tumoren (n=6) Sham-behandelter Tiere RNA isoliert und die Expressionsspiegel von 84 unterschiedlichen, immunologisch relevanten Genen mittels einer multiplex qPCR Array-Analyse bestimmt. Dadurch sollte der zugrunde liegende immunologische Wirkmechanismus weiter differenziert werden.

Gene, für die sich signifikante Unterschiede in den Expressionsspiegeln zwischen regressiven und progressiven Tumoren zeigten, wurden, unabhängig von ihrer zelltypspezifischen Expression innerhalb des Immunsystems, in funktionelle Gruppen eingeteilt. In den folgenden Kapiteln werden die Expressionsänderungen der definierten Gruppen aufgezeigt. Dabei beschreiben die „*Fold changes*“ den n-fachen Expressionsunterschied der jeweilig analysierten RNA zwischen Tumoren nach O₃/O₂-PP-Behandlung und Tumoren nach Sham-Behandlung.

3.5.2.1 *Pattern-Recognition Receptors*

Pattern-Recognition Receptors (PRRs) sind membranständige oder intrazelluläre Rezeptoren die unterschiedlichen Immunzellen dazu dienen, einerseits Pathogene anhand der von ihnen charakteristisch synthetisierten Faktoren, den PAMPs (*Pathogen-*

associated molecular patterns), zu erkennen, und andererseits zelluläre Fragmente zugrundegehender, körpereigener Zellen während der Nekrose und der Apoptose durch sogenannte DAMPs (*Damage/Danger-associated molecular patterns*) zu detektieren.

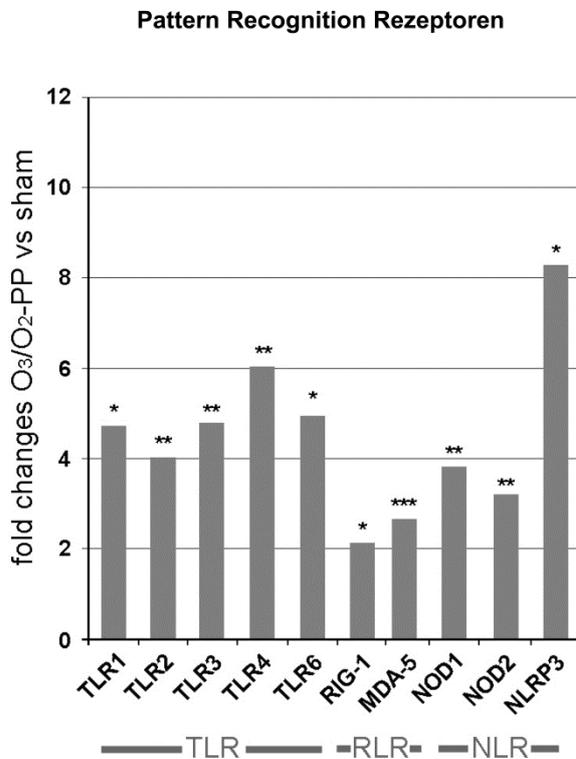


Abb. 3.10: Expression von *Pattern-Recognition Receptors*

im Primärtumor von O₃/O₂-PP-behandelten Tieren die eine Tumorregression aufweisen (n=6) im Vergleich zur Expression im Primärtumor Sham-behandelter Tiere mit progressivem Tumorverlauf (n=6). Darstellung von "fold changes". Werte über 0,0 zeigen gesteigerte Expressionslevels in remittierenden Tumoren. *p ≤ 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

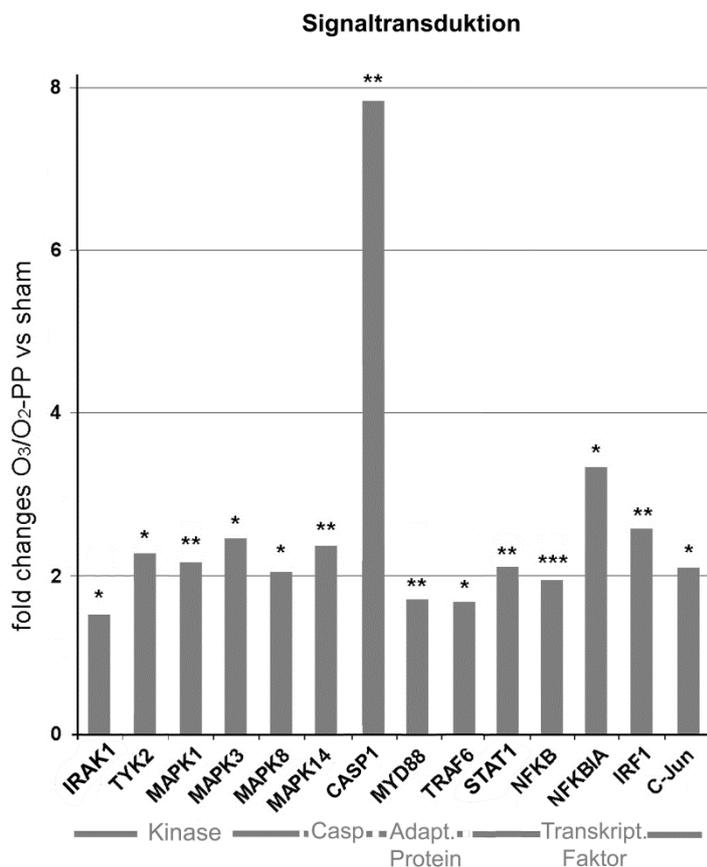
Abkürzungen der Gruppen: NLR: *NOD-like-Rezeptor*; RLR: *RIG-1-like Rezeptor*; TLR: *Toll-like Rezeptor*. Abkürzungen der Gene: MDA-5: *Melanoma Differentiation-Associated protein 5*; NLRP3: *NOD-like receptor family pyrin domain containing 3*; NOD1, 2: *Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein1, 2*; RIG-1: *retinoic acid inducible gene 1*; TLR 1,2,3,4,6: *Toll like Rezeptor 1,2,3,4,6*.

Zu den PRRs gehören u.a. die Gruppen der Toll-like Rezeptoren (TLR), der RIG-1 (*Retinoic acid-inducible gene 1*)-like Rezeptoren (RLR) und der NOD (*Nucleotide-binding oligomerization domain*)-like Rezeptoren (NLR).

Die Gesamtheit der untersuchten Gruppen der PRRs zeigten ausnahmslos signifikant höhere Expressionsspiegel in regressiven Tumoren im Vergleich zu progressiv wachsenden Tumoren (Abb. 3.10). Die Expression der TLR 1, 2, 3, 4 und 6 zeigte eine 4 bis 6-fach höhere Expression. RIG-1 und MDA-5 zeigten eine 2 bis 3-fach höhere Expression und die intrazellulär lokalisierten NLRs NOD1, 2 und NLRP3 wiesen eine, 3 bis über 8-fach höhere Expression in remittierenden Tumoren auf. Die ubiquitär gesteigerte Expression der PRRs in sich zurückbildenden Tumoren wird als ein wesentlicher Hinweis auf eine lokale Immunabwehr bewertet.

3.5.2.2 Gene der Signaltransduktion

Faktoren der Signaltransduktion sind essentiell um Signale in das Zellinnere weiterzuleiten und einen zellulären Effekt auszulösen.



associated factor 6; TYK2: Tyrosine kinase 2-like.

Abb. 3.11: Differentielle Expressionspiegel von Genen der Signaltransduktion

(remittierende Tumore n=6, progressive Tumoren n=6). Signifikanzen zwischen den Gruppen: * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Abkürzungen der Gruppen: *Adapt. Protein*: Adapter Protein; *Casp.*: Caspase; *Transkript. Faktor*: Transkriptionsfaktor. Abkürzungen der Gene: *Casp1*: Caspase 1; *C-Jun*: C-Jun transcription factor; *IRAK1*: Interleukin 1 receptor-associated kinase 1-like; *IRF1*: Interferon regulatory factor 1; *MAPK1, 3, 8, 14*: Mitogen-activated protein kinase 1-like, 3-like, 8, 14; *MyD88*: Myeloid differentiation primary response gene 88-like; *NFKB*: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells 2; *NFKBIA*: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells inhibitor alpha; *STAT1*: Signal transducer and activator of transcription 1; *TRAF6*: TNF receptor-

Sie umfassen u.a. Adapterproteine wie MyD88 und TRAF6, die in einer Signalkaskade zwei Proteine miteinander koppeln. Daneben sind Kinasen an der Signalkaskade beteiligt, die spezifische Proteine durch Phosphorylierung aktivieren. Hierzu zählen die Familie der MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*), IRAK1 (*Interleukin 1 receptor-associated kinase 1*) und TYK2 (*Tyrosine kinase 2*). Am Ende eines Signalweges werden häufig Transkriptionsfaktoren, wie NFkB und STAT1 aktiviert, die bei der Regulation der Transkription beteiligt sind. Die Gesamtheit der analysierten Gene der Signaltransduktion zeigte in remittierenden Tumoren O_3/O_2 -PP-behandelter Tiere eine signifikant gesteigerte Expression. Die Expressionsspiegel von Faktoren aus der Gruppe der Kinasen, der Adapterproteine sowie der Transkriptionsfaktoren, waren in remittierenden Tumoren im Schnitt 1,5 bis über 3-fach höher im Vergleich zu progressiven Tumoren. Darüber hinaus lag eine, über das 7,5-fach erhöhte Expression der Caspase 1 vor. Dieses Enzym bewirkt die Aktivierung der proinflammatorischen Zytokine pro-IL-1 β und pro-IL-18, indem es Vorläufermoleküle dieser Zytokine proteolytisch spaltet. Insgesamt weisen die erhöhten Expressionsspiegel dieser Faktoren auf eine gesteigerte Aktivierung von Immunzellen hin.

3.5.2.3 Entzündungsregulatorische Moleküle

In dieser Gruppe wurden Expressionsunterschiede von Kandidatenmolekülen analysiert, die eine ubiquitär modulierende Wirkung auf das Entzündungsgeschehen haben. Diese Moleküle besitzen entweder eine positiv chemotaktische Wirkung auf Immunzellen und fördern so die regionale Entzündung im Gewebe durch die Akquirierung von Leukozyten oder wirken modulierend (anti- oder proinflammatorisch) auf die Aktivität verschiedener Leukozyten-Subtypen.

In regressiven Tumoren konnte eine bis zu 3-fach höhere Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-15 ($p = 0,0268$) und IL-18 ($p = 0,0066$) festgestellt werden. Daneben lagen die Expressionsspiegel von TNF bei der Mehrheit (5 von 6) der progressiven Tumoren unterhalb der Nachweisgrenze. Demgegenüber fand sich in allen (6 von 6) regressiven Tumoren eine deutliche Hochregulation von TNF ($p = 0,0022$).

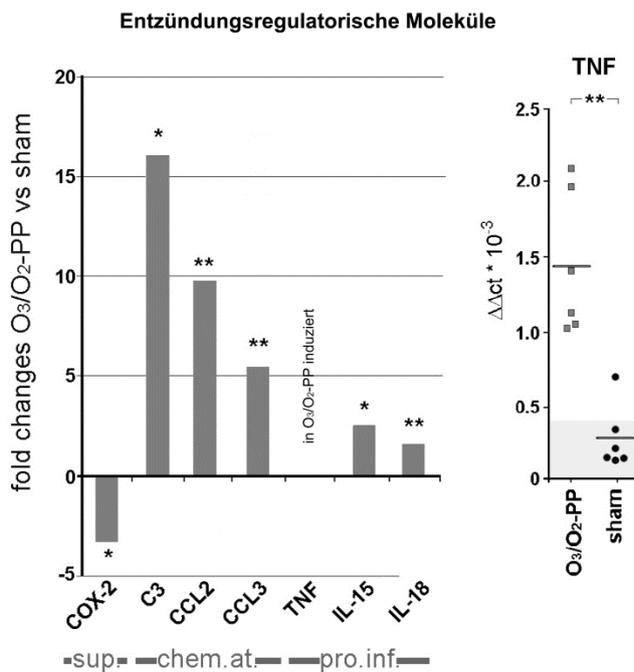


Abb. 3.12: Differentielle Expressionsspiegel entzündungsregulatorischer Moleküle

(remittierende Tumoren $n=6$, progressive Tumoren $n=6$). Signifikanzen zwischen den Gruppen: * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; bei nicht detektierbarer Expression eines Gens in einer der beiden Gruppen (O₃/O₂-PP oder Sham) und gleichzeitiger Expression in der anderen Gruppe (O₃/O₂-PP oder Sham) wird in einem Streudiagramm der $\Delta\Delta ct$ Werte die Induktion des Gens dargestellt. Messwerte innerhalb des grauen Bereichs im Streudiagramm liegen unterhalb der Nachweisgrenze von 35 Zyklen ($\Delta\Delta ct < 0,00047$) und werden als negativ gewertet.

Abkürzungen der Gruppen: *chem.at.*: chemoattractant; *pro.inf.*: proinflammatorisch; *sup.*: immunsuppressiv. Abkürzungen der Gene: CCL2, -3: chemokine (C-C motif) ligand 2, -3; C3, Complement component 3; COX-2, Cyclooxygenase-2; IL-15, -18: Interleukin-15, -18, TNF, Tumornekrosefaktor.

Mediatoren, die bei der Chemotaxis eine bedeutende Rolle spielen, wie die Chemokine CCL2 und CCL3 sowie der Komplementfaktor C3 wurden in remittierenden Tumoren ebenfalls signifikant höher ($p = 0,0018$; $p = 0,0021$; $p = 0,0188$) exprimiert. Die Expression lag um 5 bis über 16-fach höher im Vergleich zu progressiven Tumoren. Darüber hinaus zeigte COX-2, ein Enzym, welches die Synthese von antiinflammatorischen Prostaglandinen fördert, in remittierenden Tumoren O₃/O₂-PP-behandelter Tiere eine signifikant geringere Expression ($p = 0,0103$) verglichen mit Tumoren in Progression. Die Abnahme von antiinflammatorisch wirkenden COX-2-anhängigen Metaboliten weist damit,

in Übereinstimmung mit den signifikant erhöhten oder induzierten proinflammatorischen Mediatoren in remittierenden Tumoren, auf eine insgesamt gesteigerte Entzündungsreaktion hin.

3.5.2.4 Gene der Antigenpräsentation und co-stimulatorischer Oberflächenproteine

Die Beteiligung des adaptiven Immunsystems während der Tumoreradikation zeigt sich insbesondere durch die gesteigerte Expression von Rezeptoren und Liganden der Antigenpräsentation sowie Bindungspartnern co-stimulatorischer Signale einer T-Zell-getragenen Immunantwort.

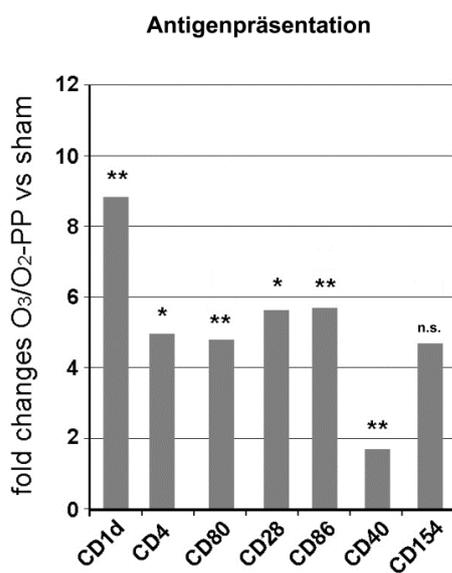


Abb. 3.13: Differentielle Expressionsspiegel von Genen der Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung durch ko-stimulatorische Signale

(remittierende Tumoren n=6, progressive Tumoren n=6). Signifikanzen zwischen den Gruppen: * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; n.s. nicht signifikant

Abkürzungen der Gene: CD: Cluster of differentiation.

CD1d, ein MHC-Klasse-I-Protein, welches im wesentlichen verantwortlich ist für die Entwicklung natürlicher Killer T (NKT)-Zellen während einer Entzündungsreaktion, war in remittierenden Tumoren 9-fach erhöht, was auf eine Beteiligung von NKT-Zellen bei der Tumoreradikation hindeutet. Die 5-fach erhöhte Expression des Co-Rezeptor CD4, der für die Aktivierung von T-Helfer Zellen durch die Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-II-Molekülen essentiell ist, weist auf eine verstärkte Infiltration von T-Helfer Zellen im remittierenden Tumorgewebe hin. Die erhöhte Genexpression der co-stimulatorischen Bindungspartner CD80/CD28 und CD86/CD28, welche die Voraussetzung für eine Aktivierung von T-Zellen darstellen, lässt im Zuge der vermehrt infiltrierenden T-Zellen auch auf eine verstärkte T-Zell-Aktivierung schließen.

Im Zusammenhang mit einer verstärkten Aktivierung von T-Zellen, aber auch weiteren Leukozyten-Subpopulationen, ist die erhöhte Expression von CD40, einem Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie, zu sehen. CD40 wird u.a. verstärkt auf aktivierten T-Zellen,

auf reifenden B-Zellen sowie Monozyten/Makrophagen exprimiert und besitzt in der Zellreifung eine zentrale Funktion als Zellaktivator.

3.5.2.5 Gene spezifischer T-Zell-Subpopulationen

Zur Analyse der aktivierten T-Zell-Subpopulationen innerhalb der Tumoren wurde die Expression für TH1-, TH2-, Treg- und TH17-Zell-spezifischer Gene gemessen. Eine zentrale Rolle in regressiven Tumoren scheinen TH1-Zellen zu spielen. Die TH1-Zell-spezifischen Gene CCR5, CXCR3 und CXCR4 sowie IFN γ waren in regressiven Tumoren signifikant höher exprimiert. Ferner war das, überwiegend von TH1-Zellen synthetisierte, IL-2 in regressiven Tumoren gegenüber progressiven Tumoren signifikant induziert.

Unter den TH2-Zell-spezifischen Genen zeigte ausschließlich das, von TH2-Zellen gebildete, IL-5 eine signifikante Induktion innerhalb des regressiven Tumorgewebes. Bekannte Marker für Treg (CCR8) und für TH17-Zellen (CCR6) zeigten eine statistisch nicht signifikante Steigerung in regressiven Tumoren. Darüber hinaus wies RORC eine geringfügige Reduktion auf, wohingegen IL-17 nicht detektiert werden konnte. Ausschließlich das Treg- und TH17-spezifische FoxP3 wies eine signifikant höhere Expression in regressiven Tumoren auf, was eine mögliche Beteiligung dieser Zellen bei der Tumoreradikation vermuten lässt. (Abb. 3.14)

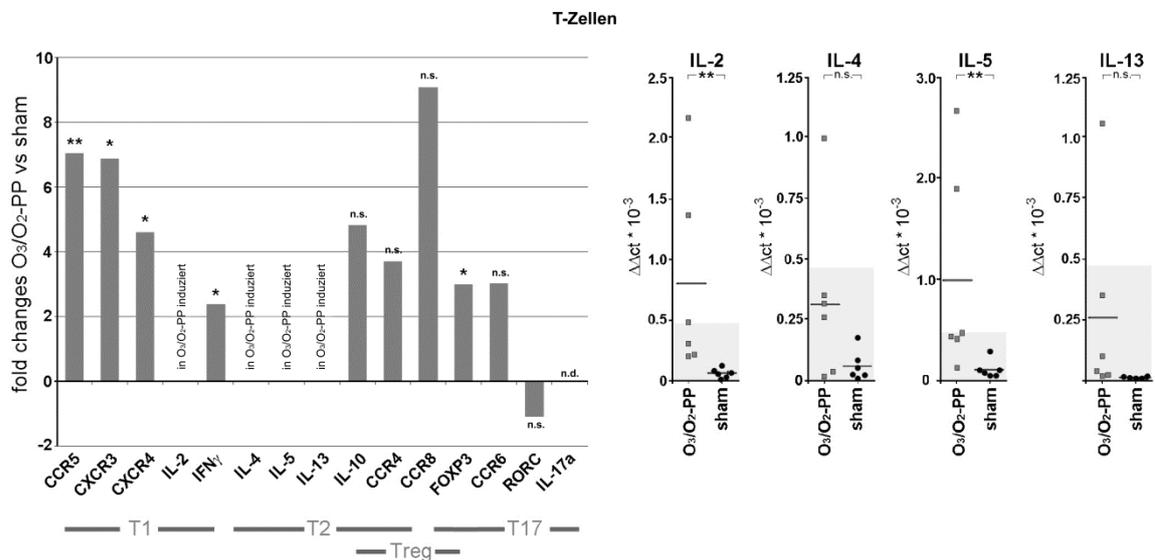


Abb. 3.14: Differentielle Expressionsspiegel von T-Zell-spezifischen Genen

(remittierende Tumoren n=6, progressive Tumoren n=6). Signifikanzen zwischen den Gruppen: *p \leq 0,05; **p < 0,01; n.s. nicht signifikant; bei nicht detektierbarer (n.d.) Expression eines Gens in einer der beiden Gruppen (O₃/O₂-PP oder Sham) und gleichzeitiger Expression in der anderen Gruppe (O₃/O₂-PP oder Sham) wird in einem Streudiagramm der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Werte die Induktion des Gens dargestellt. Messwerte innerhalb des grauen Bereichs im Streudiagramm liegen unterhalb der Nachweisgrenze von 35 Zyklen ($\Delta\Delta\text{ct} < 0,00047$) und werden als negativ gewertet.

Abkürzungen der Gruppen: T1, T2, T17: Typ 1, 2, 17 T-Helferzellen; Treg, regulatorische T-Zellen. Abkürzungen der Gene: CCR: Chemokine (C-C motif) Rezeptor; CXCR: Chemokine (C-X-C motif) Rezeptor; IL, Interleukin; IFN γ , Interferon gamma; FOXP3, Forkhead-Box-Protein P3; RORC, retinoic acid receptor related orphan receptor C.

Zusammenfassend zeigten die Expressionsdaten des RT²-Profilers, dass die O₃/O₂-PP-induzierte Tumorregression mit einer gesteigerten Expression zahlreicher immunologischer Gene assoziiert ist, welche für verschiedene PRRs, immunregulatorische Moleküle, sowie Proteine der Signaltransduktion, T-Zell-Aktivierung und Antigenpräsentation kodieren. In Übereinstimmung hiermit wiesen die Expressionsspiegel des immunsuppressiv wirkenden Enzyms COX-2 eine signifikante Herunterregulation in remittierenden Tumoren auf.

3.6 Funktioneller Nachweis einer erworbenen immunologischen Toleranz gegen den VX2-Tumor durch adoptiven Zelltransfer

Aufbauend auf dem tierexperimentellen Teilversuch 1, bei welchem Tiere in Folge der O₃/O₂-PP-Behandlung eine Tumorresistenz entwickelten, wurde in Teilversuch 2 der Frage nachgegangen, ob mit dem Rückgang der VX2-Tumoren auch eine Resistenz gegen den Tumor erworben wurde, welche über adoptiven Zelltransfer (AZT) auf Spendertiere übertragbar ist. Dieser funktionelle Versuchsansatz wurde gewählt, um die zentrale Rolle des Immunsystems bei der Tumoreradikation zu bestätigen. Ausgehend von der Annahme, dass im Falle des Vorliegens einer Tumorresistenz, diese systemisch im Tier vorliegt und damit auch in Leukozyten im peripheren Blut präsent ist, wurden isolierte PBL als potentielle Träger der Tumorresistenz für den adoptiven Transfer gewählt. Diese transferierten PBL stammten einerseits von Kaninchen, bei denen nach der O₃/O₂-PP-Behandlung der Tumor remittierte und keine Metastasen nachweisbar waren, andererseits wurden als Kontrolle PBL von Kaninchen eingesetzt, bei denen nach einer Sham-Behandlung der Tumor progressiv wuchs und Metastasen festgestellt werden konnten.

In 2 Versuchsansätzen sollte zum einen die Frage beantwortet werden, ob PBL aus O₃/O₂-PP-behandelten Tieren mit remittierenden Tumoren („protektive PBL“) vor dem Angehen und dem Wachstum eines soliden VX2-Tumors schützen können (Teilversuch 2a) und zum anderen, ob „protektive PBL“ eine tumorizide Immunantwort auslösen können, die zur Regression bereits bestehender solider VX2-Tumoren führt (Teilversuch 2b).

Zur Kontrolle, ob die transferierten PBL zu einer Abstoßungsreaktion im Sinne einer Graft-versus-Host-Reaktion führen, wurde die mittlere Körpertemperatur der Empfängertiere bis zum Tag 2 nach adoptivem Transfer gemessen. Die mittlere Körpertemperatur lag vor

dem Transfer im physiologischen Bereich von $39,4 (\pm 0,4)$ °C und wurde durch den adoptiven Zell-Transfer nicht nachweisbar beeinflusst (Abb. 3.15). Eine Graft-versus-Host-Reaktion als Ursache der Tumorremission erscheint daher unwahrscheinlich.

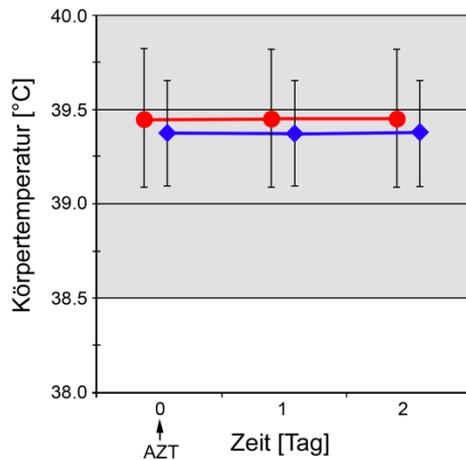


Abb. 3.15: Körpertemperatur [°C] im Verlauf des AZTs

Wirkung des adoptiven Zell-Transfers (AZT) auf die Körpertemperatur [°C] der Empfängertiere am Tag des Transfers (Tag 0) sowie an den zwei darauffolgenden Tagen. Rote Linie: Empfängertiere, die PBL von Sham-behandelten Tieren erhielten. Blaue Linie: Empfängertiere, die PBL von O₃/O₂-PP-behandelten Tieren erhielten. Der grau unterlegte Bereich umfasst die physiologische Körpertemperatur beim Kaninchen.

3.6.1 Experimenteller Ansatz zur Tumorprotektion durch adoptiven Zelltransfer (Teilversuch 2a)

Um die Frage beantworten zu können, ob der adoptive PBL-Transfer einen Schutz vor der Entstehung solider VX2-Tumoren bietet, wurde 12 gesunden Empfängertieren zeitlich parallel sowohl die VX2-Tumorzellsuspension in das eine Ohr und die isolierten PBL in die Vene des kontralateralen Ohrs injiziert. Dabei erhielten 6 Kaninchen PBL Sham-behandelter, tumorerkrankter Tiere und 6 Kaninchen PBL O₃/O₂-PP-behandelter, tumorfreier Tiere. Bei 1 Kaninchen, das PBL von O₃/O₂-PP-behandelten, tumorfreien Tieren erhalten hatte, entwickelte sich kein solider aurikulärer Tumor. In allen anderen Fällen entwickelte sich ein VX2-Tumor am Ohr, der, unabhängig von der Quelle aus welcher die transferierten PBL stammten, bis Tag 17 zunächst ein progressives Wachstum aufwies. Das mittlere Volumen der VX2-Tumoren in Tieren, welche PBL Sham-behandelter Tiere erhielten, war ab dem Auftreten eines soliden Tumors an Tag 9 p.i., insgesamt größer im Vergleich zum Tumorumfang von Tieren, denen PBL O₃/O₂-PP-behandelter Tiere injiziert wurden (Abb. 3.16). Allerdings wiesen die Tumorumfänge bis zu Tag 17 zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf. An Tag 17 wurde bei Empfängertieren mit PBL aus Sham-behandelten Tieren ein Tumorumfang von $4167 (\pm 662)$ mm³ gemessen, wohingegen die Tumoren der 5 Empfängertiere, welche mit PBL von geheilten Tieren behandelt wurden, ein Volumen von $3282 (\pm 330)$ mm³ aufwiesen. Ab Tag 18 zeigten erstmals Tumoren von Empfängertieren, welche mit PBL von geheilten Tieren behandelt wurden, ein rückläufiges Tumorumfang. Bei 3 der 5 Tiere

dieser Versuchsgruppe kam es letztendlich zu einer konstanten Reduktion der Tumorgöße, bis das Abbruchkriterium von unter 25% des individuellen Maximalvolumens erreicht wurde (Abb. 3.16b).

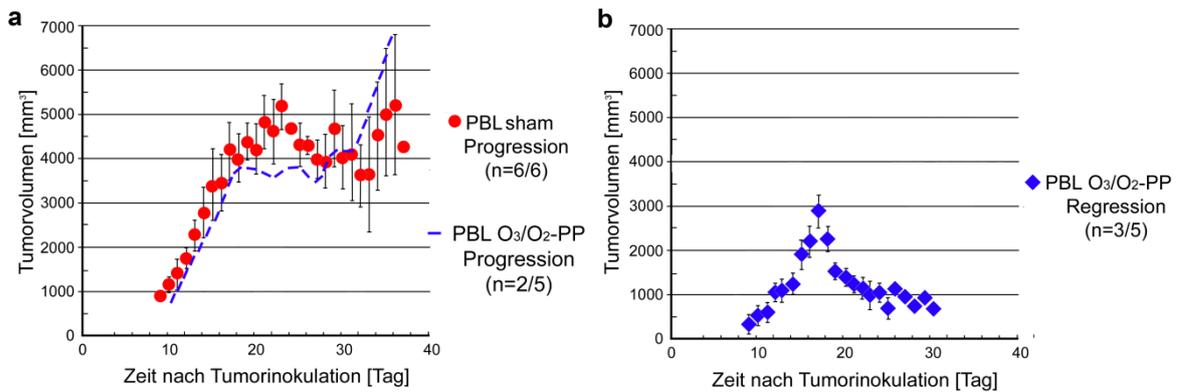


Abb. 3.16: Tumorentwicklung nach AZT (Teilversuch 2a)

Entwicklung des Tumolvolumens bei Tieren, welche parallel zur VX2-Tumorzellinokulation an Tag 0 entweder PBL von Sham-behandelten, Tumor-erkrankten oder O₃/O₂-PP-behandelten, gesunden Tieren erhielten. Gezeigt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Tumolvolumens von progressiv (a) und regressiv (b) sich entwickelnden Tumoren der entsprechenden Versuchsgruppe.

