

**Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen**

Aus der Klinik für Kinderheilkunde III  
Pädiatrische Hämatologie/Onkologie  
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin

**Präklinische Untersuchung der Wirkungen von *Viscum album L.*-  
Extrakt auf pädiatrische Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* und in  
Kombination mit Chemo- oder Radiotherapie**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von  
Marion Katrin Menke, geb. Reinhardt  
aus Essen

2020

# DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT  
DUISBURG  
ESSEN

*Offen im Denken*

ub | universitäts  
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

**DOI:** 10.17185/duepublico/74883

**URN:** urn:nbn:de:hbz:464-20211019-081203-0

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. T. J. Zuzak

2. Gutachter: Frau Prof. Dr. med. G. Fleischhack

3. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. W. E. E. Eberhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 19. April 2021

## PUBLIKATIONSLISTE

mit Bezug zur vorliegenden Arbeit

### Originalarbeiten, peer-reviewed:

- (1) Katrin Menke, Melanie Schwermer, Alexander Schramm, Tycho Jan Zuzak. (2021): **Präklinische Untersuchungen von Wechselwirkungen zwischen Mistel und Radio- oder Chemotherapie auf pädiatrische Tumorzellen.** *Complementary Medicine Research*
  
- (2) Katrin Menke\*, Melanie Schwermer\*, Jürgen Eisenbraun, Alexander Schramm, Tycho Jan Zuzak. (2020): **Anticancer effects of *Viscum album fraxini* extract on medulloblastoma cells *in vitro*.** *Complementary Medicine Research*
  
- (3) Katrin Menke, Melanie Schwermer, Alexander Schramm, Tycho Jan Zuzak. (2019): **Preclinical Evaluation of Antitumoral and Cytotoxic Properties of *Viscum album Fraxini* Extract on Pediatric Tumor Cells.** *Planta Medica*

\*geteilte Erstautorenschaft

**Veröffentlichte Abstracts:**

- (1) Katrin Menke, Melanie Schwermer, Katharina Falke, Jürgen Eisenbraun Alexander Schramm, Tycho Jan Zuzak. (2019): **Preclinical investigation of interaction of mistletoe extract (*Viscum album L.*) with radio- and chemotherapy in pediatric tumor cell lines.** *Phytomedicine*
  
- (2) Katrin Menke, Melanie Schwermer, Jürgen Eisenbraun Alexander Schramm, Tycho Jan Zuzak. (2017): **Antitumorale Effekte eines Mistelextraktes (abnoBaVISCUM Fraxini) auf Tumoren des Kindesalters *in vitro* und *in vivo*.** *Zeitschrift für Phytotherapie*
  
- (3) Tycho Jan Zuzak, Michael Bornschein, Katrin Menke, Harald Stephan; Kristian W. Pajtler; Jürgen Eisenbraun, Alexander Schramm. (2011): **Viscum album inhibits cell growth, migration and invasion of pediatric tumor cell lines – But effects are limited at concentrations found in serum.** *Phytomedicine*

**Buchbeiträge:**

- (1) Katrin Menke, Melanie Schwermer, Alexander Schramm, Tycho J. Zuzak. (2020): **Wechselwirkungen von Mistelextrakt in Kombination mit Zytostatika oder Bestrahlung auf Neuroblastomzellen *in vitro*.** *Die Mistel in der Tumorthherapie 5 – Aktueller Stand der Forschung und Klinische Anwendung* KVC Verlag, herausgegeben von Rainer Scheer, Susanne Alban, Hans Becker, Andre- Michael Beer, Wolfgang Blaschek, Wolfgang Kreis, Harald Matthes, Heinz Schilcher, Günther Spahn, Rainer Stange
  
- (2) Katrin Menke, Jennifer Felenda, Florian Stintzing, Christiane Beckmann, Alexander Schramm, Tycho J. Zuzak. (2015): **Löwenzahn (*Taraxacum officinale*) - Extrakte können antitumorale Effekte von *Viscum album* in pädiatrischen Krebszelllinien verstärken.** *Die Mistel in der Tumorthherapie 4 – Aktueller Stand der Forschung und Klinische Anwendung*, KVC Verlag, herausgegeben von Rainer Scheer, Susanne Alban, Hans Becker, Andre- Michael Beer, Wolfgang Blaschek, Wolfgang Kreis, Harald Matthes, Heinz Schilcher, Günther Spahn, Rainer Stange
  
- (3) Katrin Menke, Michael Bornschein, Harald Stephan, Kristian W. Pajtler, Jürgen Eisenbraun, Alexander Schramm, Tycho J. Zuzak (2013): ***Viscum album* inhibiert Wachstum, Migration und Invasion von pädiatrischen Tumorzelllinien- Die Effekte sind aber limitiert bei in Probanden-Seren gefundenen Konzentrationen.** *Die Mistel in der Tumorthherapie 3 – Aktueller Stand der Forschung und Klinische Anwendung*, KVC Verlag, herausgegeben von Rainer Scheer, Susanne Alban, Hans Becker, Wolfgang Blaschek, Fritz H. Kemper, Wolfgang Kreis, Harald Matthes, Heinz Schilcher, Rainer Stange

**Teile dieser Arbeit wurden als Poster oder Vorträge bei folgenden Tagungen/Kongressen vorgestellt:**

- (1) Präklinische Untersuchung zur Wechselwirkung von Misteltherapie in Kombination mit Radio- oder Chemotherapie.** Redebeitrag: Forschungstag des Gemeinschaftskrankenhauses Herdecke und der Universität Witten/Herdecke 2019
- (2) Präklinische Untersuchung zur Wechselwirkung von Misteltherapie in Kombination mit Radio- oder Chemotherapie bei pädiatrischen Tumorzellen- Ist eine intravenöse Hochdosis-Misteltherapie parallel zur Chemotherapie oder Bestrahlung bei Kindern sinnvoll?** Redebeitrag: Symposium „Die Mistel in der Tumorthherapie-Grundlagenforschung und Klinik“ in Nonnweiler 2019
- (3) Preclinical evaluation of a mistletoe extract (*Viscum album*) in pediatric tumor cells.** Posterbeitrag: International Congress on Integrative Medicine and Health in Baltimore/USA 2018
- (4) Präklinische Untersuchungen auf relevante Wechselwirkungen einer adjuvanten Misteltherapie mit Radio- oder Chemotherapie.** Posterbeitrag: Forschungstag des Gemeinschaftskrankenhauses Herdecke 2018
- (5) Antitumorale Effekte eines Mistelextraktes (abnobaVISCUM Fraxini) auf Tumoren des Kindesalters *in vitro* und *in vivo*.** Redebeitrag: Konferenz: Phytotherapie „Von der Innovation zur Evidenz (Gesellschaft für Phytotherapie (GPT)) in Münster 2017
- (6) Entwicklung einer Mistel-Lektin-Messung, um die Misteltherapie bei Kindern verbessern zu können.** Redebeitrag: Forschungstag des Gemeinschaftskrankenhauses Herdecke und der Universität Witten/Herdecke 2017
- (7) Assessment of phytopharmaceutic *Viscum album* extracts in preclinical models of pediatric tumors.** Posterbeitrag: Forschungstag der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Essen 2012

- (8) *Viscum album* inhibiert Wachstum, Migration und Invasion von pädiatrischen Tumorzelllinien- Die Effekte sind aber limitiert bei in Probanden-Seren gefundenen Konzentrationen.** Redebeitrag: Symposium „Die Mistel in der Tumorthherapie-Grundlagenforschung und Klinik“ in Nonnweiler 2011

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>PUBLIKATIONSLISTE</b>	<b>3</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Die Mistel</b> .....	<b>13</b>
1.1.1 Die Mistel in der Onkologie	13
1.1.2 Botanik der Mistel	13
1.1.3 Inhaltsstoffe der Mistel	15
1.1.4 Wirkungen, Evidenz und systematische Datenbewertung	18
1.1.5 Nebenwirkungen von Misteltherapien	21
1.1.6 Kontraindikationen von Misteltherapien	22
<b>1.2 Komplementär- und Alternativmedizin</b> .....	<b>22</b>
<b>1.3 Krebserkrankungen bei Kindern</b> .....	<b>23</b>
1.3.1 Das Neuroblastom	25
1.3.2 Das Medulloblastom	27
<b>1.4 Apoptose - der programmierte Zelltod</b> .....	<b>30</b>
1.4.1 Caspasen	32
1.4.2 Der extrinsische, Rezeptor-vermittelte Apoptoseweg	33
1.4.3 Der intrinsische, Mitochondrien-abhängige Apoptoseweg	34
<b>1.5 Kombinationstherapien in der Onkologie</b> .....	<b>36</b>
<b>2 FRAGE- UND ZIELSTELLUNG DER ARBEIT</b>	<b>38</b>
<b>3 VERWENDETE MATERIALIEN</b>	<b>40</b>
<b>3.1 Geräte</b> .....	<b>40</b>
<b>3.2 Verbrauchsmaterialien</b> .....	<b>41</b>
<b>3.3 Chemikalien</b> .....	<b>43</b>
<b>3.4 Enzyme</b> .....	<b>44</b>



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>3.5</b>	<b>Kits</b> .....	<b>44</b>
<b>3.6</b>	<b>Eingesetzte Pflanzenextrakte</b> .....	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>METHODEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER FRAGESTELLUNG</b>	<b>46</b>
<b>4.1</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b> .....	<b>46</b>
4.1.1	Zellkultur	46
4.1.2	Auftauen/Kultivierung und Subkultivierung der Tumorzellen	46
4.1.3	Einfrieren und Lagerung von Tumorzellen	48
4.1.4	Bestimmung der Zellzahl	49
4.1.5	Zellviabilitäts-assay	49
4.1.6	Bestimmung des IC <sub>50</sub> Wertes	50
4.1.7	Kultivierung chemotherapieresistent gezüchteter Neuroblastomzellen	50
4.1.8	Charakterisierung der hauptsächlich verwendeten Neuroblastom- und Medulloblastom-Zelllinien	51
<b>4.2</b>	<b>Methoden zur Bestimmung der Zellproliferation</b> .....	<b>52</b>
4.2.1	Echtzeitproliferations-assay (xCELLigence)	52
4.2.2	Inkorporation von 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU)	53
<b>4.3</b>	<b>Methoden zur Bestimmung der Migration und Invasion</b> .....	<b>53</b>
4.3.1	Scratch-assay	53
4.3.2	Boyden chamber assay	54
<b>4.4</b>	<b>Methoden zur Analyse der Apoptoseinduktion</b> .....	<b>55</b>
4.4.1	Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse	55
4.4.2	Mitochondriale Aktivitätsbestimmung durch selektive Fluoreszenzfärbung	56
4.4.3	Bestimmung der Caspase-8 und -9 Aktivität durch Caspase-Glo assay	57
4.4.4	Überprüfung auf Caspaseabhängigkeit der ausgelösten Apoptose	57
<b>4.5</b>	<b>Proteinchemische Methoden</b> .....	<b>58</b>
4.5.1	Herstellung von Proteinlysaten	58
4.5.2	Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford	58
4.5.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	59
4.5.4	Western Blot	60
4.5.5	Ponceau Färbung	61
4.5.6	Entwicklung des Blots und Detektion	62
<b>4.6</b>	<b>PCR basierte Methoden</b> .....	<b>63</b>
4.6.1	Isolierung der Gesamt-RNA	63

## INHALTSVERZEICHNIS

4.6.2	cDNA Synthese	64
4.6.3	Semiquantitative PCR	64
4.6.4	Agarose Gelelektrophorese	66
4.6.5	Quantitative Real Time PCR	66
<b>4.7</b>	<b>Bestimmung des Gesamtlektingehalts durch einen Sandwich-ELISA.....</b>	<b>67</b>
<b>4.8</b>	<b>Quantitative Analyse von Synergieeffekten .....</b>	<b>69</b>
4.8.1	Applizierte Konzentrationen der Kombinationsexperimente zwischen Mistelextrat und Zytostatikum (Cisplatin bzw. Etoposid)	72
<b>4.9</b>	<b>Bestrahlung der Tumorzellen.....</b>	<b>72</b>
4.9.1	Kombinationsbehandlung zwischen Mistel und Bestrahlung	73
4.9.2	Durchflusszytometrische Detektion von $\gamma$ -H2AX Foci	73
4.9.3	Koloniebildungstest	75
<b>4.10</b>	<b>Tierexperimentelle Methoden.....</b>	<b>77</b>
4.10.1	Tiermodell	77
4.10.2	Haltung der Versuchstiere	77
4.10.3	Markierung der Mäuse	77
4.10.4	Abbruchkriterien	78
4.10.5	Monitoring der Versuchstiere	78
4.10.6	Versuchsende, Tumorresektion und Dokumentation des Organstatus	79
4.10.7	Toxizitätstest	79
4.10.8	Inokulation der Tumorzellen	80
4.10.9	Tumorangangsrate	81
4.10.10	Einflüsse von aVF auf das Tumorgewicht und das Tumolvolumen	81
4.10.11	Einflüsse von Viscum album Extrakt auf das Gesamtüberleben	82
<b>4.11</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>82</b>
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>83</b>
<b>5.1</b>	<b>Zytotoxische und antiproliferative Effekte .....</b>	<b>83</b>
5.1.1	Bestimmung des Gesamtlektingehalts der verwendeten Mistelpräparate durch Sandwich-ELISA	83
5.1.2	Zytotoxizität von aVF auf Zelllinien verschiedener Tumorentitäten	84
5.1.3	Vergleichende Untersuchung der Zytotoxizität verschiedener Mistelextrakte	87
5.1.4	Auswirkungen von aVF auf die Tumorzell-Proliferation	89
5.1.5	Echtzeitanalyse der Auswirkungen nach aVF Behandlung	90

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>5.2</b>	<b>Untersuchung auf Apoptoseinduktion</b> .....	<b>92</b>
5.2.1	Effekte von aVF auf den Zellzyklus	92
5.2.2	Nachweis der Caspasen-Abhängigkeit der ausgelösten Apoptose	93
5.2.3	Aktivitätsbestimmung der Initiator-Caspasen-8 und -9	93
5.2.4	mRNA Expressionsanalyse der Caspasen-8 und -9	94
5.2.5	Analyse der apoptotischen Spaltung von Procaspase-8, -9 und PARP	97
5.2.6	Auswirkungen der Mistelbehandlung auf die mitochondriale Integrität	99
<b>5.3</b>	<b>Analyse der antimetastatischen Eigenschaften</b> .....	<b>100</b>
5.3.1	Migrations- und Invasionsanalyse im Transwell-assay	100
5.3.2	Migrationsanalyse im Scratch "Wound Healing assay"	102
<b>5.4</b>	<b>Wechselwirkungen von aVF mit einer Chemotherapie</b> .....	<b>106</b>
5.4.1	Responsivität gegenüber Monotherapien aus aVF oder Chemotherapeutikum	106
5.4.2	Quantifikation von Synergieeffekten bei kombinierter Chemotherapie und aVF Behandlung	107
5.4.3	Auswirkungen von aVF auf die mRNA Expression verschiedener ABC-Transporter	110
<b>5.5</b>	<b>Wechselwirkungen von aVF mit einer Strahlentherapie</b> .....	<b>112</b>
5.5.1	Quantifikation von Synergieeffekten zwischen einer Kombinationstherapie aus Bestrahlung und aVF	112
5.5.2	Effekte unterschiedlicher Behandlungszeitpunkte einer Misteltherapie	115
5.5.3	Einfluss von aVF auf die Reparatureffizienz strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche	117
5.5.4	Einflüsse einer Mistelbehandlung in Kombination mit einer Radiotherapie auf die Ausbildung von Tumorzellkolonien	119
<b>5.6</b>	<b>Resultate der <i>in vivo</i> Wirkungen von aVF</b> .....	<b>121</b>
5.6.1	<i>In vitro</i> Charakterisierung der murinen Neuroblastomzelllinie C1300	121
5.6.2	Resultate der <i>in vivo</i> Toxizitätstests	122
5.6.3	Reduktion des Tumorgewichts und des Tumolvolumens	123
5.6.4	Verlängerung des Gesamtüberlebens	125
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>132</b>
<b>6.1</b>	<b>Untersuchung der Zytotoxizität verschiedener Mistelpräparate</b> .....	<b>132</b>
<b>6.2</b>	<b>Charakterisierung antiproliferativer Effekte von aVF</b> .....	<b>135</b>
6.2.1	Charakterisierung des durch aVF ausgelösten Zelltodes	136
6.2.2	Antimetastatische Eigenschaften des Mistelextraktes aVF	138

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>6.3</b>	<b>Analyse möglicher Interaktionen zwischen aVF und einer Chemotherapie .....</b>	<b>140</b>
6.3.1	Effekte von aVF auf zytostatikaresistente Neuroblastomzelllinien	140
6.3.2	Wirkungen einer Mistelbehandlung auf ABC-Transporter bei Auftreten einer Zytostatikaresistenz	143
<b>6.4</b>	<b>Analyse von Interaktionen zwischen aVF und einer Radiotherapie .....</b>	<b>145</b>
<b>6.5</b>	<b>Untersuchung des <i>in vivo</i> Potenzials von aVF .....</b>	<b>149</b>
<b>6.6</b>	<b>Schlussfolgerungen .....</b>	<b>154</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>156</b>
<b>8</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>157</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>158</b>
<b>10</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>185</b>
<b>11</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>189</b>
<b>12</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>191</b>
<b>13</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>192</b>
<b>14</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>193</b>

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Die Mistel

#### 1.1.1 Die Mistel in der Onkologie

Die Mistel hat eine lange Tradition als Heilpflanze und wird seit Jahrhunderten zum Beispiel gegen Herzbeschwerden, Erkrankungen der Milz, Wunden, Geschwüren und Epilepsie eingesetzt. Seit den 1920er Jahren findet die Weißbeerige Mistel in der Onkologie Verwendung. Entwickelt wurden die Extrakte, nach Überlegungen des Anthroposophen Rudolf Steiner (1861–1925), von der Ärztin Ita Wegmann (Luther, Becker, 1987). Noch heute werden anthroposophisch hergestellte Mistelpräparate nach speziellen Verfahren von der Firmen Abnoba, Wala, Weleda, Helixor und Novipharm vertrieben. Dabei wird streng nach Wirtsbäumen unterschieden und der Extrakt durch das Herstellungsverfahren (Erntezeitpunkt, verwendete Pflanzenteile, Extraktionsverfahren) standardisiert. Es werden des Weiteren durch die Firmen Madaus, Cefak und Biosyn auch an phytotherapeutischen Herstellungsverfahren orientierte Mistelextrakte vertrieben. Hier werden die Extrakte nicht nach Wirtsbäumen differenziert, sie stammen meist von Pappeln. Außerdem werden sie auf einen bestimmten Inhaltsstoff, das Mistellektin I, normiert, d. h. eingestellt. Der Gehalt wird dabei über den Bezug zu einer Referenzsubstanz (in ng/ml) angegeben. Somit wird eine Vielzahl unterschiedlicher Präparate, die nach verschiedensten Herstellungsverfahren produziert werden, angeboten. Hierunter finden sich laktofermentierte Extrakte, wässrige Kaltauszüge, wässrige Flüssigextrakte, Presssäfte und nach wärmerhythmisierten Verfahren hergestellte Mistelpräparate. Die Bedeutung der Mistel wird allein durch > 1550 Einträge in der PubMed-Datenbank für das Suchwort „Mistletoe“ und > 800 Ergebnisse zum Suchwort „Viscum album“ bestätigt, die u. a. über zytotoxische, immunmodulatorische, proapoptische, antiangiogenetische und DNA-stabilisierenden Eigenschaften von Mistelextrakten berichten.

#### 1.1.2 Botanik der Mistel

Die Weißbeerige Mistel (*Viscum album* L.) ist ein immergrüner strauchartiger Halbschmarotzer von kugeliger Gestalt, der epiphytisch auf Laub- und Nadelbäumen wächst (Abb. 1). Sie kommt in ganz Europa, Asien und Nordafrika vor und gehört zur Familie der *Viscaceae* in der Ordnung der *Santalales* (Sandelholzartige). Die Mistel besitzt

## EINLEITUNG

eine Vielzahl volkstümlicher Namen. Als Beispiele seien genannt: Hexenkrut, Hexennest, Hexenbesen, Leimmistel, Marenklatte, Affolter, Vogellim, Drudenfuss, Wintergrün und Mischgelt. Mit ihren Saugorganen, die tief in das Leitgefäßsystem des Wirtes vordringen, entzieht sie Wasser und Mineralsalze. Dabei zeigt die Mistel eine ausgeprägte Wirtsspezifität: Man differenziert zwischen drei Unterarten: Die Kiefernmistel (*Viscum album ssp. austriacum*) wächst ausschließlich auf Waldkiefern. Die Tannenmistel (*Viscum album ssp. abietis*) parasitiert auf Weißtannen und kommt recht selten vor. Die Laubholzmistel (*Viscum album ssp. album*) besitzt das breiteste Wirtsspektrum und wächst auf mehr als 25 verschiedenen Laubholzgewächsen. Zu ihnen gehören, Weißdorn, Linden, Weiden, Pappeln, Birken, Ulmen, Eschen und außerdem, Apfel-, Ahorn- und Mandelbäume.

Nach circa fünf Jahren beginnt die zweihäusige Mistelpflanze zum ersten Mal zu blühen. In erster Linie erfolgt die Bestäubung durch Insekten. Die weiße, erbsengroße Frucht reift im Dezember. Es handelt es sich um eine Scheinbeere. Auch die grünen Samen der Mistel werden als Scheinsamen bezeichnet, da sie nicht in einer Samenanlage (Ovulum) liegen, sondern ohne Samenschale im Fruchtwandgewebe. Die Verbreitung der Samen erfolgt durch Vögel, die die Beeren im Winter als Futterquelle nutzen und die Samen auf den Ästen anderer Bäume ausscheiden oder mit dem Schnabel den klebrigen Fruchtschleim mitsamt dem Samen dort abstreifen. Der Gattungsname *Viscum* lässt sich wahrscheinlich auf diesen klebrigen Fruchtschleim (*viscosus* = klebrig) zurückführen.

Im März beginnen die Mistelsamen dann auf den Ästen der Wirtsbäume zu keimen, dabei schiebt sich das Hypokotyl aus dem Samen in Richtung der dunklen Wirtsrinde. Dieses Verhalten wird als negativ phototrop bezeichnet. Dabei setzt sich der Keimling mit der zu einer Haftscheibe umgeformten Hypokotylspitze fest. Aus dem Zentrum dieser Haftscheibe entwickelt sich das sogenannte Haustorium (Senker), welcher als Saugorgan dient. Wirtsspezifische Enzyme ermöglichen das Vordringen des Haustoriums. Allerdings wächst die Mistel nicht aktiv in das Xylem der Wirtspflanze ein. Sie regt vielmehr im Bereich des Senkers zu vermehrter Zellteilung an und wird dadurch mehr und mehr umhüllt. Ausgehend vom Primärsenker entwickelt sich ein netzartiges System, das eine direkte Verbindung zu den Leitungsbahnen des Wirtes aufnimmt und dadurch die eigene Flüssigkeits- und Mineralstoffversorgung sicherstellt (Becker, 2000; Luther,Becker, 1987).



**Abb. 1: Semiparasitisch wachsende Mistelpflanze. Links: Mistelpflanze mit Beeren im Winter (Quelle: Nabu). Rechts: Laubbaum, auf dem mehrere Mistelpflanzen wachsen (Quelle: Botanikus).**

### 1.1.3 Inhaltsstoffe der Mistel

#### 1.1.3.1 Mistellektine

Die Lektine der Mistel stellen die bei Weitem besterforschte Inhaltsstoffgruppe, bezogen auf Wirkungsmechanismen und Molekülstruktur, dar. Ihr Gehalt in der Pflanze ist in den Wintermonaten am höchsten (Scheffler et al., 1996), sie scheinen frostschtzende Eigenschaften inne zu haben (Hinchu et al., 1997). Sie finden sich hauptschtzlich in den Stengeln ltterer Pflanzen und dem Senker der Mistel (Urech et al., 2009). Dabei handelt es sich um Glykoproteine (11 % Kohlenhydratanteil), die jeweils aus einer A-Kette (A = active) und einer B-Kette (B = binding) aufgebaut sind, die untereinander über Disulfidgruppen verknüpft sind (Franz et al., 1981; Franz, 1986; Niwa et al., 2003). Die A-Kette besitzt N-Glykosidaseaktivitdt, wohingegen die B-Kette hochspezifisch bestimmte Zuckerstrukturen erkennt und für die Bindung an diese Strukturen verantwortlich ist. Die Mistelpflanze enthdt drei Mistellektine (Abk. ML-I, ML-II, ML-III), die aufgrund ihrer Kohlenhydratspezifitdt unterschieden werden (Tab.1). Obwohl zunchst von Franz als Lektin mit einer Spezifitdt für D-Galaktose beschrieben (Franz, 1985), konnten MÜthing et al. das Mistellektin-I als ein Sialinsäure-spezifisches Lektin mit strikter Präferenz gegenüber Gangliosiden und Glykoproteinen mit terminalen Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-Resten charakterisieren (MÜthing et al., 2002). Außerdem wurde von Franz et al. ein chitinbindendes Lektin beschrieben (Abk. cbML) (Franz et al., 2004). Je nachdem auf

## EINLEITUNG

welchem Wirtsbaum die Mistel parasitiert unterscheiden sich Lektin- und Isolektinmuster (Schink, Moser, 1996). Laubbaummisteln enthalten vorwiegend ML-I. In Extrakten von Kiefern- und Tannemisteln dominiert das Vorkommen der Mistellektine II und III (Pfüller, 2000).

**Tab. 1: Lektine der Mistel und ihre Zuckerspezifitäten.**

Lektin	Zuckerspezifität
ML-I	D-Galaktose
ML-II	D-Galaktose, N-Acetyl-D-Galaktosamin
ML-III	N-Acetyl-D-Galaktosamin

Das Lektinmolekül wird nach Rezeptorerkennung entzündiger Kohlenhydratsequenzen auf Zelloberflächen durch Endozytose internalisiert. Nach reduktiver Spaltung der Disulfidbrücke am Endoplasmatischen Retikulum, gelangt die A-Kette zu den Ribosomen (Agapov et al., 1999). Dort kommt es zur enzymatischen Abspaltung des Adenosins 4324 aus der hochkonservierten GAGA-Sequenz der 28S rRNA der 60S-Untereinheit der Ribosomen (Endo et al., 1988; Stirpe et al., 1992). Die Mistellektine I–III werden daher auch zu den Ribosomen-inaktivierenden Proteinen vom Typ II gerechnet (Abk. RIP II). In der Folge kommt es durch die Inhibierung der Proteinbiosynthese zur Einleitung der Apoptose (Büssing et al., 1996).

### 1.1.3.2 Viscotoxine

Die Viscotoxine stellen eine weitere wichtige Inhaltsstoffgruppe der Mistelpflanze dar und wurden erstmal 1948 von Winterfeld et al. beschrieben (Winterfeld, Bijl, 1949; Winterfeld, Heuken, 1960). Es handelt sich um Typ III Thionine. Sie weisen basischen Charakter auf und bestehen aus einer 45-46 Aminosäuren langen Sequenz mit einem Molekulargewicht von 5 kDa (Orrù et al., 1997). Diese cysteinreichen Polypeptide enthalten drei bis vier Disulfidgruppen und weisen dadurch eine hohe Stabilität gegenüber Erhitzen und Spaltung durch proteolytische Enzyme auf (Samuelsson, 1973). Man findet sie vor allem in den Stengeln, jungen Blättern und blütentragenden Kurztrieben, einschließlich der Beeren, wobei der Gehalt an Viscotoxinen in den Sommermonaten am höchsten ist (Pfüller, 2000). Man unterscheidet folgende Isoformen der Viscotoxine: A1, A2, A3, B, B2, 1-PS, U-PS, C1 (Debreczeni et al., 2003; Pal et al., 2008; Samuelsson, Pettersson, 1970; Urech et al., 2006). Auch hier zeigt sich ein wirtsspezifisches Muster der Viscotoxine



## EINLEITUNG

(Schaller et al., 2000; Schaller, Urech, Giannattasio, Jäggy, 1996). Die Isoformen zeigen unterschiedliche zytotoxische Potenz. So wird das Viscotoxin A3 im Vergleich zu Viscotoxin B als wesentlich potenter beschrieben (Coulon et al., 2003; Schaller, Urech, Giannattasio, 1996). Vermutlich schützen Viscotoxine die Pflanze gegen Pathogene. So konnten Giudici et al. 2004 zeigen, dass die Viscotoxine A3 und B fungizide Eigenschaften gegenüber *Fusarium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* und *Phytophthora infestans* aufweisen (Giudici et al., 2004). Ihre Zytotoxizität beruht in erster Linie auf ihrem amphiphilen Charakter. So kommt es durch Permeabilisierung von Biomembranen zur Zellyse (Carrasco et al., 1981) und im Gegensatz zum programmierten Zelltod, der durch die Mistellektine ausgelöst wird, vor allem zur Nekrose (Büssing, Stein, Wagner et al., 1999). Die Thionine induzieren die Bildung reaktiver Sauerstoffintermediate (ROI) (Büssing et al., 1998). Es kommt zum Anschwellen der Mitochondrien und einer Hochregulation des mitochondrialen Membranproteins Apo2.7 (Büssing, Wagner et al., 1999). Allerdings wird auch das Auslösen von Apoptosesignalen diskutiert. Die kationischen Viscotoxine sind in der Lage mit negativ geladener DNA Komplexe zu bilden (Woynarowski, Konopa, 1980). Ferner wird diskutiert ob ihr helix-loop-helix Motiv eine DNA Bindestelle darstellt (Romagnoli et al., 2000). Neben ihrer zytotoxischen Wirkung weisen die Viscotoxine auch immunmodulatorische Eigenschaften auf (Tabiasco et al., 2002).

