

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

**Immunhistochemische Untersuchung der zellzyklusassoziierten Antigene
pKi-67 und repp86 in Xenograftmodellen (scid-Maus) humaner Tumoren
zur Therapie des malignen Melanoms mit Mistellektin-I
und des Ösophaguskarzinoms mit Trastuzumab (Herceptin®)**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Alexander Hirche
aus Braunschweig

Hamburg 2006

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 12.12.2007

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:	Prof. Dr. U. Schumacher
Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in:	Prof. Dr. I. Moll
Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in:	PD Dr. E. Laack

Inhaltsverzeichnis

1.	Fragestellungen	3
2.	Einleitung	4
2.1.	Das maligne Melanom	4
2.2.	Mistelextrakte und Mistellektine	5
2.3.	Therapie des malignen Melanoms mit Mistelextrakten und Mistellektinen	7
2.4.	Das Ösophaguskarzinom	8
2.5.	Trastuzumab (Herceptin®)	10
2.6.	Therapie des Ösophaguskarzinoms mit Trastuzumab	12
2.7.	Proliferationsmarker	13
2.8.	Anwendung von Proliferationsmarkern in der präklinischen Forschung	15
3.	Material und Methoden	16
3.1.	Tierversuche	16
3.1.1.	Therapiestudie mit ML-I an MV3-Xenografttumoren in der scid-Maus	16
3.1.2.	Therapiestudie mit Trastuzumab (Herceptin®) an PT1590-Xenografttumoren in der scid-Maus	17
3.1.3.	HT29-Xenografttumoren in der scid-Maus	17
3.2.	Herstellung von Paraffinschnitten	18
3.3.	Immunhistochemie	18
3.3.1.	MIB-1, Ki-S11, Ki-S2 und KA7	19
3.3.2.	Suche nach einem MIB-1-Protokoll für gelagerte Paraffinschnitte	21
3.3.3.	MIB-1-Färbungen im MV3-Xenograftmodell	22
3.3.4.	Negativkontrollen	22
3.4.	Mikroskopische Auswertung	23
3.4.1.	Primärtumoren: Labelingindices für MIB-1, Ki-S11, Ki-S2 und KA7	23
3.4.2.	Lungenmetastasen im MV3-Modell: Labelingindex für MIB-1	24
3.4.3.	Intensitätsvergleiche der MIB-1-Färbungsvarianten	27
3.5.	Statistische Berechnungen	27

4.	Ergebnisse	28
4.1.	Ergebnisse im Melanom (MV3)-Xenograftmodell	28
4.1.1.	Primärtumoren: Einfluss von ML-I auf die pKi-67- und repp86-Expression	28
4.1.2.	Die pKi-67-Expression in einzelnen Lungenmetastasen	31
4.1.3.	Lungenmetastasen: Einfluss von ML-I auf die pKi-67-Expression	32
4.1.4.	Primärtumoren und Lungenmetastasen: Vergleich der pKi-67-Expression	33
4.2.	Ergebnisse im Ösophaguskarzinom (PT1590)-Xenograftmodell	35
4.2.1	Primärtumoren: Einfluss von Trastuzumab (Herceptin®) auf die pKi-67- und repp86-Expression	35
4.3.	Einfluss des Antigen-Retrievals auf die pKi-67-Immunreaktivität mit dem Antikörper MIB-1 in gelagerten Paraffinschnitten	38
4.4.	Vergleich der anti-pKi-67-Antikörper MIB-1 und Ki-S11	43
4.4.1.	HT29	43
4.4.2.	MV3	43
4.4.3.	PT1590	44
4.5.	Vergleich der Antikörper MIB-1 und KA7	45
4.5.1.	HT29	45
4.5.2.	MV3	46
5.	Diskussion	48
5.1.	Proliferationsmarker: Technische Diskussion	48
5.1.1.	Gelagerte Paraffinschnitte und Antigen-Retrieval für die MIB-1-Immunhistochemie	48
5.1.2.	Vergleich der Antikörper MIB-1, Ki-S11 und KA7	53
5.2.	Proliferationsmarker: Theoretische Überlegungen	54
5.3.	Melanom (MV3)-Xenograftmodell	59
5.4.	Ösophaguskarzinom (PT1590)-Xenograftmodell	65
6.	Zusammenfassung	70
7.	Literaturverzeichnis	71
8.	Danksagung	82
9.	Lebenslauf	83
10.	Erklärung	84

1. Fragestellungen

In zwei Therapiestudien an Xenograftmodellen humaner Tumoren in der scid-Maus, malignes Melanom (MV3-Zellen)/Mistellektin-I (ML-I) und Ösophagus-Adenokarzinom (PT1590-Zellen)/Trastuzumab, wurden das Wachstum des Primärtumors und die pulmonale Metastasierung inhibiert. Für beide Modelle soll mittels immunhistochemischer Analyse der zellzyklusassoziierten Antigene pKi-67 (exprimiert in den Zellzyklusphasen G1+S+G2+M) und repp86 (S+G2+M) untersucht werden, ob die beobachtete Inhibition des Primärtumorwachstums mit einer Reduktion der relativen Größe des durch den jeweiligen Marker erfassten proliferativen Zellpools im Zusammenhang steht. Damit soll zunächst die Wirkungsweise der Therapien näher charakterisiert werden. Weiterhin geht es dabei auch um die instrumentelle Frage, ob der Marker repp86, welcher in der variablen G1-Phase des Zellzyklus nicht exprimiert wird, die beobachteten Therapieerfolge besser reflektieren kann als pKi-67.

Folgende Hypothesen liegen der Arbeit zugrunde:

- ML-I reduziert aufgrund seiner bekannten, stark zytoziden Wirkung (Apoptose) auf MV3-Zellen die Expression von pKi-67 und repp86 in den MV3-Tumoren.
- Trastuzumab reduziert aufgrund seiner bekannten zytostatischen Wirkung (G1-Arrest) insbesondere die repp86-Expression in den PT1590-Tumoren.

Für das MV3-Xenograftmodell soll weiter untersucht werden, ob

- sich Primärtumoren und Lungenmetastasen unter Kontrollbedingungen hinsichtlich der pKi-67-Expression unterscheiden,
- die therapeutische Inhibition der pulmonalen Metastasierung mit einer Reduktion der pKi-67-Expression in den Lungenmetastasen im Zusammenhang steht, und
- ob sich die Therapie gleich oder different auf die pKi-67-Expression in den Primärtumoren und Lungenmetastasen auswirkt.

Als methodische Fragestellung soll zusätzlich untersucht werden, ob die Antikörper MIB-1, Ki-S11 und KA7 in dem zur Verfügung stehenden Tumormaterial gleichwertige Bestimmungen des G1+S+G2+M-Zellpools liefern.

Während der Durchführung der Arbeit ergab sich als weiterer technischer Aspekt die Frage, ob durch eine Optimierung der Vorbehandlungsmethode die immunhistochemische Darstellung von pKi-67 in archivierten, formalinfixierten Paraffinschnitten verbessert werden könnte.

2. Einleitung

2.1. Das maligne Melanom

Das maligne Melanom ist ein maligner melanozytärer Tumor von meistens kutaner Primärlokalisierung. Der wichtigste ätiologische Faktor für die Entstehung eines malignen Melanoms ist das UV-Licht. Unter hellhäutigen Personen steigt weltweit die Inzidenz mit einer Verdoppelung alle 10 bis 15 Jahre rapide an und variiert geographisch mit der regionalen UV-Belastung. In mittleren Breiten beträgt sie derzeit etwa 12/100.000/Jahr, in Australien ist sie mit über 40/100.000/Jahr am höchsten. Die Neigung zur frühzeitigen Metastasierung hat eine erhebliche prognostische Bedeutung [Tab. 1]. Eine hohe Apoptoseschwelle der Zellen sowie ihre Fähigkeit, durch vielfältige Mechanismen der bei dieser Tumorentität ausgeprägten Aktivierung des Immunsystems letztlich doch zu entgehen sind weitere wichtige biologische Eigenschaften mit hoher klinischer Relevanz. Heilungsaussichten bestehen bei Erkennung in einem möglichst frühen Stadium und konsequenter chirurgischer Therapie (Fritsch et al. 2004).

	Stadium	5-JÜR %	10-JÜR %
Lokalisiertes Melanom	IA	95	88
	IB	90	80
	IIA	78	64
	IIB	64	52
	IIC	45	32
Regionäre Metastasierung	IIIA	67	61
	IIIB	53	41
	IIIC	27	19
Fernmetastasierung	IV	10	7

Tab. 1: 5- und 10-Jahre Überlebensraten des malignen Melanoms nach AJCC 2002-Stadium (gerundet, nach Balch et al. 2001). Kriterien innerhalb der Stadien I und II sind die Tumordicke in mm und das Vorhandensein einer Tumorulzeration. Das Stadium III wird durch Lymphknoten-, Satelliten- oder In-Transit-Metastasen definiert. Wichtige Kriterien sind hier Anzahl und Größe (mikroskopisch vs. makroskopisch) der Lymphknotenmetastasen, aber auch die Ulzeration des Primärtumors.

Während Patienten in frühen lokalen Stadien gute Heilungschancen haben, tragen Patienten mit dickem Primärmelanom oder mit bereits eingetretener regionärer Metastasierung postoperativ ein hohes Rezidivrisiko. Für diese Gruppe wurden verschiedene Ansätze für eine postoperative, adjuvante Therapie erprobt, insbesondere Chemotherapie, Immunmodulation und Vakkzinierung mit Melanom-Antigenen. Von diesen Ansätzen führte allein die Behandlung mit hochdosiertem Interferon- α 2b in prospektiven, randomisierten Studien zu reproduzierbaren positiven Ergebnissen (Übersichten bei: Tsao et al. 2004; Thompson et al. 2005; Queirolo et al. 2005). So konnte in mehreren prospektiven, randomisierten Studien übereinstimmend eine

signifikante Verlängerung des rezidivfreien Intervalls gezeigt werden (Metaanalyse bei: Kirkwood et al. 2004; Originalzitate siehe dort). Leider war nur in zwei dieser Studien auch eine geringe signifikante Verlängerung des Überlebens feststellbar (Kirkwood et al. 1996 u. 2001). Im Stadium der Fernmetastasierung beträgt die mediane Überlebenszeit nur 6 bis 10 Monate. Keiner der in randomisierten, kontrollierten Studien in diesem Stadium geprüften medikamentösen Therapieansätze führte zu einer Verlängerung des Überlebens. Unter den Chemotherapeutika mit einer nachweisbaren Ansprechrate in diesem Stadium gilt Dacarbazin als Referenzsubstanz. Mit Polychemotherapien oder kombinierten Immun-Polychemotherapien konnte, wenn überhaupt, nur eine geringe Verbesserung der Ansprechrate oder der Dauer der Remission erreicht werden, dieses aber auf Kosten einer erheblichen Toxizität (Übersichten bei: Tsao et al. 2004; Thompson et al. 2005; Queirolo et al. 2005).

Die Suche nach weiteren Therapieansätzen für die genannten Indikationen bleibt deshalb eine dringliche Aufgabe.

2.2. Mistelextrakte und Mistellektine

Extrakte der europäischen Mistel (*Viscum album* L.) werden seit Jahrzehnten, insbesondere in Europa, zur Therapie (Komplementär-Medizin, anthroposophische Medizin) einer Vielzahl unterschiedlicher maligner Tumore einschließlich des malignen Melanoms eingesetzt. Ihr klinischer Nutzen ist jedoch Gegenstand kontroverser Diskussionen. Bisher fehlt ein Wirksamkeitsnachweis durch prospektive, randomisierte Studien. Das Angebot verschiedener Mistelextrakt-Präparate mit unterschiedlichen und nur teilweise standardisierten Konzentrationen der Inhaltsstoffe erschwert die Vergleichbarkeit (Übersichten bei: Mansky 2002; Ernst et al. 2003). Es stehen dem jedoch immer mehr ermutigende Grundlagenerkenntnisse zur Misteltherapie gegenüber, die zu einer Weiterverfolgung dieses Ansatzes stark motivieren.

Viscum album-Extrakte enthalten eine Reihe von biologisch wirksamen Substanzen, unter denen die drei Mistellektine ML-I bis -III (Syn. VAA-I bis -III) als die wichtigsten identifiziert wurden. ML-I ist das Mistellektin mit der höchsten Konzentration in den Pflanzenextrakten und wurde am intensivsten untersucht. Die Mistellektine sind Heterodimere, bestehend aus einer A-Kette mit RNA-*N*-Glykosidaseaktivität und einer B-Kette mit jeweils spezifischer Glykanbindungsfähigkeit, der Lektinkomponente, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Die A-Kette inaktiviert eukaryontische Ribosomen und inhibiert damit die Proteinbiosynthese. Als Dimere gehören die

Mistellektine zur Familie der *ribosomal inactivating proteins* (RIP) vom Typ II. Die B-Kette vermittelt die Bindung an spezifische Zuckerreste der Zellmembran als Voraussetzung der anschließenden Internalisierung des Dimers. ML-I ist D-Galaktose-spezifisch (Übersichten bei: Franz 1986; Barbieri et al. 1993; Hajtó et al. 2005).

Inzwischen konnte eine prepro-ML-cDNA aus *Viscum album* kloniert und ein rekombinantes ML-Heterodimer (rML) hergestellt werden. Die Autoren nahmen an, dass *Viscum album* ein einziges intronfreies Gen für alle drei MLs besäße, und dass sich ML-I, -II und -III allein in ihrer posttranslationalen Modifikation unterschieden (Eck et al. 1999 a, b). Einer anderen Arbeitsgruppe gelang jedoch die Klonierung von drei verschiedenen ML-Genen, die für die drei Mistellektine kodieren (Kourmanova et al. 2004). Aus der koreanischen Mistel (*Viscum album* L. *coloratum*) wurde das eng verwandte Mistellektin VCA isoliert (Park et al. 1998).

Mistellektine wirken dosisabhängig antiproliferativ auf eine Vielzahl unterschiedlicher humaner Tumorzelllinien. Die Wirkung kommt dabei durch eine Induktion der Apoptose zustande. Die Sensibilität der Zelllinien variiert in einem weiten Bereich. Die Anzahl verfügbarer Lektinbindungsstellen stellt dabei einen wichtigen Einflussfaktor dar (Janssen et al. 1993; Schumacher et al. 1995; Lyu et al. 2001; Miyoshi et al. 2001; Valentiner et al. 2002; Thies et al. 2005a). Die mutagenetische Ausschaltung der RNA-N-Glykosidase-Aktivität in der A-Kette führte zum Verlust der apoptoseinduzierenden Wirkung von rML (Langer et al. 1999).

Für ML-I konnten zusätzlich *in vitro* und *in vivo* dosisabhängig, sowohl aktivierende und als auch hemmende, immunmodulatorische Effekte nachgewiesen werden:

- Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (Hajtó et al. 1990 u. 1998; Hostanska et al. 1995)
- Stimulation der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität (Hajtó et al. 1989 u. 1998) und Anstieg der NK-Zellen im peripheren Blut (Hajtó et al. 1998; Beuth et al. 1992)
- Stimulation der Phagozytose (Hajtó et al. 1989) und Produktion freier Radikale durch neutrophile Granulozyten (Timoshenko u. Gabius 1993)
- T-Lymphozyten-Aktivierung und -Anstieg im peripheren Blut (Beuth et al. 1992)
- Apoptoseinduktion in peripheren Lymphozyten, Monocyten (Büssing et al. 1996) und neutrophilen Granulozyten (Savoie et al. 2000)
- Differentielle, subtypen- und dosisabhänige Stimulation der Proliferation und Induktion der Apoptose in Thymocyten (Hajtó et al. 2003)

Es gibt auch Hinweise darauf, dass Mistellektine eine antiangiogenetische Wirkung besitzen und damit indirekt das Tumorwachstum hemmen können (Yoon et al. 1995; Park et al. 2001; Pryme et al. 2002; van Huyen et al. 2002; Harmsma et al. 2004).

Im Tiermodell konnten Xenografttumoren humaner Tumorzelllinien effektiv mit rML oder ML-I therapiert werden (Schumacher et al. 2000; Thies et al. 2005b).

Alle drei genannten Mechanismen, Apoptoseinduktion, Immunmodulation und Antiangiogenese stellen wichtige Ansätze für die Therapie maligner Tumoren dar. Gerade aufgrund seiner proapoptischen und immunmodulatorischen Wirkung(en) ist ML-I eine speziell für die Therapie des malignen Melanoms interessante Substanz.

2.3. Therapie des malignen Melanoms mit Mistelextrakten und Mistellektinen

Malignes Melanom und ML-I-Bindungsstellen (D-Galaktosid-Glykotop)

In einer retrospektiven Untersuchung von 100 Patienten mit malignem Melanom korrelierte eine stark positiv ML-I-Bindung (Lektin histochemie) signifikant mit dem Auftreten von Metastasen während einer 10 jährigen Nachbeobachtungszeit. Insgesamt waren 86% der Melanome positiv für ML-I. Die Ergebnisse wurden als Hinweis auf eine mögliche funktionelle Rolle des D-Galaktosid-Glykotops im Rahmen des Metastasierungsvorgangs sowie auf eine potentielle antimetastatischen Wirkung einer Therapie mit ML-I diskutiert (Thies et al. 2001).

Präklinische Studien

Die Proliferation von humanen Melanom-Zelllinien wurde *in vitro* dosisabhängig von einem Extrakt mit standardisiertem Mistellektin Gehalt gehemmt (Burger et al. 2003).

In Tiermodellen des murinen Melanoms konnten Mistelextrakte (Antony et al. 1997; Weber et al. 1998), ML-I (Thies et al. 2005b) und *Viscum album L. coloratum*-Agglutinin (VCA) (Yoon et al. 1995; Park et al. 2001) Primärtumorwachstum und pulmonale Metastasierung inhibieren.

ML-I, -II und -III inhibierten *in vitro* dosisabhängig die Proliferation von sechs verschiedenen humanen Melanom-Zelllinien. Dabei verhielt sich die Zelllinie MV3 ultrasensibel gegenüber ML-I. Für MV3 wurde eine dosisabhängige Apoptoseinduktion durch ML-I gezeigt (Thies et al. 2005a). In einer weiterführenden Studie wurde die Wirkung von ML-I auf MV3-Xenografttumoren in der scid-Maus in drei unterschiedlichen Dosierungen untersucht. 30 ng/kg/d ML-I inhibierte signifikant das Primärtumorwachstum (Tumorgewicht) um 35% und die pulmonale Metastasierung

(Metastasenanzahl) um 55%. Wider Erwarten waren jedoch zwei höhere Dosierungen, 150 und 500 ng/kg/d, wirkungslos (Thies et al. 2005b).

Das hier beschriebene MV3-Xenograftmodell des malignen Melanoms ist ein Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit (Kontroll- und 30 ng/kg/d-Gruppe).

Ergebnisse aktueller klinischer Studien

In einer prospektiven, randomisierten Studie zur postoperativen, adjuvanten Therapie bei Hochrisiko-Primärmelanom oder regionärer Lymphknotenmetastasierung zeigte der Mistelextrakt Iscador® keinen signifikanten Vorteil bezüglich Überleben oder rezidivfreier Zeit gegenüber alleiniger Beobachtung (Kleeberg et al. 2004). Eine multizentrische, retrospektive, epidemiologische Kohorten-Studie verglich Melanompatienten (AJCC-Stadien II und III), die eine postoperative, adjuvante Iscador®-Therapie erhalten hatten, mit einer ähnlichen Parallelgruppe ohne Mistel-Therapie. Im Gegensatz zu der Studie von Kleeberg et al. (2004) hatten die mit Iscador® behandelten Patienten hier einen signifikanten Vorteil bezüglich rezidivfreier Zeit und Überleben und die Behandlung wurde als sicher eingestuft (Augustin et al. 2005). Klinische Studien zur Therapie des malignen Melanoms mit isoliertem oder rekombinantem Mistellektin fehlen bisher.

Während sich in der präklinischen Forschung Belege für eine therapeutische Wirksamkeit von Mistelextrakten sowie insbesondere deren Hauptwirkkomponente ML-I beim malignen Melanom mehren, ist die Datenlage aus klinischen Studien bisher widersprüchlich und knapp. Es bleibt daher zu hoffen, dass sich in Zukunft das wachsende Grundlagenwissen in reproduzierbare klinische Erfolge umsetzen läßt.

2.4. Das Ösophaguskarzinom

Ösophaguskarzinome sind maligne epitheliale Tumore der Speiseröhre und werden histopathologisch in Plattenepithel- und Adenokarzinome eingeteilt. Die Inzidenz des Plattenepithelkarzinoms, der weltweit häufigsten Form, ist in Deutschland mit 4-5/100.000/Jahr vergleichsweise niedrig und in Gebieten z. B. Chinas, der ehemaligen Sowjetunion oder des Irans mit 100-500/100.000/Jahr besonders hoch. Die Inzidenz des früher seltenen Adenokarzinoms ist in westlichen Ländern in den letzten Jahrzehnten dramatisch angestiegen und hat dort die des Plattenepithelkarzinoms eingeholt. Die meisten Adenokarzinome entstehen am gastroösophagealen Übergang im Sinne einer Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz aus einem Barrett-Ösophagus („intestinale“

Metaplasie des Plattenepithels), einer Komplikation der schweren Refluxösophagitis. Das relative Entartungsrisiko des Barrett-Ösophagus wird auf einen Faktor von 30 bis 125 geschätzt. Ösophaguskarzinome metastasieren bereits sehr frühzeitig lymphogen, später jedoch auch hämatogen. Da das Leitsymptom Dysphagie ein Spätsymptom ist, befinden sich die meisten Patient zum Zeitpunkt der Diagnose bereits in einem fortgeschrittenen Tumorstadium mit äußerst schlechter Prognose [Tab. 2]. Bei ca. 70% liegt dann ein wandüberschreitendes Tumorwachstum mit Lymphknoten- und/oder Fernmetastasen vor (Sievert u. Stein 2001).

	Stadium	TNM			5-JÜR %
in situ	0	Tis			>95
invasiver Tumor	I	T1			50-80
	IIA	T2-3			30-40
LK-Metastasierung (mediastinal)	IIB	T1-2	N1		10-30
	III	T3 T4	N1 N0-1		10-15
wandüberschreitender Tumor					
LK-Metastasierung (zervikal/abdominell)	IVA			M1a	<5
Fernmetastasierung	IVB			M1b	<1

Tab. 2: 5-Jahre Überlebensraten des Ösophaguskarzinoms nach AJCC 2002-Stadium (aus Enzinger et al. 2003). Einteilung der T-Stadien nach Invasionstiefe entsprechend der Wandschichten. Die Kategorie M1a der zervikalen bzw. abdominalen Lymphknotenmetastasierung ist für Tumoren im oberen bzw. unteren Ösophagusdrittel definiert.

Beim resezierbaren Ösophaguskarzinom ist die radikale chirurgische Therapie das Standardverfahren. Präoperative, neoadjuvante Radio-, Chemo- oder Chemoradiotherapien sind intensiv untersucht worden. Die Chemotherapiekomponente beinhaltet meistens Cisplatin und/oder 5-FU. Nach präoperativer Chemoradiotherapie gelangen signifikant häufiger vollständige (R0-)Resektionen (Urschel u. Vasan 2003). In einer Reihe von randomisierten, kontrollierten Studien konnte aber, mit Ausnahme einer Arbeit (Walsh et al. 1996), leider keine signifikante Verlängerung des Überlebens durch eine präoperative Chemoradiotherapie nachgewiesen werden. Metaanalysen konnte aus diesen Studien jedoch einen signifikanten, wenngleich geringen Trend in Richtung einer verbesserten 3-Jahres-Überlebensrate extrahieren (Urschel u. Vasan 2003; Fiorica et al. 2004; Malthaner et al. 2004; Originalzitate siehe jeweils dort). Ein histologisch nachweisbares komplettes Ansprechen (pT0, mikroskopisch kein Tumor im Resektat nachweisbar) auf eine präoperative Chemoradiotherapie ist mit einem signifikant und relevant verlängerten Überleben assoziiert (Geh et al. 2001; Berger et al. 2005).

Patienten mit nicht resezierbarem Tumor oder nachgewiesenen Fernmetastasen haben eine mediane Überlebenszeit von nur 8 bis 10 Monaten. Chemotherapien können für einige Monate zur Verbesserung von Dysphagie und Lebensqualität führen. Sie haben derzeit den Stellenwert einer palliativen Therapieoption neben vor allem lokalen Verfahren (Übersichten bei: Enzinger et al. 2003, Tew et al. 2005).

Die Arbeit an neuen Therapiekonzepten ist angesichts der nach wie vor schlechten Prognose des Ösophaguskarzinoms eine wichtige klinische Herausforderung. Aktuell werden unter anderem Hoffnungen in die Erweiterung des multimodalen Ansatzes um Wirkstoffe mit spezifischem molekularem Angriffspunkt (*targeted therapy*) gesetzt.

2.5. Trastuzumab (Herceptin®)

Das Transmembran-Glykoprotein HER2 (Syn. ErbB2) ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase und gehört zur Gruppe der partiell homologen, humanen *Epidermal Growth Factor*-Rezeptoren (HER1=EGF-Rezeptor, HER2, HER3, HER4). Die HER-Familie und die Familie ihrer Liganden (*EGF-related peptide growth factors*) sind Teil eines komplexen Netzwerkes von Signalwegen, das an der Kontrolle über Wachstum, Entwicklung und Zelldifferenzierung beteiligt ist. Die Bindung von Liganden führt zur Ausbildung von Rezeptordimeren (Homo- und Heterodimere) und deren Aktivierung. Ein spezifischer HER2-Ligand ist bisher nicht bekannt, HER2 ist aber der wichtigste Dimerisierungspartner. HER2 enthaltende Heterodimere erzeugen starke intrazelluläre Signale. Überexpression von HER2 führt zur spontanen Rezeptordimerisierung und autonomen Signalproduktion (Übersichten in: Olayoiye et al. 2000; Rubin u. Yarden 2001). Für verschiedene maligne Tumorentitäten lassen sich bei einem Teil der Patienten im Tumor HER2-Genamplifikationen mit konsekutiver Überexpression des HER2-Proteins feststellen. Beim invasiven Mammakarzinom beispielsweise trifft dieses in etwa 25% der Fälle zu und ist mit einer schlechteren Prognose verbunden (Slamon et al. 1987 u. 1989; Übersicht in: Ross et al. 2003). Die experimentelle Überexpression von HER2 führte *in vitro* zur Zelltransformation und in Tiermodellen zur Tumorgenese und Metastasierung. Aufgrund dieser Befunde wurde HER2 als Angriffspunkt einer gezielten molekularen Therapiestrategie (*targeted therapy*) für das Mammakarzinom auserkoren. Präklinische Studien untersuchten die Wirkung von monoklonalen anti-HER2-Antikörpern auf humane Tumorzelllinien, insbesondere auch des Mammakarzinoms. Diese Antikörper inhibierten *in vitro* die Zellproliferation und im Mausmodell das Wachstum von Xenografttumoren. Ihre Wirksamkeit war abhängig

vom Grad der HER2-Überexpression der jeweiligen Zelllinie (Übersichten in: Baselga 2001a; Neve et al. 2001; Nahta u. Esteva 2003).

Trastuzumab (Herceptin®) ist ein rekombinanter, humanisierter anti-HER2-Antikörper der aus einem murinen monoklonalen anti-HER2-Antikörper (4D5) und dem Fc-Anteil des humanen IgG1 zusammengesetzt wurde (Carter et al. 1992). Bekannte Wirkungsmechanismen sind (Übersichten in: Baselga et al. 2001b; Kumar u. Yarmand-Bagheri 2001; Nahta u. Esteva 2003):

- HER2-Herunterregulation durch beschleunigte Endozytose
- dosisabhängige antiproliferative Wirkung durch Zellzyklusarrest (G1-Phase)
- Induktion einer Antikörper-abhängigen Zell-vermittelten Zytotoxizität
- Inhibition der proteolytischen Abspaltung der HER2-Ektodomäne
- Sensibilisierung gegenüber einer TNF α -induzierten Apoptose (Hudziak et al. 1989)
- Inhibition der Angiogenese
- Sensibilisierung der Zellen gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika
- Sensibilisierung der Zellen gegenüber Strahlentherapie (Liang et al. 2003)

Klinischen Studien wiesen die Wirksamkeit von Trastuzumab im Sinne einer objektiven Ansprechrates zuerst beim metastasierten, HER2-überexprimierenden Mammakarzinom nach (Baselga et al. 1996; Pegram et al. 1998; Cobleigh et al. 1999, Vogel et al. 2002). In der wegweisenden randomisierten Studie von Slamon et al. (2001) führte die Kombination von Trastuzumab mit einer Standardchemotherapie (Paclitaxel oder Doxorubicin/Cyclophosphamid) im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie zu einer höheren Ansprechrates, einer längeren Remissionsdauer und einem verlängerten Überleben. Mehrere andere Kombinationen zeigten sich ebenfalls effektiv (Übersicht bei: Nahta u. Esteva 2003). In neoadjuvanten Therapien werden mit Trastuzumab-Chemotherapie-Kombinationen hohe Raten von pathologisch komplettem Ansprechen (pT0) erreicht. Daten zum Langzeitüberleben stehen aber noch aus (Übersicht bei: Montemurro u. Aglietta 2005). Inzwischen liegen auch übereinstimmend positive Ergebnisse aus mehreren großen randomisierten Studien zur Anwendung von Trastuzumab in der adjuvanten Therapie vor (Übersicht in Baselga et al. 2006).

2.6. Therapie des Ösophaguskarzinoms mit Trastuzumab

Das Ösophaguskarzinom und HER2

Die Angaben zur Prävalenz der HER2-Überexpression beim Ösophaguskarzinom in verschiedenen Studien variieren beim Plattenepithelkarzinom zwischen 0 und 52% (Mittel: 23%) und beim Adenokarzinom zwischen 0 und 43% (Mittel: 22%). Die großen Schwankungen werden unter anderem mit einer unzureichenden Verbreitung standardisierter immunhistologischer Methoden erklärt (Ross et al. 2001).

Die prognostische Bedeutung der HER2-Expression beim Ösophaguskarzinom wird kontrovers diskutiert. In einigen Studien war ein positiver immunhistochemischer HER2-Status beim Plattenepithelkarzinom ein ungünstiger prognostischer Faktor (Wang et al. 2000; Mimura et al. 2005a; Sunpaweravong et al. 2005), in anderen jedoch nicht (Wang et al. 1999 u. 2004; Hardwick et al. 1997). Auch für das Adenokarzinom konnte nur in einem Teil der Studien die HER2-Überexpression (Flejou et al. 1994; Nakamura et al. 1994) oder die HER2-Genamplifikation (Brien et al. 2000) als ungünstiger prognostischer Faktor identifiziert werden, während andere Arbeiten eine prognostische Bedeutung von HER2 nicht bestätigten (Polkowski et al. 1999; Hardwick et al. 1997; Miller et al. 2003). Anders als beim Mammakarzinom wird eine Trastuzumab-Therapie beim Ösophaguskarzinom also nicht durch eine konsistent belegte prognostische Bedeutung der HER2-Überexpression - im Sinne einer „target-Heuristik“ – in besonderem Maße motiviert.

