

Aus dem Institut für Anatomie II: Experimentelle Morphologie
(Direktor: Prof. Dr. U. Schumacher)
Zentrum für Experimentelle Medizin
Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf

**Multidimensionale Wirkung des hochaufgereinigten Mistellektins-I
auf das humane maligne Melanom im Scid-Maus Xenograft-Modell**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Philip Dautel
aus Hamburg

Hamburg, 2005

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Dekan:

Referent:

Koreferent:

Inhaltsverzeichnis:

1. Arbeitshypothese und Fragestellung	5
2. Einleitung	6
2.1. Das maligne Melanom.....	6
2.1.1. Epidemiologie des malignen Melanoms.....	6
2.1.2. Prognose und Therapieoptionen des malignen Melanoms	6
2.2. Wirkmechanismen des Mistellektins-I.....	9
2.3. Scid-Maus Xenograft-Melanommodell.....	11
3. Material und Methoden.....	12
3.1. Untersuchungsgut	12
3.2. Hämatoxylin-Eosin Färbung	12
3.2.1. Bestimmung apoptotischer Zellen.....	12
3.2.2. Bestimmung der Nekroseanteile.....	13
3.3. Immunhistochemische Untersuchungen.....	14
3.3.1. Nachweis des zytosolischen Proteins Bax.....	14
3.3.2. Nachweis des zytosolischen Proteins Bcl-2.....	16
3.3.3. Kollagen-Typ-IV-Immunhistochemie zum Nachweis von Gefäßen	17
3.3.4. Nachweis muriner NK-Zellen	18
3.4. Lektinhistochemie.....	18
3.4.1. Darstellung dendritischer Zellen mit dem Lektin BSA-I	18
3.4.2. Bestimmung apoptotischer dendritischer Zellen	19
3.5. Lichtmikroskopische Auswertungen	20
3.6. Statistische Analyse der Daten.....	21

4. Ergebnisse	22
4.1. Apoptoseinduktion	22
4.1.1. Apoptoseinduktion in den Primärtumoren	22
4.1.2. Apoptoseinduktion in den Lungenmetastasen	24
4.2. Bestimmung der Nekroseanteile in den Primärtumoren	25
4.3. Immunhistochemie	27
4.3.1. Nachweis von Bax in den Primärtumoren	27
4.3.2. Nachweis von Bcl-2 in den Primärtumoren	29
4.3.3. Anzahl der Gefäße in den Primärtumoren	31
4.4. Lektinhistochemie	34
4.4.1. Anteil dendritischer Zellen in den Primärtumoren	34
4.4.2. Anteil dendritischer Zellen in den Lungenmetastasen.....	37
4.4.3. Apoptoseinduktion in dendritischen Zellen.....	39
4.5. Korrelationen	40
5. Diskussion	42
6. Zusammenfassung	54
7. Literaturverzeichnis	55
8. Danksagung	61
9. Lebenslauf	62
10. Erklärung	63

Abkürzungsverzeichnis:

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
10-JÜR	10-Jahres-Überlebensrate
AIF	Apoptosis-Inducing Factor
ANOVA	Analysis of Variance
APAAP	Alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase
Bak	Bcl-2 Antagonist Killer 1
Bax	Bcl-2 associated x-Protein
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BSA-I	Bandeiraea simplicifolia Agglutinin-I
CARD	Caspase Recruitment Domains
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	Cluster of Differentiation 4/8 positive T-Lymphozyten
DCs	Dendritische Zellen (dendritic cells)
DD	Death Domains
DED	Death Effector Domains
DMF	Dimethylformamid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
Fas	Fibroblast-Associated Receptor
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
KG	Körpergewicht
LK	Lymphknoten
LM	Lungenmetastase(n)
LP	Lektinpuffer
min	Minute(n)
ml	Milliliter
ML-I /-II /-III	Mistellektin-I /-II /-III
mm	Millimeter
mM	millimolar
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
PBS	Phosphatpuffer
PUMA	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
RIP II	Ribosomen inaktivierendes Protein II

Rko	Rangkorrelationskoeffizient
Scid	Severe combined immunodeficiency
SLN	Sentinel Lymphknoten
TBS	Trispuffer
TG	Tumorgewicht
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNF-R	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
TRAIL-R	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Obwohl wässrige Mistelextrakte in der alternativen Tumorthherapie eine breite Anwendung finden, ist der genaue Wirkmechanismus des Mistellektins-I, dem Hauptwirkstoff dieser Extrakte, *in vivo* kaum untersucht. In einem Scid-Maus Xenograft-Modell konnte eine signifikante antiproliferative (Reduktion des Primärtumorgewichtes um ca. 35%; $P = 0,033$) und eine noch stärkere antimetastatische (Reduktion der Lungenmetastasen um ca. 55%; $P = 0,016$) Wirkung von hochaufgereinigtem Mistellektin-I (ML-I) auf die humane Melanomzelllinie MV3 gezeigt werden. Diese Wirkung zeigte sich allerdings nur in einer Dosierung von 30 ng/kg KG, wohingegen höhere Dosierungen (150 bzw. 500 ng/kg KG) weder eine Hemmung des Tumorwachstums noch der Metastasierung aufwiesen.

Für das ML-I werden sowohl eine zytotoxische Wirkung durch eine Ribosomeninaktivierung als auch eine immunmodulatorische Wirkung durch Freisetzung verschiedener Zytokine und Stimulation von NK-Zellen und Makrophagen, sowie eine antiangiogenetische Wirkung diskutiert. Daher ist es das Ziel dieser Arbeit, die genauen Wirkmechanismen des europäischen ML-I auf das Wachstum und die Metastasierung des malignen Melanoms *in vivo* zu untersuchen.

Folgende Fragen sollten im Einzelnen geklärt werden:

- Ist die Wirkung des ML-I auf die humane Melanomzelllinie MV3 im Tiermodell auf eine Apoptoseinduktion zurückzuführen?
- Wenn ja, welche Apoptosemechanismen werden durch die ML-I-Therapie induziert?
- Wirkt das ML-I einem Einsprossen von Blutgefäßen in den Tumor entgegen?
- Besteht ein Unterschied in der Expression von Bax und Bcl-2 sowie der Anzahl an Gefäßen und dendritischen Zellen zwischen den Primärtumoren und den Lungenmetastasen innerhalb und zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen?
- Läßt sich eine Erklärung für die unterschiedliche ML-I Wirkung in der Dosierung von 30 ng ML-I/kg KG/Tag im Gegensatz zu den höheren Dosierungen von 150 bzw. 500 ng ML-I/kg KG/Tag finden?

2. Einleitung

2.1. Das maligne Melanom

2.1.1. Epidemiologie des malignen Melanoms

Das maligne Melanom ist ein bösartiger Tumor, der von den Pigment produzierenden Zellen (Melanozyten) der Haut und Schleimhäute abstammt. Die Inzidenz dieses Tumors verdoppelt sich derzeit ungefähr alle 10 Jahre (Lens und Dawes, 2004). Jährlich treten in Deutschland über 11.000 Neuerkrankungen auf (Garbe et al., 1995; Garbe und Blum, 2001). Weltweit werden jährlich über 130.000 neue Melanome diagnostiziert, wobei die Inzidenz in Australien und Neu Seeland sowie im Süden der USA deutlich höher ist als in Deutschland und in Nordeuropa (Garbe et al., 1995; Lens und Dawes, 2004). Die hohe Inzidenz macht diese Erkrankung neben der äußerst schwierigen Therapie bei bereits erfolgter Metastasierung zu einer der wichtigsten bösartigen Neubildungen in der Onkologie überhaupt.

2.1.2. Prognose und Therapieoptionen des malignen Melanoms

Die Prognose des malignen Melanoms hängt maßgeblich von der Tumordicke (Breslow und Macht, 1978), dem Befall des Sentinel-Lymphknoten (erste Lymphknotenstation im Abflußgebiet, SLN) und der Anzahl befallener Lymphknoten ab, wobei mehr als drei befallene Lymphknoten die Prognose stark verschlechtern. Eine Ulzeration des Primärtumors verschlechtert die Prognose ebenfalls (Balch et al., 2000). Die Einteilung der klinischen Stadien und die entsprechende 10-Jahres Überlebensrate sind in Tabelle 1 dargestellt.

Klini. Stadium	T	N	M	10-JÜR (%)
0	Tis	N0	M0	
IA	T1a (<1.0mm)	N0	M0	97
IB	T1b (<1.0mm)	N0	M0	90
	T2a (1,01-2,0mm)	N0	M0	
IIA	T2b (1,01-2,0mm)	N0	M0	67
	T3a (2,01-4,0mm)	N0	M0	
IIB	T3b (2,01-4,0mm)	N0	M0	43
	T4a (>4,0mm)	N0	M0	
IIC	T4b (>4,0mm)	N0	M0	
IIIA	jeder T1-4a	N1b	M0	28
IIIB	jeder T1-4a	N2b	M0	19
IIIC	jeder T	N2c	M0	
	jeder T	N3	M0	
IV	jeder T	jedes N	jede M	3

Tis= Melanoma in situ, T= Primärtumor, N= Lymphknotenbefall, M= Auftreten von Metastasen; 0= es sind keine Metastasen aufgetreten, a= ohne Ulzeration, b= mit Ulzeration. Die Daten zur 10-JÜR (10 Jahres-Überlebensrate) sind von der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft übernommen (Orfanos et al., 1994).

Tabelle 1: Klinische Stadieneinteilung des kutanen malignen Melanoms nach Empfehlungen des AJCC (2000). Die 10- Jahres Überlebensrate nimmt mit zunehmender Tumordicke rapide ab, der metastatische Befall eines oder mehrerer Lymphknoten (St. IIIA und darüber) verschlechtert die Prognose noch einmal deutlich. Im Stadium IV, mit erfolgter Fernmetastasierung ist die Prognose infaust.

Weitere prognostische Faktoren sind der Invasionslevel nach Clark, die Lokalisation und der histologische Typ, wobei Tumoren vom primär nodulären Typ und die Lokalisation an Stamm und behaartem Kopf eine schlechtere Prognose bedeuten. Männliche Patienten haben zudem eine schlechtere Prognose als weibliche (Orfanos et al., 1994).

Das maligne Melanom metastasiert sowohl primär hämatogen als auch primär lymphogen (Leiter et al., 2004). Ist bereits eine Lymphknoten- oder eine Fernmetastase aufgetreten, ist die Prognose infaust. Die mediane Überlebensrate beträgt in diesem Stadium ohne Behandlung nur etwa vier bis sechs Monate (Orfanos et al., 1994). Die Therapie in den Stadien I und II, also bei fehlender Lymphknoten- oder Fernmetastasierung (Tabelle 1), besteht in der Exzision des Tumors mit einem Sicherheitsabstand von 1 cm bei einer Tumordicke ≤ 1 mm, mit 2 cm Sicherheitsabstand bei einer Tumordicke von 1-4 mm und

einem Sicherheitsabstand von 3 cm bei einer Tumordicke von mehr als 4 mm; gegebenenfalls mit folgender Nachexzision nach histologischer Beurteilung der Schnittländer (Orfanos et al., 1994). Bei eingetretener Fernmetastasierung steht die Chemo- und/oder die Strahlentherapie als Option zur Verfügung. Allerdings zeigt sich hier ein im Allgemeinen sehr schlechtes Ansprechen des malignen Melanoms auf derzeit zur Verfügung stehende chemotherapeutische Verfahren. Bei lediglich 20-30% der Patienten kommt es unter verschiedenen Mono- beziehungsweise Polychemotherapien zu einer partiellen oder sogar vollständigen, allerdings zeitlich begrenzten, Tumorremission, jedoch zu keiner Lebensverlängerung (Eigentler et al., 2003). Diese Therapieformen haben daher oft nur einen palliativen Charakter. Daher ist es nicht verwunderlich, dass 45 bis 60% der Patienten in Deutschland auf alternative Therapieformen zurückgreifen. Dabei betragen die Ausgaben der Patienten für die Misteltherapie alleine jährlich über 20 Mio € und erfahren eine jährliche Steigerung von 20% (Steuer-Vogt et al., 2001). Die genauen Mechanismen der Wirkung der Mistelextrakte sind aber nur ungenügend untersucht und die wenigen bestehenden Studien zur Wirkung der Mistelextrakte zeigen sehr widersprüchliche Ergebnisse (Heiny und Beuth, 1994; Edler, 2004). Ein Grund hierfür ist, dass Mistelextrakte viele biologisch wirksame Bestandteile wie Viscotoxine, Polysaccharide, Aminosäuren und Phenole sowie die Mistellektine I, II und III enthalten (Thies et al., 2005). Viscotoxine wirken antiproliferativ, Polysaccharide haben schwache immunmodulatorische Effekte, eine biologische Wirkung der Aminosäuren und der Phenole ist in diesem Zusammenhang nicht näher bekannt (Franz, 1985). Die Mistellektine I, II und III haben zytotoxische und immunmodulatorische Effekte (Franz, 1985; Franz, 1986). *In vitro* und *in vivo*-Untersuchungen haben gezeigt, dass das ML-I die stärkste antiproliferative Wirkung besitzt (Thies et al., 2001; Valentiner et al., 2002; Thies et al., 2005). Daher werden inzwischen einige Mistelextrakte (z.B. Eurixor®, Lektinol®) auf den ML-I Gehalt normiert. Trotzdem ergaben klinische Untersuchungen zur Wirkung der auf den ML-I Gehalt normierten Mistelextrakte widersprüchliche Ergebnisse (Heiny und Beuth, 1994; Steuer-Voigt et al., 2001; Nabrotzki und Scheffler, 2001; Edler, 2004), was darauf zurückzuführen sein mag, dass diese normierten Mistelextrakte zwar gleiche Mengen an ML-I, aber unterschiedliche Mengen der anderen, ebenfalls biologisch wirksamen Komponenten enthalten. Daher war es Ziel dieser Arbeit, die möglichen Wirkmechanismen des reinen ML-I auf das Wachstum und die Metastasierung des malignen Melanoms zu untersuchen, da für das ML-I eine Reihe verschiedener Wirkmechanismen diskutiert werden, die im Folgenden näher erläutert werden.

2.2. Wirkmechanismen des Mistellektins-I

Das Mistellektin-I (ML-I) besteht aus einer A-Kette, welche einen zytotoxischen Effekt durch Inaktivierung der Ribosomen vermittelt (Franz, 1986; Barbieri et al., 1993) und aus einer B-Kette, welche für die Zuckerbindung an der Zelloberfläche und damit für die endozytotische Einschleusung in die Zelle und den intrazellulären Transport zum Wirkort verantwortlich ist. Diese Bindung stellt die Grundvoraussetzung für die Wirkung des ML-I dar (Barbieri et al., 1993). Die A-Kette des ML-I, welche die zytotoxische Wirkung vermittelt, wirkt als Ribosomen inaktivierendes Protein (RIP). Es gibt RIPs der Klassen I und II, wobei die RIP I aus nur einer Polypeptidkette und die RIP II wie das ML-I aus zwei Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken verbunden sind, bestehen. Beide RIPs haben eine zytotoxische Wirkung, wobei die Wirkung der RIP II wesentlich stärker ist, da die B-Kette die Einschleusung in die Zelle ermöglicht und dadurch die A-Kette zu ihrem Wirkort gelangt. Den RIP I fehlt dieser Weg der endozytotischen Aufnahme, wodurch die wesentlich schwächere Wirkung erklärt wird (Barbieri et al., 1993). Die Einschleusung der RIP II geschieht nach Bindung der B-Kette an die Zelloberfläche durch endozytotische Aufnahme und es erfolgt der Transport über den Golgi-Apparat zu den Ribosomen, wo die Proteinbiosynthese durch Abspaltung der 28S Untereinheit (Glukosidaseaktivität) irreversibel gehemmt wird (Barbieri et al., 1993). Zusätzlich zu seiner zytotoxischen Wirkung, die durch Inaktivierung der Ribosomen bedingt ist und damit Apoptose in der Zielzelle auslöst (Franz, 1986; Barbieri et al., 1993) wirkt das ML-I, durch Freisetzung von TNF α , Interleukin 1, Interleukin 6 und Interferon γ aus Leukozyten und durch die Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) immunmodulatorisch (Hajto et al., 1989; Beuth et al., 1995; Hajto et al., 1997). Dieser immunmodulatorische Effekt wurde kontrovers diskutiert, da Gabius et al. (2001) für niedrige Dosierungen des ML-I eine unspezifische Stimulation verschiedener Tumorzellen feststellten, die im Gegensatz zu der beschriebenen und Apoptose auslösenden Wirkung des ML-I stand. Diese Ergebnisse konnten durch die Untersuchung der Wirkung von ML-I in Dosierungen von 10^{-16} bis 10^1 $\mu\text{g/ml}$ auf sechs verschiedene Melanomzelllinien widerlegt werden, indem selbst in der niedrigsten Dosierung ein deutlicher antiproliferativer Effekt gezeigt werden konnte (Thies et al., 2005). Zudem zeigte sich durch eine vermehrte Ausschüttung verschiedener Zytokine und die Aktivierung sowohl von NK-Zellen als auch von Makrophagen ein immunstimulierender Effekt (Hajto et al., 1989; Hajto et al., 1997). Für den Extrakt der

koreanischen Mistel konnte an C57BL/6 Mäusen ein antiangiogenetischer Effekt nachgewiesen werden (Yoon et al., 1995; Park et al., 2001), der für den Extrakt oder die Lektine der europäischen Mistel bislang nicht gezeigt wurde. Weitere Untersuchungen hatten gezeigt, dass die Auslösung der Apoptose nach Behandlung mit koreanischem Mistellektin durch vermehrte Expression des proapoptotischen Proteins Bax und geringere Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 bedingt wurde (Lyu et al., 2002). Derzeit sind nur einige kleinere klinisch kontrollierte Studien über die Wirkung der Mistel bei Tumorpatienten bekannt. In einer dieser Studien wurden bei Brustkrebspatientinnen nach einer Misteltherapie erhöhte β -Endorphinspiegel festgestellt (Heiny und Beuth, 1994). Des Weiteren ist eine Totalremission eines Duodenalkarzinoms in fortgeschrittenem Stadium, unter intratumoraler Misteltherapie in steigender Dosierung über drei Monate mit einer Rezidivfreiheit für zwei Jahre beschrieben worden (Nabrotzki und Scheffler, 2001). In einer Studie an Patienten mit Tumoren in der Kopf- und Halsregion wurde hingegen keine Verbesserung der Prognose oder der Lebensqualität der Patienten festgestellt (Steuer-Vogt et al., 2001). Alle bekannten Studien wurden mit Mistelextrakten durchgeführt, die zwar zum Teil auf den ML-I Gehalt normiert waren, aber neben dem ML-I auch die Lektine ML-II und ML-III sowie Viscotoxine und Polysaccharide als biologisch wirksame Komponenten in unterschiedlichen Anteilen enthielten (Edler, 2004). Auch wenn das ML-I die stärkste antiproliferative und antimetastatische Wirkung hat, so ist dennoch die Wirkung der wässrigen Mistelextrakte mit den benannten weiteren Inhaltsstoffen nicht direkt mit der Wirkung des hochaufgereinigten ML-I zu vergleichen. Für das hochaufgereinigte ML-I konnte *in vitro* eine starke antiproliferative Wirkung auf verschiedene Tumorentitäten gezeigt werden, wie z.B. auf Ovarialkarzinome, Kolonkarzinome und Melanome (Schumacher et al., 1995; Valentiner et al., 2002; Thies et al., 2005). Für das maligne Melanom wurde sowohl die grundsätzliche Bindungsfähigkeit für ML-I, welche die Grundvoraussetzung für die Wirkung darstellt, als auch eine signifikante Assoziation der ML-I Bindung mit der Metastasierung gezeigt (Thies et al., 2001). Zudem wurde eine starke zytotoxische und noch stärkere antimetastatische Wirkung auf das humane maligne Melanom *in vitro* und *in vivo* gezeigt (Thies et al., 2005; Thies et al., unveröffentlichte Daten). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das hochaufgereinigte ML-I in der Therapie des malignen Melanoms eine wichtige Rolle spielen könnte.