Kaninchen, die eine PBL-Inokulation von Sham-behandelten Tieren erhielten, zeigten zu 100 % einen stetigen Anstieg der Tumorgöße, bis ein Tumolvolumen von über 6000 mm³ ermittelt wurde (Abb. 3.16a).

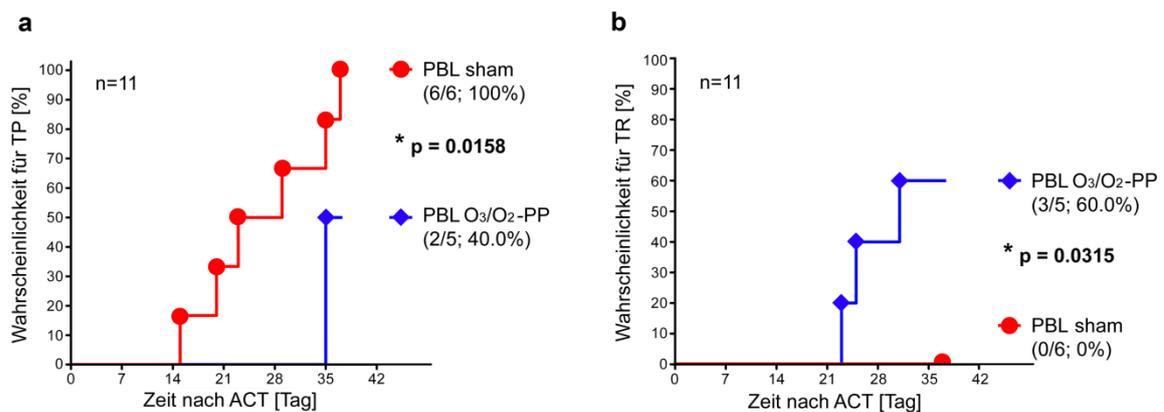


Abb. 3.17: Wahrscheinlichkeit für eine Tumorprogression [TP] (a) und Tumorregression [TR] (b) nach AZT (Teilversuch 2a)

Tag 0 ist der Zeitpunkt, an dem die Tumorzellsuspension parallel zu den PBL aurikulär inokuliert wurden (n=11). Ein Teil der Empfängertiere (n=6) erhielt PBL von Sham-behandelten Tieren, die einen progressiven Tumor ausbildeten (PBL Sham, rote Markierung). Der andere Teil der Empfängertiere (n=5) erhielt PBL von O₃/O₂-PP-behandelten, geheilten Tiere (PBL O₃/O₂-PP, blaue Markierung). Die Tumorprogression wurde definiert als Tumorgöße über 6000 mm³. Die Tumorregression wurde bei einem Rückgang des Tumolvolumens auf < 25 % des individuellen maximalen Volumens erreicht. Die Anzahl und der prozentuale Anteil der Tumoren, welche das Abbruchkriterium für Progression/Regression erreichten, werden in Klammern gezeigt. Die statistischen Unterschiede wurden mittels des nichtparametrischen Logrank-Test (Kaplan-Meier) berechnet. Die statistische Signifikanz lag bei *p ≤ 0,05.

Die Wahrscheinlichkeit für eine Tumorprogression war in dieser Gruppe signifikant größer ($p = 0,0158$), als bei Kaninchen, die PBL von O_3/O_2 -PP-behandelten Spendertieren erhielten (Abb. 3.17a). Dagegen resultierte der adoptive Transfer der Leukozyten O_3/O_2 -PP-behandelter, geheilter Tiere bei 3 von 5 Empfängertieren (60%) in einer Remission des Primärtumors. Entsprechend war die Wahrscheinlichkeit für eine Tumorregression in dieser Versuchsgruppe signifikant größer ($p = 0,0315$), als in der Versuchsgruppe Sham-PBL-behandelter Empfängertiere. (Abb. 3.17b)

3.6.2 Experimenteller Ansatz zur Tumorremission durch adoptiven Zelltransfer (Teilversuch 2b)

Zur Beantwortung der Frage, ob eine erworbene Tumorresistenz durch den adoptiven Transfer von PBL bestehende Tumoren eliminieren kann, wurde bei $n=12$ Kaninchen die VX2-Tumorzellsuspension injiziert. Nach dem Überschreiten einer Tumorgröße von 2500 mm^3 wurden die PBL der entsprechenden Spendertiere transferiert. Von den insgesamt 12 Tieren entwickelten lediglich 6 Tiere einen soliden VX2-Tumor. Davon erhielten $n=4$ Tiere PBL von O_3/O_2 -PP-behandelten, tumorfreien Tieren und $n=2$ Tiere PBL von Sham-behandelten, tumorerkrankten Tieren. In der Folge wiesen beide Empfängertiere, die PBL von Sham-behandelten Tieren erhalten hatten, ein progressives Tumorstadium bis zu einem Tumorstadium von über 6000 mm^3 auf (Abb. 3.18a). Dagegen zeigte sich bei allen Empfängertieren ($n=4$), die PBL von O_3/O_2 -PP-behandelten Tieren erhalten hatten, eine vollständige Tumorregression. In dieser Versuchsgruppe stieg das Tumorstadium nach der PBL-Inokulation zunächst bis auf $3212 (\pm 181) \text{ mm}^3$ an Tag 19 nach Tumorzellinjektion an, um dann innerhalb der folgenden 15 Tage auf unter 25 % des individuellen Maximalvolumens abzunehmen (Abb. 3.18b).

Die Wahrscheinlichkeit für eine Tumorprogression nach dem adoptiven Zelltransfer war bei tumorerkrankten Empfängertieren, die PBL der Sham-behandelten Tiere injiziert bekamen, signifikant höher ($p = 0,0177$) als bei Empfängertieren, die PBL von O_3/O_2 -PP-behandelten Tieren erhielten (Abb. 3.19a). Dagegen wies die Wahrscheinlichkeit für eine Tumorregression keinen mathematisch signifikanten Unterschied ($p = 0,0520$) zwischen den beiden Versuchsgruppen auf (Abb. 3.19b).

Die Ergebnisse zeigten, dass sich in, erfolgreich durch die O_3/O_2 -PP-Behandlung therapierten, Tieren eine immunologische Resistenz gegen den Tumor entwickelt hatte, die sich mit einer hohen Erfolgsrate von 60 bis 100% durch adoptiven Zelltransfer auf tumorerkranke Empfängertiere übertragen ließ.

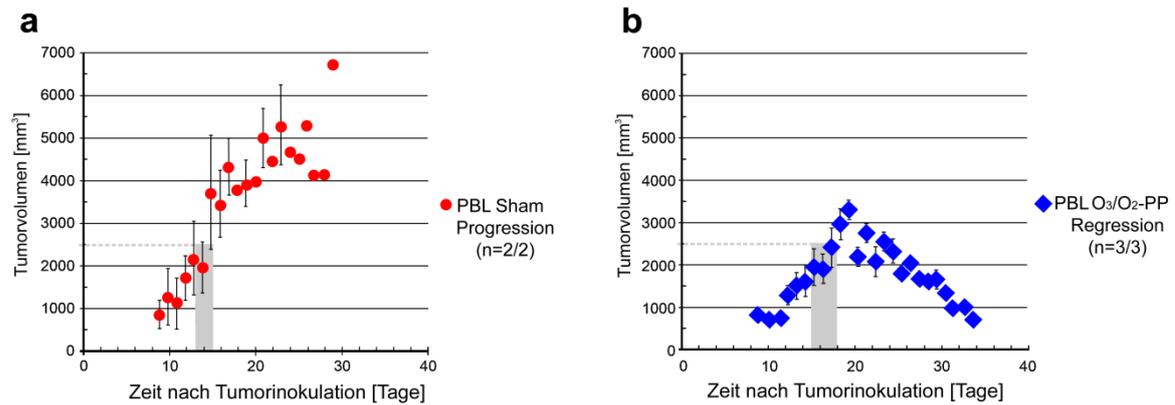


Abb. 3.18: Tumorentwicklung nach AZT (Teilversuch 2b)

Entwicklung des Tumorzvolumens bei Tieren, welche nach Entwicklung eines soliden aurikulären VX2-Tumors entweder PBL Sham-behandelter, Tumor-erkrankter oder O₃/O₂-PP-behandelter, tumorfreier Tiere erhielten. Die graue Markierung (a,b) zeigt den Zeitrahmen, in dem das Tumorzvolumen von 2500 mm³ überschritten wurde und die Tiere (a) PBL von Sham-behandelten, Tumor-erkrankten Tieren erhielten und ein progressives Tumorzvolumen aufwiesen (n=2/2) oder (b) PBL von O₃/O₂-PP-behandelten, geheilten Tieren erhielten und einen remittierenden Tumorverlauf zeigten (n=3/3). Gezeigt sind Mittelwerte ± Standardfehler.

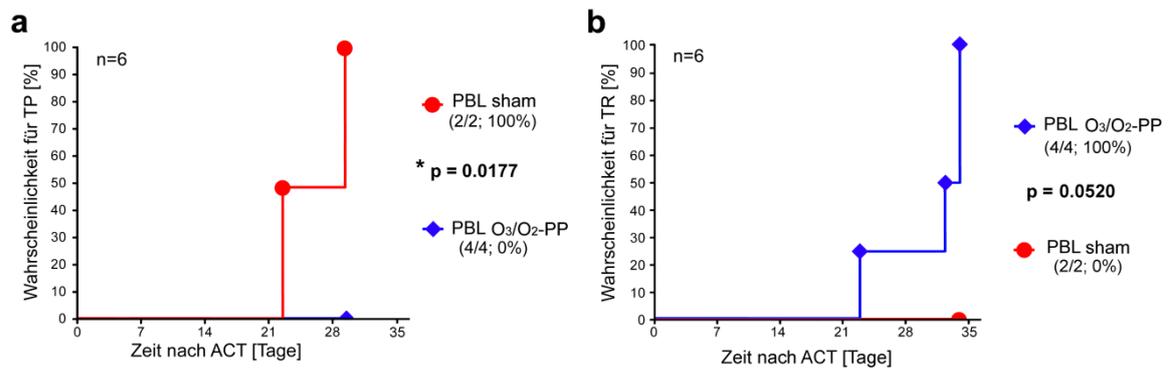


Abb. 3.19: Wahrscheinlichkeit für die Tumorzvolumenprogression [TP] (a) und Tumorzvolumenregression [TR] (b) (Teilversuch 2b)

Als Tag 0 wurde der Zeitpunkt gesetzt, an dem die Tumorzellsuspension inokuliert wurde (n=6). Nach Überschreiten eines Tumorzvolumens von 2500 mm³ erhielt ein Teil der Empfängertiere (n=2) PBL von Sham-behandelten Tieren, die einen progressiven Tumor ausbildeten. Der andere Teil der Empfängertiere (n=4) erhielt PBL von O₃/O₂-PP-behandelten, geheilten Tieren. Die Anzahl und der prozentuale Anteil der Tumoren, welche das Abbruchkriterium für Progression/Regression erreichten, werden in Klammern gezeigt. Die statistischen Unterschiede wurden mittels des nicht-parametrischen Logrank-Test (Kaplan-Meier-Analyse) berechnet. Die statistische Signifikanz lag bei * $p \leq 0,05$.

Transferierte PBL aus Sham-behandelten Spendertieren, die einen progressiven Tumorverlauf zeigten, führten in keinem Fall zu einem therapeutischen Erfolg in den Empfängertieren. Einen unmittelbaren Schutz vor dem Entstehen eines experimentell-induzierten VX2-Tumors können die übertragenden PBL bei gleichzeitigem Transfer mit den Tumorzellen in ein Empfängertier nicht leisten. Die tumorizide Wirkung wird erst ca. 10-14 Tagen nach Transfer der PBL sichtbar, wobei die Effektivitätsrate bei Vorliegen eines soliden Tumors zum Zeitpunkt des PBL Transfers am höchsten ist.

3.6.3 Expressionsprofil immunassoziierter Gene im Tumorgewebe nach adoptivem Leukozyten-Transfer

Nach adoptivem Transfer und Erreichen des jeweiligen Abbruchkriteriums für das Vorliegen einer Progression bzw. Regression wurde das Gewebe des Primärtumors abgetragen und (entsprechend Kapitel 3.5.2) auf Unterschiede in den Expressionsspiegeln immunologisch relevanter Gene zwischen Tumoren in Regression und solche in Progression analysiert. Damit soll geklärt werden, ob der zugrundeliegende Wirkmechanismus des adoptiven PBL-Transfers vergleichbar ist mit dem Wirkmechanismus der O_3/O_2 -PP-induzierten Tumorremission. Hierbei wurden remittierende Tumoren von 4 Tieren, denen PBL von O_3/O_2 -PP-behandelten Kaninchen verabreicht wurden sowie progressive Tumoren von 4 Tieren, die PBL Sham-behandelter Tiere erhielten, unabhängig vom Inokulationszeitpunkt der PBL getestet.

3.6.3.1 Pattern-Recognition Receptors

Die Gruppe der untersuchten TLRs zeigte mit Ausnahme von TLR3 eine signifikant gesteigerte Expression in regressiven Tumoren gegenüber progressiven Tumoren.

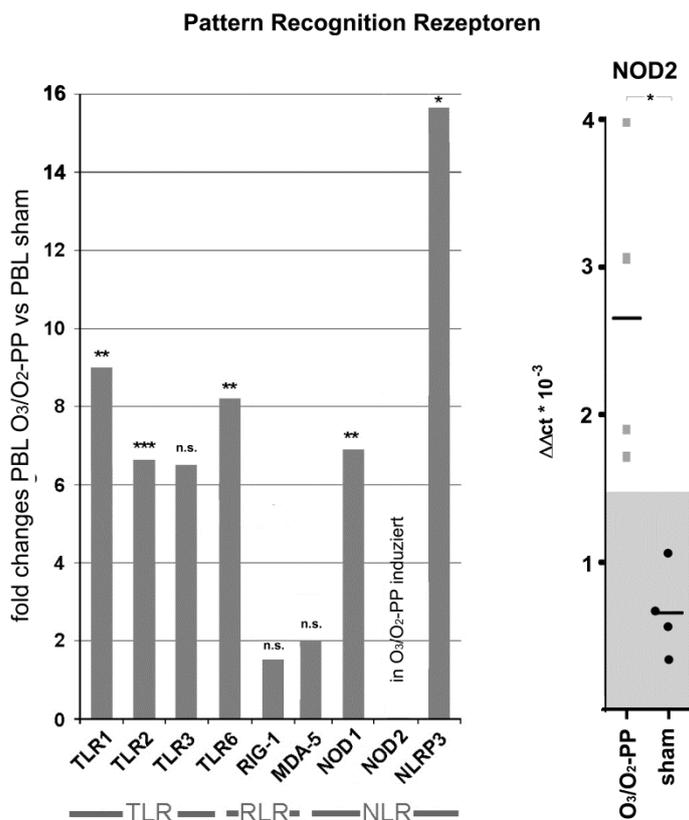


Abb. 3.20: Expression von Pattern-Recognition Receptors

im regressiven Primärtumor von Tieren, die PBL von O_3/O_2 -PP-behandelten, tumorfreien Tieren erhielten ($n=4$) im Vergleich zur Expression im progressiven Primärtumor von Tieren, die PBL von Sham-behandelten, erkrankten Tieren erhielten ($n=4$). Darstellung von fold changes. Werte über 0,0 zeigen eine gesteigerte Expression in remittierenden Tumoren. * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s. nicht signifikant; bei nicht detektierbarer Expression eines Gens in einer der beiden Gruppen (O_3/O_2 oder Sham) und gleichzeitiger Expression in der anderen Gruppe (O_3/O_2 -PP oder Sham) wird in einem Streudiagramm der $\Delta\Delta ct$ -Werte die Induktion des Gens dargestellt. Messwerte innerhalb des grauen Bereichs im Streudiagramm liegen unterhalb der Nachweisgrenze von 35 Zyklen ($\pm \Delta\Delta ct < 0,00047$) und werden als negativ gewertet.

Abkürzungen der Gruppen: NLR: NOD-like-Rezeptor; RLR: RIG-1-like Rezeptor; TLR: Toll-like Rezeptor. Abkürzungen der Gene: MDA-5: Melanoma Differentiation-Associated protein 5; NLRP3: NOD-like receptor family pyrin domain containing 3; NOD1, 2: Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein1, 2; RIG-1: retinoic acid inducible gene 1; TLR 1,2,3,6: Toll like Rezeptor 1,2,3,6.

Die Expression lag bei TLR1, TLR2 und TLR6 zwischen 6,8 und 9-fach höher ($p = 0,0017$; $p = 0,0004$; $p = 0,0026$). Ebenso wiesen die intrazellulären PRRs NOD1 und NLRP3 eine signifikant gesteigerte Expression ($p = 0,0037$; $p = 0,0240$) bei regressiven Tumoren auf. NOD1 zeigte eine 7-fach höhere Expression und NLRP3, ein bedeutendes Protein innerhalb des Inflammasom-Proteinkomplexes, eine über 15-fach höhere Expression. Demgegenüber stand die Gruppe der RLRs sowie das intrazellulär lokalisierte TLR3, welche in regressiven Tumoren nicht signifikant reguliert waren. (Abb. 3.20)

3.6.3.2 Gene der Signaltransduktion

Die Gruppen der analysierten Kinasen, der Adapterproteine und der Transkriptionsfaktoren zeigten eine signifikant höhere Expression in regressiven Tumoren gegenüber progressiven Tumoren. Die im Rahmen der Expressionsanalyse erfassten Gene der Signaltransduktion zeigten ausnahmslos eine gesteigerte Expression in remittierenden Tumoren nach adoptivem Zelltransfer (Abb. 3.21). Darüber hinaus wies die proinflammatorisch wirkende Caspase 1 eine signifikante, über 10-fach höhere Expression in regressiven Tumoren auf.

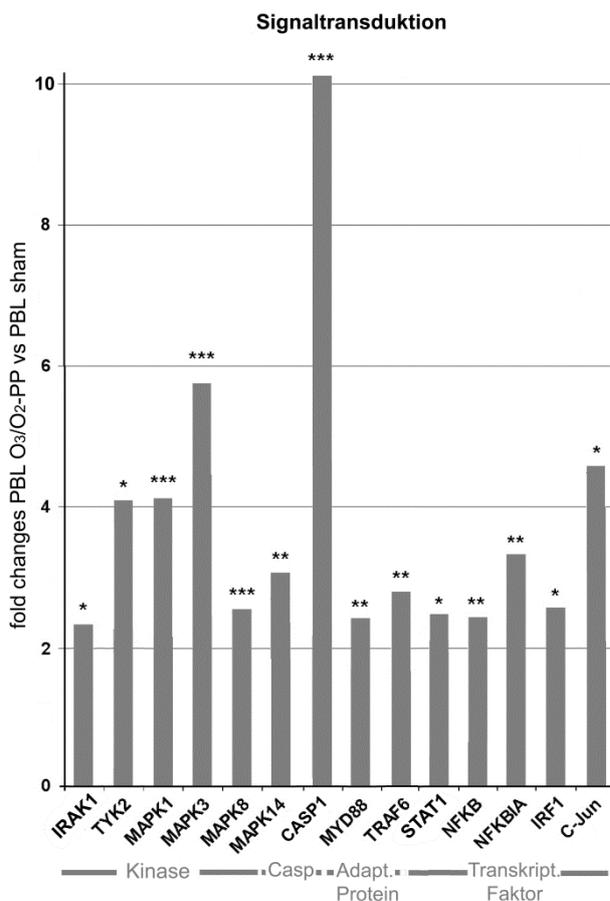


Abb. 3.21: Differentielle Expressionsspiegel von Proteinen der Signaltransduktion

(remittierende Tumoren $n=4$, progressive Tumoren $n=4$). Signifikanzen zwischen den Gruppen: * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Abkürzungen der Gruppen: *Casp*: Caspase; *Adapt. Protein*: Adapter Protein; *Transkript. Faktor*: Transkriptionsfaktor. Abkürzungen der Gene: *Casp1*: Caspase 1; *C-Jun*: C-Jun transcription factor; *IRAK1*: Interleukin 1 receptor-associated kinase 1-like; *IRF1*: Interferon regulatory factor 1; *MAPK1, 3, 8, 14*: Mitogen-activated protein kinase 1-like, 3-like, 8, 14; *MyD88*: Myeloid differentiation primary response gene 88-like; *NFKB*: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells 2; *NFKBIA*: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells inhibitor alpha; *STAT1*: Signal transducer and activator of transcription 1; *TRAF6*: TNF receptor-associated factor 6; *TYK2*: Tyrosine kinase 2-like.

3.6.3.3 Entzündungsregulatorische Moleküle

Entzündungsregulatorische Moleküle, wie die chemotaktischen Mediatoren CCL2, CCL3 und der Komplementfaktor C3 wiesen eine signifikant höhere Expression ($p = 0,0242$; $p = 0,0039$; $p = 0,0031$) in regressiven Tumoren gegenüber progressiven Tumoren auf. CCL2 und CCL3 wiesen eine 4 und 7-fach höhere Expression auf. Darüber hinaus war C3 um das 22-fache höher exprimiert. Ebenfalls zeigten die proinflammatorischen Zytokine IL-15 und IL-1b eine 2 und 3-fach höhere Expression ($p = 0,0007$; $p = 0,0324$) in diesen Tumoren. TNF war ausschließlich in Tumoren von Tieren, die PBL O_3/O_2 -PP-behandelter Tiere erhielten, induziert. Die COX-2-Expression zeigte in remittierenden Tumoren nach O_3/O_2 -PP-Behandlung, wie auch in remittierenden Tumoren nach adoptivem Zelltransfer eine Reduktion. (Abb. 3.22) Jedoch war der statistische Unterschied in den COX-2-Expressionsspiegeln zwischen sich progressiv und regressiv entwickelnden Tumoren in diesem Versuchsansatz nicht signifikant ($p = 0,1427$).

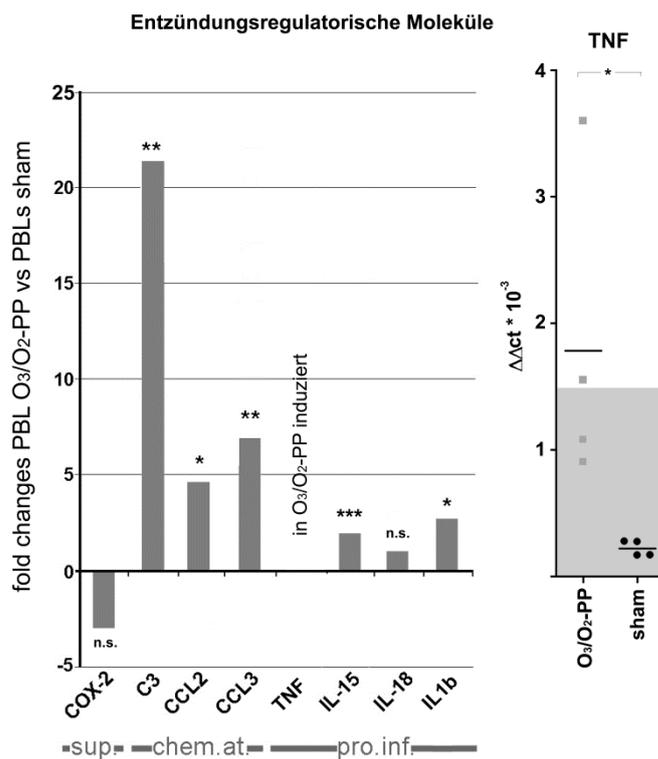


Abb. 3.22: Differenzielle Expressionsspiegel entzündungsregulatorischer Moleküle

(remittierende Tumoren $n=4$, progressive Tumoren $n=4$). Signifikanzen zwischen den Gruppen: * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s. nicht signifikant; bei nicht detektierbarer Expression eines Gens in einer der beiden Gruppen (O_3/O_2 oder Sham) und gleichzeitiger Expression in der anderen Gruppe (O_3/O_2 oder Sham) wird in einem Streudiagramm der $\Delta\Delta ct$ -Werte die Induktion des Gens dargestellt. Messwerte innerhalb des grauen Bereichs im Streudiagramm liegen unterhalb der Nachweisgrenze von 35 Zyklen ($\Delta\Delta ct < 0,00047$) und werden als negativ gewertet.

Abkürzungen der Gruppen: *sup.*: immun-suppressiv; *chem.at.*: chemoattractant; *pro.inf.*: proinflammatorisch. Abkürzungen der Gene: CCL2, -3: chemokine (C-C motif) ligand 2, -3; C3, Complement component 3; COX-2,

Cyclooxygenase-2; IL-15,-18, Interleukin-15, -18, TNF, Tumornekrosefaktor.

3.6.3.4 Gene der Antigenpräsentation und co-stimulatorischer Oberflächen-proteine

Gene der Antigenpräsentation, wie CD4, CD40 und die co-stimulatorischen Bindungspartner CD80/CD28 und CD86/CD28 wiesen eine bis zu 9-fach gesteigerte Expression in regressiven gegenüber progressiven Tumoren auf (Abb. 3.23).

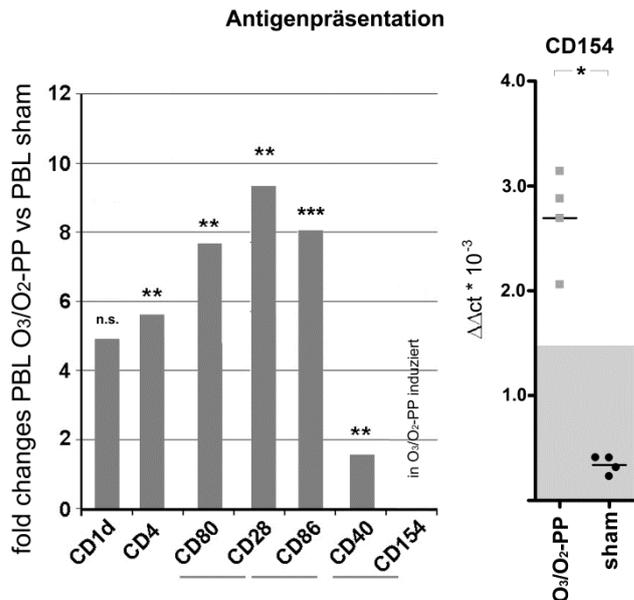


Abb. 3.23: Gene der Antigenpräsentation und co-stimulatorischer Oberflächenproteine

(remittierende Tumoren n=4, progressive Tumoren n=4). Signifikanzen zwischen den Gruppen: *p ≤ 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; n.s. nicht signifikant; bei nicht detektierbarer Expression eines Gens in einer der beiden Gruppen (O₃/O₂ oder Sham) und gleichzeitiger Expression in der anderen Gruppe (O₃/O₂ oder Sham) wird in einem Streudiagramm der ΔΔct-Werte die Induktion des Gens dargestellt. Messwerte innerhalb des grauen Bereichs im Streudiagramm liegen unterhalb der Nachweisgrenze von 35 Zyklen ($\Delta\Delta\text{ct} < 0,00047$) und werden als negativ gewertet.

Abkürzungen der Gene: CD: Cluster of differentiation.

Daneben zeigte der CD40 Ligand CD154 eine signifikante Induktion in remittierenden Tumorgeweben (Abb. 3.23).

3.6.3.5 Gene spezifischer T-Zell-Subpopulationen

Die Gene CCR5, CXCR3, CXCR4 und IFN γ , welche eine TH1-Zell-Antwort widerspiegeln zeigten eine bis über 11-fach höhere Expression in regressiven Tumoren. Darüber hinaus war IL-2, der T-Zell-Wachstumsfaktor in diesen Tumoren signifikant induziert. Daneben wiesen Interleukine der TH2-Zell-Immunantwort, wie IL-4, IL-10 und das TH2-Zell-exprimierte Chemokin CCR4 eine signifikant höhere Expression in remittierenden Tumoren auf. Die geringe Anzahl der Gene, die eine Treg- und TH17-Aktivität signalisieren, sind auf die hohe Ausschlussrate der Messwerte zurückzuführen (Abb. 3.24).