### 1.1.3.3 Weitere Inhaltsstoffe

Neben den genannten Glykoproteinen (Lektine) und Polypeptiden (Viscotoxine) enthalten Extrakte der Mistel eine Vielzahl pharmakologisch interessanter weiterer Inhaltsstoffe (Tab. 2).

**Tab. 2: Übersicht der weiteren Mistelinhaltsstoffe nach (Becker, 2000).**

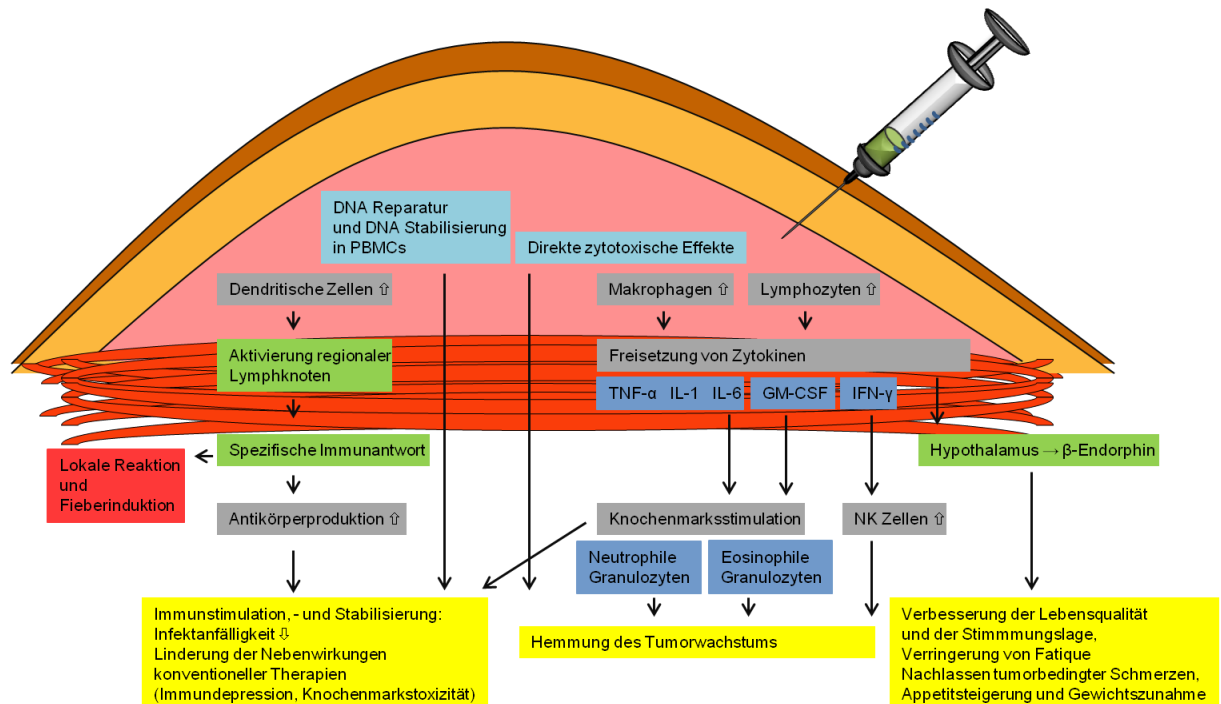
Inhaltsstoffklasse	Inhaltsstoffe	Referenz
Flavonoide	Quercetinderivate, Homoeriodyctiol, Sakuranetin	(Fukunaga et al., 1988; Lorch Elmar, 1993; Ohta, Yagishita, 2014)

## EINLEITUNG

Phenylpropane und Lignane	Kaffeesäure, Sinapinsäure; Ferulasäure, Protocatechusäure, Vanillinsäure, Anissäure, Gentisinsäure, Syringinsäure, Eleutherosid E	(Deliorman et al., 1999; Wagner, Feil et al., 1986; Wagner, Jordan, Feil, 1986)
Triterpene	$\beta$ -Amyrin, Betulinsäure, Oleanolsäure Ursolsäure	(Jäger et al., 2007; Urech et al., 2005)
Phytosterole	$\beta$ -Sitosterol, Stigmasterol	(Nazaruk, Orlikowski, 2016)
Alkaloide	4,5,4'-Trihydroxy-3,3'-iminodibenzoesäure, 4,5,4',5'-Tetrahydroxy-3,3'-iminodibenzoesäure	(Amer et al., 2012)
Cyclitole	Mannitol, myo-Inositol, Quebrachitol, Pinitol, Viscumitol	(Richter, 1992; Richter, Popp, 1992)
Polysaccharide	Stengel und Blätter enthalten vor allem Methylester der 1 $\rightarrow$ 4 $\alpha$ Galakturonsäure, Beeren enthalten Rhamnogalakturonane und Arabinogalaktan	(Edlund et al., 2000; Jordan, Wagner, 1986; Wagner, Jordan, 1988).
Biogene Amine	Tyramin, Cholin, Acetylcholin, Tryptamin	(Guggenheim, 2013; Steinegger, Hänsel, 2013)

### 1.1.4 Wirkungen, Evidenz und systematische Datenbewertung

Misteltherapien sind in der patientenzentrierten komplementären Krebsbehandlung weit verbreitet und gehören in Deutschland zu den meistverordneten Medikamenten für Krebspatienten (Grandt, Schubert, 2017). Mistelextrakte sollen dabei auf verschiedenen Ebenen auf das Krankheitsgeschehen einwirken (Abb. 2).



**Abb. 2: Übersicht der postulierten Wirkungen von Mistelinhaltsstoffen bei der üblichen *subcutanen* Applikation (Abbildung K. Menke nach dem Compendium of Mistletoe Therapy with Helixor® in Integrative Oncology).**

In der Literatur ist die Durchführung zahlreicher klinischer Studien zur Anwendung von Misteltherapien mit onkologischer Fragestellung dokumentiert und durch entsprechend viele systematische Übersichtsarbeiten und Metaanalysen evaluiert.

Die meisten Übersichtsarbeiten konnten für Misteltherapien eine Verbesserung der QoL (= quality of life, Lebensqualität) feststellen (Büssing et al., 2012; Ernst et al., 2003; Horneber et al., 2008; Kienle et al., 2009; Kienle, Kiene, 2010) und stellten eine Grundlage für eine positive Validierung von Misteltherapien durch den Gemeinsamen Bundesausschuß (GemBA) dar, womit Mistelanwendungen in der palliativen Therapiesituation zur Verbesserung der QoL zu Lasten der gesetzlichen Krankenkasse (gKV) erstattungsfähig sind.

Obwohl sich Misteltherapien in den meisten der berichteten Studien als therapeutisch wirksam erwiesen haben, gestaltet sich eine abschließende Bewertung der Evidenz von Mistelwirkungen trotz des insgesamt hohen Datenvolumens zur Mistelforschung nicht nur durch die verschiedenen untersuchten Zielparameter, die unterschiedlich zusammengesetzten Mistelpräparate und die verschiedenen Tumorentitäten als schwierig. Insbesondere ältere klinische Studien wurden wegen qualitativer Mängel

## EINLEITUNG

insbesondere ihres Studiendesigns, der teils geringen Fallzahlen, fehlender Kontrollen, unzureichender Randomisierung, schlechter Dokumentation von Studienabbruchern und Begleitmedikationen sowie unzureichender Definition der beobachteten Zielparameter zur Lebensqualität, kontrovers diskutiert. Allerdings wurde auch einigen systematischen Datenbewertungen in den Übersichtsarbeiten wegen Nichtberücksichtigung relevanter Literatur, den untersuchten Studienparametern und Fehleinschätzungen der Qualität der untersuchten Studien widersprochen (Kienle, 2008; Kienle, Kiene, 2006).

Eine weitere Schwierigkeit bei der Beurteilung der Wirksamkeit von Mistelanwendungen stellt der Umstand dar, dass sie in der klinischen Realität oft anders eingesetzt werden als in der standardisierten Form klinischer Studien (Kienle et al., 2016).

Misteltherapien sind oft Teil eines Gesamtbehandlungskonzeptes und sind üblicherweise auf den spezifischen Gesundheitszustand, die Tumorlokalisation und die Beschwerden des Patienten zugeschnitten, d. h. die Wahl des Mistelpräparates, die Dosierung, die Applikationsroute, Co-Medikationen und das Behandlungsintervall werden basierend auf den Erfahrungen des Arztes und der Reaktion des Patienten auf die Therapie gewählt und angepasst.

Obwohl Misteltherapien mit steigender Häufigkeit auch bei Kindern verabreicht werden, liegen zurzeit nur Einzelfallberichte vor (Kaestner et al., 2019) und ihre Wirksamkeit und Anwendungssicherheit sind nach wie vor nicht in klinischen Studien bei krebserkrankten Kindern untersucht. Jedoch ist eine Studie bei Kindern mit der EudraCT Number: 2004-002711-83 (Titel: „Evaluation of anthroposophic supportive medicine on treatment-related toxicity in children receiving cancer therapy“) im europäischen Register für klinische Studien angemeldet worden (European Medicines Agency), mit dem Ziel die Wirksamkeit und Sicherheit einer anthroposophischen Begleitmedikation, einschließlich Mistelpflanzenextrakten auf die Zytostatika bedingten Nebenwirkungen im Rahmen der konventionellen Chemotherapieprotokolle bei Kindern die nach den aktuellen Protokollen der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) für solide Tumore und Leukämien/Lymphome behandelt wurden, zu untersuchen.

Diese Studie ist bereits abgeschlossen, jedoch sind noch keine Ergebnisse hierzu publiziert. Somit beruht die Anwendung von Mistelextrakten bei Kindern allein auf der langjährigen Erfahrung kideronkologisch-tätiger Ärzte. Jedoch konnte die Sicherheit einer hoch dosierten, intravenösen Misteltherapie bei pädiatrischen Krebspatienten in einer Fallserie nachgewiesen werden (Zuzak et al., 2018).

Außerdem konnte eine Studie zur Untersuchung der Sicherheit einer anthroposophischen, die Erstlinientherapie unterstützenden Behandlung bei Kindern mit Medulloblastom, die auch die Anwendung von Mistelextrakten beinhaltete, keine negativen Effekte auf die

## EINLEITUNG

konventionelle Therapie und auch kein Tumorenancement durch die komplementären Behandlungen feststellen (Seifert et al., 2011).

Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Präparat abnobaVISCUM Fraxini konnte in einer unverblindeten Studie an 15 Patienten mit reseziertem Magenkrebs (Stadium IB oder II), die postoperativ durchgeführt wurde, eine Verbesserung der QoL im Vergleich zu 16 unbehandelten Kontrollen festgestellt werden (Kim et al., 2012).

In einer weiteren Studie an 23 Patienten mit inoperablem hepatozellulären Karzinom konnte abnobaVISCUM Fraxini eine gewisse antitumorale Aktivität, sowie ein niedrige Toxizität zeigen (Mabed et al., 2004).

Außerdem hatte sich die intravesikale Instillation des Extraktes abnobaVISCUM Fraxini in einer unkontrollierten Phase Ib/IIa Studie an 36 Patienten mit nicht-muskelinvasivem Blasenkrebs nach transurethraler Resektion, bei der die maximal tolerierte Dosis, Sicherheit und Wirksamkeit untersucht wurden, als sicher und gut verträglich erwiesen (Rose et al., 2015). Diese Vorstudie ließ des Weiteren erwarten, dass abnobaVISCUM Fraxini eine mit Mitomycin vergleichbare Wirkung in der Rezidivprophylaxe des oberflächlichen Harnblasenkarzinoms besitzt. Aufgrund dieser ermutigenden Erfolge wird zurzeit eine kontrollierte, randomisierte Phase III-Multicenter Studie zur Wirksamkeit der Misteltherapie bei dieser Indikation durchgeführt (EudraCT Nummer: 2013-003446-16; Titel: „Intravesical Mistletoe Extract in Superficial Bladder Cancer: A phase III efficacy study (TIM)“).

In einer aktuellen Multicenter-Studie an Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkrebs im Stadium IV, die mit verschiedenen Mistelpräparaten (u. a. abnobaVISCUM), zeigten die Patienten, die zusätzlich zur konventionellen Chemotherapie einen Mistelextrakt erhielten das längste Überleben. Eine zusätzliche Misteltherapie reduzierte dabei das Sterberisiko um 56 % (Schad et al., 2018).

### **1.1.5 Nebenwirkungen von Misteltherapien**

Als lokale Reaktionen kommt es häufig zu Rötungen, Schmerzen und Schwellungen an der Einstichstelle. Diese Reaktionen verursachen auch regelmäßig eine Entblindung bei doppelblind angelegten Studien.

Systemisch treten vor allem grippeähnliche Symptome wie Fieber, sowie Blutdruckabfall- oder anstieg, Bradykardie, Verwirrtheit, Schwindel und Halluzinationen auf. Außerdem kann es zu Übelkeit, Erbrechen und Durchfall kommen. Generell gilt eine Misteltherapie als gut verträglich. Schwere Komplikationen umfassen in erster Linie immunologische Reaktionen (anaphylaktischer Schock, Quincke-Ödem, generalisierte Urtikaria).

### 1.1.6 Kontraindikationen von Misteltherapien

Generell sollten Mistelextrakte nicht während der Schwangerschaft und Stillzeit verwendet werden. Ebenfalls gelten eine bekannte Allergie gegen Mistelinhaltsstoffe, sowie fieberhafte und chronisch-entzündliche Erkrankungen (z. B. Tuberkulose) als kontraindiziert. Für unbehandelten Thyreoiditiden und Herzrhythmusstörungen gelten strenge Indikationsstellungen. Eine Behandlung von Gehirn- und Rückenmarkstumoren mit der Tendenz zur Ödembildung sollte wegen der Gefahr der Hirndrucksteigerung ebenso nur nach strenger Indikationsstellung erfolgen. Die Behandlung von Nierenzellkarzinomen, Leukämien, Lymphome und Melanomen (sogenannten IL-6 abhängigen Tumoren) wird kontrovers diskutiert. Ausgangspunkt hierfür sind grundsätzliche Überlegungen zur Zytokinwirkung. Ob es bei der Anwendung von Mistelextrakten durch IL-6 Freisetzung zu einem Tumorenancement kommen kann, konnte noch nicht abschließend geklärt werden (Büssing, Stein, Stumpf, Schietzel, 1999) (Siehe auch Ergebnisprotokoll der Sitzung der Kommission C des Bfarm 2009).

### 1.2 Komplementär- und Alternativmedizin

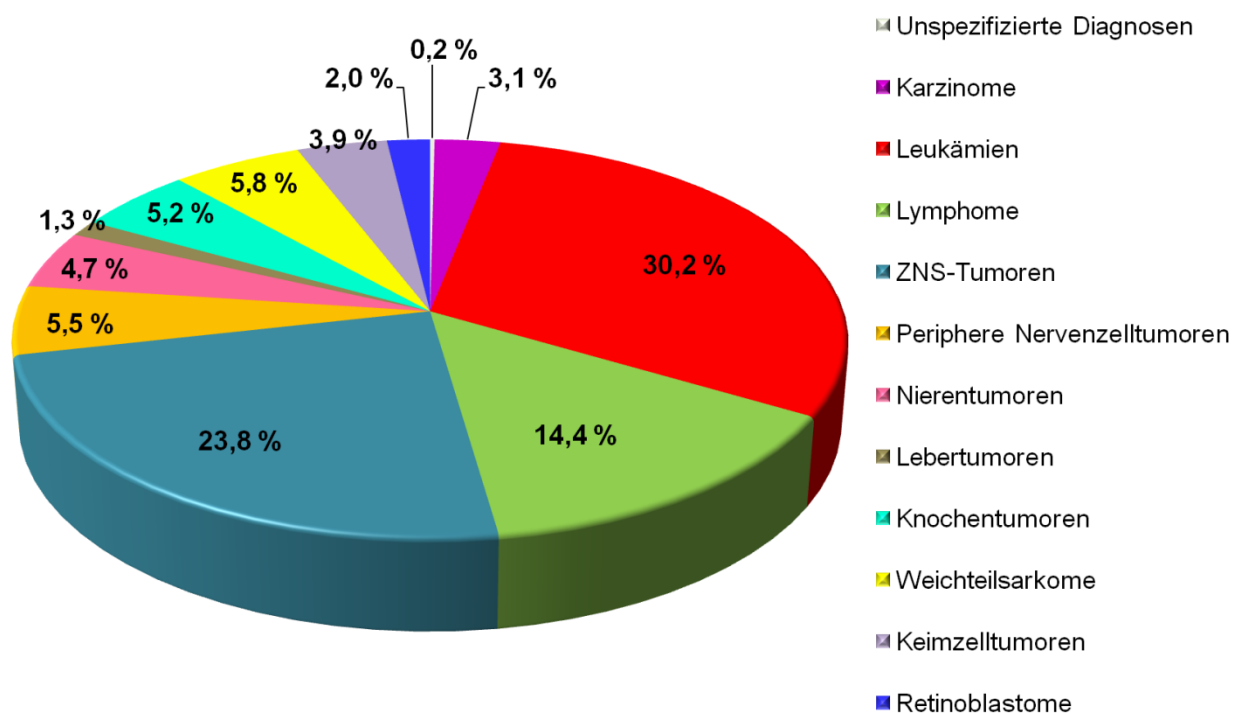
Misteltherapien gehören in Europa zu den am häufigsten angewendeten komplementären Tumorthérapien (Kaiser, 2001). Unter dem Begriff Komplementärmedizin werden unterschiedliche Behandlungsmethoden und diagnostische Konzepte verstanden, die sich als wissenschaftlich begründete Behandlungsmethoden im Sinne einer integrativen Medizin, verstehen. Er nimmt die Beobachtung auf, dass solche Behandlungsmethoden von den Patienten ergänzend zur konventionellen Therapie, der sogenannten „Schulmedizin“, in Anspruch genommen werden. Im englischsprachigen Raum hat sich der Begriff *Complementary and Alternative Medicine* (CAM) durchgesetzt. Umfragen unter betroffenen Krebspatienten haben ergeben, dass je nach Studie im Schnitt 30–40 %, und sogar bis zu 78 % der Befragten komplementäre Maßnahmen angewendet haben (Horneber et al., 2012; Richardson et al., 2000; Schönekaes et al., 2003). Auch Eltern krebskranker Kinder entscheiden sich oft für eine komplementärmedizinische Therapie (Kelly, 2004; Martel et al., 2005). So gaben 35 % dieser Eltern an CAM-Therapien anzuwenden (Längler et al., 2005; Längler et al., 2008). Dabei gibt es unterschiedliche Gründe für die Anwendung. Viele Befragte führten an, durch die Therapie krankheitsbedingte Symptome und therapiebedingte Nebenwirkungen lindern, das Immunsystem zu stärken und die Lebensqualität verbessern zu wollen. Außerdem handeln die Betroffenen aus dem Wunsch heraus nichts unversucht zu lassen und ein

## EINLEITUNG

Gefühl der Selbstständigkeit, Kontrolle und Unabhängigkeit in Bezug auf Entscheidungsprozesse zu bewahren (Gottschling et al., 2006).

### 1.3 Krebserkrankungen bei Kindern

In Deutschland erkranken pro Jahr rund 1800 Kinder und Jugendliche im Alter bis 15 Jahre an Krebs. So wurden im Jahr 2017 insgesamt 2216 Tumorerkrankungen bei Kindern und Jugendlichen unter 18 Jahren aus 63 Kliniken beim deutschen Kinderkrebsregister gemeldet (Deutsches Kinderkrebsregister, 2018). Obwohl Krebserkrankungen bei Kindern selten sind und nur 1 % aller Erkrankungen ausmachen, stellen sie die häufigste tödliche Erkrankung in dieser Altersgruppe dar.



**Abb. 3: Inzidenz kindlicher Tumorerkrankungen.**

**Relative Häufigkeiten der an das Deutsche Kinderkrebsregister gemeldeten Erkrankungsfälle nach Diagnose-Hauptgruppen in den Jahren 2009-2017, basierend auf insgesamt 19254 unter 18-jährigen Patienten (Deutsches Kinderkrebsregister, 2018).**

Krebserkrankungen bei Kindern und Erwachsenen unterscheiden sich beträchtlich voneinander in Bezug auf Ursache, Inzidenz, Therapie und Prognose.

## EINLEITUNG

Jedes Jahr werden viele neue antineoplastische Substanzen gefunden und entwickelt. Getestet und einer Wirksamkeitsprüfung unterzogen, werden sie allerdings zumeist an den typischen Tumoren des Erwachsenenalters, wie dem Colon-, Mamma-, und Lungenkarzinom. Kinder entwickeln jedoch andere Tumorerkrankungen als Erwachsene. Typische Tumoren des Kindesalters sind embryonalen Ursprungs (z. B. Neuroblastome, Medulloblastome, Retinoblastome, Nephroblastome, Ewing-Sarkome oder Rhabdomyosarkome). Im Gegensatz zu Erwachsenen erkranken sie nur zu etwa drei Prozent an Karzinomen. Auch Umweltfaktoren, wie die Exposition gegenüber Schadstoffen, spielen bei der Tumorentwicklung bei Kindern eine untergeordnete Rolle. Die Überlebensprognosen von Kindern mit Krebs sind in den letzten Jahren deutlich gestiegen, so überleben im Durchschnitt rund 82 % der Kinder im Alter unter 15 Jahren eine Tumorerkrankung mindestens 15 Jahre lang (DKKR Jahresbericht 2018; (Deutsches Kinderkrebsregister, 2018)). Insbesondere die Therapie von kindlichen Leukämien hat sich verbessert, wohingegen die soliden Tumoren des Kindesalters zum Teil noch immer mit einer schlechten Überlebensprognose für die betroffenen Patienten einhergehen (Tab. 3).

Die maligne Grunderkrankung und die multimodalen Therapien aus Chemo- und Radiotherapie sowie chirurgischen Interventionen lösen oft körperliche und psychische Belastungen aus, sowie Nebenwirkungen durch die akute Toxizität der verabreichten Arzneistoffe. Bei Kindern sind zudem oftmals bedeutsame lebenslange Spätfolgen der Therapien zu bedenken. So können Chemo- und/oder Radiotherapien bei bis zu 2/3 der Patienten Folgeerkrankungen bzw. Spätfolgen verursachen (Meitert et al., 2009), hierzu gehören Oto-, Kardio-, und Nephrotoxizität, endokrine Funktionsstörungen, Minderwuchs, Infertilität, kognitive Einschränkungen (insbesondere durch Schädelbestrahlung) und die Entstehung von Zweitmalignomen. Daher benötigen Kinder eine spezielle, auf sie zugeschnittene, risikoadaptierte, alters- und fachgerechte Therapie.

**Tab. 3: 15-Jahres-Überlebensraten aus dem DKKR Bericht 2017 zwischen 2008–2017 (Deutsches Kinderkrebsregister, 2018).**

Hämatologische Neoplasien	15-Jahres Überleben
ALL	90 %
AML	71 %
Hodgkin Lymphom	97 %
Non Hodgkin Lymphom	86 %



<b>Solide Tumoren</b>	<b>15-Jahres Überleben</b>
Hepatoblastom	79 %
Keimzelltumor	93 %
Medulloblastom	63 %
Nephroblastom	94 %
Neuroblastom	76 %
Osteosarkom	70 %
Retinoblastom	97 %
Rhabdomyosarkom	71 %

### **1.3.1 Das Neuroblastom**

Das Neuroblastom (NB) ist ein hochmaligner embryonaler Tumor des sympathischen Nervensystems und der häufigste extrakranielle Tumor des Kindesalters. Betroffen ist in Deutschland eines von 6000 Kindern im Alter unter 15 Jahren, wobei das Neuroblastom vor allem bei Kleinkindern auftritt. Jungen erkranken dabei etwas häufiger als Mädchen (Verhältnis 1,2:1) (Deutsches Kinderkrebsregister, 2018). Es entwickelt sich aus unreifen Zellen der Neuralleiste und entsteht daher dort, wo sympathisches Gewebe lokalisiert ist: Im Nebennierenmark, dem zervikalen, thorakalen und abdominellen Grenzstrang des Sympathikus und den Paraganglien. Jedoch sind 75 % der Primärtumoren im Bauchraum lokalisiert (Bhat, McGregor, 2017). Die Wahrscheinlichkeit, an einem Neuroblastom zu erkranken, nimmt mit zunehmendem Lebensalter ab. Etwa 40 % der Kinder erkranken innerhalb des ersten Lebensjahres, das mediane Alter bei Diagnose liegt heutzutage bei 15 Monaten für alle Stadien, was vor allem aus einer früheren Diagnose von Patienten mit geringem und mittlerem Risiko resultiert (Berthold et al., 2017).

Allerdings sind 50 % der Neuroblastome zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits metastasiert (Tolbert, Matthay, 2018). Die Metastasierung kann dabei lymphatisch oder hämatogen erfolgen. Fernmetasen betreffen häufig Leber, Knochen und Knochenmark, wobei das Neuroblastom oft die Orbita infiltriert (Bhat,McGregor, 2017). Die Stadieneinteilung des Neuroblastoms erfolgt nach den INSS-Kriterien (International Neuroblastoma Staging System) in vier Erkrankungsstadien (Stadium 1, 2A, 2B, 3, 4 und 4S) (Brodeur et al., 1993).

**Tab. 4: Stadieneinteilung von Neuroblastomen nach INSS-Kriterien.**

<b>Krankheitsstadium</b>	<b>Definition</b>
Stadium 1	Vollständige Resektion des Tumors, lokalisiert, ohne Lymphknotenbefall
Stadium 2A	Unvollständige Resektion des Tumors, lokalisiert, infiltriert Umgebung ohne die Mittellinie zu überschreiten, kein Lymphknotenbefall
Stadium 2B	Vollständige oder unvollständige Resektion des Tumors, lokalisiert, infiltriert Umgebung ohne die Mittellinie zu überschreiten, ipsilateraler Lymphknotenbefall
Stadium 3	Nicht resektabler unilateraler Tumor, Infiltration über Mittellinie hinaus, oder Befall der konlateralen Lymphknoten, oder Mittellinientumor mit bilateraler Ausdehnung
Stadium 4	Hämatogene Fernmetastasen
Stadium 4S	Lokalisierter Primärtumor (Definition wie Stadium 1 oder 2) mit Dissemination in Haut, Leber und/oder Knochenmark, tritt nur im Säuglingsalter auf (< 1Jahr), spontane Regression möglich

Da die Stadieneinteilung nach den INSS-Kriterien in der Regel postchirurgisch erfolgt, wurde außerdem im Jahr 2008 das INRG (International Neuroblastoma Risk Group) Stadiensystem eingeführt, welches eine prätherapeutische Stadieneinteilung ermöglicht (Brisse et al., 2011; Cohn et al., 2009). Eine Prognose über Verlauf, Überlebensrate und auch die Behandlungsstrategie des Neuroblastoms schließt neben Faktoren wie dem Stadium, auch das Alter des Patienten und molekulargenetische Veränderungen ein. So haben Hochrisikopatienten nach wie vor eine schlechte Prognose mit 5-Jahresüberlebensraten von nur <50 %. Zu den molekulargenetischen Markern gehört eine genomische Amplifikation des Onkogens *MYCN* (*v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog*), die in 20 % der Fälle zu finden ist und mit einer schlechten Prognose korreliert. Ein weiterer wichtiger prognostischer Marker ist die Deletion des kurzen Armes von Chromosom 1p, der die Region 1p36 umfasst (Kaghad et al., 1997; Maris et al., 1995). Auch die Ploidy gilt als signifikanter prognostischer Indikator bei Neuroblastomen. Ein diploider DNA Gehalt ist ein ungünstiges Merkmal, wohingegen hyperdiploide Karyotypen mit einer weniger aggressiven Tumorbiologie assoziiert sind (Brodeur, 1995). Ein Zugewinn von 17q stellt eine weitere chromosomale Aberration dar, die in 63–68 % aller Neuroblastome auftritt (Bown et al., 1999). Die Expression der Neurotrophinrezeptoren TrkA (Tropomyosin receptor kinase A) und TrkB (Tropomyosin

## EINLEITUNG

receptor kinase B) gibt ebenfalls Aufschluss über den möglichen Krankheitsverlauf. So ist die erhöhte Expression von TrkB (ein Rezeptor für BDNF (brain derived neurotrophic factor)) mit einem schlechten Krankheitsverlauf assoziiert, wohingegen die Expression von TrkA (ein Rezeptor für NGF (neurotrophin growth factor)) mit einer guten Prognose und einem niedrigen Tumorstadium einhergeht (Nakagawara, 1998; Shimada et al., 2004). In familiär auftretenden Neuroblastomen, und auch in etwa 10 % der spontan auftretenden Neuroblastome, konnten aktivierende Mutationen der *anaplastischen Lymphom Kinase (ALK)* gefunden werden (Chen et al., 2008). Das Therapiekonzept des Neuroblastoms umfasst, zumindest bei den Hochrisikopatienten, eine chirurgische Entfernung des Tumors mit Polychemotherapie, Radiotherapie bzw. <sup>131</sup>I-MIBG-Therapie, autologer Stammzelltransplantation (nach myeloablativer Therapie), sowie konsolidierende Therapien z. B. mit 13-cis-Retinsäure. Zudem besitzt seit Mai 2017 der GD2 Antikörper Dinutuximab beta (APEIRON Biologics AG; Österreich) eine europäische Zulassung und ist Teil der aktuellen Therapieempfehlung der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) bei Hochrisikoneuroblastom-Patienten in der Erhaltungsphase (Simon et al., 2017).

