

Aus dem Institut für Anatomie II:  
Experimentelle Morphologie  
(Direktor: Prof. Dr. U. Schumacher)

Zentrum für experimentelle Medizin  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Wirkung des Mistellektin-I auf das Wachstums- und  
Metastasierungsverhalten der humanen Melanomzelllinie MV3 *in vivo* in  
einem Xenograftmodell mit *scid*- und *pfp/rag2*-Mäusen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Franziska Sander  
aus Hamburg

Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 15.12.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. U. Schumacher

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. H.-E. Laack

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. S. Klutmann

Meiner Familie.

## Abkürzungsverzeichnis

5-JÜR	5-Jahresüberlebensrate
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
ALU	<i>Arthrobacter luteus</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA-I	<i>Bandeiraea Simplicifolia Agglutinin-I</i>
DMF	Dimethylformamid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZ e	extravasale Einzelzellen
g	Gramm
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxylin-Eosin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IL	Interleukin
IFN	Interferon
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LP	Lektinpuffer
LK	Lymphknoten
LM	Lungenmetastase(n)
Met	Metastase(n)
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
ML-I /-II /-III	Mistellektin-I /-II /-III
mm	Millimeter
mM	millimolar

---

mmol	Millimol
n	Anzahl
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
p	Wahrscheinlichkeitskoeffizient
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
pmol	Picomol
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute-1640</i> Zellkulturmedium
r	Korrelationskoeffizient nach <i>Pearson</i>
s.c.	subkutan
scid	<i>severe combined immune deficiency</i>
sek	Sekunde(n)
SEM	<i>Standard error of the mean</i> (Standardfehler)
SLK	<i>Sentinel</i> Lymphknoten
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung)
TG	Tumorgewicht
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TG	Tumorgewicht
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i> (Internationale Vereinigung gegen den Krebs)
Upm	Umdrehungen pro Minute

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Arbeitshypothese und Fragestellung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>2</b>
2.1	Das maligne Melanom.....	2
2.1.1	Epidemiologie.....	2
2.1.2	Prognose.....	3
2.1.3	Therapie.....	7
2.2	Iscador®.....	8
2.3	Das Melanom-Xenograftmodell.....	10
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>12</b>
3.1	Zellbiologische Methoden.....	12
3.1.1	Melanomzelllinie MV3.....	12
3.1.2	Zellkultur.....	12
3.1.3	Langzeitlagerung eukaryontischer Zellen.....	13
3.1.4	Versuchsdurchführung.....	14
3.1.4.1	Versuchstiere.....	14
3.1.4.2	Versuchstierhaltung.....	14
3.1.4.3	Inokulation der MV3-Melanomzellen.....	15
3.1.4.4	Iscador®.....	15
3.1.5	Gewebeaufbereitung.....	16
3.2	Histologische Färbungen.....	18
3.2.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	18
3.2.2	Immunhistochemische Färbung mit dem biotinylierten BSA-I.....	18
3.3	Molekularbiologische Methoden.....	19
3.3.1	Zellzahlbestimmung mit dem Zellanalyzer CASY®.....	19
3.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	19
3.3.2.1	Quantitative ALU-PCR.....	19
3.4	Lichtmikroskopische Untersuchung.....	21

---

3.5	Statistische Auswertung.....	22
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>23</b>
4.1	<i>scid</i> -Mäuse.....	23
4.1.1	Charakterisierung des Primärtumorgewichts in <i>scid</i> -Mäusen.....	23
4.1.2	Charakterisierung des Metastasierungsverhaltens von MV3 in <i>scid</i> -Mäusen.....	25
4.1.2.1	Pulmonale Gesamtmetastasierung von MV3 in <i>scid</i> -Mäusen.....	26
4.1.2.2	Extravasale pulmonale Metastasierung von MV3 in <i>scid</i> -Mäusen.....	27
4.1.2.3	Intravasale pulmonale Metastasierung von MV3 in <i>scid</i> -Mäusen.....	29
4.1.3	Korrelation zwischen Primärtumorgewicht und pulmonaler Gesamtmetastasierung in <i>scid</i> -Mäusen.....	30
4.1.4	Charakterisierung der dendritischen Zellen in den Primärtumoren der <i>scid</i> -Mäuse.....	31
4.1.5	Disseminierte MV3-Melanomzellen im Blut der <i>scid</i> -Mäuse.....	34
4.2	<i>pfp/rag2</i> -Mäuse.....	35
4.2.1	Charakterisierung des Primärtumorgewichts in <i>pfp/rag2</i> -Mäusen.....	35
4.2.2	Charakterisierung des Metastasierungsverhaltens von MV3 in <i>pfp/rag2</i> -Mäusen.....	37
4.2.2.1	Pulmonale Gesamtmetastasierung von MV3 in <i>pfp/rag2</i> -Mäusen.....	38
4.2.2.2	Extravasale pulmonale Metastasierung von MV3 in <i>pfp/rag2</i> -Mäusen.....	40
4.2.2.2.1	Extravasale pulmonale Einzelzellen von MV3 in <i>pfp/rag2</i> -Mäusen.....	41
4.2.2.3	Intravasale pulmonale Metastasierung von MV3 in <i>pfp/rag2</i> -Mäusen.....	43
4.2.3	Korrelation zwischen Primärtumorgewicht und pulmonaler Gesamtmetastasierung in <i>pfp/rag2</i> -Mäusen.....	44
4.2.4	Charakterisierung der dendritischen Zellen in den Primärtumoren der <i>pfp/rag2</i> -Mäuse.....	45
4.2.5	Disseminierte MV3-Melanomzellen im Blut der <i>pfp/rag2</i> -Mäuse.....	48
4.3	Vergleich der <i>scid</i> - und <i>pfp/rag2</i> -Ergebnisse.....	49

---

4.3.1	Primärtumorgewichte in <i>scid</i> - und <i>pfp/rag2</i> -Mäusen.....	49
4.3.2	Pulmonale Metastasierung von MV3 in <i>scid</i> - und <i>pfp/rag2</i> -Mäusen...51	
4.3.2.1	Pulmonale Gesamtmetastasierung von MV3 in <i>scid</i> - und <i>pfp/rag2</i> -Mäusen.....	51
4.3.2.2	Extravasale pulmonale Metastasierung in <i>scid</i> - und <i>pfp/rag2</i> -Mäusen.....	51
4.3.3	Vergleich der dendritischen Zellen in den Primärtumoren der <i>scid</i> - und <i>pfp/rag2</i> -Mäuse.....	53
4.3.4	Vergleich disseminierter MV3-Melanomzellen im Blut der <i>scid</i> - und <i>pfp/rag2</i> -Mäuse.....	54
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>67</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>77</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>78</b>
	<b>Selbständigkeitserklärung.....</b>	<b>79</b>

## 1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Für Patienten mit malignem Melanom ist die Prognose nach eingetretener Metastasierung trotz Chemotherapie weiterhin infaust, so dass bei zusätzlich deutlich ansteigender Inzidenz dieses Malignoms innerhalb der letzten Jahre ein großes Interesse an neuen Therapieansätzen besteht. Im Hinblick auf die bei dieser Erkrankung angewandten Naturheilverfahren zeigte sich für das Mistellektin-I bereits in diversen Arbeiten eine ausgeprägt antiproliferative, antimetastatische sowie die Immunantwort induzierende und gleichzeitig zytotoxische Wirkung. Unklar sind jedoch weiterhin sowohl der genaue Mechanismus, mit welchem diese Wirkung erzielt wird, als auch die zu empfehlende Dosierung des Mistellektin-I.

Daher war Ziel der vorliegenden Arbeit, folgende Fragen zu klären:

- Welchen Einfluss hat das Fehlen natürlicher Killerzellen bei *pfp/rag2*-Mäusen auf das Metastasierungsverhalten des humanen malignen Melanoms der Zelllinie MV3 unter einer Therapie mit Iscador® bzw. Mistellektin-I?
- Besteht auch ohne B-/T-Lymphozyten und NK-Zellen die Möglichkeit der Tumorreduktion durch Gabe von Iscador® bzw. Mistellektin-I?
- Welchen Einfluss haben verschiedene Dosierungen des Iscador® bzw. Mistellektin-I auf das Wachstums- und Metastasierungsverhalten der Zelllinie MV3 in *pfp/rag2*-Mäusen im Vergleich zu *scid*-Mäusen?
- Wie wirkt sich die Behandlung mit Iscador® bzw. Mistellektin-I in verschiedenen Dosierungen auf die Anzahl der im Blut zirkulierenden disseminierten Tumorzellen aus?

## 2 Einleitung

### 2.1 Das maligne Melanom

#### 2.1.1 Epidemiologie

Als malignes Melanom wird ein bösartiger Tumor der Haut bezeichnet, dessen Ursprung sich in den pigmentproduzierenden Melanozyten findet. Die dieser Erkrankung in der dermatologischen Onkologie beigemessene große Bedeutung basiert zum einen auf der rapide ansteigenden Inzidenz (Lens und Dawes, 2004; Jemal *et al.*, 2004), zum anderen auf ausgesprochen aggressivem Wachstumsverhalten und ausgeprägter Therapieresistenz bei eingetretener Metastasierung (Eigentler *et al.*, 2003; O'Day *et al.*, 2002; Garbe *et al.*, 2001). Jährlich werden weltweit etwa 132.000 maligne Melanome diagnostiziert, wobei sich geographisch bedingte Schwankungen feststellen lassen. So zeigt sich in Australien und den südlichen Teilen der Vereinigten Staaten die höchste Inzidenz mit bis zu 50 Neuerkrankungen je 100.000 Einwohner, während in Deutschland etwa 15 von 100.000 Einwohnern ein neu entstandenes malignes Melanom aufweisen (*Union internationale contre le cancer (UICC)*, 2002). Etwa 90 % aller malignen Melanome entstehen primär an der Haut. Weitere 5 % der Tumoren gehen von extrakutanen Lokalisationen aus, bevorzugt von den Schleimhäuten des Gastrointestinaltraktes, vor allem Ösophagus und Anorektum, sowie von der Uvea des Auges. Bei bis zu 5% der Patienten mit metastasiertem Melanom lässt sich kein Primärtumor an der Haut nachweisen, wobei eine spontane Regression des Primärtumors neben einer möglichen primären Entwicklung in den Lymphknoten diskutiert wird. Bezüglich der Abhängigkeit vom Geschlecht der Patienten kann eine höhere Erkrankungsrate bei Frauen nachgewiesen werden (Becker *et al.*, 1998). Histologisch und klinisch werden mehrere Tumorsubtypen unterschieden (Tab. 2.1.2.1). In über 80 % der Fälle metastasieren Melanome primär lymphogen in die regionären Lymphknoten und erst sekundär hämatogen mit Ausbildung von Organmetastasen.

Subtyp	Häufigkeit [%]	Medianes Patientenalter [Jahre]
Superfiziell spreitendes Melanom	57,4	51
Noduläres Melanom	21,4	56
Lentigo-maligna-Melanom	8,8	68
Akral-lentiginöses Melanom	4,0	63
Nicht klassifizierbares Melanom	3,5	54
Sonstige	4,9	54

**Tab. 2.1.1.1: Klinisch-histologische Subtypen kutaner maligner Melanome im deutschsprachigen Raum (UICC, 2002).** Dargestellt ist die klinisch-histologische Einteilung des malignen Melanoms in Subtypen unter Angabe des prozentualen Anteils an der Gesamtmelanomzahl sowie des medianen Patientenalters bei Diagnosestellung (Ergebnisse des Zentralregisters Malignes Melanom 1983 - 1995, n = 30.015).

Als Sonderform der Metastasierung gelten sog. Satelliten- bzw. *In-transit*-Metastasen, welche als kutane oder subkutane Metastasen der Lymphbahnen zwischen Primärtumor und regionärer Lymphknotenstation definiert sind. Bis zu einem Abstand von 2 cm vom Rand des Primärtumors werden diese als Satellitenmetastasen bezeichnet, darüber hinaus als *In-transit*-Metastasen.

Die neben Haut und Lunge von Metastasierung betroffenen Organe sind in absteigender Häufigkeit Lymphknoten, Leber, Hirn, Knochen und Nebenniere (Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2007).

## 2.1.2 Prognose

Da dem malignen Melanom ausschließlich in frühem Stadium mit kurativem Ansatz begegnet werden kann, ist der Zeitpunkt der Diagnosestellung von entscheidender Bedeutung. Bei bereits stattgefundenener Metastasierung zeigen sich dagegen kaum noch therapeutische Erfolge. Ein auffälliger Hautbefund wird zunächst nach der ABCDE-Regel beurteilt, welche das Vorliegen von Kriterien wie Asymmetrie (A), unscharfer Begrenzung (B), unterschiedlich starker Pigmentierung (C, Color) innerhalb einer Läsion, einem Durchmesser (D) von > 5 mm und Erhabenheit (E) des verdächtigen Areals gegenüber dem Hautniveau umfasst. Bei Erfüllung zweier dieser fünf Kriterien wird eine komplette Exzision des Tumors empfohlen.

Hinsichtlich der Klassifikation des histologischen Materials und der daraus resultierenden Prognose für den Patienten werden unterschiedliche Parameter genutzt. Der Parameter mit der höchsten prognostischen Relevanz ist der größte vertikale Tumordurchmesser nach *Breslow* (1970), welcher innerhalb der letzten Jahre die Beurteilung nach der Eindringtiefe in die verschiedenen Hautschichten (*Clark-Level*) weitgehend zurückgedrängt hat. Als weiteres prognostisches Kriterium an Relevanz gewonnen hat die histologisch nachgewiesene Ulzeration. Zudem werden Tumorlokalisation sowie Anzahl der befallenen Lymphknoten berücksichtigt (Tab. 2.1.2.2, Tab. 2.1.2.3 und Tab. 2.1.2.5).

<b>T-Klassifikation</b>	<b>Größter vertikaler Tumordurchmesser nach <i>Breslow</i> [mm]</b>	<b>Zusätzliche prognostische Parameter</b>
<b>pTis</b>		Melanoma <i>in situ</i> , keine Tumorinvasion
<b>pT1</b>	≤ 1,0	a: ohne Ulzeration, <i>Clark-Level</i> II-III b: mit Ulzeration oder <i>Clark-Level</i> IV oder V
<b>pT2</b>	1,01 – 2,0	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
<b>pT3</b>	2,01 – 4,0	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
<b>pT4</b>	> 4,0	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
<b>pTx</b>	Keine Angabe	Stadium nicht bestimmbar

**Tab. 2.1.2.1: T-Klassifikation des Primärtumors beim malignen Melanom (UICC, 2002).** Dargestellt ist die Klassifikation des Primärtumorbefundes unter Angabe des größten vertikalen Tumordurchmessers nach *Breslow* sowie weiterer prognostischer Parameter (Tis = Tumor *in situ*, Tx = Fehlen einer Bestimmung der Tumordicke und/oder Ulzeration oder unbekannter Primärtumor, p = durch pathologische Auswertung ermittelt).

Neueren Studien zufolge erwies sich eine Stadieneinteilung als sinnvoll, welche mittels der intraoperativen Analyse von Lymphknoten durch *Lymphoszintigraphie* sowie der Biopsie des jeweiligen *Sentinel-Lymphknotens* erfolgt (Balch *et al.*, 2000).

<b>N-Klassifikation</b>	<b>Anzahl metastatisch befallener LK</b>	<b>Ausmaß der LK-Metastasierung</b>
<b>N0</b>	0	Keine
<b>N1</b>	1	a: Mikroskopische Metastasierung b: Makroskopische Metastasierung
<b>N2</b>	2-3 oder 1 intralymphatische regionäre Metastase	a: Mikroskopische Metastasierung b: Makroskopische Metastasierung c: Satelliten oder <i>In-transit</i> -Metastasen
<b>N3</b>	≥ 4 oder Satelliten- oder <i>In-transit</i> - Metastasen mit regionalen LK-Metastasen	

**Tab. 2.1.2.2: N-Klassifikation der regionären Lymphknoten beim malignen Melanom (UICC, 2002).** Dargestellt ist die Klassifikation des Lymphknotenbefundes unter Berücksichtigung der Anzahl metastatisch befallener Lymphknoten sowie des Ausmaßes der Lymphknotenmetastasierung (LK = Lymphknoten).

Als zusätzlicher Prognosefaktor, vor allem im Stadium IV der Erkrankung, dient die Konzentration der Laktatdehydrogenase (LDH) im Serum als Marker für tumorbedingten Zellerfall (Tab. 2.1.2.4).

<b>M-Klassifikation</b>	<b>Art der Fernmetastasierung</b>	<b>LDH-Spiegel im Serum</b>
<b>M1 a</b>	Haut, subkutan oder Lymphknoten	Normal
<b>M1 b</b>	Lunge	Normal
<b>M1 c</b>	Alle anderen Organmetastasen	Normal
	Jede Art von Fernmetastasierung	Erhöht

**Tab. 2.1.2.3: M-Klassifikation der Fernmetastasen beim malignen Melanom (UICC, 2002).** Dargestellt ist die Klassifikation der Fernmetastasen des malignen Melanoms unter Angabe der Art der Metastasierung sowie des LDH-Spiegels im Serum (LDH = Laktatdehydrogenase).

Stadium	Primärtumor (pT)	Regionäre Lymphknotenmetastasen (N)	Fernmetastasen (M)
<b>0</b>	pTis	Nein	nein
<b>I A</b>	≤ 1,0 mm, keine Ulzeration	Nein	nein
<b>I B</b>	≤ 1,0 mm mit Ulzeration oder <i>Clark Level IV</i> oder <i>V</i>	Nein	nein
	1,01 – 2,0 mm, keine Ulzeration	Nein	nein
<b>II A</b>	1,01 – 2,0 mm mit Ulzeration	Nein	nein
	2,01 – 4,0 mm, keine Ulzeration	Nein	nein
<b>II B</b>	2,01 – 4,0 mm mit Ulzeration	Nein	nein
	> 4,0 mm, keine Ulzeration	Nein	nein
<b>II C</b>	> 4,0 mm mit Ulzeration	Nein	nein
<b>III A</b>	Jede Tumordicke, keine Ulzeration	Mikrometastasen	nein
<b>III B</b>	Jede Tumordicke mit Ulzeration	Mikrometastasen	nein
	Jede Tumordicke, keine Ulzeration	≤ 3 Makrometastasen	nein
	Jede Tumordicke ± Ulzeration	nein, aber Satelliten- und/ oder <i>In-transit</i> -Metastasen	nein
<b>III C</b>	Jede Tumordicke mit Ulzeration	≤ 3 Makrometastasen	nein
	Jede Tumordicke ± Ulzeration	≥ 4 oder Satelliten- oder <i>In-transit</i> - Metastasen mit regionalen LK-Metastasen	nein
<b>IV</b>			ja

Tab. 2.1.2.4: Stadieneinteilung des malignen Melanoms (UICC, 2002).

Die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) von Patienten mit einer Tumordicke von unter 1 mm beträgt über 90 %, während die Prognose bei Tumordicken über 4 mm auf unter 50 % nach 5 Jahren absinkt. Das Auftreten von Lokalrezidiven bzw. Metastasen bedeutet eine insgesamt deutlich schlechtere Prognose. Ohne Therapie bei eingetretener Metastasierung beträgt die mittlere Überlebensrate vier bis sechs Monate (UICC, 2002; Orfanos *et al.*, 1994).

### 2.1.3 Therapie

Die Möglichkeit einer kurativen Therapie des malignen Melanoms besteht zur Zeit nur bei vorliegendem Primärtumor und Fehlen jeglicher Metastasierung. In diesem Fall ist die komplette, in Lymphabflussrichtung ausgeführte Exzision der Läsion mit einem Sicherheitsabstand *in sano* von 0,5 bis maximal 2 cm indiziert. Der einzuhaltende Sicherheitsabstand wird durch die Tumordicke nach *Breslow* festgelegt, wobei zusätzliche Risikofaktoren wie Ulzerationen oder Regressionszeichen im Primärtumor ebenfalls berücksichtigt werden müssen. Ab einer Tumordicke nach *Breslow* von 1,0 mm empfiehlt sich die szintigraphisch gesteuerte Biopsie des *Sentinel*-Lymphknotens für die Präzisierung der Stadieneinteilung. Zeigt sich histologisch ein ausgedehnter Befall des *Sentinel*-Lymphknotens, ist die Indikation zur radikalen Lymphknotendissektion gegeben, um einer Entstehung von Fernmetastasen vorzubeugen (UICC, 2002).

Bei eingesetzter Metastasierung stellen die systemische adjuvante Chemotherapie sowie die Radiotherapie einen Ansatz dar, auch wenn lediglich 20-30 % der mono- bzw. polychemotherapeutisch behandelten Patienten eine teilweise oder gar komplette Remission aufweisen. Chemotherapie mit Cisplatin, Vinblastin und Dacarbazin in Kombination mit immunmodulatorischen Techniken, wie zum Beispiel der gleichzeitigen Anwendung von Interferon- $\alpha$  oder Interleukin-2, zeigt eine positive Antwort bei 60 % der Patienten, während jedoch nur bei 10 % der Patienten das Überleben verlängert wird (Antoine *et al.*, 1997; Legha *et al.*, 1997) und sich zudem eine sehr hohe Morbiditätsrate findet (Hauschild *et al.*, 2003). In der Konsequenz liefern weder Mono- noch Polychemotherapie, noch kombinierte Immunchemotherapie zufriedenstellende Ergebnisse. Nur wenige Remissionen werden erreicht, und die Intensivtherapie scheint eher palliative Ansätze zu verfolgen. Da nach wie vor keine Standardtherapie festgelegt wurde, bringt ein möglicher Vergleich entsprechender Studien große Schwierigkeiten mit sich (Crosby *et al.*, 2000).

Sowohl dieser Umstand als auch vor allem die rapide ansteigende Inzidenz des malignen Melanoms innerhalb der letzten Jahre verdeutlichen die Dringlichkeit der Suche nach weiteren Therapieoptionen. Einen solchen Ansatzpunkt bietet möglicherweise die Anwendung von Mistellektinen, unter ihnen vor allem das Mistellektin-I, welche bereits in

diversen Studien antiproliferative, antimetastatische, zytotoxische sowie immunmodulatorische Effekte aufweisen.

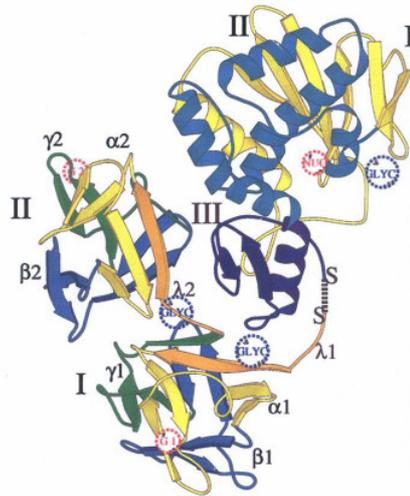
## 2.2 Iscador®

Mistelextrakte wie auch das Iscador® werden seit Jahrzehnten in der Krebsbehandlung in Europa eingesetzt (Bocci, 1993), wobei sie sowohl mit adjuvanter als auch palliativer Intention, ausschließlich oder in Kombination mit den anderen traditionellen Behandlungsformen wie Strahlen- und Chemotherapie sowie bei operativem Vorgehen Anwendung finden (Grothey *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 1998). Neben der dennoch geringen Anzahl vorhandener experimenteller Daten, welche sich zudem als widersprüchlich erweisen (Kienle *et al.*, 2003; Mansky, 2002; Heiny und Beuth, 1994), fehlt es ferner an aussagekräftigen, klinisch kontrollierten Studien, auf die sich ein Therapieansatz stützen könnte (Edler, 2004; Kienle *et al.*, 2003).

Zu den wichtigsten Inhaltsstoffen der Mistelextrakte zählen die Mistellektine (ML) -I, -II und -III und die Viscotoxine (VT). Vor allem den Mistellektinen, insbesondere dem ML-I, werden in der Onkologie neben antiproliferativer und antimetastatischer Wirkung auch zytotoxische sowie immunmodulatorische Effekte zugesprochen, welche sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in diversen Arbeiten zeigen (Thies *et al.*, 2007, 2005 und 2001; Valentiner *et al.*, 2002; Yoon *et al.*, 1999 und 1995; Hajto *et al.*, 1997, 1990 und 1989; Büssing *et al.*, 1996; Beuth *et al.*, 1995<sup>a</sup>, 1991; Heiny und Beuth, 1994; Janssen *et al.*, 1993). Zudem findet sich für das ML-I der koreanischen Mistel eine antiangiogenetische Komponente (Yoon *et al.*, 1995), welche sich auch in Versuchen mit Iscador® Qu widerspiegelt (Park *et al.*, 2001).

Mistellektine sind monomere Glykoproteine (Molekulargewicht um 63 kDa), bestehend aus einer A-Kette (29 kDa) und einer B-Kette (34 kDa), welche über eine Disulfidbrücke das Hololektin bilden (Abb. 2.2.2). Die A-Untereinheit weist zytotoxische, die Proteinbiosynthese von Ribosomen inaktivierende Potenz auf (Witthohn *et al.*, 1996; Janssen *et al.*, 1993; Franz, 1991), während die B-Kette über die für die Endozytose des Hololektins notwendigen Zuckerbindungsstellen verfügt (Büssing *et al.*, 1996; Franz, 1986). In Abhängigkeit des jeweiligen Lektins findet sich eine hohe Affinität zu D-Galaktose-Resten (ML-I), N-Acetyl-D-Galaktosamin (ML-III) oder zu beiden Zuckerresten (ML-II) (Schumacher *et al.*, 1996, 1995<sup>a</sup> und 1995<sup>b</sup>; Kopp *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1992; Franz *et al.*, 1991; Ziska und Franz, 1981). Innerhalb der Zelle kommt es während des Molekültransportes zur Reduktion der die A- und B-Untereinheit verbindenden Disulfidbrücke und damit zur Dissoziation der beiden

Untereinheiten. Die freie A-Untereinheit des Mistellektins wird als potentes ribosomeninaktivierendes Protein im Zytosol wirksam (Langer *et al.*, 1996; Barbieri *et al.*, 1993). Die N-Ribosidhydrolase-Aktivität der A-Untereinheit inhibiert die Proteinbiosynthese irreversibel und führt folglich zum Tod der Zelle (Büssing *et al.*, 1996; Barbieri *et al.*, 1993; Janssen *et al.*, 1993; Endo *et al.*, 1988; Stirpe *et al.*, 1982).



**Abb. 2.2.1: Darstellung der A- und B-Ketten von ML-I.** Die drei Domänen der A-Kette (I, II, und III) sind gelb, blau und violett dargestellt. Die homologen Subdomänen der zwei Domänen (I und II) der B-Kette ( $\alpha_{1,2}$ ,  $\beta_{1,2}$  und  $\gamma_{1,2}$ ) sind gelb, blau und grün. Die Linkerregionen  $\lambda_{1,2}$  sind orange, die Disulfidbrücke zwischen der A- und B-Kette ist als blaue unterbrochene Linie dargestellt. Die roten unterbrochenen Kreise entsprechen der Nukleotidbindestelle der A-Kette (NUC) bzw. der niedrig- und hochaffinen Galaktosebindestellen der B-Kette (G1 und G2). Die Glykosilierungsstellen (GLYC) sind als blaue unterbrochene Kreise dargestellt. Spirale:  $\alpha$ -Helix, Pfeil:  $\beta$ -Faltblatt (Krauspenhaar *et al.*, 1999).

Neben dem rein zytotoxischen Effekt, welcher durch die ribosomeninaktivierende Funktion des ML-I zustande kommt, gibt es *in vivo* zahlreiche biologische Eigenschaften des ML-I, so dass der genaue Wirkmechanismus der Mistellektine weitgehend unklar ist und daher Gegenstand der aktuellen Forschung darstellt. Die antiproliferativen Effekte werden unter anderem mit der Stimulation natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) erklärt (Antony *et al.*, 2000; Hostanska *et al.*, 1995), welche vor allem unter der Behandlung mit ML-I zu erkennen ist. Mistellektine erweisen sich darüber hinaus als potente Induktoren antitumoraler zytotoxischer T-Zellen, sowie als Aktivatoren von Makrophagen über Stickstoffmonoxid (Mossalayi *et al.*, 2006). Eine mögliche Erklärung der Zytotoxizität stellt die mitochondrial geregelte Interferenz mit apoptotischen Mechanismen in Krebszellen, ebenso wie die Inhibition des Zellzyklus unter Beteiligung von Caspase 3 und 8, Cytochrom C und Chloromethyl-X-Rosamin dar (Harmsma *et al.*, 2004). Zudem findet sich *in vitro* eine durch ML-II vermittelte Apoptose humaner myeloleukämischer U937-Zellen über die Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase 1 (JNK1) (Park *et al.*, 2000). Die zytotoxische Wirkung der Mistellektine ML-I, -II und -III zeigt sich *in vitro* ebenfalls gegenüber Mamma- bzw. Kolonkarzinom-Zelllinien (Valentiner *et al.*, 2002; Schumacher *et al.*, 1995<sup>b</sup>, Janssen *et al.*, 1993). *In vivo* kann die Zytotoxizität

von rekombinant hergestelltem ML-I auf humane ovariale Karzinomzellen dargestellt werden (Schumacher *et al.*, 2000).

