

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

Zentrum für experimentelle Medizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

**Wirkung von Mistellektin-I im Extrakt Iscador[®] M 5 mg spezial
auf das Wachstums- und Metastasierungsverhalten
der humanen Melanomzelllinie MV3 *in vivo*
in einem *Scid*- und *E^{-/-}/P^{-/-}/Scid*-Maus-Xenograftmodell**

Dissertation

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

vorgelegt von

Astrid Michaela Ehm
aus Herdecke

Hamburg 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
am: 30.05.2011

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg

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

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

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. M. Horstmann

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

5-JÜR	5-Jahresüberlebensrate
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
Abb.	Abbildung
Alu	Arthrobacter luteus
ANOVA	Analysis of Variance
Aqua dest.	Aqua destillata
bp	Basenpaar
BSA-I	Bandeiraea simplicifolia Agglutinin-I
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CASY	Cell Counter + Analyser System
CO ₂	Kohlendioxid
d	Tag
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere
E-Selektin	endotheliales Selektin
FCS	Fetal Calf Serum
g	Gramm
h	Stunde

H ₂ O	Wasser
HCl	Hydrogenchlorid
HE	Hämatoxylin-Eosin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i. p.	intraperitoneal
Iscador [®] M spez	Iscador [®] M 5 mg spezial
i. v.	intravenös
KCl	Kaliumchlorid
KDa	KiloDalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LDH	Laktatdehydrogenase
Lj.	Lebensjahr
Lk.	Lymphknoten
LM	Lungenmetastasen
Lsg.	Lösung
M	Mali (Apfel)
Met	Metastase
mg	Milligramm
min	Minute
Mio	Million
ml	Milliliter
ML-I/-II/-III	Mistellektin-I/-II/-III
mM	millimolar
mm	Millimeter
mmol	Millimol

MPS	Mononukleär-phagozytisches System
N	normal
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
P	Pini (Kiefer)
p	Wahrscheinlichkeitskoeffizient
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyd
pmol	Picomol
P-Selektin	Platelet-Selectin
r	Korrelationskoeffizient nach Pearson
RPMI-1640	Zellkulturmedium Roswell Park Memorial Institute-1640
s. c.	subkutan
Scid	Severe Combined Immunodeficiency
s	Sekunde
SEM	Standard Error of the Mean
ssp.	Subspezies
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBS	Tris Buffered Saline
TG	Tumorgewicht
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
UICC	Union for International Cancer Control

UpM

Umdrehungen pro Minute

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Inhaltsverzeichnis	V
1 Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2 Einleitung	3
2.1 Malignes Melanom.....	3
2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	3
2.1.2 Stadieneinteilung und Prognose	4
2.1.3 Therapie.....	7
2.2 Von der Mistel zum Extrakt Iscador® M 5 mg spezial	9
2.2.1 Mistellektine	10
2.2.1.1 Zytotoxizität.....	11
2.2.1.2 Immunmodulation	12
2.2.2 Viscotoxine.....	13
2.2.2.1 Zytotoxizität.....	14
2.2.2.2 Immunmodulation	14
2.2.3 Andere Inhaltsstoffe von <i>Viscum album</i> L.	15
2.3 Das <i>Scid</i> - und <i>E⁻/P⁻/Scid</i> -Maus-Xenograft-Melanommodell.....	16
2.3.1 Die <i>Scid</i> -Maus.....	16
2.3.2 Die <i>E⁻/P⁻/Scid</i> -Maus.....	17
2.4 Die Selektine	18
2.5 Die Metastasierungskaskade.....	20
3 Material und Methoden	22
3.1 Material.....	22
3.1.1 Geräte	22
3.1.2 Software.....	23
3.1.3 Verbrauchsmaterialien	23
3.1.4 Chemikalien und Reagenzien	24
3.1.5 Puffer und Lösungen.....	25
3.1.6 Antitumorale Substanzen	26
3.1.7 Fertige Lösungen und Reaktionssysteme	26
3.1.8 Verwendete Oligonukleotide	26
3.2 Methoden.....	26
3.2.1 Zellbiologische Methoden.....	26
3.2.1.1 Melanomzelllinie MV3	26
3.2.1.2 Langzeitlagerung eukaryontischer Zellen.....	27
3.2.1.3 Zellkultur	27
3.2.2 Zellzahlbestimmung mit dem Zellanalysegerät <i>CASY</i>	28
3.2.2.1 Durchführung der Zellzählung.....	29
3.2.3 Versuchstiere	29
3.2.3.1 Die <i>Scid</i> -Maus.....	30
3.2.3.2 Die <i>E⁻/P⁻/Scid</i> -Maus	30
3.2.4 Tierhaltung	31
3.2.5 Behandlung der Versuchstiere	31
3.2.5.1 Inokulation der Tumorzellen in die Versuchstiere	32

3.2.5.2	Behandlung der Tiere mit Iscador® M 5 mg spezial.....	32
3.2.6	Blutentnahme und Organentnahme	34
3.2.7	Histologische Untersuchungen.....	35
3.2.7.1	Gewebefixierung	35
3.2.7.2	Primärtumoren	35
3.2.7.3	Lungenmetastasierung.....	35
3.2.8	Darstellung dendritischer Zellen in den Primärtumoren durch das biotinylierte Lektin <i>Bandeiraea simplicifolia Agglutinin-I (BSA-I)</i>	37
3.2.9	Bestimmung disseminierter Melanomzellen im Blut	38
3.2.9.1	LightCycler <i>real-time polymerase chain reaction (RT PCR)</i>	39
3.2.9.2	Quantifizierung mit <i>SYBR Green I</i> -Farbstoff	39
3.2.9.3	Der quantitative Nachweis humaner <i>Alu</i> -Sequenzen.....	40
3.2.9.4	Absolute Quantifizierung mit internen Standards	41
3.2.9.5	Durchführung der quantitativen <i>Alu</i> -PCR.....	42
3.2.10	Statistische Auswertungen	43
4	Ergebnisse	44
4.1	Primärtumoren.....	44
4.1.1	<i>Scid</i> -Mäuse	44
4.1.2	<i>E⁻/P⁻/Scid</i> -Mäuse.....	47
4.1.3	Vergleich der Primärtumoren zwischen <i>Scid</i> und <i>E⁻/P⁻/Scid</i>	49
4.2	Lungenmetastasen	51
4.2.1	<i>Scid</i> -Mäuse	53
4.2.1.1	Gesamtmetastasierung	53
4.2.1.2	Extravasale Lungenmetastasen.....	55
4.2.1.3	Intravasale Lungenmetastasen	57
4.2.2	<i>E⁻/P⁻/Scid</i> -Mäuse	59
4.2.2.1	Gesamtmetastasierung	59
4.2.2.2	Extravasale Lungenmetastasen.....	61
4.2.2.3	Intravasale Lungenmetastasen	63
4.2.2.4	Einzelne metastasierte Melanomzellen in den Lungen	65
4.2.3	Vergleich der Gesamtmetastasierung zwischen <i>Scid</i> und <i>E⁻/P⁻/Scid</i>	67
4.2.4	Vergleich der extravasalen Lungenmetastasen zwischen <i>Scid</i> und <i>E⁻/P⁻/Scid</i>	69
4.2.5	Vergleich der intravasalen Lungenmetastasen zwischen <i>Scid</i> und <i>E⁻/P⁻/Scid</i>	71
4.3	Dendritische Zellen in den Primärtumoren.....	73
4.3.1	<i>Scid</i>	74
4.3.2	<i>E⁻/P⁻/Scid</i>	76
4.3.3	Vergleich dendritischer Zellen in den Primärtumoren von <i>Scid</i> und <i>E⁻/P⁻/Scid</i>	77
4.4	Disseminierte Tumorzellen im Blut	79
4.4.1	<i>Scid</i>	79
4.4.2	<i>E⁻/P⁻/Scid</i>	80
4.4.3	Vergleich disseminierter Melanomzellen im Blut von <i>Scid</i> und <i>E⁻/P⁻/Scid</i>	82
4.5	Korrelationen	84
4.5.1	Korrelation zwischen Primärtumorgewicht und pulmonaler Gesamtmetastasierung	84

4.5.1.1	<i>Scid</i>	84
4.5.1.2	<i>E⁻/P⁻/Scid</i>	85
4.5.2	Korrelation zwischen pulmonaler Gesamtmetastasierung und disseminierten Melanomzellen im Blut.....	87
4.5.2.1	<i>Scid</i>	87
4.5.2.2	<i>E⁻/P⁻/Scid</i>	88
5	Diskussion	90
5.1	Auswirkungen der Selektindefizienz in der <i>E⁻/P⁻/Scid</i> -Maus auf die Tumorbilogie im Vergleich zur <i>Scid</i> -Maus	91
5.2	Auswirkungen der Behandlung mit dem Mistelextrakt Iscador [®] M spez auf das Wachstums- und Metastasierungsverhalten des MV3- Melanoms in der <i>Scid</i> - und <i>E⁻/P⁻/Scid</i> -Maus	95
6	Zusammenfassung	110
7	Literaturverzeichnis	112
	Danksagung	127
	Curriculum Vitae	128

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Für Menschen mit einem malignen Melanom, das bereits Fernmetastasen gestreut hat, lässt sich durch eine adjuvante systemische Chemo- oder Immuntherapie bzw. hoch dosierte Interferontherapie nur ein geringer Vorteil an rezidivfreiem, aber kein Gewinn an Gesamtüberleben erreichen (Voigt, 2006). Dieses Faktum ist auch deshalb klinisch bedeutsam, weil die Inzidenz ansteigt. Während der Einfluss toxischer, medikamentöser oder endokriner Faktoren auf das Wachstumsverhalten des Melanoms kontrovers beurteilt wird, bleibt die Bedeutung immunologischer Faktoren in der Tumorprogression dieser Neoplasie unbestritten (Garbe *et al.*, 2005).

Die aus der komplementären Krebstherapie stammenden Mistelpräparate sind für ihre immunmodulatorische, direkt zytotoxische sowie antiproliferative und antimetastatische Wirksamkeit bekannt. Nach wie vor unzureichend geklärt sind jedoch das komplexe Zusammenwirken der mannigfaltigen Mistelbestandteile *in vivo* und die damit verbundene Frage nach der Wahl von Extrakt oder isoliertem ML-I-Präparat.

Neben der Suche nach der optimalen Dosierung von ML-I, um die stimulierenden Effekte der Mistel *in vivo* optimal zu nutzen, umfasste die Zielsetzung der Arbeit die Frage nach der funktionellen Beteiligung der dendritischen Zellen an der antiproliferativen Wirkung in zwei verschiedenen Mausstämmen. In diesem Sinne soll durch die vorliegende Arbeit die Effektivität des auf den ML-I-Gehalt festgelegten Mistelextrakts Iscador[®] M 5 mg spezial in den Dosierungen von 10, 30 und 150 ng ML-I/kg KG auf die humane Mistellektin-I-sensitive Melanomzelllinie MV3 in einem *Scid*- und *E⁻/P⁻/Scid*-Maus Xenograftmodell untersucht werden.

Die Untersuchung der Frage, ob durch die Hemmung der E- und P-Selektin-Expression in Endothelzellen die initialen Schritte im Metastasierungs-geschehen wie Adhäsion und Diapedese der Melanomzellen an bzw. durch die Endothelzellmonolayer verhindert werden, sollte die molekulare Grundlage zur Konzeption neuer therapeutischer Strategien zur Inhibition der Metastasierung des Melanoms bilden.

Folgende Fragen sollten im Speziellen geklärt werden:

- Welchen Einfluss hat das Fehlen endothelialer Adhäsionsmoleküle in der $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Maus auf das Wachstums- und Metastasierungsverhalten der humanen malignen Melanomzelllinie MV3 im Vergleich zur $Scid$ -Maus und wie wirkt sich die Kombination der Selektindefizienz mit Iscador[®] M spez auf das Melanom aus?
- Welchen Einfluss hat die E- und P-Selektindefizienz auf den Gehalt disseminierter Melanomzellen im Blut?
- Welchen Einfluss hat die E- und P-Selektindefizienz auf die Migration dendritischer Vorläuferzellen aus dem Blutstrom und damit auf den Gehalt dendritischer Zellen im Primärtumor?
- Welchen Einfluss haben die unterschiedlichen Dosierungen von Iscador[®] M spez bzw. Mistellektin-I auf das Wachstums- und Metastasierungsverhalten der humanen Melanomzelllinie MV3 in der $Scid$ -Maus im Vergleich zur $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Maus?
- Bewirkt der Mistelextrakt Iscador[®] M spez direkte zytotoxische Effekte auf disseminierte Melanomzellen im Blut der $Scid$ - bzw. der $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Maus?
- Bewirkt der Mistelextrakt Iscador[®] M spez eine Induktion der Proliferaion von dendritischen Zellen im Primärtumor der $Scid$ - bzw. der $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Maus?

2 Einleitung

2.1 Malignes Melanom

2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das maligne Melanom, als eine neuroektodermale Neoplasie des melanozytären Systems, kann überall dort entstehen, wo sich im Zuge der fetalen Emigration aus dem Gebiet der Neuralleiste Melanozyten ausgebildet haben. Die Haut ist hierbei präferenziell beteiligt, doch kommen Melanome ebenfalls im Bereich der Schleimhäute, der Meningen und im Auge vor (Voigt, 2008).

Die Häufigkeit der Diagnose „malignes Melanom der Haut“ ist in den letzten drei Jahrzehnten deutlich angestiegen. Seit den 1980er Jahren haben sich die Erkrankungsraten mehr als verdreifacht. Jährlich erkranken in Deutschland etwa 14.900 Menschen an einem malignen Melanom der Haut, darunter ca. 8.400 Frauen und ca. 6.500 Männer. Verglichen mit anderen Tumorarten sind die betroffenen Altersgruppen relativ jung, sodass relevante Erkrankungsraten des malignen Melanoms bereits ab dem 20. Lebensjahr zu beobachten sind. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer beim vergleichsweise frühen 63. Lebensjahr und bei Frauen um die 57 Jahre. Das mittlere Sterbealter liegt bei Männern um das 68., bei Frauen um das 72. Lebensjahr (Robert-Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister, 2008).

Besonders gefährdet sind Menschen mit hoher Zahl melanozytärer Nävi und solche, die hoher UV-Strahlung ausgesetzt sind. Dabei reicht eine moderate Sonnenexposition in unseren Breitengraden ohne Sonnenbrände schon aus, um melanozytäre Nävi zu induzieren (Wiecker *et al.*, 2003). Der Zusammenhang von Sonnenexposition und erhöhter Melanomentstehung bestätigt sich unter anderem bei hellen Pigmentierungstypen (Hauttypen I und II), Sonneneinstrahlung im großen Winkel (Äquatornähe) und der Induktion von Melanomvorläuferläsionen (erworbene melanozytäre Läsionen, aktinische Lentigines) (Garbe, 1997).

Familiäre Melanome werden in 8 bis 14 % aller Melanompatienten beobachtet, während das Risiko der Melanomerkrankung mit steigender Zahl atypischer melanozytärer Nävi und Melanomen in der Verwandtschaft zunimmt (Greene, 1999).

Kontrovers wird der Einfluss toxischer, medikamentöser oder endokriner Faktoren auf das Wachstumsverhalten des Melanoms, wie etwa durch Kontrazeptiva oder Gravidität beurteilt (Feskanich *et al.*, 1999). Unbestritten bleibt hingegen die Bedeutung immunologischer Faktoren in der Tumorprogression dieser Neoplasie, was durch Spontanremissionen oder aber besonders aggressive Verläufe bei Immunsupprimierten zum Ausdruck kommt (Garbe *et al.*, 2005).

2.1.2 Stadieneinteilung und Prognose

Die Prognose eines malignen Melanoms ist in erster Linie vom Lymphknotenbefall abhängig, der wiederum in Zusammenhang mit der vertikalen Tumordicke steht. Entscheidend ist somit der Zeitpunkt der Diagnosestellung. Die durch Früherkennung diagnostizierten malignen Melanome weisen die beste Prognose auf. So könnten etwa 85 % der diagnostizierten Melanome in einer nicht-invasiven Phase festgestellt werden; tatsächlich sind es aber nur 30 bis 45 % (Voigt, 2008).

Das rasche Einwandern von Melanomzellen in die dünnwandigen Lymphgefäße des oberen Koriums und die damit frühzeitig einsetzende Metastasierung erklärt sich dadurch, dass Melanozyten unabhängig von ihrer Dignität nicht im Zellverband wachsen und keine Interzellularbrücken bilden, was sie nach der Zellteilung direkt segregieren lässt (Herz, 2003). Dabei kann das maligne Melanom sowohl primär lymphogen als auch primär hämatogen metastasieren.

Die Metastasierung erfolgt in der Haut lokal, mit Satelliten-Metastasen um den Primärtumor oder auf dem Weg zu den regionalen Lymphknoten (*In-Transit*-Metastasen). Bei beiden letztgenannten Stadien beträgt die 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten ca. 30 bis 50 %. Ist es bereits zur Fernmetastasierung gekommen, ist die Prognose zumeist infaust. Die mediane Überlebenszeit bei Fernmetastasierung ohne Therapie beträgt nur etwa 6 bis 9 Monate, wobei je nach Organbefall eine erhebliche Variationsbreite vorliegt (Garbe *et al.*, 2005).

Die von der Metastasierung meist betroffenen Organsysteme sind neben der Haut mit abnehmender Häufigkeit die Lunge, Lymphknoten, Leber, Hirn, Knochen und Nebennieren. Die wichtigsten prognostischen Faktoren beim primären

malignen Melanom ohne Metastasen sind gemäß der deutschen Leitlinie der vertikale Tumordurchmesser nach *Breslow* am histologischen Präparat (mit steigender Tumordicke nimmt die Überlebensdauer schnell ab), das Vorhandensein einer histologisch erkennbaren Ulzeration (Höhergruppierung in das nächst höhere Stadium), der Invasionslevel nach Clark, der Nachweis von Mikrometastasierung in den regionalen Lymphknoten, das Geschlecht (signifikant schlechtere Prognose für Männer) und die Tumorlokalisierung (ungünstige Prognose für oberen Stamm, Oberarme, Hals und behaarten Kopf) (Garbe *et al.*, 2005).

Des Weiteren prognostisch maßgeblich ist im fortgeschrittenen Stadium der Anstieg der Laktatdehydrogenase (LDH) im Serum, die den erhöhten Zellzerfall des Malignoms anzeigt. Die Klassifikation des histologischen Materials und die genannten maßgeblichen Parameter, nach denen sich die Prognose abschätzen lässt, sind Tab. 2.1.2.1 und die daraus resultierende Stadieneinteilung Tab. 2.1.2.2 zu entnehmen.

TNM-Stadium	Tumordurchmesser nach <i>Breslow</i> [mm]/Zahl befallener Lk./Fernmetastasierung	Weitere prognostische Parameter/Ausmaß der Lymphknotenmetastasierung/LDH	5-JÜR [%]
pT1a	≤ 1,0 mm	ohne Ulzeration und <i>Clark Level</i> II/III	95
pT1b	≤ 1,0 mm	mit Ulzeration oder <i>Clark Level</i> IV/V	90
pT2	1,01–2,0 mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration	89–77
pT3	2,01–4,0 mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration	78–63
pT4	> 4,0 mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration	67–45
N1	1 Lk.	a: Mikrometastasen b: Makrometastasen	69–29
N2	2–3 Lk.	a: Mikrometastasen b: Makrometastasen c: <i>In-transit</i> -/Satelliten-Metastasen ohne Lk.	50–24
N3	≥ 4 Lk.	oder <i>In-transit</i> /Satellitenmetastasen plus Lymphknotenbeteiligung	26
M1a	Fernmetastasen in Haut, subkutanem Fettgewebe oder Lk.	LDH normal	19
M1b	Lungenmetastasen	LDH normal	7
M1c	alle anderen Organmetastasen oder jede Art von Fernmetastasierung	LDH erhöht	10

Tab. 2.1.2.1: TNM-Klassifikation des malignen Melanoms gemäß der deutschen Leitlinie von 02/2005 (Balch *et al.*, 2001a) mit der zugeordneten 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) nach Voigt (2008). Dargestellt ist die Klassifikation des Primärtumorbefundes (pT), des Lymphknotenbefundes (N) und der Fernmetastasen (M) sowie weiterer prognostischer Parameter. Die 5-JÜR nimmt mit zunehmender Tumordicke rapide ab (p = durch pathologische Begutachtung ermittelt, Lk. = Lymphknoten, LDH = Laktatdehydrogenase).

Stadium	Primärtumor (pT)	Regionäre Lymphknotenmetastasen (N)	Fernmetastasen (M)
0	in situ Tumoren	N0	M0
IA	≤ 1,0 mm, keine Ulzeration	N0	M0
IB	≤ 1,0 mm mit Ulzeration oder <i>Clark Level</i> IV/V	N0	M0
	1,01–2,0 mm, keine Ulzeration	N0	M0
IIA	1,01–2,0 mm mit Ulzeration	N0	M0
	2,01–4,0 mm, keine Ulzeration	N0	M0
IIB	2,01–4,0 mm mit Ulzeration	N0	M0
	> 4,0 mm, keine Ulzeration	N0	M0
IIC	> 4,0 mm mit Ulzeration	N0	M0
IIIA	jede Tumordicke, keine Ulzeration	Mikrometastasen	M0
IIIB	jede Tumordicke mit Ulzeration	Mikrometastasen	M0
	jede Tumordicke, keine Ulzeration	≤ 3 Makrometastasen	M0
	jede Tumordicke ± Ulzeration	keine aber Satelliten- und/oder <i>In-transit</i> -Metastasen	M0
IIIC	jede Tumordicke mit Ulzeration	≤ 3 Makrometastasen	M0
	jede Tumordicke ± Ulzeration	≥ 4 Makrometastasen oder kapselüberschreitender Lymphknotenbefall oder Satelliten und/oder <i>In-transit</i> -Metastasen mit Lymphknotenbefall	M0
IV			Fernmetastasen

Tab. 2.1.2.2: Stadieneinteilung des malignen Melanoms (Balch *et al.*, 2001a)

2.1.3 Therapie

Bei lokalisiertem Befund und Operabilität stellt die Tumorchirurgie das gegenwärtig effektivste Therapieverfahren dar. Das chirurgische Vorgehen, der Sicherheitsabstand und die Biopsie des *Sentinel*-Lymphknotens richten sich nach

den morphologischen, histopathologischen und immunhistochemischen Befunden. Liegt ein Befall des Sentinel-Lymphknotens vor, ist die Indikation zur radikalen Lymphknotendisektion gegeben (Voigt, 2008).

Die Indikation zu einer adjuvanten systemischen Chemo- oder Immuntherapie bzw. hoch dosierten Interferontherapie ist trotz zahlreicher Studien noch immer umstritten, da die Metaanalyse sich widersprechende Ergebnisse aufzeigte. Es war nur ein geringer Vorteil an rezidivfreiem, aber kein Gewinn an Gesamtüberleben nachzuweisen. Dies gilt für günstige Stadien (Tumordicke < 1,5 mm) wie auch für fortgeschrittenere Stadien (Tumordicke > 4 mm) und für Patienten mit Lymphknotenbefall im Stadium III. Bei Auftreten von Fernmetastasen sind die verfügbaren Therapieoptionen von überwiegend palliativem Charakter.

Zu den wirksamen Zytostatika gehören Dacarbazin und Fotemustin, BCNU, CCNU, Cis- und Carboplatin, Vindesin, Vinblastin, Ifosfamid und Hydroxyharnstoff. Dabei sprechen Metastasen in Haut, Lymphknoten, Weichteilen und Lunge generell besser an als viszerale. Einer niedrig dosierten Interferontherapie kann nach aktuellen Studienergebnissen ebenfalls keine Wirksamkeit nachgesagt werden. Daneben wird international sehr unterschiedlich darüber geurteilt, ob durch die Hochdosis-Interferon-Therapie bessere Ergebnisse erzielt werden können (Voigt, 2008). Die Strahlentherapie spielt in der primär-kurativen und adjuvanten Therapie heute keine Rolle mehr (Voigt, 2008).

Die palliative zytostatische Therapie bei inoperablen Fernmetastasen ist oft nur begrenzt wirksam und eine Polychemotherapie gegenüber einer Monotherapie mit Fotemustin oder Dacarbazin (mit Ansprechraten von lediglich 5 bis 20 %) nur bei aggressiven Therapieprotokollen mit kumulativ etwa 40 bis 60 % (zumeist kurzfristigen) Remissionen wirksamer. Die Remissionsdauer ist in der Regel auf wenige Wochen beschränkt und die Überlebenszeit nur bei Patienten mit kompletter Remission signifikant verlängert (Voigt, 2008).

Therapieprotokolle aus Kombinationen verschiedener Zytostatika und Zytokine (IL-2, IL-6, IL-10 sowie IFN- α -2a/2b) und auch Interleukin-basierte Protokolle in Kombination mit weiteren Biomodulatoren (z. B. Thalidomid) sind klinisch eher enttäuschend. Gleiches gilt für Vakzinationsverfahren, für die verlässliche Resultate noch ausstehen (Voigt, 2008). So lassen viele der bisherigen Studien zu allopathischen Therapieansätzen eine messbare Modulation der

immunologischen Antwort erkennen, doch schlägt sich diese derzeit nicht in fassbaren klinischen Resultaten nieder. Dieses Faktum und der kritische Anstieg der Inzidenz des malignen Melanoms heben die Notwendigkeit alternativer Therapieansätze hervor.

Die Anwendung von Mistelpräparaten stellt eine solche mögliche Alternative dar, zu der bereits Erfahrungen vorliegen. Mistelpräparate wirken ebenfalls über eine Stimulation des Immunsystems, aber zudem auch direkt zytotoxisch, antiproliferativ, antimetastatisch und antiangiogenetisch, was *in vitro* und *in vivo* vielfach gezeigt werden konnte (Elluru *et al.*, 2008; Thies *et al.*, 2008, 2007a, 2005; Büssing *et al.*, 2004, 2000, 1999, 1998, 1997, 1996; Valentiner *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2001; Schumacher *et al.*, 2000, 1996, 1995; Heiny *et al.*, 1998, 1994; Hajto *et al.*, 1997, 1990, 1989; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1997, 1986; Beuth *et al.*, 1995, 1993, 1992; Janssen *et al.*, 1993). Auch zahlreichen kontrollierten klinischen Studien ist die Wirksamkeit der Mistel bei Krebs zu entnehmen (Kienle & Kiene, 2007). Dabei wird insbesondere die immunmodulatorische Wirkung der Mistel auf das spezifische und unspezifische Immunsystem als klinisch relevant für die Therapie von Tumorpatienten angesehen (Blaschek *et al.*, 2004; Kienle & Kiene 2003a; Heiny & Beuth, 1994; Gabius & Gabius, 1991; Hajto *et al.*, 1990, 1989).

2.2 Von der Mistel zum Extrakt Iscador® M 5 mg spezial

Extrakte aus der Mistel werden seit Hippokrates als Naturheilmittel verwendet. Auch keltische Druiden verehrten die Mistel als die „alles Heilende“ und im Mittelalter wurde sie gegen Leberleiden und später zur Blutdrucksenkung eingesetzt (Franz, 1985). Subkutane, nichttoxische Injektionen von Mistelextrakten zur Behandlung von Tumorerkrankungen wurden erstmalig in den Zwanzigerjahren des 20. Jahrhunderts von dem Natur- und Geisteswissenschaftler Rudolf Steiner (1861–1925) empfohlen und von der Ärztin Ita Wegmann (1876–1943) angewandt. Das formulierte Ziel Rudolf Steiners, die Mistel möge durch entsprechende Verarbeitungsprozesse derart wirkungsvoll sein, das sie das Chirurgenmesser zu ersetzen vermag (Steiner, 1920), ist noch nicht erreicht. Dieser besondere Verarbeitungsprozess ist bis heute Forschungsgegenstand vieler Arzneimittelhersteller.

Zur Krebstherapie wird die in Europa am weitesten verbreitete weißbeerige Mistel (*Viscum album* L.) eingesetzt, die in drei Unterarten als Laubholzmistel, als Kiefernmistel und als Tannenmistel vorkommt. Zur Herstellung des Extraktes Iscador[®] M 5 mg spezial werden Mistelpflanzen (*Viscum album* L. ssp. *album*) von Apfelbäumen kurz vor Johanni bzw. Weihnachten geerntet, da die Mistel im Sommer einen hohen Gehalt an Viscotoxinen hat und im Winter einen sehr viel höheren Mistellektingehalt. Der Frühjahrs- und der Herbstsaft werden dann in einem maschinellen Verfahren zu einem Extrakt verarbeitet (Baumgartner *et al.*, 2005). Der Gehalt des Extraktes an Lektinen und Viscotoxinen sowie jeweils der einzelnen Fraktionen, ist nicht nur abhängig vom Erntezeitpunkt, sondern auch vom Wirtsbaum (Schaller *et al.*, 1996b; Scheffler *et al.*, 1996).

Pharmakologisch wirksame Inhaltsstoffe der Mistel sind außer den Mistellektinen ML-I, ML-II und ML-III, die Viscotoxine, Flavonoide, Phenylpropane, Lignane, Alkaloide, Polysaccharide sowie weitere Proteine (Pfüller, 2000).

2.2.1 Mistellektine

Die Lektine stellen heute die bekannteste und meistuntersuchte Stoffklasse der Mistel dar. So sind mittlerweile viele Präparate auf den ML-I-Gehalt festgelegt, wie auch das in dieser Arbeit angewandte Mistelpräparat Iscador[®] M 5 mg spez.

Die drei identifizierten Isolektine der Mistel (ML-I, ML-II und ML-III) sind toxische Glykoproteine, die jeweils aus einer A („active“)- und einer B („binding“)-Kette bestehen, die wiederum über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Abb. 2.2.1). Unterschieden werden die Lektine über ihre Eigenschaft, mit der B-Kette bestimmte Zucker zu erkennen und zu binden sowie über das Molekulargewicht (Franz *et al.*, 1981; Eifler *et al.*, 1993). ML-I stellt das Sialinsäure- und D-Galaktose-spezifische Lektin dar, ML-III bindet an N-Acetyl-D-Galaktosamin und ML-II kann an beide Zuckerarten binden (Müthing *et al.*, 2004; Krauspenhaar *et al.*, 1999; Schumacher *et al.*, 1996, 1995a, 1995b; Franz *et al.*, 1991, 1981; Ziska & Franz, 1981). Darüber hinaus kommt in *Viscum album* noch ein Chitin-bindendes Mistellektin vor (Stoeva *et al.*, 2001).

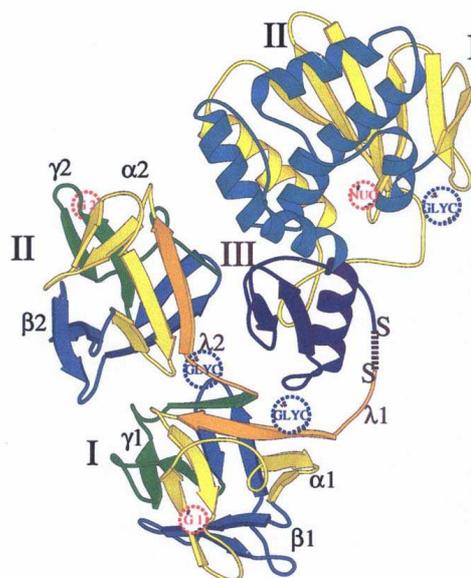


Abb. 2.2.1.1: Räumliche Darstellung der A- und B-Kette von Mistellektin-I: Die drei Domänen der A-Kette (I, II, und III) sind gelb, blau und violett dargestellt. Die homologen Subdomänen der zwei Domänen (I und II) der B-Kette ($\alpha_{1,2}$, $\beta_{1,2}$ und $\gamma_{1,2}$) sind gelb, blau und grün. 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 Nukleotidbindungsstelle der A-Kette (NUC) bzw. den niedrig- und hochaffinen Galaktosebindungsstellen der B-Kette (G1 und G2). Die Glykosilierungsstellen (GLYC) sind als blaue unterbrochene Kreise dargestellt. Spirale: α -Helix, Pfeil: β -Faltblatt (nach Krauspenhaar *et al.*, 1999).

2.2.1.1 Zytotoxizität

Die Wirkungen von ML-I können in direkt zytotoxische und indirekt immunmodulatorische unterschieden werden. Die zytotoxische Wirkung der A-Kette erfolgt nach stattgehabter Internalisierung des Lektinmoleküls in die Zielzelle, welche die B-Kette ermöglicht. In der Zielzelle geschieht zunächst die Reduktion der die A- und B-Kette verbindenden Disulfidbrücke und damit die Dissoziation der beiden Untereinheiten. Die freie A-Kette des ML-I ist durch eine RNA-Glykosidase-Aktivität in der Lage, in die 28 S rRNA eukaryontischer Ribosomen eine Apurinstelle einzuführen und damit die Proteinsynthese der großen Ribosomenuntereinheit irreversibel zu inhibieren, was zum Tod der Zelle führt (Büssing *et al.*, 1996c; Witthohn *et al.*, 1996; Barbieri *et al.*, 1993; Janssen *et al.*, 1993; Franz, 1991; Endo *et al.*, 1988; Franz *et al.*, 1982; Stirpe *et al.*, 1982).

Aufgrund dieser zytotoxischen, die Proteinbiosynthese inaktivierenden Fähigkeit, gehört ML-I zur Familie der Typ II Ribosomen-inaktivierenden Proteine

(Typ II RIPs) (Stirpe *et al.*, 1992). Diese Fähigkeit, Apoptose zu induzieren, besitzt nur das Hololektin und nicht die isolierte A- oder B-Kette (Vervecken *et al.*, 2000).

Auf das maligne Melanom bezogen, konnte dieser antiproliferative Effekt von ML-I durch eine Induktion der Apoptose *in vitro* und *in vivo* bestätigt werden. Im Kontrollexperiment zu dieser Arbeit erhobene Zellproliferationsanalysen zeigten eine signifikante Reduktion lebensfähiger Melanomzellen durch hoch aufgereinigtes ML-I und in gleicher Weise durch äquivalente Dosierungen von Iscador® M spez ab jeweils einer Dosierung von > 0,001 ng/ml (Thies, unveröffentlichte Daten).

Da hoch metastatische Melanomzellen mehr ML-I-Bindungsstellen (Galaktose) exprimieren, 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.*, 2001a, 2001b). So erweist sich in der Gegenüberstellung sechs verschiedener humaner Melanomzelllinien *in vitro* die stark metastasierende Melanomzelllinie MV3, die auch in dieser Arbeit eingesetzt wurde, als besonders sensibel gegenüber ML-I und zeigt bereits bei einer Konzentration von 1×10^{-13} ng/ml ML-I eine signifikante Wachstumshemmung, welche *in vivo* in einem MV3-Xenograftmodell annähernd reproduzierbar ist (Thies *et al.*, 2008, 2007a, 2005).

2.2.1.2 Immunmodulation

Die mannigfaltige Immunmodulation ist Resultat verschiedener Wirkmechanismen der Bestandteile von *Viscum album* L. So scheint die zuckerbindende B-Kette von ML-I dosisabhängig zu einer Sekretion von Zytokinen wie Interleukin-1, Interleukin-6, Interferon γ , Tumornekrosefaktor α und Granulozyten-Monozyten-Kolonie-Stimulierendem-Faktor zu führen (Hajto *et al.*, 1997, 1990). Auf die Wirkungen der isolierten B-Kette und des isolierten ML-I *in vivo* in nicht-toxischen Dosierungen (0,25 bis 1,0 ng/kg KG) ist auch die signifikante Aktivitätssteigerung natürlicher Killerzellen zurückzuführen ebenso wie die signifikant gesteigerte Phagozytoseaktivität von Granulozyten und die intensivierete Freisetzung von Lymphozyten ins Blut (Hajto *et al.*, 1989; Franz, 1986). Diese Beobachtungsergebnisse sind in der klinisch

relevanten Situation bei Krebspatienten nach Iscador[®]-Injektion (s. c. und i. v.) reproduzierbar (Hajto *et al.*, 1989).

Unter dem Einfluss von ML-I sind zudem ein signifikanter Anstieg der Thymozytenzahl sowie eine beträchtliche numerische Steigerung der im Thymus gereiften lymphatischen Untergruppen nachweisbar (Beuth *et al.*, 1993).

Krebspatienten weisen unter der Therapie mit ML-I-standardisiertem Extrakt (1 ng/kg KG, 2 d/Woche) trotz stattgehabter Chemotherapie stabilisierte (bzw. moderat erhöhte) periphere Blutlymphozyten-Zahlen auf und leiden dadurch weniger an immunologisch bedingten Nebenwirkungen der Zytostatikatherapie (Büssing, 1998; Heiny & Beuth, 1994).

In der zugrunde liegenden Arbeit soll das Augenmerk insbesondere auf die in der immundefizienten *Scid*-Maus noch vorhandenen dendritischen Zellen gerichtet werden, die zu den akzessorischen Zellen des unspezifischen Immunsystems zählen. Ihre gesteigerte Aktivität kann unter dem Einfluss von Iscador[®] Qu spez (Elluru *et al.*, 2008) sowie anderen Mistelextrakten (Stein *et al.*, 2002a, 2002b) nachgewiesen werden. Ein hoch signifikanter Anstieg der Zahl dendritischer Zellen in Primärtumoren *in vivo* zeigte sich unter der Therapie mit hoch aufgereinigtem ML-I (30 ng/kg KG) in einem der vorliegenden Arbeit vorausgegangenen Xenograft-Melanommodell (Thies *et al.*, 2008).

Nicht zuletzt ist der Einfluss auf neuroendokrine Parameter zu nennen, der sich in der signifikanten Konzentrationserhöhung des Beta-Endorphinspiegels im Blut nach Gabe von ML-I-standardisiertem Extrakt (1 ng/kg KG, 2 d/Woche) zeigt, welcher mit einer verbesserten Lebensqualität von Krebspatienten positiv korreliert (Heiny *et al.*, 1998; Heiny & Beuth, 1994).

2.2.2 Viscotoxine

Viscotoxine in *Viscum album* L. sind niedermolekulare, amphiphile Polypeptide aus der Gruppe der Thionine mit drei oder vier Disulfidbrücken (Orrù *et al.*, 1997; Florack & Stiekema, 1994; Franz *et al.*, 1983) und einem Viscotoxingehalt von 0.05 bis 0.1 % (Teuscher, 1994). Sie sind von ausgesprochen hitze- und spaltungsresistentem Charakter und weisen einen hohen Anteil der Aminosäure Cystin auf (Stec, 2006;

Fintelmann, 2002). Dreißigminütiges Erhitzen auf 100 °C hat keinen Einfluss auf ihre Toxizität, wofür wohl die Disulfidbrücken verantwortlich sind (Samuelsson, 1974a). Ferner haben Viscotoxine durch ihre positive Ladung einen stark basischen Charakter, der sie zur Komplexbildung mit Nukleinsäuren und damit zur Bindung an die DNA-Doppelhelix befähigt, was letztere gegen Hitzedenaturierung schützen kann und möglicherweise eine Rolle bei der genetischen Regulierung spielt (Winkler *et al.*, 2008; Woynarowsky & Konopa, 1980).

2.2.2.1 Zytotoxizität

Ihre Zytotoxizität entfalten Viscotoxine – anders als Lektine – über eine rasche Permeabilisierung und Lyse der Zellmembran sowie über die Generierung reaktiver Sauerstoffmetabolite, was letztendlich die Zellnekrose induziert (Büssing, 2000; Büssing *et al.*, 1999a; Carrasco *et al.*, 1981; Franz, 1986; Lankisch & Vogt, 1971; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1986). Im Unterschied zu den Lektinen können Viscotoxine die Proteinsynthese in zellfreien Systemen nicht hemmen (Franz *et al.*, 1983); inwieweit sie auch Signale zur Apoptose-Induktion anregen können, ist nicht vollständig geklärt (Büssing, 1996b; Büssing *et al.*, 1999b; Stein *et al.*, 2000; Stein *et al.*, 1999a).

2.2.2.2 Immunmodulation

Viscotoxine erweisen sich zudem als potente Immunmodulatoren, was möglicherweise über eine Hemmung der Suppressorzell-Aktivität geschieht (Wagner *et al.*, 1987). Die *In-vitro*-Kultivierung mit Viscotoxinen (25 bzw. 250 µg/ml) erhöht die phagozytotische Aktivität und den oxidativen Burst (Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies bei der Phagozytose) von Granulozyten signifikant. Dabei ist die Phagozytose für sich, wie auch ihre Aktivierung durch die Viscotoxine von Kalzium abhängig (Stein *et al.*, 1999a; Stein *et al.*, 1999b). Nach Tabiasco *et al.* (2002) führen niedrige Dosen isolierter Viscotoxine zu einer erheblichen Steigerung der Zytotoxizität von NK-Zellen auf Tumorzellen (K562, NK-92, NKL, Daudi, CIR).

Stein und Kollegen (1998) erforschten ebenfalls die Fähigkeit der Viscotoxine in mononukleären Zellen Zytokine freizusetzen, wie beispielsweise IL-6. In anderen Untersuchungen zeigte sich, dass viscotoxinhaltige Extrakte aus *Viscum album* L. nach einmaliger intravenöser Applikation den Operations-assoziierten signifikanten Abfall der Granulozytenfunktion verhindern, ohne dass die Zahl der Granulozyten selber beeinträchtigt wird (Büssing *et al.*, 2004).

Insgesamt weisen demnach auch die Viscotoxine mindestens drei onkologisch interessante Eigenschaften auf: (1) Sie sind zytotoxisch, v. a. über eine Lyse der Zellmembran, eventuell auch über die Induktion der Apoptose. (2) Sie aktivieren und steigern die körpereigene Immunabwehr und (3) sie haben eine Schutzfunktion für die DNA und können diese möglicherweise auch genetisch regulieren.