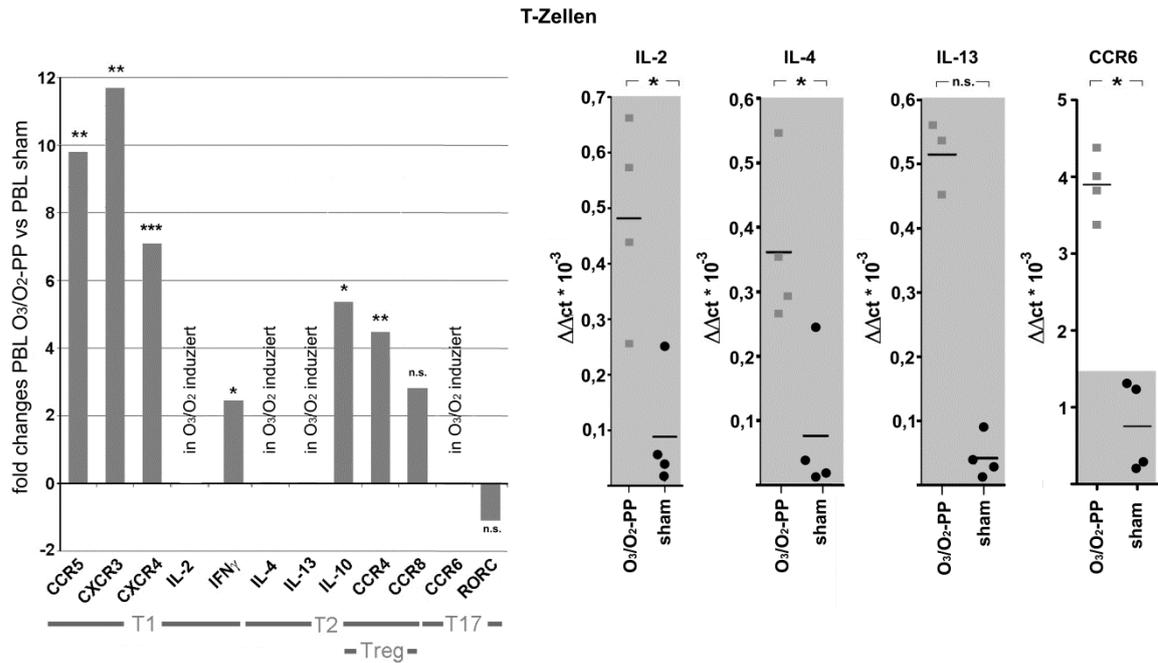


Abb. 3.24: Differentielle Expressionsspiegel von T-Zell spezifischen Genen

(remittierende Tumoren n=4, progressive Tumoren n=4). Signifikanzen zwischen den Gruppen: * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s. nicht signifikant; bei nicht detektierbarer Expression eines Gens in einer der beiden Gruppen (O₃/O₂ bzw. Sham) und gleichzeitiger Expression in der anderen Gruppe (O₃/O₂ bzw. Sham) wird in einem Streudiagramm der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Werte die Induktion des Gens dargestellt. Messwerte innerhalb des grauen Bereichs im Streudiagramm liegen unterhalb der Nachweisgrenze von 35 Zyklen ($\Delta\Delta\text{ct} < 0,00047$) und werden als negativ gewertet.

Abkürzungen der Gruppen: T1, T2, T17: Typ 1, 2, 17 T-Helferzellen; Treg, regulatorische T-Zellen. Abkürzungen der Gene: CCR4, -5, -6, -8: Chemokine (C-C motif) Rezeptor 4, 5, 6, 8; CXCR3, -4: Chemokine (C-X-C motif) Rezeptor 3, 4; IL-2, -4, -10, -13, Interleukin-2, -4, -10, -13; IFN γ , Interferon gamma; RORC, retinoic acid receptor related orphan receptor C.

3.7 Funktioneller Nachweis einer erworbenen immunologischen Toleranz gegen den VX2-Tumor nach Reimplantation des VX2-Tumors (Teilversuch 3)

Zum Nachweis einer andauernd erworbenen VX2-Tumorresistenz durch die O₃/O₂-PP-Behandlung wurde bei den verbliebenen 3 Kaninchen, die durch O₃/O₂-PP-Behandlung geheilt worden waren, 18 Monate nach Abschluss des Teilversuchs 1 eine erneute aurikuläre VX2-Tumorzellinokulation vorgenommen. Als Kontrolle für das tumorigene Potenzial der eingesetzten VX2-Tumorzellsuspension dienten weitere 4, bisher unbehandelte, gesunde Tiere, die zum ersten Mal eine VX2-Tumorzellinjektion erhielten. Hierbei wurde bei allen der O₃/O₂-PP-behandelten, tumorfreien Tieren eine VX2-Tumorresistenz nachgewiesen, welche sich durch das Ausbleiben des Wachstums eines soliden VX2-Tumors am Ohr zeigte (Abb. 3.25). Der Bereich der Tumorinokulation zeigte lediglich eine Rötung, welche nach wenigen Tagen der Injektion der Tumorzellsuspension zurückging.

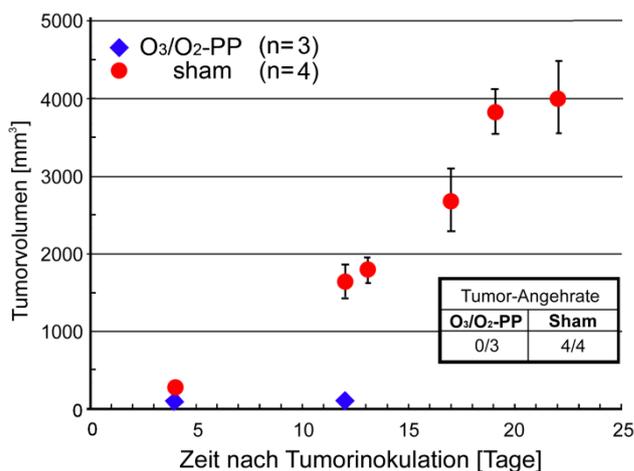


Abb. 3.25: Tumorentwicklung nach VX2-Reimplantation

Entwicklung des Tumolvolumens bei Tieren, welche zum ersten Mal eine VX2-Tumorzellinjektion erhielten (Sham) sowie Tiere, welche durch die O₃/O₂-PP-Behandlung geheilt worden waren und 18 Monate nach Abschluss des Teilversuchs 1 eine erneute Tumoringokulation erhielten (O₃/O₂-PP). Gezeigt sind Mittelwerte ± Standardfehler. Die Tabelle zeigt die Angehrate des VX2-Tumors innerhalb der zwei Gruppen.

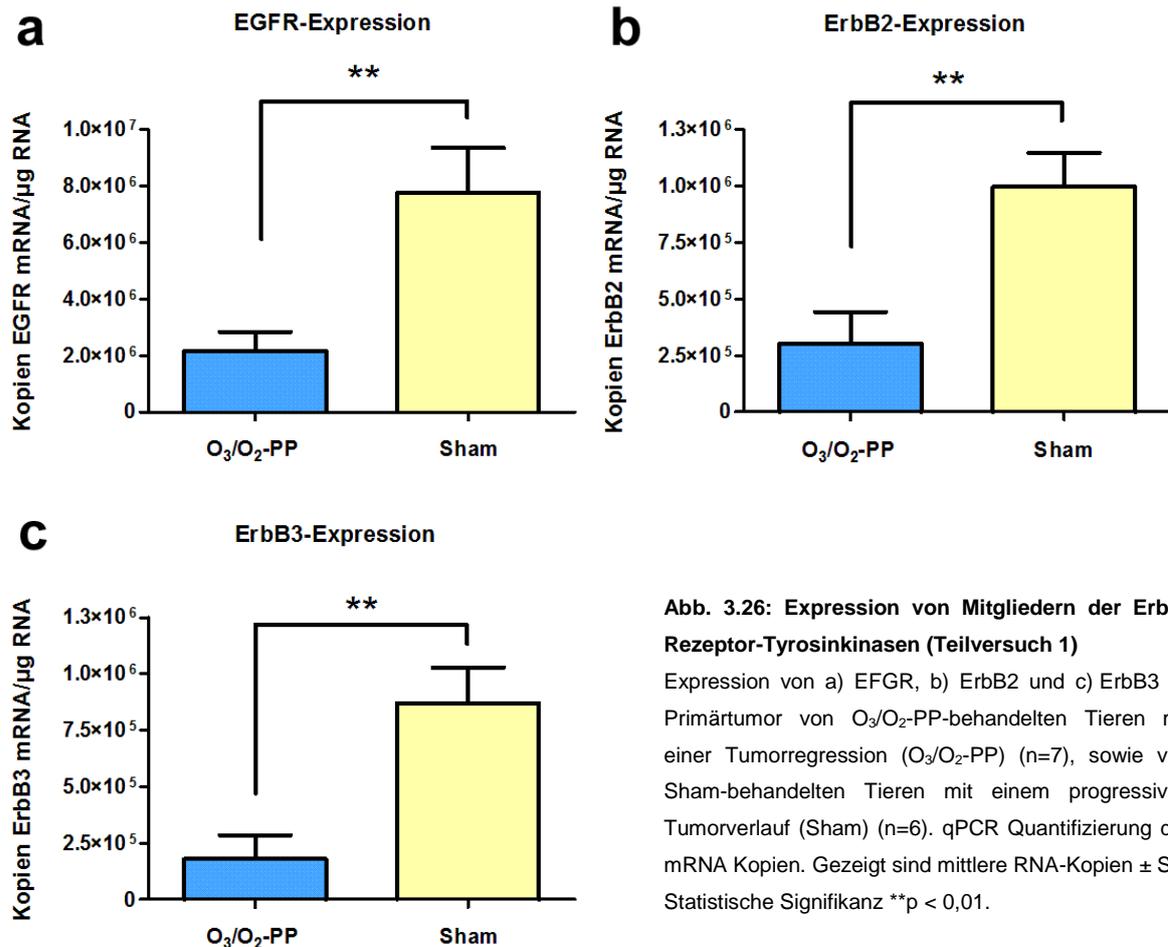
Dagegen entwickelte sich bei allen Tieren der Kontrollgruppe ein solider VX2-Tumor, der einen typischen progressiven Wachstumsverlauf aufwies. Anhand der 100%-igen Angehrate der VX2-Tumorzellsuspension mit Bildung eines soliden Tumors bei den Kontrolltieren wird auch die hohe Tumorigenität der verwendeten VX2-Tumorzellsuspension sichtbar.

3.8 Wirkung der O₃/O₂-PP-Behandlung auf wachstumsregulatorische Mechanismen der VX2-Tumorregression

Das Wachstum von Zellverbänden und Geweben hängt in vielen Fällen von der lokalen Präsenz von wachstumsfördernden Faktoren ab. Dies gilt besonders für stark proliferative Gewebe wie das VX2-Tumorgewebe. Neben Immunzell-vermittelten tumoriziden Wirkungen könnte deshalb auch eine Herunterregulation wachstumsfördernder Mediatoren oder deren Rezeptoren im Tumorgewebe für die Remission des VX2-Tumors ursächlich verantwortlich sein. Um den Einfluss der O₃/O₂-PP-induzierten Tumorremission durch Wachstumsfaktoren zu untersuchen wurde die Expression der ErbB-Rezeptorfamilie im Tumorgewebe analysiert. Die Mitglieder dieser Rezeptor-Tyrosinkinase Familie tragen durch proliferationsfördernde und antiapoptotische Wirkungen in hohem Maße zum Wachstum von HNSCC-Tumoren bei. Zur Beantwortung der Frage, ob eine Reduktion von Rezeptoren der ErbB-Familie kausal verantwortlich für die beobachtete Tumorremission im VX2-Karzinom ist, wurde die Genexpression der ErbB-Rezeptoren EGFR, ErbB2, ErbB3 und ErbB4 untersucht. Hierzu wurde in regressiven und progressiven Tumoren die mRNA Expression einerseits quantitativ durch qPCR gemessen und andererseits ihre Lokalisation mittels *in situ* Hybridisierung bestimmt.

3.8.1 Expression von ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinasen im VX2-Tumorgewebe

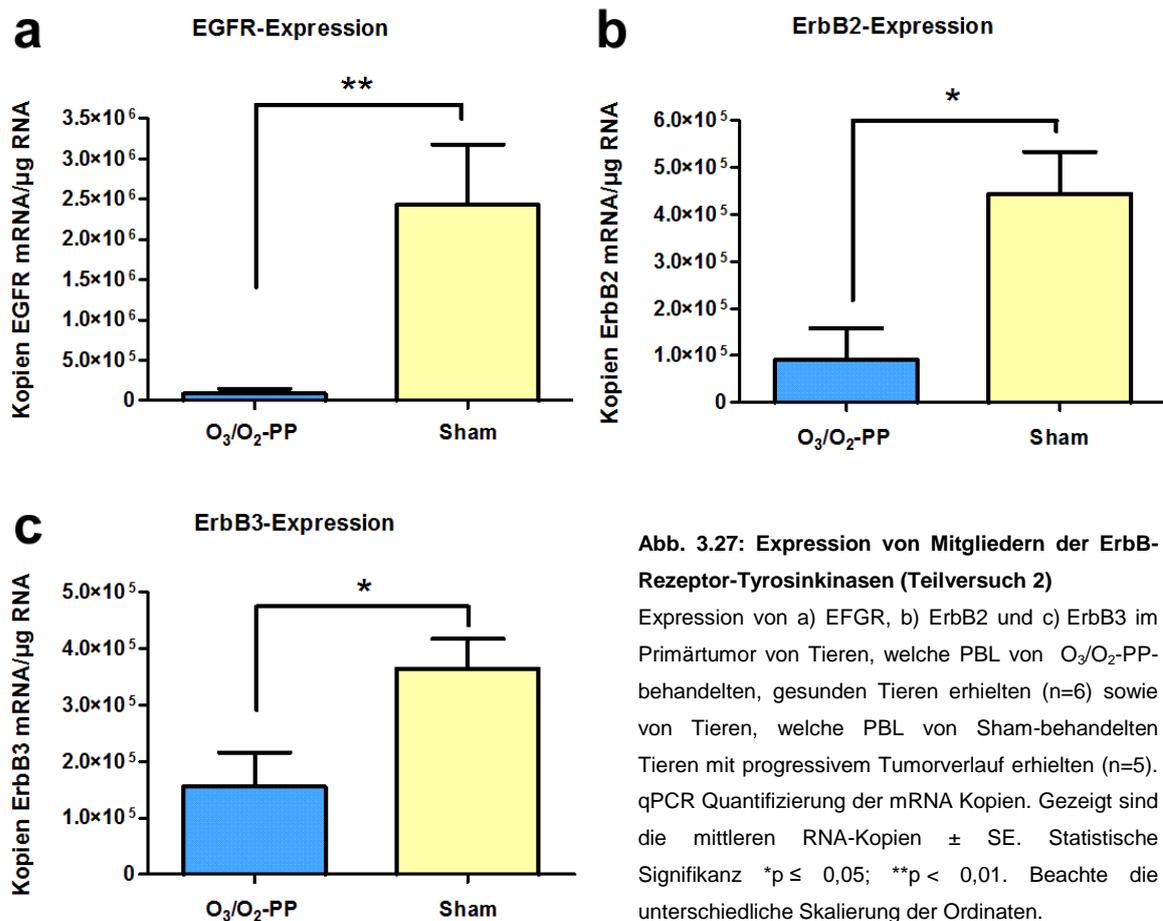
Zur absoluten Quantifizierung der, im Tumor vorliegenden, ErbB-Rezeptor mRNA-Spiegel wurde mittels RT-qPCR eine Standardkurve der jeweiligen Ziel-mRNA-Amplifikate angefertigt anhand derer die absolute Anzahl der Template (Kopien/ μg RNA) ermittelt werden konnte. Die mRNAs der drei ErbB-Rezeptoren EGFR, ErbB2 und ErbB3 waren im Tumorgewebe nachweisbar. Dagegen konnte die ErbB4 mRNA in keinem der Tumoren detektiert werden.



Die absolute Quantifizierung der EGFR, ErbB2 und ErbB3 mRNAs wies bei allen 3 ErbB-Rezeptoren eine signifikant niedrigere Expression in regressiven Tumoren O₃/O₂-PP-behandelter Tiere im Vergleich zu progressiven Tumoren Sham-behandelter Tiere auf (Abb. 3.26). Bei regressiven Tumoren lag die EGFR-Expression bei $2,2 \times 10^6$ Kopien/ μg RNA (Abb. 3.26a). ErbB2 und ErbB3 zeigten eine geringere Genexpression als EGFR in regressiven Tumoren, die bei durchschnittlich $3,0 \times 10^5$ Kopien/ μg RNA bzw. $1,8 \times 10^5$ Kopien/ μg RNA lag (Abb. 3.26b/c). Mit $7,8 \times 10^6$ Kopien/ μg RNA in progressiven Tumoren

wies der EGFR die höchsten gemessenen Expressionsspiegel auf (Abb. 3.26a). ErbB2 und ErbB3 zeigten mit durchschnittlich $9,3 \times 10^5$ Kopien/ μg RNA geringere aber untereinander nahezu übereinstimmende Expressionsspiegel in progressiven Tumoren (Abb. 3.26b/c).

Übereinstimmend mit diesen Daten zeigte sich auch im adoptiven Transferexperiment eine signifikant geringere Expression der drei ErbB-Rezeptoren in den regressiven Tumoren im Vergleich zu den progressiven Tumoren (Abb. 3.27).



In regressiven Tumoren lag die Expression von EGFR, ErbB2 und ErbB3 bei $8,4 \times 10^4$ Kopien/ μg RNA; $9,1 \times 10^4$ Kopien/ μg RNA sowie $1,6 \times 10^5$ Kopien/ μg RNA (Abb. 3.27). In progressiven Tumoren wies der EGF-Rezeptor mit durchschnittlich $2,4 \times 10^6$ Kopien/ μg RNA, ebenso wie in den Tumoren des Teilversuchs 1, die höchste Expression auf (Abb. 3.27a). Dagegen zeigten ErbB2 und ErbB3 in diesen Tumoren eine Expression von durchschnittlich $4,0 \times 10^5$ Kopien/ μg RNA (Abb. 3.27b, c).

Zusammenfassend konnte eine signifikant höhere Expression der drei ErbB-Rezeptoren in progressiven Tumoren gegenüber regressiven Tumoren beobachtet werden. Dies gilt sowohl für die Expression in regressiven Tumoren in Folge einer O_3/O_2 -PP-Behandlung als auch nach adoptivem Transfer tumorresistenter PBL.

3.8.2 Histomorphologische Zuordnung der ErbB mRNA innerhalb des VX2-Tumors

Die Lokalisation der nachgewiesenen mRNAs innerhalb des Tumorgewebes soll Aufschluss darüber geben, in welchem Teil des Tumorgewebes die einzelne ErbB-Rezeptor mRNA exprimiert ist (a) und ob die nachgewiesene Reduktion in den Expressionsspiegeln in regressiven Tumoren auf präferentielle Regionen (Tumorzentrum, Tumorrand, umgebendes Stromagewebe) beschränkt sind (b). Der histologische Nachweis erfolgte mittels *in situ* Hybridisierung von radioaktiv markierten cRNA-Sonden spezifisch für den jeweiligen ErbB-Rezeptor. Die Sequenzspezifität der selbst klonierten Sonden wurde im Vorfeld mittels Sequenzierung und Sequenzabgleich durch die *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) Datenbank überprüft. Die histologische Analyse der hybridisierten Gewebeschnitte im Mikroskop erfolgte im Dunkelfeld als auch im Hellfeld.

Im Dunkelfeld wird die Expression des jeweiligen ErbB-Rezeptors durch weiß leuchtende Signale in der Fotoemulsion sichtbar. In der Hellfeldanalyse, die zusätzlich eine histologische Färbung sichtbar werden lässt, werden positive Signale durch schwarze Kristalle in der Fotoemulsion sichtbar. Die als Kontrolle eingesetzten *sense*-Sonden zeigten bei keinen Gewebeschnitten positive Signale oberhalb der Hintergrundsignale.

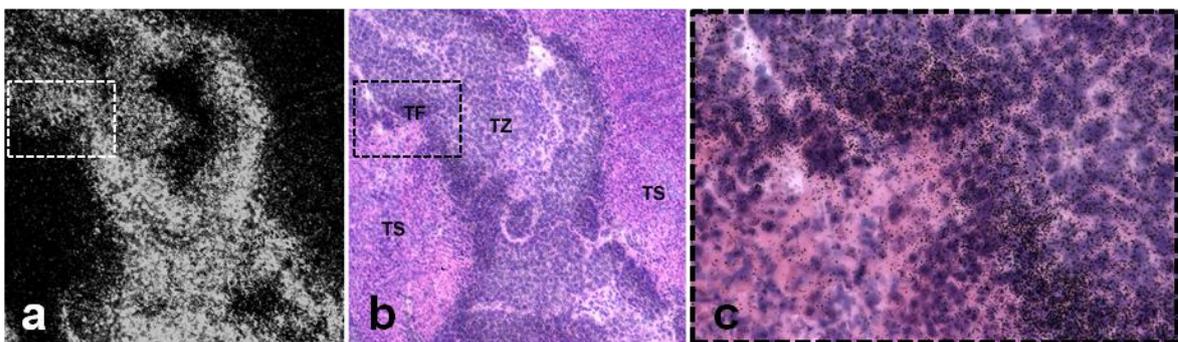


Abb. 3.28: Histologische Darstellung von EGFR mRNA im progressiv wachsenden Primärtumor nach Sham-Behandlung

In situ Hybridisierung mit ^{35}S -markierten EGFR-Sonden im Dunkelfeld (a) und Hellfeld (b). (c) Vergrößerung des eingerahmten Bereiches. TF: Tumorfront; TZ: Tumorzentrum; TS: Tumorstroma

Der EGF-Rezeptor wurde im progressiv wachsenden Tumorgewebe exprimiert. Hier wurde EGFR von den eigentlichen VX2-Tumorzellen exprimiert, nicht aber von Bystander-

Zellen im Tumorstroma. Im Bereich der Tumorzellinseln fanden sich die höchsten Expressionsspiegel in der Tumorfront. (Abb. 3.28) Im Gewebe von Tumoren, die sich regressiv entwickelten, ließ sich ebenfalls die Expression der EGFR mRNA in VX2-Tumorzellen der Tumorfront nachweisen (Abb. 3.29). Allerdings war die Signalstärke der Hybridisierungssignale optisch deutlich geringer als die, in den progressiv wachsenden Tumoren. Dieses Ergebnis bestätigt die Reduktion der EGFR mRNA in regressiven Tumoren, die in der RT-qPCR quantitativ ermittelt wurde und zeigt, dass die Abnahme der EGFR mRNA auf einer global verringerten Genexpression in allen Tumorzellen beruht.

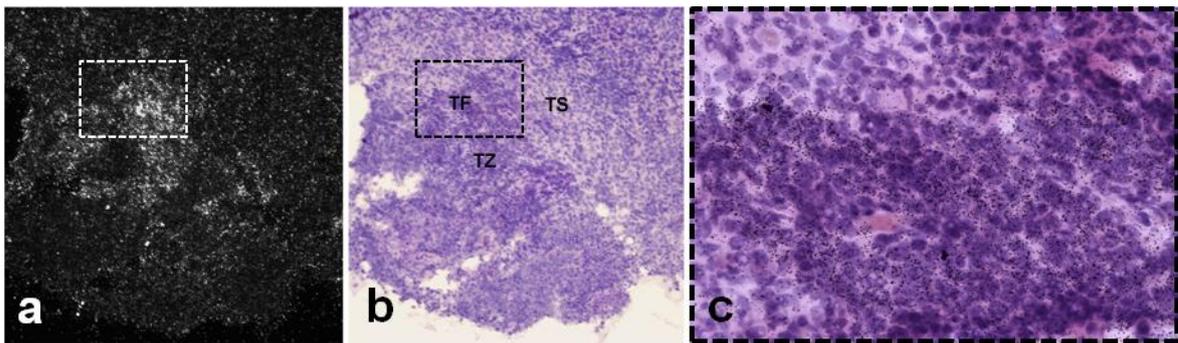


Abb. 3.29: Histologische Darstellung von EGFR mRNA im regressiven Primärtumor nach O₃/O₂-PP-Behandlung
In situ Hybridisierung mit ³⁵S-markierten EGFR-Sonden im Dunkelfeld (a) und Hellfeld (b). (c) Vergrößerung des eingekrehten Bereiches. TF: Tumorfront; TZ: Tumorzentrum; TS: Tumorstroma

Die Rezeptoren ErbB2 (Abb. 3.30) und ErbB3 (Abb. 3.32) zeigten eine vermehrte Expression im progressiv wachsenden Tumorgewebe. Die Genexpression beider Rezeptoren war ebenfalls auf die eigentlichen VX2-Tumorzellen beschränkt, wies aber im Gegensatz zur EGFR Expression eine gleichmäßige Verteilung innerhalb der gesamten Tumorbereiche auf.

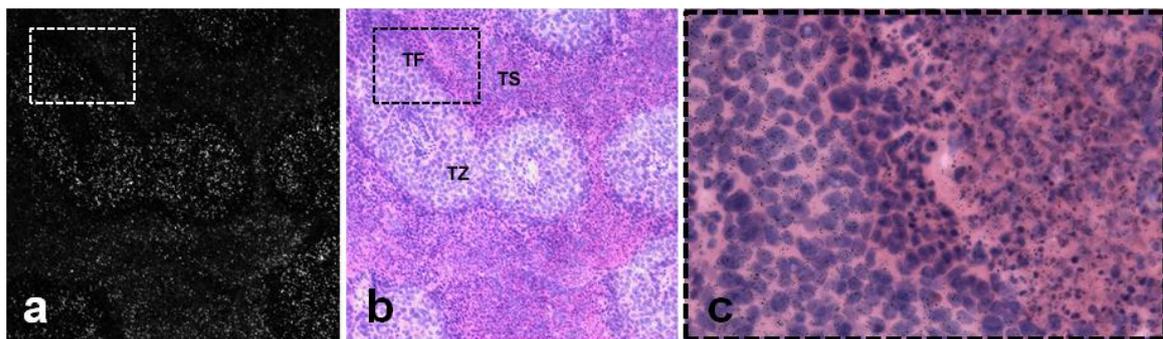


Abb. 3.30: ErbB2-Expression im progressiven Primärtumor eines Sham-behandelten Tieres
In situ Hybridisierung mit radioaktiv markierten ErbB2-Sonden im Dunkelfeld (a) und Hellfeld (b). Rechts: Vergrößerung des eingekrehten Bereiches der anderen beiden Bilder (c). TF: Tumorfront; TZ: Tumorzentrum; TS: Tumorstroma

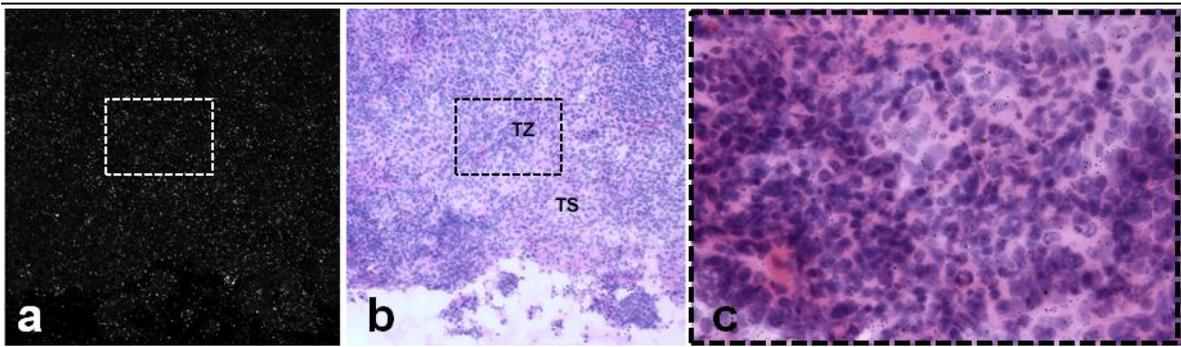


Abb. 3.31: ErbB2-Expression im regressiven Primärtumor eines O_3/O_2 -PP-behandelten Tieres

In situ Hybridisierung mit radioaktiv markierten ErbB2-Sonden im Dunkelfeld (a) und Hellfeld (b). Rechts: Vergrößerung des eingerahmten Bereiches der anderen beiden Bilder (c). TF: Tumorfront; TZ: Tumorzentrum; TS: Tumorstroma

In regressiven Tumoren zeigte sich für beide Rezeptoren eine Abnahme in der Signalstärke, die ebenso wie bei EGFR, die Gesamtheit der Tumorzellen betraf (Abb. 3.31; 3.33).

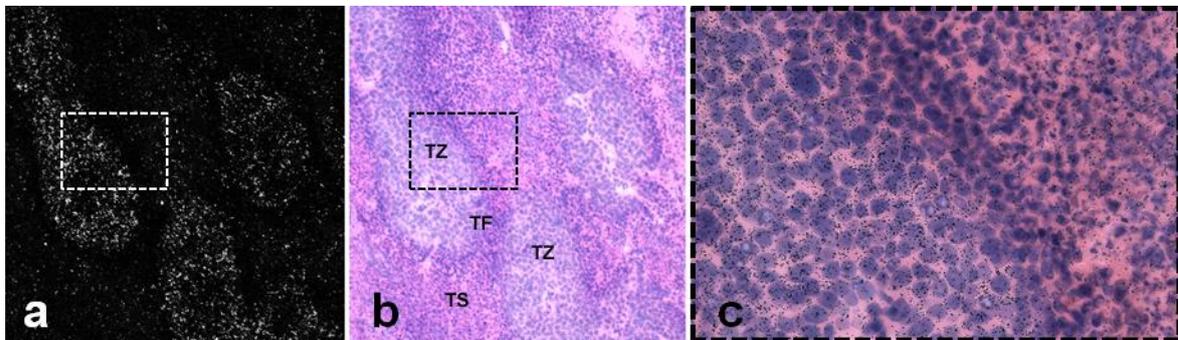


Abb. 3.32: ErbB3-Expression im progressiven Primärtumor eines Sham-behandelten Tieres

In situ Hybridisierung mit radioaktiv markierten ErbB3-Sonden im Dunkelfeld (a) und Hellfeld (b). Rechts: Vergrößerung des eingerahmten Bereiches der anderen beiden Bilder (c).