Um die Wirkungen von reinem ML-I der europäischen Mistel auf das humane Melanom zu untersuchen, wurde an einem Scid-Maus Xenograft-Melanommodell mit humanen

Tumorzellen eine *in vivo* Studie durchgeführt, die die Grundlage für die nachfolgenden Untersuchungen bildete.

2.3. Scid-Maus Xenograft-Melanommodell

Die hier beschriebenen Untersuchungen wurden an Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Primärtumoren und Lungen aus einem vorangegangenen Scid-Maus Xenograft-Melanommodell durchgeführt. In diesem Tiermodell wurden 80 neun bis 15 Wochen alte, männliche, pathogenfreie Scid Mäuse in vier Gruppen (drei Behandlungsgruppen und eine Kontrollgruppe) von je 20 Tieren zufällig aufgeteilt. Nach der subkutanen Injektion von 1×10^6 Tumorzellen der humanen Melanomzelllinie MV3 zwischen die Schulterblätter der Tiere am Tag eins wurde an den folgenden 19 Tagen allen Tieren täglich eine intraperitoneale Injektion nach folgendem Schema verabreicht: Die Behandlungsgruppen erhielten den aufgereinigten Wirkstoff ML-I in den Dosierungen: 30 ng/kg KG, 150 ng/kg KG oder 500 ng/kg KG und die Kontrollgruppe erhielt nur das Lösungsmittel PBS. Am Tag 20 wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und der Primärtumor und die Lungen entnommen und zur histologischen Aufarbeitung in Paraffin eingebettet. Das Gewicht der Primärtumoren und die Anzahl der Lungenmetastasen wurden bestimmt. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich eine hochsignifikante Reduktion des Primärtumorgewichtes ($P = 0,033$) auf ca. 65 % der Kontrollgruppe in der 30 ng/kg Behandlungsgruppe, wobei in der 150 ng/kg Behandlungsgruppe keine Reduktion und in der 500 ng/kg Behandlungsgruppe nur eine leichte, aber nicht signifikante Reduktion des Tumorgewichtes gegenüber der Kontrollgruppe gezeigt werden konnte (Thies et al., unveröffentlichte Daten). Die Anzahl der Lungenmetastasen war in der 30 ng/kg Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe sogar um 50% vermindert ($P = 0,016$). In den Behandlungsgruppen mit den höheren Dosierungen (150 bzw. 500 ng/kg) war kein Unterschied zur Kontrollgruppe gezeigt worden (Thies et al., unveröffentlichte Daten). Auf Grund der in vorangegangenen *in vitro* Untersuchungen gezeigten Zunahme der Zytotoxizität des ML-I bei steigender Dosierung (Thies et al., 2005) wäre in dem Tiermodell in den Behandlungsgruppen mit höherer Dosierung auch ein größerer oder zumindest gleichwertiger Behandlungserfolg wie in der 30 ng/kg Behandlungsgruppe zu erwarten gewesen. Die Ergebnisse dieses Tiermodells lassen nun vermuten, dass es *in vivo* gegenläufige Mechanismen geben könnte, wodurch die geringe Dosierung des ML-I stark antiproliferativ und antimetastatisch

wirkt, höhere Dosierungen jedoch keine signifikante Wirkung zeigen. Ziel dieser Arbeit war es daher, die möglichen Mechanismen der Wirkung des ML-I auf das humane Melanom *in vivo* an Paraffin eingebettetem Gewebe aus dem oben beschriebenen Tiermodell zu untersuchen.

3. Material und Methoden

3.1. Untersuchungsgut

Aus dem oben beschriebenen, dieser Arbeit vorausgegangenem Tiermodell wurden die routinemäßig in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Primärtumoren und die Lungen aus den drei Behandlungsgruppen, die mit 30 bzw. 150 bzw. 500ng ML-I/kg KG/Tag behandelt wurden sowie die Tumoren und Lungen aus der Kontrollgruppe untersucht. Es wurden 5µm dicke Paraffinschnitte aller Tumoren und Lungen aus jeder Behandlungsgruppe angefertigt. Diese wurden auf silanbeschichtete Objektträger (Histo Bond®, Marienfeld, Deutschland) aufgebracht und über Nacht bei 37° im Brutschrank getrocknet. Anschließend wurden die Gewebsschnitte in Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe für die folgenden immunhistochemischen Färbungen und Reaktionen rehydriert.

3.2. Hämatoxylin-Eosin Färbung

3.2.1. Bestimmung apoptotischer Zellen

Der Anteil apoptotischer Zellen wurde an Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbten Gewebsschnitten ausgewertet. Die HE-Färbung der Tumor- und der Lungenschnitte wurde in einem Färbeautomaten (Varistain, Shandon, Frankfurt, Deutschland) nach einem Standardprotokoll durchgeführt. Die Gewebsschnitte wurden in Xylol entparaffiniert und

über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert. Anschließend folgten Inkubationen in destilliertem Wasser für zwei Minuten, Hämalaun für eine Minute, destilliertem Wasser für zwei Minuten, Leitungswasser für fünf Minuten, Eosin für drei Minuten und wiederum in destilliertem Wasser für 30 Sekunden. Abschließend wurden die Gewebsschnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert, dreimal für je fünf Minuten in Xylol gespült und mit Eukitt (Kindler, Freiburg, Deutschland) eingedeckt. Für die Bestimmung der Apoptoserate in den Primärtumoren wurden die Gewebsschnitte in einer 400fachen Vergrößerung ausgewertet. Es wurden drei Gesichtsfelder in vitalem Tumorgewebe ausgezählt und der prozentuale Anteil der Apoptosen unter den Tumorzellen des Gesichtsfeldes bestimmt. Hierbei wurden die morphologischen Zeichen der Apoptose in den Zellen wie Verkleinerung und Kondensierung des Zellkerns (Apoptosekörperchen), Kontaktverlust zu den Nachbarzellen und kleine runde oder ovale zytoplasmatische Einschlüsse und Protuberanzen am Inneren der Zellmembran, die Bestandteilen des Zellkerns entsprechen (Kerr et al., 1972), als Grundlage genommen. Für die Auszählung der Apoptosekörperchen in den Lungenmetastasen wurden die Gewebsschnitte in einer 100fachen Vergrößerung auf der Suche nach Metastasen meanderförmig durchfahren. Alle Metastasen eines Gewebsschnittes, die mehr als 15 Zellen beinhalteten, wurden in einer 400fachen Vergrößerung ausgewertet. Da nicht jeder Gewebsschnitt Metastasen von über 15 Zellen enthielt, konnten nicht für alle Gruppen die Lungenmetastasen aller 20 Tiere in die Bewertung mit einfließen.

3.2.2. Bestimmung der Nekroseanteile

Zur Bestimmung des Anteils der Nekrose in den Primärtumoren wurden die Hämatoxylin-Eosin gefärbten Gewebsschnitte in einer 50fachen Vergrößerung mit einem Zählgitter (100 Kästchen auf 2mm²) (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) betrachtet. Die Anzahl der Kästchen des Gitters, in denen das Tumorgewebe vital war und die Anzahl der Kästchen, in denen der Tumor nekrotisch war, wurden bestimmt. Hierbei wurden auch halbe Kästchen in die Bestimmung mit einbezogen. Um einen prozentualen Anteil der Nekroseareale innerhalb des Primärtumors zu erhalten, wurde die Anzahl der Kästchen mit nekrotischem Gewebe mit der Anzahl der Kästchen des gesamten Primärtumors ins Verhältnis gesetzt.

3.3. Immunhistochemische Untersuchungen

Alle folgenden immunhistochemischen Untersuchungen wurden, wenn nicht anders erwähnt, mit DAKO Antibody Diluent with Background Reducing Components (DAKO, Glostrup, Dänemark) zur Verdünnung der Antikörper durchgeführt. Die Inkubation der Antikörper fand in einer Feuchtkammer bei jeweils angegebenen Temperaturen für die angegebene Dauer statt. Die Farbentwicklung wurde, wenn nicht anders erwähnt, wie folgt durchgeführt: 7,5 ml einer 4%igen Naturnitritlösung wurden mit 300 µl Neufuchsin-Stammlösung (5 g Neufuchsin in 100 ml 2 n HCl) vermischt. Es wurden sofort 150 ml TBS (pH 8,64), versetzt mit 180 µl Tween 20 (Sigma, Steinheim, FRG) zur Unterdrückung der Hintergrundfärbung sowie 60 mg Levamisole (Sigma, Steinheim, FRG) zur Hemmung der endogenen nicht-intestinalen alkalischen Phosphatase zugegeben. Anschließend wurden 30 mg Naphthol-AS-Bisphosphat in 750 µl Dimethylformamid (DMF) gelöst und als Substrat für die alkalische Phosphatase hinzugegeben. Die Präparate wurden in dieser Lösung 20 Minuten unter Lichtausschluß belassen. Die Reaktion wurde unter fließendem Leitungswasser (10 Minuten) gestoppt. Abschließend wurden die Präparate in 50%igem Mayers Hämalaun 10 Sekunden gegengefärbt, 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut und mit dem wasserhaltigen Eindeckmedium Clarion/Chrystal Mount (Biomedica, Foster City, CA) eingedeckt.

3.3.1. Nachweis des zytosolischen Proteins Bax

Zur Antigenmaskierung wurden drei verschiedene Methoden einander gegenübergestellt: erstens die Vorbehandlung mit 150 mg Trypsin (L 2103 Biochrom AG, Berlin, Deutschland) auf 150 ml TBS (pH 7,6), zweitens die Vorbehandlung mit 15 mg Protease XXIV (P-8038 Sigma, Steinheim, FRG) auf 150 ml TBS (pH 7,6) für 15 Minuten im Wasserbad bei 37°C und drittens eine Mikrowellenbehandlung der Gewebsschnitte. Die Mikrowellenbehandlung lieferte die besten Resultate und wurde somit für die Untersuchung der Expression von Bax gewählt.

Die entparaffinierten und rehydrierten Gewebsschnitte wurden in 10 mM Zitratpuffer (pH 6,0) für fünf Minuten bei 1000 Watt und dann viermal für je zwei Minuten mit 500 Watt

in der Mikrowelle hitzebehandelt. Die Gewebsschnitte kühlten für 20 Minuten bei Raumtemperatur unter langsamer Zugabe von kaltem (4°C) Zitratpuffer ab und wurden dann dreimal fünf Minuten in Trispuffer (TBS: 50 mM Trisma Base (Sigma), 150 mM Natriumchlorid; pH 7,6), versetzt mit 0,1% Tween 20 (Sigma, Steinheim, FRG) gespült. Anschließend wurden die Gewebsschnitte für 30 Minuten mit Normalserum vom Schwein (X0901 DAKO, Glostrup, Dänemark) in der Verdünnung 1:10 inkubiert und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur mit dem polyklonalen Kaninchen-Anti-Human-Antikörper gegen das Protein Bax (A3533 DAKO, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:100 inkubiert. Es wurden fünf Verdünnungen des primären Antikörpers von 1:50 bis 1:1000 sowie die Inkubation für eine, 12 und 48 Stunden jeweils bei Raumtemperatur und bei 4°C zum Erreichen des optimalen Färbeergebnisses getestet. Die besten Ergebnisse zeigten sich bei einer Verdünnung des primären Antikörpers von 1:100 und der Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur, so dass diese Methode für die Auswertungen herangezogen wurde.

Anschließend inkubierten die Gewebsschnitte nach dreimaligem Spülen in TBS plus Tween für 40 Minuten mit dem biotinylierten DAKO Schwein-Anti-Kaninchen-Antikörper (R0156 DAKO, Glostrup, Dänemark) in der Verdünnung 1:200.

Nach erneutem dreimaligem Spülen in TBS plus Tween wurden die Gewebsschnitte mit einem Avidin-alkalische Phosphatase-Komplex (Vectastain, ABC kit, Vektor, Burlingame, CA) für 30 Minuten inkubiert. Abschließend wurden die Präparate erneut in TBS gespült und die Farbreaktion wie oben beschrieben durchgeführt.

Mit den Negativkontrollen wurde auf die gleiche Weise verfahren, nur wurden die Gewebsschnitte an Stelle des primären Antikörpers nur mit DAKO Antibody Diluent inkubiert. Als Negativkontrolle wurden zwei Primärtumoren gefärbt. Zum direkten Vergleich wurden Gewebsschnitte gewählt, die auch als Positivkontrolle gefärbt wurden.

Für die Auswertung wurden in jedem der Gewebsschnitte drei Gesichtsfelder in einer 400fachen Vergrößerung in vitalen Tumorarealen ausgezählt. Hierbei wurde der prozentuale Anteil der Bax-positiven Zellen bestimmt und der statistischen Auswertung zugeführt.

3.3.2. Nachweis des zytosolischen Proteins Bcl-2

Neben den Vorbehandlungen mit Protease und Trypsin für je 10 beziehungsweise 15 Minuten wurde für diesen monoklonalen Antikörper eine Vorbehandlung in EDTA-Puffer (10 mM Trizma Base mit 1 mM EDTA; pH 9,0) über Nacht im Wasserbad bei 85°C und die Antigendemaskierung in Zitratpuffer (pH 6,0) in der Mikrowelle bei einmal 1000 Watt für fünf Minuten und dann fünf, sieben oder neunmal bei 500 Watt für je zwei Minuten getestet.

Die Hitzebehandlung zur Antigendemaskierung in 10 mM Zitratpuffer (pH 6,0) für fünf Minuten bei 1000 Watt und dann siebenmal für je zwei Minuten bei 500 Watt in der Mikrowelle erwies sich als die beste Vorbehandlung und wurde deshalb durchgeführt. Die Gewebsschnitte kühlten anschließend für 20 Minuten bei Raumtemperatur unter langsamer Zugabe von kaltem Zitratpuffer ab und wurden dann dreimal fünf Minuten in TBS plus Tween gespült. Anschließend wurden die Gewebsschnitte zunächst für 30 Minuten mit Normalserum vom Kaninchen (X0902 DAKO, Glostrup, Dänemark), 1:10 verdünnt, inkubiert. Es wurden vier Verdünnungen des primären Antikörpers von 1:50 bis 1:1000 getestet. Anschließend wurden die Gewebsschnitte für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit dem monoklonalen Maus-Anti-Human-Antikörper gegen das Protein Bcl-2 (M0887 DAKO, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:50 inkubiert. Nach dreimaligem Spülen in TBS plus Tween inkubierten die Gewebsschnitte für 40 Minuten mit dem biotinylierten DAKO Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper (E0464 DAKO, Glostrup, Dänemark) in der Verdünnung 1:200. Die Gewebsschnitte wurden dreimal in TBS plus Tween gespült. Um eine Verstärkung der Farbreaktion zu erreichen, wurden die Gewebsschnitte mit der löslichen Immunkomplex-Methode APAAP Maus (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase aus der Maus) (D0651 DAKO, Glostrup, Dänemark) für 30 min inkubiert. Diese APAAP Verstärkung wurde probeweise bis zu dreimal durchgeführt, was für jeden Zyklus der Reaktion eine erneute Inkubation des primären und des sekundären Antikörpers bedeutete. Die einmalige Verstärkung mit dieser Methode erwies sich als am effektivsten für die spezifische Anfärbung der Bcl-2 positiven Zellen bei gleichzeitig geringer Hintergrundfärbung. Nach anschließendem dreimaligem Spülen in TBS plus Tween wurden die Gewebsschnitte für 30 Minuten mit dem Avidin Biotin Complex (Vectastain, ABC kit, Vektor, Burlingame, CA) inkubiert und dann über die oben beschriebene Entwicklungsreaktion entwickelt, gegengefärbt und

eingedeckt. Mit den Negativkontrollen wurde auf die gleiche Weise verfahren, wobei die Gewebsschnitte an Stelle des primären Antikörpers nur mit DAKO Antibody Diluent inkubiert wurden. Als Negativkontrolle wurden zwei Primärtumoren gefärbt, die zum direkten Vergleich auch als Positivkontrolle gefärbt wurden.

Für die Auswertung wurden in jedem der Gewebsschnitte drei Gesichtsfelder in einer 400fachen Vergrößerung in vitalen Tumorarealen ausgezählt. Hierbei wurde der prozentuale Anteil der Bax-positiven Zellen bestimmt und der statistischen Auswertung zugeführt.

3.3.3. Kollagen-Typ-IV-Immunhistochemie zum Nachweis von Gefäßen

Zur Antigendemaskierung wurden die Gewebsschnitte mit 0,04%iger Protease XXIV (P-8038 Sigma, Steinheim, FRG) in TBS für 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad behandelt. Nach dreimal fünfminütigem Spülen in TBS wurden die Gewebsschnitte mit Normalserum vom Kaninchen (X0902 DAKO, Glostrup, Dänemark) 1:10 verdünnt abgedeckt und für 30 Minuten in der Feuchtkammer inkubiert. Danach wurden die Gewebsschnitte mit Anti-Kollagen-Typ-IV-Antikörper aus der Ziege (UNLB 1340-01 Southern Biotech, Birmingham, USA) in einer Verdünnung von 1:200 über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach dreimaligem Spülen der biotinylierte Kaninchen-Anti-Ziege-Antikörper (E0466 DAKO, Glostrup, Dänemark) für 40 Minuten ebenfalls in einer Verdünnung von 1:200 inkubiert und anschließend wurden die Gefäße über den Avidin-alkalische Phosphatase-Komplex (Vectastain, ABC kit, Vektor, Burlingame, CA) und die beschriebene Farbentwicklung sichtbar gemacht. Mit den Negativkontrollen wurde auf die gleiche Weise verfahren, wobei die Gewebsschnitte an Stelle des primären Antikörpers nur mit DAKO Antibody Diluent inkubiert wurden. Als Negativkontrolle wurden zwei Primärtumoren gefärbt, die zum direkten Vergleich auch als Positivkontrolle gefärbt wurden.

Um die Anzahl der Gefäße in 0,5 mm² zu ermitteln, wurden von zwei unabhängigen Auswertern mit einem geeichten Zählgitter (100 Kästchen auf 0,5mm²) (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) in einer 200fachen Vergrößerung pro Schnitt fünf Felder ausgewertet. Es wurden ausschließlich in vitalen Bereichen des Tumors, nicht in direkter Nachbarschaft zu nekrotischen Arealen oder dem Randbereich des Tumors,

Auswertungen vorgenommen, um für alle Tumoren gleiche Auswertungsbedingungen zu gewährleisten. Aus den Ergebnissen der unabhängigen Auswerter wurde ein Mittelwert für jeden Tumorschnitt ermittelt und der statistischen Analyse zugeführt.

3.3.4. Nachweis muriner NK-Zellen

Der immunhistochemische Nachweis von Maus-NK-Zellen mit dem monoklonalen Anti-Maus-NK-Zell-Antikörper, ATCC HB-191 (American Type Culture Collection, USA), der uns freundlicherweise von Frau Prof. Dr. M. Schachner (Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) zur Verfügung gestellt wurde, ist trotz zahlreicher Probefärbungen an diesem Formalin fixierten und Paraffin eingebetteten Gewebe nicht gelungen. Es wurden alle zuvor beschriebenen Vorbehandlungen, Konzentrationen des primären Antikörpers von 1:50 bis 1:1000, bis zu 48 stündige Inkubationszeiten bei Raumtemperatur und 4°C und die auf bis zu 40 Minuten verlängerte Farbreaktion getestet.