### 1.3.2 Das Medulloblastom

Das Medulloblastom (MB) ist der häufigste maligne Hirntumor des Kindes- und Jugendalters mit hoher Tendenz zu leptomeningealer Aussaat (Abtropfmetastasen). Medulloblastome wurden erstmals von Cushing und Bailey in den 1920er Jahren beschrieben (Bailey, Cushing, 1925) und stellen einen embryonalen Tumor dar, welcher aus unreifen neuroektodermalen Zellen entsteht. Zwar können Medulloblastome in jedem Lebensalter auftreten, allerdings werden sie am häufigsten zwischen dem vierten und neunten Lebensjahr diagnostiziert. Medulloblastome entstehen am Dach des 4. Ventrikels und im Wurmfortsatz des Cerebellums und sind durch ihr rasches, infiltratives Wachstum mit Invasion des gesamten Subarachnoidalraumes gekennzeichnet (Millard, Braganca, 2016). Bei Diagnosestellung sind bei bis zu einem Drittel der Patienten bereits primär solide Metastasen des Zentralnervensystems (ZNS) vorhanden (Packer et al., 2003). Eine systemische Metastasierung mit Ausbreitung des Tumors außerhalb des Gehirns und der spinalen Corda ist bei Erstdiagnose jedoch selten (Kondoff et al., 2015). Die Inzidenz für das Auftreten eines Medulloblastoms liegt bei fünf Neuerkrankungen pro einer Million Kinder unter fünfzehn Jahren. Dabei sind Jungen etwas häufiger betroffen als Mädchen (Verhältnis 1,63:1) (Millard, Braganca, 2016). Geläufig ist eine Stadieneinteilung nach

## EINLEITUNG

Chang (Chang et al., 1969). Diese lehnt sich an TNM-Klassifikationen an und berücksichtigt die Größe des Primärtumors sowie die Metastasierungstendenz (Tab. 5). Neuere Studien zeigen, dass das Medulloblastom keine definierte und einheitliche Erkrankung ist, sondern eine Gruppe verschiedener molekularer Subtypen (WNT, SHH, Gruppe 3 und Gruppe 4) (Northcott et al., 2012). Die Einteilung in eine Untergruppe hat somit prognostische und therapeutische Implikationen (Tab. 6).

**Tab. 5: Tumorklassifikation von Medulloblastomen nach Chang.**

<b>Stadium</b>	<b>Tumorgröße- und ausdehnung</b>
T1	Tumordurchmesser < 3 cm und begrenzt auf Kleinhirnhemisphäre
T2	Tumordurchmesser ≥ 3 cm und dringt in eine Nachbarstruktur ein
T3a	Tumordurchmesser > 3 cm und Ausdehnung zum Aquädukt und/oder zum Foramen Luschkae
T3b	Tumordurchmesser > 3 cm mit Hirnstamminfiltration
T4	Tumordurchmesser > 3 cm mit Ausdehnung jenseits des Aquäduktes bzw. Foramen magnum (Ausbreitung außerhalb der hinteren Schädelgrube)
M0	Kein Nachweis einer liquorogenen oder hämatogenen Metastasierung
M1	Tumorzellen im Liquor cerebrospinalis (pos. Liquorzytologie)
M2	Intrakranielle Metastasierung außerhalb der hinteren Schädelgrube
M3	Makroskopische Tumoraussaat innerhalb des Spinalkanals
M4	Metastasen außerhalb des Zentralnervensystems

T = Tumorstadium: Beurteilung durch den Neurochirurgen nach der Operation, beinhaltet Tumorgröße und Ausdehnung (meist in die hintere Schädelgrube)

M = Metastasierungsstadium

**Tab. 6: Einteilung der Medulloblastome aufgrund ihres molekulargenetischen Profils (modifiziert nach (Taylor et al., 2012))**

	<b>Wnt</b>	<b>SHH</b>	<b>Gruppe 3</b>	<b>Gruppe 4</b>
Altershäufigkeit	Kinder und Erwachsene; selten Kleinkinder	Kleinkinder und Erwachsene; selten Kinder	Kleinkinder und Kinder; fast nie bei Erwachsenen	Kleinkinder und Erwachsene, aber am häufigsten bei Kindern
Häufigkeit	10 %	30 %	20 %	40 %
Geschlechtsverteilung	1:1	1:1	m > w	m > w
<b>Klinische Merkmale</b>				
Histologie	klassisch, selten großzellig/anaplastisch	oft nodulär/desmoplastisch, klassisch; großzellig/anaplastisch	klassisch; großzellig/anaplastisch	klassisch; großzellig/anaplastisch
Metastasierung	kaum	wenig	Sehr stark	stark
Prognose	sehr gut	Kleinkinder gut, andere intermediär	schlecht	intermediär
Genetisches Profil	6-; CTNNB1 Mutationen	3q+; 9q-; 10q- PTCH/SMO/SUFU Mutationen GLI2 Amplifikation MYCN Amplifikation	1q+; 5q-; 7+; 8-; 10q-; 11p-; 16q-; 17q+; i17q; 18q+; MYC Amplifikation	X-; 7+; 8-; 11p-; 17q+; i17q; 18q+ CDK6 Amplifikation MYCN Amplifikation
Genexpression	Wnt Signalweg  MYC+	SHH Signalweg  MYC+	Photorezeptor/-GABAerg  MYC+++	Neuronal/-Glutamaterg Wenig MYC/MYCN

## EINLEITUNG

Kleinkinder: 0–3 Jahre

Kinder: 3–16 Jahre

Erwachsene: > 16 Jahre

In 30–50 % der Fälle findet man eine Deletion an Chromosom 17p (Bigner et al., 1988). Häufig beobachtet man außerdem eine Trisomie 7, sowie Veränderungen an Chromosom 9q. Auch eine Monosomie 22 wird beschrieben. Des Weiteren findet man in einigen Fällen eine Amplifikation des *MYCN* Onkogens (Roussel, Robinson, 2013; Tomlinson et al., 1994). Prognostisch bedeutsam sind die Tumorgöße bei Diagnosestellung, das Vorhandensein von Metastasen, die Histologie und die Lokalisation des Tumors. Ein weiterer prognostischer Faktor ist das Alter (Jenkin et al., 2000; Kumar et al., 2015). In der HIT-91 Studie wurde das 3-Jahres progressionsfreie Überleben bei unter dreijährigen Kindern mit 56 % angegeben. Bei Kindern mit einem Alter zwischen acht und achtzehn Jahren lag es hingegen bei 79 % (Kortmann et al., 2000). Bei der Therapie des Medulloblastoms steht die möglichst vollständige Resektion des Tumors im Vordergrund. Wegen des stark infiltrativen Wachstums und der Metastasierungstendenz erfolgen bei Kindern über vier Jahre in der Regel im Anschluss eine Strahlentherapie und eine Chemotherapie. Dabei wird der gesamte Liquorraum mit Gehirn und Rückenmark mit Dosierungen zwischen 24–36 Gy, im Primärtumorbereich zwischen 54–60 Gy, bestrahlt. In den HIT-SKK Studien wurde der Einfluss der Strahlentherapie auf die kognitive Entwicklung der Kinder untersucht. So wird heutzutage weitgehend auf eine Radiatio bei Kindern, die jünger als drei Jahre sind, verzichtet, um die Schwere der kognitiven Defizite abzuschwächen (Rutkowski et al., 2009). Zu den Spätfolgen gehören außerdem neurologischen Störungen der Koordination und der Motorik und auch hormonelle Störungen, die zu einer Veränderung des Körperlängenwachstums und der Schilddrüsenfunktion führen können.

### **1.4 Apoptose - der programmierte Zelltod**

Die Apoptose ist ein physiologischer Prozess, der nach einem festgelegten genetischen Programm aktiv, also unter ATP Verbrauch, abläuft. Daher wird sie oft auch als programmierter Zelltod beschrieben und ist evolutiv hochkonserviert. Sie stellt einen wichtigen Mechanismus im mehrzelligen Organismus dar, um nicht mehr benötigte, oder beschädigte Zellen zu entfernen. Außerdem hat sie weitere Funktionen bei der Differenzierung im sich entwickelnden Gewebe (der embryonalen Morphogenese), bei der

## EINLEITUNG

Homöostase der Zellzahl und bei der Immuntoleranz. Die Apoptose kann durch distinkte Signale ausgelöst und reguliert werden.

Obwohl bereits im Jahr 1842 durch Carl Voigt beschrieben, wurde der Begriff Apoptose erst im Jahr 1972 von Kerr et al. geprägt (Kerr et al., 1972), da hier erstmals die charakteristischen morphologischen Veränderungen beim Ablauf dieses Selbsttötungsprogrammes beschrieben wurden.

Von der Apoptose lässt sich die Nekrose abgrenzen. Im Gegensatz zur Apoptose stellt die Nekrose eine pathologische Form des Zelltodes dar, bei dem Zellen, meist im Verband, unter Erzeugung einer Entzündungsreaktion untergehen. Dadurch kann es zu einer Schädigung des umliegenden Gewebes kommen. Mittlerweile sind allerdings auch Zwischenformen dieser beiden Phänomene und andere Formen des programmierten Zelltodes beschrieben worden (Formigli et al., 2000; Proskuryakov et al., 2003). Bei der Apoptose kommt es zu einer Schrumpfung der Zelle, zur Abschnürung bläschenförmiger Bestandteile der Zellmembran (blebbing) und zur Kondensierung und Fragmentierung der DNA in internukleosomale Fragmente mit einer Länge von 180 bp oder Vielfachen davon (DNA laddering). Die Zellorganellen bleiben dabei weitestgehend intakt. Abgeschnürte apoptotische Zellbestandteile (apoptotic bodies) werden schließlich ohne Entwicklung einer Entzündungsreaktion phagozytiert (Hacker, 2000; Hengartner, 2000). Bei der Nekrose hingegen schwillt die Zelle durch Wassereinstrom und Zusammenbruch des Stoffwechsels bis zum Platzen an und der Zellinhalt wird in die Umgebung freigesetzt. Hierdurch kommt es zu einer inflammatorischen Reaktion (Proskuryakov, Gabai, 2010). Die Nekrose wird oft durch äußere toxische Einflüsse hervorgerufen.

Eine Fehlregulation der Apoptose kann zu einer Vielzahl von Krankheiten führen (Thompson, 1995). So werden neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Chorea Huntington oder Morbus Parkinson mit einer akzelerierten Apoptose in Verbindung gebracht. Auch beim Myokardinfarkt, Diabetes mellitus, Leberzirrhosen, Muskeldystrophien und der Alopezie wird ein Zusammenhang mit einer überschießenden Apoptosereaktion diskutiert. Dagegen findet man in Tumorzellen eine erniedrigte Apoptoserate (Bellamy et al., 1995) (Tab. 7).

**Tab. 7: Beispiele für verminderten Apoptose bei der Tumorgenese (modifiziert nach (Debatin, Fulda, 2006)).**

Ereignis	Konsequenz	Tumorentität	Referenz
Chromosomale Translokation t(14,18)	Überexpression des antiapoptotischen Moleküls Bcl-2	Follikuläres Lymphom, AML, ALL	(Tsujiimoto et al., 1984)
Somatische Mutation mit Zugewinn von 17q	Verstärkte Expression von Survivin (IAP)	Neuroblastom	(Altieri, 2003),
Heterozygote CD95 Mutation	Verminderte Expression des CD95 Rezeptor	Morbus Hodgkin, Leukämien	(Debatin et al., 2003)
Promotor-Hypermethylierung des Caspase-8 Gens	Verminderte Expression der Caspase-8	Neuroblastom, Medulloblastom, Ewing-Sarkom	(Baylin, Bestor, 2002; Fulda et al., 2001; Teitz et al., 2000)

Generell unterscheidet man zwei Hauptapoptosesignalwege: Der extrinsische Signalweg wird über die Aktivierung sogenannter Todesrezeptoren initiiert, dagegen läuft der intrinsische Apoptoseweg unter Beteiligung der Mitochondrien ab (Abb. 4). Beiden Signalwegen gemein ist die Ausbildung eines zytosolischen Signaltransduktionskomplexes, welcher eine kaskadenartige Aktivierung nachgeschalteter Faktoren zur Folge hat. Dieser Prozess wird dabei streng durch sowohl hemmende als auch aktivierende Regulatoren kontrolliert. Der Aktivierung der sogenannten Caspasen kommt dabei eine zentrale Rolle zu (Kumar, 2006).

### 1.4.1 Caspasen

Caspasen sind die Hauptmediatoren und Exekutoren der Apoptose (Thornberry, Lazebnik, 1998). Es handelt sich um Proteasen, die ein Cystein im aktiven Zentrum enthalten und ihre Substrate durch limitierte Proteolyse hinter Aspartatresten aktivieren, oder degradieren können (**C**ystein-dependent **A**spartat-specific **P**roteases). Beim Menschen wurden bisher elf Caspasen beschrieben, wobei sieben an Apoptoseprozessen (Caspasen 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10), und vier an Entzündungsvorgängen (Caspasen 1, 4, 5, 13), beteiligt sind. Sie sind evolutiv hochkonserviert und liegen als inaktive Vorstufen



## EINLEITUNG

(Procaspasen, Zymogene) in der Zelle vor. Die apoptotischen Caspasen lassen sich in zwei Gruppen unterteilen, Initiator- (Caspase-2, -8, -9, -10) und Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, -7). Procaspasen bestehen aus drei Domänen: Einer NH<sub>2</sub>-terminalen Prodomäne, einer großen Untereinheit p20 (ca. 20 kDa) und einer kleinen Untereinheit p10 (ca. 10 kDa). Durch Spaltung an Aspartatresten werden die kleine-, die große Untereinheit und die Prodomäne voneinander getrennt. Die Spaltung der Untereinheiten führt zu einem aktiven Heterodimer. Effektor- und Initiatorcaspasen unterscheiden sich durch die Länge und Struktur ihrer Prodomänen. Initiatorcaspasen tragen eine lange Prodomäne bestehend aus einer DED (death effector domain) oder einer CARD (Caspase recruitment domain), welche die Bindung und Aktivierung von Adaptermolekülen ermöglichen. Effektorcaspasen tragen hingegen nur kurze Prodomänen und werden ihrerseits durch aktivierte Initiatorcaspasen proteolytisch gespalten. Sie können in ihrem aktivierten Zustand zytoplasmatische und nukleäre Steuer- und Strukturproteine spalten. Die limitierte Proteolyse der Caspase-Substrate führt zu deren Aktivierung (ICAD→CAD, Bid→tBid, PAK2) (Bokoch, 1998), oder Destruktion (PARP, Foldrin, Gelsolin, Lamin B) (Hengartner, 2000). Dabei kann es sich bei den Caspase-Substraten um einfache Polypeptide oder makromolekulare Strukturen, wie das Lamin Netzwerk handeln.

### **1.4.2 Der extrinsische, Rezeptor-vermittelte Apoptoseweg**

Die Induktion der Apoptose über den extrinschen Apoptoseweg erfolgt durch Vermittlung von Rezeptoren der TNF-Rezeptor Superfamilie. Bislang sind sechs Mitglieder bekannt. Zu den Liganden der Rezeptoren gehören CD95-L, TRAIL, APO3-L, TNF- $\alpha$ . Nach Ligandenbindung erfolgt eine Rezeptortrimerisierung und Zusammenlagerung der intrazellulären Todesdomänen (DD, Death domain). Dies ermöglicht wiederum die Rekrutierung des Adaptermoleküls FADD (Fas-associated death domain). Die Rezeptoren TNF-R1, DR3 und DR6 lagern zunächst das Molekül TRADD (Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein) an, welches als Bindeglied nun FADD anlagert. Auf diese Weise bildet sich ein DISC (Death inducing signaling Komplex). Neben den DD besitzt FADD auch eine Todeseffektordomäne (DED, Death effector domain), über die Procaspase-8 mit seiner DED an den Signalkomplex binden kann. Durch die Rekrutierung mehrerer Caspase-Moleküle („induced proximity“) kommt es zur autokatalytischen Spaltung und Aktivierung der Caspase-8 (FLICE) (Muzio et al., 1998). Die aktivierte Caspase-8 löst nun durch Spaltung von Effektorcaspasen die Caspasekaskade aus. Außerdem spaltet Caspase-8 das BH3-only Molekül Bid zu tBid

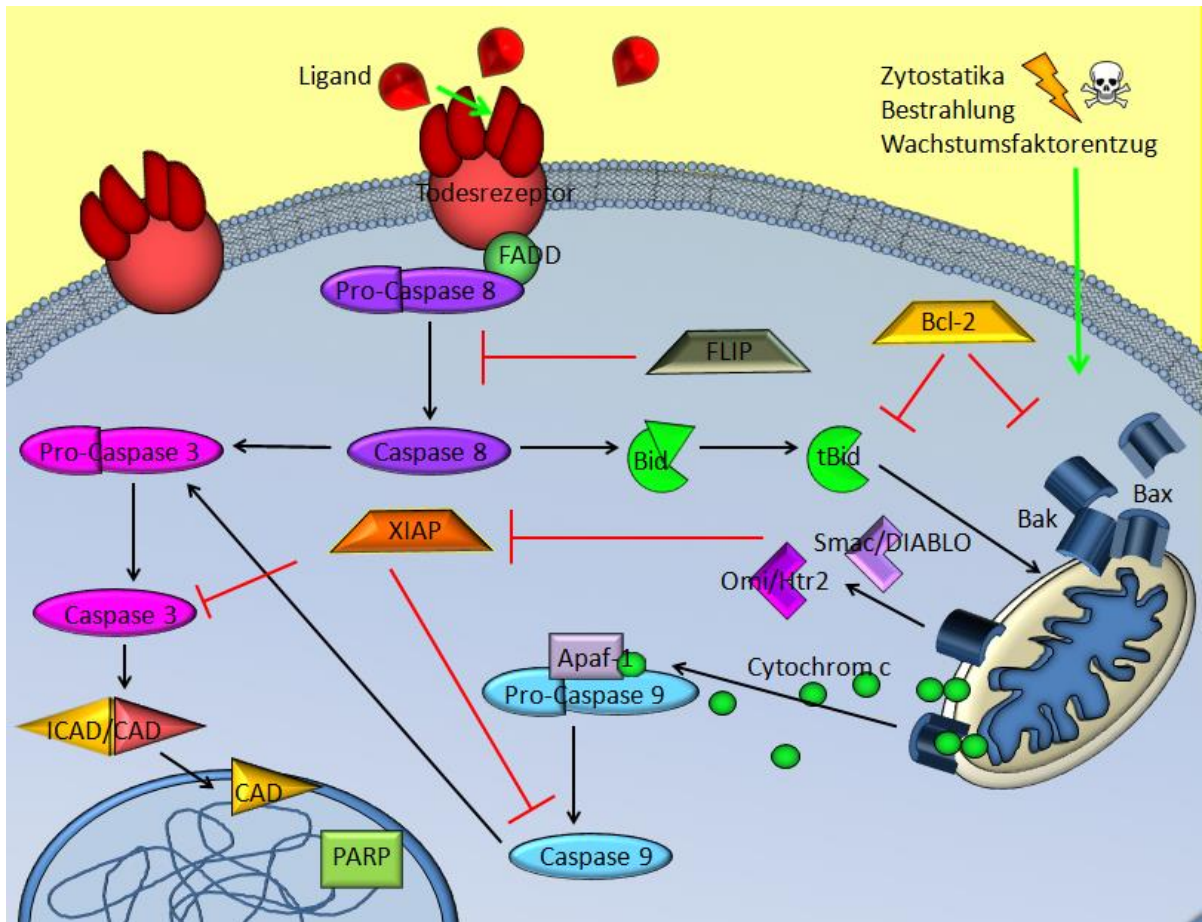
## EINLEITUNG

(truncated Bid), welches zu den Mitochondrien transloziert und dort ein proapoptotisches Signal weiterleitet. Hierdurch entsteht auch eine Verbindung zwischen extrinsischem- und intrinsischem Apoptoseweg (Kruidering, Evan, 2000).

Bei den Decoy-Rezeptoren handelte es sich um TRAIL-Rezeptoren ohne, oder mit fehlerhafter intrazellulärer Domäne. Sie sind zwar zur Ligandenbindung fähig, das Signal wird allerdings nicht weitergeleitet. Sie wirken dadurch als kompetitive Inhibitoren der funktionellen Todesrezeptoren und puffern ankommende Signale ab (Daniel et al., 2001; LeBlanc, Ashkenazi, 2003).

### **1.4.3 Der intrinsische, Mitochondrien-abhängige Apoptoseweg**

Der intrinsische Apoptoseweg wird insbesondere durch DNA-Schäden, zytotoxische Substanzen, Adhäsionsverlust, Bestrahlung, reaktive Sauerstoffintermediate (ROI) sowie Wachstumsfaktorentzug ausgelöst. Kontrolliert und reguliert wird dieser Weg in erster Linie durch Mitglieder der Bcl-2 Familie, die sowohl pro- (Bim, Bax, Bad, Bok, Bmf, Bik, PUMA, NOXA), als auch antiapoptotisch (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-B, Bcl-W, Bfl-1, Mcl-1) wirken können. Sie liegen zum Teil frei im Zytoplasma vor, aber auch gebunden an Membranen des Nukleus, der äußeren Mitochondrienmembran oder des Endoplasmatischen Retikulums. Der initiale Schritt der intrinsischen Apoptose ist die Freisetzung von Cytochrom c aus dem mitochondrialen Intermembranraum. Durch Zusammenlagerung von Cytochrom c, Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) und dATP kommt es zur Bildung des Apoptosoms, eines Signaltransduktionskomplexes, an das sich die Procaspase-9 mit ihrer CARD (Caspase activation and recruitment domain) anlagert. Die Aktivierung der Caspase-9 im Signalkomplex erfolgt nun durch Konformationsänderung. Dabei ist die Stöchiometrie des Apoptosoms unbekannt (Hengartner, 2000). Die aktivierte Caspase-9 kann nun die Effektorcaspasen 3 und 7 spalten.



**Abb. 4: Übersicht beider Hauptapoptosewege. Auf der linken Seite ist die Apoptoseinduktion über den extrinsischen Weg abgebildet, auf der rechten Seite der Verlauf nach Aktivierung der mitochondrialen (= intrinsischen) Apoptose (Abbildung K. Menke).**

Noch sind die genauen Mechanismen der Cytochrom c-Freisetzung ungeklärt. Es werden mehrere Modelle diskutiert, wie es zu einer Porenbildung der äußeren Mitochondrienmembran (= MOMP; mitochondrial outer membrane permeabilization) und der anschließenden Freisetzung proapoptotischer Faktoren kommen kann (Gogvadze et al., 2006)). Neben Cytochrom c werden auch andere Moleküle, darunter Smac, AIF, Omi und EndoG ausgeschüttet, wobei die Faktoren AIF (Apoptosis inducing factor) und EndoG (Endonuclease G) im Zellkern zu einer Caspasen-unabhängigen DNA Fragmentation führen (Li et al., 2001; Susin et al., 1999).

Die Öffnung von Kanälen in der äußeren Mitochondrienmembran stellt ein frühes Ereignis im Verlauf der Apoptose dar. Die Atmungskette bleibt zunächst noch intakt. Erst später kommt es durch Flüssigkeitseinstrom zum Anschwellen und Platzen der Mitochondrien und damit zum Zusammenbruch des Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ), der mitochondrialen

## EINLEITUNG

„permeability transition„. Damit kommt es schließlich auch zum Zusammenbruch der Atmungskette. Die Mitglieder der Bcl-2 Familie sind an der Ausformung dieser Kanäle entscheidend beteiligt (Youle, Strasser, 2008). So liegt Bax in Abwesenheit proapoptotischer Signale als Monomer im Cytosol, oder assoziiert mit Bcl-2 vor. Durch proapoptotische Reize kommt es zur Insertion in die äußere Mitochondrienmembran und zur Bildung von Bax-Oligomeren, welche die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran verursachen (Korsmeyer et al., 2000).

Der Balance zwischen pro- und antiapoptotischen Bcl-2 Molekülen kommt eine wichtige Rolle zu, sie entscheidet über die Weiterleitung des ankommenden Signals (Hockenbery et al., 1990). So führen z. B. frameshift-Mutationen des Bax Gens beim Kolonkarzinom zur Tumorprogression (Ionov et al., 2000), während eine hohe Bax Expression bei der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) einen guten prognostischen Faktor darstellt (Ong et al., 2000). Auf der anderen Seite findet man insbesondere bei Leukämien erhöhte Bcl-2 Level (Coustan-Smith et al., 1996). Auch andere antiapoptotische Bcl-2 Familien Mitglieder, insbesondere Mcl-1 sind in verschiedene Tumorentitäten überexprimiert (Placzek et al., 2010).

### **1.5 Kombinationstherapien in der Onkologie**

Arzneimittelwechselwirkungen können bei der gleichzeitigen Einnahme mehrerer Medikamente auftreten. Die Arzneistoffe können synergistisch oder antagonistisch miteinander interagieren (Yin et al., 2014). Synergie wird dabei definiert als eine Wirkung, die größer ist als die Einzeleffekte der kombinierten Substanzen (Di Chen et al., 2015).

Tumorzellen sichern sich ihr Überleben durch meist nur einen geringe Anzahl molekularer Modifikationen (Hanahan, Weinberg, 2000; Yap et al., 2013).

Heutzutage stellen multimodale Kombinationstherapien einen Eckpfeiler der Krebstherapie dar, da man sich durch den Angriff mehrerer Ziele an der Tumorzelle innerhalb eines Signalnetzwerks ein größeres therapeutisches Ansprechen, eine geringere Resistenzentwicklung, ein geringeres Metastasierungsrisiko, eine geringere Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs und eine mögliche Dosisreduktion der kombinierten Arzneimittel verspricht, die mit einem ebenfalls reduzierten Auftreten der korrelierten Nebenwirkungen, verbunden sein soll (Fouquier, Guedj, 2015; Tallarida, 2011).

Hier kommen klassische Chemotherapeutika, Rezeptor-Inhibitoren, monoklonale Antikörper, Hormone bzw. antihormonell wirkende Substanzen zum Einsatz, als auch Supportivtherapeutika zur Bekämpfung der oft schweren Nebenwirkungen (Schirrmacher,

## EINLEITUNG

2019) wie Immunsuppression, Myelosuppression, Übelkeit und Erbrechen, Tumorschmerzen oder Infektionen durch Bakterien und Pilze.

Zu Bedenken ist jedoch, dass die meisten Zytostatika eine geringe therapeutische Breite besitzen. Eine Kombination birgt die Gefahr der Toxizitätsverstärkung der Einzelsubstanzen (Park et al., 2013). Allerdings kann es auch zu einer Abschwächung der Wirkung anderer Arzneimittel in der Kombination kommen, die den Therapieerfolg insgesamt gefährden kann (Scripture, Figg, 2006).

Für die Quantifizierung und Vorhersage möglicher synergistischer Effekte gibt es mehrere mathematische Ansätze und Modelle, die das Ziel haben zu überprüfen ob die experimentell beobachteten Wirkungen von den postulierten erwarteten Effekten (Nullhypothese) des jeweiligen Referenzmodells abweichen (Sinzger et al., 2019).

Alle vorgeschlagenen mathematischen Herangehensweisen, dazu gehören unter anderem die Loewe-Additivität (Loewe, 1953), Bliss-Unabhängigkeit (Bliss, 1939), Highest Single Agent (HSA) (Berenbaum, 1989) und die Chou-Talalay Methode (Chou, Talalay, 1984) erheben einen Anspruch auf Richtigkeit, kommen jedoch zum Teil aufgrund inhärenter Unterschiede in den Modellannahmen zu unterschiedlichen Ergebnissen in Bezug auf die Quantifizierung des Grades der Interaktion (Tang et al., 2015; Yadav et al., 2015). Bisher gibt es kein standardisiertes Verfahren zur Auswahl des optimalen Referenzmodells, da keines der genannten Referenzmodelle eine Allgemeingültigkeit nachweisen kann und Einschränkungen besitzt (Roell et al., 2017; Yadav et al., 2015).