Für eine Inhibition maligner Melanomzelllinien finden sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Belege. Da hochmetastatische Melanomzelllinien eine größere Menge an Galaktose zu exprimieren scheinen als weniger stark metastasierende Zelllinien, führt diese Tatsache aufgrund der Bindungseigenschaften von ML-I zu einer positiven Korrelation zwischen Ausmaß der Metastasierung und Affinität der jeweiligen Zelllinie zu ML-I (Thies *et al.*, 2001<sup>a</sup> und 2001<sup>b</sup>). So erweist sich in einem Vergleich sechs verschiedener humaner Melanomzelllinien die stark metastasierende Melanomzelllinie MV3 *in vitro* als besonders sensibel gegenüber ML-I und zeigt bereits bei einer Konzentration von  $1 \times 10^{-13}$  ng/ml ML-I eine signifikante Wachstumshemmung, welche sich *in vivo* in einem Xenograftmodell nahezu reproduzieren lässt (Thies *et al.*, 2007 und 2005).

Den in Mischpräparaten wie Iscador<sup>®</sup> ebenfalls enthaltenen Viscotoxinen, vor allem dem Viscotoxin 3 (VT3), wird durch reversible Bindung an Membranvesikel sowie fraglicher Interaktion auf DNA-Ebene (Winkler *et al.*, 2008) eine zusätzliche antiproliferative Wirkung zugesprochen. Darüber hinaus zeigen diverse Polysaccharide, die zusätzlich in den Mistelextrakten enthalten sind, eine geringe immunmodulatorische Wirkung (Franz, 1989).

Aufgrund der mehrschichtigen Wirkansätze des bereits in der Onkologie angewandten Extraktes Iscador<sup>®</sup> wird in dieser Arbeit ein Xenograftmodell erstellt, welches Rückschlüsse auf etwaige Unterschiede zu der Behandlung mit reinem ML-I ermöglichen soll, mit dem Ziel, eine genauere Aufschlüsselung des Wirkmechanismus der verschiedenen Komponenten des Mistelextraktes zu erreichen.

### 2.3 Das Melanom-Xenograftmodell

Für die Durchführung von *in vivo* Studien werden Modelle benötigt, welche der Situation im humanen Organismus weitgehend entsprechen. Das Maus-Xenograftmodell weist bereits für eine Reihe von Tumoren, z. B. für Kolon- und Mamma-Karzinome sowie für maligne Melanome, eine hohe Korrelation mit der humanen klinischen Situation auf (Schumacher *et al.*, 2000). Um ein Anwachsen der inokulierten humanen Tumorzellen zu gewährleisten, ist es notwendig, Mäuse zu verwenden, bei denen eine Abstoßungsreaktion durch das spezifische Immunsystem nicht erfolgen kann.

Die aus dem CB-17-Inzuchtstamm hervorgegangene *scid* (*severe combined immune deficiency*)-Maus verfügt infolge einer Mutation auf dem Chromosom 16 und dem daraus resultierenden Fehlen von T- und B-Zellen über ein stark eingeschränktes spezifisches Immunsystem. Aufgrund dieser genetischen Prädisposition bewährte sich die Verwendung der *scid*-Maus bereits in zahlreichen Xenograftmodellen und erweist sich nicht zuletzt bezüglich des malignen Melanoms als dienlich (Thies *et al.*, 2005). Der im Zusammenhang mit *scid*-Mäusen verwendete Begriff der *leakiness* beschreibt die Beobachtung, dass bei etwa 15 % der *scid*-Mäuse ein geringer Anteil an reifen T- und B-Lymphozyten nachgewiesen werden kann, welche jedoch eine eingeschränkte Expression von Antigen-Rezeptorgenen zeigen (Bosma, 1992).

In Bezug auf die Stimulation der NK-Zellen ist die *pfp/rag2*-Maus ein geeignetes Modell. Diese Mausart zeichnet sich durch eine Doppelmutation sowohl im *pfp*- als auch im *rag2*-Gen aus, welche zum einen in dem Fehlen reifer T- und B-Lymphozyten, zum anderen, im Unterschied zu den *scid*-Mäusen, zusätzlich in einer Depletion der NK-Zellen resultiert. Somit ergibt sich über die Einschränkung des spezifischen Immunsystems hinaus ebenfalls eine Dysfunktion des unspezifischen Immunsystems.

Die unter der Therapie mit Iscador<sup>®</sup> auftretenden Unterschiede in der Reaktion beider Mausarten sollen in dieser Arbeit einander gegenübergestellt werden und somit zur weiteren Aufklärung des Wirkmechanismus von Iscador<sup>®</sup> beitragen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.1.1 Melanomzelllinie MV3

In diesem Versuch wurde die humane kutane Melanomzelllinie MV3 verwendet, welche freundlicherweise von Frau Prof. Dr. I. Moll (Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Kopf- und Hautzentrum des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf) zur Verfügung gestellt wurde. Die humane Melanomzelllinie MV3 wurde aus einer Lymphknotenmetastase gewonnen (Edward, 2001) und weist ein mittleres metastatisches Potential auf, welches innerhalb von 20 Tagen eine Metastasierung in die Lungen der Mäuse ermöglicht (Mauer, 2005).

#### 3.1.2 Zellkultur

Sämtliche Arbeiten mit der Melanomzelllinie MV3 wurden unter aseptischen Bedingungen unter einer Sicherheitsbank (Hera Safe<sup>®</sup>, Baker Company, Stanford, Maine, USA) durchgeführt. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in T75-Zellkulturflaschen (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) unter Standardbedingungen (37 °C, 100 % relative Luftfeuchtigkeit, 5 % CO<sub>2</sub>/95 % Luft) in einem Brutschrank (Hera Cell, Heraeus Instruments GmbH, Osterode). Als Standardnährmedium diente *RPMI*-1640 Medium (Gibco Life Technologies, Paisley, UK), welches zusätzlich mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum (Gibco Life Technologies), 2 mM L-Glutamin (Gibco Life Technologies), 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin (Gibco Life Technologies) versetzt wurde. Dieses Medium wird im Weiteren als Kulturmedium bezeichnet. Ein Wechsel des Kulturmediums wurde entsprechend dem Wachstum der Zelllinie zwei- bis dreimal wöchentlich durchgeführt. Hierzu wurde das gebrauchte Kulturmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit 15 ml PBS (Gibco Dulbeccos *Phosphate Buffered Saline*, Gibco Life Technologies) gespült und anschließend mit 5 ml Trypsin-EDTA (Gibco Life Technologies) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 5 Minuten (min) inkubiert, um die adhärent wachsenden Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Hiernach erfolgte die Zugabe von 5 ml Kulturmedium, welche mit der Inaktivierung des Trypsin-EDTA und der daraus resultierenden Beendigung der Ablösungsreaktion einherging, um eine Schädigung der Zellen durch das Trypsin-EDTA zu verhindern. Abschließend wurden 5 ml der abgelösten Zellen auf neue, mit 20 ml frischem Kulturmedium befüllte Zellkulturflaschen verteilt. Da in dieser Arbeit für die Untersuchungen eine hohe Zellzahl erforderlich war, wurde die Zelllinie vor Beginn der Behandlung in Zellkulturflaschen mehrere Wochen lang angezüchtet bis eine ausreichende Zellzahl vorhanden war. Einen Tag vor der

Injektion wurden die Zellen in den Kulturflaschen ein letztes Mal geteilt. So befanden sich die Zellen für den folgenden Tag der Injektion in der exponentiellen Wachstumsphase.

Um eine Kontamination der Zellkultur durch Mykoplasmen ausschließen zu können, wurde das VenorGeM<sup>®</sup>Mykoplasmen-Detektionskit (Minerva Biolabs GmbH, Berlin), das auf der Basis der Polymerase-Kettenreaktion arbeitet, eingesetzt. Der Test ist zum Nachweis der typischerweise als Kontamination in Zellkulturen auftretenden Mykoplasmen-Spezies geeignet und wurde entsprechend den Angaben des Herstellers vor Beginn der Zellkulturversuche durchgeführt. Bei der in diesem Versuch verwendeten Zelllinie konnte keine Kontamination durch Mykoplasmen nachgewiesen werden.

### 3.1.3 Langzeitlagerung eukaryontischer Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten MV3-Melanomzellen stammen aus einer im November 2002 eingefrorenen und sich in der Passagezahl 12 befindenden Vorratskultur. Beim Einfrieren wurde nach den Angaben des Herstellers (c-c-pro GmbH, Neustadt) vorgegangen, und die Zellen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet. Nach dem zehnminütigen Zentrifugieren der so gewonnenen Zellsuspension für 10 min bei Raumtemperatur wurde der Medienüberstand dekantiert. Darauf wurde das Zellsediment mit dem Einfriermedium *cryo-safe* (c-c-pro GmbH) resuspendiert und dabei eine Zelldichte von  $2-4 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Diese Zellsuspension wurde in 1,8 ml Gefrierampullen gefüllt und in Aliquots verschlossen. Bei -10 bis -14 °C wurden die Zellen für 40 min in einem Kühlschrankgefrierfach gekühlt und danach sofort in einer Ultratiefkühltruhe bei -80 °C für weitere 60 min durchgefroren. Abschließend wurden die Zellen in einen Stickstofftank bei -196 °C eingelagert.

Vor Versuchsbeginn wurden zwei Aliquots der MV3-Melanomzellen aus dem flüssigen Stickstoff aufgetaut und mindestens zwei Wochen lang, wie unter 3.1.2 beschrieben, kultiviert und hinsichtlich ihrer Vitalität begutachtet.

Die für die Untersuchungen notwendige Bestimmung der in einer Zellsuspension enthaltenen Anzahl an Zellen erfolgte mithilfe des Zellanalysegerätes *CASY<sup>®</sup>* (*Cell Counter + Analyser System Modell TT*, Schärfe System GmbH, Reutlingen) und wird unter 3.3.1 beschrieben.

### 3.1.4 Versuchsdurchführung

#### 3.1.4.1 Versuchstiere

**scid-Maus.** Für die Durchführung des Versuches wurden insgesamt  $n = 80$  weibliche ausgewachsene und pathogenfreie *scid* (*severe combined immune deficiency*)-Mäuse des Typs BALB/c *scid/scid* verwendet. Dabei wurden 40 Tiere aus der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf verwendet, während weitere 40 Tiere von M&B A/S (Ry, Dänemark) bezogen wurden. Die Tiere waren zu Versuchsbeginn zwischen 8 und 14 Wochen alt und wiesen ein Gewicht von durchschnittlich 22 g auf. Die Versuchstiere aus Dänemark wurden 6-8 Tage vor Versuchsbeginn zur Akklimatisierung und Eingewöhnung im Tierstall des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gehalten.

**pfp/rag2-Maus.** Desweiteren wurden  $n = 82$  sowohl weibliche als auch männliche ausgewachsene und pathogenfreie *pfp/rag2*-Mäuse aus der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf verwendet. Alter und Gewicht dieser Tiere betragen zu Versuchsbeginn ebenso zwischen acht und vierzehn Wochen beziehungsweise 22 g durchschnittlich.

#### 3.1.4.2 Versuchstierhaltung

Die Haltung der Tiere erfolgte in Filter-Top-Käfigen in Gruppen zu maximal 10 Tieren in der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter Standardbedingungen ( $20 \pm 1$  °C; relative Luftfeuchtigkeit 50 %; 12 Stunden (h) zirkadianer Rhythmus, Dunkelphase von 19.00 - 7.00 Uhr). Die Tiere erhielten Standard-Einstreufutter (ssniff® extrudants, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und steriles Wasser *ad libitum*. Sämtliches Vorgehen mit den Versuchstieren erfolgte unter aseptischen Bedingungen unter einem *Laminar Flow* Abzug in Räumlichkeiten mit Unterdruckversorgung.

Die Versuchstiere wurden unter Berücksichtigung einer gleichmäßigen Verteilung bezüglich des Gewichts und Geschlechts jeweils vier gleichgroßen Gruppen von maximal 21 Tieren zugeordnet, von denen eine Gruppe als Kontrollgruppe und drei weitere als 10 ng/kg, 30 ng/kg sowie 150 ng/kg - Behandlungsgruppen dienten und entsprechend der zu erhaltenden Dosierung benannt wurden. Aufgrund der hohen Anzahl an Versuchstieren wurde die Behandlung in zwei direkt aufeinanderfolgenden Etappen mit jeweils der Hälfte der Tiere durchgeführt. In der Behandlung ergaben sich keine Unterschiede zwischen den aus Dänemark und den aus Deutschland stammenden *scid*-Mäusen.

Das Wohlergehen aller Versuchstiere wurde täglich überprüft und anhand von Aktivität und Körperhaltung sowie Fellbeschaffenheit und Nahrungsaufnahme ermittelt. Im Verlauf des

Versuches mussten einige Tiere aufgrund beginnender Ulzeration im Bereich der über dem Tumor liegenden Haut gesondert in Einzelkäfigen gehalten werden. Während des Experimentes verstarben zwei *scid*-Mäuse sowie eine *pfp/rag2*-Maus, wobei eine jeweilig durchgeführte Autopsie keinen Anhalt für einen Zusammenhang mit der Behandlung ergab. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden nach § 8 des Tierschutzgesetzes der Bundesrepublik Deutschland von 1998 unter der Versuchsnummer 39/05 von der Behörde für Umwelt und Gesundheit in Hamburg genehmigt.

#### 3.1.4.3 Inokulation der MV3-Melanomzellen

Die Inokulation der MV3-Melanomzellen erfolgte bei allen Tieren jeweils einen Tag vor Beginn der Behandlung. Die subkutan (*s.c.*) zwischen die Schulterblätter injizierte Menge betrug pro Maus  $1 \times 10^6$  Tumorzellen, welche aus einer Zellsuspension von  $5 \times 10^6$  Melanomzellen pro Milliliter RPMI 1640 Medium gewonnen wurden. Das verabreichte Volumen umfasste 200  $\mu$ l pro Maus.

#### 3.1.4.4 Iscador®

Die Behandlung der Tiere erfolgte mit dem Mistelpräparat Iscador® M 5 mg spezial (Ch.-B.: 5081(1), PZN - 1385611, Weleda AG, Schwäbisch Gmünd). Bei diesem Naturheilmittel handelt es sich um einen in der anthroposophischen Medizin verwendeten fermentierten, wässrigen Auszug, welcher pro 1 ml 5 mg *Viscum album ssp. album* (Apfelbaummistel), *Herba rec.* (Pflanze zu Auszug = 1:5) 25 mg enthält. Sonstige Bestandteile sind Natriumchlorid, Natriumhydroxid sowie Wasser für Injektionszwecke. Bei einem Gesamtlektin Gehalt von 250 mg/ml weist Iscador® M 5 mg spezial einen Gehalt an Mistellektin-I (ML-I), dem Hauptbestandteil, von 80 ng/ml auf. Zur besseren Vergleichbarkeit zu anderen Studien wurde die in dieser Arbeit verwendete Injektionsmenge auf ihren Gehalt an ML-I genormt. Die behandelten Gruppen erhielten somit *intraperitoneale* (*i.p.*) Injektionen von 10, 30 oder 150 ng/kg Körpergewicht (KG) an auf ML-I normiertem Iscador®.

Um Artefakte durch Wandadsorption zu vermeiden (Cleland *et al.*, 1993; Wang und Hanson, 1988; Suelter und De Luca, 1983), wurde die ML-I-Verdünnungsreihe täglich unmittelbar vor der *i.p.*- Injektion unter sterilen Bedingungen in Polystyrolröhrchen von 30 ml (Greiner Bio-One) bzw. 50 ml (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) vorbereitet, wobei PBS als Verdünnungsmedium diente. Um Konzentrationsschwankungen des ML-I in den Verdünnungen sowie durch das Pipettieren verursachte Fehler möglichst gering zu halten, wurden die verwendeten Glaspipetten (Brand GmbH & Co. KG, Wertheim) vor jedem Gebrauch durch dreimaliges Aufziehen und Entleeren benetzt und die zu pipettierende

Verdünnung gleichzeitig durchmischt. Gemäß diesem Verfahren wurden auch die Glasspritzen (Fortuna® Optima®, Poulten & Graf GmbH, Wertheim) vor der Injektion vorbereitet, um sowohl einen Fehler durch Wandadsorption des Mistelextraktes zu vermeiden, als auch die Verdünnung direkt vor der Injektion noch einmal zu durchmischen. Es wurden sterile 1 ml Glasspritzen verwendet, da die Anhaftung von Mistellektinen an gläsernen Oberflächen sehr viel geringer ausfällt als an Plastikoberflächen. Die Glasspritzen wurden vor der Injektion mit etwas mehr als 1 ml der entsprechenden Verdünnung ML-I aufgezogen und mit einer sterilen Einmalkanüle (BD Microlance, Becton Dickinson, S.A., Spanien) versehen. Im Anschluss wurde der Kanülenkonus entlüftet und der Spritzenkolben auf 1 ml eingestellt. Mit diesem Volumen wurden 10 Mäuse derselben Gruppe mit jeweils 100 µl behandelt.

<b>ML-I- Behandlungsdosis</b>	<b>Pipettiertes Volumen [ml]</b>	<b>ML-I-Konzentration [ng/ml]</b>
150 ng/kg KG	2,5 ml Iscador® 2,83 ml PBS	37,5
30 ng/kg KG	1,2 ml der 150 ng/kg KG - Lösung 4,8 ml PBS	7,5
10 ng/kg KG	1,5 ml der 30 ng/kg KG - Lösung 3,0 ml PBS	2,5

**Tab 3.1.4.4.1: Verdünnungsschema von ML-I.**

Die Behandlung der Versuchstiere mit ML-I wurde über einen Zeitraum von 20 Tagen täglich unter denselben Bedingungen und zur selben Uhrzeit durchgeführt. Für den Vorgang der Injektion wurden die Mäuse mit Daumen und Zeigefinger am Nacken gefasst, während die Handfläche und der kleine Finger derselben Hand zur Fixierung des Schwanzes dienen. Die Injektionsstelle befand sich *paramedian* auf Höhe der Beinfalten. Um Injektionsfehler bzw. eine versehentliche Mehrfachinjektion zu vermeiden, wurden die Mäuse direkt nach der Injektion übergangsweise in einem separaten sterilen und mit dem Gruppennamen gekennzeichneten Käfig untergebracht bis alle Mäuse einer Gruppe behandelt waren.

### 3.1.5 Gewebeaufbereitung

Der Versuch endete am 21. Tag nach Inokulation der Melanomzellen und somit einen Tag nach der letzten Injektion von ML-I. Die Versuchstiere wurden anästhesiert mittels *i.p.*-

Injektion von 0,25 ml (0,1 ml/10g KG) eines Gemisches, bestehend aus 0,8 ml Rompun (Bayer Vital GmbH, Leverkusen), 1,2 ml Ketamin 100 (Gräub AG, Bern, Schweiz) und 8 ml physiologischer Kochsalzlösung (Braun, Melsungen). Die anschließende Blutentnahme erfolgte mittels Punktion des retrobulbären Venenplexus durch eine Glaskapillare, wobei die gewonnene Menge Blut zwischen 100 und 600 µl umfasste. Das Blut wurde in EDTA-Röhrchen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) bei +4 °C gelagert bis zur DNA-Extraktion, welche maximal 24 h später stattfand.

Unter anhaltender Anästhesie wurden die Tiere durch zervikale Dislokation bzw. Thorakotomie getötet und anschließend gewogen (Mettler PE 2000<sup>®</sup>, Mettler-Toledo, Gießen). Unmittelbar nach dem Tod wurden Primärtumor, Lunge, Leber und Gehirn herauspräpariert und von umliegendem Bindegewebe befreit. Milz und Thymus wurden bezüglich ihrer Größe beurteilt, und das Knochenmark wurde per Spülung vom Femur separiert. Primärtumor und Lunge wurden in 4 %igem Formalin (Merck, Darmstadt) für 48 h fixiert. Die im Anschluss an die Fixierung durchgeführte Einbettung erfolgte nach einem standardisierten Verfahren mithilfe aufsteigender, entwässernder Isopropanol-Konzentrationen von 50, 70 und 90 % und darauffolgender Infiltration mit Paraffin Paraplast Plus<sup>®</sup> (Tyco Healthcare, Mansfield, USA). Die in Paraffin eingebetteten Primärtumoren wurden mittels eines Mikrotoms (Microm International GmbH, Walldorf) in 5 µm dicke Scheiben geschnitten, in ein Warmwasserbad überführt, auf silanbeschichtete Objektträger (Histobond<sup>®</sup>, Marienfeld, Lauda-Königshofen) aufgezogen und anschließend bei 37 °C 24 h getrocknet. Ein Schnitt je Tumor wurde entparaffiniert, rehydriert und Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt, wie in 3.2.1 beschrieben. Ein zweiter Schnitt wurde für immunhistochemische Färbungen verwendet (3.2.2).

Nach Präparation und Fixierung der Lungen wurden diese unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops und Millimeterpapiers in 2 mm dicke Scheiben geschnitten und zerkleinert, in 4 %igem Agar Noble (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) ausgegossen und gepresst, um nach dem Abkühlen ebenfalls in Paraffin eingebettet zu werden. Die so vorbereiteten Lungen wurden mit dem Mikrotom nach oben beschriebener Methode geschnitten, wobei im Abstand von 50 µm jeder zehnte Schnitt in das Warmwasserbad überführt und anschließend auf einen Objektträger aufgezogen wurde. Nach 24-stündigem Trocknen bei 37 °C erfolgte die Entparaffinierung, Rehydrierung und HE-Färbung (3.2.1), wobei 3 x 20 zentrale Schnitte jeder Lunge für immunhistochemische Untersuchungen zunächst ungefärbt aufbewahrt wurden.

## 3.2 Histologische Färbungen

### 3.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die histologische Analyse der Primärtumoren und Lungenmetastasen erfolgte mittels Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbter Gewebe. Die HE-Färbung wurde nach einem Standardprotokoll in einem Färbeautomaten (Varistain<sup>®</sup>, Shandon, Frankfurt) durchgeführt. Abschließend wurden die Objektträger mit dem Eindeckmedium Eukitt<sup>®</sup> (Kindler GmbH & Co, Freiburg) und einem Deckglas versehen.

### 3.2.2 Immunhistochemische Färbung mit dem biotinylierten Lektin BSA-I

Einem Standardprotokoll folgend wurden die entparaffinierten und 5 min in Lektinpuffer (LP) (50 mM *Trizma-Base* (TBS, Sigma), 150 mM Natriumchlorid (Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande), 1mM Magnesiumchlorid (Merck, Darmstadt) und 1 mM Calciumchlorid (Merck); pH 7.6) gespülten Gewebeschnitte zur Antigendemaskierung in 0,1 %igem Trypsin für 15 min vorbehandelt. Die Enzymreaktion wurde unter fließendem Leitungswasser angehalten und die Gewebeschnitte anschließend in LP überführt und zweimal 5 min gespült. Die Gewebeschnitte wurden mit dem biotinylierten Lektin *Bandeiraea simplicifolia Agglutinin-I* (BSA-I, Sigma) 1:100 mit LP verdünnt (entspricht einer Konzentration von 10 µg BSA-I/ml LP) und bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer für eine Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Spülen in TBS Puffer wurden die Gewebeschnitte für 30 min bei Raumtemperatur mit dem Avidin-Alkalische-Phosphatase-Komplex (*Vectastain<sup>®</sup>-ABC-AP Kit*, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) inkubiert. Nach dreimaliger Spülung für jeweils 5 min mit TBS wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase mit Neufuchsin (Sigma) nachgewiesen: 10 ml einer 4 %igen Natriumnitritlösung wurden mit 400 µl Neufuchsin-Stammlösung (5 g Neufuchsin in 100 ml 2 N HCl) gemischt. Anschließend wurden sofort 200 ml TBS/HCl Puffer (pH 8,24), versetzt mit 60 mg Levamisol (Sigma) zur Hemmung der endogenen nicht-intestinalen alkalischen Phosphatase, zugegeben. Daraufhin wurden 30 mg Naphthol-AS-Bisphosphat (Sigma) in 1000 µl Dimethylformamid (DMF, Sigma) gelöst und als Substrat für die alkalische Phosphatase hinzugegeben. 300 µl Tween 20 (Sigma) wurden der Lösung für eine zusätzliche Hintergrundunterdrückung zugesetzt. Die Gewebeschnitte verblieben für 30 min unter Lichtausschluss in dieser Lösung. Die Farbreaktion wurde unter fließendem Leitungswasser (5 min) und in *Aqua dest.* (5 min) angehalten. Darauf wurden die Präparate in 50 %igem Mayers Hämalaun (Merck) 10 Sekunden (sek) gegengefärbt und 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Abschließend wurden sie mit dem wasserhaltigen Eindeckmedium *Clarion/Crystal Mount* (Biomedica, Foster City, Kalifornien, USA) beschichtet und danach mit *Permanent Mounting*

*Media* und einem Deckglas versehen. Bei den Negativkontrollen wurde der primäre Antikörper weggelassen und statt des Lektins BSA-I nur mit LP inkubiert. Bei keiner der Negativkontrollen konnte eine unspezifische Bindung festgestellt werden. Es dienten zwei Gewebeschnitte von MV3 Melanomzell-Primärtumoren als Positivkontrollen, von denen aus vorangegangenen Studien eine intensive Anfärbbarkeit durch BSA-I bekannt war.

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 Zellzahlbestimmung mit dem Zellanalysegerät *CASY*<sup>®</sup>

Für die Untersuchung war es notwendig, die Anzahl an Melanomzellen im Kulturmedium zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurde das Zellanalysegerät *CASY*<sup>®</sup> verwendet. Für die Zellzählung wurde das alte Kulturmedium aus der jeweiligen Zellkulturflasche abgesaugt, die Zellen einmal mit 15 ml PBS gespült und anschließend für das Ablösen vom Flaschenboden mit 5 ml Trypsin-EDTA bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 5 min inkubiert. Nach dem Ablösen erfolgte die Zugabe von 5 ml Kulturmedium, um das Trypsin-EDTA zu inaktivieren und damit die Ablösungsreaktion zu beenden und eine Schädigung der Zellen durch das Trypsin-EDTA zu verhindern. Nachfolgend wurden die in der Lösung befindlichen MV3-Melanomzellen in 30 ml Polystyrolröhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) überführt und 10 min bei 1500 Umdrehungen/min (Upm) zentrifugiert. Nach dem anschließenden Abgießen des Überstandes wurde das erhaltene Zellpellett in 10 ml Kulturmedium aufgeschwemmt. Daraufhin erfolgte das Pipettieren von 100 µl der zu untersuchenden Zellsuspension in ein *Casy*<sup>®</sup>*cup* (Schärfe System GmbH), in das bereits 10 ml der speziellen Elektrolytlösung *Casy*<sup>®</sup>*ton* (Schärfe System GmbH) vorgelegt worden waren. Die Durchmischung der Probe wurde mittels dreimaligen Wendens des *Casy*<sup>®</sup>*cup* unter Vermeidung von Blasen- und Schaumbildung durchgeführt. Um eine Aggregation und ein Absetzen der Zellen zu umgehen, erfolgte die Messung der pipettierten Probe ohne Zeitverzögerung. Nach erfolgreicher Messung wurde die Zellzahl auf eine Konzentration von 5 x 10<sup>6</sup> Zellen pro 1 ml *RPMI*-1640 Medium eingestellt.