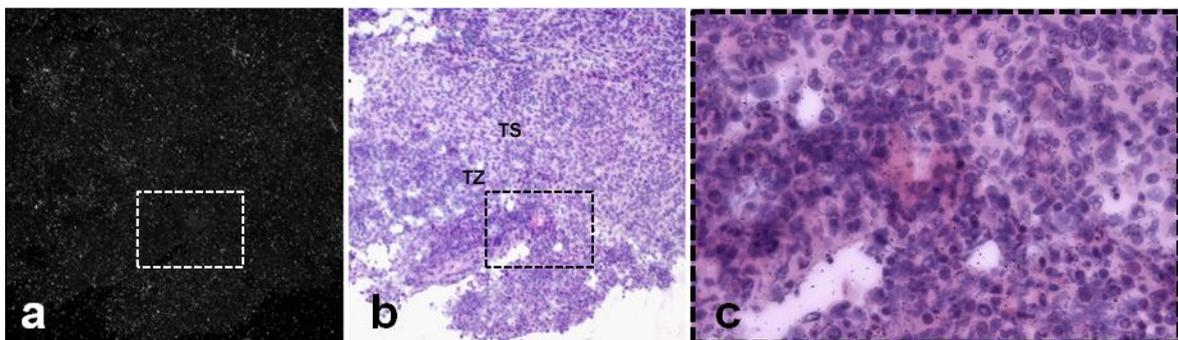


Abb. 3.33: ErbB3-Expression im regressiven Primärtumor eines O_3/O_2 -PP-behandelten Tieres

In situ Hybridisierung mit radioaktiv markierten ErbB3-Sonden im Dunkelfeld (a) und Hellfeld (b). Rechts: Vergrößerung des eingerahmten Bereiches der anderen beiden Bilder (c).

Insgesamt zeigt die Analyse der Wachstumsfaktor-Rezeptoren, dass spezifisch die VX2-Tumorzellen diese Rezeptoren im soliden Tumorgewebe exprimieren und dass die O_3/O_2 -PP-Behandlung hierauf einen hemmenden Einfluss ausübt. Die Reduktion

wachstumsfördernde Signale durch spezifische Rezeptoren detektieren zu können scheint damit, neben den Immunzell-basierten Vorgängen ein zweiter möglicher Wirkmechanismus zu sein, der zu dem tumoriziden Effekt der O₃/O₂-PP-Behandlung beiträgt.

3.9 Nachweis der Expression Papillomavirus-spezifischer Gene im VX2-Tumor

Der VX2-Tumor ist ein squamöser Tumor, der durch die Infektion von Keratinozyten mit dem Shope Papillomavirus, entstanden ist. Im Laufe der Zeit hat der Tumor seine Virulenz sowie seine Immunogenität verloren, es ist jedoch unbekannt, ob eine mögliche Präsenz viraler Komponenten des Shope Papillomavirus innerhalb der VX2-Tumoren, nach wie vor für die Tumorigenität verantwortlich ist. Um diese Frage zu klären, wurden VX2-Tumorgewebe auf das Vorliegen der Shope Papillomavirus-assoziierten Onkogene E5, E6 und E7 hin analysiert. Die Genprodukte E6 und E7 waren trotz Testung unterschiedlicher Oligonukleotid-Primerpaare innerhalb des VX2-Tumors nicht nachweisbar, wohingegen das E5-Onkogen erfolgreich isoliert und quantifiziert werden konnte.

In regressiven Tumoren von O₃/O₂-PP-therapierten Tieren zeigte sich eine signifikant geringere E5-Expression verglichen mit progressiven Tumoren Sham-behandelter Tiere (Abb. 3.34a).

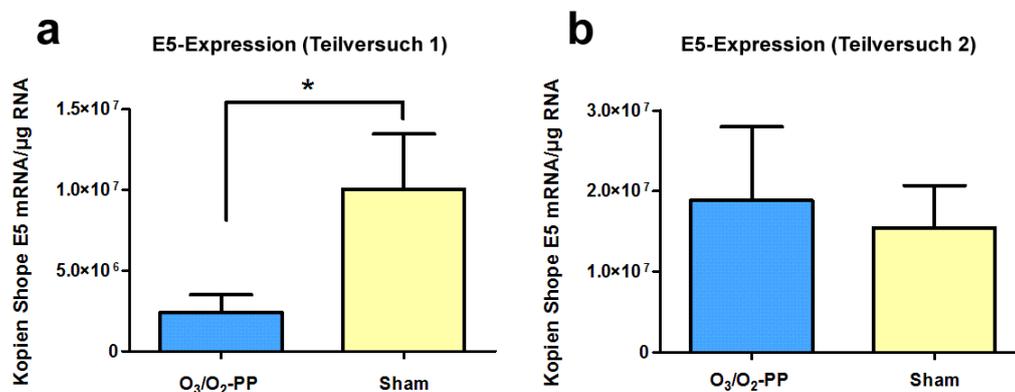


Abb. 3.34: Expression von E5-mRNA im VX2-Karzinom

Expression des Shope E5-Onkogen a) im Primärtumor O₃/O₂-PP-behandelter Tiere mit Tumorregression (O₃/O₂-PP) (n=7) und Sham-behandelte Tiere mit progressivem Tumorverlauf (Sham) (n=6) und b) im Primärtumor von Tieren, welche PBL von O₃/O₂-PP-behandelten, gesunden Tieren erhielten (n=6) sowie von Tieren, welche PBL von Sham-behandelten Tieren mit progressivem Tumorverlauf erhielten (n=5). qPCR Quantifizierung der mRNA Kopien. Gezeigt sind die mittleren RNA-Kopien ± SE. Statistische Signifikanz *p ≤ 0,05.

Die E5-Expression lag bei regressiven Tumoren von Tieren des Tierversuchs 1 bei durchschnittlich $2,4 \times 10^6$ Kopien/ μg RNA, bei progressiven Tumoren dagegen bei $1,0 \times 10^7$ Kopien/ μg RNA (Abb. 3.34a). Die E5-Expression in regressiven Tumoren von Tieren des Tierversuchs 2 (adoptiver Zelltransfer) zeigte dagegen keinen signifikanten Unterschied in der Expressionsstärke zwischen regressiven und progressiven Tumoren (Abb. 3.34b).

4 Diskussion

4.1 Die antitumorigene Wirkung der O₃/O₂-PP-Behandlung

Ozon ist ein stark oxidativ wirkendes Gas, bestehend aus 3 Sauerstoffatomen, das durch Einatmen zu starken Reizungen der Lunge bis hin zu irreversiblen Schäden führen kann. Gerade die Reaktionsfreudigkeit des Ozons auf Zellen hat dieses Gas für die medizinische Anwendung interessant gemacht. Dabei stand zunächst die desinfizierende Wirkung gegen Mikroben im Vordergrund. Bereits seit den 80-iger Jahren wird aber auch der Nutzen des Ozons bei der Tumorthherapie diskutiert. Demnach berichtete das Journal *Science* im Jahr 1980 über einen wachstumshemmenden Effekt des Ozons bei menschlichen Tumorzellen (alveoläres Adenokarzinom, Karzinosarkom, Adenokarzinom) *in vitro* und zeigte damit erstmals einen antitumorigenen Effekt von Ozon (Sweet F. et al. 1980). Im Jahr 2008 zeigten Schulz et al., dass die wiederholte intraperitoneale Applikation des O₃/O₂-Gemisches eine effiziente antitumorigene Wirkung auf einen soliden squamösen Tumor *in vivo* ausübt. Am Modell des VX2-Karzinoms beim NZW-Kaninchen konnte beobachtet werden, dass die intraperitoneale Applikation des O₃/O₂-Gemisches bei 50 % der tumor Erkrankten Tiere zu einer vollständigen Regression des aurikulären Primärtumors führt. Eigene tierexperimentelle Studien an diesem Modell führten zu einer vergleichbaren Heilungsrate von 70 % (Remission des Primärtumors) und liefern damit den Beweis der Reproduzierbarkeit dieses Therapieansatzes.

Als ein erster experimenteller Ansatz zum Nachweis des zugrundeliegenden Wirkmechanismus wurden im Rahmen der Studie von Schulz und Kollegen Reimplantationsversuche von VX2-Tumoren an bereits geheilten Tieren vorgenommen. Dieser funktionelle Ansatz ergab, dass mit der Therapie-induzierten Tumorremission die Tiere auch eine Resistenz gegen das VX2-Karzinom erworben hatten. Erst eine breit wirksame Immunsuppression durch Gabe von Dexamethason und Cyclosporin A vor Injektion der VX2-Tumorzellsuspension resultierte in einem Verlust der erworbenen Toleranz und ermöglichte ein erneutes Anwachsen der VX2-Tumorzellen (Schulz S. et al. 2008). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass intraperitoneal appliziertes Ozon eine tumorizide Immunantwort auszulösen scheint.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Parameter analysiert und deren Bedeutung für die Tumorremission differenziert. Im Zentrum der

Analysen standen Induktoren und Mediatoren einer Immunantwort sowohl des angeborenen wie des erworbenen Immunsystems als auch die Expression wachstumsfördernder Faktoren im Tumorgewebe. Darüber hinaus wurden Daten über noch vorhandene virale Komponenten des Papillomavirus-assoziierten VX2 Tumors erhoben.

4.1.1 Mögliche Aktivierungswege des Ozons zur Generierung einer tumoriziden Immunantwort

Die hohe oxidative Reaktivität des Ozons lässt es unter Berücksichtigung der kurzen Halbwertszeit als sehr wahrscheinlich erscheinen, dass die therapeutische Wirkung, die das Ozon auf den aurikulären VX2-Tumor ausübt, bereits in der Peritonealhöhle zur Generierung einer antitumorigenen Immunantwort führt. Eine Passage von Ozon durch Zellen ist daher weniger wahrscheinlich. Biochemische Daten zeigten, dass lediglich ein sehr geringer Anteil einer Ozon-Dosis eine Biomembran unverändert durchdringen kann (Pryor W.A. et al. 1995). In der Peritonealhöhle kann das Ozon an verschiedenen Zellen oder löslichen Faktoren in der Peritonealflüssigkeit angreifen. Hierbei ist der Aufbau der Peritonealhöhle zu berücksichtigen.

Die Peritonealhöhle ist in Kaninchen, gleichermaßen wie beim Menschen, von einer Peritonealmembran ausgekleidet. Die Peritonealmembran bedeckt die Mesenterien, die Omenti (majus et minus) sowie alle intraperitoneal-liegenden Organe. Zentrale Stellen des immunologischen Abwehrsystems im Bauchraum finden sich direkt in den, der Peritonealhöhle anliegenden Omenti, einem gut vaskularisiertem Fettgewebe, in das zahlreiche Cluster von Leukozyten eingelagert sind, den sogenannten „milky spots“ (Shimotsuma M. et al. 1993) sowie den als Peyers Patches bezeichneten Lymphfollikeln im Dünndarm (Makala L.H. et al. 2002). Auch innerhalb der Peritonealflüssigkeit finden sich unter physiologischen Bedingungen freie Immunzellen, wie Makrophagen, B-Zellen und T-Zellen. In der Peritonealflüssigkeit sowie den angrenzenden Peyers Patches und „milky spots“ findet sich ein ideales immunologisches Milieu, das es dem Immunsystem ermöglicht, den Bauchraum keimfrei zu halten. (Berberich S. et al. 2008; Sorensen E.W. et al. 2009; Ray A. and Dittel B.N. 2010; Sedlacek A.L. et al. 2013)

Aller Wahrscheinlichkeit nach moduliert das, in die Peritonealhöhle insufflierte Ozon die, in der Peritonealflüssigkeit oder in den unmittelbar angrenzenden Peyers Patches und „milky spots“ lokalisierten, Immunzellen. Diese Modulation scheint zunächst weitestgehend unselektiv für verschiedene Subpopulationen von

Leukozyten zu sein und dabei eine Aktivierung, als auch eine Suppression bis hin zur Destruktion zu beinhalten. Relevant für den tumoriziden Effekt des Ozons und den therapeutischen Erfolg des O_3/O_2 -PPs ist die Wirkung auf spezifische Immunzellen, die Einfluss auf die Tumorentwicklung nehmen können; im Folgenden als tumorspezifische Leukozyten bezeichnet. Die Funktion dieser tumorspezifischen Leukozyten kann dabei sowohl anti- als auch pro-tumorigen sein. Zur Modulation (Stimulation / Inhibition / Destruktion) von tumorspezifischen Leukozyten durch das O_3/O_2 -Gasgemisch sind prinzipiell zwei Mechanismen denkbar: a) durch direkten Kontakt oder b) über eine Oxidation löslicher Faktoren, welche die Bildung von immunstimulatorisch wirksamen ROS oder DAMPs zur Folge hat (Zusammenfassung möglicher Aktivierungswege siehe Abb. 4.1).

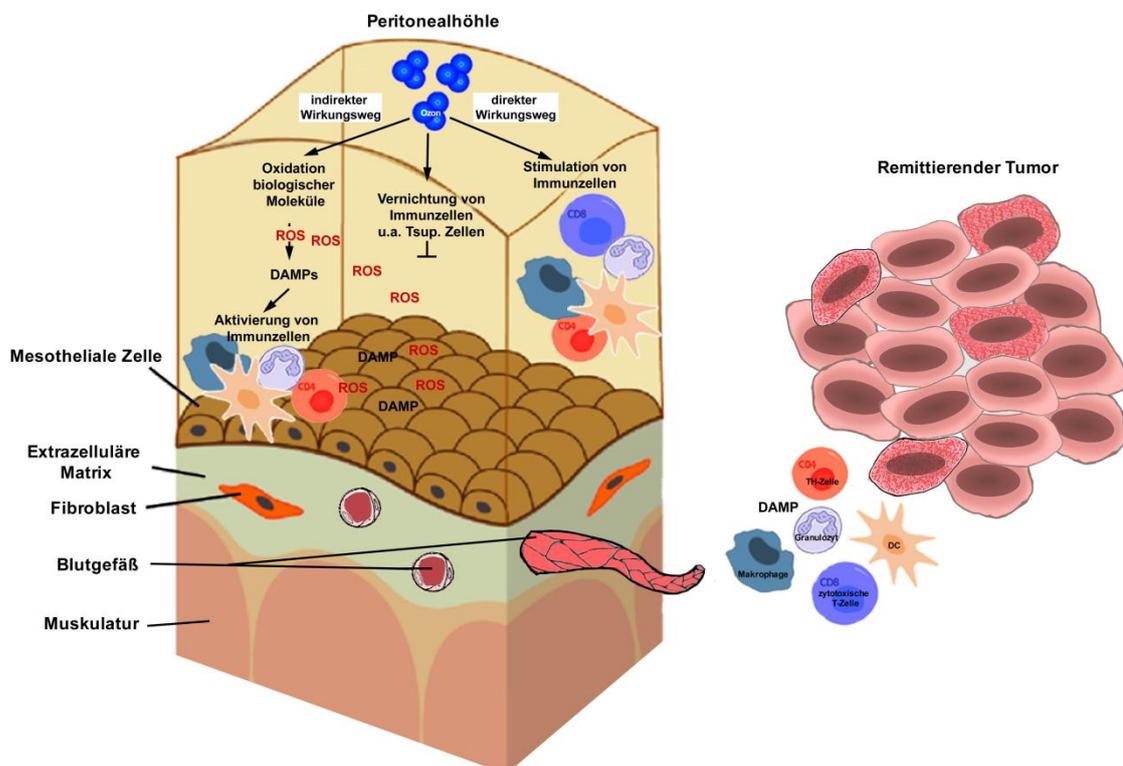


Abb. 4.1: Modell für mögliche Wirkmechanismen des O_3/O_2 -Gasgemisches innerhalb der Peritonealhöhle

Innerhalb der Peritonealhöhle kann Ozon a) Immunzellen direkt stimulieren (direkter Wirkungsweg) oder b) indirekt über die Bildung von ROS und DAMP (indirekten Wirkungsweg) oder aber c) die Vernichtung von Immunzellen, wie suppressiven T-Zellen hervorrufen, sodass die antitumorigene Antwort dieser Zellen unterbunden wird. Die Zirkulation der DAMPs, ROS sowie intraperitoneal aktivierten Immunzellen über die Blutgefäße führt zu einer komplexen antitumorigenen Immunantwort innerhalb des Tumorgewebes. [Eigene Darstellung; die Peritonealhöhle wurde aus (Aguilera A. et al. 2013) übernommen, einem *open-access* Artikel, was die uneingeschränkte Nutzung erlaubt.]

Die Möglichkeit einer Stimulation des O_3/O_2 -Gasgemisches von intraperitoneal-zirkulierenden und antitumorigen wirkenden Immunzellen durch direkten Kontakt an den Zellen wird durch *in vitro* Studien gestützt, die zeigten, dass Ozon die Freisetzung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 β , IFN γ und TNF bei isolierten mononukleären Zellen beeinflusst (Ishii Y. et al. 1997; Larini A. and Bocci V. 2005). *In vivo* führt eine pulmonale Ozonexposition zur epithelialen Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, wie IL-6, IL-8 und TNF- α und kann in einer Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten resultieren (Li Z. et al. 2013).

Neben der Stimulation von Immunzellen besteht aufgrund der zelltoxischen Wirkung (Gabrielson E.W. et al. 1994; Huth K.C. et al. 2006) von Ozon bei direktem Zellkontakt ebenfalls die Möglichkeit einer Destruktion der Immunzellen. Dies muss nicht notwendigerweise zu einem Verlust der antitumorigenen Immunantwort und einem, infolgedessen ungehinderten Tumorwachstum führen. Im Falle einer immunzelltoxischen Wirkung des Ozons ist es denkbar, dass unter der nicht selektiven zelltoxischen Wirkung auch solche tumorspezifischen Leukozyten eliminiert werden, die im tumorerkrankten Organismus eine überwiegend protumorigene Wirkung haben, indem sie dazu beitragen, dass der Tumor von antitumorigenen Immunzellen nicht erkannt oder attackiert wird. Dieses als „Immunevasion“ bezeichnete Phänomen kann, wie man heute weiß u.a. durch regulatorische und suppressive T-Lymphozyten vermittelt werden, die durch die Hemmung von tumorspezifischen Zellen, einschließlich zytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen, den Tumor vor dem Angriff durch das Immunsystem schützen (Nishikawa H. and Sakaguchi S. 2010).

Weiterhin könnte Ozon auf einem indirekten Weg, durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (Bocci V.A. 2006) und DAMPs (Li Z. et al. 2013) zu einer Stimulierung des Immunsystems führen. Hierbei steht die hohe oxidative Kapazität des Ozons im Vordergrund. Ein möglicher Angriffspunkt von Ozon ist in diesem Zusammenhang die Peritonealmembran innerhalb der Peritonealhöhle, die, ähnlich wie die Pleura (Agostoni E. and Zocchi L. 2007), aus einer Schicht mesothelialer Zellen besteht, unter der Submesothelium, Kollagenfibrillen sowie Kapillaren liegen (Mutsaers S.E. 2002; Yung S. et al. 2006; Yung S. and Chan T.M. 2011).

Die Peroxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, Proteinen und Polysacchariden innerhalb der Zellmembranen mesothelialer Zellen, und in löslicher Form in Körperflüssigkeiten, durch Ozon könnte in der Bildung von ROS resultieren,

zu denen Peroxyradikale, Hydroxyperoxide und Malondialdehyd gehören (Pryor W.A. et al. 1995; Sunil V.R. et al. 2012). ROS können, durch eine Hochregulation von Oberflächenmolekülen (CD80, CD83 und CD86) zu einer Reifung von Antigen-präsentierenden DC führen (Kantengwa S. et al. 2003), was im Fall der O₃/O₂-PP-Behandlung zu einer verbesserten Antigenpräsentation von tumorspezifischen Faktoren führen könnte.

Zentraler Bildungsort von DAMPs in der Peritonealhöhle ist ebenfalls das Mesothel. Mesothelien synthetisieren Glycosaminoglykane, Phospholipide und Proteoglykane innerhalb der mesothelialen Glykokalyx, einer nicht adhäsiven Schicht, welche die Peritonealmembran vor Reibungen und Infektionen schützt. Ein bekanntes Glycosaminoglykan stellt die Hyaluronsäure dar. Sie ist ein nicht-verzweigtes Polysaccharid, bestehend aus aneinanderhängenden Disaccharid-Ketten, welche aus den Monomeren N-Acetylglucosamin und D-Glucuronsäure zusammengesetzt sind (Yung S. and Chan T. 2007). Hochmolekulare Hyaluronsäure (*high molecular weight Hyaluron*) kann einerseits physiologisch durch die Hyaluronidase (Auerbach A. and Hernandez M.L. 2012), andererseits durch ROS zu niedermolekularer Hyaluronsäure (*low molecular weight Hyaluron*) hydrolytisch gespalten werden (Soltes L. et al. 2006; Manzanares D. et al. 2007; Yung S. and Chan T.M. 2011), die dann als DAMP im Körper fungieren kann. Durch die Bildung von ROS nach O₃/O₂-Insufflation kann somit die Synthese von DAMPs in der Peritonealhöhle erhöht werden und eine effektive Grundlage für die O₃/O₂-PP-induzierte Immunstimulation geschaffen werden. Zusätzlich verstärkt werden kann die Synthese von DAMPs durch eine direkte Wirkung des Ozons an der Hyaluronsäure. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass neben ROS auch Ozon zu einer Depolymerisation von Hyaluronsäure führt (Garantziotis S. et al. 2010; Hernandez M.L. et al. 2010; Li Z. et al. 2010; Feng F. et al. 2012).

Im Gegensatz zur ursprünglichen hochmolekularen Hyaluronsäure, welche protektive Funktionen innerhalb des Peritoneums einnimmt, agieren die niedermolekularen Fragmente als DAMPs mit Makrophagen, endothelialen Zellen und führen zur Reifung von DC (Termeer C.C. et al. 2000; Termeer C. et al. 2002). Sie stellen endogene Liganden für zahlreiche Rezeptoren mononukleärer Zellen dar, wie TLR4 (Termeer C.C. et al. 2000; Termeer C. et al. 2002; Garantziotis S. et al. 2010; Li Z. et al. 2013), CD44 (Garantziotis S. et al. 2009) und TLR2 (Scheibner K.A. et al. 2006; Yamawaki H. et al. 2009). Die so induzierte oder verstärkte Immunantwort basiert weitestgehend auf einer Induktion von Chemokinen, wie

MCP-1 und Zytokinen, wie IL-6 und IL-8 (Yung S. and Chan T. 2007; Yamawaki H. et al. 2009; Yung S. and Chan T.M. 2011; Li Z. et al. 2013). Als Folge einer lokalen Immunreaktion in der Peritonealhöhle kommt es zu einer verstärkten Migration von Leukozyten, insbesondere Monozyten und Neutrophilen, aus den Gefäßen über die mesotheliale Zellschicht in die Peritonealhöhle (Li F.K. et al. 1998; Mutsaers S.E. 2002). Im Falle der O₃/O₂-Gasgemisch-Insufflation in das Peritoneum würde dies den direkten Kontakt mit einer zunehmenden Zahl an Leukozyten erlauben und dadurch direkte Wirkungen des Ozons – wie oben diskutiert – verstärkt ermöglichen.

4.1.2 Auswirkung der O₃/O₂-PP-Behandlung auf Zellen des Immunsystems

Messungen der Blutparameter zeigten, übereinstimmend mit Daten aus der Arbeit von Schulz et al. 2008, eine signifikante Erhöhung der Zahl von weißen Blutzellen (WBC) über den Zeitraum der 5-tägigen O₃/O₂-PP-Behandlung, wobei die Zunahme noch im Bereich einer physiologischen Leukozytose anzusiedeln war. Sham-behandelte Tiere zeigten keine signifikante Veränderung in der Zahl der WBC, sodass der Effekt mit einer hohen Wahrscheinlichkeit durch die Wirkung des O₃/O₂-Gasgemisches im Peritoneum verursacht wird. Die Zunahme an WBC weist auf eine ubiquitäre Immunreaktion hin, die durch die systemische Präsenz vermehrter Leukozyten im Blut in alle Regionen und Organe des Körpers gelangt. Zirkulierende und durch das Ozon aktivierte antitumorogene Leukozyten können so zum Tumor gelangen, unabhängig von dessen Lokalisation.

Darüber hinaus weist die sehr geringe Metastasierungsfrequenz in O₃/O₂-PP-behandelten und geheilten Tieren auf eine systemisch im Körper verteilte Immunantwort hin. Lediglich bei 1 von 7 O₃/O₂-PP-behandelten Tieren konnten trotz Tumorremission Lymphknoten- als auch Lungenmetastasen diagnostiziert werden, wohingegen alle 6 Sham-behandelten Tiere, die einen progressiven Tumor aufwiesen, auch Lymphknotenmetastasen entwickelten. Eine, nicht nur auf den Primärtumor beschränkte, Immunantwort könnte in diesem Zusammenhang die Ursache für den Schutz vor Bildung und Ausbreitung von Metastasen in den 6 geheilten Tieren sein. Ob dieser systemische Schutz auch zur Elimination bereits bei Behandlungsbeginn im Körper vorhandener VX2-Metastasen beiträgt kann aufgrund der erst späteren PET-CT-Analysen gegenwärtig nicht beantwortet werden. Eine mögliche Ursache für die entstandenen Metastasen in dem, vom Primärtumor, geheilten Tier könnte das Phänomen des „seeding at implantation“ darstellen. Hierbei wird während der Tumorzellinokulation aufgrund des Injektionsdrucks eine unbeabsichtigte Infusion von Tumorzellen in die Blutgefäße

verursacht, was eine frühe Metastasierung in die Lungen zur Folge hat (Van Es R.J. et al. 2000).

Einen funktionellen Beweis für eine Immunzell-getriggerte VX2-Tumorregression liefert der, in dieser Arbeit durchgeführte, adoptive Zelltransfer peripherer Blutleukozyten (PBL). Der Transfer isolierter PBL ausschließlich von O₃/O₂-PP-behandelten und vom Tumor geheilten Tieren führte bei allen Empfängertieren zur Regression des Primärtumors. Dieser therapeutische Erfolg fand sich bei allen Empfängertieren, die zum Zeitpunkt des adoptiven Zelltransfers bereits an einem VX2-Tumor erkrankt waren sowie bei der Mehrzahl von Empfängertieren, die zeitlich parallel zum adoptiven Zelltransfer eine aurikuläre VX2-Tumorzellsuspension erhielten. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass sich nach einer O₃/O₂-PP-Behandlung ein immunologischer Schutz durch die Generierung tumorspezifischer Gedächtniszellen gebildet hat, vergleichbar mit dem Schutz nach Durchführung einer Vakzinierung.

In aktuellen Tumorthherapie-Strategien beim Menschen finden ebenfalls immunstimulatorische Ansätze zunehmend Beachtung mit teilweise vielversprechenden Ergebnissen. So zeigten *in vitro*-Stimulationen isolierter, endogener Antigen-spezifischer T-Zellen mit antigenpräsentierenden Zellen tumortherapeutische Erfolge (Benencia F. et al. 2012; Yee C. 2013). Eine in der Humanmedizin angewandte neue Methode, die der O₃/O₂-PP-Behandlung zumindest im Bezug auf die Aktivierung antitumorigener Leukozyten entspricht, ist der adoptive Zelltransfer. Hierbei werden Leukozyten, die zunächst aus dem Tumor eines Krebspatienten isoliert wurden, *in vivo* stimuliert und reimplantiert (Gattinoni L. et al. 2006; Rosenberg S.A. et al. 2008; Kirkwood J.M. et al. 2012; Restifo N.P. et al. 2012; Devaud C. et al. 2013; Yee C. 2013; Yu Y. et al. 2013; Zigler M. et al. 2013). Mit der Separation spezifisch aus einer Tumorbiopsie isolierter Leukozyten, den sogenannten tumorinfiltrierenden Leukozyten (TILs), erhofft man sich möglichst solche Leukozyten zu gewinnen, die spezifisch für diesen Tumor sind. Diese Methode wird limitiert durch chirurgisch nicht zugängige Tumoren oder eine sehr geringen Zahl von TILs in Tumorbiopsien. Die Effektivität der anschließenden *in vitro*-Stimulation ist nur so gut wie der verwendete Wachstumsfaktor (z.B. rekombinantes IL-2). Die Aufreinigung der *in vitro* stimulierten Zellen birgt dazu das hohe Risiko einer Kontamination von noch vorhandenen und ggf. ebenfalls stimulierten Tumorzellen, die dann zu einem erhöhten Metastasierungsrisiko führen könnten. Eine immunstimulierende Therapie, wie in der vorliegenden Arbeit

beschrieben, hätte daher den Vorteil, dass Immunzellen tumorforn (intraperitoneal) *in vivo* stimuliert werden können. Hierbei gelingt es eine Reaktivierung der *Tumorimmunosurveillance* (ein komplexer Prozess aus Zytokin-Generierung, Aktivierung von T- und B-Zellen sowie abschließender Tumor-Eliminierung (Finn O.J. 2012; Zigler M. et al. 2013)) im natürlichen Milieu des Körpers zu induzieren.

Neben den Ergebnissen des adoptiven Zelltransfers deutet die langzeitige Resistenz gegenüber dem VX2-Tumorgewebe auf eine Entstehung von langlebigen Gedächtniszellen des Immunsystems gegen den VX2-Tumor hin. Ein funktioneller Beweis hierfür waren Versuche, die zeigten, dass eine Reinokulation von VX2-Tumorzellen in O_3/O_2 -PP-behandelten Tieren mit remittierenden Tumoren nicht mehr möglich war. Diese Ergebnisse reproduzieren und bestätigen damit die Ergebnisse der Studie von Schulz et al., 2008. Die zum Zeitpunkt der VX2-Reimplantation über ein Jahr bestehende Toleranz gegen ein erneutes VX2-Tumorwachstum unterstützt die Annahme einer Beteiligung des adaptiven Immunsystems bei der Therapie-induzierten Tumorremission. Hierbei sind insbesondere T- und B-Gedächtniszellen zu nennen, welche durch einen wiederholten Kontakt mit Tumorantigenen aktiviert werden und zu einer Tumorzell-eradikation beitragen können (Camus M. and Galon J. 2010). Sie nehmen eine bedeutende Rolle bei der Prävention von Rezidiven ein. So steht eine hohe intratumorale Dichte von Gedächtniszellen mit einer Inhibierung der metastasierenden Invasivität in lymphovaskuläre Gefäße in Zusammenhang (Mlecnik B. et al. 2011). Desweiteren konnten CD45RO+ tumorinfiltrierende T-Gedächtniszellen in zahlreichen Tumoren, wie kolorektales Karzinom (Pages F. et al. 2005), ösophageales Plattenepithelkarzinom (Enomoto K. et al. 2012) und Magenkarzinomen (Wakatsuki K. et al. 2013) mit einer signifikanten Reduktion von Rezidiven sowie einer gesteigerten Überlebensrate in Verbindung gebracht werden (Pages F. et al. 2005; Enomoto K. et al. 2012; Wakatsuki K. et al. 2013).