### 2 FRAGE- UND ZIELSTELLUNG DER ARBEIT

Naturprodukte sind eine unübertroffene Quelle von Leitstrukturen für die Wirkstoffforschung (Rayan et al., 2017). Über 60 % der zugelassenen Krebsmedikamente sind natürlichen Ursprungs und stammen aus Pflanzen, Meeresorganismen und Mikroorganismen, oder sind hieraus abgeleitet (Cragg, Newman, 2005). Daher ist die Erforschung der antitumoralen Wirkungen von Pflanzenextrakten eine logische Konsequenz.

Krebs ist die am häufigsten auftretende tödliche Erkrankung im Kindes- und Jugendalter in Deutschland. Dabei ist das Neuroblastom der häufigste solide extrakranielle Tumor und das Medulloblastom der häufigste bösartige Hirntumor bei Kindern und Jugendlichen, die beide eine starke klinische Heterogenität aufweisen. Trotz ermutigender Erfolge in Prognostik und Therapie dieser Krebserkrankungen stagnieren die Heilungsraten im Besonderen bei soliden Tumoren. Den Therapiekonzepten liegt eine Kombination von lokaler und/oder systemischer Polychemotherapie, mit einer operativen Behandlung und/oder strahlentherapeutischen Intervention zugrunde. Allerdings greifen die Eltern betroffener Kinder oft auch zu komplementärmedizinischen Therapieoptionen, die zusätzlich zur konventionellen Behandlung appliziert werden. Hierbei werden Mistelextrakte mit steigender Frequenz angewendet, deren Wirkungen auf adulte Tumorerkrankungen bereits lange erforscht werden. Allerdings gibt es bislang noch wenige Untersuchungen zur Effektivität einer Misteltherapie auf pädiatrische Tumorzellen. Die Wirksamkeit eines im klinischen Alltag oft verwendeten Mistelextraktes auf kindliche Tumorzellen sollte in dieser Arbeit charakterisiert und beurteilt werden.

Um einen größtmöglichen zytostatischen Effekt zu erzielen und um Nebenwirkungen eines einzelnen Chemotherapeutikums zu minimieren, beinhaltet ein onkologisches Therapieregime oft Kombinationen Arzneimittel. In der pädiatrischen Onkologie gibt es jedoch bezüglich der Wirksamkeit von Mistelanwendungen und möglichen Kombinationswirkungen mit der konventionellen Chemo- und Radiotherapie nur sehr wenige Forschungsdaten. Eine Kombinationstherapie aus verschiedenen Arzneimitteln, oder Arzneimitteln, die simultan mit einer Bestrahlung verabreicht werden, birgt gerade durch die geringe therapeutische Breite der Zytostatika ein Risiko von Interaktionen und dem Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen. Diese sind gerade in der Pädiatrie im Hinblick auf mögliche Langzeitschäden von enormer Bedeutung. Generell können diese Wechselwirkungen sowohl die Wirkung der konventionellen Chemo- oder Radiotherapien verstärken, als auch abschwächen und können somit für den Therapieerfolg entscheidend sein.

## FRAGE- UND ZIELSTELLUNG DER ARBEIT

Ziel dieser Arbeit war daher die präklinische Untersuchung von antitumoralen Effekten eines kommerziell erhältlichen und oft applizierten Mistelextraktes auf pädiatrische Tumorzellen insbesondere auf das Neuroblastom und das Medulloblastom. Dabei sollte das therapeutische Potenzial einer Mistelbehandlung *in vitro* und *in vivo* und die dabei ausgelösten zytotoxischen Effekte charakterisiert werden. Hierbei sollte auch der Frage nachgegangen werden ob, und inwieweit, eine simultan verabreichte Misteltherapie Auswirkungen auf die antitumoralen Effekte einer Chemo- oder Radiotherapie hat. Die Ergebnisse sollen dazu beitragen die Therapiesicherheit einer komplementären Behandlungssituation in der pädiatrischen Onkologie zu verbessern.

### 3 VERWENDETE MATERIALIEN

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Materialien sind den folgenden Aufstellungen zu entnehmen. Die zur Anwendung gekommenen Antikörper, Primer, Größen- und Molekulargewichtsmarker, die Zusammensetzung von Medien, Lösungen und Puffern, sowie die Herkunft der Versuchstiere, sind in den jeweiligen Kapiteln beschrieben.

#### 3.1 Geräte

Agarose-Gelelektrophoresekammer	Peqlab Biotechnologies GmbH (Erlangen, Deutschland)
Biodoc Analyzer	Biometra (Göttingen, Deutschland)
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Durchflusszytometer Cytomics FC500	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
Eisbereiter	Scotsman Ice Systems (Vernon Hills, USA)
EL-800 Microplate Reader	Bio-Tek Instruments (Bad Friedrichshall, Deutschland)
Enduro 250V Power Supply	Stellar Scientific (Maryland, USA)
Eppendorf Bio Photometer	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Feinwaage	Ohaus Europe GmbH (Greifensee, Schweiz)
Fusion FX 7	Vilber Lourmat (Eberhardzell, Deutschland)
Gefrierschrank	Kirsch (Willstätt-Sand, Deutschland)
GFL 3005 Schüttler	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Handy Step	Brand GmbH (Wertheim, Deutschland)
Heizblock Thermostat TCR 100	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Kühlzentrifuge Mikro22R	Hettich (Kirchlengern, Deutschland)
Laborwaage EW420-3NM	Kern & Sohn (Balingen- Frommen, Deutschland)
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Mikroskop Motic AE 31	Motic (Wetzlar, Deutschland)
Mikrowelle	Severin Elektrogeräte GmbH (Brühl, Deutschland)
Modulus Microplate Reader	Turner Biosystems/Promega (Mannheim, Deutschland)
Multipette Stream	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Nanodrop 100 Spektrophotometer	Peqlab Biotechnologies GmbH (Erlangen, Deutschland)
PCR C 100 Thermal Cycler	BioRad (München, Deutschland)



## VERWENDETE MATERIALIEN

pH-Meter inolab PH 7310	WTW (Weilheim, Deutschland)
Pipettierhilfe Rotafiller 3000	Quasar Instruments (Colorado Springs, USA)
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, Deutschland)
Rasierapparat Braun	Kaz, A Helen of Troy Company (Marlborough, USA)
Rollschüttler Tube Roler	STARLAB GmbH (Hamburg, Deutschland)
Röntgengerätes X-RAD 320	PXI Precision X-Ray (North Branford, USA)
Rührer RTC basic	IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland)
Schieblehre digital	Bochem Instrumente GmbH (Weilburg, Deutschland)
scil Vet abc	scil animal care company GmbH (Viernheim, Deutschland)
Semi-Dry Blotter	Peqlab Biotechnologies GmbH (Erlangen, Deutschland)
StepONE Plus Real-Time PCR Applied	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Sterilwerkbank Herasafe	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
Sterilwerkbank Sterigard	The Baker Company (Stanford, USA)
Vortex Heidolph Reax top	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel, Deutschland)
Infrarot-Stirnthermometer W977 F	Kaz, A Helen of Troy Company (Marlborough, USA)
Wiegeschüttler Heidolph Vibramax 100	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Z1 Coulter Partikel Counter	Beckmann Coulter (Krefeld, Deutschland)
Zentrifuge 542R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge Allegra X-22R	Beckmann Coulter (Krefeld, Deutschland)
Zentrifuge Rotixa 50RS	Hettich (Kirchlengern, Deutschland)

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

24- und 96-Loch-Platten	STARLAB (Hamburg, Deutschland)
6- und 12-Loch-Platten	Corning (Kaiserslautern, Deutschland)
96- Loch Platte, weiß	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Bakterienzurückhaltender Filter Minisart Plus 0,22 µm	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
BD Bio Coat Matrigel Invasion Chambers 8 µm	BD Becton Dickinson and Company (Franklin Lakes, USA)

## VERWENDETE MATERIALIEN

BD FluoroBlok 8 µm Insert System	BD Becton Dickinson and Company (Franklin Lakes, USA)
Combitips	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Combitips steril	STARLAB GmbH (Hamburg, Deutschland)
Deckgläschen	Menzel Gläser (Braunschweig, Deutschland)
Einwegpipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Einwegspritzen	Teumo Europe (Leuven, Belgien)
E-Plate 96	ACEA Biosciences Inc. (San Diego, USA)
Kanülen	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Kanülen 0,9 mm; 0,4 mm	BD Becton Dickinson and Company (Franklin Lakes, USA)
Kapillarröhrchen	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG (Eberstadt, Deutschland)
Kryoröhrchen	Simport (Beloeil, Kanada)
Kulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> )	Corning (Corning, USA)
Kulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> und 175 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Küvetten Halbmikro, PS	LLG Labware Lab Logistic Group GmbH (Meckenheim; Deutschland)
Microvette	Sarstedt AG & Co (Nümbrecht, Deutschland)
Mikroreaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
NuPAGE™ 4–12 % Bis-Tris Protein Gel	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Objektträger	Engelbrecht (Edermünde, Deutschland)
Ohrlochzange	Finescience Tool (Heidelberg, Deutschland)
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Inc. (Chicago, USA)
Pasteurpipetten	Brand GmbH (Wertheim, Deutschland)
PCR Reaktionsgefäße	Peqlab Biotechnologies GmbH (Erlangen, Deutschland)
Pipettenspitzen	STARLAB (Ahrensburg, Deutschland)
PMMA Einmalküvetten	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Protran Transfer	Whatman (Dassel, Deutschland)
Nitrozellulosemembran	
PS-Röhrchen (15 ml und 50 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Scheren	Finescience Tool (Heidelberg, Deutschland)

## VERWENDETE MATERIALIEN

Skalpelle	Servopax (Wesel, Deutschland)
Sterile Applikatoren	Böttger (Bodenmais, Deutschland)
Zellulose Blot Papier (3 mm)	GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen	Beckmann Coulter (Krefeld, Deutschland)

### 3.3 Chemikalien

abnobaVISCUM Fraxini 20 mg	ABNOBA GmbH (Pforzheim, Deutschland)
Agarose	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Amphotericin B	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Ampuwa 50 ml	Fresenius Kabi GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
BSA	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Cisplatin Teva 1 mg/ml	Teva GmbH (Ulm, Deutschland)
Clens Lösung	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
Collagen R solution 0.2 %	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Coomassie Brilliant Blue R-250	Bio Rad Laboratories (Hercules, USA)
DAPI (= 4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Essigsäure	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Etoposid 20 mg/ml	Teva Pharma B. V. (Haarlem, Niederlande)
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Glycin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Insolution™ Q-VD-OPh, Non-O-methylated	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Iscucin Pini; Iscucin Tiliae	Wala Heilmittel GmbH (Bad Boll, Deutschland)

## VERWENDETE MATERIALIEN

Isoton-Lösung	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
LDS (Lithiumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
MES (2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Milchpulver	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumdesoxycholat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
NP-40 (Nonylphenoethoxylat)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Paraformaldehyd	Morphisto (Frankfurt a. M., Deutschland)
PBS (1x)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Gibco™ Penicillin- Streptomycin	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Ponceau S	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Roti®-Quant	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) Medium	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
SDS Ultrapure (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Terralin liquid	Schülke & Mayr GmbH (Norderstedt, Deutschland)
Thermo Scientific™ Shandon™ Immu-Mount™	Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)
Thiazolylblau	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Trypan Blue Solution	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trypsin/ EDTA	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Tween 20	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

### 3.4 Enzyme

cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche (Mannheim, Deutschland)
MyTaq™ HS Red Mix	Bioline (Luckenwalde, Deutschland)
PhosSTOP™ Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche (Mannheim, Deutschland)
RNAse A	Peqlab Biotechnologies GmbH (Erlangen, Deutschland)

### 3.5 Kits

Caspase-Glo® 8 assay system	Promega (Mannheim, Deutschland)
-----------------------------	---------------------------------

## VERWENDETE MATERIALIEN

Caspase-Glo® 9 assay system	Promega (Mannheim, Deutschland)
Cell Proliferation ELISA, BrdU	Roche (Mannheim, Deutschland)
ECL Plus Western Blotting Detection	GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)
High Pure RNA Isolation	Roche (Mannheim, Deutschland)
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis	Roche (Mannheim, Deutschland)

### 3.6 Eingesetzte Pflanzenextrakte

In dieser Studie wurde das Präparat abnobaVISCUM Fraxini 20 mg/ml (im Folgenden aVF genannt) der Firma ABNOBA GmbH (Pforzheim, Deutschland) verwendet. Es handelt sich hierbei um einen Presssaft aus Blättern, Beeren und Stängeln von Mistelpflanzen des Wirtsbaums Esche, der nach einem patentierten Verfahren (Patent: EP0288603 A1), hergestellt wird. Durch die intensiven Druck- und Scherkräfte kommt es zu einem starken Zellaufschluss, bei dem die Inhaltsstoffe durch Membranlipide vesikulär, in einer stabilen kolloidalen Lösung vorliegen. Durch das enthaltene Chlorophyll ist der Extrakt grün gefärbt. AbnobaVISCUM Fraxini 20 mg stellt dabei einen Extrakt aus 20 mg frischem Mistelkraut dar und enthält 15 mg Presssaft. Hierbei werden die im Sommer und im Winter gewonnenen Presssäfte beider Ernten mithilfe eines speziellen Strömungsverfahrens zusammengeführt. Für die Berechnung der Konzentrationen in dieser Arbeit wurde das Fertigarzneimittel zugrunde gelegt und davon ausgegangen, dass eine Ampulle abnobaVISCUM Fraxini 20 mg, 1000 mg/ml entspricht. Eine in dieser Arbeit oft verwendete Konzentrationsangabe von 0,05 mg/ml, entspricht so beispielsweise einer 1:20000 Verdünnung des Fertigarzneimittels aVF 20 mg. In dieser Arbeit wurden die aVF Chargen: 609 A04; 404 A24 und 211 A06 verwendet. Dabei wurde, soweit nicht anders angegeben, die Charge 404 A24 für alle zellbiologischen Arbeiten, mit Ausnahme der Analyse von Wechselwirkungen zwischen einer Chemo- oder Radiotherapie mit aVF, eingesetzt. Hier kam die Charge 609 A04 zum Einsatz. Für die *in vivo* Versuche wurde die Charge 211 A06 verwendet.

In dieser Arbeit wurden weiterhin die Mistelpräparate Iscucin Tiliae (Ch.-B.: A029911B) und Iscucin Pini (Ch.-B.: A027750) der Potenzstärke H (WALA Heilmittel GmbH) verwendet. Die Potenzstärke H stellt eine 1:20 Verdünnung aus der Urtinktur dar und enthält somit 50 mg Urtinktur pro 1 ml Fertigarzneimittel. Die Iscucin-Mistelpräparate werden aus getrockneten Pflanzenteilen der Mistel durch Mazeration bei 4 °C über 14 Tage hergestellt. Die Sommer- und die Winterernte werden dabei getrennt verarbeitet und anschließend in einer durch den Arzt Karl Köller (1896-1975) entwickelten Apparatur vermischt.

### **4 METHODEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER FRAGESTELLUNG**

#### **4.1 Zellbiologische Methoden**

##### **4.1.1 Zellkultur**

Alle Arbeiten an Zellen wurden unter einer sterilen Werkbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Verwendet wurden weitestgehend sterile Einmalartikel. Alle anderen benötigten Materialien wurden vor Gebrauch autoklaviert, mit dem Desinfiziens Terralin abgesprüht und abgewischt, oder mithilfe eines bakterienzurückhaltenden Filters der Porengröße 0,22 µm steril filtriert.

##### **4.1.2 Auftauen/Kultivierung und Subkultivierung der Tumorzellen**

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sup>2</sup> und 95 % Luftfeuchte auf T25, T75 bzw. T175 Flaschen kultiviert. Medien und Lösungen wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Zum Auftauen wurden die Zellen ebenfalls kurz im Wasserbad erwärmt und unter leichtem Schwenken vorsichtig mit dem entsprechenden Medium in einem 15-ml-Greiner-Röhrchen aufgenommen. Nach Abzentrifugation bei 300 g für 5 Minuten wurde das gewonnene Zellpellet mit Medium resuspendiert und auf Kulturflaschen gegeben. Nicht adhärent wachsende Zellen wurden in stehenden Flaschen kultiviert. Für die Kultivierung der Ewing Sarkom Zelllinien TC-71, RD-ES und CADO-ES wurden die Flaschen mit einer 1:10 verdünnten Collagenlösung (2 mg/ml) beschichtet. Dazu wurde die Lösung auf die Wachstumsfläche aufgebracht und nach 30 Minuten mithilfe einer Pasteurpipette abgesaugt. Das Wachstum aller Zellen wurde täglich mikroskopisch begutachtet. Eine Subkultivierung erfolgte bei ca. 80 %iger Konfluenz. Hierzu wurde der Zellrasen bei adhären Zellen zunächst mit warmem PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA abgelöst. Das Abstoppen der Trypsinierungsreaktion erfolgte mit FCS-haltigem Zellkulturmedium. Nach Abzentrifugation bei 300 g für 5 Minuten wurde der Überstand verworfen, die pelletierten Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen und erneut ausgesät. Zur Bestimmung der optimalen Zelldichte wurden vor den Experimenten Proliferationskurven mit verschiedenen Zellzahlen erstellt. Die für die Kultivierung der Zellen verwendeten Medien und ihre Zusammensetzung können den Tabellen 8 und 9 entnommen werden.

Dabei wurden die Zelllinien HL-60, Daoy, ONS-76, LAN-1, LAN-5, IMR-32, Kelly, NB69, SH-SY5Y und SK-N-AS von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland) und die Zelllinien HeLa, LAMA-84, Caco-2,

## METHODEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER FRAGESTELLUNG

SW620, AN3-Ca, D341, 3T3, PANC-1 und BxPC-3 von ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, USA) erworben. Die Zelllinien U-87, EJ-28, J82, RT-112, T24, Hep G2, HuH-7, MDA-MB-231, B16-F10 und Saos-2 wurden freundlicherweise vom Institut für Molekulare Onkologie (Universitätsklinikum Essen) und die Zelllinien A549, SK-BR-3, SKOV-3 und NIH:OVCAR-3 vom Institut für Zellbiologie (Universitätsklinikum Essen) zur Verfügung gestellt. Die Zelllinien NALM-6, TC-71, RD-ES und CADO-ES wurden dankend vom Kinderspital Zürich (Schweiz) und die Zelllinie Fibro 17 von der Arbeitsgruppe von Prof. Helmut Hanenberg (Universitätsklinikum Essen) erhalten. Die Zelllinien C1300 und Ishikawa wurden von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) erworben.

**Tab. 8: Zusammensetzung der verwendeten Medien.**

Zusammensetzung Medium A	Zusammensetzung Medium B
RPMI 10 % FCS	DMEM 10 % FCS

**Tab. 9: Verwendete Zelllinien und dafür gebrauchte Medien.**

Entität	Zelllinie	Medium
Akute myeloische Leukämie (AML)	HL-60	A
B Zell-Vorläufer Leukämie	NALM-6	A
Cervixkarzinom	HeLa	A
Chronische myeloische Leukämie (CML)	LAMA-84	A
Colonkarzinom	Caco-2	B
Colonkarzinom	SW620	B
Endometriumkarzinom	Ishikawa	B
Endometriumkarzinom	AN3-Ca	B
Ewing Sarkom	TC-71	A
Ewing Sarkom	RD-ES	A
Ewing Sarkom	CADO-ES	A
Glioblastom	U-87	A
Harnblasenkarzinom	EJ-28	A
Harnblasenkarzinom	J82	A
Harnblasenkarzinom	RT-112	B
Harnblasenkarzinom	T24	A
Hepatozelluläres Karzinom	Hep G2	B
Hepatozelluläres Karzinom	HuH-7	B

## METHODEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER FRAGESTELLUNG

Humane Fibroblasten	Fibro 17	B
Lungenkarzinom	A549	B
Mammakarzinom	SK-BR-3	A
Mammakarzinom	MDA-MB-231	A
Mammakarzinom	MCF-7	A
Medulloblastom	D341	B
Medulloblastom	Daoy	A
Medulloblastom	ONS-76	A
Murine Fibroblasten	3T3	A
Murines Melanom	B16-F10	B
Murines Neuroblastom	C1300	A
Neuroblastom	LAN-1	A
Neuroblastom	LAN-1 Cisplatin resistent	A
Neuroblastom	LAN-1 Etoposid resistent	A
Neuroblastom	LAN-5	A
Neuroblastom	IMR-32	B
Neuroblastom	Kelly	A
Neuroblastom	NB69	A
Neuroblastom	SH-SY5Y	A
Neuroblastom	SK-N-AS	A
Osteosarkom	Saos-2	A
Ovarialkarzinom	SKOV-3	B
Ovarialkarzinom	NIH:OVCAR-3	B
Pankreaskarzinom	PANC-1	B
Pankreaskarzinom	BxPC-3	B

### 4.1.3 Einfrieren und Lagerung von Tumorzellen

Für eine dauerhafte Lagerung wurde das Zellpellet, nach der an die Trypsinierungsreaktion anschließenden Abzentrifugation, statt in frischem Medium in Einfriermedium aufgenommen und bei -80 °C eingefroren.

#### Zusammensetzung Einfriermedium:

DMSO 5 ml

FCS ad 50 ml



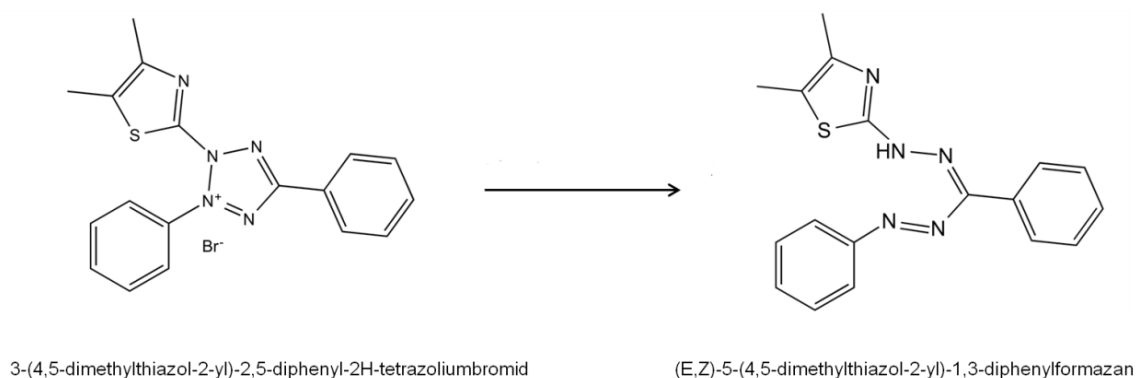
### 4.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Als standardisiertes und reproduzierbares Verfahren der Zellzählung kam das Gerät Z-Series Coulter Counter der Firma Beckmann zur Anwendung. Hierbei wurden Veränderungen des elektrischen Widerstandes beim Durchfluss von Partikeln einer eingegrenzten Größe durch eine Kapillare erfasst und digital ausgewertet. Die Zellen wurden hierzu durch Trypsinierung geerntet, zentrifugiert und in neuem Medium aufgenommen. Von dieser Zellsuspension wurden 100 µl mit 9,9 ml einer isotonen Elektrolytlösung in einer Accuvette vermischt, in das Gerät gestellt und vermessen.

### 4.1.5 Zellviabilitäts-assay

Zur Bestimmung der Zellviabilität diente der sogenannte MTT-assay, der von Mosmann 1983 beschrieben wurde (Mosmann, 1983) und in einer leicht veränderten Variante zum Einsatz kam. Es handelt sich hierbei um eine Messung der metabolischen Aktivität lebender Zellen. Diese wurden hierzu im 96-well Maßstab auf Mikrotiterplatten ausgesät ( $n = 8$ ) und nach einer Zeit von 24 h mit dem jeweiligen Mistelpräparat, oder Zytostatikum behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 72 h wurden 50 µl/well des gelb gefärbten, wasserlöslichen Reagenzes MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid = Thiazolylblau) zugegeben. Durch mitochondriale und zytoplasmatische Dehydrogenasen erfolgte eine reduktive Ringspaltung des Tetrazolrings zu violetten wasserunlöslichen Formazankristallen (Abb. 5). Eine Solubilisierung der Formazankristalle erfolgte 4 h nach Zugabe des MTT-Reagenzes nach Absaugen des Überstandes durch Hinzufügen von jeweils 100 µl MTT-Lysereagenz pro well. Zur Messung der Zellviabilität nicht-adhärenter Zellen wurden die Mikrotiterplatten vor Entfernung des Überstandes für 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert, um die Zellen am Boden der Mikrotiterplatten zu pelletieren. Um die lilafarbenen Formazankristalle effektiv zu lösen, wurden alle Mikrotiterplatten vor der spektrophotometrischen Quantifizierung der Menge an umgesetztem Farbstoff bei einer Wellenlänge von 570/630 nm am ELISA Reader, für 30 Minuten auf einem Plattenschüttler geschüttelt.

## METHODEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER FRAGESTELLUNG



**Abb. 5: Reduktion des gelb gefärbten MTT zum violett gefärbten Formazan.**

### Zusammensetzung MTT-Lösung:

Thiazolylblau 250 mg

PBS ad 50 ml

Die Lösung wurde anschließend sterilfiltriert

### Zusammensetzung MTT-Lysereagenz:

SDS 10 g

DMSO 100 ml

Eisessig 0,6 ml

### 4.1.6 Bestimmung des $IC_{50}$ Wertes

Die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ), bei der die Wirkstoffkonzentration für eine halbmaximale Hemmung gemessen wird, wurde aus MTT-Dosis-Wirkungsdaten mithilfe des Programms Graph Pad Prism 5 durch nichtlineare Regression ermittelt.

### 4.1.7 Kultivierung chemotherapieresistent gezüchteter Neuroblastomzellen

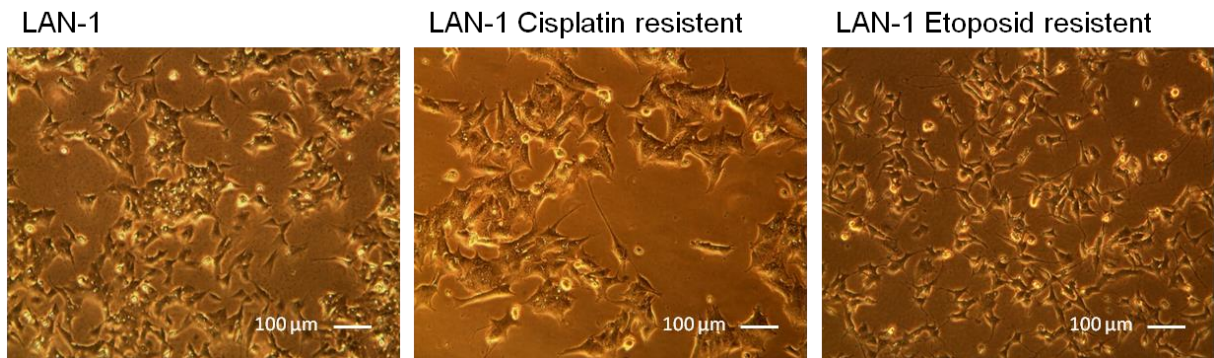
Die in dieser Arbeit verwendeten, resistent gezüchteten Subzelllinien der Zelllinie LAN-1 wurden im hämatologisch-onkologischen Labor der Kinderklinik von Frau Ehleben durch Langzeitkultur mit wiederholten Chemotherapeutika Gaben etabliert. Um den Resistenzerhalt zu gewährleisten, wurden die entsprechenden Zelllinien während der Kultivierung ständig folgenden Dosen des jeweiligen Zytostatikums ausgesetzt. Durch diesen Selektionsdruck wurden auch morphologische Unterschiede festgestellt (Abb. 6).

## METHODEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER FRAGESTELLUNG

Dosis zur Resistenzerhaltung während der Kultivierung:

LAN-1 Cisplatin resistent (Cispl. res. LAN-1): 0,68 µg/ml

LAN-1 Etoposid resistent (Etop. res. LAN-1): 0,5 µg/ml



**Abb. 6: Morphologische Charakterisierung der Zelllinie LAN-1 und ihrer gegen Cisplatin bzw. Etoposid resistent gezüchteten Subzelllinien. Gezeigt sind mikroskopische Bilder unter dem Durchlichtmikroskop.**

### 4.1.8 Charakterisierung der hauptsächlich verwendeten Neuroblastom- und Medulloblastom-Zelllinien

#### **LAN-1:**

Die Zelllinie LAN-1 wurde im Jahr 1977 von Seeger et al. aus dem Knochenmark eines zweijährigen Jungen mit einem Neuroblastom des Stadiums 4 etabliert (Seeger et al., 1977). Die Zellen überexprimieren *MYCN*, tragen eine 1p36 Deletion, eine F1174L *ALK* Mutation, sowie eine *TP53* Mutation.

#### **SH-SY5Y:**

Die Zelllinie SH-SY5Y wurde durch dreifache Subklonierung aus der Zelllinie SK-N-SH gewonnen (Biedler et al., 1973), welche im Jahr 1973 aus einer Knochenmarksmetastase eines vierjährigen Mädchens etabliert wurde. Die Zellen tragen keine *MYCN* Amplifikation, keine 1p36 Deletion und sind nicht *TP53* mutiert, tragen aber eine F1174L *ALK* Mutation.