3.4. Lektin histochemie

3.4.1. Darstellung dendritischer Zellen mit dem Lektin BSA-I

Die entparaffinierten und rehydrierten Gewebsschnitte wurden in 0,1% Trypsin, gelöst in Lektinpuffer (LP: 50 mM Trizma Base (Sigma), 150 mM Natriumchlorid, 1 mM Magnesiumchlorid und 1 mM Calciumchlorid; pH 7,6) für 15 Minuten zur Antigendemaskierung vorbehandelt. Die Enzymreaktion wurde unter fließendem Leitungswasser gestoppt und die Gewebsschnitte anschließend in Lektinpuffer überführt und zweimal fünf Minuten gespült. Die Gewebsschnitte wurden mit dem biotinylierten Lektin BSA-I (*Bandeiraea simplicifolia* Agglutinin-I BSA-I Sigma, Steinheim, Deutschland), 1:100 in Lektinpuffer verdünnt, bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer für eine Stunde inkubiert.

Nach zweimaligem Spülen in Trispuffer (TBS: 50 mM Trisma Base (Sigma), 150 mM Natriumchlorid; pH 7,6) wurden die Gewebsschnitte mit einem Avidin-alkalische

Phosphatase-Komplex (Vectastain, ABC kit, Vektor, Burlingame, CA) für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Präparate wiederum in TBS gespült und die Farbreaktion durchgeführt: 7,5 ml einer 4%igen Natrumnitritlösung wurden mit 300 µl Neufuchsin-Stammlösung (5 g Neufuchsin in 100 ml 2 n HCl) vermischt. Es wurden sofort 150 ml TBS (pH 8,64), versetzt mit 60 mg Levamisole (Sigma, Steinheim, FRG), zur Hemmung der endogenen nicht-intestinalen alkalischen Phosphatase zugegeben. Anschließend wurden 30 mg Naphthol-AS-Bisphosphat in 750 µl Dimethylformamid (DMF) gelöst und als Substrat für die alkalische Phosphatase hinzugegeben. Die Präparate wurden in dieser Lösung 30 Minuten unter Lichtausschluss belassen. Die Reaktion wurde unter fließendem Leitungswasser (10 Minuten) gestoppt. Abschließend wurden die Präparate in 50%igem Mayers Hämalaun 10 Sekunden gegengefärbt, 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut und mit dem wasserhaltigen Eindeckmedium Clarion/Chrystal Mount (Biomedica, Foster City, CA) eingedeckt. Mit der Negativkontrolle wurde auf die gleiche Weise verfahren, wobei an Stelle des verdünnten Lektins nur mit Lektinpuffer inkubiert wurde. Jeweils zwei Gewebsschnitte der Primärtumoren und der Lungen wurden als Negativkontrolle und zum direkten Vergleich auch als Positivkontrolle gefärbt.

Um den Anteil der BSA-I positiven Zellen in den Primärtumoren zu bestimmen, wurden in einer 400fachen Vergrößerung fünf Gesichtsfelder ausgezählt, wobei auch deutlich erkennbare Zellfortsätze in die Auswertung mit einbezogen wurden.

Um den Anteil der dendritischen Zellen in den Lungenmetastasen zu bestimmen, wurden die Gewebsschnitte in einer 100fachen Vergrößerung meanderförmig durchfahren und alle Metastasen, die aus mehr als 15 Zellen bestanden, ausgewertet. Hierbei wurden die dendritischen Zellen, die in den Metastasen lagen oder in direktem Kontakt mit der Metastase standen, in die Zählung mit einbezogen.

3.4.2. Bestimmung apoptotischer dendritischer Zellen

An den BSA-I gefärbten Gewebsschnitten der Primärtumoren wurden die apoptotischen Zellen unter den BSA-I positiven Zellen mittels der in Kapitel 3.2.1. erwähnten morphologischen Kriterien bestimmt. Um den Anteil der apoptotischen dendritischen Zellen zu bestimmen, wurden in jedem Schnitt von zwei unabhängigen Personen 4x100

Zellen in einer 400fachen Vergrößerung bewertet und der Anteil der apoptotischen dendritischen Zellen bestimmt. Aus den Daten der zwei Auswerter wurde ein Mittelwert gebildet, der der statistischen Analyse zugeführt wurde.

3.5. Lichtmikroskopische Auswertungen

Die Gewebsschnitte aller Färbungen wurden im Anschluss an die Färbung von einer zweiten Person in eine zufällige Reihenfolge gebracht und die Beschriftung der Objektträger, aus der die Zugehörigkeit zu der jeweiligen Behandlungsgruppe hervorgeht, mit einem undurchsichtigen Klebeband überklebt. Anschließend wurden die Gewebsschnitte kodiert und somit für die Untersucher verblindet. Nach Abschluss aller Zählungen und Auswertungen wurden die Gewebsschnitte dekodiert und die Tumoren und Lungen den entsprechenden Behandlungsgruppen zugeordnet.

Alle gefärbten Gewebsschnitte wurden unter einem Zeiss Axioplan 2 Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet und zur Befunddokumentation mit der digitalen Axiocam MRc5 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) fotografiert.

Für die Auswertung der Apoptoserate wurden in drei von einander unabhängigen hochauflösenden Gesichtsfeldern in einer 400fachen Vergrößerung die apoptotischen und die vitalen Zellen gezählt und somit der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen für jeden Gewebsschnitt aus den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe ermittelt.

Für die Bestimmung der Nekroseareale wurde in einer 50fachen Vergrößerung mit einem Zählgitter die Anzahl der Kästchen des Gitters, in denen das Tumorgewebe vital war und die Anzahl der Kästchen, in denen der Tumor nekrotisch war, bestimmt. Hierbei wurden auch halbe Kästchen in die Bestimmung mit einbezogen. Um einen prozentualen Anteil der Nekrose zu erhalten, wurde die Anzahl der Nekrosekästchen mit der Anzahl der Gesamtkästchen ins Verhältnis gesetzt.

Für die Auswertung der Expression von Bax wurden in jedem der Gewebsschnitte drei Gesichtsfelder in einer 400fachen Vergrößerung in vitalen Tumorarealen ausgezählt. Hierbei wurden die positiven Zellen (rot) und die negativen Zellen (blau) ausgezählt, um den prozentualen Anteil der Bax-positiven Zellen zu bestimmen. Für die Auswertung der Expression von Bcl-2 wurden in jedem der Gewebsschnitte drei Gesichtsfelder in einer 400fachen Vergrößerung in vitalen Tumorarealen ausgezählt.

Hierbei wurden die positiven Zellen (rot) und die negativen Zellen (blau) ausgezählt, um

den prozentualen Anteil der Bcl-2 positiven Zellen zu bestimmen.

Um die Anzahl der Gefäße in der Kollagen-Typ-IV Färbung in 0,5 mm² zu ermitteln, wurden von zwei unabhängigen Auswertern mit einem geeichten Zählgitter (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) in einer 200fachen Vergrößerung pro Schnitt fünf Felder ausgewertet. Es wurden ausschließlich in vitalen Bereichen des Tumors, nicht in direkter Nachbarschaft zu nekrotischen Arealen oder dem Randbereich des Tumors, Auswertungen vorgenommen, um für alle Tumoren gleiche Auswertungsbedingungen zu gewährleisten. Aus den Ergebnissen der unabhängigen Auswerter wurde ein Mittelwert für jeden Tumorschnitt ermittelt. Um den Anteil der BSA-I positiven Zellen in den Primärtumoren zu bestimmen, wurden in einer 400fachen Vergrößerung fünf Gesichtsfelder ausgezählt, wobei positive Zellen (rot) und auch deutlich erkennbare Zellfortsätze (rot) in die Auswertung einbezogen wurden.

Um den Anteil der dendritischen Zellen in den Lungenmetastasen zu bestimmen, wurden die Gewebsschnitte in einer 100fachen Vergrößerung meanderförmig durchfahren und alle Metastasen, die aus mehr als 15 Zellen bestanden, ausgewertet. Hierbei wurden die dendritischen Zellen, die in den Metastasen lagen oder in direktem Kontakt mit der Metastase standen, in die Zählung einbezogen.

Um den Anteil der apoptotischen dendritischen Zellen zu bestimmen, wurden von zwei unabhängigen Personen in jedem Gewebsschnitt 4x100 Zellen in einer 400fachen Vergrößerung bewertet und die apoptotischen dendritischen Zellen und die vitalen dendritische Zellen bestimmt, um den Anteil der apoptotischen dendritischen Zellen zu ermitteln. Aus den Daten der zwei Auswerter wurde ein Mittelwert gebildet.

3.6. Statistische Analyse der Daten

Die erhobenen Daten für die Gewebsschnitte der jeweiligen Behandlungsgruppen wurden mittels one-way ANOVA mit anschließendem Tukey Test evaluiert. P-Werte < 0,05 galten als statistisch signifikant.

Die verschiedenen Variablen wurden mittels des Spearman Rang-Korrelationskoeffizienten (Rko) auf eine Korrelation hin untersucht. Als statistisch signifikant wurde ein Wert von $P < 0,05$ angesehen.

Alle Analysen und Graphen wurde mit Hilfe der Computersoftware Graph Pad Prism (Intuitive Software for Science, San Diego, USA) erstellt.

4. Ergebnisse

4.1. Apoptoseinduktion

4.1.1. Apoptoseinduktion in den Primärtumoren

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung zeigte das typische Bild mit blau angefärbten Kernen und rötlichem Zytoplasma, Bindegewebe und Kollagenfasern. Die apoptotischen Zellen stellten sich mit verkleinerten und kondensierten Zellkernen (Apoptosekörperchen) mit Kontaktverlust zu den Nachbarzellen und mit kleinen runden oder ovalen zytoplasmatischen Einschlüssen und Protuberantien am Inneren der Zellmembran dar, die Bestandteilen des Zellkerns entsprechen (Kerr et al., 1972).

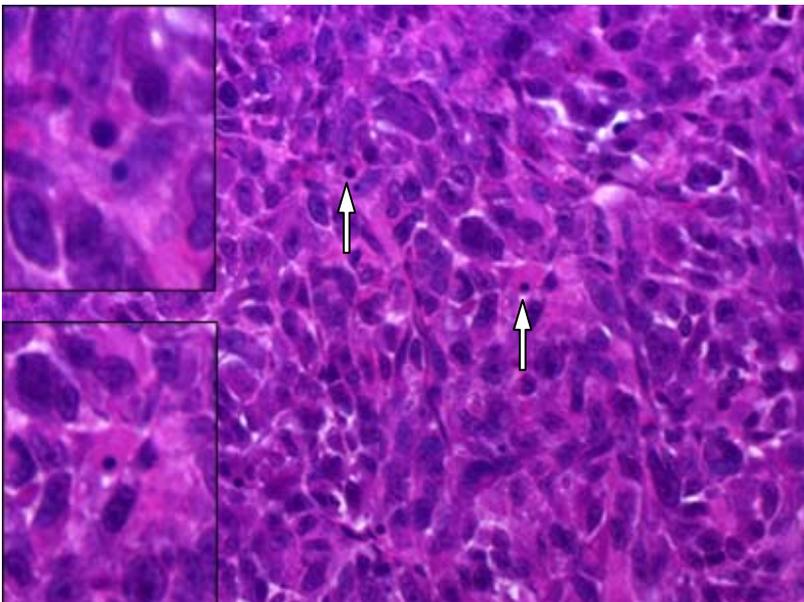


Abb. 1: HE-Färbung eines Primärtumors der 30 ng/kg Behandlungsgruppe in 400facher Vergrößerung. Zur Bestimmung des Anteils apoptotischer Tumorzellen wurden die Apoptosekörperchen ausgewertet. Die Pfeile zeigen auf typische Apoptosekörperchen. Bildausschnitte: 1200fache Vergrößerung der Apoptosekörperchen.

Da nicht in allen Gruppen alle 20 Tiere bis zum Abschluß des Versuches überlebt hatten und da in einigen Tumoren die nekrotischen Areale zu groß waren, um ausgewertet werden zu können, kamen in der Kontrollgruppe Gewebsschnitte von 18, in der 30 ng/kg Gruppe von 17, in der 150 ng/kg Gruppe von 19 und in der 500 ng/kg Gruppe ebenfalls von 17 Tieren zur Auswertung. Der Anteil der apoptotischen Tumorzellen im Primärtumor zeigte sich in der 30 ng/kg Behandlungsgruppe um das 2,6fache von 1,68% auf 4,36% erhöht im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($P < 0,0001$). In den beiden Behandlungsgruppen mit höherer Dosierung des ML-I (150 ng/kg und 500 ng/kg) zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate, und zwar um das 1,73fache in der 150 ng/kg und um das 1,81fache in der 500 ng/kg Behandlungsgruppe. Vergleicht man die Apoptoserate in der 30 ng/kg Behandlungsgruppe mit der Apoptoserate in den 150 bzw. 500 ng/kg Behandlungsgruppen, so zeigt sich dort eine signifikante Abnahme der Apoptoserate ($P < 0,01$) bei höherer Dosierung im Vergleich zur 30 ng/kg Behandlungsgruppe (Abb. 2).

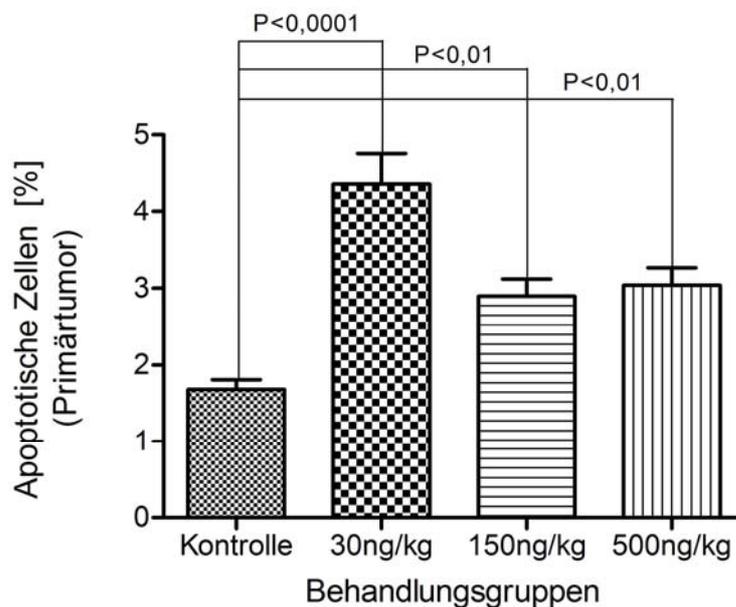


Abb. 2: Nachweis apoptotischer Tumorzellen in den Primärtumoren. Es zeigte sich ein hochsignifikanter Anstieg der Apoptoserate in allen Behandlungsgruppen gegenüber der Kontrolle. In der 30 ng/kg Behandlungsgruppe ist die Apoptoseinduktion am deutlichsten ausgeprägt (2,6fach erhöht).

4.1.2. Apoptoseinduktion in den Lungenmetastasen

In der Kontrollgruppe kamen die Lungenschnitte von 14, in der 30 ng/kg Gruppe von 12, in der 150 ng/kg Gruppe von 13 und in der 500 ng/kg Gruppe ebenfalls von 14 Tieren zur Auswertung.

Es zeigte sich ein tendenzieller Anstieg der apoptotischen Zellen in den Lungenmetastasen in der 30 ng/kg Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrolle von 1,8% auf 2,3%, der jedoch keine Signifikanz aufwies ($P = 0,223$). In den Behandlungsgruppen mit höherer Dosierung (150 bzw. 500 ng/kg) zeigte sich gegenüber der 30 ng/kg Behandlungsgruppe ein tendentieller Abfall der apoptotischen Zellen auf 0,8% in der 150 und 1,7% in der 500 ng/kg Behandlungsgruppe, der ebenfalls keine Signifikanz ($P > 0,05$) aufwies (Abb. 3).

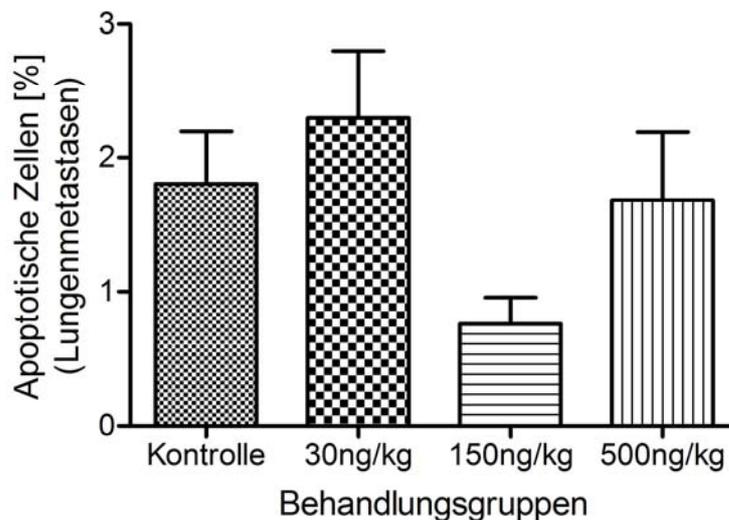


Abb. 3: Vergleichende Darstellung apoptotischer Tumorzellen in den Lungenmetastasen. Es zeigte sich ein tendenzieller Anstieg der Apoptoserate in der 30 ng/kg Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe, jedoch kein signifikanter Unterschied der Apoptoserate zwischen den Behandlungsgruppen.

4.2. Bestimmung der Nekroseanteile in den Primärtumoren

In der HE-Färbung der Primärtumoren zeigten sich in der Mehrzahl der Tumoren meist zentral gelegene großflächige Nekroseareale (Abb. 4). Die Zellen in den Nekrosearealen wiesen morphologische Zeichen der Zellnekrose wie Kernpyknose, Karyorhexis und Karyolyse, auf (Kerr et al., 1972). Zudem zeigte sich in diesen Arealen wie auch in den immunhistochemischen Färbungen eine unspezifische Anfärbung der Tumorzellen, die auf sterische Anheftungseffekte zurückzuführen sind.

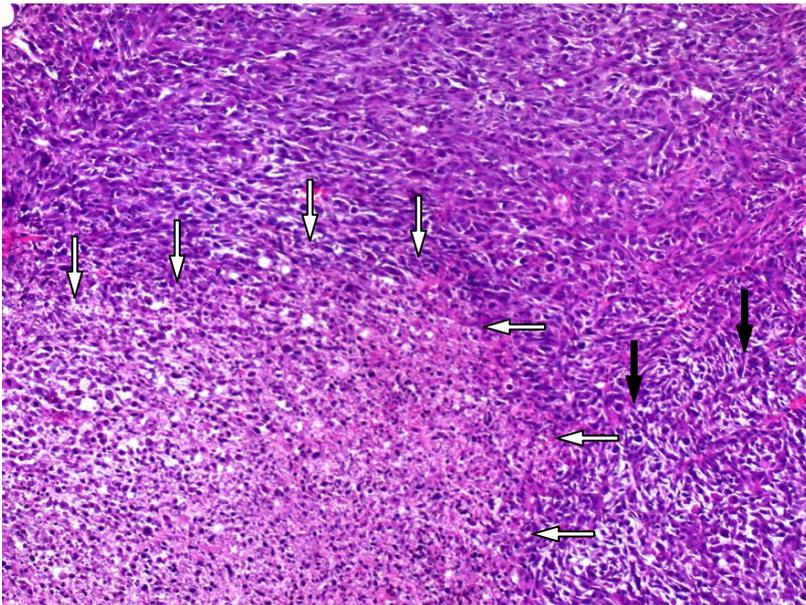


Abb. 4: HE-Färbung eines Primärtumors des malignen Melanoms. Die weißen Pfeile umgrenzen ein großes zentrales Nekroseareal. Die schwarzen Pfeile markieren den subnekrotischen Bereich. In der oberen Bildhälfte ist vitales Tumorgewebe zu sehen. Vergrößerung 100fach.