Präklinische Studien

Trastuzumab inhibierte *in vitro* die Proliferation von zwei HER2-überexprimierenden humanen Ösophagus-Adenokarzinom-Zelllinien (OE19, OE33) (Dahlenberg et al. 2004). Auf die bisher untersuchten Ösophagus-Plattenepithelkarzinom-Zelllinien mit unterschiedlichem HER2-Expressionsgrad hatte Trastuzumab *in vitro* keine direkte antiproliferative Wirkung, induzierte aber eine antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (Yamazaki et al. 2003; Mimura et al. 2005b).

Für die von einem Adenokarzinom des Ösophagus abstammende humane Zelllinie PT1590 (Hosch et al. 2000) konnte eine Amplifikation des HER2-Gens sowie eine Überexpression des HER2-Proteins nachgewiesen werden. Ihre *in vitro*-Proliferation wurde durch Trastuzumab dosisabhängig gehemmt. Die Behandlung von PT1590-Xenografttumoren in der scid-Maus mit Trastuzumab (2 oder 10 mg/kg/Woche) inhibierte signifikant das Wachstum der Primärtumoren (Tumorgewicht) um jeweils

ca. 35% gegenüber der Kontrollgruppe, d. h. ohne Unterschied zwischen den beiden Dosierungen. Während in der Kontrollgruppe 78% der Tiere spontan Lungenmetastasen entwickelten, wurde in beiden Therapiegruppen die Metastasierungsrate auf 17% gesenkt (Lüth et al., bisher unveröffentlicht).

Das hier beschriebene PT1590-Xenograftmodell des Ösophagus-Adenokarzinoms stellt einen Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit dar (Primärtumoren).

Klinische Studien

Bisher wurde erst eine einzige klinische Studie zur Therapie mit Trastuzumab beim Ösophaguskarzinom abgeschlossen. In dieser Phase I-Studie führte bei Patienten mit Adenokarzinom die Kombination einer Chemoradiotherapie (Cisplatin, Paclitaxel) mit Trastuzumab in voller Dosis zu keiner Verstärkung toxischer Nebenwirkungen gegenüber der Chemoradiotherapie allein (Safran et al. 2004). Da es sich um eine Phase-I-Studie handelt, kann naturgemäß noch nichts über eine therapeutische Wirkung ausgesagt werden.

2.7. Proliferationsmarker

Methoden zur Messung von Zellproliferation in Geweben sind in der onkologischen Forschung von besonderem Interesse.

Gerdes et al. (1983) immunisierten Mäuse mit isolierten Zellkernen einer humanen Hodgkin-Lymphom-Zelllinie mit dem Ziel, spezifisch gegen nukleäre Antigene von Hodgkin- und Sternberg-Reed-Zellen gerichtete monoklonale Antikörper herzustellen. Dabei fanden sie einen Ki-67 getauften Antikörper mit der besonderen Eigenschaft, offenbar spezifisch Zellkerne in proliferationsreichen Kompartimenten humaner Gewebe wie z. B. Keimzentren von Lymphfollikeln immunhistochemisch darzustellen. Detaillierte Zellzyklusanalysen ergaben, dass das über den neuen Antikörper definierte nukleäre Ki-67-Antigen in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G1, S, G2 und Mitose) exprimiert wird, nicht aber in ruhenden Zellen (G0) (Gerdes et al. 1984). Damit war ein einfacher operationaler Marker zur immunhistochemischen Bestimmung der sogenannten Wachstumsfraktion, dem Anteil der aktiv proliferierenden Zellen einer Zellpopulation, verfügbar. Das Ki-67-Antigen wurde als Protein identifiziert und die für pKi-67 codierende cDNA kloniert (Gerdes et al. 1991; Schlüter et al. 1993). Datenbanksuchen ergaben keine Sequenzhomologien zu bis dato bekannte Proteinen. Als Immunogen zur Produktion weiterer muriner monoklonaler Antikörper, darunter

MIB-1, diente ein rekombinant hergestelltes Peptid, welches das vermutete Ki-67-Epitop enthielt (Gerdes et al. 1992; Key et al. 1993). Die Antikörper Ki-67 und MIB-1 binden tatsächlich ein nahezu identisches Epitop (Key et al. 1993; Kubbutat et al. 1994). Ein wesentlicher Nachteil des Ki-67-Antikörpers war, dass er nur für Gefrierschnitte, nicht aber für formalinfixierte Paraffinschnitte, dem Standardmaterial der Pathologie, geeignet war. Nach Anpassung der von Shi et al. (1991) vorgestellten Mikrowellen-Vorbehandlung (*Antigen-Retrieval*) für die Immunhistochemie mit MIB-1 gelang erstmals eine gegenüber Gefrierschnitten gleichwertige Darstellung des Ki-67-Proteins in formalinfixierten Paraffinschnitten (Cattoretti et al. 1992). Damit konnte nun archiviertes Paraffinmaterial für eine Vielzahl von retrospektiven klinischen Studien genutzt werden. Kurz darauf wurde über einen weiteren murinen monoklonalen anti-pKi-67-Antikörper für formalinfixierte Paraffinschnitte, Ki-S5, berichtet (Kreipe et al. 1993b). Der murine monoklonale anti-pKi-67-Antikörper Ki-S11 unterscheidet sich von seinen Verwandten durch seine Eignung für bouinfixiertes Paraffinmaterial (Rudolph et al. 1997). Neben pKi-67 gibt es weitere Marker der Wachstumsfraktion. Das Enzym Topoisomerase-II α wird exklusiv in den Zellzyklusphasen G1 bis M exprimiert und durch mehrere murine monoklonale Antikörper spezifisch erkannt (Kreipe et al. 1993a; Kellner et al. 1997). Der murine monoklonale Antikörper KA7 markiert ein Antigen, das exklusiv in den aktiven Zellzyklusphasen exprimiert wird (mündliche Information: Prof. Dr. Rudolph, ehemals Institut für Hämatopathologie, Universität Kiel). Das *proliferating nuclear cell antigen* (PCNA) gilt nicht mehr als spezifischer Marker der zellulären Proliferation, weil es teilweise auch in ruhenden Zellen exprimiert wird und funktionell an der DNA-Synthese beteiligt ist (McCormick u. Hall 1992).

pKi-67 ist als Standardmarker der Wachstumsfraktion etabliert und MIB-1 der weitaus am häufigsten eingesetzte Antikörper. Der pKi-67-Index (=Anteil pKi-67-positiver Zellen an einer Zellpopulation) hat sich als unabhängiger und signifikanter prognostischer Faktor für eine Reihe von Tumorerkrankungen, darunter Mammakarzinom, Prostatakarzinom, Blasenkarzinom, Cervixkarzinom, Bronchialkarzinom, NHL, Weichteilsarkom, Astrozytom und Meningeom erwiesen (Übersichten in: Scholzen u. Gerdes 2000; Endl et al. 2001; Brown u. Gatter 2002).

Das humane nukleäre Protein repp86 (*restrictedly expressed proliferation-associated protein*), spezifisch erkannt von dem murinen monoklonalen Antikörper Ki-S2, unterscheidet sich wesentlich von den bisher vorgestellten Proliferationsmarkern. Zellzyklusanalysen zeigten, dass es exklusiv in den Phasen S, G2 und M exprimiert

wird („*resticted*“). Der Antikörper Ki-S2 ist bei adäquatem Antigen-Retrieval zur immunhistochemischen Färbung von formalinfixierten Paraffinschnitten geeignet (Heidebrecht et al. 1997; Rudolph et al. 1998; Heidebrecht et al. 2003). Die im Expressionsprofil von repp86 nicht eingeschlossene G1-Phase beherbergt wichtige Verzweigungspunkte im Schicksal der einzelnen Zelle und ist die Zyklusphase mit dem größten Betrag zu der erheblichen Variabilität der Zellzyklusdauer. Der Aus- und Eintrittspunkt zwischen dem Zellzyklus und der Ruhephase G0 liegt in der mittleren G1-Phase und am so genannten G1/S-Restriktionspunkt kann die einzelne Zelle verweilen, die Apoptose einleiten oder mit Übertritt in die S-Phase den Zellzyklus fortsetzen. Das komplexe Netzwerk der Zellzyklussteuerung ist in malignen Zellen typischerweise gestört, was gerade in Bezug auf die G1-Phase gilt. Nach Ansicht der Entwickler des Ki-S2-Antikörpers sollte der repp86-Index (=Anteil der repp86-positiven Zellen an einer Zellpopulation) besser als der pKi-67-Index diejenige Zellfraktion erfassen können, die tatsächlich proliferieren wird (Rudolph u. Parwaresch 1996; Heidebrecht et al. 1997; Rudolph et al. 1998).

2.8. Anwendung von Proliferationsmarkern in der präklinischen Forschung

In der experimentellen Forschung stellen Xenograftmodelle humaner Tumoren in der scid-Maus eine wichtig Möglichkeit dar, komplexe biologische Vorgänge wie Tumorwachstum und Metastasierung, sowie deren pharmakologische Beeinflussbarkeit zu untersuchen. Zur Feststellung eines Medikamenteneffektes werden typischerweise Größen wie Tumorgewicht und Metastasenzahl herangezogen. Als zusätzlicher Parameter wird häufig die Wachstumsfraktion der Primärtumoren immunhistochemisch mit anti-pKi-67-Antikörpern bestimmt (z. B. Sharma et al.1997; Katoh et al. 2004b). Das Wachstum eines (malignen) Gewebes ist das „Nettoergebnis“ der zelluläre Proliferation einerseits und des Zellverlusts durch Zelltod (Apoptose, Nekrose) und Zellabschilferung andererseits. Neben den oben genannten „Nettogröße“ Tumorgewicht liefert die Wachstumsfraktion also zusätzliche Information. Selten wurde im Xenograftmodell auch in Metastasen die Wachstumsfraktion zur Untersuchung einer Therapiewirkung bestimmt (Nakanishi et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit soll nun neben dem pKi-67-Index erstmals auch der repp86-Index als zweites, differentes Maß zur Untersuchung der Wirkung eines zytoziden (ML-I: Apoptose) und eines zytostatische (Trastuzumab: G1-Arrest) Medikaments auf humane Tumorzellen (MV3 bzw. PT1590) im Xenograftmodell bestimmt werden.

3. Material und Methoden

3.1. Tierversuche

3.1.1. Therapiestudie mit ML-I an MV3-Xenograftumoren in der scid-Maus (Thies et al. 2005b)

In dieser Studie wurden 80 pathogenfreie BALB/c scid/scid Mäuse (kurz: scid-Mäuse) männlichen Geschlechts im Alter von 9 bis 15 Wochen verwendet. Tierhaltung, Ernährung (Futter und Wasser ad libitum) und Manipulationen erfolgten unter sterilen Bedingungen. Jedes Tier erhielt am Versuchstag 1 eine subkutane Injektion von 1×10^6 Zellen der humanen Tumorzelllinie MV3 interskapulär. Die Einteilung in eine Kontroll- und drei Therapiegruppen mit jeweils 20 Tieren erfolgte per Zufall. An den Versuchstage 2 bis 20 (19 Tage) wurde den Tieren einmal täglich 30, 150 bzw. 500 ng/kg ML-I (aufgereinigt; Prof. Dr. Pfüller, Institut für Phytochemie, Universität Witten/Herdecke) in PBS intraperitoneal injiziert. Den Tieren der Kontrollgruppe wurde entsprechend nur das Lösungsmittel verabreicht. Während der Versuchszeit verstarben in der Kontrollgruppe zwei und in den Therapiegruppen (30, 150, bzw. 500 ng/kg/d) zwei, ein bzw. drei Tiere. Nach Tötung der verbleibenden Tiere am Tag 20 durch zervikale Dislokation wurden die Primärtumoren und die Lungen herauspräpariert und die Gewichte der Primärtumoren bestimmt. Zur weiteren histologischen Untersuchung wurden Primärtumoren und Lungen in neutral gepuffertem Formalin fixiert. Die Primärtumoren wurden in Paraffin eingebettet. Für jedes Tier wurde nach einem etablierten Verfahren (Jojovic u. Schumacher 2000) die Anzahl von Metastasen in den Lungen bestimmt. Beide Lungen eines Tieres werden dazu in 1 mm dicken Scheiben zerteilt, diese in zufälliger Verteilung in Agar eingegossen und dann in Paraffin eingebettet. Der Paraffinblock wird komplett in Serie geschnitten (5 μm), wobei jeder zehnte Schnitt auf einen Objektträger aufgezogen und gesammelt wird. Aus dem mittleren Teil dieser Sammlung wird in zehn aufeinander folgende H.E.-gefärbten Schnitte die Metastasenzahl unter dem Mikroskop ausgezählt. Ein repräsentativer Wert für die Gesamtmetastasenzahl des Tieres wird mit einer Korrekturformel berechnet (Jojovic u. Schumacher 2000). Neben den Schnitten im Zehnerabstand werden im mittleren Teil des Blockes abschnittsweise auch Folgen direkt benachbarter Schnitte gesammelt und für spätere immunhistochemische Untersuchungen gelagert.

3.1.2. Therapiestudie mit Trastuzumab (Herceptin®) an PT1590-Xenograftumoren in der scid-Maus (Lüth et al., bisher unveröffentlicht)

Insgesamt 30 pathogenfreien weiblichen scid-Mäusen im Alter von 6 bis 8 Wochen wurde eine Suspension von jeweils 1×10^6 Tumorzellen der Linie PT1590 (Hosch et al. 2000) in Matrigel® (BD, Heidelberg, Deutschland) subkutan in die Flankenregion injiziert. Vorversuche hatten ergeben, dass der genannte Zusatz, eine Mischung von Bestandteilen der murinen extrazellulären Matrix, die Anwachsrate der implantierten Zellen erhöht und die Dauer bis zu einem makroskopisch feststellbaren Tumorwachstums verkürzt. Die Tiere wurden per Zufall in eine Kontroll- und zwei Therapiegruppen eingeteilt. Tierhaltung, Ernährung (Futter und Wasser ad libitum) und Manipulationen erfolgten unter sterilen Bedingungen. Nach 23 Tagen zeigten alle 30 Tiere palpierbare subkutane Tumorknoten. Innerhalb der folgenden 21 Tagen erhielten die Tiere der Therapiegruppen dann Trastuzumab (Herceptin®, zur Verfügung gestellt von Hoffmann LaRoche) in den Dosierungen 2 bzw. 10 mg/kg/Woche, verteilt auf jeweils zwei intraperitoneale Injektionen pro Woche. Den Kontrolltieren wurde entsprechend nur das verwendete Lösungsmittel PBS verabreicht. Ein Tier aus der Kontrollgruppe musste wegen einer ulzerierenden Läsion über dem Tumorknoten vorzeitig getötet werden. Nach insgesamt 44 Tagen, zwei Tage nach der letzten Applikation, wurden die verbliebenen Tiere geopfert. Primärtumoren und Lungen der Tiere wurden entnommen und die Gewichte der Primärtumoren dokumentiert. Die anschließende Aufbereitung der Präparate zur weiteren histologischen Untersuchung entspricht der Beschreibung im vorangegangenen Abschnitt 3.1.1.

Durch einen zwischenzeitlichen Verlust von zwei Paraffinblöcken reduzierte sich das Material auf acht Primärtumoren in der Kontroll- und neun in der 10 mg-Gruppe.

3.1.3. HT29-Xenograftumoren in der scid-Maus

Zu Vergleichszwecken standen insgesamt 17 HT29-Xenograftumoren zur Verfügung. Diese stammten aus den Kontrollgruppen des Versuchs von Sharma et al. (1997) sowie einer Wiederholung dieses Versuchs unter gleichen Bedingungen im selben Institut ($9+8=17$). Pathogenfreien scid-Mäusen wurde am ersten Versuchstag jeweils eine Suspension von 5×10^7 HT29-Zellen (humane Kolonkarzinom-Zelllinie) subkutan injiziert. An den Tagen 20 bis 23 erhielten die Kontrolltiere dreimal täglich physiologische Kochsalzlösung intraperitoneal verabreicht. Am folgenden Tag wurden die Tiere getötet, die Primärtumoren präpariert und wie in 3.1.1. weiter verarbeitet.

3.2. Herstellung von Paraffinschnitten

5 µm dicke Paraffinschnitte wurden mit einem Mikrotom hergestellt, auf silanbeschichtete Objektträger (HistoBond®, Marienfeld, Deutschland) aufgezogen und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank getrocknet. Für alle Versuche wurden falls nicht speziell angegeben, frisch hergestellte Paraffinschnitte verwendet.

Direkt vor den Färbungen wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert.

3.3. Immunhistochemie

Bei denen hier zur immunhistochemischen Färbung von humanen Xenografttumoren verwendeten Primärantikörpern [Tab. 3] handelt es sich um monoklonale Maus-anti-human-Antikörper. Die als Trägerorganismus der Tumoren eingesetzten scid-Mäuse produzieren keine eigenen Immunglobuline. Die Detektion der gebundenen Primärantikörper durch anti-Maus-Antikörper als Sekundärantikörper ist also ohne Interferenz möglich.

Aus dem MV3-Xenograftmodell wurden die Primärtumoren und Lungenmetastasen der Kontroll- und der 30 ng/kg/d-Gruppe untersucht, aus dem PT1590-Xenograftmodell die Primärtumoren der Kontroll- sowie beider Therapiegruppen. Grundsätzlich wurden dabei jeweils für jeden der Antikörper MIB-1, Ki-S2 und KA7 die Schnitte der Kontroll- und Therapiegruppe(n) in einem simultanen Durchgang behandelt. Unterschiede zwischen verschiedenen Färbedurchgängen wirken sich so nicht auf den Vergleich der Gruppen aus. Die Färbung von MV3-Kontrolltumoren mit den Antikörper MIB-1 und Ki-S11 erfolgte in einem gemeinsamen Durchgang, genauso auch die der PT1590-Kontrolltumoren.

Zum Vergleich der Antikörper MIB-1, Ki-S11 und KA7 in HT29-Tumoren wurden drei unabhängige Färbungen herangezogen.

Antikörper	MIB-1	Ki-S11	KA7	Ki-S2
Antigen	pKi-67		unveröffentlicht	repp86
Zellzyklusphasen	G1, S, G2, M			S, G2, M
Bezug	DAKO A/S	Institut für Hämatopathologie, Universität Kiel		

Tab. 3: Primärantikörper, die in dieser Arbeit verwendet werden.

3.3.1. MIB-1, Ki-S11, Ki-S2 und KA7

Die Antikörper Ki-S11, Ki-S2 und KA7 wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Parwaresch (Institut für Hämatopathologie, Universität Kiel) zur Verfügung gestellt.

Entparaffinierte und rehydrierte Schnitte wurden in Citratpuffer (10 mM Citronensäuremonohydrat, mit 10 N NaOH add pH 6.0) in der Mikrowelle zunächst bei 1000 W bis zum Siedebeginn, dann bei 500 W fünfmal über 2 min (MIB-1, Ki-S11) bzw. viermal über 5 min (Ki-S2, KA7) vorbehandelt. Anschließend verblieben die Schnitte zum langsamen Abkühlen für 30 min im Citratpuffer, wobei nach 20 min die Hälfte durch frischen Puffer ersetzt wurde. Die vorbehandelten Schnitte wurde dreimal über 5 min in TBS (Tris-buffered saline: 50 mM Tris base, 150 mM NaCl, mit 2 N HCl add pH 7.6) gespült.

Die nachfolgenden Inkubationen wurden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt (mit Ausnahme der primären Antikörper, siehe dort). Alle Verdünnungen wurden in DAKO® Antibody Diluent With Background Reducing Components (DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA) angesetzt. Zur Blockade unspezifischer Bindungen wurden die Schnitte mit 1:10 verdünntem Kaninchen-Normalserum (DAKO A/S, Glostrup, Dänemark) für 30 min inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper bei 4°C über Nacht; MIB-1 (DAKO A/S) 1:50 verdünnt, Ki-S2 1:10 verdünnt, Ki-S11 und KA7 als unverdünnter Zellkulturüberstand. Am nächsten Tag wurden die Präparate dreimal über 5 min in TBS gespült um ungebundene Primärantikörper zu entfernen, dann mit 1:100 verdünntem Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (DAKO A/S) als Sekundärantikörper für 30 min inkubiert und anschließend wie oben gespült. Es folgte ein Inkubation mit 1:100 verdünntem APAAP Mouse Monoclonal (DAKO A/S) für 30 min und erneutes Spülen. Um eine ausreichende Signalverstärkung zu erreichen, wurden die Inkubationen mit dem Sekundärantikörper und mit dem APAAP-Komplex sowie die jeweils nachfolgenden Spülschritten einmal (MIB-1, Ki-S11, Ki-S2) bzw. zweimal (KA7) wiederholt.

Zur Herstellung des Reaktionsansatzes (Mengen je Küvette angegeben) für die enzymatischen Farbstoffentwicklung durch die alkalische Phosphatase wurden 400 mg Natrium-Nitrit in 10 ml Aqua dest. gelöst und mit 400 µl Neufuchsin (5 g/100 ml 2 N HCl) und 400 ml TBS (50 mM Tris base, 150 mM NaCl, mit 2 N HCl add pH 8.24) ergänzt. Danach wurden in rascher Folge 40 mg Naphthol AS in 1000 µl Dimethylformamid (DMF) gelöst und hinzugeben, 260 µl Tween 20 hinzugeben, der

gesamte Ansatz gemischt und die Schnitte darin für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Spülen für 5 min unter fließendem Leitungswasser gestoppt und die Schnitte danach in Aqua dest. überführt. Anschließend wurden die Präparate mit frisch gefiltertem Mayers Hämalaun (1:1 in Aqua dest.) 10 sek gegengefärbt, für 5 min in fließendem Leitungswasser gebläut, erneut in Aqua dest. überführt und mit Hilfe des wasserhaltigen Mediums Clarion/Crystal Mount (Biomedica corp., Foster City, California, USA) eingedeckt.

Die Färbungen mit den Antikörpern Ki-S2 und KA7 zeigten in Vorversuchen an Schnitten aus allen drei Tierversuchsreihen einen zytoplasmatischen Hintergrund, der durch Verdünnung des primären und sekundären Antikörpers oder Zugabe von Tween 20 zum TBS-Puffer nicht reduziert werden konnte. Geringer konzentrierte Antikörper führten jedoch zu einem Abfall der spezifischen Färbeintensität, der die Differenzierbarkeit zwischen gefärbten und ungefärbten Kernen beeinträchtigte.

Die KA7-Färbung der PT1590-Xenografttumoren nach dem oben beschriebenen Protokoll konnte wegen einer starken zytoplasmatischen Hintergrundfärbung nicht ausgewertet werden. Die Unterscheidung zwischen ungefärbten und spezifisch gefärbten Kernen gelang hier nur unzuverlässig.

3.3.2. Suche nach einem MIB-1-Protokoll für gelagerte Paraffinschnitte

Bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit hatten die Lungenserienschnitte des MV3-Xenograftmodells, die im Rahmen der Metastasenzählung für nachfolgende Untersuchungen aufgehoben worden waren, eine Lagerungsdauer von einem Jahr bei Raumtemperatur. Auch bereits vorhandene Schnitte aller MV3-Primärtumoren hatten unter denselben Bedingungen gleich lange gelagert. Testschnitte aus dieser Sammlung wurden mit dem oben beschriebenen Protokoll für MIB-1 nur sehr schwach angefärbt. Über einen Abfall der pKi-67-Immunreaktivität in gelagerten Paraffinschnitten wurde mehrfach berichtet. Dieser soll aber durch eine Optimierung des Antigen-Retrievals (AR) kompensierbar sein (Wester et al. 2000a, b; zur Diskussion siehe 5.1.1.).

An gelagerten Paraffinschnitten von fünf Primärtumoren des MV3-Modells sowie an frisch angefertigten Schnitten von den Paraffinblöcken derselben Tumoren wurde zwecks einer solchen Optimierung ein Suchtest durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Parameter des Antigen-Retrievals kombinatorisch modifiziert, alle übrigen Schritte des MIB-1-Protokolls blieben unverändert. Hitze wurde in der Mikrowelle zunächst bei 1000 W bis zum Siedebeginn, dann bei 500 W fünfmal über 2 min [MW] oder im Wasserbad bei 85°C über 16h [WB] zugeführt. Als AR-Puffer diente Standard-Citratpuffer (10 mM Citronensäuremonohydrat, mit 10 N NaOH add pH 6.0) [C] oder Borsäure (0.2 M Borsäure, mit 2N NaOH add pH 7.2) [B]. Es wurden also insgesamt vier Varianten an frischen [F] und gelagerten [L] Paraffinschnitten getestet: MW-C, WB-C, MW-B und WB-B [Tab. 4]. Die beiden Varianten WB-C und WB-B wurden aus der Arbeit von Wester et al. (2000b) übernommen. MW-C entspricht mit der Verwendung von Standardcitratpuffer und einer Gesamtdauer der Mikrowellenbehandlung von 10 min ab Siedbeginn den Empfehlungen für das MIB-1-Epitop aus der Literatur (Cattoretto et al. 1992; Taylor et al. 1994).

Das MIB-1[WB-C]-Protokoll lieferte an frischen und gelagerten Paraffinschnitten des MV3-Modells vergleichbare Färbergebnisse und wurde daher ausgewählt. Eine analoge Protokollvariante wurde auch für den Antikörper Ki-S11 an zwei Primärtumoren erprobt.

	Citratpuffer [C]	Borsäure [B]
Mikrowelle [MW]	frische Schnitte, n=5 [F] gelagerte Schnitte, n=5 [L]	frische Schnitte, n=5 [F] gelagerte Schnitte, n=5 [L]
Wasserbad [WB]	frische Schnitte, n=5 [F] gelagerte Schnitte, n=5 [L]	frische Schnitte, n=5 [F] gelagerte Schnitte, n=5 [L]

Tab. 4: Testschema zum Antigen-Retrieval für gelagerte Paraffinschnitte.

3.3.3. MIB-1-Färbungen im Melanom (MV3)-Xenograftmodell

Um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse für Primärtumoren und Lungenmetastasen zu ermöglichen wurde auch für die Primärtumoren auf die gelagerten Paraffinschnitte zurückgegriffen. Diese wurden mit dem MIB-1[WB-C]-Protokoll gefärbt.

Bei einer orientierenden Durchsicht der H.E.-gefärbten Schnitte der Mäuselungen aus der Vorgängerarbeit fiel auf, dass die meisten Metastasen sehr klein waren. Selbst in Schnitten mit mehr als einer Metastase waren die Gesamtzahlen an Tumorzellkernen häufig klein. In vielen Schnitten waren keine Metastasen vorhanden. Für eine hinreichend genaue Berechnung des Labelingindices ist jedoch die Zählung einer möglichst großen Zahl von Zellkernen zu fordern. In der Vorgängerarbeit konnte in 16 Tieren der Kontroll- und in 18 Tieren der 30 ng/kg/d-Therapiegruppe eine pulmonale Metastasierung nachgewiesen werden. Für jedes dieser Tiere wurde daher mit Hilfe des vorhandenen Datensatzes der Metastasenzählung ein Schnitt mit möglichst vielen Metastasen ausgewählt. Für die MIB-1[WB-C]-Färbung wurde dann ein direkter, ungefärbt gelagerter Nachbarschnitt verwendet.

Ob unter Verwendung des MIB-1[WB-C]-Protokolls die gelagerten Paraffinschnitte gegenüber frischen als gleichwertig zu betrachten sind, wurde erneut mit einer jetzt höheren Probenzahl überprüft. Aus praktischen Gründen wurde der angestrebte Vergleich der Antikörper MIB-1 und Ki-S11 parallel dazu durchgeführt: Für 11 Primärtumoren der Kontrollgruppe wurde jeweils zwei benachbarte, frisch angefertigte Schnitte mit dem MIB[WB-C]- und dem Ki-S11[WB-C]-Protokoll gefärbt. Die Auswertung (siehe unten, codiert in durchmischter Reihenfolge) erfolgte unter Einschluss der von denselben Tumoren stammenden Schnitte aus der MIB-1[WB-C]-Färbung am gelagerten Material. (Die MIB-1[WB-C]-Färbung am frischen Material dient hier als Referenz für zwei Vergleiche.)

3.3.4. Negativkontrollen

In allen Färbegängen wurde je Küvette ein Schnitt aus einem Tumorpräparat desselben Tiermodells als Negativkontrolle mitgeführt. Statt mit dem jeweiligen Primärantikörper wurde dieser mit DAKO® Antibody Diluent inkubiert, alle übrigen Arbeitsschritte unterschieden sich nicht.

Die Gewebe in den Negativkontrollen waren stets frei von immunhistochemischer Anfärbung.

3.4. Mikroskopische Auswertung

Die gefärbten Schnitte wurden am Mikroskop Axiolplan 2 (Zeiss, Göttingen, Deutschland) ausgewertet. Repräsentative Areale wurde mit der Digitalkamera Axiovision MRc5 (Zeiss) unter Berücksichtigung des Köhler'schen Beleuchtungsprinzips dokumentiert.

Grundlage der Auswertung ist die Unterscheidung von positiven (spezifisch immunreaktiv gefärbten) und negativen (nur Gegenfärbung) humanen Tumorzellkernen. Hilfreich dabei ist die Kenntnis des aus der Literatur bekannten Färbemusters/Verteilungsmusters des jeweiligen Antikörpers/Antigens. Die Verteilung von pKi-67 und repp86 ist abhängig von den Zellzyklusphasen. In Interphasenkernen färbt die anti-pKi-67-Immunhistochemie die Nucleoli stark an, aber auch das Nukleoplasma diffus sowie in zahlreichen Foci; in der Mitose werden die kondensierten Chromosomen intensiv dargestellt (Scholzen u. Gerdes 2000). Das mittels anti-Ki-S2-Färbung darstellbare repp86 findet sich während der Zyklusphasen S und G2 in einer diffusen nukleoplasmatischen Verteilung und ist in der Mitose strikt mit den Spindelpolen und –fasern assoziiert (Heidebrecht et al. 1997 u. 2003). Nach eigenen Beobachtungen sind KA7-positive Interphasenkerne durch eine diffuse Färbung gekennzeichnet. Mitotische Zellen sind durch eine diffuse zytoplasmatische Färbung stets als KA7-positiv zu erkennen, die Chromosomen oder der Spindelapparat werden jedoch nicht spezifisch dargestellt.

Die humanen Tumorzellkerne konnten von den murinen Wirtszellen (Fibroblasten, Endothelzellen, leukozytäres Infiltrat, Alveolarepithel) morphologisch einfach unterschieden werden. Im Gegensatz zu den murinen Zellkernen sind die MV3-, PT1590- und HT29-Zellkerne deutlich größer und besitzen prominente Nucleoli.

Um verfälschende Tendenzen von vorne herein auszuschließen wurden die Schnitte jedes Färbedurchgangs codiert in zufällig durchmischter Reihenfolge, d. h. verblindet ohne Kenntnis von Gruppenzugehörigkeit oder Färbemethode, ausgewertet.