4.1.3 Intratumoral, immunregulatorischer Effekt der O_3/O_2 -PP-Behandlung

Um solide Tumoren zur Regression zu bringen sind lokale Wirkungen im Tumor unabdingbar. Diese können entweder lösliche und vom Immunsystem unabhängig gebildete Faktoren beinhalten, die auf die Tumorzellen selber regulatorisch einwirken und zum Absterben der Zellen führen, oder sie basieren auf einer lokalen, gegen die Tumorzelle gerichteten, Immunantwort.

In der vorliegenden Studie kommen als lösliche immunsystem-unabhängige Faktoren einmal das zytotoxisch wirkende Ozon selbst, aber auch durch das Ozon gebildete ROS in Frage. Eine direkte wachstumshemmende Wirkung von Ozon auf humane Lungen-, Mamma- und Uterustumorzellen konnte zwar *in vitro* gezeigt werden (Sweet F. et al. 1980), aufgrund der hohen Reaktivität und kurzen Halbwertszeit des Ozons erscheint es jedoch unwahrscheinlich, dass intraperitoneal appliziertes O_3/O_2 -Gasgemisch selbst zum Tumorgewebe gelangen kann. Andere, lokal im Peritoneum gebildete ROS sowie DAMPs - induziert durch das insufflierte Ozon – kommen hierfür eher in Betracht. Sie könnten über den Blutstrom in das Tumorgewebe gelangen und dort direkt auf Tumorzellen einwirken. Für ROS wurde in diesem Zusammenhang gezeigt, dass eine stimulierte endogene Synthese von ROS in den Zellen selbst (Afzal S. et al. 2012), als auch die exogene Zufuhr dieser reaktiven Moleküle eine Hemmung der Proliferation und Steigerung der Apoptoserate von Tumorzellen zur Folge hat (Laurent A. et al. 2005).

Als entscheidender Impuls für die antitumorogene Immunantwort scheint aber die, durch das oxidative Gas ausgelöste, Inflammation innerhalb der Peritonealhöhle ursächlich zu sein, die letztlich zu einer effizienten Immunreaktion gegen den VX2-Tumor führt. Tumorregressionen nach vorausgegangenen Infektionen und Inflammationen konnten bereits in retrospektiven Untersuchungen festgestellt werden (Hobohm U. 2005; Sengupta N. et al. 2010). Hierbei werden die Immunzellen durch Produkte von Zellverletzungen und nekrotischem Zelltod sowie von bakteriellen Infektionen und Inflammationen für einen antitumorigenen „Immunangriff“ aktiviert (Abb. 4.2).

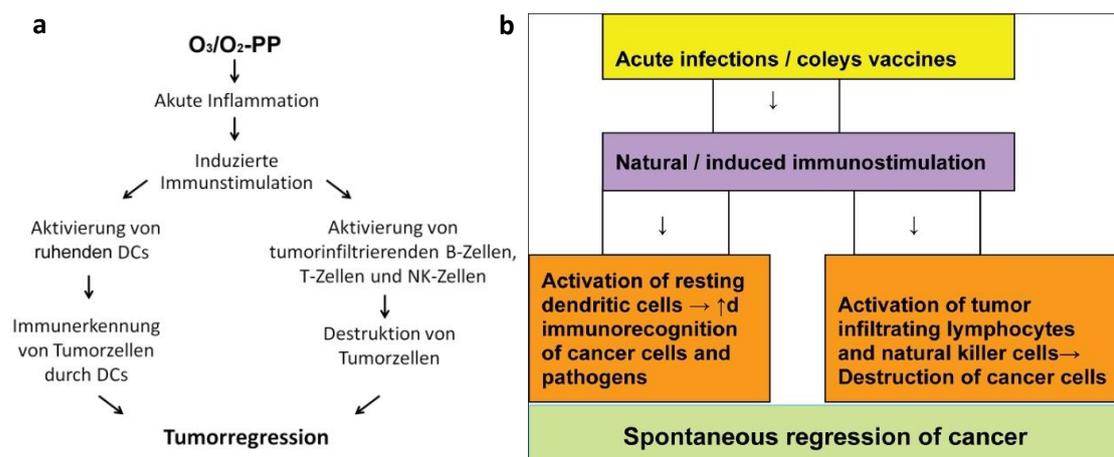


Abb. 4.2: Entzündungsabhängige Tumorregression

Modell der entzündungsvermittelten Wirkung des O_3/O_2 -PP (a) in Anlehnung an eine entzündungsabhängige Tumorregression von (Jessy T. 2011) „Immunity over inability: The spontaneous regression of cancer.“ (b) [Abbildung b stammt aus einem *open-access* Artikel, was die uneingeschränkte Nutzung erlaubt.]

Diese, durch das reaktive Gas aktivierten Immunzellen scheinen vermehrt in das Tumorgewebe zu infiltrieren und eine verstärkte Entzündungsreaktion auszulösen. Erster Hinweis auf eine solche Reaktion im VX2-Tumormodell ist die signifikant gesteigerte Infiltration von CD3-positiven T-Lymphozyten innerhalb des regressiven Tumorgewebes. CD3 stellt ein Proteinkomplex des T-Zell-Rezeptors dar, welcher auf allen T-Zellen exprimiert wird, einschließlich T-Helfer, regulatorischen und zytotoxischen T-Zellen (Nedergaard B.S. et al. 2007). Die signifikante Steigerung der CD3-positiven Zellen innerhalb regressiver Tumoren ist damit ein wesentlicher Hinweis auf eine intratumorale T-Zell-vermittelte Immunantwort. Die heterogenen Funktionen der intratumoralen T-Lymphozyten sind bis heute unklar, aber wesentlich für das Verständnis der Tumorentwicklung. Infiltrierende Leukozyten können Tumorzellen selbst, aber auch Zellen des Tumorstroma modifizieren, sodass das Tumorwachstum als auch die Metastasierung der Tumorzellen beeinträchtigt wird.

In der Tumormedizin kann die Infiltrationsdichte von CD3-positiven T-Zellen als ein wesentliches Kriterium für die Prognose von Patienten dienen. Eine geringe intratumorale Infiltrationsdichte der CD3-positiven Zellen ist oftmals mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Shibuya T.Y. et al. 2002; Nedergaard B.S. et al. 2007), die vergleichbar ist mit der Prognose von Patienten, bei denen bereits begleitende Fernmetastasen diagnostiziert wurden (Galon J. et al. 2006). Dagegen ist eine positive Korrelation zwischen der Präsenz von CD3-positiven Zellen und einer niedrigen Inzidenz von rezidivierenden Karzinomen für verschiedene Tumorentitäten beschrieben, wie kolorektales Karzinom, Plattenepithelkarzinom im Gebärmutterhals, sowie HNSCC (Shibuya T.Y. et al. 2002; Galon J. et al. 2006; Nedergaard B.S. et al. 2007). Insgesamt ist die Anwesenheit von tumorinfiltrierenden Lymphozyten innerhalb verschiedenster Tumoren mit einer signifikant gesteigerten Überlebensrate der Patienten assoziiert (Shibuya T.Y. et al. 2002; Kim R. et al. 2007; Kong C.S. et al. 2009; Pages F. et al. 2010; Gooden M.J. et al. 2011; Otto W. et al. 2012; Jiang J. et al. 2013).

Neben der T-Lymphozyten-Dichte ist auch ihre histologische Lokalisation von entscheidender Bedeutung für eine effektive antitumorogene Wirkung. So zeigen T-Lymphozyten, welche sich um das eigentliche solide Tumorgewebe ausbreiten nicht generell eine antitumorogene Immunantwort. T-Lymphozyten, die bis in das Tumorgewebe eindringen wird hingegen eine zentrale Bedeutung bei der

Beseitigung von Tumorzellen zugesprochen (Naito Y. et al. 1998; Kim R. et al. 2007).

Im VX2-Tumormodell des NZW-Kaninchens konnte die zentrale Rolle von tumorinfiltrierenden Immunzellen durch den quantitativen Nachweis verschiedener, für das angeborene wie auch das erworbene Immunsystem relevanter Gene experimentell nachgewiesen werden. Zur Charakterisierung im Tumor ablaufender Immunantworten wurden mittels des *RT²*-Profiler-Systems insgesamt 84 Gene quantifiziert und in Abhängigkeit von deren Funktion für eine Immunreaktion in folgende spezifische Gruppen eingeteilt: *Pattern-Recognition Receptors* (PRRs), Gene der Signaltransduktion, entzündungsregulatorische Moleküle, Gene der Antigenpräsentation und kostimulatorischer Oberflächenproteine und T-Zell-spezifische Gene.

Pathologische Veränderungen können physiologisch durch verschiedene Membran-gebundene und lösliche PRRs detektiert werden. Die relevantesten PRRs innerhalb der angeborenen Immunität umfassen die Nucleotide-binding oligomerization domain receptors (NLRs), Retinoic acid-inducing gene (RIG)-like helicases (RLHs) und Toll-like Rezeptoren (TLRs) (Basith S. et al. 2012; Benencia F. et al. 2012). Sie werden insbesondere von dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert und erkennen eingedrungene Mikroorganismen anhand von, für diese Mikroben typischen Faktoren, die als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) bezeichnet werden. Aber auch körpereigene, als toxisch eingestufte Faktoren, sogenannte *danger-associated molecular patterns* (DAMPs), werden von Zellen, welche die dafür spezifischen PRRs exprimieren, erkannt. DAMPs stellen u.a. Zellkomponenten dar, die von Tumorzellen oder Zellen des Tumormikromilieus durch Zerstörung freigesetzt werden. Zu diesen Komponenten gehören unter anderem RNA/DNA-Fragmente, Glukose, ATP, Glykoproteine sowie Hitzeschockproteine (Ciocca D.R. and Calderwood S.K. 2005; Kono H. and Rock K.L. 2008; Chalmers S.A. et al. 2013). Die Bindung solcher DAMPs an die entsprechenden PRRs löst die Freisetzung inflammatorischer Zytokine aus und setzt dadurch eine Immunantwort in Gang (Basith S. et al. 2012; Benencia F. et al. 2012), die für die Tumorentwicklung eine entscheidende Rolle einnehmen kann.

Beispielsweise verstärkt die Freisetzung von ATP aus Mitochondrien nekrotischer Tumorzellen eine Infiltration von Immunzellen in den Tumor. ATP bindet an den purinerigen Rezeptor von infiltrierenden DCs, was in der Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms, der proteolytischen Reifung der Caspase 1 sowie der Spaltung und

Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18 resultiert. Diese Zytokine, insbesondere IL-1 β , stimulieren die Aktivierung Tumorantigen-spezifischer T-Lymphozyten und können somit zu einer antitumorigenen Immunantwort beitragen (Ghiringhelli F. et al. 2009; Miao E.A. et al. 2011; Zitvogel L. et al. 2012).

Die Bildung von ROS trägt ebenfalls zu einer Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms bei und verstärkt Migration und Reifung von DCs (Tait S.W. and Green D.R. 2012; Corsini E. et al. 2013). Das high-mobility-group-protein B1 (HMGB1), ein spezifischer Ligand von TLR4, wird durch nekrotische Tumorzellen sezerniert und übt einen bedeutenden Einfluss auf die Aktivierung von DCs und der Präsentation von tumorspezifischen Antigenen aus (Apetoh L. et al. 2007). Hitzeschockproteine, wie HSP70, werden ebenfalls von nekrotischen und chemisch gestressten Tumorzellen freigesetzt und verstärken eine antitumorigene T-Zell getragene Immunantwort über die Bindung an den TLR4 auf DCs (Fang H. et al. 2014).

Die Daten dieser Studien lassen darauf schließen, dass die Präsenz von tumor-abhängigen DAMPs bei antitumorigenen Prozessen von Relevanz ist. Überdies nehmen hierbei PRRs, welche DAMPs detektieren eine bedeutende Rolle bei der antitumorigenen Wirkung ein. So weisen Tumorpatienten mit einem TLR4 Loss-of-Function-Allel eine hohe Rückfallrate auf (Apetoh L. et al. 2007).

Infolgedessen werden künstlich synthetisierte Agonisten der PRRs aktuell als potenzielle Tumorthapeutika eingesetzt. Hierbei werden extrinsisch und intrinsisch exprimierte PRRs verschiedener Zellen, wie T- und B-Lymphozyten, Granulozyten, Makrophagen und DC innerhalb des Tumormikromilieus stimuliert, was zur Aktivierung einer antitumorigenen Immunantwort führen soll (Rydberg C. et al. 2009; Goutagny N. et al. 2012; Hedayat M. et al. 2012). Insbesondere für die Gruppe der TLRs wurde eine Vielzahl von Agonisten entwickelt und bereits in klinischen Studien eingesetzt (Hedayat M. et al. 2012). Synthetische doppelsträngige RNA-Fragmente (Poly[I:C]), welche neben dem intrazellulär lokalisierten TLR3 (Salaun B. et al. 2006) auch die RLRs MDA-5, RIG-1 aktivieren, konnten zu einer proapoptotischen Wirkung in verschiedenen Tumoren, wie dem Melanom (Besch R. et al. 2009; Tormo D. et al. 2009) und Mammakarzinom (Cheng Y.S. and Xu F. 2012) beitragen. Zu den lizenzierten TLR-Agonisten, die bereits in der Tumorthherapie eingesetzt werden, gehören Monophosphoryl lipid A, ein Agonist für TLR4, sowie Imiquimod, ein Aktivator des TLR7 (Vacchelli E. et al. 2013).

Die, mittels des $R7^2$ -Profilers analysierten PRRs zeigten in regressiven Tumoren O_3/O_2 -PP-behandelter Tiere eine signifikant höhere Expression im Vergleich zu

progressiv wachsenden Tumoren. Obwohl PRRs sowohl antitumorigene als auch protumorigene Wirkungen (Chen R. et al. 2008; Pradere J.P. et al. 2013; Yu L. et al. 2013) zugeschrieben werden, deuten die Ergebnisse der vorliegenden Studie darauf hin, dass eine gesteigerte Expression von TLR1, 2, 3, 4 und 6, als auch die der Helikasen RIG-1 und MDA-5 sowie der NLRs NOD1, 2 und P3 mit einer Tumorremission im VX2-Karzinom assoziiert ist. Dies galt auch für VX2-Tumoren, die durch den allogenen Zelltransfer von PBL in den Empfängertieren zur Remission gebracht werden konnten. Mit Ausnahme der intrazellulär lokalisierten PRRs TLR3, RIG-1 und MDA-5 wiesen remittierende Tumoren von Empfängertieren eine signifikant höhere Expression der analysierten PRRs auf. Diese Daten stehen im Einklang mit den zahlreichen Studien, die antitumorigene Effekte der PRRs nachweisen konnten (Adams S. 2009; Goutagny N. et al. 2012).

Die Aktivierung der PRRs durch verschiedene DAMPs oder PAMPs führt zu der Einleitung unterschiedlicher Signaltransduktionswege, welche in der Synthese von Zytokinen, Wachstumsfaktoren oder der Pyroptosis der Zelle resultieren können (Takeuchi O. and Akira S. 2010). Wie die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen zeigten, wurden zahlreiche Signaltransduktionsmoleküle und Transkriptionsfaktoren in remittierenden Tumoren hochreguliert. Dies schließt das zentrale Adaptorprotein MyD88 ein, welches im Zusammenhang mit TLR2, TLR4 und TLR6 in einer NF- κ B abhängigen Expression von verschiedenen inflammatorischen Zytokinen, insbesondere der Synthese von pro-IL-1 β und pro-IL-18 resultiert (Takeuchi O. and Akira S. 2010). Die Zytokine pro-IL-1 β und pro-IL-18 werden anschließend durch Caspase 1 in die aktiven Formen gespalten (Tschopp J. and Schroder K. 2010). Caspase 1, sowie das Plattformprotein des Inflammasoms, NLRP3 zeigten in remittierenden VX2-Tumoren nach O₃/O₂-PP-Behandlung und auch nach adoptivem Transfer von PBL geheilten Tieren eine gesteigerte Expression. Dies kann auf eine Formation und Aktivierung des Inflammasoms innerhalb des Tumormikromilieus hindeuten, welches die erhöhte Expression von IL-18 bzw. IL-1 β in remittierenden Tumoren bewirken könnte.

Neben NF- κ B zeigte auch dessen Inaktivator NF- κ BIA eine Hochregulation im remittierenden VX2-Tumorgewebe. Erhöhtes NF- κ BIA scheint jedoch die NF- κ B-abhängige Genexpression zahlreicher Zytokine, wie TNF- α , MIP-1 α und IFN γ nicht zu blockieren. Diese Zytokine/Chemokine wiesen in remittierenden Tumoren eine signifikant gesteigerte Expression auf. Die daraus resultierende Diskrepanz könnte

auf der Expression von NF- κ B und NF- κ BIA in unterschiedlichen Zellpopulationen innerhalb des Tumorgewebes beruhen.

Im Einklang mit einer verstärkten Immunantwort in remittierenden Tumoren wies die Cyclooxygenase-2 (COX-2), ein Enzym, welches hemmenden Einfluss auf Entzündungsreaktionen ausüben kann, eine signifikant verminderte Expression auf. COX-2 ist verantwortlich für die Synthese von Prostaglandinen, die ihrerseits immunsuppressive Effekte aufzeigen und damit eine reduzierte antitumorogene Antwort begünstigen. Die Effekte umfassen unter anderem die Inhibierung der Differenzierung und Aktivität dendritischer Zellen (Sharma S. et al. 2003; Yang L. et al. 2003), als auch die Stimulation der FoxP3-Expression (Baratelli F. et al. 2005) und Treg-Aktivität (Sharma S. et al. 2005). Darüber hinaus wird COX-2 im Zusammenhang mit verstärkter Tumorprogression, Angiogenese und Apoptose-Hemmung diskutiert (Cheng J. and Fan X.M. 2013; Koontongkaew S. 2013). Beim Menschen stellt ein erhöhter COX-2-Spiegel einen schlechten prognostischen Faktor bei verschiedenen Tumorerkrankungen dar (Edwards J.G. et al. 2002; Juuti A. et al. 2006; De Heer P. et al. 2007). Die Inhibierung von COX-2 durch spezifische Inhibitoren wird heute im Rahmen von Chemotherapien angewandt (Meric J.B. et al. 2006; Ghosh N. et al. 2010). So führt die Hemmung von COX-2 bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen zu einer gesteigerten Monozyten Bindung an *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) sowie zu einer erhöhten Tumordinfiltration von Lymphozyten, Monozyten und aktivierten T-Zellen (Lang S. et al. 2007). Eine unspezifische COX-2-Inhibition durch Acetylsalicylsäure zeigt überdies deutliche Effekte in der Tumorprävention und -behandlung (Cook N.R. et al. 2013; Tougeron D. et al. 2014).

Bei der beobachteten verstärkten Infiltration von Leukozyten in remittierenden VX2-Tumoren scheinen u.a. auch Faktoren beteiligt zu sein, für die positiv chemotaktische Wirkungen auf Leukozyten bekannt sind. Signifikant erhöhte Spiegel für die Chemokin (C-C-motif) Liganden (CCL)2 und CCL3 sowie des Komplementfaktors C3 in remittierenden Tumoren lassen vermuten, dass die O_3/O_2 -PP-induzierte tumorizide Entzündungsreaktion im Tumor sich selbst verstärkt. Die Faktoren CCL2 und CCL3 sind von Bedeutung für die Tumor-Infiltration verschiedener Immunzellen - insbesondere DC, T-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen - was eine gesteigerte Destruktion des Tumorgewebes hervorrufen kann (Crittenden M. et al. 2003; Iida N. et al. 2008; Lanca T. et al. 2013; Lanca T. and Silva-Santos B. 2013).

Für die Generierung einer effektiven Immunantwort, insbesondere einer adaptiven Immunantwort mit Bildung von T-Gedächtniszellen, ist die Präsentation von tumorspezifischen Antigenen in Kombination mit co-stimulierenden Signalen durch antigenpräsentierende Zellen essentiell. Gerade antigenpräsentierende dendritische Zellen wird eine bedeutende Rolle bei der Tumorregression zugeschrieben (Li Q. et al. 2009; Candolfi M. et al. 2011; Wathelet N. and Moser M. 2013). Die Expressionsdaten zeigten in diesem Zusammenhang eine Hochregulation der Rezeptoren CD80 und CD86 der antigenpräsentierenden Zellen sowie ihres Bindungspartners CD28 der T-Zellen. Daneben wiesen CD40 (von antigenpräsentierenden Zellen) sowie dessen Bindungspartner CD154 ((CD40L) von T-Helferzellen), als auch das T-Helferzell-spezifische CD4 eine gesteigerte Expression auf.

Auch NKT-Zellen wird eine potentielle antitumorogene Wirkung zugesprochen (Gillissen S. et al. 2003; Wu L. and Van Kaer L. 2011; Wen X. et al. 2013), die insbesondere auf einer Freisetzung von IFN γ zu beruhen scheint (Neparidze N. and Dhodapkar M.V. 2009). NKT-Zellen werden durch spezifische Lipid-Antigene aktiviert, die ausschließlich über den CD1d MHC-I-Komplex präsentiert werden. Die erhöhte Genexpression des CD1d-Komplexes in remittierenden Tumoren lässt deshalb auf eine verstärkte Aktivität von NKT-Zellen schließen. Sie könnte daher als Basis für die Immunität gegen den VX2-Tumor in geheilten Tieren gesehen werden, da eine therapeutische Aktivierung von NKT-Zellen durch selektive Agonisten, welche von CD1d-positiven antigenpräsentierenden Zellen präsentiert werden, zur Ausbildung einer Anti-Tumor-Immunität führt (Exley M.A. et al. 2011).

Weitere Genexpressionsanalysen von spezifischen Rezeptoren, Zytokinen und Transkriptionsfaktoren der T-Zellsubpopulationen lassen erkennen, dass gegenüber Treg, TH2- und TH17-Zellen in erster Linie TH1-Zellen im Tumormikromilieu von remittierenden Tumoren nach O₃/O₂-PP-Behandlung vertreten sind.

Die signifikant gesteigerte Expression der Zytokine IL-2, -18 und IFN γ , als auch die der Marker CCR5 und CXCR3, stützen die Hypothese, dass in remittierenden Tumoren O₃/O₂-PP-behandelter Tiere eine Immunantwort durch TH1, zytotoxische T-Zellen und NKT-Zellen überwiegt. Diesen Zellen wird eine bedeutende Rolle bei der Eradikation von Tumorzellen sowie Inhibierung des Tumorwachstums zugeschrieben (Jiang J. et al. 2013). IFN γ scheint in der Tumorabwehr das bedeutendste Zytokin dieser Zellen darzustellen (Zamarron B.F. and Chen W. 2011;

Fujii S.I. et al. 2013). IFN γ spielt eine entscheidende Rolle in immunmodulatorischen Effekten der „*Immunosurveillance*“, indem es das Wachstum von Tumorzellen durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT1 hemmt (Kortylewski M. et al. 2004; Rodriguez T. et al. 2007). In Übereinstimmung hiermit wiesen TH1-Zellen in Kombination mit IFN γ in Beta-Krebszellen (Braumuller H. et al. 2013) sowie in B-Zell Lymphomen (Haabeth O.A. et al. 2011) tumorsuppressive Effekte auf. TH1-Zellen zeigen im Vergleich zu TH2-Zellen eine erwiesene antitumorogene Wirkung. Demnach führt ein adoptiver TH1-Zell-Transfer zur Eradikation unterschiedlicher Tumoren (Nishimura T. et al. 1999; Jiang J. et al. 2013). Darüber hinaus kann das TH1-Zell-assoziierte Zytokin IFN γ im Gegensatz zu den TH2-Zell-assoziierten Zytokinen IL-4 und IL-13 die antitumorogene Funktion von Makrophagen stimulieren (Luheshi N. et al. 2014).

Die TH2-spezifischen Zytokine IL-4, -10 und -13, als auch die Marker CCR4 und CCR8, wiesen keine signifikante Expressionssteigerung innerhalb regressiver VX2-Tumoren auf. Ausschließlich IL-5 war in wenigen remittierenden Tumoren signifikant induziert, was auf eine mögliche TH2-Immunantwort rückschließen lässt. TH2-Zellen und ihre spezifischen Zytokine IL-4, -5, -10 und -13 zeigen durch Steigerung der T-Zellenergie und Inhibierung der T-Zell vermittelten Zytotoxizität eine antiinflammatorische Wirkung. Desweiteren stimulieren sie eine, durch B-Zellen ausgelöste humorale Immunantwort (Hallett M.A. et al. 2012; Hou N. et al. 2013; Lakshmi Narendra B. et al. 2013). Ein Ungleichgewicht zwischen TH1- und TH2-Zellen, bei dem TH2-Zellen überwiegen, wurde bereits bei zahlreichen Tumorerkrankungen festgestellt. So zeigten Patienten mit Tumoren, wie Blasenkrebs (Lang F. et al. 2012), laryngopharyngealem Karzinom (Bleotu C. et al. 2013), oralem Plattenepithelkarzinom (Gaur P. et al. 2014) und Zervixkarzinom (Sharma A. et al. 2009) signifikant höhere Serumkonzentrationen der Interleukine IL-4, -6, und -10 im Vergleich zur Kontrolle. Gleichzeitig war eine signifikante Reduktion der TH1-assoziierten Zytokine IFN γ und IL-2 im Serum zu verzeichnen. Ein Überwiegen von tumorinfiltrierenden TH2-Zellen über TH1-Zellen geht mit einer schlechten Prognose einher (De Monte L. et al. 2011), die auf einer Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine, wie IL-10 und TGF- β zurückzuführen ist (Sheu B.C. et al. 2001). Neben zahlreichen Studien, die eine protumorogene Wirkung von TH2-Zellen aufzeigen, gibt es Publikationen, die gegensätzliche Ergebnisse berichten (Ellyard J.I. et al. 2007; Schreck S. et al. 2009). Demnach sollen TH2-Zellen über die Sekretion von IL-4, IL-13 und IL-10 die Tumordinfiltration von eosinophilen

Granulozyten stimulieren (Ellyard J.I. et al. 2007), die mit einer antitumorigenen Wirkung verbunden sein kann (Tepper R.I. et al. 1992; Ellyard J.I. et al. 2007). Andere Studien zeigen dagegen positive Effekte von IL-10 auf tumorizide Zellen. So führt eine gesteigerte IL-10-Synthese in Kombination mit IL-2 zu einer erhöhten Aktivierung CD8-positiver zytotoxischer T-Zellen (Chen W.F. and Zlotnik A. 1991; Santin A.D. et al. 2000) sowie IL-18 (Novick D. et al. 2013), ebenfalls in Kombination mit IL-10 (Cai G. et al. 1999), zu einer erhöhten Proliferation und Zytotoxizität von NK-Zellen.

Die verstärkte Expression des, für regulatorische Zellen spezifischen Transkriptionsfaktors Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3) lässt eine funktionelle Beteiligung von Tregs und TH17-Zellen vermuten. Da jedoch weitere Faktoren, die spezifisch in Tregs bzw. TH17-Zellen exprimiert werden, nicht signifikant erhöht waren, kann keine abschließende Bewertung über die Rolle dieser T-Zell-Subpopulationen bei der Tumorremission erfolgen. Für das Verständnis der immunabhängigen Tumorremission sind weitere Analysen zur Rolle von Tregs bzw. TH17-Zellen im VX2-Tumorgewebe essentiell. Dies gilt vor allem vor dem Hintergrund, dass beide T-Zell-Subpopulationen einen wesentlichen Einfluss auf die Tumorentwicklung haben. In der Literatur wird Tregs eine überwiegend protumorigene Wirkung zugeschrieben, die in ihrer immunsuppressiven Eigenschaft begründet liegt (Bergmann C. et al. 2008; Jie H.B. et al. 2013). Somit steht eine starke Infiltration von Tregs in das Tumorgewebe mit einer schlechten Prognose und hoher Wahrscheinlichkeit für Rezidive im Zusammenhang (Bates G.J. et al. 2006; Petersen R.P. et al. 2006; Boucek J. et al. 2010). Infolgedessen ist die Inhibition und Destruktion dieser T-Zellsubpopulation ein aktuelles Konzept der Tumorbehandlung (Yamaguchi T. and Sakaguchi S. 2006; De Rezende L.C. et al. 2010; Byrne W.L. et al. 2011).

Dagegen ist die Rolle der TH17-Zellen innerhalb der Tumorentwicklung derzeit noch nicht endgültig geklärt. Zahlreiche Studien gehen von einer antitumorigenen Immunantwort dieser Zellen aus, andere von einer prokanzerogenen Wirkung (Ji Y. and Zhang W. 2010; Ye Z.J. et al. 2010; Alizadeh D. et al. 2013; Qi W. et al. 2013). Die antitumorigene Antwort der TH17-Zellen scheint nicht durch eine direkte TH17-vermittelte, zytotoxische Aktivität gegenüber Tumorzellen zu erfolgen (Yen H.R. et al. 2009), sondern mittels einer TH17-induzierten Rekrutierung antitumorigener Leukozyten (Park H. et al. 2005; Kryczek I. et al. 2009a; Kryczek I. et al. 2009b; Zou W. and Restifo N.P. 2010; Nunez S. et al. 2013). Darüber hinaus zeigten Martin-

Orozco N et al., dass TH17-Zellen die Aktivierung von tumorspezifischen CD8-positiven T-Zellen begünstigen (Martin-Orozco N. et al. 2009). TH17-Zellen, die ein progressives Tumorwachstum fördern, zeigen zum einen eine abweichende Zytokinausschüttung, so sezernieren diese, im Gegensatz zu antitumorigenen TH17-Zellen, vermindert INF- γ und weisen darüber hinaus eine verstärkte Sekretion des immunsuppressiven IL-10 auf. Zum anderen können sich TH-17-Zellen in FoxP3-exprimierende immunsupprimierende Tregs umwandeln, welche dann ein progressives Tumorwachstum begünstigen (Ye J. et al. 2011; Martin F. et al. 2012).