#### **Kelly:**

Die Zelllinie Kelly wurde aus Hirngewebe eines Patienten mit Neuroblastom etabliert. Die Zellen besitzen eine genomische Amplifikation des *MYCN* Gens (Schwab et al., 1983)

## METHODEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER FRAGESTELLUNG

und tragen eine F1174L *ALK* Mutation. Sie sind 1p36 deletiert und weisen eine *TP53* Mutation auf (Arnhold et al., 2018).

### **Daoy:**

Die Medulloblastomzellen Daoy entstammen der Biopsie des Cerebellums eines vierjährigen Jungen mit einem desmoplastischen Medulloblastom. Sie wurden von Jacobsen et al. als Zelllinie etabliert (Jacobsen et al., 1985). Daoy Zellen sind *TP53* mutiert und weisen aktivierende Mutationen im SHH-Signalweg auf (Ivanov et al., 2016; Künkele et al., 2012).

### **ONS-76:**

Die Zelllinie ONS-76 wurde aus Tumormaterial eines 1987 chirurgisch entnommenen und bereits metastasierten Medulloblastoms eines 2-jährigen Mädchens etabliert. Der Tumor wurde als klassisches Medulloblastom beschrieben (Yamada et al., 1989). ONS-76 Zellen weisen keine *TP53* Mutation, aber aktivierende Mutationen im SHH-Signalweg auf (Ivanov et al., 2016; Künkele et al., 2012).

## **4.2 Methoden zur Bestimmung der Zellproliferation**

### **4.2.1 Echtzeitproliferations-assay (xCELLigence)**

Im Gegensatz zum MTT-assay, welcher eine Endpunkt-Zytotoxizitätsanalyse darstellt, ist das xCELLigence System der Firma ACEA Biosciences in der Lage impedanzbasierte Echtzeitmessungen in einem nicht-invasiven *in vitro* Versuchsaufbau durchzuführen. Hierzu werden die Zellen auf goldbeschichtete, sogenannte E-plates, ausgesät, auf deren Boden sich Mikroelektroden befinden. Veränderungen der Zellen in Bezug auf Adhärenz, Morphologie (Größe, Volumen, Spreitung) oder Zellzahl, welche wiederum zu Änderungen der Impedanz führen, werden alle 15 Minuten durch das xCELLigence Gerät registriert, aufgezeichnet und in Form eines dimensionslosen Parameters (CI-Wert = Cell Index) dargestellt. Der Cell Index wurde bei der Auswertung auf den Zeitpunkt der Substanzzugabe, 24 h nach der Aussaat, normalisiert. Durch diese Biosensor Technik können die Zytotoxizität quantifiziert und Wachstumskurven erstellt werden. Das Experiment wurde gemäß der Herstelleranweisung durchgeführt. Die Zellen wurden in folgenden Zellzahlen ausgesät: 25000 (SH-SY5Y), 15000 (Kelly), 3000 (Daoy), 3000 (ONS-76).

### **4.2.2 Inkorporation von 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU)**

Bei 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) handelt es sich um ein synthetisches Thymidin Analogon, welches kompetitiv während der S-Phase der DNA-Replikation anstelle des natürlichen Nukleotids eingebaut wird (Gratzner et al., 1975). Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurde das Cell Proliferation Kit der Firma Roche gemäß Herstellerangaben verwendet. Hierzu wurden die Zellen (in den Zellzahlen 25000 (SH-SY5Y), 15000 (Kelly), 3000 (Daoy) und 3000 (ONS-76)) zunächst in einem Volumen von 100 µl auf einer 96-well Mikrotiterplatte ausgesät und nach 24 h mit aVF in den Konzentrationen 0,05 und 0,5 mg/ml behandelt. Nach 72 h wurden jeweils 20 µl der BrdU-Lösung zugegeben und die Zellen für weitere 4 h inkubiert. Nach Denaturierung der DNA mithilfe einer Fixierungslösung, erfolgte die Bindung des peroxidasegekoppelten Antikörpers und die Quantifizierung der Proliferationsrate über die Tetramethylbenzidinreaktion, durch Messung der Absorption am Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm.

### **4.3 Methoden zur Bestimmung der Migration und Invasion**

Ein wesentliches Kennzeichen von Tumorzellen ist ihre Fähigkeit zur Ausbreitung (Migration) und nachfolgender Infiltrierung weiterer Gewebe (Invasion), um schließlich Metastasen zu bilden (Hanahan, Weinberg, 2000). Des Weiteren stellt eine Tumormetastasierung die Haupttodesursache bei Krebspatienten dar (Woodhouse et al., 1997).

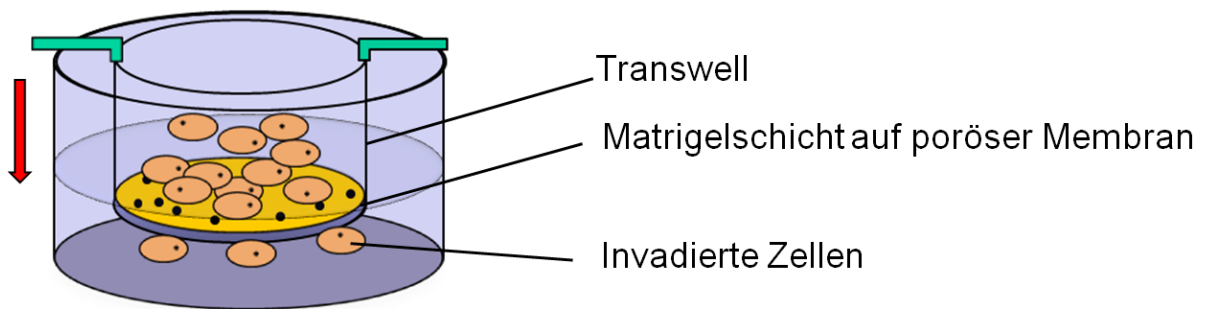
#### **4.3.1 Scratch-assay**

Mithilfe des Scratch-assays kann die Wirkung von Testsubstanzen auf die Migration von Tumorzellen abgeschätzt werden. Beim Scratch-assay, dem sogenannten „*in vitro*-Wundheilungstest“, wird mikroskopisch beobachtet, wie schnell eine künstlich gesetzte Wunde (Scratch), durch Einwanderung von Zellen aus den Randbereichen in die freige kratzten Flächen, verheilt (Liang, Park et al. 2007). Nach Setzen der artifiziellen Wunde mithilfe einer Pipettenspitze in einen konfluent wachsenden Zellrasen, wurde das Medium der 6-well Mikrotiterplatten abgesaugt und vorsichtig mit jeweils 1 ml warmem PBS gespült um den Debris zu entfernen. Anschließend wurden die Platten umgedreht und mittels eines Fineliners zwei Striche senkrecht zur Wunde am Boden der wells

angebracht. Dies sollte das Wiederfinden des Scratch-Bereichs gewährleisten. Die Zellen wurden schließlich mit einem Volumen von 4 ml Medium bzw. Testsubstanz behandelt. Der FCS-Gehalt des Wachstumsmediums wurde während des Versuchs auf 0,1 % reduziert, um Auswirkungen auf die Zellproliferation zu verhindern, aber auch um Apoptose oder Nekrose durch vollständiges Aushungern zu verhindern. Die Wanderung der Tumorzellen wurde anschließend für einen Zeitraum von 0 h, 24 h und 48 h durch die Anfertigung eines Fotos unter dem Mikroskop dokumentiert. Eine Quantifizierung der freien Flächen erfolgte durch das Softwareprogramm ImageJ (Rasband, 1997-2018).

### **4.3.2 Boyden chamber assay**

Der Boyden Chamber Transwell-assay stellt, neben dem Scratch-assay, einen weiteren Versuchsaufbau dar, um Einflüsse auf Metastasierungsprozesse zu untersuchen (Marshall, 2011). Hierbei wird die Wanderung von Tumorzellen, in einem Zwei-Kammer System, durch eine poröse Membran hindurch in Richtung eines chemotaktischen Attraktanten, gemessen (Albini et al., 1987). Verwendet wurde das System BD FluoroBlok Insert der Firma Becton Dickinson Biosciences mit einer Porengröße der Membran von 8 µm. Für eine Analyse der Tumorzellinvasion, bei der es außerdem zur Degradation der Basalmembran kommt, wurden Matrigel® beschichtete Inserts verwendet. Die Mistelextraktverdünnungen wurden in doppelt so hoher Konzentration mit 5 % FCS-haltigem Medium hergestellt und je 250 µl davon in die oberen Kammern gefüllt. Danach wurden die Tumorzellen ebenfalls in einem Volumen von 250 µl in 5 % FCS-haltigem Medium hinzugegeben. In die unteren Kammern wurden jeweils 750 µl eines Mediums mit einem FCS-Anteil von 15 % gefüllt, um die chemotaktische Migration der Tumorzellen über den FCS-Gradienten zu triggern (Abb. 7). Die migrierten Zellen konnten nach Fixierung und Anfärben mit dem Kernfarbstoff DAPI am Boden der Kammer fluoreszenzmikroskopisch durch Auszählen quantifiziert werden. Dabei wurde die Anzahl der gewanderten Zellen als Maß für die Invasivität und die Tendenz zur Metastasierung gewertet.



**Abb. 7: Versuchsaufbau des Boyden Chamber Invasionsassays. Die Zellen befinden sich zunächst in dem oberen Insert und wandern entlang eines FCS-Gradienten sowohl durch eine poröse Membran als auch eine Matrigelschicht, in das untere Reservoir. Der rote Pfeil kennzeichnet die Wanderungsrichtung der Tumorzellen (Abbildung K. Menke).**

### **4.4 Methoden zur Analyse der Apoptoseinduktion**

Ein weiteres Kennzeichen von Tumorzellen ist der Verlust ihrer Fähigkeit zum „programmierten Zelltod“ (Apoptose) (Hanahan, Weinberg, 2000). Daher sollten die Wirkungen des Mistelextraktes in Bezug auf eine Apoptoseinduktion aufgezeigt werden.

#### **4.4.1 Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse**

Während der Teilung einer Zelle werden verschiedene Zellzyklusphasen durchlaufen. Die Progression durch diesen Zyklus ist charakterisiert durch die Interphase und der sich anschließenden mitotischen Teilung (M-Phase). Die Interphase gliedert sich wiederum in die G1, S und G2 Phase. In der G1 Phase, die auch als gap-Phase bezeichnet wird, beginnt die Zelle zu wachsen und bereitet sich durch gesteigerte Proteinbiosynthese auf die Zellteilung vor. In der anschließenden S-Phase erfolgt die Replikation der DNA durch Neusynthese, wodurch es zu einem zweifachen Chromosomensatz kommt. In der G2 Phase, die auch als prämitotische Phase bezeichnet wird, bereitet sich die Zelle durch gesteigerte Synthese zellteilungsspezifischer Proteine auf die mitotische Teilung vor, an dessen Ende wieder der einfache Chromosomensatz vorhanden ist. In apoptotischen Zellen findet man weiterhin die sog. subG1 Phase, die durch fragmentierte DNA charakterisiert ist.

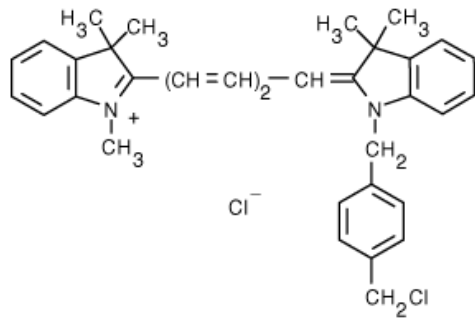
## METHODEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER FRAGESTELLUNG

Mithilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, den DNA-Gehalt von Zellen nach Anfärbung mit Propidiumiodid, einem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, welcher stöchiometrisch an doppelsträngige DNA bindet, zu messen und diese den verschiedenen Zellzyklusphasen zuzuordnen (Krishan, 1975; Vermes et al., 2000). Da die emittierte Fluoreszenz proportional zum DNA-Gehalt der Zelle ist, gibt die Färbung Aufschluss über den DNA-Gehalt und den Zellzyklusstatus einer einzelnen Zelle (Darzynkiewicz et al., 1992). Im DNA-Histogramm erscheinen die apoptotischen Zellen im hypodiploiden Bereich als subG1-Peak unterhalb der G1 Phase, da sie bedingt durch DNA-Abbau während der Apoptose weniger Kernmaterial enthalten als intakte Zellen (Nicoletti et al., 1991).

### **4.4.2 Mitochondriale Aktivitätsbestimmung durch selektive Fluoreszenzfärbung**

Mithilfe des Fluorochroms Mitotracker Deep Red® (Invitrogen) (Absorption/Emmission ~644/665 nm) können Mitochondrien vitaler Zellen selektiv gefärbt werden. Die Aufnahme des Mitotracker-Farbstoffs ist abhängig vom Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) der Mitochondrien (Keij et al., 2000). Kationisch lipophile Stoffe werden, nach zunächst passiver Diffusion durch die Mitochondrienmembranen, in der Matrix der Mitochondrien angereichert. Der Farbstoff lagert sich dabei spezifisch durch eine thiol-reaktive Chloromethyl-Seitenkette in die intakte Mitochondrienmembran ein. Auf diese Weise ermöglicht die Fluoreszenzfärbung eine Differenzierung zwischen vitalen und apoptotischen Zellen. Die Zellen wurden für den Versuch im 96-well Maßstab ausplattiert und nach 24 h mit aVF behandelt. Nach weiteren 24 h bzw. 48 h Inkubationszeit wurden die Proben mit Mitotracker Deep Red® (0,1  $\mu\text{M}$ ) versetzt und für 1 h in den Brutschrank gestellt. Nach dieser Zeit wurden die Zellen unter Mitnahme der Zellüberstände trypsinisiert und eine FACS-Analyse durchgeführt.





**Abb. 8: Chemische Formel von Mitotracker Deep Red®.**

#### 4.4.3 Bestimmung der Caspase-8 und -9 Aktivität durch Caspase-Glo assay

Zur Detektion der Aktivität der Initiatorcaspasen-8 und -9 wurde der entsprechende Caspase-Glo assay (Promega) gemäß Herstelleranweisung durchgeführt. Hierbei wird ein prolumineszentes Substrat der Caspase-8 bzw. -9, welches die Tetrapeptidsequenz DEVD enthält, gespalten, wobei Lumineszenz erzeugt wird. Die Lumineszenz entsteht beim Umsatz des Luciferins durch die enthaltene Luciferase. Die Menge des Lichtsignals ist dabei proportional zur Caspase Aktivität. Um unspezifische Hintergrundsignale zu minimieren, wurde der Proteaseinhibitor MG-132 zugefügt.

#### 4.4.4 Überprüfung auf Caspaseabhängigkeit der ausgelösten Apoptose

Um zu untersuchen, welchen Anteil Caspasen bei der durch die Misteltherapie ausgelösten Apoptose spielen, wurden die Zellen nach der Aussaat auf 6-well Platten nach einer Behandlungszeit von 48 h gleichzeitig mit 10 mM des PAN-Caspase Inhibitors Q-VD-OPh und aVF behandelt. Die Apoptoserate, ausgedrückt als prozentualer Anteil der subG1 Phase, wurde anschließend mittels durchflusszytometrischer Zellzyklusanalyse nach Propidiumiodid Färbung untersucht.

### 4.5 Proteinchemische Methoden

#### 4.5.1 Herstellung von Proteinlysaten

Die Medulloblastomzellen wurden dazu im 6-well Maßstab in folgenden Zellzahlen pro Kavität ausgesät 1.000.000 (D341) 400.000 (Daoy) und 300.000 (ONS-76) und nach 24 h mit aVF in den Konzentrationen 0,05 mg/ml und 0,5 mg/ml behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, die lediglich Wachstumsmedium erhielten. Nach 24 h wurden die adhären Zellen durch Trypsinierung gewonnen, die D341 Suspensionszellen wurden in 15 ml Falconröhrchen überführt und die Zellen bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert. Die Zellpellets wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und schließlich in jeweils 30 µl RIPA-Lysepuffer aufgenommen. Zur späteren Verwendung wurden die Proteinlysate bei -80 °C eingefroren.

#### **RIPA Lysepuffer:**

TRIS 50 mM NaCl 150 mM

100 mM EDTA Lösung pH 7,4

NP-40 1 % (v/v)

10%ige Natriumdesoxycholat-Lösung 1 % (v/v)

10%ige SDS Lösung 0,1 % (v/v)

Ad 50 ml Aqua dest.

Zusätzlich wurde hierin eine Tablette cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail aufgelöst

#### 4.5.2 Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford

Um die Taschen des Gels gleichmäßig mit Proteinen zu beladen, wurde eine Quantifikation der enthaltenen Proteine mithilfe der Methode nach Bradford (Bradford, 1976) am Eppendorf Photometer durchgeführt. Hierbei wird durch die Bindung der Proteine an den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 (Roti®-Quant) das Absorptionsspektrum von 465 nm zu 595 nm verschoben. Hierdurch ist nach Erstellung einer Eichgeraden mit definiertem Proteingehalt eine sensitive Quantifizierung der in den Proben enthaltenen Proteinmengen möglich.

### 4.5.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese diente dem Nachweis spezifischer Proteine. Hierbei wurde das zu untersuchende Proteingemisch durch ein elektrisches Feld in einem Polyacrylamid-Gel aufgrund des Molekulargewichts aufgetrennt. Zur Probenvorbereitung wurden die Proteine mittels SDS (Natriumlaurylsulfat) denaturiert. Die Zugabe diente zum einen dazu die Eigenladung der Proteine zu kaschieren, da SDS sich mit seiner negativen Ladung an die Proteine bindet, zum anderen wurde die native Konformation und Konfiguration der Polypeptidketten (Sekundär- und Tertiärstruktur) zerstört, sodass eine Wanderung im elektrischen Feld allein aufgrund des Molekulargewichts erfolgte. Eine Reduktion von Disulfidbrücken wurde ferner durch die Zugabe von DTT (Dithiothreitol) und Aufkochen bei 95 °C erreicht. Schließlich wurden die Proteingemische in die Taschen eines Gels gefüllt und zusätzlich wurde in die linke äußere Tasche ein Größenmarker aufgetragen, welcher gefärbte Proteine mit definierten Molekulargewichten enthielt. Das Gel wurde für den Lauf in eine mit Laufpuffer gefüllte Kammer gegeben. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung über das sogenannte „power supply“ wanderten die negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode, wobei kleine Proteine schneller wanderten als große.

#### **4x Nu Page Ladepuffer:**

TRIS HCl 0,666 g  
TRIS Base 0,682 g  
LDS 0,800 g  
EDTA 0,006 g  
Glycerol 4,0 g  
Coomassie 1 %ig 0,75 ml  
Phenolrot 1 %ig 0,25 ml  
Ad 10 ml Aqua dest.

#### **Probenansatz:**

4x Nu Page Ladepuffer 6,7 µl  
DTT 0,5 M 2 µl  
Proteinlysate 20 µl  
Das Gesamtvolumen beträgt 28,7 µl

## METHODEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER FRAGESTELLUNG

### **Laufpuffer für Fertiggele:**

MES 195,2 g

TRIS Base 121,2 g

SDS 0,1%ig 20 g

EDTA 6 g

Ad 1000 ml Aqua dest

### **Verwendeter Marker:**

Precision Plus Protein Standards Dual Color (Bio-Rad, Hercules, USA)

### **Verwendetes Fertiggel:**

Novex Nu Page 4–12 % Bis- Tris Gel 1,0 mm x 12 well

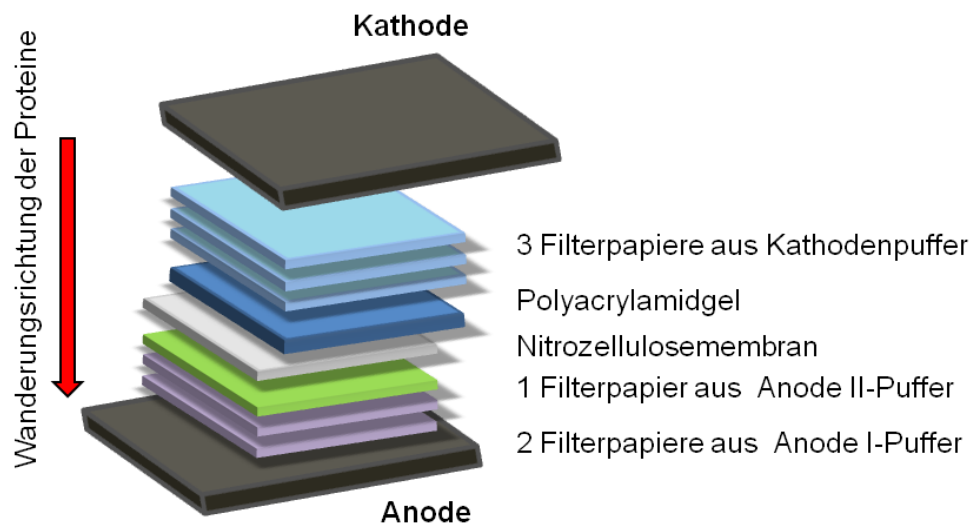
### **Gellauf:**

10 Minuten Vorlauf zum Sammeln der Proben bei 80 Volt konstant

60 Minuten bei 120 Volt konstant

### **4.5.4 Western Blot**

Für die Übertragung der aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel („blotting“) wurde das sogenannte „semi-dry“ Verfahren mit einem diskontinuierlichen Puffersystem nach Kyhse-Andersen angewendet (Kyhse-Andersen, 1984). Die Filterpapiere wurden dazu mit den entsprechenden Puffern getränkt (Abb. 9). Auch das Gel wurde vor dem „blotten“ für 15 Minuten in eine Schale mit Kathodenpuffer gelegt. Der Proteintransfer, der im Gel aufgetrennten Proteine, auf die Nitrozellulosemembran erfolgte bei 180 mA für 90 Minuten.



**Abb. 9: Schematischer Aufbau des Semi-Dry Western Blots zur Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Abbildung K. Menke).**

**Zusammensetzung Puffer Anode I:**

TRIS 0,3 M

Methanol 20 % (v/v)

Ad Aqua dest.

**Zusammensetzung Puffer Anode II:**

TRIS 25 mM

Methanol 20 % (v/v)

Ad Aqua dest.

**Zusammensetzung Kathodenpuffer:**

TRIS 25 mM

Glycin 40 mM

Methanol 10 % (v/v)

SDS 0,005 %

#### 4.5.5 Ponceau Färbung

Um die Effizienz des Proteintransfers zu kontrollieren, wurde die Membran mit dem Farbstoff Ponceau angefärbt, welcher reversibel an die Proteine bindet. Der Farbstoff lässt sich nach dem Anfärben mit Wasser abwaschen.

### **Zusammensetzung Ponceau Färbelösung:**

Ponceau S 0,1 % (w/v)

Essigsäure 5%ig (v/v)

### **4.5.6 Entwicklung des Blots und Detektion**

Da Nitrozellulosemembranen Proteine unspezifisch aufgrund hydrophober Wechselwirkungen binden, müssen diese unspezifischen Bindungsstellen vor der Zugabe von Antikörpern mithilfe einer Milchlösung blockiert werden. Dazu wurde die Membran, mit der Proteinbeladenen Seite nach innen gerichtet, in ein 50-ml-Falconröhrchen gesteckt, 25 ml Blockierungslösung zugefügt und das Röhrchen für 1 h auf einen Rollschüttler gelegt. Die Inkubation mit dem entsprechenden Erstantikörper (Tab. 10) erfolgte bei 4 °C über Nacht auf dem Rollschüttler, wobei der Antikörper durch Verdünnung in Blockierungslösung angesetzt wurde. Danach wurde der Antikörper durch dreimaliges Waschen mit TBS-T entfernt. Anschließend wurde der Zweitantikörper (Tab. 11) zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rollschüttler inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS-T wurden die Aktivität des Antikörpergekoppelten Enzyms HRP durch die Luminol-Luminogen Lichtreaktion mithilfe des Amersham ECL Prime Western Blotting Reagenzes im UVIchemi Chemilumineszenzgerät visualisiert und dokumentiert.

### **Blockierungslösung:**

Milchpulver 1 g

TBS-T 20 ml

### **Waschpuffer TBS-T:**

NaCl 8 g

Tween-20 1 ml

TRIS HCl pH 8 20 ml

Zugabe von 980 ml Aqua dest.

**Verwendete Antikörper:**

**Tab. 10: Verwendete Primärantikörper (Western Blot).**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Katalognummer</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>
Caspase-8	05-477	Upstate Biotechnology (Lace Placid, USA)	Maus	1:1000
Caspase-9	9502	Cell Signaling Technology (Cambridge, UK)	Kaninchen	1:1000
PARP	Sc-8007	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)	Maus	1:1000
GAPDH	MAB374	Merck Millipore (Burlington, USA)	Maus	1:4000
Vinculin	Sc-25336	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)	Maus	1:2000

**Tab. 11: Verwendete Sekundärantikörper (Western Blot).**

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Katalognummer</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>
Anti-Maus HRP	NA9310	GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)	Schaf	1:2000
Anti-Kaninchen HRP	NA9340	GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)	Esel	1:2000

## **4.6 PCR basierte Methoden**

### **4.6.1 Isolierung der Gesamt-RNA**

Die Tumorzellen wurden zunächst im 6-well Maßstab ausplattiert und nach 24 h mit aVF in den Konzentrationen 0,5 mg/ml und 0,05 mg/ml behandelt. Zur Gewinnung der RNA wurde das Kit High Pure RNA Isolation der Firma Roche gemäß Herstellerangaben

## METHODEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER FRAGESTELLUNG

verwendet. Die über Säulen aufgereinigte RNA wurde zum Schluß in einem Volumen von 75 µl des im Kit befindlichen Elutionspuffers gewonnen und bei -80 °C eingefroren.

### 4.6.2 cDNA Synthese

Vor der Umschreibung der isolierten RNA in cDNA wurde ihre Konzentration am Nanodrop-ND 1000 Spektrophotometer der Firma Peqlab bestimmt. Hierfür wurde jeweils 1 µl der Probe eingesetzt. Zur Beurteilung der Reinheit einer Nukleinsäureprobe kann der Quotient der Wellenlängen bei A260/280 herangezogen werden. Dieser sollte für reine RNA bei 2.0 liegen. Werte < 1.8 deuten auf Verunreinigungen mit Proteinen hin.

Für die reverse Transkription wurde das Kit Transkriptor First Strand cDNA Synthesis der Firma Roche nach Herstellerangaben verwendet. Hierzu wurden jeweils 100 ng isolierte RNA eingesetzt und mit Wasser (Ampuwa) auf ein Volumen von 11 µl ergänzt.

Zu diesem Volumen wurden pro Reaktionsansatz 2 µl Vial 6 (Random Hexamer Primer) hinzugefügt.

Die Proben wurden nun in einen Biorad Thermal Cycler gestellt, um die Template-Primer für 10 Minuten bei 65 °C zu denaturieren. Danach wurden pro Ansatz folgende Volumina der angegebenen Reagenzien hinzugefügt:

+ 2 µl Vial 4 (Desoxynukleotid Mix)

+ 4 µl Vial 2 (5x Puffer)

+ 0,5 µl Vial 3 (RNase Inhibitor)

+ 0,5 µl Vial 1 (Reverse Transkriptase)

Nun wurden die Ansätze erneut in den Cycler gestellt und für 10 Minuten bei 25 °C und anschließend für 30 Minuten bei 55 °C inkubiert. Zum Schluß wurden die Proben nochmals für 5 Minuten auf 85 °C erhitzt, um die enthaltene reverse Transkriptase zu inaktivieren. Eine Lagerung, der fertigen cDNA erfolgte bei -20 °C.

### 4.6.3 Semiquantitative PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein *in vitro* Verfahren um spezifische DNA-Sequenzen zu vervielfältigen. Die Reaktion findet in einem Thermocycler statt, der es ermöglicht das Reaktionsgemisch auf definierte, vorher eingestellte Temperaturen zu erhitzen bzw. abzukühlen (Tab. 12). Ihre Spezifität erreicht die PCR durch ausgewählte



## METHODEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER FRAGESTELLUNG

Oligonukleotide sog. Primer, welche an die Enden des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts binden. Generell wird die PCR in drei Schritte unterteilt (Denaturierung, Annealing, Elongation), welche zusammen einen Zyklus bilden. In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR genutzt, um anhand eines sog. housekeeping Gens (*GAPDH* = Glyceraldehyd 3-phosphat Dehydrogenase) die Effizienz der cDNA Synthese zu überprüfen. Bei *GAPDH* handelt es sich um ein nicht reguliertes, konstitutives Gen.

### Pipettierschema bei der PCR:

- 1 µl cDNA (100 ng/µl)
- + 10 µl MyTaq™ HS Red Mix
- + 8 µl H<sub>2</sub>O (Ampuwa)
- + 0,5 µl *GAPDH* Primer sense (5 pmol/µl)
- + 0,5 µl *GAPDH* Primer reverse (5 pmol/µl)

**Tab. 12: Gewählte Programme bei der semiquantitativen PCR.**

Temperatur	Zeit	Prozess
95 °C	5 min	Denaturierung der DNA, sie liegt danach einzelsträngig vor
95 °C	30 sek	Denaturierung
95 °C	30 sek	Bindung (Annealing) hier erfolgt die Bindung der Primer an das 3`-Ende der Gensequenz
72 °C	30 sek	Die hitzestabile Polymerase synthetisiert vom Primer aus den neuen Strang in 5`-3-Richtung

Insgesamt wurden 29 Zyklen durchgeführt.