In der Auswertung der Nekroseanteile zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$) zwischen den Gruppen und im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 5). Bemerkenswert ist der - mit etwa 35% - hohe Anteil der Nekrose bereits im Primärtumor.

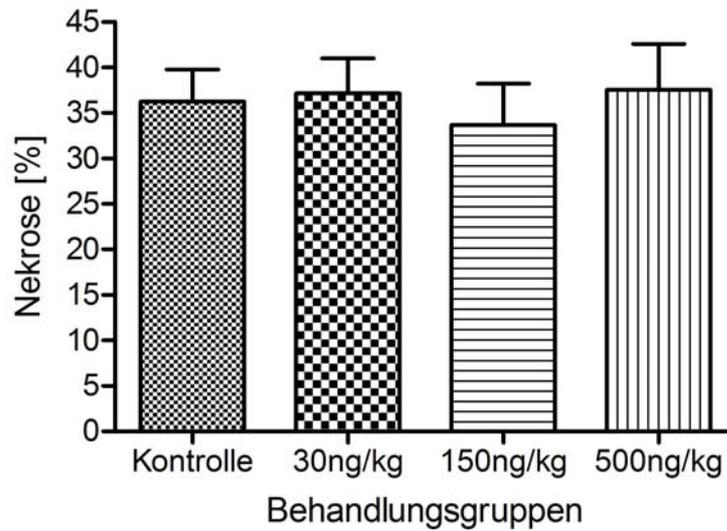


Abb. 5: Vergleichende Darstellung der prozentualen Ausdehnung der Nekroseareale in den Primärtumoren der verschiedenen Behandlungsgruppen. Es zeigten sich keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Bemerkenswert ist der - mit etwa 35% - hohe Anteil der Nekrose bereits im Primärtumor.

4.3. Immunhistochemie

4.3.1. Nachweis von Bax in den Primärtumoren

Bei dem immunhistochemischen Nachweis von Bax zeigte sich in der Negativkontrolle keine Farbreaktion (Abb. 6).

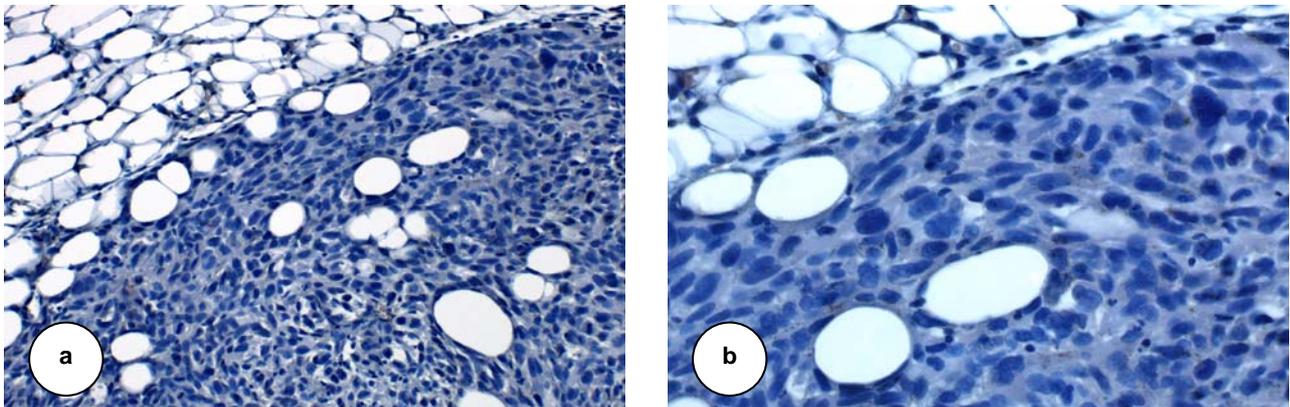


Abb. 6: Immunhistochemischer Nachweis des Proteins Bax. Die Negativkontrollen weisen keinerlei unspezifische Färbung auf. Vergrößerung 200fach (6a), 400fach (6b).

In den Primärtumoren zeigten sowohl Fibroblasten als auch Fettgewebszellen eine membranöse Anfärbung, wobei nekrotische Tumorzellen eine zytoplasmatisch granulierte Rotfärbung aufwiesen. Die Intima großer Gefäße, sofern solche in dem wenigen anhängenden Gewebe vorhanden waren, wiesen ebenfalls eine Rotfärbung auf. Die vitalen Tumorzellen reagierten mit einer granulierten zytoplasmatischen, teils um den Kern verstärkten Rotfärbung (Abb. 7).

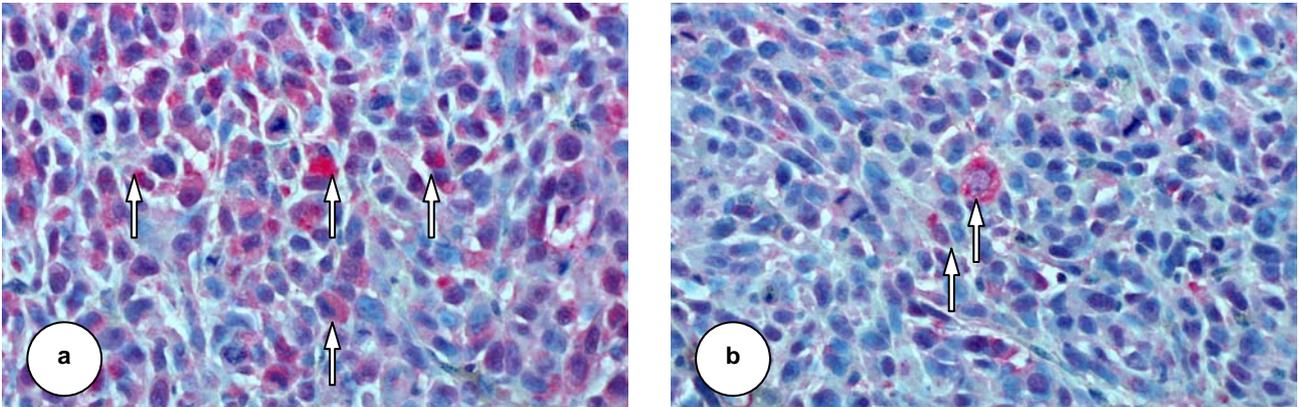


Abb. 7: Immunohistochemische Darstellung des proapoptotischen Proteins Bax in Primärtumoren. Es zeigt sich eine leichte Anfärbung in den meisten Tumorzellen, wobei die Zellen mit deutlich hervorstechender Farbreaktion (siehe Pfeile) als Bax-positiv gewertet wurden. Tumoren der 30 ng/kg Behandlungsgruppe zeigten deutlich mehr Bax-positive Zellen, als Tumoren aus der Kontrollgruppe (Abb. 7b). Vergrößerung 400fach.

Auf Grund zu großer nekrotischer Areale waren für eine statistische Auswertung nicht in allen Gruppen 20 Werte zu erheben. In der Kontrollgruppe sind 16, in der 30 ng/kg Gruppe 17, in der 150 ng/kg Gruppe 19 und in der 500 ng/kg Gruppe ebenfalls 16 Gewebsschnitte zur Auswertung gekommen. Die statistische Analyse ergab einen tendenziellen Anstieg der Bax-Expression in der 30 ng/kg Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe von 22,6% auf 24,9% und in den Behandlungsgruppen mit höheren Dosierungen (150 bzw. 500 ng/kg) einen leichten Abfall gegenüber der 30 ng/kg Behandlungsgruppe. Es zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe ($P > 0,05$) (Abb. 8).

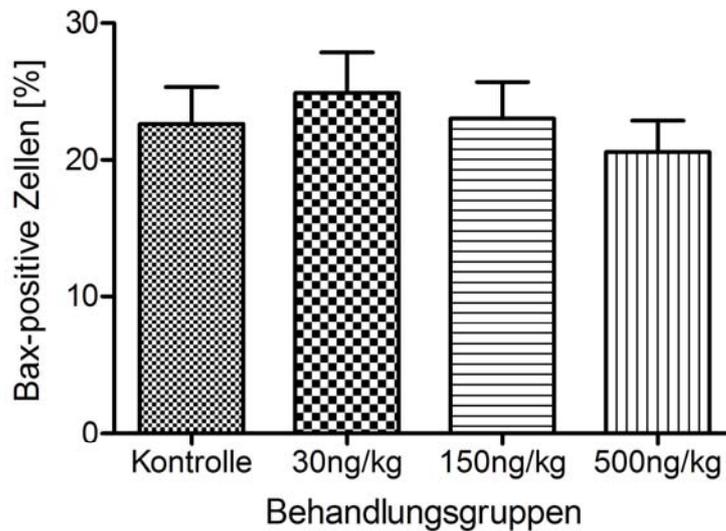


Abb. 8: Vergleichende Darstellung der Bax-Expression in den verschiedenen Behandlungsgruppen. Es zeigte sich ein leichter Anstieg der Bax-positiven Zellen in der 30 ng/kg Behandlungsgruppe von 22,6% auf 24,9%, der jedoch keine Signifikanz erreichte ($P=0,2864$).

4.3.2. Nachweis von Bcl-2 in den Primärtumoren

Bei dem immunhistochemischen Nachweis von Bcl-2 zeigte sich in der Negativkontrolle keine Farbreaktion. In den Färbungen der Primärtumoren zeigten ausschließlich vitale Tumorzellen eine homogene zytoplasmatische Rotfärbung (Abb. 9).

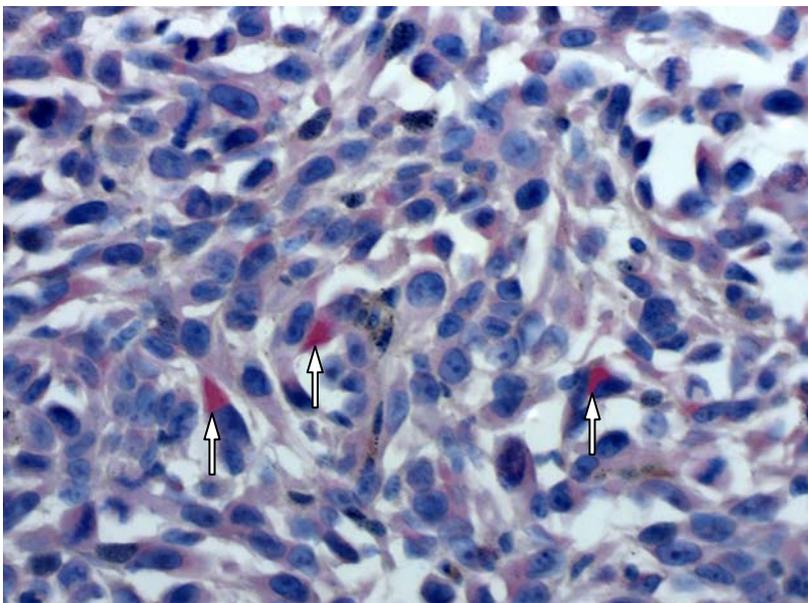


Abb. 9: Bcl-2-Immunhistochemie eines Primärtumors aus der 30 ng/kg Behandlungsgruppe. Es fällt eine positive Farbreaktion in allen Zellen auf, die auf den ständigen Regulationsmechanismen der Proliferation und der Apoptose beruht. Hier wurden die stark zytoplasmatisch angefärbten Zellen (Pfeile) als positiv gewertet. Vergrößerung 400fach.

In der Kontrollgruppe waren die Gewebsschnitte von 18, in der 30 ng/kg Gruppe von 16, in der 150 ng/kg Gruppe von 19 und in der 500 ng/kg Gruppe von 15 Tieren zur Auswertung gekommen. Es zeigte sich ein minimaler Abfall der Bcl-2-Expression in der 30 ng/kg (15,3%) und in der 500 ng/kg Behandlungsgruppe (13,4%) und ein leichter Anstieg der Expression in der 150 ng/kg Behandlungsgruppe (16,8%) gegenüber der Kontrollgruppe (15,8%). Es wurde jedoch keine Signifikanz erreicht (Abb. 10).

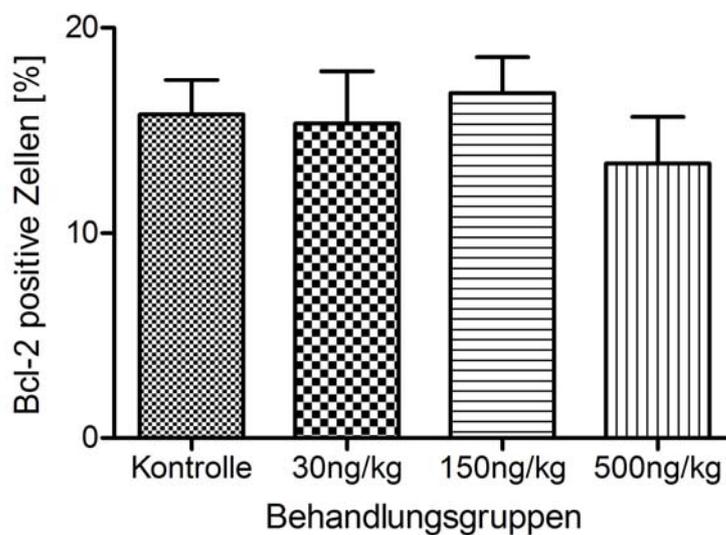


Abb. 10: Vergleichende Darstellung der Bcl-2-Expression in den Primärtumoren der verschiedenen Behandlungsgruppen. Es zeigte sich ein leichter Abfall in der 30 ng/kg (15,3%) und in der 500 ng/kg Behandlungsgruppe (13,4%), jedoch keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen.

4.3.3. Anzahl der Gefäße in den Primärtumoren

Bei dem immunhistochemischen Nachweis des Kollagen-Typ-IV in der Basalmembran von Blutgefäßen zeigte sich in der Negativkontrolle keine Farbreaktion. In den Färbungen der Primärtumoren färbten sich neben der Basalmembran der Blutgefäße und Kapillaren auch die Membranen von Fettgewebszellen, Nervenfasern und Muskelfasern intensiv an und galten somit als interne Positivkontrolle (Abb. 11).

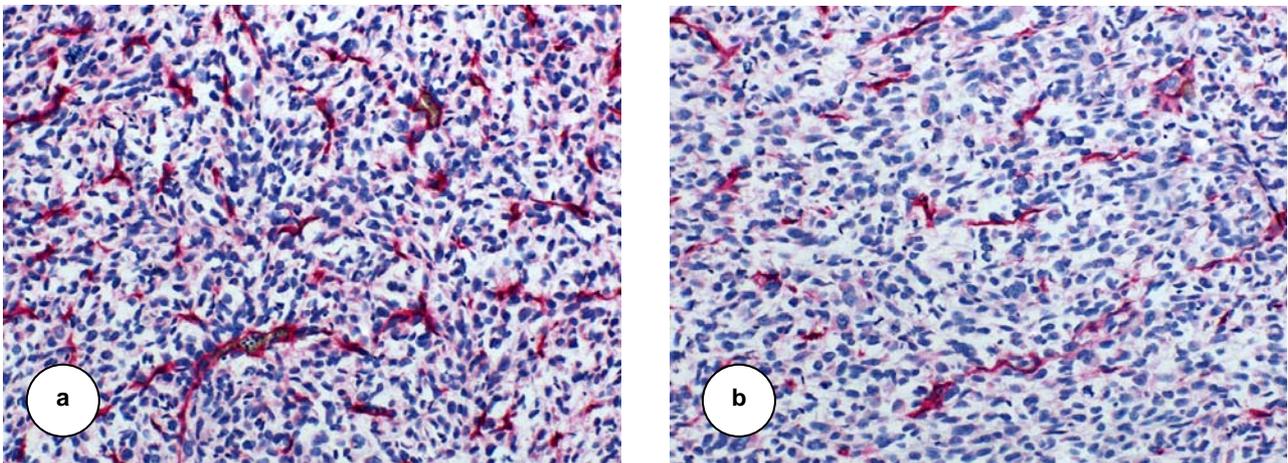


Abb. 11: Kollagen-Typ-IV-Immunhistochemie an Primärtumoren. Es zeigte sich eine wesentlich höhere Gefäßdichte in Gewebsschnitten aus der 500 ng/kg Behandlungsgruppe (Abb. 11a) als in dem Gewebsschnitt aus der Kontrollgruppe (Abb. 11b). Vergrößerung 200fach.

In einigen Gewebsschnitten, in denen etwas umgebendes Gewebe den Primärtumoren anhing, zeigten sich größere Gefäße, die in der Tumorkapsel verliefen und von außen in den Tumor einsprossen (Abb. 12).

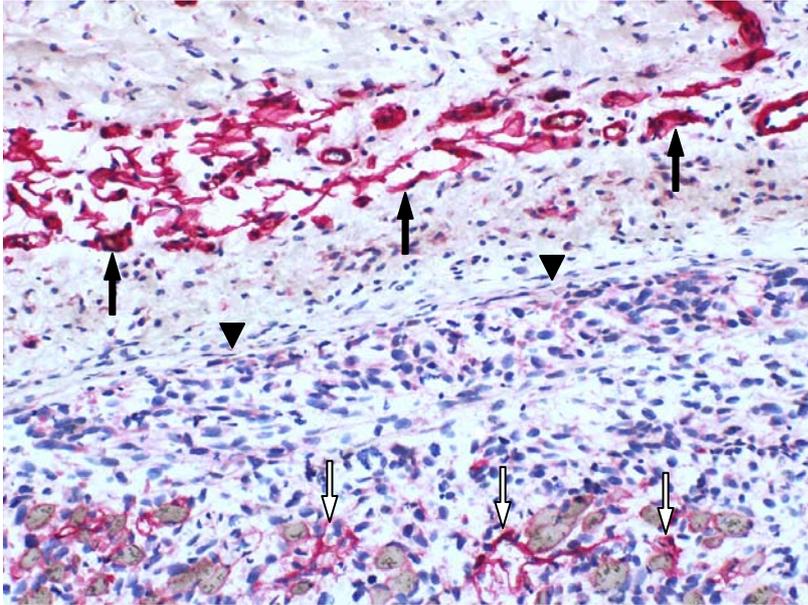


Abb. 12: Kollagen-Typ-IV-Immunhistochemie. Es zeigte sich ein dicht über dem Tumorgewebe in der Tumorkapsel liegendes Gefäßgeflecht (schwarze Pfeile), Vergrößerung 200fach. Die schwarzen Pfeilspitzen markieren den Beginn des Tumorgewebes, die weißen Pfeile zeigen auf die ausgewerteten intratumoralen Gefäße.

In direkter Umgebung der nekrotischen Areale zeigte sich in den meisten der Tumoren aus den verschiedenen Behandlungsgruppen eine erhöhte Dichte der Gefäße (Abb. 13). Diese Areale gingen jedoch nicht in die Auswertung mit ein. Ausgewertet wurden nur Gefäße in vitalem Tumorgewebe.