#### 3.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

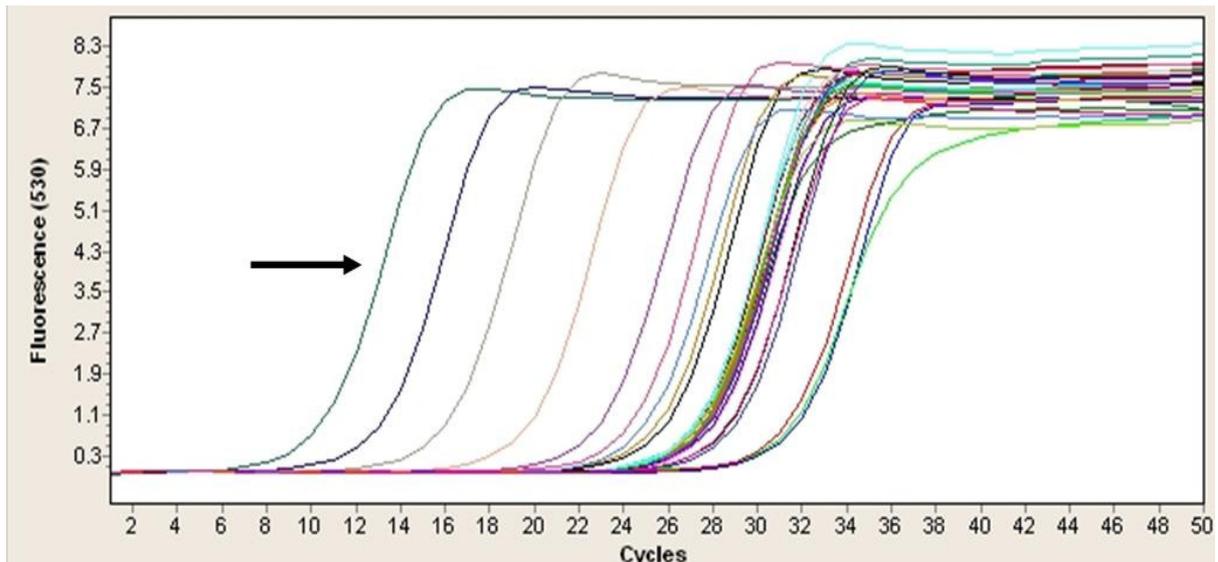
##### 3.3.2.1 Quantitative ALU-PCR

Die für die PCR verwendeten *ALU* (*Arthrobacter luteus*)-Sequenzen, welche eine Größe von etwa 300 Basenpaaren (bp) aufweisen, und deren Name sich von dem die *ALU*-Sequenz humaner DNA schneidenden Restriktionsenzym *ALU* ableitet (Kariya *et al.*, 1987), erwiesen

sich bereits in mehreren Arbeiten als geeignetes Template zum Nachweis humaner Tumorzellen in der PCR-Amplifikation (Zubair *et al.*, 1996). Aufgrund fehlender Enzymaktivität u. a. in Nager-DNA bietet eine mit *ALU*-Sequenzen durchgeführte PCR eine hohe Spezifität bezüglich der Quantifizierung humanen DNA-Gehaltes in Xenograftmodellen. Für die *Real-time* PCR dieser Arbeit wurde das LightCycler® *Fast Start DNA MasterPLUS SYBRGreen I Kit* (Cat No. 03515885001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet. 2 µl DNA eines Vollblutextraktes, welche mittels des QIAmp® *DNA Blood Mini Kit 250* (Qiagen GmbH, Hilden) isoliert wurden, dienten als Vorlage für die PCR und wurden in einem Reaktionsvolumen von insgesamt 10 bzw. 20 µl inkubiert, welches zum einen den *SYBRGreen I Master Mix* inklusive des *SYBRGreen* Fluoreszenzmediums, zum anderen hitzestabile *Taq* DNA-Polymerase, *Taq* PCR-Puffer, eine Desoxyribonukleotidtriphosphat (dNTP)-Mischung, 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, sowie jeweils 10 pmol der spezifischen *ALU*-Primer enthielt. Forward *ALU*-Primer (TGG CTC ACG CCT GTA ATC CCA) und reverse *ALU*-Primer (GCC ACT ACG CCC GGC TAA TTT) wurden von MWG-BIOTECH AG (Ebersberg) synthetisiert und freundlicherweise von Frau Dr. rer. nat. Nina Nehmann (Institut für Anatomie II, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) zur Verfügung gestellt.

Die PCR-Bedingungen wurden initial auf 10 min bei 95 °C festgelegt, gefolgt von insgesamt 50 Zyklen von 5 sek bei 95 °C, 5 sek bei 67 °C und 20 sek bei 72 °C (Fluoreszenzmessung). Bei jedem Durchlauf wurde eine Eichreihe, bestehend aus sechs Proben absteigender Melanomzellkonzentrationen von 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup> and 10<sup>1</sup> Melanomzellen/ml, mitgeführt, welche jeweils in Qiagen Elutionspuffer (Qiagen) verdünnt vorlagen. Mittels dieser Eichkurve war eine quantitative Analyse der im Mausblut enthaltenen Tumorzellen möglich. Zusätzlich enthielt jeder Durchlauf zwei Negativkontrollen in Form zweifach destillierten Wassers, sowie *scid*- oder *pfp/rag2*-Kontroll-DNA, um die regelrechte Durchführung und Analyse der Ergebnisse zu gewährleisten.

Eine Schmelzkurvenanalyse (0 sek bei 95°C, 12 sek bei 65 °C und 0 sek bei 95 °C) wurde jeweils direkt im Anschluss an die PCR durchgeführt. Für die *Real-time* PCR sowie für die Schmelzkurvenanalyse wurden Glaskapillaren des LightCycler® 2.0 Systems verwendet. Sämtliche Proben wurden mindestens sechs Durchläufen unterzogen. Die Datenverarbeitung erfolgte mit der gerätespezifischen LightCycler® Software 4.05 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).



**Abb. 3.3.2.1.1: Darstellung des typischen Verlaufes einer quantitativen ALU Real-time PCR mit der LightCycler® Software.** Gezeigt ist das Fluoreszenzsignal aller Proben eines Laufes bei 530 nm, zeitlich aufgetragen anhand der Anzahl der durchgeführten Zyklen. Der Pfeil markiert dasjenige Signal der mitgeführten Eichkurve, welches mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Melanomzellen zuerst ansteigt.

### 3.4 Lichtmikroskopische Untersuchung

Vor der histologischen Begutachtung wurden sämtliche Schnitte randomisiert verblindet und codiert, um eine Verfälschung der Resultate durch eventuelle, nicht-objektive Erwartungshaltung des Untersuchenden auszuschließen. Die histologische Analyse wurde mithilfe des Axioplan Digitalmikroskop 35 mm (Zeiss, Oberkochen) durchgeführt.

Bei 100-facher Vergrößerung wurden die HE-gefärbten Schnitte des Lungengewebes meanderförmig begutachtet und die Lungenmetastasen ausgezählt. Die Anzahl der in der gesamten Lunge enthaltenen Metastasen wurde nach der Formel von Jojovic und Schumacher (2000) bestimmt:

$$(\text{Met}_{\text{ges}} * n) - 20 \% = \text{Anzahl pulmonaler Gesamtmetastasen}$$

**Abb. 3.4.1: Formel zur Berechnung der pulmonalen Gesamtmetastasierung nach Jojovich und Schumacher (2000).**  $\text{Met}_{\text{ges}}$  = Durchschnitt mikroskopisch gezählter Metastasen,  $n$  = Gesamtmenge an Gewebeschnitten.

Für die Ermittlung der in den Primärtumoren enthaltenen BSA-I-positiven dendritischen Zellen wurden die immunhistochemisch gefärbten Primärtumoren lichtmikroskopisch ausgewertet. Hierzu wurde ein Okular mit Zählgitternetz benutzt, welches aus  $10 \times 10$  Kästchen bestand. Es wurden die vitalen Areale des Primärtumors bestimmt und anschließend in einer 100-fachen Vergrößerung drei aneinandergrenzende Gesichtsfelder

ausgezählt. Pro Gesichtsfeld wurden in dem Zählgitter 500 Zellen mit einem Zellzähler gezählt und der prozentuale Anteil der Dendriten in diesem Feld bestimmt. Die insgesamt ermittelte Zellzahl betrug somit 1500 Zellen pro Primärtumor. Die Ergebnisse der drei Gesichtsfelder wurden im Anschluss zu einem Mittelwert vereint. Bei der Auszählung der Zellen wurden ausschließlich Melanomzellen sowie diejenigen dendritischen Zellen, deren Nucleus eindeutig zu erkennen war, berücksichtigt.

Alle Ergebnisse wurden nochmals mit denen eines weiteren unabhängigen Untersuchers verglichen. Abweichende Resultate wurden neu bewertet und gesichert. Nach Beendigung aller Zählungen wurde die Verblindung aufgehoben, und es erfolgte die Zuordnung der Schnitte zur jeweiligen Gruppe. Für die photographische Dokumentation wurde die Axiocam MRc5 Digitalkamera (Zeiss, Oberkochen) verwendet.

### 3.5 Statistische Auswertung

Für alle statistischen Berechnungen und Graphen wurde die Software Graph Pad Prism™ (*Intuitive Software for Science*, San Diego, Kalifornien, USA) verwendet, wobei p-Werte  $< 0,05$  als statistisch signifikant bewertet wurden. Ein signifikanter Unterschied wurde in der Graphik gekennzeichnet (\*p  $< 0,05$ ; \*\*p  $< 0,01$ ) und im Text erwähnt. Alle graphisch dargestellten Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM (Standardfehler des Mittelwertes) aufgeführt. Dafür wurde vorausgesetzt, dass die Daten normalverteilt waren und gleiche Varianzen aufwiesen.

Das Tumorgewicht, die Lungenmetastasierung, die Anzahl dendritischer Zellen sowie der Gehalt an zirkulierenden Tumorzellen im Blut der einzelnen Gruppen wurden bezüglich der Wirkung von Iscador® bzw. ML-I verglichen. Die statistisch signifikanten Unterschiede der Mittelwerte wurden durch eine *one-way ANOVA* (einfaktorielle Varianzanalyse) nachgewiesen. Als Post-Test wurde ein *Tukey*-Test durchgeführt. Die verschiedenen Variablen wurden mittels des *Pearson*-Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) auf eine Korrelation hin untersucht.

## 4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss des Naturheilmittels Iscador® mit seinem Hauptbestandteil Mistellektin-I (ML-I) auf das Primärtumorwachstum und das Metastasierungsverhalten der humanen Melanomzelllinie MV3, sowie auf die Induktion des unspezifischen Immunsystems in Form von Induktion der Einwanderung dendritischer Zellen in den Tumor im Xenograftmodell ermittelt werden. Es wurde hierzu ein Vergleich in der Behandlung zweier Mausarten durchgeführt, bei dem zum einen *scid*-Mäuse und zum anderen *pfp/rag2*-Mäuse verwendet wurden.

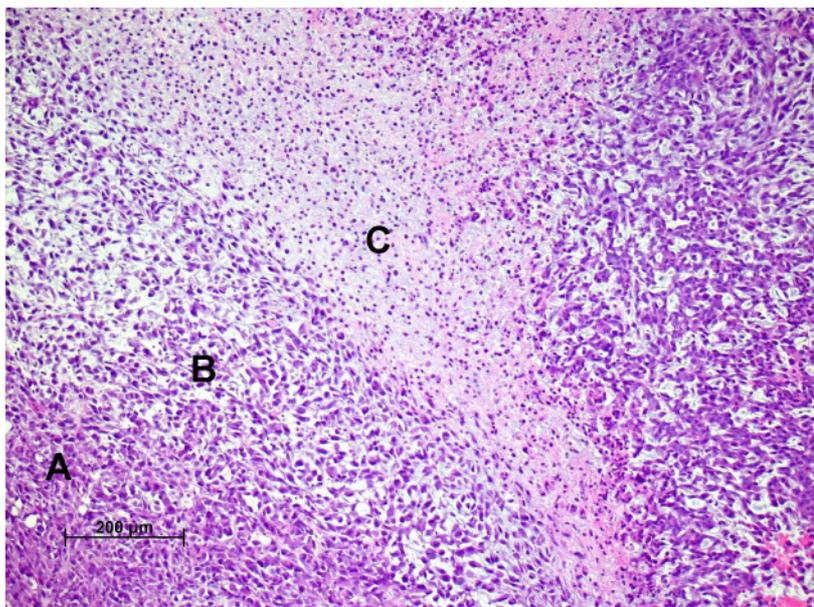
### 4.1 *scid*-Mäuse

#### 4.1.1 Charakterisierung des Primärtumorgewichtes in *scid*-Mäusen

Um zu Beginn der Untersuchung die Anwachsrate der inokulierten Melanomzellen zu überprüfen, wurde am siebten Tag nach Verabreichung der Melanomzellen eine Palpation der Primärtumoren durchgeführt, wobei zu diesem Zeitpunkt bei 66 von 79 Tieren (= 84 %) ein Primärtumor getastet werden konnte, dessen Größe mindestens der eines Reiskornes entsprach. Im Verlauf konnten sämtliche Primärtumoren getastet werden und es zeigte sich eine Anwachsrate von 100% in allen Gruppen.

Durch den Tod zweier Tiere im Laufe des Versuches wurden 77 Primärtumoren in der weiteren Auswertung berücksichtigt.

Zu Versuchsende wiesen 23 von 77 Tieren (= 30 %) ulzerierte Primärtumoren auf, während 3 Tiere (= 4 %) nekrotisch veränderte Primärtumoren zeigten, welche sich sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch (Abb. 4.1.1.1) erkennen ließen. Von den 26 Tieren mit Ulkus bzw. Nekrose stammten 9 Tiere aus der Kontrollgruppe (7 Ulzera, 2 Nekrosen), 4 Tiere aus der 10 ng/kg Gruppe (4 Ulzera), 5 Tiere aus der 30 ng/kg Gruppe (4 Ulzera, 1 Nekrose) und 8 Tiere aus der 150 ng/kg Gruppe (8 Ulzera). Zusätzlich fiel auf, dass etwa 50 % der Primärtumoren eine zystisch-mukoid veränderte Struktur aufwiesen.



**Abb. 4.1.1.1: Primärtumor der *scid* 30 ng/kg KG-Gruppe.** Dargestellt ist das für die *scid*-Mäuse typische Bild eines Primärtumors mit vitaler Tumorrandozone (A), Intermediärzone (B) und zentraler Nekrose (C). HE-Färbung. 25-fache Vergrößerung. Der Maßstabsbalken zeigt 200  $\mu\text{m}$ .

In der makroskopischen Begutachtung und Gewichtsdocumentation aller Primärtumoren wurden 19 Tiere der Kontrollgruppe, jeweils 20 Tiere der 10- und 30 ng/kg KG Gruppe sowie 18 Tiere der 150 ng/kg KG Gruppe berücksichtigt.

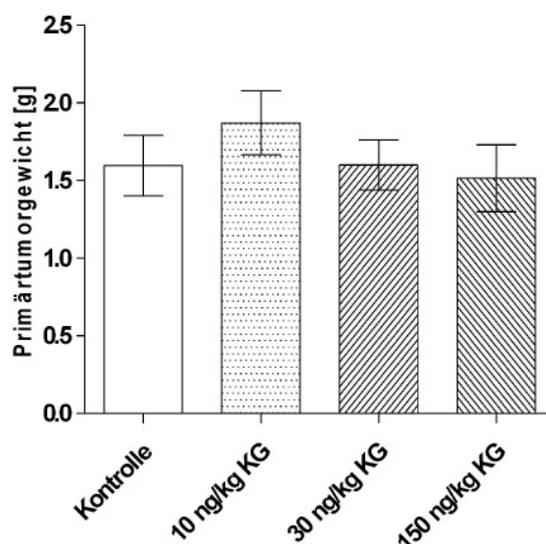
Gruppe	Durchschnittliches TG [g]	Varianz (min - max) [g]
Kontrolle	1,67 $\pm$ 0,18	0,50 - 3,70
10 ng/kg KG	1,87 $\pm$ 0,20	0,60 - 3,60
30 ng/kg KG	1,60 $\pm$ 0,16	0,40 - 2,90
150 ng/kg KG	1,51 $\pm$ 0,21	0,27 - 3,90

**Tab. 4.1.1.1: Durchschnittliches Primärtumorgewicht unter Angabe der Varianz in allen *scid*-Gruppen.** Dargestellt ist das durchschnittliche Primärtumorgewicht in allen Gruppen sowie die jeweilige Varianz (min = Minimum, max = Maximum, TG = Tumorgewicht). Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Während in der Kontrollgruppe die Primärtumorgewichte von 0,5 bis 3,7 g variierten, zeigten sich in den Behandlungsgruppen Streubreiten zwischen 0,6 und 3,6 g (10 ng/kg KG), 0,4 und 2,9 g (30 ng/kg KG) bzw. 0,3 und 3,9 g (150 ng/kg KG) (Tab. 4.1.1.1).

Bezüglich des durchschnittlichen Tumorgewichts zeigte sich in der 10 ng/kg KG-Gruppe mit 1,9 g eine Erhöhung um das 1,11-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe (1,7 g). Hinsichtlich

der 30- bzw. 150 ng/kg KG-Gruppe ergab sich ein leichtes Absinken des durchschnittlichen Gewichts auf 1,6 bzw. 1,5 g, wobei sich jedoch keine statistisch signifikanten Differenzen feststellen ließen (Abb. 4.1.1.2).

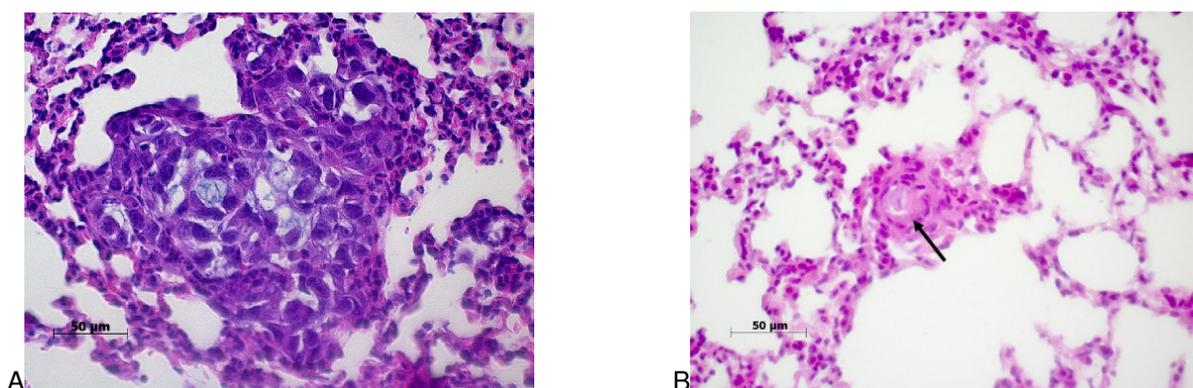


**Abb. 4.1.1.2: Durchschnittliches Primärtumorgewicht in allen *scid*-Gruppen.** In der vergleichenden Darstellung des durchschnittlichen Primärtumorgewichts zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Kontrollgruppe (n = 19), der 10 ng/kg KG-Gruppe (n = 20), der 30 ng/kg KG-Gruppe (n = 20) und der 150 ng/kg KG-Gruppe (n = 18). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Zusammenfassend ließ sich in den *scid*-Gruppen keine signifikante Abhängigkeit des Primärtumorgewichts von der Behandlung mit ML-I feststellen.

#### 4.1.2 Charakterisierung des Metastasierungsverhaltens von MV3 in *scid*-Mäusen

Mit dem Ziel, einen Einfluss unterschiedlicher Dosierungen von ML-I auf das pulmonale Metastasierungsverhalten der malignen Melanomzelllinie MV3 zu analysieren, wurden die geschnittenen Lungen nach der Vorbereitung (3.1.5) sowie HE-Färbung (3.2.1) wie unter 3.4 beschrieben lichtmikroskopisch ausgewertet. Während der vorgenommenen meanderförmigen Durchmusterung der einzelnen Schnitte wurde insbesondere der Gehalt an soliden extra- und intravasalen Metastasen (Abb. 4.1.2.1) sowie extravasalen Einzelzellen (EZ e) dokumentiert. Unter dem im Folgenden verwendeten Begriff der Gesamtmetastasierung wird sowohl die extra- als auch die intravasale Metastasierung zusammengefasst. EZ e ließen sich in dieser Mausart nicht finden.



**Abb. 4.1.2.1: Pulmonale Metastasen der *scid* 10 ng/kg KG-Gruppe.** Dargestellt sind eine extravasale (A) sowie eine kleine intravasale pulmonale Metastase (B). Der Pfeil deutet auf das noch erhaltene Gefäßendothel. HE-Färbung. Links 50-fache, rechts 100-fache Vergrößerung. Der Maßstabsbalken zeigt jeweils 50 µm.

#### 4.1.2.1 Pulmonale Gesamtmetastasierung von MV3 in *scid*-Mäusen

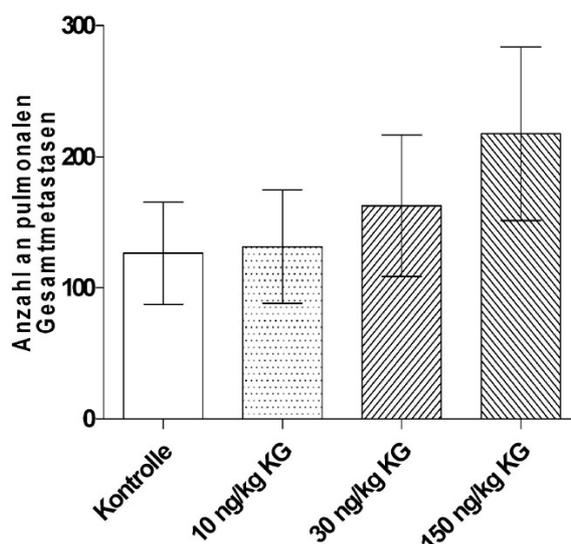
Für die Analyse der pulmonalen Gesamtmetastasierung wurden Lungen von insgesamt 71 Tieren berücksichtigt (Kontrollgruppe n = 15, 10- und 30 ng/kg KG-Gruppe n = 19, 150 ng/kg KG-Gruppe n = 18). Von diesen 71 Tieren mit palpablen Primärtumoren bildeten sich bei 51 Tieren (72 %) extra- und intravasale pulmonale Metastasen aus. Die bei insgesamt 12 Tieren gefundenen intravasalen Metastasen waren stets begleitet durch das Vorkommen von extravasalen Metastasen.

Gruppe	Metastasierungsrate [%]	Anzahl Metastasen gesamt	Varianz (min - max) [g]	TG [g]
Kontrolle	80	126 ± 39	0 - 408	1,67 ± 0,18
10 ng/kg	63	131 ± 43	0 - 640	1,87 ± 0,20
30 ng/kg	68	163 ± 54	0 - 757	1,60 ± 0,16
150 ng/kg	78	218 ± 66	0 - 998	1,51 ± 0,21

**Tab. 4.1.2.1.1: Metastasierungsrate und Anzahl an Gesamtmetastasen unter Angabe von Varianz und Primärtumorgewicht in allen *scid*-Gruppen.** Dargestellt ist die Metastasierungsrate und Anzahl an Gesamtmetastasen (min = Minimum, max = Maximum). Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM.

Die Kontrollgruppe wies eine Metastasierungsrate von 80 % auf, dagegen zeigten sich in den jeweiligen Behandlungsgruppen geringere Werte (10 ng/kg-Gruppe 63 %, 30 ng/kg KG-Gruppe 68 %, 150 ng/kg KG-Gruppe 78 %). Zudem ließ sich ein Anstieg der Anzahl an

Gesamtmetastasen von 126 Metastasen in der Kontrollgruppe um das 1,4-fache in der 10 ng/kg KG-Gruppe, um das 1,28-fache in der 30 ng/kg KG-Gruppe sowie um das 1,72-fache in der 150 ng/kg KG-Gruppe feststellen (Tab. 4.1.2.1.1 und Abb. 4.1.2.1.1).



**Abb. 4.1.2.1.1: Durchschnittliche Anzahl an pulmonalen Gesamtmetastasen in allen *scid*-Gruppen.** Bei zunehmender Iscador<sup>®</sup>-Behandlungsdosis zeigt sich ein kontinuierlicher Anstieg in der Anzahl der pulmonalen Gesamtmetastasen über alle Behandlungsgruppen (10- und 30 ng/kg KG-Gruppe n = 19, 150 ng/kg KG-Gruppe n = 18) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n = 15). Die gezeigten Unterschiede weisen keine statistische Signifikanz auf. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

In der Zusammenfassung ergab sich eine positive, aber statistisch nicht-signifikante Korrelation zwischen steigender Iscador<sup>®</sup>-Dosis und zunehmender Anzahl an Gesamtmetastasierung in den Lungen der *scid*-Mäuse.

#### 4.1.2.2 Extravasale pulmonale Metastasierung von MV3 in *scid*-Mäusen

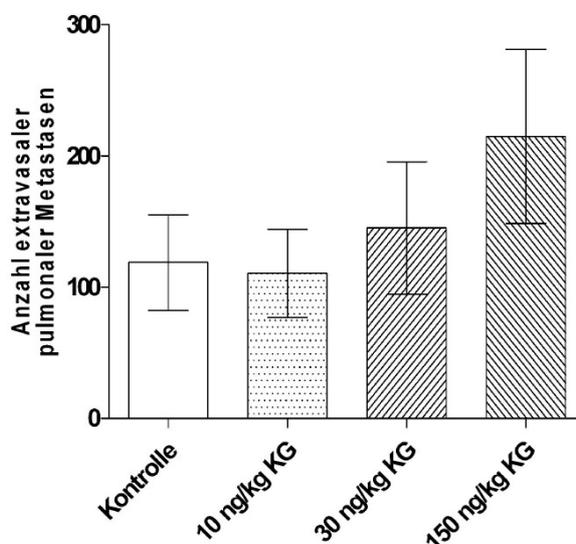
Um Rückschlüsse insbesondere auf die Art der in *scid*-Mäusen ablaufenden Metastasierungskaskade von MV3 unter der Wirkung von Iscador<sup>®</sup> zu ermöglichen, wurde neben der Gesamtmetastasierung ebenso die extravasale Metastasierung im Einzelnen bewertet, um den Schritt der Ausschleusung der Melanomzellen aus dem Blutgefäß genauer betrachten zu können. Hierzu wurden die soliden extravasalen Metastasen, bestehend aus zwei oder mehr nebeneinander liegenden Melanomzellen, sowie etwaig vorliegende EZ e wie unter 3.4 beschrieben lichtmikroskopisch ausgewertet.

Bezüglich der *scid*-Mäuse kamen aufgrund fehlender EZ e lediglich die soliden extravasalen Metastasen für die Auswertung in Betracht.

Gruppe	Metastasierungsrate [%]	Anzahl Metastasen extravasal	Varianz (min - max) [g]	TG [g]
Kontrolle	80	119 ± 36	0 - 408	1,67 ± 0,18
10 ng/kg	63	111 ± 34	0 - 576	1,87 ± 0,20
30 ng/kg	68	145 ± 50	0 - 757	1,60 ± 0,16
150 ng/kg	78	215 ± 66	0 - 998	1,51 ± 0,21

**Tab. 4.1.2.2.1: Pulmonale Metastasierungsrate sowie durchschnittliche Anzahl extravasaler Lungenmetastasen unter Angabe von Varianz und Primärtumorgewicht in allen *scid*-Gruppen.** Dargestellt ist die pulmonale Metastasierungsrate und Anzahl extravasaler pulmonaler Metastasen (min = Minimum, max = Maximum). Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM.

Insgesamt fanden sich bei 51 der 71 *scid*-Tiere (72 %) extravasale Lungenmetastasen. Weiterhin zeigte sich in den Behandlungsgruppen ein kontinuierlicher Anstieg der durchschnittlichen Anzahl an extravasalen Metastasen (Tab. 4.1.2.2.1 und Abb. 4.1.2.2.1).



**Abb. 4.1.2.2.1: Durchschnittliche Anzahl extravasaler pulmonaler Metastasen in allen *scid*-Gruppen.** Bei zunehmender ML-I-Behandlungsdosis zeigt sich ab der 10 ng/kg KG-Gruppe (n = 19) ein kontinuierlicher, statistisch nicht-signifikanter Anstieg in der Anzahl der extravasalen pulmonalen Metastasen in den Behandlungsgruppen (30 ng/kg KG-Gruppe n = 19, 150 ng/kg KG-Gruppe n = 18). Im Vergleich zur Kontrollgruppe (n = 15) sind die Werte der 10 ng/kg KG-Gruppe erniedrigt, weisen jedoch keine statistische Signifikanz auf. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

Zusammenfassend ergab sich für die *scid*-Gruppen eine positive, aber statistisch nicht-signifikante Korrelation zwischen steigender Iscador®-Dosis und zunehmender Anzahl an extravasaler pulmonaler Metastasierung.

#### 4.1.2.3 Intravasale pulmonale Metastasierung von MV3 in *scid*-Mäusen

Weitere Aufschlüsse über das Metastasierungsverhalten von MV3 in *scid*-Mäusen unter dem Einfluss von Iscador® sollten sich aus der zusätzlichen Beurteilung der intravasalen Metastasierung ergeben.

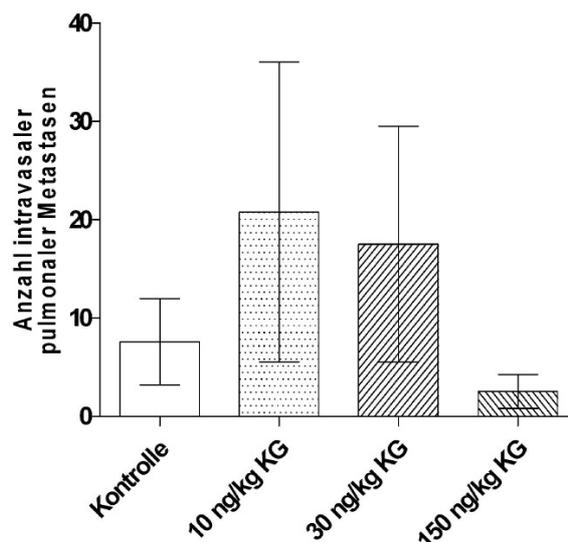
Gruppe	Metastasierungsrate [%]	Anzahl Metastasen intravasal	Varianz (min - max) [g]	TG [g]
Kontrolle	20	8 ± 4	0 - 56	1,67 ± 0,18
10 ng/kg	21	21 ± 15	0 - 288	1,87 ± 0,20
30 ng/kg	16	18 ± 12	0 - 221	1,60 ± 0,16
150 ng/kg	11	3 ± 2	0 - 23	1,51 ± 0,21

**Tab. 4.1.2.3.1: Intravasale Metastasierungsrate sowie durchschnittliche Anzahl intravasaler pulmonaler Metastasen unter Angabe von Varianz und Primärtumorgewicht in allen *scid*-Gruppen.** Dargestellt sind intravasale Metastasierungsrate und Anzahl intravasaler pulmonaler Metastasen (min = Minimum, max = Maximum). Gezeigt ist jeweils der Mittelwert ± SEM.