3.4.1. Primärtumoren: Labelingindices für MIB-1, Ki-S11, Ki-S2 und KA7

Es wurde das von Sharma et al. (1997) an den HT29-Xenografttumoren benutzte Auswertungsverfahren in leicht modifizierter Form übernommen. Dort wurden je Schnitt mindestens 500 Zellen unter 400x Vergrößerung mit Hilfe eines Zählgitters ausgezählt, das zur Normierung der Zählposition zunächst unter geringer Vergrößerung mit der Ecke auf die Tumorrand/Wirt-Grenze eingestellt worden war.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden in fünf möglichst weit getrennten vitalen Tumorregionen jeweils mindestens 100 Zellkerne gezählt (insgesamt also mindestens 500), um den Einfluss einer regionalen Heterogenität des Gewebes zu mindern. Die Wahl der prospektiven Zählpositionen erfolgte stets in der Lupenvergrößerung.

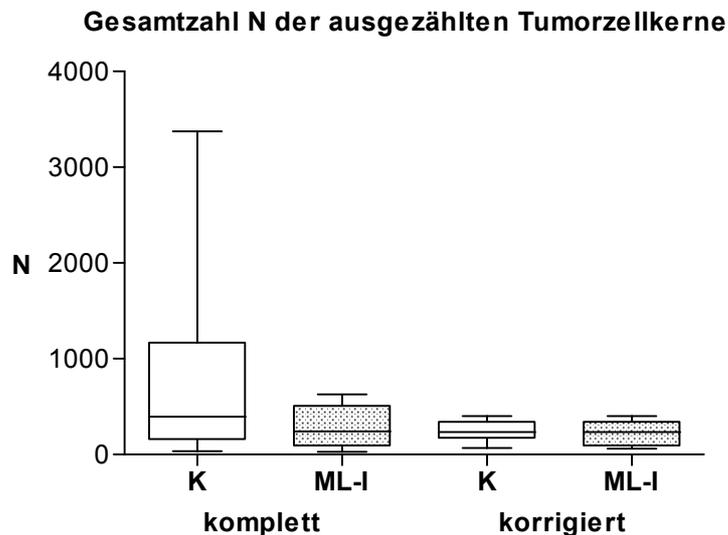
Die PT1590- und die HT29-Primärtumoren besitzen einen geordneten Aufbau mit einer proliferationsreichen Tumorrandzone und zentral gelegenen Nekrosen. Für diese Tumorarten wurden die Zählpositionen in die Randzone gelegt. Nach Wechsel zur 100x (für HT29) bzw. 200x (für PT1590) Vergrößerung wurde zwecks Abstandsnormierung die Kante eines quadratischen Zählgitters (10 mal 10 Feldern, Zeiss) parallel zur Tumorrand-Wirt-Grenze eingestellt. Ohne Änderung der Position wurden dann unter 400x Vergrößerung mindestens 100 Tumorzellkernen (100 Kernen und das zuletzt begonnene Feld noch vollständig) ausgezählt. Die Anzahl der positiven und negativen Tumorzellkerne wurde für jede der fünf Positionen getrennt notiert. Der Labelingindex (kurz: LI) wurde als Quotient aus der Summe der positiven Tumorzellkerne und der Gesamtsumme aller gezählten Tumorzellkerne berechnet.

Die MV3-Primärtumoren zeigten keinen im Sinne von Rand und Zentrum klar geordneten Aufbau. Nekrosezonen können hier dicht unterhalb einer schmalen vitalen Randzone, ausgedehnte vitale Areal können hingegen auch zentral liegen. Die Zählpositionen wurden daher ohne Randregel über das gesamte vitale Tumorgewebe verstreut. Auszählung unter 400x Vergrößerung mittels Gitter und Berechnung des LIs erfolgten wie oben beschrieben.

3.4.2 Lungenmetastasen im MV3-Modell: Labelingindex für MIB-1

Es wurden jeweils alle angeschnittenen Lungenmetastasen aufgesucht und für jede die Tumorzellkerne vollständig mit dem Zählgitter ausgezählt. Die Zahl negativer und positiver Tumorzellkerne und deren Summe wurden für jede Metastase getrennt notiert. Der Labelingindex wurde erstens für die im Schnitt vorhandenen Metastasen einzeln sowie zweitens für den Schnitt zusammenfassend jeweils als Quotient aus der Summe der positiven Tumorzellkerne und der Gesamtsumme der Tumorzellkerne berechnet. Metastasen mit einer Tumorzellkernzahl kleiner als 10 wurden aus der Auswertung ausgeschlossen.

Die „komplette“ Auszählung aller im Lungenschnitt vorhandenen Tumorzellkerne birgt jedoch das Problem, dass aufgrund unterschiedlicher Gesamtzahlen von Tumorzellkernen der zusammenfassende LI für jedes Tier mit einer anderen Genauigkeit bestimmt wird [Abb. 1].



		Gesamtanzahl N an Tumorzellkernen je Schnitt								
Methode	Gruppe	n=	Min	25%ile	Median	75%ile	Max	IQR	Mittel	SD
komplett	Kontrolle	15	36	155	395	1167	3375	1012	694	870,8
	ML-I	13	27	84	243	505	629	421	301	212,6
korrigiert	Kontrolle	13	65	165	234	341	400	176	238	111,3
	ML-I	11	59	89	234	342	399	253	229	123,6

Abb. 1: Gesamtzahl N der ausgezählten/berücksichtigten Tumorzellkerne.

Aufgrund unterschiedlicher Größe und Anzahl der angeschnittenen Metastasen variieren die Gesamtzahlen der je Schnitt komplett ausgezählten Kerne in einem weiten Bereich und haben in den beiden Gruppen eine andere Verteilung, wie anhand der Mediane und Interquartilsabstände (IQR) erkennbar ist. Damit unterscheidet sich innerhalb und zwischen den Gruppen auch die Genauigkeit, mit der der MIB-1-Labelingindex (LI) ermittelt wurde („komplette“ Auswertung). Durch eine nachträgliche Reduktion des Datensatzes per Losverfahren wurden die Gesamtkernzahlen aneinander angepasst. Die LIs werden vergleichbarer („korrigierte“ Auswertung).

In der Kontrollgruppe betrug die Gesamtzahl der in den Lungenschnitten ausgezählten Tumorzellkerne im Median 395, in der Therapiegruppe 243. Der Unterschied der Mediane war jedoch statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney-Test: $p=0,333$). Innerhalb der Gruppen variierten die Gesamtzahlen erheblich zwischen den Fällen (IQR 1012 bzw. 421; Interquartilsabstand).

Die erhobenen Daten wurden daher zusätzlich mit einem abgewandelten Verfahren ausgewertet, das durch einen zufälligen rückwirkenden Ausschluss einzelner Metastasen darauf abzielt, die Unterschiede in der Gesamtzahl an Tumorzellkernen in gewissen Grenzen zu „korrigieren“. Statt einer vordefinierten Zielmarke an

auszählenden Kernen wie bei den Primärtumoren, wurde hier nachträglich ein Zielbereich für die Anzahl einzuschließender Kerne festgelegt. Es wurde abgeschätzt, dass mit einem Zielbereich zwischen 40 und 400 Zellkernen die Gesamtzahlen in Kontroll- und Therapiegruppe bei gleichzeitig kleinerer Streuung aneinander angenähert werden könnten. Der gewählte Zielbereich stellt einen Kompromiss dar. Engere Grenzen führen zum vermehrten Ausschluss von Fällen. Zunächst wurden alle einzelnen Metastasen mit einer Gesamtzahl an Tumorzellkernen jenseits der gewählten Obergrenze von 400 aus der Auswertung gestrichen. In der Kontroll- bzw. der Therapiegruppe lag jetzt in fünf bzw. drei Fällen die Gesamtzahl der Tumorzellkerne aller verbleibenden Metastasen noch oberhalb der oberen Grenze. In diesen Fällen wurden durch ein Losverfahren solange einzelne Metastasen aus der Auswertung entfernt, bis die resultierende Gesamtzahl der noch berücksichtigten Tumorzellkerne kleiner oder gleich 400 war. Lungenschnitte, in denen die Gesamtzahl die gewählte Untergrenze von 40 Tumorzellkernen nicht erreichte, wurden ausgeschlossen. Nach Durchführung der beschriebenen Korrekturmethode lag in der Kontroll- und Therapiegruppe die Anzahl der eingeschlossenen Tumorzellkerne im Median gleichauf bei 234. Der Vergleich durch den Mann-Whitney-Test zeigte dementsprechend keinen signifikanten Unterschied ($p=0,885$). Die Streubreite der Werte innerhalb der Gruppen konnte verringert (IQR 176 bzw. 253) und die Form ihrer Verteilung in beiden Gruppen angeglichen werden [Abb. 1]. In beiden Gruppen mussten jeweils zwei Fälle wegen Verletzung der aufgestellten Grenzbedingungen ausgeschlossen werden. Zur Berechnung des LIs wurden jetzt nur noch die verbliebenen Metastasen herangezogen.

Der Vergleich der Labelingindices zwischen Primärtumoren und Lungenmetastasen wird von einem analogen Problem berührt. Die Gesamtzahl der ausgezählten Kerne in den Primärtumoren betrug im Median in der Kontrollgruppe 520 (IQR 13) und in der Therapiegruppe 522 (IQR 15), in den Lungenmetastasen jedoch 395 (IQR 1012) bzw. 243 (IQR 421). Daher wurden auch hier eine alternative, „korrigierte“ Auswertungen vorgenommen. Für jeden Primärtumor wurde per Zufall zwei der fünf Zählareale aus dem Datensatz ausgewählt. Jetzt lag die Gesamtzahl der noch berücksichtigten Kerne in der Kontroll- und Therapiegruppe im Median bei 208 (IQR 8) bzw. 209 (IQR 6), konnte also gut an den Wert von 234 für die Lungenschnitte angepasst werden.

Zur erneuten Berechnung der LIs wurden jeweils nur noch die beiden ausgelosten Zählpositionen verwendet.

3.4.3. Intensitätsvergleiche der MIB-1-Färbungsvarianten

Jeweils zwei analoge Schnitte desselben Tumors, die sich nur in einer der drei modifizierten Bedingungen [MW/WB, C/B, F/L] unterschieden, wurden miteinander verglichen. Insgesamt ergeben sich so für jeden der fünf Tumore 12 (=3*2*2) paarweise Vergleichsmöglichkeiten. Die Auswertung wurde codiert und in durchmischter Reihenfolge zweimal durchgeführt. Die Intensität der spezifischen Kernfärbung des MIB-1-Antikörpers in den gepaarten Schnitten wurde mit Hilfe der drei Kategorien *kein* (=), *leichter* (< bzw. >) und *starker Unterschied* (<< bzw. >>) verglichen (nach Bertheau et al. 1998). In Fälle von abweichenden Wertungen in beiden Auswertungsdurchgängen wurden durch eine dritte Betrachtung zwischen beiden vorherigen Antworten entschieden: Alle abweichenden Wertungen (15 von 60 Fällen) betrafen die Stärke des Intensitätsunterschiedes (</<< bzw. >/>>), während die Richtung stets konsistent angegeben wurde.

3.5. Statistische Berechnungen

Für die Berechnungen und die graphische Darstellung wurde das Programm GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) verwendet.

Zur Beschreibung der Verteilung des LIs eines Antikörpers innerhalb einer Gruppe wurden jeweils Minimum, 25%ile, Median, 75%ile und Maximum berechnet und als Box-Plot dargestellt. Der Median stellt ein für die gesamte Gruppe repräsentatives Maß dar, das gegenüber Extremwerten robust und auch bei schiefen Verteilungen aussagekräftig ist. Der Interquartilsabstand (IQR=75%ile-25%ile) ist ein Streuungsmaß. Alternativ werden zusätzlich Mittelwerte bzw. Standardabweichungen angegeben.

Zu Vergleichen der Gruppen im Hinblick auf statistisch signifikante Unterschiede wurden der Mann-Whitney-Test (Vergleich zweier Gruppen) und der Kruskal-Wallis-Test (Vergleich von mehr als zwei Gruppen) angewendet. Zum Vergleich verschiedener Parameter innerhalb derselben Gruppe wurde der Wilcoxon-Test für gepaarte Werte eingesetzt.

Alle p-Werte wurden zweiseitig berechnet, Werte kleiner als 0,05 bzw. 0,01 galten als statistisch signifikant bzw. hoch signifikant.

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse im Melanom (MV3)-Xenograftmodell

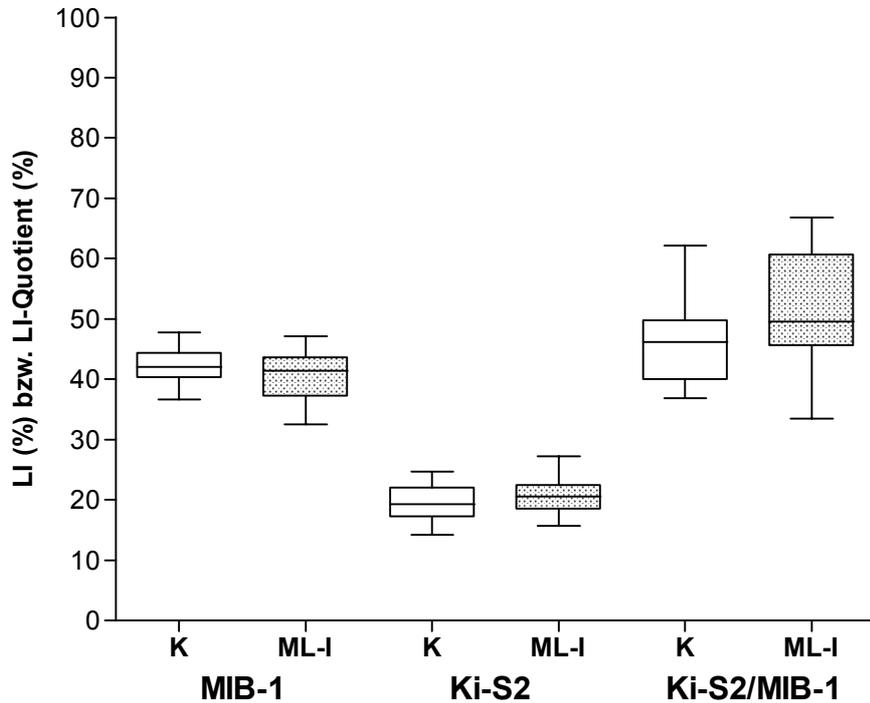
4.1.1. Primärtumoren: Einfluss von ML-I auf die pKi-67- und repp86-Expression

Der Median des MIB-1-LIs der MV3-Primärtumoren lag in der Kontrollgruppe bei 42% (IQR 4) und in der Therapiegruppe (30 ng/kg/d ML-I) bei 41% (IQR 6). Im Mann-Whitney-Test zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied beider Gruppen ($p=0,223$). Kontroll- und Therapiegruppe unterscheiden sich also nicht bezüglich der als Anteil pKi-67-positiver Zellen bestimmten Wachstumsfraktion [Abb. 2, 3].

Die Untersuchung des Ki-S2-LIs ergab für die MV3-Primärtumoren der Kontroll- und Therapiegruppe einen Median von 19% (IQR 5) bzw. 21% (IQR 4). Auch dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney-Test: $p=0,335$). Kontroll- und Therapiegruppe unterscheiden sich demnach nicht im Hinblick auf die relative Größe des mittels der repp86-Expression identifizierten Proliferationspools [Abb. 2, 3].

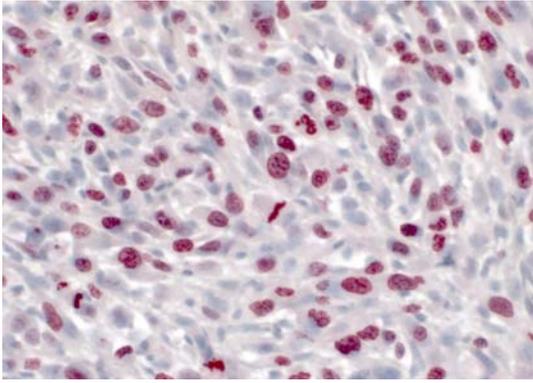
Für jeden Tumor wurde auch der Quotient aus MIB-1-LI und Ki-S2-LI berechnet, um damit indirekt den Anteil der nicht-G1-Zellen am Zellzyklus zu bestimmen [Abb. 2]. Der Median dieses Quotienten betrug für die Kontrolltumoren 46% (IQR 10) und für die Therapietumoren 50% (IQR 15). Dieser geringe Anstieg war statistisch signifikant (Mann-Whitney-Test: $p=0,046$).

MV3-Primärtumoren: Therapie mit ML-I (30 ng/kg/d)

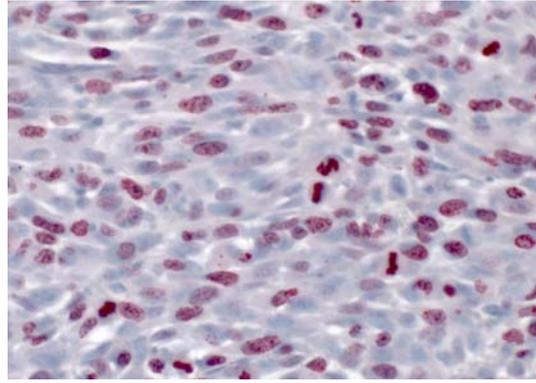


			LI (%) bzw. LI-Quotient (%)							
Antikörper	Gruppe	n=	Min	25%ile	Median	75%ile	Max	IQR	Mittel	SD
MIB-1	Kontrolle	18	36	40	42	44	48	4	42	2,9
	ML-I	18	31	37	41	44	47	6	40	4,3
Ki-S2	Kontrolle	18	14	17	19	22	25	5	20	2,7
	ML-I	18	16	18	21	22	27	4	21	3,0
Ki-S2/MIB-1	Kontrolle	18	37	40	46	50	62	10	46	7,1
	ML-I	18	34	46	50	61	67	15	52	9,4

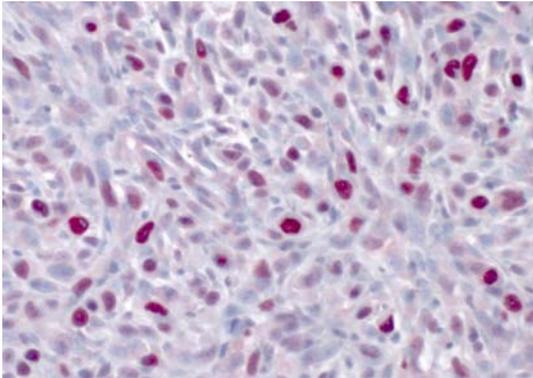
Abb. 2: Untersuchung des Effekts einer Therapie mit 30 ng/kg/d ML-I auf die Expression der proliferationsassoziierten Antigene pKi-67 (MIB-1) und repp86 (Ki-S2) in MV3-Primärtumoren. Durch den Labelingindex (LI) wird jeweils die relative Größe eines bestimmten Proliferationspools ermittelt (G1+S+G2+M [pKi-67] bzw. S+G2+M [repp86]). Im Fall von pKi-67 heißt diese *Wachstumsfraktion*. Der Quotient beider LIs ist ein indirektes Maß für den Anteil der nicht-G1-Zellen am Zellzyklus. Der geringe Unterschied beider Gruppen hinsichtlich dieses Quotienten ist statistisch signifikant (Mediandifferenz 4%, p= Mann-Whitney-Test: p=0,046).



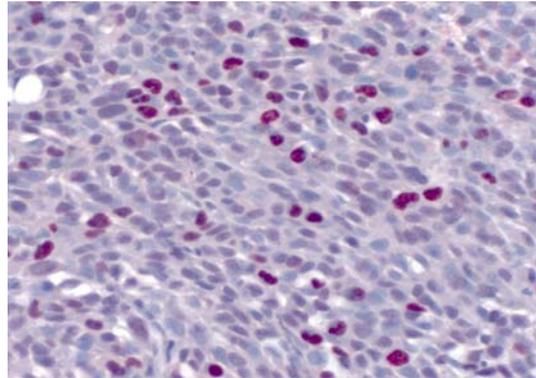
Kontrolle / MIB-1



ML-I / MIB-1



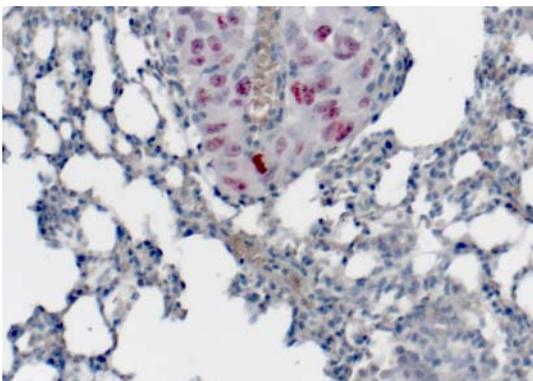
Kontrolle / Ki-S2



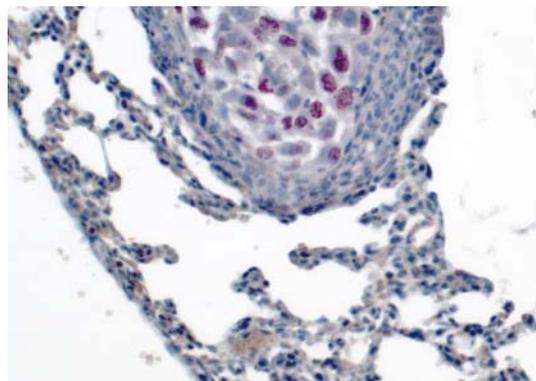
ML-I / Ki-S2

Abb. 3: Immunhistochemische Darstellung der proliferationsassoziierten Antigene pKi-67 (MIB-1) und repp86 (Ki-S2) in jeweils einem MV3-Primärtumor aus der Kontroll- und der Therapie (30 ng/kg/d ML-I)-Gruppe. Die Primärtumoren der Kontroll- und der Therapiegruppe unterscheiden sich im Median weder hinsichtlich des Anteils pKi-67-positiver noch des Anteils repp86-positiver Tumorzellkerne. Allgemein ist der Anteil repp86-positiver Tumorzellkerne kleiner als der pKi-67-positiver. [Rote Zellkerne = spezifische immunreaktive Färbung; Blaue Zellkerne = Hämalaun-Gegenfärbung]

100 µm



Kontrolle / MIB-1



ML-I / MIB-1

Abb. 4: Immunhistochemische Darstellung der proliferationsassoziierten Antigene pKi-67 (MIB-1) und repp86 (Ki-S2) in jeweils einer MV3-Lungenmetastase aus der Kontroll- und der Therapie (30 ng/kg/d ML-I)-Gruppe. Die Metastasen der Kontroll- und der Therapiegruppe unterscheiden sich im Median nicht bezüglich des Anteils pKi-67-positiver Tumorzellkerne. [Rote Zellkerne = spezifische immunreaktive Färbung; Blaue Zellkerne = Hämalaun-Gegenfärbung]

100 µm

4.1.2. Die pKi-67-Expression in einzelnen Lungemetastasen

Für jede gefundene Metastase wurde der MIB-1-LI getrennt berechnet und in einem Diagramm gegen die jeweilige Gesamtzahl der in dieser Metastase komplett ausgezählten Tumorzellkerne aufgetragen [Abb. 4, 5]. Im Bereich kleiner Gesamtzahlen streuen die Werte des LI erheblich (9 bis 97% in der Kontroll- und 11 bis 78% in der Therapiegruppe). Mit zunehmender Gesamtzahl der angeschnittenen und ausgewerteten Tumorzellkerne nimmt die Streuung der MIB-1-Werte systematisch ab. Dabei scheinen die Punkte für die Kontroll- und die Therapiegruppe jeweils in Form eines symmetrischen Trichters verteilt zu liegen. Die Punktwolken beider Gruppen überlappend sich vollständig.

Nicht zu erkennen ist eine positive oder negative Korrelation zwischen der Gesamtzahl der Tumorzellkerne im Metastasenanschnitt und dem MIB-1-LI, die als systematischer positiver oder negativer Zusammenhang zwischen Metastasengröße und Wachstumsfraktion interpretierbar wäre.

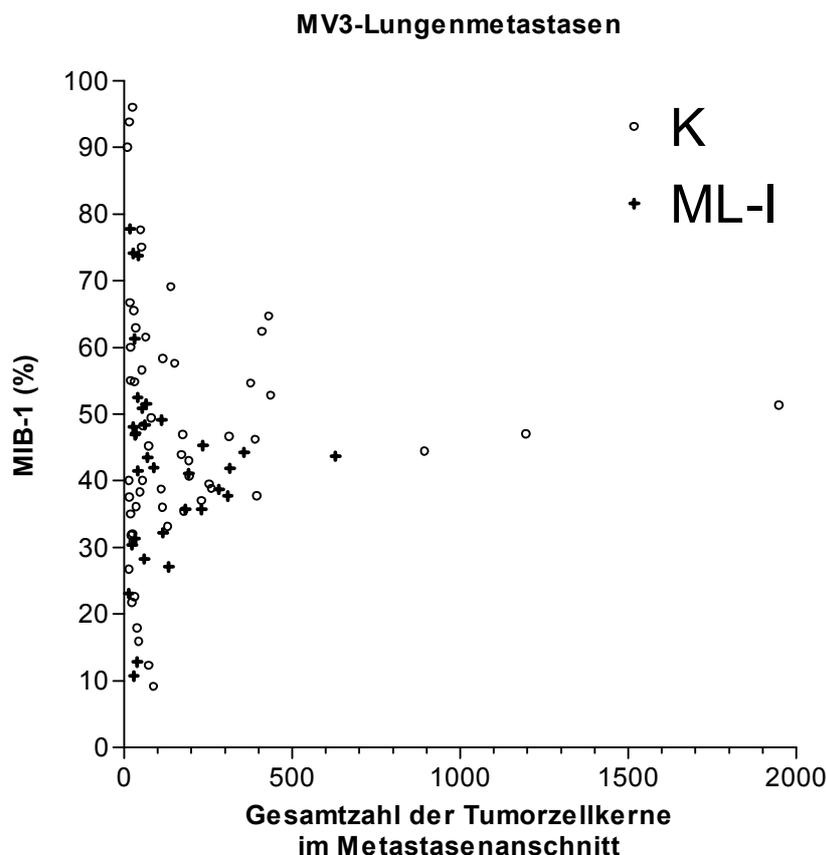


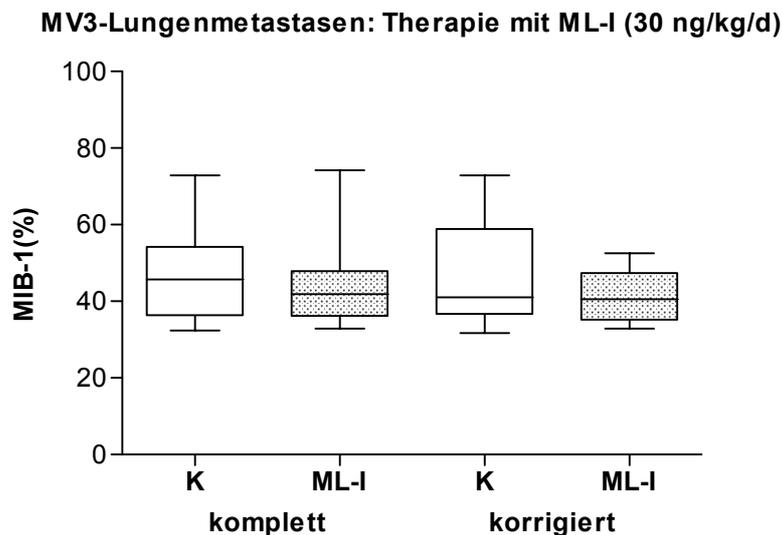
Abb. 5: Individuelle pKi-67-Expression (MIB-1) der MV3-Lungenmetastasen. Einzelne Metastasen werden hier als individuelle Punkte und unabhängig ihrer Zugehörigkeit zum jeweiligen Fall (Versuchstier) für die Gruppen vereinigt dargestellt. Der jeweilige MIB-1-Labelingindex (LI) als Maß für die *Wachstumsfraktion* wird gegen die Gesamtanzahl der Tumorzellkerne im Metastasenanschnitt als Ersatzmaß der Metastasengröße aufgetragen.

4.1.3. Lungenmetastasen: Einfluss von ML-I auf die pKi-67-Expression

In der „kompletten“ Auswertung der MV-3-Lungenmetastasen wurde für die Kontroll- und Therapiegruppe ein Median des MIB-1-LIs von 46% (IQR 18) bzw. 42% (IQR 12) ermittelt. Der Mann-Whitney-Test zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied beider Gruppen ($p=0,612$).

In der „korrigierten“ Auswertung lag der Median des MIB-1-LIs in der Kontroll- und Therapiegruppe gleich bei 41% (IQR 22 bzw. 12) und ohne statistisch signifikanten Unterschied der Gruppen im Mann-Whitney-Test ($p=0,524$).

Beide Methoden führten mit vergleichbaren p-Werten zu derselben Aussage: Es konnte kein Unterschied der Wachstumsfraktion zwischen den MV3-Lungenmetastasen der Kontroll- und Therapiegruppe gefunden werden [Abb. 4, 6].



			MIB-1-LI (%)							
Methode	Gruppe	n=	Min	25%ile	Median	75%ile	Max	IQR	Mittel	SD
komplett	Kontrolle	15	32	36	46	54	73	18	46	11,5
	ML-I	13	33	36	42	48	74	12	44	10,9
korrigiert	Kontrolle	13	32	37	41	59	73	22	46	12,9
	ML-I	11	33	35	41	47	53	12	41	6,8

Abb. 6: Untersuchung des Effekts einer Therapie mit 30 ng/kg/d ML-I auf die Expression des proliferationsassoziierten Antigens pKi-67 (MIB-1) in MV3-Lungenmetastasen. Der MIB-1-Labelingindex (LI) misst die *Wachstumsfraktion*. Ergebnisse der „kompletten“ und der bezüglich der problematischen Tumorzellkerngesamtzahlen „korrigierten“ Auswertung.

4.1.4. Primärtumoren und Lungenmetastasen: Vergleich der pKi-67-Expression

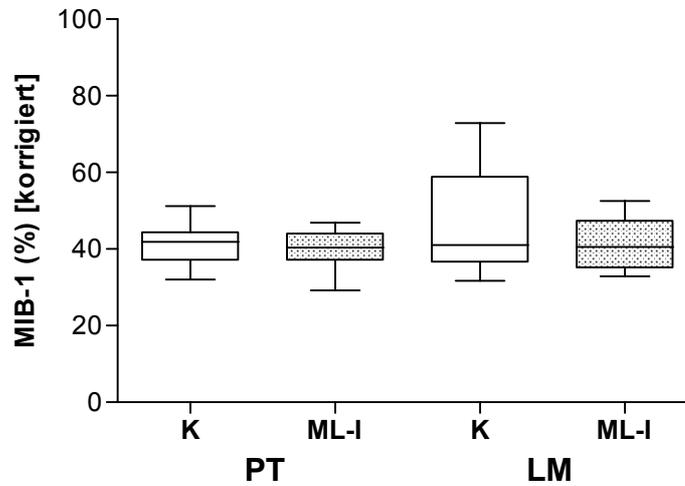
Die MIB-1-LIs der Primärtumoren und der Lungenmetastasen wurde miteinander verglichen [Abb. 7]. Auch hier wurden dazu beide Auswertungsverfahren einander gegenübergestellt.