2.2.3 Andere Inhaltsstoffe von *Viscum album* L.

Triterpenextrakte von *Viscum album* L., die reich an Oleanolsäuren sind, induzieren Apoptose und nekrotischen Zelltod von B16.F10 Mausmelanomzellen *in vitro* (Strüh *et al.*, 2009). Eine direkte Wirkung auf Tumorzellen wird außerdem Kuttan'schen Peptiden und Flavonoiden zugeschrieben (Schierholz & Schlodder, 2003). Speziell die immunstimulierende Wirkung ist neben den Mistellektinen und Viscotoxinen auch für Polysaccharide, Oligosaccharide, Kuttan'sche Peptide, Flavonoide und Vesikel bewiesen (Kienle & Kiene, 2003a; Schierholz & Schlodder, 2003). Weitere pharmakologisch wirksame Inhaltsstoffe der Mistel sind außer den bereits genannten die Phenylpropane, Lignane, Alkaloide, Rhamnogalacturonane, biogene Amine, Cholinderivate, Phenylpropanderivate, Phenolcarbonsäuren, Phytosterole, freie Aminosäuren, extreme Anreicherungen von DNA und RNA sowie weitere Proteine (Pfüller, 2000a).

2.3 Das *Scid*- und *E⁻/P⁻/Scid*-Maus-Xenograft-Melanommodell

Auch unter der Behandlung mit Mistelextrakten, die auf den ML-I-Gehalt festgelegt sind, resultieren unterschiedliche Therapieerfolge. Diese Variabilität der Ergebnisse könnte im Herstellungsverfahren und in der Anwesenheit der anderen Inhaltsstoffe von *Viscum album* L. begründet sein, die ebenfalls immunmodulatorisch und teilweise zytotoxisch wirken und miteinander multimolekulare Wirkkomplexe bilden, die auf die biologische Gesamtwirkung Einfluss nehmen (Pfüller *et al.*, 2009; Edlund *et al.*, 2000; Heiny & Beuth, 1994).

So war es ein Aspekt der vorliegenden Arbeit, die komplexe Vielfalt der Wirkmechanismen des Mistelextraktes Iscador[®] M 5 mg speziell mit festgelegtem ML-I-Gehalt in den Dosierungen von 10, 30 und 150 ng ML-I/kg KG auf das Wachstums- und Metastasierungsverhalten der Melanomzelllinie MV3 *in vivo* zu untersuchen und die immunmodulatorischen Effekte weiter aufzuklären.

Zu diesen Untersuchungen eignet sich das gewählte *Scid*- und *E⁻/P⁻/Scid*-Maus-Modell insofern, da die *Scid*-Maus nur die Funktionen des unspezifischen Immunsystems besitzt und in der *E⁻/P⁻/Scid*-Maus darüber hinaus Letzteres funktionell kontrolliert wird.

2.3.1 Die *Scid*-Maus

Die *Scid*-Maus des Typs BALB/c *scid/scid* hat eine Mutation auf dem Chromosom 16, die zu einem Fehlen von T- und B-Zellen führt. Durch diese starke Einschränkung des spezifischen Immunsystems ist sie ein bewährtes Modell, um das unspezifische Immunsystem in seinen Funktionen zu untersuchen (Bosma *et al.*, 1991, Hilbert *et al.*, 1991). Durch diese Immundefizienz erweisen sich *Scid*-Mäuse als besonders geeignet für die Transplantation maligner Zellen, da sie zu keiner Abstoßungsreaktion neigen.

Eine variable Anzahl junger adulter Mäuse (2 bis 20 %) entwickelt jedoch, wenn auch verringert, einen nachweislichen Anteil von reifen B- und T-Zellen, die ein begrenztes Repertoire an Antigen-Rezeptorgen exprimieren können. Dieses Phänomen wird als „*leakiness*“ beschrieben (Bosma, 1992). *Scid*-Mäuse, die „*leaky*“ sind, werden durch die Bestimmung des IgG-Serumspiegels identifiziert (Habu *et al.*,

1987). *Scid*-Mäuse, die nicht „leaky“ sind, haben kaum zirkulierende Lymphozyten und wenig oder keine Serumimmunglobuline (üblicherweise unter 0,02 mg/ml). Die Zahl der Erythrozyten und Neutrophilen liegt im Normbereich. Lymphknoten und Thymus haben ungefähr ein Zehntel oder weniger der normalen Größe. Die häufig verkleinerte Milz ist ein charakteristisches Zeichen der „non-leaky“-*Scid*-Maus (Custer *et al.*, 1985; Dagnæs-Hansen *et al.*, 1991). Des Weiteren fehlen der *Scid*-Maus dendritische Thy-1⁺ Zellen epidermaler Herkunft (Nixon-Fulton *et al.*, 1987).

2.3.2 Die *E⁻/P⁻/Scid*-Maus

Die *E⁻/P⁻/Scid*-Maus hat zusätzlich zur Immundefizienz der *Scid*-Maus einen genetischen Defekt für E- und P-Selektine (<http://jaxmice.jax.org/strain/002916.html>). Durch das Fehlen dieser endothelialen Zelladhäsionsmoleküle kommt es zusätzlich zur Einschränkung des spezifischen Immunsystems zur Dysfunktion der Zellen des unspezifischen Immunsystems. Funktionell ist das unspezifische Immunsystem mit u. a. den dendritischen Zellen zwar vorhanden, letztere werden durch die Mutation jedoch in ihrer Einwanderung aus dem Blutstrom ins Gewebe behindert.

Dendritische Zellen gehören zu den akzessorischen Zellen des Immunsystems und sind aus dem Knochenmark stammende Leukozyten mit feinen Verzweigungen ihres Zelleibes, die darin spezialisiert sind, Antigene (z. B. Tumorzellen) zu erkennen, einzufangen, zu prozessieren und gegenüber T-Lymphozyten zu präsentieren. Sie sind für die Einleitung und Modulation der Antigen-spezifischen Immunantwort essenziell (Banchereau & Steinman, 1998). Sowohl Vorläuferzellen als auch reifere dendritische Zellen sind im Blut in kleiner Zahl vorhanden. Sie besiedeln lymphatische wie nicht-lymphatische Gewebe (Martín-Fontecha *et al.*, 2009) und sind primär in Epithelien zu finden, wie z. B. als Langerhans-Zellen in der Epidermis (Steinmann, 1991). Durch Aktivierung verändern sie sich in ihrer Gestalt, die es ihnen dann erlaubt, z. B. in T-Zell-Gebiete regionaler Lymphknoten zu migrieren (Cella *et al.*, 1997). Dendritische Zellen, die im entzündeten Gewebe wie auch im Tumorgewebe zu finden sind, stammen von unreifen Vorläuferzellen aus dem Blutstrom ab, die durch aktive Rekrutierung ins Gewebe einwandern und erst dort zu dendritische Zellen ausreifen (Pendl *et al.*, 2002). Bei der Diapedese der Endothelzellmonolayer benutzen sowohl die unreifen

dendritischen Vorläuferzellen, als auch andere Leukozyten, die endothelialen E- und P-Selektine zur Adhäsion (Pendl *et al.*, 2002). Da diese beiden Selektine der *E⁻/P⁻/Scid*-Maus fehlen, kann der Prozess der Migration selektiv untersucht werden. Unter der Annahme, die Vorläuferzellen könnten ohne Adhäsionsmoleküle die Blutbahn nicht verlassen und nicht in den Tumor einwandern, kann der Einfluss dendritischer Zellen auf das Tumorwachstum in der *E⁻/P⁻/Scid*-Maus im Vergleich zur *Scid*-Maus untersucht werden.

Die endothelialen Zelladhäsionsmoleküle werden nicht nur von dendritischen Zellen und Leukozyten für die Diapedese durch das vaskuläre Endothel gebraucht. Auch Tumorzellen bedienen sich desselben Mechanismus um die Blutbahn auf „physiologischem Wege“ zu verlassen und den initialen Schritt der Fernmetastasierung einzuleiten (Hebbar *et al.*, 2009; Brodt *et al.*, 1997; Mannori *et al.*, 1997; Biancone *et al.*, 1996; Dejana *et al.*, 1992) Deshalb war es eine weitere Frage der im Folgenden beschriebenen Studien, ob durch eine gezielte genetische Ausschaltung der E- und P-Selektin-Expression in Endothelzellen der *E⁻/P⁻/Scid*-Maus die initialen Schritte im Metastasierungs geschehen wie Adhäsion und Diapedese des u. a. hämatogen metastasierenden malignen Melanoms verhindert werden könnten.

2.4 Die Selektine

Ende der 1980er Jahre wurde die Stoffklasse der Selektine entdeckt und beschrieben (Krause & Turner, 1999; Bevilacqua *et al.*, 1989; Johnston *et al.*, 1989; Tedder *et al.*, 1989). Die Forschungsarbeiten legten nahe, dass Selektine die Adhäsion zwischen Leukozyten und den blutgefäßauskleidenden Endothelzellen sowie den Kontakt von Leukozyten und Thrombozyten vermitteln (Bienvenu & Granger, 1993; Mayrovitz *et al.*, 1992). Mittlerweile werden Selektine als Moleküle betrachtet, die den initialen Schritt der Immunantwort bei inflammatorischen Reaktionen steuern (McEver, 1997; Lasky, 1995; Tedder *et al.*, 1995; Harlan *et al.*, 1992; Springer, 1990).

Ferner ist die Kaskade der hämatogenen Metastasierung, von der Adhäsion der Selektinliganden-präsentierenden Tumorzelle an vaskuläres Endothel

bis hin zu deren Invasion in umliegendes Gewebe, von Selektinen abhängig – speziell von E-Selektin (Krause & Turner, 1999; Bevilacqua & Nelson, 1993). Grundsätzlich binden Selektine an sialylierte, glykosylierte, sulfatierte und/oder fukosylierte Tetrasaccharid-Glykane von Glykoproteinen, Glykolipiden oder Proteoglykanen (McEver, 1997; Rosen & Bertozzi, 1994; Needham & Schnaar, 1993).

Die Selektin-Familie wird aus drei strukturell verwandten Mitgliedern gebildet, die entsprechend ihrem Vorkommen als P(*platelet*, dt.: Blutplättchen)-, L(*leukocyte*, dt.: Leukozyten)- und E(*endothelial*, dt.: endotheliales)-Selektin bezeichnet werden (Lasky, 1995).

P-Selektin, vesikulär in Endothelzellen und in den α -Granula der Thrombozyten gespeichert, ist relevant für die endotheliale Anheftung von Leukozyten und dendritischen Vorläuferzellen wie auch im Kontakt zwischen Leukozyten und Thrombozyten (Pendl *et al.*, 2002; Bienvenu *et al.*, 1993; Mayrovitz *et al.*, 1992). Dabei vermittelt es die als „Rollen“ bezeichnete schwache Adhäsion von Monozyten und Granulozyten auf dem Endothel, wodurch die Extravasation dieser weißen Blutzellen in inflammatorische Bereiche initiiert wird (Mayrovitz *et al.*, 1992). Darüber hinaus ist P-Selektin für die Anheftung von Thrombozyten an Phagozyten verantwortlich und spielt somit auch bei der Blutgerinnung eine wichtige Rolle (Iwamura *et al.*, 1997; Pottratz *et al.*, 1996).

L-Selektin ist das Lektin der meisten Leukozyten, wie etwa Granulozyten, Monozyten und der meisten T- und B-Zellen (Bird *et al.*, 1997). Nach seiner Bindung an Liganden wird es zügig abgespalten und ins Blut freigesetzt, was als „*shedding*“ bezeichnet wird (Kishimoto *et al.*, 1995). Durch L-Selektin wird das Lymphozyten-*Homing* in periphere Lymphknoten und die Adhäsion von Neutrophilen an Endothelzellen in entzündetem Gewebe vermittelt (Van Zante & Rosen, 2003; Luscinskas *et al.*, 1996). Für L-Selektin gibt es mittlerweile Hinweise darauf, dass es auch am Metastasierungsgeschehen beteiligt ist (Resto *et al.*, 2008).

E-Selektin, früher auch als ELAM-1 bezeichnet, wird von Gefäßendothelzellen exprimiert, nachdem diese durch inflammatorische Zytokine wie z. B. TNF α , IL-1 oder IL-10, durch Neuropeptide wie die Substanz P oder durch bakterielle Endotoxine angeregt wurden (Iwamura *et al.*, 1997; Vora *et al.*, 1996; Walz *et al.*, 1990; Bevilacqua *et al.*, 1989, 1987). E-Selektin vermittelt reversibel das „Rollen“ von

Neutrophilen, Monozyten und T-Zellen, was zur Extravasation dieser Leukozyten in inflammatorische Gebiete führt.

Darüber hinaus adhäreren unreife dendritische Vorläuferzellen sowohl an P-, als auch an E-Selektin, wenn sie aus dem Blutstrom in entzündete Bereiche rekrutiert werden (Pendl *et al.*, 2002). E-Selektin vermittelt außer dieser umfassenden Leukozytenadhäsion bei Entzündungen auch die Bindung von Tumorzellen an vaskuläres Endothel und leitet damit die Kaskade der Fernmetastasierung ein (Brodt *et al.*, 1997; Mannori *et al.*, 1997; Biancone *et al.*, 1996; Dejana *et al.*, 1992).

2.5 Die Metastasierungskaskade

Metastasierung kann als ein sekundäres Wachstum und eine sekundäre Ausbreitung eines malignen Tumors an einen Ort, der nicht seinem Ursprungsort entspricht, bezeichnet werden (Hakomori, 1996). Für sämtliche Schritte der malignen Progression und der Metastasierung sind Zelladhäsionsmoleküle unabdingbar (Brodt, 1991). Unter physiologischen Bedingungen kommt es zu keinem Anheften von Zellen an die Endothelzelloberfläche (Schwarzacher, 2002).

Im malignen Geschehen kommt es zu Verlust und Fehlsteuerung der Zelladhäsionsmoleküle, was die Schädigung einer geordneten Gewebsstruktur nach sich zieht. Tumorzellen lösen sich dann aus dem Gewebsverband und dringen zunächst in die Lymphabflusswege ein, was beim malignen Melanom aufgrund fehlender Interzellularbrücken besonders rasch geschieht (Herz, 2003).

Über die weitere Infiltration von Blutgefäßen können die malignen Zellen in die Blutbahn gelangen. Dort vermitteln Selektine die Interaktion mit der Gefäßwand, bis die Tumorzellen das Endothel und die endotheliale Basalmembran durchdrungen haben (Schadendorf *et al.*, 1995; Spertini *et al.*, 1992). In diesem Stadium der Diapedese adhäreren Tumorzellen, ähnlich wie Leukozyten im Rahmen der Immunantwort, über so schwache Interaktionen am Endothel, dass sie vom vorbeiströmenden Blut mitgerissen werden können.

Sogleich kommt es aber zur erneuten Adhäsion und der beschriebene Vorgang wiederholt sich mehrfach, was unter dem Mikroskop betrachtet als

Entlangrollen am Endothel wahrgenommen werden kann (Folkman, 1996; Herlyn & Malkowicz, 1991). Der Ort dieser Adhäsionskaskade ist vornehmlich die postkapillare Venole (Ley & Gaethgens, 1991). Hat die Extravasation der Tumorzellen stattgefunden, migrieren sie in das subendotheliale, bindegewebige Stroma und im weiteren Verlauf in das Parenchym des betreffenden Organs. Die Bildung einer Tochtergeschwulst hat begonnen (Wagener, 1999).

Es wird heute angenommen, dass Tumorzellen direkt oder indirekt die Expression von Selektinen und anderen Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und Blutplättchen stimulieren. Mit dieser Bindungsmöglichkeit schaffen sie sich die Grundvoraussetzung für Metastasierung selbst (Hakomori, 1994).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Autoklav	memmert
Brutschrank, TDO 60 Tissue Drying Oven	medite
<i>CASY Cell Counter + Analyser System Model TT</i>	Schärfe System GmbH
Einbettungsautomat LEICA EG 1160	Leica
Färbeautomat Varistain	Shandon
Finnpipetten, 0,5–10 µl	Labsystems
Finnpipetten, 40–200 µl	Labsystems
Finnpipetten, 200–1000 µl	Labsystems
SterilGard	Baker Company
Heizblock HBT 130	Firma HLC
Hera Cell Zellkulturkühlschrank	Heraeus
Hera Safe Sicherheitswerkbank (S2/L2)	Heraeus Instruments
LightCycler System 2.0	Roche Diagnostics
Mikroskop Axioplan 35mm 2,5x	Zeiss
Mikrotom	Mircrom, Techno Med GmbH
Objektiv PI 10x/25 (444034) mit Zählgitter	Zeiss
pH-Meter MP 220	Mettler-Toledo GmbH
Photomikroskop Axiophot 2 mit Axio Cam MRc5	Zeiss
Pipettus Akku	Hirschmann Laborgeräte
Trockenschrank	Melag
Vortex-Mischgerät, Minishaker MS 1	IKA Work Inc.
Waage Mettler PE 2000	Mettler-Toledo
Waage	Kern ALS120-4

Wärmeplatte	Medax, Kiel
Zellzähler, Assistent Counter AC-15	Karl Hecht, Sondheim
Zentrifuge Universal 32R	Hettich

3.1.2 Software

Axio Vision 4.6	Zeiss
Graph Pad Prism 4	Graph Pad Software Inc.
MS Excel	Microsoft
MS Word	Microsoft
Windows XP, Home Edition, Version 2002	Microsoft

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Casy cup	Schärfe System GmbH
Deckgläser	Marienfeld
Injektionskanülen 0,9x40 mm und 0,45x13 mm	BD Microlance
Eppendorfröhrchen 1,5 ml (0,5 ml)	Sarstedt
Gefrierampullen, 1,8 ml NUNC cryo tube vials	NUNC
Glaspipetten 5, 10 und 20 ml	Brand
Glasspritzen 1 ml	Fortuna Optima
Kapillarblutentnahmeröhrchen (EDTA)	Kabe Labortechnik
LightCycler Kapillaren	Roche
Objektträger Histobond	Marienfeld
Pipettenspitzen 0,1–10, 1–20, 100, 200 und 1000 µl	Eppendorf
Polystyrolröhrchen 30 ml	Greiner Bio-One

Polystyrolröhrchen 50 ml	Sarstedt
Polystyrolröhrchen 7ml	Sterilin Barloworld
Spritze 1 ml Volumen	BD Plastipak
T75 Zellkulturflaschen	Sarstedt

3.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Agar Noble 4 %	Difco Laboratories
Aqua destillata	Baxter S.A., Lessines
BSA-I, Lectin, Biotin labeled	Sigma
Einfriermedium cryo-safe I	c-c-pro
Calciumchlorid	Merck
Clarion/Crystal Mount	Biomeda
D PBS-CaCl ₂ , MgCl ₂	DulbeccosPhosphat Buffer Saline, Gibco
Ethanol pro analysi	Merck
Ethanol	Th. Geyer Hamburg GmbH & Co
Eukitt	Kindler GmbH & Co
Fetales Kälberserum FCS	Gibco
HCl 2N	Merck
Ketamin 100mg/ml	Fa. Graub
Levamisole	Sigma
L-Glutamin	Gibco
Magnesiumchlorid	Merck
Mayers Hämalaun	Merck
Mevalonsäure	Sigma

N,N-Dimethylformamid 99 %	Sigma
Naphthol AS-Bisphosphate disodium salt	Sigma
Natriumchlorid, Pulver	M Ballinckrodt Baker
Natriumnitrit	Sigma
Neufuchsin	Sigma-Aldrich
Paraffin Paraplast Plus	Tyco Kendall
Penicillin und Streptomycin	Gibco
Permanent Mounting Media	Biomeda
Rompun 2 %	Bayer Vital GmbH
RPMI-1640 (+L-Glutamine)	Gibco
Trizma Base	Sigma
Trypsin-EDTA	Gibco
Tween 20	Sigma

3.1.5 Puffer und Lösungen

0,2 M Phosphatpuffer pH 7,2-7,4	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat)
4 % Formalin	37 % Formalin, 0,2 M Phosphatpuffer
Anästhetikum	Rompun/Ketamin-Gemisch ad 10 ml: 1,2 ml Ketamin (100 mg/ml), 0,8 ml 2 % Rompun, 8,0 ml 0,9 % NaCl
Lektinpuffer, pH 7,6	50 mM Trizma Base Sigma, 150 mM Natriumchlorid, 1 mM Magnesiumchlorid, 1 mM Calciumchlorid, Einstellen des pH mit HCl
TBS Puffer, pH 7,6	50 mM Trizma Base Sigma, 150 mM Natriumchlorid, Einstellen des pH mit HCl

3.1.6 Antitumorale Substanzen

Iscador[®] M 5 mg spezial Weleda AG

3.1.7 Fertige Lösungen und Reaktionssysteme

Casy ton Schärfe System GmbH

LightCycler FastStart DNA,

Master^{PLUS} SYBR Green I, Cat No. 03515869001 Roche Diagnostics

QIAamp DNA Mini Kit QIAGEN

Vectastain-ABC-AP Kit Vector Laboratories

VenorGeM[®] Mykoplasmen-Detektionskit Minerva Biolabs GmbH

3.1.8 Verwendete Oligonukleotide

Alu Primer forward

(TGG CTC ACG CCT GTA ATC CCA) MWG-Biotech AG

Alu Primer reverse

(GCC ACT ACG CCC GGC TAA TTT) MWG-Biotech AG

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Melanomzelllinie MV3

In diesem Versuch wurde die humane kutane Melanomzelllinie MV3 verwendet, die Frau Prof. Dr. I. Moll (Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Kopf- und Hautzentrum des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf) freundlicherweise zur Verfügung stellte. Die humane Melanomzelllinie MV3 wurde aus einer Lymphknotenmetastase gewonnen (Edward, 2001) und besitzt ein mittleres

metastatisches Potential, das innerhalb von 20 Tagen zur Lungenmetastasierung führt (Mauer, 2005).

3.2.1.2 Langzeitlagerung eukaryontischer Zellen

Die MV3 Melanomzellen dieser Arbeit stammen aus einem Stock, der im November 2002 eingefroren wurde und sich in der Passagezahl 12 befindet. Das Einfrieren wurde nach den Angaben des Herstellers c-c-pro vorgenommen: Die Zellen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet. Die so gewonnene Zellsuspension wurde 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Medienüberstand dekantiert. Darauf wurde das Zellsediment mit dem Einfriermedium *cryo-safe* resuspendiert und dabei eine Zelldichte von $2-4 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Diese Zellsuspension wurde in 1,8 ml Gefrierampullen gefüllt und aliquot 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 3.2.1.3 beschrieben kultiviert und hinsichtlich ihrer Vitalität begutachtet.

3.2.1.3 Zellkultur

Die Arbeiten mit der Zelllinie MV3 wurden ausschließlich unter einer Hera Safe Sicherheitsbank unter sterilen Bedingungen vorgenommen. Die Kultivierung der Zelllinie erfolgte in T75-Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen (37 °C, 100 % relative Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂/95 % Luft) in einem Hera Cell Brutschrank. Als Nährmedium diente RPMI-1640 Medium, das zusätzlich mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin versetzt wurde. Dieses Medium wird im Weiteren als Kulturmedium bezeichnet.

Ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte dem Wachstum der Zelllinien entsprechend zwei- bis dreimal pro Woche. Dazu wurde das alte Kulturmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit 15 ml PBS gespült und anschließend mit 5 ml Trypsin-EDTA bei 37 °C und 5 % CO₂ für 5 min inkubiert, sodass sich die adhären wachsenden Zellen vom Flaschenboden lösten. 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. Abschließend wurden 5 ml der abgelösten Zellen auf neue Zellkulturflaschen verteilt, in die 20 ml frisches Kulturmedium vorgelegt war.

Da für die Untersuchungen dieser Arbeit eine hohe Zellzahl erforderlich war, wurde die Zelllinie vor Beginn der Behandlung in Zellkulturflaschen mehrere Wochen lang vermehrt bis eine ausreichende Zellzahl vorhanden war. Einen Tag vor der Injektion wurden die Zellen in den Kulturflaschen ein letztes Mal geteilt. So waren 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[®] Mykoplasmen-Detektionskit, das auf der Basis der Polymerase-Kettenreaktion arbeitet, eingesetzt. Der Test ist zum Nachweis der typischerweise als Kontamination in Zellkulturen auftretenden Mykoplasmenspezies geeignet und wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Vor Beginn der Zellkulturversuche wurde die Zelllinie auf Mykoplasmen getestet. Bei der in diesem Versuch verwendeten Zelllinie konnte keine Kontamination durch Mykoplasmen detektiert werden.

3.2.2 Zellzahlbestimmung mit dem Zellanalysegerät CASY

Für die Untersuchungen war es notwendig, die Anzahl der in einer Zellsuspension enthaltenen Zellen zu bestimmen. Dies erfolgte mit Hilfe des Zellanalysegerätes CASY. Zur Zellzählung wurden die Zellen in einer speziellen Elektrolytlösung suspendiert und mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Präzisionsmesspore gesaugt. Beim Durchwandern der Messpore verdrängen die Zellen eine ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung. Auf diese

Weise können Zahl, Volumen und Vitalität der Zellen bestimmt werden (CASY, Bedienungsanleitung, 2002).

3.2.2.1 Durchführung der Zellzählung

Für die Zellzählung der MV3 Melanomzellen wurde das alte Kulturmedium aus der jeweiligen Zellkulturflasche abgesaugt, die Zellen einmal mit 15 ml PBS gespült und anschließend mit 5 ml Trypsin-EDTA bei 37 °C und 5 % CO₂ für 5 min inkubiert, sodass sich die Zellen vom Flaschenboden lösten. 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. Daraufhin wurden die, sich in der Lösung befindenden Melanomzellen in 30 ml Polystyrolröhrchen überführt und 10 min bei 1500 UpM zentrifugiert.

Nach dem darauffolgenden Abgießen des Überstandes wurde das erhaltene Zellpellett in 10 ml Kulturmedium aufgeschwemmt. Dann erfolgte das Pipettieren von 100 µl der zu untersuchenden Zellsuspension in ein *Casy cup*, in das bereits 10 ml der speziellen Elektrolytlösung *Casy ton* vorgelegt wurden. Die Durchmischung der Probe wurde durch dreimaliges Kippen des *Casy cup* erreicht, während auf die Vermeidung von Blasen- und Schaumbildung geachtet wurde. Um eine Aggregation und ein Absetzen der Zellen zu vermeiden, erfolgten die Messungen der pipettierten Probe ohne Zeitverzögerung. Nach erfolgreicher Messung wurde die Zellzahl auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen pro 1 ml RPMI-1640 Medium eingestellt.

3.2.3 Versuchstiere

Diese Versuche wurden an *Scid*-(*severe combined immunodeficiency*) und *E⁻/P⁻/Scid*-Mäusen durchgeführt.

3.2.3.1 Die *Scid*-Maus

Für die Versuche wurden 80 (40 männliche und 40 weibliche) spezifisch pathogenfreie homozygote *Scid*-Mäuse des Typs BALB/c *scid/scid* verwendet. Dabei stammten 30 Tiere aus der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und 50 *Scid*-Mäuse wurden von M&B, RY, Dänemark bezogen. Alle Tiere waren zu Versuchsbeginn zwischen 8 und 14 Wochen alt und hatten ein Gewicht von 20–25 g.

3.2.3.2 Die $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Maus

81 (36 männliche und 45 weibliche), spezifisch pathogenfreie $E^{-/-}$ - und $P^{-/-}$ -Selektindefiziente *Scid*-Mäuse kamen ebenfalls aus der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und stammen aus der von Frau Dr. Silke Köhler etablierten Mauszüchtung. Die Tiere waren zu Versuchsbeginn zwischen 8 und 14 Wochen alt und hatten ein Gewicht von 20–25 g.

Die Züchtung der $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Maus basiert auf der Kreuzung von zwei Paaren $E^{-/-}$ - und $P^{-/-}$ -Selektin defizienter *Scid*-Mäuse (mit einem B6;129S2-Hintergrund, ursprünglich von Jackson Laboratory, Maine, USA; Stock Number 002916; <http://jaxmice.jax.org/strain/002916.html>) mit zwei Paaren *Scid*-Mäusen (BALB/c C57BL/Kalgh-I *scid/scid*, Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf).

Die daraus hervorgegangenen F1-Generationen wurden wieder miteinander gekreuzt und ihre Nachkommen auf $E^{-/-}$ - und $P^{-/-}$ -Selektin-Null-Mutationen/-Varianten durch eine PCR genotypisiert. Das Vorhandensein von *severe combined immunodeficiency* wurde über ein *dot blot* festgestellt. Die homozygoten $E^{-/-}$ - und $P^{-/-}$ -Selektin defizienten $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Mäuse wurden miteinander gekreuzt und der Genotyp und Immunstatus ihrer Nachkommen bis in die F5-Generation hinein verifiziert (Köhler, persönliche Mitteilung).

3.2.4 Tierhaltung

Die Haltung der Tiere erfolgte in Filter-Top-Käfigen in Gruppen zu jeweils 5 Tieren in der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Unter Standardbedingungen ($20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$; relative Luftfeuchtigkeit $\approx 50\%$; 12 h zirkadianer Rhythmus, Dunkelphase von 19.00–7.00 Uhr) erhielten die Tiere Standard-Einstreufutter und steriles Wasser *ad libitum*. Die Versuchstiere aus Dänemark wurden 6–8 Tage vor Versuchsbeginn zur Akklimatisierung und Eingewöhnung im Tierstall des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gehalten.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden nach § 8 des Tierschutzgesetzes von 1998 der Bundesrepublik Deutschland unter der Versuchsnummer 39/05 von der Behörde für Umwelt und Gesundheit in Hamburg genehmigt.

3.2.5 Behandlung der Versuchstiere

Die Behandlungen der Tiere fanden unter aseptischen Bedingungen unter einer *laminar flow hood* in Räumen mit Überdruck statt. Aufgrund der großen Anzahl der Versuchstiere wurde die Behandlung gestaffelt in zwei aufeinanderfolgenden Durchgängen vorgenommen. Dazu wurden im ersten und im zweiten Durchgang jeweils die Hälfte der *Scid*- und *E⁻/P⁻/Scid*-Mäuse in vier Gruppen, davon drei Behandlungsgruppen und eine Kontrollgruppe von je ca. 20 Tieren eingeteilt. Dabei wurde auf eine gleichmäßige Aufteilung nach Geschlecht und Gewicht geachtet. Die Behandlungsgruppen wurden nach den zu erhaltenden Dosierungen benannt: die 10-Nanogramm (ng)/Kilogramm (kg)-Gruppe, die 30-ng/kg-Gruppe, die 150-ng/kg-Gruppe und schließlich die Kontrollgruppe, wobei eine deutliche Kennzeichnung der Käfige erfolgte.

Das Wohlergehen aller Tiere wurde täglich überprüft und anhand der Aktivität und Körperhaltung der Tiere, deren Fellbeschaffenheit und Nahrungsaufnahme beurteilt. Im Verlauf des Versuchs mussten einige Tiere aufgrund beginnender Ulzeration der Haut über dem Tumor in Einzelkäfigen gehalten werden.

3.2.5.1 Inokulation der Tumorzellen in die Versuchstiere

Jeweils einen Tag vor Behandlungsbeginn wurden den Tieren aller Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppen beider Durchgänge aus der in Kap. 3.2.2.1 beschriebenen Zellsuspension von 5×10^6 Melanomzellen pro ml RPMI-1640 Medium eine Menge von 1×10^6 Tumorzellen der humanen Melanomzelllinie MV3 *subkutan* zwischen die Schulterblätter injiziert. Das verabreichte Volumen pro Maus betrug 200 μ l.

3.2.5.2 Behandlung der Tiere mit Iscador[®] M 5 mg spezial

Die Tiere wurden mit dem aus der anthroposophischen Medizin stammenden Arzneimittel Iscador[®] M 5 mg spezial (Ch.-B.:50811, PZN-1385611, Weleda AG, Schwäbisch Gmünd) behandelt, einem fermentierten wässrigen Extrakt der Mistelpflanze. Zur Herstellung der Komponenten für Iscador M (*Mali*) werden Mistelpflanzen (*Viscum album* L. *ssp.* *album*) von Apfelbäumen (*Malus domestica* Boekh.) kurz vor Johanni bzw. Weihnachten geerntet.

Die ein- bis zweijährigen Blätter, Stengel, Blüten und Fruchtanlagen sowie bei der Winterernte die gereiften Beeren werden mechanisch aufgeschlossen, mit destilliertem Quellwasser, Zucker und misteleigenen Laktobazillen versetzt und milchsauer vergoren. Der durch Abpressung gewonnene Auszug ist nach Sterilfiltration stabil.

Zur Herstellung von Iscador gelangt Wintermistelextrakt ins Zentrum einer mit 10.000 UpM rotierenden Titanscheibe von 1 m Durchmesser. Von hier spreitet er horizontal aus und vereinigt sich anschließend mit aus 1 m Höhe senkrecht tropfendem Sommermistelextrakt im hoch gebogenen Rand der Scheibe. Die Iscador-Ursubstanz besitzt ein Droge-Extrakt-Verhältnis von 1:5 (Extrakt aus 200 mg Mistelpflanze auf 1 ml Flüssigkeit) und weist einen Gesamtmistellektingehalt von $10,0 \pm 1,6 \mu\text{g/ml}$ auf (Iscador Mali spez) (Baumgartner *et. al.*, 2005).

Sonstige Bestandteile einer 1 ml Ampulle Iscador[®] M 5 mg spezial sind Natriumchlorid, Natriumhydroxid und Wasser für Injektionszwecke. Die verwendete Charge des Präparates Iscador[®] M 5 mg spezial hatte einen normierten Mistellektin-I-Gehalt (ML-I-Gehalt) von ca. 80 ng/ml und einen Gesamtmistellektingehalt von ca.

250 ng/ml (Wagner, 2001). Der Viscotoxingehalt lag bei 7–8 µg/ml. Da der Viscotoxingehalt nicht routinemässig im Fertigprodukt bestimmt wird, ist er aus dem Wirkstoff berechnet (Schaller, persönliche Mitteilung). Die Iscador[®] Ampullen zu 1 ml wurden bei 4 °C gelagert. Im Weiteren wird der Mist eleextrakt Iscador[®] M 5 mg spezial mit Iscador[®] M spez bezeichnet werden.

Um Artefakte durch Wandadsorption zu vermeiden (Suelter und De Luca, 1983; Wang und Hanson, 1988; Cleland *et al.*, 1993), wurden die verschiedenen, auf den ML-I-Gehalt festgelegten Verdünnungen täglich unmittelbar vor der Injektion unter sterilen Bedingungen in Polystyrolröhrchen (30 und 50 ml) pipettiert. Um Konzentrationsunterschiede des Iscador[®] M spez in den Verdünnungen und Pipettierfehler möglichst gering zu halten, wurden die Glaspipetten vor jedem Gebrauch durch dreimaliges Aufziehen und Entleeren benetzt und die zu pipettierende Verdünnung gleichzeitig durchmischt.

Nach diesem Verfahren wurden auch die Glasspritzen vor den Injektionen vorbereitet, um insbesondere einen Fehler durch Wandadsorption zu vermeiden und die Verdünnung direkt vor der Injektion noch mal zu durchmischen. Es wurden sterile 1 ml Glasspritzen verwendet, da Mistellektine weniger an gläsernen Oberflächen haften, als an Einmalspritzen aus Plastik. Die Glasspritzen wurden vor der Injektion mit etwas mehr als 1 ml der entsprechenden Verdünnung von Iscador[®] M spez aufgezogen, mit einer sterilen Einmalkanüle versehen, dann der Kanülenkonus entlüftet und der Spritzenkolben auf 1 ml eingestellt. Mit diesem Volumen wurden 10 Mäuse einer Gruppe mit jeweils 100 µl behandelt.

Die Tiere der Behandlungsgruppen erhielten den auf den ML-I-Gehalt festgelegten Mistelextrakt Iscador[®] M spez in folgenden Dosierungen: 10 ng/kg Körpergewicht (KG)/Tag (d), 30 ng/kg KG/d oder 150 ng/kg KG/d und die Kontrollgruppe erhielt nur das Trägermedium PBS. Da Iscador[®] M 5 mg spezial einen ML-I-Gehalt von 80 ng/ml hat, wurden die täglichen ML-I-standardisierten Verdünnungen nach dem Schema in Tab. 3.1 hergestellt. Dabei wurden täglich 2,5 ml Iscador[®] M spez als Grundlage für die Verdünnungen verwendet, die mit PBS versetzt wurden. Der ML-I-Gehalt wurde für die verschiedenen Behandlungsgruppen pro 1 ml so eingestellt, dass 10 Tiere mit einem Injektionsvolumen von jeweils 100 µl behandelt werden konnten. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten 100 µl PBS.

ML-I- Behandlungsdosis	Pipettiertes Volumen [ml]	ML-I-Gehalt [ng/ml]
150 ng/Kg KG	2,5 ml Iscador [®] M spez 2,83 ml PBS	37,5
30 ng/Kg KG	1,2 ml aus 150 ng/Kg KG 4,8 ml PBS	7,5
10 ng/Kg KG	1,5 ml aus 30 ng/Kg KG 3,0 ml PBS	2,5

Tab. 3.2.5.2.1: Pipettierschema der einzelnen ML-I-Konzentrationen.

Die Behandlung fand über einen Zeitraum von 19 Tagen täglich zur selben Zeit statt. Für die *intraperitoneale* Verabreichung wurden die Tiere mit Daumen und Zeigefinger an der Nackenhaut gehalten, während der Schwanz zwischen Handfläche und kleinem Finger derselben Hand fixiert wurde. Es wurde auf Höhe der Beinchenfalten *paramedian* injiziert. Um Verwechslungen der Tiere und Mehrfachinjektionen zu vermeiden, wurden die Mäuse einer Gruppe nach der Injektion vorübergehend in einem separaten Käfig gehalten, bis alle Tiere der Gruppe behandelt waren.

3.2.6 Blutentnahme und Organentnahme

Nachdem die inokulierten Melanomzellen 20 Tage gewachsen und 19 Behandlungstage mit Iscador[®] M spez vergangen waren, wurden die Versuche beendet. Den Tieren wurde nach einer *i. p.* Narkose mit Rompun/Ketamin (0,1 ml/10 g KG) durch Punktion des *retrobulbären Venenplexus* mit einer Glaskapillare Blut entnommen. Die entnommene Menge variierte zwischen 100 und 600 µl. Danach wurden die Tiere durch *zervikale Dislokation* getötet. Die Primärtumoren, die Lungen und Gehirne wurden herauspräpariert, die Milz und der Thymus auf ihre Größe hin beurteilt und das Knochenmark aus den Femurknochen gespült. Das Blut wurde in EDTA-Röhrchen entnommen und bis zur DNA-Extraktion, die spätestens nach 24 h stattfand, bei + 4 °C gelagert.

3.2.7 Histologische Untersuchungen

3.2.7.1 Gewebefixierung

Die Tumore wurden für 48 h in 4%igem Formalin fixiert und anschließend nach einem standardisierten Verfahren in Paraffin eingebettet. Dazu wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Isopropanolreihe, beginnend mit 50 %, dann 70 % und 90 % entwässert und mit Paraffin Paraplast Plus infiltriert. Die Lungen wurden 16–24 h in 4 %igem Formalin, gepuffert mit 0,2 M Phosphatpuffer, fixiert und anschließend in etwa 1 mm dicke Scheiben geschnitten. Diese Lungenstücke wurden in einer dafür vorgesehenen Form verteilt und mit warmem 4 %igem Agar ausgegossen und mit einem Stempel gepresst. Im erkalteten Zustand wurden diese Blöcke herausgelöst und ebenfalls in Paraffin eingebettet. Die Primärtumoren und die Lungen waren somit für die Histologie vorbereitet.

3.2.7.2 Primärtumoren

Von den in Paraffin eingebetteten Primärtumoren wurden mit einem Mikrotom 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Diese wurden anschließend in ein Wärmebad überführt und auf einen beschichteten Objektträger aufgezogen. Danach wurden die Schnitte für 24 h im Wärmeschrank bei 37 °C getrocknet und anschließend mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Die Färbung wurde nach einem Standardprotokoll in einem Färbeautomaten durchgeführt. Abschließend wurden die Objektträger mit dem Eindeckmedium Eukitt und einem Deckglas abgedeckt. Von den Primärtumorblöcken wurden zusätzlich aus der Mitte heraus jeweils 30 Schnitte für die Immunhistologie gewonnen.

3.2.7.3 Lungenmetastasierung

Die vorher in Agar und Paraffin eingebetteten Lungen wurden ebenfalls in 5 µm dicke Paraffinschnitte geschnitten. Die Lungen wurden komplett in Serie aufgeschnitten, wobei jeder zehnte Schnitt im Abstand von 50 µm in ein Wärmebad überführt und auf einen beschichteten Objektträger aufgezogen wurde. Von den Lungenblöcken

wurden zusätzlich aus der Mitte heraus jeweils 3-mal 20 Schnitte für immunhistologische Untersuchungen gewonnen. Nach 24 h im Wärmeschrank bei 37 °C waren die Schnitte getrocknet. Daraufhin wurden die 10 mittleren mit der größten Dichte an Lungenstücken ausgewählt und nach einem Standardprotokoll in einem Färbeautomaten mit HE gefärbt und abschließend mit dem Eindeckmedium Eukitt und einem Deckglas abgedeckt.

Für die lichtmikroskopische Zählung der Lungenmetastasen wurden die Objektträger randomisiert. Sodann wurden die HE-gefärbten Schnitte der Lungen bei 100-facher Vergrößerung betrachtet und die Anzahl der intra- und extravasalen Metastasen und die einzelnen intra- und extravasalen Tumorzellen gezählt. Dabei wurde der Objektträger mäanderförmig durchmustert, um alle Areale des Schnittes zu erfassen und gleichzeitig eine Doppelzählung von Lungenmetastasen auszuschließen. Die Lungenmetastasen stellen sich in der HE-Färbung unter dem Lichtmikroskop deutlich abgegrenzt vom umgebenden Lungengewebe dar. Die Schnitte wurden jeweils zweimal durchmustert. Die Metastasen der 10 mittleren HE-gefärbten Serienschnitte wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Nach Beendigung der Metastasenzählung wurden die Objektträger dekodiert und den entsprechenden Behandlungsgruppen zugeordnet.