Insgesamt fanden sich bei 12 der 71 Tiere (17 %) solide intravasale Metastasen. In Anbetracht einer bei 51 *scid*-Tieren vorgefundenen Gesamtmetastasierung ergab sich somit eine intravasale Metastasierung bei 24 % dieser Tiere.

Während die Kontrollgruppe eine intravasale Metastasierungsrate von 20 % aufwies, zeigte sich in der 10 ng/kg KG-Gruppe ein nicht-signifikanter Anstieg auf 21 %. Für die weiteren Behandlungsgruppen ergaben sich geringere Raten von 16 % in der 30- bzw. 11 % in der 150 ng/kg KG-Gruppe (Tab. 4.1.2.3.1).

Gleichzeitig fand sich zwischen den Behandlungsgruppen ein Abfall der durchschnittlichen Anzahl an intravasalen Metastasen bei steigender Iscador®-Dosis (Abb. 4.1.2.3.1).

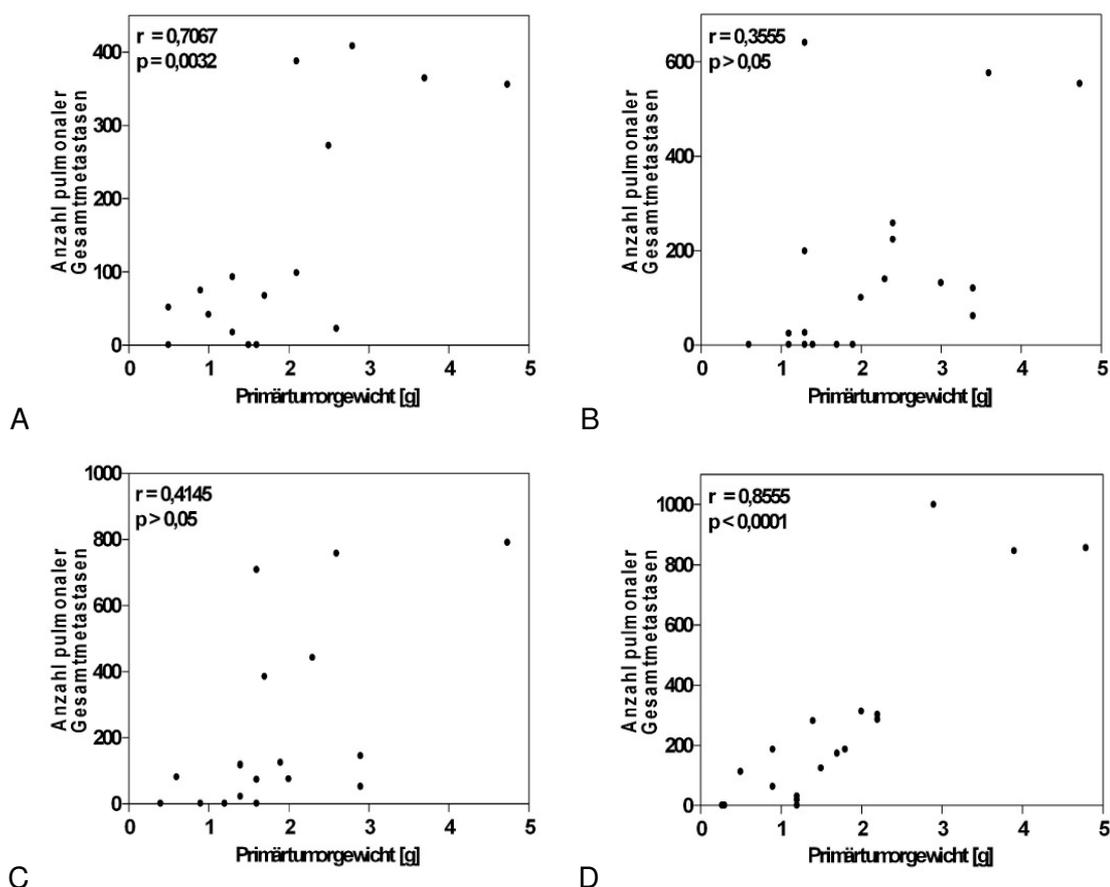


**Abb. 4.1.2.3.1: Durchschnittliche Anzahl intravasaler pulmonaler Metastasen in allen *scid*-Gruppen.** Bei zunehmender ML-I-Behandlungsdosis zeigt sich ab der 10 ng/kg KG-Gruppe (n = 19) ein kontinuierlicher, statistisch nicht-signifikanter Abfall in der Anzahl der intravasalen pulmonalen Metastasen in den Behandlungsgruppen (30 ng/kg KG-Gruppe n = 19, 150 ng/kg KG-Gruppe n = 18). Im Vergleich zur Kontrollgruppe (n = 15) sind die Werte der 10- und 30 ng/kg KG-Gruppe erhöht sowie in der 150 ng/kg KG-Gruppe erniedrigt, weisen jedoch keine statistische Signifikanz auf. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Zusammenfassend ergab sich bezüglich der intravasalen Metastasierung in *scid*-Mäusen eine statistisch nicht-signifikante Verminderung der durchschnittlichen Anzahl intravasaler pulmonaler Metastasen in der 150 ng/kg KG-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, während sowohl in der 10- als auch in der 30 ng/kg KG-Gruppe deutlich erhöhte Werte gegenüber der Kontrollgruppe zu finden waren.

#### 4.1.3 Korrelation zwischen Primärtumorgewicht und pulmonaler Gesamtmetastasierung in *scid*-Mäusen

Es zeigte sich in allen Gruppen der *scid*-Mäuse eine positive Korrelation zwischen Primärtumorgewicht und pulmonaler Gesamtmetastasierung, wobei sowohl die Kontrollgruppe ( $r = 0,7067$ ,  $p < 0,0032$ ) als auch die 150 ng/kg KG-Gruppe ( $r = 0,8555$ ,  $p < 0,0001$ ) eine hochsignifikante Korrelation aufwiesen (Abb. 4.1.3.1 A – D).



**Abb. 4.1.3.1: Korrelation von Primärtumorgewicht und pulmonaler Gesamtmetastasierung in allen *scid*-Gruppen.** Dargestellt ist eine positive, in **A** und **D** zusätzlich hochsignifikante Korrelation (\*\* $p < 0,01$ ) zwischen dem Primärtumorgewicht und der pulmonalen Gesamtmetastasierung in allen *scid*-Gruppen ((**A**) = Kontrollgruppe, (**B**) = 10 ng/kg KG-Gruppe, (**C**) = 30 ng/kg KG-Gruppe, (**D**) = 150 ng/kg KG-Gruppe).

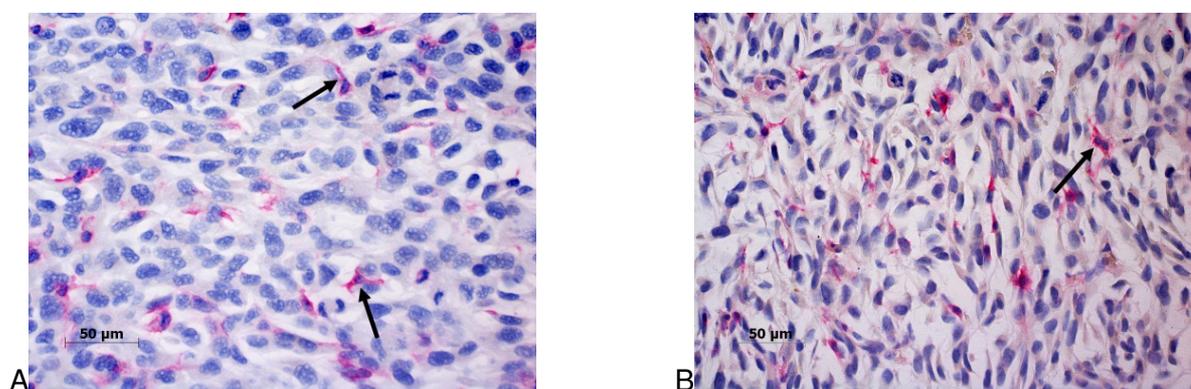
#### 4.1.4 Charakterisierung der dendritischen Zellen in den Primärtumoren der *scid*-Mäuse

Die immunhistochemische Aufbereitung und Untersuchung der dendritischen Zellen mit dem biotinylierten Lektin BSA-I (3.2.2) diente dem Ziel, eine Aussage über die durch Iscador® herbeigeführte Induktion des unspezifischen Immunsystems treffen zu können und hierbei festzulegen, welche Behandlungsdosis ein geeignetes Verhältnis zwischen möglichst effektiver Induktion des Immunsystems und gleichzeitig möglichst geringer, da auch die dendritischen Zellen betreffender, direkter Zytotoxizität bietet.

Bereits im Rahmen der makroskopischen Begutachtung der Primärtumoren zeigte sich eine hohe Rate an Ulzerationen sowie eine zentral nekrotische oder zystisch-mukoid veränderte Struktur, wovon Primärtumoren sämtlicher *scid*-Gruppen betroffen waren (4.1.1, Abb. 4.1.1.1). Infolgedessen stand oftmals lediglich ein schmaler, sich für die mikroskopische

Analyse eignender Randsaum unbeeinträchtigt Tumorgewebes zur Verfügung. In den Gewebeschnitten der Primärtumoren zeigte sich eine Anfärbung der Nekroseareale und Lymphozyten, sowie der Bindegewebszellen der Tumorkapsel und der größeren Gefäße. Hiervon klar morphologisch abzugrenzen waren jedoch die dendritischen Zellen, welche eine Reaktion in Form homogener, intensiver Rotfärbung des gesamten Zytoplasmas aufwiesen. In die Analyse wurden jedoch ausschließlich diejenigen dendritischen Zellen einbezogen, deren Zellkerne sowie Zellfortsätze deutlich zu erkennen waren (Abb. 4.1.4.1).

Bei der mikroskopischen Auswertung der BSA-I gefärbten Primärtumorschnitte wurden die Schnitte von 16 Tieren der Kontrollgruppe, von 19 bzw. 20 Tieren der 10- bzw. 30 ng/kg KG-Gruppe sowie von 17 Tieren der 150 ng/kg KG-Gruppe berücksichtigt. Die während des Färbeprozesses mitgeführten Negativkontrollen wiesen keine Bindung des BSA-I-Lektins auf.



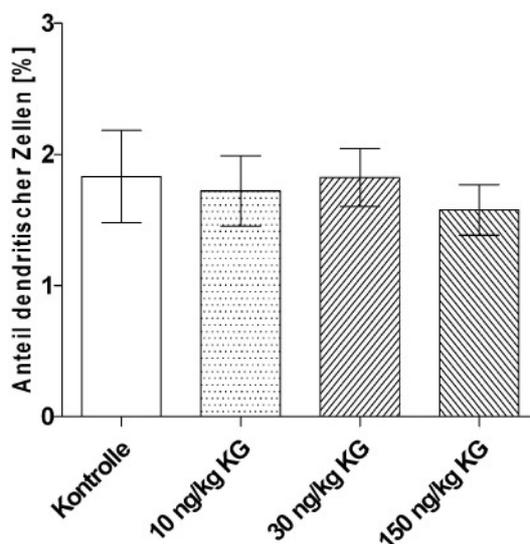
**Abb. 4.1.4.1: Dendritische Zellen in Primärtumoren der *scid*-Mäuse.** Dargestellt sind dendritische Zellen in Primärtumoren der 10 ng/kg KG-Gruppe (**A**) sowie der 30 ng/kg KG-Gruppe (**B**) der *scid*-Mäuse. Die Pfeile deuten exemplarisch auf dendritische Zellen mit klar erkennbaren Zellfortsätzen. In (**B**) zeigt sich zusätzlich eine dendritische Zelle mit doppeltem Nucleus. BSA-I-Färbung. 100-fache Vergrößerung. Der Maßstabsbalken stellt jeweils 50 µm dar.

Bezüglich der Anzahl an Primärtumoren, welche eine Expression dendritischer Zellen aufwiesen, zeigte sich in der Kontrollgruppe eine Rate von 94 % (15 von 16 Primärtumoren), während in sämtlichen Behandlungsgruppen eine Rate von 100 % festzustellen war.

Gruppe	Dendritenexpression in PT [%]	Anteil dendritischer Zellen [%]	Varianz (min - max) [g]
Kontrolle	94	1,8 ± 0,4	0,0 - 4,1
10 ng/kg	100	1,7 ± 0,3	0,3 - 5,0
30 ng/kg	100	1,8 ± 0,2	0,5 - 4,2
150 ng/kg	100	1,6 ± 0,2	0,1 - 3,1

**Tab. 4.1.4.1: Prozentuale Dendritenexpression in den Primärtumoren und durchschnittlicher Dendritenanteil unter Angabe der Varianz in allen *scid*-Gruppen.** Gezeigt sind die Anzahl dendritische Zellen exprimierender Primärtumoren sowie der prozentuale Anteil dendritischer Zellen an der Gesamtzellzahl (min = Minimum, max = Maximum). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert ± SEM.

Im Vergleich des prozentualen Anteils dendritischer Zellen an der ausgezählten Gesamtzellzahl zeigte sich in allen Behandlungsgruppen ein niedrigerer Anteil an Dendriten gegenüber der Kontrollgruppe mit durchschnittlich 1,8 %. Während die 10- bzw. 150 ng/kg KG-Gruppe einen Anteil von 1,7 % (94 % des Kontrollgruppenwertes) bzw. 1,6 % (86 % des in der Kontrollgruppe gezeigten Wertes) aufwies, ergab sich für die 30 ng/kg KG-Gruppe ein zum Ergebnis der Kontrollgruppe unveränderter Wert (Tab. 4.1.4.1, Abb. 4.1.4.2).



**Abb. 4.1.4.2: Anteil dendritischer Zellen in den Primärtumoren aller *scid*-Gruppen.** Gezeigt ist der prozentuale Anteil dendritischer Zellen an der ausgezählten Gesamtzellzahl in allen *scid*-Gruppen. Gegenüber der Kontrollgruppe (n = 16) zeigt sich eine Verminderung des Anteils dendritischer Zellen in der 10- (n = 19) und 150 ng/kg KG-Gruppe (n = 17), während das Ergebnis der 30 ng/kg KG-Gruppe (n = 20) nahezu dem der Kontrollgruppe entspricht. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

Zusammenfassend zeigte sich in den Primärtumoren der *scid*-Mäuse keine Induktion der Einwanderung dendritischer Zellen unter der Behandlung mit Iscador®.

#### 4.1.5 Disseminierte MV3-Melanomzellen im Blut der *scid*-Mäuse

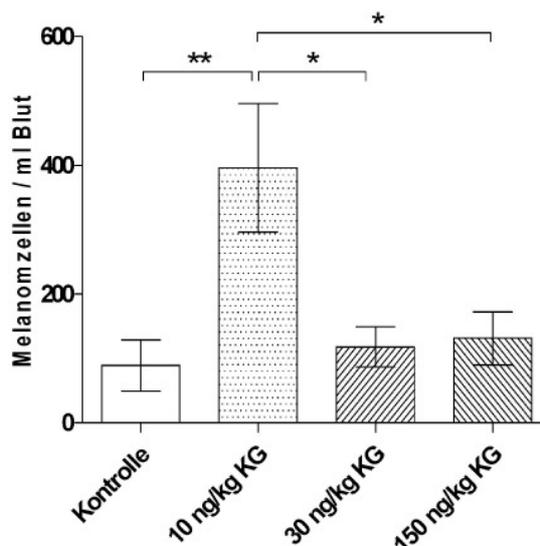
Für die Quantifikation disseminierter Tumorzellen im Blut der *scid*-Mäuse wurde eine *Real-time* PCR von humanen *ALU*-Sequenzen aus den Melanomzellen (3.3.2) durchgeführt.

Disseminierte Tumorzellen konnten bei 71 der insgesamt 74 Tiere (96 %) nachgewiesen werden (Tab. 4.1.5.1).

Gruppe	Nachweis disseminierter Melanomzellen [%]	Gehalt disseminierter Melanomzellen / ml Blut	Varianz (min - max) [g]
Kontrolle	95	89 ± 40	0 - 769
10 ng/kg	85	396 ± 100	0 - 1422
30 ng/kg	100	118 ± 31	9 - 447
150 ng/kg	100	131 ± 41	2 - 518

**Tab. 4.1.5.1: Nachweisrate disseminierter Melanomzellen sowie durchschnittlicher Gehalt an Melanomzellen im Blut unter Angabe der Varianz in allen *scid*-Gruppen.** Gezeigt ist der prozentuale Nachweis disseminierter Melanomzellen sowie Anzahl identifizierter Melanomzellen pro ml Mausblut (min = Minimum, max = Maximum). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert ± SEM.

In der Kontrollgruppe konnte die geringste Anzahl an disseminierten Melanomzellen im Blut nachgewiesen werden. Die 10 ng/kg KG-Gruppe wies einen signifikanten Anstieg der Melanomzellen/ml Blut im Vergleich zur Kontrollgruppe auf, während sich weder in der 30- noch in der 150 ng/kg KG-Gruppe ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe zeigte. Allerdings war die Anzahl der disseminierten Melanomzellen im Blut sowohl in der 30- als auch in der 150 ng/kg KG-Gruppe signifikant reduziert, wenn sie mit der 10 ng/kg KG-Gruppe verglichen wurde (Tab. 4.1.5.1, Abb. 4.1.5.1).



**Abb. 4.1.5.1: Disseminierte MV3-Melanomzellen im Blut der *scid*-Mäuse.** Gegenüber der Kontrollgruppe (n = 19) zeigt sich in allen Behandlungsgruppen ein erhöhter Gehalt disseminierter Tumorzellen, wobei sich dieser Anstieg in der 10 ng/kg KG-Gruppe (n = 20) als hochsignifikant (\*\*p < 0,01) gegenüber der Kontrollgruppe erweist. Die 10 ng/kg KG-Gruppe zeigt ebenso signifikant (\*p < 0,05) erhöhte Werte gegenüber der 30- (n = 18) und der 150 ng/kg KG-Gruppe (n = 17). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*p < 0,05, \*\*p < 0,01).

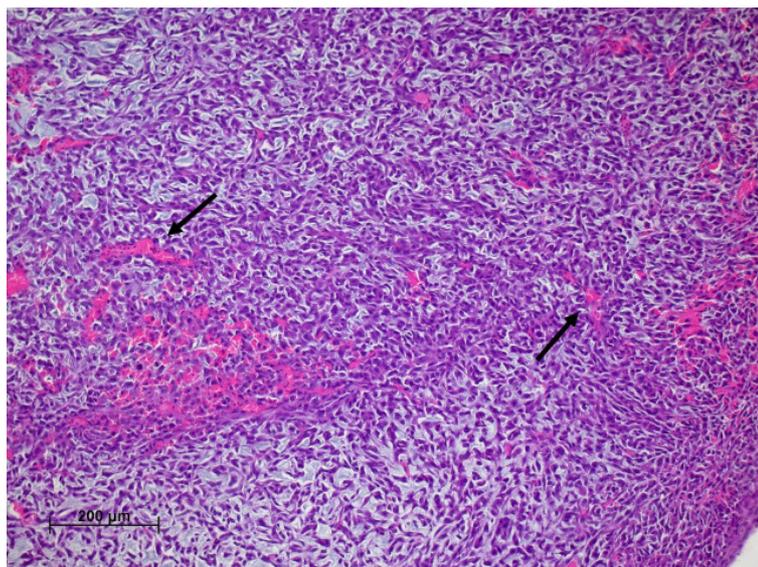
## 4.2 *pfp/rag2*-Mäuse

### 4.2.1 Charakterisierung des Primärtumorgewichtes in *pfp/rag2*-Mäusen

Um zu Beginn der Untersuchung die Anwachsrate der inokulierten Melanomzellen zu überprüfen, wurde am siebten Tag nach Verabreichung der Melanomzellen eine Palpation der Primärtumoren durchgeführt. Bei 50 von 82 Tieren (= 61%) konnte zu diesem Zeitpunkt ein Primärtumor palpieren werden, dessen Größe mindestens der eines Reiskornes entsprach. Im Verlauf zeigte sich eine Anwachsrate in der Kontrollgruppe 95 %, in den Behandlungsgruppen jeweils 100 %, wobei sämtliche Tumoren zu palpieren waren.

Durch den Tod eines Tieres im Verlauf der Behandlungszeit wurden 81 Primärtumoren in der weiteren Auswertung berücksichtigt. Innerhalb der Kontrollgruppe entwickelte sich bei einem Tier kein Tumor. Dieser Wert wurde dennoch in Form eines Primärtumorgewichts von 0 g in die Auswertung miteinbezogen.

Zu Versuchsende fanden sich bei 18 von 81 Tieren (= 22 %) ulzerierte Primärtumoren, wovon 7 Tiere aus der Kontrollgruppe, 4 Tiere aus der 10 ng/kg Gruppe, 4 Tiere aus der 30 ng/kg Gruppe und 3 Tiere aus der 150 ng/kg Gruppe betroffen waren. Nekrosen fanden sich nicht.



**Abb. 4.2.1.1: Primärtumor der *pfp/rag2* 150 ng/kg KG-Gruppe.** Gezeigt ist ein für die *pfp/rag2*-Mäuse typischer Primärtumor. Die Pfeile deuten auf in den Tumor einwachsende Blutgefäße. HE-Färbung. 25-fache Vergrößerung. Der Maßstabsbalken zeigt 200  $\mu\text{m}$ .

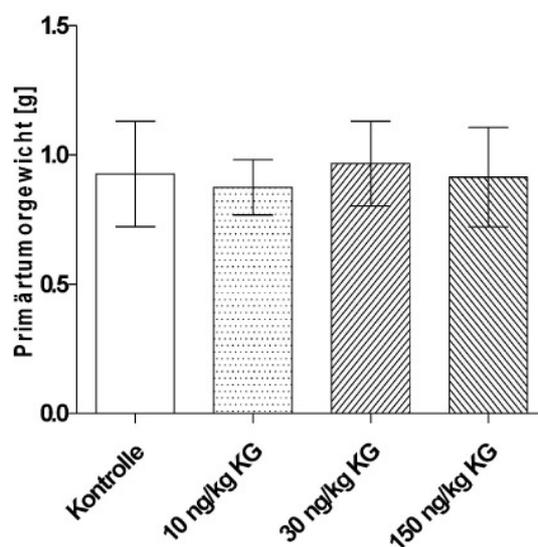
Bei der nach sorgfältiger Präparation, makroskopischer Begutachtung und Gewichtsdocumentation aller Primärtumoren durchgeführten Analyse bezüglich der Gewichtsunterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden 19 Tiere der Kontrollgruppe, 20 Tiere der 10 ng/kg KG-Gruppe, sowie jeweils 21 Tiere der 30- und 150 ng/kg KG-Gruppe berücksichtigt.

Gruppe	Durchschnittliches TG [g]	Varianz (min - max) [g]
Kontrolle	$0,93 \pm 0,20$	0,00 - 3,90
10 ng/kg	$0,88 \pm 0,11$	0,30 - 2,20
30 ng/kg	$0,99 \pm 0,17$	0,20 - 3,00
150 ng/kg	$0,91 \pm 0,19$	0,02 - 3,10

**Tab. 4.2.1.1: Durchschnittliches Primärtumorgewicht unter Angabe der Varianz in allen *pfp/rag2*-Gruppen.** Darstellung des durchschnittlichen Primärtumorgewichts (min = Minimum, max = Maximum). Gezeigt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM.

Während in der Kontrollgruppe die Primärtumorgewichte von 0 bis 3,9 g variierten, zeigten sich in den Behandlungsgruppen Streubreiten zwischen 0,3 und 2,2 g (10 ng/kg KG), 0,2 und 3,0 g (30 ng/kg KG) bzw. 0,02 und 3,1 g (150 ng/kg KG) (Tab. 4.2.1.1).

Bezüglich des durchschnittlichen Tumorgewichts zeigte sich in der 10 ng/kg KG-Gruppe bei 0,88 g ein Absinken auf 95 % des in der Kontrollgruppe ermittelten Gewichts von 0,93 g. Hinsichtlich der 30- bzw. 150 ng/kg KG-Gruppe ergab sich eine leichte Erhöhung des durchschnittlichen Gewichts auf 0,99 g (106 % des Gewichts in der Kontrollgruppe), bzw. bei 0,91 g ein erneutes Absinken auf 98 % des Kontrollgruppengewichts (Abb. 4.2.1.2).

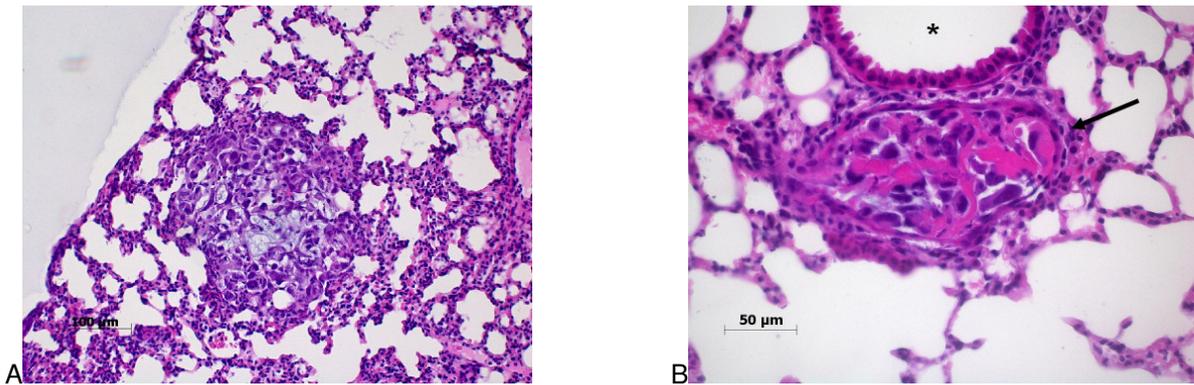


**Abb. 4.2.1.2: Durchschnittliches Primärtumorgewicht in den Gruppen der *pfp/rag2*-Mäuse.** In der vergleichenden Darstellung des durchschnittlichen Primärtumorgewichts zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe (n = 19), und den behandelten Gruppen (10 ng/kg KG-Gruppe: n = 20, 30 ng/kg KG-Gruppe: n = 21, 150 ng/kg KG-Gruppe: n = 21). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

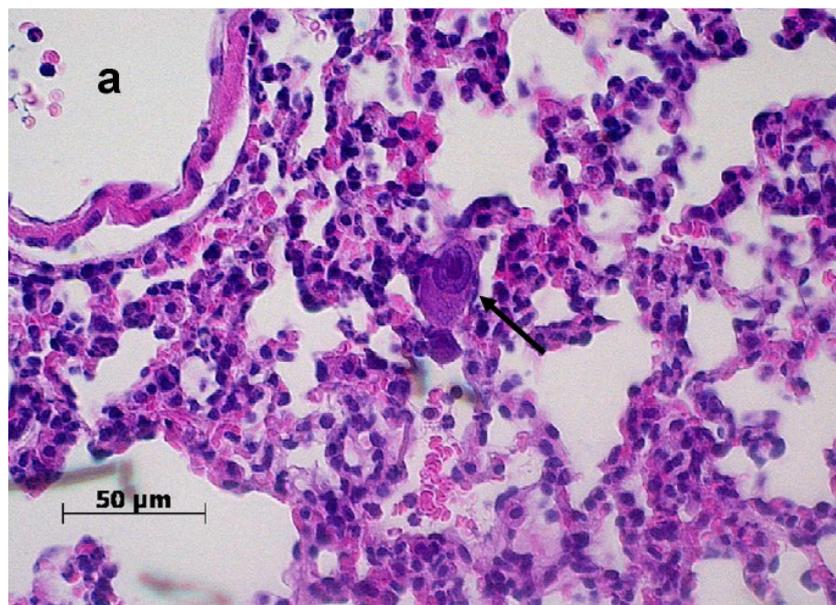
Zusammenfassend ließ sich in den *pfp/rag2*-Gruppen keine Abhängigkeit des Primärtumorgewichtes von der Behandlung mit Iscador® feststellen.

#### 4.2.2 Charakterisierung des Metastasierungsverhaltens von MV3 in *pfp/rag2*-Mäusen

Um die Charakterisierung des Metastasierungsverhaltens von MV3 in *pfp/rag2*-Mäusen zu bestimmen, wurden die geschnittenen Lungen nach der Vorbereitung (3.1.5) sowie HE-Färbung (3.2.1) wie unter 3.4 beschrieben lichtmikroskopisch ausgewertet. Hierzu wurden die einzelnen Schnitte meanderförmig durchmustert, und der Gehalt an soliden extra- und intravasalen Metastasen (Abb. 4.2.2.1) sowie EZ e (Abb. 4.2.2.2) wurde dokumentiert. Unter dem im Folgenden verwendeten Begriff der Gesamtmetastasierung wird sowohl die extra- als auch die intravasale Metastasierung zusammengefasst, wobei sich die extravasale Metastasierung aus sowohl soliden extravasalen Metastasen als auch EZ e zusammensetzt.