In der jeweiligen „kompletten“ Auswertung betrug der Median des LIs in der Kontrollgruppe 42% (IQR 4) für die Primärtumoren und 46% (IQR 18) für die Lungenmetastasen, in der Therapiegruppe 41 % (IQR 6) bzw. 42% (IQR 12). Im Wilcoxon-Test zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Primärtumoren und den Lungenmetastasen in der Kontrollgruppe ($p= 0,525$) und der Therapiegruppe ($p= 0,414$).

Auf der Grundlage der „korrigierten“ Auswertungen betrug der Median des LIs in der Kontrollgruppe 42% (IQR 7) für die Primärtumoren und 41% (IQR 22) für die Lungenmetastasen, in der Therapiegruppe 40% (IQR 7) bzw. 41% (IQR 12). Im Wilcoxon-Test zeigte sich innerhalb der Kontroll- ($p=0,497$) und Therapiegruppe ($p=0,320$) kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Primärtumoren und den Lungenmetastasen.

Damit unterscheiden sich die MV3-Primärtumoren und -Lungenmetastasen weder innerhalb der Kontrollgruppe, noch innerhalb der ML-I-Therapiegruppe bezüglich ihrer Wachstumsfraktion. Das Ergebnis war unabhängig von der Auswertungsmethode.

MV3-Primärtumoren und -Lungenmetastasen



			MIB-1-LI (%) „korrigierte“ Daten							
Gruppe	Lokalisation	n=	Min	25%ile	Median	75%ile	Max	IQR	Mittel	SD
Kontrolle	PT	18	32	37	42	44	51	7	41	4,7
	LM	13	32	37	41	59	73	22	46	12,9
ML-I	PT	18	29	37	40	44	47	7	40	4,9
	LM	11	33	35	41	47	53	12	41	6,8

Abb. 7: Vergleich der Expression des proliferationsassoziierten Antigens pKi-67 (MIB-1) zwischen Primärtumoren und Lungenmetastasen im MV3-Xenograftmodell. Der MIB-1-Labelingindex (LI) misst die Wachstumsfraktion (hier nur für die „korrigierte“ Auswertung dargestellt).

4.2. Ergebnisse im Ösophaguskarzinom (PT1590)-Xenograftmodell

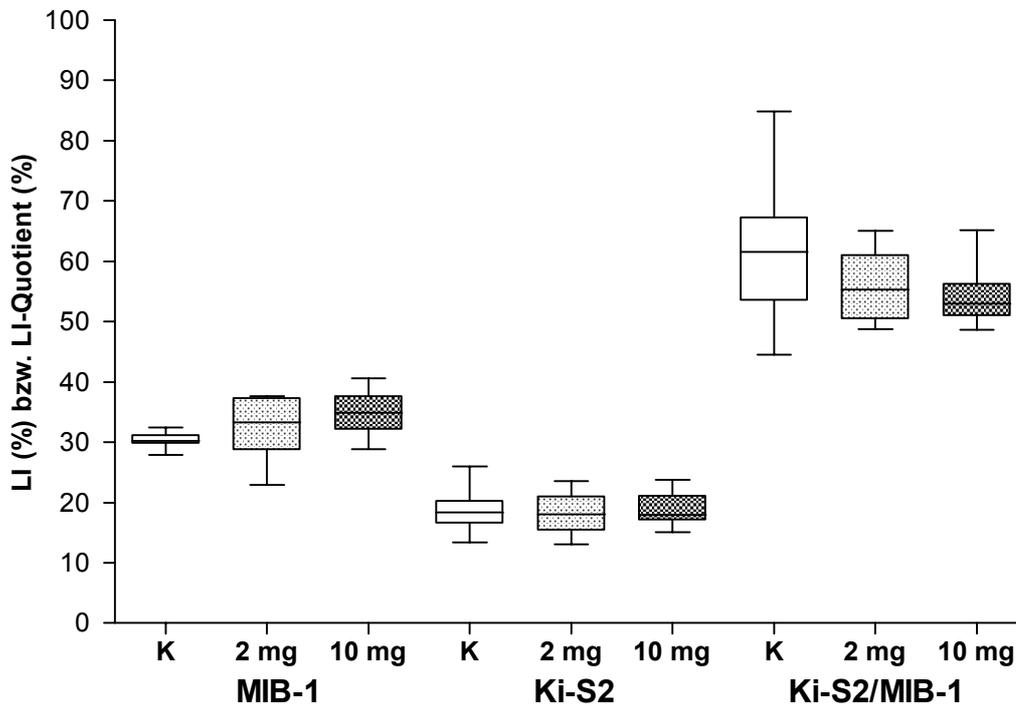
4.2.1. Primärtumoren: Einfluss von Trastuzumab (Herceptin®) auf die pKi-67- und repp86-Expression

Die pKi-67-Expression in den PT1590-Primärtumoren der Kontrollgruppe und der beiden Therapiegruppen (2 und 10 mg/kg/Woche Trastuzumab) wurde durch den MIB-1-LI bestimmt, der im Median 30% (IQR 1), 33% (IQR 9) bzw. 35% (IQR 6) betrug. Der Vergleich durch den Kruskal-Wallis-Test zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied der drei Gruppen ($p=0,034$). Beim paarweisen Vergleich der Gruppen durch den Mann-Whitney-Test war der Unterschied zwischen der Kontroll- und der 10 mg/kg/Woche Trastuzumab-Gruppe statistisch hoch signifikant ($p=0,008$). Die Kontroll- und die 2 mg/kg/Woche-Gruppe ($p=0,101$), sowie die beiden Therapiegruppen untereinander ($p=0,400$) zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied. Relativ war die Wachstumsfraktion also unter 10 mg/kg/Woche Trastuzumab um etwa 16% größer als unter Kontrollbedingungen [Abb. 8, 9].

Der Median des Ki-S2-LIs lag in allen drei Gruppen (Kontrolle, 2 und 10 mg/kg/Woche Trastuzumab) gleich bei 18% (IQR 4, 6, bzw. 4). Entsprechend lieferte der Vergleich der drei Gruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test einen p-Wert oberhalb der Signifikanzgrenze ($p=0,882$). Kontroll- und Therapiegruppen unterscheiden sich folglich nicht im Hinblick auf die relative Größe des mittels der repp86-Expression identifizierten Proliferationspools [Abb. 8, 9].

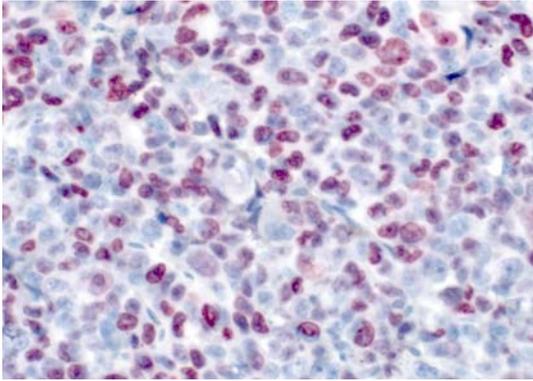
Für jeden Tumor wurde auch der Quotient aus MIB-1-LI und Ki-S2-LI berechnet, um damit indirekt den Anteil der nicht-G1-Zellen am Zellzyklus zu bestimmen [Abb. 8]. Der Median dieses Quotienten betrug für die Tumoren der Kontrollgruppe 62% (IQR 13) und für die Tumoren der Therapiegruppen (2 und 10 mg/kg/Woche Trastuzumab) 55% (IQR 11) und 53 (IQR 53). Der Abfall war statistisch nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test: $p=0,882$).

PT1590-Primärtumoren: Therapie mit Trastuzumab (Herceptin®)

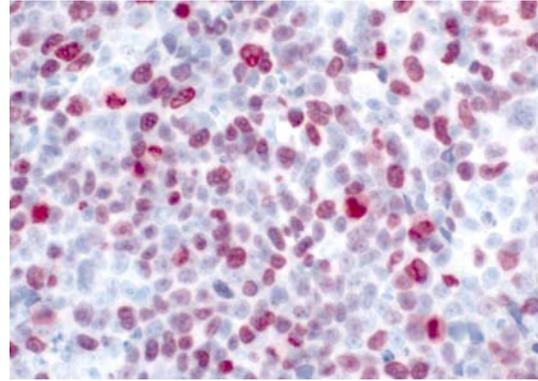


			LI (%) bzw. LI-Quotient (%)							
Antikörper	Gruppe	n=	Min	25%ile	Median	75%ile	Max	IQR	Mittel	SD
MIB-1	Kontrolle	8	28	30	30	31	32	1	30	1,3
	2mg/kg	10	23	29	33	37	38	9	32	4,8
	10mg/kg	9	29	32	35	38	41	6	35	3,6
Ki-S2	Kontrolle	8	13	17	18	20	26	4	19	3,7
	2mg/kg	10	13	15	18	21	24	6	18	3,2
	10mg/kg	9	15	17	18	21	24	4	19	2,8
MIB-1/Ki-S2	Kontrolle	8	45	54	62	67	85	13	62	12,3
	2mg/kg	10	49	50	55	61	65	11	58	5,5
	10mg/kg	9	49	51	53	56	65	6	54	4,9

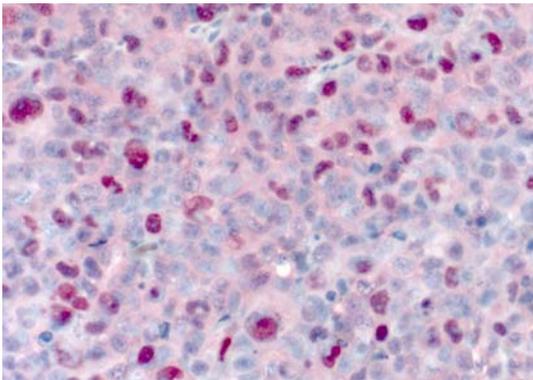
Abb. 8: Untersuchung des Effekts einer Therapie mit 2 bzw. 10 mg/kg/Woche Trastuzumab (Herceptin®) auf die Expression der proliferationsassoziierten Antigene pKi-67 (MIB-1) und repp86 (Ki-S2) in PT1590-Primärtumoren. Durch den Labelingindex (LI) wird jeweils die relative Größe eines bestimmten Proliferationspools ermittelt (G1+S+G2+M [pKi-67] bzw. S+G2+M [repp86]). Im Fall von pKi-67 heißt diese *Wachstumsfraktion*. Der geringe Unterschied der Gruppen hinsichtlich des Anteils pKi-67-positiver Zellen ist statistisch signifikant (Kruskal-Wallis-Test: $p=0,034$). Der Quotient beider LIs, ein indirektes Maß für den Anteil der nicht-G1-Zellen am Zellzyklus, unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gruppen.



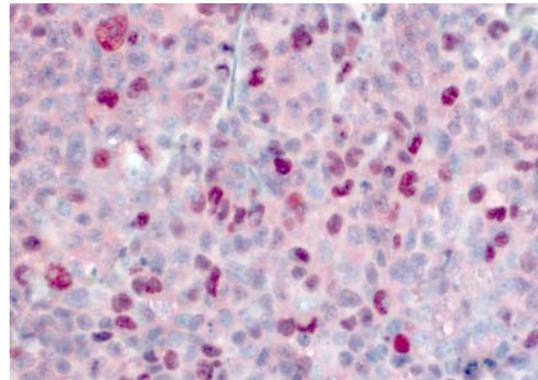
Kontrolle / MIB-1



Trastuzumab / MIB-1



Kontrolle / Ki-S2



Trastuzumab / Ki-S2

Abb. 9: Immunhistochemische Darstellung der proliferationsassoziierten Antigene pKi-67 (MIB-1) und repp86 (Ki-S2) in jeweils einem PT1590-Primärtumor aus der Kontroll- bzw. einer Therapie (10 mg/kg/Woche Trastuzumab)-Gruppe. Die Primärtumoren der 10 mg/kg/Woche-Gruppe haben gegenüber der Kontrollgruppe einen geringfügig höheren Anteil pKi-67-positiver Tumorzellkerne (Mediandifferenz 5%, Mann-Whitney-Test: $p=0,008$). Hinsichtlich des Anteils repp86-positiver Tumorzellkerne besteht kein Unterschied zwischen den Gruppen. Allgemein ist der Anteil repp86-positiver Tumorzellkerne kleiner als der pKi-67-positiver. In der Ki-S2-Färbung der PT1590-Tumoren fällt eine deutliche zytoplasmatische Hintergrundfärbung auf. [Rote Zellkerne = spezifische immunreaktive Färbung; Blaue Zellkerne = Hämalaun-Gegenfärbung]

100 μ m

4.3. Einfluss des Antigen-Retrievals auf die pKi-67-Immunreaktivität mit dem Antikörper MIB-1 in gelagerten Paraffinschnitten

In einer Testfärbung an fünf MV3-Primärtumoren wurde erstens der Einfluss der Lagerung von Paraffinschnitten über ein Jahr bei Raumtemperatur im Vergleich zur Verwendung von frisch angefertigten Schnitten sowie zweitens der Einfluss der Variation mehrerer Parameter der Vorbehandlungsprozedur (Antigen-Retrieval, AR) auf die pKi-67-Immunreaktivität (MIB-1-Antikörper) untersucht [Abb. 11]. Als Kriterien dienten die Intensität der Färbung und die eigentliche Zielgröße, der MIB-1-Labelingindex.

Durch paarweisen Vergleich der spezifischen Färbungsintensität zwischen jeweils zwei Schnitten desselben Tumors, die sich nur in einer der modifizierten Bedingungen *Material* (frisch [F] vs. gelagert [L]), *Hitzezufuhr* (Mikrowelle [MW] 500 W über 5x 2 min ab Siedebeginn vs. Wasserbad [WB] bei 85°C über 16h) und *AR-Puffer* (Citratpuffer [C] vs. Borsäure [B]) unterschieden, wurde versucht, deren Wirkung zu isolieren [Tab. 5].

Die Verwendung gelagerter Schnitte im Vergleich zu frischen führte in Verbindung mit den Varianten MW-C, WB-C und MW-B konsistent zu einer verminderten Färbungsintensität. Dabei war der lagerungsbedingte Intensitätsabfall nach der Vorbehandlung in Citratpuffer bei 100°C in der Mikrowelle besonders stark ausgeprägt und das Intensitätsniveau bei den gelagerten Schnitten hier schwach. Mit der Variante WB-B war die Färbungsintensität von frische und gelagerte Schnitte vergleichbar.

Die Wasserbadmethode führte im Vergleich zur Mikrowellenmethode mit beiden Puffern konsistent zu stärkeren Färbeergebnissen. Bei der Behandlung von frischen Schnitten in Citratpuffer war der Einfluss der Erhitzungsmethode tendenziell am geringsten ausgeprägt.

Die Färbungsintensitäten waren nach einer Vorbehandlung mit Borsäure statt Citratpuffer konsistent kräftiger. Die Variante WB-B erzeugte eine starke Überfärbung der Schnitte. Die mit Borsäure behandelten Schnitte neigten zu einer stärkeren zytoplasmatischen Hintergrundfärbung.

In keiner der Vorbehandlungsvarianten kam es zu einer Ablösung von Paraffinschnitten vom Objektträger.

Mit der Variante WB-C konnte in den gelagerten Schnitten eine qualitativ sehr gute, kräftige und detailreiche MIB-1-Färbung erzielt werden, die mit den frischen Schnitten identisch war.

Bedingungen		Paarweise Intensitätsvergleiche der MIB-1 Färbung (n=5)				
fix	verglichen	>>	>	=	<	<<
MW-C	F vs. L <i>Material</i>	5/5				
WB-C		2/5	3/5			
MW-B		3/5	2/5			
WB-B				5/5		
C-F	MW vs. WB <i>Hitzezufuhr</i>				4/5	1/5
C-L					2/5	3/5
B-F						5/5
B-L						5/5
MW-F	C vs. B <i>AR-Puffer</i>				2/5	3/5
WB-F						5/5
MW-A					2/5	3/5
WB-A						5/5

Tab. 5: Antigen-Retrieval-Test für pKi-67 (MIB-1) an frischen und gelagerten Paraffinschnitten von MV3-Primärtumoren (n=5). Paarweiser Intensitätsvergleich der spezifischen Färbung zwischen Schnitten jeweils desselben Tumors. Kategorien: kein (=), geringer (> bzw. <) oder starker Unterschied (>> bzw. <<). Bsp.: Nach einer Vorbehandlung mit Citratpuffer im Wasserbad (WB-C) war die Intensität der spezifischen Färbung für 3 von 5 Fällen in frischen Paraffinschnitten gering stärker als in gelagerten (F>L). [MW= Mikrowelle 1000 W bis Siedebeginn, dann 500 W über 5x2 min; WB= Wasserbad bei 85°C über 16 h; C= 10 mM Citratpuffer (pH 6.0); B= 0,2 M Borsäure (pH 7.2); F= frische Paraffinschnitte; L= Paraffinschnitte mit einer Lagerungsdauer von 1 Jahr bei Raumtemperatur]

Antigen-Retrieval-Test für pKi-67 an frischen und gelagerten Paraffinschnitten

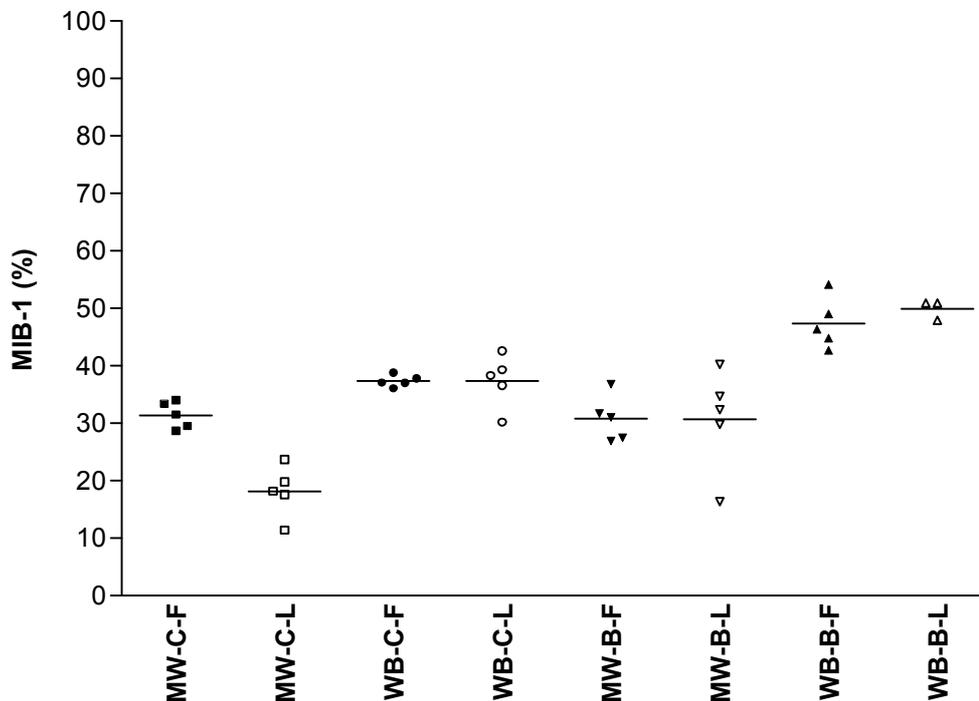
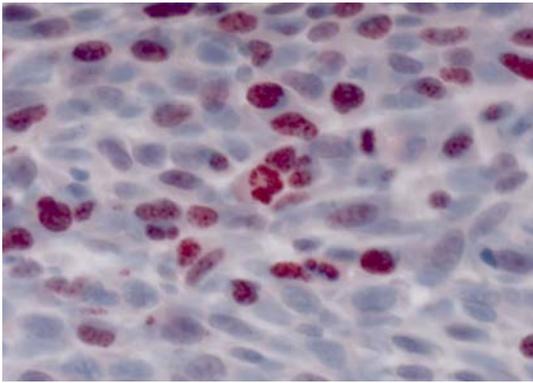
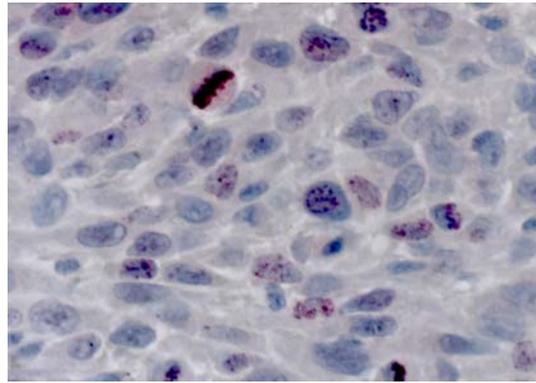


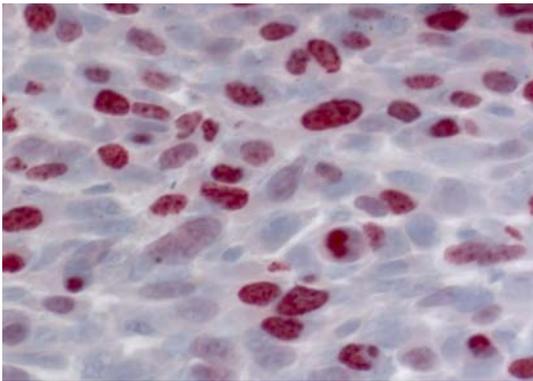
Abb. 10: Antigen-Retrieval-Test für pKi-67 (MIB-1) an frischen und gelagerten Paraffinschnitten von MV3-Primärtumoren (n=5). Auswirkungen von Lagerung und Vorbehandlungsmethoden auf den MIB-1-Labelingindex. [MW= Mikrowelle 1000 W bis Siedebeginn, dann 500 W über 5x 2 min; WB= Wasserbad bei 85°C über 16 h; C= 10 mM Citratpuffer (pH 6.0); B= 0,2 M Borsäure (pH 7.2); F= frische Paraffinschnitte; L= Paraffinschnitte mit einer Lagerungsdauer von 1 Jahr bei Raumtemperatur]



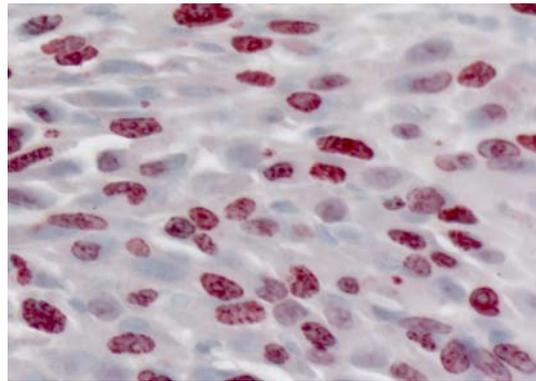
MW-C-F



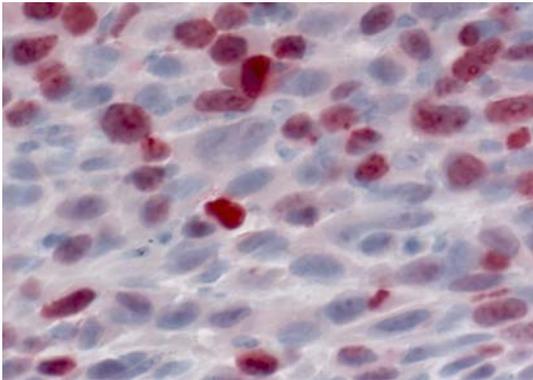
MW-C-L



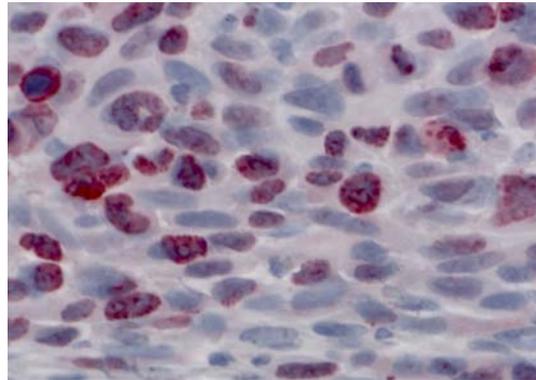
WB-C-F



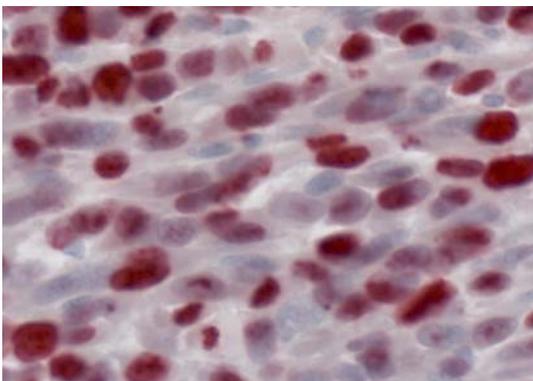
WB-C-L



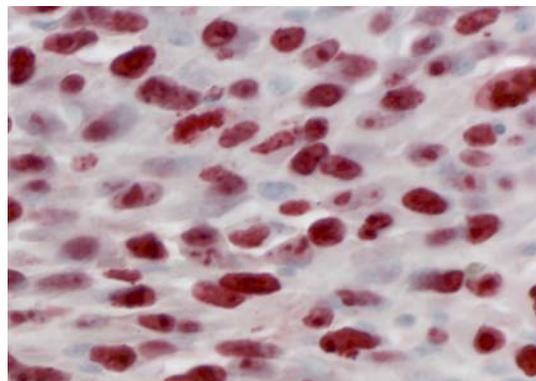
MW-B-F



MW-B-L



WB-B-F



WB-B-L

50 µm | **Abb. 11: Antigen-Retrieval-Test für pKi-67 (MIB-1) in einem MV3-Primärtumor.**
 Die Lagerung von Paraffinschnitten vor MIB-1-Immunhistochemie mit einer Standardvorbehandlung (MW-C) führt zu einem starken Verlust an Immunreaktivität, welcher jedoch durch eine optimierte Vorbehandlung (WB-C) kompensierbar ist. [MW= Mikrowelle; WB= Wasserbad; C= Standard-citratpuffer; B= Borsäure; F= frische Paraffinschnitte; L= 1 Jahr gelagerte Paraffinschnitte]

Aufgrund der geringen Fallzahl werden die für die Testschnitte bestimmten MIB-1-Labelingindices rein deskriptiv behandelt [Abb. 10]. Auf die Berechnung von p-Werten wurde verzichtet. Zwei Schnitte, beide WB-B-L, konnten wegen einer unzureichenden Gegenfärbung nicht ausgezählt werden.

In Verbindung mit der Mikrowellenbehandlung in Citratpuffer war der Labelingindex für MIB-1 in den gelagerten Paraffinschnitten deutlich niedriger als in den frischen (absolut um ca. 13%). Es ergibt sich hier eine abgeschätzte relative Reduktion des LIs nach einjähriger Lagerung der Schnitte bei Raumtemperatur auf etwa das 0,6 fache des Wertes für frische Schnitte. Nach einer Vorbehandlung in Citratpuffer mit dem Wasserbad, oder in Borsäure mit beiden Erhitzungsalternativen zeigte sich kein lagerungsbedingter Abfall des LIs.

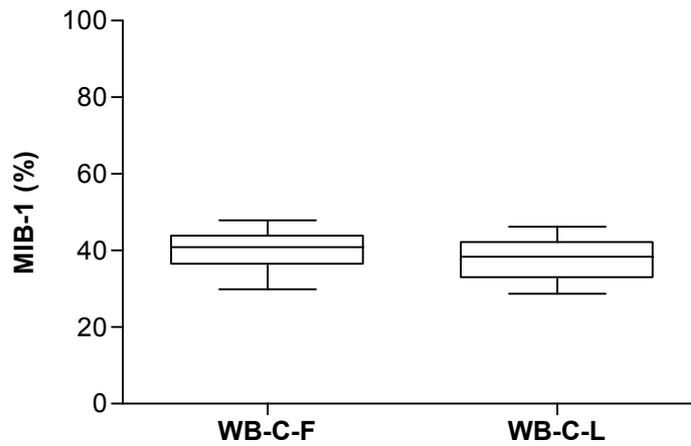
Die Wasserbadmethode führte gegenüber der Mikrowellenmethode zu höheren LIs. Dabei waren bei Verwendung von Citratpuffer die Werte in den frischen Schnitte nur wenig (ca. 6%), in den gelagerten Schnitte jedoch deutlich (ca. 19%) größer. Letzteres entspricht hier in etwa einer Verdoppelung des LIs von der Mikrowellen- zur Wasserbadmethode. In den mit Borsäure behandelten Schnitten wurde ein relativer Anstieg des LIs um etwa die Hälfte beobachtet.

Mit der Mikrowellenbehandlung frischer Schnitte in Citratpuffer und Borsäure wurden vergleichbaren LIs erzielt. Mit der Wasserbadmethode lagen die Werte bei Verwendung von Borsäure an Stelle von Citratpuffer höher.

Zur Überprüfung Variante WB-C mit einer größeren Fallzahl wurden für 11 Primärtumoren der Kontrollgruppe des MV3-Xenograftversuchs MIB-1-Färbungen von frischen und ein Jahr gelagerten Paraffinschnitten in einer simultanen Auszählung verglichen. Der Median des LIs betrug für die frischen Schnitte 41% (IQR 8%), für die gelagerten Schnitte 38% (IQR 9%) [Abb. 12]. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant (Wilcoxon Test: $p=0,240$). Demnach kommt es mit der Vorbehandlungsmethode WB-C im Hinblick auf die relevante Zielgröße zu keiner Reduktion der pKi-67-Immunreaktivität im gelagerten Material.

In einem kleinen Zusatztest wurden Mikrowellen- und Wasserbadvorbehandlung mit Citratpuffer auch für den anti-pKi-67-Antikörper Ki-S11 verglichen ($n=2$): Während bei Mikrowellenvorbehandlung ein starker Intensitätsverlust der Ki-S11-Färbung in gelagerten Schnitten beobachtet wurde, konnte die Intensität mit Wasserbadvorbehandlung deutliche angehoben werden. Ki-S11 zeigte damit ein ähnliches Verhalten wie MIB-1.