Die Metastasenanzahl für die gesamte Lunge wurde mit der im eigenen Institut etablierten, quantitativen Methode analysiert (Jojovic und Schumacher, 2000). Dabei wurden die extra- und intravasalen Metastasen und die extravasalen Einzelzellen in die Berechnung einbezogen. Die Anzahl der Lungenmetastasen der mittleren 10 Schnitte einer Lunge wurde addiert und ein Mittelwert für die Anzahl der Lungenmetastasen pro Schnitt gebildet. Dieser wurde mit der Gesamtzahl der Schnitte einer Lunge multipliziert. Anschließend wurden von dem so errechneten Wert 20 % subtrahiert. Das so erhaltene Ergebnis gab die Anzahl der Lungenmetastasen in der gesamten Lunge wieder.

3.2.8 Darstellung dendritischer Zellen in den Primärtumoren durch das biotinylierte Lektin *Bandeiraea simplicifolia* Agglutinin-I (BSA-I)

Für die immunhistologischen Versuche wurde von den Primärtumorblöcken (siehe Kapitel 3.2.7.2) ein Schnitt pro Versuchstier mit dem biotinylierten Lektin *BSA-I* gefärbt. Die Färbung wurde nach einem Standardprotokoll vorgenommen. Die entparaffinierten und 5 min in Lektinpuffer gespülten Gewebeschnitte wurden in 0,1 % Trypsin, das zuvor in Lektinpuffer gelöst wurde, für 15 min zur Glykotopdemaskierung vorbehandelt. Die Enzymreaktion wurde unter fließendem Leitungswasser angehalten und die Gewebeschnitte anschließend in Lektinpuffer überführt und zweimal fünf min gespült. Die Gewebeschnitte wurden mit dem biotinylierten Lektin *BSA-I*, 1:100 mit Lektinpuffer verdünnt (entspricht einer Konzentration von 10 µg *BSA-I*/ml Lektinpuffer) 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 *Vectastain-ABC-AP Kit* (Avidin-Alkalische-Phosphatase-Komplex) inkubiert. Nach dreimaliger Spülung für jeweils 5 min mit TBS wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase mit Neufuchsin 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 Levamisole zur Hemmung der endogenen nicht-intestinalen alkalischen Phosphatase, zugegeben. Daraufhin wurden 30 mg Naphthol-AS-Bisphosphat in 1000 µl Dimethylformamid gelöst und als Substrat für die alkalische Phosphatase hinzugegeben. 300 µl Tween 20 wurden der Lösung zur zusätzlichen Hintergrundunterdrückung zugesetzt. Die Gewebeschnitte inkubierten in dieser Lösung für 30 min unter Lichtausschluss. Die Farbreaktion wurde unter fließendem Leitungswasser (5 min) und in Aqua dest. (5 min) angehalten. Darauf wurden die Präparate in 50 %igem Mayers Hämalaun 10 s gegengefärbt und 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Abschließend wurden sie mit dem wasserhaltigen Eindeckmedium *Clarion/Crystal Mount* beschichtet und danach mit *Permanent Mounting Media* mit einem Deckglas versehen.

Bei den Negativkontrollen wurde der primäre Antikörper weggelassen und statt des Lektins *BSA-I* nur mit Lektinpuffer 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.

Die *BSA-I* gefärbten Schnitte der Primärtumoren wurden anschließend durch Lichtmikroskopie auf den Anteil der *BSA-I*-positiven dendritischen Zellen untersucht. Hierzu wurde ein Okular mit Zählgitternetz benutzt, das aus 10 mal 10 Quadraten bestand. Es wurden die vitalen Areale des Primärtumors bestimmt und in diesen mit 100-facher Vergrößerung drei aneinandergrenzende Gesichtsfelder ausgezählt. Pro Gesichtsfeld wurden in dem Zählgitter 500 Melanomzellen gezählt, mit einem Zellzähler registriert und der prozentuale Anteil der Dendriten in diesem Feld bestimmt.

3.2.9 Bestimmung disseminierter Melanomzellen im Blut

Zur Analyse des Gehalts disseminierter Tumorzellen im Blut der *Scid*- und *E⁻/P⁻/Scid*-Mäuse wurde eine *real-time polymerase chain reaction* mit dem LightCycler System 2.0 durchgeführt.

Für die Herstellung der hierzu benötigten Eichreihen, wurden die MV3 Melanomzellen mit dem *CASY*-Verfahren, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, gezählt und in dem entsprechenden Blut der *Scid*- und *E⁻/P⁻/Scid*-Mäuse und in Puffer suspendiert.

Die Extraktion der genomischen DNA aus dem Vollblut der Versuchstiere und aus den MV3 Melanomzellen für die Eichreihen erfolgte mit dem *QIAamp DNA Blood Mini Kit*. Die Durchführung wurde nach den Angaben des Herstellers vorgenommen (*QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook*). Dazu wurden die Blutproben der Tiere mit PBS ergänzt, wenn sie nicht 200 µl ergaben. Zur Isolierung der Melanomzellen wurden 1 Mio Zellen in 200 µl PBS suspendiert. Nach der Extraktion wurde das im Reaktionsgefäß eluierte DNA-Extrakt der Blutproben bei -20 °C eingefroren. Die DNA der MV3 Melanomzellen, deren Konzentration in Zellen/ml bekannt war, wurde für die Eichreihen mit AE-Puffer, *Scid*- oder

E⁻/*P*⁻/*Scid*-Mausblut so verdünnt, dass eine Eichreihe entstand, die von 10⁶ Zellen/ml über 10⁵, 10⁴, 10³, 10² bis zu 10¹ Zellen/ml enthielt.

3.2.9.1 LightCycler *real-time polymerase chain reaction* (RT PCR)

Das in dieser Arbeit für die Quantifizierung verwendete LightCycler System 2.0 ist ein kombiniertes Gerät aus *real-time-PCR-Cycler* und Fluorimeter und ermöglicht ein Verfolgen der log-linearen PCR-Phase in Echtzeit am Bildschirm. Das System ermöglicht den Nachweis sehr kleiner DNA-Mengen. Eine Überprüfung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese ist dabei nicht mehr notwendig. Im Fluorimeter des Gerätes wird Licht gefiltert und über eine Linse fokussiert. Die von der markierten Probe ausgesandte Fluoreszenz wird dann von derselben Linse wieder gesammelt, über dichromatische Filter spezifisch gefiltert und an Photohybrid-Detektoren übermittelt. Die optische Einheit enthält drei Filter in den Wellenlängen 530, 640 und 710 nm, sodass die Detektion von Fluoreszenzfarbstoffen (siehe Kap. 3.2.9.3), deren Emissionsmaxima bei den entsprechenden Filtern liegen, möglich ist.

Die Datenverarbeitung erfolgte mit der gerätespezifischen LightCycler Software 4.05, mit der die Ergebnisse der einzelnen Messungen nach jedem Zyklus auf dem Bildschirm dargestellt wurden. Zur Auswertung kamen nur solche PCR-Läufe deren Ergebnisse auf eine adäquate Effizienz von 1,8 bis 2,0 geprüft worden waren und deren Fehlerquote bei < 0,05 lag. Die Effizienz gibt für den jeweiligen Lauf an, wie präzise die Verdopplung des definierten DNA-Fragments stattgefunden hat.

3.2.9.2 Quantifizierung mit *SYBR Green I*-Farbstoff

Für das LightCycler System gibt es zwei verschiedene Fluoreszenz-Techniken, die die Detektion der Amplifikationsrate ermöglichen: mittels *SYBR Green I* oder Hybridisierungssonden. Da in dieser Arbeit nur erstere verwendet wurde, wird im Folgenden lediglich auf diese näher eingegangen.

SYBR Green I, ein interkalierender Farbstoff, bindet nach dem Hybridisieren der Primer an die neu gebildete doppelsträngige DNA und erreicht sein

Fluoreszenzmaximum am Ende der Elongationsphase mit einer Wellenlänge von 530 nm. Das generierte Fluoreszenzsignal ist proportional zur DNA-Konzentration. Ungebunden emittiert der Farbstoff mit geringer Fluoreszenz, wodurch eine leichte Hintergrundfluoreszenz existiert, die in der Auswertung vom Gerät subtrahiert wird. Der Nachteil dieser Methode ist, dass auch unspezifische PCR-Produkte und Primer-Dimere, die durch komplementäre Sequenzen der Primer entstehen, mitgemessen werden und somit das Ergebnis bei der Quantifizierung verfälschen können. Dies kann dadurch vermieden werden, indem eine Messtemperatur gewählt wird, die über der Schmelztemperatur der Primer-Dimere liegt, aber noch unterhalb des Schmelzpunktes der eigentlichen PCR-Produkte, die dann noch doppelsträngig vorliegen.

3.2.9.3 Der quantitative Nachweis humaner *Alu*-Sequenzen

Der in dieser Arbeit dargelegte Ansatz geht von dem quantitativen Nachweis humaner *Alu*-Sequenzen in Xenograftmodellen mittels quantitativer *Alu*-PCR aus. *Alu*-Sequenzen gehören zur Familie der mittel-repetitiven DNA-Sequenzen im menschlichen Genom. Ca. 1×10^6 Kopien befinden sich im haploiden Genom, was in etwa einem Anteil von 5 % der gesamten Menge der DNA entspricht. Ihr Name leitet sich von dem Restriktionsenzym *Arthrobacter luteus* ab, das in der *Alu*-Konsensussequenz schneidet (Kariya *et al.*, 1987).

Die *Alu*-Sequenzen weisen eine Länge von ca. 300 Basenpaaren auf und setzen sich aus zwei ähnlichen Monomeren zusammen, die über einen Oligo-dA-Bereich miteinander verbunden sind. Beide Hälften (*Alu*-links und *Alu*-rechts) weisen eine große Ähnlichkeit mit der 7SL-RNA auf. *Alu*-Sequenzen sind kennzeichnend für Primaten. In Nagern gibt es zwar homologe repetitive Elemente, die mit B1 benannt werden, sie sind jedoch im Verlauf der Evolution unabhängig von den humanen *Alu*-Sequenzen entstanden. Die Verwendung der *Alu*-Sequenzen als *Template* für die PCR-Amplifikation, um humane Tumorzellen nachzuweisen, wurde von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben. Zubair *et al.* (1996) konnten mit dieser Methode die Kolonisation von Tumorzellen in Milz, Leber und Lunge nach Injektion von humanen Burkitt-Lymphom-Zellen nachweisen.

3.2.9.4 Absolute Quantifizierung mit internen Standards

Für die absolute Quantifizierung der PCR-Produkte wurde die Eichreihe aus der humanen Melanomzelllinie MV3 mit den gemessenen Proben in Relation gesetzt. Für alle PCR-Läufe wurde diese Eichreihe mit bekannter DNA-Konzentration von 10^6 Zellen/ml über 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 bis zu 10^1 Zellen/ml erneuert.

Wie folgende Abbildung belegt, ergab es keinen Unterschied, ob die DNA der Eichreihe in AE-Puffer oder in dem entsprechenden Blut tumorfreier *Scid*- und *E⁻/P⁻/Scid*-Mäuse suspendiert war.

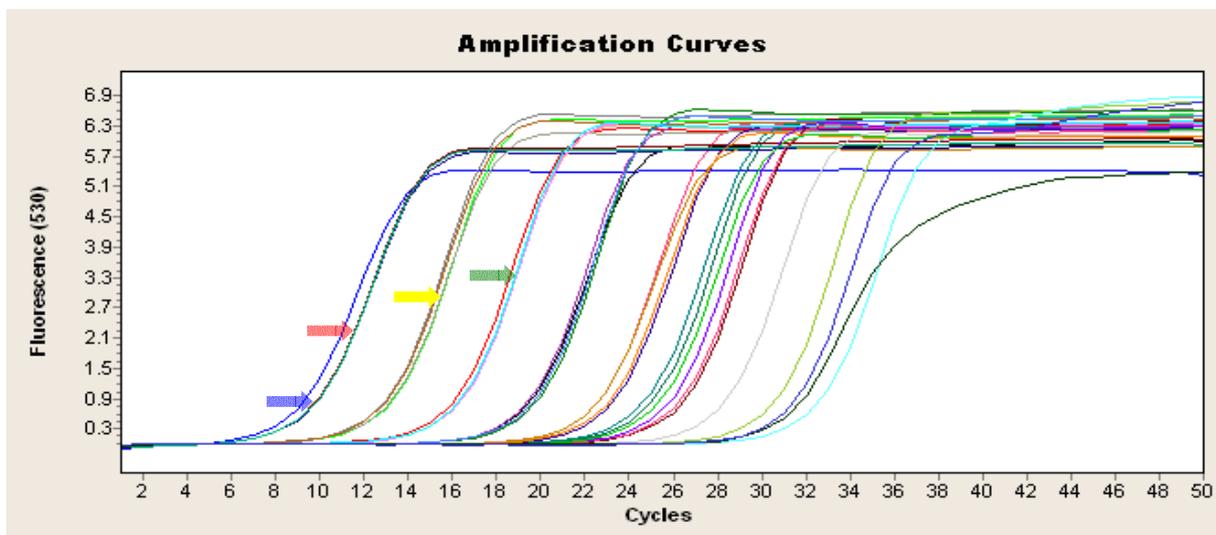


Abb. 3.2.9.4.1: Eichreihen mit MV3 Melanomzellen in Puffer und Mausblut. Dargestellt sind die Eichreihen in Puffer oder Blut der *Scid*- und *E⁻/P⁻/Scid*-Mäuse. Auf der Abszisse ist die Anzahl an Zyklen der Amplifikation aufgetragen, die Ordinate zeigt das Fluoreszenzsignal in Nanometern an, das proportional zur doppelsträngigen DNA-Konzentration ist. Als erstes werden nach 5 bis 6 Zyklen die Proben mit 1×10^6 Melanomzellen detektierbar. Der blaue Pfeil markiert die DNA-Probe, die in Puffer suspendiert ist. Der rote Pfeil markiert die DNA-Proben im Blut der *Scid*- und *E⁻/P⁻/Scid*-Mäuse (diese beiden Kurven liegen aufeinander und sind nicht voneinander zu unterscheiden). Nach 8 Zyklen sind die Proben mit 1×10^5 Zellen detektierbar (gelber Pfeil), nach 12 Zyklen die Proben mit 1×10^4 Zellen (grüner Pfeil) usw. Sowohl die Kurven der DNA-Proben, die in Puffer lysiert sind, als auch die Kurven der Proben in Mausblut, liegen jeweils im selben Bereich.

Dem LightCycler Programm wurde die eingesetzte Eichreihe in jedem Lauf als Standardkurve mit definierter DNA-Menge vorgegeben. Bei der Auswertung wurde berücksichtigt, dass einige Blutproben mit PBS auf das Probenvolumen von 200 μ l heraufverdünnt worden waren. Die Ergebnisse wurden mittels Dreisatz auf die jeweilige Eichreihe bezogen.

3.2.9.5 Durchführung der quantitativen *Alu*-PCR

Der Reaktionsansatz für eine PCR mit einem Volumen von 20 µl wurde in 20 µl Glaskapillaren pipettiert und setzte sich aus Folgendem zusammen: 2 µl extrahierte DNA des Vollblutes (wie unter 3.2.9 beschrieben) der Versuchstiere, 0,4 µl *Alu*-Primer forward (TGG CTC ACG CCT GTA ATC CCA), 0,4 µl *Alu*-Primer reverse (GCC ACT ACG CCC GGC TAA TTT), 4,0 µl ddH₂O und 13,2 µl LightCycler Master Mix.

Die Herstellung des LightCycler Master Mixes erfolgte nach den Angaben des Herstellers mit *LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I*. Dieses Kit enthält einen Master Mix bestehend aus einer *FastStart Taq DNA Polymerase*, Reaktionspuffer, einem Nukleotidmix *dNTP* (mit dUTP statt dTTP), dem Fluoreszenz-Farbstoff *SYBR Green I* und MgCl₂.

Nach dem Pipettieren des PCR-Ansatzes wurden die Kapillaren verschlossen und kurz zentrifugiert. Anschließend wurden die Kapillaren in den Rotor gesteckt und in das LightCycler-Gerät überführt. Der Ablauf der PCR gliedert sich in drei Phasen: Die Denaturierung, die Amplifikation und die Schmelzkurvenanalyse. Die Amplifikation unterteilt sich wiederum in Denaturierung, Primer-Hybridisierung und DNA-Synthesephase. Die Messung der Fluoreszenz fand in der DNA-Synthesephase und in der Schmelzkurvenanalyse statt.

Jede DNA-Probe wurde mindestens 6-mal und maximal 12-mal analysiert, wobei jeweils drei Proben in zwei bis vier unabhängigen Läufen gemessen wurden. In jedem Lauf wurden die Eichkurvenproben als Negativ- bzw. Positivkontrollen gereinigtes Wasser, die beiden Primer, das jeweilige Blut der *Scid*^{-/-}- oder *E^{-/-}/P^{-/-}/Scid*^{-/-}-Mäuse, und die Elutionspuffer mitbestimmt.

Im Anschluss an die PCR wurde stets zur Analyse des PCR-Produktes eine Schmelzkurven-Analyse durchgeführt. Diese bezieht sich auf den charakteristischen Schmelzpunkt doppelsträngiger DNA. Der Farbstoff *SYBR Green I* bindet wie vorangehend beschrieben an doppelsträngige DNA. Wird die DNA in der Kapillare langsam erhitzt und die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen, löst sich das *SYBR Green I* von der doppelsträngigen DNA am Schmelzpunkt des PCR-Produkts und das Fluoreszenzsignal geht zurück. Da sich die PCR-Produkte von den unspezifischen PCR-Nebenprodukten bzw. von den Primer-Dimeren in ihrer

Schmelztemperatur unterscheiden, kann die Qualität der PCR-Reaktion durch diese Methode bestimmt werden.

3.2.10 Statistische Auswertungen

Für alle statistischen Berechnungen und Graphen wurde die Software Graph Pad Prism 4 verwendet, wobei p-Werte $< 0,05$ als statistisch signifikant bewertet wurden. Ein signifikanter Unterschied wurde in der Graphik gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0001$) und im Text erwähnt. Alle graphisch dargestellten Daten sind als Mittelwert \pm SEM aufgeführt. Dafür wurde vorausgesetzt, dass die Daten normalverteilt waren und gleiche Varianzen hatten.

Das Tumorgewicht, die Lungenmetastasierung, die Anzahl dendritischer Zellen und die Analyse der zirkulierenden Tumorzellen im Blut der einzelnen Gruppen wurden in Bezug auf die Wirkung des Mistelextrakts Iscador[®] M spez 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 wurde einerseits das Fehlen endothelialer Adhäsionsmoleküle in der *E⁻/P⁻/Scid*-Maus in seiner Auswirkung auf das Wachstums- und Metastasierungsverhalten der humanen malignen Melanomzelllinie MV3 im Vergleich zur *Scid*-Maus erforscht. Andererseits wurde die Wirkung des auf den ML-I-Gehalt festgelegten Mistelextrakts Iscador[®] M spez auf das Wachstums- und Metastasierungsverhalten der humanen Melanomzelllinie MV3 im *Scid*- und *E⁻/P⁻/Scid*-Maus-Xenograftmodell untersucht. Dafür wurden die Primärtumorgewichte, die Anzahl der Lungenmetastasen und der Gehalt disseminierter Tumorzellen im Blut der Versuchstiere bestimmt und auf mögliche Korrelationen untersucht. Zudem wurde der Effekt des Mistelextrakts Iscador[®] M spez auf die Immigration der dendritischen Zellen ins Primärtumorgewebe untersucht.

4.1 Primärtumoren

Nach 19 Behandlungstagen wurden die Primärtumoren makroskopisch begutachtet, sorgfältig vom umgebenden Gewebe frei präpariert und entnommen um das Gewicht zu ermitteln.

4.1.1 *Scid*-Mäuse

Die Inokulation der Melanomzellen verlief bei allen in die Auswertung einbezogenen 79 Tieren komplikationslos. Um die Anwachsrate der inokulierten Melanomzellen zu überprüfen, wurden die Primärtumoren am 7. Tag nach der Verabreichung palpiert. Bei 66 von 79 Tieren (= 83,54 %) konnte ein Primärtumor palpiert werden, der mindestens die Größe eines Reiskornes hatte. Im Verlauf betrug die Anwachsrate 100 % und sämtliche Tumoren waren als Knötchen bzw. Knoten palpabel.

Durch den Tod von zwei Tieren im Verlauf der Behandlungszeit kamen 77 Primärtumoren zur weiteren Auswertung.

Drei bis vier Tage vor Versuchsende hatten 25 von 77 Tieren (= 32,46 %) ulzerierte Primärtumoren und 7 Tiere (= 9,09 %) hatten nekrotisch veränderte Primärtumoren. Von den 32 Tieren mit Ulkus oder Nekrose stammten 9 Tiere aus der Kontrollgruppe (6 Ulzera, 3 Nekrosen), 6 Tiere aus der 10-ng/kg-Gruppe (6 Ulzera), 8 Tiere aus der 30-ng/kg-Gruppe (5 Ulzera, 3 Nekrosen) und 9 Tiere aus der 150-ng/kg-Gruppe (8 Ulzera, 1 Nekrose) (Tab. 4.1.1.1).

Gruppe	Nekrose (Anzahl Tiere)	Ulkus (Anzahl Tiere)
Kontrolle	3	6
10 ng/kg	0	6
30 ng/kg	3	5
150 ng/kg	1	8

Tab. 4.1.1.1: Übersicht über die Anzahl nekrotisch veränderter oder ulzerierter Primärtumoren in den Gruppen der *Scid*-Mäuse.

In die Analyse der Gewichte der Primärtumoren wurden in der Kontrollgruppe 19 Tiere, in der 10- und 30-ng/kg-Gruppe jeweils 20 Tiere und in der 150-ng/kg-Gruppe 18 Tiere einbezogen.

Eine Zusammenfassung der durchschnittlichen Primärtumorgewichte der MV3 Melanomzellen in den einzelnen Gruppen zeigt Tab. 4.1.1.2. Die Primärtumorgewichte lagen in der Kontrollgruppe zwischen 0,50 g und 3,70 g, in der 10-ng/kg-Gruppe zwischen 0,60 g und 3,60 g, in der 30-ng/kg-Gruppe zwischen 0,40 g und 2,90 g und in der 150-ng/kg-Gruppe zwischen 0,27 g und 3,90 g (Tab. 4.1.1.2).

Gruppe	Durchschnittliches TG [g]	Streubreite (min – max) [g]
Kontrolle	1,68 ± 0,19	0,50–3,70
10 ng/kg	1,87 ± 0,21	0,60–3,60
30 ng/kg	1,60 ± 0,16	0,40–2,90
150 ng/kg	1,52 ± 0,21	0,27–3,90

Tab. 4.1.1.2: Übersicht über die durchschnittlichen Primärtumorgewichte mit zugehöriger Streubreite in der jeweiligen Behandlungsgruppe der *Scid*-Mäuse. Die Gewichtsunterschiede zwischen den einzelnen Gruppen waren statistisch nicht signifikant. Gezeigt ist der Mittelwert ± SEM. TG = Tumorgewicht.

Die mittleren Tumorgewichte der 10-ng/kg-Gruppe waren mit 1,87 g um das 1,11-fache erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 1,68 g. Die durchschnittlichen Tumorgewichte der 30-ng/kg-Gruppe mit 1,60 g und der 150-ng/kg-Gruppe mit 1,52 g waren um das 1,05-fache, bzw. um das 1,11-fache leicht erniedrigt im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 1,68 g. Diese Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$) (Abb. 4.1.1.1).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ab einer ML-I-Konzentration im Mistelextrakt von 30 ng/kg KG und größer das Primärtumorgewicht reduziert war.

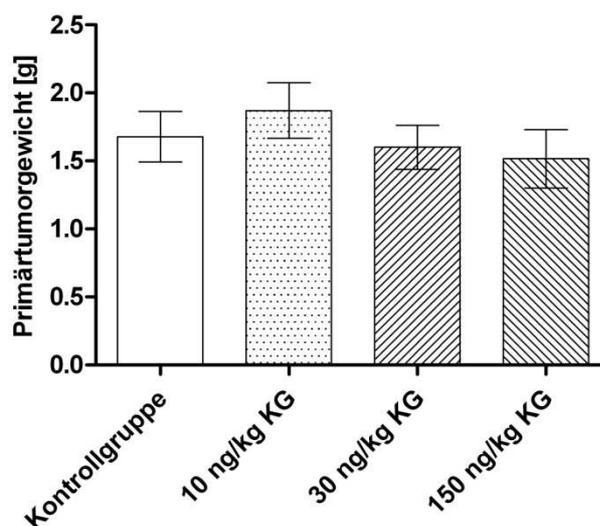


Abb. 4.1.1.1: Durchschnittliches Primärtumorgewicht in den Gruppen der *Scid*-Mäuse. Die Gewichtsunterschiede zwischen der Kontrollgruppe (n = 19) und den Behandlungsgruppen mit 10 (n = 20), 30 (n = 20) und 150 ng/kg KG (n = 18) waren statistisch nicht signifikant. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM.

4.1.2 *E^{-/-}/P^{-/-}/Scid*-Mäuse

Die Inokulation der Melanomzellen verlief bei allen in die Auswertung einbezogenen 80 Tieren ohne Komplikationen. Um die Anwachsrate der inokulierten Melanomzellen zu überprüfen, wurden die Primärtumoren am 7. Tag nach der Impfung palpirt. Bei 67 von 80 Tieren (= 83,75 %) konnte ein Primärtumor palpirt werden, der mindestens reiskorngroß war. Im Verlauf betrug die Anwachsrate 100 % und alle Tumoren waren als Knötchen bzw. Knoten palpabel.

Im Verlauf der Behandlungszeit starb keines der Tiere, sodass 80 Primärtumoren in die Auswertung einbezogen wurden. 3 bis 4 Tage vor Versuche hatten 20 von 80 Tieren (= 25 %) ulzerierte Primärtumoren und 4 Tiere (= 5 %) hatten nekrotisch veränderte Primärtumoren. Von den 24 Tieren mit Ulkus oder Nekrose stammten 9 Tiere aus der Kontrollgruppe (7 Ulzera, 2 Nekrosen), 5 Tiere aus der 10-ng/kg-Gruppe (4 Ulzera, 1 Nekrose), 4 Tiere aus der 30-ng/kg-Gruppe (4 Ulzera) und 6 Tiere aus der 150-ng/kg-Gruppe (5 Ulzera, 1 Nekrose) (Tab. 4.1.2.1).

Gruppe	Nekrose (Anzahl Tiere)	Ulkus (Anzahl Tiere)
Kontrolle	2	7
10 ng/kg	1	4
30 ng/kg	0	4
150 ng/kg	1	5

Tab. 4.1.2.1: Übersicht über die Anzahl nekrotisch veränderter oder ulzerierter Primärtumoren in den Gruppen der $E^{\prime}/P^{\prime}/Scid$ -Mäuse.

Zur Analyse der Primärtumorgewichte kamen in der Kontrollgruppe und der 10-ng/kg-Gruppe 20 Tiere, in der 30-ng/kg-Gruppe 19 Tiere und in der 150-ng/kg-Gruppe 21 Tiere. Eine Übersicht über die durchschnittlichen Primärtumorgewichte der MV3 Melanomzellen in den einzelnen Gruppen gibt Tab. 4.1.2.2. Die Primärtumorgewichte lagen in der Kontrollgruppe zwischen 0,08 g und 2,90 g, in der 10-ng/kg-Gruppe zwischen 0,60 g und 2,50 g, in der 30-ng/kg-Gruppe zwischen 0,10 g und 4,30 g und in der 150-ng/kg-Gruppe zwischen 0,08 g und 3,70 g (Tab. 4.1.2.2).

Gruppe	Durchschnittliches TG [g]	Streubreite (min–max) [g]
Kontrolle	1,19 ± 0,19	0,08–2,90
10 ng/kg	1,54 ± 0,15	0,60–2,50
30 ng/kg	1,62 ± 0,25	0,10–4,30
150 ng/kg	1,19 ± 0,23	0,08–3,70

Tab. 4.1.2.2: Zusammenfassung der durchschnittlichen Primärtumorgewichte mit zugehöriger Streubreite in den Gruppen der $E^{\prime}/P^{\prime}/Scid$ -Mäuse. Die Gewichtsunterschiede zwischen den einzelnen Gruppen waren statistisch nicht signifikant. Gezeigt ist der Mittelwert ± SEM. TG = Tumorgewicht.

Die mittleren Tumorgewichte der 10- und der 30-ng/kg-Gruppe waren mit 1,54 bzw. 1,62 g im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 1,19 g um das 1,29-fache, bzw. um das 1,36-fache erhöht. Das durchschnittliche Tumorgewicht der 150-ng/kg-Gruppe entsprach mit 1,19 g dem der Kontrollgruppe. Diese Unterschiede waren statistisch

nicht signifikant ($p > 0,05$) (Abb. 4.1.2.1). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Primärtumorgewicht unter steigender ML-I-Konzentration des Mistelextrakts zunächst zunahm gegenüber der Kontrollgruppe und in der höchst dosierten Behandlungsgruppe mit 150 ng/kg im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert war.

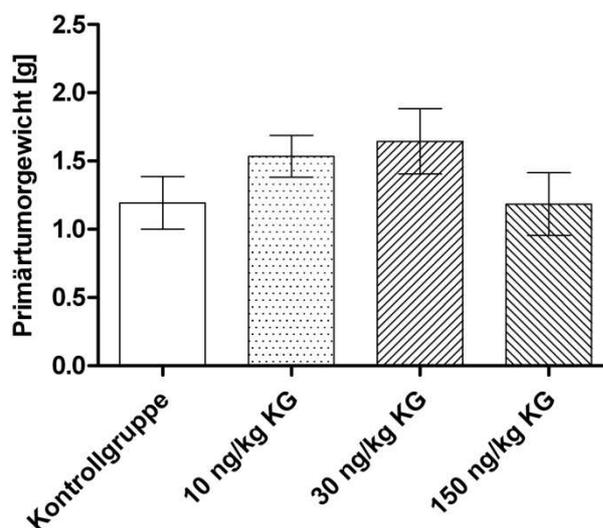


Abb 4.1.2.1: Durchschnittliches Primärtumorgewicht in den Gruppen der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Mäuse. Die Gewichtsunterschiede zwischen der Kontrollgruppe ($n = 20$) und den behandelten Gruppen mit 10 ($n = 20$), bzw. 30 ($n = 19$) und 150 ng/kg KG ($n = 21$) waren statistisch nicht signifikant. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM.

4.1.3 Vergleich der Primärtumoren zwischen *Scid* und $E^{-}/P^{-}/Scid$

Die Anzahl von Tieren mit nekrotischen oder ulzerierten Primärtumoren lag in der *Scid*-Gruppe bei 32 von 77 Tieren (= 41,55 %) und in der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe bei 24 von 80 Tieren (= 30 %). Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

Der aus Tumor-biologischer Fragestellung heraus erhobene Vergleich der durchschnittlichen Primärtumorgewichte zwischen den gesamten Mausgruppen, ergab in der *Scid*-Gruppe ein Durchschnittsgewicht von 1,67 g ($\pm 0,09$ g, $n=77$) und in der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe von 1,37 g ($\pm 0,10$, $n=80$). Damit war das Gewicht in der *Scid*-Gruppe um das 1,21-fache statistisch signifikant erhöht gegenüber der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe ($p < 0,05$) (Abb. 4.1.3.1).

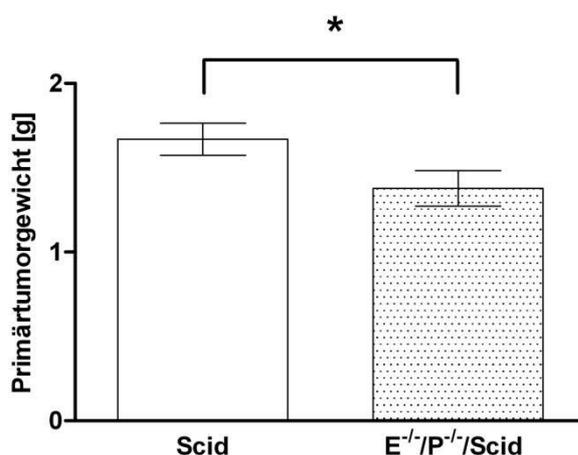


Abb. 4.1.3.1: Durchschnittliches Primärtumorgewicht der Scid-Gruppe gegenüber der E^{-/-}/P^{-/-}/Scid-Gruppe. Das Primärtumorgewicht in der Scid-Gruppe (n = 77) war statistisch signifikant erhöht im Vergleich zur E^{-/-}/P^{-/-}/Scid-Gruppe (n = 80). Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM (*p < 0,05).

Beim Vergleich der behandelten Gruppen mit den Kontrollgruppen beider Mausarten hinsichtlich des Primärtumorgewichtes kamen in der Gruppe der Scid-Tiere 77 Primärtumoren zur Auswertung und in der Gruppe der E^{-/-}/P^{-/-}/Scid-Tiere 80 Primärtumoren. Eine Übersicht über die durchschnittlichen Primärtumorgewichte der MV3 Melanomzellen beider Mausarten gibt Tab. 4.1.3.1.

Gruppe	Primärtumorgewicht [g]		Streubreite (min–max) [g]	
	Scid	E ^{-/-} /P ^{-/-}	Scid	E ^{-/-} /P ^{-/-}
Maus				
Kontrolle	1,68 ± 0,19	1,19 ± 0,19	0,50–3,70	0,08–2,90
10 ng/kg	1,87 ± 0,21	1,54 ± 0,15	0,60–3,60	0,60–2,50
30 ng/kg	1,60 ± 0,16	1,62 ± 0,25	0,40–2,90	0,10–4,30
150 ng/kg	1,52 ± 0,21	1,19 ± 0,23	0,27–3,90	0,08–3,70

Tab 4.1.3.1: Zusammenfassung der durchschnittlichen Primärtumorgewichte mit Streubreite der Scid- und E^{-/-}/P^{-/-}/Scid-Gruppe. Gezeigt ist der Mittelwert ± SEM.

Das durchschnittliche Primärtumorgewicht der Scid-Tiere war sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der 10- und 150-ng/kg-Gruppe im Vergleich zur entsprechenden E^{-/-}/P^{-/-}/Scid-Gruppe statistisch nicht signifikant erhöht (p = 0,0781, bzw. 0,1982 und 0,3049). Nur in der 30-ng/kg-Gruppe war das durchschnittliche

Primärtumorgewicht der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe geringfügig und damit nicht signifikant höher als in der $Scid$ -Gruppe ($p = 0,9435$) (Abb. 4.1.3.2).

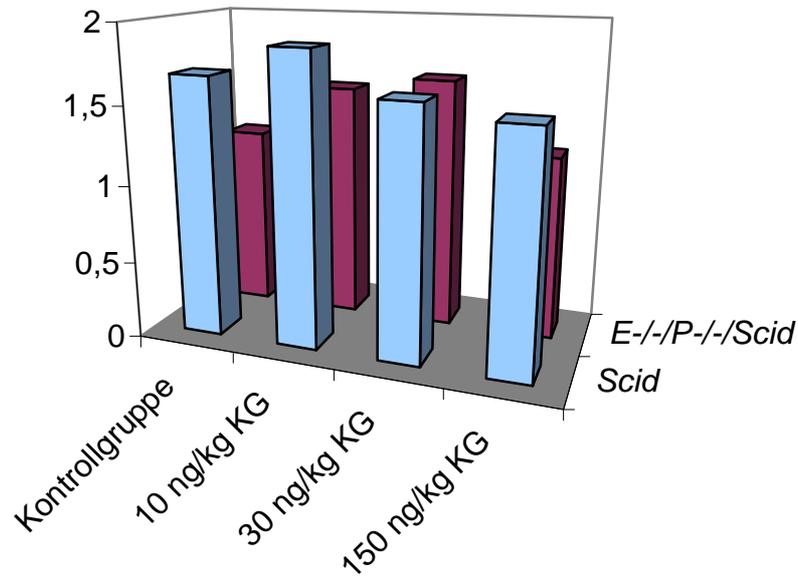


Abb. 4.1.3.2: Durchschnittliches Primärtumorgewicht [g] in den Kontroll- und Behandlungsgruppen der $Scid$ - und $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Tiere. Die $Scid$ -Gruppe war sowohl in der Kontrollgruppe, als auch in der 10- und 150-ng/kg-Gruppe im Vergleich zur entsprechenden $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe erhöht. Nur die durchschnittlichen Gewichte der 30-ng/kg-Gruppe der $Scid$ -Tiere lagen unter der entsprechenden $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe. Die Gewichtsunterschiede zwischen den Gruppen waren statistisch nicht signifikant. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM.

4.2 Lungenmetastasen

Um den Einfluss von ML-I im Mistelextrakt Iscador[®] M spez auf die Lungenmetastasierung zu untersuchen, wurden HE-gefärbte Schnitte angefertigt und die Anzahl der Metastasen, wie unter 3.2.7.3 beschrieben, gezählt.

In die Anzahl der Gesamtmetastasierung wurden in der $Scid$ - und $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe solide extra- und intravasale Metastasen und in der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe zusätzlich extravasale Einzelzellen miteinbezogen, die in der $Scid$ -Gruppe nicht vorhanden waren (Abb. 4.2.1 A und B, Abb. 4.2.2).

Bei der Auszählung und Berechnung der extravasalen Lungenmetastasen wurden in beiden Mausgruppen jeweils nur solide extravasale Metastasen und keine Einzelzellen berücksichtigt (Abb. 4.2.1 A und B).

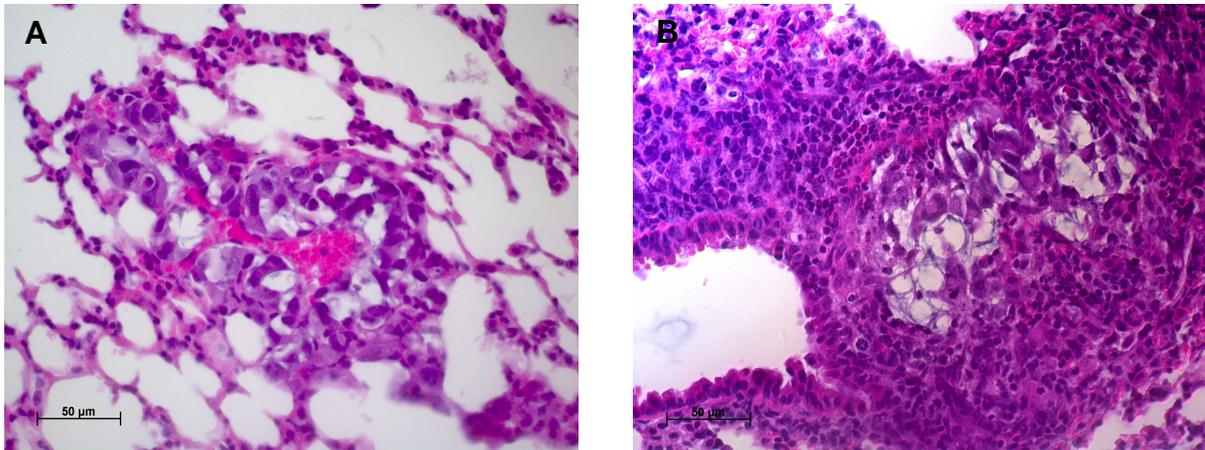


Abb.4.2.1: Extravasale Metastasen in den Lungen der *Scid*- und *E⁻/P⁻/Scid*-Tiere. Dargestellt sind extravasale Metastasen in den Lungen der *Scid*- (Kontrollgruppe) (A) und *E⁻/P⁻/Scid*-Tiere (30-ng/kg-Gruppe) (B) (HE-Färbung). Dabei umgibt die Metastase in A ein Blutgefäß, während die Metastase in B neben einem Blutgefäß wächst. Die Balken entsprechen 50 µm.

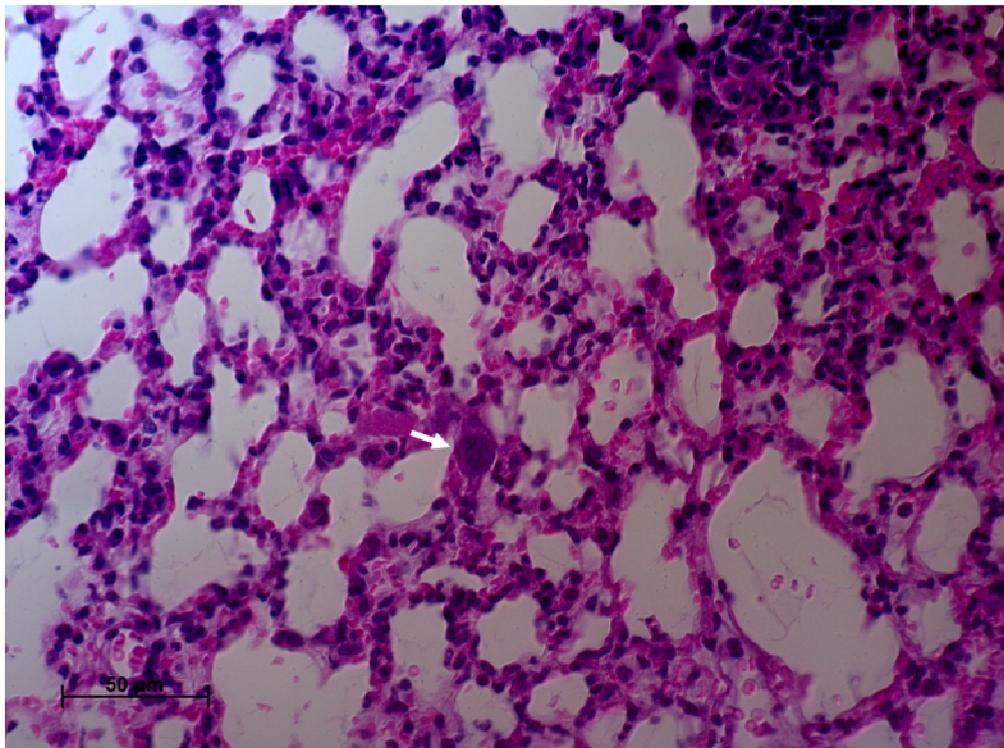


Abb. 4.2.2: Metastasierte Melanomzelle. Gezeigt ist eine einzelne metastasierte Melanomzelle (Pfeil) in der Lunge einer *E⁻/P⁻/Scid*-Maus der 150-ng/kg-Gruppe (HE-Färbung). Der Balken entspricht 50 µm.