**Tab. 13: Verwendete Primer bei der semiquantitativen PCR**

Gen	Sequenz	Hersteller
<i>GAPDH</i>	sen.: ccacccatggcaaattccatggca rev.: tctagacggcaggtcaggtccacc	Eurofins (Luxemburg)

### 4.6.4 Agarose Gelelektrophorese

Um die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren am Nanodrop-ND 1000 Spektrophotometer, als auch die erfolgreiche cDNA Synthese aus isolierter RNA zu überprüfen, wurde der amplifizierte Genabschnitt für *GAPDH* durch die Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Es wurden dazu 2 g Agarose in 100 ml TAE Puffer durch Aufkochen gelöst und 3 µl einer Ethidiumbromidstammlösung (10 mg/ml der Firma Roth) hinzugefügt. Das Gel wurde luftblasenfrei in eine horizontale Gelkammer gefüllt. Nach dem Ziehen der Stege wurden 15 µl der jeweiligen Proben geladen. Zusätzlich wurden sowohl eine Wasserprobe als auch 5 µl eines Größenmarker von 100 bp (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) aufgetragen. Der Gellauf erfolgte für 40 Minuten bei einer angelegten Spannung von 120 Volt. Im Anschluss konnte die aufgetrennte DNA durch den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid im UV-Licht detektiert und fotografiert werden.

#### Zusammensetzung 50x TAE-Puffer:

TRIS-Base 242 g gelöst in 700 ml Aqua dest.

EDTA 0,5 M pH 8 100 ml

Eisessig 57,1 ml

Aqua dest. ad 1 l

### 4.6.5 Quantitative Real Time PCR

Die Real Time PCR ermöglicht eine simultane Quantifizierung des gebildeten PCR Amplifikats während der PCR. Dies wird durch den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I, welcher in Nukleinsäuren interkaliert ermöglicht (Dragan et al., 2012). Während der PCR steigt die Fluoreszenz proportional zur Menge des PCR-Produktes an. Auf diese Weise kann in der exponentiellen Phase des PCR-Laufs eine Quantifizierung erfolgen. In dieser Arbeit wurde die Expression des Zielgens zur Expression des Referenzgens *GAPDH* in Relation gesetzt, es wurde dabei davon ausgegangen, dass das Zielgen und das Referenzgen mit der gleichen Effizienz amplifiziert wurden. Die relative mRNA Expression wurde dabei mithilfe der komparativen Ct-Methode ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) bestimmt (Livak, Schmittgen, 2001). Die auf diese Weise normalisierte Expression der Kontrolle, wurde zur Expression der behandelten Proben in Relation gesetzt und durch die sogenannte „fold change“ beschrieben, welche Vielfache der normalisierten Expressionsrate der Kontrolle darstellt. Ist die fold change größer als die normalisierte Expression, bedeutet dies, dass das Gen hochreguliert wurde. Ein Wert unter 1 kennzeichnet dementsprechend eine

## METHODEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER FRAGESTELLUNG

Herunterregulation. Für die Real Time PCR wurde das StepOne Plus Real-Time PCR System der Firma Applied Biosystems verwendet.

### Pipettierschema bei der Real Time PCR:

- 1 µl cDNA
- + 10 µl SYBR-Green I
- + 1 µl Primer sense
- + 1 µl Primer reverse
- + 7 µl RNase freies Wasser

**Tab. 14: Verwendete Primer in der Real Time PCR.**

<b>Gen</b>	<b>Katalognummer/Sequenz</b>	<b>Hersteller</b>
<i>ABCB1</i>	QT00081928	Qiagen (Venlo, Niederlande)
<i>ABCC1</i>	QT00061159	Qiagen (Venlo, Niederlande)
<i>ABCC4</i>	QT02406537	Qiagen (Venlo, Niederlande)
<i>ABCC5</i>	QT00049959	Qiagen (Venlo, Niederlande)
<i>MVP</i>	QT00076244	Qiagen (Venlo, Niederlande)
<i>GSTO1</i>	QT00027972	Qiagen (Venlo, Niederlande)
<i>Caspase-8</i>	QT 00052416	Qiagen (Venlo, Niederlande)
<i>Caspase-9</i>	QT 00036267	Qiagen (Venlo, Niederlande)
<i>GAPDH</i>	sen.: catcaagaagggtggaagc rev.: gagcttgacaaagtgtcgt	Eurofins (Luxemburg)

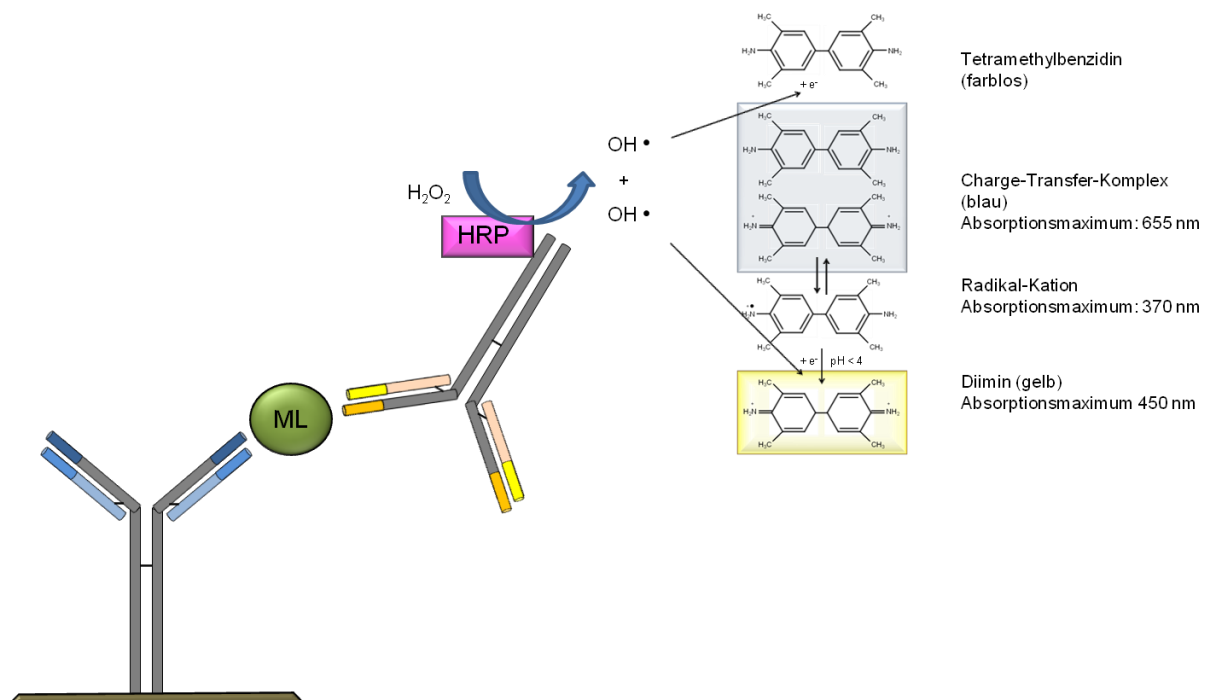
### 4.7 Bestimmung des Gesamtlektinergehalts durch einen Sandwich-ELISA

Bei einem ELISA (= Enzyme-linked immunosorbent assay) handelt es sich um ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, bei dem mithilfe spezifischer Antikörper ein Stoff (Antigen) nachgewiesen und quantifiziert werden kann. In der vorliegenden Arbeit kam ein sog. Sandwich-ELISA zum Einsatz (Abb. 10). Hierbei wird ein sog. Fangantikörper (Anti-ML-A-5F5) an den Boden einer Mikrotiterplatte gebunden. Nach der Inkubation mit der Probe, die den gesuchten Stoff enthält, wird ein zweiter Antikörper, der sog. Detektionsantikörper (Anti-ML-5H8-POD) zugegeben. Dieser ist an ein Enzym gekoppelt, welches nach Zugabe eines für das Enzym passenden Substrats eine Reaktion umsetzt, dessen Reaktionsprodukt schließlich quantifiziert werden kann. Die Meerrettichperoxidase

## METHODEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER FRAGESTELLUNG

(POD, oder HRP = horseradish peroxidase) diene hierbei als Reporterenzym. Diese setzt das farblose TMB (= 3, 3',5, 5'-Tetramethylbenzidin) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid zum tiefblau gefärbten Charge-Transfer-Komplex um, der mit dem Radikalkation im Gleichgewicht steht. Das in einem zweiten Reaktionsschritt entstehende Diimin liegt im sauren Milieu protoniert vor und kann bei einer Wellenlänge von 450 nm am Photometer vermessen werden.

Die beiden für den Sandwich ELISA verwendeten Mistellektin-Antikörper (Tab. 15 und 16) erkennen und binden an unterschiedliche Epitope des Mistellektinproteins.



**Abb. 10: Funktionsprinzip des antikörpervermittelten Farbnachweises der Mistellektine (Abbildung K. Menke).**

### **Zusammensetzung des Puffers zum Lösen des Detektionsantikörpers 5H8-POD:**

50 mg BSA (= Bovine serum albumin, Rinderserumalbumin, proteasefrei)

5 ml PBS-Tween

Sterilfiltration der Lösung

### **Zusammensetzung PBS-Tween:**

0,4 ml Tween-20

Ad 400 ml PBS (steril)

Einstellung auf einen pH-Wert von 7,3

**Zusammensetzung Bicarbonat-Puffer:**

847,92 mg Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

1008,12 mg NaHCO<sub>3</sub>

ad 200 ml Aqua dest.

Einstellung auf einen pH von 9,6

**Referenzstandard ML-I der Firma Abnoba:**

Mistellektin-I Suspension in 3,0–3,3 M Ammoniumsulfatlösung, pH 6–7

**Tab. 15: Verwendete Fangantikörper des ELISA Verfahrens.**

Fangantikörper	Katalognummer	Hersteller	Spezies
Anti-Mistellektin (A-Kette) 5F5	PL110008	Sifin AG (Berlin, Deutschland)	Maus IgG

**Tab. 16: Verwendete Detektionsantikörper des ELISA Verfahrens.**

Detektionsantikörper	Katalognummer	Hersteller	Spezies
Anti-Mistellektin (A-Kette) 5H8 POD markiert	PL110005	Sifin AG (Berlin, Deutschland)	Maus IgG

#### 4.8 Quantitative Analyse von Synergieeffekten

Um kombinatorische Effekte auf die Zellviabilität zwischen einer Misteltherapie und einer Chemo- oder Radiotherapie quantitativ zu bewerten, wurden die Zellen entweder nur mit Mistelextrakt behandelt, oder der konventionellen Therapie ausgesetzt, oder mit beiden Therapien gleichzeitig behandelt. Wobei zum Auffinden synergistischer bzw. antagonistischer Kombinationswirkungen jede in der Einzelbehandlung verwendete Konzentration auch in der Kombination eingesetzt wurde.

Für die quantitative Analyse einer Kombinationstherapie wurden die Softwareprodukte Combenefit und CompuSyn verwendet.

Die Software Combenefit erlaubt die modellbasierte Analyse, Visualisierung und Quantifizierung von Arzneimittelkombinationseffekten im Hinblick auf Synergismus bzw. Antagonismus anhand von Dosis-Wirkungskurven durch den Vergleich der erwarteten Additivität und der experimentell bestimmten Abweichungen davon als Maß für die

## METHODEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER FRAGESTELLUNG

Synergie. Der Differenzwert wird als sogenannter „Synergyscore“ ausgedrückt, der positive Werte annimmt sobald der beobachtete Effekt größer ist die Additivitätsvoraussage des Referenzmodells.

Dabei werden die eingegebenen *in vitro* erhobenen Daten von der Software zunächst als eine Matrix relativ zum Kontrollwert (in %) über die verwendeten Substanzkonzentrationen dargestellt. Außerdem werden die Effekte der Arzneimittel in der Monotherapie separat als Dosis-Wirkungskurve analysiert. Basierend auf diesen Einzel-Dosis-Wirkungskurven wird eine modellgestützte Kombinations-Dosis-Wirkungs-Oberfläche abgeleitet. Dabei stellt die generierte Oberfläche eine auf der Grundlage des gewählten Modells eine "Referenz"-Dosis-Wirkungs-Fläche für additiv, nicht-synergistische Kombination dar. Die Software implementiert hierbei die in der Literatur am häufigsten verwendeten Referenzmodelle zur Quantifizierung von Synergieeffekten, Loewe-Additivität, Bliss-Unabhängigkeit und HSA (Highest Single Agent; Modell der höchsten Einzelwirkungsrate). Die experimentelle Dosis-Wirkungs-Fläche der Kombination wird dann mit der vom Modell generierten verglichen und die errechnete Synergieverteilung der gewählten Kombinationen dargestellt (Di Veroli et al., 2016).

Die Referenzmodelle unterscheiden sich voneinander aufgrund unterschiedlicher Annahmen über die erwartete Nicht-Wechselwirkung. Der Grad der Arzneimittelwechselwirkung als Differenz zwischen erwartetem und experimentell bestimmtem Effekt wird demnach unterschiedlich berechnet.

Nach Yadav et al., kann man annehmen, dass ein Medikament bei einer Dosis  $x_1$  eine Wirkung  $y_1$  hat und das zweite Medikament bei einer Dosis  $x_2$  eine Wirkung  $y_2$  hervorruft, wobei die Wirkungen  $y_1$  und  $y_2$  im verwendeten zellbasierten System als relative fraktionierte Hemmung der Zellviabilität bestimmt werden. Eine Kombination dieser beiden Wirkstoffe würde eine Wirkung  $y_c$  erzeugen. Der erwartete Kombinationseffekt  $y_e$  wird modellspezifisch unterschiedlich berechnet. (Yadav et al., 2015):

$$\text{Loewe: } y_{\text{Loewe}} = y_1 (x_1+x_2) = y_2 (x_1+x_2)$$

Das Loewe-Additivitätsmodell definiert die erwartete Wirkung so, als ob ein Medikament mit sich selbst kombiniert würde.

$$\text{Bliss: } y_{\text{Bliss}} = y_1 + y_2 - y_1y_2$$

Das Modell nach Bliss geht davon aus, dass jedes der Arzneimittel in der Kombination unabhängig voneinander aber konkurrierend wirken.

$$\text{HSA: } y_{\text{HSA}} = \max (y_1, y_2)$$

## METHODEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER FRAGESTELLUNG

Das HSA-Modell besagt, dass die erwartete Kombinationswirkung der höheren Wirkung der einzelnen Medikamente entspricht. Jede zusätzliche Wirkung gegenüber dem Effekt der stärkeren Einzelsubstanz wird als synergistisch betrachtet. Demgegenüber findet man Antagonismus, wenn die Kombinationsantwort  $y_c$  niedriger ist als  $\max(y_1, y_2)$ .

CompuSyn eines der am häufigsten zitierten eigenständigen Softwarepakete zur Berechnung des Interaktionsscores auf der Grundlage des Loewe Modells (Yadav et al., 2015). Sie beruht auf der Chou-Talalay-Methode, welche Arzneimittelwechselwirkungen gemäß der Theorie des Median-Effekt Prinzips des Massenwirkungsgesetzes analysiert (Chou, 2006; Chou, Talalay, 1984).

Es gilt:

$$fa/fu = (D/D_m)^m$$

Hierbei ist  $fa$ , die von der Dosis betroffene Fraktion (fraction affected), d. h. abgetötete Zellfraktion,  $fu$  die unbeeinflusste Fraktion ( $1-fa$ ),  $D$  die Dosis die benötigt wird um  $fa$  zu verursachen,  $D_m$  die mediane Wirkungs-dosis (IC50) und  $m$  der Steigungsparameter der Dosis-Wirkungs-Kurve (Sigmoidizität).

Im Jahr 1983 führten Chou und Talalay den Begriff Kombinationsindex (Combination Index; CI) ein, welcher sich wie folgt berechnen lässt:

$$CI = (D)_1/(D_x)_1 + (D)_2/(D_x)_2 = (D)_1/(D_m)_1[fa/(1 - fa)]^{1/m_1} + (D)_2/(D_m)_2[fa/(1 - fa)]^{1/m_2}$$

Dabei steht  $(D_x)$  für die Dosis, die alleine ein System um  $x\%$  hemmt, während  $(D)_1 + (D)_2$  "in Kombination" ebenfalls  $x\%$  hemmen.

Der CI-Wert gibt eine quantitative Auskunft darüber, ob die gegebene Wirkstoffkombination additive ( $CI = 1$ ), synergistische ( $CI < 1$ ) oder antagonistische ( $CI > 1$ ) Effekte auf die Zellviabilität hat (Chou, 2010) (Tab. 17).

**Tab. 17: Einteilung und Bewertung der CI-Werte gemäß Chou et al. (Chou, 2006).**

< 0,1	Sehr starker Synergismus
0,1–0,3	Starker Synergismus
0,3–0,7	Synergismus
0,7–0,85	Moderater Synergismus
0,85–0,90	Schwacher Synergismus
0,90–1,10	Additives Verhältnis
1,10–1,20	Schwacher Antagonismus
1,20–1,45	Moderater Antagonismus
1,45–3,3	Antagonismus
3,3–10	Starker Antagonismus
> 10	Sehr starker Antagonismus

#### **4.8.1 Applizierte Konzentrationen der Kombinationsexperimente zwischen Mistelextrat und Zytostatikum (Cisplatin bzw. Etoposid)**

Die Zelllinien LAN-1, LAN-1 Cisplatin resistent und LAN-1 Etoposid resistent wurden alle mit den aVF Konzentrationen [in mg/ml] 0; 0,005; 0,05; 0,5 und 5 in Form einer Monotherapie und in Kombination behandelt. Die Konzentrationen der Zytostatika Cisplatin und Etoposid betragen bei LAN-1 Zellen [in µg/ml] 0; 0,078; 0,156; 0,313; 0,625; 1,25; 2,5; 5 und 10. LAN-1 Cisplatin resistente Zellen wurden in den Kombinationsversuchen mit folgenden Cisplatinkonzentrationen [in µg/ml] behandelt: 0; 0,156; 0,313; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 und 40. Die Etoposidkonzentrationen [in µg/ml] für die Behandlung der LAN-1 Etoposid resistenten Tumorzellen betragen: 0; 0,313; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40; und 80.

#### **4.9 Bestrahlung der Tumorzellen**

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte im Institut für Medizinische Strahlenbiologie des Universitätsklinikums Essen mithilfe des Röntgengerätes X-RAD 320 der Firma PXI, welches mit einer Röhrenspannung von 320 kV und einen Kathodenstrom von 12,5 mA betrieben wurde. Um eine homogene Bestrahlung zu gewährleisten, wurden die Proben



auf einem sich drehenden Plattenteller bestrahlt. Der Abstand zwischen der Röntgenröhre und den bestrahlten Platten betrug dabei 7500 mm. Eine regelmäßige Kontrolle der Dosisleistungen erfolgte durch Fricke Dosimetrie.

#### 4.9.1 Kombinationsbehandlung zwischen Mistel und Bestrahlung

Für die Kombinationsexperimente wurden die Tumorzellen unterschiedlichen Konzentrationen des Mistelextraktes und einer Bestrahlung sowohl in Form einer Monotherapie als auch einer Kombinationsbehandlung ausgesetzt (Tab. 18).

**Tab. 18: Verwendete Behandlungsdosen der Kombinationsversuche.**

SH-SY5Y		Kelly		Daoy		ONS-76	
A	B	A	B	A	B	A	B
0,5	0,0225	1,0	0,0225	5,0	0,005	5,0	0,005
1,0	0,05	2,0	0,05	10,0	0,05	10,0	0,05
1,5	0,075	3,0	0,075	20,0	0,1	20,0	0,225
2,0	0,1	5,0	0,1	40,0	0,225	40,0	0,5
2,5	0,225	8,0	0,225	60,0	0,5	60,0	5,0

A = Bestrahlungsdosis [Gy]

B = aVF Konzentration [mg/ml]

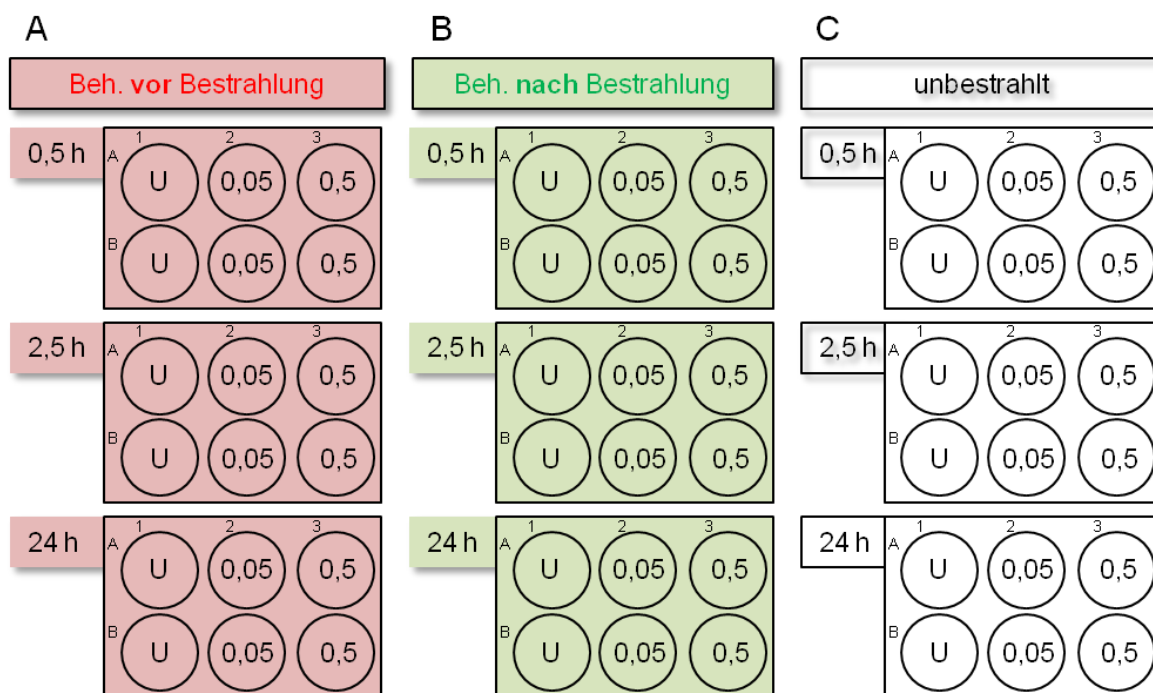
#### 4.9.2 Durchflusszytometrische Detektion von $\gamma$ -H2AX Foci

DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) stellen für Zellen den schwerwiegendsten Schaden nach Exposition mit ionisierenden Strahlen dar. Ein DSB hat immer die Phosphorylierung des Histons H2AX an Serin 139 zur Folge (Rogakou et al., 1998). Die Phosphorylierung wird dabei durch die Kinasen ATM (= ataxia telangiectasia mutated), ATR (= ataxia telangiectasia and Rad3 related) und DNA-PKcs (= DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit) im Bereich von ca. 1–2 Mega-Basenpaaren an flankierenden Stellen des Doppelstrangbruchs, ausgeführt. Das nukleosomale Protein H2AX gehört zur H2A Familie und ist Bestandteil des Histon Oktamers. In seiner phosphorylierten Form wird es auch als  $\gamma$ -H2AX bezeichnet.

Die durch eine Bestrahlung induzierten  $\gamma$ -H2AX Foci lassen sich immunzytochemisch im Durchflusszytometer quantifizieren und stellen einen sensitiven Nachweis für das

## METHODEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER FRAGESTELLUNG

Vorhandensein von DSB dar (Huang, Darzynkiewicz, 2006; Kuo, Yang, 2008). Ziel dieses Versuchs war es herauszuarbeiten, inwieweit die Mistelbehandlung Einflüsse auf die Effektivität der Doppelstrangbruchreparatur nimmt und ob eine Vorbehandlung mit dem Extrakt die Entstehung von DSB beeinflusst. Die Zellen wurden hierzu zunächst im 6-well ausgesät und nach 24 h einer Behandlung gemäß Versuchsaufbau unterzogen (Abb. 11).



**Abb. 11: Layout der Behandlung zur Detektion von  $\gamma$ -H2AX Foci: Die Neuroblastomzellen SH-SY5Y wurden entweder vor (A), oder nach der Bestrahlung mit einer Dosis von 1 Gy (B), mit aVF in den angegebenen Konzentrationen [mg/ml] behandelt (U = unbehandelt), oder als Kontrolle unbestrahlt belassen (C). Eine Probennahme erfolgte zu den Zeitpunkten 0,5 h; 2,5 h und 24 h (Abbildung K. Menke).**

Drei Platten wurden hierbei 30 Minuten vor der Bestrahlung mit aVF behandelt (Abb. 11 A) und drei Platten direkt nach der Bestrahlung (Abb. 10 B). Drei weitere 6-well Platten wurden nicht bestrahlt und dienten der Zeitwertkontrolle während des Kinetikversuchs (Abb. 11 C). Nach 0,5 h erfolgte die Probennahme des ersten Zeitwertes, indem das Medium abgesaugt wurde und die Zellen mit jeweils 1 ml PBS gewaschen wurden. Die Zellen wurden trypsinisiert, bei 300 g für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Zusätzlich wurden noch 3,5 ml kaltes PBS hinzugefügt. Danach wurden die Zellen erneut zentrifugiert und das Pellet in 4 ml eiskaltem 4%igem Paraformaldehyd aufgenommen. Die Zellsuspension wurde anschließend für 15 min auf

## METHODEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER FRAGESTELLUNG

Eis gestellt. Danach wurde die Fixierungslösung durch Abzentrifugation und Waschen mit 4 ml PBS entfernt. Das erhaltene Zellpellet wurde in 0,5 ml PBS resuspendiert, mit 4 ml eiskaltem 70%igem Ethanol versetzt und für mindestens 2 h bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  stehen gelassen. Die Zellen wurden im Anschluss zentrifugiert und zweimalig mit 4 ml BSA-T-PBS gewaschen. Schließlich wurden die Proben mit  $1\text{ }\mu\text{l}$  des Erstantikörpers Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139) clone JBW 301 (Katalognummer: 05-636) der Firma Merck Millipore für 45 min auf Eis stehend auf einem Schüttler inkubiert. Nach dieser Zeit wurde zweimal mit 4 ml BSA-T-PBS gewaschen und anschließend jede Probe mit jeweils  $2\text{ }\mu\text{l}$  des Zweitantikörpers Goat Anti-Mouse IgG, Human ads FITC konjugiert (Katalognummer: 1030-02) der Firma Southern Biotech versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h im Dunkeln auf Eis unter Schütteln wurde der Antikörperüberschuss durch Zugabe von 4 ml BSA-T-PBS zweimalig ausgewaschen. Das Zellpellet wurde mit  $600\text{ }\mu\text{l}$  PBS resuspendiert, jeweils  $12,5\text{ }\mu\text{l}$  RNase A zugefügt und für 30 min bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Vor der Vermessung der Proben im Durchflusszytometer wurden jeweils  $10\text{ }\mu\text{l}$  einer Propidiumiodidlösung ( $1\text{ mg/ml}$ ) zugegeben. Mit den Proben der anderen Zeitwerte wurde ebenfalls wie beschrieben verfahren.

### **Zusammensetzung BSA-T-PBS:**

BSA 1 %

Tween-20 0,2 %

Ad 100 ml PBS

### **4.9.3 Koloniebildungstest**

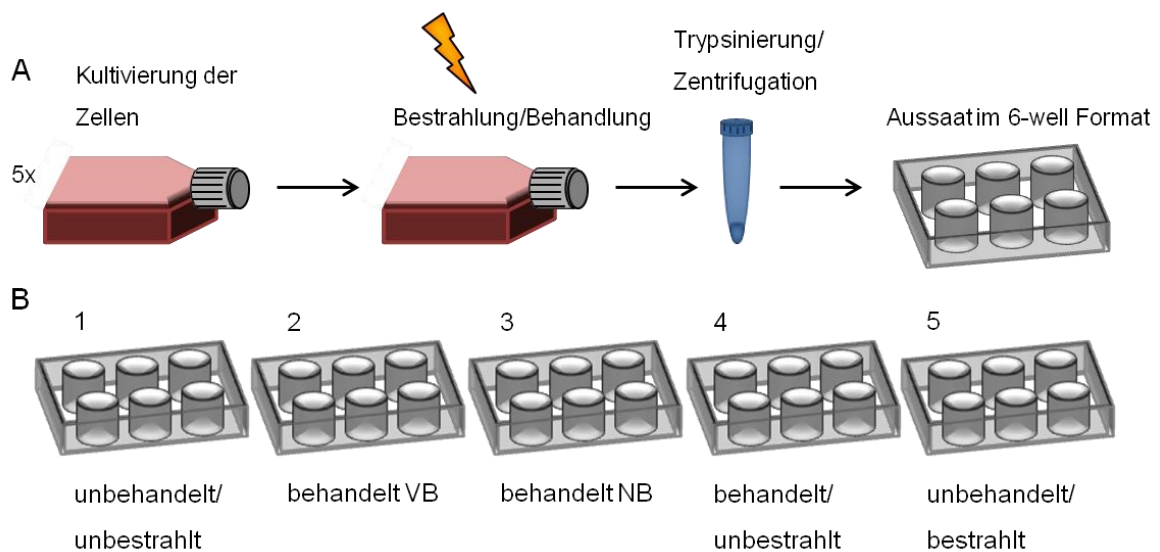
Der sogenannte Koloniebildungstest ist ein bekanntes *in vitro* Verfahren, bei dem die Fähigkeit einer Zellpopulation untersucht wird, nach Exposition mit einer bestimmten Noxe Kolonien auszubilden („surviving fraction“) (Puck, Marcus, 1956). Der Koloniebildungsversuch untersucht somit das sog. klonogene Überleben. Unter einer Kolonie wird dabei eine Ansammlung von mindestens 50 Zellen verstanden. In Abb. 12 A ist der Versuchsaufbau des Experiments veranschaulicht. Für den Versuch wurden die SH-SY5Y Zellen auf fünf T25 Flaschen in einer Zellzahl von 1.000.000 ausgesät und nach 24 h entweder nur mit Mistelextrakt ( $0,05\text{ mg/ml}$  oder  $0,1\text{ mg/ml}$ ) behandelt, nur bestrahlt ( $1\text{ Gy}$ ) oder unmittelbar vor der Bestrahlung ( $1\text{ Gy}$ ) mit aVF behandelt (Behandlungskondition 1–5) (Abb. 12 B).