**low temperature antigen retrieval mit Citratpuffer für pKi-67:
frische und gelagerte Paraffinschnitte**



			MIB-1-LI (%)							
Material	Gruppe	n=	Min	25%ile	Median	75%ile	Max	IQR	Mittel	SD
frisch	Kontrolle	11	30	36	41	44	48	8	40	5,2
gelagert	Kontrolle	11	29	33	38	42	46	9	38	5,6

Abb. 12: pKi-67-Immunreaktivität als MIB-1-Labelingindex (LI) nach Antigen-Retrieval bei 85°C über 16 h im Wasserbad mit 10mM Citratpuffer (pH 6,0) in MV3-Primärtumoren (n=11).
[WB= Wasserbad; C= Standardcitratpuffer; F= frische Paraffinschnitte; L= Paraffinschnitte mit einer Lagerungsdauer von 1 Jahr bei Raumtemperatur]

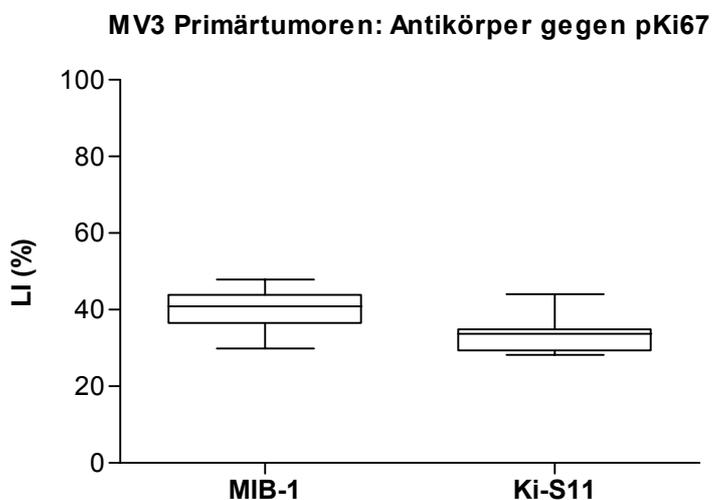
4.4. Vergleich der anti-pKi-67-Antikörper MIB-1 und Ki-S11

4.4.1. HT29

Der LI für die beiden anti-pKi-67-Antikörper MIB-1 und Ki-S11 wurde an HT29-Xenograftumoren verglichen [Abb. 16, 18]. Die Werte für Ki-S11 lagen mit einem Median des LI von 17% (IQR 5) deutlich unter denen für MIB-1 mit 40% (IQR 11). Dieser Unterschied war statistisch hoch signifikant (Wilcoxon-Test: $p < 0,001$). Die Differenz der Mediane betrug 23%.

4.4.2. MV3

Für 11 MV3-Primärtumoren wurde der LI von zwei verschiedenen anti-pKi-67-Antikörper, MIB-1 und Ki-S11, verglichen [Abb. 13, 19]. Der Median des LIs für MIB-1 war mit 41% (IQR 8) etwas größer als der für Ki-S11 mit 34% (IQR 6). Der Unterschied der Mediane von 7% war statistisch hoch signifikant (Wilcoxon-Test: $p = 0,002$).

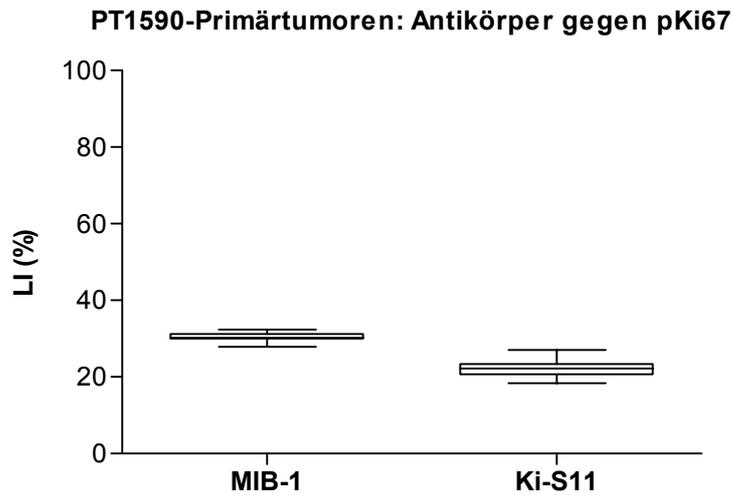


			LI (%)							
Antikörper	Gruppe	n=	Min	25%ile	Median	75%ile	Max	IQR	Mittel	SD
MIB-1	Kontrolle	11	30	36	41	44	48	8	40	5,2
Ki-S11	Kontrolle	11	28	29	34	35	44	6	33	4,8

Abb. 13: Untersuchung der pKi-67-Expression in MV3-Primärtumoren mit zwei verschiedenen Antikörpern, MIB-1 und Ki-S11. Der Antikörper Ki-S11 liefert hier eine niedrigere Bestimmung des Anteils pKi-67-positiver Tumorzellkerne (Labelingindex) als der Antikörper MIB-1, der Unterschied ist statistisch hochsignifikant (Mediandifferenz 7%, Wilcoxon-Test: $p = 0,002$).

4.4.3. PT1590

Für die PT1590-Primärtumoren der Kontrollgruppe wurde der LI für MIB-1 und Ki-S11 miteinander verglichen [Abb. 14, 15]. Für Ki-S11 war der Median des LI mit 22% (IQR 3) kleiner als für MIB-1 mit 30% (IQR 1). Der Unterschied mit einer Differenz von 8% war statistisch hoch signifikant (Wilcoxon Test: $p=0,008$).



		LI (%)								
Antikörper	Gruppe	n=	Min	25%ile	Median	75%ile	Max	IQR	Mittel	SD
MIB-1	Kontrolle	8	28	30	30	31	32	1	30	1,3
Ki-S11	Kontrolle	8	18	21	22	23	27	3	22	2,6

Abb. 14: Untersuchung der pKi-67-Expression in PT1590-Primärtumoren mit zwei verschiedenen Antikörpern, MIB-1 und Ki-S11. Der Antikörper Ki-S11 liefert hier eine niedrigere Bestimmung des Anteils pKi-67-positiver Tumorzellkerne (Labelingindex) als der Antikörper MIB-1, der Unterschied ist statisch hochsignifikant (Mediandifferenz 8%, Wilcoxon-Test: $p=0,008$).

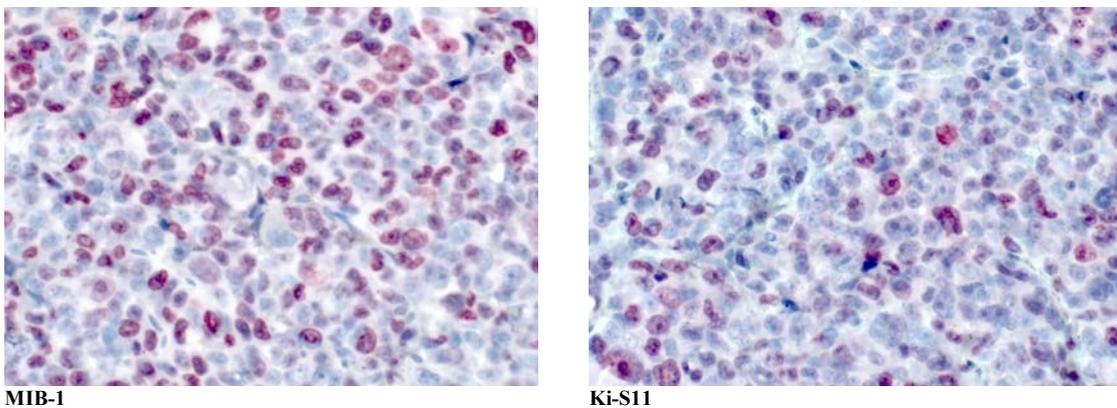


Abb. 15: Immunhistochemische Darstellung von pKi-67 in einem PT1590-Primärtumor der Kontrollgruppe mit zwei verschiedenen Antikörpern, MIB-1 und Ki-S11. Der Antikörper Ki-S11 färbt weniger Zellkerne an als der Antikörper MIB-1. [Rote Zellkerne = spezifische immunreaktive Färbung; Blaue Zellkerne = Hämalaun-Gegenfärbung]

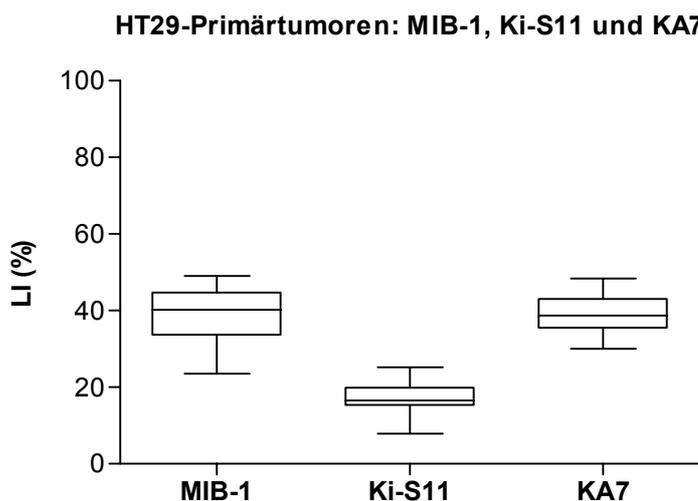
50 µm

4.5. Vergleich der Antikörper MIB-1 und KA7

4.5.1. HT29

Mit einem Median von 40% (IQR 11) bzw. 39% (IQR 11) unterschieden sich die LIs für KA7 und MIB-1 nicht signifikant in den untersuchten HT29-Xenografttumoren (Wilcoxon-Test: $p=0,526$) [Abb. 16, 18].

Die HT29-Kontrolltumoren der beiden unter gleichen Bedingungen durchgeführten Xenograft-Tierversuche glichen sich untereinander hinsichtlich der LIs für die hier getesteten Antikörper MIB-1, Ki-S11 und KA7 (Mann-Whitney-Test). Die mittleren Tumorgewichte der Kontrollgruppen beider Versuchsreihen waren identisch. Hier und im Abschnitt 4.4.1. werden die Ergebnisse für eine vereinigte Gruppe gezeigt.



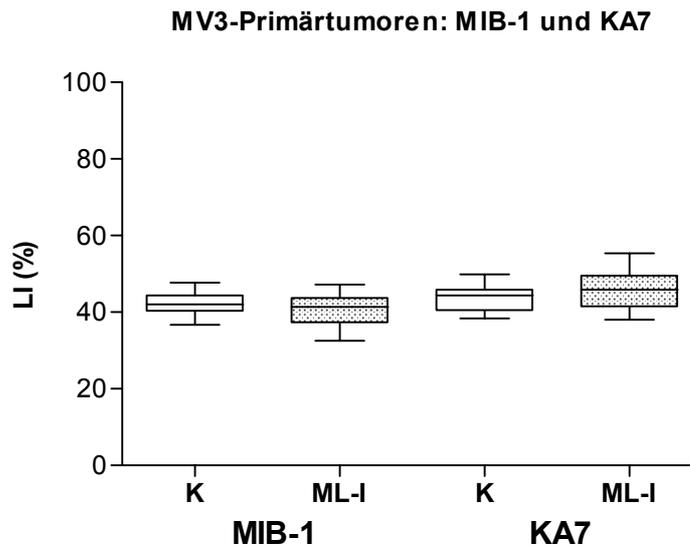
			LI (%)							
Antikörper	Gruppe	n=	Min	25%ile	Median	75%ile	Max	IQR	Mittel	SD
MIB-1	Kontrolle	17	24	34	40	45	49	11	39	6,6
Ki-S11	Kontrolle	16	8	15	17	20	25	5	17	4,3
KA7	Kontrolle	17	30	35	39	43	48	8	39	4,8

Abb. 16: Untersuchung der p-Ki-67-Expression von HT29-Primärtumoren mit zwei verschiedenen Antikörpern, MIB-1 und Ki-S11, und Vergleich mit der Expression des „KA7-Antigens“. Der Antikörper Ki-S11 liefert hier eine niedrigere Bestimmung des Anteils pKi-67-positiver Tumorzellkerne (Labelingindex) als MIB-1, der Unterschied ist statisch hochsignifikant (Mediandifferenz 23%, Wilcoxon-Test: $p<0,001$). Die Antikörper KA7 und MIB-1 markieren einen gleichgroßen Anteil an Tumorzellkernen (Labelingindex).

4.5.2. MV3

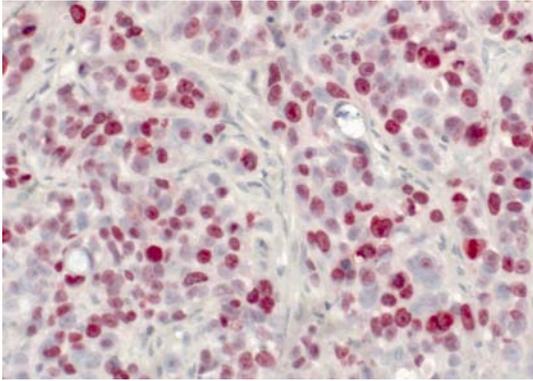
Die MV3-Primärtumoren hatten im Median einen KA7-LI von 44% (IQR 6) in der Kontroll- und von 46% (IQR 8) in der Therapiegruppe (30 ng/kg/d ML-I) [Abb. 17]. Im Vergleich durch den Mann-Whitney-Test ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied beider Gruppen ($p=0,137$). Damit führt der Vergleich der Wachstumsfraktion zwischen der Kontroll- und Therapiegruppe mit Hilfe Antikörper KA7 und MIB-1 (siehe 4.1.1.) zu demselben Ergebnis.

Die LIs für MIB-1 und KA7 unterschieden sich innerhalb der Kontrollgruppe mit Medianen von 42% bzw. 44% nicht signifikant (Wilcoxon-Test: $p=0,293$) [Abb. 17, 19]. Im Gegensatz dazu war innerhalb der Therapiegruppe der Unterschied mit Medianen von 41% bzw. 46% statistisch hoch signifikant (Wilcoxon-Test: $p<0,001$), die Differenz betrug jedoch nur 5% [Abb. 17].

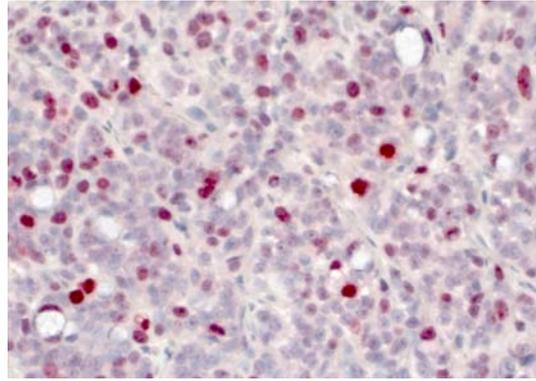


		LI (%)								
Antikörper	Gruppe	n=	Min	25%ile	Median	75%ile	Max	IQR	Mittel	SD
MIB-1	Kontrolle	18	36	40	42	44	48	4	42	2,9
	ML-I	18	31	37	41	44	47	6	40	4,3
KA7	Kontrolle	18	38	40	44	46	50	6	44	3,4
	ML-I	18	38	41	46	49	55	8	46	4,6

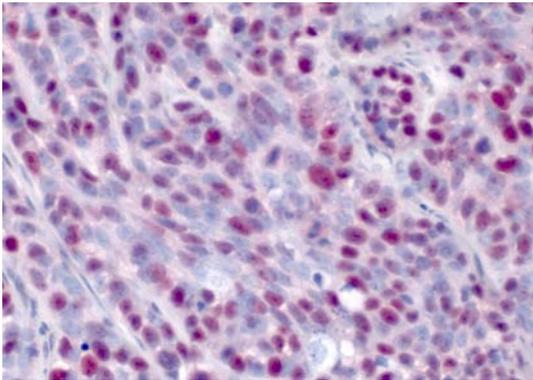
Abb. 17: Vergleich der Expression von pKi-67 (MIB-1) und „KA7-Antigen“ (KA7) in MV3-Primärtumoren der Kontroll- und der Therapie (30 ng/kg/d ML-I)-Gruppe. Die Antikörper KA7 und MIB-1 markieren in der Kontrollgruppe einen gleichgroßen Anteil an Tumorzellkernen (Labelingindex). In der Therapiegruppe unterscheiden sich ihre Labelingindices zwar statistisch hochsignifikant, jedoch nur geringfügig (Mediandifferenz 5%, Wilcoxon-Test: $p<0,001$).



MIB-1



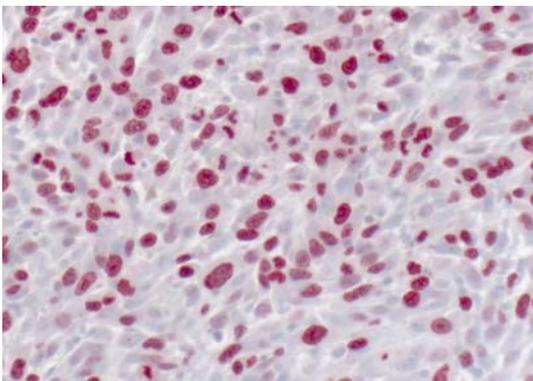
Ki-S11



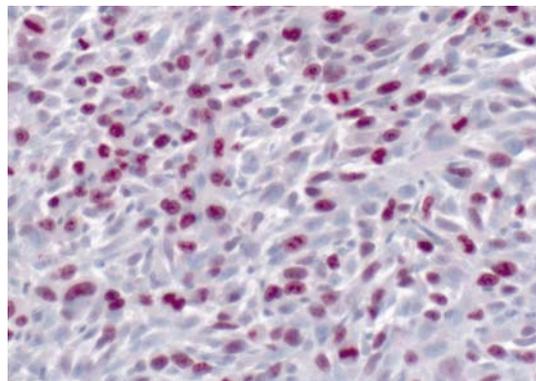
KA7

Abb. 18: Immunhistochemische Färbung eines HT29-Primärtumors der Kontrollgruppe mit den Antikörpern MIB-1, Ki-S11 (beide anti-pKi-67) sowie KA7. Der Antikörper Ki-S11 färbt weniger Zellkerne an als der Antikörper MIB-1. Die Antikörper KA7 und MIB-1 markieren einen gleichgroßen Anteil an Tumorzellkernen. [Rote Zellkerne = spezifische immunreaktive Färbung; Blaue Zellkerne = Hämalauengegenfärbung]

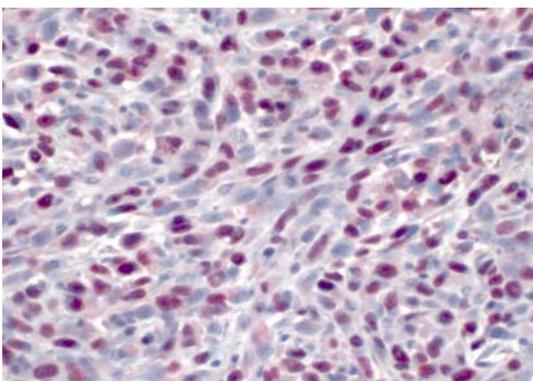
100 μ m



MIB-1



Ki-S11



KA7

Abb. 19: Immunhistochemische Färbung eines MV3-Primärtumors der Kontrollgruppe mit den Antikörpern MIB-1, Ki-S11 (beide anti-pKi-67) sowie KA7. Der Antikörper Ki-S11 färbt weniger Zellkerne an als der Antikörper MIB-1. Die Antikörper KA7 und MIB-1 markieren einen gleichgroßen Anteil an Tumorzellkernen. [Rote Zellkerne = spezifische immunreaktive Färbung; Blaue Zellkerne = Hämalauengegenfärbung]

100 μ m

5. Diskussion

Die bereits bekannte therapeutische Wirksamkeit von ML-I in einem Xenograftmodell des humanen malignen Melanoms in der scid-Maus, sowie von Trastuzumab in einem entsprechenden Modell des humanen Ösophagus-Adenokarzinoms sollte durch die immunhistochemische Analyse der proliferationsassoziierten Marker pKi-67 und repp86 näher charakterisiert werden. Daneben wurde auch die Frage gestellt, welcher der beiden Marker besser als Instrument geeignet ist, die beobachteten wachstumshemmenden Effekte der Medikamente zu reflektieren. Der Diskussion der Ergebnisse werden zunächst eine Besprechung von technischen Aspekten der Immunhistochemie mit Proliferationsmarkern sowie ausführliche theoretische Überlegungen zu deren Anwendung im Rahmen der Untersuchung von Therapieeffekten auf Tumoren vorangestellt.

5.1. Proliferationsmarker: Technische Diskussion

5.1.1. Gelagerte Paraffinschnitte und Antigen-Retrieval für die MIB-1-Immunhistochemie

Die verfügbaren Lungenschnitte des MV3-Xenograftmodells hatten eine Lagerungsdauer von einem Jahr. Testfärbungen mit einem an anderen Xenografttumoren (HT29) bereits erfolgreich eingesetzten MIB-1-Protokoll zeigten hier nur ein unzureichendes Signal. Es stellte sich die Frage, ob durch eine Optimierung des MIB-1-Protokolls die vorhandenen Lungenschnitte nutzbar gemacht werden könnten.

Die Möglichkeit eines Abfalls der Immunreaktivität in gelagerten, ungefärbten Paraffinschnitten wurde in den letzten 10 Jahren in einer Reihe von methodischen Arbeiten für eine Vielzahl von Antigenen untersucht. Die Aussagekraft und Vergleichbarkeit von klinischen und experimentellen Studien könnten beeinträchtigt sein, wenn auf gelagerte Schnitte mit unter Umständen sogar unterschiedlicher Lagerungsdauer zurückgegriffen werden muss. Dabei könnte es zu falsch negativen Aussagen, zu artifiziellen Unterschieden zwischen Vergleichsgruppen, zur Verdeckung echter Gruppenunterschiede oder zur Nichtübertragbarkeit von Cut-Off-Werten kommen.

Mehrere Teilfragen waren von Bedeutung:

- Welche Antigene, oder genauer Epitop/Antikörper-Kombinationen, sind betroffen? In welchem Ausmaß und mit welchem Zeitverlauf findet dort die Reduktion der Immunreaktivität statt? Antworten hierauf bestimmen die Relevanz des möglichen Problems. Dabei ist die für das jeweilige Antigen bedeutsame Zielgröße zu berücksichtigen, z. B. Intensität, Verteilungsmuster oder Labelingindex.
- Welchen Einfluss haben die Fixierung, die Lagerungstemperatur oder die Exposition der Schnitte gegenüber dem Sauerstoff der Luft?
- Kann ein optimiertes Antigen-Retrieval (AR) einen lagerungsbedingten Signalabfall kompensieren?

Es zeigte sich, dass das Phänomen für viele, aber nicht alle der geprüften Antigene tatsächlich in einem relevanten Ausmaß und innerhalb einer Zeitspanne von praktischer Bedeutung zu beobachten ist. So fanden Wester et al. (2000b) nach einer Lagerungszeit der Paraffinschnitte von 12 Wochen einen relevanten Signalabfall für sieben von elf getesteten Antigenen. Zu denen in diesem Zusammenhang besonders häufig untersuchten Antigenen, für die übereinstimmend von diesem Effekt berichtet wurde, gehören p53, ER (Östrogen-Rezeptor) und pKi-67 (Bromley et al. 1994; Prioleau u. Schnitt 1995; Kato et al. 1995; Jacobs et al. 1996; Shin et al. 1997; Bertheau et al. 1998; Grabau et al. 1998; Wester et al. 2000b; DiVito et al. 2004; Fergenbaum et al. 2004).

Prioleau und Schnitt (1995) beobachteten mit zwei verschiedenen Antikörpern einen Abfall der p53-Immunreaktivität in Paraffinschnitten von zehn p53-positiven Mammakarzinomen, die über zwei Monate bei Raumtemperatur gelagert hatten, gegenüber frischen Schnitten derselben Blöcke in einer simultanten Färbung. Übereinstimmend für beide Antikörper war die Intensität der Färbung in den gelagerten Schnitten stets geringer als in den frischen. Alle zehn Fälle zeigten sich im frischen Material p53-positiv, drei Fälle im gelagerten Material jedoch falsch-negativ.

Jacobs et al. (1996) verglichen die p53-Immunreaktivität in über 2, 4, 8 oder 12 Wochen bei Raumtemperatur gelagerten Paraffinschnitten von p53-positiven Mammakarzinomen gegenüber frischen Schnitte mit einer computergestützten (Anteil positiver Pixel) und visuellen Auswertung (negativ/positiv). Bereits nach zwei Wochen hatte der Anteil positiver Pixel signifikant auf 31% des Wertes für frische abgenommen und reduzierte sich bei längerer Lagerung nach 12 Wochen weiter auf nur 8% des Wertes für frische Schnitte. Es waren jetzt ein Viertel der Fälle falsch-negativ. Auch die

Lagerung bei 4°C führte zu einem Abfall der Immunreaktivität, der hier jedoch signifikant geringer ausgeprägt war als bei Raumtemperatur.

Wester et al. (2000b) verfolgten die Immunreaktivität von p53 und vom MIB-1-Epitop auf pKi-67 in gelagerten Paraffinschnitten (4°C oder 20°C) von Blasenkarzinomen mit den Zeitintervallen 2, 4 und 8 Wochen im Vergleich zu frischen Schnitten ebenfalls mit einer computergestützten Auswertung (Anteil positiver Pixel, mittlere Objektintensität). Es kam zu einem signifikanten Abfall beider Maße für beide Antigene innerhalb der ersten zwei Wochen, der sich bei längerer Lagerung nur gering fortsetzte. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Lagerungstemperaturen gefunden. In einem Test an Schnitten von in Formalin fixierten und in Agarose eingebetteten Tumorzellen zeigte sich für beide Antigene eine signifikante Abschwächung des Lagerungseffekts bei -20°C.

Die MIB-1-Labelingindices in Blasenkarzinombiopsien waren nach einer 10 wöchigen Lagerung bei Raumtemperatur signifikant niedriger als bei 4°C (Wester et al. 2000a).

Grabau et al. (1998) fanden eine temperaturabhängige Reduktion der Immunreaktivität (hier als Anteil positiver Pixel) für sieben von acht geprüften Antigenen nach einer Lagerungsdauer von drei Jahren, darunter pKi-67 (MIB-1-Epitop) und p53. Nach einer Lagerung bei 4°C oder 20°C war weniger als 50% der pKi-67-Immunreaktivität gegenüber ungelagerten Schnitten erhalten, bei einer Temperatur von -80°C zeigte sich kein Lagerungseffekt.

Wester et al. (2000b) fanden keinen Einfluß der Fixierungszeit von 6 h bis 7 Tage in Formalin auf den lagerungsbedingten Abfall der Immunreaktivität von p53 und pKi-67. In der Arbeit von Atkins et al. (2004) jedoch hatten acht verschiedenen Fixierungsmethoden einen zum Teil unterschiedlichen Effekt auf einen lagerungsbedingten Abfall der Immunreaktivität des EGF-Rezeptors.

Oxidation unter Einfluss des Luftsauerstoffs wurde häufig als Mechanismus vorgeschlagen, der zum Abfall der Immunreaktivität von Antigenen in gelagerten Paraffinschnitten führen soll. Eine Paraffinbeschichtung der Schnitte hatte nur einen minimalen (Jacobs et al. 1996), zwei alternative Beschichtungen überhaupt keinen protektiven Effekt (Wester et al. 2000a). Die Kombination einer Paraffinbeschichtung mit der Lagerung der Schnitte in einer Stickstoffatmosphäre führte zu einer Retention der Immunreaktivität von 72% bis 99% für Cytokeratin, ER und pKi-67 gegenüber frischen Schnitten, beide Methoden allein waren weniger effektiv. Bei Lagerung

unbeschichteter Schnitte an der Luft hingegen zeigte sich für alle drei Antigen ein deutlicher Abfall (DiVito et al. 2004).

In der bereits genannten Arbeit konnten Grabau et al. (1998) für sechs von sieben Antigenen die nach Lagerung reduzierte Immunreaktivität durch ein alternatives Antigen-Retrieval-Protokoll wiederhergestellt werden. Für einige Antigene, darunter pKi-67 (MIB-1-Epitop) und p53, bestand die Verbesserung in der Verwendung von Tris-EGTA-Puffer (pH 9.0) statt Citratpuffer (pH 6.0) im Rahmen einer Mikrowellenvorbehandlung über 25 min, für andere Antigene in der Verlängerung der Dauer der Vorbehandlung mit Tris-EGTA-Puffer von 25 auf 35 min.

In der Untersuchung von Wester et al. (2000b) war der lagerungsbedingte Abfall der Immunreaktivität von pKi-67 (MIB-1-Epitop) durch ein modifiziertes Antigen-Retrieval kompensierbar. Das Standardverfahren in dieser Arbeit war eine Vorbehandlung mit Citratpuffer (10 mM, pH 6.0) bei 85° C im Wasserbad über 16 h. Die alternative Vorbehandlung mit Borsäure (0.2 M, pH 7.2) unter sonst gleichen Bedingungen führte in 12 Wochen gelagerten Schnitten zu signifikant höheren Flächen- und Intensitätswerten gegenüber frischen Schnitten, die mit dem Citratpuffer-Protokoll behandelt worden waren. Ein simultaner Vergleich einerseits mit frischen Schnitten plus Borsäure-Protokoll, andererseits mit 12 Wochen gelagerten Schnitten plus Citratpuffer-Protokoll wurde leider nicht durchgeführt. Die alternative Vorbehandlung mit Borsäure führte gegenüber der Standardmethode des Labors nicht nur zu stärkeren Färbungsintensitäten, sondern auch zu höheren MIB-1-Labelingindices in 10 Wochen gelagerten Schnitten (West et al. 2000a).

Motiviert durch die genannten Untersuchungen wurde in der hier vorliegenden Arbeit ein Test zur Optimierung des Antigen-Retrieval-Protokolls für die MIB-1-Färbung der gelagerten Paraffinschnitte durchgeführt. Dazu wurden die beiden von Wester et al. (2000a, b) verwendeten Protokolle WB-C und WB-B übernommen und mit unserem Standardprotokoll MW-C sowie einer Borsäure-basierten Variante MW-B verglichen. Nach einer Vorbehandlung mit der Variante MW-C zeigte sich in den gelagerten Schnitten eine starke Reduktion der Färbungsintensität und ein Abfall des Labelingindices auf etwa 60% des Wertes in frischen Schnitten. Die hier interessante Zielgröße, der Labelingindex, wird also in einem relevanten Ausmaß von der Lagerung beeinflusst. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Wester et al. (2000b) war in Verbindung mit der Variante WB-C die Färbungsintensität in den gelagerten Schnitten vermindert, die Labelingindices waren jedoch nicht reduziert. Offenbar konnten anders

als mit der Variante MW-C schwächer gefärbte Kerne hier noch deutlich als positiv erkannt werden. Die Variante WB-C führte in frischen Schnitten zu leicht höheren Labelingindices als die Variante MW-C. Dies erscheint tolerierbar, da die Werte in derselben Größenordnung liegen und letztlich nicht die absolute Werte, sondern Unterschiede zwischen Geweben oder Gruppen interessant sind. In einer Überprüfung des WB-C-Protokolls mit einer vergrößerten Fallzahl fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied der MIB-1-Labelingindices zwischen frischen und einjährig gelagerten Schnitten. Das Protokoll WB-C kann damit für MIB-1-Färbung von gelagerten Paraffinschnitten empfohlen werden.