Bei der Auszählung und Berechnung der intravasalen Lungenmetastasen wurden in beiden Mausgruppen nur solide intravasale Metastasen berücksichtigt (Abb. 4.2.3 A und B).

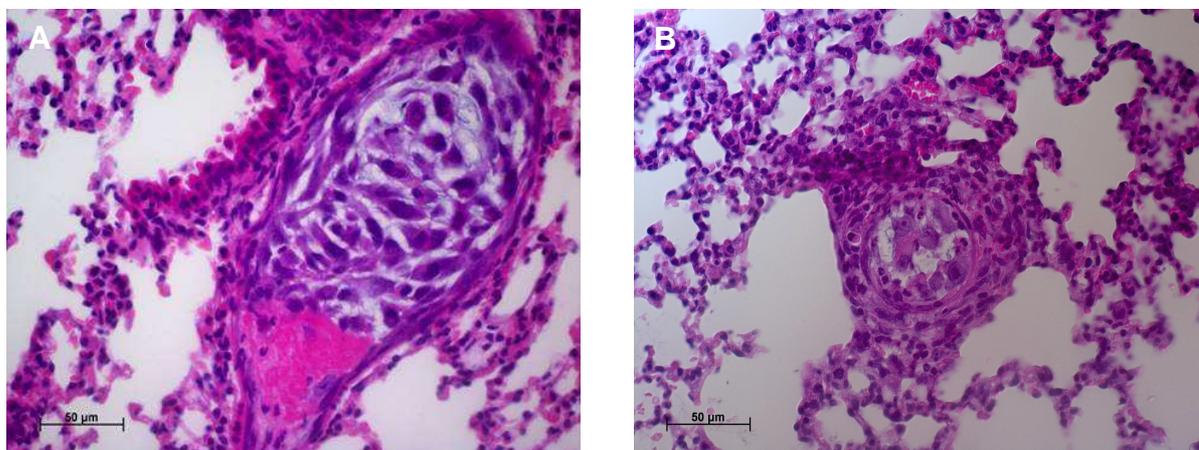


Abb. 4.2.3: Intravasale Metastasen in den Lungen der *Scid*- und *E^{-/-}/P^{-/-}/Scid*-Tiere. Dargestellt sind intravasale Metastasen in den Lungen der *Scid*- (10-ng/kg-Gruppe) (A) und *E^{-/-}/P^{-/-}/Scid*-Tiere (30-ng/kg-Gruppe) (B) (HE-Färbung). Die Balken entsprechen 50 μ m.

4.2.1 *Scid*-Mäuse

Bei der mikroskopischen Zählung der Lungenmetastasen der *Scid*-Mäuse wurden aus der Kontrollgruppe Gewebeschnitte von 15 Tieren, aus der 10-ng/kg-Gruppe von 19, aus der 30-ng/kg-Gruppe ebenfalls von 19 und aus der 150-ng/kg-Gruppe von 18 Tieren ausgewertet.

4.2.1.1 Gesamtmetastasierung

Von insgesamt 71 Tieren, die solide palpable Primärtumoren hatten, bildeten sich bei 51 Tieren (71,83 %) extra- und intravasale Lungenmetastasen aus. Die 12 Tiere mit intravasalen Lungenmetastasen hatten gleichzeitig auch extravasale Metastasen.

In den einzelnen Gruppen stellte sich die Metastasierungsrate wie folgt dar: In der Kontrollgruppe entwickelten 80 % der Tiere (12/15) Lungenmetastasen, in der 10-ng/kg-Gruppe 63,16 % (12/19), in der 30-ng/kg-Gruppe 68,42 % (13/19) und

in der 150-ng/kg-Gruppe entwickelten 77,78 % (14/18) Lungenmetastasen (Tab. 4.2.1.1.1). Von der Gesamtmetastasierungsrate alleinig der Kontrollgruppe mit 80 % (12/15) hatten wiederum 100 % (12/12) der Tiere mit Metastasen extravasale Metastasen und 25 % (3/12) intravasale Metastasen.

Gruppe	Metastasierungsrate [%]	Anzahl Metastasen gesamt	Streubreite (min–max)	Primärtumorgewicht [g]
Kontrolle	80,00	126,30 ± 38,83	0–408	1,68 ± 0,19
10 ng/kg	63,16	131,40 ± 43,08	0–640	1,87 ± 0,21
30 ng/kg	68,42	162,60 ± 53,98	0–757	1,60 ± 0,16
150 ng/kg	77,78	217,60 ± 66,17	0–998	1,52 ± 0,21

Tab. 4.2.1.1.1: Übersicht über Metastasierungsrate, durchschnittliche Anzahl der Lungenmetastasen, Streubreite der Lungenmetastasen und die durchschnittlichen Primärtumorgewichte in der *Scid*-Gruppe. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM.

Die mittlere Anzahl der Lungenmetastasen in der 10-, 30- und 150-ng/kg-Gruppe war mit 131,40 bzw. 162,60 und 217,60 um das 1,04-fache, bzw. das 1,28-fache und das 1,72-fache erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe mit durchschnittlich 126,30 Lungenmetastasen, allerdings waren diese Unterschiede statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$). In der Zusammenfassung ergab sich unter steigender ML-I-Konzentration des Mistelextraktes eine statistisch nicht signifikante kontinuierliche Zunahme der Lungenmetastasierung (Tab. 4.2.1.1.1, Abb. 4.2.1.1.1).

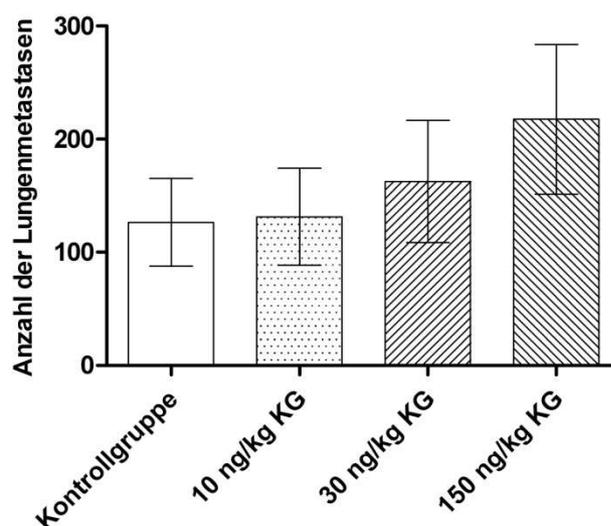


Abb. 4.2.1.1.1: Durchschnittliche Anzahl der gesamten Lungenmetastasen in der Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen der *Scid*-Mäuse. Es zeigte sich ein kontinuierlicher, aber statistisch nicht signifikanter Anstieg der Lungenmetastasen bei zunehmender ML-I-Konzentration des Mistelextraktes in der 10-(n = 19), 30-(n = 19) und 150-ng/kg(n = 18)-Gruppe gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe (n = 15). Gezeigt ist der Mittelwert ± SEM.

4.2.1.2 Extravasale Lungenmetastasen

Eine Übersicht über die Metastasierungsrate der extravasalen Lungenmetastasen, über die durchschnittliche Anzahl der extravasalen Metastasen und die Streubreite in den einzelnen Gruppen gibt Tab. 4.2.1.2.1.

Gruppe	Metastasierungsrate [%]	Anzahl Metastasen Extravasal	Streubreite (min–max)
Kontrolle	80,00	118,80 ± 36,41	0–408
10 ng/kg	63,16	110,50 ± 33,51	0–576
30 ng/kg	68,42	145,20 ± 50,41	0–757
150 ng/kg	77,78	215,10 ± 66,21	0–998

Tab. 4.2.1.2.1: Übersicht über die Metastasierungsrate, die durchschnittliche Anzahl der extravasalen Lungenmetastasen und die Streubreite der Lungenmetastasen in der *Scid*-Gruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.

Von den 71 Tieren der *Scid*-Gruppe hatten 51 Tiere (71,83 %) extravasale Lungenmetastasen. Dies entspricht der Rate der Gesamtmetastasierung (51/71) in der *Scid*-Gruppe.

Die Gesamtmetastasierungsrate der Kontrollgruppe betrug 80 % (12/15). Hiervon hatten wiederum von den Tieren mit Metastasen 100 % (12/12) der Tiere solide extravasale Metastasen.

In den einzelnen Gruppen stellte sich die extravasale Metastasierungsrate wie folgt dar: In der Kontrollgruppe entwickelten 80,00 % (12/15) der Tiere Lungenmetastasen, in der 10-ng/kg-Gruppe 63,16 % (12/19), in der 30-ng/kg-Gruppe 68,42 % (13/19) und in der 150-ng/kg-Gruppe entwickelten 77,78 % (14/18) extravasale Lungenmetastasen (Tab. 4.2.1.2.1).

Die mittlere Anzahl der extravasalen Lungenmetastasen der 10-ng/kg-Gruppe war mit 110,50 um das 1,08-fache gegenüber der Kontrollgruppe mit durchschnittlich 118,80 Lungenmetastasen erniedrigt. Die 30- und die 150-ng/kg-Gruppen waren mit 145,20 bzw. 215,10 extravasalen Lungenmetastasen um das 1,22-fache, bzw. das 1,81-fache gegenüber der Kontrollgruppe mit 118,80 Metastasen erhöht. Diese Unterschiede in der Anzahl der extravasalen Lungenmetastasen zwischen den drei Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe sowie zwischen den Behandlungsgruppen untereinander waren statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$) (Tab. 4.2.1.2.1, Abb. 4.2.1.2.1).

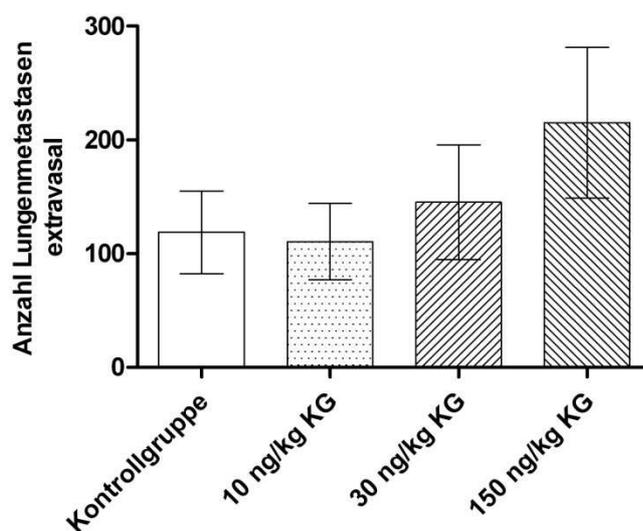


Abb. 4.2.1.2.1: Durchschnittliche Anzahl extravasaler Lungenmetastasen in der Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen der *SciD*-Mäuse. Es zeigte sich ein kontinuierlicher, aber statistisch nicht signifikanter Anstieg der Lungenmetastasen unter zunehmender ML-I-Konzentration des Misteextraktes. Die 10-ng/kg-Gruppe (n = 19) lag unter der Kontrollgruppe. Die 30-(n = 19) und 150-ng/kg-Gruppen (n = 18) waren gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe (n = 15) erhöht. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SEM.

4.2.1.3 Intravasale Lungenmetastasen

Eine Zusammenfassung der Metastasierungsrate, der durchschnittlichen Anzahl der intravasalen Lungenmetastasen und der Streubreite der Lungenmetastasen in den einzelnen Gruppen zeigt Tab. 4.2.1.3.1.

Gruppe	Metastasierungsrate [%]	Anzahl Metastasen intravasal	Streubreite (min–max)
Kontrolle	20,00	7,53 ± 4,36	0–56
10 ng/kg	21,05	20,79 ± 15,27	0–288
30 ng/kg	15,79	17,53 ± 12,00	0–221
150 ng/kg	11,11	2,50 ± 1,72	0–23

Tab. 4.2.1.3.1: Übersicht über die intravasale Metastasierungsrate, die durchschnittliche Anzahl der Lungenmetastasen und die Streubreite der Lungenmetastasen in der *Scid*-Gruppe. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM.

Von den 71 Tieren der *Scid*-Gruppe hatten 12 Tiere (16,90 %) intravasale Lungenmetastasen. Bezogen auf die Rate der Gesamtmetastasierung in der *Scid*-Gruppe von 71,83 % (51/71) hatten 23,53 % (12/51) zusätzlich zu den extravasalen Metastasen auch intravasale Lungenmetastasen.

Die Gesamtmetastasierungsrate der Kontrollgruppe lag bei 80 % (12/15). Davon hatten wiederum 25 % (3/12) der Tiere mit Metastasen intravasale Metastasen.

In den einzelnen Gruppen stellte sich die Metastasierungsrate wie folgt dar: In der Kontrollgruppe entwickelten 20 % (3/15) der Tiere Lungenmetastasen, in der 10-ng/kg-Gruppe 21,05 % (4/19), in der 30-ng/kg-Gruppe 15,79 % (3/19) und in der 150-ng/kg-Gruppe entwickelten 11,11 % (2/18) intravasale Lungenmetastasen (Tab. 4.2.1.3.1).

Die mittlere Anzahl der intravasalen Lungenmetastasen der 10- und 30-ng/kg-Gruppe war mit 20,79 bzw. 17,53 um das 2,76-fache, bzw. das 2,32-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe mit durchschnittlich 7,53 Lungenmetastasen erhöht. Die 150-ng/kg-Gruppe lag mit durchschnittlich 2,5 intravasalen Lungenmetastasen um das 3,01-fache unter der Kontrollgruppe mit 7,53. Diese Unterschiede in der Anzahl der intravasalen Lungenmetastasen, sowohl zwischen den drei Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe als auch zwischen den Behandlungsgruppen untereinander, waren statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$) (Tab. 4.2.1.3.1, Abb. 4.2.1.3.1).

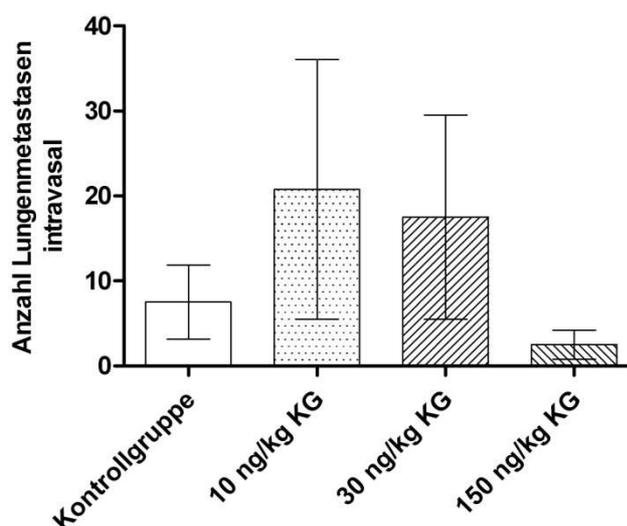


Abb. 4.2.1.3.1: Durchschnittliche Anzahl intravasaler Lungenmetastasen in der Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen der *Scid*-Mäuse. Es zeigte sich in der behandelten 10-(n = 19) und 30-ng/kg-Gruppe (n = 19) ein Anstieg der Lungenmetastasierung im Vergleich zur Kontrollgruppe (n = 15), der statistisch nicht signifikant war. In der Behandlungsgruppe mit 150 ng/kg (n = 18) war wiederum ein statistisch nicht signifikanter Rückgang der Metastasierung unter die Kontrollgruppe festzustellen. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SEM.

4.2.2 $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Mäuse

Bei der mikroskopischen Zählung der Lungenmetastasen der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Mäuse wurden in der Kontrollgruppe Gewebeschnitte von 19 Tieren, in der 10-ng/kg-Gruppe von 20, in der 30-ng/kg-Gruppe ebenfalls von 20 und in der 150-ng/kg-Gruppe von 21 Tieren ausgewertet.

4.2.2.1 Gesamtmetastasierung

Von insgesamt 80 Tieren, die solide palpable Primärtumoren hatten, bildeten sich bei 45 Tieren (56,25 %) extra- und/oder intravasale Lungenmetastasen und/oder einzelne Tumorzellen aus. Zwei Tiere mit intravasalen Lungenmetastasen hatten parallel keine extravasalen Metastasen und Einzelzellen. Ebenfalls hatten zwei Tiere ausschließlich metastasierte Einzelzellen.

In den einzelnen Gruppen stellte sich die Metastasierungsrate wie folgt dar: In der Kontrollgruppe entwickelten 57,89 % (11/19) der Tiere

Lungenmetastasen, in der 10-ng/kg-Gruppe 50 % (10/20), in der 30-ng/kg-Gruppe 60 % (12/20) und in der 150-ng/kg-Gruppe entwickelten 57,14 % (12/21) Lungenmetastasen (Tab. 4.2.2.1.1). In der Kontrollgruppe mit der Gesamtmetastasierungsrate von 57,89 % (11/19) hatten wiederum 72,73 % (8/11) der Tiere mit Metastasen extravasale Metastasen, 18,18 % (2/11) intravasale Metastasen und 36,36 % (4/11) zudem extravasale Einzelzellen.

Gruppe	Metastasierungsrate [%]	Anzahl Metastasen gesamt	Streubreite (min–max)	Primärtumorgewicht [g]
Kontrolle	57,89	97,21 ± 35,37	0–510	1,19 ± 0,19
10 ng/kg	50,00	171,80 ± 67,16	0–1241	1,54 ± 0,15
30 ng/kg	60,00	144,20 ± 45,84	0–699	1,62 ± 0,25
150 ng/kg	57,14	190,10 ± 58,16	0–998	1,19 ± 0,23

Tab. 4.2.2.1.1: Übersicht über Metastasierungsrate, durchschnittliche Anzahl der Lungenmetastasen, Streubreite der Lungenmetastasen und die durchschnittlichen Primärtumorgewichte in der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM.

Die mittlere Anzahl der Lungenmetastasen der 10-, 30- und 150-ng/kg-Gruppe war mit 171,80 bzw. 144,20 und 190,10 um das 1,77-fache, bzw. das 1,48-fache und das 1,95-fache erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe mit durchschnittlich 97,21 Lungenmetastasen. Allerdings waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$). Zusammengefasst konnte eine diskontinuierliche Zunahme der Lungenmetastasierung unter steigender ML-I-Konzentration des Mistelextraktes beobachtet werden, die unter 30 ng/kg KG etwas schwächer verlief als unter 10- und 150 ng/kg KG (Tab. 4.2.2.1.1, Abb. 4.2.2.1.1).

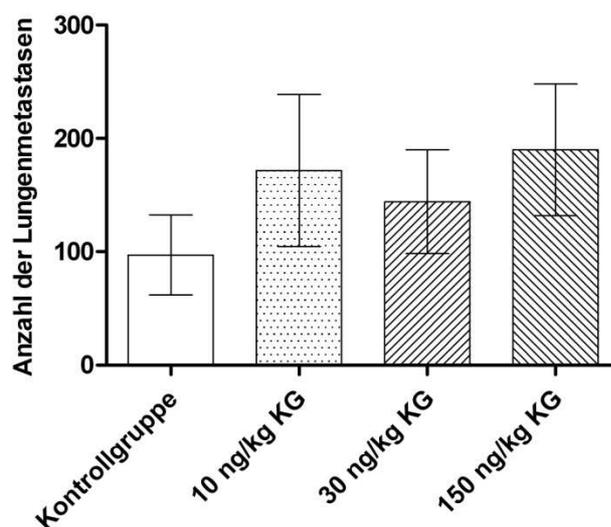


Abb. 4.2.2.1.1: Durchschnittliche Anzahl der gesamten Lungenmetastasen in der Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Mäuse. Es zeigte sich ein nicht signifikanter Anstieg der Lungenmetastasen unter steigender Dosierung von ML-I im Mistelextrakt in der 10-(n = 20), 30-(n = 20) und 150-ng/kg-Gruppe (n = 21) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (n = 19). Gezeigt ist der Mittelwert \pm SEM.

4.2.2.2 Extravasale Lungenmetastasen

Eine Übersicht über die Metastasierungsrate, die durchschnittliche Anzahl der extravasalen Lungenmetastasen und die Streubreite der Lungenmetastasen in den einzelnen Gruppen gibt Tab. 4.2.2.2.1.

Gruppe	Metastasierungsrate [%]	Anzahl Metastasen extravasal	Streubreite (min–max)
Kontrolle	42,10	79,42 \pm 31,50	0–432
10 ng/kg	45,00	150,70 \pm 64,43	0–1203
30 ng/kg	60,00	131,40 \pm 43,12	0–662
150 ng/kg	52,38	173,60 \pm 55,08	0–960

Tab. 4.2.2.2.1: Übersicht über die extravasale Metastasierungsrate, die durchschnittliche Anzahl der Lungenmetastasen und die Streubreite der Lungenmetastasen in der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM.

Von den 80 Tieren der $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Gruppe hatten genau 40 (50 %) extravasale Lungenmetastasen. Bezogen auf die Gesamtmetastasierungsrate von 56,25 % (45/80) hatten 88,88 % (40/45) der Tiere extravasale Lungenmetastasen.

In der Kontrollgruppe lag die Gesamtmetastasierungsrate bei 57,89 % (11/19). Hiervon hatten wiederum 72,73 % (8/11) der Tiere mit Metastasen extravasale Metastasen.

In den einzelnen Gruppen stellte sich die extravasale Metastasierungsrate wie folgt dar: In der Kontrollgruppe entwickelten 42,10 % (8/19) der Tiere Lungenmetastasen, in der 10-ng/kg-Gruppe 45 % (9/20), in der 30-ng/kg-Gruppe 60 % (12/20) und in der 150-ng/kg-Gruppe entwickelten 52,38 % (11/21) extravasale Lungenmetastasen (Tab. 4.2.2.2.1).

Die mittlere Anzahl der extravasalen Lungenmetastasen jeder einzelnen behandelten Gruppe lag über der Anzahl der Kontrollgruppe. Die 10-ng/kg-Gruppe war mit 150,70 um das 1,90-fache erhöht gegenüber der Kontrollgruppe mit durchschnittlich 79,42 extravasalen Lungenmetastasen. Die 30- und die 150-ng/kg-Gruppe war mit 131,40 bzw. 173,60 extravasalen Lungenmetastasen um das 1,65-fache, bzw. das 2,19-fache erhöht gegenüber der Kontrollgruppe mit 79,42 Metastasen. Diese Unterschiede in der Anzahl der extravasalen Lungenmetastasen zwischen den drei Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe und zwischen den Behandlungsgruppen untereinander waren statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$) (Tab. 4.2.2.2.1, Abb. 4.2.2.2.1).

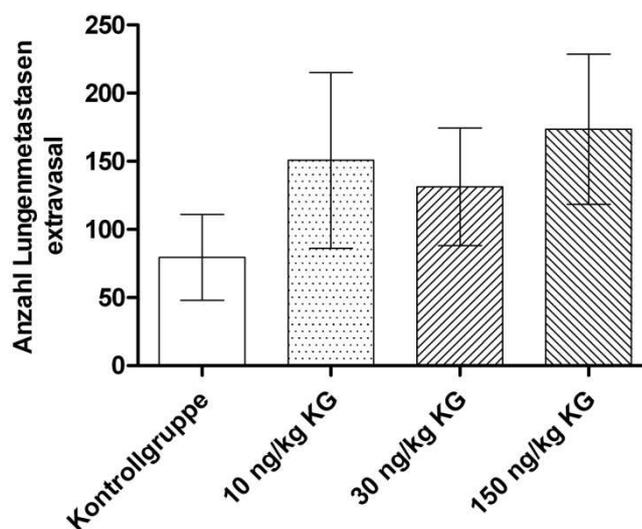


Abb. 4.2.2.2.1: Durchschnittliche Anzahl extravasaler Lungenmetastasen in der Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen der $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Mäuse. Es zeigte sich ein nicht signifikanter Anstieg der Lungenmetastasen unter steigender Dosierung von ML-I im Mistelextrakt in der 10-(n = 20), 30-(n = 20) und 150-ng/kg-Gruppe (n = 21) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (n = 19). Gezeigt ist der Mittelwert \pm SEM.

4.2.2.3 Intravasale Lungenmetastasen

Eine Zusammenfassung der Metastasierungsrate, der durchschnittlichen Anzahl der intravasalen Lungenmetastasen und der Streubreite der Lungenmetastasen in den einzelnen Gruppen zeigt Tab. 4.2.2.3.1.

Gruppe	Metastasierungsrate [%]	Anzahl Metastasen intravasal	Streubreite (min–max)
Kontrolle	10,53	9,95 \pm 6,84	0–96
10 ng/kg	10,00	4,70 \pm 3,26	0–52
30 ng/kg	20,00	9,70 \pm 4,56	0–61
150 ng/kg	4,76	2,10 \pm 2,10	0–44

Tab. 4.2.2.3.1: Übersicht über die intravasale Metastasierungsrate, die durchschnittliche Anzahl der Lungenmetastasen und die Streubreite der Lungenmetastasen in der $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Gruppe. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM.

Von den 80 Tieren der *E⁻/P⁻/Scid*-Gruppe entwickelten 9 Tiere (11,25 %) intravasale Lungenmetastasen. Bezogen auf die Rate der Gesamtmetastasierung von 56,25 % (45/80) wurden 20 % (9/45) durch intravasale Lungenmetastasen verursacht.

Die Gesamtmetastasierungsrate der Kontrollgruppe lag bei 57,89 % (11/19). Davon hatten wiederum 18,18 % (2/11) der Tiere mit Metastasen intravasale Metastasen.

Aufgegliedert in die Gruppen verhielt sich die intravasale Metastasierungsrate folgendermaßen: in der Kontrollgruppe entwickelten 10,53 % (2/19) der Tiere intravasale Lungenmetastasen, in der 10-ng/kg-Gruppe 10 % (2/20), in der 30-ng/kg-Gruppe 20 % (4/20) und in der 150-ng/kg-Gruppe entwickelten 4,76 % (1/21) intravasale Lungenmetastasen (Tab. 4.2.2.3.1).

Die mittlere Anzahl der intravasalen Lungenmetastasen aller behandelten Gruppen lag unter der Anzahl der Kontrollgruppe. Die 10-, 30- und 150-ng/kg-Gruppe war mit 4,70 bzw. 9,70 und 2,10 um das 2,12-fache, bzw. das 1,03-fache und das 4,74-fache erniedrigt im Vergleich zur Kontrollgruppe mit durchschnittlich 9,95 Lungenmetastasen. Allerdings waren diese Unterschiede, sowohl zwischen den drei Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe als auch zwischen den Behandlungsgruppen untereinander, statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$) (Tab. 4.2.2.3.1, Abb. 4.2.2.3.1).

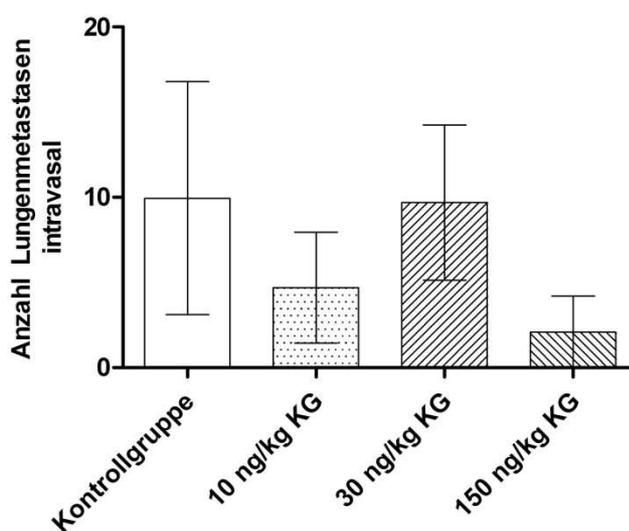


Abb. 4.2.2.3.1: Durchschnittliche Anzahl intravasaler Lungenmetastasen in der Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Mäuse. Es zeigte sich ein nicht signifikanter Rückgang der Lungenmetastasierung unter der Behandlung mit Iscador[®] M spez in der 10- (n = 20), 30- (n = 20) und 150-ng/kg-Gruppe (n = 21) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (n = 19). Gezeigt ist der Mittelwert \pm SEM.

4.2.2.4 Einzelne metastasierte Melanomzellen in den Lungen

Einen Überblick über die Metastasierungsrate der Einzelzellen, über deren Streubreite, über die durchschnittliche Anzahl der metastasierten Einzelzellen und zum Vergleich auch über die Anzahl der Gesamtmetastasierung gibt Tab. 4.2.2.4.1.

Gruppe	Metastasierungsrate [%]	Streubreite (min–max)	Anzahl Einzelzellen extravasal	Anzahl Metastasen gesamt
Kontrolle	21,05	0–44,80	7,92 \pm 3,65	97,21 \pm 35,37
10 ng/kg	20,00	0–120	16,28 \pm 8,05	171,80 \pm 67,16
30 ng/kg	10,00	0–32,80	3,16 \pm 2,18	144,20 \pm 45,84
150 ng/kg	33,33	0–56	14,44 \pm 4,76	190,10 \pm 58,16

Tab. 4.2.2.4.1: Übersicht über Metastasierungsrate der extravasalen Einzelzellen, Streubreite der Einzelzellen, durchschnittliche Anzahl der metastasierten Einzelzellen und durchschnittliche Anzahl der gesamten Metastasen in der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM.

Von den insgesamt 80 Tieren der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe hatten 17 Tiere (21,25 %) extravasale metastasierte Einzelzellen in den Lungen. Bezogen auf die Rate der Gesamtmetastasierung von 56,25 % (45/80) wurden 37,78 % (17/45) durch Einzelzellen herbeigeführt. Zwei der 17 Tiere hatten nur Einzelzellen in der Lunge, während die anderen 15 Tiere parallel noch mehrzellige Metastasen entwickelt hatten.

In der Kontrollgruppe lag die Gesamtmetastasierung bei 57,89 % (11/19). Hiervon hatten 36,36 % (4/11) der Tiere mit Metastasen extravasale Einzelzellen.

In den einzelnen Gruppen stellte sich die Metastasierungsrate der Einzelzellen wie folgt dar: In der Kontrollgruppe wiesen 21,05 % der Tiere Einzelzellen auf, in der 10-ng/kg-Gruppe 20 %, in der 30-ng/kg-Gruppe 10 % und in der 150-ng/kg-Gruppe 33,33 % (Tab. 4.2.2.4.1).

Die mittlere Anzahl der metastasierten Einzelzellen in der 10- und 150-ng/kg-Gruppe war mit 16,28 und 14,44 um das 2,06-fache, bzw. das 1,82-fache erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 7,92. Die mittlere Zahl der Einzelzellen in der 30-ng/kg-Gruppe lag mit 3,16 um das 2,50-fache unter dem Wert der Kontrollgruppe. Diese Unterschiede in der Anzahl der metastasierten Einzelzellen zwischen den vier Gruppen waren statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$) (Tab. 4.2.2.4.1, Abb. 4.2.2.4.1).

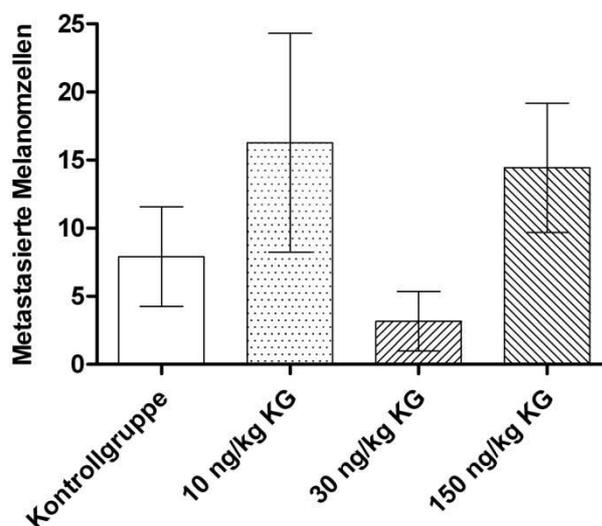


Abb. 4.2.2.4.1: Darstellung der durchschnittlichen Anzahl der metastasierten einzelnen Melanomzellen in der Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Mäuse. Es zeigte sich ein nicht signifikanter Anstieg der metastasierten Einzelzellen in der 10- (n = 20) und 150 ng/kg (n = 21) Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (n = 19). In der 30-ng/kg-Gruppe (n = 20) war ein Abfall unter den Wert der Kontrollgruppe zu verzeichnen, der statistisch nicht signifikant war. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SEM.

4.2.3 Vergleich der Gesamtmetastasierung zwischen *Scid* und $E^{-}/P^{-}/Scid$

In der *Scid*-Gruppe wurden 71 Lungen und in der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe 80 Lungen bewertet.

In der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe wurden zusätzlich zu den soliden extra- und intravasalen Metastasen extravasale einzelne Tumorzellen berücksichtigt, die in den Lungen der *Scid*-Mäuse nicht vorhanden waren.

Der Vergleich der Gesamtmetastasierungsraten zwischen sämtlichen Behandlungsgruppen beider Mausarten ergab für die *Scid*-Gruppe mit 71,83 % (51 Tiere von 71 hatten Metastasen) ein 15,58 % (1,28-fach) höheres Ergebnis gegenüber der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe mit 56,25 % (45 von 80 Tieren hatten Metastasen).

Der Vergleich der Gesamtmetastasierungsraten zwischen den Kontrollgruppen beider Mausarten ergab 80 % (12/15) für die *Scid*-Gruppe und 57,89 % (11/19) für die $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe. Damit ergab sich durch die

Selektindefizienz eine Abnahme der Gesamtmetastasierungsrate um 22,11 % in der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe gegenüber der $Scid$ -Gruppe.

Die Metastasierungsrate war nicht nur in der Kontrollgruppe, sondern auch in den behandelten $Scid$ -Gruppen höher als in der entsprechenden $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe (Tab. 4.2.3.1).

Gruppe	Metastasierungs-Rate [%]		Anzahl Metastasen gesamt		Streubreite (min–max)	
	<i>Scid</i>	E^{-}/P^{-}	<i>Scid</i>	E^{-}/P^{-}	<i>Scid</i>	E^{-}/P^{-}
Maus						
Kontrolle	80,00	57,89	126,30	97,21	0–408	0–510
10 ng/kg	63,16	50,00	131,40	171,80	0–640	0–1241
30 ng/kg	68,42	60,00	162,60	144,20	0–757	0–699
150 ng/kg	77,78	57,14	217,60	190,10	0–998	0–998

Tab. 4.2.3.1: Übersicht über Metastasierungsrate, durchschnittliche Anzahl der Lungenmetastasen und Streubreite der Lungenmetastasen in den beiden Mausgruppen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. $E^{-}/P^{-} = E^{-}/P^{-}/Scid$.

Der Vergleich der mittleren Metastasenanzahl zwischen $Scid$ und $E^{-}/P^{-}/Scid$ zeigte ein diffuses Bild, bei dem die Tumoren in der $Scid$ -Gruppe überwiegend mehr Metastasen entwickelt hatten: Sowohl die Kontrollgruppe ($p = 0,5842$), als auch die 30-ng/kg-Gruppe ($p = 0,7954$) und die 150-ng/kg-Gruppe ($p = 0,7560$) der $Scid$ -Tiere lag über der entsprechenden $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe. Nur die 10-ng/kg-Gruppe der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Mäuse lag als einzige über der Anzahl in der entsprechenden $Scid$ -Gruppe ($p = 0,6198$) (Tab. 4.2.3.1, Abb. 4.2.3.1).

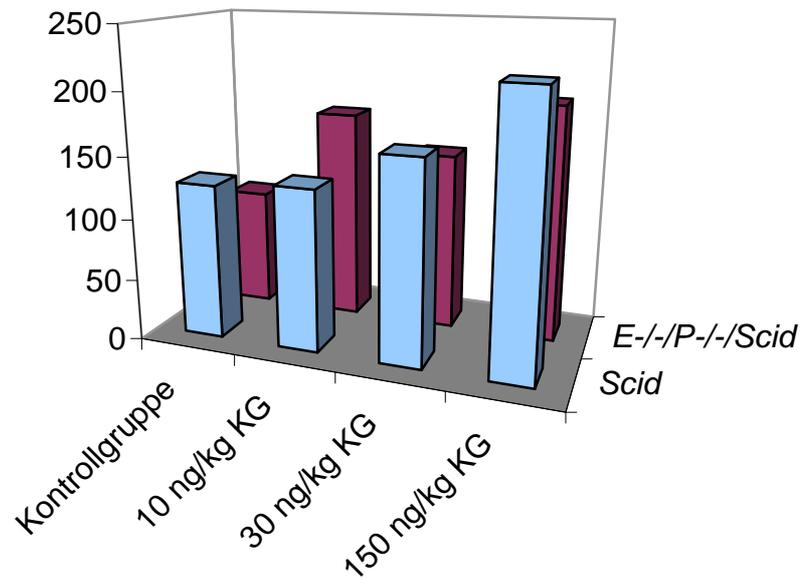


Abb. 4.2.3.1: Durchschnittliche Anzahl der Lungenmetastasen (Gesamtmetastasierung) in der Scid- und E⁻/P⁻/Scid-Gruppe. Sowohl die Kontrollgruppe, als auch die 30- und 150-ng/kg-Gruppe der Scid-Tiere war gegenüber der entsprechenden E⁻/P⁻/Scid-Gruppe erhöht. Nur die 10-ng/kg-Gruppe der Scid-Tiere lag unter der 10-ng/kg-Gruppe der E⁻/P⁻/Scid-Tiere. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren statistisch nicht signifikant. Gezeigt ist der Mittelwert ± SEM.

4.2.4 Vergleich der extravasalen Lungenmetastasen zwischen Scid und E⁻/P⁻/Scid

In der Scid-Gruppe wurden 71 Lungen und in der E⁻/P⁻/Scid-Gruppe 80 Lungen bewertet.

Die Metastasierungsrate extravasaler Metastasen in der Scid-Gruppe lag bei 71,83 % (51/71). In der E⁻/P⁻/Scid-Gruppe lag die Metastasierungsrate bei 50 % (40/80).

Beim Vergleich des prozentualen Anteils extravasaler Metastasen an der jeweiligen Gesamtmetastasierungsrate zwischen beiden Mausgruppen, lag die Scid-Gruppe mit 100 % (51/51) (Zahl der Tiere mit extravasalen Metastasen entspricht der Anzahl von Tieren in der Gesamtmetastasierung) um das 1,12-fache über der

$E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe mit einem extravasalen Anteil von 88,88 % (40/45) an der Gesamtmetastasierung.

Der Vergleich der extravasalen Metastasierungsraten zwischen den Kontrollgruppen ergab 80 % (12/15) für die *Scid*-Gruppe und 42,10 % (8/19) für die $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe. Folglich führte die Selektindefizienz zu einer Senkung der extravasalen Metastasierungsrate um 37,9 % in der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe.

Die extravasale Metastasierungsrate der *Scid*-Gruppe erwies sich nicht nur in der Kontrollgruppe, sondern auch in allen drei Behandlungsgruppen als erhöht gegenüber der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe. In der Kontrollgruppe lagen die *Scid*-Tiere um das 1,90-fache über den $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Tieren, in der 10-ng/kg-Gruppe um das 1,40-fache, in der 30-ng/kg-Gruppe um das 1,14-fache und in der 150-ng/kg-Gruppe um das 1,48-fache (Tab.4.2.4.1).

Gruppe	Metastasierungsrate, extravasal [%]		Anzahl Metastasen extravasal		Anzahl Metastasen gesamt	
	<i>Scid</i>	E^{-}/P^{-}	<i>Scid</i>	E^{-}/P^{-}	<i>Scid</i>	E^{-}/P^{-}
Maus	<i>Scid</i>	E^{-}/P^{-}	<i>Scid</i>	E^{-}/P^{-}	<i>Scid</i>	E^{-}/P^{-}
Kontrolle	80,00	42,10	118,80 ± 36,41	79,42 ± 31,50	126,30	97,21
10 ng/kg	63,16	45,00	110,50 ± 33,51	150,70 ± 64,43	131,40	171,80
30 ng/kg	68,42	60,00	145,20 ± 50,41	131,40 ± 43,12	162,60	144,20
150 ng/kg	77,78	52,38	215,10 ± 66,21	173,60 ± 55,08	217,60	190,10

Tab. 4.2.4.1: Übersicht über die Metastasierungsrate extravasaler Metastasen, über die durchschnittliche Anzahl extravasaler Lungenmetastasen und die durchschnittliche Anzahl der gesamten Lungenmetastasen in den beiden Mausgruppen. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM. $E^{-}/P^{-} = E^{-}/P^{-}/Scid$.

Ähnlich wie bei der Metastasierungsrate verhielt es sich bei der Gegenüberstellung der mittleren extravasalen Metastasenanzahl von *Scid* und $E^{-}/P^{-}/Scid$. Hier lag die Anzahl der Metastasen in der 10-ng/kg-Gruppe der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Mäuse als einzige über der Anzahl in der entsprechenden *Scid*-Gruppe ($p = 0,5893$). Sowohl die Kontrollgruppe ($p = 0,4180$), als auch die 30-ng/kg-Gruppe ($p = 0,8363$) und die

150-ng/kg-Gruppe ($p = 0,6304$) der *Scid*-Tiere lag über der entsprechenden $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Gruppe (Tab. 4.2.4.1, Abb. 4.2.4.1).