Interessanterweise zeigte sich in VX2-Tumoren, die durch den adoptiven Zelltransfer in Regression gebracht wurden, im Gegensatz zu Tumoren, die in Folge der O₃/O₂-PP-Behandlung remittierten, eine signifikant gesteigerte Expression des TH2-spezifischen Interleukin IL-10 und des Chemokins CCR4. Im Gegensatz zu den remittierenden Tumoren nach O₃/O₂-PP-Behandlung lässt dies auf eine Beteiligung von TH2-Zellen bei der antitumorigenen Immunreaktion schließen.

Die Unterschiede im Schwerpunkt der antitumorigenen Immunantwort lassen es als möglich erscheinen, dass während der O₃/O₂-PP-induzierten Tumorremission B-Gedächtniszellen entstanden sind, die nach adoptivem Transfer die Grundlage für die Tumorremission in den VX2-Empfängertieren darstellen. Auch könnte so die Resistenz von zuvor vom VX2-Tumor geheilten Tieren vor der Reimplantation eines VX2-Tumors erklärt werden. Mögliche spezifische Antigene, die den VX2-Tumor als körperfremd charakterisieren, könnten Proteine des Shope papilloma virus darstellen. Die Synthese von Antikörpern gegen diese Epitope durch B-Zellen würde den Tumor angreifbar machen und B-Gedächtniszellen könnten die Resistenz gegen eine erneute Tumorbildung erklären. Tatsächlich entstand der VX2-Tumor durch die maligne Veränderung einer Shope papilloma virus-induzierten Warze (Kidd J.G. and Rous P. 1940) gegen die sich eine humorale Immunantwort ausbilden konnte. Bis fünf Jahre nach der Induktion des originalen VX2-Karzinoms konnten innerhalb des Blutes von betroffenen Tieren spezifische Antikörper gegen Papillomavirus-Antigene detektiert werden. In folgenden Generationen von Kaninchen waren diese Antikörper nicht mehr nachweisbar was, in der Literatur als ein Verlust der Virulenz des Shope Virus diskutiert wird. Das Ausbleiben einer humoralen Antwort könnte aber auch durch einen Verlust der Immunogenität des VX2-Tumors bedingt sein (Rous P. et al. 1952; Muckle D.S. and Dickson J.A. 1971). Die Ergebnisse des adoptiven Zelltransfer-Experiments beim Kaninchen weisen jedoch auf die Entstehung von Gedächtniszellen in Tieren hin, die den Tumor

erfolgreich zur Remission bringen konnten. Somit ist ein vollständiger Verlust der Immunogenität unwahrscheinlich. Vielmehr scheint durch die O₃/O₂-PP-Behandlung entweder die Immunogenität des Tumors selbst erhöht, oder die Sensitivität des Immunsystems gegen die schwach vorhandene Immunogenität des VX2-Tumors verstärkt.

Zusammenfassend weist der Anstieg von Leukozyten sowie die Infiltration von T-Lymphozyten und Hochregulation zahlreicher immunspezifischer Gene innerhalb der regressiven Tumoren O₃/O₂-PP-behandelter Tiere auf eine immungetriggerte tumorizide Wirkung von Ozon hin. Diese Hypothese wird darüber hinaus durch die adoptiven Zelltransfer-Versuche gestützt.

4.2 Änderung der Expression der ErbB-Familie innerhalb regressiver Tumoren

Neben Faktoren, die eine tumorizide Wirkung auf den Tumor ausüben können, wurden die Expressionsspiegel von solchen Faktoren innerhalb remittierender vs. progressiver Tumoren analysiert, die eine wachstumsfördernde Wirkung auf den VX2-Tumor haben könnten. Spezifisch wurde für die Beantwortung der Frage, ob die O₃/O₂-PP-induzierte Tumorremission auch über die Herabregulation protumorigen wirkender Faktoren vermittelt werden könnte, Expressionsspiegel von Mitgliedern der ErbB-Rezeptor-Familie analysiert. Diese Gruppe von Wachstumsfaktor-Rezeptoren stimuliert die Zellproliferation und hemmt den Zelltod, wodurch sie eine bedeutende Rolle bei der Tumorprogression einnimmt. Insgesamt kennt man heute 4 ErbB-Rezeptoren (EGFR, ErbB2, ErbB3 und ErbB4). Für das Kaninchen konnten wir die Expression der ErbB-Rezeptoren EGFR, ErbB2 und ErbB3 im Tumorgewebe nachweisen, nicht jedoch die des ErbB4.

Die Abwesenheit von ErbB4 im VX2-Tumor steht möglicherweise im Zusammenhang mit bisherigen Studien, die keinen nennenswerten Zusammenhang von ErbB4 auf das Tumorwachstum nachweisen konnten (Xia W. et al. 1999; Rogers S.J. et al. 2005; Baselga J. and Swain S.M. 2009). Darüber hinaus scheinen Plattenepithelkarzinome keine hohe Expression von ErbB4-Rezeptoren aufzuweisen (Carpenter G. 2003).

Die absolute Quantifizierung der drei ErbB-Rezeptoren EGFR, ErbB2 und ErbB3 wies in progressiven Tumoren von Sham-behandelten Tieren signifikant höhere Expressionsspiegel auf, im Vergleich zu regressiven Tumoren von O₃/O₂-PP-behandelten Tieren. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit zahlreichen Studien, bei denen die ErbB-Rezeptoren in unterschiedlichen Tumorerkrankungen, so auch

bei HNSCCs, aufgrund von Mutationen und Überexpressionen eine große Relevanz aufweisen (Holbro T. and Hynes N.E. 2004). Tumoren, die solche Genveränderungen der ErbB-Rezeptoren EGFR, ErbB2 und ErbB3 aufweisen, zeigen eine weitaus schlechtere Prognose (Ang K.K. et al. 2002; Kruser T.J. and Wheeler D.L. 2010; Mitsudomi T. and Yatabe Y. 2010; Chung C.H. et al. 2011; Takikita M. et al. 2011; Ocana A. et al. 2013; Yewale C. et al. 2013).

Unter den ErbB-Rezeptoren besitzt der EGFR die größte Relevanz bei HNSCC-Tumoren. Er weist in bis zu 90 % dieser Tumoren eine Überexpression auf (Rogers S.J. et al. 2005; Kalyankrishna S. and Grandis J.R. 2006). Mit der Bedeutung des EGFR bei HNSCC einhergehend zeigte dieser in den untersuchten progressiven VX2-Tumoren, im Vergleich zu ErbB2 und ErbB3 eine höhere Expression. Da der EGF-Rezeptor mit zunehmender TumorgroÙe, steigendem Risiko für Rezidive sowie sinkender Therapiesensitivität einhergeht, dient er als prognostischer Faktor (Chung C.H. et al. 2006; Koontongkaew S. 2013) und stellt darüber hinaus ein vielversprechendes Therapie-Ziel bei HNSCC-Tumoren dar (Rogers S.J. et al. 2005; Yewale C. et al. 2013). Der therapeutische Einsatz monoklonaler anti-EGFR Antikörper, wie Cetuximab war die erste molekulare Target-Therapie, die eine erfolgreiche Wirksamkeit bei Patienten mit Rezidiven oder Metastasen aufwies. Andere anti-EGFR-Therapien, einschließlich weiterer monoklonaler Antikörper (wie Panitumumab und Zalutumumab) und reversible und irreversible ErbB-Familie Tyrosinkinase-Inhibitoren (wie Lapatinib, Afatinib und Dacomitinib) werden bereits in klinischen Phase II und Phase III Studien untersucht (Cohen R.B. 2014).

Auch ErbB2 und ErbB3 zeigten in zahlreichen Studien an verschiedenen Tumoren, wie Melanomen, Mammakarzinomen und HNSCC-Tumoren, eine signifikant gesteigerte Expression (Lee-Hoeflich S.T. et al. 2008; Lee Y. et al. 2014), die mit der Tumorprogression korreliert (Rogers S.J. et al. 2005; Goerner M. et al. 2010; Silva S.D. et al. 2010; Chu F. et al. 2011; Takikita M. et al. 2011; Ettl T. et al. 2012). Infolgedessen werden neue Therapieansätze, welche die ErbB2 und ErbB3 Rezeptoren als Zielstrukturen nutzen, entwickelt (Baselga J. and Swain S.M. 2009).

Die histologische Lokalisation der mRNAs der ErbB-Rezeptoren EGFR, ErbB2 und ErbB3 auf Tumorgewebeschnitten mittels *in situ* Hybridisierung ergab eine verstärkte Expression der Rezeptoren im eigentlichen Tumorbereich. Das umliegende Stroma, welches aus nicht-malignen Zellen wie Fibroblasten, Immunzellen und vaskulären Zellen sowie extrazellulärer Matrix zusammengesetzt ist, wies dagegen lediglich eine mäßige ErbB-Expression auf. ErbB2 und ErbB3

zeigten eine gleichmäßig verteilte Expression innerhalb der Tumorbereiche. Dagegen wurde EGFR innerhalb der invasiven Tumorfront verstärkt exprimiert. In diesem Randbereich des Tumorgewebes migrieren maligne Zellen in das umliegende Gewebe, wobei sie eine invasive Front bilden, in der die Tumorzellen vermehrt Integrin-vermittelte Interaktionen mit der extrazellulären Matrix ausbilden (Christofori G. 2006; Gavert N. and Ben-Ze'ev A. 2008; Trimboli A.J. et al. 2008; Rathinam R. and Alahari S.K. 2010; Sterz C.M. et al. 2010; Cao C. et al. 2012). EGFR spielt bei der Tumorinvasivität eine bedeutende Rolle. Für den Vorgang der Invasion muss die Zellmotilität erhöht und gleichzeitig die Zelladhäsion reduziert werden (Gavert N. and Ben-Ze'ev A. 2008). Diese Prozesse gehen mit einer Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) einher, der Umwandlung von Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften. Hierbei werden epithelial-spezifische Tight Junctions, wie E-Cadherin herunterreguliert und eine Mesenchym-spezifische Beschaffenheit, einschließlich der Expression eines Vimentin-Zytoskelets sowie N-Cadherin ausgebildet. Diese Veränderungen steigern die invasive Motilität der Zellen. (Christofori G. 2006; Gavert N. and Ben-Ze'ev A. 2008; Trimboli A.J. et al. 2008; Cao C. et al. 2012)

Den Tumorzellen innerhalb der invasiven Front wird im Vergleich zu Tumorzellen, welche sich im Zentrum des Tumors befinden, ein verstärktes aggressives Verhalten zugeschrieben, das durch eine gesteigerte Migration und damit Metastasierung gekennzeichnet ist (Sterz C.M. et al. 2010; Sentani K. et al. 2013). Die Migration in nahegelegene und ferne Organe steht mit einem Verlust der Zell-Zell-Adhäsion sowie Separation von Zellgruppen aus dem Tumorverband im Zusammenhang (Gupta G.P. and Massague J. 2006). Beim kolorektalen Karzinom konnte innerhalb der invasiven Front eine erhöhte EGFR Expression festgestellt werden, was mit einer schlechten Prognose der Patienten einherging (Ljuslinder I. et al. 2011). Dies kann auf eine EGFR-vermittelte Stimulation von Tumorzellinvasion und Metastasierung zurückzuführen sein. So konnte eine EGF-induzierte EGFR-Aktivierung die Migration und Invasion von HNSCC-Zelllinien steigern, indem eine Epithelial-mesenchymale Transition durch Degradation von E-Cadherin sowie Hochregulation von mesenchymalen Markern, wie Vimentin ausgelöst wurde (Zuo J.H. et al. 2011). Diese, durch EGFR vermittelte Epithelial-mesenchymale Transition wurde ebenfalls bei Ovarialkarzinom (Ahmed N. et al. 2006; Lim R. et al. 2007) sowie humanen Mammakarzinomzellen (Ackland M.L. et al. 2003) beobachtet. Eine signifikant erhöhte EGFR-Expression in Plattenepithelkarzinomen steht mit einer

gesteigerten Invasivität im Zusammenhang, die über eine verstärkte Expression von Laminen und Glykoproteinen der Extrazellulärmatrix ausgelöst werden kann (Kato K. et al. 2002; Ono Y. et al. 2002; Richter P. et al. 2005). Die verminderte ErbB-Expression in regressiven Tumoren deutet damit auf eine wachstumshemmende Wirkung der O_3/O_2 -PP-Behandlung hin.

4.3 Die mögliche Relevanz des Shope papilloma-Virus innerhalb des VX2-Tumors

VX2-Karzinome entwickelten sich ursprünglich aus Keratinozyten nach Infektion durch das Shope papilloma Virus (Georges E. et al. 1985). Aufgrund der Virus-Ätiologie eignen sich VX2-Tumoren als Modellsystem für HPV-positive HNSCCs. Rund ein Viertel aller HNSCC-Tumoren zeigt gleichermaßen, in Abhängigkeit von der anatomischen Lokalisation, eine Assoziation mit Hoch-Risiko humanen Papillomaviren (HPV). Hierbei zeigt der HPV-Typ 16, insbesondere bei Oropharynxkarzinomen, die häufigste Prävalenz (Kreimer A.R. et al. 2005). Um zu untersuchen, ob virale Bestandteile innerhalb des VX2-Tumors nachzuweisen sind, wurde die Expression der Onkogene E5, E6 und E7 analysiert. Ausschließlich E5 wurde detektiert und wies in regressiven Tumoren von O_3/O_2 -PP-therapierten Tieren eine signifikant geringere Expression auf, im Vergleich zu progressiven Tumoren.

E5 besitzt als Onkogen eine antiapoptotische Wirkung, indem es die Fas-Ligand- und TRAIL-vermittelte Apoptose beeinträchtigt (Jiang P. and Yue Y. 2014). Desweiteren stimuliert es durch die Aktivierung des EGFR eine gesteigerte Zellproliferation und Angiogenese (Venuti A. et al. 2011). Die erhöhte E5-Expression in VX2-Tumoren könnte demzufolge auch die gesteigerte EGFR-Expression in diesen Tumoren begünstigen und demzufolge das progressive Wachstum fördern. Neben den Effekten auf wachstumsregulatorische Mechanismen zeigt E5 ebenfalls Auswirkungen auf immunologische Vorgänge innerhalb des Tumors. Demnach sind Interaktionen von E5 mit Molekülen der MHC-Klasse I bekannt, wodurch es zu einer Herunterregulation des Membran-ständigen MHC-Proteinkomplexes kommt. Eine Folge wäre hierbei, dass Tumorzellen, die E5 exprimieren, der immunologischen Abwehr entgehen können (Ashrafi G.H. et al. 2005; Marchetti B. et al. 2006; Campo M.S. et al. 2010; Venuti A. et al. 2011). Darüber hinaus vermindert E5 die Immunerkennung von infizierten Keratinozyten, indem es die MHC-Klasse II Reifung beeinträchtigt (Zhang B. et al. 2003).

Die Expression von E5, aber auch die verminderte Expression des MHC-Proteins CD1d (Miura S. et al. 2010), in progressiv wachsenden VX2-Tumoren nach Sham-Behandlung, gegenüber regressiven Tumoren nach O₃/O₂-PP-Behandlung, könnte daher mit der gesteigerten Immunevasion dieser Tumoren im Zusammenhang stehen.

Die hohen Expressionsspiegel von E5 im Tumorgewebe nach adoptivem Zelltransfer, die in den Empfängertieren der PBL keinen signifikanten Unterschied zwischen progressiven und regressiven VX2-Tumoren aufwiesen, scheinen allerdings keinen Einfluss auf die Expressionsspiegel von CD1d zu haben, da auch dieses MHC-Klasse I Molekül unabhängig von der Entwicklung des Tumors, gleichbleibend exprimiert wird. Der therapeutische Erfolg des AZT von PBL aus Tieren mit remittierenden Tumoren und die darauffolgende effektive Tumoreradikation scheint auf den Transfer spezifischer T-Zellen und B-Gedächtniszellen zurückzuführen sein.

Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches (*Head and Neck Squamous Cell Carcinomas* (HNSCCs)) stellen weltweit die 6. häufigste Tumorerkrankung dar. Als etabliertes Tiermodell für HNSCC dient das aurikuläre VX2-Tumormodell des Weißen Neuseelandkaninchens (NZW). VX2-Tumoren ähneln HNSCCs in ihrer Morphologie, einem lymphogenen Metastasierungsverhalten und zeichnen sich, analog zu HPV-induzierten HNSCCs, durch eine virale Ätiologie aus. In dieser Arbeit wurde das VX2-Tumormodell genutzt, um den zugrundeliegenden Mechanismus der antitumorigenen Wirkung einer intraperitonealen Applikation von oxidativem Stress, in Form einer O_3/O_2 -Pneumoperitoneum (O_3/O_2 -PP) Behandlung, zu charakterisieren.

Solide aurikuläre VX2-Tumoren wurden beim NZW-Kaninchen induziert. Bei Erreichen einer definierten Tumorgöße wurde die O_3/O_2 -PP-Behandlung durchgeführt und die sich daraufhin regressiv bzw. progressiv entwickelnden Tumoren chirurgisch abgetragen. Die O_3/O_2 -PP-Behandlung resultierte, verglichen mit einer Kontroll- (Sham-) Behandlung, in einer signifikant gesteigerten Regressionsrate der aurikulären VX2-Tumoren. Eine signifikant erhöhte Anzahl tumorinfiltrierender T-Lymphozyten (TILs) im Gewebe remittierender Tumoren konnte immunhistochemisch ermittelt werden. Molekularbiologische Analysen von immunologisch relevanten Faktoren zeigten eine Zunahme in den Expressionsspiegeln von Genen aus der Gruppe der *Pattern-Recognition Receptors*, inflammatorischen Mediatoren sowie Molekülen, die essentiell für die Antigenpräsentation und T-Zellaktivierung sind.

Anhand von adoptiven Zelltransferexperimenten konnte der funktionelle Nachweis erbracht werden, dass sich in Tieren, die durch die O_3/O_2 -PP-Behandlung den Tumor erfolgreich bekämpfen konnten, Gedächtniszellen gegen den VX2-Tumor entwickelten. Diese Zellen wurden durch den Transfer von PBL auf tumorkranke Empfängertiere übertragen und führten auch in diesen zu einer Tumorregression. Reimplantationsexperimente in geheilten Tieren bestätigten den Erwerb einer Tumorresistenz und die damit verbundene Präsenz von Gedächtniszellen gegen den VX2-Tumor.

Untersuchungen zur Genexpression von epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren ergaben eine signifikant geringere Expression von EGFR, ErbB2 und ErbB3 in regressiven Tumoren. In situ Hybridisierungsanalysen, zur Lokalisation der

Wachstumsfaktor-Rezeptoren, zeigten eine verstärkte Expression von EGFR in der Tumorfront und eine homogene Verteilung der ErbB2 und ErbB3 im gesamten Tumorgewebe.

Fazit

Die Daten untermauern die Annahme einer immunvermittelten Remission des VX2-Tumors durch intraperitoneal applizierten oxidativen Stress (O_3/O_2 -PP) unter Hochregulation antitumorigener Immunantworten und Reduktion von Wachstumsfaktor-Rezeptoren im Tumorgewebe. Die intraperitoneale Applikation von oxidativem Stress könnte somit eine potentielle Krebsimmuntherapie im Sinne aktueller Therapieansätze darstellen, die eine Aktivierung isolierter TILs durch *in vitro*-Stimulation nicht mehr erforderlich macht. Die Analyse der O_3/O_2 -induzierten intraperitonealen Wirkmechanismen könnte damit zur Entwicklung definierter Tumorthérapien beitragen.

Summary

Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) is the sixth leading cancer by incidence worldwide. The papilloma virus-associated rabbit auricular VX2 tumor model of the New Zealand White (NZW) rabbit is an established animal tumor model which resembles the human HNSCC in its morphological characteristics and property for lymphogenic metastatic spread. In this study the VX2 tumor was used to characterize underlying antitumorigenic mechanisms of intraperitoneal oxidative stress following O_3/O_2 -pneumoperitoneum (O_3/O_2 -PP) treatment.

Solid auricular VX2 tumors were induced in NZW rabbits and after reaching a defined tumor size the O_3/O_2 -PP therapy was started. Regressive and progressive tumors were surgically ablated. In comparison to sham treatment the O_3/O_2 -PP therapy resulted in a significantly higher proportion of regressing tumors. Immunohistochemical staining exhibited increased levels of CD3⁺ tumor infiltrating lymphocytes (TILs) in VX2 tumors under regression. RT-qPCR of 84 immunologically relevant factors showed enhanced gene expression levels of receptors involved in pattern recognition, molecules required for antigen presentation, and T cell activation as well as inflammatory mediators.

Adoptive transfer of peripheral blood leukocytes (PBL) derived from animals with tumor regression into control animals with progressing tumors represented functional proof for the presence of acquired tumor resistance in the host leading to tumor regression in recipient animals. Reimplantation experiments in cured animals confirmed the acquisition of tumor resistance pointing to the presence of memory cells directed against the VX2 tumor tissue.

Gene expression analyses of epidermal growth factor receptor (EGFR)-family members exhibited significant lower expression levels of EGFR, ErbB2 and ErbB3 in regressive tumors. Investigation of their localization by in situ hybridization showed increased expression of EGFR at the tumor front and a homogenous distribution of ErbB2 and ErbB3 in the entire tumor tissue.

Conclusion

The data support the hypothesis that intraperitoneal oxidative stress (O_3/O_2 -PP) triggers an immune mediated remission of the VX2 tumor due to upregulation of antitumorigenic immune reactions and reduction of growth factor receptors within the tumor tissue. Therefore, intraperitoneal oxidative stress could represent an effective immune mediated anti-tumor treatment not requiring *ex vivo* stimulation of isolated TILs. Further analyses of the local intraperitoneal O_3/O_2 -induced immunomodulatory mechanism could help in the development of new antitumor strategies.

Literaturverzeichnis

- Ackland ML, Newgreen DF, Fridman M, Waltham MC, Arvanitis A, Minichiello J, Price JT, Thompson EW (2003). "Epidermal growth factor-induced epithelio-mesenchymal transition in human breast carcinoma cells." Lab Invest **83**(3): 435-48.
- Adams JC (1981). "Heavy metal intensification of DAB-based HRP reaction product." J Histochem Cytochem **29**(6): 775.
- Adams S (2009). "Toll-like receptor agonists in cancer therapy." Immunotherapy **1**(6): 949-64.
- Afzal S, Jensen SA, Sorensen JB, Henriksen T, Weimann A, Poulsen HE (2012). "Oxidative damage to guanine nucleosides following combination chemotherapy with 5-fluorouracil and oxaliplatin." Cancer Chemother Pharmacol **69**(2): 301-7.
- Agostoni E, Zocchi L (2007). "Pleural liquid and its exchanges." Respir Physiol Neurobiol **159**(3): 311-23.
- Aguilera A LJ, González-Mateo G, Selgas R, López-Cabrera M (2013). The mesothelial to mesenchymal transition a pathogenic and therapeutic key for peritoneal membrane failure. The Latest in Peritoneal Dialysis. A. P. A.
- Aguilera A, Loureiro J, González-Mateo G, Selgas R, López-Cabrera M (2013). The mesothelial to mesenchymal transition a pathogenic and therapeutic key for peritoneal membrane failure. The Latest in Peritoneal Dialysis. A. P. A.
- Ahmed N, Maines-Bandiera S, Quinn MA, Unger WG, Dedhar S, Auersperg N (2006). "Molecular pathways regulating EGF-induced epithelio-mesenchymal transition in human ovarian surface epithelium." Am J Physiol Cell Physiol **290**(6): C1532-42.
- Al-Dalain SM, Martinez G, Candelario-Jalil E, Menendez S, Re L, Giuliani A, Leon OS (2001). "Ozone treatment reduces markers of oxidative and endothelial damage in an experimental diabetes model in rats." Pharmacol Res **44**(5): 391-6.
- Al-Hegelan M, Tighe RM, Castillo C, Hollingsworth JW (2011). "Ambient ozone and pulmonary innate immunity." Immunol Res **49**(1-3): 173-91.
- Alizadeh D, Katsanis E, Larmonier N (2013). "The multifaceted role of Th17 lymphocytes and their associated cytokines in cancer." Clin Dev Immunol **2013**: 957878.
- Almaz ME, Sonmez IS (2013). "Ozone therapy in the management and prevention of caries." J Formos Med Assoc.
- Ang KK, Berkey BA, Tu X, Zhang HZ, Katz R, Hammond EH, Fu KK, Milas L (2002). "Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma." Cancer Res **62**(24): 7350-6.
- Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, Yang H, Amigorena S, Ryffel B, Barrat FJ, Saftig P, Levi F, Lidereau R, Nogues C, Mira JP, Chompret A, Joulin V, Clavel-Chapelon F, Bourhis J, Andre F, Delaloge S, Tursz T, Kroemer G, Zitvogel L (2007). "Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy." Nat Med **13**(9): 1050-9.
- Ashrafi GH, Haghshenas MR, Marchetti B, O'Brien PM, Campo MS (2005). "E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I." Int J Cancer **113**(2): 276-83.
- Aslan MK, Boybeyi O, Senyuçel MF, Ayva S, Kisa U, Aksoy N, Soyer T, Cesur O, Cakmak M (2012). "Protective effect of intraperitoneal ozone application in experimental ovarian ischemia/reperfusion injury." J Pediatr Surg **47**(9): 1730-4.
- Auerbach A, Hernandez ML (2012). "The effect of environmental oxidative stress on airway inflammation." Curr Opin Allergy Clin Immunol **12**(2): 133-9.
- Bakkal BH, Gultekin FA, Guven B, Turkcu UO, Bektas S, Can M (2013). "Effect of ozone oxidative preconditioning in preventing early radiation-induced lung injury in rats." Braz J Med Biol Res **46**(9): 789-96.
- Baratelli F, Lin Y, Zhu L, Yang SC, Heuze-Vourc'h N, Zeng G, Reckamp K, Dohadwala M, Sharma S, Dubinett SM (2005). "Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells." J Immunol **175**(3): 1483-90.
- Barber E, Menendez S, Leon OS, Barber MO, Merino N, Calunga JL, Cruz E, Bocci V (1999). "Prevention of renal injury after induction of ozone tolerance in rats submitted to warm ischaemia." Mediators Inflamm **8**(1): 37-41.
- Baselga J, Swain SM (2009). "Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3." Nat Rev Cancer **9**(7): 463-75.
- Basith S, Manavalan B, Yoo TH, Kim SG, Choi S (2012). "Roles of toll-like receptors in cancer: a double-edged sword for defense and offense." Arch Pharm Res **35**(8): 1297-316.
- Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, Banham AH (2006). "Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse." J Clin Oncol **24**(34): 5373-80.

- Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T (1999). "Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA." *Science* **285**(5428): 727-9.
- Bellovin DI, Das B, Felsher DW (2013). "Tumor dormancy, oncogene addiction, cellular senescence, and self-renewal programs." *Adv Exp Med Biol* **734**: 91-107.
- Benencia F, Sprague L, McGinty J, Pate M, Muccioli M (2012). "Dendritic cells the tumor microenvironment and the challenges for an effective antitumor vaccination." *J Biomed Biotechnol* **2012**: 425476.
- Berberich S, Dahne S, Schippers A, Peters T, Muller W, Kremmer E, Forster R, Pabst O (2008). "Differential molecular and anatomical basis for B cell migration into the peritoneal cavity and omental milky spots." *J Immunol* **180**(4): 2196-203.
- Bergmann C, Strauss L, Wang Y, Szczepanski MJ, Lang S, Johnson JT, Whiteside TL (2008). "T regulatory type 1 cells in squamous cell carcinoma of the head and neck: mechanisms of suppression and expansion in advanced disease." *Clin Cancer Res* **14**(12): 3706-15.
- Besch R, Poock H, Hohenauer T, Senft D, Hacker G, Berking C, Hornung V, Endres S, Ruzicka T, Rothenfusser S, Hartmann G (2009). "Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells." *J Clin Invest* **119**(8): 2399-411.
- Bhola NE, Bako JM, Dugger TC, Kuba MG, Sanchez V, Sanders M, Stanford J, Cook RS, Arteaga CL (2013). "TGF-beta inhibition enhances chemotherapy action against triple-negative breast cancer." *J Clin Invest* **123**(3): 1348-58.
- Bleotu C, Chifiruc MC, Grigore R, Grancea C, Popescu CR, Anton G, Cernescu C (2013). "Investigation of Th1/Th2 cytokine profiles in patients with laryngo-pharyngeal, HPV-positive cancers." *Eur Arch Otorhinolaryngol* **270**(2): 711-8.
- Bocci VA (2006). "Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art." *Arch Med Res* **37**(4): 425-35.
- Borrelli E, Diadori A, Zalaffi A, Bocci V (2012). "Effects of major ozonated autohemotherapy in the treatment of dry age related macular degeneration: a randomized controlled clinical study." *Int J Ophthalmol* **5**(6): 708-13.
- Bose P, Brockton NT, Dort JC (2013). "Head and neck cancer: from anatomy to biology." *Int J Cancer* **133**(9): 2013-23.
- Boucek J, Mrkvan T, Chovanec M, Kuchar M, Betka J, Boucek V, Hladikova M, Betka J, Eckschlager T, Rihova B (2010). "Regulatory T cells and their prognostic value for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck." *J Cell Mol Med* **14**(1-2): 426-33.
- Boyle P, Levin B (2008). "World Cancer Report 2008." (5): 330-331.
- Brand TM, Lida M, Luthar N, Starr MM, Huppert EJ, Wheeler DL (2013). "Nuclear EGFR as a molecular target in cancer." *Radiother Oncol* **108**(3): 370-7.
- Braumuller H, Wieder T, Brenner E, Assmann S, Hahn M, Alkhaled M, Schilbach K, Essmann F, Kneilling M, Griessinger C, Ranta F, Ullrich S, Mocikat R, Braungart K, Mehra T, Fehrenbacher B, Berdel J, Niessner H, Meier F, van den Broek M, Haring HU, Handgretinger R, Quintanilla-Martinez L, Fend F, Pesic M, Bauer J, Zender L, Schaller M, Schulze-Osthoff K, Rocken M (2013). "T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence." *Nature* **494**(7437): 361-5.
- Burnet F (1971). "Immunological Surveillance in Neoplasia." **7**(1): 3-25.
- Byrne WL, Mills KH, Lederer JA, O'Sullivan GC (2011). "Targeting regulatory T cells in cancer." *Cancer Res* **71**(22): 6915-20.
- Cai G, Kastelein RA, Hunter CA (1999). "IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN-gamma when combined with IL-18." *Eur J Immunol* **29**(9): 2658-65.
- Campo MS, Graham SV, Cortese MS, Ashrafi GH, Araibi EH, Dornan ES, Miners K, Nunes C, Man S (2010). "HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells." *Virology* **407**(1): 137-42.
- Camus M, Galon J (2010). "Memory T-cell responses and survival in human cancer: remember to stay alive." *Adv Exp Med Biol* **684**: 166-77.
- Candolfi M, Curtin JF, Yagiz K, Assi H, Wibowo MK, Alzadeh GE, Foulad D, Muhammad AK, Salehi S, Keech N, Puntel M, Liu C, Sanderson NR, Kroeger KM, Dunn R, Martins G, Lowenstein PR, Castro MG (2011). "B cells are critical to T-cell-mediated antitumor immunity induced by a combined immune-stimulatory/conditionally cytotoxic therapy for glioblastoma." *Neoplasia* **13**(10): 947-60.
- Cao C, Chen Y, Masood R, Sinha UK, Kobiela A (2012). "alpha-Catulin marks the invasion front of squamous cell carcinoma and is important for tumor cell metastasis." *Mol Cancer Res* **10**(7): 892-903.
- Carpenter G (2003). "ErbB-4: mechanism of action and biology." *Exp Cell Res* **284**(1): 66-77.
- Chalmers SA, Eidelman AS, Ewer JC, Ricca JM, Serrano A, Tucker KC, Vail CM, Kurt RA (2013). "A role for HMGB1, HSP60 and Myd88 in growth of murine mammary carcinoma in vitro." *Cell Immunol* **282**(2): 136-45.

- Chen DS, Mellman I (2013). "Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle." *Immunity* **39**(1): 1-10.
- Chen I, Dubnau D (2004). "DNA uptake during bacterial transformation." *Nat Rev Microbiol* **2**(3): 241-9.
- Chen R, Alvero AB, Silasi DA, Steffensen KD, Mor G (2008). "Cancers take their Toll--the function and regulation of Toll-like receptors in cancer cells." *Oncogene* **27**(2): 225-33.
- Chen WF, Zlotnik A (1991). "IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor." *J Immunol* **147**(2): 528-34.
- Cheng J, Fan XM (2013). "Role of cyclooxygenase-2 in gastric cancer development and progression." *World J Gastroenterol* **19**(42): 7361-8.
- Cheng YS, Xu F (2012). "Anticancer function of polyinosinic-polycytidylic acid." *Cancer Biol Ther* **10**(12): 1219-23.
- Christofori G (2006). "New signals from the invasive front." *Nature* **441**(7092): 444-50.
- Chu F, Feng Q, Qian Y, Zhang C, Fang Z, Shen G (2011). "ERBB2 gene amplification in oral squamous cell malignancies: a correlation with tumor progression and gene expression." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **112**(1): 90-5.
- Chung CH, Ely K, McGavran L, Varella-Garcia M, Parker J, Parker N, Jarrett C, Carter J, Murphy BA, Netteville J, Burkey BB, Sinard R, Cmelak A, Levy S, Yarbrough WG, Slebos RJ, Hirsch FR (2006). "Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas." *J Clin Oncol* **24**(25): 4170-6.
- Chung CH, Gillison ML (2009). "Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications." *Clin Cancer Res* **15**(22): 6758-62.
- Chung CH, Zhang Q, Hammond EM, Trotti AM, 3rd, Wang H, Spencer S, Zhang HZ, Cooper J, Jordan R, Rotman MH, Ang KK (2011). "Integrating epidermal growth factor receptor assay with clinical parameters improves risk classification for relapse and survival in head-and-neck squamous cell carcinoma." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **81**(2): 331-8.
- Ciocca DR, Calderwood SK (2005). "Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications." *Cell Stress Chaperones* **10**(2): 86-103.
- Citri A, Yarden Y (2006). "EGF-ERBB signalling: towards the systems level." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(7): 505-16.
- Cohen RB (2014). "Current challenges and clinical investigations of epidermal growth factor receptor (EGFR)- and ErbB family-targeted agents in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)." *Cancer Treat Rev* **40**(4): 567-77.
- Cook NR, Lee IM, Zhang SM, Moorthy MV, Buring JE (2013). "Alternate-day, low-dose aspirin and cancer risk: long-term observational follow-up of a randomized trial." *Ann Intern Med* **159**(2): 77-85.
- Corpet F (1988). "Multiple sequence alignment with hierarchical clustering." *Nucleic Acids Res* **16**(22): 10881-90.
- Corsini E, Galbiati V, Nikitovic D, Tsatsakis AM (2013). "Role of oxidative stress in chemical allergens induced skin cells activation." *Food Chem Toxicol* **61**: 74-81.
- Crittenden M, Gough M, Harrington K, Olivier K, Thompson J, Vile RG (2003). "Expression of inflammatory chemokines combined with local tumor destruction enhances tumor regression and long-term immunity." *Cancer Res* **63**(17): 5505-12.
- de Heer P, Gosens MJ, de Bruin EC, Dekker-Ensink NG, Putter H, Marijnen CA, van den Brule AJ, van Krieken JH, Rutten HJ, Kuppen PJ, van de Velde CJ (2007). "Cyclooxygenase 2 expression in rectal cancer is of prognostic significance in patients receiving preoperative radiotherapy." *Clin Cancer Res* **13**(10): 2955-60.
- De Marchi E, Baldassari F, Bononi A, Wieckowski MR, Pinton P (2013). "Oxidative stress in cardiovascular diseases and obesity: role of p66Shc and protein kinase C." *Oxid Med Cell Longev* **2013**: 564961.
- De Monte L, Reni M, Tassi E, Clavenna D, Papa I, Recalde H, Braga M, Di Carlo V, Doglioni C, Protti MP (2011). "Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer." *J Exp Med* **208**(3): 469-78.
- de Rezende LC, Silva IV, Rangel LB, Guimaraes MC (2010). "Regulatory T cell as a target for cancer therapy." *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **58**(3): 179-90.
- Devaud C, John LB, Westwood JA, Darcy PK, Kershaw MH (2013). "Immune modulation of the tumor microenvironment for enhancing cancer immunotherapy." *Oncoimmunology* **2**(8): e25961.
- Dranoff G (2004). "Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy." *Nat Rev Cancer* **4**(1): 11-22.
- Dunne AA, Kuropkat C, Sapundzhiev N, Ramaswamy A, Sesterhenn A, Schulz S, Werner JA (2004). "Intravenous chemotherapy with cisplatin for regional lymph node metastases of auricular VX2 carcinoma." *Anticancer Res* **24**(3a): 1785-9.
- Dunne AA, Mandic R, Ramaswamy A, Plehn S, Schulz S, Lippert BM, Moll R, Werner JA (2002). "Lymphogenic metastatic spread of auricular VX2 carcinoma in New Zealand white rabbits." *Anticancer Res* **22**(6A): 3273-9.

- Eccles SA (2011). "The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology." *Int J Dev Biol* **55**(7-9): 685-96.
- Edwards JG, Faux SP, Plummer SM, Abrams KR, Walker RA, Waller DA, O'Byrne KJ (2002). "Cyclooxygenase-2 expression is a novel prognostic factor in malignant mesothelioma." *Clin Cancer Res* **8**(6): 1857-62.
- Ellyard JI, Simson L, Parish CR (2007). "Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe?" *Tissue Antigens* **70**(1): 1-11.
- Elvis AM, Ekta JS (2011). "Ozone therapy: A clinical review." *J Nat Sci Biol Med* **2**(1): 66-70.
- Enomoto K, Sho M, Wakatsuki K, Takayama T, Matsumoto S, Nakamura S, Akahori T, Tanaka T, Migita K, Ito M, Nakajima Y (2012). "Prognostic importance of tumour-infiltrating memory T cells in oesophageal squamous cell carcinoma." *Clin Exp Immunol* **168**(2): 186-91.
- Ettl T, Stiegler C, Zeitler K, Agaimy A, Zenk J, Reichert TE, Gosau M, Kuhnel T, Brockhoff G, Schwarz S (2012). "EGFR, HER2, survivin, and loss of pSTAT3 characterize high-grade malignancy in salivary gland cancer with impact on prognosis." *Hum Pathol* **43**(6): 921-31.
- Exley MA, Lynch L, Varghese B, Nowak M, Alatrakchi N, Balk SP (2011). "Developing understanding of the roles of CD1d-restricted T cell subsets in cancer: reversing tumor-induced defects." *Clin Immunol* **140**(2): 184-95.
- Fang H, Ang B, Xu X, Huang X, Wu Y, Sun Y, Wang W, Li N, Cao X, Wan T (2014). "TLR4 is essential for dendritic cell activation and anti-tumor T-cell response enhancement by DAMPs released from chemically stressed cancer cells." *Cell Mol Immunol* **11**(2): 150-9.
- Feller L, Wood NH, Khammissa RA, Lemmer J (2010). "Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 1: human papillomavirus-mediated carcinogenesis." *Head Face Med* **6**: 14.
- Feng F, Li Z, Potts-Kant EN, Wu Y, Foster WM, Williams KL, Hollingsworth JW (2012). "Hyaluronan activation of the Nlrp3 inflammasome contributes to the development of airway hyperresponsiveness." *Environ Health Perspect* **120**(12): 1692-8.
- Fernández Iglesias A, González Núñez L, Calunga Fernández J, Rodríguez Salgueiro S, Santos Febles E (2011). "Ozone postconditioning in renal ischaemia-reperfusion model. Functional and morphological evidences." *Nefrología* **31**(4): 464-70.
- Finn OJ (2012). "Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer." *Ann Oncol* **23** Suppl 8: viii6-9.
- Foglieni C, Fulgenzi A, Belloni D, Sciorati C, Ferrero E, Ferrero ME (2011). "Ozonated autohemotherapy: protection of kidneys from ischemia in rats subjected to unilateral nephrectomy." *BMC Nephrol* **12**: 61.
- Fujii SI, Shimizu K, Okamoto Y, Kunii N, Nakayama T, Motohashi S, Taniguchi M (2013). "NKT Cells as an Ideal Anti-Tumor Immunotherapeutic." *Front Immunol* **4**: 409.
- Gabrielson EW, Yu XY, Spannhake EW (1994). "Comparison of the toxic effects of hydrogen peroxide and ozone on cultured human bronchial epithelial cells." *Environ Health Perspect* **102**(11): 972-4.
- Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX (2013). "Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment." *Nat Immunol* **14**(10): 1014-22.
- Galluzzi L, Senovilla L, Vacchelli E, Eggermont A, Fridman WH, Galon J, Sautes-Fridman C, Tartour E, Zitvogel L, Kroemer G (2012). "Trial watch: Dendritic cell-based interventions for cancer therapy." *Oncoimmunology* **1**(7): 1111-1134.
- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Page C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoue F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pages F (2006). "Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome." *Science* **313**(5795): 1960-4.
- Garantziotis S, Li Z, Potts EN, Kimata K, Zhuo L, Morgan DL, Savani RC, Noble PW, Foster WM, Schwartz DA, Hollingsworth JW (2009). "Hyaluronan mediates ozone-induced airway hyperresponsiveness in mice." *J Biol Chem* **284**(17): 11309-17.
- Garantziotis S, Li Z, Potts EN, Lindsey JY, Stober VP, Polosukhin VV, Blackwell TS, Schwartz DA, Foster WM, Hollingsworth JW (2010). "TLR4 is necessary for hyaluronan-mediated airway hyperresponsiveness after ozone inhalation." *Am J Respir Crit Care Med* **181**(7): 666-75.
- Gattinoni L, Powell DJ, Jr., Rosenberg SA, Restifo NP (2006). "Adoptive immunotherapy for cancer: building on success." *Nat Rev Immunol* **6**(5): 383-93.
- Gaur P, Singh AK, Shukla NK, Das SN (2014). "Inter-relation of Th1, Th2, Th17 and Treg cytokines in oral cancer patients and their clinical significance." *Hum Immunol* **75**(4): 330-7.
- Gavert N, Ben-Ze'ev A (2008). "Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors." *Trends Mol Med* **14**(5): 199-209.
- Georges E, Breitbart F, Jibard N, Orth G (1985). "Two Shope papillomavirus-associated VX2 carcinoma cell lines with different levels of keratinocyte differentiation and transplantability." *J Virol* **55**(1): 246-50.
- Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, Vermaelen K, Panaretakis T, Mignot G, Ullrich E, Perfettini JL, Schlemmer F, Tasmemir E, Uhl M, Genin P, Civas A, Ryffel B,

- Kanellopoulos J, Tschopp J, Andre F, Lidereau R, McLaughlin NM, Haynes NM, Smyth MJ, Kroemer G, Zitvogel L (2009). "Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 β -dependent adaptive immunity against tumors." Nat Med **15**(10): 1170-8.
- Ghosh N, Chaki R, Mandal V, Mandal SC (2010). "COX-2 as a target for cancer chemotherapy." Pharmacol Rep **62**(2): 233-44.
- Gillessen S, Naumov YN, Nieuwenhuis EE, Exley MA, Lee FS, Mach N, Luster AD, Blumberg RS, Taniguchi M, Balk SP, Strominger JL, Dranoff G, Wilson SB (2003). "CD1d-restricted T cells regulate dendritic cell function and antitumor immunity in a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent fashion." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(15): 8874-9.
- Goerner M, Seiwert TY, Sudhoff H (2010). "Molecular targeted therapies in head and neck cancer--an update of recent developments." Head Neck Oncol **2**: 8.
- Gooden MJ, de Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW (2011). "The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis." Br J Cancer **105**(1): 93-103.
- Goutagny N, Estornes Y, Hasan U, Lebecque S, Caux C (2012). "Targeting pattern recognition receptors in cancer immunotherapy." Target Oncol **7**(1): 29-54.
- Gul H, Uysal B, Cakir E, Yaman H, Macit E, Yildirim AO, Eyi YE, Kaldirim U, Oztas E, Akgul EO, Cayci T, Ozler M, Topal T, Oter S, Korkmaz A, Toygar M, Demirbag S (2012). "The protective effects of ozone therapy in a rat model of acetaminophen-induced liver injury." Environ Toxicol Pharmacol **34**(1): 81-6.
- Gupta GP, Massague J (2006). "Cancer metastasis: building a framework." Cell **127**(4): 679-95.
- Gutierrez C, Schiff R (2011). "HER2: biology, detection, and clinical implications." Arch Pathol Lab Med **135**(1): 55-62.
- Güven A, Gundogdu G, Sadir S, Topal T, Erdogan E, Korkmaz A, Sürer I, Oztürk H (2008). "The efficacy of ozone therapy in experimental caustic esophageal burn." J Pediatr Surg **43**(9): 1679-84.
- Güven A, Gundogdu G, Vurucu S, Uysal B, Oztas E, Oztürk H, Korkmaz A (2009). "Medical ozone therapy reduces oxidative stress and intestinal damage in an experimental model of necrotizing enterocolitis in neonatal rats." J Pediatr Surg **44**(9): 1730-5.
- Haabeth OA, Lørvik KB, Hammarström C, Donaldson IM, Haraldsen G, Bogen B, Corthay A (2011). "Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer." Nat Commun **2**: 240.
- Halbauer K, Prskalo K, Jankovic B, Tarle Z, Panduric V, Kalenic S (2013). "Efficacy of ozone on microorganisms in the tooth root canal." Coll Antropol **37**(1): 101-7.
- Hallett MA, Venmar KT, Fingleton B (2012). "Cytokine stimulation of epithelial cancer cells: the similar and divergent functions of IL-4 and IL-13." Cancer Res **72**(24): 6338-43.
- Halonen JI, Lanki T, Tiittanen P, Niemi JV, Loh M, Pekkanen J (2010). "Ozone and cause-specific cardiorespiratory morbidity and mortality." J Epidemiol Community Health **64**(9): 814-20.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-74.
- Harris RC, Chung E, Coffey RJ (2003). "EGF receptor ligands." Exp Cell Res **284**(1): 2-13.
- Hedayat M, Takeda K, Rezaei N (2012). "Prophylactic and therapeutic implications of toll-like receptor ligands." Med Res Rev **32**(2): 294-325.
- Hernandez ML, Lay JC, Harris B, Esther CR, Jr., Brickey WJ, Bromberg PA, Diaz-Sanchez D, Devlin RB, Kleeberger SR, Alexis NE, Peden DB (2010). "Atopic asthmatic subjects but not atopic subjects without asthma have enhanced inflammatory response to ozone." J Allergy Clin Immunol **126**(3): 537-44 e1.
- Higashiyama S, Iwabuki H, Morimoto C, Hieda M, Inoue H, Matsushita N (2008). "Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: beyond receptor ligands." Cancer Sci **99**(2): 214-20.
- Hobohm U (2005). "Fever therapy revisited." Br J Cancer **92**(3): 421-5.
- Holbro T, Civenni G, Hynes NE (2003). "The ErbB receptors and their role in cancer progression." Exp Cell Res **284**(1): 99-110.
- Holbro T, Hynes NE (2004). "ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life." Annu Rev Pharmacol Toxicol **44**: 195-217.
- Holtmeier W, Kabelitz D (2005). "gamma delta T cells link innate and adaptive immune responses." Chem Immunol Allergy **86**: 151-83.
- Hou N, Zhang X, Zhao L, Zhao X, Li Z, Song T, Huang C (2013). "A novel chronic stress-induced shift in the Th1 to Th2 response promotes colon cancer growth." Biochem Biophys Res Commun **439**(4): 471-6.
- Hu J, Budgeon LR, Cladel NM, Culp TD, Balogh KK, Christensen ND (2007). "Detection of L1, infectious virions and anti-L1 antibody in domestic rabbits infected with cottontail rabbit papillomavirus." J Gen Virol **88**(Pt 12): 3286-93.
- Huth KC, Jakob FM, Saugel B, Cappello C, Paschos E, Hollweck R, Hickel R, Brand K (2006). "Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials." Eur J Oral Sci **114**(5): 435-40.

- Hynes NE, Lane HA (2005). "ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors." Nat Rev Cancer **5**(5): 341-54.
- Iida N, Nakamoto Y, Baba T, Kakinoki K, Li YY, Wu Y, Matsushima K, Kaneko S, Mukaida N (2008). "Tumor cell apoptosis induces tumor-specific immunity in a CC chemokine receptor 1- and 5-dependent manner in mice." J Leukoc Biol **84**(4): 1001-10.
- Ishii Y, Yang H, Sakamoto T, Nomura A, Hasegawa S, Hirata F, Bassett DJ (1997). "Rat alveolar macrophage cytokine production and regulation of neutrophil recruitment following acute ozone exposure." Toxicol Appl Pharmacol **147**(2): 214-23.
- Jessy T (2011). "Immunity over inability: The spontaneous regression of cancer." J Nat Sci Biol Med **2**(1): 43-9.
- Ji Y, Zhang W (2010). "Th17 cells: positive or negative role in tumor?" Cancer Immunol Immunother **59**(7): 979-87.
- Jiang J, Wu C, Lu B (2013). "Cytokine-induced killer cells promote antitumor immunity." J Transl Med **11**: 83.
- Jiang P, Yue Y (2014). "Human papillomavirus oncoproteins and apoptosis (Review)." Exp Ther Med **7**(1): 3-7.
- Jie HB, Gildener-Leapman N, Li J, Srivastava RM, Gibson SP, Whiteside TL, Ferris RL (2013). "Intratumoral regulatory T cells upregulate immunosuppressive molecules in head and neck cancer patients." Br J Cancer **109**(10): 2629-35.
- Juuti A, Louhimo J, Nordling S, Ristimaki A, Haglund C (2006). "Cyclooxygenase-2 expression correlates with poor prognosis in pancreatic cancer." J Clin Pathol **59**(4): 382-6.
- Kalos M, June CH (2013). "Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology." Immunity **39**(1): 49-60.
- Kalyankrishna S, Grandis JR (2006). "Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer." J Clin Oncol **24**(17): 2666-72.
- Kantengwa S, Jornot L, Devenoges C, Nicod LP (2003). "Superoxide anions induce the maturation of human dendritic cells." Am J Respir Crit Care Med **167**(3): 431-7.
- Katoh K, Nakanishi Y, Akimoto S, Yoshimura K, Takagi M, Sakamoto M, Hirohashi S (2002). "Correlation between laminin-5 gamma2 chain expression and epidermal growth factor receptor expression and its clinicopathological significance in squamous cell carcinoma of the tongue." Oncology **62**(4): 318-26.
- Khatri SB, Holguin FC, Ryan PB, Mannino D, Erzurum SC, Teague WG (2009). "Association of ambient ozone exposure with airway inflammation and allergy in adults with asthma." J Asthma **46**(8): 777-85.
- Kidd JG, Rous P (1940). "A Transplantable Rabbit Carcinoma Originating in a Virus-Induced Papilloma and Containing the Virus in Masked or Altered Form." J Exp Med **71**(6): 813-38.
- Kim R, Emi M, Tanabe K (2007). "Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape." Immunology **121**(1): 1-14.
- Kirkwood JM, Butterfield LH, Tarhini AA, Zarour H, Kalinski P, Ferrone S (2012). "Immunotherapy of cancer in 2012." CA Cancer J Clin **62**(5): 309-35.
- Kong CS, Narasimhan B, Cao H, Kwok S, Erickson JP, Koong A, Pourmand N, Le QT (2009). "The relationship between human papillomavirus status and other molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas." Int J Radiat Oncol Biol Phys **74**(2): 553-61.
- Kono H, Rock KL (2008). "How dying cells alert the immune system to danger." Nat Rev Immunol **8**(4): 279-89.
- Koontongkaew S (2013). "The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas." J Cancer **4**(1): 66-83.
- Kortylewski M, Komyod W, Kauffmann ME, Bosserhoff A, Heinrich PC, Behrmann I (2004). "Interferon-gamma-mediated growth regulation of melanoma cells: involvement of STAT1-dependent and STAT1-independent signals." J Invest Dermatol **122**(2): 414-22.
- Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S (2005). "Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **14**(2): 467-75.
- Kreuter KA, El-Abbadi N, Shbeeb A, Tseng L, Mahon SB, Narula N, Burney T, Colt H, Brenner M (2008). "Development of a rabbit pleural cancer model by using VX2 tumors." Comp Med **58**(3): 287-93.
- Kruser TJ, Wheeler DL (2010). "Mechanisms of resistance to HER family targeting antibodies." Exp Cell Res **316**(7): 1083-100.
- Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, Vatan L, Szeliga W, Wei S, Huang E, Finlayson E, Simeone D, Welling TH, Chang A, Coukos G, Liu R, Zou W (2009a). "Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments." Blood **114**(6): 1141-9.
- Kryczek I, Wei S, Szeliga W, Vatan L, Zou W (2009b). "Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis." Blood **114**(2): 357-9.
- Kundu SK, Nestor M (2012). "Targeted therapy in head and neck cancer." Tumour Biol **33**(3): 707-21.

- Lakshmi Narendra B, Eshvendar Reddy K, Shantikumar S, Ramakrishna S (2013). "Immune system: a double-edged sword in cancer." *Inflamm Res* **62**(9): 823-34.
- Lanca T, Costa MF, Goncalves-Sousa N, Rei M, Grosso AR, Penido C, Silva-Santos B (2013). "Protective role of the inflammatory CCR2/CCL2 chemokine pathway through recruitment of type 1 cytotoxic gammadelta T lymphocytes to tumor beds." *J Immunol* **190**(12): 6673-80.
- Lanca T, Silva-Santos B (2013). "Recruitment of gammadelta T lymphocytes to tumors: A new role for the pleiotropic chemokine CCL2." *Oncoimmunology* **2**(8): e25461.
- Lang F, Linlin M, Ye T, Yuhai Z (2012). "Alterations of dendritic cell subsets and TH1/TH2 cytokines in the peripheral circulation of patients with superficial transitional cell carcinoma of the bladder." *J Clin Lab Anal* **26**(5): 365-71.
- Lang S, Tiwari S, Andratschke M, Loehr I, Lauffer L, Bergmann C, Mack B, Lebeau A, Moosmann A, Whiteside TL, Zeidler R (2007). "Immune restoration in head and neck cancer patients after in vivo COX-2 inhibition." *Cancer Immunol Immunother* **56**(10): 1645-52.
- Larini A, Bocci V (2005). "Effects of ozone on isolated peripheral blood mononuclear cells." *Toxicol In Vitro* **19**(1): 55-61.
- Laurent A, Nicco C, Chereau C, Goulvestre C, Alexandre J, Alves A, Levy E, Goldwasser F, Panis Y, Soubrane O, Weill B, Batteux F (2005). "Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species." *Cancer Res* **65**(3): 948-56.
- Lee-Hoeflich ST, Crocker L, Yao E, Pham T, Munroe X, Hoeflich KP, Sliwkowski MX, Stern HM (2008). "A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy." *Cancer Res* **68**(14): 5878-87.
- Lee KC, Moon WK, Chung JW, Choi SH, Cho N, Cha JH, Lee EH, Kim SM, Kim HS, Han MH, Chang KH (2007). "Assessment of lymph node metastases by contrast-enhanced MR imaging in a head and neck cancer model." *Korean J Radiol* **8**(1): 9-14.
- Lee Y, Ma J, Lyu H, Huang J, Kim A, Liu B (2014). "Role of erbB3 receptors in cancer therapeutic resistance." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **46**(3): 190-8.
- Leon Fernandez OS, Ajamieh HH, Berlanga J, Menendez S, Viebahn-Hansler R, Re L, Carmona AM (2008). "Ozone oxidative preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in a rat model of liver ischemia/ reperfusion." *Transpl Int* **21**(1): 39-48.
- Leon OS, Menendez S, Merino N, Castillo R, Sam S, Perez L, Cruz E, Bocci V (1998). "Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals." *Mediators Inflamm* **7**(4): 289-94.
- Leone P, Shin EC, Perosa F, Vacca A, Dammacco F, Racanelli V (2013). "MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells." *J Natl Cancer Inst* **105**(16): 1172-87.
- Li FK, Davenport A, Robson RL, Loetscher P, Rothlein R, Williams JD, Topley N (1998). "Leukocyte migration across human peritoneal mesothelial cells is dependent on directed chemokine secretion and ICAM-1 expression." *Kidney Int* **54**(6): 2170-83.
- Li Q, Teitz-Tennenbaum S, Donald EJ, Li M, Chang AE (2009). "In vivo sensitized and in vitro activated B cells mediate tumor regression in cancer adoptive immunotherapy." *J Immunol* **183**(5): 3195-203.
- Li Z, Potts-Kant EN, Garantzios S, Foster WM, Hollingsworth JW (2011). "Hyaluronan signaling during ozone-induced lung injury requires TLR4, MyD88, and TIRAP." *PLoS One* **6**(11): e27137.
- Li Z, Potts EN, Piantadosi CA, Foster WM, Hollingsworth JW (2010). "Hyaluronan fragments contribute to the ozone-primed immune response to lipopolysaccharide." *J Immunol* **185**(11): 6891-8.
- Li Z, Tighe RM, Feng F, Ledford JG, Hollingsworth JW (2013). "Genes of innate immunity and the biological response to inhaled ozone." *J Biochem Mol Toxicol* **27**(1): 3-16.
- Lim R, Ahmed N, Borregaard N, Riley C, Wafai R, Thompson EW, Quinn MA, Rice GE (2007). "Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) an early-screening biomarker for ovarian cancer: NGAL is associated with epidermal growth factor-induced epithelio-mesenchymal transition." *Int J Cancer* **120**(11): 2426-34.
- Lin Q, Chen H, Lu C, Wang B, Zhang Y, He X, Yu B (2011). "Effects of ozone on sciatic nerve in rat." *Interv Neuroradiol* **17**(3): 281-5.
- Linggi B, Carpenter G (2006). "ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology." *Trends Cell Biol* **16**(12): 649-56.
- Ljuslinder I, Melin B, Henriksson ML, Oberg A, Palmqvist R (2011). "Increased epidermal growth factor receptor expression at the invasive margin is a negative prognostic factor in colorectal cancer." *Int J Cancer* **128**(9): 2031-7.
- Luheshi N, Davies G, Poon E, Wiggins K, McCourt M, Legg J (2014). "Th1 cytokines are more effective than Th2 cytokines at licensing anti-tumour functions in CD40-activated human macrophages in vitro." *Eur J Immunol* **44**(1): 162-72.
- Madej P, Plewka A, Madej JA, Nowak M, Plewka D, Franik G, Golka D (2007). "Ozonotherapy in an induced septic shock. I. Effect of ozonotherapy on rat organs in evaluation of free radical reactions and selected enzymatic systems." *Inflammation* **30**(1-2): 52-8.