Die Vorbehandlung mit Borsäure statt mit Citratpuffer führte zu kräftigeren Färbungsintensitäten, im Falle der Wasserbadmethode sogar zu einer starken Überfärbung. Mit Borsäure unterschieden sich die MIB-1-Labelingindices nicht zwischen frischen und gelagerten Schnitten, unabhängig von der gewählten Hitzezufuhr des Antigen-Retrievals, aber das Niveau der Werte war bei der Wasserbadmethode deutlich höher. Bei der Mikrowellenmethode lagen die Werte für beide AR-Puffer auf dem gleichen Niveau. Aufgrund der guten Ergebnisse mit dem Standardcitratpuffer unter der alternativen Hitzezufuhrmethode wurde die Anwendung von Borsäure nicht weiter verfolgt.

Die drei wichtigsten Einflussfaktoren des Antigen-Retrievals sind die Temperatur, die Dauer der Vorbehandlung und der pH-Wert der verwendeten Lösung (Shi et al. 1997). Die Varianten WB-C und MW-C unterscheiden sich in zwei dieser Parametern, der Temperatur und der Dauer. Auf eine weitere unabhängige Manipulation wurde verzichtet. Temperatur und die nötige Dauer stehen nach Shi et al. (1997) in einem umgekehrten Verhältnis zueinander, ihr Produkt verhalte sich konstant. Das Temperatur-Zeit-Produkt ist für das WB-C-Protokoll um etwa den Faktor 80 größer als für das MW-C-Protokoll. Möglicherweise besteht also der Vorteil einer Temperatur unterhalb des Siedpunktes darin, dass eine massive Erhöhung des Temperatur-Zeit-Produkts über einer Verlängerung der Vorbehandlungsdauer leicht, ohne fortwährend verdampften Puffer ersetzen zu müssen, erreicht werden kann. Die Temperatur jedoch könnte nicht in einem vergleichbaren Maß vergrößert werden. Für einige Antigene scheint aber eine reduzierte Temperatur per se erforderlich zu sein (Shi et al. 1997, 2002). pKi-67 profitiert von einem Antigen-Retrieval mit Lösungen deren pH-Wert über dem des Standardcitratpuffers von 6.0 liegt (Shi et al. 1995; Kim et al. 2004). Dies

könnte die verstärkende Wirkung der Vorbehandlung mit Tris-EGTA-Puffer oder Borsäure auf die MIB-1-Färbung von gelagerten Paraffinschnitten erklären.

Offen bleibt, nach welchem Mechanismus ein intensiviertes Antigen-Retrieval einen lagerungsbedingten Verlust an Immunreaktivität kompensieren kann. Denkbar sind eine überhaupt effektivere Rekrutierung formalinmodifizierter Epitope oder eine Umkehr von anderen chemischen Modifikationen, die im Verlauf der Lagerungszeit entstehen.

Als Ergebnis der Vorarbeiten lässt sich festhalten, dass mit dem Vorbehandlungsprotokoll WB-C in Paraffinschnitten eine qualitativ sehr gute MIB-1-Färbung ohne lagerungsbedingten Abfall des Labelingindices erzielt werden kann. Die Verstärkung der Intensität durch die alternative Verwendung von Borsäure statt Citratpuffer ist nicht notwendig.

5.1.2. Vergleich der Antikörper MIB-1, Ki-S11 und KA7

Die Antikörper MIB-1 (Gerdes et al. 1992) und Ki-S11 (Rudolph et al. 1997) reagieren beide mit dem pKi-67-Antigen, welches exklusiv in den Phasen G1 bis M des Zellzyklus exprimiert wird (Gerdes et al. 1984). Der Antikörper KA7 (Institut für Hämatopathologie, Universität Kiel) reagiert mit einem von pKi-67 verschiedenen Antigen, welches ebenfalls exklusiv in denselben Zellzyklusphasen exprimiert wird (mündliche Information: Prof. Dr. Rudolph, ehemals Institut für Hämatopathologie, Universität Kiel). Im Sinne einer Qualitätssicherung wurde gefragt, ob in unseren Paraffinschnitten mit allen drei Antikörpern gleiche Labelingindices und damit gleiche Bestimmungen der Wachstumsfraktion erreicht werden.

In den HT29-Xenografttumoren lieferten die Antikörper MIB-1 und KA7 identische LIs. In den MV3-Xenografttumoren lagen die LIs für KA7 tendenziell etwas höher als für MIB-1. In der Therapiegruppe, nicht aber in der Kontrollgruppe, fand sich ein statistisch zwar hoch signifikanter, mit einer absoluten Differenz von nur 5% in getrennten Färbungen jedoch nicht relevanter Unterschied. Im letztlich interessanten Vergleich der Wachstumsfraktion zwischen der Kontroll- und Therapiegruppe des MV3-Xenograftversuches führten beide Marker zu derselben Aussage (kein Unterschied der Gruppen). Die Tatsache, dass die Bestimmung der Wachstumsfraktion mittels zweier unterschiedlicher Antigene zu gleichwertigen Ergebnissen führt, kann als positives Qualitätskriterium gelten. Im Vergleich zu MIB-1 war allerdings bei der Anwendung von KA7 eine stärkere Hintergrundfärbung auffällig.

Die LIs für Ki-S11 waren in den HT29-, MV3- und PT1590-Kontrolltumoren jeweils statistisch hoch signifikant kleiner als die LIs für MIB-1. Dabei betragen die absoluten Differenzen 23%, 7% bzw. 8%. Bei der Bestimmung des Anteils pKi-67-positiver Zellen durch zwei unterschiedliche Antikörper ist eine Differenz in der Größenordnung von 20% sicherlich zu groß. Absolute Unterschiede <10% halten wir jedoch für vertretbar, wenn nach einem relativen Vergleich zwischen Gruppen gefragt wird. Die besonders große Differenz in den HT29-Tumoren ist am ehesten durch eine einmalig unzureichende Ki-S11-Färbung erklärbar. Auf eine Wiederholung wurde verzichtet.

Für die Untersuchung des MV3- und PT1590-Xenograftmodells hinsichtlich der inhaltlichen und nicht rein methodischen Fragestellungen wurde der kommerzielle Antikörper MIB-1 eingesetzt.

5.2. Proliferationsmarker: Theoretische Überlegungen

Wichtig für die Interpretation der mit Hilfe von *Proliferationsmarkern* wie pKi-67 erhobenen Daten ist eine kritische Betrachtung des Konzeptes der *Wachstumsfraktion*. Aufgrund seiner besonderen zellzyklusabhängigen Expression kann pKi-67 dafür genutzt werden, den verhältnismäßigen Anteil derjenigen Zellen an einer Gesamtzellpopulation zu bestimmen, die sich in den proliferationsaktiven Phasen des Zellzyklus G1, S, G2 und M, nicht aber in der Ruhephase G0 befinden. Der übliche Begriff *Wachstumsfraktion* ist nicht frei von Unstimmigkeit. Er wird einerseits als der Anteil der Zellen in den Zyklusphasen G1, S, G2 und M, andererseits aber auch als Anteil „proliferierender“ Zellen definiert. Aus prinzipiellen Gründen ist eine klare Unterscheidung zwischen „proliferierenden“ und „nicht-proliferierenden“ Zellen aber gar nicht möglich ist. Für jede Zelle innerhalb des Zellzyklus ist ihre tatsächliche Teilung stets ein potentielles Ereignis in der Zukunft. Eine einzelne Zelle kann ihren Weg durch den Zyklus bis zur Teilung fortsetzen oder ihn zuvor entweder durch Übertritt in die Ruhephase oder durch Zelltod verlassen. Außerdem kann die Dauer komplett vollzogener Zellzyklusdurchläufe innerhalb einer Zellpopulation erheblich variieren. Die Wachstumsfraktion, operationalisiert als Anteil der pKi-67-positiven Zellen, ist eine Zustandsbeschreibung des Gewebes zu einem gegebenen Zeitpunkt. Sie gibt die relative Größe des Pools potentiell teilungsfähiger Zellen an und darf nicht mit der *Proliferationsrate* verwechselt werden. Die Untersuchung zusätzlicher Parameter könnte Analyse von Zellproliferation und Tumorwachstum verbessern (die Diskussion folgt hier Scholzen u. Gerdes 2000).

Das nukleäre Protein repp86, spezifisch markiert durch den Antikörper Ki-S2, wird exklusiv in den Zellzyklusphasen S, G2 und M exprimiert, nicht aber in der G1-Phase (Rudolph u. Parwaresch 1996; Heidebrecht et al. 1997; Rudolph et al. 1998). Die G1-Phase ist die Zyklusphase mit der längsten Dauer und der größten zeitlichen Variabilität. Sie beherbergt mit dem Aus- und Eintrittspunkt zwischen dem Zellzyklus und der Ruhephase sowie mit dem G1/S-Restriktionspunkt, an welchem die Zelle verweilen, in die S-Phase fortschreiten oder die Apoptose einleiten kann, wichtige Verzweigungspunkte im Zellschicksal. Die Kieler Arbeitsgruppe, die den Ki-S2-Antikörper entwickelte, vermutete daher, dass der repp86-Index besser den tatsächlich proliferierenden Zellpool erfasse und eine höhere prognostische Relevanz für maligne Tumoren besitzen könnte als der pKi-67-Index (die Diskussion folgt hier Rudolph u. Parwaresch 1996, Heidebrecht et al. 1997 u. Rudolph et al. 1998). Der Quotient aus dem repp86-Index und dem pKi-67-Index, ein indirektes Ersatzmaß für den Anteil der nicht-G1-Zellen im Zellzyklus, war in allen untersuchten normalen Geweben nur selten größer als 40%. Verschiedene Gewebetypen wiesen unterschiedliche, charakteristische Quotienten auf, welche im Allgemeinen in den Geweben mit bekanntermaßen hohem Umsatz besonders hoch lagen. In verschiedenen malignen Tumoren variierte der Quotient in einem weiten Bereich von 10 bis 90%. Sein Mittelwert lag (mit großen Streuungen) für gut differenzierte Karzinome bei 25%, für schlecht differenzierte Karzinome bei 57% und für hochmaligne Lymphome bei 72%. Die Werte des repp86/pKi-67-Quotient ließen sich also in einen biologisch sinnvollen Zusammenhang bringen (Rudolph et al. 1998). In einer Studie zu prognostischen Faktoren des Lymphknoten-negativen Mammakarzinoms war der repp86-Index dem pKi-67-Index gegenüber überlegen und sogar insgesamt der stärkste, der signifikanten und unabhängigen prognostischen Faktoren (Rudolph et al. 1999). Auch beim Neuroblastom stellte sich der repp86-Index in einer Multivarianzanalyse als wichtigster prognostischer Faktor heraus. Der pKi-67-Index wurde hier nicht mit bestimmt, ist aber nach Kenntnissen aus der Literatur kein prognostischer Faktor beim Neuroblastom (Krams et al. 2003). Beim endometrioiden Adenokarzinom des Uterus war ein höherer repp86/pKi-67-Quotient ein unabhängiger prognostischer Faktor einer schnelleren Krankheitsprogression, nicht aber ein höherer pKi-67-Index (Bonatz et al. 2001). Zum repp86/pKi-67-Quotienten könnte kritisch angemerkt werden, dass der Anteil der nicht-G1-Zellen im Zellzyklus indirekt über die repp86- und pKi-67-Indices aus getrennten Färbungen von zwei Paraffinschnitten berechnet wird. Eine Evaluierung dieser

indirekten Bestimmung, z.B. durch Vergleich mit einer durchflusszytometrischen 2-Parameter-Analyse von pKi-67-Expression und DNA-Gehalt, wurde offenbar noch nicht unternommen.

Unter der idealisierenden Annahme einer einheitlichen Zellzyklusdauer und einer zu vernachlässigenden Zelltodrate sind die Wachstumsfraktion (pKi-67-Index) und die Proliferationsrate (Entstehungsrate neuer Zellen) proportionale Größen. Die Frage, ob der pKi-67-Index die *Proliferation* misst, lässt demnach auch wie folgt formulieren: Ist unter realen Bedingungen trotz Variabilität der Zellzykluszeiten (zwischen den Zellen derselben Gewebeprobe und zwischen den Gewebeproben) und der Variabilität der Zelltodrate (zwischen den Gewebeproben) eine gemeinsame Variation von Wachstumsfraktion und Proliferationsrate feststellbar? Diese Vermutung ist sicherlich nicht in jedem Fall zutreffend.

Die direkte Messung der Proliferationsrate oder verwandter Maße wie der *potential doubling time* (T_{pot}) ist methodisch aufwendig und schwierig. Am weitesten verbreitet ist die Pulsverfolgungsmethode. Die Zellen in der Kultur bzw. im Gewebe werden dazu zeitlich begrenzt einem markierten Nukleotidanalogen (z. B. BrdU) ausgesetzt, im Tierversuch oder am Patienten als Bolusinjektion. Nach einem Intervall werden die Inkorporation des Analogons sowie der DNA-Gehalt der Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Zellkinetische Parameter werden unter bestimmten idealisierenden Annahmen mit mathematischen Formeln aus den Daten abgeleitet (Wilson u. McNally 1992).

Die immunhistochemische Bestimmung des pKi-67-Indices ist retrospektiv (!) und ohne Substanzapplikation (Klinik!) durchführbar. Vorteile immunhistochemischer gegenüber durchflusszytometrischer Methoden sind der Erhalt räumlicher Information und die Möglichkeit, allein die Tumorzellpopulation des Gewebes untersuchen zu können. Der pKi-67-Index misst mit dem Anteil der Zellen in den Zyklusphasen G1, S, G2 und M eine biologisch sinnvoll interpretierbare, proliferationsbezogene Größe. Diese ist für verschiedene klinische Fragestellungen ein aussagekräftiger Parameter, z. B. als diagnostische Hilfe (benigne vs. maligne) oder als prognostischer Faktor für bestimmte maligne Tumoren (Übersichten in: Scholzen und Gerdes 2000; Endl et al. 2001; Brown und Gatter 2002). Der Nutzen des Markers muss jeweils für Gewebstyp und Fragestellung einzeln bestätigt oder ausgeschlossen werden und ist praktisch entscheidender als die Frage nach einer optimalen Validität als Ersatzmaß für die

Proliferationsrate. In den bisher untersuchten Anwendungen zeigte repp86 oder seine kombinierte Betrachtung mit pKi-67 gegenüber letzterem alleine Vorteile.

Die Frage, ob in der experimentellen oder klinischen Situation Änderungen der Proliferationsrate eines Tumors unter Therapie von parallelen Änderungen des pKi-67-Indices reflektiert werden, ist von anderen Anwendungen dieses Markers getrennt zu betrachten.

Um den Unterschied zwischen der Wachstumsfraktion, operationalisiert als pKi-67-Index, und der Proliferationsrate zu verdeutlichen, verweisen Scholzen und Gerdes (2000) auf eine Arbeit, in der der pKi-67-Index bei pharmakologischen Manipulationen der Zellkinetik untersucht wurde. Wie Van Oijen et al. (1998) in dieser Arbeit feststellten, blieben Zellen *in vitro* nach Inhibition der G1/S-Progression, der DNA-Synthese oder Induktion eines mitotischen Arrests positiv für pKi-67, ohne weiter zu proliferieren. Daneben wäre auch noch die Überlegung zu berücksichtigen, dass im Falle einer therapeutisch erhöhten Zelltodrate von Zykluszellen nicht alle Zykluszellen in ihrer Zukunft den Zyklus komplett bis zur vollzogenen Teilung durchlaufen, sondern teilweise zuvor sterben werden. Diese Befunde bzw. Hypothesen haben offensichtlich eine große Bedeutung für die hier besprochene Frage. Unterschiede in der Proliferationsrate zwischen Proben, die durch experimentell oder therapeutisch induzierte Unterschiede in Zellzyklusdauer oder Zelltodrate zustande kommen, müssen nicht von Unterschieden in der Wachstumsfraktion reflektiert werden.

Die Regulation von Zellteilung und Apoptose im Gewebe erfolgt auf mehreren ineinander verschränkten Ebenen. Auf der zellulären Ebene werden Zellzyklus und Apoptose durch ein komplexes Netzwerk von Signalwegen gesteuert. Auf der Ebene des Gewebes interagieren Zellen lokal in einem dreidimensionalen Verband z. B. über lösliche Faktoren, Zellkontakte und Substratverbrauch. Physiologisch werden Proliferations- und Zellverluste je nach Gewebstyp und Funktionszustand genau aufeinander abgestimmt, um das jeweilige Bilanzziel (bei ganz unterschiedlichen Umsätzen) zu erreichen.

Für maligne Zellen sind molekulare Defekte im intrazellulären Signalnetzwerk pathogenetisch essentiell bedeutsam (Fenton u. Longo 2005). Diese führen zu einer unterschiedlich ausgeprägten zellulären Autonomie. Die integrative Rückkoppelung unter den Zellen auf der Ebene des Gewebes muss dabei aber nicht vollständig zusammenbrechen. Die Verschränkung beider Ebenen lässt sich z. B. sehr elegant an

multizellulären Sphäroid-Kulturen von Tumorzellen untersuchen, die sich in ihrem Verhalten deutlich von *monolayer*-Kulturen unterscheiden (LaRue et al. 2004). Das Phänomen der Repopulation von Tumorzellen im Intervall zwischen den Applikationen von Radio- oder Chemotherapien ist ein häufiger Grund des Therapieversagens (Kim u. Tannock 2005). In einem Xenografttumormodell des humanen Plattenepithelkarzinoms der Zervix setzte eine Repopulation bereits frühzeitig während einer multifraktionierten Bestrahlungsserie ein, und nicht erst nach deren Abschluss. Sie wurde durch einen Anstieg der Wachstumsfraktion getragen. Die Zellzyklusdauer blieb dagegen relativ konstant. Als Auslöser wurde der unter Bestrahlung gesteigerter Zellverlust angenommen (Sham u. Durand 1999). Es muss also an die Möglichkeit gedacht werden, dass therapeutisch induzierte Störungen über die Integration der Zellen zum Gewebe zu sekundären Verhaltensänderungen von primär nicht betroffenen Zellen führen können.

Die relativen Größen der Zellpools von G0-, G1-, S-, G2- und M-Zellen sind das Ergebnis eines (eventuell gestörten) Fließgleichgewichts der Ein- und Austritte der einzelnen Zellen in die bzw. aus den Phasen. G1-Zellen durchlaufen nacheinander die Phasen S, G2 und M und treten aus dieser dupliziert wieder in die G1-Phase ein. Bestimmende Parameter sind die individuellen Aufenthaltszeiten der Zellen in den Phasen G1, S, G2 und M, die Zyklustrittsrate von G1-Zellen in die Ruhephase G0, die Zykluseintrittsrate von G0-Zellen in die G1-Phase und die jeweiligen Zellverlustraten aus den einzelnen Phasen heraus. Die durch Quotientenbildung bestimmten Größenverhältnisse unterschiedlich zusammengesetzter Zellpools bilden das zugrunde liegende dynamische Geschehen jeweils als Momentaufnahme aus einer bestimmten Perspektive ab.

$[G1+S+G2+M] / [G0+G1+S+G2+M]$	gemessen als	pKi-67-Index
$[S+G2+M] / [G0+G1+S+G2+M]$	gemessen als	repp86-Index
$[S+G2+M] / [G1+S+G2+M]$	gemessen als	pKi-67/ repp86-Quotient

Prinzipiell sind vier Wege denkbar, auf denen eine Therapie einen negativen Einfluss auf die Gewebsbilanz (Proliferationsrate minus Zellverlustrate) haben kann:

- (1) Zellzyklusverlangsamung (Extremfall: Arrest): In welcher/n Phase(n)?
- (2) Erhöhung der Zyklustrittsrate in die Ruhephase.
- (3) Verminderung der Zykluseintrittsrate aus der Ruhephase.
- (4) Zelltod: Zellen aus der Ruhephase? Zellen (phasenspezifisch?) aus dem Zellzyklus?

Die Erhöhung der Zelltodrate stellt in sofern einen Sonderfall dar, als sie nicht nur per se auf der Negativseite der Gewebsbilanz wirkt, sondern auch die Proliferationsrate durch Verlust von Zellen aus dem Zellzyklus vermindern kann.

Das Verhalten des pKi-67-Indices, des repp86-Indices oder des pKi-67/repp86-Quotienten unter der Therapie wird also bestimmt von der Wirkung der Mechanismen (1), (2), (3) und/oder (4) und auf das weiter oben beschriebene dynamische Geschehen, sowie möglicherweise auch von sekundären Änderungen anderer Parameter des beschriebenen Zellzyklusmodells.

Nach diesen prinzipiellen Überlegungen soll nun auf die untersuchten Modelle spezifisch eingegangen werden.

5.3. Melanom (MV3)-Xenograftmodell

Primärtumoren

ML-I inhibierte in einer Dosierung von 30 ng/kg/d signifikant und in relevantem Ausmaß das Primärtumorwachstum von MV3-Xenografttumoren in der scid-Maus (Thies 2005b). *In vitro* konnte ein dosisabhängiger antiproliferativer Effekt von ML-I auf MV3-Zellen auf eine ebenfalls dosisabhängige Induktion der Apoptose zurückgeführt werden (Thies et al. 2005a). Inzwischen wurde auch in den Primärtumoren des MV3-Xenograftmodells eine relevante und hoch signifikante Zunahme der Apoptose nachgewiesen (Dautel 2006). Die Apoptoseinduktion ist also ein wesentlicher Wirkmechanismus von ML-I in diesem Tiermodell des humanen malignen Melanoms. Es wurde vermutet, dass ML-I über die Apoptoseinduktion die Wachstumsfraktion der Tumoren senken könnte.

In der vorliegenden Arbeit konnte für die MV3-Primärtumoren zwischen der Kontroll- und der 30 ng/kg/d-Therapiegruppe kein Unterschied bezüglich der immunhistochemisch als pKi-67-Index bestimmten Wachstumsfraktion gefunden werden. Die Inhibition des MV3-Tumorwachstums durch ML-I, d. h. die negative Beeinflussung der Gewebsbilanz der Tumore, steht also nicht im Zusammenhang mit einer Verkleinerung des Anteils derjenigen Tumorzellen, die sich im Zellzyklus befinden.

Da sich die Wachstumsfraktion unter ML-I und Kontrollbedingungen nicht unterscheiden, ist es unwahrscheinlich, dass ML-I hier die Nettozyklusaustrittsrate in die Ruhephase wesentlich erhöht. Dieser Mechanismus hätte seine direkt antiproliferative Wirkung ja gerade über eine Reduktion der Wachstumsfraktion

erreicht. Die Argumentationssituation ist allerdings asymmetrisch: Eine Reduktion der Wachstumsfraktion unter ML-I wäre mehrdeutig gewesen und hätte demgemäß durch verschiedene Mechanismen erklärt werden können.

Entgegen der ursprünglichen Vermutung reduziert der durch ML-I hervorgerufene apoptotische Zellverlust nicht die Wachstumsfraktion. Mehrere Erklärungen sollen als Hypothesen diskutiert werden. ML-I könnte ruhende Zellen und Zykluszellen gleichermaßen in die Apoptose schicken. Der Anteil der Zykluszellen an der Gesamtpopulation bliebe dann unverändert. ML-I könnte aber auch bevorzugt oder ausschließlich auf Zykluszellen wirken, und müsste eigentlich die Wachstumsfraktion senken. Dann stellt sich aber die Frage, wie sich die Steigerung des Zellverlustes, eine Reduktion der Wachstumsfraktion und das Ergebnis der kumulativen Gesamtbilanz über die Zeit von ihrem Ausmaß her zueinander verhalten. Bereits eine gering höhere Zellverlustrate aus dem Zykluskompartiment in der Therapiegruppe könnte sich über die Versuchsdauer zu einer deutlichen Reduktion des Tumorgewichts im Vergleich zur Kontrollgruppe potenzieren ohne, dass die Wachstumsfraktion messbar vermindert wäre. Alternativ könnte ein Zellverlust aus dem Zykluskompartiment auch durch eine sekundäre Verminderung der Zellzyklusaustrittsrate in die Ruhephase kompensiert werden. In allen diesen Fällen aber müsste in der Therapiegruppe nicht nur die Zellverlustrate höher, sondern müsste auch die *Proliferationsrate* niedriger sein als in der Kontrollgruppe, da nicht alle Zellen, die sich zu einem Zeitpunkt im Zellzyklus befinden diesen komplett durchlaufen werden. Thies et al. (2005a) zeigten die apoptoseinduzierende Wirkung von ML-I auf MV3 an Zellkulturen im expandierenden Zustand. Kulturen in der Plateau-Phase mit einem höheren Anteil an ruhenden Zellen wurden dort nicht untersucht. Dass ML-I (RNA-Glykosidase-Aktivität) stärker auf ruhende Zellen wirken könnte ist aber eher unwahrscheinlich, da Zykluszellen eine höhere Proteinbiosynthesetätigkeit haben. Eine hinsichtlich des Tumorstadiums wirksame Erhöhung der Apoptoserate ohne Reduktion der Wachstumsfraktion wurde auch in anderen *in vivo*-Tumorthierapie-Modellen beschrieben (Hawkin et al. 2000; Katoh et al. 2004b).

Unter ML-I kommt es auch zu einer signifikant gesteigerten Einwanderung dendritischer Zellen in die MV3-Primärtumoren, passend zur bekannten immunmodulatorischen Aktivität des Medikaments. Die dendritischen Zellen könnten durch Phagozytoseaktivität zur Inhibition des Tumorstadiums beitragen (Dautel 2006). Die möglichen Auswirkungen eines als nichtselektiv unterstellten

Tumorzellverlustes durch gesteigerte Phagozytose auf die Wachstumsfraktion und die Proliferationsrate wurden weiter oben bereits implizit mitdiskutiert.

Zusätzlich zur Wachstumsfraktion wurde auch der repp86-Index immunhistochemisch bestimmt, mit welchem der Anteil derjenigen Tumorzellen an der Population erfasst werden kann, die sich in den Zellzyklusphasen S+G2+M befinden. Auch bezüglich dieses Parameters konnte kein Unterschied zwischen den Primärtumoren der Kontroll- und der 30 ng/kg/d-Therapiegruppe gefunden werden. Der Marker repp86 reflektiert also genauso wenig wie pKi-67 die Inhibition des MV3-Tumorstwachstums durch ML-I.

In der getrennten Betrachtung beider Marker gab es keinen Hinweis auf ein differentielles Verhalten unter der Therapie mit ML-I. Für jeden Tumor wurde aber auch der repp86/pKi-67-Quotient berechnet, der ein indirektes Maß des Anteils der nicht-G1-Zellen im Zellzyklus darstellt. Die Quotienten lagen in der 30 ng/kg/d-Gruppe nur geringfügig (Mediandifferenz: 4%) höher als in der Kontrollgruppe, der Unterschied erreichte jedoch gerade ein niedriges statistisches Signifikanzniveau ($p=0,046$). Unter Berücksichtigung des im Abschnitt 5.2. geäußerten methodischen Vorbehalts bezüglich des Quotienten darf dieser minimale Unterschied nur äußerst vorsichtig interpretieren werden: Es konnte kein sehr aussagekräftiger Hinweis auf eine deutliche Störung der Zellzyklusphasenverteilung zwischen G1 und S+G2+M in den MV3-Primärtumoren unter 30ng/kg/d ML-I gefunden werden. Berichte in der Literatur über eine Wirkung von Mistellektinen/-extrakten auf die Zellzyklusverteilung oder -dynamik humaner Zellen sind zudem selten und betreffen nur einen Teil der untersuchten Zelltypen.

Hahn (2000) untersuchte die Wirkung von ML-I und ML-III auf die Zellzyklusverteilung in der humanen Leukämie-Zelllinie MOLT-4 und in humanen Lymphozyten. Beide Mistellektine führten in beiden Zelllinien zu einer deutlichen dosisabhängigen S-Phasen-Akkumulation, hauptsächlich auf Kosten einer Abnahme des Anteils der G0/G1-Zellen. Harmsma et al. (2004) untersuchten den Einfluss des Mistelextraktes IscadorQu® auf die Zellzyklusdynamik verschiedener humaner Zelllinien durchflusszytometrisch mit der BrdU-Pulsverfolgungsmethode. In den Zelllinien HaCaT (immortalisierte Epidermiszellen), NCI-H125 (Adenokarzinom der Lunge) und MCF7 (Mammakarzinom) wurde eine Verzögerung der Progression durch die S-Phase und eine geringe Akkumulation von BrdU-positiven Zellen in der S+G2+M-Phase beobachtet. Der zytostatische Effekt war dosisabhängig. In drei weiteren Zelllinien konnte kein Effekt auf die Zellzyklusprogression festgestellt werden. ML-I induzierte in der humanen Zelllinie A549 (Lungenkarzinom) eine G1-Phasen-

Akkumulation, aber keine Apoptose (Siegle et al. 2001). Keinen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung hatten koreanisches bzw. europäisches Mistellektin in den humanen Leukämie-Zelllinien HL-60 und U937 (Lyu et al. 2001; Miyoshi et al. 2001) sowie rekombinantes Mistellektin in der humanen Ovarialkarzinom-Zelllinie SKOV-3 (Abuharbeid et al. 2004).

Eine geringfügige Erhöhung des repp86/pKi-67-Quotient in den MV3-Primärtumoren unter ML-I-Therapie wäre von der Richtung her verträglich mit den Ergebnisse von Hahn (2000) und Harmsma et al. (2004).

Lungenmetastasen

Auch in den MV3-Lungenmetastasen wurde die Wachstumsfraktion immunhistochemisch als pKi-67-Index bestimmt. Für jedes Versuchstier wurden sowohl individuelle Wachstumsfraktionen für die einzelnen Metastasen berechnet, als auch eine Gesamtwachstumsfraktion für alle untersuchten MV3-Metastasenzellen zusammen.

Unter Kontrollbedingungen gab es bezüglich der Gesamtwachstumsfraktion keinen signifikanten Unterschied zwischen Lungenmetastasen und Primärtumoren, die Werte für die Lungenmetastasen streuten aber stärker.

Auch in einem analogen Kolonkarzinom (HT29)-Xenograftmodell unterschieden sich die Primärtumoren und Lungenmetastasen nicht wesentlich in der Wachstumsfraktion, die Werte lagen zudem in derselben Größenordnung wie in der vorliegenden Arbeit (Mitchell u. Schumacher 1997).