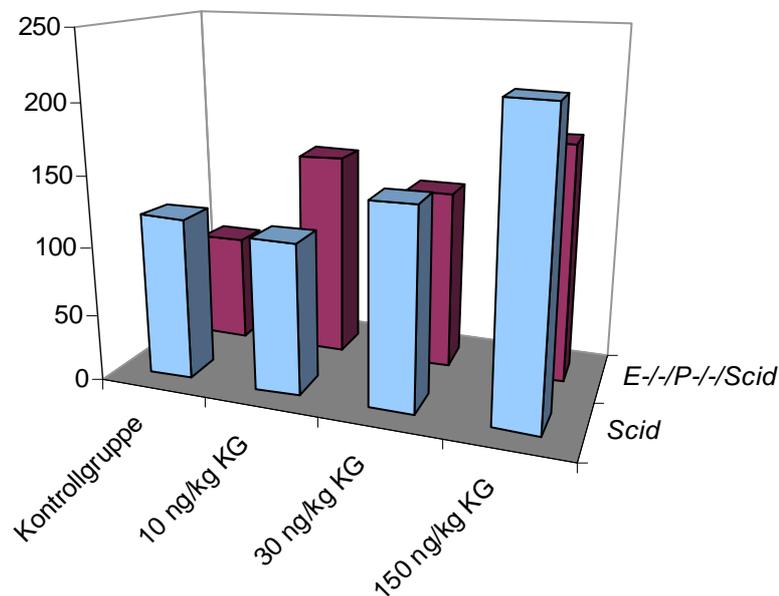


Abb. 4.2.4.1: Durchschnittliche Anzahl extravasaler Lungenmetastasen in der *Scid*- und $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Gruppe. Sowohl die Kontrollgruppe, als auch die 30- und 150-ng/kg-Gruppe der *Scid*-Tiere war gegenüber der entsprechenden $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Gruppe erhöht. Lediglich die 10-ng/kg-Gruppe der *Scid*-Tiere lag unter der 10-ng/kg-Gruppe der $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Tiere. Diese Unterschiede zwischen den Gruppen waren statistisch nicht signifikant. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SEM.

4.2.5 Vergleich der intravasalen Lungenmetastasen zwischen *Scid* und $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$

In der *Scid*-Gruppe wurden 71 Lungen und in der $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Gruppe 80 Lungen bewertet (Tab. 4.2.5.1).

Gruppe	Metastasierungsrate, intravasal [%]		Anzahl Metastasen intravasal		Anzahl Metastasen gesamt	
	<i>Scid</i>	<i>E⁻/P⁻</i>	<i>Scid</i>	<i>E⁻/P⁻</i>	<i>Scid</i>	<i>E⁻/P⁻</i>
Maus						
Kontrolle	20,0	10,5	7,5 ± 4,36	9,9 ± 6,83	126,3	97,2
10 ng/kg	21,1	10,0	20,8 ± 15,27	4,7 ± 3,25	131,4	171,8
30 ng/kg	15,8	20,0	17,5 ± 12,00	9,7 ± 4,55	162,6	144,2
150 ng/kg	11,1	4,7	2,5 ± 1,71	2,1 ± 2,09	217,6	190,1

Tab. 4.2.5.1: Übersicht über die Metastasierungsrate intravasaler Metastasen, über die durchschnittliche Anzahl der intravasalen Lungenmetastasen und die durchschnittliche Anzahl der gesamten Lungenmetastasen in den beiden Mausgruppen. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM. $E^{-}/P^{-} = E^{-}/P^{-}/Scid$.

Die Metastasierungsrate intravasaler Metastasen in der *Scid*-Gruppe lag bei 16,90 % (12/71). In der *E⁻/P⁻/Scid*-Gruppe lag die Metastasierungsrate bei 11,25 % (9/80).

Beim Vergleich des prozentualen Anteils intravasaler Metastasen an der Gesamtmetastasierungsrate zwischen beiden Mausgruppen lagen die Metastasen in der *Scid*-Gruppe mit 23,52 % (12/51) um das 1,17-fache über denen der *E⁻/P⁻/Scid*-Gruppe mit einem intravasalen Anteil von 20 % an der Gesamtmetastasierungsrate.

Der Vergleich der intravasalen Metastasierungsraten zwischen den Kontrollgruppen ergab 20 % (3/15) für die *Scid*-Gruppe und 10,53 % (2/19) für die *E⁻/P⁻/Scid*-Gruppe. Folglich führte die Selektindefizienz zu einer Senkung der intravasalen Metastasierungsrate um 9,47 % in der *E⁻/P⁻/Scid*-Gruppe.

Die intravasale Metastasierungsrate der *Scid*-Gruppe zeigte sich nicht nur in der Kontrollgruppe, sondern auch in der 10- und 150-ng/kg-Gruppe höher als in der *E⁻/P⁻/Scid*-Gruppe. Nur in der 30-ng/kg-Gruppe war die Metastasierungsrate der *E⁻/P⁻/Scid*-Gruppe höher als in der *Scid*-Gruppe. In der Kontrollgruppe lagen die *Scid*-Tiere um das 1,90-fache über den *E⁻/P⁻/Scid*-Tieren, in der 10-ng/kg-Gruppe um das 2,10-fache und in der 150-ng/kg-Gruppe um das 2,30-fache. In der 30-ng/kg-

Gruppe lagen die *Scid*-Tiere um das 1,30-fache unter der $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Gruppe (Tab. 4.2.5.1).

Anders verhielt es sich beim Vergleich der mittleren intravasalen Metastasenanzahl zwischen *Scid* und $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$. Hier war es die Kontrollgruppe der $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Mäuse, die als einzige über der Anzahl in der *Scid*-Kontrollgruppe lag ($p = 0,7815$). Sowohl die 10-ng/kg-Gruppe ($p = 0,2981$) als auch die 30-ng/kg-Gruppe ($p = 0,5381$) und die 150-ng/kg-Gruppe ($p = 0,8845$) der *Scid*-Tiere lag über der entsprechenden $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Gruppe (Tab. 4.2.5.1, Abb. 4.2.5.1).

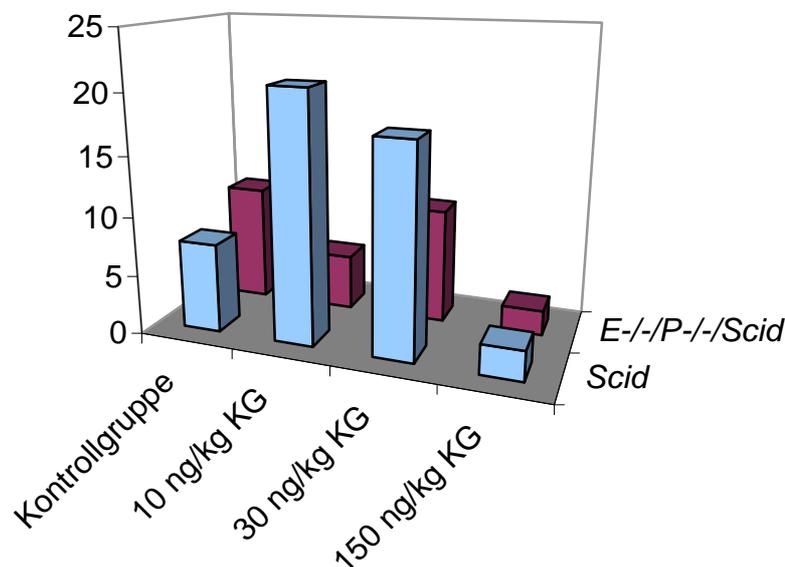


Abb. 4.2.5.1: Durchschnittliche Anzahl intravasaler Lungenmetastasen in der *Scid*- und $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Gruppe. Der Vergleich zwischen *Scid* und $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ zeigte, dass lediglich die Kontrollgruppe der *Scid*-Tiere weniger intravasale Metastasen hatte, als die entsprechende Gruppe der $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Tiere. Sowohl die 10- als auch die 30- und 150-ng/kg-Gruppe der *Scid*-Tiere war gegenüber der entsprechenden $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Gruppe erhöht. Diese Unterschiede zwischen den Gruppen waren statistisch nicht signifikant. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SEM.

4.3 Dendritische Zellen in den Primärtumoren

Bei der makroskopischen Begutachtung der Primärtumoren fiel eine große Zahl durch oberflächliche Ulzeration oder Nekrose auf. Wie in Kapitel 4.1.1 und 4.1.2. beschrieben, betrafen diese Veränderungen die Kontrollgruppen und sämtliche Behandlungsgruppen beider Mausarten. Zudem war etwa ein Viertel der

Primärtumoren im Innern mit klarem Mukoid gefüllt. Für die Mikroskopie der BSA-I-gefärbten Dendriten bedeutete das, dass oft nur ein schmaler Randsaum unbeeinträchtigten Tumorgewebes für die Zählung zur Verfügung stand. In den Gewebeschnitten der Primärtumoren färbten sich die Nekroseareale und Lymphozyten, die Bindegewebezellen der Tumorkapsel und größere Gefäße an. Die dendritischen Zellen reagierten mit einer homogenen, intensiven Rotfärbung des gesamten Zytoplasmas, sodass eine morphologische Abgrenzung anhand der Zellfortsätze gut möglich war (Abb. 4.3.1 A und B).

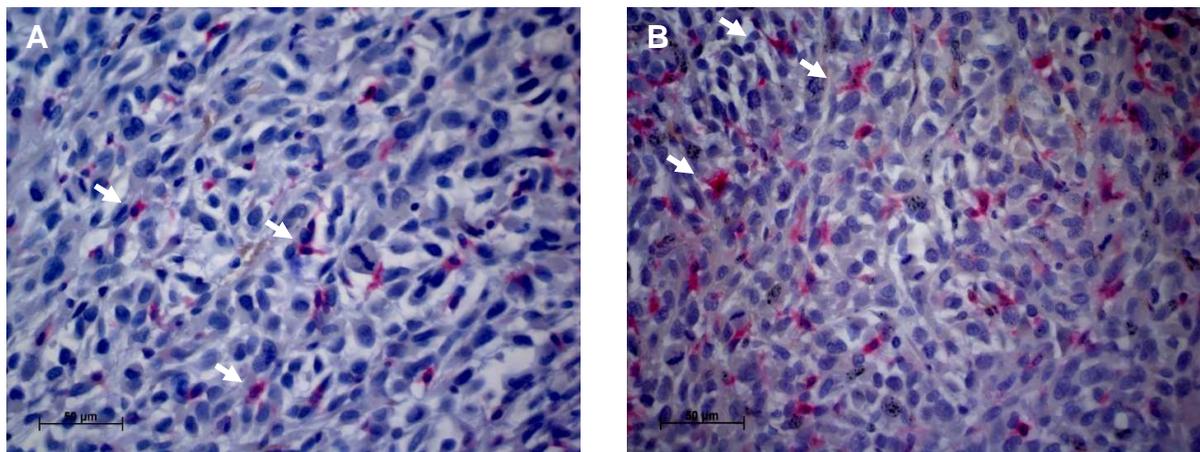


Abb. 4.3.1: Dendritische Zellen in den Primärtumoren (BSA-I-Färbung). Die weißen Pfeile markieren dendritische Zellen in den Primärtumoren der *Scid*- (A) und *E⁻/P⁻/Scid*-Tiere (B). Die Abbildungen der *Scid*- und *E⁻/P⁻/Scid*-Tiere stammen beide aus den 10-ng/kg-Gruppen. Die Balken entsprechen 50 μ m.

4.3.1 *Scid*

In die mikroskopische Zählung der dendritischen Zellen wurden in der Kontrollgruppe BSA-I-gefärbte Gewebeschnitte von 16 Tieren, in der 10-ng/kg-Gruppe von 19, in der 30-ng/kg-Gruppe von 20 und in der 150-ng/kg-Gruppe von 17 einbezogen. Die Negativkontrollen wiesen keine unspezifischen Bindungen des Lektins BSA-I auf.

In der Kontrollgruppe hatten 15 von 16 Tieren (93,75 %) dendritische Zellen in den Primärtumoren, während in den drei Behandlungsgruppen in sämtlichen Primärtumoren dendritische Zellen zu finden waren (Tab. 4.3.1.1).

Gruppe	Rate dendritischer Zellen [%]	Anteil dendritischer Zellen [%]	Streubreite (min–max)
Kontrolle	93,8	1,8 ± 0,35	0,0–4,10
10 ng/kg	100,0	1,7 ± 0,26	0,3–4,90
30 ng/kg	100,0	1,8 ± 0,22	0,5–4,20
150 ng/kg	100,0	1,6 ± 0,19	0,1–3,10

Tab: 4.3.1.1: Übersicht über die Rate der dendritischen Zellen, den durchschnittlichen prozentualen Anteil der dendritischen Zellen und die Streubreite der dendritischen Zellen in der *Scid*-Gruppe. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM.

Der prozentuale Anteil dendritischer Zellen in den Primärtumoren der 10- und 150 ng/kg Behandlungsgruppe lag mit 1,73 % und 1,57 % um das 1,05-fache bzw. das 1,16-fache unter der Kontrollgruppe mit 1,83 %. In der 30-ng/kg-Gruppe mit 1,82 % entsprach der prozentuale Anteil dendritischer Zellen dem der Kontrollgruppe mit 1,82 %. Diese Unterschiede waren statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$). (Tab. 4.3.1.1, Abb. 4.3.1.1).

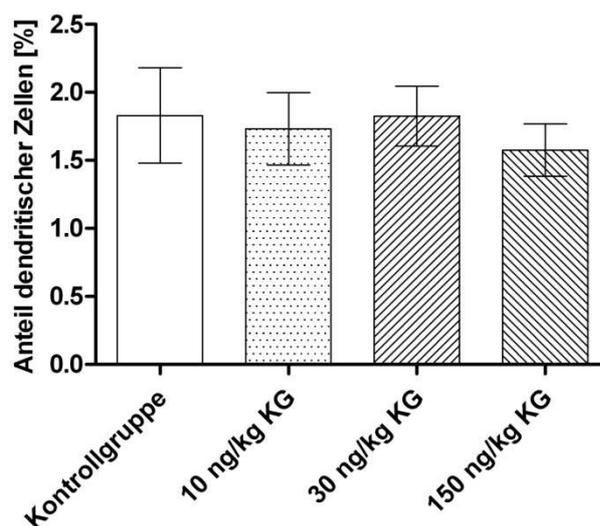


Abb. 4.3.1.1: Dendritische Zellen in den Primärtumoren der *Scid*-Gruppe. Der prozentuale Anteil dendritischer Zellen in den Primärtumoren der Behandlungsgruppen mit 10 ($n = 19$) und 150 ng/kg ($n = 17$) war gegenüber der Kontrollgruppe ($n = 16$) erniedrigt. Die 30-ng/kg-Gruppe ($n = 20$) entsprach der Kontrollgruppe. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM.

4.3.2 *E^{-/-}/P^{-/-}/Scid*

In die mikroskopische Zählung der dendritischen Zellen wurden jeweils 20 BSA-I-gefärbte Gewebeschnitte der Kontrollgruppe, der 10- und 30-ng/kg-Gruppe einbezogen und in der 150-ng/kg-Gruppe wurden 19 Gewebeschnitte berücksichtigt. Die Negativkontrollen wiesen keine unspezifischen Bindungen des Lektins BSA-I auf.

In sämtlichen 79 Primärtumoren waren dendritische Zellen zu finden (Tab. 4.3.2.1).

Gruppe	Rate dendritischer Zellen [%]	Anteil dendritischer Zellen [%]	Streubreite (min–max)
Kontrolle	100	0,96 ± 0,11	0,20–1,90
10 ng/kg	100	1,80 ± 0,22	0,30–3,30
30 ng/kg	100	0,91 ± 0,17	0,20–3,60
150 ng/kg	100	1,81 ± 0,26	0,10–3,30

Tab: 4.3.2.1: Übersicht über die Rate der dendritischen Zellen, den durchschnittlichen prozentualen Anteil der dendritischen Zellen in Primärtumoren und die Streubreite in der *E^{-/-}/P^{-/-}/Scid*-Gruppe. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM.

Es konnte ein signifikanter Anstieg dendritischer Zellen in der 10- und 150 ng/kg Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (*p < 0,05) um das 1,9-fache von 0,96 % in der Kontrollgruppe auf 1,80 % bzw. 1,81 % festgestellt werden. Die 30-ng/kg-Gruppe war mit einem Anteil von 0,91 % im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 0,96 % um das 1,1-fache nicht signifikant erniedrigt. Der alleinige Vergleich der Behandlungsgruppen untereinander zeigte einen signifikant höheren Anteil dendritischer Zellen in der 10- und 150-ng/kg-Gruppe gegenüber der mittleren 30 ng/kg Behandlungsgruppe (*p < 0,05). Die 10- und 150-ng/kg-Gruppen waren mit 1,80 % bzw. 1,81 % um das zweifache gegenüber der 30-ng/kg-Gruppe mit 0,91 % erhöht (Tab. 4.3.2.1, Abb. 4.3.2.1).

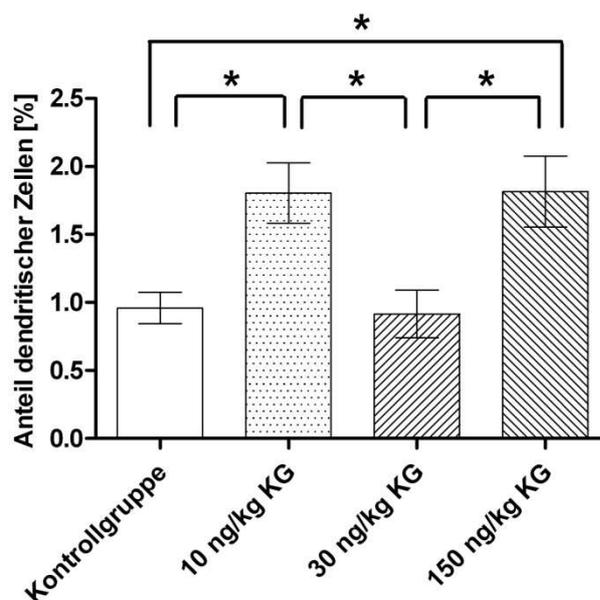


Abb. 4.3.2.1: Dendritische Zellen in den Primärtumoren der $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Gruppe. Der Anteil dendritischer Zellen in den Primärtumoren war in der 10- (n = 20) und 150-ng/kg-Gruppe (n = 19) gegenüber der Kontrollgruppe (n = 20) signifikant erhöht. Ebenso bestanden signifikant höhere Werte für die 10- und 150-ng/kg-Gruppe im Vergleich zur 30-ng/kg-Gruppe (n = 20). Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die 30-ng/kg-Gruppe gering erniedrigt. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SEM. *p < 0,05.

4.3.3 Vergleich dendritischer Zellen in den Primärtumoren von *Scid* und $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$

In der *Scid*-Gruppe wurden 72 Gewebeschnitte und in der $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Gruppe 79 Gewebeschnitte der Primärtumoren bewertet.

Gruppe	Rate dendritischer Zellen [%]		Anteil dendritischer Zellen [%]	
	<i>Scid</i>	$E^{-/-}/P^{-/-}$	<i>Scid</i>	$E^{-/-}/P^{-/-}$
Kontrolle	93,8	100	1,8 \pm 0,35	0,9 \pm 0,11
10 ng/kg	100,0	100	1,7 \pm 0,26	1,8 \pm 0,22
30 ng/kg	100,0	100	1,8 \pm 0,22	0,9 \pm 0,17
150 ng/kg	100,0	100	1,6 \pm 0,19	1,8 \pm 0,26

Tab. 4.3.3.1: Übersicht über die Rate der dendritischen Zellen und über den durchschnittlichen prozentualen Anteil der dendritischen Zellen in den Primärtumoren in beiden Mausgruppen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. $E^{-/-}/P^{-/-} = E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$.

Beim Vergleich des prozentualen Anteils dendritischer Zellen von beiden Mausgruppen waren die Werte der *Scid*-Gruppe sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der 30-ng/kg-Gruppe gegenüber der $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Gruppe signifikant erhöht: Die Kontrollgruppe der *Scid*-Gruppe war mit 1,83 % um das 1,9-fache erhöht gegenüber der Kontrollgruppe der $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Gruppe mit 0,96 % ($p = 0,0147$). Die 30-ng/kg-Gruppe der *Scid*-Tiere war mit 1,82 % um das 2-fache gegenüber der 30-ng/kg-Gruppe der $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Tiere mit 0,91 % ($p = 0,0026$) erhöht. Der fortgeführte Vergleich des prozentualen Anteils dendritischer Zellen zwischen *Scid* und $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ in den 10- und 150-ng/kg-Gruppen ergab hier erniedrigte Werte für die *Scid*-Gruppe um das 1,0-fache ($p > 0,05$), bzw. 1,2-fache ($p > 0,05$), die statistisch nicht signifikant waren (Tab. 4.3.3.1, Abb. 4.3.3.1).

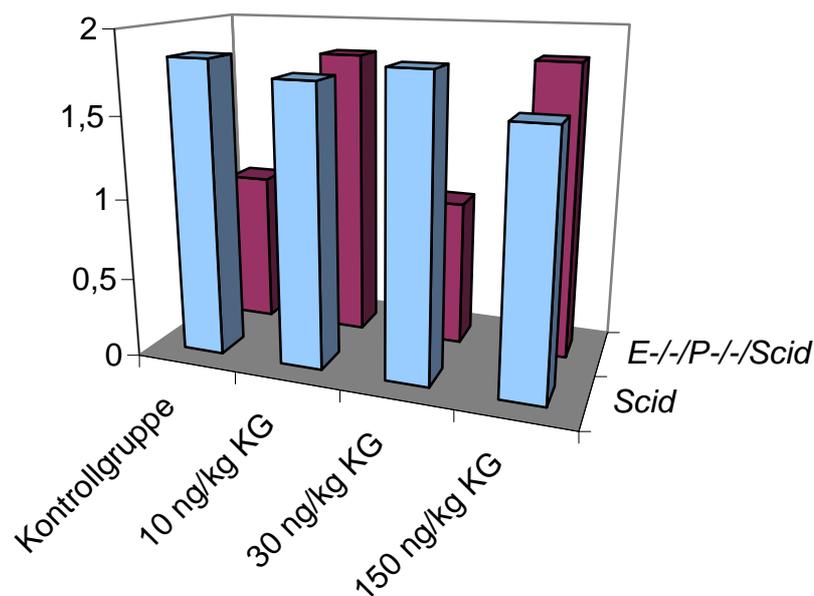


Abb. 4.3.3.1: Dendritische Zellen in den Primärtumoren der *Scid*- und $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Tiere. Der Vergleich des prozentualen Anteils dendritischer Zellen zwischen beiden Mausgruppen zeigte signifikant höhere Werte für die *Scid*-Gruppe in der Kontrollgruppe und in der 30-ng/kg-Gruppe. In den beiden anderen Behandlungsgruppen mit 10 und 150 ng/kg KG war die $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Gruppe gegenüber der *Scid*-Gruppe erhöht, allerdings statistisch nicht signifikant. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SEM.

4.4 Disseminierte Tumorzellen im Blut

Zur Analyse des Gehalts disseminierter Tumorzellen im Blut der *Scid*- und *E⁻/P⁻/Scid*-Mäuse wurde eine *real-time polymerase chain reaction* durchgeführt (Kap. 3.2.9). Der Nachweis der zirkulierenden Melanomzellen im Blut der Versuchstiere verlief über die quantitative Bestimmung humaner *Alu*-Sequenzen in den Melanomzellen durch die quantitative *Alu*-PCR. Sämtliche DNA-Proben wurden mindestens 6-mal analysiert und die Ergebnisse einer Ausreißeranalytik unterzogen.

4.4.1 *Scid*

Um den Gehalt disseminierter Melanomzellen im Blut der *Scid*-Mäuse quantitativ zu bestimmen, wurden in der Kontrollgruppe DNA-Proben von 19 Tieren analysiert, in der 10-ng/kg-Gruppe von 20 Tieren, in der 30-ng/kg-Gruppe von 18 und in der 150-ng/kg-Gruppe von 17 Tieren.

Im Blut von 71 der insgesamt 74 Tiere (95,94 %) waren disseminierte Melanomzellen nachweisbar. Wie sich die Rate disseminierter Melanomzellen in den Gruppen verhielt, zeigt Tab. 4.4.1.1.

Gruppe	Rate disseminierter Melanomzellen [%]	Gehalt disseminierter Melanomzellen/ml Blut	Streubreite (min–max)
Kontrolle	94,7	89,2 ± 39,78	0,0–768,8
10 ng/kg	85,0	396,0 ± 99,96	0,0–1422
30 ng/kg	100,0	117,8 ± 31,26	8,5– 446,5
150 ng/kg	100,0	131,4 ± 41,21	2,1–518,4

Tab. 4.4.1.1: Übersicht über die Rate disseminierter Melanomzellen im Blut der *Scid*-Mäuse, den durchschnittlichen Gehalt der Melanomzellen pro ml Blut und die Streubreite. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM.

Die Untersuchung des Gehalts disseminierter Melanomzellen im Blut der *Scid*-Mäuse ergab, dass die Kontrollgruppe im Vergleich zu allen mit Iscador[®] M spez behandelten Gruppen am wenigsten zirkulierende Melanomzellen aufwies. Die

10-ng/kg-Gruppe war mit 396,0 Melanomzellen gegenüber der Kontrollgruppe mit durchschnittlich 89,20 Melanomzellen pro ml Blut um den Faktor 4,43 statistisch signifikant erhöht (* $p < 0,05$). Die 30- und die 150-ng/kg-Gruppe lagen mit durchschnittlich 117,8 und 131,4 Melanomzellen um das 1,32-fache bzw. das 1,47-fache oberhalb des Gehaltes in der Kontrollgruppe mit 89,20 Melanomzellen (Tab. 4.4.1.1, Abb. 4.4.1.1).

Der Vergleich der behandelten *Scid*-Gruppen untereinander ergab jeweils ein signifikant höheres Ergebnis für die 10-ng/kg-Gruppe gegenüber der 30- und 150-ng/kg-Gruppe (* $p < 0,05$) (Tab. 4.4.1.1, Abb. 4.4.1.1).

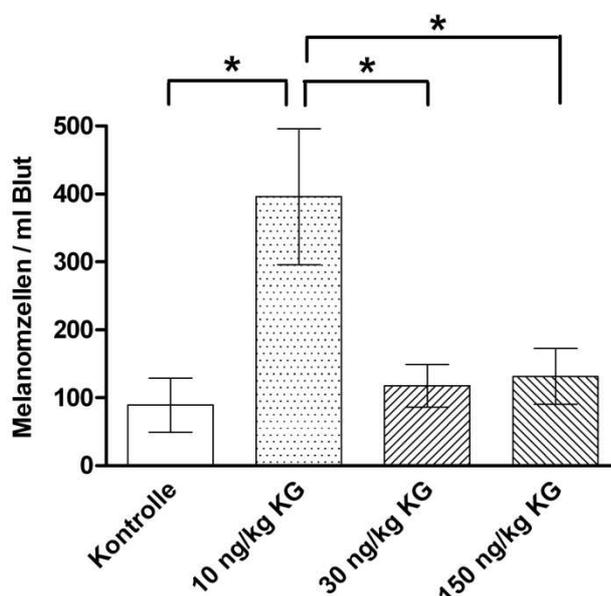


Abb. 4.4.1.1: Disseminierte Melanomzellen im Blut der *Scid*-Mäuse. Im Blut der Tiere aller behandelten Gruppen war der Gehalt disseminierter Melanomzellen gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Dabei war die 10-ng/kg-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Ebenso war die 10-ng/kg-Gruppe gegenüber der 30- und 150-ng/kg-Gruppe statistisch signifikant erhöht. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$.

4.4.2 $E^{-}/P^{-}/Scid$

Bei der quantitativen Bestimmung disseminierter Melanomzellen im Blut der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Mäuse wurden in der Kontrollgruppe und der 10-ng/kg-Gruppe DNA-Proben von 19 Tieren, in der 30-ng/kg-Gruppe von 20 und in der 150-ng/kg-Gruppe von 21 Tieren ausgewertet.

Im Blut von 76 der insgesamt 79 Tiere (96,21 %) waren disseminierte Melanomzellen nachweisbar. Wie sich die Rate disseminierter Melanomzellen in den Gruppen verhielt, zeigt Tab. 4.4.2.1.

Gruppe	Rate disseminierter Melanomzellen [%]	Gehalt disseminierter Melanomzellen / ml Blut	Streubreite (min–max)
Kontrolle	100,0	194,0 ± 54,36	11,9–996,0
10 ng/kg	100,0	273,8 ± 34,18	92,9–703,8
30 ng/kg	90,0	113,3 ± 30,25	0,0–603,9
150 ng/kg	95,2	85,25 ± 30,9	0,0–519,0

Tab. 4.4.2.1: Übersicht über die Rate disseminierter Melanomzellen im Blut der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Mäuse, den durchschnittlichen Gehalt der Melanomzellen pro ml Blut und die Streubreite. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM.

Die Analyse des Gehalts disseminierter Melanomzellen im Blut der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Mäuse ergab für die Kontrollgruppe mit durchschnittlich 194,0 Melanomzellen pro ml Blut im Vergleich zur behandelten 10-ng/kg-Gruppe mit 273,8 Melanomzellen ein 1,4fach niedrigeres Ergebnis. Die beiden anderen mit 30- und 150 ng/kg KG ML-I behandelten Gruppen lagen mit durchschnittlich 113,3 und 85,25 Melanomzellen um das 1,71-fache, bzw. das 2,27-fache unterhalb des Gehaltes in der Kontrollgruppe mit 194,0 Melanomzellen (Tab. 4.4.2.1, Abb. 4.4.2.1).

Der Vergleich der behandelten Gruppen untereinander ergab ein signifikant höheres Ergebnis für die 10-ng/kg-Gruppe gegenüber der 30- und 150-ng/kg-Gruppe (* $p < 0,05$) (Tab. 4.4.2.1, Abb. 4.4.2.1).

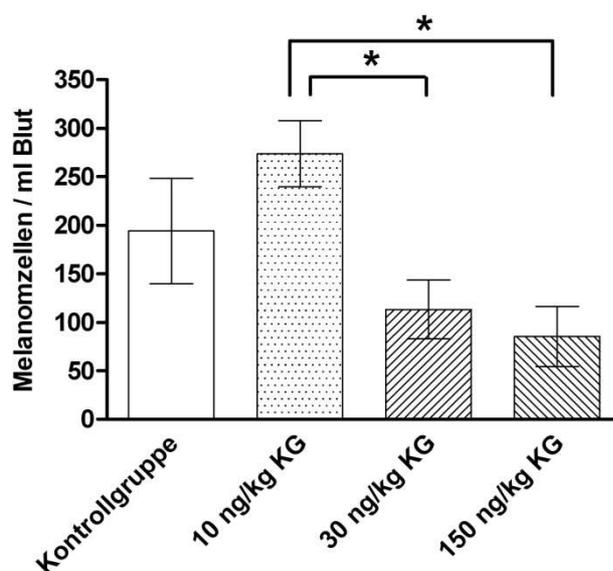


Abb. 4.4.2.1: Disseminierte Melanomzellen im Blut der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Mäuse. Im Blut der Tiere aus der 10-ng/kg-Gruppe waren statistisch nicht signifikant mehr Melanomzellen nachweisbar als in der Kontrollgruppe. In der 30- und 150-ng/kg-Gruppe lag die Anzahl der disseminierten Melanomzellen statistisch nicht signifikant unter der Kontrollgruppe. Die 10-ng/kg-Gruppe lag statistisch signifikant über der 30- und 150-ng/kg-Gruppe. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$.

4.4.3 Vergleich disseminierter Melanomzellen im Blut von *Scid* und $E^{-}/P^{-}/Scid$

Um den Gehalt freier Melanomzellen im Blut zu bestimmen, wurden in der *Scid*-Gruppe 74 DNA-Proben ausgewertet und in der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe 79 DNA-Proben. In der *Scid*-Gruppe waren bei 71 von 74 Tieren (95,94 %) Melanomzellen im Blut nachweisbar und in der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe bei 76 von 79 Tieren (96,21 %). Wie sich die Rate disseminierter Melanomzellen in den einzelnen Gruppen verhielt, zeigt Tab. 4.4.3.1.

Gruppe	Rate disseminierter Melanomzellen [%]		Gehalt disseminierter Melanomzellen / ml Blut	
	<i>Scid</i>	<i>E⁻/P⁻</i>	<i>Scid</i>	<i>E⁻/P⁻</i>
Maus				
Kontrolle	94,7	100,0	89,2 ± 39,78	194,0 ± 54,36
10 ng/kg	85,0	100,0	396,0 ± 99,96	273,8 ± 34,18
30 ng/kg	100,0	90,0	117,8 ± 31,26	113,3 ± 30,25
150 ng/kg	100,0	95,2	131,4 ± 41,21	85,25 ± 30,9

Tab. 4.4.3.1: Übersicht über die Rate disseminierter Melanomzellen in den Gruppen der *Scid*- und *E⁻/P⁻/Scid*-Mäuse und den durchschnittlichen Gehalt frei zirkulierender Melanomzellen im Blut der Tiere beider Mausgruppen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. $E^{-}/P^{-} = E^{-}/P^{-}/Scid$.

Der mittlere Gehalt frei zirkulierender Melanomzellen war beim Vergleich der Kontrollgruppe in der *E⁻/P⁻/Scid*-Gruppe höher und beim Vergleich der Behandlungsgruppen in der *Scid*-Gruppe.

Die *E⁻/P⁻/Scid*-Kontrollgruppe war mit durchschnittlich 194 disseminierten Melanomzellen um das 2,17-fache gegenüber der *Scid*-Kontrollgruppe mit 89,20 Melanomzellen ($p = 0,1285$) erhöht. Die 10-, 30- und 150-ng/kg-Gruppe der *Scid*-Mäuse war mit 396 bzw. 117,8 und 131,4 Melanomzellen um das 1,44-fache, bzw. das 1,03-fache und das 1,54-fache erhöht gegenüber der entsprechenden *E⁻/P⁻/Scid*-Gruppe mit 273,8, 113,3 und 85,25 Melanomzellen ($p = 0,2646$, bzw. $0,9175$ und $0,3673$). Diese Unterschiede waren statistisch nicht signifikant (Tab. 4.4.3.1, Abb. 4.4.3.1).

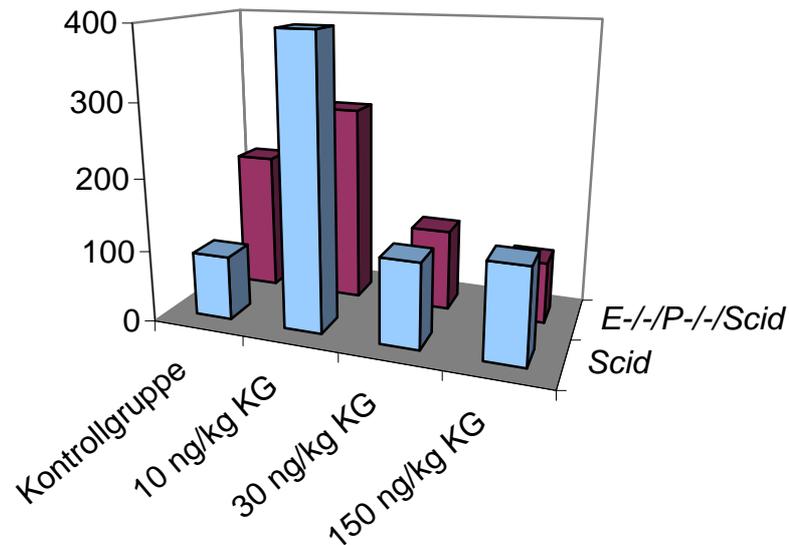


Abb. 4.4.3.1: Disseminierte Melanomzellen im Blut der *Scid*- und *E⁻/P⁻/Scid*-Mäuse. Der mittlere Gehalt disseminierter Melanomzellen lag beim Vergleich der Kontrollgruppen in der *E⁻/P⁻/Scid*-Gruppe über der *Scid*-Gruppe. Der Vergleich der Behandlungsgruppen (10-, 30- und 150-ng/kg-Gruppe) ergab erhöhte Werte für die *Scid*-Gruppe gegenüber der *E⁻/P⁻/Scid*-Gruppe. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant. Gezeigt ist der Mittelwert ± SEM.

4.5 Korrelationen

4.5.1 Korrelation zwischen Primärtumorgewicht und pulmonaler Gesamtmetastasierung

4.5.1.1 *Scid*

In die Korrelationsanalyse nach Pearson zwischen Primärtumorgewicht und pulmonaler Gesamtmetastasierung wurden aus der Kontrollgruppe 15 XY-Wertepaare einbezogen, aus der 10- und 30-ng/kg-Gruppe jeweils 19 XY-Wertepaare und aus der 150-ng/kg-Gruppe 18 XY-Wertepaare (Abb. 4.5.1.1.1 A-D).

In der Anzahl der pulmonalen Gesamtmetastasierung wurden solide extra- und intravasale Metastasen berücksichtigt.

Es zeigte sich in allen Gruppen der *Scid*-Tiere eine positive Korrelation zwischen Primärtumorgewicht und pulmonaler Gesamtmetastasierung, wobei sowohl

in der Kontrollgruppe ($r = 0,7065$, $p = 0,0032$), als auch der 150-ng/kg-Gruppe ($r = 0,8556$, $p < 0,0001$) eine signifikante Korrelation vorlag (Abb. 4.5.1.1 A–D).

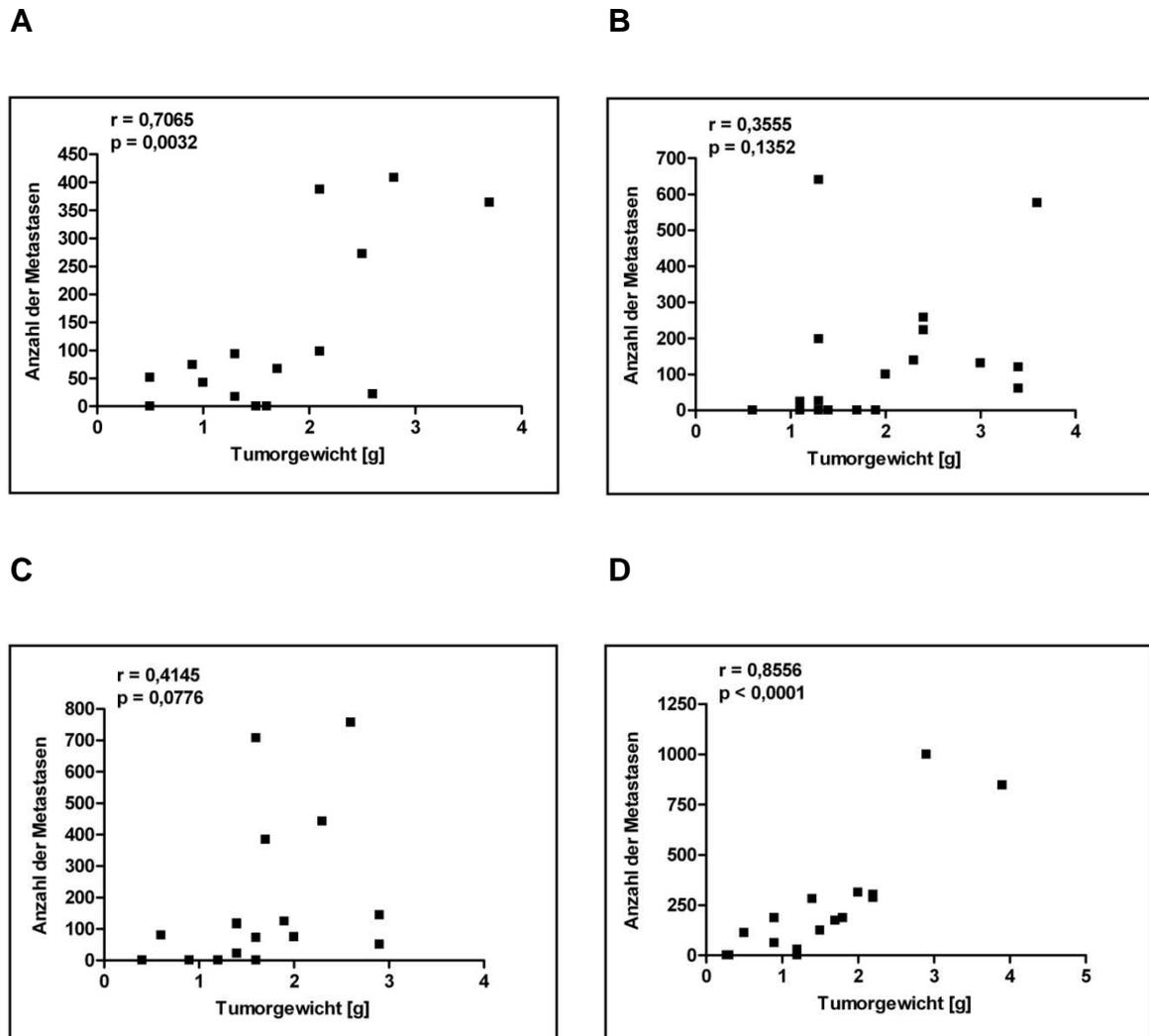


Abb. 4.5.1.1 A–D: Korrelation von Primärtumorgewicht und pulmonaler Gesamtmetastasierung in der Kontrollgruppe und den mit Iscador[®] M spez behandelten Gruppen der *Scid*-Mäuse. Dargestellt ist eine positive, in A (** $p < 0,005$) und D (** $p < 0,0001$) zusätzlich signifikante Korrelation zwischen Primärtumorgewicht und Lungenmetastasierung in allen *Scid*-Gruppen. A = Kontrollgruppe, B = 10-ng/kg-Gruppe, C = 30-ng/kg-Gruppe und D = 150-ng/kg-Gruppe. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SEM.

4.5.1.2 $E^{-}/P^{-}/Scid$

In die Korrelationsanalyse nach Pearson zwischen Primärtumorgewicht und pulmonaler Gesamtmetastasierung wurden aus der Kontrollgruppe 19 XY-Wertepaare einbezogen, aus der 10- und 30-ng/kg-Gruppe jeweils

20 XY-Wertepaare und aus der 150-ng/kg-Gruppe wurden 21 XY-Wertepaare berücksichtigt (Abb. 4.5.1.2.1 A–D).

Zur Anzahl der pulmonalen Gesamtmetastasierung wurden solide extra- und intravasale Metastasen und extravasale Einzelzellen gezählt.