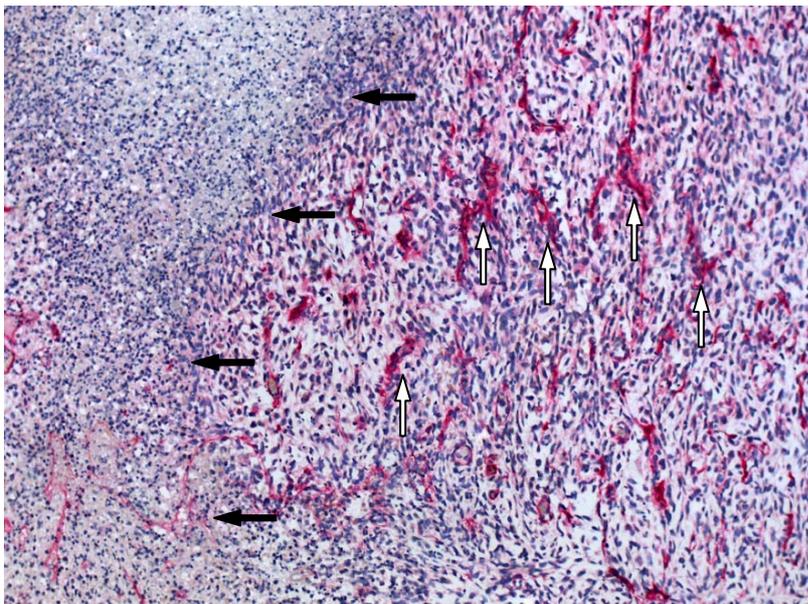


Abb. 13: Kollagen-Typ-IV-Immunhistochemie eines Primärtumors. Es ist deutlich eine hohe Konzentration an Gefäßen im subnekrotischen Bereich zu erkennen. Das nekrotische Areal ist mit schwarzen Pfeilen markiert, die Gefäße in der subnekrotischen Zone sind mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. Vergrößerung 100fach.

In der Kontrollgruppe waren Gewebsschnitte von 17, in der 30 ng/kg Gruppe von 18, in der 150 ng/kg Gruppe ebenfalls von 18 und in der 500 ng/kg Gruppe von 15 Tieren zur Auswertung gekommen. In den Primärtumoren zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Gefäßdichte in der 500 ng/kg Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe um 24,5% von 31,9 auf 39,7 Gefäße pro mm² (P =0,0008) sowie gegenüber den beiden anderen Behandlungsgruppen (P <0,05) (Abb. 14).

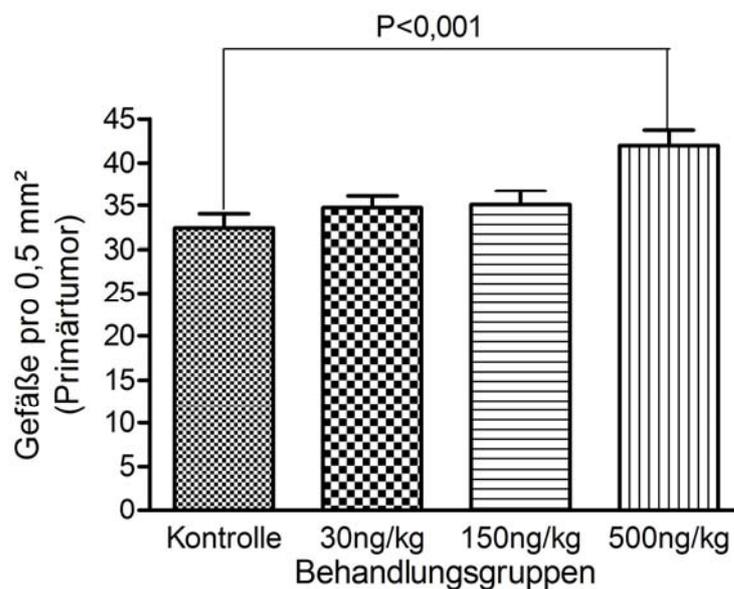


Abb. 14: Vergleichende Darstellung tumorinfiltrierender Gefäße in den verschiedenen Behandlungsgruppen. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg in der 500 ng/kg Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrolle von 31,9 um 24,5% auf 39,7 Gefäße pro mm² (P =0,0008) und ebenfalls ein signifikanter Anstieg gegenüber den beiden anderen Behandlungsgruppen (30 bzw. 150 ng/kg) um 20,7% bzw. 17,8% (P <0,05).

4.4. Lektin histochemie

4.4.1. Anteil dendritischer Zellen in den Primärtumoren

Die Negativkontrollen wiesen keinerlei unspezifische Bindungen des Lektins BSA-I auf. In den Färbungen der Primärtumoren färbten sich neben Lymphozyten und der murinen Haut, soweit am anhängenden Gewebe vorhanden, sowohl größere Gefäße als auch die Bindegewebszellen der Tumorkapsel an. Die dendritischen Zellen reagierten mit einer homogenen, intensiven Rotfärbung des gesamten Zytoplasmas, so dass eine morphologische Abgrenzung anhand der Zellfortsätze leicht möglich war (Abb. 15).

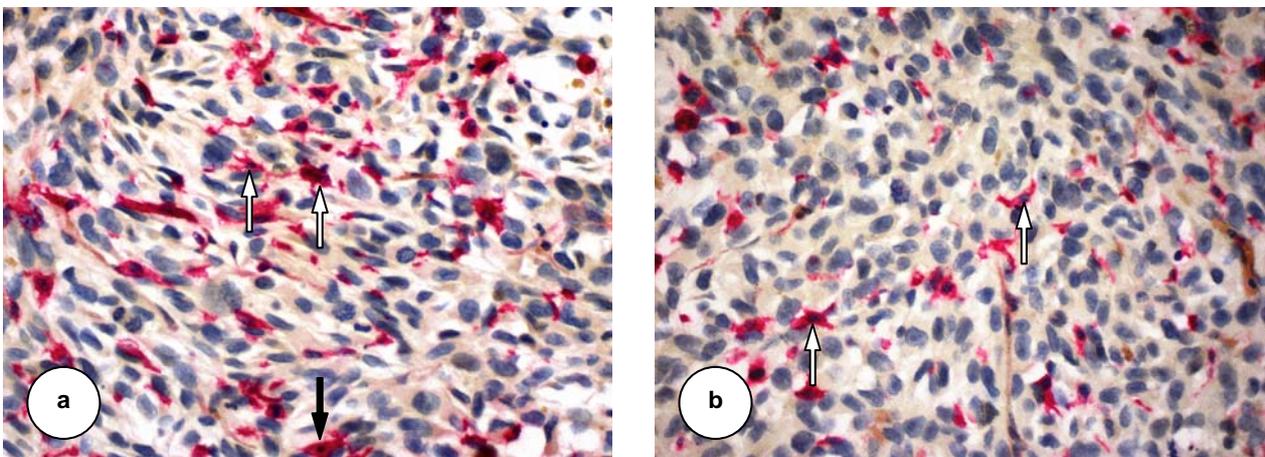


Abb. 15: BSA-I Lektin histochemie an Primärtumoren. Die Abbildung 15a zeigt einen Primärtumor aus der 30 ng/kg Behandlungsgruppe mit einer sichtlich großen Anzahl an rot gefärbten dendritischen Zellen (Pfeile). Der schwarze Pfeil zeigt eine apoptotische dendritische Zelle, wohingegen die weißen Pfeile auf vitale dendritische Zellen zeigen, die stark ausgeprägte Zellfortsätze aufweisen. In Abbildung 15b ist ein Primärtumor aus der 150 ng/kg Behandlungsgruppe mit einer mittleren Anzahl an dendritischen Zellen abgebildet. Vergrößerung 400fach.

In der Kontrollgruppe waren Gewebsschnitte von 16, in der 30 ng/kg Gruppe von 17, in der 150 ng/kg Gruppe von 19 und in der 500 ng/kg Gruppe ebenfalls von 16 Tieren zur Auswertung gekommen. In den Primärtumoren zeigte sich ein hochsignifikanter Anstieg des Anteils dendritischer Zellen in der 30 ng/kg Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe ($P < 0,001$) um das 1,81fache von 8,8% auf 15,9%. In den Behandlungsgruppen mit höherer Dosierung (150 bzw. 500 ng/kg) zeigte sich ebenfalls eine signifikante Erhöhung der dendritischen Zellen gegenüber der Kontrollgruppe um das 1,45fache bzw. das 1,48fache ($P < 0,05$), jedoch eine deutliche, aber gerade nicht signifikante Erniedrigung gegenüber der 30 ng/kg Behandlungsgruppe.

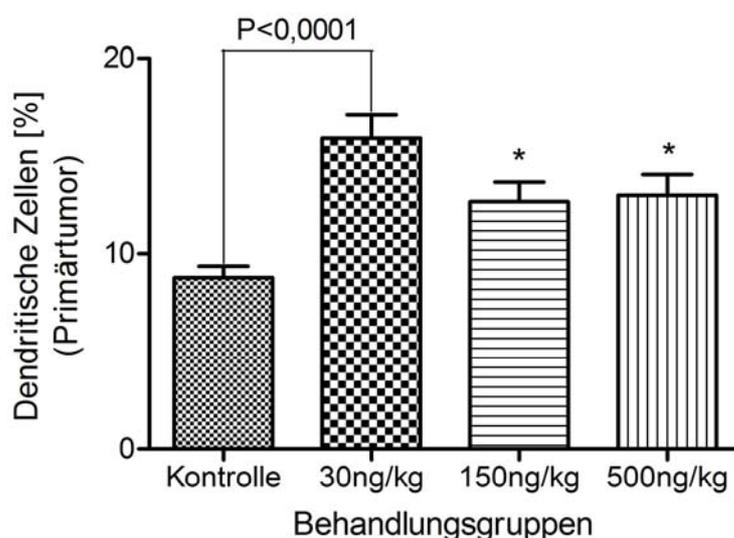


Abb. 16: Der Anteil dendritischer Zellen in den Primärtumoren wies in der 30 ng/kg Behandlungsgruppe einen hochsignifikanten Anstieg um das 1,81fache gegenüber der Kontrolle auf. Der Anstieg in den beiden anderen Behandlungsgruppen (150 bzw. 500 ng/kg) fiel deutlich geringer aus als in der 30 ng/kg Behandlungsgruppe.

In einigen der Primärtumorschnitte zeigte sich zudem ein deutlich erkennbarer, intensiv rot gefärbter Lymphozytenwall in der Tumorkapsel (Abb. 17).

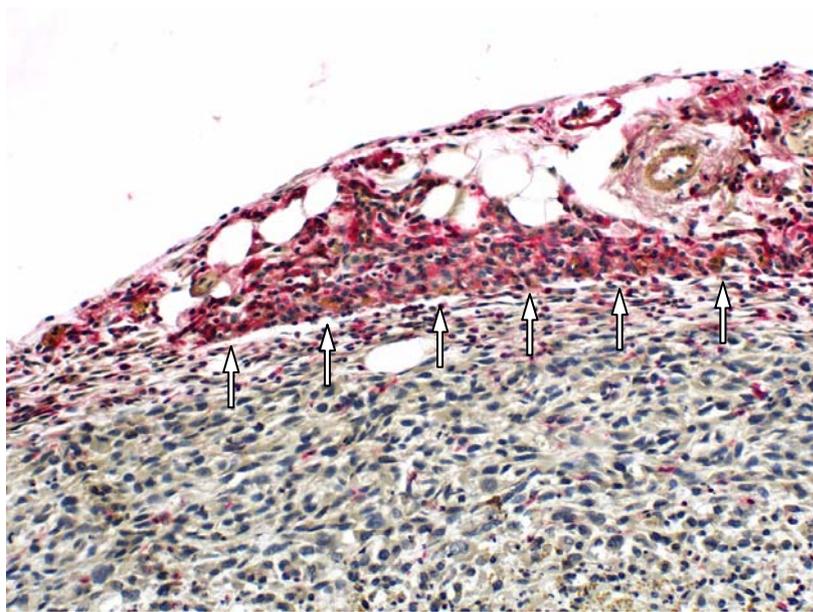


Abb. 17: BSA-I Lektin histochemie eines Primärtumors. Der Lymphozytenwall (Pfeile) im anhängenden Bindegewebe des Primärtumors stellt sich deutlich dar. In den wenigsten Tumoren fand sich auf Grund der präzisen Präparation (genaue Gewichtsbestimmung des Primärtumors) anhängendes Gewebe, so dass diese Beobachtung nur vereinzelt gemacht werden konnte. Vergrößerung 200fach.

Ein zusätzlich mitgefärbter Lymphknoten aus einem Tier aus der 30 ng/kg Behandlungsgruppe zeigte eine deutliche erkennbare Ansammlung von dendritischen Zellen, vor allem in dem Randsinus des Lymphknotens (Abb. 18).

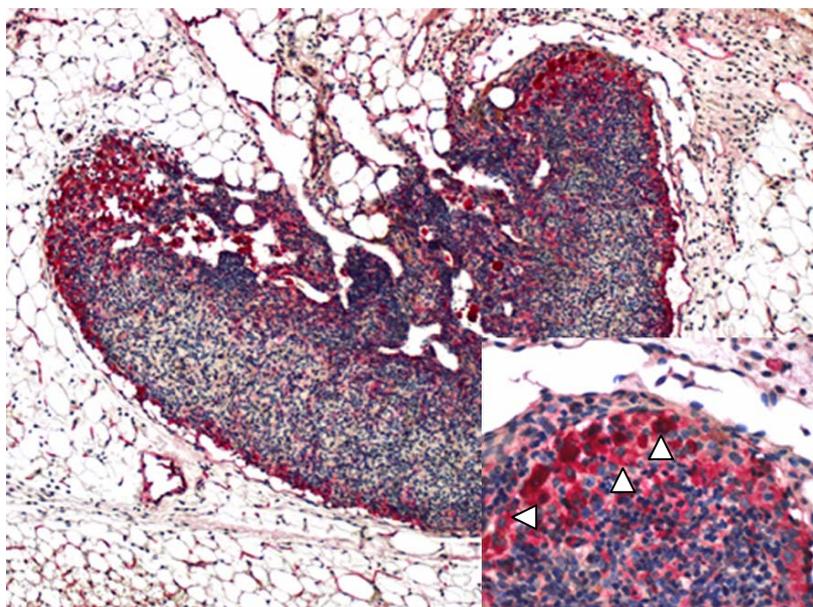


Abb. 18: BSA-I Lektin histochemie eines murinen Lymphknotens aus der 30 ng/kg Behandlungsgruppe. Deutlich ist eine große Anzahl an dendritischen Zellen in den Randsinus zu erkennen (Pfeilspitzen). Zudem stellen sich auch hier, wie in Abb. 17, einige Lymphozyten oder T-Zell Untergruppen, z.B. NK-Zellen, positiv gefärbt dar.

4.4.2. Anteil dendritischer Zellen in den Lungenmetastasen

Die Negativkontrolle wies keinerlei unspezifische Bindung des Lektins BSA-I auf. In den Lungenmetastasen färbten sich neben Lymphozyten größere Gefäße und die Alveolarmakrophagen an. Die dendritischen Zellen reagierten mit einer homogenen intensiven Rotfärbung des gesamten Zytoplasmas und der Zellfortsätze, wodurch eine morphologische Abgrenzung leicht möglich war (Abb. 19).

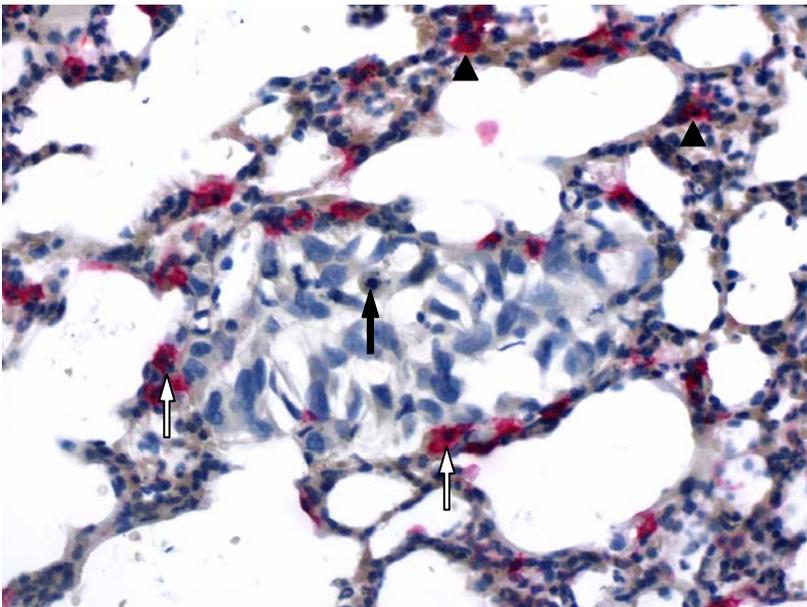


Abb. 19: BSA-I Lektin histochemie einer Lungenmetastase aus der Kontrollgruppe. Die dendritischen Zellen, die in direktem Kontakt mit der Metastase standen (weiße Pfeile) gingen in die Auswertung ein. Die Alveolarmakrophagen im Lungengewebe (schwarze Pfeilspitzen) wurden nicht mit ausgewertet. Der schwarze Pfeil zeigt eine apoptotische Melanomzelle. Vergrößerung 400fach.

In der Kontrollgruppe kamen Gewebsschnitte von 14, in der 30 ng/kg Gruppe von 12, in der 150 ng/kg Gruppe von 13 und in der 500 ng/kg Gruppe ebenfalls von 14 Tieren zur Auswertung.

Die statistische Analyse ergab einen leichten Anstieg der dendritischen Zellen in der 30 ng/kg Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe von 20,9% auf 22,8%. In den Gruppen mit höherer Dosierung (150 bzw. 500 ng/kg) zeigte sich eine deutliche Abnahme des Anteils dendritischer Zellen in den Metastasen gegenüber der Kontrollgruppe und auch der 30 ng/kg Behandlungsgruppe auf 15,4% bzw. 16,7%. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen gezeigt werden ($P > 0,05$).

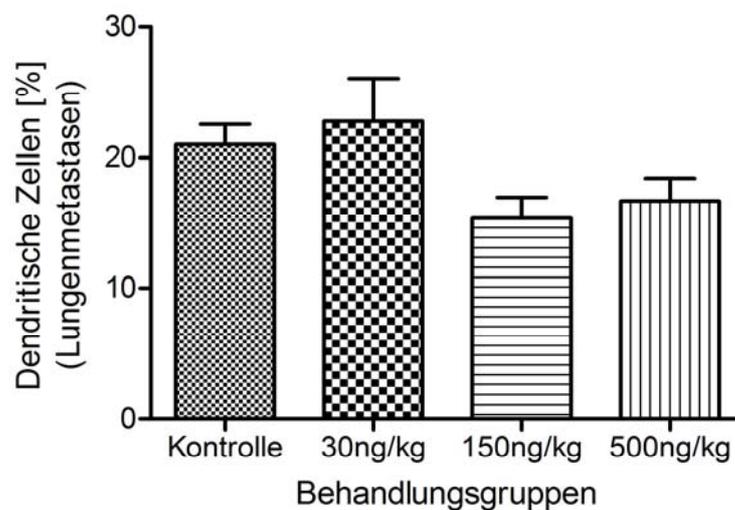


Abb. 20: Vergleichende Darstellung dendritischer Zellen in den Lungenmetastasen. Es zeigte sich ein leichter Anstieg in der 30 ng/kg Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrolle von 20,9% auf 22,8%. In den Behandlungsgruppen mit höherer Dosierung (150 bzw. 500 ng/kg) zeigte sich ein deutlicher, aber gerade nicht signifikanter Abfall gegenüber der Kontrolle von 20,9% auf 15,4% bzw. 16,7%.