**Abb. 4.2.2.1: Darstellung extra- und intravasaler pulmonaler Metastasen in *pfp/rag2* 10 ng/kg KG-Gruppe.** (A) extravasale Metastase, umgeben von alveolärem Lungengewebe. (B) intravasale Metastase, peribronchial (\*) gelegen. Das erhaltene Gefäßendothel ist mit Pfeil gekennzeichnet. HE-Färbung. Links 50-, rechts 100-fache Vergrößerung. Der Maßstabsbalken zeigt 100 (links) bzw. 50  $\mu\text{m}$  (rechts).



**Abb. 4.2.2.2: Extravasale Einzeltumorzelle in der *pfp/rag2*-Kontrollgruppe.** Gezeigt ist eine in erhaltenem Lungengewebe liegende extravasale Einzelzelle (Pfeil) der MV3-Zelllinie. Sie fällt durch den im Vergleich zu den umliegenden Lungengewebszellen deutlich vergrößerten Zellkern auf. (a) Kleines Blutgefäß. HE-Färbung. 100-fache Vergrößerung. Der Maßstabsbalken zeigt 50  $\mu\text{m}$ .

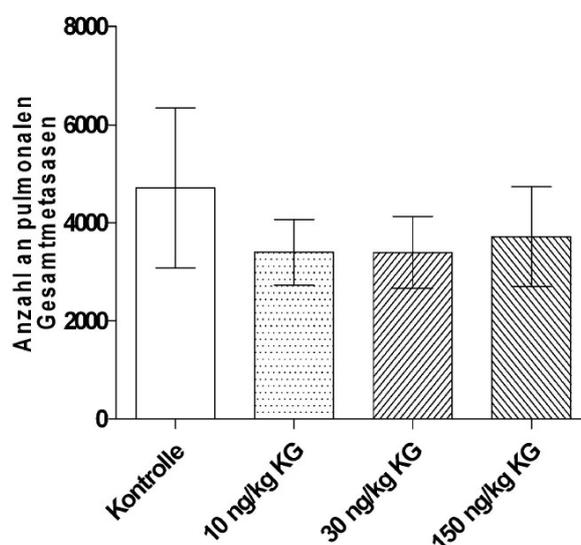
#### 4.2.2.1 Pulmonale Gesamtmetastasierung von MV3 in *pfp/rag2*-Mäusen

Für die Analyse der pulmonalen Gesamtmetastasierung wurden Lungen von insgesamt 80 Tieren berücksichtigt (Kontrollgruppe  $n = 19$ , 10- und 30 ng/kg KG-Gruppe jeweils  $n = 20$ , 150 ng/kg KG-Gruppe  $n = 21$ ). Unter diesen 80 betrachteten Lungen fanden sich insgesamt zwei metastasenfremde Lungen. Somit ergab sich eine Gesamtmetastasierungsrate über alle Gruppen von 98 %. Vorliegende intravasale Metastasen waren stets begleitet von ebenfalls zu findenden extravasalen Metastasen. Die Kontrollgruppe wies ebenso wie die 30 ng/kg KG-Gruppe eine Metastasierungsrate von 95 % auf, dagegen zeigte sich in der 10- und 150

ng/kg KG-Gruppe eine Metastasierung von 100 %. Gleichzeitig ließ sich zwischen der Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen eine Reduktion der durchschnittlichen Anzahl an Gesamtmetastasen feststellen (Tab. 4.2.2.1.1 und Abb. 4.2.2.1.1).

Gruppe	Metastasierungsrate [%]	Anzahl Metastasen gesamt	Varianz (min - max) [g]	TG [g]
Kontrolle	95	4711 ± 1634	0 - 31099	0,93 ± 0,20
10 ng/kg	100	3404 ± 668	851 - 4235	0,88 ± 0,11
30 ng/kg	95	3397 ± 731	0 - 9869	0,97 ± 0,16
150 ng/kg	100	3715 ± 1022	102 - 19184	0,91 ± 0,19

**Tab. 4.2.2.1.1: Metastasierungsrate und Anzahl an Gesamtmetastasen unter Angabe von Varianz und Primärtumorgewicht in allen *pfp/rag2*-Gruppen.** Gezeigt sind Metastasierungsrate sowie Anzahl der pulmonalen Gesamtmetastasen (min = Minimum, max = Maximum). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.



**Abb. 4.2.2.1.1: Durchschnittliche Anzahl an pulmonalen Gesamtmetastasen in allen *pfp/rag2*-Gruppen.** Es findet sich eine im Vergleich zur Kontrollgruppe (n = 19) in allen Behandlungsgruppen erniedrigte Gesamtmetastasenzahl. Bei zunehmender ML-I-Behandlungsdosis zeigt sich ein kontinuierlicher Anstieg in der Anzahl der pulmonalen Gesamtmetastasen über alle Behandlungsgruppen (10- und 30 ng/kg KG-Gruppe n = 20, 150 ng/kg KG-Gruppe n = 21). Die gezeigten Unterschiede weisen keine statistische Signifikanz auf. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

Insgesamt zeigten sich gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigte Werte in der Gesamtmetastasierung unter der Behandlung mit Iscador®. Innerhalb der Behandlungsgruppen ergab sich keine Korrelation zwischen steigender Dosierung und sinkender Metastasenzahl.

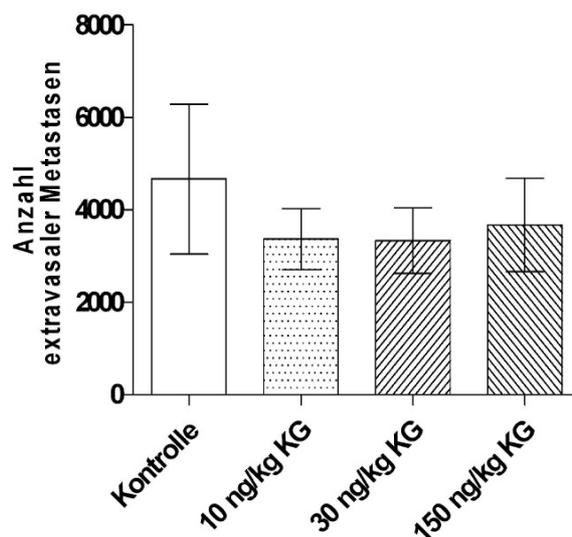
#### 4.2.2.2 Extravasale pulmonale Metastasierung von MV3 in *pfp/rag2*-Mäusen

Für die Beurteilung der Wirkung von Iscador® auf die in *pfp/rag2*-Mäusen ablaufende Metastasierungskaskade von MV3 wurde neben der Gesamtmetastasierung ebenso die extravasale Metastasierung im Einzelnen bewertet. Bei der lichtmikroskopischen Auswertung (3.4) wurden sowohl die soliden extravasalen Metastasen, bestehend aus zwei oder mehr nebeneinander liegenden Melanomzellen, als auch die EZ e berücksichtigt.

Gruppe	Metastasierungsrate [%]	Anzahl Metastasen extravasal	Varianz (min - max) [g]	TG [g]
Kontrolle	95	4667 ± 1623	0 – 30901	0,93 ± 0,20
10 ng/kg	100	3368 ± 656	821 - 13987	0,88 ± 0,11
30 ng/kg	95	3333 ± 709	0 – 11664	0,97 ± 0,16
150 ng/kg	100	3673 ± 1007	0 – 18867	0,91 ± 0,19

**Tab. 4.2.2.2.1: Pulmonale Metastasierungsrate sowie durchschnittliche Anzahl extravasaler Lungenmetastasen unter Angabe von Varianz und Primärtumorgewicht in allen *pfp/rag2*-Gruppen.** Dargestellt ist die pulmonale Metastasierungsrate und Anzahl extravasaler pulmonaler Metastasen (min = Minimum, max = Maximum). Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM.

Insgesamt fanden sich bei 78 der 80 Tiere (98 %) der *pfp/rag2*-Gruppe extravasale pulmonale Metastasen. Die extravasale Metastasierungsrate entsprach somit der Gesamtmetastasierungsrate. Gegenüber der Kontrollgruppe mit durchschnittlich 4667 extravasalen Metastasen zeigte sich in allen Behandlungsgruppen eine deutliche Reduktion der Metastasierung unter der Behandlung mit Iscador®, wobei sich jedoch kein Zusammenhang zwischen steigender Dosierung und Reduktion der Metastasierung erkennen ließ (Tab. und Abb. 4.2.2.2.1).

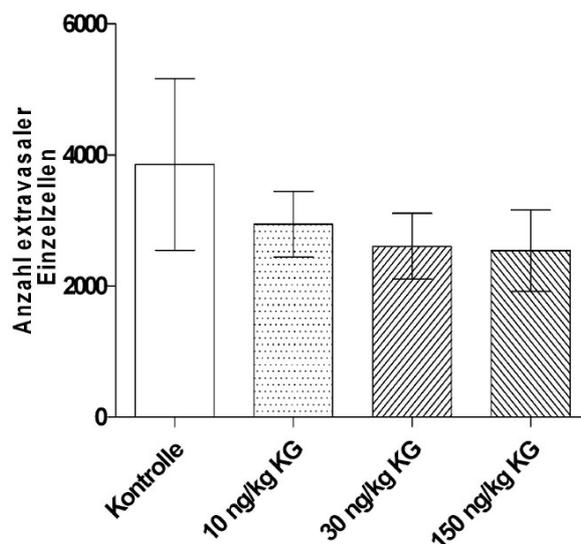


**Abb. 4.2.2.2.1: Durchschnittliche Anzahl extravasaler pulmonaler Metastasen in allen *pfp/rag2*-Gruppen.** Im Vergleich zur Kontrollgruppe (n = 19), sind die Werte der Behandlungsgruppen erniedrigt, weisen jedoch keine statistische Signifikanz auf. Es zeigt sich innerhalb der Behandlungsgruppen ein kontinuierlicher, statistisch nicht-signifikanter Anstieg in der Anzahl der extravasalen pulmonalen Metastasen (10 ng/kg KG-Gruppe n = 20, 30 ng/kg KG-Gruppe n = 20, 150 ng/kg KG-Gruppe n = 21). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

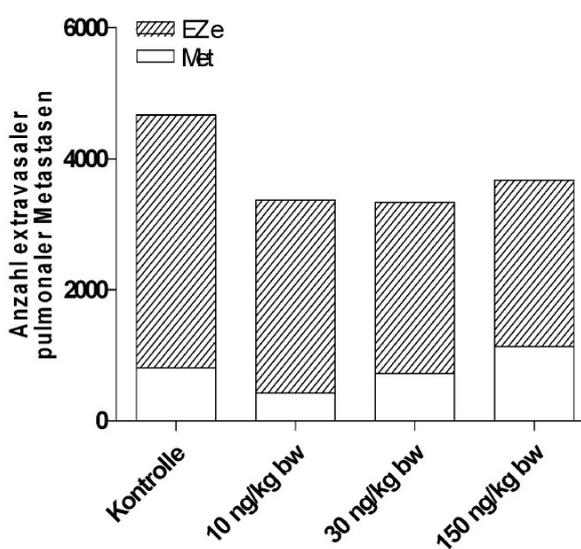
#### 4.2.2.2.1 Extravasale pulmonale Einzelzellen von MV3 in *pfp/rag2*-Mäusen

Bei der Ermittlung des Gehalts an extravasalen Metastasen in den Lungen der *pfp/rag2*-Mäuse zeigte sich eine erhebliche Anzahl EZ e (Abb. 4.2.2.2.1.1). In diesem Zusammenhang wurden diese EZ e nochmals einer separaten Analyse unterzogen. Von insgesamt 80 beurteilten Lungen zeigten sich in 78 dieser Lungen EZ e, was somit wiederum der Gesamtmetastasierungsrate von 98 % entspricht.

Es fand sich eine kontinuierliche Reduktion der durchschnittlichen Anzahl an EZ e bei steigender Dosierung, welches mit Ausnahme der 150 ng/kg KG-Gruppe mit den Werten der extravasalen Metastasierung korrelierte (Abb. 4.2.2.2.1.1).



**Abb. 4.2.2.2.1.1: Extravasale pulmonale Einzelzellen in allen *pfp/rag2*-Gruppen.** Gegenüber der Kontrollgruppe (n = 19) zeigt sich eine kontinuierliche, wenn auch statistisch nicht-signifikante Reduktion der EZ e bei zunehmender Iscador®-Dosierung (10- sowie 30 ng/kg KG-Gruppe n = 20, 150 ng/kg KG-Gruppe n = 21). Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM.



**Abb. 4.2.2.2.1.2: Darstellung des Anteils extravasaler Einzelzellen an der extravasalen pulmonalen Metastasierung in allen *pfp/rag2*-Gruppen.** Gezeigt ist der jeweilige Anteil der EZ e an der Gesamtzahl extravasaler pulmonaler Metastasen in allen *pfp/rag2*-Gruppen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.

Es zeigte sich für alle *pfp/rag2*-Gruppen eine erhebliche numerische Beteiligung der EZ e an der extravasalen pulmonalen Gesamtmetastasierung, welche gegenüber der Kontrollgruppe in allen Behandlungsgruppen erniedrigt war und mit steigender Iscador®-Dosierung kontinuierlich absank (Abb. 4.2.2.2.1.1 und 4.2.2.2.1.2).

#### 4.2.2.3 Intravasale pulmonale Metastasierung von MV3 in *pfp/rag2*-Mäusen

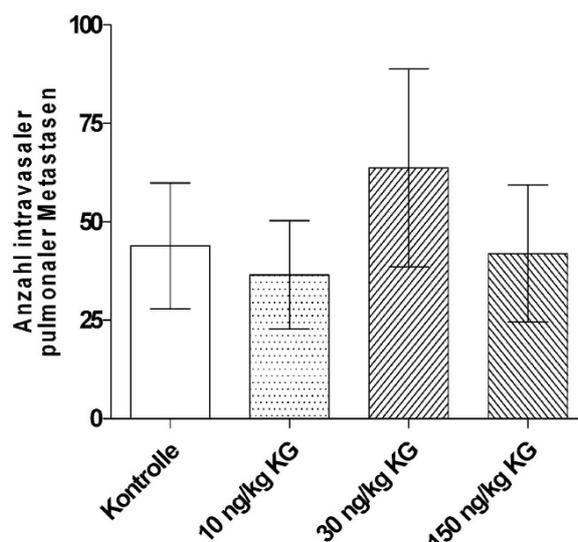
Mit dem Ziel, weitere Aufschlüsse über das Metastasierungsverhalten der MV3-Zelllinie in *pfp/rag2*-Mäusen zu erhalten, wurde neben der Gesamt- sowie extravasalen Metastasierung ebenso die intravasale Metastasierung einzeln betrachtet. Hierbei wurden lediglich die soliden intravasalen Metastasen bewertet.

Gruppe	Metastasierungsrate [%]	Anzahl Metastasen intravasal	Varianz (min - max) [g]	TG [g]
Kontrolle	42	44 ± 16	0 - 218	0,93 ± 0,20
10 ng/kg	45	37 ± 14	0 - 248	0,88 ± 0,11
30 ng/kg	45	64 ± 25	0 - 360	0,97 ± 0,16
150 ng/kg	38	42 ± 17	0 - 317	0,91 ± 0,19

**Tab. 4.2.2.3.1: Intravasale Metastasierungsrate sowie durchschnittliche Anzahl intravasaler pulmonaler Metastasen unter Angabe von Varianz und Primärtumorgewicht in allen *pfp/rag2*-Gruppen.** Dargestellt sind intravasale Metastasierungsrate und Anzahl intravasaler pulmonaler Metastasen (min = Minimum, max = Maximum). Gezeigt ist jeweils der Mittelwert ± SEM.

Insgesamt fanden sich bei 34 von 80 Tieren (43 %) solide intravasale Metastasen. In Anbetracht einer bei 78 *pfp/rag2*-Tieren vorgefundenen Metastasierung ergab sich somit eine intravasale Metastasierung bei 44 % dieser Tiere.

Im Vergleich der einzelnen Gruppen zeigten sich geringe Unterschiede bezüglich der intravasalen Metastasierungsrate. Während die Kontrollgruppe einen Wert von 42% aufwies, fanden sich in der 10- und 30 ng/kg KG-Gruppe eine Metastasierungsrate von jeweils 45 %, in der 150 ng/kg KG-Gruppe von 38 % (Tab. 4.2.2.3.1). Zudem war keine deutliche Tendenz im Metastasierungsverhalten unter der Behandlung mit Iscador® erkennbar (Abb. 4.2.2.3.1).

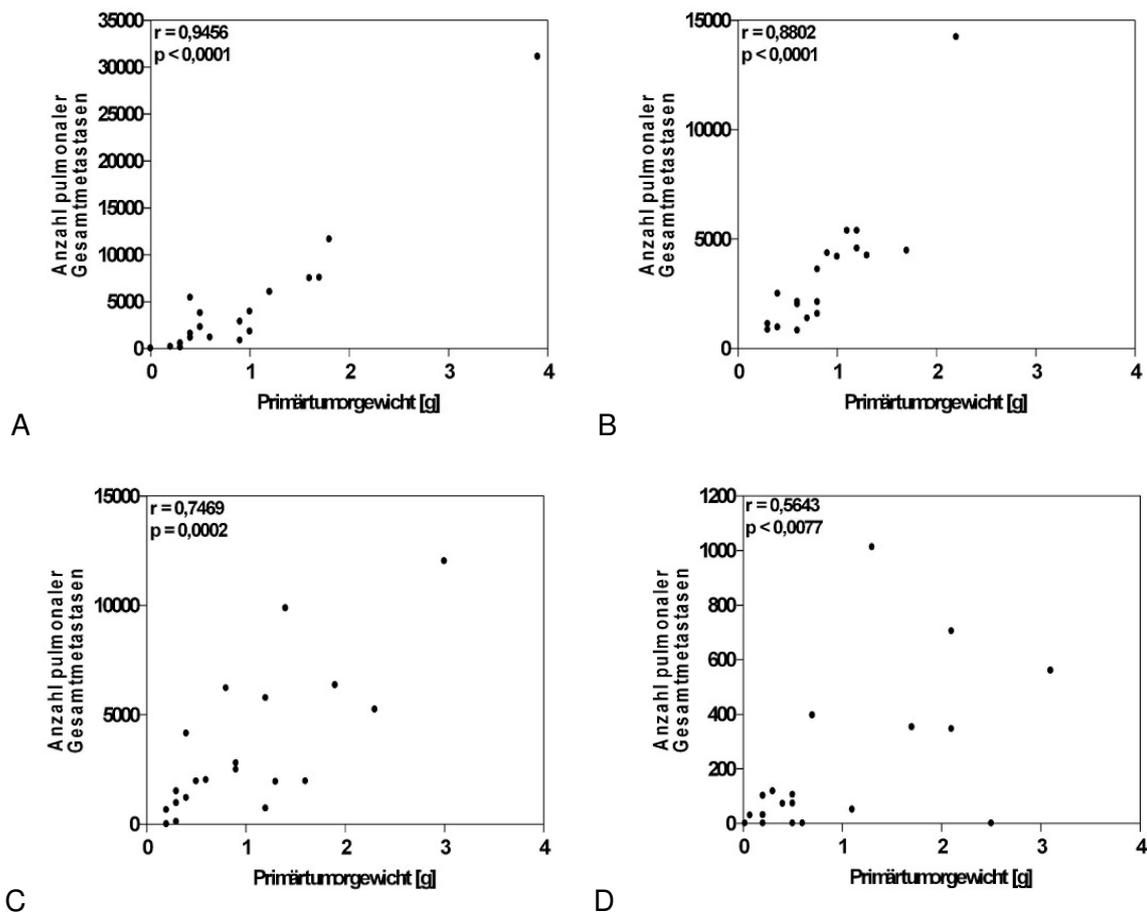


**Abb. 4.2.2.3.1: Durchschnittliche Anzahl intravasaler pulmonaler Metastasen in allen *pfp/rag2*-Gruppen.** Im Vergleich aller Gruppen lässt sich keine Kontinuität bezüglich eines möglichen Einflusses durch die Iscador®-Behandlung ermitteln. Die 30 ng/kg KG-Gruppe (n = 20) zeigt einen gegenüber allen anderen Gruppen erhöhten, wenn sich auch nicht-signifikant unterscheidenden Wert an intravasaler Metastasierung (Kontrollgruppe n = 19, 10 ng/kg KG-Gruppe n = 20, 150 ng/kg KG-Gruppe n = 21). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

Zusammenfassend ergab sich bezüglich der intravasalen Metastasierung in *pfp/rag2*-Mäusen eine Steigerung der durchschnittlichen Anzahl intravasaler pulmonaler Metastasen in der 30 ng/kg KG-Gruppe, während die Resultate der 10- als auch der 150 ng/kg KG-Gruppe nur geringe Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe aufzeigten. Es ließ sich somit kein reduzierender Einfluss von Iscador® auf die intravasale Metastasierung feststellen.

#### 4.2.3 Korrelation zwischen Primärtumorgewicht und pulmonaler Gesamtmetastasierung in *pfp/rag2*-Mäusen

In die Korrelationsanalyse wurden solide extra- und intravasale Metastasen sowie EZ e einbezogen (Abb. 4.2.3.1 A - D). Es zeigte sich in allen Gruppen der *pfp/rag2*-Mäuse eine positive und hochsignifikante Korrelation zwischen Primärtumorgewicht und pulmonaler Gesamtmetastasierung.



**Abb. 4.2.3.1: Korrelation von Primärtumorgewicht und pulmonaler Gesamtmetastasierung in allen *pfp/rag2*-Gruppen.** Dargestellt ist eine positive, in sämtlichen *pfp/rag2*-Gruppen hochsignifikante Korrelation (\*\* $p < 0,01$ ) zwischen dem Primärtumorgewicht und der pulmonalen Gesamtmetastasierung ((**A**) = Kontrollgruppe, (**B**) = 10 ng/kg Gruppe, (**C**) = 30 ng/kg Gruppe, (**D**) = 150 ng/kg Gruppe).

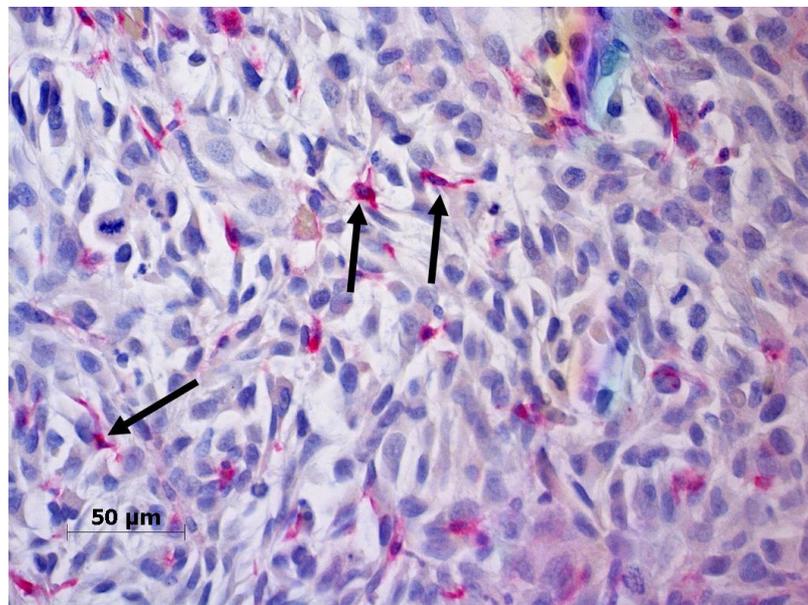
#### 4.2.4 Charakterisierung der dendritischen Zellen in den Primärtumoren der *pfp/rag2*-Mäuse

Die immunhistochemische Aufbereitung und Untersuchung der dendritischen Zellen mit dem biotinylierten Lektin BSA-I (3.2.2) diente dem Ziel, eine Aussage über die durch Iscador® herbeigeführte Induktion des unspezifischen Immunsystems treffen zu können und hierbei festzulegen, welche Behandlungsdosis ein geeignetes Verhältnis zwischen möglichst effektiver Induktion des Immunsystems und gleichzeitig möglichst geringer, da auch die dendritischen Zellen betreffender, direkter Zytotoxizität bietet.

Bereits im Rahmen der makroskopischen Begutachtung der Primärtumoren zeigte sich eine hohe Rate an Ulzerationen (23 %), wovon Primärtumoren sämtlicher *pfp/rag2*-Gruppen betroffen waren (4.2.1).

In den Gewebeschnitten der Primärtumoren zeigte sich eine Anfärbung der Lymphozyten, der Bindegewebszellen der Tumorkapsel sowie der größeren Gefäße. Hiervon klar morphologisch abzugrenzen waren jedoch die dendritischen Zellen, welche eine Reaktion in Form homogener, intensiver Rotfärbung des gesamten Zytoplasmas aufwiesen. In die Analyse wurden jedoch ausschließlich diejenigen dendritischen Zellen einbezogen, deren Zellkerne sowie Zellfortsätze deutlich zu erkennen waren (Abb. 4.2.4.1).

Bei der mikroskopischen Auswertung der BSA-I gefärbten Primärtumorschnitte wurden die Schnitte von 18 Tieren der Kontrollgruppe, von 20 bzw. 21 Tieren der 10- bzw. 30 ng/kg KG-Gruppe sowie von 19 Tieren der 150 ng/kg KG-Gruppe berücksichtigt. Die während des Färbeprozesses mitgeführten Negativkontrollen wiesen keine unspezifische Bindung des BSA-I-Lektins auf.



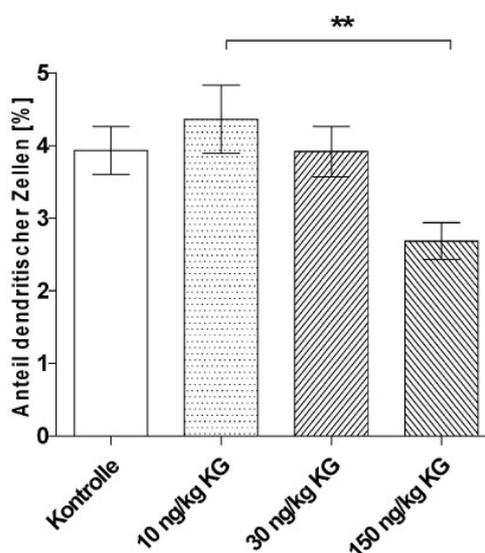
**Abb. 4.2.4.1: Dendritische Zellen in einem Primärtumor der *pfp/rag2*-Mäuse.** Dargestellt sind dendritische Zellen in einem Primärtumor der 150 ng/kg KG-Gruppe. Die Pfeile deuten exemplarisch auf dendritische Zellen mit klar erkennbaren Zellfortsätzen und Nuclei. BSA-I-Färbung. 100-fache Vergrößerung. Der Maßstabsbalken zeigt 50  $\mu\text{m}$ .

Bezüglich der Anzahl an Primärtumoren, welche eine Expression dendritischer Zellen aufwiesen, zeigte sich in allen Gruppen eine Rate von 100 % (Tab. 4.2.4.1).

Gruppe	Dendritenexpression in PT [%]	Anteil dendritischer Zellen [%]	Varianz (min - max) [g]
Kontrolle	100	3,9 ± 0,3	1,3 - 6,8
10 ng/kg	100	4,4 ± 0,5	1,4 - 9,7
30 ng/kg	100	3,9 ± 0,4	1,7 - 9,1
150 ng/kg	100	2,7 ± 0,3	0,3 - 4,9

**Tab. 4.2.4.1: Prozentuale Dendritenexpression in den Primärtumoren und durchschnittlicher Dendritenanteil unter Angabe der Varianz in allen *pfp/rag2*-Gruppen.** Gezeigt sind die Anzahl dendritische Zellen exprimierender Primärtumoren sowie der prozentuale Anteil dendritischer Zellen an der Gesamtzellzahl (PT = Primärtumoren, min = Minimum, max = Maximum). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert ± SEM.

Der Anteil dendritischer Zellen in der 10 ng/kg KG-Gruppe war deutlich erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dagegen fand sich in der 30 ng/kg KG-Gruppe wiederum der in der Kontrollgruppe ermittelte Wert, während in der 150 ng/kg KG-Gruppe eine deutliche Reduktion erkennbar war. Allerdings ergab sich eine hochsignifikante Reduktion (\*\* $p < 0,01$ ) zwischen der 10- und der 150 ng/kg KG-Gruppe (Tab. 4.2.4.1, Abb. 4.2.4.2).



**Abb. 4.2.4.2: Anteil dendritischer Zellen in den Primärtumoren aller *pfp/rag2*-Gruppen.** Gezeigt ist der prozentuale Anteil dendritischer Zellen an der ausgezählten Gesamtzellzahl in allen *pfp/rag2*-Gruppen. Gegenüber der Kontrollgruppe (n = 18) findet sich ein erhöhter Anteil dendritischer Zellen in der 10- (n = 20), sowie ein reduzierter Anteil dendritischer Zellen in der 150 ng/kg KG-Gruppe (n = 19), während das Ergebnis der 30 ng/kg KG-Gruppe (n = 21) nahezu dem der Kontrollgruppe entspricht. Die Reduktion zwischen der 10- und der 150 ng/kg KG-Gruppe erweist sich als statistisch hochsignifikant (\*\* $p < 0,01$ ). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

Zusammenfassend zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine leichte, jedoch nicht-signifikante Induktion von dendritischen Zellen im Tumor unter der 10 ng/kg KG-Behandlung mit Iscador<sup>®</sup>, während demgegenüber der Anteil der dendritischen Zellen in der 150 ng/kg KG-Gruppe deutlich erniedrigt war. Die 30 ng/kg KG-Gruppe wies keine Veränderung der Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Eine hochsignifikante Reduktion der dendritischen Zellen fand sich zwischen der 10- und der 150 ng/kg KG-Gruppe.