In allen Gruppen der $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Tiere zeigte sich eine positive Korrelation zwischen Primärtumorgewicht und pulmonaler Gesamtmetastasierung, wobei die Kontrollgruppe ($r = 0,6219$, $p = 0,0045$) und die 150-ng/kg-Gruppe ($r = 0,5319$, $p = 0,0131$) eine signifikante Korrelation aufwiesen (Abb. 4.5.1.2.1 A–D).

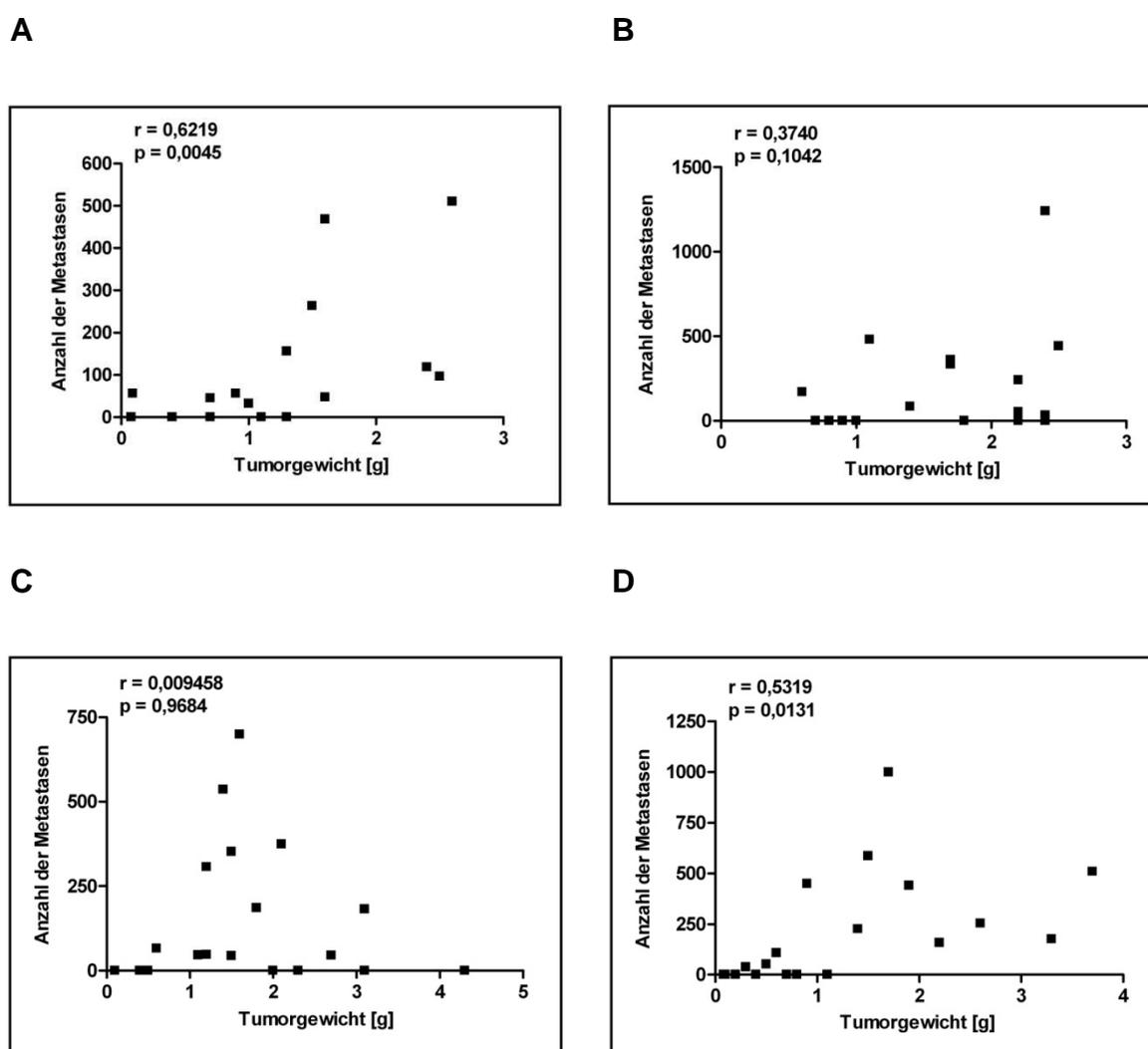


Abb. 4.5.1.2.1 A–D: Korrelation von Primärtumorgewicht und pulmonaler Gesamtmetastasierung in der Kontroll- und den Behandlungsgruppen der $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Mäuse. Dargestellt ist eine positive, in **A** (** $p < 0,005$) und **D** (* $p < 0,05$) zusätzlich signifikante Korrelation zwischen Primärtumorgewicht und Lungenmetastasierung in allen $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Gruppen. **A** = Kontrollgruppe, **B** = 10-ng/kg-Gruppe, **C** = 30-ng/kg-Gruppe und **D** = 150-ng/kg-Gruppe. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SEM.

4.5.2 Korrelation zwischen pulmonaler Gesamtmetastasierung und disseminierten Melanomzellen im Blut

4.5.2.1 *Scid*

In die Korrelationsanalyse nach Pearson zwischen pulmonaler Gesamtmetastasierung und dem Gehalt disseminierter Melanomzellen im Blut der *Scid*-Mäuse, wurden aus der Kontrollgruppe 14 XY-Wertepaare einbezogen. Aus der 10-ng/kg-Gruppe wurden 19 XY-Wertepaare einbezogen, aus der 30- und 150-ng/kg-Gruppe wurden jeweils 17 XY-Wertepaare einbezogen (Abb. 4.5.2.1.1 A–D).

In der Anzahl der pulmonalen Gesamtmetastasierung wurden solide extra- und intravasale Metastasen berücksichtigt.

Die *Scid*-Tiere wiesen mit Ausnahme der 30-ng/kg-Gruppe in allen anderen Gruppen eine positive Korrelation zwischen pulmonaler Gesamtmetastasierung und dem Gehalt disseminierter Melanomzellen im Blut auf, wobei die Kontrollgruppe ($r = 0,6137$, $p = 0,0196$) signifikant korrelierte (Abb. 4.5.2.1.1 A–D).

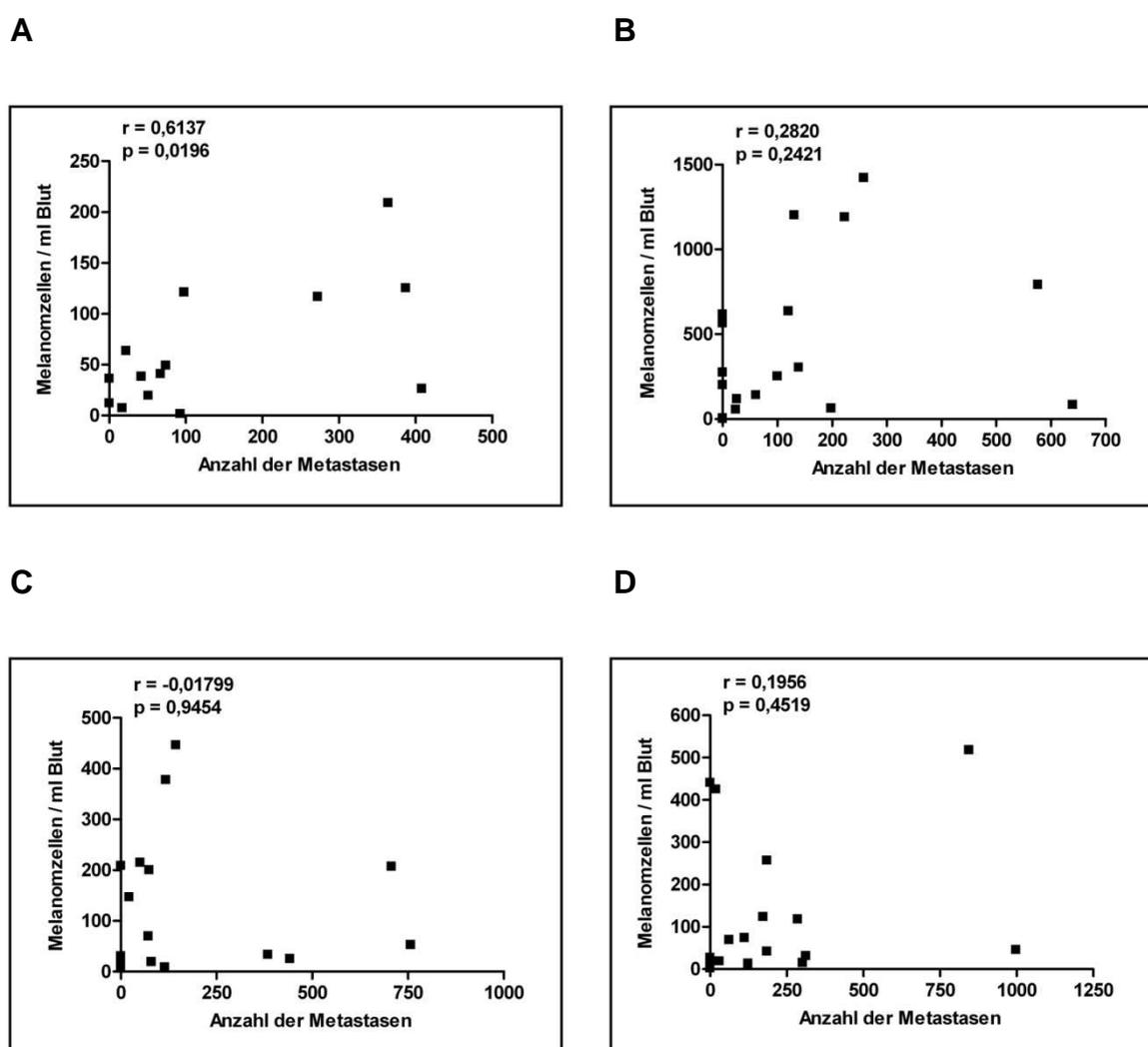


Abb. 4.5.2.1.1 A–D: Korrelation von pulmonaler Gesamtmetastasierung und dem Gehalt disseminierter Melanomzellen im Blut der Kontroll- und der Behandlungsgruppen der *Scid*-Mäuse. Dargestellt ist eine positive Korrelation in A, B und D, wobei A zusätzlich signifikant, korrelierte ($*p < 0,05$). In C bestand keine Korrelation. A = Kontrollgruppe, B = 10-ng/kg-Gruppe, C = 30-ng/kg-Gruppe und D = 150-ng/kg-Gruppe. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SEM.

4.5.2.2 *E^{-/-}/P^{-/-}/Scid*

In die Korrelationsanalyse nach Pearson zwischen pulmonaler Gesamtmetastasierung und dem Gehalt disseminierter Melanomzellen im Blut der *E^{-/-}/P^{-/-}/Scid*-Mäuse, wurden aus der Kontrollgruppe 18 XY-Wertepaare einbezogen, aus der 10-ng/kg-Gruppe 19 XY-Wertepaare und aus der 30- und 150-ng/kg-Gruppe wurden 20 bzw. 21 XY-Wertepaare einbezogen (Abb. 4.5.2.2.1 A–D).

Die Anzahl pulmonaler Metastasen setzte sich aus soliden extra- und intravasalen Metastasen und extravasalen Einzelzellen zusammen.

Es zeigte sich in allen Gruppen der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Mäuse eine positive Korrelation zwischen der pulmonalen Gesamtmetastasierung und dem Gehalt disseminierter Melanomzellen im Blut, wobei die 10-ng/kg-Gruppe ($r = 0,4897$, $p = 0,0333$) eine signifikante Korrelation aufwies (Abb. 4.5.2.2.1 A–D).

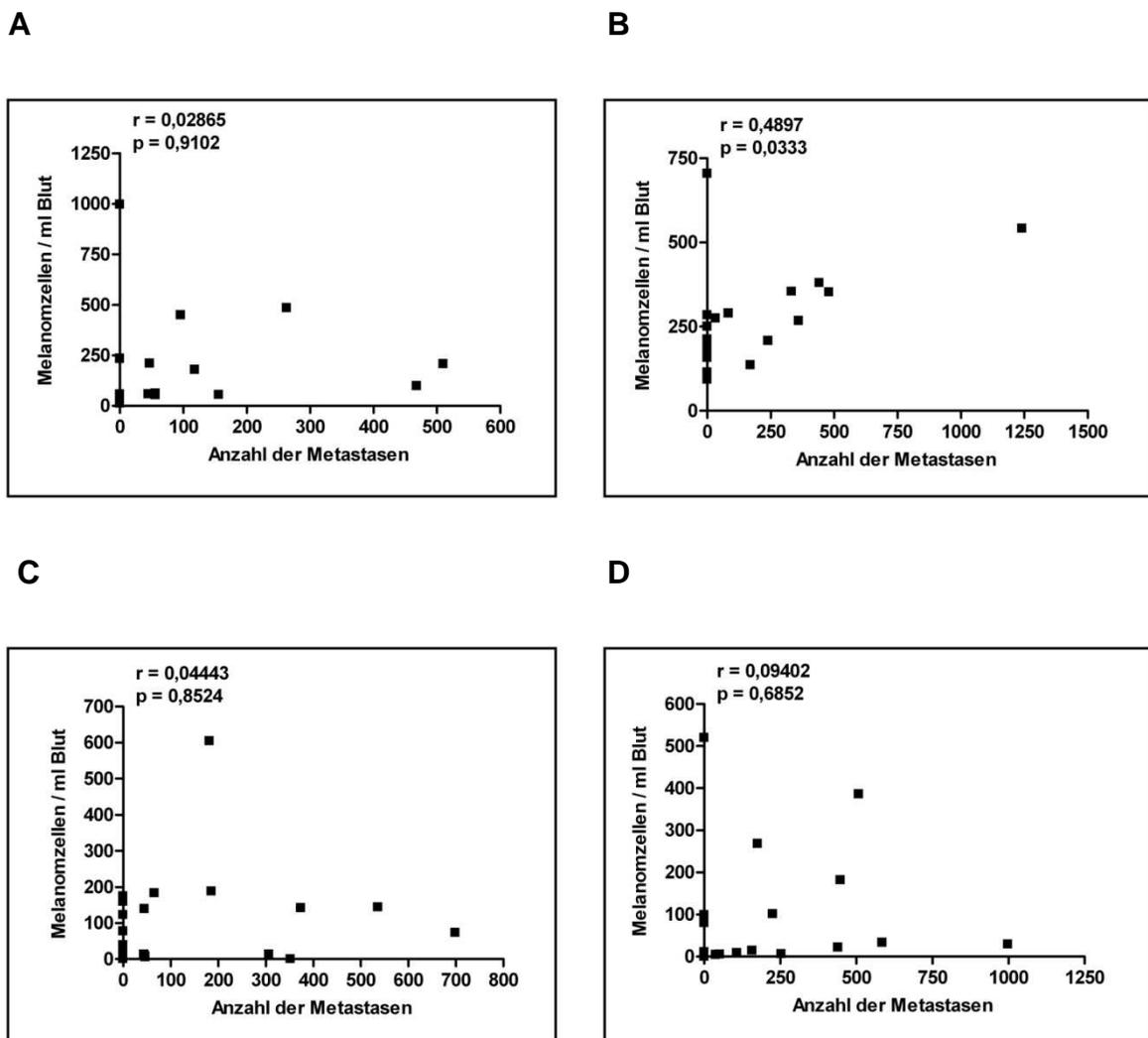


Abb. 4.5.2.2.1 A–D: Korrelation von pulmonaler Gesamtmetastasierung und dem Gehalt disseminierter Melanomzellen im Blut der Kontroll- und der Behandlungsgruppen der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Mäuse. Dargestellt ist eine positive, in B zusätzlich signifikante Korrelation ($*p < 0,05$) zwischen Lungenmetastasierung und dem Gehalt disseminierter Melanomzellen im Blut in allen $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppen. A = Kontrollgruppe, B = 10-ng/kg-Gruppe, C = 30-ng/kg-Gruppe und D = 150-ng/kg-Gruppe. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SEM.

5 Diskussion

Das maligne Melanom der Haut ist eine der bösartigsten Erkrankungen, die Dermatologen immer wieder vor Herausforderungen stellt, da nach erfolgter hämatogener Metastasierung bis auf wenige Einzelfälle keine Heilung zu erzielen ist. Die Erforschung alternativ therapeutischer Möglichkeiten ist somit von größter klinischer Bedeutung, zumal das Melanom an Inzidenz stark zunimmt.

Eine Zielsetzung dieser Arbeit war es demgemäß, den Mistelextrakt Iscador[®] M spez in seiner Wirksamkeit auf das maligne Melanom *in vivo* zu untersuchen. Vorangegangene Untersuchungen mit hoch aufgereinigtem Mistellektin-I am Melanom hatten bereits antiproliferative, antimetastatische und immunmodulatorische Effekte *in vitro* und *in vivo* an *Scid*-Mäusen ergeben (Thies *et. al.*, 2008 und 2005). Diese erfolgreichen Ergebnisse konnten mit dem Extrakt der gesamten Mistelpflanze jedoch *in vivo* nicht reproduziert werden.

Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss einer zweifachen Selektindefizienz auf das Wachstums- und Metastasierungsverhalten des Melanoms untersucht. Dazu kamen $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Mäuse zum Einsatz, da Untersuchungen mit HT 29 Kolonkarzinomzellen an dieser Mausart einen Rückgang der Lungenmetastasierung um 84 % im Vergleich zur Wildtyp-*Scid*-Maus ergeben hatten (Köhler, 2010). Ob dies auch für Melanomzellen zutrifft, sollte ebenfalls untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit konnte mit MV3-Melanomzellen nur näherungsweise eine solche Reduktion der Metastasierung um 22,11 % in der $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Maus beobachtet werden. Inzwischen liegen Ergebnisse vor, dass MV3-Melanomzellen das Integrin $\alpha 4$, das den Selektinen in der Adhäsionskaskade gleich- und nachgeschaltet ist, hoch exprimieren, wodurch sich das aggressive Metastasierungsverhalten erklären lassen könnte (Müller, unveröffentlicht). Weitere Untersuchungsergebnisse mit MV3-Melanomzellen, deren Integrin-Expression genetisch ausgeschaltet ist, stehen noch aus.

Im Hinblick auf die Tumorbilogie werden zunächst die unbehandelten Kontrollgruppen beider Mausarten einander gegenübergestellt. Das Wachstums- und Metastasierungsverhalten der humanen Melanomzelllinie MV3 kann auf diese Weise unter dem alleinigen Einfluss der Selektindefizienz und unter der daraus resultierenden unterschiedlichen Immunkompetenz der Mäuse beurteilt werden. Die

durch Iscador[®] M spez erzielten Wirkungen können dann im Weiteren richtig eingeschätzt werden.

5.1 Auswirkungen der Selektindefizienz in der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Maus auf die Tumorbilogie im Vergleich zur $Scid$ -Maus

Die Tiere beider Kontrollgruppen wurden nach stattgehabter Inokulation von 1×10^6 Melanomzellen über 19 Tage mit PBS i.p. gespritzt. Das durchschnittliche Primärtumorgewicht für die Kontrollgruppe der $Scid$ -Mäuse lag danach bei 1,68 g (0,5–3,7 g, n=19) (Tab. 4.1.1.2). Bei Anwuchszeiten von 20 bis 90 Tagen hatten Thies *et al.* (2007a) für 6 Melanomzelllinien (G361, FEMX1, MeWo, MV3, LOX und UISO-Mel6) ein durchschnittliches TG zwischen 0,7 und 1,6 g ermittelt.

Vergleichsweise liegt das TG der vorliegenden Arbeit über der Obergrenze, insbesondere in Anbetracht der kürzeren Wachstumszeit von nur 20 Tagen. Das in der Kontrollgruppe der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Mäuse ermittelte Primärtumorgewicht betrug vergleichsweise nur durchschnittliche 1,19 g (0,08–2,9 g, n=20) (Tab. 4.1.2.2). Dieses 1,4-fach nicht signifikant niedrigere durchschnittliche Primärtumorgewicht in der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe erscheint erst einmal erstaunlich. Denn dieser Mausart fehlen nicht nur B- und T-Lymphozyten, sondern darüber hinaus ist das vorhandene unspezifische Immunsystem für die Tumorabwehr durch die E- und P-Selektindefizienz funktionell eingeschränkt (Abb. 4.1.3.2). Auch Köhler (2010) stellte an $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Mäusen ein verspätetes und reduziertes Primärtumorwachstum im Vergleich zur $Scid$ -Maus fest, wobei es sich jedoch um HT 29 Kolonkarzinomzellen handelte und nicht um MV3-Melanomzellen.

Nachfolgend wird das pulmonale Metastasierungsverhalten der MV3-Melanomzelllinie unter dem Einfluss der Selektindefizienz in beiden Kontrollgruppen analysiert. Dabei werden in die Anzahl der Gesamtmetastasierung solide extra- und intravasale Metastasen und in der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe zusätzlich extravasale Einzelzellen miteinbezogen, die in der $Scid$ -Gruppe nicht vorhanden waren.

Zunächst ein Blick auf die Rate der Lungenmetastasierung im Vergleich zwischen den beiden Mausgruppen, der sämtliche Behandlungsgruppen einschließt. Die $Scid$ -Gruppe hatte mit 71,83 % (51 Tiere von 71 hatten Metastasen) eine um

15,58 % (1,28-fache) höhere Metastasierungsrate als die $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe mit 56,25 % (45 von 80 Tieren hatten Metastasen). Die Metastasierungsrate war in allen untersuchten Gruppen, sowohl in der Kontrollgruppe als auch bei den behandelten Tieren, in der $Scid$ -Gruppe höher als in der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe (Tab. 4.2.3.1), was den Erwartungen an die Selektindefizienz im Ansatz entspricht.

Die pulmonale Gesamtmetastasierungsrate der $Scid$ -Kontrollgruppe lag mit 80 % (12/15) um 22,11 % über der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Kontrollgruppe mit 57,89 % (11/19). Die Selektindefizienz führte also zu einer Reduktion der pulmonalen Gesamtmetastasierung von 22,11 % (Tab. 4.2.3.1). Mit HT 29 Kolonkarzinomzellen konnte in $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Mäusen die pulmonale Metastasierung um 84 % reduziert werden (Köhler, 2010). Die durchschnittliche Metastasenzahl ergab in der $Scid$ -Kontrollgruppe 126,30 (0–408, n=15) Lungenmetastasen und in der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Kontrollgruppe lediglich 97,21 (0–510, n=19) Metastasen (Tab. 4.2.3.1, Abb. 4.2.3.1). Der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant. Außerdem ist das Ergebnis vergleichbar mit der zuvor analysierten nicht signifikant niedrigeren Metastasierungsrate beziehungsweise dem Primärtumorgewicht in der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Mausgruppe.

Wird nun der Blick auf die Zusammensetzung der pulmonalen Gesamtmetastasierungsrate gerichtet, so zeigt sich in beiden Mausgruppen, dass der Hauptteil der Metastasierung durch extravasal lokalisierte Metastasen bedingt wurde. In der $Scid$ -Kontrollgruppe hatten 80 % (12/15) extravasal lokalisierte solide Metastasen, während nur 20 % (3/12) intravasale Metastasen hatten. Dem gegenüber steht die $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Kontrollgruppe mit 42,10 % (8/19) extravasalen Metastasen, 10,53 % intravasalen Metastasen und 21,05 % extravasalen Einzelzellen. Somit ergab sich durch die Selektindefizienz eine Reduktion der extravasalen Metastasierungsrate um 37,9 % (Kap. 4.2.4) und erstaunlicherweise auch der intravasalen Metastasierungsrate um 9,47 % (Kap. 4.2.5).

Dennoch lag die mittlere intravasale Metastasenanzahl der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Mäuse (9,9), wenn auch nicht signifikant, sondern knapp aber erwartungsgemäß über der Anzahl in der $Scid$ -Kontrollgruppe (7,5) ($p = 0,7815$) (Tab. 4.2.5.1, Abb. 4.2.5.1).

Dagegen wurde die durchschnittliche Anzahl extravasaler Metastasen durch die Selektindefizienz von 118,80 (0–408) in der $Scid$ -Kontrollgruppe

(Tab. 4.2.1.2.1) auf 79,42 (0–432) in der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe (Tab. 4.2.2.2.1) – wenn auch statistisch nicht signifikant – reduziert ($p = 0,4180$) (Tab. 4.2.4.1, Abb. 4.2.4.1).

In der *Scid*-Gruppe fanden sich lediglich Metastasen, die aus mindestens zwei nebeneinanderliegenden Melanomzellen bestanden. Einzelzellen fanden sich im Gegensatz zur $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe nicht, die trotz der 36,36 % (4/11) metastasierten Einzelzellen in der Kontrollgruppe mit der Metastasierungsrate um 22,11 % unter der der *Scid*-Gruppe lag.

So kann man sagen, dass die Selektindefizienz auf den Primärtumor bezogen den Wachstumsbeginn verzögert. Betrachtet man die Metastasierungsrate, verhindert die Selektindefizienz geringfügig das Entstehen/Auswandern aus dem Gefäß und ebenfalls den Wachstumsbeginn einer Metastase. Denn die ausschließlich in den Lungen der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Mäuse vorhandenen einzelnen extravasalen Melanomzellen wären bei einer Verlängerung der Versuchsdauer, gegebenenfalls mit zwischenzeitlicher Exzision des Primärtumors, ebenfalls zu manifesten Metastasen ausgewachsen.

Wenn die mittlere intravasale Metastasenanzahl der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Kontrollgruppe (9,9) auch knapp über der Anzahl der *Scid*-Mäuse (7,5) lag ($p = 0,7815$) (Tab. 4.2.5.1, Abb. 4.2.5.1), so korrelierte sie jedoch nicht mit einer vermehrten Bildung extravasaler Metastasen, wie das in der *Scid*-Gruppe der Fall war. Dies ist wohl am ehesten auf die Auswirkungen der Selektindefizienz zurückzuführen.

Ein Blick in die behandelten Gruppen eröffnet allerdings ein gegenteiliges Ergebnis bezüglich der intravasalen Metastasierung. Alle mit ML-I-behandelten Gruppen der *Scid*-Mäuse haben im Gegensatz zur Kontrollgruppe mehr intravasale Metastasen als die entsprechende mit ML-I behandelte $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe. Die Ergebnisse der Lungenmetastasierung lassen sich nun nicht mehr nur auf das aggressive Metastasierungsverhalten des MV3-Melanoms zurückführen. Die Selektindefizienz scheint, in Anbetracht aller nicht signifikanten Ergebnisse, auf das Metastasierungsverhalten des MV3-Melanoms kaum Einfluss zu nehmen.

Der dürftige Effekt der Selektindefizienz, gepaart mit dem aggressiven Wachstumsverhalten des Melanoms, zeigte sich auch an der signifikant positiven Korrelation zwischen Primärtumorgewicht und Lungenmetastasierung. Nicht nur die *Scid*-Kontrollgruppe (** $p < 0,005$, $r = 0,7065$) war signifikant auffällig, sogar die

selektindefiziente $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Kontrollgruppe (**p < 0,005, r = 0,6219) zeigte diesen positiven Zusammenhang (Abb. 4.5.1.1.1 A und 4.5.1.2.1 A). In den Kontrollgruppen beider Mausarten war eine positive Korrelation bereits bei einigen Primärtumorgewichten von unter 1 g festzustellen. Den Untersuchungen von Jojovic und Schumacher (2000) zufolge kann eine Korrelation zwischen Primärtumorgewicht und Metastasierung erst ab einem Minimalgewicht des Primärtumors von 1,0 g zuverlässig festgestellt werden. Die Untersuchungen von Jojovic und Schumacher (2000) wurden allerdings nicht mit MV3-Melanomzellen, sondern an der Kolonkarzinom-Zelllinie HT 29 in *Scid*-Mäusen durchgeführt.

Zur Aktivitätsbeurteilung des unspezifischen Immunsystems bei bestehender Selektindefizienz wurden dendritische Zellen im Gewebe der Primärtumoren bestimmt. Die Annahme, dendritische Vorläuferzellen würden durch das Fehlen der Adhäsionsmoleküle in ihrer Rekrutierung aus dem Blutstrom ins Primärtumorgewebe behindert werden, bestätigte sich. Die Kontrollgruppe der *Scid*-Mäuse war mit einem Anteil dendritischer Zellen im Primärtumorgewebe mit 1,83 % um das 1,9-fache signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe der $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Mäuse mit nur 0,96 % (*p < 0,05). Diese Einwanderung ins Primärtumorgewebe zeigte sich erstaunlicherweise bei nur 93,8 % der *Scid*-Mäuse und unerwarteterweise bei 100 % der $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Mäuse (Tab. 4.3.3.1, Abb. 4.3.3.1). Es ist zu bemerken, dass der signifikant höhere prozentuale Anteil dendritischer Zellen in der *Scid*-Maus keinen dezimierenden Einfluss auf das gleichzeitig höhere Primärtumorgewicht in dieser Gruppe hatte. Wahrscheinlich ist der, wenn auch statistisch signifikante Unterschied von biologischer Warte betrachtet nicht evident.

Zur molekulargenetischen Analyse des Gehalts disseminierter Tumorzellen im Blut der *Scid*- und $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Mäuse wurde eine *real-time polymerase chain reaction* mit dem LightCycler System 2.0 durchgeführt. Die Tatsache, dass in der *Scid*-Kontrollgruppe nur bei 94,7 % der Tiere Melanomzellen im Blut nachweisbar waren und in der $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Gruppe bei 100 % entspricht in der Tendenz der Erwartung, die an die Selektindefizienz gestellt werden kann (Tab. 4.4.3.1). Dies trifft ebenso für den mittleren Gehalt frei zirkulierender Melanomzellen zu. Die $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Kontrollgruppe mit durchschnittlich 194 (11,9–996,0) disseminierten Melanomzellen zeigte sich als nicht signifikant höher gegenüber der *Scid*-Gruppe mit 89,20 (0–768,8) Melanomzellen (Tab. 4.4.3.1, Abb. 4.4.3.1). Durch dieses Ergebnis

lässt sich ein Verhältnis zur mittleren intravasalen Metastasenzahl der $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid^{-/-}$ -Gruppe herstellen. Denn die mittlere intravasale Metastasenzahl der $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid^{-/-}$ -Gruppe lag ähnlich knapp oberhalb der Ergebnisse der entsprechenden $Scid^{-/-}$ -Kontrollgruppe ($p = 0,7815$) (Tab. 4.2.5.1, Abb. 4.2.5.1).

Ferner konnte in der $Scid^{-/-}$ -Kontrollgruppe eine signifikant positive Korrelation zwischen pulmonaler Gesamtmetastasierung und dem Gehalt disseminierter Melanomzellen im Blut ($*p < 0,05$, $r = 0,6137$) konstatiert werden (Abb. 4.5.2.1.1 A), die sich wiederum in der $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid^{-/-}$ -Gruppe als nicht signifikant darstellte. Dies ist ein zu erwartendes Ergebnis, welches auf das Vorhandensein der Selektindefizienz zurückzuführen ist, obschon ihre Auswirkungen an anderer Stelle nahezu ausbleiben.

Es ist grundsätzlich bei dieser Untersuchung zu berücksichtigen, dass infolge der quantitativen *Alu*-PCR die humanen *Alu*-Sequenzen sämtlicher in den Proben enthaltener DNA vervielfältigt wurden. Mit davon umfasst war daher auch die DNA bereits apoptotischer oder lysierter Melanomzellen, wohingegen in der mikroskopischen Auswertung nur vollkommen erkennbare Melanomzellen berücksichtigt wurden. Eine Divergenz der Daten ist möglicherweise auch auf zwei methodische Punkte zurückzuführen. Zum einen könnte die Qualität und die Quantität der Blutentnahme aus dem retrobulbären Venenplexus durch eine Herzpunktion verbessert werden. Zum anderen könnte das Primerdesign optimiert werden (gleiches Alter der Primer), um bestmögliche Ergebnisse zu erreichen.

5.2 Auswirkungen der Behandlung mit dem Mistelextrakt Iscador® M spez auf das Wachstums- und Metastasierungsverhalten des MV3-Melanoms in der $Scid^{-/-}$ - und $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid^{-/-}$ -Maus

Nach Inokulation der Melanomzellen erhielten die Behandlungsgruppen beider Mausstämme über insgesamt 19 Tage Iscador® M spez *i. p.* Das Primärtumorgewicht konnte unter der Behandlung mit Iscador® M spez weder in den $Scid^{-/-}$ -, noch in den $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid^{-/-}$ -Behandlungsgruppen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe signifikant reduziert werden. Beim alleinigen Blick zunächst auf die $Scid^{-/-}$ -Gruppe konnte ab einer ML-I-Konzentration im Mistelextrakt von 30 ng/kg KG und höher das

Primärtumorgewicht reduziert werden (Tab. 4.1.1.2, Abb. 4.1.1.1). Jedoch waren die Ergebnisse statistisch nicht signifikant, wie es in bereits erwähntem, dieser Arbeit vorausgegangenem *Scid*-Maus-Xenograft-Melanommodell im Gegensatz der Fall war. In diesem konnte eine signifikant antiproliferative Wirkung (Reduktion des Primärtumorgewichtes um ca. 35 %; $p < 0,05$) von hoch aufgereinigtem Mistellektin-I in der Dosierung von 30 ng/kg KG auf die humane Melanomzelllinie MV3 gezeigt werden (Thies *et al.*, 2008).

Die Reduktion des Primärtumorgewichtes unter Iscador[®] M spez ist mutmaßlich auch vor allem auf die antiproliferative und zytotoxische Wirkung des am besten erforschten Inhaltsstoffes ML-I zurückzuführen. Diese ML-Wirkung konnte auch in anderen Untersuchungen mehrfach demonstriert werden (Valentiner *et al.*, 2002; Büssing *et al.*, 1996c; Witthohn *et al.*, 1996; Barbieri *et al.*, 1993; Janssen *et al.*, 1993; Franz, 1991; Endo *et al.*, 1988; Franz *et al.*, 1982; Stirpe *et al.*, 1982). Auch durch *in vitro* Versuche mit der in dieser Arbeit angewandten Iscador[®]-Charge konnte der antiproliferative Effekt von ML-I auf das maligne Melanom durch eine Induktion der Apoptose bestätigt werden. Im Kontrollexperiment zu dieser Arbeit erhobene Zellproliferationsanalysen (colourimetric tetrazolium derived XTT proliferation assay) zeigten eine signifikante Reduktion lebensfähiger Melanomzellen durch hoch aufgereinigtes ML-I und in gleicher Weise durch äquivalente Dosierungen von Iscador[®] M 5 mg spezial ab jeweils einer Dosierung von $> 0,001$ ng/ml. Hitzebehandeltes (80 °C) Iscador[®] M 5 mg spezial bewies diese zytotoxischen Effekte nicht (Thies, unveröffentlichte Daten).

Dass unter der Behandlung mit Iscador[®] M spez *in vivo* kein der ML-I-Behandlung von Thies *et al.* (2008) vergleichbares Ergebnis erzielt wurde, ist möglicherweise in der Zusammensetzung von Iscador[®] M spez begründet. Iscador[®] M spez umfasst neben den Mistellektinen-I, -II, -III und Viscotoxinen zusätzlich viele weitere Proteine, welche möglichenfalls mit dem ML-I *in vivo* interferieren und dessen Wirksamkeit dadurch einschränken.

In der 10-ng/kg-Gruppe der *Scid*-Tiere war die ML-I-Wirkung von Iscador[®] M spez vermutlich sogar ganz aufgehoben oder aber zu niedrig dosiert, da das Primärtumorgewicht zwar nicht signifikant, aber dennoch über dem der Kontrollgruppe lag. Genauso verhielt es sich auch in den *E⁻/P⁻/Scid*-Behandlungsgruppen mit 10 und 30 ng/kg KG. Die 150-ng/kg-Gruppe der

$E^{-}/P^{-}/Scid$ -Tiere entsprach bezüglich des Primärtumorgewichtes ihrer Kontrollgruppe (Tab. 4.1.2.2, Abb. 4.1.2.1).

So ist festzustellen, dass nur in der *Scid*-Gruppe eine geringe antiproliferative Wirkung durch die Mistelbehandlung eintrat, die in der selektindefizienten $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Maus vollkommen ausblieb. Es ist bekannt, dass dendritische Zellen, die zur Reduktion des Primärtumorgewichtes beitragen können, in der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Maus durch die Selektindefizienz in ihrer Migration ins Primärtumorgewebe behindert werden (Pendl, 2000). Das zeigte auch die vorliegende Arbeit beim Vergleich des prozentualen Anteils dendritischer Zellen im Primärtumorgewebe. Hier gab es signifikant erhöhte Werte für die *Scid*-Gruppe, und zwar sowohl in der Kontrollgruppe (* $p < 0,05$) als auch in der 30-ng/kg-Gruppe (** $p < 0,005$) gegenüber den $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Mäusen (Tab. 4.3.3.1, Abb. 4.3.3.1). Auch Thies *et al.* (2008) hatten im bereits erwähntem *Scid*-Maus-Xenograft-Melanommodell mit hoch aufgereinigtem ML-I eine signifikant erhöhte Anzahl eingewanderter dendritischer Zellen im Primärtumor unter allen ML-I-Dosierungen festgestellt. Zu beachten ist auch, dass gerade nur in der 30-ng/kg-Gruppe von Thies *et al.* (2008), mit dem signifikant erniedrigten Primärtumorgewicht, die Rate apoptotischer dendritischer Zellen 16 % unterhalb der Ergebnisse der Kontrollgruppe lag (Thies *et al.*, 2008).

Thies *et al.* (2008) schlussfolgerten daher, dass die Behandlung mit 30 ng/kg KG die Einwanderung von dendritischen Zellen stimuliert, aber gleichzeitig nicht zu einer Apoptose führt, wie das bei höheren Dosierungen der Fall ist. Damit spielt die Immunstimulation die vorherrschende Rolle in der Effektivität gegen das Melanom. In diesem Sinne wäre die vorliegend nicht gegebene Mistelwirkung auf das Primärtumorgewicht der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe durch die behinderte Migrationsfähigkeit dendritischer Vorläuferzellen ins Primärtumorgewebe zu erklären.

Dass aber in der 30-ng/kg-Gruppe der *Scid*-Mäuse dieser Arbeit, in der nun gerade der signifikant hohe dendritische Zellanteil zu finden war, ein höheres Primärtumorgewicht vorlag, als in der 150-ng/kg-Gruppe ohne zugehörigen signifikant erhöht dendritischen Anteil, widerspricht dieser Hypothese. Hier muss möglichenfalls davon ausgegangen werden, dass die signifikanten Unterschiede im Anteil dendritischer Zellen zwischen *Scid* und $E^{-}/P^{-}/Scid$ (Kontrolle: 1,83 % versus 0,96 %

($p < 0,05$); 30 ng/kg KG: 1,82 % versus 0,91 % ($p < 0,005$)) von keiner biologischen Relevanz waren.

Eine anderer Diskussionsansatz für die geringe *in vivo* Wirksamkeit von Iscador® M spez auf die humane Melanomzelllinie MV3 könnte Urech *et al.* (1995) zufolge auch auf die variierende Sensitivität einer Tumorzelllinie gegenüber Mistelinhaltsstoffen zurückzuführen sein. Beim Vergleich der Zytotoxizität von Lektinen und Viscotoxinen im Mistelextrakt auf drei Tumorzelllinien stellten Urech *et al.* (1995) fest, dass die Sensitivität sehr unterschiedlich ausfällt. Dies ist auf die Antikörperbildung gegen Lektine oder Viscotoxine in Gegenwart dieser oder jener Tumorzelllinie zurückzuführen. So gibt es nicht nur besonders Lektin-empfindliche Tumorzelllinien, sondern auch vornehmlich Viscotoxin-empfindliche Tumorzelllinien (Urech *et al.*, 1995). Grundsätzlich ist jedoch bei den untersuchten immundefizienten Mäusen nicht von einer Antikörperbildung auszugehen.

Das Verhalten der pulmonalen Metastasierung unter der Behandlung mit Iscador® M spez veränderte sich dahingehend, dass unter steigender ML-I-Konzentration eine – wenn auch statistisch nicht signifikante – fast kontinuierliche Zunahme der Gesamtmetastasierung in beiden Mausstämmen festzustellen war. Beim Blick in die *Scid*-Mausgruppe nahm die Gesamtmetastasierung von durchschnittlich 131,40 Metastasen in der 10-ng/kg-Gruppe bis hin zu 217,60 Metastasen in der 150-ng/kg-Gruppe kontinuierlich zu. In der Kontrollgruppe wurden demgegenüber nur 126,30 Metastasen gezählt (Tab. 4.2.1.1.1, Abb. 4.2.1.1.1).

In der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe nahm die Gesamtmetastasierung von 171,80 Metastasen in der 10-ng/kg-Gruppe über 144,20 in der 30-ng/kg-Gruppe bis hin zu 190,10 Metastasen in der 150-ng/kg-Gruppe diskontinuierlich zu. Hier wurden in der Kontrollgruppe nur 97,21 Metastasen gezählt (Tab. 4.2.2.1.1, Abb. 4.2.2.1.1). Wenn auch die Unterschiede statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$) waren, so ist doch festzuhalten, dass anstatt einer antiproliferativen und antimetastatischen Wirkung von Iscador® M spez ein eher gegenteiliger, prometastatischer Effekt eingetreten ist, und zwar mit direktem positivem Zusammenhang zwischen ML-I-Dosissteigerung und Metastasenzahl. Bemerkenswert ist außerdem, dass der Selektindefizienz der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe in den Behandlungsgruppen kein additiver antimetastatischer Effekt im Zusammenspiel mit der Mistel zukommt. Schließlich liegen die durchschnittlichen Metastasenzahlen beider Mausgruppen nah beieinander. Der nun

erneut angestellter Vergleich mit den Ergebnissen von Thies *et al.* (2008) zeigt, dass hoch aufgereinigtes ML-I im Gegensatz zu Iscador[®] M spez auch auf die Metastasierung der MV3-Melanomzelllinie eine stärkere antimetastatische Wirkung besitzt (Reduktion der Lungenmetastasen um ca. 55 %; $p < 0,05$). Diese stärkere Wirkung von ML-I zeigte sich indessen nur in einer Dosierung von 30 ng/kg KG, wohingegen höhere Dosierungen (150 bzw. 500 ng/kg KG) keinen Rückgang der Metastasierung bewirkten (Thies *et al.*, 2008).