Die Flasche der Kondition 2 wurde unmittelbar vor der Bestrahlung mit  $1\text{ Gy}$  mit dem Mistelextrakt aVF behandelt und alle Flaschen wurden anschließen in das Institut für

## METHODEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER FRAGESTELLUNG

Medizinische Strahlenbiologie mitgenommen, um sie den gleichen transportbedingten Gegebenheiten auszusetzen. Nach der dort vorgenommenen Strahlenexposition der Flaschen 2, 3 und 5, wurden die Zellen in der Flasche 3 mit aVF behandelt und alle Flaschen für 30 Minuten in den Inkubator gestellt. Danach wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und sie wurden vom Boden der T25 Flaschen abtrypsiniert. Nach einer Zentrifugation bei 300 g für 5 min wurden die Neuroblastomzellen mit einer Zellzahl von 1000 Zellen pro Kavität auf 6-well Platten ausplattiert, die mit den jeweiligen Konditionen (1–5) gekennzeichnet wurden.

Eine Kultivierung im Brutschrank erfolgte anschließend für einen Zeitraum von 10 Tagen. Danach wurden die Zellkolonien mit 70%igem Ethanol für 1 h bei Raumtempertur fixiert, anschließend mit 1 % Kristallviolett in 70%igem Ethanol für 5 min angefärbt, mit Wasser gewaschen, bis nur noch die Kolonien farbig zu sehen waren und im Anschluss getrocknet. Eine Quantifizierung der Kolonien erfolgte durch manuelles Auszählen. In einem weiteren Versuchsaufbau wurde der Mistelextrakt nicht nach 30 Minuten von den Zellen entfernt, sondern bis zur Auszählung der Kolonien auf den Zellen belassen (= Dauertherapie).



**Abb. 12: Behandlungsprinzip des Koloniebildungstests. (A) Die Zellen wurden zunächst in T25 Flaschen kultiviert und mit aVF behandelt bzw. bestrahlt. Nach der Ablösung der Zellen durch Trypsinierung, wurden die Tumorzellen in einer definierten Zellzahl im 6-well Format ausplattiert und die Tumorzellkolonien nach einer Inkubationszeit von 10 Tagen ausgezählt. (B) Layout und Beschreibung der gewählten Konditionen 1–5 (VB = Mistelbehandlung vor der Bestrahlung; NB = Mistelbehandlung nach der Bestrahlung) (Abbildung K. Menke).**

## METHODEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER FRAGESTELLUNG

Für die Datenanalyse wurden die gefärbten Kolonien ausgezählt. Zur Beurteilung der reproduktiven Toxizität der Behandlung wurde zunächst eine sogenannte „plating efficiency“ (PE) nach folgender Formel berechnet:

$$PE (\%) = (\text{Anzahl der gezählten Kolonien} / \text{Anzahl der ausgesäten Zellen}) \times 100$$

Die Toxizität kann dann als Verhältnis der PE der behandelten, zu denen der unbehandelten Kontrolle ausgedrückt werden, um so die Überlebensrate („surviving fraction“) darzustellen.

### **4.10 Tierexperimentelle Methoden**

#### **4.10.1 Tiermodell**

Die für diese Arbeit verwendeten Mäuse wurden im Zentralen Tierlaboratorium des Uniklinikums Essen gezüchtet und entstammen dem Inzuchthintergrund A/J. Die Tumorzelllinie C1300 wurde aus einem Maustumor, welcher im Jahr 1940 aus dem Bauchraum einer A/J-Maus entnommen wurde, etabliert. Diese Zellen wurden als Neuroblastom beschrieben (Schubert et al., 1969). Es handelt sich somit hierbei um ein syngenes immunkompetentes Mausmodell des Neuroblastoms.

#### **4.10.2 Haltung der Versuchstiere**

Die Tiere wurden unter SPF (spezifisch pathogenfrei) Bedingungen in IVC-Käfigen in Gruppen von bis zu 5 Mäusen unter Einfluss eines 12-stündigen Hell-Dunkel Rhythmus und einer Temperatur von  $20 \pm 2$  °C gehalten. Die Futterpellets (Ssniff Spezialdiäten GmbH) und Wasser wurden ad libitum zur Verfügung gestellt.

#### **4.10.3 Markierung der Mäuse**

Die Versuchstiere wurden zu Versuchsbeginn in verschiedene Gruppen aufgeteilt und mithilfe einer sterilen Ohrlochzange markiert.

### 4.10.4 Abbruchkriterien

Per Definition sind Abbruchkriterien ein Anzeichen für eine starke Belastung des Versuchstieres, bei deren Auftreten das Tier schmerzlos aus dem Versuch genommen werden muss. Somit legen sie den Endpunkt eines Tierversuchs fest und vermeiden unnötige Schmerzen und Leiden des Tieres. Die Abbruchkriterien wurden vor Versuchsbeginn gemäß der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV Solas) festgelegt. Zur Beurteilung wurde der Allgemeinzustand der Mäuse, insbesondere der Zustand des Fells, das Gewicht, die Atmung, die Herzfrequenz und die Körpertemperatur in einem 24-stündigen Intervall begutachtet und dokumentiert. Zur Messung der Körpertemperatur diente ein Baby-Stirnthermometer der Firma Kaz Europe. Die Messung erfolgte nicht-invasiv am Bauch der Tiere.

Als Abbruchkriterien galten insbesondere:

- Eine starke Verschlechterung des Allgemeinzustandes gemäß eines body condition scores (BCS) nach Morton und Griffiths (Morton, Griffiths, 1985)
- Eine Abnahme des Körpergewichts um 15 %
- Ein Tumordurchmesser größer als 1,5 cm
- Ein ulzerierender Tumor
- Einschränkungen der lokomotorischen Aktivität

### 4.10.5 Monitoring der Versuchstiere

Die Bestimmung und Kontrolle des Tumorwachstums erfolgten mit einer elektronischen Schieblehre. Zur Berechnung des Tumolvolumens/Tumormasse wurde folgende Formel für ellipsoide Tumoren zugrunde gelegt (Tomayko, Reynolds, 1989):

Tumolvolumen =  $\pi/6$  x Länge x Höhe x Breite

Zur Kontrolle der Blutparameter erfolgte einmalig eine Blutentnahme durch Punktion des retrobulbären Venenplexus. Die Tiere wurden hierzu mit Isofluran narkotisiert. Das Blut wurde mit einer Kapillare entnommen und in eine Kalium/EDTA Microvette gegeben. Mithilfe des Hämatologiegeräts scil Vet abc wurde anschließend ein Differenzialblutbild erstellt.

#### 4.10.6 Versuchsende, Tumorresektion und Dokumentation des Organstatus

Beim Eintreten eines Abbruchkriteriums wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Der Tumor wurde bei jeder Versuchsmaus herauspräpariert und auf einer Feinwaage ausgewogen. Die Organe wurden begutachtet, fotografiert und durch Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und/oder in Formalinlösung konserviert.

#### 4.10.7 Toxizitätstest

Zu Beginn wurde das Ansprechen der C1300 Zellen auf die Misteltherapie *in vitro* untersucht und durch MTT-assays eine Dosis-Wirkungskurve erstellt. Für die Ermittlung der maximal tolerierbaren Dosis (MTD) wurden einem Versuchstier steigende Konzentrationen an aVF, in einem Volumen von 200 µl, *i. p.* appliziert (Tab. 19). Eine Dosissteigerung sollte nur erfolgen, wenn eine Dosis zuvor gut vertragen wurde. Während des Versuchs wurde das Tier engmaschig überwacht.

**Tab. 19: Injektionsschema zur Ermittlung der MTD.**

Versuchstag	aVF Dosis [mg/ml]
1.+ 4	0,1
8 + 11	0,5
15 + 18	1.0
22 + 25	5
29 + 32	10
36 + 39	50

In einem anschließenden Toxizitätstest wurden weiteren Versuchstieren gleichbleibend hohe Dosen von aVF, ebenfalls *i.p* in einem Volumen von 200 µl appliziert. Die Mäuse wogen durchschnittlich 20 g. Um die heterogene Körpergewichtsverteilung innerhalb einer Gruppe zu berücksichtigen, wurde das Mistelpräparat gewichtsadaptiert dosiert. Folgende Dosen sollten bezogen auf 20 g KG verabreicht werden. Die tatsächlich verabreichten Misteldosen sind der Tabelle 20 zu entnehmen.

**Tab. 20: Übersicht der Behandlung des zweiten Toxizitätstests**

Zieldosis pro 20 g KG [mg/ml]	Maus Nr.	Geschlecht	Gewicht [g]	verabreichte Dosis in einem Volumen von 200 µl [mg/ml]
10	1	m	21	10,5
10	2	w	22	11
10	3	m	22	11
20	4	m	25	25
20	5	w	17	17
20	6	m	22	22
40	7	m	27	54
40	8	w	22	44
40	9	m	21	42

Der Versuch wurde nach 42 Tagen beendet. Alle Mäuse wurden zu diesem Zeitpunkt durch zervikale Dislokation getötet und die Organe auf Auffälligkeiten hin untersucht und durch Fotos dokumentiert.

#### **4.10.8 Inokulation der Tumorzellen**

Einen Tag vor der Inokulation wurde die Flanke der Versuchstiere mit einem elektrischen Rasierapparat der Firma Braun vorrasiert, um die Injektion der Tumorzellen zu erleichtern und um das Tumorwachstum besser beobachten zu können.

Die murinen Neuroblastomzellen C1300 wurden in T175 Flaschen kultiviert und am Versuchstag durch Trypsinierung gewonnen. Das Zellpellet wurde nach der Zentrifugation bei 300 g für 5 min, mit PBS gewaschen erneut abzentrifugiert. Die Zellen wurden danach in PBS aufgenommen und die entsprechende Zellzahl in sterile Eppendorfgefäße gegeben, in die zuvor jeweils 200 µl bzw. 100 µl Matrigel vorgelegt wurden. Die Eppendorfgefäße wurden hierzu auf Eis gelagert und vorgekühlt. Das Gemisch wurde anschließend gevortext und unter sterilen Bedingungen *subcutan* in eine Flanke inokuliert. Die Applikation erfolgte nach einer Wägekontrolle der Mäuse mit einer 1-ml-Tuberkulinspritze mit Spardorn und einer 0,45 x 16 mm Kanüle.

Zur Beendigung des Experiments, siehe Abbruchkriterien Kapitel 4.10.4 und Versuchsende Kapitel 4.10.6.



#### 4.10.9 Tumorangangsrate

Für die Ermittlung der Tumorangangsrate der s.c. applizierten C1300 Zellen, wurden sechs Mäusen in beide Flanken verschiedene Zellzahlen in Matrigel injiziert. Zur Verlaufskontrolle wurden die Tiere jeden Tag gewogen und die Tumorgöße mithilfe einer Schieblehre bestimmt.

#### 4.10.10 Einflüsse von aVF auf das Tumorgewicht und das Tumolvolumen

Um Effekte des Mistelextraktes auf das Tumorgewicht und das Tumolvolumen zu untersuchen, wurden 10 Versuchstiere in zwei Gruppen aufgeteilt (Tab. 21). Zu Versuchsbeginn wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Tumorzellen, eingebettet in 200  $\mu$ l Matrigel, der Zelllinie C1300 in die rechte Flanke der Versuchstiere inokuliert.

Eine erste Mistelinjektion der Verumgruppe in einer Dosis von 50 mg/ml erfolgte, 24 h nach Inokulation der Neuroblastomzellen, *i. p.* in einem Volumen von 200  $\mu$ l. Dabei wurden eine 1-ml-Tuberkulinspritze mit Spardorn und eine Kanüle mit dem Durchmesser 0,4 mm verwendet. Die Placebogruppe erhielt 200  $\mu$ l PBS *i. p.* Die Injektionen wurden zweimal wöchentlich gegeben.

Der Versuch stellte eine Endpunktkontrolle dar und wurde abgebrochen, als die erste Maus aus einer der beiden Gruppen ein Abbruchkriterium erfüllte (siehe Abbruchkriterien Kapitel 4.10.4). Alle Tiere wurden zu diesem Zeitpunkt getötet und das Tumorgewicht- und volumen der beiden Gruppen miteinander verglichen.

**Tab. 21: Randomisierung der Versuchstiere**

Verumgruppe				Kontrollgruppe (Placebo)			
Maus Nr.	Geschlecht	Alter [Wochen]	Gewicht	Maus Nr.	Geschlecht	Alter [Wochen]	Gewicht
1	w	16,4	20,4	2	w	16,4	20,0
3	m	16,4	28,7	5	m	16,4	27,0
4	m	16,4	22,4	6	m	16,4	23,0
7	m	14,6	22,5	9	m	11,9	20,3
8	m	11,9	21,5	10	m	11,9	21,5

### **4.10.11 Einflüsse von *Viscum album* Extrakt auf das Gesamtüberleben**

Um Einflüsse des Mistelextraktes auf das Gesamtüberleben zu untersuchen, wurden den Versuchstieren jeweils  $1 \times 10^5$  C1300 Zellen in 100  $\mu$ l Matrigel s.c. inokuliert.

Im ersten Versuch wurden die Tiere wie folgt in drei Versuchsgruppen aufgeteilt:

Kontrollgruppe: n = 6

5 mg/ml Gruppe: n = 7

50 mg/ml Gruppe: n = 7

Im zweiten Versuch wurden die Mäuse ebenfalls in drei Gruppen aufgeteilt:

Kontrollgruppe: n = 3

10 mg/ml Gruppe: n = 3

20 mg/ml Gruppe: n = 4

Eine Behandlung erfolgte 24 h nach der Tumorzellinokulation mit einem Volumen von 200  $\mu$ l der entsprechenden aVF Verdünnung bzw. PBS als Kontrolle. Bei Erreichen eines Abbruchkriteriums wurden die entsprechenden Tiere aus dem Versuch genommen (siehe Abbruchkriterien Kapitel 4.10.4).

### **4.11 Statistik**

Die statistische Auswertung und die Signifikanzberechnungen wurden mit der Software GraphPad Prism 5, (San Diego, USA) durchgeführt. Für die Analyse auf statistische Unterschiede wurde der Students t-Test herangezogen und das Signifikanzniveau wie folgt kenntlich gemacht:  $p \leq 0,05$  signifikant (\*),  $p \leq 0,01$  sehr signifikant (\*\*),  $p \leq 0,001$  hochsignifikant (\*\*\*). Die Standardabweichungen wurden in den Graphen aller Abbildungen als Fehlerbalken gekennzeichnet.

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 Zytotoxische und antiproliferative Effekte

#### 5.1.1 Bestimmung des Gesamtlektingehalts der verwendeten Mistelpräparate durch Sandwich-ELISA

Die Unterarten der Mistel *Viscum album* L. zeichnen sich durch unterschiedliche Wirkungsspektren aus. Laubholzmisteln (*Viscum album* ssp. *album*), aus denen die Extrakte aVF und Iscucin Tiliae gewonnen werden, weisen generell erheblich höhere Konzentrationen an Mistellektinen auf als Kiefernmisteln (*Viscum album* ssp. *austriacum*), die der Herstellung von Iscucin Pini dienen. Die Gesamtlektinkonzentration (ML-I, -II und -III) wurde, wie in Kapitel 4.7 beschrieben, durch einen ELISA bestimmt. Das Mistelpräparat aVF wies hierbei mit einem mittleren Gehalt von 13,46 µg/ml aller getesteten Chargen den höchsten Lektiningehalt auf. Insgesamt wurden drei verschiedene Chargen von aVF 20 mg getestet (Tab. 22). Für die Charge 609 A04 konnte ein Gesamtlektiningehalt von 12,52 µg/ml ± 1,80 und für die Charge 404 A24 ein Gehalt von 12,46 µg/ml ± 1,57 ermittelt werden. Die Charge 211 A06 wies mit 15,4 ± 2,12 µg/ml den höchsten Gesamtlektiningehalt auf. Für Iscucin Tiliae konnte ein Gesamtlektiningehalt von 8,10 µg/ml ± 1,84 gemessen werden und für Iscucin Pini wurde ein Gehalt von 1,92 µg/ml ± 0,05 ermittelt.

**Tab. 22: Gesamtlektiningehalte ermittelt durch Sandwich-ELISA.**

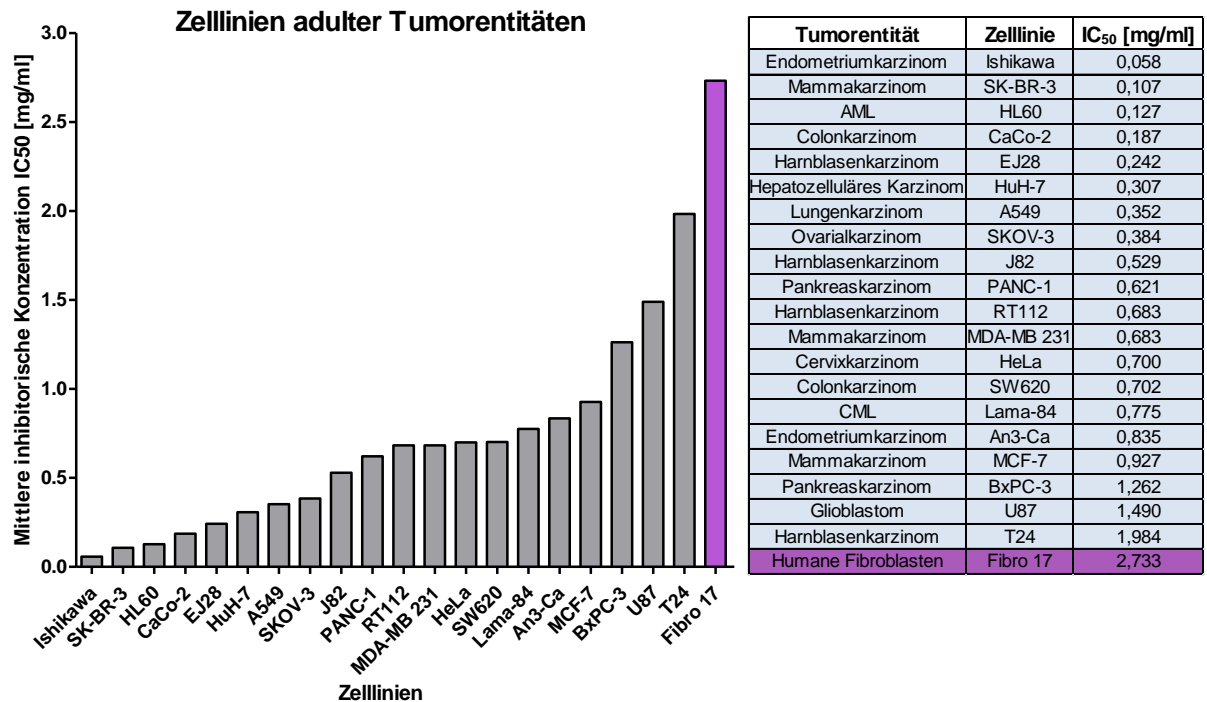
Bezeichnung	Charge	Gehalt [µg/ml] ± STD
aVF 20 mg	609 A04	12,52 ± 1,80
aVF 20 mg	404 A24	12,46 ± 1,57
aVF 20 mg	211 A06	15,40 ± 2,12
Iscucin Tiliae	A029911B	8,10 ± 1,84
Iscucin Pini	A027750	1,92 ± 0,05

### 5.1.2 Zytotoxizität von aVF auf Zelllinien verschiedener Tumorentitäten

Die Wirkungen von aVF auf die Zellviabilität wurden im MTT-assay ( $n = 8$ ) untersucht, indem die Zellen mit seriellen Verdünnungen des Pflanzenextraktes behandelt wurden. Aus den resultierenden Dosis-Wirkungskurven wurde die halbmaximale inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) berechnet. Es wurde ein Panel aus Tumorzelllinien verschiedener Tumorentitäten zusammengestellt, dabei wurden von jeder Tumorentität nach Möglichkeit zwei Zelllinien getestet. Außerdem wurde unterschieden, ob es sich um adulte, oder pädiatrische Krebsarten handelt, um herauszuarbeiten, ob die Empfindlichkeit gegenüber dem Extrakt differiert. Auf diese Weise sollte eine mögliche Spezifität gegenüber einer bestimmten Tumorentität untersucht werden. Jedoch konnte sowohl im pädiatrischen, als auch im adulten Zelllinien-Panel keine Tumorentität mit einer spezifischen Empfindlichkeit gegenüber der Mistelbehandlung ausgemacht werden. Die Wirksamkeit von aVF scheint daher eher zelllinienspezifisch als tumorentitätsspezifisch zu sein.

Alle adulten Zelllinien waren empfindlicher als die mitgetesteten humanen Fibroblasten Fibro 17 (Abb. 13), welche einen  $IC_{50}$  Wert von 2,733 mg/ml aufwiesen. Insgesamt wurde eine durchschnittliche aVF Konzentration von 0,648 mg/ml benötigt um die Zellviabilität der adulten Zelllinien um 50 % zu reduzieren. Als sensitivste Zelllinie erwies sich die Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa ( $IC_{50} = 0,058$  mg/ml). Die Zelllinie T24 (Harnblasenkarzinom), war hingegen mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 1,984 mg/ml am unempfindlichsten gegenüber der Behandlung.

## ERGEBNISSE



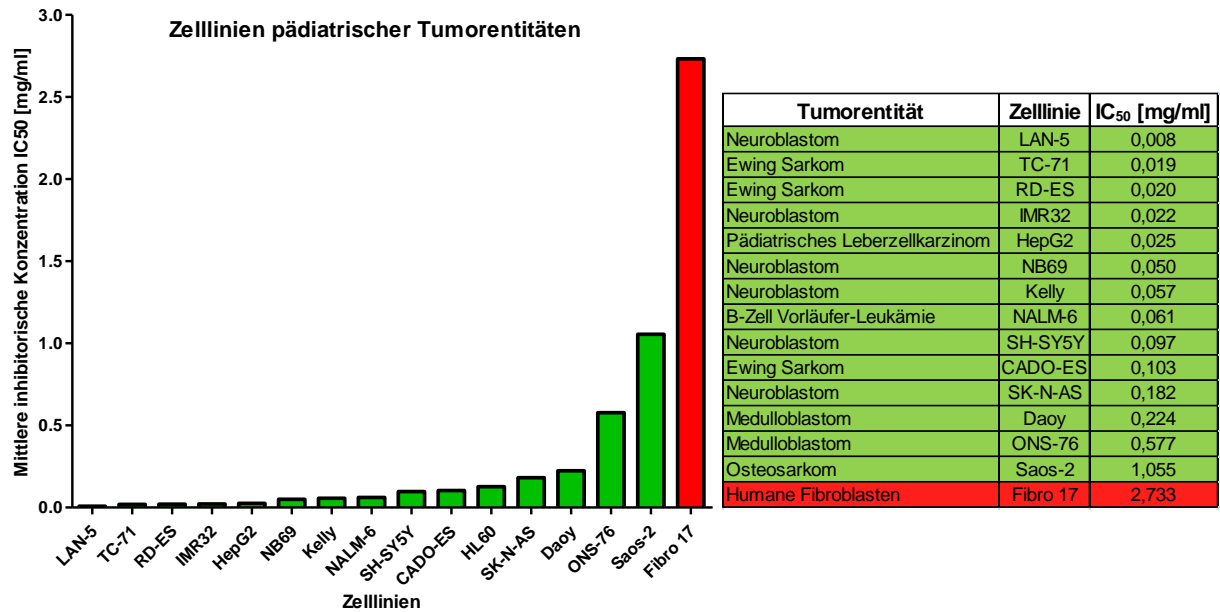
**Abb. 13: Mit aVF behandeltes adultes Zelllinien-Panel.**

Die Untersuchung der Empfänglichkeit pädiatrischer Zelllinien in einem breiten Zelllinien-Panel (Abb. 14), konnte die Osteosarkomzelllinie Saos-2 ( $IC_{50} = 1,055$  mg/ml) als unempfindlichste pädiatrische Zelllinie identifizieren. Auch die Medulloblastomzelllinie ONS-76 war vergleichsweise unempfindlich ( $IC_{50} = 0,768$  mg/ml). Die Neuroblastomzellen LAN-5 reagierten am empfindlichsten ( $IC_{50} = 0,008$  mg/ml), allerdings kann hieraus keine generelle Aussage über die Responsivität von Neuroblastomen gegenüber aVF abgeleitet werden, da andere Neuroblastom Zelllinien wesentlich unempfindlicher als die LAN-5 Zellen reagierten. So waren z. B. SK-N-AS 23-mal unempfindlicher als die LAN-5 Zellen. Im Vergleich zu anderen pädiatrischen Tumorentitäten waren die Ewing Sarkom Zellen mit einem mittleren  $IC_{50}$ -Wert von 0,047 mg/ml am empfindlichsten gegenüber der Behandlung.

Die Zelllinien des pädiatrischen Zelllinien-Panels zeigten insgesamt eine höhere Empfindlichkeit gegenüber der Mistelexposition als die adulten Zelllinien. Hier lag der mittlere  $IC_{50}$ -Wert aller Tumorzelllinien bei 0,179 mg/ml. Somit waren die pädiatrischen Zelllinien durchschnittlich 3,6-mal empfindlicher gegenüber der Misteltherapie als adulte Tumorzellen. Die pädiatrischen Tumorzelllinien reagierten ebenfalls alle sensitiver auf die Behandlung mit aVF, als normale humane Fibroblasten.

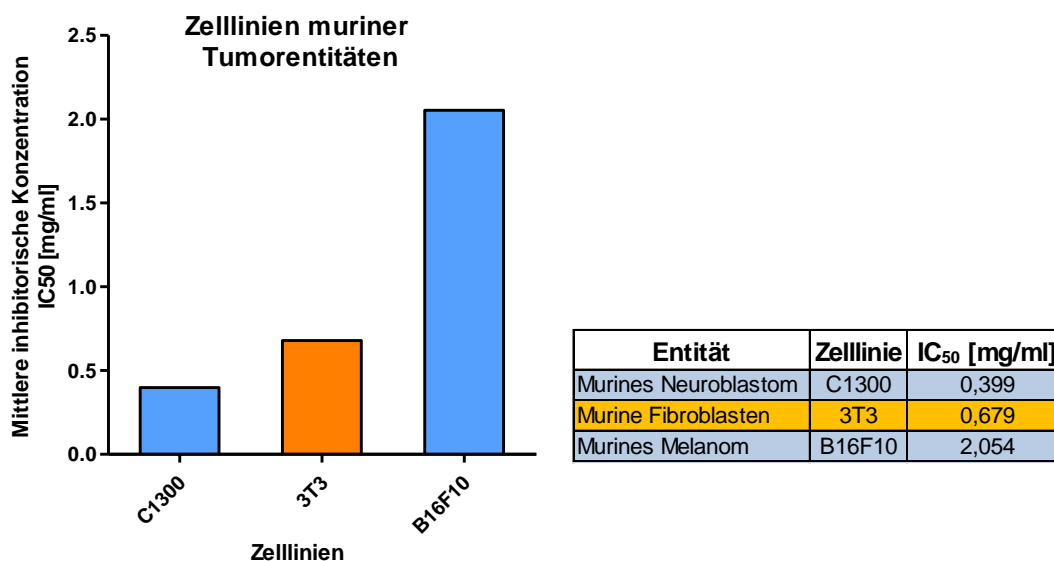
Als Resultat kann aus diesen Ergebnissen eine tumorspezifische Zytotoxizität des Mistelextraktes gefolgert werden.