Als Nebenfrage war interessant, ob die individuelle Wachstumsfraktion der einzelnen Metastasen abhängig von ihrer Größe ist. Für die einzelnen Metastasen wurde die Wachstumsfraktion graphisch gegen die Anzahl der angeschnittenen Tumorzellkerne als Ersatzmaß für die Metastasengröße aufgetragen und die so gewonnene Darstellung interpretierend beschrieben. Ein methodischer Einwand ist jedoch, dass die Anzahl der Tumorzellkerne in einem zufälligen Anschnitt durch eine eigentlich dreidimensionale Metastase zwar ein praktikables, aber kein optimales Größenmaß ist. Ein von der Metastasengröße abhängiger ansteigender oder abfallender Trend der Wachstumsfraktion war nicht zu erkennen. Unter kleinen Metastasen streut die Wachstumsfraktion in einem sehr weiten Bereich von etwa 10% bis 95%. Mit zunehmender Metastasengröße wird die Streuung kleiner. Dieses entspricht zunächst einmal der statistisch zu begründenden Erwartung, dass sich die Streuung der

Wachstumsfraktion mit zunehmender Anzahl in die Berechnung einbezogener Zellkerne verringert. Darüberhinaus könnte die weite Streuung der Wachstumsfraktion unter den kleinen Metastasen möglicherweise aber auch Ausdruck einer biologischen Heterogenität von zellteilungs-inaktiven, ruhenden bis hin zu stark zellteilungs-aktiven kleinen Metastasen sein.

In einem Tiermodell des murinen Melanoms (B16F10) exprimierten fast alle kleinen, und alle mittleren und großen Lungenmetastasen pKi-67. In allen aktiven Metastasen lag die Wachstumsfraktion größenunabhängig bei ungefähr 40% und war damit vergleichbar mit dem in der hier vorliegenden Arbeit ermittelten Medianwert (Cameron et al. 2000). Einige kleine Metastasen zeigten dort also keine Proliferationstätigkeit, eine größere Streubreite der Wachstumsfraktionen in teilungsaktiven Metastasen kam jedoch offenbar nicht vor. In einer klinischen Studie hatten Lymphknoten-Mikrometastasen des malignen Melanoms eine kleinere Wachstumsfraktion (2,4% vs. 18%) und eine geringere Gefäßdichte (*microvessel density*) als vielfach größere Makrometastasen. Die Autoren diskutierten die Ergebnisse im Rahmen des Konzeptes „schlafender“ (*dormant*) Metastasen, welche sich vor Eintritt in eine Wachstumsphase für eine (unbestimmte) Zeit in einer Art Wartezustand befinden (Barnhill et al. 1998).

Im MV3-Xenograftmodell hemmte die Therapie mit 30 ng/kg/d ML-I nicht nur das Wachstum der Primärtumoren, sondern auch die pulmonale Metastasierung. Verglichen mit der Kontrollgruppe waren die Tumorgewichte um 35% und die Metastasenzahlen sogar um 55% reduziert (Thies et al. 2005b). Analog zur Situation der Primärtumore wurde auch für die Lungenmetastasen zunächst eine Reduktion der Wachstumsfraktion durch ML-I erwartet. Zudem wurde die Frage nach einer möglicherweise differentiellen Reaktion der Wachstumsfraktion am primären und sekundären Ort gestellt.

Es konnte jedoch zwischen der Kontroll- und der 30 ng/kg/d-Gruppe kein statistisch signifikanter Unterschied in den Gesamtwachstumsfraktionen der zusammengefassten Lungenmetastasen festgestellt werden. Die antimetastatische Wirkung von ML-I steht also nicht mit einer Verkleinerung des Anteils der Zykluszellen im Zusammenhang. Eine differentielle Reaktion der Wachstumsfraktion am primären und sekundären Ort liegt nicht vor.

Unter der Therapie mit 30ng/kg/d ML-I wurde in den Lungenmetastasen eine deutliche Tendenz zu einem höheren Anteil von apoptotischen Tumorzellen und zu einer stärkeren Infiltration mit dendritischen Zellen festgestellt, jedoch jeweils ohne eine statistische Signifikanz zu erreichen. Die beiden genannten Effekte konnten für die

Primärtumoren hingegen mit hohem statistischem Signifikanzniveau nachgewiesen werden (Dautel 2006). Es wäre durchaus möglich, dass die Induktion der Apoptose und die Rekrutierung dendritischer Zellen nicht nur in den Primärtumoren, sondern auch in den Lungenmetastasen eine funktionelle Bedeutung in der Wirkungsweise von ML-I besitzen, die Ergebnisse aber bei deutlich kleineren Stichprobengrößen an auswertbaren Zellen in den Metastasen die statistische Signifikanz verfehlten.

Denkbar wäre auch, dass ML-I (zugleich) auf früheren Etappen der Metastasierungskaskade wirksam ist. So könnten zirkulierende Tumorzellen im Blut durch ML-I direkt, oder durch stimulierte Zellen der angeborenen Abwehr getötet werden. Im HT29-Xenograftmodell korrelierten die Primärtumorgewichte mit der Anzahl der Lungenmetastasen (Jojovic u. Schumacher 2000). In einer Nachfolgearbeit zu demselben Tiermodell korrelierten die Primärtumorgewichte sehr gut mit der Anzahl zirkulierender Tumorzellen im Blut (PCR-Detektion) und letztere wiederum sehr gut mit der Anzahl der spontanen Lungenmetastasen (Kato et al. 2004a). Jedoch konnte für sechs verschiedener humane Melanom-Zelllinien, darunter auch MV3, im Xenograftmodell keine Korrelation zwischen Primärtumorgewichten und Lungenmetastasenzahlen gefunden werden (Thies et al., eingereicht 2006). Die Hypothese einer antimetastatischen Wirkung von ML-I durch primäre Massenreduktion der MV3-Primärtumoren mit sekundär geringerer Auswanderungsrate von Tumorzellen in die Blutgefäße muss demnach verworfen werden.

Bei der mikroskopischen Untersuchung von Lungenmetastasen im Xenograftmodell werden geringe Metastasenzahlen und kleine Metastasengrößen per se, insbesondere aber auch deren Reduktion im Falle einer antimetastatischen Wirkung im Therapiearm, zum Problem für die Bestimmung von Labelingindices. In der vorliegenden Arbeit wurden für den pKi-67-Index alle im jeweiligen Lungenschnitt vorhandenen Tumorzellkerne ausgezählt ohne zuvor eine Gesamtanzahl zu zählender Kerne festzulegen. Dieses erlaubte einen kombinierten Überblick über Wachstumsfraktionen und Metastasengrößen. Übersehen wurde dabei aber, dass damit Anforderungen für den Vergleich der Gruppen mittels statistischer Testverfahren nicht streng erfüllt wurden, weil sowohl innerhalb als auch zwischen den Gruppen die Werte mit einer unterschiedlichen Genauigkeit bestimmt wurden (wir danken Herrn Prof. Dr. Berger für seinen kritischen und wertvollen Beitrag). Wie in Abschnitt 3.4.2. dargestellt, wurden daher die Daten zusätzlich mit einem abgewandelten Verfahren ausgewertet. Durch einen zufälligen Ausschluss einzelner Metastasen aus der Auswertung konnten die

Genauigkeiten der Berechnung des Labelingindices besser, aber nicht vollständig, aneinander angeglichen werden. Die Auswertungen mit den kompletten bzw. den per Zufallsprinzip reduzierten Daten ergaben nahezu identische Ergebnisse. Mit der hier gemachten Erfahrung ist eine Komplettauszählung von Metastasenzellen nicht weiter zu empfehlen. Die Zuhilfenahme von Daten einer vorherigen Metastasenzählung in H.E.-Serienschnitten ist zur Auswahl von ungefärbten Nachbarschnitten mit möglichst vielen erwarteten Metastasen sehr hilfreich. Für Fälle mit insgesamt wenigen Metastasen kann in den H.E.-Schnitten die Metastasengröße und Zellzahl geschätzt werden, was bei der Festlegung einer zu zählende Gesamtzellzahl von Nutzen sein sollte. Auch könnte so abgeschätzt werden, ob für einige oder vielleicht alle Versuchstiere mehrere Schnitte zu färben sind. Die Zielmarker stellt somit einen Kompromiss zwischen Genauigkeit und Machbarkeit dar.

5.4. Ösophaguskarzinom (PT1590)-Xenograftmodell

In vitro zeigte Trastuzumab (Herceptin®) eine dosisabhängige antiproliferative Wirkung auf die HER2-überexprimierende Zelllinie PT1590. *In vivo* inhibierte Trastuzumab in einer Dosierung von 2 oder 10 mg/kg/Woche signifikant und in relevantem Ausmaß das Primärtumorwachstum von PT1590-Xenografttumoren in der scid-Maus. Beide Dosierungen unterschieden sich nicht hinsichtlich ihres wachstumshemmenden Effekts (Lüth et al., bisher unveröffentlicht). Die zytostatische Wirkung des 4D5-Antiköpers und seiner rekombinanten, humanisierten Variante Trastuzumab auf HER2-überexprimierende Mammakarzinom-Zelllinien (SKBR-3, BT474) *in vitro* konnte auf die dosisabhängige Induktion eines G1-Phasen-Arrests zurückgeführt werden, welcher über den Cdk2-Inhibitor p27^{Kip1} vermittelt wird (Sliwkowski et al. 1999; Lane et al. 2000; Yakes et al. 2002; Le et al. 2003). In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese verfolgt, dass der genannte zytostatische Mechanismus auch an der im PT1590-Xenograftmodell beobachteten wachstumshemmenden Wirkung von Trastuzumab beteiligt sein könnte. Es wurde daher vermutet, dass die in den Primärtumoren immunhistochemisch als repp86-Index bestimmbare relative Größe des S+G2+M-Pools von PT1590-Zellen unter Therapie mit Trastuzumab reduziert sei. Unklar war, ob es im Falle einer tatsächlichen Zellzyklusblockade/-verzögerung in der G1-Phase infolgedessen auch zu einer Verkleinerung die Wachstumsfraktion, d. h. des immunhistochemischen pKi-67-Indices käme.

Für die PT1590-Tumoren wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den beiden Therapiegruppen mit 2 und 10 mg/kg/Woche Trastuzumab bezüglich der Wachstumsfraktion gefunden, jedoch entgegen den vorausgegangenen Überlegungen im Sinne einer Zunahme. Die Wachstumsfraktion war in der 10 mg/kg/Woche-Gruppe statistisch hoch signifikant größer als in der Kontrollgruppe. Der Unterschied betrug absolut aber nur 5%. Bezogen auf den Kontrollwert war die Wachstumsfraktion unter 10 mg/kg/Woche Trastuzumab relativ um 16% größer. Im Vergleich zwischen der Kontrolle mit der niedrigen Dosierung sowie zwischen den beiden Dosierungen untereinander fand sich kein signifikanter Unterschied. Offensichtlich besteht eine Diskrepanz zwischen der Inhibition des Tumorwachstums einerseits und der Erhöhung der Wachstumsfraktion unter Trastuzumab andererseits. Der wachstumshemmende Effekt von Trastuzumab im PT1590-Xenografmodell kann damit nicht durch eine Reduktion der Wachstumsfraktion erklärt werden. Eine insgesamt negative Beeinflussung der Gewebsbilanz, wie anhand der Tumorgewichte beobachtet, ist nur möglich, wenn die Zunahme der Wachstumsfraktion durch eine Erhöhung der Zellverlustrate und/oder eine Verlängerung der Zellzyklusdauer überkompensiert wird.

Das Verhalten der Wachstumsfraktion unter einer Therapie mit Trastuzumab wurde bisher kaum untersucht. In einem Xenograft-Mausmodell des humanen HER2-überexprimierenden duktales Mammakarzinoms in situ (DCIS) führte die Therapie mit Trastuzumab zu keiner Reduktion der Wachstumsfraktion (Chan et al. 2001). In einer klinischen Pilotstudie zur neoadjuvanten Monotherapie mit Trastuzumab an 11 Patientinnen mit primärem HER2-überexprimierendem Mammakarzinom wurde zwischen prätherapeutischen Biopsien und OP-Präparaten kein Unterschied hinsichtlich des pKi-67-Indices gefunden (Gennari et al. 2004). In einer weiteren klinischen Studie zu neoadjuvanten Therapie des primären HER2-überexprimierenden Mammakarzinoms mit Trastuzumab an 35 Patientinnen konnte in sequentiellen Biopsien ebenfalls keine Änderung des pKi-67-Indices gefunden werden (Mohsin et al. 2005). In den angeführten Studien wurde aus dem Fehlen einer therapeutischen Reduktion der Wachstumsfraktion darauf geschlossen, dass Trastuzumab nicht antiproliferativ wirke (Diese Schlussfolgerung wurde in Abschnitt 5.2. ausführlich kritisiert.).

Entgegen der ursprünglichen Hypothese reduzierte die Therapie mit Trastuzumab im PT1590-Xenograftmodell den Anteil der Tumorzellen in den Zellzyklusphasen S+G2+M, immunhistochemisch bestimmt über den repp86-Index, nicht.

Die in den oben zitierten Untersuchungen an HER2-überexprimierenden Mammakarzinom-Zellen (SKBR-3, BT474) *in vitro* festgestellte Zunahme des G0+G1-Pools bzw. Reduktion S+G2+M-Pools (Durchflusszytometrie: DNA-Gehalt) unter 4D5 oder Trastuzumab konnte hier an den PT1590-Zellen unter Trastuzumab *in vivo* im Tiermodell nicht reproduziert werden (Immunhistochemie: repp86-Index).

Auch in zwei Xenograftmodellen HER2-überexprimierender Mammakarzinom-Zelllinien (LCC6^{HER-2}, MCF-7^{HER-2}) inhibierte Trastuzumab das Tumorwachstum (Tumorvolumen), ohne dass eine Störung der Zellzyklusverteilung (Durchflusszytometrie: DNA-Gehalt) nachgewiesen werden konnte (Warburton et al. 2004).

Im PT1590-Xenograftmodell war der repp86/pKi-67-Quotient als indirektes Maß des Verhältnisses vom S+G2+M-Pool zum G1-Pool unter der Therapie mit Trastuzumab vermindert, jedoch ohne ein statistisches Signifikanzniveau zu erreichen. Umgekehrt erscheint also der G1-Pool bezogen auf den S+G2+M-Pool tendenziell vergrößert zu sein, was durchaus in Einklang mit der Beteiligung eines G1-Arrests stünde. In der kombinierten Betrachtung gibt das differentielle Verhalten der Indices für pKi-67 und repp86 unter Trastuzumab Anhalt für eine Zunahme des G1-Pools auf Kosten des G0-Pools (pKi-67-Index größer), nicht aber auf Kosten des S+G2+M-Pools (repp86-Index gleich). Eine Steigerung der Proliferationsrate, wie aus einer isolierten Betrachtung von pKi-67 fälschlich geschlossen werden könnte, wird durch die kombinierte Sicht beider Marker nicht unterstützt. Der beobachtete negative Effekt von Trastuzumab auf das PT1590-Tumorwachstum kann aber bei fehlender Reduktion des S+G2+M-Pools in der vorliegenden Arbeit leider nicht erklärt werden.

In der Literatur werden Apoptose und Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität als Ursachen für eine direkte bzw. indirekte Zytoxizität von Trastuzumab diskutiert.

HER2-überexprimierende Mamma- und Ovarialkarzinom-Zelllinien sind resistent für die proapoptotischen Wirkung von TNF α (Hudziak et al. 1989; Lichtenstein et al. 1990; Zhou et al. 2000). Durch die Behandlung mit einem anti-HER2-Antikörper (4D5, der Vorläufer von Trastuzumab) konnten HER2-überexprimierende Mammakarzinomzellen gegenüber TNF α sensibilisiert werden (Hudziak et al. 1989). Ein anti-HER2-Antikörper (Trastuzumab) verstärkte auch die TRAIL (=TNF-related apoptosis-inducing ligand)-induzierte Apoptose in HER2-überexprimierenden Zelllinien des Mamma- und Ovarialkarzinoms (Cuello et al. 2001).

Die Herunterregulierung der HER2-Expression durch antisense-DNA induzierte in verschiedenen HER2-überexprimierenden Tumorzelllinien spontan die Apoptose (Roh et al. 2000). In dem Tumormodell einer immortalisierten murinen Fibroblasten-Zelllinie, welche HER2 unter einem Tetrazyklin-kontrollierten Promotor überexprimiert, führte das Abschalten der HER2-Expression zur Apoptose, Reduktion der Wachstumsfraktion und Tumorremission. Die Induktion der Apoptose, nicht aber die Reduktion der Wachstumsfraktion, erklärte die dort beobachteten Voll- und Teilremissionen (Schiffer et al. 2003).

Für die HER2-überexprimierende Mammakarzinom-Zelllinie SKBR-3 konnte *in vitro* eine Induktion der Apoptose als direkte Wirkung von Trastuzumab festgestellt werden (Moulder et al. 2001, Yakes et al. 2002). Auf die HER2-überexprimierende Mammakarzinom-Zelllinie BT474 aber wirkt Trastuzumab weder *in vitro* (Moulder et al. 2001, Argiris et al. 2004) noch *in vivo* (Moulder et al. 2001) proapoptotisch. In zehn unterschiedlichen Tumorzelllinien des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus besaß Trastuzumab *in vitro* eine nur marginale zytostatische und proapoptotische Wirkung (Mimura et al. 2005b). Zusammenfassend stellt der präklinische Nachweis einer direkten Induktion der Apoptose durch Trastuzumab eher die Ausnahme dar.

Bisher wurde zudem erst in einer einzigen klinischen Studie zu Trastuzumab die Apoptose als Mechanismus systematisch geprüft. In ihre Untersuchung von sequentiellen Biopsien im Rahmen einer neoadjuvanten Trastuzumab-Monotherapie des primären HER2-überexprimierenden Mammakarzinoms fanden Mohsin et al. (2005) eine Steigerung der Apoptose als Erklärung der beobachteten Remissionen.

In Gegenwart von mononukleären Zellen des peripheren Blutes oder isolierten NK-Zellen stimulierte Trastuzumab *in vitro* eine Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität (ADCC = *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) auf verschiedene HER2-positive Tumorzelllinien, wie zum Beispiel des Mammakarzinoms (Lewis et al. 1993; Cooley et al. 1999; Clynes et al. 2000; Carson et al. 2001; Kubo et al. 2003), des Ovarialkarzinoms (Lewis et al. 1993), des Magenkarzinoms (Lewis et al. 1993), des Kolorektalkarzinoms (Lewis et al. 1993) und des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus (Yamazaki et al. 2003; Mimura et al. 2005b).

In einem Xenograftmodell der HER2-überexprimierenden Mammakarzinom-Zelllinie BT474M1 konnte eine starke Abhängigkeit der wachstumshemmende Trastuzumab-Wirkung von der Interaktion des Fc-Fragments des Antikörpers (IgG1) mit aktivierenden und inhibierenden Fc γ -Rezeptoren auf mononukleären Zellen, und damit

eine tatsächliche Bedeutung der ADCC für die Trastuzumab-Wirkung *in vivo* aufgezeigt werden. Bei fehlender Expression von aktivierenden Fc γ -Rezeptoren wurde das Tumorstadium durch Trastuzumab um nur 29% reduziert, bei normaler Expression der Rezeptoren jedoch um 90% (Clynes et al. 2000). Dieses ist besonders interessant vor dem Hintergrund, dass Trastuzumab auf BT474-Zellen *in vitro* eine zytostatische Wirkung besitzt (Sliwkowski et al. 1999; Lane et al. 2000; Le et al. 2003). Ein zytostatischer Effekt scheint aber in dem Versuch von Clynes et al. *in vivo* eine gegenüber der ADCC untergeordnete Rolle gespielt zu haben.

Auf vier HER2-überexprimierenden Zelllinien von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus hatte Trastuzumab *in vitro* keinen antiproliferativen Effekt, führte jedoch bei zwei der Zelllinien in Gegenwart mononukleärer Zellen zu einer dosisabhängigen ADCC. Im Mausmodell konnte Trastuzumab das Wachstum von Xenografttumoren dieser Zellen signifikant inhibieren (Yamazaki et al. 2003). In der Arbeit von Mimura et al. (2005b) induzierte Trastuzumab bei einer Reihe von humanen Zelllinien des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus *in vitro* eine ADCC, deren Stärke vom Grad der HER2-Expression der Zellen abhängig war. Bei nur marginaler zytostatischer und proapoptotischer Wirkung wurde hier die ADCC als der wesentliche Wirkmechanismus von Trastuzumab angesehen.

In der bereits weiter oben zitierten klinischen Pilotstudie zur neoadjuvanten Trastuzumab-Monotherapie des primären HER2-überexprimierenden Mammakarzinoms zeigte sich für Patientinnen mit einer kompletten oder partiellen Remission *in situ* eine stärkere Leukozyteninfiltration und *in vitro* eine stärkere ADCC-Aktivität (von autologen mononukleären Zellen mit autologem Serum auf eine HER2-überexprimierende humane Mammakarzinomzelllinie) als für Patientinnen ohne Ansprechen auf die Therapie (Gennari et al. 2004). Der in Biopsien von primären Mammakarzinomen unter einer Therapie mit Trastuzumab durch Mohsin et al. (2005) beobachtete Anstieg der Apoptose könnte entsprechend der Argumentation von Menard et al. (2005) auch Effekt einer klinisch bedeutsamen ADCC anstelle einer direkten Apoptoseinduktion sein.

Da in der vorliegenden Arbeit durch die Analyse der zellzyklusassoziierten Antigene pKi-67 und repp86 entgegen der ursprünglichen Hypothese kein Hinweis für eine zytostatische Wirkung von Trastuzumab im PT1590-Xenograftmodell gefunden werden konnte, sollten künftige Untersuchungen in diesem *in vivo*-Tumormodell gezielt nach Apoptoseinduktion und ADCC als möglichen zytotoxischen Wirkmechanismen suchen.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels immunhistochemischer Analyse der zellzyklusassoziierten Antigene pKi-67 (spezifisch für die Zellzyklusphasen G1+S+G2+M) und repp86 (S+G2+M) in Xenograftmodellen humaner Tumoren in der scid-Maus zur Therapie des malignen Melanoms (MV3) mit ML-I und Therapie des Ösophagus-Adenokarzinoms (PT1590) mit Trastuzumab untersucht, ob die dort jeweils festgestellte therapeutische Wirksamkeit mit einer Reduktion der durch die genannten Marker erfassten proliferativen Zellpools im Zusammenhang steht. Die Therapie mit ML-I (30 ng/kg/d) im MV3-Xenograftmodell hatte weder in den Primärtumoren noch in den Lungenmetastasen einen Einfluss auf die Wachstumsfraktion, d. h. den Anteil der Tumorzellen in den Zellzyklusphasen G1+S+G2+M. Darüber hinaus verringerte ML-I auch nicht den Anteil der Primärtumorzellen in den Zellzyklusphasen S+G2+M. Eine Verkleinerung dieser proliferativen Zellpools als (Teil-) Ursache der beobachteten therapeutischen Inhibition von Primärtumorwachstums und Metastasierung kann damit ausgeschlossen werden. Primärtumoren und Lungenmetastasen unterschieden sich im Median nicht in der Größe der Wachstumsfraktion. Die Therapie von PT1590-Xenografttumoren mit Trastuzumab (2 und 10 mg/kg/Woche) führte zu keiner Änderung des Anteils an Tumorzellen in den Zellzyklusphasen S+G2+M und sogar zu einer statistisch hochsignifikanten, wenngleich geringen Vergrößerung (10 mg/kg/d) der Wachstumsfraktion. Die beobachtete therapeutische Inhibition des Tumorwachstums kann folglich nicht durch eine Verkleinerung dieses proliferativen Zellpools erklärt werden. Die kombinierte Betrachtung der beiden Marker gab Anhalt für eine geringe absolute Zunahme des G1-Pools auf Kosten des G0-Pools unter Trastuzumab, mit der Analyse der repp86/pKi-67-Quotienten konnte aber kein statistisch signifikanter Hinweis auf eine Störung der Zellzyklusphasenverteilung zwischen den Pools G1 und S+G2+M gefunden werden.

Die Lagerung von formalinfixierten Paraffinschnitten über ein Jahr bei Raumtemperatur vor Immunhistochemie mit kurzer Vorbehandlung in siedendem Citratpuffer führte zu einem relevanten Abfall des Labelingindices des Antikörpers MIB-1 (pKi-67) im Vergleich zu frisch angefertigten Paraffinschnitten. Dieser Abfall war durch eine Verlängerung der Vorbehandlungszeit bei reduzierter Temperatur kompensierbar.

Die Antikörper MIB-1, Ki-S11 und KA7 lieferten im Wesentlichen vergleichbare Bestimmungen der Wachstumsfraktion in verschiedenen Tumoren, wenngleich die mittels Ki-S11 gemessenen Werte tendenziell kleiner waren.

7. Literaturverzeichnis

Abuharbeid S, Apel J, Sander M, Fiedler B, Langer M, Zuzarte ML, Czubyko F, Aigner A (2004) Cytotoxicity of the novel anti-cancer drug rViscumin depends on HER-2 levels in SKOV-3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 321:403-12

Antony S, Kuttan R, Kuttan G (1997) Effect of viscum album in the inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F10 melanoma cells. *J Exp Clin Cancer Res* 16:159-62

Argiris A, Wang CX, Whalen SG, DiGiovanna MP (2004) Synergistic interactions between tamoxifen and trastuzumab (Herceptin). *Clin Cancer Res* 10:1409-20

Atkins D, Reiffen KA, Tegtmeier CL, Winther H, Bonato MS, Storkel S (2004) Immunohistochemical detection of EGFR in paraffin-embedded tumor tissues: variation in staining intensity due to choice of fixative and storage time of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 52:893-901

Augustin M, Bock PR, Hanisch J, Karasmann M, Schneider B (2005) Safety and efficacy of the long-term adjuvant treatment of primary intermediate-to high-risk malignant melanoma (UICC/AJCC stage II and III) with a standardized fermented European mistletoe (*Viscum album* L.) extract. Results from a multicenter, comparative, epidemiological cohort study in Germany and Switzerland. *Arzneimittelforschung* 55:38-49

Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF (2001) Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 19:3635-3648

Barnhill RL, Piepkorn MW, Cochran AJ, Flynn E, Karaoli T, Folkman J (1998) Tumor vascularity, proliferation, and apoptosis in human melanoma micrometastases and macrometastases. *Arch Dermatol* 134:991-4

Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, Sklarin NT, Seidman AD, Hudis CA, Moore J, Rosen PP, Twaddell T, Henderson IC, Norton L (1996) Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 14:737-44

Baselga J (2001a) Phase I and II clinical trials of trastuzumab. *Ann Oncol* 12 Suppl 1:S49-55

Baselga J, Albanell J, Molina MA, Arribas J (2001b) Mechanism of action of trastuzumab and scientific update. *Semin Oncol* 28 Suppl 16:S4-11

Baselga J, Perez EA, Pienkowski T, Bell R (2006) Adjuvant Trastuzumab: A Milestone in the Treatment of HER-2-Positive Early Breast Cancer. *Oncologist* 11 Suppl 1:S4-12

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

Berger AC, Farma J, Scott WJ, Freedman G, Weiner L, Cheng JD, Wang H, Goldberg M (2005) Complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy in esophageal carcinoma is associated with significantly improved survival. *J Clin Oncol* 23:4330-7

Bertheau P, Cazals-Hatem D, Meignin V, de Roquancourt A, Verola O, Lesourd A, Sene C, Brocheriou C, Janin A (1998) Variability of immunohistochemical reactivity on stored paraffin slides. *J Clin Pathol* 51:370-4

Beuth J, Ko HL, Gabius HJ, Burrichter H, Oette K, Pulverer G (1992) Behavior of lymphocyte subsets and expression of activation markers in response to immunotherapy with galactoside-specific lectin from mistletoe in breast cancer patients. *Clin Investig* 70:658-61

Bonatz G, Frahm SO, Klapper W, Helfenstein A, Heidorn K, Jonat W, Krupp G, Parwaresch R, Rudolph P (2001) High telomerase activity is associated with cell cycle deregulation and rapid progression in endometrioid adenocarcinoma of the uterus. *Hum Pathol* 32:605-14

Brien TP, Odze RD, Sheehan CE, McKenna BJ, Ross JS (2000) HER-2/neu gene amplification by FISH predicts poor survival in Barrett's esophagus-associated adenocarcinoma. *Hum Pathol* 31:35-9

Bromley CM, Palechek PL, Benda J (1994) Preservation of estrogen receptor in paraffin sections. *J Histotechnol* 17:115-8

Brown DC, Gatter KC (2002) Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 40:2-11

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

Burger AM, Mengs U, Kelter G, Schuler JB, Fiebig HH (2003) No evidence of stimulation of human tumor cell proliferation by a standardized aqueous mistletoe extract in vitro. *Anticancer Res* 23:3801-6

Cameron MD, Schmidt EE, Kerkvliet N, Nadkarni KV, Morris VL, Groom AC, Chambers AF, MacDonald IC (2000) Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Res* 60:2541-6

Carson WE, Parihar R, Lindemann MJ, Personeni N, Dierksheide J, Meropol NJ, Baselga J, Caligiuri MA (2001) Interleukin-2 enhances the natural killer cell response to Herceptin-coated Her2/neu-positive breast cancer cells. *Eur J Immunol* 31:3016-25

Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM (1992) Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4285-9

Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes J (1992) Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 168:357-63

Chan KC, Knox WF, Gandhi A, Slamon DJ, Potten CS, Bundred NJ (2001) Blockade of growth factor receptors in ductal carcinoma in situ inhibits epithelial proliferation. *Br J Surg* 88:412-8

Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV (2000) Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets *Nat Med* 6:443-6

Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Lieberman G, Slamon DJ (1999) Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 17:2639-48

Cooley S, Burns LJ, Repka T, Miller JS (1999) Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of antibody-dependent cellular cytotoxicity against LFA-3 and HER2/neu. *Exp Hematol* 27:1533-41

Cuello M, Etenberg SA, Clark AS, Keane MM, Posner RH, Nau MM, Dennis PA, Lipkowitz S (2001) Down-regulation of the erbB-2 receptor by trastuzumab (herceptin) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines that overexpress erbB-2. *Cancer Res* 61:4892-900

Dahlberg PS, Jacobson BA, Dahal G, Fink JM, Kratzke RA, Maddaus MA, Ferrin LJ (2004) ERBB2 amplifications in esophageal adenocarcinoma. *Ann Thorac Surg* 78:1790-800

Dautel P (2006) Multidimensionale Wirkung des hochaufgereinigten Mistlektins-I auf das humane maligne Melanom im Scid-Maus Xenograft-Modell. Dissertation Medizin, Universität Hamburg

- DiVito KA, Charette LA, Rimm DL, Camp RL (2004) Long-term preservation of antigenicity on tissue microarrays. *Lab Invest* 84:1071-8
- Eck J, Langer M, Mockel B, Baur A, Rothe M, Zinke H, Lentzen H (1999a) Cloning of the mistletoe lectin gene and characterization of the recombinant A-chain. *Eur J Biochem* 264:775-784
- Eck J, Langer M, Mockel B, Witthohn K, Zinke H, Lentzen H (1999b) Characterization of recombinant and plant-derived mistletoe lectin and their B-chains. *Eur J Biochem* 265:788-797
- Endl E, Hollmann C, Gerdes J (2001) Antibodies against the Ki-67 protein: assessment of the growth fraction and tools for cell cycle analysis. *Methods Cell Biol* 63:399-418
- Enzinger PC, Mayer RJ (2003) Esophageal cancer. *N Engl J Med* 349:2241-52
- Ernst E, Schmidt K, Steuer-Vogt MK (2003) Mistletoe for cancer? A systematic review of randomised clinical trials. *Int J Cancer* 107:262-267
- Fenton RG, Longo DL (2005) Cancer cell biology and angiogenesis. In: Kasper DL et al. (editors), *Harrison's principles of internal medicine*, 16th ed., p 453-464, Mc Graw-Hill New York
- Fergenbaum JH, Garcia-Closas M, Hewitt SM, Lissowska J, Sakoda LC, Sherman ME (2004) Loss of antigenicity in stored sections of breast cancer tissue microarrays. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:667-72
- Fiorica F, Di Bona D, Schepis F, Licata A, Shahied L, Venturi A, Falchi AM, Craxi A, Camma C (2004) Preoperative chemoradiotherapy for oesophageal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gut* 53:925-30
- Flejou JF, Paraf F, Muzeau F, Fekete F, Henin D, Jothy S, Potet F (1994) Expression of c-erbB-2 oncogene product in Barrett's adenocarcinoma: pathological and prognostic correlations. *J Clin Pathol* 47:23-6
- Franz H (1986) Mistletoe lectins and their A and B chains. *Oncology* 43 Suppl 1:S23-34
- Fritsch P, Zelger B, Sepp N (2004) Melanozytäre Tumoren. In: Fritsch P (Herausg.), *Dermatologie Venerologie*, 2. Aufl., p 618-647, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg
- Geh JI, Crellin AM, Glynn-Jones R (2001) Preoperative (neoadjuvant) chemoradiotherapy in oesophageal cancer. *Br J Surg* 88:338-56
- Gennari R, Menard S, Fagnoni F, Ponchio L, Scelsi M, Tagliabue E, Castiglioni F, Villani L, Magalotti C, Gibelli N, Oliviero B, Ballardini B, Da Prada G, Zambelli A, Costa A (2004) Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clin Cancer Res* 10:5650-5
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983) Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31:13-20
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133:1710-5
- Gerdes J, Li L, Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD (1991) Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 138:867-73
- Gerdes J, Becker MH, Key G, Cattoretti G (1992) Immunohistological detection of tumour growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. *J Pathol* 168:85-6
- Grabau DA, Nielsen O, Hansen S, Nielsen MM, Laenkholm A-V, Knoop A, Pfeiffer P (1998) Influence of storage temperature and high-temperature antigen retrieval buffers on results of immunohistochemical staining in sections stored for long periods. *Appl Immunohistochem* 6:209-13

Hahn P (2000) Apoptoseinduzierende und antimutagene Wirkung von *Viscum album* L. auf humane Zellkulturen. Dissertation Biologie, Universität Kaiserslautern

Hajtó T, Hostanska K, Gabius HJ (1989) Modulatory potency of the beta-galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defense system in vivo in rabbits and patients. *Cancer Res.* 49:4803-8

Hajtó T, Hostanska K, Frei K, Rordorf C, Gabius HJ (1990) Increased secretion of tumor necrosis factors alpha, interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to beta-galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract. *Cancer Res.* 50:3322-6

Hajtó T, Hostanska K, Weber K, Zinke H, Fischer J, Mengers U, Lentzen H, Saller R (1998) Effect of a recombinant lectin, *Viscum album* agglutinin on the secretion of interleukin-12 in cultured human peripheral blood mononuclear cells and on NK-cell-mediated cytotoxicity of rat splenocytes in vitro and in vivo. *Nat Immun.* 16:34-46

Hajtó T, Berki T, Boldizsár F, Németh P (2003) Galactoside-specific plant lectin, *Viscum album* agglutinin-I induces enhanced proliferation and apoptosis of murine thymocytes in vivo. *Immunol Lett* 86:23-7.