Daher war es ein Aspekt der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, ob noch stärkere antitumorale Effekte bei weiter reduzierter Dosierung auf 10 ng/kg festzustellen sind. Diesem Ansatz ging die Annahme voraus, dass die Zytotoxizität in niedrigeren ML-I-Dosierungen weniger ausgeprägt ist, was sich positiv auf die Vitalität der dendritischen Zellen des unspezifischen Immunsystems auswirken würde. Unter der Therapie mit Iscador[®] M spez ist der erwartete antitumorale Effekt in der Dosierung von 10 ng/kg KG ML-I nicht feststellbar gewesen. Daher sollten weiterführende Untersuchungen mit gereinigtem ML-I in der Dosierung von 10 ng/kg KG aufgegriffen werden, um zu vermutende Interaktionen im Gesamtextrakt der Mistel weiter aufklären zu können.

Anders stellen sich klinische Ergebnisse unter der Therapie mit Iscador[®] dar. So konnte bei Patienten mit malignem Melanom im UICC/AJCC-Stadium II-III unter der Therapie mit Iscador[®] gegenüber einer Kontrollgruppe, die tumorbedingte Mortalität als statistisch signifikant erniedrigt festgestellt werden (Augustin *et al.*, 2005). Auch in Bezug auf die Gesamtmortalität, das tumorfreie Überleben und das Hirnmetastasen-freie Überleben, zeigte sich in der mit Iscador[®] behandelten Gruppe ein signifikanter Vorteil. Die Patienten dieser Melanom-Studie erhielten allerdings überwiegend das Mistelpräparat Iscador[®] P vom Wirtsbaum der Kiefer (Pini) und nicht Iscador[®] M vom Apfelbaum (Mali), welches in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kam.

Interessanterweise konnte in einer anderen vierarmigen Studie von Kleeberg *et al.* (2004) kein signifikanter Effekt auf das erkrankungsfreie Intervall oder das Überleben nachgewiesen werden. Bei dieser Studie wurde v.a. auch Iscador[®] M für Patienten mit malignem Hochrisiko-Melanom (Tumordicke > 3 mm) oder regionaler Lymphknotenmetastasierung adjuvant eingesetzt. Zur Studie von Augustin *et al.* (2005) besteht jedoch insofern keine Vergleichbarkeit, als in beiden Studien

ganz unterschiedliche Populationen von Patienten untersucht wurden, und die mediane Dauer der Therapie unter Iscador[®] M nur ≤ 1 Jahr (Kleeberg *et al.*, 2004) betrug im Gegensatz zu 2,5 Jahren unter Iscador[®] P (Augustin *et al.*, 2005).

Wie schon beim Einsatz von Iscador[®] in der Therapie des Kolon-, Rektum-, Magen-, Mamma- und Bronchialkarzinoms deutlich wurde (Grossarth-Maticsek *et al.*, 2001), scheint die Dauer der Therapie mit Iscador[®] ein wichtiger Faktor zu sein, der den Effekt der Therapie auf das Überleben bei den untersuchten soliden Tumoren beeinflusst. Über einen Beobachtungszeitraum von bis zu 25 Jahren wurde für die mit Iscador[®] behandelten Patienten eine signifikante Verlängerung der durchschnittlichen Überlebenszeit über alle Tumorarten hinweg von rund 40 % nachgewiesen. Bei kontinuierlicher und langfristiger Iscador[®]-Behandlung konnte eine bis doppelt so lange Überlebenszeit im Vergleich zu den Kontrollpatienten erreicht werden (Grossarth-Maticsek *et al.*, 2001).

Nicht nur die Behandlungsdauer scheint jedoch ausschlaggebend zu sein, sondern auch die Wahl des Wirtsbaumes. Während in der Studie von Augustin *et al.* (2005) bei 83,3 % der Patienten Iscador[®] P (Pini) verabreicht wurde, erhielten die Patienten der Studie von Kleeberg *et al.* (2004) Iscador[®] M (Mali). Wie auch von Bock *et al.* (2004) gezeigt und von Augustin *et al.* (2005) nachgewiesen wurde, scheint Iscador[®] P bei den untersuchten soliden Tumoren das Überleben wirksamer zu beeinflussen als Iscador[®] M. Das Ergebnis einer klinischen Einzelfallstudie, in der ein metastasiertes malignes Melanom unter der Therapie mit Iscador[®] M als adjuvantem Monotherapeutikum eine komplette Remission der Metastasierung erfuhr (Kirsch, 2007), stellt in diesem Zusammenhang wohl eher eine Ausnahme dar.

Dass die Wahl des Wirtsbaumes der Mistel von Relevanz ist, stellten auch Büssing und Kollegen (1997) *in vitro* an menschlichen Lymphozyten mit einem Mistelextrakt der gesamten Pflanze fest. Bei gleichzeitig erhaltener Zytotoxizität zeigte sich eine DNA-stabilisierende Wirkung auf menschliche Lymphozyten unter Cyclophosphamid-Behandlung. Diese apoptotischen Fähigkeiten erwiesen sich als wirtsbaum-spezifisch und korrelierten nicht mit dem Gehalt an Lektin oder Viscotoxin (Büssing *et al.*, 1997). Wobei trotzdem erwähnt sei, dass die Apfelbaummisteln, aus denen das in dieser Arbeit verwendete Iscador[®]-Präparat zubereitet ist, die viscotoxinärmsten Misteln sind. Der Wirtsbaum, der mit Abstand die größte Viscotoxinaktivität aufweist, ist die Tannenmistel, entsprechend dem hohen Gehalt

des am stärksten wirksamen Viscotoxin A3 (Schaller *et al.*, 2000). Die der Tanne verwandte Kiefernmistel (*Viscum Pini*), die eigentlich beim Melanom eingesetzt wird, hat ebenfalls einen hohen Viscotoxingehalt, welcher für die Wirkstärke ebenso wichtig sein soll, wie der Lektingehalt (Dobos *et al.*, 2006).

In Zusammenschau der klinischen und experimentellen Resultate wäre nun eine *in vivo* Untersuchung zur spezifischen MV3-Melanom-Therapie mit Iscador® P ein wichtiger weiterführender Baustein in der Erschließung der Wirkmechanismen und möglicher Interaktionen von Mistelextrakten im Vergleich zum gereinigten ML-I. Wie die Ergebnisse einer Langzeitbehandlung mit Iscador® P am Melanom *in vivo* ausfielen, wäre von ebenso großem Interesse, um die klinischen Erfolge durch *In vivo*-Ergebnisse untermauern zu können. Den dringenden Aufklärungsbedarf über die umfassende Wirkweise und auch die optimale Dosierung der Mistelextrakte *in vivo* unterstreichen die im Folgenden dargestellten Untersuchungsergebnisse.

Die Korrelationsanalyse des Primärtumorgewichts mit der pulmonalen Gesamtmetastasierung erwies sich in allen Behandlungsgruppen als positiv. Jedoch konnten ausschließlich in den mit 150 ng/kg behandelten Gruppen beider Mausarten (*Scid*: *** $p < 0,0001$, $r = 0,8556$; $E^{-}/P^{-}/Scid$: * $p < 0,05$, $r = 0,5319$) statistische Signifikanzen ermittelt werden (Abb. 4.5.1.1.1 D und 4.5.1.2.1 D). Da auch die Kontrollgruppen diesbezüglich statistisch signifikante Werte hatten, sieht es so aus, als ob zwischen der Gabe des Trägermediums PBS und der Therapie mit Iscador® M spez in der hohen Dosierung von 150 ng/kg KG gar kein Unterschied besteht. In beiden Fällen führt ein hohes Primärtumorgewicht zu verhältnismäßig signifikant zunehmender pulmonaler Metastasierung. Nun wäre zu erwarten gewesen, in der Korrelationsanalyse von Gesamtmetastasierung mit dem Gehalt disseminierter Melanomzellen im Blut ein ähnliches Ergebnis feststellen zu können. Tatsächlich aber konnte unter allen behandelten Tieren nur in der 10-ng/kg-Gruppe der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe ein signifikant positiver Zusammenhang festgestellt werden (* $p < 0,05$, $r = 0,4897$) (Abb. 4.5.2.2.1 B). Die Gruppen mit 150 ng/kg KG zeigten zwar positive Korrelationen, die aber statistisch nicht signifikant waren. So steigt die Zahl der Lungenmetastasen zwar verhältnismäßig zum Primärtumorgewicht unter 150 ng/kg KG signifikant an, der Gehalt zirkulierender Tumorzellen im Blut aber nicht.

Die Analyse der Verteilung von extra- und intravasaler Metastasierung zeigte auch in den Behandlungsgruppen, dass die Gesamtmetastasenzahl maßgeblich auf den extravasalen Anteil zurückzuführen ist. Unter den verschiedenen ML-I-Dosierungen konnte weder speziell auf die extravasalen noch auf die intravasalen Metastasen ein signifikant antiproliferativer Einfluss festgestellt werden. Wie bei der Gesamtmetastasierung war der Effekt auf den extravasalen Anteil in beiden Mausgruppen, mit einer Ausnahme in der 10-ng/kg-Gruppe der *Scid*-Tiere, tendenziell prometastatisch. Diese prometastatische Tendenz ist auch auf die extravasalen Einzelzellen in der *E^{-/-}/P^{-/-}/Scid*-Gruppe zu verzeichnen. Allerdings kann auf den intravasalen Anteil diese prometastatische Neigung von Iscador[®] M spez nicht festgestellt werden.

Insbesondere in der höchsten Dosierung von 150 ng/kg KG liegt in beiden Mausgruppen ein, wenn auch statistisch nicht signifikanter, aber dennoch deutlich antiproliferativer Effekt auf die intravasale Metastasierung vor (Tab. 4.2.5.1, Abb. 4.2.5.1). Ferner zeigen die Ergebnisse, dass die höchste Dosierung von 150 ng/kg von allen am effektivsten auf die intravasale Metastasierung wirkt. Andererseits kann durch den positiven Zusammenhang von extravasaler Metastasierung unter steigender Dosierung von Iscador[®] M spez angenommen werden, dass Bestandteile des Extraktes auch noch außerhalb der Blutbahn in so hohen Konzentrationen vertreten sind, dass sie dort proproliferativ wirken können. Die Abnahme der intravasalen Metastasierung unter 150 ng/kg KG in beiden Mausgruppen wäre dann mit einer vermehrten Auswanderung der MV3-Zellen ins Lungenparenchym zu vereinbaren, was den Anstieg der extravasalen Metastasierung der jeweiligen 150-ng/kg-Gruppe wiederum unterstützt. Diese Auswanderung von Melanomzellen scheint die Selektindefizienz in der *E^{-/-}/P^{-/-}/Scid*-Maus in keiner Weise im Vergleich zur *Scid*-Maus zu inhibieren.

Demzufolge wäre Iscador[®] M spez nicht nur ein prometastatischer Effekt, sondern auch eine Eigenschaft zuzuschreiben, die die Penetration metastatischer Zellen aus der Blutbahn in andere Organe induziert. Die Ergebnisse der Iscador[®]-Wirkung auf die Lungenmetastasierung hätten also zu der Annahme führen können, dass *i. p.* verabreichtes Iscador[®] M spez nur auf intravasale Metastasen antiproliferativ wirken kann und zudem nur in hohen Dosen von 150 ng/kg KG ML-I. Die Annahme, dass die Konzentration im Lungenparenchym möglicherweise nicht

mehr hoch genug ist, um auch auf extravasale Metastasen antiproliferativ wirksam sein zu können, ist nicht haltbar. Denn eine deutliche prometastatische Tendenz unter steigender Dosierung lässt auch dort auf eine noch vorhandene Wirkung schließen. Diese prometastatische Tendenz könnte jedoch auch durch das verstärkte Penetrationsverhalten der MV3-Zelllinie unter ansteigender Dosierung vorgetäuscht werden.

Zur Aktivitätsbeurteilung der akzessorischen Zellen des unspezifischen Immunsystems unter der Therapie mit Iscador® M spez wurden dendritische Zellen im Primärtumorgewebe erfasst. In der *Scid*-Gruppe konnte unter keiner Dosierung eine Induktion der Einwanderung in das Primärtumorgewebe verzeichnet werden (Tab. 4.3.1.1, Abb. 4.3.1.1). Hingegen war eine, wenn auch statistisch nicht signifikante, aber dennoch leicht gegenteilige Wirkung in der mit 10 und 150 ng/kg KG behandelten Gruppe eingetreten. Während Iscador® M spez möglicherweise die Penetration metastatischer Zellen aus der Blutbahn in andere Organe zu induzieren vermag, scheint es in der *Scid*-Maus nicht die Fähigkeit zu besitzen, das Auswandern dendritischer Vorläuferzellen aus der Blutbahn ins Primärtumorgewebe zu begünstigen. Dies stellte sich in der *E⁻/P⁻/Scid*-Maus anders dar. Aber auch in der *Scid*-Maus hatten Thies *et al.* (2008) mit hoch aufgereinigtem ML-I signifikant erhöhte Zahlen eingewanderter dendritischer Zellen im Primärtumor unter allen ML-I-Dosierungen (30, 150 und 500 ng/kg KG) festgestellt. Bezüglich der Reifung dendritischer Zellen hatten Stein und Kollegen (2002a) mit Iscador® P *in vitro* festgestellt, dass es signifikant die Ausreifung (CD83 Expression) dendritischer Zellen fördert. Nebenbei induziert es die Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 und die für die Präsentation von Antigenen wichtigen HLA-Klasse I- und II-Moleküle, was mit unfermentierten Mistelpräparaten hingegen nicht gelang (Stein *et al.*, 2002a).

Da bekannt ist, dass ausgereifte dendritische Zellen nicht mehr zur Diapedese der Endothelzellmonolayer der Blutgefäße in der Lage sind, was die unreifen Vorläuferzellen noch vermögen (Pendl *et al.*, 2002), wäre folgende Frage zu erheben: Ist in dieser Arbeit unter der Therapie mit Iscador® M spez die Ausreifung der dendritischen Zellen auch derartig signifikant gesteigert und möglicherweise beschleunigt worden, dass dies zu einer verminderten Auswanderung in das Primärtumorgewebe führte? Angesichts des nicht signifikanten Unterschieds

zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppen muss dieser Gedanke jedoch nicht näher weiterverfolgt werden. Auch die Ergebnisse in der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe unterstützen diese Annahme nicht. Denn hier konnte ein signifikanter Anstieg dendritischer Zellen in den Primärtumoren unter der Behandlung mit 10- und 150 ng/kg KG im Vergleich zur Kontrollgruppe (* $p < 0,05$) festgestellt werden (Tab. 4.3.2.1, Abb. 4.3.2.1). Die 30-ng/kg-Gruppe war im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht und im Vergleich zu den beiden anderen Behandlungsgruppen signifikant erniedrigt. Die Selektindefizienz scheint in diesem Punkt überraschenderweise einen additiven Effekt auf die ML-I-Therapie zu haben. Schließlich wäre ein gegenteiliger Effekt der Selektindefizienz auf das Auswandern dendritischer Vorläuferzellen in den Primärtumor zu erwarten gewesen. Von biologischer Warte aus betrachtet, ist es jedoch fraglich, ob die signifikanten Unterschiede des Anteils dendritischer Zellen in der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe von 0,96 % in der Kontrollgruppe (Streubreite 0,20–1,90 dendritische Zellen) auf 1,80 % bzw. 1,81 % (Streubreite 0,30–3,30 bzw. 0,10–3,30 dendritische Zellen) in der 10- bzw. 150 ng/kg Behandlungsgruppe überhaupt biologisch relevant sind. Tatsächlich befinden sich die absoluten Zahlen im Bereich von nur 0,10 bis 3,30 Zellen. Richtet man den Blick, mit der Frage der biologischen Relevanz, noch einmal auf die Primärtumorgewichte, so ist zu erkennen, dass sich die Signifikanz dort nicht in einer Reduktion des Primärtumorgewichtes ausgewirkt hat. Weder in der 10- noch in der 150-ng/kg-Gruppe hatten die signifikant erhöhten dendritischen Zellen einen reduktiven Einfluss auf das Primärtumorgewicht ausgeübt. Nur in der *Scid*-Gruppe konnte überhaupt eine geringe antiproliferative Wirkung auf den Primärtumor durch die Mistelbehandlung ab 30 ng/kg KG und höher erreicht werden, die aber wiederum nicht auf die dendritischen Zellen zurückgeführt werden kann. Dass dendritische Zellen in der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Maus durch die Selektindefizienz in ihrer Migration ins Primärtumorgewebe behindert werden (Pendl, 2000), zeigte auch die vorliegende Arbeit an signifikant erhöhten Werten für die *Scid*-Gruppe, und zwar sowohl in der Kontrollgruppe (* $p < 0,05$) als auch in der 30-ng/kg-Gruppe (** $p < 0,005$) gegenüber den $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Mäusen (Tab. 4.3.3.1, Abb. 4.3.3.1).

Allerdings konnte diese Tendenz nicht für die gesamte *Scid*-Mausgruppe festgestellt werden, da in den beiden anderen Behandlungsgruppen mit 10- und 150 ng/kg KG wiederum die $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe etwas mehr dendritische Zellen im Primärtumorgewebe hatte (Tab. 4.3.3.1, Abb. 4.3.3.1). Trotzdem kann letzteres Ergebnis im Hinblick auf die immunologische Konstitution der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Maus als

adäquat eingeschätzt werden. Als unerwartet ist hingegen die Wirkweise von Iscador[®] M spez zu bezeichnen, das im Gegensatz zu gereinigtem ML-I zu keiner positiven Korrelation von Dosissteigerung und Anstieg des Dendritenanteils in allen behandelten Gruppen führte.

Der mittels quantitativer *Alu*-PCR analysierte Gehalt disseminierter Melanomzellen im Blut der Versuchstiere konnte nur in der *E^{-/-}/P^{-/-}/Scid*-Gruppe unter der Behandlung mit 30 und 150 ng/kg KG ML-I im Vergleich mit der Kontrollgruppe jeweils leicht reduziert werden (Tab. 4.4.2.1, Abb. 4.4.2.1). Gegenteilig und dazu noch teilweise signifikant war der Effekt in der *Scid*-Gruppe. Dort war der Gehalt disseminierter Melanomzellen in der 10-ng/kg-Gruppe mit 396,0 (0–1422) Melanomzellen sowohl gegenüber der Kontrollgruppe mit 89 (0–769) Zellen als auch gegenüber den beiden höher dosierten Behandlungsgruppen statistisch signifikant erhöht (**p* < 0,05) (Tab. 4.4.1.1, Abb. 4.4.1.1). In dieser 10-ng/kg-Gruppe der *Scid*-Tiere zeigte sich auch das Primärtumorgewicht und die Zahl intravasaler Metastasen im Vergleich zu allen anderen Vergleichsgruppen erhöht, wenn auch nicht statistisch signifikant, wie der Gehalt an disseminierten Melanomzellen. Währenddessen ist in dieser Gruppe die Zahl dendritischer Zellen nicht auffällig niedrig, was als eine Erklärung hätte herangezogen werden können.

Das Phänomen des signifikant erhöhten Gehaltes disseminierter Melanomzellen in der 10-ng/kg-Gruppe gegenüber den anderen Behandlungsgruppen fand sich sowohl in der *Scid*- als auch in der *E^{-/-}/P^{-/-}/Scid*-Gruppe. Diese Dosierung hat offensichtlich einen induzierenden Effekt auf die im Blut zirkulierenden MV3-Melanomzellen (Tab. 4.4.2.1, Abb. 4.4.2.1). Allerdings ist dieser, das Wachstum induzierende Effekt auch schon im Primärtumorwachstum dieser beiden 10-ng/kg-Gruppen tendenziell offenbar, obschon er in der Lungenmetastasierung wiederum keine konsequente Bestätigung findet. In der Korrelationsanalyse zwischen pulmonaler Gesamtmetastasierung und dem Gehalt disseminierter Melanomzellen fand sich in nur einer Behandlungsgruppe eine nennenswerte Wechselbeziehung. Dies war ausgerechnet die 10-ng/kg-Gruppe der *E^{-/-}/P^{-/-}/Scid*-Tiere. In dieser Gruppe spiegelte wiederum die intravasale Metastasierung nicht die Tendenzen wider, die unter 10 ng/kg KG ML-I in Bezug auf den Gehalt disseminierter intravasaler Zellen gefunden werden konnte. Erstaunlich ist außerdem, dass trotz bestehender Selektindefizienz durch die Kombination mit

10 ng/kg KG ML-I eine signifikant positive Korrelation zwischen intravasal zirkulierenden Zellen und Gesamtmetastasierung zustande kommen konnte. Diese Beobachtung konnte in der entsprechenden 10-ng/kg-Gruppe der *Scid*-Tiere nicht gemacht werden. Eine tendenzielle Abnahme, wie sie bei der intravasalen Lungenmetastasierung in den 150-ng/kg-Gruppen beider Mausstämme beobachtet werden konnte, war hinsichtlich des Gehaltes disseminierter intravasaler Melanomzellen nur in der $E^{-}/P^{-}/Scid$ -Gruppe zu verzeichnen. Die Annahme einer vermehrten Auswanderung der MV3-Zellen ins Lungenparenchym, die dort den Anstieg der extravasalen Lungenmetastasierung dieser 150-ng/kg-Gruppe unterstützt, wäre damit zu vereinbaren. Es ist jedoch verwunderlich, dass diese Beobachtung in der *Scid*-Gruppe keine Bestätigung findet. Schließlich ist in der *Scid*-Gruppe eine vermehrte Auswanderung aus dem Blutstrom ins Parenchym anderer Organe leichter vorstellbar als unter bestehender Selektindefizienz.

Ein weiterer diskussionswürdiger Aspekt ist die in dieser Arbeit gewählte Applikationsform der Mistel. Die intraperitoneale Injektion ermöglichte, das ML-I systemisch zu verabreichen ohne es intravenös applizieren zu müssen, da eine mehrmalige Punktion der Schwanzvenen mit der allgemeinen Gefahr der Thrombosierung, Thrombophlebitis und Vernarbung verbunden ist. Diese Komplikationen der intravenösen Applikation hätten die Injektionen über den Zeitraum von 19 Tagen möglicherweise behindert. Die intraperitoneale Injektion ermöglicht wiederum keine Vorhersage über die tatsächlich im Serum erzielte ML-I-Konzentration. Das ML-I ist ein großes Molekül, das in wässrigen Lösungen Dimere bildet und daher wahrscheinlich nur zu einem geringen Prozentsatz resorbiert wird. Inwieweit die anderen Inhaltsstoffe von Iscador[®] M spez resorbiert werden und die Resorption von ML-I beeinflussen, ist unklar.

Interessant wäre es daher, *in vivo* zu untersuchen, wie die Ergebnisse mit Iscador[®] M spez bei intravenöser oder intratumoraler Applikation ausfielen, da hier sehr gute Ergebnisse mit dem lektinreichen Mistelextrakt Abnobaviscum Fraxini[®] in humanen Pankreas-Ca-Xenografts gemacht wurden (Rostock *et al.*, 2005). Auch bei einem Patienten mit Duodenumkarzinom im fortgeschrittenen Stadium (Zustand nach Operation) führte die intratumorale Misteltherapie mit dem Mistelextrakt Abnobaviscum Quercus[®] in eine komplette Remission eines Duodenum-Karzinom-Rezidivs (Nabrotzki & Scheffler, 2001). Daneben gibt es für den *intravenös*

applizierten Extrakt der koreanischen Mistel ebenfalls gute Ergebnisse, die einen signifikanten Rückgang der pulmonalen Filialisierung bei diversen Melanom-, Lymphom- sowie Kolonkarzinom-Zelllinien zeigen (Yoon *et al.*, 1998). Allerdings wurde der Extrakt der Mistel in diesen Arbeiten zwei Tage vor Inokulation der Krebszellen *intravenös* verabreicht und nicht *intraperitoneal* oder nach der Inokulation wie in der vorliegenden Arbeit.

In Synopse der dargestellten Ergebnisse wird deutlich, dass die Resultate der vorliegenden Arbeit überwiegend im Gegensatz zu den Resultaten klinischer Erfahrungen und Ergebnisse mit dem Mistelextrakt Iscador[®] stehen. Die mit dieser Arbeit unter anderem angestrebte Aufklärung zum tieferen Verständnis des molekularen Wirkmechanismus von bereits erfolgreich eingesetzten Mistelextrakten hat zum Aufkommen weiterer Fragen geführt und kann die antitumorale Wirksamkeit *in vivo* nicht bestätigen. Positiv bestätigt werden können lediglich die gute allgemeine Verträglichkeit und die Sicherheit von Iscador[®] (Melzer *et al.*, 2009, Bock *et al.*, 2004, Kienle & Kiene, 2003b) in den angewandten Dosierungen von 10, 30 und 150 ng/kg KG ML-I. Die Dosierungen waren über den gesamten Behandlungszeitraum von 19 Tagen für alle Mäuse gut verträglich, da keine Veränderungen in der Vitalität der Mäuse auftraten.

Ein weiterer, zu berücksichtigender Aspekt bei der Interpretation der Ergebnisse ist die ungleiche Konstitution der Immunsysteme von Mensch und Versuchstier. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *Scid*-Mäuse des Typs BALB/c *scid/scid* verfügten aufgrund eines Gendefektes nur über eine eingeschränkte Immunfunktion. Würden sie über eine spezifische zelluläre Immunabwehr aus B- und T-Lymphozyten verfügt haben, hätten ihnen humane Melanomzellen nicht transplantiert werden können. Die B- und T-Lymphozyten mussten depletiert sein, da es sonst zur Abstoßung des Transplantates gekommen wäre. Jedoch verfügten sie über eine unspezifische zelluläre Immunabwehr aus Makrophagen, NK-Zellen und dendritischen Zellen. Es wurde davon ausgegangen, dass diese durch die intraperitoneale Gabe von Iscador[®] M spez stimuliert worden ist. Folglich ist es zulässig, durch die Untersuchungsergebnisse, die aus dem Melanom-Mausmodell hervorgegangen sind, eine Aussage über das immunologische Reaktionsvermögen des unspezifischen Immunsystems der *Scid*-Maus zu machen. Diese Folgerungen lassen sich jedoch nicht ohne weiteres auf den

Menschen übertragen, da insbesondere die Iscador[®]-Behandlung auch Wirkungen auf das spezifische Immunsystem ausübt. Die B- und T-Zellen des spezifischen Immunsystems, die unter anderem über das unspezifische Immunsystem aktiviert werden, sind zu einem großen Teil für die immunologische Antwort auf die Misteltherapie verantwortlich (Elluru *et al.*, 2008; Büssing, 2006; Blaschek *et al.*, 2004; Kienle & Kiene 2003a; Wagner, 2001; Heiny & Beuth, 1994; Gabius & Gabius, 1991; Hajto *et al.*, 1990, 1989), wodurch die guten klinischen Ergebnisse mit Mistelextrakten begründet sein könnten. Dass die neben ML-I im Mistelextrakt enthaltenen Mistelbestandteile auch auf das unspezifische Immunsystem einwirken, zeigen die vorliegenden Ergebnisse im Vergleich mit den Ergebnissen von Thies *et al.* (2008) mit hoch aufgereinigtem ML-I in gleicher Dosierung. Die Ergebnisse ließen zum einen auch die Interpretation zu, dass der Gesamtextrakt gleichsam zu stark auf die isolierte unspezifische Abwehr der Versuchstiere einwirkt und die Immunzellen gewissermaßen zerstört, statt sie zu aktivieren. Zum anderen könnte davon ausgegangen werden, dass die peritoneale Resorption von ML-I durch die Anwesenheit der anderen Mistelinhaltsstoffe in gewisser Weise verhindert wird. Auch die Bildung von Anti-Mistellektin-Antikörpern ist an dieser Stelle zu diskutieren, die möglicherweise nur durch den Extrakt der gesamten Pflanze, nicht aber durch hoch aufgereinigtes ML-I induziert wird. Zudem ist es bekannt, dass die Inhaltsstoffe von *Viscum album* L. miteinander multimolekulare Wirkkomplexe bilden, die auf die biologische Gesamtwirkung Einfluss nehmen (Pfüller *et al.*, 2009; Edlund *et al.*, 2000; Heiny & Beuth, 1994).

Die Wirkung auf Tumorzellen ist gesondert zu betrachten und könnte durch die vorstellbare Beeinflussung der E-Selektin-Expression unter der Misteltherapie einen Diskussionsansatz finden. E-Selektin vermittelt außer der umfassenden Leukozytenadhäsion bei Entzündungen auch die Bindung von Tumorzellen an vaskuläres Endothel und leitet damit die Kaskade der Fernmetastasierung ein (Brodthorn *et al.*, 1997; Mannori *et al.*, 1997; Biancone *et al.*, 1996; Dejana *et al.*, 1992). Zytokinkombinationen von IFN γ mit TNF α oder INF γ mit LPS können die Expressionszeit von E-Selektin verlängern, wohingegen IL-4 – alleine oder in Kombination mit TGF- β – die TNF α - oder LPS-Induktion verhindert (Carlos & Harlan, 1994, Thornhill & Haskard, 1990). Auch die Mistel führt bekanntermaßen zur Erhöhung der endogenen Spiegel von IL-1, IL-6, TNF α und INF- γ (Hajto *et al.*, 1997, 1990; Hostanska *et al.*, 1995). Insbesondere die Erhöhung von TNF α und INF- γ führt

zur Verlängerung der E-Selektin-Expressionszeit in der *Scid*-Maus und könnte damit zur Beschleunigung der Metastasierung geführt haben.

Die zunehmende Tendenz der Lungenmetastasierung unter steigender ML-I-Konzentration fände in der *Scid*-Gruppe dadurch einen Diskussionsansatz. Jedoch unterstützten die Ergebnisse der $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Gruppe diese Hypothese nicht, da trotz fehlender E-Selektine dort diese steigende Tendenz der pulmonalen Metastasierung ebenso auftrat. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass es kontrovers diskutiert wird, ob E-Selektin im Melanom-Metastasierungs-geschehen involviert ist oder nicht (Nguyen *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 1996; Kunzendorf *et al.*, 1994). In diesem Sinne ist es von Interesse, ob durch eine E- und P-Selektindefizienz die Metastasierung anderer, weniger aggressiver Melanomzelllinien aufgehalten werden kann. Ein Vergleich mit vorangegangenen Analysen ist insbesondere bezüglich des Verhaltens der Metastasierung in der $E^{-/-}/P^{-/-}/Scid$ -Maus erschwert, da hier noch wenige vergleichbare Forschungsergebnisse vorliegen.

In Synopse der dargestellten Resultate wird das Erfordernis weiterführender Untersuchungen zur Klärung des Wirksamkeitsunterschiedes *in vivo* zwischen Mistelextrakt und gereinigtem ML-I deutlich. Es obliegt weiteren Untersuchungen, diese im Mistelextrakt Iscador[®] M 5 mg spezial enthaltenen Stoffe zu identifizieren, die ursächlich für die nicht vorhandene Wirksamkeit von ML-I am Melanom *in vivo* sind.

6 Zusammenfassung

Für Menschen mit kutanem malignem Melanom ist die Prognose nach erfolgter Metastasierung trotz neuester Therapieprotokolle infaust, so dass größtes Interesse an neuen therapeutischen Ansätzen besteht. Deshalb sollte der Mistelextrakt Iscador® M 5 mg spezial mit festgelegtem ML-I-Gehalt auf seine Wirksamkeit durch *in vivo* Experimente im Xenograftmelanommodell überprüft werden. Hierzu wurden an humanen MV3-Melanomen in immundefizienten Mäusen die antiproliferative und antimetastatische Wirkung anhand von Primärtumorwachstum sowie intra- und extravasaler pulmonaler Metastasierung bewertet. Analysiert wurden ferner der Gehalt disseminierter Melanomzellen im Blut und die immunmodulatorische Potenz anhand der Einwanderung dendritischer Zellen in den Primärtumor. Zur präziseren Analyse der initialen Metastasierungsschritte und der funktionellen Beteiligung der dendritischen Zellen wurden die zwei ungleich immundefizienten Mausarten *Scid* und *E⁻/P⁻/Scid* miteinander verglichen. Verschiedene Dosierungen von Iscador® M 5 mg spezial (10, 30 und 150 ng/kg KG) hatten keinen relevanten Einfluß auf die untersuchten Parameter.

Die tumorbiologischen Untersuchungen zeigten, dass es in der *E⁻/P⁻/Scid*-Maus zu einem verspäteten und leicht reduzierten Primärtumorwachstum im Vergleich zur *Scid*-Maus kam. Die pulmonale Gesamtmetastasierungsrate wurde durch die Selektindefizienz um 22,11 % gesenkt während die mittlere Gesamtmetastasenzahl der *E⁻/P⁻/Scid*-Gruppe statistisch nicht signifikant unterhalb der Ergebnisse in der *Scid*-Gruppe lag. Die extra- und intravasale Metastasierungsrate wurde in der *E⁻/P⁻/Scid*-Gruppe durch die Selektindefizienz jeweils nahezu gegenüber der *Scid*-Gruppe halbiert.

Währenddessen war die mittlere extravasale Metastasenzahl der *E⁻/P⁻/Scid*-Gruppe nur leicht erniedrigt und die intravasale leicht erhöht gegenüber der *Scid*-Gruppe. Die Untersuchung des Gehaltes dendritischer Zellen im Primärtumorgewebe zeigte in der *Scid*-Kontrollgruppe einen signifikant höheren dendritischen Zellanteil, welcher sich jedoch nicht in einer Reduktion des Primärtumorgewichtes dieser Gruppe auswirkte. Das wiederum nicht signifikante Ergebnis der molekulargenetischen Analyse des mittleren Gehaltes disseminierter Tumorzellen im Blut zeigte die *E⁻/P⁻/Scid*-Kontrollgruppe leicht erhöht gegenüber der *Scid*-Gruppe.

Die Behandlung mit Iscador[®] M spez führte weder in den *Scid*- noch in den *E⁻/P⁻/Scid*-Behandlungsgruppen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe zu einer signifikanten Reduktion des Primärtumorgewichtes. Gleiches gilt für das Verhalten der pulmonalen Metastasierung sowie den molekulargenetisch analysierten Gehalt disseminierter Melanomzellen im Blut der Versuchstiere unter der Behandlung mit Iscador[®] M spez. Erstaunlicherweise führte die Behandlung mit Iscador[®] M spez nur in der *E⁻/P⁻/Scid*-Gruppe zu einer positiven Korrelation von Dosissteigerung und Anstieg des Dendritenanteils mit signifikantem Anstieg unter der Behandlung mit 10 und 150 ng/kg KG.

Während vorherige Studien mit isoliertem ML-I am malignen Melanom eine deutliche Wirkung auf die Primärtumorgröße und die Anzahl der Metastasen zeigten, war dies bei gleicher Dosierung von ML-I in Iscador[®] M spez nicht der Fall. Deshalb ist davon auszugehen, dass weitere Inhaltsstoffe in Iscador[®] M spez die Wirksamkeit des ML-I *in vivo* inhibieren. Zur Klärung des Wirksamkeitsunterschiedes *in vivo* wird die Identifizierung der die ML-I-Wirkung im Extrakt beeinflussenden Substanzen ein wichtiger Fortschritt sein.

7 Literaturverzeichnis

- Armstrong BK, Kricger A. Cutaneous melanoma. *Cancer Surv* 1994 19-20:219-40.
- Augustin M, Bock PR, Hanisch J, Karasmann M, Schneider B. 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* 2005 55:38-49.
- Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton AJ, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001a 19:3635-48.
- Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, Urist M, McMasters KM, Ross MI, Kirkwood JM, Atkins MB, Thompson JA, Coit DG, Byrd D, Desmond R, Zhang Y, Liu PY, Lyman GH, Morabito A. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* 2001b 19:3622-34.
- Balch CM, Buzaid AC, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Houghton AJ, Kirkwood JM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen D, Ross MI, Sober A, Soong SJ, Thompson JA, Thompson JF, Gershenwald JE, McMasters KM. A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *Cancer* 2000 88:1484-91.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998 392:245-52.
- Bantel H, Engels IH, Voelter W, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S. Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Research* 1999 59:2083-90.
- Barbieri L, Battelli MG, Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochim. Biophys. Acta*, 1993 1154:237-82.
- Baumgartner S, Flückiger H, Jäggy C, Schaller G, Rossi DS, Urech K. Untersuchung des Iscador-Maschinenprozesses in Modellsystemen der Zytotoxikologie und Phytopathologie. In: Scheer R, Bauer R, Becker H, Fintelman V, Kemper FH, Schilcher H (Hrsg.). *Fortschritte in der Misteltherapie. Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung*. KVC Verlag, Essen 2005 S. 169-79.
- Baxevanis CN, Vontsas IF, Soler MH, Gritzapis AD, Tsitsilonis OE, Stoeva S, Voelter W, Arsenis P, Papamichail M. Mistletoe lectin I-induced effects on human cytotoxic lymphocytes. I. Synergism with IL-2 in the induction of enhanced LAK cytotoxicity. *Immunopharm. Immunotox.* 1998 20:355-72.
- Becker N, Wahrendorf J. *Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland, 1981-1990*. Springer Verlag, 3. Auflage, 1998.

- Becker H. In: Büssing A (Hrsg.). Mistletoe. The Genus *Viscum*, Hardwood Academic Publishers, Band 16, Amsterdam 2000, S. 31-43.
- Beuth J, Stoffel B, Ko HL, Buss G, Tunggal L, Pulverer G. Immunoactive effects of various mistletoe lectin-1 dosages in mammary carcinoma patients. *Arzneimittelforschung* 1995 45:505-7.
- Beuth J, Ko HL, Tunggal L, Steuer MK, Geisel J, Jeljaszewicz J, Pulverer G. Thymocyte proliferation and maturation in response to galactoside-specific mistletoe lectin-1. *In Vivo* 1993 7:407-10.
- Beuth J, Ko HL, Gabius HJ, Burcher H, Oette K, Pulverer G. Behavior of lymphocyte subsets and expression of activation markers in response to immunotherapy with galactoside-specific lectin from mistletoe in breast cancer patients. *Clin. Investig.* 1992 70:658-61.
- Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest.* 1993 91:379-87.
- Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA Jr, Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science.* 1989 243:1160-5.
- Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA Jr. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 84:9238-42.
- Biancone L, Araki M, Araki K, Vassalli P, Stamenkovic I. Redirection of tumor metastasis by expression of E-selectin in vivo. *J Exp Med.* 1996 183:581-7.
- Bienvenu K, Granger DN. Molecular determinants of shear rate-dependent leukocyte adhesion in postcapillary venules. *Am J Physiol.* 1993 264:H1504-8.
- Bird MI, Foster MR, Priest R, Malhotra R. Selectins: physiological and pathophysiological roles. *Biochem Soc Trans.* 1997 25:1199-206.
- Blaschek W. Mistelpräparate. In: Bruhn, H., Fölsch, U., Kneba, MLH. (Hrsg.). *Onkologische Therapie.* Stuttgart, New York 2004. S. 130-140.
- Bock PR, Friedel WE, Hanisch J, Karasmann M, Schneider B. 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 of a multi-center, comparative, epidemiological cohort study in Germany and Switzerland. *Arzneimittelforschung* 2004 54:456-66. Erratum in: *Arzneimittelforschung.* 2004 54:563.
- Bosma MJ. B and T cell leakiness in the scid mouse mutant. *Immunodefic Rev* 1992 3:261-76.
- Bosma M, Carroll A, Reichman-Fried M, Hardy R. Status of Ig and TCR genes in non transformed B and T lineage cells of scid mice. 7th International Workshop on Immune-Deficient Animals. 1991, Sept 25-29.
- Brodts P, Fallavollita L, Bresalier RS, Meterissian S, Norton CR, Wolitzky BA. Liver endothelial E-selectin mediates carcinoma cell adhesion and promotes liver metastasis. *Int J Cancer.* 1997 71:612-19.
- Brodts P. Adhesion mechanisms in lymphatic metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 1991 10:23-32.