4.4.3. Apoptoseinduktion in dendritischen Zellen

Die Auswertung wurde an den BSA-I gefärbten Gewebsschnitten vorgenommen. In der Kontrollgruppe kamen demnach ebenfalls Gewebsschnitte von 16, in der 30 ng/kg Gruppe von 17, in der 150 ng/kg Gruppe von 19 und in der 500 ng/kg Gruppe von 16 Tieren zur Auswertung. Es zeigten sich signifikant höhere Apoptoseraten in den dendritischen Zellen in den Behandlungsgruppen mit 150 und 500 ng/kg ML-I gegenüber der 30 ng/kg Gruppe ($P < 0,01$), wobei die 150 ng/kg Gruppe 28,9% und die 500 ng/kg Gruppe 33,7% mehr apoptotische dendritische Zellen aufwies als die 30 ng/kg Gruppe.

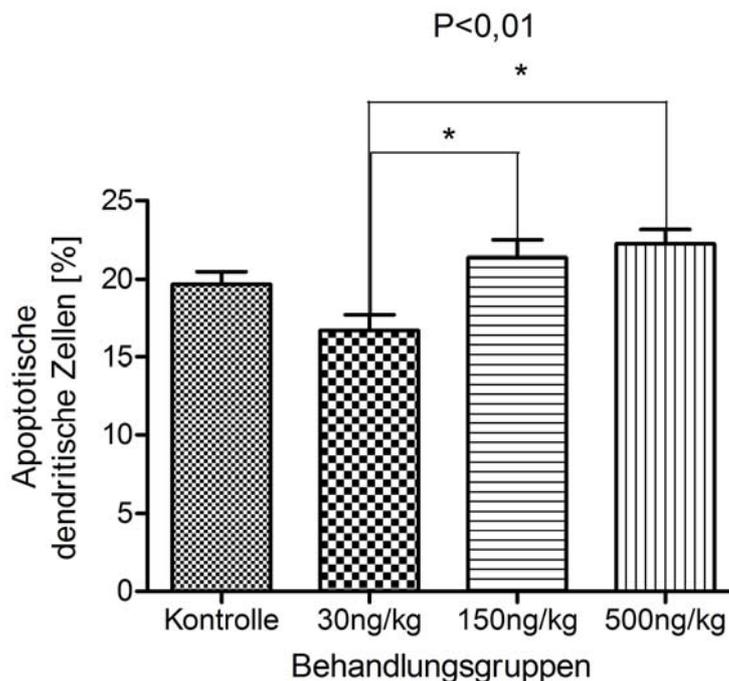


Abb. 21: Vergleichende Darstellung der Apoptoseraten in den tumorinfiltrierenden dendritischen Zellen. Es zeigte sich ein Abfall in der 30 ng/kg Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrolle um 15,7% sowie ein signifikanter Anstieg in den 150 bzw. 500 ng/kg Behandlungsgruppen gegenüber der 30 ng/kg Behandlungsgruppe um 28,9% bzw. 33,7%.

4.5. Korrelationen

Die ermittelten Korrelationen zwischen den verschiedenen Variablen sind in Tabelle 2 zusammengefasst:

Variablen	Behandlungsgruppe	Spearman r	95% KI	P
TG : Apoptose	Kontrolle	0,037	-0,45-0,51	0,44
TG : Apoptose	30 ng/kg	0,076	-0,43-0,55	0,39
TG : Apoptose	150 ng/kg	0,354	-0,14-0,70	0,07
TG : Apoptose	500 ng/kg	0,167	-0,35-0,61	0,26
TG : Nekrose	Kontrolle	* 0,416	-0,09-0,75	* 0,048
TG : Nekrose	30 ng/kg	0,291	-0,22-0,68	0,12
TG : Nekrose	150 ng/kg	* 0,556	0,12-0,81	* 0,007
TG : Nekrose	500 ng/kg	-0,069	-0,54-0,44	0,39
TG : dendritische Zellen	Kontrolle	0,099	-0,43-0,58	0,36
TG : dendritische Zellen	30 ng/kg	0,032	-0,47-0,52	0,45
TG : dendritische Zellen	150 ng/kg	-0,033	-0,49-0,44	0,45
TG : dendritische Zellen	500 ng/kg	-0,395	-0,75-0,14	0,065
TG : apopt. dendr. Zellen	Kontrolle	-0,144	-0,59-0,37	0,29
TG : apopt. dendr. Zellen	30 ng/kg	* -0,503	-0,79-0,01	* 0,019
TG : apopt. dendr. Zellen	150 ng/kg	0,046	-0,43-0,50	0,43
TG : apopt. dendr. Zellen	500 ng/kg	0,028	-0,49-0,53	0,46
Apoptose : Bax	Kontrolle	* -0,626	-0,86-0,02	* 0,005
Apoptose : Bax	30 ng/kg	0,324	-0,22-0,71	0,11
Apoptose : Bax	150 ng/kg	-0,356	-0,70-0,13	0,067
Apoptose : Bax	500 ng/kg	0,042	-0,47-0,54	0,44
Apoptose : Bcl-2	Kontrolle	0,153	-0,35-0,59	0,27
Apoptose : Bcl-2	30 ng/kg	-0,052	-0,55-0,47	0,42
Apoptose : Bcl-2	150 ng/kg	0,188	-0,30-0,60	0,22
Apoptose : Bcl-2	500 ng/kg	-0,369	-0,75-0,19	0,088
Gefäße : Nekrose	Kontrolle	-0,142	-0,59-0,38	0,29
Gefäße : Nekrose	30 ng/kg	0,312	-0,19-0,69	0,10
Gefäße : Nekrose	150 ng/kg	-0,018	-0,49-0,46	0,47
Gefäße : Nekrose	500 ng/kg	0,079	-0,47-0,58	0,39
Gefäße : LM	Kontrolle	0,235	-0,29-0,65	0,18
Gefäße : LM	30 ng/kg	0,131	-0,37-0,57	0,30
Gefäße : LM	150 ng/kg	0,052	-0,44-0,52	0,42
Gefäße : LM	500 ng/kg	-0,123	-0,61-0,43	0,33

Tabelle 2: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Korrelationen der verschiedenen Variablen untereinander mittels Spearman Korrelationskoeffizient. Die signifikanten Korrelationskoeffizienten und P-Werte sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet. Es zeigte sich in der Kontrolle und in der 150 ng/kg Gruppe eine pos. Korrelation zwischen Tumorgewicht und Nekrose. Zudem zeigte sich eine neg. Korrelation zwischen dem Tumorgewicht und der Anzahl apoptotischer dendritischer Zellen in der 30 ng/kg Gruppe und eine ebenfalls neg. Korrelation zwischen der Apoptoserate und der Bax-Expression in der Kontrollgruppe. TG = Tumorgewicht, LM = Lungenmetastasen.

Es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen dem Tumorgewicht (TG) und der Größe des Nekroseareals in der Kontrollgruppe ($r = 0,42$; $P = 0,048$) und in der 150 ng/kg Behandlungsgruppe ($r = 0,56$; $P = 0,007$), wobei in den beiden anderen Behandlungsgruppen kein signifikanter Zusammenhang festgestellt wurde.

Zwischen dem Tumorgewicht und der Anzahl an apoptotischen dendritischen Zellen in der 30 ng/kg Behandlungsgruppe zeigte sich eine negative Korrelation ($r = -0,50$; $P = 0,019$). In den anderen Gruppen zeigte sich hier keine Korrelation zwischen diesen Variablen. Zwischen der Apoptoserate und der Bax-Expression zeigte sich in der Kontrollgruppe eine negative Korrelation ($r = -0,63$; $P = 0,005$). Auch hier zeigte sich in den anderen Gruppen keine Korrelation zwischen diesen Variablen.

5. Diskussion

In einem dieser Arbeit vorausgegangenen Tiermodell an einem Scid-Maus Xenograft-Melanommodell konnte eine signifikante antiproliferative (Reduktion des Primärtumorgewichtes um ca. 35%; $P = 0,033$) und eine noch stärkere antimetastatische Wirkung (Reduktion der Lungenmetastasen um ca. 55%; $P = 0,016$) von hochaufgereinigtem Mistellektin-I (ML-I) auf die humane Melanomzelllinie MV3 gezeigt werden. Diese Wirkung zeigte sich allerdings nur in der geringen Dosierung von 30 ng/kg KG, während höhere Dosierungen (150 bzw. 500 ng/kg KG) weder eine signifikante Hemmung des Tumorwachstums noch der Metastasierung aufwiesen (Thies et al., unveröffentlichte Daten). Aus dieser Konstellation der Daten ergab sich die Vermutung, dass es gegenläufige Mechanismen in der Wirkung des ML-I geben könnte. In geringer Dosierung (30 ng/kg) hatte das ML-I eine stark antiproliferative und antimetastatische Wirkung, wohingegen diese Effekte in der 150 bzw. 500 ng/kg Gruppe aufgehoben schienen. Daher war es Ziel dieser Arbeit die zugrunde liegenden Mechanismen der ML-I Wirkung zu untersuchen, um so auch diese gegenläufigen Mechanismen aufzudecken.

Die Wirkweise des ML-I ist vielfältig. Zum einen wirkt es zytotoxisch durch eine Ribosomeninaktivierung (Franz, 1986; Barbieri et al., 1993), zum anderen ist eine immunmodulatorische Wirkung durch Freisetzung verschiedener Zytokine und Stimulierung von NK-Zellen und Makrophagen beschrieben worden (Hajto et al., 1989; Beuth et al., 1995; Hajto et al., 1997). Des Weiteren wird eine antiangiogenetische Wirkung für die koreanische Mistel diskutiert (Yoon et al., 1995; Park et al., 2001). Diese Wirkungen des ML-I sollten in dem hier vorliegenden Scid-Maus Xenograft-Melanommodell untersucht werden.

Das ML-I besitzt als Ribosomen inaktivierendes Protein der Klasse 2 (RIP II) einen zytotoxischen, Apoptose auslösenden Effekt (Barbieri et al., 1993). Es besteht aus einer A-Kette, die die Ribosomen inaktivierende Wirkung vermittelt sowie aus einer B-Kette, dem eigentlichen Lektin, welches über seine spezifische Zuckerbindungsstelle den Kontakt mit der Glykokalix der Zielzelle herstellt. Die Bindung und Einschleusung des Lektins in die Zelle sind Grundlage für die zytotoxische Wirkung des Lektins (Franz, 1985; Thies et al., 2001; Barbieri et al., 1993). Um den zytotoxischen Effekt des ML-I zu

untersuchen, wurde für diese Arbeit in den Primärtumoren der drei Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe der Anteil der apoptotischen Tumorzellen anhand morphologischer Kriterien (Kerr et al., 1972), die auch nach neueren Untersuchungen immer noch die sicherste und exakteste Methode darstellt (Hall, 1999), ermittelt.

In der 30 ng/kg Behandlungsgruppe zeigte sich ein hochsignifikanter Anstieg der Apoptoseinduktion gegenüber der Kontrollgruppe ($P < 0,0001$) um das 2,6fache von 1,68% in der Kontrollgruppe auf 4,36% apoptotische Zellen in der 30 ng/kg Behandlungsgruppe. In der 150 bzw. 500 ng/kg Behandlungsgruppe war die Apoptoseinduktion gegenüber der Kontrollgruppe ebenfalls signifikant erhöht ($P < 0,01$), wobei die Apoptoseinduktion in der 150 ng/kg Gruppe um das 1,73fache und in der 500 ng/kg Gruppe um das 1,81fache erhöht war. Im Vergleich zu der 30 ng/kg Behandlungsgruppe jedoch war die Apoptoseinduktion in den Behandlungsgruppen mit höherer Dosierung (150 ng/kg: 2,9%, 500 ng/kg: 3,04% apoptotische Zellen) signifikant niedriger ausgeprägt ($P < 0,01$). Für die Primärtumorgewichte zeigte sich eine hochsignifikante Abnahme des Gewichts in der 30 ng/kg Gruppe auf etwa 65% der Kontrolle; in den 150 bzw. 500 ng/kg Gruppen zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (Thies et al., unveröffentlichte Daten). Diese in höheren Dosierungen geringere aber immer noch signifikante Apoptoseinduktion kann also nicht die Erklärung für die antiproliferative Wirkung in der 30 ng/kg Behandlungsgruppe, die aber nicht in den Gruppen mit höheren Dosierungen auftrat, sein. Die Untersuchung der Anzahl der Lungenmetastasen ergab eine signifikante Abnahme auf etwa die Hälfte der Metastasen in der 30 ng/kg Behandlungsgruppe, wohingegen die Anzahl in der Kontrollgruppe und in den anderen Behandlungsgruppen keine Unterschiede aufwies (Thies et al., unveröffentlichte Daten). Der antimetastatische Effekt des ML-I war mit der Verringerung der Anzahl der Lungenmetastasen auf etwa die Hälfte - also knapp 500 Metastasen - noch stärker ausgeprägt als der Effekt auf das Tumorstadium (Thies et al., unveröffentlichte Daten). Der Anteil apoptotischer Tumorzellen in den Lungenmetastasen wies in der 30 ng/kg Behandlungsgruppe jedoch keinen signifikanten Anstieg gegenüber der Kontrollgruppe auf. Die Auswertung der durchschnittlichen Größe der Lungenmetastasen ergab keinen Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe. Es bleibt also die Halbierung der Anzahl der Lungenmetastasen in der 30 ng/kg Behandlungsgruppe herauszustellen. Dieser Rückgang könnte sowohl auf die von Weber et al. (1998) beschriebene, starke zytotoxische Wirkung von ML-I auf im Blut zirkulierende Tumorzellen als auch auf die zusätzlichen immunstimulierenden Effekte des

ML-I zurückzuführen sein (Beuth et al., 1995; Büssing et al., 1997; Hajto et al., 1989; Hajto et al., 1997). Weber et al. (1998) untersuchten den Effekt von Lektinol®, einem auf ML-I standardisiertem Mistelextrakt, auf i.v. injizierte Melanomzellen in einem Mausmodell und konnten in einer Äquivalenzdosierung von drei und 30 ng ML-I/kg KG den stärksten Abfall der in der Lunge kolonisierten Melanomzellen feststellen, wobei bei 150 ng ML-I/kg KG der Effekt abgeschwächt war. Auch in diesen Untersuchungen zeigte sich in höherer Dosierung eine abgeschwächte Wirkung auf die Metastasierung, ähnlich den hier erzielten Ergebnissen. Besonders der Rückgang der Anzahl, aber nicht der durchschnittlichen Größe der Lungenmetastasen, weist darauf hin, dass die zytotoxische Wirkung des ML-I besonders stark im Blut zur Geltung kommt, die Zytotoxizität auf bereits etablierte Metastasen jedoch nicht so stark zu sein scheint.

Nimmt man hier Bezug auf die klinische Situation der Patienten, so lässt sich die besondere Wichtigkeit der starken zytotoxischen Wirkung des ML-I gegen die im Blut zirkulierenden Tumorzellen herausstellen. Gerade bei größeren Tumoren mit einer fortgeschrittenen Invasionstiefe (Stadium II, Stadium III und bei Ulceration des Tumors) ist die Gefahr von bereits zirkulierenden Tumorzellen im Blut oder Lymphsystem besonders hoch und daher könnte hier eine adjuvante ML-I Therapie von besonderem Nutzen sein. Diese Beobachtungen legen also nahe, dass eine peri- und oder postoperative Behandlung mit ML-I eine effektive Maßnahme sein könnte, um die Gefahr der Metastasierung zu verringern.

Der Ablauf und die Regulation der Apoptose auf molekularer Ebene stellt ein sehr komplexes und bislang nur in Teilen verstandenes System aus vielen Bestandteilen dar, die sich in vielen Bereichen gegenseitig beeinflussen. Die bisherigen Untersuchungen weisen darauf hin, dass es vier Hauptmechanismen der Apoptoseinduktion gibt (Hussein et al., 2003; Mehlen und Thibert, 2004). Zum einen gibt es den Weg der Apoptoseinduktion über die sogenannten Death Receptors, wie den Fibroblast-Associated Receptor (Fas), den Tumour Nekrosis Factor Receptor (TNF-R) und den TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor (TRAIL-R) (Hussein et al., 2003). Bei Bindung des jeweiligen Liganden an den Rezeptor wird das Signal über die Death Domains (DD), die Death Effector Domains (DED) und die Caspase Recruitment Domains (CARD) weitergeleitet und über verschiedene Zwischenschritte wird die Kaskade der Caspasen ausgelöst, die zur Apoptose der Zelle führt (Hussein et al., 2003).

Ein weiterer Mechanismus der Apoptoseregulation geht über das p53 Protein. Dieses Protein spielt eine große Rolle in der Regulation des Zellzyklus, der genomischen Stabilität

und der Auslösung der Apoptose (Hussein et al., 2003). Das p53 Protein kann an vielen Stellen in verschiedene Wege der Apoptose eingreifen. Es kann beispielsweise das proapoptotische Protein Bax induzieren sowie den p53 Upregulated Modulator of Apoptosis (PUMA), der die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien bewirkt. Zudem kann p53 die Expression der Death Receptors verstärken und somit ebenfalls die Wahrscheinlichkeit eines apoptotischen Ereignisses erhöhen (Hussein et al., 2003).

Der dritte Regulationsmechanismus wird über die Dependence Receptors vermittelt. Diese besondere Art der Rezeptoren kann bei Fehlen eines Liganden Apoptose auslösen. Derzeit sind etwa 10 dieser Rezeptoren bekannt (Mehlen und Thibert, 2004). Die meisten dieser Rezeptoren sind Substrate für Caspasen und haben eine spezielle Domäne, die in Abwesenheit des Liganden die Apoptose auslösen kann. Bei gebundenen Liganden oder in Anwesenheit von Inhibitoren der Caspasen verlieren diese Rezeptoren ihre Fähigkeit Apoptose auszulösen (Mehlen und Thibert, 2004).

Der vierte hier näher beschriebene Hauptmechanismus ist die mitochondrial vermittelte Apoptoseinduktion. Hierbei führt die Induktion verschiedener Proteine dazu, dass sich das proapoptotische Bcl-2-associated-X-Protein (Bax) mit dem Bcl-2-Antagonist-Killer 1 (Bak) dimerisiert und eine Pore in der äußeren Mitochondrienmembran bildet, durch die das Cytochrom C und der Apoptosis-Inducing-Factor (AIF) aus den Mitochondrien freigesetzt wird. Das Cytochrom C aktiviert den Apoptosom-Komplex, der den programmierten Zelltod auslöst (Hussein et al., 2003).