#### 4.2.5 Disseminierte MV3-Melanomzellen im Blut der *pfp/rag2*-Mäuse

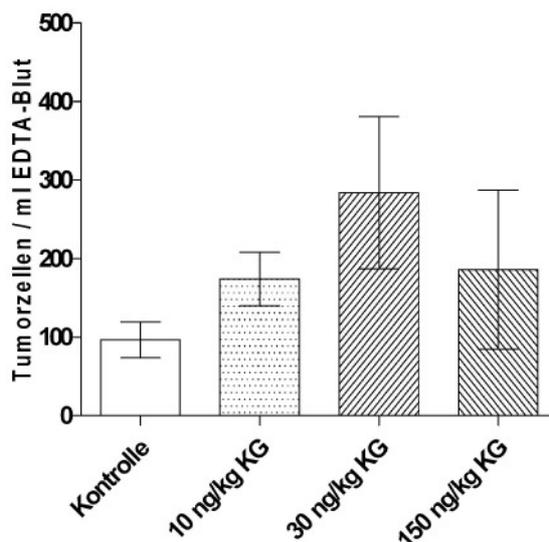
Für die Quantifizierung disseminierter Tumorzellen im Blut der *scid*-Mäuse wurde eine *Real-time* PCR von humanen *ALU*-Sequenzen aus den Melanomzellen (3.3.2) durchgeführt.

Disseminierte Tumorzellen konnte im Blut sämtlicher 76 Tiere nachgewiesen werden (Tab. 4.2.5.1).

Gruppe	Nachweis disseminierter Melanomzellen [%]	Gehalt disseminierter Melanomzellen/ml Blut	Varianz (min - max)
Kontrolle	100	96 ± 23	14 - 303
10 ng/kg	100	174 ± 34	30 - 651
30 ng/kg	100	284 ± 97	11 - 1604
150 ng/kg	100	186 ± 101	13 - 1921

**Tab. 4.2.5.1: Nachweisrate disseminierter Melanomzellen sowie durchschnittlicher Gehalt an Melanomzellen im Blut unter Angabe der Varianz in allen *pfp/rag2*-Gruppen.** Gezeigt ist der prozentuale Nachweis disseminierter Melanomzellen sowie die Anzahl identifizierter Melanomzellen pro ml Mausblut (min = Minimum, max = Maximum). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert ± SEM.

Im Vergleich aller *pfp/rag2*-Gruppen bezüglich ihres Gehaltes an disseminierten Melanomzellen zeigte sich das niedrigste Resultat in der Kontrollgruppe mit durchschnittlich 96 Melanomzellen/ml Blut. Die 10- bzw. 150 ng/kg KG-Gruppe wiesen mit Werten von durchschnittlich 174 bzw. 186 Melanomzellen/ml Blut einen Anstieg auf 181 bzw. 193 % des Kontrollgruppenwertes auf, während die 30 ng/kg KG-Gruppe mit 284 Melanomzellen/ml Blut einen deutlicheren Anstieg auf 274 % des in der Kontrollgruppe ermittelten Wertes bot (Tab. 4.2.5.1, Abb. 4.2.5.1).



**Abb. 4.2.5.1: Disseminierte MV3-Melanomzellen im Blut der *pfp/rag2*-Mäuse.** Gegenüber der Kontrollgruppe (n = 18) fand sich in allen Behandlungsgruppen ein erhöhter Gehalt disseminierter Tumorzellen, wobei sich dieser Anstieg in der 30 ng/kg KG-Gruppe (n = 20) am deutlichsten, wenn auch statistisch nicht-signifikant, zeigt (10- und 150 ng/kg KG-Gruppe n = 19). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Der Vergleich des Gehalts an disseminierten Melanomzellen in den *pfp/rag2*-Gruppen ergab gegenüber der Kontrollgruppe einen gesteigerten Gehalt in sämtlichen Behandlungsgruppen, wobei sich diese Steigerung am deutlichsten in der 30 ng/kg KG-Gruppe zeigte (Abb. 4.2.5.1).

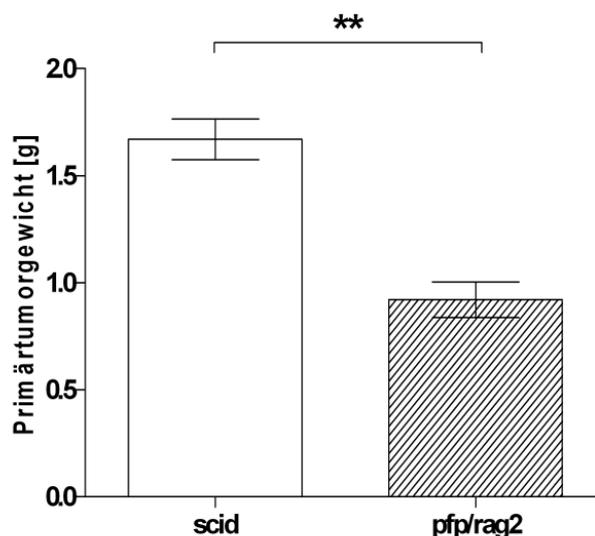
### 4.3 Vergleich der *scid*- und *pfp/rag2*-Ergebnisse

Um die Unterschiede zwischen den beiden Mausarten zu verdeutlichen, wurden deren Werte einander direkt gegenüber gestellt.

#### 4.3.1 Primärtumorgewichte in *scid*- und *pfp/rag2*-Mäusen

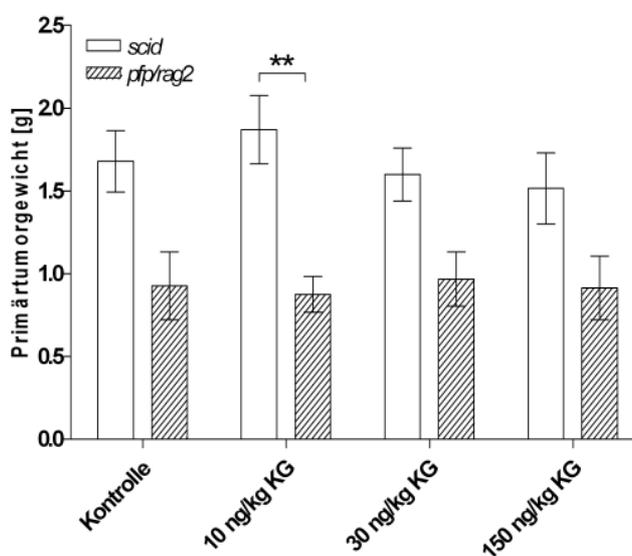
Bei 32 von 77 *scid*-Mäusen zeigten sich bei makroskopischer Begutachtung ulzerierte sowie zentral nekrotische Primärtumoren (insgesamt 43 % der Tiere), wohingegen sich unter den *pfp/rag2*-Mäusen bei 18 der 81 Tiere (22 %) ulzerierte Tumoren fanden. Zentrale Nekrosen blieben bei Letzteren aus.

Ein Vergleich des durchschnittlichen Tumorgewichts zwischen den beiden Mausarten (*scid* = 1,66 g versus *pfp/rag2* = 0,93 g) ergab eine hochsignifikante Reduktion (\*\*p < 0,01) in den *pfp/rag2*-Gruppen gegenüber den *scid*-Gruppen (Abb. 4.3.1.1).



**Abb. 4.3.1.1: Vergleich des Primärtumorgewichtes zwischen *scid*- und *pfp/rag2*-Gruppe.** Das Primärtumorgewicht der *scid*-Gruppe (n = 77) war statistisch hochsignifikant erhöht (\*\*p < 0,01) im Vergleich zur *pfp/rag2*-Gruppe (n = 81). Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM.

Im Vergleich der einzelnen Gruppen der verschiedenen Mausarten miteinander wurden 77 Primärtumoren der *scid*- sowie 81 Primärtumoren der *pfp/rag2*-Mäuse berücksichtigt.



**Abb. 4.3.1.2: Durchschnittliches Primärtumorgewicht in den einzelnen Gruppen der *scid*- sowie *pfp/rag2*-Mäuse.** Es zeigt sich ein deutlich, wenn auch lediglich in der 10 ng/kg KG-Gruppe hochsignifikant (\*\*p < 0,01) reduziertes Primärtumorgewicht in allen *pfp/rag2*- gegenüber allen *scid*-Gruppen (*scid*: Kontrollgruppe n = 19, 10- und 30 ng/kg KG-Gruppe n = 20, 150 ng/kg KG-Gruppe n = 18. *pfp/rag2*: Kontrollgruppe n = 19, 10 ng/kg KG-Gruppe n = 20, 30- und 150 ng/kg KG-Gruppe = 21). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

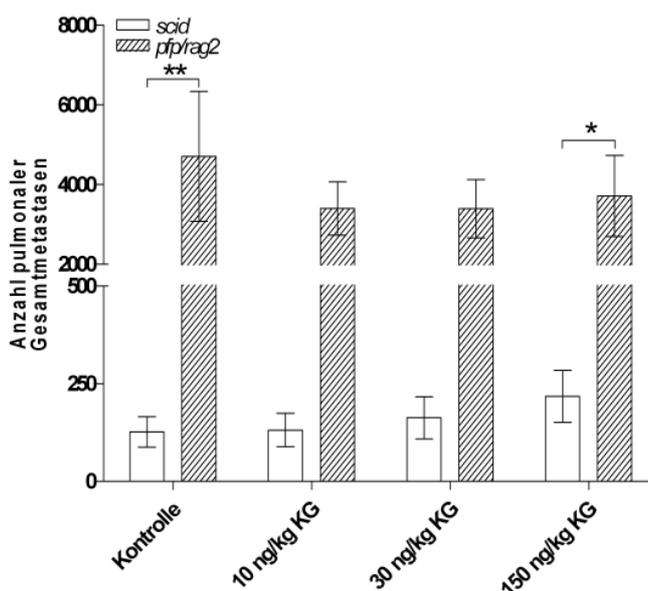
Es zeigte sich ein deutlich erniedrigtes durchschnittliches Primärtumorgewicht in allen *pfp/rag2*-Gruppen. Zwischen den beiden 10 ng/kg KG-Gruppen fand sich eine hochsignifikante Differenz (\*\*p < 0,01) (Abb. 4.3.1.2).

### 4.3.2 Pulmonale Metastasierung von MV3 in *scid*- und *pfp/rag2*-Mäusen

#### 4.3.2.1 Pulmonale Gesamtmetastasierung in *scid*- und *pfp/rag2*-Mäusen

In der *scid*-Gruppe wurden 71 Lungen und in der *pfp/rag2*-Gruppe 80 Lungen bewertet. In der *pfp/rag2*-Gruppe wurden zusätzlich zu soliden extra- und intravasalen pulmonalen Metastasen auch EZ e berücksichtigt, welche sich in den Lungen der *scid*-Mäuse nicht fanden.

Bezüglich der Anzahl an Gesamtmetastasen fanden sich in den *pfp/rag2*-Gruppen bis zu 30-fach erhöhte Metastasenzahlen. Während die *scid*-Mäuse Metastasenwerte zeigten, welche zwischen der Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen kontinuierlich anstiegen, fanden sich in den *pfp/rag2*-Behandlungsgruppen nahezu gleichbleibende Werte bei demgegenüber deutlich erhöhter Gesamtmetastasenzahl in der Kontrollgruppe (Abb. 4.3.2.1.1).



**Abb. 4.3.2.1.1: Vergleich der pulmonalen Gesamtmetastasen zwischen *scid*- und *pfp/rag2*-Gruppe.** Sämtliche Gruppen der *pfp/rag2*-Mäuse zeigen eine deutliche Erhöhung der pulmonalen Gesamtmetastasierung gegenüber den *scid*-Mäusen. In der *pfp/rag2*-Kontrollgruppe findet sich eine statistisch hochsignifikante Erhöhung der Metastasenzahl gegenüber der *scid*-Kontrollgruppe (\*\* $p < 0,01$ ), in den 150 ng/kg Gruppen findet sich eine signifikant niedrigere Anzahl pulmonaler Gesamtmetastasen bei der *scid*-Gruppe (\* $p < 0,05$ ). Die bezüglich der 10- und 30 ng/kg KG-Gruppen ermittelten Differenzen weisen keine statistische Signifikanz auf. (*scid*: Kontrollgruppe  $n = 15$ , 10- und 30 ng/kg KG-Gruppe  $n = 19$ , 150 ng/kg KG-Gruppe  $n = 18$ . *pfp/rag2*: Kontrollgruppe  $n = 19$ , 10- und 30 ng/kg KG-Gruppe  $n = 20$ , 150 ng/kg KG-Gruppe = 21). Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

#### 4.3.2.2 Extravasale pulmonale Metastasierung in *scid*- und *pfp/rag2*-Mäusen

Für die extravasale Metastasierung wurden sowohl solide extravasale Metastasen, bestehend aus zwei oder mehr nebeneinander liegenden Melanomzellen, als auch EZ e berücksichtigt. Während sich Letztere in den *scid*-Gruppen nicht fanden, zeigten sich in den

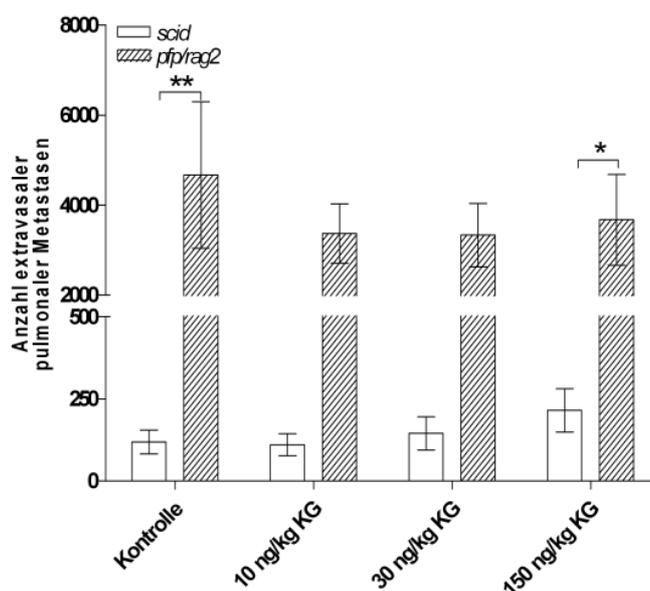
*pfp/rag2*-Gruppen bedeutende Mengen pulmonaler EZ e (Abb. 4.2.2.2.1.1), woraus sehr hohe Werte für die extravasale Gesamtmetastasierung resultierten (Abb. 4.2.2.2.1.2).

Die extravasalen Metastasierungsraten entsprachen mit 72 % (*scid*) bzw. 98 % (*pfp/rag2*) in beiden Mausarten der Gesamtmetastasierungsrate. Somit zeigten beide Mausarten in 100 % der von Metastasen befallenen Lungen eine extravasale Metastasierung.

Im Vergleich der einzelnen Gruppen miteinander zeigte sich in den *pfp/rag2*-Gruppen eine durchgehend höhere, in der 10- und 150 ng/kg KG-Gruppe sogar bei 100 % liegende extravasale Metastasierungsrate, während sich bei den *scid*-Mäusen die höchste Metastasierungsrate von 80 % in der Kontrollgruppe fand.

Auch bezüglich der mittleren Anzahl extravasaler Metastasen zeigten sich in allen *pfp/rag2*-Gruppen deutlich, bis zu etwa 30-fach erhöhte Werte gegenüber den entsprechenden *scid*-Gruppen.

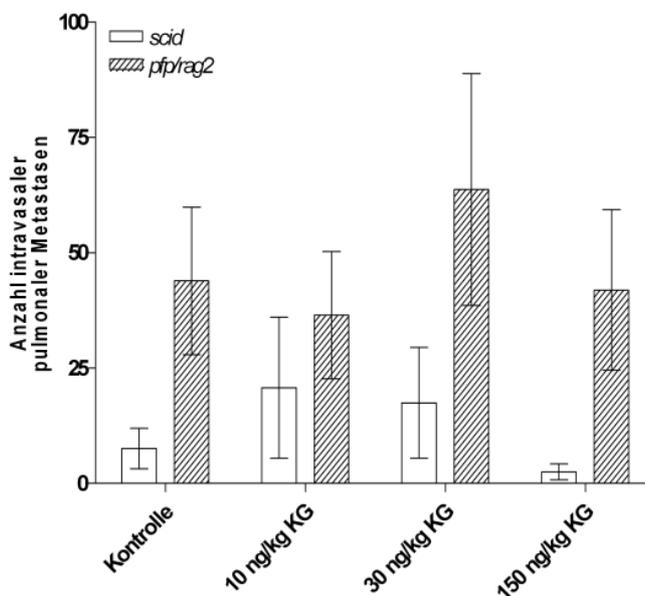
Während sich jedoch bei den *scid*-Mäusen die höchste Anzahl an pulmonalen extravasalen Metastasen in der 150 ng/kg KG-Gruppe fand, stellte sich bei den *pfp/rag2*-Mäusen der höchste Wert in der Kontrollgruppe dar.



**Abb. 4.3.2.2.1: Durchschnittliche Anzahl extravasaler pulmonaler Metastasen in der *scid*- und *pfp/rag2*-Gruppe.** Sämtliche Gruppen der *pfp/rag2*-Mäuse zeigen eine deutliche Erhöhung der pulmonalen Gesamtmetastasierung gegenüber den *scid*-Mäusen. In der *pfp/rag2*-Kontrollgruppe findet sich eine statistisch hochsignifikante Erhöhung der Metastasenzahl gegenüber der *scid*-Kontrollgruppe (\*\* $p < 0,01$ ), in den 150 ng/kg Gruppen findet sich eine signifikant niedrigere Anzahl pulmonaler Gesamtmetastasen bei der *scid*-Gruppe (\* $p < 0,05$ ). Die bezüglich der 10- und 30 ng/kg KG-Gruppen ermittelten Differenzen zeigen keine statistische Signifikanz. (*scid*: Kontrollgruppe  $n = 15$ , 10- und 30 ng/kg KG-Gruppe  $n = 19$ , 150 ng/kg KG-Gruppe  $n = 18$ . *pfp/rag2*: Kontrollgruppe  $n = 19$ , 10- und 30 ng/kg KG-Gruppe  $n = 20$ , 150 ng/kg KG-Gruppe  $n = 21$ ). Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

#### 4.3.2.3 Intravasale pulmonale Metastasierung in *scid*- und *pfp/rag2*-Mäusen

Ein Vergleich der intravasalen Metastasen zeigte für die *scid*-Mäuse eine durchgehend geringere Metastasierung gegenüber den *pfp/rag2*-Mäusen (17 % versus 43 %) (Abb. 4.3.2.3.1).



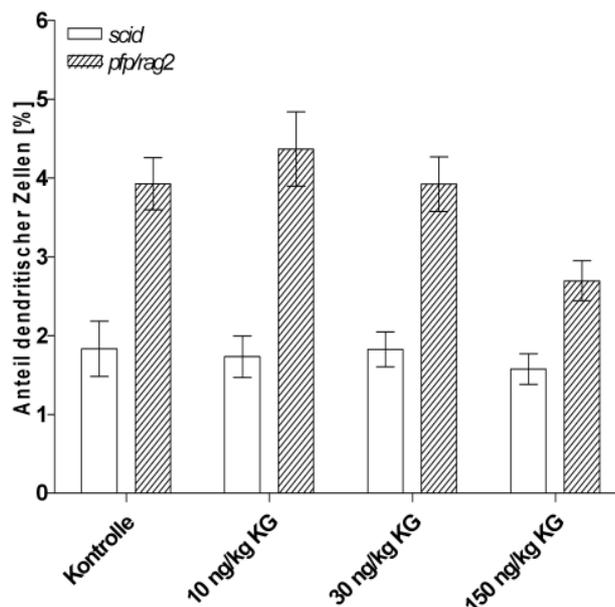
**Abb. 4.3.2.3.1: Durchschnittliche Anzahl intravasaler pulmonaler Metastasen in der *scid*- und *pfp/rag2*-Gruppe.** Sämtliche Gruppen der *pfp/rag2*-Mäuse zeigen eine deutliche Erhöhung der intravasalen pulmonalen Metastasierung gegenüber den *scid*-Mäusen, wobei sich der deutlichste Unterschied zwischen den 30 ng/kg KG-Gruppen findet. Statistische Signifikanzen zeigen sich nicht (*scid*: Kontrollgruppe n = 15, 10- und 30 ng/kg KG-Gruppe n = 19, 150 ng/kg KG-Gruppe n = 18. *pfp/rag2*: Kontrollgruppe n = 19, 10- und 30 ng/kg KG-Gruppe n = 20, 150 ng/kg KG-Gruppe = 21). Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

#### 4.3.3 Vergleich der dendritischen Zellen in den Primärtumoren der *scid*- und *pfp/rag2*-Mäuse

In der *scid*-Gruppe wurden 72 Gewebeschnitte, in der *pfp/rag2*-Gruppe hingegen 78 Gewebeschnitte der Primärtumoren bewertet.

Während sich bei den *scid*-Mäusen in 99 % der Primärtumoren dendritische Zellen fanden, lag diese Rate in allen *pfp/rag2*-Gruppen bei 100 %.

Die dendritischen Zellen der *pfp/rag2*-Mäuse waren in ihrer Gesamtmenge gegenüber denen der *scid*-Mäuse hochsignifikant (\*\*p < 0,01) erhöht. Im Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander fanden sich jedoch keine statistischen Signifikanzen (Abb. 4.3.3.1).

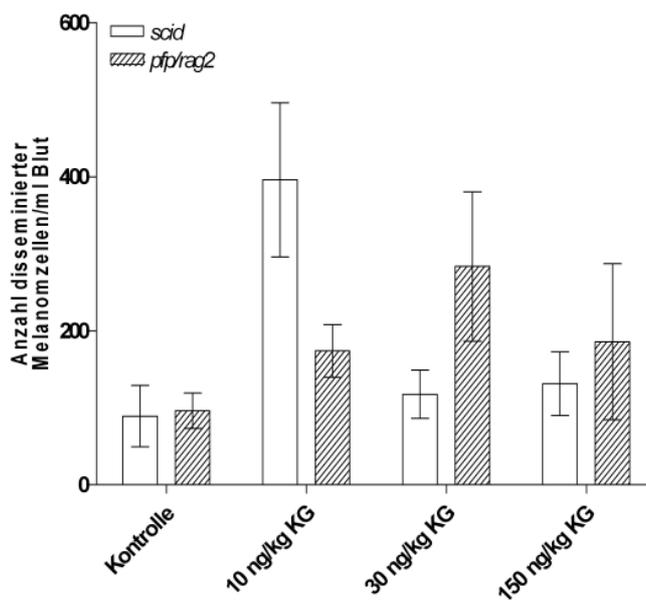


**Abb. 4.3.3.1: Anteil dendritischer Zellen in den Primärtumoren aller *scid*- und *pfp/rag2*-Gruppen.** Gezeigt ist der prozentuale Anteil dendritischer Zellen an der ausgezählten Gesamtzellzahl in allen *scid*- und *pfp/rag2*-Gruppen. Gegenüber den *scid*-Gruppen finden sich in allen *pfp/rag2*-Gruppen erhöhte, wenn auch keine statistische Signifikanz aufweisende Werte. (*pfp/rag2*: Kontrollgruppe n = 18, 10 ng/kg KG-Gruppe n = 20, 30 ng/kg KG-Gruppe n = 21, 150ng/kg KG-Gruppe n = 19. *scid*: Kontrollgruppe n = 16, 10 ng/kg KG-Gruppe n = 19, 30 ng/kg KG-Gruppe n = 20, 150ng/kg KG-Gruppe n = 17). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

#### 4.3.4 Vergleich disseminierter MV3-Melanomzellen im Blut der *scid*- und *pfp/rag2*-Mäuse

Bei der Auswertung wurden DNA-Proben von 74 Tieren der *scid*- sowie von 76 Tieren der *pfp/rag2*-Gruppe berücksichtigt. In den Proben der *scid*-Mäuse fanden sich zu 96 % (71 von 74 Tieren) nachweisbare Melanomzellen, in den *pfp/rag2*-Proben zu 100 %.

Der Vergleich des durchschnittlichen Gehalts disseminierter Melanomzellen im Blut zeigte in den Kontrollgruppen beider Mausarten ähnliche Resultate (*scid* = 90 MV3-Zellen/ml vs. *pfp/rag2* = 97 MV3-Zellen/ml). Während in der 10 ng/kg KG-Gruppe der *scid*-Mäuse eine deutlich höhere Anzahl an disseminierten MV3-Melanomzellen nachgewiesen werden konnte als in der 10 ng/kg KG-Gruppe der *pfp/rag2*-Mäuse, fanden sich in der 30- und 150 ng/kg KG-Gruppe der *pfp/rag2*-Mäuse deutlich mehr Melanomzellen als in den entsprechenden *scid*-Gruppen (Abb. 4.3.4.1).



**Abb. 4.3.4.1: Disseminierte MV3-Melanomzellen im Blut der *scid*- und *pfp/rag2*-Mäuse.**

Gegenüber den *scid*-Mäusen findet sich mit Ausnahme der 10 ng/kg KG-Gruppe bei den *pfp/rag2*-Mäusen eine höhere Anzahl disseminierter Melanomzellen/ml Blut. Statistische Signifikanzen zeigen sich nicht (*scid*: Kontrollgruppe n = 19, 10 ng/kg KG-Gruppe n = 20, 30 ng/kg KG-Gruppe n = 18, 150 ng/kg KG-Gruppe n = 17. *pfp/rag2*: Kontrollgruppe n = 18, 10 ng/kg KG-Gruppe n = 19, 30 ng/kg KG-Gruppe n = 20, 150 ng/kg KG-Gruppe n = 19). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.

## 5 Diskussion

Das maligne Melanom ist ein bösartiger Tumor der Haut, welchem in der dermatologischen Onkologie eine immer größere Bedeutung beigemessen wird. Dies begründet sich nicht zuletzt durch seine innerhalb der vergangenen Jahre rapide angestiegene Inzidenz (Lens und Dawes, 2004; Jemal *et al.*, 2004), sowie durch auffallend aggressives Wachstumsverhalten und ausgeprägte Therapieresistenz bei eingetretener Metastasierung (Eigentler *et al.*, 2003; O'Day *et al.*, 2002; Garbe *et al.*, 2001). Da bislang angewandte konservative Therapieformen wie Chemo-, Radio- bzw. Immunchemotherapie für das metastasierte Melanom keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferten (Hauschild *et al.*, 2003; Antoine *et al.*, 1997; Legha *et al.*, 1997), ist eine Suche nach alternativen Therapieansätzen dringend erforderlich.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher überprüft werden, inwiefern der Einsatz des Naturheilmittels Iscador® eine valide Behandlungsmöglichkeit des malignen Melanoms *in vivo* darstellt, da dessen Hauptinhaltsstoff, das ML-I, bereits aufgrund seiner antiproliferativen, antimetastatischen sowie immunmodulatorischen und direkt zytotoxischen Wirkung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bei einem Versuch mit *scid*-Mäusen Erfolge gezeigt hatte (Thies *et al.*, 2007 und 2005). Hierzu wurden in dieser Arbeit zum einen *scid*- und zum anderen *pfprag2*-Mäuse verwendet, deren unterschiedlich ausgestattete Immunsysteme zusätzliche Informationen bezüglich des genauen Wirkmechanismus von Iscador® liefern sollten.

Für die Erschließung der durch die Anwendung von Iscador® erzielten Veränderungen wurden zunächst die Kontrollgruppen einander gegenübergestellt, um das generelle Wachstums- und Metastasierungsverhalten der MV3-Zelllinie in diesen beiden Mausarten zu analysieren.