- Makala LH, Suzuki N, Nagasawa H (2002). "Peyer's patches: organized lymphoid structures for the induction of mucosal immune responses in the intestine." *Pathobiology* **70**(2): 55-68.
- Maker AV, Phan GQ, Attia P, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Kammula US, Royal RE, Haworth LR, Levy C, Kleiner D, Mavroukakis SA, Yellin M, Rosenberg SA (2005). "Tumor regression and autoimmunity in patients treated with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and interleukin 2: a phase I/II study." *Ann Surg Oncol* **12**(12): 1005-16.
- Mandic R, Dunne AA, Eikelkamp N, Ramaswamy A, Schulz S, Teymoortash A, Sesterhenn A, Moll R, Werner JA (2002). "Expression of MMP-3, MMP-13, TIMP-2 and TIMP-3 in the VX2 carcinoma of the New Zealand white rabbit." *Anticancer Res* **22**(6A): 3281-4.
- Manzanares D, Monzon ME, Savani RC, Salathe M (2007). "Apical oxidative hyaluronan degradation stimulates airway ciliary beating via RHAMM and RON." *Am J Respir Cell Mol Biol* **37**(2): 160-8.
- Marchetti B, Ashrafi GH, Dornan ES, Araibi EH, Ellis SA, Campo MS (2006). "The E5 protein of BPV-4 interacts with the heavy chain of MHC class I and irreversibly retains the MHC complex in the Golgi apparatus." *Oncogene* **25**(15): 2254-63.
- Markovic A, Chung CH (2012). "Current role of EGF receptor monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors in the management of head and neck squamous cell carcinoma." *Expert Rev Anticancer Ther* **12**(9): 1149-59.
- Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y, Yang XO, Yamazaki T, Lu S, Hwu P, Restifo NP, Overwijk WW, Dong C (2009). "T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity." *Immunity* **31**(5): 787-98.
- Martin F, Apetoh L, Ghiringhelli F (2012). "Controversies on the role of Th17 in cancer: a TGF-beta-dependent immunosuppressive activity?" *Trends Mol Med* **18**(12): 742-9.
- Masopust D, Schenkel JM (2013). "The integration of T cell migration, differentiation and function." *Nat Rev Immunol* **13**(5): 309-20.
- McCarthy JT, Pelle E, Dong K, Brahmabhatt K, Yarosh D, Pernodet N (2013). "Effects of ozone in normal human epidermal keratinocytes." *Exp Dermatol* **22**(5): 360-1.
- McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG (2005). "Antigen-specific memory B cell development." *Annu Rev Immunol* **23**: 487-513.
- Meric JB, Rottey S, Olausson K, Soria JC, Khayat D, Rixe O, Spano JP (2006). "Cyclooxygenase-2 as a target for anticancer drug development." *Crit Rev Oncol Hematol* **59**(1): 51-64.
- Miao EA, Rajan JV, Aderem A (2011). "Caspase-1-induced pyroptotic cell death." *Immunol Rev* **243**(1): 206-14.
- Mitsudomi T, Yatabe Y (2010). "Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer." *Febs J* **277**(2): 301-8.
- Miura S, Kawana K, Schust DJ, Fujii T, Yokoyama T, Iwasawa Y, Nagamatsu T, Adachi K, Tomio A, Tomio K, Kojima S, Yasugi T, Kozuma S, Taketani Y (2010). "CD1d, a sentinel molecule bridging innate and adaptive immunity, is downregulated by the human papillomavirus (HPV) E5 protein: a possible mechanism for immune evasion by HPV." *J Virol* **84**(22): 11614-23.
- Mlecik B, Bindea G, Pages F, Galon J (2011). "Tumor immunosurveillance in human cancers." *Cancer Metastasis Rev* **30**(1): 5-12.
- Morris JC, Tan AR, Olencki TE, Shapiro GI, Dezube BJ, Reiss M, Hsu FJ, Berzofsky JA, Lawrence DP (2014). "Phase I study of GC1008 (fresolimumab): a human anti-transforming growth factor-beta (TGFbeta) monoclonal antibody in patients with advanced malignant melanoma or renal cell carcinoma." *PLoS One* **9**(3): e90353.
- Muckle DS, Dickson JA (1971). "The selective inhibitory effect of hyperthermia on the metabolism and growth of malignant cells." *Br J Cancer* **25**(4): 771-8.
- Mudway IS, Kelly FJ (2000). "Ozone and the lung: a sensitive issue." *Mol Aspects Med* **21**(1-2): 1-48.
- Mutsaers SE (2002). "Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair." *Respirology* **7**(3): 171-91.
- Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, Ohtani H (1998). "CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer." *Cancer Res* **58**(16): 3491-4.
- Nathan C, Cunningham-Bussell A (2013). "Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species." *Nat Rev Immunol* **13**(5): 349-61.
- Nedergaard BS, Ladekarl M, Thomsen HF, Nyengaard JR, Nielsen K (2007). "Low density of CD3+, CD4+ and CD8+ cells is associated with increased risk of relapse in squamous cell cervical cancer." *Br J Cancer* **97**(8): 1135-8.
- Neparidze N, Dhodapkar MV (2009). "Harnessing CD1d-restricted T cells toward antitumor immunity in humans." *Ann N Y Acad Sci* **1174**: 61-7.
- Neuzillet C, de Gramont A, Tijeras-Raballand A, de Mestier L, Cros J, Faivre S, Raymond E (2014). "Perspectives of TGF-beta inhibition in pancreatic and hepatocellular carcinomas." *Oncotarget* **5**(1): 78-94.
- Nishikawa H, Sakaguchi S (2010). "Regulatory T cells in tumor immunity." *Int J Cancer* **127**(4): 759-67.

- Nishimura T, Iwakabe K, Sekimoto M, Ohmi Y, Yahata T, Nakui M, Sato T, Habu S, Tashiro H, Sato M, Ohta A (1999). "Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo." J Exp Med **190**(5): 617-27.
- Nouri-Shirazi M, Banchereau J, Bell D, Burkeholder S, Kraus ET, Davoust J, Palucka KA (2000). "Dendritic cells capture killed tumor cells and present their antigens to elicit tumor-specific immune responses." J Immunol **165**(7): 3797-803.
- Novick D, Kim S, Kaplanski G, Dinarello CA (2013). "Interleukin-18, more than a Th1 cytokine." Semin Immunol **25**(6): 439-48.
- Nunez S, Saez JJ, Fernandez D, Flores-Santibanez F, Alvarez K, Tejon G, Ruiz P, Maldonado P, Hidalgo Y, Manriquez V, Bono MR, Roseblatt M, Sauma D (2013). "T helper type 17 cells contribute to anti-tumour immunity and promote the recruitment of T helper type 1 cells to the tumour." Immunology **139**(1): 61-71.
- Ocana A, Vera-Badillo F, Seruga B, Templeton A, Pandiella A, Amir E (2013). "HER3 overexpression and survival in solid tumors: a meta-analysis." J Natl Cancer Inst **105**(4): 266-73.
- Ono Y, Nakanishi Y, Gotoh M, Sakamoto M, Hirohashi S (2002). "Epidermal growth factor receptor gene amplification is correlated with laminin-5 gamma2 chain expression in oral squamous cell carcinoma cell lines." Cancer Lett **175**(2): 197-204.
- Otto W, Denzinger S, Wieland WF, Hartmann A (2012). "First analysis of immune cell infiltration in stage pT1 urothelial bladder carcinoma: CD3 positivity as a prognostic marker for cancer-specific survival." World J Urol **30**(6): 875-7.
- Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J (2005). "Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer." N Engl J Med **353**(25): 2654-66.
- Pages F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautes-Fridman C, Fridman WH (2010). "Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored." Oncogene **29**(8): 1093-102.
- Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." Nat Immunol **6**(11): 1133-41.
- Petersen RP, Campa MJ, Sperlazza J, Conlon D, Joshi MB, Harpole DH, Jr., Patz EF, Jr. (2006). "Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients." Cancer **107**(12): 2866-72.
- Pilonis KA, Aryankalayil J, Demaria S (2012). "Invariant NKT cells as novel targets for immunotherapy in solid tumors." Clin Dev Immunol **2012**: 720803.
- Pradere JP, Dapito DH, Schwabe RF (2013). "The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer." Oncogene.
- Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M (1995). "The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products." Free Radic Biol Med **19**(6): 935-41.
- Qi W, Huang X, Wang J (2013). "Correlation between Th17 cells and tumor microenvironment." Cell Immunol **285**(1-2): 18-22.
- Rathinam R, Alahari SK (2010). "Important role of integrins in the cancer biology." Cancer Metastasis Rev **29**(1): 223-37.
- Rautava J, Syrjanen S (2012). "Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis." Head Neck Pathol **6 Suppl 1**: S3-15.
- Ray A, Dittel BN (2010). "Isolation of mouse peritoneal cavity cells." J Vis Exp(35).
- Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA (2012). "Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response." Nat Rev Immunol **12**(4): 269-81.
- Richter P, Bohmer FD, Hindermann W, Borsi L, Hyckel P, Schleier P, Katenkamp D, Kosmehl H, Berndt A (2005). "Analysis of activated EGFR signalling pathways and their relation to laminin-5 gamma2 chain expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC)." Histochem Cell Biol **124**(2): 151-60.
- Rodriguez T, Mendez R, Del Campo A, Jimenez P, Aptsiauri N, Garrido F, Ruiz-Cabello F (2007). "Distinct mechanisms of loss of IFN-gamma mediated HLA class I inducibility in two melanoma cell lines." BMC Cancer **7**: 34.
- Rogers SJ, Harrington KJ, Rhys-Evans P, P OC, Eccles SA (2005). "Biological significance of c-erbB family oncogenes in head and neck cancer." Cancer Metastasis Rev **24**(1): 47-69.
- Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME (2008). "Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy." Nat Rev Cancer **8**(4): 299-308.
- Roskoski R, Jr. (2013). "The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer." Pharmacol Res **79**: 34-74.
- Rous P, Beard JW (1935). "The Progression To Carcinoma Of Virus-Induced Rabbit Papillomas (Shope)." J Exp Med **62**(4): 523-48.

- Rous P, Kidd JG, Smith WE (1952). "Experiments on the cause of the rabbit carcinomas derived from virus-induced papillomas. II. Loss by the Vx2 carcinoma of the power to immunize hosts against the papilloma virus." *J Exp Med* **96**(2): 159-74.
- Rydberg C, Mansson A, Uddman R, Riesbeck K, Cardell LO (2009). "Toll-like receptor agonists induce inflammation and cell death in a model of head and neck squamous cell carcinomas." *Immunology* **128**(1 Suppl): e600-11.
- Sagai M, Bocci V (2011). "Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress?" *Med Gas Res* **1**: 29.
- Salaun B, Coste I, Rissoan MC, Lebecque SJ, Renno T (2006). "TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells." *J Immunol* **176**(8): 4894-901.
- Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Bellone S, Pecorelli S, Roman JJ, Parham GP, Cannon MJ (2000). "Interleukin-10 increases Th1 cytokine production and cytotoxic potential in human papillomavirus-specific CD8(+) cytotoxic T lymphocytes." *J Virol* **74**(10): 4729-37.
- Sapundzhiev N, Dunne AA, Ramaswamy A, Werner JA (2005). "The auricular VX2 carcinoma: feasibility of complete tumor resection." *Anticancer Res* **25**(6B): 4209-14.
- Scaltriti M, Baselga J (2006). "The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy." *Clin Cancer Res* **12**(18): 5268-72.
- Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, Fenton MJ, Powell JD, Horton MR (2006). "Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2." *J Immunol* **177**(2): 1272-81.
- Schreck S, Friebel D, Buettner M, Distel L, Grabenbauer G, Young LS, Niedobitek G (2009). "Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma." *Hematol Oncol* **27**(1): 31-9.
- Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ (2011). "Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion." *Science* **331**(6024): 1565-70.
- Schulz S, Haussler U, Mandic R, Heverhagen JT, Neubauer A, Dunne AA, Werner JA, Weihe E, Bette M (2008). "Treatment with ozone/oxygen-pneumoperitoneum results in complete remission of rabbit squamous cell carcinomas." *Int J Cancer* **122**(10): 2360-7.
- Schulz S, Rodriguez ZZ, Mutters R, Menendez S, Bette M (2003). "Repetitive pneumoperitoneum with ozonized oxygen as a preventive in lethal polymicrobial sepsis in rats." *Eur Surg Res* **35**(1): 26-34.
- Schwartzentruber DJ, Lawson DH, Richards JM, Conry RM, Miller DM, Treisman J, Gailani F, Riley L, Conlon K, Pockaj B, Kendra KL, White RL, Gonzalez R, Kuzel TM, Curti B, Leming PD, Whitman ED, Balkissoon J, Reintgen DS, Kaufman H, Marincola FM, Merino MJ, Rosenberg SA, Choyke P, Vena D, Hwu P (2011). "gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma." *N Engl J Med* **364**(22): 2119-27.
- Sedlacek AL, Gerber SA, Randall TD, van Rooijen N, Frelinger JG, Lord EM (2013). "Generation of a dual-functioning antitumor immune response in the peritoneal cavity." *Am J Pathol* **183**(4): 1318-28.
- Sengupta N, MacFie TS, MacDonald TT, Pennington D, Silver AR (2010). "Cancer immunoediting and "spontaneous" tumor regression." *Pathol Res Pract* **206**(1): 1-8.
- Senovilla L, Vacchelli E, Garcia P, Eggermont A, Fridman WH, Galon J, Zitvogel L, Kroemer G, Galluzzi L (2013). "Trial watch: DNA vaccines for cancer therapy." *Oncoimmunology* **2**(4): e23803.
- Sentani K, Matsuda M, Oue N, Uraoka N, Naito Y, Sakamoto N, Yasui W (2013). "Clinicopathological significance of MMP-7, laminin gamma2 and EGFR expression at the invasive front of gastric carcinoma." *Gastric Cancer*.
- Seshacharyulu P, Ponnusamy MP, Haridas D, Jain M, Ganti AK, Batra SK (2012). "Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy." *Expert Opin Ther Targets* **16**(1): 15-31.
- Shah P, Shyam AK, Shah S (2011). "Adjuvant combined ozone therapy for extensive wound over tibia." *Indian J Orthop* **45**(4): 376-9.
- Sharma A, Rajappa M, Satyam A, Sharma M (2009). "Cytokines (TH1 and TH2) in patients with advanced cervical cancer undergoing neoadjuvant chemoradiation: correlation with treatment response." *Int J Gynecol Cancer* **19**(7): 1269-75.
- Sharma S, Stolina M, Yang SC, Baratelli F, Lin JF, Atianzar K, Luo J, Zhu L, Lin Y, Huang M, Dohadwala M, Batra RK, Dubinett SM (2003). "Tumor cyclooxygenase 2-dependent suppression of dendritic cell function." *Clin Cancer Res* **9**(3): 961-8.
- Sharma S, Yang SC, Zhu L, Reckamp K, Gardner B, Baratelli F, Huang M, Batra RK, Dubinett SM (2005). "Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E2-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4+ CD25+ T regulatory cell activities in lung cancer." *Cancer Res* **65**(12): 5211-20.
- Sheu BC, Lin RH, Lien HC, Ho HN, Hsu SM, Huang SC (2001). "Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer." *J Immunol* **167**(5): 2972-8.
- Shibuya TY, Nugyen N, McLaren CE, Li KT, Wei WZ, Kim S, Yoo GH, Rogowski A, Ensley J, Sakr W (2002). "Clinical significance of poor CD3 response in head and neck cancer." *Clin Cancer Res* **8**(3): 745-51.

- Shilpa Reddy A, Reddy N, Dinapadu S, Reddy M, Pasari S (2013). "Role of ozone therapy in minimal intervention dentistry and endodontics - a review." *J Int Oral Health* **5**(3): 102-8.
- Shimotsuma M, Shields JW, Simpson-Morgan MW, Sakuyama A, Shirasu M, Hagiwara A, Takahashi T (1993). "Morpho-physiological function and role of omental milky spots as omentum-associated lymphoid tissue (OALT) in the peritoneal cavity." *Lymphology* **26**(2): 90-101.
- Shope RE, Hurst EW (1933). "Infectious Papillomatosis of Rabbits: With a Note on the Histopathology." *J Exp Med* **58**(5): 607-24.
- Silva SD, Cunha IW, Younes RN, Soares FA, Kowalski LP, Graner E (2010). "ErbB receptors and fatty acid synthase expression in aggressive head and neck squamous cell carcinomas." *Oral Dis* **16**(8): 774-80.
- Singh AB, Harris RC (2005). "Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands." *Cell Signal* **17**(10): 1183-93.
- Soltes L, Mendichi R, Kogan G, Schiller J, Stankovska M, Arnhold J (2006). "Degradative action of reactive oxygen species on hyaluronan." *Biomacromolecules* **7**(3): 659-68.
- Sorensen EW, Gerber SA, Sedlacek AL, Rybalko VY, Chan WM, Lord EM (2009). "Omental immune aggregates and tumor metastasis within the peritoneal cavity." *Immunol Res* **45**(2-3): 185-94.
- Soret J (1864). "Ueber die elektrische Darstellung des Ozons und über die Natur dieses Körpers." *Annalen der Physik* **194**(4): 623-629.
- Staruschenko A, Palygin O, Ilatovskaya DV, Pavlov TS (2013). "Epidermal growth factors in the kidney and relationship to hypertension." *Am J Physiol Renal Physiol* **305**(1): F12-20.
- Sterz CM, Kulle C, Dakic B, Makarova G, Botcher MC, Bette M, Werner JA, Mandic R (2010). "A basal-cell-like compartment in head and neck squamous cell carcinomas represents the invasive front of the tumor and is expressing MMP-9." *Oral Oncol* **46**(2): 116-22.
- Sunil VR, Patel-Vayas K, Shen J, Laskin JD, Laskin DL (2012). "Classical and alternative macrophage activation in the lung following ozone-induced oxidative stress." *Toxicol Appl Pharmacol* **263**(2): 195-202.
- Sweet F, Kao MS, Lee SC, Hagar WL, Sweet WE (1980). "Ozone selectively inhibits growth of human cancer cells." *Science* **209**(4459): 931-3.
- Tait SW, Green DR (2012). "Mitochondria and cell signalling." *J Cell Sci* **125**(Pt 4): 807-15.
- Takeuchi O, Akira S (2010). "Pattern recognition receptors and inflammation." *Cell* **140**(6): 805-20.
- Takikita M, Xie R, Chung JY, Cho H, Yaya K, Hong SM, Moskaluk CA, Hewitt SM (2011). "Membranous expression of Her3 is associated with a decreased survival in head and neck squamous cell carcinoma." *J Transl Med* **9**: 126.
- Tarhini AA, Kirkwood JM, Gooding WE, Cai C, Agarwala SS (2007). "Durable complete responses with high-dose bolus interleukin-2 in patients with metastatic melanoma who have experienced progression after biochemotherapy." *J Clin Oncol* **25**(25): 3802-7.
- Tasdemir C, Tasdemir S, Vardi N, Ates B, Onal Y, Erdogan S, Yucel A, Aglamis E, Yakupogullari Y, Altintas R, Karaman A (2013). "Evaluation of the effects of ozone therapy on Escherichia coli-induced cytitis in rat." *Ir J Med Sci* **182**(4): 557-63.
- Tepper RI, Coffman RL, Leder P (1992). "An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4." *Science* **257**(5069): 548-51.
- Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, Miyake K, Freudenberg M, Galanos C, Simon JC (2002). "Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4." *J Exp Med* **195**(1): 99-111.
- Termeer CC, Hennies J, Voith U, Ahrens T, Weiss JM, Prehm P, Simon JC (2000). "Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells." *J Immunol* **165**(4): 1863-70.
- Thielens A, Vivier E, Romagne F (2012). "NK cell MHC class I specific receptors (KIR): from biology to clinical intervention." *Curr Opin Immunol* **24**(2): 239-45.
- Thomas L (1982). "On Immunosurveillance in Human Cancer." *The Yale Journal of Biology and Medicine* **55**: 329-333.
- Tormo D, Checinska A, Alonso-Curbelo D, Perez-Guijarro E, Canon E, Riveiro-Falkenbach E, Calvo TG, Larribere L, Megias D, Mulero F, Piris MA, Dash R, Barral PM, Rodriguez-Peralta JL, Ortiz-Romero P, Tuting T, Fisher PB, Soengas MS (2009). "Targeted activation of innate immunity for therapeutic induction of autophagy and apoptosis in melanoma cells." *Cancer Cell* **16**(2): 103-14.
- Tougeron D, Sha D, Manthavadi S, Sinicrope FA (2014). "Aspirin and colorectal cancer: back to the future." *Clin Cancer Res* **20**(5): 1087-94.
- Trimboli AJ, Fukino K, de Bruin A, Wei G, Shen L, Tanner SM, Creasap N, Rosol TJ, Robinson ML, Eng C, Ostrowski MC, Leone G (2008). "Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer." *Cancer Res* **68**(3): 937-45.
- Tschopp J, Schroder K (2010). "NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production?" *Nat Rev Immunol* **10**(3): 210-5.
- Uysal B, Demirbag S, Poyrazoglu Y, Cayci T, Yesildaglar N, Guven A, Surer I, Korkmaz A (2012). "Medical ozone therapy decreases postoperative uterine adhesion formation in rats." *Arch Gynecol Obstet* **286**(5): 1201-7.

- Vacchelli E, Eggermont A, Fridman WH, Galon J, Tartour E, Zitvogel L, Kroemer G, Galluzzi L (2013). "Trial Watch: Adoptive cell transfer for anticancer immunotherapy." *Oncoimmunology* **2**(5): e24238.
- Vaillant JD, Fraga A, Diaz MT, Mallok A, Viebahn-Hansler R, Fahmy Z, Barbera A, Delgado L, Menendez S, Fernandez OS (2013). "Ozone oxidative postconditioning ameliorates joint damage and decreases pro-inflammatory cytokine levels and oxidative stress in PG/PS-induced arthritis in rats." *Eur J Pharmacol* **714**(1-3): 318-24.
- van Es RJ, Dullens HF, van der Bilt A, Koole R, Slootweg PJ (2000). "Evaluation of the VX2 rabbit auricle carcinoma as a model for head and neck cancer in humans." *J Craniomaxillofac Surg* **28**(5): 300-7.
- van Es RJ, Franssen O, Dullens HF, Bernsen MR, Bosman F, Hennink WE, Slootweg PJ (1999). "The VX2 carcinoma in the rabbit auricle as an experimental model for intra-arterial embolization of head and neck squamous cell carcinoma with dextran microspheres." *Lab Anim* **33**(2): 175-84.
- Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A, Roperto S, Campo MS, Borzacchiello G (2011). "Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions." *Mol Cancer* **10**: 140.
- Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ (2011). "Natural innate and adaptive immunity to cancer." *Annu Rev Immunol* **29**: 235-71.
- Wakatsuki K, Sho M, Yamato I, Takayama T, Matsumoto S, Tanaka T, Migita K, Ito M, Hotta K, Nakajima Y (2013). "Clinical impact of tumor-infiltrating CD45RO(+) memory T cells on human gastric cancer." *Oncol Rep* **29**(5): 1756-62.
- Wang XY, Zuo D, Sarkar D, Fisher PB (2011). "Blockade of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 as a new therapeutic approach for advanced melanoma." *Expert Opin Pharmacother* **12**(17): 2695-706.
- Wathelet N, Moser M (2013). "Role of dendritic cells in the regulation of antitumor immunity." *Oncoimmunology* **2**(4): e23973.
- Wen X, Rao P, Carreno LJ, Kim S, Lawrenczyk A, Porcelli SA, Cresswell P, Yuan W (2013). "Human CD1d knock-in mouse model demonstrates potent antitumor potential of human CD1d-restricted invariant natural killer T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(8): 2963-8.
- Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H (2000). "Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry." *Am J Surg Pathol* **24**(7): 1016-9.
- Wiegand S, Wiemers C, Murthum T, Zimmermann AP, Bette M, Mandic R, Werner JA (2013). "Risk of lymph node metastases after en bloc cold steel, en bloc laser-, and piecemeal laser surgical resection of auricular VX2 carcinoma." *Lasers Med Sci* **28**(4): 1137-41.
- Wilson KJ, Gilmore JL, Foley J, Lemmon MA, Riese DJ, 2nd (2009). "Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: implications for cancer." *Pharmacol Ther* **122**(1): 1-8.
- Wu L, Van Kaer L (2011). "Natural killer T cells in health and disease." *Front Biosci (Schol Ed)* **3**: 236-51.
- Xia W, Lau YK, Zhang HZ, Xiao FY, Johnston DA, Liu AR, Li L, Katz RL, Hung MC (1999). "Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members." *Clin Cancer Res* **5**(12): 4164-74.
- Yamaguchi T, Sakaguchi S (2006). "Regulatory T cells in immune surveillance and treatment of cancer." *Semin Cancer Biol* **16**(2): 115-23.
- Yamawaki H, Hirohata S, Miyoshi T, Takahashi K, Ogawa H, Shinohata R, Demircan K, Kusachi S, Yamamoto K, Ninomiya Y (2009). "Hyaluronan receptors involved in cytokine induction in monocytes." *Glycobiology* **19**(1): 83-92.
- Yang L, Yamagata N, Yadav R, Brandon S, Courtney RL, Morrow JD, Shyr Y, Boothby M, Joyce S, Carbone DP, Breyer RM (2003). "Cancer-associated immunodeficiency and dendritic cell abnormalities mediated by the prostaglandin EP2 receptor." *J Clin Invest* **111**(5): 727-35.
- Ye J, Su X, Hsueh EC, Zhang Y, Koenig JM, Hoft DF, Peng G (2011). "Human tumor-infiltrating Th17 cells have the capacity to differentiate into IFN-gamma+ and FOXP3+ T cells with potent suppressive function." *Eur J Immunol* **41**(4): 936-51.
- Ye ZJ, Zhou Q, Gu YY, Qin SM, Ma WL, Xin JB, Tao XN, Shi HZ (2010). "Generation and differentiation of IL-17-producing CD4+ T cells in malignant pleural effusion." *J Immunol* **185**(10): 6348-54.
- Yee C (2013). "Adoptive T-cell therapy for cancer: boutique therapy or treatment modality?" *Clin Cancer Res* **19**(17): 4550-2.
- Yen HR, Harris TJ, Wada S, Grosso JF, Getnet D, Goldberg MV, Liang KL, Bruno TC, Pyle KJ, Chan SL, Anders RA, Trimble CL, Adler AJ, Lin TY, Pardoll DM, Huang CT, Drake CG (2009). "Tc17 CD8 T cells: functional plasticity and subset diversity." *J Immunol* **183**(11): 7161-8.
- Yewale C, Baradia D, Vhora I, Patil S, Misra A (2013). "Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: a review of trends and strategies." *Biomaterials* **34**(34): 8690-707.
- Yu L, Wang L, Chen S (2013). "Dual character of Toll-like receptor signaling: pro-tumorigenic effects and anti-tumor functions." *Biochim Biophys Acta* **1835**(2): 144-54.

- Yu Y, Cho HI, Wang D, Kaosaard K, Anasetti C, Celis E, Yu XZ (2013). "Adoptive transfer of Tc1 or Tc17 cells elicits antitumor immunity against established melanoma through distinct mechanisms." *J Immunol* **190**(4): 1873-81.
- Yung S, Chan T (2007). "Glycosaminoglycans and proteoglycans: overlooked entities?" *Perit Dial Int*. **27**(Suppl 2): 104-9.
- Yung S, Chan TM (2011). "Pathophysiology of the peritoneal membrane during peritoneal dialysis: the role of hyaluronan." *J Biomed Biotechnol* **2011**: 180594.
- Yung S, Li FK, Chan TM (2006). "Peritoneal mesothelial cell culture and biology." *Perit Dial Int* **26**(2): 162-73.
- Zafirova B, Wensveen FM, Gulin M, Polic B (2011). "Regulation of immune cell function and differentiation by the NKG2D receptor." *Cell Mol Life Sci* **68**(21): 3519-29.
- Zamarron BF, Chen W (2011). "Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression." *Int J Biol Sci* **7**(5): 651-8.
- Zamora ZB, Borrego A, Lopez OY, Delgado R, Gonzalez R, Menendez S, Hernandez F, Schulz S (2005). "Effects of ozone oxidative preconditioning on TNF-alpha release and antioxidant-prooxidant intracellular balance in mice during endotoxic shock." *Mediators Inflamm* **2005**(1): 16-22.
- Zhang B, Li P, Wang E, Brahmi Z, Dunn KW, Blum JS, Roman A (2003). "The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma." *Virology* **310**(1): 100-8.
- Zhang H, Berezov A, Wang Q, Zhang G, Drebin J, Murali R, Greene MI (2007). "ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies." *J Clin Invest* **117**(8): 2051-8.
- Zigler M, Shir A, Levitzki A (2013). "Targeted cancer immunotherapy." *Curr Opin Pharmacol* **13**(4): 504-10.
- Zitvogel L, Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G (2012). "Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses." *Nat Immunol* **13**(4): 343-51.
- Zou W, Restifo NP (2010). "T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy." *Nat Rev Immunol* **10**(4): 248-56.
- Zuo JH, Zhu W, Li MY, Li XH, Yi H, Zeng GQ, Wan XX, He QY, Li JH, Qu JQ, Chen Y, Xiao ZQ (2011). "Activation of EGFR promotes squamous carcinoma SCC10A cell migration and invasion via inducing EMT-like phenotype change and MMP-9-mediated degradation of E-cadherin." *J Cell Biochem* **112**(9): 2508-17.