Für die koreanische Mistel konnte *in vitro* gezeigt werden, dass sie in humanen Leberzellkarzinomzellen eine Hochregulation des proapoptotischen Proteins Bax bewirkt und eine geringere Expression des antiapoptotisch wirksamen Bcl-2 zur Folge hat (Lyu et al., 2002), welches die Freisetzung von Cytochrom C verhindert. Auf Grund der Ergebnisse von Lyu et al. (2002) stellte sich damit die Frage, ob die europäische Mistel ebenfalls über den mitochondrialen Mechanismus Apoptose auslöst.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zur Expression der Proteine Bax und Bcl-2 wiesen einen leichten Anstieg der Expression des proapoptotischen Proteins Bax von 22,6% auf 24,9% und einen minimalen Abfall der Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 von 15,8% auf 15,3% in der 30 ng/kg Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe auf. In der 150 ng/kg Behandlungsgruppe zeigte sich in der Bax-Expression kein Unterschied und sogar ein Anstieg zu der Kontrollgruppe in der Bcl-2-Expression von 15,8% auf 16,8%. In der 500 ng/kg Behandlungsgruppe zeigte sich ein Abfall der Bax von 22,6% auf 20,6% und ebenfalls ein Abfall der Bcl-2-Expression von

15,8% auf 13,4%. Keines dieser Ergebnisse wies jedoch einen signifikanten Unterschied auf. Insgesamt waren die Bax und Bcl-2 Färbungen schwer auszuwerten, da nahezu alle Zellen eine schwache Bindung der Antikörper aufwiesen und sich nur einige Zellen in der Intensität der Farbreaktion stark hervorhoben. Diese Beobachtung lässt sich durch eine Grundaktivität beider Proteine erklären, die auf Grund des ständig in der Zelle ablaufenden Regulierungsmechanismus des Überlebens der Zellen oder des Eintritts in die Apoptose immer vorhanden ist. So werden in normalen Melanozyten und in metastasierten malignen Melanomen sowohl die Proteine Bax, Bak und Bad als auch Bcl-2 und Bcl-x_L exprimiert (Selzer et al., 1998; Huang und Strasser, 2000). Zu der Gruppe der Bcl-2-Familie gehören sowohl proapoptotische Proteine, wie Bax, Bak, Bcl-x_s und Bad als auch antiapoptotische Proteine wie Bcl-2, Bcl-x_L und Bcl-w. Diese Faktoren können sich direkt gegenseitig beeinflussen, oder über andere Faktoren Einfluss aufeinander nehmen. Die Zusammenlagerung von Bax und Bak zum Beispiel sorgt für die Freisetzung von Cytochrom C, während Bcl-x_L und Bcl-2 diese Freisetzung verhindern können (Hussein et al., 2003). Die Bcl-2-Wirkung über andere Faktoren wird beispielsweise durch die Hemmung von Adapterproteinen, die für die Aktivierung der Caspasen und damit für die Auslösung der Apoptose wichtig sind, vermittelt (Adams und Cory, 1998). Diese an sich schon komplexen Regulationsmechanismen werden dadurch zusätzlich verkompliziert, dass die unterschiedlichen Proteine durch viele Reize und Faktoren aktiviert oder inaktiviert werden können. So spielt Bax nicht nur in dem mitochondrialen Apoptoseweg, sondern auch in dem p53 vermittelten Weg der Apoptose eine wichtige Rolle (siehe oben). Auf Grund der komplexen Regulationsmechanismen der Apoptose lässt sich eine verstärkte Expression von Bax nicht mit dem Auslösen von Apoptose gleichsetzen, ebenso wenig wie eine verstärkte Expression von Bcl-2 mit Proliferation gleichzusetzen wäre. Im Gegensatz zu Untersuchungen zur Wirkung der koreanischen Mistel, die einen dosisabhängigen Anstieg von Bax und einen ebenfalls dosisabhängigen Abfall von Bcl-2 zeigte (Lyu et al., 2002), fand sich in der 30 ng/kg Behandlungsgruppe zwar ebenfalls ein tendenzieller Anstieg von Bax und ein minimaler Abfall von Bcl-2, der aber keine Signifikanz erreichte aber in höheren Dosierungen eher gegenläufige Ergebnisse aufwies. Die negative Korrelation zwischen der Apoptoserate und der Bax-Expression in der Kontrollgruppe ($r = -0,626$; $P = 0,005$), nicht aber in den Behandlungsgruppen, weist ebenfalls darauf hin, dass Bax zwar an der Regulation beteiligt ist, jedoch nicht der apoptosebestimmende Faktor ist. Es zeigte sich, dass in der Kontrollgruppe offensichtlich ein Ungleichgewicht zwischen diesen Proteinen vorherrschte, denn es wäre zu erwarten

gewesen, dass sich eine positive Korrelation zwischen der Apoptose und dem proapoptotischen Protein Bax zeigt. Die ML-I-Therapie scheint dieses Ungleichgewicht ein wenig zu bessern, da sich in keiner der anderen drei Behandlungsgruppen eine negative Korrelation dieser Variablen findet.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass der durch ML-I ausgelöste Apoptosemechanismus keinem der oben beschriebenen vier Hauptmechanismen entspricht. Vielmehr ist der Mechanismus der Apoptoseinduktion am ehesten mit dem Mechanismus des Ribosomen inaktivierenden Proteins (RIP) Ricin zu vergleichen. RIPs wie Ricin und ML-I binden an die Zelloberfläche, werden endozytiert und dann über einen retrograden Transport, über den Golgi-Apparat und das endoplasmatische Retikulum ins Zytosol abgegeben (Barbieri et al., 1993). Durch die Glykosidase der RIPs wird dann die Proteinbiosynthese an den Ribosomen unterbunden (Barbieri et al., 1993).

Weitere Untersuchungen haben eine antiangiogenetische Wirkung des koreanischen Mistelextraktes im Mausmodell und an Hühnereiern gezeigt (Yoon et al., 1995; Park et al., 2001). Hierbei wurde sowohl in geringer als auch in höherer Dosierung ein signifikanter Effekt festgestellt und der mögliche Zusammenhang zwischen Antiangiogenese und einer antimetastatischen sowie einer Tumorstadium begrenzenden Wirkung diskutiert. Daher sollten die nun durchgeführten Untersuchungen klären, ob das ML-I aus der europäischen Mistel ebenfalls antiangiogenetisch wirksam ist und gegebenenfalls auch darin eine Ursache für die gezeigte antimetastatische Wirkung (Thies et al., unveröffentlichte Daten; Weber et al., 1998) gesehen werden könnte.

Um zu untersuchen, ob auch die europäische Mistel einen antiangiogenetischen Effekt besitzt, wurde die Anzahl tumorinfiltrierender Blutgefäße in den vier Behandlungsgruppen quantifiziert. Es konnte jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen von Yoon et al. (1995) kein antiangiogenetischer Effekt für das europäische ML-I gezeigt werden. Es zeigte sich sogar ein minimaler Anstieg der Gefäßzahl in den 30 bzw. 150 ng/kg Behandlungsgruppen. Die 500 ng/kg Behandlungsgruppe wies sogar einen signifikanten Anstieg der Gefäßzahl um das 1,24fache gegenüber der Kontrollgruppe auf.

Um diese Diskrepanz der Ergebnisse zwischen der koreanischen und der europäischen Mistel weiter zu klären, wurden die Anteile der Nekrose in den Primärtumoren aller Behandlungsgruppen mit der Gefäßdichte korreliert, da in subnekrotischen Bereichen des Tumors durch den Sauerstoffmangel ein starker angiogenetischer Reiz vorhanden ist (Weinmann et al., 2004; Moeller et al., 2004). Die Größe der Nekroseareale unterschied sich jedoch nicht zwischen den Behandlungsgruppen. Auffällig war die relative Größe der

Nekrose in den Primärtumoren (durchschnittlich etwa 35%), was für ein überschießendes Wachstum des malignen Melanoms in diesem Tiermodell spricht. Dies ist recht gut mit der klinischen Situation zu vergleichen, da hier bei überschießendem Wachstum in Form von Ulceration des Tumors die Prognose für den Patienten schlechter ist. Die von Melanomzellen sezernierten Wachstumsfaktoren für Gefäße, wie der Vascular-Endothelial-Growth-Factor (VEGF) und Angiopoetin-2 (Ijland et al., 1999; Rofstad und Halsor, 2000) sowie die Hypoxie in den subnekrotischen Bereichen greifen als starker Stimulus (Weinmann et al., 2004; Moeller et al., 2004) regulierend in das Gefäßwachstum ein. Neben diesen spielen unter anderem Faktoren wie der Basic-Fibroblast-Growth-Factor (bFGF) und Epidermal-Growth-Factor (EGF) (Danielsen und Rofstad, 1998) in diesen komplexen Mechanismen eine beeinflussende Rolle. Die Angiogenese ist von sehr komplexen, teils ungeklärten Regulationsmechanismen abhängig. Die hier gefundene Korrelation zwischen dem Tumorgewicht und dem Nekroseanteil in der Kontrollgruppe ($r = 0,416$; $P = 0,048$) und in der 150 ng/kg Behandlungsgruppe ($r = 0,556$; $P = 0,007$), nicht aber in den anderen Behandlungsgruppen zeigt, dass in einem Modell, in dem Tumoren für 20 Tage in den Scid-Mäusen wachsen, nicht genug Zeit ist, um diesen komplexen Regulationsmechanismen gerecht zu werden. Die Untersuchungen zum antiangiogenetischen Effekt der koreanischen Mistel wurden von Park et al. (2001) an der Chorionallantoismembran befruchteter Hühnereier durchgeführt und sind somit auch nicht direkt auf das Tumorstadium und dessen komplexe Mechanismen zu übertragen. Die Untersuchungen von Yoon et al. (1995) fanden an C57BL-6 Mäusen statt, denen B16/BL6 Melanomzellen subcutan injiziert wurden. Nach nur acht Tagen Behandlung mit KM-110 (koreanischer Mistelextrakt) wurden die Tumoren von drei Tieren pro Behandlungsgruppe unter einem Präpariermikroskop betrachtet und die Gefäße, die im umgebenden Gewebe lagen und zur Tumormasse orientiert waren, ausgezählt. Hierbei zeigte sich eine signifikante Reduktion der Gefäßzahl (Yoon et al., 1995). Diese Methode der Auszählung der Gefäßzahl war in der vorliegenden Untersuchung nicht anwendbar, da zur Bestimmung des exakten Primärtumorgewichtes das umgebende Bindegewebe abpräpariert worden war. In der vorliegenden Untersuchung konnten also nur intratumoral liegende Gefäße ausgewertet werden. Hierbei wurde besonders darauf geachtet, dass nur in vitalem Tumorgewebe ausgewertet wurde. Sowohl die Nekrosezonen als auch die subnekrotischen Bereiche wurden ausgeschlossen, so dass eine Verfälschung der Ergebnisse ausgeschlossen werden konnte. Durch diesen Unterschied in der Auswertung und durch die sehr kleinen Behandlungsgruppen von Yoon et al. (1995) ist ein direkter

Vergleich der Ergebnisse des Effektes auf die Angiogenese nicht möglich. Der gezeigte Effekt der verstärkten Angiogenese in der 500 ng/kg Behandlungsgruppe könnte sogar der Grund sein, warum trotz kleinerer Primärtumoren im Vergleich zur Kontrollgruppe in der 500 ng/kg Behandlungsgruppe ebenso viele Metastasen vorhanden waren wie in der Kontrollgruppe, denn die Metastasierungswahrscheinlichkeit steigt, je größer der Tumor ist und je besser er vaskularisiert ist (Hanahan und Weinberg, 2000; Leiter et al., 2004). Dennoch sind in der 30 ng/kg Behandlungsgruppe trotz signifikant kleinerer Tumoren und minimal mehr Gefäßen als in der Kontrollgruppe signifikant weniger Metastasen aufgetreten. Dieser Effekt könnte auf die geringere Tumorgröße und damit geringere Metastasierungswahrscheinlichkeit sowie auf die hohe zytotoxische Wirkung des ML-I auf Tumorzellen im Blut zurückzuführen sein (Weber et al., 1998). Insgesamt verdeutlichen die Ergebnisse der Korrelation zwischen Größe der Primärtumoren, der Vaskularisierung, der Nekroseareale und der Anzahl der Lungenmetastasen, wie komplex das Zusammenspiel einiger proangiogener Faktoren in ihrer Wirkung auf das Tumorwachstum und die Metastasierung ist.

Untersuchungen von Hajto et al. (1989, 1997) zur Immunmodulation durch ML-I haben zum einen den Anstieg von Lymphokinen wie Interleukin $1\alpha/\beta$, Interleukin 6, TNF- α , Interferon γ und Granulocyte-Monocyte-Colony-Stimulating-Factor und zum anderen einen Anstieg der Makrophagen und NK-Zell Aktivität *in vitro* und *in vivo* gezeigt. Ein immunmodulatorischer Effekt von ML-I *in vivo* wurde auch von Beuth et al. (1995) beschrieben. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich ein Anstieg der NK-Zellen und der Helfer-/Induktor-T-Lymphozyten bei Mammakarzinom-Patientinnen, wobei hier die Gesamtzahl der Lymphozyten keinen signifikanten Anstieg aufwies. Für den Effekt des Mistelextraktes auf Immunzellen haben Büssing et al. (1996) eine Dosisabhängigkeit festgestellt. Für niedrige Dosierungen des Mistelextraktes wurden eine Stimulation und ein schützender Effekt für neutrophile Granulozyten gezeigt, wohingegen höhere Dosierungen diese Immunzellen abtöteten.

Um die immunmodulatorische Wirkung des ML-I auf Primärtumoren und Lungenmetastasen zu untersuchen, wurden dendritische Zellen (DCs) mit Hilfe der Lektinhistochemie nachgewiesen. Es zeigte sich eine hochsignifikante Erhöhung der dendritischen Zellen in den Primärtumoren der 30 ng/kg Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe um das 1,81fache und eine geringere, aber signifikante Erhöhung in den Behandlungsgruppen mit höheren Dosierungen (150 bzw. 500 ng/kg) um das 1,45fache bzw. das 1,48fache. In den Lungenmetastasen zeigte sich gegenüber der

Kontrollgruppe eine leichte Erhöhung tumorinfiltrierender DCs in der 30 ng/kg Behandlungsgruppe von 20,9% auf 22,8% und eine deutliche, aber gerade nicht signifikante Erniedrigung in den Gruppen mit höherer Dosierung auf 15,4% bzw. 16,7%. Diese Ergebnisse deckten sich genau mit den Ergebnissen des Primärtumorgewichtes und der Anzahl der Lungenmetastasen. Dieses unterstreicht die herausragende Rolle der DCs in der antitumoralen und antimetastatischen Wirkung des ML-I auf das humane maligne Melanom.

Die mit Abstand höchste Anzahl an dendritischen Zellen in der 30 ng/kg Behandlungsgruppe und das mit Abstand geringste Tumorgewicht und die geringste Anzahl an Lungenmetastasen in der 30 ng/kg Behandlungsgruppe erhärten diese Annahme. Auch die deutlich niedrigere Anzahl an dendritischen Zellen in den Gruppen mit höherer Dosierung gegenüber der 30 ng/kg Behandlungsgruppe und die deutlich größeren Primärtumoren in diesen Gruppen sowie die erniedrigte Anzahl an dendritischen Zellen in den Gruppen mit höherer Dosierung und die höhere Anzahl an Metastasen in diesen Gruppen verdeutlichen die Effektivität der DCs. Die durch die Aktivierung der dendritischen Zellen hervorgerufene unspezifische Immunreaktion scheint also in der Wirkung des ML-I einen großen Stellenwert einzunehmen.

Dennoch stellte sich die Frage, warum die Anzahl der dendritischen Zellen in den Tumoren der Gruppen mit höherer ML-I-Dosierung deutlich niedriger war als in der 30 ng/kg Behandlungsgruppe. In einem Melanommodell mit humanen malignen Melanomzellen und Scid-Mäusen zeigte sich, dass dendritische Zellen das ML-I sehr intensiv binden (Thies et al., unveröffentlichte Daten; Artigas et al., 1992). Diese Bindungsfähigkeit von ML-I ist die Grundvoraussetzung für eine Aktivierung der DCs, aber auch für die Aufnahme und die Apoptoseinduktion in den DCs (siehe oben). Möglicherweise bewirkt das ML-I in niedrigen Dosierungen eine Aktivierung und in höheren Dosierungen die Auslösung der Apoptose in den DCs, wie es auch schon für T-Lymphozyten gezeigt werden konnte (Büssing et al., 1996).

Um diesen Effekt zu untersuchen, wurden die Apoptosen in den dendritischen Zellen (DCs) anhand der lichtmikroskopischen Kriterien (Kerr et al., 1972) an den BSA-I gefärbten Gewebsschnitten der Primärtumoren ausgewertet. Die Anzahl der DCs in den Lungenmetastasen war zu gering, um dort eine Ratio erstellen zu können. In den Primärtumoren zeigte sich in den Behandlungsgruppen mit höherer Dosierung (150 bzw. 500 ng/kg) eine signifikante Erhöhung der apoptotischen DCs gegenüber der 30 ng/kg Behandlungsgruppe, wobei diese in der 30 ng/kg Gruppe, gegenüber der Kontrollgruppe

deutlich, aber gerade nicht signifikant erniedrigt waren. Die signifikante Erhöhung der apoptotischen DCs (150 bzw. 500 ng/kg) erklärt die deutliche, aber gerade nicht signifikante Erniedrigung der DCs in den Primärtumoren der Behandlungsgruppen mit 150 bzw. 500 ng/kg gegenüber der 30 ng/kg Behandlungsgruppe. Es zeigte sich also deutlich, dass durch eine geringe Dosierung (30 ng/kg) eine Stimulation der DCs erfolgt, die in höheren Dosierungen (150 bzw. 500 ng/kg) durch Erhöhung der Apoptose der DCs abgeschwächt wird. Zudem zeigte sich in der 30 ng/kg Behandlungsgruppe eine negative Korrelation zwischen dem Primärtumorgewicht und der Anzahl der apoptotischen DCs ($r = -0,503$; $P = 0,019$). Diese Korrelation zeigt sehr deutlich den Zusammenhang zwischen der ML-I-Therapie und der Aktivierung der DCs, die trotz eines großen Tumors weniger Apoptosen aufwiesen. Die ML-I-Therapie in der 30 ng/kg Dosierung aktivierte und schützte die DCs also vor dem programmierten Zelltod. Die Apoptoseinduktion in den DCs in höheren Dosierungen (150 bzw. 500 ng/kg) könnte demnach die Erklärung dafür sein, dass die antiproliferative und antimetastatische Wirkung des ML-I in diesen Behandlungsgruppen aufgehoben war.

Das ML-I der europäischen Mistel wirkt demnach in geringen Dosierungen stark immunstimulierend, aber auf Grund der gegenläufigen Mechanismen (Auslösung der Apoptose von Immunzellen in höherer Dosierung) scheint es von besonderer Bedeutung, dass ausführliche Dosisfindungsstudien für den klinischen Einsatz durchgeführt werden. Gerade die Stimulation der dendritischen Zellen durch ML-I spielt in der Therapie des malignen Melanoms eine ganz besondere Rolle, da diese Zellen über zwei verschiedene Mechanismen in das Tumorstadium und die Metastasierung eingreifen können. Erstens wird durch die Aktivierung der dendritischen Zellen und der Makrophagen die unspezifische Immunantwort (Phagozytose) gegen Tumorzellen verstärkt. Zweitens gehören die dendritischen Zellen und Makrophagen zu den wichtigsten Antigen präsäsentierenden Zellen (Bauer, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass apoptotische Melanomzellen wesentlich leichter von DCs phagozytiert werden können als nekrotische oder lebende Melanomzellen (Shaif-Muthana et al., 2000). Zudem lösen DCs, die apoptotische Melanomzellen phagozytiert haben, eine stärkere Immunantwort aus als Makrophagen. So können sie sowohl $CD4^+$, als auch $CD8^+$ T-Lymphozyten aktivieren, da die Antigene sowohl über das MHC I als auch über das MHC II Molekül präsentiert werden (Shaif-Muthana et al., 2000). Durch die ML-I bedingt verstärkte Antigenpräsentation der DCs und durch die daraus folgende Aktivierung der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten könnte ebenfalls eine verstärkte spezifische Immunantwort induziert werden, zumal DCs

eine Antigen spezifische Immunantwort auslösen können (Shaif-Muthana et al., 2000). Dieser Effekt konnte an dem Scid-Maus Xenograft-Modell nicht beurteilt werden, da dieses Modell keine B-Zellen zur Antikörperproduktion besitzt. Dieser Effekt wird auch bei der Tumor-Vaccinierung genutzt (Ehlken et al., 2004), wobei nur reife dendritische Zellen eine Wirkung auf die Immunisierung beim malignen Melanom zu haben scheinen (de Vries et al., 2003). Studien, in denen die Patienten mit reifen dendritischen Zellen immunisiert wurden, zeigten einen positiven Effekt auf die Rückbildung eines malignen Melanoms (Rescigno et al., 2004). Es zeigte sich eine besonders starke Immunreaktion bei der Immunisierung mit dendritischen Zellen, die mit Tumorpeptiden stimuliert wurden (Hersey et al., 2004). So könnte man sich auch eine positive Beeinflussung von Vaccinierungstherapien durch eine parallele ML-I-Therapie vorstellen. Möglicherweise könnte eine ML-I Therapie diese komplizierten Vaccinierungen mit der Extraktion und der Reifung der DCs sogar ersetzen, da erstens Apoptose induziert wird und zweitens die durch ML-I aktivierten DCs sowohl eine unspezifische als auch eine spezifische Immunantwort hervorrufen können.