Die Kontrollgruppen wurden über insgesamt 20 Tage *i.p.* mit PBS behandelt, nachdem vorher jeder Maus  $1 \times 10^6$  Melanomzellen *s.c.* inokuliert worden waren. Im Anschluss an die Behandlung wurde zunächst das Primärtumorwachstum anhand des Tumorgewichts beurteilt. Hierbei zeigte sich für die Kontrollgruppe der *scid*-Mäuse ein durchschnittliches Tumorgewicht von 1,67 g (0,5 - 3,7 g) (Tab. 4.1.1.1). Thies *et al.* (2007) hatten bei Anwuchszeiten von 25 bis 90 Tagen für die getesteten Melanomzelllinien (G361, FemX1, UIISO-Mel 6, MeWo, Lox und MV3) ein durchschnittliches Tumorgewicht zwischen 0,1 und 2,4 g ermittelt. Insofern stellt sich das in dieser Arbeit präsentierte Tumorgewicht als relativ hoch dar, insbesondere in Anbetracht der noch kürzeren Anwachsrate von lediglich 20 Tagen. Unter Berücksichtigung der Überlegungen von Teicher (2006), welchen zufolge das Tumorwachstum logarithmisch mit der Versuchsdauer ansteigt, hätte sich hieraus bei verlängerter Versuchsdauer eine noch größere Diskrepanz zu den von Thies *et al.* (2007)

ermittelten Werten ergeben. Eine mit Zunahme der TumorgroÙe einhergehende mögliche Bewegungseinschränkung der Tiere sollte jedoch bei nachfolgenden Studien von längerer Dauer entsprechend beachtet und vermieden werden. Das in den *pfp/rag2*-Mäusen ermittelte Primärtumorgewicht betrug in der Kontrollgruppe durchschnittlich 0,93 g (0 - 3,9 g) (Tab. 4.2.1.1). Im Vergleich der beiden Mausarten miteinander zeigt sich somit ein 1,8-fach höheres durchschnittliches Primärtumorgewicht in der Kontrollgruppe der *scid*-Mäuse (Abb. 4.3.1.2). In Anbetracht der stärker eingeschränkten Immunabwehr in *pfp/rag2*-Mäusen, welche neben einem Mangel an reifen B- und T-Lymphozyten eine zusätzliche Dysfunktion der NK-Zellen aufweisen (Walsh *et al.*, 1994; Shinkai *et al.* 1992), erscheint dieses Ergebnis überraschend. In einem vergleichbaren Modell (Sodeur *et al.*, 2008, bislang unveröffentlicht) konnte hingegen nach Inokulation von verschiedenen Zelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms (*small cell lung cancer*, SCLC) unter Verwendung von *scid*- und *pfp/rag2*-Mäusen ein 1,6-fach erhöhtes Tumorgewicht in den *pfp/rag2*-Mäusen festgestellt werden. Diese Differenz scheint daher am ehesten in der Art des Malignoms begründet zu sein.

Im Anschluss wurde das pulmonale Metastasierungsverhalten der MV3-Zelllinie in den jeweiligen Kontrollgruppen betrachtet. Für eine genauere Analyse der Metastasierung wurde in der mikroskopischen Auswertung des Versuches neben der Gesamtmetastasierung auch zwischen extra- und intravasalen soliden Metastasen, bestehend aus zwei oder mehr nebeneinander liegenden Melanomzellen, sowie EZ e unterschieden.

Bezüglich der Gesamtmetastasierung fand sich in der *scid*-Kontrollgruppe bei einer Metastasierungsrate von 80 % ein Durchschnitt von 126 (0 - 408) pulmonalen Metastasen (Tab. 4.1.2.1.1). Für die *pfp/rag2*-Kontrollgruppe ergab sich bei 95 % der Tiere eine pulmonale Metastasierung mit durchschnittlich 4711 (0 - 31099) Metastasen. Die um den Faktor 37 hochsignifikant (\*\*p < 0,01) erhöhte mittlere Metastasenanzahl der *pfp/rag2*-gegenüber der *scid*- Kontrollgruppe lässt aufgrund des zuvor eruierten niedrigeren Tumorgewichtes auf einen deutlichen Unterschied hinsichtlich des Metastasierungs geschehens schließen. Hierbei liegt die Vermutung nahe, dass der Mangel funktionsfähiger NK-Zellen zwar auf die Größe des Primärtumors keinen negativen Einfluss ausübt, umso mehr jedoch eine erheblich stärker ausgeprägte Metastasierung begünstigt. Die Tatsache, dass es in der *scid*-Gruppe bei 80 % der Mäuse zu einer pulmonalen Metastasierung kam, bei den *pfp/rag2*-Mäusen dagegen bei 95 % der Tiere, unterstützt diese These. Bestätigung findet diese Annahme ebenfalls in bereits erwähntem Xenograftmodell mit kleinzelligem Bronchialkarzinom (Sodeur *et al.*, 2008, unveröffentlichte Daten). Es ergab sich dabei eine signifikant erhöhte Metastasierung in den Lungen der *pfp/rag2*-Mäuse gegenüber den *scid*-Mäusen. Für beide Mausarten konnte in der vorliegenden Arbeit eine hochsignifikante Korrelation zwischen dem Primärtumorgewicht und der pulmonalen

Gesamtmetastasierung gezeigt werden (*scid* und *pfp/rag2* = \*\*p < 0,01). Diese Korrelation fand sich bereits für das jeweils geringste Primärtumorgewicht. Das Ergebnis unterscheidet sich somit von den Untersuchungen von Jojovic und Schumacher (2000), denen zufolge eine Korrelation zwischen Primärtumorgewicht und Metastasierung erst ab einem Minimalgewicht des Primärtumors von 1,0 g zuverlässig festgestellt werden konnte. Nicht außer Acht zu lassen ist hierbei allerdings die Tatsache, dass es sich in besagter Studie zwar ebenfalls um *scid*-Mäuse handelte, nicht jedoch um die MV3-Zelllinie des malignen Melanoms, sondern vielmehr um die Kolonkarzinom-Zelllinie HT29.

Der größte Anteil an der pulmonalen Gesamtmetastasierung wurde jeweils durch extravasal lokalisierte Metastasen bedingt. So ergab sich für die *scid*-Mäuse eine extravasale Metastasierung in sämtlichen Tieren, bei denen eine pulmonale Metastasierung nachgewiesen werden konnte. Die durchschnittliche Anzahl betrug 119 (0 - 408) extravasale Metastasen in der Kontrollgruppe (Tab. 4.1.2.2.1). Es konnten lediglich Metastasen gefunden werden, die aus mindestens zwei nebeneinander liegenden Zellen bestanden. Einzelzellen fanden sich nicht. Im Gegensatz hierzu zeigte die Kontrollgruppe der *pfp/rag2*-Mäuse eine wiederum massiv erhöhte Anzahl extravasaler Metastasen (durchschnittlich 4667 Metastasen, Tab. 4.2.2.2.1), von denen jedoch ein erheblicher Anteil aus EZ e bestand (Abb. 4.2.2.2.1.2). Es lässt sich vermuten, dass bei einer Verlängerung der Versuchsdauer, gegebenenfalls mit zwischenzeitlicher Exzision des Primärtumors, aus diesen EZ e ebenfalls manifeste Metastasen entstehen könnten. Die immunologische Konstitution der *pfp/rag2*-Mäuse scheint es somit für Melanomzellen erheblich zu erleichtern, das Gefäßendothel zu durchwandern und Metastasen auszubilden.

Als weiterer Aspekt der Metastasierung wurde die Anzahl intravasaler Metastasen beurteilt. Hier fanden sich in sämtlichen Gruppen deutlich geringere Mengen an Metastasen, verglichen mit dem extravasalen Anteil. In der Kontrollgruppe der *scid*-Mäuse bildeten lediglich 20 % der Gruppe intravasale Metastasen aus, welche aus mindestens zwei nebeneinander liegenden Zellen bestanden. Die durchschnittliche Anzahl betrug 8 (0 - 56) intravasale Metastasen pro Maus. Die *pfp/rag2*-Mäuse zeigten eine Metastasierungsrate von 42 %, durchschnittlich wurden 44 (0 - 218) intravasale Metastasen ermittelt. Im Vergleich beider Kontrollgruppen fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Dennoch konnte eine wiederum erhöhte Metastasierung in den *pfp/rag2*-Mäusen gefunden werden. Dieser Umstand korreliert mit der vermehrten Bildung extravasaler Metastasen in den *pfp/rag2*-Mäusen, verdeutlicht jedoch die Diskrepanz zu deren geringerem Primärtumorgewicht. Bei dennoch vorliegender hochsignifikant positiver Korrelation zwischen Primärtumorgewicht und Metastasierung (\*\*p < 0,01) ist in diesem Modell daher von unterschiedlicher Genese hinsichtlich des Ausmaßes dieser beiden Faktoren auszugehen.

Zur Beurteilung der unspezifischen Immunaktivität wurde der prozentuale Anteil der in den Primärtumor eingewanderten dendritischen Zellen an der betreffenden Gesamtzellzahl in der *scid*- und *pfp/rag2*-Kontrollgruppe verglichen. Eine derartige Einwanderung zeigte sich bei 94 % der *scid*-Mäuse, der Anteil an dendritischen Zellen betrug 1,8 % (0 - 4,1 %). In der *pfp/rag2*-Gruppe dagegen fand sich ein Wert von 100 % bzw. durchschnittlich 3,9 % (1,3 - 6,8 %). Es ergab sich somit eine deutlich höhere durchschnittliche Anzahl dendritischer Zellen in den Primärtumoren der *pfp/rag2*-Mäuse, welche jedoch aufgrund hoher Schwankungen keine statistische Signifikanz gegenüber den Ergebnissen der *scid*-Mäuse aufwies.

Zudem wurden mittels LightCycler® *ALU-Real-time* PCR die in der Zirkulation befindlichen disseminierten MV3-Zellen quantifiziert. Aufgrund der nur sehr schwach erhöhten mittleren Anzahl zirkulierender Tumorzellen in der *pfp/rag2*-Kontrollgruppe von 96 (14 - 303) im Gegensatz zu einem Durchschnitt von 89 (0 - 769) Zellen in der *scid*-Kontrollgruppe ließ sich jedoch kein Zusammenhang zum Verhältnis der extravasalen Metastasierung zwischen *scid*- (119 extravasale Metastasen) und *pfp/rag2*-Kontrollgruppe (4667 extravasale Metastasen) erkennen. Zu beachten ist jedoch, dass mittels dieser PCR das *ALU*-Gen sämtlicher in den Proben enthaltener MV3-DNA quantifiziert wurde, also auch die DNA bereits apoptotischer oder zerstörter Zellen, während in die mikroskopische Auswertung ausschließlich eindeutig erkennbare MV3-Zellen miteinbezogen wurden.

Den Behandlungsgruppen der zwei Mausarten wurde anstelle von PBS über insgesamt 20 Tage Iscador® *i.p.* verabreicht.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich innerhalb der Mausarten keine signifikante Reduktion des Primärtumorgewichts unter Iscador®-Therapie ergab. Während bezüglich der *scid*-Mäuse in der 10 ng/kg KG-Gruppe das Tumorgewicht zunächst leicht, wenn auch nicht-signifikant gegenüber der Kontrollgruppe anstieg, fand sich in der 150 ng/kg KG-Gruppe ein leicht vermindertes durchschnittliches Primärtumorgewicht (Abb. 4.1.1.2). Im Falle der 150 ng/kg KG-Gruppe könnte somit zunächst an eine antiproliferative, ebenso wie zytotoxische Wirkung von Iscador® gedacht werden, welche für das ML-I bereits in anderen Konzentrationen in diversen Arbeitsgruppen deutlich demonstriert werden konnte (Thies *et al.*, 2008; Valentiner *et al.*, 2002; Yoon *et al.*, 1999, 1998 und 1995; Hajto *et al.*, 1997, 1990 und 1989; Büssing *et al.*, 1996; Beuth *et al.*, 1995<sup>a</sup> und 1991; Heiny und Beuth, 1994; Janssen *et al.*, 1993). Hier scheint zum einen die irreversible Inaktivierung von Ribosomen durch die A-Kette eine Rolle zu spielen (Barbieri *et al.*, 1993; Franz, 1986), wodurch der Abbruch der Proteinsynthese in der Zelle und folglich die Apoptose vermittelt wird (Büssing *et al.*, 1996; Langer *et al.*, 1996). Zum anderen ist die Bindung der B-Kette an entsprechende Rezeptoren der Tumorzellen an der Zytotoxizität beteiligt (Thies *et al.*, 2001<sup>b</sup>; Langer *et al.*,

1996; Barbieri *et al.*, 1993), deren Ausmaß wiederum positiv mit der Metastasierungspotenz der Malignome über vermehrte Expression ML-I-affiner Galaktosylreste korreliert (Schumacher *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1992; Ziska und Franz, 1981).

Thies *et al.* (2008) stellten in einem Versuch mit *scid*-Mäusen fest, dass die maximale antiproliferative Wirkung des ML-I in der 30 ng/kg KG-Konzentration (\*p < 0,05) vorliegt, während sich in der 150- bzw. 500 ng/kg KG-Gruppe kein derartiger Effekt zeigt. Hier lässt sich somit ein Unterschied zu der Wirkung von Iscador<sup>®</sup> erkennen, welches in der 30 ng/kg KG-Gruppe keine signifikante Reduktion des Tumorgewichts bewirken konnte, in der 150 ng/kg KG-Gruppe jedoch einen geringen derartigen Effekt erzielte. Da sich dieser Verlauf in den *pfp/rag2*-Gruppen allerdings nicht widerspiegelte (Abb. 4.2.1.2), finden sich für die Diskussion zwei verschiedene Ansätze. Zum einen ließe sich bezüglich der *scid*-Ergebnisse eine Abweichung in der Wirkung von Iscador<sup>®</sup> im Vergleich zu ML-I feststellen. Eine Ursache hierfür könnte sich in der Zusammensetzung von Iscador<sup>®</sup> finden, welches neben den Mistellektinen-I, -II, -III und Viscotoxinen zusätzliche Peptide und Kohlenhydrate wie Galaktose enthält, die möglicherweise mit dem ML-I in Iscador<sup>®</sup> interferieren und dadurch dessen Wirkung abschwächen oder sogar vollständig blockieren. Bestätigung findet die Annahme einer fehlenden antiproliferativen Wirkung in dem Ergebnis einer Studie von Kleeberg *et al.* (2004), der zufolge weder eine adjuvante Therapie mit rekombinantem Interferon- $\alpha$ 2b oder Interferon- $\gamma$  noch mit Iscador<sup>®</sup> in einem klinischen Vorteil für Patienten mit Hochrisiko-Melanom (Tumordicke > 3 mm) oder regionaler Lymphknotenmetastasierung resultiert. Augustin *et al.* (2005) konnten jedoch feststellen, dass sich unter der Iscador<sup>®</sup>-Therapie die melanombedingte Mortalität als hochsignifikant (\*\*p < 0,01) und klinisch relevant niedriger erwies als in der Kontrollgruppe. Ebenso waren Gesamtüberleben (\*p < 0,05), sowie tumor- bzw. hirnmetastasenfreies Überleben signifikant verlängert (jeweils \*p < 0,05).

Im Anschluss wurde das pulmonale Metastasierungsverhalten der MV3-Zelllinie unter der Behandlung mit Iscador<sup>®</sup> betrachtet. In der Bewertung der Gesamtmetastasierung zeigte sich in den *scid*-Gruppen eine bei steigender Dosierung kontinuierlich zunehmende durchschnittliche Anzahl von 131 Metastasen in der 10 ng/kg KG-Gruppe bis hin zu 218 Metastasen in der 150 ng/kg KG-Gruppe (Abb. 4.1.2.1.1). Es fand sich somit auch hier keine antiproliferative, antimetastatische Wirkung von Iscador<sup>®</sup>. Stattdessen ist eher ein gegenteiliger, prometastatischer Effekt anzunehmen, da ein direkter positiver Zusammenhang zwischen Dosierung und Metastasenanzahl hergestellt werden konnte. Es zeigen sich somit wiederum Parallelen zu den Beobachtungen von Kleeberg *et al.* (2004), welchen zufolge eine Behandlung von Melanompatienten (Tumordicke > 3 mm nach Breslow) mit Iscador<sup>®</sup> zu einer Verkürzung des krankheitsfreien Intervalls führt. Diesem Ergebnis wäre das Resultat eines *scid*-Xenograftmodells von Thies *et al.* (2008)

entgegenzusetzen, welches in der ML-I -Konzentration von 30 ng/kg KG eine Reduktion der pulmonalen Metastasierung um 55 % (\*p < 0,05) erzielte. In den höheren Dosierungen von 150- bzw. 500 ng/kg KG zeigte sich kein derartig deutlicher Effekt. Infolge dieser Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit noch geringere Mistelkonzentrationen verwendet, um zu prüfen, ob in Dosierungen kleiner als 30 ng/kg KG eine noch stärkere antimetastatische Wirkung erzielt werden könne. Diesem Ansatz ging die Annahme voraus, dass in niedrigeren Dosierungen die Zytotoxizität des ML-I geringer ausgeprägt sei, was sich auf die Vitalität der Zellen des unspezifischen Immunsystems positiv auswirke. Zu beachten ist jedoch, dass im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit in beiden genannten Fällen wiederum aufgereinigtes ML-I anstelle des Mischpräparates Iscador<sup>®</sup> verwendet wurde, welches zusätzliche Substanzen enthält, deren Wirkung und mögliche Interferenz mit ML-I noch nicht ausreichend erörtert wurde. Kirsch (2007) konnte hingegen zeigen, dass ein an metastasiertem malignem Melanom leidender Patient unter adjuvanter Monotherapie mit Iscador<sup>®</sup> eine vollständige Remission der Metastasierung erfuhr.

Die in den *pfp/rag2*-Mäusen ermittelte Anzahl an Gesamtmetastasen ergab reduzierte Werte in allen Behandlungsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei sich die deutlichste Verminderung in der 10- und 30 ng/kg KG-Gruppe zeigte (Tab. und Abb. 4.2.2.1.1). Die demgegenüber in der 150 ng/kg KG-Gruppe vorgefundene leichte Steigerung der Metastasenanzahl lässt auf einen weniger starken antimetastatischen Effekt von Iscador<sup>®</sup> in höherer Dosierung schließen, während in den niedrigeren Konzentrationen eine derartige Wirkung eingetreten zu sein scheint. Diese Beobachtung deckt sich insofern in der Tendenz mit dem bereits erwähnten Resultat von Thies *et al.* (2008). Zudem erreichten Yoon *et al.* (1998) eine signifikante Reduktion der Lungenmetastasierung für diverse Melanom-, Lymphom- sowie Kolonkarzinom-Zelllinien, indem der Extrakt der koreanischen Mistel zwei Tage vor Inokulation der Krebszellen *i.v.* verabreicht wurde. Derartige Resultate konnten jedoch mit Iscador<sup>®</sup> nicht erzielt werden, sondern wurden durch Kleeberg *et al.* (2004) hinsichtlich des malignen Melanoms widerlegt. Um diesen in den Ergebnissen ermittelten Unterschied eingehender zu untersuchen, wäre es daher interessant, einen Versuch mit 10 ng/kg KG reinem ML-I durchzuführen, um einen Vergleich zu den mit dem auf 10 ng/kg KG ML-I standardisierten Mischpräparat Iscador<sup>®</sup> ermittelten Ergebnissen anstellen zu können.

In der Gegenüberstellung der Gesamtmetastasierung von *scid*- und *pfp/rag2*-Mäusen zeigten sich, neben oben aufgeführter gegenläufiger Tendenz der Gesamtmetastasenanzahl, in allen *pfp/rag2*-Gruppen als auffälligstes Merkmal durchschnittlich 30-fach höhere Werte als in den entsprechenden *scid*-Gruppen (*pfp/rag2*: 10 ng/kg KG-Gruppe: 3404, 30 ng/kg KG-Gruppe: 3397 und 150 ng/kg KG-Gruppe: 3715 Metastasen; *scid*: 10 ng/kg KG-Gruppe: 131, 30 ng/kg KG-Gruppe: 163 und 150 ng/kg KG-Gruppe: 218 Metastasen). Diese wiesen in der Kontrollgruppe (\*\*p < 0,01) und in der 150 ng/kg KG-Gruppe (\*p < 0,05) zusätzlich statistisch

signifikante Unterschiede im Vergleich zu der jeweiligen *scid*-Gruppe auf. Die Korrelation des Primärtumorgewichts und der Gesamtmetastasierung erwies sich, entsprechend den Ergebnissen der jeweiligen Kontrollgruppe, in allen Behandlungsgruppen als positiv. Während für die *scid*-Mäuse jedoch ausschließlich in der 150 ng/kg KG-Gruppe eine statistische Signifikanz (\*\* $p < 0,01$ ,  $r = 0,8555$ ) ermittelt werden konnte, fand sich diese dagegen in sämtlichen *pfprag2*-Behandlungsgruppen (\*\* $p < 0,01$ ,  $r$  zwischen 0,5643 und 0,9456).

In der gesonderten Betrachtung der Verteilung von extra- und intravasaler Metastasierung konnte diese deutlich erhöhte Gesamtmetastasenanzahl hauptsächlich auf den extravasalen Anteil zurückgeführt werden. Hier fand sich, wie auch bereits in der Kontrollgruppe, in den *pfprag2*-Behandlungsgruppen insbesondere eine sehr hohe Anzahl an EZ e (Abb. 4.2.2.2.1.1 und 4.2.2.2.1.2), welche jedoch unter steigender Iscador<sup>®</sup>-Dosierung kontinuierlich abnahm. Die in der Gesamtmetastasierung der 150 ng/kg KG-Gruppe jedoch den anderen Behandlungsgruppen gegenüber leicht gesteigerten Werte resultieren daher am ehesten aus einer Zunahme der manifesten extravasalen Metastasen (Abb. 4.2.2.2.1.2), da der Anteil intravasaler Metastasen in der 150 ng/kg KG-Gruppe von der Behandlung unabhängig gleichbleibende Werte aufwies. Dieser Umstand wirft die Frage auf, ob unter steigender Iscador<sup>®</sup>-Konzentration nicht nur die Metastasierung an sich, sondern auch die Formierung manifester Metastasen aus extravasal gelegenen Einzelzellen induziert wird, während die Anzahl intravasaler Metastasen keine positive Korrelation mit der steigenden Dosierung aufweist. Diese hauptsächlich induzierte extravasale Metastasierung wird durch die Ergebnisse der *scid*-Mäuse bestätigt, da sich auch dort in der höchsten Iscador<sup>®</sup>-Konzentration kein gesteigerter Wert in der Anzahl intravasaler Metastasen zeigte.

Im Vergleich der intravasalen Metastasenanzahl ergaben sich große Schwankungen innerhalb beider Mausarten. Während sich bei den *scid*-Mäusen der deutlichste Anstieg in der 10 ng/kg KG-Gruppe fand, ließ sich dies bezüglich der *pfprag2*-Mäuse für die 30 ng/kg KG-Gruppe feststellen. Für beide Mausarten ergab sich in der 150 ng/kg KG-Gruppe eine geringfügige Abnahme an intravasalen Metastasen, was jedoch in beiden Fällen mit der vermehrten Auswanderung der MV3-Zellen aus den Gefäßen zu vereinbaren wäre, welches wiederum in der ansteigenden Anzahl extravasaler Metastasen in der jeweiligen 150 ng/kg KG-Gruppe Bestätigung findet. Insofern ergäbe sich für Iscador<sup>®</sup> nicht allein ein prometastatischer Effekt aufgrund einer Erhöhung des *Tumorloads* im Sinne der vermehrten Präsenz von Tumorzellen im Blut, sondern vielmehr auch eine Induktion der Penetration metastatischer Zellen aus den Gefäßen heraus in das periphere Gewebe. Gesondert auf die Erforschung der Penetration von MV3-Zellen ausgerichtete Projekte sind Gegenstand aktueller Forschung (Thies *et al.*, unveröffentlicht).

Für die Beurteilung der immunmodulatorischen Potenz von Iscador<sup>®</sup> wurde die Einwanderung dendritischer Zellen in den Primärtumor nach der Therapie betrachtet. Bezüglich der *scid*-Behandlungsgruppen zeigte sich hier keine Einwanderung induzierender Einfluss von Iscador<sup>®</sup> (Tab. und Abb. 4.1.4.2), es ließ sich hingegen in der 150 ng/kg KG-Gruppe eine leichte Abnahme der Anzahl dendritischer Zellen gegenüber der Kontrollgruppe feststellen. Dieser Verlauf konnte ebenso in den Behandlungsgruppen der *pfp/rag2*-Mäuse beobachtet werden, wobei sich hier die Reduktion dendritischer Zellen in der 150 ng/kg KG-Gruppe (durchschnittlich 2,7 %) als statistisch hochsignifikant (\*\*p < 0,01) gegenüber der 10 ng/kg KG-Gruppe (durchschnittlich 4,4 %) erwies, da zunächst in dieser Gruppe ein leichter Anstieg dendritischer Zellen zu verzeichnen war (Abb. 4.2.4.2). Die gleichartige Reduktion der Dendriten in der 150 ng/kg KG-Gruppe im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle könnte am ehesten auf die zytotoxisch wirkende Komponente des Iscador<sup>®</sup> zurückzuführen sein, wofür hauptsächlich die A-Kette des ML-I verantwortlich zu sein scheint (Gabius *et al.*, 2001; Witthohn *et al.*, 1996; Janssen *et al.*, 1993; Franz, 1991). Zusammenfassend konnte für sämtliche *pfp/rag2*-Gruppen ein höherer prozentualer Anteil dendritischer Zellen ermittelt werden (durchschnittlich 3,7 % Dendriten in allen Gruppen) als für die *scid*-Gruppen (durchschnittlich 1,8 % Dendriten) (Abb. 4.3.3.1). In Anbetracht des zusätzlich supprimierten Immunsystems der *pfp/rag2*-Mäuse erscheint dieses Ergebnis überraschend. Da sich diese Beobachtung bereits im Vergleich beider Kontrollgruppen zeigte und aufgrund der fehlenden positiven Korrelation von Dosissteigerung und Anstieg des Dendritenanteils in den Behandlungsgruppen nicht von einem diesbezüglich immunmodulatorischen Effekt von Iscador<sup>®</sup> auszugehen ist, scheint dieses Ergebnis doch in der ursprünglichen immunologischen Konstitution der *pfp/rag2*-Mäuse begründet zu sein. Das signifikant niedrigere durchschnittliche Primärtumorgewicht der *pfp/rag2*-Mäuse könnte somit aus einer gesteigerten Aktivität der dendritischen Zellen in dieser Mausart resultieren, was in den gegenläufigen Werten der *scid*-Mäuse Bestätigung findet. Dies würde bedeuten, dass ein Mangel an NK-Zellen eine kompensatorisch hochregulierte Einwanderung dendritischer Zellen in den Primärtumor hervorruft. Erste Ergebnisse für diese Hypothese finden sich in den Untersuchungen von Vivier *et al.* (2008), welchen zufolge NK-Zellen reziprok regulatorische Interaktionen mit den Zellen des unspezifischen Immunsystems eingehen können, welches neben einem Effekt gegenüber Makrophagen auch Endothelzellen und dendritische Zellen umfasst. Es wäre daher eine negative Korrelation zwischen der Präsenz von NK-Zellen und der Induktion dendritischer Zellen nachvollziehbar. Diese bezöge sich entweder auf eine kompensatorische Hochregulation der einen Zellart aufgrund der Abwesenheit der anderen, oder aber auf eine direkte Hemmung der dendritischen Zellen durch die NK-Zellen. Einen gegenteiligen Ansatz bietet jedoch das Ergebnis von Guan *et al.* (2007), welches eine gesteigerte dendritische Aktivität zeigt, die

von NK-Zellen über den NKG2D-Signalweg ausgelöst wird und eine verstärkte Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene in Form einer vermehrten Produktion von IL-12 zur Folge hat. Die in dieser Studie hauptsächlich betrachtete Reaktion gegenüber intrazellulären Parasiten könnte somit bezüglich der Abwehr von Tumorzellen ähnliche Mechanismen vermuten lassen. Brilot *et al.* (2007) beschreiben darüberhinaus eine Aktivierung der NK-Zellen durch dendritische Zellen, welche durch den IL-15-Rezeptor der NK-Zellen vermittelt wird und durch Blockade dieses Rezeptors eine vermehrte Apoptose der NK-Zellen zur Folge hat. In der Konsequenz hieraus könnte sich daher ebenso eine positive Korrelation zwischen Anzahl dendritischer Zellen und Anzahl an NK-Zellen ergeben, welches dem Ergebnis der hier vorliegenden Arbeit widerspräche. Diese Beobachtungen verdeutlichen daher den Bedarf an weiteren diesbezüglichen Studien.