Hajtó T, Hostanska K, Berki T, Pálinkás L, Boldizsár F and Németh P (2005) Oncopharmacological Perspectives of a Plant Lectin (*Viscum album* Agglutinin-I): Overview of Recent Results from In vitro Experiments and In vivo Animal Models, and Their Possible Relevance for Clinical Applications. *Evid Based Complement Alternat Med* 2:59-67

Hardwick RH, Barham CP, Ozua P, Newcomb PV, Savage P, Powell R, Rahamin J, Alderson D (1997) Immunohistochemical detection of p53 and c-erbB-2 in oesophageal carcinoma; no correlation with prognosis. *Eur J Surg Oncol* 23:30-5

Harmsma M, Gromme M, Ummelen M, Dignef W, Tusenius KJ, Ramaekers FC (2004) Differential effects of *Viscum album* extract IscadorQu on cell cycle progression and apoptosis in cancer cells. *Int J Oncol* 25:1521-9

Hawkin RA, Arends MJ, Ritchie AA, Langdon S, Miller WR (2000) Tamoxifen increases apoptosis but does not influence markers of proliferation in an MCF-7 xenograft model of breast cancer. *Breast* 9:96-106

Heidebrecht HJ, Buck F, Steinmann J, Sprenger R, Wacker HH, Parwaresch R (1997) p100: a novel proliferation-associated nuclear protein specifically restricted to cell cycle phases S, G2, and M. *Blood* 90:226-33

Heidebrecht HJ, Adam-Klages S, Szczepanowski M, Pollmann M, Buck F, Endl E, Kruse ML, Rudolph P, Parwaresch R (2003) repp86: A human protein associated in the progression of mitosis. *Mol Cancer Res* 1:271-9

Hosch S, Kraus J, Scheunemann P, Izbicki JR, Schneider C, Schumacher U, Witter K, Speicher MR, Pantel K (2000) Malignant potential and cytogenetic characteristics of occult disseminated tumor cells in esophageal cancer. *Cancer Res* 60:6836-40

Hostanska K, Hajtó T, Spagnoli GC, Fischer J, Lentzen H, Herrmann R (1995) A plant lectin derived from *Viscum album* induces cytokine gene expression and protein production in cultures of human peripheral blood mononuclear cells. *Nat Immun.* 14:295-304

Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, Fendly BM, Shepard HM, Ullrich A (1989) p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 9:1165-72

Jacobs TW, Prioleau JE, Stillman IE, Schnitt SJ (1996) Loss of tumor marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 88:1054-9

- Janssen O, Scheffler A, Kabelitz D (1993) In vitro effects of mistletoe extracts and mistletoe lectins. Cytotoxicity towards tumor cells due to the induction of programmed cell death (apoptosis). *Arzneimittelforschung* 43:1221-1227
- Jojovic M, Schumacher U (2000) Quantitative assessment of spontaneous lung metastases of human HT29 colon cancer cells transplanted into SCID mice. *Cancer Lett* 152:151-6
- Kato J, Sakamaki S, Niitsu Y (1995) More on p53 antigen loss in stored paraffin slides. *N Engl J Med* 333:1507-8
- Katoh M, Neumaier M, Nezam R, Izbicki JR, Schumacher U (2004a) Correlation of circulating tumor cells with tumor size and metastatic load in a spontaneous lung metastasis model. *Anticancer Res* 24:1421-5
- Katoh M, Feldhaus S, Schnitzer T, Bauer S, Schumacher U (2004b) Limited tumor growth (HT29) in vivo under RO205-2349 is due to increased apoptosis and reduced cell volume but not to decreased proliferation rate. *Cancer Lett* 210:7-15
- Kellner U, Heidebrecht HJ, Rudolph P, Biersack H, Buck F, Dakowski T, Wacker HH, Domanowski M, Seidel A, Westergaard O, Parwaresch R (1997) Detection of human topoisomerase II alpha in cell lines and tissues: characterization of five novel monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 45:251-63
- Key G, Becker MH, Baron B, Duchrow M, Schluter C, Flad HD, Gerdes J (1993) New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. *Lab Invest* 68:629-36
- Kim SH, Kook MC, Shin YK, Park SH, Song HG (2004) Evaluation of antigen retrieval buffer systems. *J Mol Histol* 35:409-16.
- Kim JJ, Tannock IF (2005) Repopulation of cancer cells during therapy: an important cause of treatment failure. *Nat Rev Cancer* 5:516-25
- Kirkwood JM, Strawderman MH, Ernstoff MS, Smith TJ, Borden EC, Blum RH (1996) Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J Clin Oncol* 14:7-17
- Kirkwood JM, Ibrahim JG, Sosman JA, Sondak VK, Agarwala SS, Ernstoff MS, Rao U (2001) High-dose interferon alfa-2b significantly prolongs relapse-free and overall survival compared with the GM2-KLH/QS-21 vaccine in patients with resected stage IIB-III melanoma: results of intergroup trial E1694/S9512/C509801. *J Clin Oncol* 19:2370-2380
- Kirkwood JM, Manola J, Ibrahim J, Sondak V, Ernstoff MS, Rao U; Eastern Cooperative Oncology Group (2004) A pooled analysis of eastern cooperative oncology group and intergroup trials of adjuvant high-dose interferon for melanoma. *Clin Cancer Res* 10:1670-7
- Kleeberg UR, Suci S, Brocker EB, Ruitter DJ, Chartier C, Lienard D, Marsden J, Schadendorf D, Eggermont AM; EORTC Melanoma Group in cooperation with the German Cancer Society (2004) Final results of the EORTC 18871/DKG 80-1 randomised phase III trial. rIFN-alpha2b versus rIFN-gamma versus ISCADOR M versus observation after surgery in melanoma patients with either high-risk primary (thickness >3 mm) or regional lymph node metastasis. *Eur J Cancer* 40:390-402
- Kourmanova AG, Soudarkina OJ, Olsnes S, Kozlov JV (2004) Cloning and characterization of the genes encoding toxic lectins in mistletoe (*Viscum album* L). *Eur J Biochem* 271:2350-2360
- Krams M, Heidebrecht HJ, Hero B, Berthold F, Harms D, Parwaresch R, Rudolph P (2003) Repp86 expression and outcome in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol* 21:1810-8
- Kreipe H, Heidebrecht HJ, Hansen S, Rohlk W, Kubbies M, Wacker HH, Tiemann M, Radzun HJ, Parwaresch R (1993a) A new proliferation-associated nuclear antigen detectable in paraffin-embedded tissues by the monoclonal antibody Ki-S1. *Am J Pathol* 142:3-9

- Kreipe H, Wacker HH, Heidebrecht HJ, Haas K, Hauberg M, Tiemann M, Parwaresch R (1993b) Determination of the growth fraction in non-Hodgkin's lymphomas by monoclonal antibody Ki-S5 directed against a formalin-resistant epitope of the Ki-67 antigen. *Am J Pathol* 142:1689-94
- Kubbutat MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Flad HD, Gerdes J (1994) Epitope analysis of antibodies recognising the cell proliferation associated nuclear antigen previously defined by the antibody Ki-67 (Ki-67 protein). *J Clin Pathol* 47:524-8
- Kubo M, Morisaki T, Kuroki H, Tasaki A, Yamanaka N, Matsumoto K, Nakamura K, Onishi H, Baba E, Katano M (2003) Combination of adoptive immunotherapy with Herceptin for patients with HER2-expressing breast cancer. *Anticancer Res* 23:4443-9
- Kumar R, Yarmand-Bagheri R (2001) The role of HER2 in angiogenesis. *Semin Oncol* 28 Suppl 16:S27-32
- Lane HA, Beuvink I, Motoyama AB, Daly JM, Neve RM, Hynes NE (2000) ErbB2 potentiates breast tumor proliferation through modulation of p27(Kip1)-Cdk2 complex formation: receptor overexpression does not determine growth dependency. *Mol Cell Biol* 20:3210-23
- Langer M, Mockel B, Eck J, Zinke H, Lentzen H (1999) Site-specific mutagenesis of mistletoe lectin: the role of RIP activity in apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 264:944-8
- LaRue KE, Khalil M, Freyer JP (2004) Microenvironmental regulation of proliferation in multicellular spheroids is mediated through differential expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Cancer Res* 64:1621-31
- Le XF, Claret FX, Lammayot A, Tian L, Deshpande D, LaPushin R, Tari AM, Bast RC Jr. (2003) The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in anti-HER2 antibody-induced G1 cell cycle arrest and tumor growth inhibition. *J Biol Chem* 278:23441-50
- Lewis GD, Figari I, Fendly B, Wong WL, Carter P, Gorman C, Shepard HM (1993) Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Immunother* 37:255-63
- Liang K, Lu Y, Jin W, Ang KK, Milas L, Fan Z (2003) Sensitization of breast cancer cells to radiation by trastuzumab. *Mol Cancer Ther* 2:1113-20
- Lichtenstein A, Berenson J, Gera JF, Waldburger K, Martinez-Maza O, Berek JS (1990) Resistance of human ovarian cancer cells to tumor necrosis factor and lymphokine-activated killer cells: correlation with expression of HER2/neu oncogenes. *Cancer Res* 50:7364-70
- Lüth M, Scheunemann P, Hosch SB, Knöfel WT, Schumacher U, ... (bisher unveröffentlicht) Herceptin Treatment of Human Metastatic Esophageal Cancer in SCID-Mouse Xenografts with HER-2/neu Overexpression
- Lyu SY, Park WB, Choi KH, Kim WH (2001) Involvement of caspase-3 in apoptosis induced by *Viscum album* var. *coloratum* agglutinin in HL-60 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 65:534-541
- Mansky PJ (2002) Mistletoe and cancer: controversies and perspectives. *Semin Oncol* 29:589-594
- Malthaner RA, Wong RK, Rumble RB, Zuraw L; Members of the Gastrointestinal Cancer Disease Site Group of Cancer Care Ontario's Program in Evidence-based Care (2004) Neoadjuvant or adjuvant therapy for resectable esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med* 2:35
- McCormick D, Hall PA (1992) The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology* 21:591-4
- Menard S, Pupa SM, Campiglio M, Balsari A, Fagnoni F, Costa A, Tagliabue E (2005) Apoptosis induction by trastuzumab: possible role of the core biopsy Intervention [letter to the editor]. *J Clin Oncol* 23:7238-40

- Miller CT, Moy JR, Lin L, Schipper M, Normolle D, Brenner DE, Iannettoni MD, Orringer MB, Beer DG (2003) Gene amplification in esophageal adenocarcinomas and Barrett's with high-grade dysplasia. *Clin Cancer Res* 9:4819-25
- Mimura K, Kono K, Hanawa M, Mitsui F, Sugai H, Miyagawa N, Ooi A, Fujii H (2005a) Frequencies of HER-2/neu expression and gene amplification in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 92:1253-60
- Mimura K, Kono K, Hanawa M, Kanzaki M, Nakao A, Ooi A, Fujii H (2005b) Trastuzumab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity against esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 11:4898-904
- Mitchell BS, Schumacher U (1997) Use of immunodeficient mice in metastasis research. *Br J Biomed Sci* 54:278-86
- Miyoshi N, Koyama Y, Katsuno Y, Hayakawa S, Mita T, Ohta T, Kaji K, Isemura M (2001) Apoptosis induction associated with cell cycle dysregulation by rice bran agglutinin. *J Biochem (Tokyo)* 130:799-805
- Mohsin SK, Weiss HL, Gutierrez MC, Chamness GC, Schiff R, Digiovanna MP, Wang CX, Hilsenbeck SG, Osborne CK, Allred DC, Elledge R, Chang JC (2005) Neoadjuvant trastuzumab induces apoptosis in primary breast cancers. *J Clin Oncol* 23:2460-8
- Montemurro F, Aglietta M (2005) Incorporating trastuzumab into the neoadjuvant treatment of HER2-overexpressing breast cancer. *Clin Breast Cancer* 6:77-80
- Moulder SL, Yakes FM, Muthuswamy SK, Bianco R, Simpson JF, Arteaga CL (2001) Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 61:8887-95
- Nahta R, Esteva FJ (2003) HER-2-targeted therapy: lessons learned and future directions. *Clin Cancer Res* 9:5078-84
- Nakamura T, Nekarda H, Hoelscher AH, Bollschweiler E, Harbeck N, Becker K, Siewert JR, Harbeck N (1994) Prognostic value of DNA ploidy and c-erbB-2 oncoprotein overexpression in adenocarcinoma of Barrett's esophagus. *Cancer* 73:1785-94
- Nakanishi H, Abe A, Inada K, Tsukamoto T, Yasui K, Tatematsu M (1999) Induction of apoptosis in metastatic foci from human gastric cancer xenografts in nude mice and reduction of circulating tumor cells in blood by 5-FU and 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil. *J Cancer Res Clin Oncol* 125:660-8
- Neve RM, Lane HA, Hynes NE (2001) The role of overexpressed HER2 in transformation. *Ann Oncol* 12 Suppl 1:S9-13
- Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 19:3159-67
- Park WB, Ju YJ, Han SK (1998) Isolation and characterization of beta-galactoside specific lectin from Korean mistletoe (*Viscum album* var. *coloratum*) with lactose-BSA-sepharose 4B and changes of lectin conformation. *Arch Pharm Res* 21:429-435
- Park WB, Lyu SY, Kim JH, Choi SH, Chung HK, Ahn SH, Hong SY, Yoon TJ, Choi MJ (2001) Inhibition of tumor growth and metastasis by Korean mistletoe lectin is associated with apoptosis and antiangiogenesis. *Cancer Biother Radiopharm* 16:439-47
- Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, Weber BL, Baselga JM, Tripathy D, Baly D, Baughman SA, Twaddell T, Glaspy JA, Slamon DJ (1998) Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol* 16:2659-71

- Polkowski W, van Sandick JW, Offerhaus GJ, ten Kate FJ, Mulder J, Obertop H, van Lanschot JJ (1999) Prognostic value of Lauren classification and c-erbB-2 oncogene overexpression in adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Ann Surg Oncol* 6:290-7
- Prioleau J, Schnitt SJ (1995) p53 antigen loss in stored paraffin slides. *N Engl J Med* 332:1521-2
- Pryme IF, Bardocz S, Pusztai A, Ewen SW (2002) Dietary mistletoe lectin supplementation and reduced growth of a murine non-Hodgkin lymphoma. *Histol Histopathol* 17:261-71
- Queirolo P, Acquati M, Kirkwood JM, Eggermont AM, Rocca A, Testori A (2005) Update: current management issues in malignant melanoma. *Melanoma Res* 15:319-324
- Roh H, Pippin J, Drebin JA (2000) Down-regulation of HER2/neu expression induces apoptosis in human cancer cells that overexpress HER2/neu. *Cancer Res* 60:560-5
- Ross JS, McKenna BJ (2001) The HER-2/neu oncogene in tumors of the gastrointestinal tract. *Cancer Invest* 19:554-68
- Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Pusztai L, Bloom KJ (2003) The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist* 8:307-25
- Rubin I, Yarden Y (2001) The basic biology of HER2. *Ann Oncol* 12 Suppl 1:S3-8
- Rudolph P, Parwaresch R (1996) The Cell Cycle – Theory and Application. *Onkologie* 19:464-472
- Rudolph P, Kellner U, Chassevent A, Collin F, Bonichon F, Parwaresch R, Coindre JM (1997) Prognostic relevance of a novel proliferation marker, Ki-S11, for soft-tissue sarcoma. A multivariate study. *Am J Pathol* 150:1997-2007
- Rudolph P, Knuchel R, Endl E, Heidebrecht HJ, Hofstader F, Parwaresch R (1998) The immunohistochemical marker Ki-S2: cell cycle kinetics and tissue distribution of a novel proliferation-specific antigen. *Mod Pathol* 11:450-6
- Rudolph P, Alm P, Heidebrecht HJ, Bolte H, Ratjen V, Baldetorp B, Ferno M, Olsson H, Parwaresch R (1999) Immunologic proliferation marker Ki-S2 as prognostic indicator for lymph node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 91:271-8
- Safran H, DiPetrillo T, Nadeem A, Steinhoff M, Tantravahi U, Rathore R, Wanebo H, Hughes M, Maia C, Tsai JY, Pasquariello T, Pepperell JR, Cioffi W, Kennedy T, Reeder L, Ng T, Adrian A, Goldstein L, Chak B, Choy H (2004) Trastuzumab, paclitaxel, cisplatin, and radiation for adenocarcinoma of the esophagus: a phase I study. *Cancer Invest* 22:670-7
- Savoie A, Lavastre V, Pelletier M, Hajto T, Hostanska K, Girard D (2000) Activation of human neutrophils by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I: modulation of de novo protein synthesis and evidence that caspases are involved in induction of apoptosis. *J Leukoc Biol* 68:845-53
- Schiffer IB, Gebhard S, Heimerdinger CK, Heling A, Hast J, Wollscheid U, Seliger B, Tanner B, Gilbert S, Beckers T, Baasner S, Brenner W, Spangenberg C, Prawitt D, Trost T, Schreiber WG, Zabel B, Thelen M, Lehr HA, Oesch F, Hengstler JG (2003) Switching off HER-2/neu in a tetracycline-controlled mouse tumor model leads to apoptosis and tumor-size-dependent remission. *Cancer Res* 63:7221-31
- Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, Gerdes J (1993) The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 123:513-22
- Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182:311-22
- Schumacher U, Stamouli A, Adam E, Peddie M, Pfuller U (1995) Biochemical, histochemical and cell biological investigations on the actions of mistletoe lectins I, II and III with human breast cancer cell lines. *Glycoconj J* 12:250-257

- Schumacher U, Feldhaus S, Mengs U (2000) Recombinant mistletoe lectin (rML) is successful in treating human ovarian cancer cells transplanted into severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Cancer Lett* 150:171-5
- Sham E, Durand RE (1999) Cell kinetics and repopulation parameters of irradiated xenograft tumours in SCID mice: comparison of two dose-fractionation regimens. *Eur J Cancer* 35:850-8
- Sharma R, Adam E, Schumacher U (1997) The action of 5-fluorouracil on human HT29 colon cancer cells grown in SCID mice: mitosis, apoptosis and cell differentiation. *Br J Cancer* 76:1011-6
- Shi SR, Key ME, Kalra KL (1991) Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39:741-8
- Shi SR, Imam SA, Young L, Cote RJ, Taylor CR (1995) Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 43:193-201
- Shi SR, Cote RJ, Taylor CR (1997) Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. *J Histochem Cytochem* 45:327-43
- Shi SR, Cote RJ, Liu C, Yu MC, Castelao JE, Ross RK, Taylor CR (2002) A modified reduced-temperature antigen retrieval protocol effective for use with a polyclonal antibody to cyclooxygenase-2 (PG 27). *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 10:368-73
- Shin HJ, Kalapurakal SK, Lee JJ, Ro JY, Hong WK, Lee JS (1997) Comparison of p53 immunoreactivity in fresh-cut versus stored slides with and without microwave heating. *Mod Pathol* 10:224-30
- Siegle I, Fritz P, McClellan M, Gutzeit S, Murdter TE (2001) Combined cytotoxic action of *Viscum album* agglutinin-1 and anticancer agents against human A549 lung cancer cells. *Anticancer Res* 21:2687-91
- Sievert JR, Stein HJ (2001) Ösophaguskarzinom. In: Sievert JR (Herausg.), *Chirurgie*, 7. Aufl., p 569-578, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235:177-82
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244:707-12
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344:783-92
- Sliwkowski MX, Lofgren JA, Lewis GD, Hotaling TE, Fendly BM, Fox JA (1999) Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol* 26 Suppl 12:S60-70
- Sunpaweravong P, Sunpaweravong S, Puttawibul P, Mitarnun W, Zeng C, Baron AE, Franklin W, Said S, Varella-Garcia M (2005) Epidermal growth factor receptor and cyclin D1 are independently amplified and overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 131:111-9
- Taylor CR, Shi SR, Chaiwun B, Young L, Imam SA, Cote RJ (1994) Strategies for improving the immunohistochemical staining of various intranuclear prognostic markers in formalin-paraffin sections by antigen retrieval techniques. *Hum Pathol* 25:263-70
- Tew WP, Kelsen DP, Ilson DH (2005) Targeted therapies for esophageal cancer. *Oncologist* 10:590-601
- Thies A, Pfüller U, Schachner M, Horny HP, Molls I, Schumacher U (2001) Binding of mistletoe lectins to cutaneous malignant melanoma: implications for prognosis and therapy. *Anticancer Res* 21:2883-7

- Thies A, Nugel D, Pfuller U, Moll I, Schumacher U (2005a) Influence of mistletoe lectins and cytokines induced by them on cell proliferation of human melanoma cells in vitro. *Toxicology* 207:105-116
- Thies A, Meyer A, Dautel P, Hirche A, Nugel D, Pfuller U, Schumacher U (2005b) Mistletoe lectin I as a new tool in melanoma therapy? In vitro and in vivo studies on a controversial topic. 100. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft Leipzig, Germany, *Ann Anat* 187: 69
- Thies et al. (submitted 2006) Clinically proven markers of metastasis predict metastatic spread of human melanoma cells engrafted in scid-mice. *Brit J Cancer*
- Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF (2005) Cutaneous melanoma. *Lancet* 365:687-701
- Timoshenko AV, Gabius HJ (1993) Efficient induction of superoxide release from human neutrophils by the galactoside-specific lectin from *Viscum album*. *Biol Chem Hoppe Seyler* 374:237-43
- Tsao H, Atkins MB, Sober AJ (2004) Management of cutaneous melanoma. *N Engl J Med* 351:998-1012
- Urschel JD, Vasan H (2003) A meta-analysis of randomized controlled trials that compared neoadjuvant chemoradiation and surgery to surgery alone for resectable esophageal cancer. *Am J Surg* 185:538-43
- Van Huyen JP, Bayry J, Delignat S, Gaston AT, Michel O, Bruneval P, Kazatchkine MD, Nicoletti A, Kaveri SV (2002) Induction of apoptosis of endothelial cells by *Viscum album*: a role for anti-tumoral properties of mistletoe lectins. *Mol Med* 8:600-6
- Valentiner U, Pfuller U, Baum C, Schumacher U (2002) The cytotoxic effect of mistletoe lectins I, II and III on sensitive and multidrug resistant human colon cancer cell lines in vitro. *Toxicology* 171:187-199
- van Oijen MG, Medema RH, Slootweg PJ, Rijksen G (1998) Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells. *Am J Clin Pathol* 110:24-31
- Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ, Press M (2002) Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20:719-26
- Walsh TN, Noonan N, Hollywood D, Kelly A, Keeling N, Hennessy TP (1996) A comparison of multimodal therapy and surgery for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 335:462-7
- Wang LS, Chow KC, Chi KH, Liu CC, Li WY, Chiu JH, Huang MH (1999) Prognosis of esophageal squamous cell carcinoma: analysis of clinicopathological and biological factors. *Am J Gastroenterol* 94:1933-40
- Wang LS, Chow KC, Wu YC, Lin TY, Li WY (2004) Inverse expression of dihydrodiol dehydrogenase and glutathione-S-transferase in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 111:246-51
- Wang Y, Chen J, Meng L, Liu J, Du D, Zou Y (2000) A histopathologic and immunohistochemical study of prognostic factors in esophageal squamous cell carcinoma [abstract] *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 29:267-71
- Warburton C, Dragowska WH, Gelmon K, Chia S, Yan H, Masin D, Denyssevyeh T, Wallis AE, Bally MB (2004) Treatment of HER-2/neu overexpressing breast cancer xenograft models with trastuzumab (Herceptin) and gefitinib (ZD1839): drug combination effects on tumor growth, HER-2/neu and epidermal growth factor receptor expression, and viable hypoxic cell fraction. *Clin Cancer Res* 10:2512-24
- Weber K, 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. *Arzneimittelforschung* 48:497-502

- Wester K, Andersson AC, Ranefall P, Bengtsson E, Malmstrom PU, Busch C (2000a) Cultured human fibroblasts in agarose gel as a multi-functional control for immunohistochemistry. Standardization of Ki67 (MIB1) assessment in routinely processed urinary bladder carcinoma tissue. *J Pathol* 190:503-11
- Wester K, Wahlund E, Sundstrom C, Ranefall P, Bengtsson E, Russell PJ, Ow KT, Malmstrom PU, Busch C (2000b) Paraffin section storage and immunohistochemistry. Effects of time, temperature, fixation, and retrieval protocol with emphasis on p53 protein and MIB1 antigen. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 8:61-70
- Wilson GD, McNally NJ (1992) Measurement of cell proliferation using bromodeoxyuridine. In: Hall PA, Levinson DA and Wright NA (editors), *Assessment of Cell Proliferation in Clinical Practice*, p 113-139, Springer-Verlag London 1992
- Yakes FM, Chinratanalab W, Ritter CA, King W, Seelig S, Arteaga CL (2002) Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res* 62:4132-41
- Yamazaki M, Yamashita Y, Kubo N, Ohira M, Hirakawa K (2003) Effect of trastuzumab for human esophageal cancer [abstract] *Gan To Kagaku Ryoho* 30:1780-3
- Yoon TJ, Yoo YC, Choi OB, Do MS, 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 tumour cells in mice. *Cancer Lett* 97:83-91
- Zhou BP, Hu MC, Miller SA, Yu Z, Xia W, Lin SY, Hung MC (2000) HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF-kappaB pathway. *J Biol Chem* 275:8027-31

8. Danksagung

Mein ganz persönlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Udo Schumacher für seine engagierte und umfassende Betreuung dieser Arbeit.

Ich danke Frau Dr. Anka Thies für ihre fachliche Unterstützung und die freundliche Überlassung der Paraffinblöcke des Melanom-Projektes, sowie Herrn Dr. Manuel Lüth für die freundliche Überlassung der Paraffinblöcke des Ösophaguskarzinom-Projektes.

Herrn Prof. Dr. Reza Parwaresch und Herrn Prof. Dr. Pierre Rudolph danke ich für die freundliche Überlassung der Antikörper Ki-S2, Ki-S11 und KA7.

Herrn Prof Dr. Jürgen Berger danke ich für seinen kritischen Beitrag zur statistischen Datenauswertung.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Susanne Feldhaus und Frau Maike Märker für die hervorragende Einarbeitung in die Immunhistochemie und die unzähligen Hilfestellungen bei der Durchführung der Laborarbeiten.

Ganz besonders für ihre großartige Unterstützung bedanke ich mich bei meinen Eltern Sabine und Bernhard, meiner Großmutter Annemarie, meiner Schwester Julia und meiner Freundin Ronja.

9. Lebenslauf

Name: Alexander Hirche
Geburtsdatum/-ort: 1.5.1976 in Braunschweig

Schulbildung

1982-1986 Grundsule in Braunschweig
1986-1995 Grundsule und Gymnasium in Hamburg

Zivildienst

10/1995-10/1996 Evangelisches Amalie Sieveking-Krankenhaus, OP-Pfleger

Studium

4/1997-11/2004 Medizinstudium an der Universität Hamburg
03/1999 Physikum
03/2000 1. Staatsexamen
09/2002 2. Staatsexamen
10/2003-9/2004 PJ mit Wahlfach Neurologie im AK Barmbek, Hamburg,
bei Prof. Dr. L. Lachenmayer
11/2004 3. Staatsexamen
bis 12/2005 Promotionsstudium

artzliche Tätigkeit

seit 12/2005 Assistenzarzt in der Abteilung für Kardiologie der
Asklepios Klinik St. Georg, Hamburg, bei Prof. Dr. K.-H. Kuck

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. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Alexander Hirche