- Burger AM., Mengs U, Schuler J.B., Fiebig H.H..Anticancer activity of an aqueous mistletoe extract (AME) in syngeneic murine tumor models. *Anticancer Res.* 2001 21:1965-68.
- Büssing A. Immun Modulation Using Mistletoe (*Viscum album L.*) Extracts *Isca dor. Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 2006 56:508-15.
- Büssing A, Bischof M, Hatzmann W, Bartzsch F, Soto-Vera D, Fronk EM, Gmeindl M, Schietzel D, Stein GM. Beeinflussung der Granulozytenfunktion durch einmalige perioperative Mistelextrakt-Infusion. *Deutsche Zeitschrift für Onkologie* 2004 36:148-53.
- Büssing A. Biological and pharmacological properties of *Viscum album L.*. From tissue flask to man. In: Büssing (Hrsg.). *Mistletoe. The Genus Viscum.* Hardwood Academic Publishers Amsterdam 2000 S. 123-182.
- Büssing A, Wagner M, Wagner B, Stein GM, Schietzel M, Schaller G, Pfüller U. Induction of mitochondrial Apo2.7 molecules and generation of reactive oxygen-intermediates in cultured lymphocytes by the toxic proteins from *Viscum album L.*. *Cancer Lett* 1999a 139:79-88.
- Büssing A, Stein GM, Wagner M, Wagner B, Schaller G, Pfüller U, Schietzel M. Accidental cell death and generation of reactive oxygen intermediates in human lymphocytes induced by thionins from *Viscum album L.*. *Eur J Biochem* 1999b 262:79-87.
- Büssing A, Vervecken W, Wagner M, Wagner B, Pfüller U, Schietzel M. Expression of mitochondrial Apo2.7 molecules and Caspase-3 activation in human lymphocytes treated with the ribosome-inhibiting mistletoe lectins and the cell membrane permeabilizing viscotoxins. *Cytometry* 1999c 37:133-39.
- Büssing A, Stein GM, Pfüller U. Selective killing of CD8⁺ cells with a 'memory' phenotype (CD62L^{lo}) by the N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from *Viscum album L.*. *Cell death and Differentiation* 1998a 5:231-40.
- Büssing A, Multani AS, Pathak S, Pfüller U, Schietzel M. Induction of apoptosis by the N-acetyl-galactosamine-specific toxic lectin from *Viscum album L.* is associated with a decrease of nuclear p53 and Bcl-2 proteins and induction for telomeric associations. *Cancer Lett.* 1998b 130:57-68.
- Büssing A, Schaller G, Pfüller U. Generation of reactive oxygen intermediates (ROI) by the thionins from *Viscum album L.* *Anticancer Res.* 1998c 18:4291-96.
- Büssing, A. Apoptose-Induktion und DNA-Stabilisierung durch *Viscum album L.* *Forschende Komplementärmedizin* 1998:164-71.
- Büssing A, Suzart K, Schweizer K. Differences in the apoptosis-inducing properties of *Viscum album L.* extracts. *Anticancer Drugs* 1997 8:9-14.
- Büssing A, Suzart K, Schweizer K, Schietzel M. Killing und Inflammation. Über die Apoptose-induzierende Potenz von *Viscum album L.*-Extrakten. *Z Onkol* 1996a 28:2-9.
- Büssing A. Induction of apoptosis by the mistletoe lectins: a review on the mechanisms of cytotoxicity mediated by *Viscum album L.* *Apoptosis* 1996b:25-32.
- Büssing A, Suzart K, Bergmann J, Pfüller U, Schietzel M, Schweizer K. Induction of apoptosis in human lymphocytes treated with *Viscum album L.* is mediated by the mistletoe lectins. *Cancer Lett.* 1996c:59-72.

- Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*. 1994 84:2068-101.
- Carrasco L, Vásquez D, Hernández-Lucas C, Carbonero P, García-Olmedo F. Thionins: plant peptides that modify membrane permeability in cultured mammalian cells. *Eur J Biochem* 1981 116:185-89.
- Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol*. 1997 9:10-16.
- Cleland JL, Powell MF, Shire SJ. The development of stable protein for-mutations: A close look at protein aggregation, deamidation and oxidation. *Crit Rev Ther Drug Carrier Systems* 1993 10:307-77.
- Custer RP, Bosma GC, Bosma MJ. Severe combined immunodeficiency (SCID) in the mouse: pathology reconstitutionneoplasms. *Am J Pathol*. 1985 120:464-77.
- Dagnæs-Hansen F, Schjodtz Hansen P, Christensen L, Laursen H. The immune system of the SCID mouse. Characterisation of the immune system in the severe combined immune deficient (scid) mouse. *Scand-Las symposium Turku*. 1991, May 8-11.
- Dautel P. Multidimensionale Wirkung des hochaufgereinigten Mistlektins-I auf das humane maligne Melanom im Scid-Maus Xenograft-Modell. Dissertation aus dem Institut für Anatomie II: Experimentelle Morphologie, 2005, S. 25-36.
- Dejana E, Martin-Padura I, Lauri D, Bernasconi S, Bani MR, Garofalo A, Giavazzi R, Magnani J, Mantovani A, Menard S. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1-dependent adhesion of colon carcinoma cells to vascular endothelium is inhibited by an antibody to Lewis fucosylated type I carbohydrate chain. *Lab Invest*. 1992 66:324-30.
- Diepgen TL, Mahler V. "The epidemiology of skin cancer." *Br. J. Dermatol*. 2002, 146 Suppl 61:1-6.
- Dobos G, Deuse U, Michalsen A. Chronische Erkrankungen integrativ. Konventionelle und komplementäre Therapie. Elsevier, München; Urban & Fischer 2006, S. 308f.
- Edlund U, Hensel A, Fröse D, Pfüller U, Scheffler A. Polysaccharides from fresh *Viscum album* L. berry extract and their interaction with *Viscum album* agglutinin I. *Arzneimittelforschung*. 2000 50:645-51.
- Edward M. Melanoma cell-derived factors stimulate glycosaminoglycan synthesis by fibroblasts cultured as monolayers and within contracted collagen lattices. *Br J Dermatol*. 2001 144:465-70.
- Eifler R, Pfüller K, Göckeritz W, Pfüller U. Improved procedures for isolation of mistletoe lectins and their subunits: lectin pattern of the European mistletoe. In: Basu J, Kundu M, Chakrabarti P (Hrsg.). *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. Wiley Eastern Ltd. 9, 1993 S. 144-51.
- Elluru SR, van Huyen JP, Delignat S, Kazatchkine MD, Friboulet A, Kaveri SV, Bayry J. Induction of maturation and activation of human dendritic cells: a mechanism underlying the beneficial effect of *Viscum album* as complimentary therapy in cancer. *BMC Cancer* 2008 8:161.
- Endo Y. Mechanism of action on ricin and related toxic lectins on the inactivation of eukaryotic ribosomes. *Advances in Lectin Research* 1989 S. 60-73.

- Endo Y, Tsuguri K, Franz H. 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.* 1988 231:378-80.
- Feskanich D, Hunter DJ, Willett WC, Spiegelman D, Stampfer MJ, Speizer FE, Colditz GA. Oral contraceptive use and risk of melanoma in premenopausal women. *Br J Cancer.* 1999 81:918-23.
- Fintelmann V. *Onkologie auf anthroposophischer Grundlage.* Verlag J. Meyer, Stuttgart, Berlin 2002.
- Fischer S. *Stimulation der Immunabwehr durch Mistelinhaltsstoffe,* Hippokrates Verlag, Stuttgart 1996.
- Florack DEA, Stiekema WJ. Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of actions. *Plant Mol Biol* 1994 26:25-37.
- Folkman J. New perspectives in clinical oncology from angiogenesis research. *Eur J Cancer.* 1996 32A:2534-9.
- Franz H. *Viscoceaea lectins.* In: Franz H (Hrsg.). *Advances in lectin research.* VEB Verlag: Volk und Gesundheit, Berlin, 4. Auflage, 1991, S. 33-50.
- Franz H. Mistletoe lectins and their A and B chains. *Oncology* 1986 43:23-34.
- Franz, H. Inhaltsstoffe der Mistel (*Viscum album L.*) als potentielle Arzneimittel. *Pharmazie* 1985 40:97-104.
- Franz H, Kindt A, Eifler R, Ziska P, Benndorf R, Junghahn I. Differences in toxicity and antigenicity between mistletoe lectin I and viscotoxin A 3. *Biomed Biochim Acta.* 1983 42:K21-25.
- Franz H, Kindt A, Ziska P, Bielka H, Benndorf R, Venker L. The toxic A-chain of mistletoe lectin I: Isolation and its effect on cell-free protein synthesis. *Acta biol. med. germ.* 1982 41:9-16.
- Franz H, Ziska P, Kindt A. Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album L.*) *Biochem. J.* 1981 195:481-84.
- Gabius S, Kayser K, Gabius HJ. Analytische, immunologische und tierexperimentelle Voraussetzungen für die klinische Prüfung der auf Lektin Gehalt standardisierten Misteltherapie. *Dtsch. Z Onkol* 1991 23:113-19.
- Gabius S, Gabius HJ. Mistelpräparate als Immunstimulatoren in der Onkologie. *Niedersächsisches Ärzteblatt* 1991 9:16-24.
- Garbe C, Hauschild A, Volkenandt M, Schadendorf D, Stolz W, Reinhold U, Kortmann RD, Kettelhack C, Frerich B, Keilholz U, Dummer R, Sebastian G, Tilgen W, Schuler G, Mackensen A, Kaufmann R. *Deutsche Leitlinie: Malignes Melanom Version 15, 02/2005* (Internetquelle siehe unten).
- Garbe C. A rational approach to the follow-up of melanoma patients. *Recent Results Cancer Res* 2002 160:205-15.
- Garbe C, Blum A. Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001 14:280-90.
- Garbe C. Epidemiologie des Hautkrebses. In: Garbe C, Dummer R, Kaufmann R, Tilgen W (Hrsg.). *Dermatologische Onkologie.* Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio. 1997:40-56.

- Garbe C, Büttner P, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, Guggenmoos H, Lechner I, Lippold W, Orfanos CE. Primary cutaneous melanoma. Identification of prognostic groups and estimation of individual prognosis for 5093 patients. *Cancer* 1995a 75:2484-91.
- Garbe C, Büttner P, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, Guggenmoos-Holzmann I, Lechner W, Lippold A, Orfanos CE, Peters A, Rassner G, Stadler R, Stroebel W. Primary cutaneous melanoma: Prognostic classification of anatomic location. *Cancer* 1995b 75:2492-98.
- Gawlik C, Versteeg R, Engel E, Arps H, Kleeberg UR. Antiproliferative effect of mistletoe-extracts in melanoma cell lines. *Anticancer Res.* 1992 12:1882.
- Greene MH. The genetics of hereditary melanoma and nevi. *Cancer* 1999 86:2464-77.
- Grossarth-Maticek R, Kiene H, Baumgartner SM, Ziegler R. Use of Iscador, an extract of European mistletoe (*Viscum album*), in cancer treatment: prospective nonrandomized and randomized matched-pair studies nested within a cohort study. *Altern Ther Health Med.* 2001 7:57-66, 68-72, 74-6 passim.
- Grothey A, Düppe J, Hasenburg A, Voigtmann R. Anwendung alternativmedizinischer Methoden durch onkologische Patienten. *Dtsch. Med. Wschr.* 1998 123:923-29.
- Habu S, Kimura M, Katsuki M, Hioki K, Nomura T. Correlation of T-cell receptor gene rearrangements to T-cell surface antigen expression and to serum immunoglobulin level in scid mice. *Eur J Immunol* 1987 17:1467-71.
- Hajto T, Hostanska K, Fischer J, Saller R. Immunomodulatory effects of *Viscum album* agglutinin-I on natural immunity. *Anticancer Drugs* 1997 8:43-46.
- Hajto T, Hostanska K, Frei K, Rohrdorf C, Gabius HJ. Increased secretion of tumor necrosis factor α , interleukin 1 and interleukin 6 by human monomolecular cells exposed to β -galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extracts. *Cancer Res.* 1990 50:3322-26.
- Hajto T, Hostanska K, Gabius HJ. Modulatory potency of the β -galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defense system in vivo in rabbits and patients. *Cancer Res.* 1989 49:4803-08.
- Hakomori S. Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Res.* 1996 56:5309-18.
- Hakomori S. Novel endothelial cell activation factor(s) released from activated platelets which induce E-selectin expression and tumor cell adhesion to endothelial cells: a preliminary note. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 203:1605-13.
- Harlan JM, Winn RK, Vedder NB, Doerschuk CM, Rice CL. In Adhesion: Its role in inflammatory disease. Harlan JM & Liu DY, Edition Freeman; New York, 1992:117-24.
- Hebbar M, Adenis A, Révillion F, Duhamel A, Romano O, Truant S, Libersa C, Giraud C, Triboulet JP, Pruvot FR, Peyrat JP. E-selectin gene S128R polymorphism is associated with poor prognosis in patients with stage II or III colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2009 45:1871-76.

- Heiny BM, Albrecht V, Beuth J. Correlation of immune cell activities and beta-endorphin release in breast carcinoma patients treated with galactose-specific lectin standardized mistletoe extract. *Anticancer Res* 1998 18:583-6.
- Heiny BM, Beuth J. Mistletoe extract Standardized for the Galactoside-Spezifische Lectin (ML-I) Induces Beta-Endorphin Release and Immunopotential in Breast Cancer Patients. *Anticancer Res* 1994 14:1339-42.
- Herlyn M, Malkowicz SB. Regulatory pathways in tumor growth and invasion. *Lab Invest.* 1991 65:262-71.
- Herz E. Maligne Tumoren und Paraneoplasien. In: Jung EG, Moll I (Hrsg.). *Dermatologie*. Thieme Verlag Stuttgart, 5. Auflage 2003 S. 226.
- Hilbert DM, Holmes K, Anderson AO, Rudikoff S. Peyer's patch cells reconstitute the peripheral and mucosal immune systems of scid mice. 7th International Workshop on Immune-Deficient Animals. 1991, Sept 25-29.
- Holly EA, Kelly JW, Shpall SN, Chiu SH. Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1987 17: 459-68.
- Hostanska K, Hajto T, Spagnoli GC, Fischer J, Lentzen H, Herrmann R. A plant lectin derived from *Viscum album* induces cytokine gene expression and protein production in cultures of human peripheral blood mononuclear cells. *Nat Immun* 1995 14:295-304.
- Iwamura T, Caffrey TC, Kitamura N, Yamanari H, Setoguchi T, Hollingsworth MA. P-selectin expression in a metastatic pancreatic tumor cell line (SUIT-2). *Cancer Res.* 1997 57:1206-12.
- Janssen O, Scheffler A, Kabelitz D. In vitro effects of mistletoe extracts and mistletoe lectins. Cytotoxicity towards tumor cells due to the induction of programmed cell death (apoptosis). *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 1993 43:1221-27.
- Johnston GI, Cook RG, McEver RP. Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. *Cell.* 1989 56:1033-44.
- Jojovic M, Schumacher U. Quantitative assessment of spontaneous lung metastases of human HT29 colon cancer cells transplanted into scid mice. *Cancer Lett.* 2000 152:151-56.
- Kienle GS, Kiene H. Complementary cancer therapy: a systematic review of prospective clinical trials on anthroposophic mistletoe extracts. *Eur J Med Res.* 2007 12:103-19.
- Kienle GS, Kiene H. Die Mistel in der Onkologie. Fakten und konzeptionelle Grundlagen. Schattauer Stuttgart New York, 2003a, S. 300 ff.
- Kienle GS, Kiene H. Die Mistel in der Onkologie. Fakten und konzeptionelle Grundlagen. Schattauer Stuttgart New York, 2003b, S. 591 ff.
- Kleeberg UR, Suci S, Bröcker EB, Ruiter DJ, Chartier C, Liénard D, Marsden J, Schadendorf D, Eggermont AM; EORTC Melanoma Group in cooperation with the German Cancer Society (DKG) Final results of the EORTC 18871/DKG 80-1 randomised phase III trial. rIFN-alpha2b versus rIFN-gamma versus Iscador M versus observation after surgery in melanoma patients with either high-risk primary (thickness >3 mm) or regional lymph node metastasis. *Eur J Cancer* 2004 40:390-402.

- Klein R, Claßen K, Berg PA, Lüdtke R, Werner M, Huber R. In vivo induction of antibodies to mistletoe lectin-1 and viscotoxin by exposure to aqueous mistletoe extracts: a randomised double-blinded placebo controlled phase I study in healthy individuals. *Eur. J. Med. Res.* 2002 7:155-63.
- Köhler S, Ullrich S, Richter U, Schumacher U. E-/P-selectins and colon carcinoma metastasis: first in vivo evidence for their crucial role in a clinically relevant model of spontaneous metastasis formation in the lung. *Br J Cancer.* 2010 102:602-9. Epub 2009 Dec 15.
- Konopa J, Woynarowski M, Lewandowska-Gumieniak M. Isolation of Viscotoxins – Cytotoxic basic polypeptides from *Viscum album* L. *Hoppe-Seyler's Z.f.Physiol.Chem* 1980 361:1525-33.
- Krause T, Turner GA. Are selectins involved in metastasis? *Clin Exp Metastasis.* 1999 17:183-92.
- Krauspenhaar R. Struktur-Funktions-Analyse des Proteinkomplexes Mistellektin-I aus *Viscum album*. Dissertation: Hamburg, Universität, Chemie 2002 URN (NBN): urn:nbn:de:gbv:18-7575 S. 28-30.
- 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. Crystal structure of mistletoe lectin I from *Viscum album*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999 257:418-24.
- Krifter R, Lischinig H, Pachmajer U. Ergänzende und alternative Karzinomtherapie in Österreichs Allgemeinpraxen. *Der Praktische Arzt* 1992 46:564-75.
- Krüpe M. Blutgruppenspezifische pflanzliche Eiweißkörper. Enke, Stuttgart 1956.
- Kunzendorf U, Krüger-Krasagakes S, Notter M, Hock H, Walz G, Diamantstein T. A sialyl-Le(x)-negative melanoma cell line binds to E-selectin but not to P-selectin. *Cancer Res.* 1994 54:1109-12.
- Lankisch PG, Vogt W. Potention of haemolysis by the combined action of Phosphoipase A and a basic peptide containing S-S-Bonds (Viscotoxin B). *Experientia* 1971 27:122-23.
- Lasky LA. Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annu Rev Biochem.* 1995 64:113-39.
- Ley K, Gaehtgens P. Endothelial, not hemodynamic, differences are responsible for preferential leukocyte rolling in rat mesenteric venules. *Circ Res.* 1991 69:1034-41.
- Luscinskas FW, Ding H, Tan P, Cumming D, Tedder TF, Gerritsen ME. L- and P-selectins, but not CD49d (VLA-4) integrins, mediate monocyte initial attachment to TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow in vitro. *J Immunol.* 1996 157:326-35.
- Mackie RM, Freudenberger T, Aitchison TC. Personal risk-factor chart for cutaneous melanoma. *Lancet* 1989 2:487-90.
- Mannori G, Santoro D, Carter L, Corless C, Nelson RM, Bevilacqua MP. Inhibition of colon carcinoma cell lung colony formation by a soluble form of E-selectin. *Am J Pathol.* 1997 151:233-43.

- Martín-Fontecha A, Lanzavecchia A, Sallusto F. Dendritic cell migration to peripheral lymph nodes. *Handb Exp Pharmacol*. 2009 188:31-49.
- Mauer S. Lektin- und Immunhistochemische Untersuchungen am malignen Melanom im Xenograftmodell. Dissertation Hamburg, 2005.
- Mayrovitz HN. Leukocyte rolling: a prominent feature of venules in intact skin of anesthetized hairless mice. *Am J Physiol*. 1992 262:H157-61.
- McEver RP. Selectin-carbohydrate interactions during inflammation and metastasis. *Glycoconj J*. 1997 14:585-91.
- Melzer J, Iten F, Hostanska K, Saller R. Efficacy and safety of mistletoe preparations (*Viscum album*) for patients with cancer diseases. A systematic review. *Forsch Komplementmed*. 2009 16:217-26.
- Metzner G, Franz H, Kindt A, Fahlbusch B, Süß J. The in vitro activity of lectin 1 from mistletoe (ML 1) and its isolated A and B chains on functions of macrophages and polymorphonuclear cells. *Immunobiol*. 1985 169:461-72.
- Miller N, Vile RG, Hart IR. Selectin ligands on human melanoma cells. *Glycoconj J*. 1996 13:33-43.
- Möckel B, Schwarz T, Zinke H, Eck J, Langer M, Lentzen H. Effects of mistletoe lectin I on human blood cell lines and peripheral blood cells. Cytotoxicity, apoptosis and induction of cytokines. *Arzneim.-Forsch./Drug Res*. 1997 47:1145-51.
- Müthing J, Meisen I, Bulau P, Langer M, Witthon K, Lenzen H, Neumann U, Peter-Katalinić J. Mistletoe lectin I is a sialic acid-specific lectin with strict preference to gangliosides and glycoproteins with terminal Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc residues. *Biochem*. 2004 43:2996-3007.
- Nabrotzki M, Scheffler A. Komplette Remission nach intratumoralen Misteltherapie eines Duodenum-Karzinom-Rezidivs. In: Scheer R, Bauer R, Becker H, Berg PA, Fintelmann V (Hrsg.). *Die Mistel in der Tumorthherapie*. Grundlagenforschung und Klinik. KVC Verlag, Essen 2001 S. 413-22.
- Needham LK, Schnaar RL. Carbohydrate recognition in the peripheral nervous system: a calcium-dependent membrane binding site for HNK-1 reactive glycolipids potentially involved in Schwann cell adhesion. *J Cell Biol*. 1993 121:397-408.
- Nguyen TD, Smith MJ, Hersey P. Contrasting effects of T cell growth factors on T cell responses to melanoma in vitro. *Cancer Immunol Immunother*. 1997 43:345-54.
- Nixon-Fulton JL, Witte PL, Tigelaar RE, Bergstresser PR, Kumar V. Lack of dendritic Thy-1⁺ epidermal cells in mice with severe combined immunodeficiency disease. *J Imm* 1987 138:2902-05.
- Olsnes S, Stirpe F, Sandvig K, Pihl A. Isolation and characterization of viscumin, a toxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe). *J. Biol. Chem*. 1982 257:13263-70.
- Orfanos CE, Jung EG, Rassner G, Wolff HH, Garbe C. Stellungnahme und Empfehlungen der Kommission malignes Melanom der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft zur Diagnostik, Behandlung und Nachsorge des malignen Melanoms der Haut. Stand 1993/94. *Hautarzt* 1994 45:285-91.

- Orrù S, Scaloni A, Giannattasio M, Urech K, Pucci P, Schaller G. Amino acid sequence, S-S bridge arrangement and distribution in plant tissues of thionins from *Viscum album*. *Biol Chem*. 1997 378:989-96.
- Pae HO, Oh GS, Seo WG, Shin MK, Hong SG, Lee HS, Chung HT. Mistletoe lectin synergizes with paclitaxel in human SK-hep 1 hepatocarcinoma cells. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 2001 23:531-49.
- Park WB, Lyu SY, Kim JH, Choi SH, Chung HK, Ahn SH, Hong SY, Yoon TJ, Choi MJ. Inhibition of tumor growth and metastasis by Korean mistletoe lectin is associated with apoptosis and antiangiogenesis. *Cancer Biother Radiopharm* 2001 16:439-47.
- Pendl GG, Robert C, Steinert M, Thanos R, Eytner R, Borges E, Wild MK, Lowe JB, Fuhlbrigge RC, Kupper TS, Vestweber D, Grabbe S. Immature mouse dendritic cells enter inflamed tissue, a process that requires E- and P-selectin, but not P-selectin glycoprotein ligand 1. *Blood*. 2002 99:946-56.
- Pfüller U, Pfüller K, Wahlkamp M. Glykanmotive der Mistellektine vom RIP II-Typ in ihrer biologischen Bedeutung. In: Scheer R, Alban S, Becker H, Holzgrabe U, Kemper FH, Kreis W, Matthes H, Schilcher H (Hrsg.). *Die Mistel in der Tumorthherapie. Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung*. KVC Verlag, Essen 2009 S. 80-89.
- Pfüller U. Chemical Constituents of European Mistletoe (*Viscum album* L.). Isolation and Characterisation of the Main Relevant Ingredients: Lectins, Viscotoxins, Oligo-/polysaccharides, Flavonoides, Alkaloids. In: Büssing A (Hrsg.). *Mistletoe. The Genus *Viscum*. Medicinal & Aromatic Plants – Industrial Profiles*. Amsterdam 2000 S. 101-22.
- Pottratz ST, Hall TD, Scribner WM, Jayaram HN, Natarajan V. P-selectin-mediated attachment of small cell lung carcinoma to endothelial cells. *Am J Physiol*. 1996 271:L918-23.
- Resto VA, Burdick MM, Dagia NM, McCammon SD, Fennewald SM, Sackstein R. L-selectin-mediated lymphocyte-cancer cell interactions under low fluid shear conditions. *J Biol Chem*. 2008 283:15816-24.
- Ribéreau-Gayon G, Jung ML, Frantz M, Anton R. Modulation of cytotoxicity and enhancement of cytokine release induced by *Viscum album* L. extracts or mistletoe lectins. *Anti-Cancer Drugs* 1997 8:3-8.
- Ribéreau-Gayon G, Jung ML, Baudino S, Sallé G, Beck JP. Effects of mistletoe (*Viscum album* L.) extracts on cultured tumor cells. *Experientia* 1986 42:594-99.
- Robert-Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). *Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends*. 6. überarbeitete Auflage. Berlin, 2008 S. 50-53.
- Rosen SD, Bertozzi CR. The selectins and their ligands. *Curr Opin Cell Biol*. 1994 6:663-73.
- Rostock M, Huber R, Greiner T, Fritz P, Schüler J, Scheer R, Fiebig HH. Antitumorale Aktivität intratumoraler Injektionen eines lektinreichen Mistelextraktes in humanen Pankreas-Ca-Xenografts. In: Scheer R, Bauer R, Becker H, Fintelmann V, Kemper FH, Schilcher H (Hrsg.). *Fortschritte in der Misteltherapie. Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung*. KVC Verlag, Essen 2005 S. 333-49.

- Samuelsson G. Mistletoe toxins. *Systematic Zoology* 1974 22:566-69.
- Samuelsson G, Jayawardene AL. Isolation and characterization of viscotoxin 1-Ps from *Viscum album* L. ssp. *austriacum* (Wiesb.) Vollmann, growing on *Pinus silvestris*. *Acta Parm. Suecica* 1974 11:175-84.
- Samuelsson G, Pettersson BM. Separation of viscotoxines from the European mistletoe, *Viscum album* L. (Loranthaceae) by chromatography on sulfoethyl sephadex. *Acta Chemica Scandinavica* 1970 24:2751-56.
- Samuelsson G. Phytochemical and pharmacological Studies on *Viscum album* L. *Svensk Farmaceutisk Tidskrift* 1961 65:481-94.
- Schadendorf D, Herfordt R, Czarnetzki BM. P-glycoprotein expression in primary and metastatic malignant melanoma. *Br J Dermatol.* 1995 132:551-5.
- Schaller G, Urech K, Grazi G. Viscotoxine in den drei Unterarten von *Viscum album* L. Verlag Kooperative Dürnau, Sonderdruck Jahrgang 2000 S. 32-40.
- Schaller G. In: Orrù S, Scaloni A, Giannattasio M, Urech K, Pucci P. Amino acid sequence, S-S bridge arrangement and distribution in plant tissues of thionins from *Viscum album*. *Biol.Chem.* 1997 378:989-96.
- Schaller G, Urech K, Giannattasio M. Cytotoxicity of different viscotoxins and extracts from the European subspecies of *Viscum album* L. *Phytother Res* 1996a 10:473-77.
- Schaller G, Urech K, Giannattasio M, Jäggy C. Viscotoxinspektren von *Viscum album* L. auf verschiedenen Wirtsbäumen. In: Scheer R, Becker H, Berg PA (Hrsg.). *Grundlagen der Misteltherapie. Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung.* Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart 1996b S. 105-10.
- Scheer R, Becker H, Berg PA (Hrsg.). *Die Mistel in der Tumortherapie. Grundlagenforschung und Klinik.* KVC Verlag, Essen 2001.
- Scheffler A, Richter C, Beffert M, Errenst M, Scheer R. Differenzierung der Mistelinhaltsstoffe nach Zeit und Ort. In: Scheer R, Becker H, Berg PA (Hrsg.). *Grundlagen der Misteltherapie. Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung.* Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart 1996 S. 49-76.
- Schierholz JM, Schlodder D. Komplementäre Tumor-Therapie mit Mistelextrakten – eine aktuelle Übersicht. *Deutsche Zeitschrift Für Onkologie* 2003 35:124-33.
- Schnober-Sen M. *Die Mistel - ein geheimnisvolles Gewächs mit heilender Wirkung,* Urania Verlag Berlin 1999 S. 6-9.
- Schumacher U, Feldhaus S, Mengs U. Recombinant mistletoe lectin (rML) is successful in treating human ovarian cancer cells transplanted into severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Cancer Lett.* 2000 150:171-75.
- Schumacher U, Schumacher D, Schwarz T, Pfüller U. Cell biological and immunopharmacological investigations on the use of mistletoe lectin I (ML-I). In: Loew D, Rietbrock N (Hrsg.). *Phytopharmaka,* Steinkopff Verlag Darmstadt, 2. Auflage 1996 S. 197-204.
- Schumacher U, Adam E, Brooks SA, Leathem AJ. Lectin binding properties of human breast cancer cell lines and human milk with particular reference to *Helix pomatia* agglutinin. *J Histochem Cytochem* 1995a 43:275-81.

- Schumacher U, Stamouli A, Adam E, Peddie M, Pfüller U. Biochemical, histochemical and cell biological investigations on the actions of mistletoe lectins I,II and III with human breast cancer cell lines. *Glycoconjug J* 1995b 12:250-57.
- Schumacher K, Schneider B, Reich G. Post surgical complementary therapy of primary breast carcinoma with a lectin standardized mistletoe extract – an epidemiological controlled, multicenter, retrospective cohort study. *German J. Oncol.* 2002 34:106.
- Schwabe U, Paffrath D. *Arzneiverordnungsreport 1998*, Springer Verlag, Heidelberg 1998.
- Schwarzacher SP. Das Endothel: parakrine und endokrine Funktionen. *J Kardiol.* 2002 9:121-24.
- Spertini O, Luscinskas FW, Gimbrone MA Jr, Tedder TF. Monocyte attachment to activated human vascular endothelium in vitro is mediated by leukocyte adhesion molecule-1 (L-selectin) under nonstatic conditions. *J Exp Med.* 1992 175:1789-92.
- Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature.* 1990 346:425-34.
- Stec B. Plant thionins-the structural perspective. *Cell Mol Life Sci.* 2006 63:1370-85.
- Stein GM, Büssing A, Schietzel M. Einfluss von Mistelextrakten auf die Generierung und Ausreifung Dendritischer Zellen in vitro. In: Scheer R, Bauer R, Becker H, Fintelmann V, Kemper FH, Schilcher H (Hrsg.). *Fortschritte in der Misteltherapie. Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung.* KVC Verlag, Essen 2005 S. 269-80.
- Stein GM, Büssing A, Schietzel M. Stimulation of the maturation of dendritic cells in vitro by a fermented mistletoe extract. *Anticancer Res* 2002a 22:4215-19.
- Stein GM, Büssing A, Schietzel M. Activation of dendritic cells by an aqueous mistletoe extract and mistletoe lectin-3 in vitro. *Anticancer Res* 2002b 22:267-74.
- Stein GM, Pfüller U, Schietzel M, Büssing A. Toxic proteins from European mistletoe (*Viscum album L.*): increase of intracellular IL-4 but decrease of IFN- γ in apoptotic cells. *Anticancer Res* 2000 20:1673-78.
- Stein GM, Schaller G, Pfüller U, Schietzel M, Büssing A. Thionins from *Viscum album L.*: Influence of the viscotoxins on the activation of granulocytes. *Anticancer Res* 1999a 19:1037-42.
- Stein GM, Schaller G, Pfüller U, Wagner M, Wagner B, Schietzel M, Büssing A. Characterisation of granulocyte stimulation by thionins from European mistletoe and from wheat. *Biochim.Biophys.Acta* 1999b 1426:80-90.
- Stein GM, Büssing A, Edlund U, Pfüller U, Schaller G, Schietzel M. Cytokine release of peripheral blood mononuclear cells stimulated with lectins, polysaccharides and viscotoxins from *Viscum album L.* in vitro. *Immunobiol.* 1998 199:489.
- Steiner R (1920). *Geisteswissenschaft und Medizin.* Rudolf Steiner Verlag Dornach/Schweiz. 7. Auflage 1999 Gesamtausgabe (GA) 312, S. 252-53.
- Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol.* 1991 9:271-96.

- Steuer-Vogt MK, Bonkowsky A, Ambrosch P, Scholz M, Neiß A, Strutz J, Hennig M, Lenarz T, Arnold W. The effect of an adjuvant mistletoe treatment programme in resected head and neck cancer patients: a randomised controlled clinical trial. *Eur J Cancer* 2001 37:23-31.
- Stirpe F, Barbieri L, Battelli MG, Soria M, Lappi DA. Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Biotechnology (NY)* 1992 10:405-12.
- Stirpe F, Sandvig K, Olsnes S, Pihl A. Action of Viscumin, a Toxic Lectin from Mistletoe, on Cells in Culture. *J. Biol. Chem.* 1982 257:13271-77.
- Stoeva S, Franz M, Wacker R, Krauspenhaar R, Guthöhrlein E, Mikhailov A, Betzel C, Voelter W. Primary Structure, Isoforms and Molecular Modeling of a Chitin-Binding Mistletoe Lectin. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001 392:23-31.
- Strüh CM, Jäger S, Schemp CM, Jakob T, Scheffler A, Martin SF. Oleanolic acid rich solubilized triterpene extracts from mistletoe induce apoptotic and necrotic cell death of murine B16.F10 melanoma cells. *Zeitschrift für Phytotherapie* 2009 30:33.
- Suelter CH, De Luca M. How to prevent losses of protein by adsorption to glass and plastic. *Anal Biochem* 1983 135:112-19.
- Tabiasco J, Pont F, Fournié JJ, Vercellone A. Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Biochem.* 2002 269:2591-600.
- Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J.* 1995 9:866-73.
- Tedder TF, Isaacs CM, Ernst TJ, Demetri GD, Adler DA, Distech CM. Isolation and chromosomal localization of cDNAs encoding a novel human lymphocyte cell surface molecule, LAM-1. Homology with the mouse lymphocyte homing receptor and other human adhesion proteins. *J Exp Med.* 1989 170:123-33.
- Teuscher E. In: Hänsel R, Keller K, Rimpler H, Schneider G (Hrsg.). *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*. Springer-Verlag, Heidelberg, 5. Auflage, Band 6. 1994 S.1160-83.
- Thies A, Dautel P, Meyer A, Pfüller U, Schumacher U. Low-dose mistletoe lectin-I reduces melanoma growth and spread in a scid mouse xenograft model. *Br J Cancer* 2008 98:106-12.
- Thies A, Mauer S, Fodstad O, Schumacher U. Clinically proven markers of metastasis predict metastatic spread of human melanoma cells engrafted in scid mice. *Br J Cancer* 2007a 96:609-16.
- Thies A, Berlin A, Brunner G, Schulze HJ, Moll I, Pfüller U, Wagener C, Schachner M, Altevogt P, Schumacher U. Glycoconjugate profiling of primary melanoma and its sentinel node and distant metastases: Implications for diagnosis and pathophysiology of metastases. *Cancer Lett* 2007b 248:68-80.
- Thies A, Nugel D, Pfuller U, Moll I, Schumacher U. Influence of mistletoe lectins and cytokines induced by them on cell proliferation of human melanoma cells in vitro. *Toxicology* 2005 207:105-16.
- Thies A, Moll I, Berger J, Schumacher U. Lectin binding to cutaneous malignant melanoma: HPA is associated with metastasis formation. *Br J Cancer* 2001a 84:819-23.

- Thies A, Pfüller U, Schachner M, Horny HP, Moll I, Schumacher U. Binding of mistletoe lectins to cutaneous malignant melanoma: implications for prognosis and therapy. *Anticancer Res* 2001b 21:2883-87.
- Thornhill MH, Haskard DO. IL-4 regulates endothelial cell activation by IL-1, tumor necrosis factor, or IFN-gamma. *J Immunol*. 1990 145:865-72.
- Timoshenko AV, Gabius HJ. Efficient induction of superoxide release from human neutrophils by the galactoside-specific lectin from *Viscum album*. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1993 374:237-43.
- Urech K, Schaller G, Giannattasio M. Bioassay zur Bestimmung von Viscotoxinen. In: Scheer R, Becker H, Berg PA (Hrsg.). *Grundlagen der Misteltherapie. Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung*. Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart 1996 S. 111-18.
- Urech K, Schaller G, Ziska P, Giannattasio M. Comparative study on the cytotoxic effect of viscotoxin and mistletoe lectin on tumour cells in culture. *Phytotherapy Research* 1995 9:49-55.
- Valentiner U, Pfüller U, Baum C, Schumacher U. The cytotoxic effect of mistletoe lectins I, II and III on sensitive and multidrug resistant human colon cancer cell lines in vitro. *Toxicology* 2002 171:187-99.
- Van Damme EJM, Peumans WJ, Pusztai A, Bardocz S. *Handbook of Plant Lectins: Properties and Biomedical Applications*. Wiley-VCH Verlag, 1998 S.417-21.
- Van Zante A, Rosen SD. Sulphated endothelial ligands for L-selectin in lymphocyte homing and inflammation. *Biochem Soc Trans*. 2003 31:313-17.
- Vervecken W, Kleff S, Pfüller K, Büssing A. Induction of apoptosis by mistletoe lectin I and its subunits. No evidence for cytotoxic effects caused by isolated A- and B-chains. *Int J Biochem Cell Biol* 2000 32:317-26.
- Voigt H. Melanom, malignes. In: Preiß, J., Dornoff, W., Hagmann, F.-G., Schmieder, A., (Hrsg.). *Taschenbuch Onkologie 2008/09, Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie*, W. Zuckschwerdt Verlag GmbH, 14. Auflage, 2008 S. 166-72.
- Vora M, Romero LI, Karasek MA. Interleukin-10 induces E-selectin on small and large blood vessel endothelial cells. *J Exp Med*. 1996 184:821-29.
- Wagener, C. *Molekulare Onkologie: Entstehung und Progression maligner Tumoren*. Thieme Stuttgart, New York, 2., aktualisierte Aufl. 1999 S. 221.
- Wagner H, Jordan E, Zänker KS. Cell-mediated and direct cytotoxicity of purified ingredients of *Viscum album*. *J Cancer Res Clin Oncol* 1987:53.
- Wagner, R. *Iscador® M/QU Spezial - Erfahrungen und Ergebnisse*. 2001, Verlag Freies Geistesleben & Urachhaus GmbH, S. 25, S. 33f.
- Walz G, Aruffo A, Kolanus W, Bevilacqua M, Seed B. Recognition by ELAM-1 of the sialyl-Lex determinant on myeloid and tumor cells. *Science*. 1990 250:1132-5.
- Wang YCJ, Hanson MA. Parenteral formulation of proteins and peptides: Stability and stabilizers. *J Parenter Sci Technol* 1988 42:3-26.
- Weis J, Bartsch HH, Hennies F, Rietschel M, Heim M, Adam G, Gärtner U, Ammon A. Complementary medicine in cancer patients: demand, patients' attitudes and psychological beliefs. *Onkologie* 1998 21:144-49.

- Wiecker TS, Luther H, Buettner P, Bauer J, Garbe C. Moderate sun exposure and nevus counts in parents are associated with development of melanocytic nevi in childhood: a risk factor study in 1812 kindergarten children. *Cancer* 2003 97:628-38.
- Winkler K, Jäger S, Lenewit G, Schubert R. Interactions of viscotoxins with vesicles of genuine plant membranes. *Planta Med.* 2008 74:163-67.
- Witthohn K, Wächter W, Lentzen H. Chemische Standardisierung von Mistelextraktzubereitungen als Voraussetzung für den Nachweis der Wirksamkeit. In: Loew D, Rietbrook N (Hrsg.). *Phytopharmaka II: Forschung und klinische Anwendung*. Steinkopf Verlag, Darmstadt, 1996 S. 185-204.
- Wojnarowski JM, Konopa J. Interaction between DNA and viscotoxins. Cytotoxic basic polypeptides from *Viscum album* L. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 1980 361:1535-45.
- Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, Baek YJ, Huh CS, Song SK, Lee KH, Azuma I. Prophylactic effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumor metastasis is mediated by enhancement of NK cell activity. *Int J Immunopharmacol* 1998 20:163-72.
- Ziska P, Franz H. Studies on the interaction of mistletoe lectin I with carbohydrates. *Experientia* 1981 37:219

Internetquelle:

- Deutsche Leitlinie: Malignes Melanom, Vers. 15, 02/2005. Claus Garbe, Axel Hauschild, Matthias Volkenandt, Dirk Schadendorf, Wilhelm Stolz, Uwe Reinhold, Rolf-Dieter Kortmann, Christoph Kettelhack, Bernhard Frerich, Ulrich Keilholz, Reinhard Dummer, Günther Sebastian, Wolfgang Tilgen, Gerold Schuler, Andreas Mackensen, Roland Kaufmann (Hrsg.). Abgerufen am 12.08.2009 unter:
http://www.krebsgesellschaft.de/download/s2_leitlinie_malignes_melanom.doc.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Udo Schumacher, Direktor des Instituts für Anatomie II – Experimentelle Morphologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, für die Überlassung des wissenschaftlichen Themas. Ich danke ihm recht herzlich für die sehr freundliche und stets zuverlässige Betreuung, das große Interesse an meiner Arbeit, die anregenden Diskussionen und die sehr angenehme Zusammenarbeit.

Frau Dr. A. Thies danke ich für die engagierte Planung des Projektes und die Einweisung in den praktischen Versuchsteil dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. I. Moll danke ich für die freundlicherweise zur Verfügung gestellte humane MV3-Melanomzelllinie sowie der Weleda AG für das großzügig bereitgestellte Iscador[®] M 5 mg spezial.

Frau Dr. N. Nehmann und Frau Dr. H. Gustke danke ich sehr für die freundliche und kompetente Betreuung in praktischen und inhaltlichen Fragen.

Großer Dank sei auch an das gesamte MTA-Laborteam ausgesprochen für die Einweihung in die Geheimnisse des Zellkulturlebens und die freundliche und stets fachkundige Zusammenarbeit. Dies sei insbesondere an Frau M. Märker, Frau S. Feldhaus, Frau R. Gehrke und Frau K. Burger gerichtet.

Den fleißigen Mitarbeitern des Tierstalles danke ich für die hervorragende Versorgung der Mäuse.

Von ganzem Herzen danken möchte ich meinem wunderbaren Ehemann Frithjof Ehm für das unermüdliche Korrekturlesen und den immerwährenden emotionalen Rückhalt. Auch meiner Tochter Josephine danke ich, dass sie mich immer wieder entbehrt hat. Ich danke meinen Eltern Elisabeth und Manfred Deubach für ihre einzigartige Unterstützung auf allen Ebenen, die ich schon mein Leben lang erfahren darf. Auch meinem Bruder Georg Deubach sei innig für seine Hilfe gedankt.

Curriculum Vitae

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig 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.

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

Hamburg, den 13. Dezember 2010

Astrid Michaela Ehm