Die mittels *ALU*-PCR eruierte Menge disseminierter MV3-Zellen im Blut unterlag in beiden Mausarten deutlichen Schwankungen, es fand sich jedoch in sämtlichen Behandlungsgruppen beider Mausarten eine im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe erhöhte Anzahl an Melanomzellen. In den *scid*-Gruppen zeigte sich der größte Gehalt an disseminierten MV3-Zellen mit durchschnittlich 396 (0 - 1422) Tumorzellen in der 10 ng/kg KG-Gruppe, dessen Wert sich gegenüber der Kontrollgruppe mit 89 (0 - 769) Zellen als hochsignifikant (\*\* $p < 0,01$ ) und den zwei weiteren Behandlungsgruppen (30 ng/kg KG: 118; 150 ng/kg KG: 131 Tumorzellen) gegenüber als signifikant (\* $p < 0,05$ ) erhöht erwies. In den *pfp/rag2*-Gruppen hingegen zeigte sich die deutlichste Erhöhung von durchschnittlich 284 (11 - 1604) Zellen in der 30 ng/kg KG-Gruppe, wobei jedoch keine Signifikanz ermittelt werden konnte. Im direkten Vergleich beider Mausarten fand sich außer in der 10 ng/kg KG-Gruppe mit 174 (30 - 651) MV3-Zellen eine grundsätzlich höhere Anzahl an Melanomzellen im Blut der *pfp/rag2*-Mäuse. Für die 10 ng/kg KG-Gruppen ergab sich jedoch ein deutlich höherer Wert für die *scid*-Mäuse. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich, entgegen der Annahme für das ML-I (Thies *et al.*, 2007, 2005 und 2001; Valentiner *et al.*, 2002; Yoon *et al.*, 1999 und 1995; Hajto *et al.*, 1997, 1990 und 1989; Büssing *et al.*, 1996; Beuth *et al.*, 1995<sup>a</sup> und 1991; Heiny und Beuth, 1994; Janssen *et al.*, 1993;), somit ein prometastatischer Effekt von Iscador<sup>®</sup> festhalten, der sich bereits in der Arbeit von Kleeberg *et al.* (2004) anhand eines verkürzten krankheitsfreien Intervalls unter Iscador<sup>®</sup>-Behandlung zeigte, und welcher sich hier bezüglich der intravasalen Metastasierung hauptsächlich in der 10- und 30 ng/kg KG-Konzentration von Iscador<sup>®</sup> darstellt. Im Vergleich zu der zuvor mikroskopisch ermittelten und deutlich niedrigeren Anzahl intravasaler Metastasen ist anzumerken, dass es sich in diesem Zusammenhang ausschließlich um manifeste Metastasen handelte. Im Rahmen des Auszählens von Metastasen fixierter Schnitte war davon auszugehen, dass es sich bei den intravasalen Einzelzellen lediglich um eine Momentaufnahme frei flottierender und nicht notwendigerweise schädlicher Melanomzellen handele und daher keine

Möglichkeit für die Erstellung eines zuverlässigen durchschnittlichen Wertes gegeben sei. Darüberhinaus ist zu beachten, dass die mittels PCR detektierte Menge an MV3-DNA größer sein könnte als die mikroskopisch eruierte Zellzahl, da in der PCR möglicherweise auch freie DNA bereits zugrunde gegangener MV3-Zellen quantifiziert wurde. Über eine mögliche ursächliche Toxizität von Iscador<sup>®</sup> für die reduzierte intravasale Metastasenzahl in der 150 ng/kg KG-Gruppe ließe sich daher keine konkrete Aussage treffen.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit einer noch präziseren Erforschung der Wirkmechanismen von Iscador<sup>®</sup> und ML-I. Ein Vergleich mit vorangegangenen Untersuchungen ist insbesondere bezüglich der Reaktion der *ptp/rag2*-Mäuse erschwert, da hier zurzeit nur wenige Forschungsergebnisse publiziert sind. Empfehlenswert wäre daher zum einen, das Augenmerk auf die Reaktion von *ptp/rag2*-Mäusen mit anderen malignen Zelllinien zu richten, wobei vor allem weitere Zelllinien des malignen Melanoms von großem Interesse sei könnten. Zum anderen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich Iscador<sup>®</sup> in seiner Wirkweise nicht mit der zuvor vielfach festgestellten Wirkweise von ML-I deckt. Insofern ist es dringend notwendig, diesen Unterschieden auf den Grund zu gehen, wobei nahe liegt, dass insbesondere auf die im Iscador<sup>®</sup> neben ML-I zusätzlich enthaltenen Stoffe geachtet werden sollte. Derartige Versuche sollten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durchgeführt werden, um möglichst zeitnah zu aussagekräftigen Ergebnissen zu gelangen und deren klinische Relevanz eruiieren zu können.

## 6 Zusammenfassung

Das maligne Melanom ist ein bösartiger, früh metastasierender Tumor der Haut, welcher sich besonders durch aggressives Wachstumsverhalten sowie ausgeprägte Resistenz gegenüber konservativer Therapie bei eingetretener Metastasierung auszeichnet. Die in den letzten Jahren zusätzlich rapide ansteigende Inzidenz verdeutlicht die dringende Notwendigkeit alternativer Therapieansätze.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, zu überprüfen, inwiefern die Anwendung des Naturheilmittels Iscador® eine valide Alternative zur Behandlung des malignen Melanoms *in vivo* darstellt. Hierbei wurden sowohl die antiproliferative und antimetastatische Wirkung anhand von Primärtumorwachstum sowie intra- und extravasaler pulmonaler Metastasierungsrate, als auch die immunmodulatorische Wirkung anhand von Induktion der Einwanderung dendritischer Zellen in den Primärtumor bewertet. Für die präzisere Analyse des Wirkmechanismus wurden die zwei unterschiedlich immundefizienten Mausarten *scid* und *pfp/rag2* hinsichtlich dieser Parameter einander gegenübergestellt.

Die Untersuchungen zeigten, dass bei insgesamt signifikant geringerem Primärtumorgewicht der *pfp/rag2*-Mäuse in keiner Mausart eine antiproliferative Wirkung von Iscador® zu erzielen war.

Auch bezüglich der extravasalen Metastasierung fand sich kein hemmender Effekt von Iscador®. Hier wiesen die *pfp/rag2*-Gruppen signifikant erhöhte Werte auf, welches hauptsächlich auf einen bedeutenden Anteil an EZ e zurückzuführen war, der sich in den *scid*-Gruppen nicht fand. Die intravasale Metastasierung zeigte in der *scid*-Gruppe unter der höchsten Iscador®-Konzentration eine leichte Reduktion, während die *pfp/rag2*-Gruppen unbeeinflusst blieben. Eine positive, teilweise auch hochsignifikante Korrelation zwischen Primärtumorgewicht und Gesamtmetastasierung konnte für alle Mausgruppen bereits ab dem geringsten Tumorgewicht nachgewiesen werden.

Eine Induktion der Einwanderung dendritischer Zellen in den Primärtumor konnte weder für die *scid*- noch für die *pfp/rag2*-Mäuse erzielt werden, der Anteil dendritischer Zellen erwies sich jedoch in allen *pfp/rag2*-Gruppen gegenüber den *scid*-Gruppen als erhöht.

Eine molekulargenetische Analyse des Anteils zirkulierender Tumorzellen im Blut ergab für beide Mausarten eine kontinuierliche Zunahme disseminierter MV3-Zellen unter steigender Iscador®-Dosierung, welche sich bei den *scid*-Mäusen vor allem in der 10 ng/kg KG-, bei den *pfp/rag2*-Mäusen insbesondere in der 30 ng/kg KG-Gruppe fand.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich Iscador® in seiner Wirkung deutlich von der des isolierten ML-I unterscheidet. Es ergibt sich hieraus der dringende Bedarf an weiterer Analyse der genauen Wirkmechanismen, nicht zuletzt auch hinsichtlich der neben dem ML-I in Iscador® enthaltenen Substanzen.

## 7 Literaturverzeichnis

Alt FW, Blackwell TK, DePinho RA, Reth MG, Yancopoulos GD (1986) Regulation of genome rearrangement events during lymphocyte differentiation. *Immunol Rev*: 89: 5-30.

Antony S, Kuttan R, Kuttan G (2000) Role of natural killer cells in Iscador mediated inhibition of metastasis by adoptive immunotherapy. *Immunol Invest* 29: 219-31.

Antony S, Kuttan R, Kuttan G (1999) Inhibition of lung metastasis by adoptive immunotherapy using Iscador. *Immunol Invest* 28: 1-8.

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.

Balch CM, Houghton AN, Peters LJ (1993<sup>a</sup>) Cutaneous melanoma. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds.). *Cancer: Principles and practice of oncology*, JB Lippincott, Philadelphia: 1612-1661.

Balch CM, Urist MM, Karakousis CP, Smith TJ, Temple WJ, Drzewiecki K, Jeweli TJ, Bartolucci AA, Mihm MC, Barnhill R, Wanebo HJ (1993<sup>b</sup>) Efficacy of 2 cm surgical margins for intermediate-thickness melanomas (1-4 mm). Results of a multi-institutional randomized surgical trial. *Ann Surg* 218: 262-269.

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

Becker N, Wahrendorf J (1998) *Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland, 1981-1990*. 3 Auflage, Springer Verlag.

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

- Beuth J, Ko HL, Gabius HJ, Pulverer G (1991) Influence of treatment with the immunomodulatory effective dose of the beta-galactoside-specific lectin from mistletoe on tumor colonization in BALB/c-mice for two experimental model systems. *In Vivo* 5: 29-32.
- Bocci V (1993) Mistletoe (*Viscum album*) lectins as cytokin inducers and immunoadjuvant in tumor therapy. A review. *J Biol Reg Homeos Agents* 7: 1-6.
- Bock PR, Friedel WE, Hanisch J, Karasmann M, Schneider B (2004) Efficacy and safety of long-term complementary treatment with standardized European mistletoe extract (*Viscum album* L.) in addition to the conventional adjuvant oncologic therapy in patients with primary non-metastasized mammary carcinoma. Results from a multicenter, comparative, epidemiological cohort study in Germany and Switzerland. *Arzneim Forsch* 54: 456-466.
- Bosma MJ (1992) B and T cell leakiness in the scid mouse mutant. *Immunodef Rev* 3: 261-276.
- Breslow A (1970) Thickness, cross sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 172: 902-908.
- Breslow A, Macht SD (1978) Evaluation of prognosis in Stage I cutaneous melanoma. *Plast Reconstr Surg* 113: 737-739.
- Brilot F, Strowig T, Roberts SM, Arrey F, Münz C (2007) NK cell survival mediated through the regulatory synapse with human DCs requires IL-15 $\alpha$ . *J Clin Invest* 117: 3316-3329.
- Büssing A, Suzart K, Schweizer K (1997) Differences in the apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts. *Anticancer Drugs* 8: 9-14.
- 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, Schüler JB, Fiebig HH (2003) No evidence of stimulation of human tumor cell proliferation by a standardized aqueous mistletoe extract in vitro. *Anticancer Res* 23: 3801-3806.
- Celli S, Breart B, Bouso P (2008) Intravital Two-Photon Imaging of Natural Killer Cells and Dendritic Cells in Lymph Nodes. *Methods Mol Biol* 415: 119-126.
- Edler L (2004) Mistel in der Krebstherapie. *Dtsch Arztebl* 101: A 44-49.

Eifler R, Pfüller K, Göckeritz W, Pfüller U (1994) Improved procedures for isolation and standardization of mistletoe lectins and their subunits: Lectin pattern of the European mistletoe. In *Lectins 9: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. Basu J, Kundu M, Chakrabari P, Bog-Hansen TC (eds.). M/S Wiley Eastern Limited, New Delhi, India: 144-151.

Eggermont AMM, Kleeberg UR, Ruiter DJ, Suci S (2001) European Organisation for Research and Treatment of Cancer Melanoma group trial experience with more than 2000 patients, evaluating adjuvant treatment with low or inter-mediate doses of interferon  $\alpha$ -2b. In: Perry MC (ed.): *American Society of Clinical Oncology, 37<sup>th</sup> Annual meeting*, Alexandria, VA, USA, Educational Book 2001: 88-93.

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

Endo Y, Tsuguri K, Franz H (1988) The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eucaryotic ribosomes – the RNA N-glycosidase activity of the protein. *FEBS Lett* 231: 378-380.

Fisher JC (1985) Safe margins for melanoma excision. *Ann Plast Surg* 14: 158-161.

Franz H (1991) *Viscoceaea lectins*. In: Franz H (ed.) *Advances in lectin research*. Vol 4; VEB Verlag: Volk und Gesundheit, Berlin: 33-50.

Franz H (1989) Characterization and qualitative estimation of viscaceae lectins. In: Franz H (ed.) *Advances in lectin research Vol 2*, VEB Verlag: Volk und Gesundheit, Berlin: 32-37.

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

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

Franz H, Ziska P, Kindt A (1981) Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album L.*). *Biochem J* 195: 481-484.

Freudlsperger C, Moll I, Schumacher U, Thies A (2006) Anti-proliferative effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists on human malignant melanoma cells in vitro. *Anticancer Drugs* 17: 325-32.

- Gabius HJ, Darro F, Remmelink M, André S, Kopitz J, Danguy A, Gabius S, Salmon I, Kiss R (2001) Evidence for stimulation of tumor proliferation in cell lines and histotypic cultures by clinically relevant low doses of the galactoside-binding mistletoe lectin, a component of proprietary extracts. *Cancer Invest* 19: 114-26.
- Garbe C, Paul A, Kohler-Spath H, Ellwanger U, Stroebel W, Schwarz M, Schlagenhauff B, Meier F, Schittek B, Blaheta HJ, Blum A, Rassner G (2003) Prospective evaluation of a follow-up schedule in cutaneous melanoma patients: recommendations for an effective follow-up strategy. *J Clin Oncol* 21: 520-529.
- Garbe C, Schadendorf D (2003) Surveillance and follow-up examinations in cutaneous melanoma. *Oncology* 26: 241-246.
- Garbe C, Blum A (2001). Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14: 280-290.
- Garbe C, Büttner P, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, Guggenmoos HI, Lechner W, Lippold A, Orfanos CE (1995) Primary cutaneous melanoma: identification of prognostic groups and estimation of individual prognosis in 5093 patients. *Cancer* 75: 2484-2491.
- Grothey A, Düppe J, Hasenburg A, Voigtmann R (1998) Use of alternative medicine in oncology patients. *Dtsch Med Wschr* 123: 923-929.
- Guan H, Moretto M, Bzik DJ, Gigley J, Khan IA (2007) NK cells enhance dendritic cell response against parasite antigens via NKG2D pathway. *J Immunol* 179: 590-596.
- Hajto T, Hostanska K, Gabius HJ (1989) Modulatory potency of the  $\beta$ -galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defence system in vivo in rabbits and patients. *Cancer Res* 49: 4803-4808.
- Hajto T, Hostanska K, Frei K, Rordorf C, Gabius HJ (1990) Increased secretion of tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin 1 and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to  $\beta$ -galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract. *Cancer Res* 50: 3322-3326.
- Hajto T, Hostanska K, Fischer J, Saller R (1997) Immunomodulatory effects of *Viscum album* agglutinin-I on natural immunity. *Anticancer Drugs* 8: 43-46.
- Hart IR, Saini A (1992) Biology of tumor metastasis. *Lancet* 339: 1453-1461.
- Hart IR, Goode NT, Wilson RE (1989) Molecular aspects of the metastatic cascade. *Biochim Biophys Acta*, 989: 65-84.

- Hauschild A, Weichenthal M, Balda BR, Becker JC, Wolff HH, Tilgen W, Schulte KW, Ring J, Schadendorf D, Lischner S, Burg G, Dummer R (2003) Prospective randomized trial of interferon alfa-2b and interleukin-2 as adjuvant treatment for resected intermediate- and high-risk primary melanoma without clinically detectable node metastasis. *J Clin Oncol* 21: 2883-2888.
- Heiny BM, Beuth J (1994) Mistletoe extract standardized for the galactoside-specific lectin (ML-I) induces  $\beta$ -endorphin release and immunopotentialiation in breast cancer patients. *Anticancer Res* 14: 1339-1342.
- Hostanska K, Hajto 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.
- 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.
- Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ; American Cancer Society (2004) Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 54: 8-29.
- Jojovic M, Schumacher U (2000) Quantitative assessment of spontaneous lung metastases of human HT29 colon cancer cells transplanted into SCID mice. *Cancer Lett* 152: 151-156.
- Kariya Y, Kato K, Hayashizaki Y, Himeno S, Tarui S, Matsubara K (1987) Revision of consensus sequence of human Alu repeats – a review. *Gene* 53: 1-10.
- Kaufmann R, Proebstle T, Sterry W (1995) Malignes Melanom. In: Zeller WJ, zur Hausen H (eds.) *Onkologie*. Ecomed, Erlangen.
- Kaufmann R (1996) Operative Therapie des primären Melanoms. *Onkologie* 2: 449-452.
- Keilholz U, Tilgen W, Hohenberger W (2003) Systemische Therapie des metastasierten Melanoms: Ergebnisse randomisierter Studien der letzten 10 Jahre. *Dtsch Arztebl* 100: A 1054-1064.
- Kelter G, Schierholz JM, Fischer IU, Fiebig HH (2007) Cytotoxic activity and absence of tumor growth stimulation of standardized mistletoe extracts in human tumor models in vitro. *Anticancer Res* 27: 223-233.
- Kienle GS, Berrino F, Büssing A, Portalupi E, Rosenzweig S, Kiene H (2003) Mistletoe in cancer – a systematic review on controlled clinical trials. *Eur J Med Res* 8: 109-119.

Kienle GS, Kiene H (2004) Die Mistel in der Onkologie. Fakten und konzeptionelle Grundlagen. Schattauer, Stuttgart-New York.

Kirsch A (2007) Successful treatment of metastatic malignant melanoma with *Viscum album* extract (Iscador M). *J Altern Complement Med* 13: 443-445.

Kleeberg UR, Suci S, Bröcker EB, Rüter DJ, Chartier C, Liénard D, Marsden J, Schadendorf D, Eggermont AM; EORTC Melanoma Group in cooperation with the German Cancer Society (DKG) (2004) Final results of the EORTC 18871/DKG 80-1 randomised phase III trial. rIFN- $\alpha$ 2b 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.

Kopp J, Körner IJ, Pfüller U, Göckeritz W, Eifler R, Pfüller K, Franz H (1993) Toxicity of mistletoe lectins I, II, III on normal and malignant cells. In: Van Driessche E, Franz H, Beeckmans S, Pfüller U, Kallikorm A, Bog-Hansen TC (eds.) *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry Vol 8*, Copenhagen: Textop-Verlag: 41-47.

Krauspenhaar R, Eschenburg S, Perbandt M, Kornilov V, Konareva N, Mikailova I, Stoeva S, Wacker R, Maier T, Singh T, Mikhailov A, Voelter W, Betzel C (1999) Crystal structure of mistletoe lectin I from *Viscum album*. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 257: 418-424.

Langer M, Rothe M, Eck J, Möckel B, Zinke H (1996) A nonradioactive assay for ribosome-inactivating proteins. *Analytic Biochem* 243: 150-153.

Langer M, Möckel 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: 944-948.

Lenartz D, Andermahr J, Plum G, Menzel J, Beuth J (1998) Efficiency of treatment with galactoside-specific lectin from mistletoe against rat glioma. *Anticancer Res* 18: 1011-1014.

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

Mansky PJ (2002) Mistletoe and cancer: controversies and perspectives. *Semin Oncol* 29: 589-594.

Mengs U, Göthel D, Leng-Peschlow E (2002) Mistletoe extracts standardized to mistletoe lectins in oncology: review on current status of preclinical research. *Anticancer Res* 22: 1399-1407.

Miller M, Boyer MJ, Butow PN, Gattellari M, Dunn SM, Childs A (1998) The use of unproven methods of treatment by cancer patients. Frequency, expectations and cost. *Support Care Cancer* 6: 337-347.

Möller P, Koretz K, Leithäuser F, Brüderlein S, Henne C, Quentmeier A, Krammer PH (1994) Expression of APO-1 (CD95), a member of the NGF/TNF receptor superfamily, in normal and neoplastic colon epithelium. *Int J Cancer* 57: 371-377.

O'Connell MJ, Chua R, Hoyos B, Buck J, Chen Y, Derguini F, Hämmerling U (1996) Retro-retinoids in regulated cell growth and death. *J Exp Med* 184: 549-555.

O'Day SJ, Kim CJ, Reintgen DS (2002) Metastatic melanoma: chemotherapy to biochemotherapy. *Cancer Control* 9: 31-38.

Orfanos CE, Jung EG, Rassner G, Wolff HH, Garbe C (1994) Position paper of the Melanoma Committee of the German Dermatological Society on cutaneous malignant melanoma, with recommendations for diagnosis, treatment and follow up. *Hautarzt* 45: 285-291.

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 Radio-pharm* 16: 439-447.

Restifo NP (2000) Not so Fas: Re-evaluating the mechanisms of immune privilege and tumor escape. *Nat Med* 6: 493-495.

Restifo NP (2001) Countering the 'counterattack' hypothesis. *Nat Med* 7: 259.

Ribéreau-Gayon G, Dumont S, Muller C, Jung ML, Poindron P, Anton R (1996) Mistletoe lectins I, II and III induce the production of cytokines by cultured human monocytes. *Cancer Lett* 109: 33-38.

Scheffler A, Fiebig HH, Kabelitz D, Metelmann HR (1993) Zur direkten Zytotoxizität von Mistelpräparaten. *Erfahrungsheilkunde* 6: 338-346.

Scheffler A, Musielski H, Scheer R (1995) Synergismus zwischen Lektinen und Vesikeln von *Viscum album* L. *Dtsch Zschr Onkol* 27: 72-75.

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: 171-175.

- Schumacher U, Schumacher D, Schwarz T, Pfüller U (1996) Cell biological and immunopharmacological investigations on the use of mistletoe lectin I (ML-I). In: Loew D, Rietbrock N (eds) *Phytopharmaka*, Vol II, Steinkopff Verlag, Darmstadt: 197-204.
- Schumacher U, Adam E, Brooks SA, Leathem AJ (1995<sup>a</sup>) Lectin binding properties of human breast cancer cell lines and human milk with particular reference to *Helix pomatia* agglutinin. *J Histochem Cytochem* 43: 275-281.
- Schumacher U, Stamouli A, Adam E, Peddie M, Pfüller U (1995<sup>b</sup>) 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.
- Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall AM, *et al.* (1992) RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68: 855-867.
- Sodeur S, Ullrich S, Gustke H, Zangemeister-Wittke U, Schumacher U (unveröffentlicht) Increased numbers of spontaneous SCLC metastasis in absence of NK cells after subcutaneous inoculation of different SCLC cell lines into pfp/rag2 double knock out mice.
- Steuer-Vogt MK, Bonkowsky V, Ambrosch P, Scholz M, Neiss A, Strutz J, Henning M, Lenarz T, Arnold W (2001) The effect of an adjuvant mistletoe treatment programme in resected head and neck cancer patients: a randomised controlled clinical trial. *Eur J Cancer* 37: 23-31.
- Stirpe F, Legg RF, Onyon LJ, Ziska P, Franz H (1980) Inhibition of protein synthesis by a cytotoxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe). *Biochem J* 190: 843-845.
- Stirpe F, Sandvig K, Olsnes S (1982) Action of viscumin, a toxic lectin from mistletoe, on cells in culture. *J Biol Chem* 257: 13271-13277.
- Suelter CH, De Luca M (1983) How to prevent losses of protein by adsorption to glass and plastic. *Anal Biochem* 135: 112-119.
- Tang L, Tron VA, Reed JC, Mah KJ, Krajewska M, Li G, Zhou X, Ho VC, Trotter MJ (1998) Expression of apoptosis regulators in cutaneous malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 4: 1865-71.
- Thies A, Dautel P, Meyer A, Pfüller U, Schumacher U (2008) Low-dose mistletoe lectin-I reduces melanoma growth and spread in a scid mouse xenograft model. *Br J Cancer* 98: 106-112.

Thies A, Berlin A, Brunner G, Schulze HJ, Moll I, Pfüller U, Wagener C, Schachner M, Altevogt P, Schumacher U (2007<sup>a</sup>) Glycoconjugate profiling of primary melanoma and its sentinel node and distant metastases: implications for diagnosis and pathophysiology of metastases. *Cancer Lett* 248: 68-80.

Thies A, Mauer S, Fodstad O, Schumacher U (2007<sup>b</sup>) Clinically proven markers of metastasis predict metastatic spread of human melanoma cells engrafted in scid mice. *Br J Cancer* 96: 609-616.

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

Thies A, Schachner M, Berger J, Moll I, Schulze HJ, Brunner G, Schumacher U (2004) The developmentally regulated neural crest-associated glycotope HNK-1 predicts metastasis in cutaneous malignant melanoma. *J Pathol*: 203: 933-939.

Thies A, Schachner M, Moll I, Berger J, Schulze H-J, Brunner G, Schumacher U (2002) Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma. *Eur J Cancer* 38: 1708-1716.

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: 2883-2888.

Thomsen M, Yacoub-Youssef H, Marcheix B (2005) Reconstitution of a human immune system in immunodeficient mice: models of human alloreaction in vivo. *Tissue Antigens* 66: 73-82.

Tourneur L, Chiocchia G (2002) FasL Expression in Normal and Pathological Conditions: What Have We Learnt From Murine Models. *Mod. Asp. Immunobiol* 2: 178-183.

Valentiner U, Pfüller 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.

Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S (2008) Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9: 503-510.

- Walsh CM, Matloubian M, Liu CC, Ueda R, Kurahara CG, Christensen JL, Huang MT, Young JD, Ahmed R, Clark WR (1994) Immune function in mice lacking the perforin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10854-10858.
- Witthohn K, Wächter W, Lentzen H (1996) Chemische Standardisierung von Mistelextraktzubereitungen als Voraussetzung für den Nachweis der Wirksamkeit. In: Loew D; Rietbrook N (eds.) *Phytopharmaka II: Forschung und klinische Anwendung*, Steinkopff Verlag, Darmstadt: 185-204.
- Wu AM, Chin L-K, Franz H, Pfüller U, Herp A (1992) Carbohydrate specificity of the receptor sites of mistletoe toxic lectin-I. *Biochim Biophys Acta* 1117: 232-234.
- Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Song SK, Lee KB, Her E, Song KS, Kim JB (2003) Antitumor activity of the Korean mistletoe lectin is attributed to activation of macrophages and NK cells. *Arch Pharm Res* 26: 861-867.
- Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Shimazaki K, Song SK, Lee KH, Kim SH, Park CH, Azuma I, Kim JB (1999) Lectins isolated from Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) induce apoptosis in tumor cells. *Cancer Lett* 136: 33-40.
- Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Baek YJ, Huh CS, Song SK, Lee KH, Azuma I (1998) Prophylactic effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumor metastasis is mediated by enhancement of NK cell activity. *Int J Immunopharmacol* 20: 163-172.
- 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 tumor cells in mice. *Cancer Lett* 97: 83-91.
- Ziska P, Franz H (1981) Studies on the interaction of mistletoe lectin I with carbohydrates. *Experientia* 37: 219.
- Ziska P, Franz H (1990) Lectins, Vol 6, *Handbook of Immunological Methods*: 473-480.
- Zubair AC, Ali SA, Rees RC, Goepel JR, Goyns MH (1996) Investigation of the effect of BB-94 (batimastat) on the colonization potential of human lymphoma cells in SCID mice. *Cancer Lett* 107: 91-95.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Mentor, Herrn Prof. Dr. med. U. Schumacher, für die Bereitstellung des interessanten Projektes und für die Möglichkeit, dieses im Institut für Anatomie II durchführen zu dürfen, sowie für seine stets motivierenden Anregungen und Ideen, welche diese Arbeit gelingen ließen.

Frau Dr. A. Thies möchte ich für kompetente Projektplanung sowie Anleitung im praktischen Teil dieser Arbeit danken.

Frau Prof. Dr. I. Moll danke ich für die freundliche Bereitstellung der humanen MV3-Melanomzellline, sowie Herrn Dr. H. Wesp für das zur Verfügung gestellte Iscador®.

Den wissenschaftlichen Assistenten, hierunter vor allem Frau Dr. rer. nat. N. Nehmann und ganz besonders Frau Dr. rer. nat. H. Gustke, danke ich hiermit von Herzen für fortwährende ausgezeichnete Unterstützung bei praktischen Fragestellungen, sowie für ein immer offenes Ohr, nützliche Ratschläge und Hilfestellungen.

Dem MTA-Labor team möchte ich meinen ausdrücklichen Dank aussprechen für hervorragende und stets kompetente Leistung, sowie für allzeit gute Zusammenarbeit und aufmunternde Worte. Dies gilt vor allem Frau M. Märker, Frau S. Feldhaus, Frau R. Gehrke, und insbesondere Frau K. Burger.

Sämtlichen Mitarbeitern des Tierstalles danke ich sehr für die gute Versorgung der Versuchstiere.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Mitdoktoranden und Freunden, vor allem Frau C. Haane und Frau S. Münchmeyer, für zahlreiche aufschlussreiche Gespräche und Anregungen, ständige Unterstützung und Loyalität, sowie aufmunternde Worte und emotionalen Rückhalt, auch in schwierigen Zeiten.

Mein ganz besonderer Dank gilt jedoch meiner Familie, die mir Selbstvertrauen gegeben und mich während des Studiums fortwährend unterstützt und in meinen Zielen bestärkt hat.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Sander
Vorname	Franziska
Geburtsdatum	01.05.1983
Geburtsort:	Hamburg

### Schulbildung

08/1989 – 07/1993	Grund- und Hauptschule Nenndorf, Niedersachsen
08/1993 – 07/1999	Humanistisches Friedrich-Ebert-Gymnasium, Hamburg
08/1999 – 07/2000	Wilmot Union High School, Wisconsin, USA
08/2000 – 06/2002	Immanuel-Kant-Gymnasium, Hamburg

### Hochschulausbildung

10/2002	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf der Universität Hamburg
08/2004	Physikum
10/2004 – 08/2006	Klinische Ausbildung am Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf
seit 07/2007	Praktisches Jahr
07/2007 – 12/2007	Universidad de Buenos Aires, Hospital Cosme Argerich Tertial der Allgemein- und Unfallchirurgie in Argentinien

## **Selbständigkeitserklärung**

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

Hamburg, den 4. Juni 2008

---