Neuere Studien haben gezeigt, dass nur etwa 30% der malignen Melanome primär hämatogen metastasieren und etwa 50% der Patienten zunächst regionale Lymphknotenmetastasen entwickeln (Leiter et al., 2004). Im Anschluss an eine regionale Lymphknotenmetastasierung findet oft eine weitere Metastasierung in die folgenden Lymphknotenstationen und dann in die Blutbahn statt. Die Wahrscheinlichkeit der weiteren Metastasierung aus dem ersten Lymphknoten der Abflussbahn, dem Sentinel-Lymphknoten, steigt nach neuen Studien an, wenn die Aktivität der dendritischen Zellen in diesem Sentinel Lymphknoten verringert ist (Vuylsteke et al., 2004). Es zeigte sich ebenfalls, dass eine lokale Umspritzung der Exzisionsstelle des Primärtumors mit dem Granulocyte/Makrophage-Colony-Stimulating Factor wenige Tage vor der Operation die tumorinduzierte Verringerung der Aktivität der dendritischen Zellen in dem Sentinel Lymphknoten aufheben kann und damit die Prognose für den Patienten verbessert (Vuylsteke et al., 2004).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass den DCs eine besonders wichtige Rolle bei der Verhinderung einer weiteren Metastasierung des malignen Melanoms zukommt. Diese große Bedeutung der DCs innerhalb der Metastasierung machen die DCs möglicherweise zu einem wichtigen Instrument in der Therapie des malignen Melanoms, da durch diese Zellen sowohl die unspezifische als auch die spezifische Immunreaktion gegen den Tumor verstärkt werden könnte. Die Ergebnisse der Aktivierung der DCs durch ML-I-Therapie

weist darauf hin, dass eine zusätzliche adjuvante Therapie für die Patienten einen positiven Effekt, ähnlich der lokalen Umspritzung mit dem Granulocyte/Makrophage-Colony-stimulating Factor haben könnte, da die dendritischen Zellen auch in den Lymphknoten aktiviert werden könnten. Zudem ist eine ML-I Therapie problemlos in der häuslichen Routine durchführbar, wohingegen die Umspritzung des Primärtumors und der Sentinel Lymphknotenstation, und nach Exzision eine Umspritzung der Narbe, sicher eine stationäre Behandlung erforderlich machen würde. Außerdem hätte eine ML-I Therapie zusätzlich zu der Aktivierung der DCs und deren positiven Folgen, noch die Apoptoseinduktion in den Primärtumoren, den Fernmetastasen und vor allem in den zirkulierenden Zellen zur Folge.

ML-I scheint also dreifach gegen das maligne Melanom zu wirken. Zum einen wird Apoptose in den Tumorzellen induziert, zum zweiten wirkt es immunstimulierend auf das unspezifische Abwehrsystem durch Aktivierung der DCs, zum dritten wirkt es stimulierend auf das spezifische Abwehrsystem, indem die apoptotischen Zellen von den DCs phagozytiert und präsentiert werden und dadurch sowohl CD4⁺, als auch CD8⁺ Zellen aktiviert werden können.

Zusammenfassend zeigte sich, dass hochaufgereinigtes ML-I eine vielschichtige Wirkung in der Therapie des malignen Melanoms entfaltet, wobei die Stimulation des unspezifischen Immunsystems und die direkte Apoptoseinduktion, in der antiproliferativen und antimetastatischen Wirkung des ML-I eine Schlüsselrolle spielt. Es zeigte sich zudem deutlich, wie wichtig die genaue Dosierung ist. In zu hohen Dosierungen wurde die herausragende immunstimulierende Komponente des ML-I abgeschwächt, da in den Zellen des unspezifischen Immunsystems (dendritische Zellen) ebenfalls Apoptose induziert wurde.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, mögliche antiproliferative Wirkmechanismen des hochaufgereinigten ML-I, welches in Mistelextrakten enthalten ist, *in vivo* zu klären. Durch immunhistochemische Färbungen an Primärtumoren und spontanen Lungenmetastasen aus einem Scid-Maus Xenograft-Melanommodell wurden die Apoptoseinduktion, die Bax- und Bcl-2-Expression, die Gefäßdichte und die Anzahl dendritischer Zellen (DCs) untersucht. Die Behandlung mit 30 ng/kg KG ML-I induzierte eine 2,6fache Erhöhung der Apoptoserate ($P < 0,0001$), höhere Dosierungen (150 bzw. 500 ng/kg) eine 1,73 bzw. 1,81fache Erhöhung ($P < 0,01$) gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe. Diese Apoptoseinduktion ist am ehesten auf die Ribosomen-inaktivierende Wirkung des ML-I zurückzuführen, da eine Induktion des proapoptotischen Proteins Bax oder eine Reduktion des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 kaum nachzuweisen war und daher eine eher untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Da die Gefäßdichte einen signifikanten Anstieg (1,24fach) in der 500 ng/kg Gruppe und einen minimalen Anstieg in den übrigen Behandlungsgruppen aufwies, besitzt das ML-I im unteren Dosisbereich keinen antiangiogenetischen Effekt. Die Stimulation des unspezifischen Immunsystems scheint der direkten Apoptose auslösenden Wirkung des ML-I sogar noch überlegen zu sein, da in der 30 ng/kg Gruppe die Anzahl der DCs um das 1,81fache stieg ($P < 0,0001$), während höhere Dosierungen die Anzahl der DCs nur in geringerem Maße (1,45 bzw. 1,48fach; $P < 0,05$) steigerten. In den Behandlungsgruppen mit höheren Dosierungen jedoch zeigte die ML-I Therapie auch in den DCs eine signifikante Apoptoseinduktion gegenüber der 30 ng/kg Gruppe ($P < 0,01$), wohingegen 30 ng/kg KG ML-I sogar einen Schutz vor Apoptose zu bewirken scheint, da etwa 16% weniger apoptotische DCs auftraten als in der unbehandelten Kontrollgruppe.

Zusammenfassend zeigt sich, dass hochaufgereinigtes ML-I eine vielschichtige Wirkung in der Therapie des malignen Melanoms entfaltet, wobei die Stimulation des unspezifischen Immunsystems und die direkte Apoptoseinduktion eine Schlüsselrolle spielt. Zudem zeigt sich deutlich, wie wichtig eine genaue Dosisfindung ist, da in zu hohen Dosierungen die herausragende immunstimulierende Wirkung des ML-I abgeschwächt wird.

7. Literaturverzeichnis

Adams JM, Cory S (1998) The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science* 281:1322-1326

Artigas J, Balcher B, Habedank S, Taube F, Franz H, Niedobitek F (1992) Comparative lectin histochemical studies on paraffin- and glycol methacrylate-embedded CNS tissue specimens from AIDS autopsies. Mistletoe lectin I (ML I) as cell marker. *Zentralbl Pathol* 138:272-277

Balch CM, Buzaid AC, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Houghton AJ, Kirkwood JM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen D, Ross MI, Sober A, Soong SJ, Thompson JA, Thompson JF, Gershenwald JE, McMasters KM (2000) A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *Cancer* 88:1484-1491

Barbieri L, Battelli MG, Stirpe F (1993) Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochem Biophys Acta* 1154:237-282

Bauer C (2001) Immunabwehr. In: Klinker R und Silbernagl S (Hrsg) *Blut: Ein flüssiges Organsystem*. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York (Lehrbuch der Physiologie, 3. vollst. überarb. Aufl., S 205-206)

Beuth J, Stoffel B, Ko HL, Buss G, Tunggal L, Pulverer G (1995) Immunaktive Wirkung verschiedener Mistlektin-1-Dosierungen in Mammakarzinom-Patientinnen. *Arzneim.-Forsch.* 45:505-507

Breslow A, Macht SD (1978) Evaluation of prognosis in Stage I cutaneous melanoma. *Plast Reconstr Surg* 113:737-9

Büssing A, Suzart K, Bergmann J, Pfüller U, Schietzel M, Schweizer K (1996) Induction of apoptosis in human lymphocytes treated with *Viscum album L.* is mediated by the mistletoe lectins. *Cancer Lett* 99:59-72

Büssing A, Suzart K, Schweizer K (1997) Differences in the apoptosis-inducing properties of *Viscum album L.* extracts. *Anticancer Drugs* 8:9-14

Danielsen T, Rofstad EK (1998) VEGF, bFGF and EGF in the angiogenesis of human melanoma Xenografts. *Int J Cancer* 76:836-841

de Vries IJM, Lesterhuis WJ, Scharenborg NM, Engelen LPH, Ruiter DJ, Gerritsen MJP, Croockewit S, Britten CM, Torensma R, Adema GJ, Figdor CG, Punt CJA (2003) Maturation of dendritic cells is a prerequisite for inducing immune responses in advanced melanoma patients. *Clin Cancer Res* 9:5091-5100

Edler L (2004) Mistel in der Krebstherapie. *Deutsches Ärzteblatt* 101:A44-A49

Ehlken H, Schadendorf D, Eichmüller S (2004) Humoral immune response against melanoma antigens induced by vaccination with cytokine gene-modified autologous tumor cells. *Int J Cancer* 108:307-313

Eigentler TK, Caroli UM, Radny P, Garbe C (2003) Palliative therapy of disseminated malignant melanoma: a systematic review of 41 randomised clinical trials. *Lancet Oncol* 4:748-759

Franz H (1985) Inhaltsstoffe der Mistel (*Viscum album L.*) als potentielle Arzneimittel. *Pharmazie* 40:97-104

Franz H (1986) Mistletoe lectins and their A and B chains. *Oncology* 43:23-34

Gabius H-J, Darro F, Remmelink M, André S, Kopitz J, Danguy A, Gabius S, Salmon I, Kiss R (2001) Evidence for stimulation of tumor proliferation in cell lines and histotypic cultures by clinically relevant low doses of the galactoside-binding mistletoe lectin, a component of proprietary extracts. *Cancer Invest* 19:114-126

Garbe C, Blum A (2001) Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14:280-290

Garbe C, Büttner P, Ellwanger U, Bröcker EB, Jung EG, Orfanos CE, Rassner G, Wolff HH (1995) Das Zentralregister Malignes Melanom der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft in den Jahren 1983-1993. *Hautarzt* 46:683-692

Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70

Hajto T, Hostanska K, Fischer J, Saller R (1997) Immunomodulatory effects of *Viscum album* agglutinin-I on natural immunity. *Anticancer Drugs* 8:43-46

Hajto T, Hostanska K, Gabius H-J (1989) Modulatory potency of the β -galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defense system *in vivo* in rabbits and patients. *Cancer Res* 49:4803-4808

Hall PA (1999) Assessing apoptosis: a critical survey. *Endocr Relat Cancer* 6:3-8

Heiny BM, Beuth J (1994) Mistletoe extract standardized for the galactoside-specific lectin (ML-I) induces β -endorphin release and immunopotentialiation in breast cancer patients. *Anticancer Res* 14:1339-1342

Hersey P, Menzies SW, Halliday GM, Nguyen T, Farrelly ML, DeSilva C, Lett M (2004) Phase I/II study of treatment with dendritic cell vaccines in patients with disseminated melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 53:125-134

Huang DC, Strasser A (2000) BH3-only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 103:839-842

Hussein MR, Haemel AK, Wood GS (2003) Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. *J Pathol* 199:275-288

Ijland SA, Jager MJ, Heijdra BM, Westphal JR, Peek R (1999) Expression of angiogenic and immunosuppressive factors by uveal melanoma cell lines. *Melanoma Res* 9:445-450

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257

Lens MB, Dawes M (2004) Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* 150:179-185

Leiter U, Meier F, Schittek B, Garbe C (2004) The natural course of cutaneous melanoma. *J Surg Oncol* 86:172-178

Lyu SY, Choi SH, Park WB (2002) Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in hepatocarcinoma cells is associated with inhibition of telomerase via mitochondrial controlled pathway independent of p53. *Arch Pharm Res* 25:93-101

Mehlen P, Thibert C (2004) Dependence receptors: between life and death. *Cell Mol Life Sci* 61:1854-1866

Moeller BJ, Cao Y, Vujaskovic Z, Li CY, Haroon ZA, Dewhirst MW (2004) The relationship between hypoxia and angiogenesis. *Semin Radiat Oncol* 14:215-221

Nabrotzki M, Scheffler A (2001) Complete remission after intralesional mistletoe therapy into recurrent duodenal carcinoma. In: Scheer R, Bauer R, Becker H, Berg PA, Fintelmann V (Hrsg) *Die Mistel in der Tumorthherapie. Grundlagenforschung und Klinik*. KVC Verlag, Essen, S 413-422

Orfanos CE, Jung EG, Rassner G, Wolff HH, Garbe C (1994) Stellungnahme und Empfehlungen der Kommission malignes Melanom der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft zur Diagnostik, Behandlung und Nachsorge des malignen Melanoms der Haut. *Hautarzt* 45:285-291

Park W-B, Lyu S-Y, Kim J-H, Choi S-H, Chung H-K, Ahn S-H, Hong S-Y, Yoon T-J, Choi M-J (2001) Inhibition of tumor growth and metastasis by korean mistletoe lectin is associated with apoptosis and antiangiogenesis. *Cancer Biother Radiopharm* 16:439-447

Rescigno M, Testori A, Parmiani G (2004) What is new in melanoma research? Vaccines, basic and translational research in 2003: report of a workshop at the Third Research Meeting on Melanoma, Milan, Italy, May 2003. *Melanoma Res* 14:241-243

Rofstad EK, Halsor EF (2000) Vascular endothelial growth factor, interleukin 8, platelet-derived endothelial cell growth factor, and basic fibroblast growth factor promote angiogenesis and metastasis in human melanoma xenografts. *Cancer Res* 60:4932-4938

Schumacher U, Adam E, Brooks SA, Leathem AJ (1995) Lectin binding properties of human breast cancer cell lines and human milk with particular references to *Helix pomatia* agglutinin. *J Histochem Cytochem* 43:275-281

Selzer E, Schlagbauer-Wadl H, Okamoto I, Pehamberger H, Potter R, Jansen B (1998) Expression of Bcl-2 family members in human melanocytes, in melanoma metastases and in melanoma cell lines. *Melanoma Res* 8:197-203

Shaif-Muthana M, McIntyre C, Sisley K, Rennie I, Murray A (2000) Dead or alive: immunogenicity of human melanoma cells when presented by dendritic cells. *Cancer Res* 60:6441-6447

Steuer-Vogt MK, Bonkowsky A, Ambrosch P, Scholz M, Neiß A, Strutz J, Hennig M, Lenarz T, Arnold W (2001) The effect of an adjuvant mistletoe treatment programme in resected head and neck cancer patients: a randomised controlled clinical trial. *Eur J Cancer* 37:23-31

Thies A, Pfüller U, Schachner M, Horny HP, Moll I, Schumacher U (2001) Binding of mistletoe lectins to cutaneous malignant melanoma: implications for prognosis and therapy. *Anticancer Res* 21:2883-2888

Thies A, Nugel D, Pfüller U, Moll I, Schumacher U (2005) Influence of mistletoe lectins and cytokines induced by them on cell proliferation of human melanoma cells *in vitro*. *Toxicology* 207:105-116

Valentiner U, Pfüller U, Baum C, Schumacher U (2002) The cytotoxic effect of mistletoe lectins I, II, III on sensitive and multidrug resistant human colon cancer cell lines *in vitro*. *Toxicology* 171:187-199

Vuylsteke RJCLM, Molenkamp BG, Gietema HA, van Leeuwen PAM, Wijnands PGJTB, Vos W, van Diest PJ, Scheper RJ, Meijer S, de Gruijl TD (2004) Local administration of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor increases the number and activation state of dendritic cells in the sentinel lymph node of early-stage melanoma. *Cancer Res* 64:8456-8460

Weber C, Mengs U, Schwarz T, Hajto T, Hostanska K, Allen TR, Weyhenmeyer R, Lentzen H (1998) Effects of a standardized mistletoe preparation on metastatic B16 melanoma colonization in murine lungs. *Drug Res* 48:497-502

Weinmann M, Belka C, Plasswilm L (2004) Tumour hypoxia: impact on biology, prognosis and treatment of solid malignant tumours. *Onkologie* 27:83-90

Yoon TJ, Yoo YC, Choi OB, Do M-S, Kang TB, Lee SW, Azuma I, Kim JB (1995) Inhibitory effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumour angiogenesis and metastasis of haematogenous and non-haematogenous tumor cells in mice. *Cancer Lett* 97:83-91

8. Danksagung

Mein Dank gilt Frau Dr. Anka Thies für die Überlassung des Themas und die sehr freundliche und kompetente Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit, die Hilfestellung bei der mikroskopischen Auswertung und für die Bereitschaft mir immer jede Art von Frage geduldig zu beantworten.

Herrn Prof. Dr. Udo Schumacher danke ich für das in mich gesetzte Vertrauen, seine Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit sowie für die Erlaubnis, die Einrichtungen des Institutes zu nutzen.

Frau Maike Ziesenitz, Frau Susanne Feldhaus, Frau Renate Gehrcke und Herrn Klaus Siebert danke ich für die hervorragende Einführung in die Laborarbeiten und die Unterstützung bei der Ausarbeitung und Durchführung der immun- und lektinhistochemischen Färbungen.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, Fritz und Christa Dautel, die mir das Studium der Medizin ermöglicht haben und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stehen und für ihr unermüdliches Daumen drücken, welches immer geholfen hat.

Meiner Schwester Julia und meiner Freundin Roxane danke ich, da sie mich stets unterstützt haben und immer für mich da sind.

9. Lebenslauf

■ Persönliche Daten

Name: Philip Dautel
Geburtsdaten: 08.12.1978 in Hamburg
Mutter: Christa Dautel, geb. 24.03.1944
Vater: Fritz Dautel, geb. 23.11.1943
Schwester: Julia Dautel, geb. 29.07.1975

■ Schulbildung

1985-1989 Katholische Grundschule Farmsen
1989-1998 Gelehrtenschule des Johanneums zu Hamburg
1998 Allgemeine Hochschulreife

■ Studium der Medizin

SS 00 – WS 01/02 Universität Hamburg
13.03.2002 Physikum
SS 02 – WS 02/03 Universität Hamburg
25.03.2003 1. Staatsexamen
Seit SS 03 Beginn der Dr. Arbeit
14.09.2005 2. Staatsexamen
24.10.2005 Beginn des Praktischen Jahres

10. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.