## ERGEBNISSE



**Abb. 14: Mit aVF behandeltes pädiatrisches Zelllinien-Panel.**

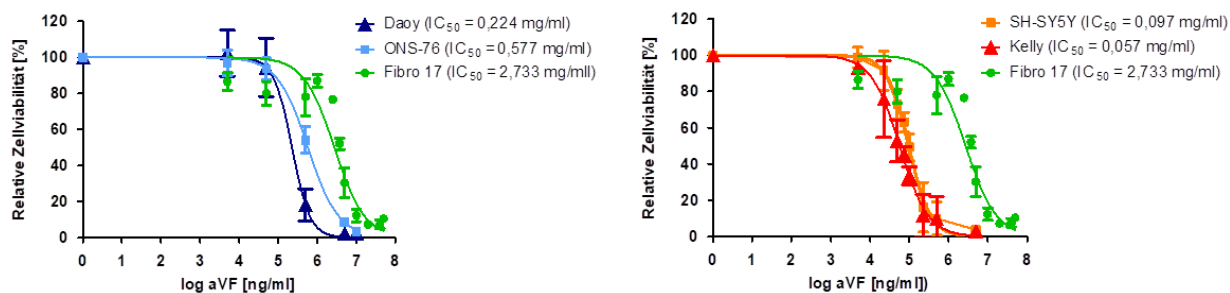
Die Untersuchung der Empfänglichkeit von murinen Zellen auf eine Behandlung mit aVF ergab, dass die murine Neuroblastomzelllinie C1300 im Vergleich zu den humanen Neuroblastomen resistenter gegenüber der Mistelbehandlung war (Abb. 15). Mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0,399 mg/ml war sie 2,2-mal unempfindlicher als die gegenüber aVF unempfindlichste Neuroblastomzelllinie SK-N-AS. Die C1300 Zellen waren allerdings sensitiver, als murine Fibroblasten 3T3 (IC<sub>50</sub> = 0,679 mg/ml). Die insgesamt resistenterste Tumorzelllinie, des murinen Zelllinien-Panels, war die Melanomzelllinie B16F10 (IC<sub>50</sub> = 2,054), sie war damit 3-mal unempfindlicher als die murinen Fibroblasten 3T3.



**Abb. 15: Mit aVF behandeltes murines Zelllinien-Panel.**

## ERGEBNISSE

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Untersuchung von antitumoralen Effekten einer Mistelbehandlung auf die pädiatrischen Tumorentitäten Neuroblastom und Medulloblastom. Für weitere Untersuchungen wurden daher die Zelllinien SH-SY5Y und Kelly (Neuroblastom) und die Zelllinien Daoy und ONS-76 (Medulloblastom) ausgewählt (Abb. 16).



**Abb. 16: Dosis-Wirkungskurven der ausgewählten Neuroblastom- und Medulloblastomzelllinien im direkten Vergleich zu humanen Fibroblasten.**

### 5.1.3 Vergleichende Untersuchung der Zytotoxizität verschiedener Mistelextrakte

Um die zytotoxischen Wirkungen des verwendeten Mistelextraktes aVF mit anderen Mistelpräparaten vergleichen und abschätzen zu können und um zu überprüfen, ob die Zytotoxizität mit dem Lektiningehalt korreliert, wurden zwei weitere Extrakte, Iscucin Tiliae und Iscucin Pini (Wala Heilmittel GmbH) mit unterschiedlichen Mistellektiningehalten ausgewählt. In den Tabellen 23 und 24 sind die mittleren inhibitorischen Wirkstoffkonzentrationen (IC<sub>50</sub>) der Mistelpräparate, verschiedener Tumorzellen vergleichend gegenübergestellt. Die IC<sub>50</sub>-Werte des mit den Iscucinen behandelten Zelllinien-Panels wurden dabei ebenso wie für aVF behandelte Zellen aus MTT-Daten errechnet.

Es handelt sich bei den Iscucinen um wässrige Pflanzenauszüge und bei aVF um einen Presssaft.

ERGEBNISSE

**Tab. 23: IC<sub>50</sub>-Werte verschiedener Mistelpräparate auf Tumorzelllinien pädiatrischer Tumorentitäten.**

Tumorentität	Zelllinie	IC <sub>50</sub> [mg/ml]		
		aVF	Iscucin Tiliae	Iscucin Pini
Ewing Sarkom	CADO-ES	0,103	0,437	7,210
Ewing Sarkom	RD-ES	0,020	0,030	0,156
Ewing Sarkom	TC-71	0,019	0,041	0,605
Medulloblastom	Daoy	0,224	0,218	2,883
Medulloblastom	ONS-76	0,577	1,125	39,080
Neuroblastom	Kelly	0,057	0,080	0,314
Neuroblastom	NB69	0,050	0,105	0,630
Neuroblastom	SK-N-AS	0,182	0,140	1,593
Neuroblastom	SH-SY5Y	0,097	0,148	0,528
Osteosarkom	Saos-2	1,055	0,812	28,600
Mittelwert IC <sub>50</sub> [mg/ml]		0,238	0,314	8,160

**Tab. 24: IC<sub>50</sub>-Werte verschiedener Mistelpräparate auf Tumorzelllinien adulter Tumorentitäten.**

Tumorentität	Zelllinie	IC <sub>50</sub> [mg/ml]		
		aVF	Iscucin Tiliae	Iscucin Pini
Cervixkarzinom	HeLa	0,700	0,760	41,520
Colonkarzinom	CaCo2	0,187	0,169	1,888
Colonkarzinom	SW620	0,702	0,775	39,080
Endometriumkarzinom	AN3 CA	0,835	0,238	3,528
Endometriumkarzinom	Ishikawa	0,058	0,168	1,416
Harnblasenkarzinom	EJ28	0,242	0,464	6,259
Harnblasenkarzinom	J82	0,529	0,723	6,829
Harnblasenkarzinom	RT112	0,683	1,018	69,840
Harnblasenkarzinom	T24	1,984	10,187	11,556
Hepatozelluläres Karzinom	HuH-7	0,307	0,168	1,416
Lungenkarzinom	A549	0,352	0,248	4,533
Mammakarzinom	MCF-7	0,927	1,522	31,120
Mammakarzinom	MDA-MB 231	0,683	0,570	23,440



## ERGEBNISSE

Mammakarzinom	SK-BR-3	0,107	0,058	0,649
Ovarialkarzinom	SKOV-3	0,384	0,429	3,428
Pankreaskarzinom	PANC-1	0,621	0,843	10,624
Mittelwert IC <sub>50</sub> [mg/ml]		0,581	1,146	16,070

Mit Ausnahme der Zelllinien SK-N-AS, Daoy und Saos-2 waren die IC<sub>50</sub> Werte im pädiatrischen Zelllinien-Panel für den Mistelextrakt aVF niedriger als für die beiden Iscucin Präparate (Tab. 23). Jedoch wies Iscucin Tiliae in dem getesteten pädiatrischen Zelllinien-Panel einen durchschnittlichen IC<sub>50</sub>-Wert von 0,314 mg/ml auf und war damit ähnlich gut wirksam wie aVF (IC<sub>50</sub> = 0,238). Um die Zellviabilität um 50 % zu reduzieren, mussten von Iscucin Pini hingegen durchschnittlich 8,16 mg/ml verabreicht werden. Es konnte keine Zelllinie identifiziert werden bei der eine Behandlung mit Iscucin Pini gegenüber aVF oder Iscucin Tiliae überlegen war. Die Medulloblastomzelllinie ONS-76 zeigte sich gegenüber Iscucin Pini am resistentesten (IC<sub>50</sub> = 39,08 mg/ml), gefolgt von der Osteosarkomzelllinie Saos-2 (IC<sub>50</sub> = 28,6 mg/ml).

Die durchschnittlichen IC<sub>50</sub>-Werte des adulten Zelllinien-Panels (Tab. 24) waren bei allen drei Mistelpräparaten höher als im pädiatrischen Zelllinien-Panel. Hier konnte für aVF ein durchschnittlicher IC<sub>50</sub> Wert von 0,581 mg/ml errechnet werden. Für Iscucin Tiliae lag der durchschnittliche IC<sub>50</sub> Wert bei 1,146 mg/ml und war damit in der Effektivität dem Präparat aVF um das 2-fache unterlegen. Der mittlere IC<sub>50</sub>-Wert von Iscucin Pini lag bei 16,07 mg/ml. Damit war dieses Fertigarzneimittel dem Präparat aVF um das 28-fache unterlegen. Für die Mammakarzinomzelllinien SK-BR-3 und MDA-MB231, die Lungenkarzinomzelllinie A549, die Colonkarzinomzelllinie CaCo2, die Endometriumkarzinomzelllinie AN3 Ca und die Hepatozelluläre Karzinom Zelllinie HuH-7 konnte jedoch jeweils für Iscucin Tiliae ein niedrigerer IC<sub>50</sub> Wert als für aVF errechnet werden. Das Präparat Iscucin Pini war den beiden anderen Mistelextrakten in allen adulten Zelllinien unterlegen.

### 5.1.4 Auswirkungen von aVF auf die Tumorzell-Proliferation

Für die Quantifizierung der Proliferation der Tumorzellen wurde der Einbau des Thymidin Analogons 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU), während der DNA-Neusynthese mittels Cell Proliferation ELISA untersucht (n = 3). Die Zellen wurden dazu 24 h nach der Aussaat mit aVF behandelt und nach weiteren 72 h ein BrdU-assay durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass eine Behandlung mit einer aVF Konzentration von 0,5 mg/ml in allen untersuchten Zelllinien, mit Ausnahme der Zelllinie ONS-76, zu einem signifikanten Rückgang der

## ERGEBNISSE

Proliferation führte (Abb. 17) In Daoy Zellen betrug diese Proliferationshemmung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen 76,4 %, in SH-SY5Y 47 % und in Kelly Zellen 91,3 %. Eine Mistelkonzentration von 0,05 mg/ml hatte hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die Zellproliferation.

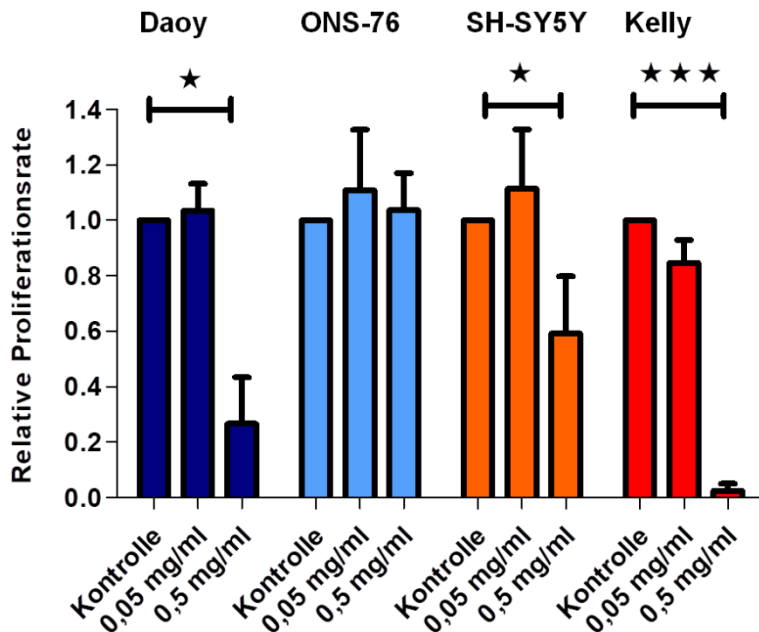


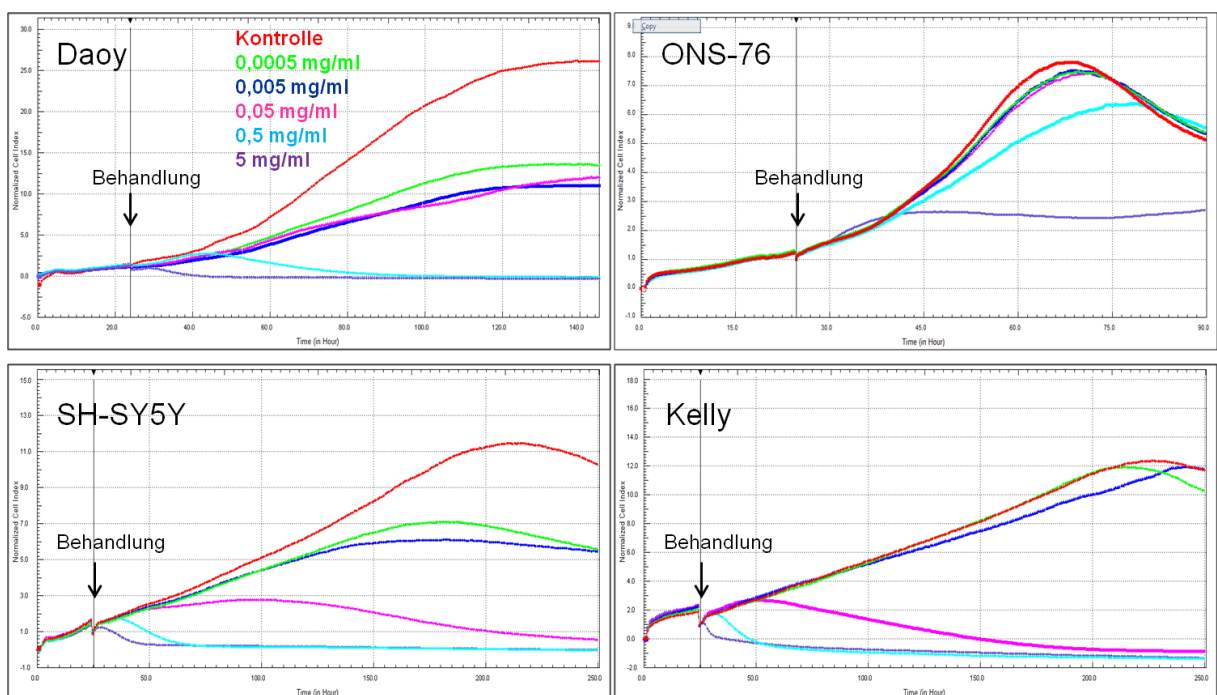
Abb. 17: Auswirkungen einer Behandlung mit aVF der Konzentrationen 0,05 und 0,5 mg/ml auf die Tumorzellproliferation im BrdU-assay, 72 h nach der Applikation (n = 3).

### 5.1.5 Echtzeitanalyse der Auswirkungen nach aVF Behandlung

Das Verhalten von Zellen in Bezug auf Proliferation, Adhärenz und Spreitung kann mit dem nichtinvasiven, impedanzbasierten xCELLigence System untersucht werden. Die Behandlung mit steigenden Konzentrationen des Mistelextraktes aVF erfolgte 24 h nach der Aussaat auf die E-Plates (n = 4). Die Impedanzmessungen wurden auf den Zeitpunkt der Substanzzugabe normalisiert (Abb. 18). Zu einer Verringerung des Cell Index kommt es bei einem Ablösen oder einer Verminderung der Spreitung der Zellen. Der Cell Index erhöht sich bei einer Vermehrung von Zellen oder einer stärkeren Spreitung oder der Zunahme von Zell-Zell-Kontakten. Alle Zelllinien zeigten bei diesem Versuch eine dosisabhängige Reaktion auf die Therapie.

## ERGEBNISSE

Bei beiden Neuroblastomzelllinien (SH-SY5Y und Kelly) führte eine Behandlung mit den aVF Konzentrationen 5 mg/ml und 0,5 mg/ml zu einem sofortigen Abfall der Cell Index Werte, die auch nach Exposition mit einer Dosis von 0,05 mg/ml aVF stetig, jedoch langsamer absanken. Auch die Mistelkonzentrationen 0,005 und 0,0005 mg/ml führten in der Zelllinie SH-SY5Y zu einem Abfall der Cell Index-Werte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Diese Konzentrationen zeigten jedoch in Kelly Zellen keine Effekte. Im Vergleich zu den Neuroblastomzellen zeigten sich die Medulloblastomzelllinien (Daoy und ONS-76) wesentlich resistenter gegenüber einer Behandlung mit aVF. Eine Behandlung mit 5 mg/ml des Mistelextraktes führte zwar auch hier zu einem sofortigen Abfall der Kurven, eine Behandlung mit der zweithöchsten Konzentration von 0,5 mg/ml und geringere Substanzkonzentrationen zeigten in der Zelllinie ONS-76 jedoch keine Effekte mehr. Die Applikation von 0,5 mg/ml führte bei Daoy-Zellen zu einem raschen Abfall der Kurve. Auch eine Behandlung mit geringeren Mistelkonzentrationen von 0,05, 0,005 und 0,0005 mg/ml ließ die Kurven bei Daoy Zellen im Vergleich zur Kontrolle abflachen.

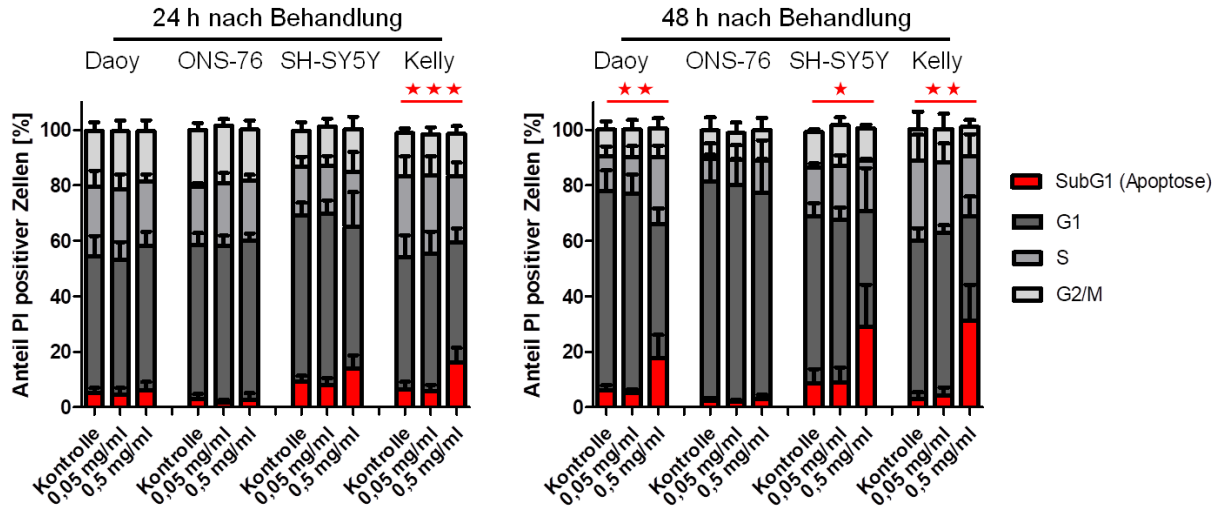


**Abb. 18: Echtzeitüberwachung der Effekte einer Behandlung mit aVF auf die Medulloblastom- und Neuroblastom Zellen im xCELLigence System (n = 4). Der im jeweiligen Diagramm eingezeichnete Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Mistelextraktzugabe. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.**

## 5.2 Untersuchung auf Apoptoseinduktion

### 5.2.1 Effekte von aVF auf den Zellzyklus

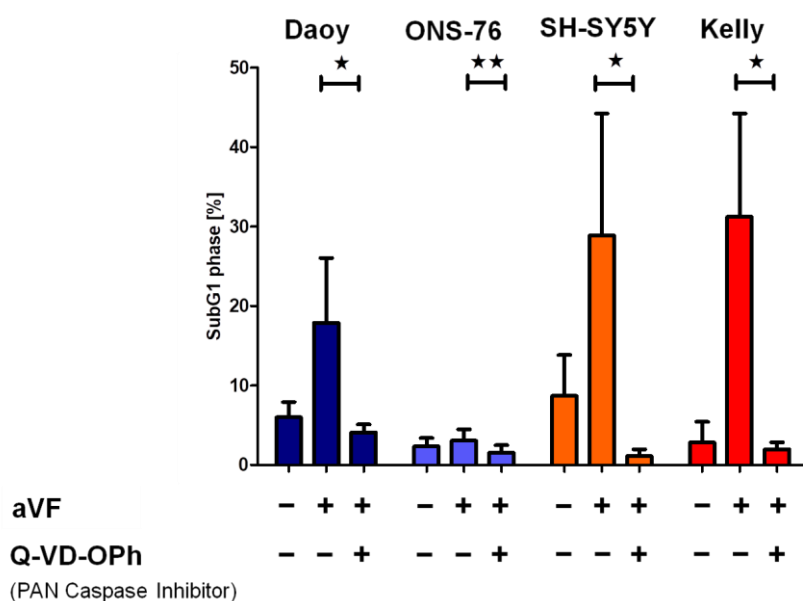
Für die weitere Aufklärung der wachstumsinhibierenden Eigenschaften des Pflanzenextraktes wurden FACS-basierte Zellzyklusanalysen, 24 h und 48 h nach Behandlung (n = 6), durchgeführt. Eine Auslösung des programmierten Zelltods wird hierbei durch einen prozentualen Anstieg von Zellen in der subG1 Phase gekennzeichnet. Die Behandlung mit 0,5 mg/ml aVF führte 24 h nach der Exposition zu einer stark signifikanten Erhöhung des Anteils von Zellen in der subG1 Phase um 9,6 % bei der Neuroblastomzelllinie Kelly im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 19). Nach einer Zeit von 48 h konnte in allen Zelllinien, mit Ausnahme der Medulloblastomzelllinie ONS-76, mit dieser Mistelkonzentration eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate beobachtet werden. In Daoy Zellen stieg der Anteil von Zellen in der subG1 Phase im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen um das 2-fache (Erhöhung um 11,9 %) an, in SH-SY5Y Zellen um das 2,3-fache (Erhöhung um 20,3 %) und in Kelly Zellen um das 11-fache (Erhöhung um 28,4 %). Die niedrigere aVF Verdünnung von 0,05 mg/ml hatte in den untersuchten Zelllinien jedoch keine signifikanten Effekte auf die subG1 Phase.



**Abb. 19: Apoptosenachweis mithilfe durchflusszytometrischer Zellzyklusanalyse 24 h bzw. 48 h nach Behandlung mit aVF in den Konzentrationen 0,05 und 0,5 mg/ml (n = 6). Die Apoptoserate stellt den Anteil an Zellen in der subG1 Phase (hypodiploide Zellen) dar (in der Abbildung rot hervorgehoben).**

### 5.2.2 Nachweis der Caspasen-Abhängigkeit der ausgelösten Apoptose

Um die Rolle von Caspasen, bei der durch 0,5 mg/ml aVF getriggerten Apoptose zu untersuchen, wurden die Zellen simultan zu einer Behandlung mit dem Mistelextrakt, mit einem PAN-Caspase Inhibitor inkubiert und nach 48 h eine FACS-basierte Zellzyklusanalyse durchgeführt (n = 6). Hier konnte gezeigt werden, dass die Apoptoserate in allen Zelllinien signifikant durch den PAN-Caspase Inhibitor gesenkt werden konnte (Abb. 20). Der Anteil der Caspasen-abhängigen Apoptose nach Behandlung mit 0,5 mg/ml aVF betrug in Daoy Zellen 95,5 %, in SH-SY5Y 96,1 % und in Kelly Zellen 94 %.



**Abb. 20: Caspasen-abhängigkeit der ausgelösten Apoptose.** Die nach 48-stündiger aVF Behandlung in der Konzentration 0,5 mg/ml ausgelöste Apoptose, konnte durch zeitgleiche Behandlung mit dem PAN-Caspase Inhibitor Q-VD-OPh aufgehoben werden (n = 6).

### 5.2.3 Aktivitätsbestimmung der Initiator-Caspasen-8 und -9

Für die nähere Untersuchung der ausgelösten Apoptosewege wurde ein Caspase-Glo assay durchgeführt, mit dem die Aktivität der jeweiligen Caspase bestimmt werden konnte. Eine Erhöhung der Caspase-9 Aktivität weist dabei auf eine Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges hin. In Kelly und SH-SY5Y Neuroblastomzellen konnte eine dosisabhängige Steigerung der Caspase-9 Aktivität festgestellt werden (Abb. 21). Die

## ERGEBNISSE

Aktivität der Caspase-9 wurde durch eine Konzentration von 0,5 mg/ml aVF in Daoy Zellen um das 1,4-fache im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen gesteigert, in SH-SY5Y um 1,3-fache und in Kelly Zellen um 1,8-fache. Die Medulloblastomzellen ONS-76 reagierten hingegen mit einer signifikanten Aktivitätsminderung der Initiator-Caspase-9. Auch die Aktivität der Caspase-8 war in ONS-76 Zellen durch eine Mistelbehandlung mit 0,5 mg/ml im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen signifikant um das 0,9-fache vermindert. In Daoy Zellen kam es durch Behandlung mit dieser Mistelkonzentration hingegen zu einer dosisabhängigen und signifikanten Aktivitätssteigerung der Caspase-8 um das 1,3-fache. Die Neuroblastomzelllinien SH-SY5Y und Kelly wurden nicht hinsichtlich ihrer Caspase-8 Aktivitäten untersucht. Hier ist bekannt, dass die Caspase-8 Expression epigenetisch durch Promotorhypermethylierung herunterreguliert ist (Lázcoz et al., 2006; Teitz et al., 2000).

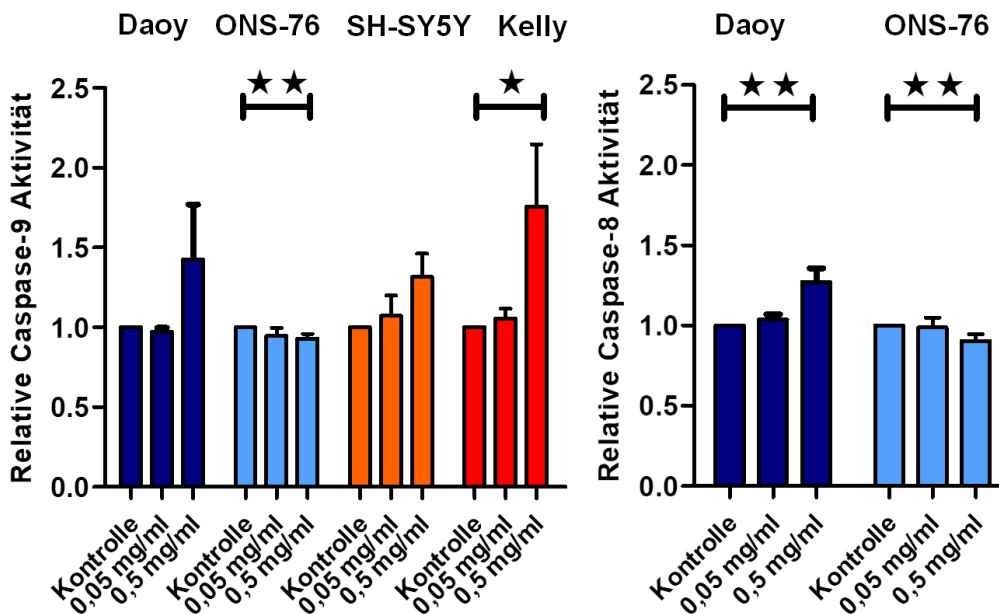


Abb. 21: Aktivitätsbestimmung der Caspasen-8 und -9 mittels Caspase-Glo assay. Die Aktivitätsmessung erfolgte nach einer Behandlungszeit von 24 h mit aVF (0,05 und 0,5 mg/ml) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (n = 3).

### 5.2.4 mRNA Expressionsanalyse der Caspasen-8 und -9

Um zu untersuchen, ob der Mistelextrakt einen Einfluss auf transkriptioneller Ebene auf die Initiatorcaspasen-8 und -9 hat, wurden die mRNA Level mithilfe der Real-Time-PCR untersucht (n = 5). Die sogenannte „fold change“ drückt dabei die mRNA Expression in

## ERGEBNISSE

Relation zur unbehandelten Kontrolle aus. Die Daten wurden auf die jeweilige GAPDH Expression normalisiert.

Auf die *Caspase-9* mRNA Expression von Daoy Zellen zeigte die Mistelbehandlung keinerlei Einflüsse (Abb. 22). Eine Behandlung mit 0,05 mg/ml aVF führte in der Medulloblastomzelllinie ONS-76 zu einem Anstieg der *Caspase-9* mRNA Level, welcher jedoch keine statistische Signifikanz erreichen konnte. Unter Behandlung mit der 10-fach höheren Konzentration des Mistelextraktes (0,5 mg/ml) konnte bei ONS-76 allerdings kein Anstieg der *Caspase-9* mRNA Expression detektiert werden.

In beiden Medulloblastomzelllinien konnte allerdings ein Anstieg der *Caspase-8* mRNA Expression durch eine Konzentration von 0,5 mg/ml aVF im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen verzeichnet werden (Abb. 23). In der Zelllinie ONS-76 stieg die mRNA Expression dabei um das 1,7-fache und in Daoy Zellen um das 2-fache (statistisch signifikant) an.

Die Expression der *Caspase-8* in den Neuroblastomzelllinien SH-SY5Y und Kelly war negativ (Daten nicht gezeigt). In beiden Zelllinien kam es dafür zu einem signifikanten Anstieg der *Caspase-9* mRNA durch Behandlung mit 0,5 mg/ml aVF für 24 h (Abb. 22). Die mRNA Level stiegen bei SH-SY5Y um das 3-fache und bei Kelly um das 4-fache an. Bei der Zelllinie Kelly kam es auch durch Behandlung mit der niedrigeren Mistelkonzentration von 0,05 mg/ml zu einem signifikanten Anstieg der *Caspase-9* mRNA.

## ERGEBNISSE

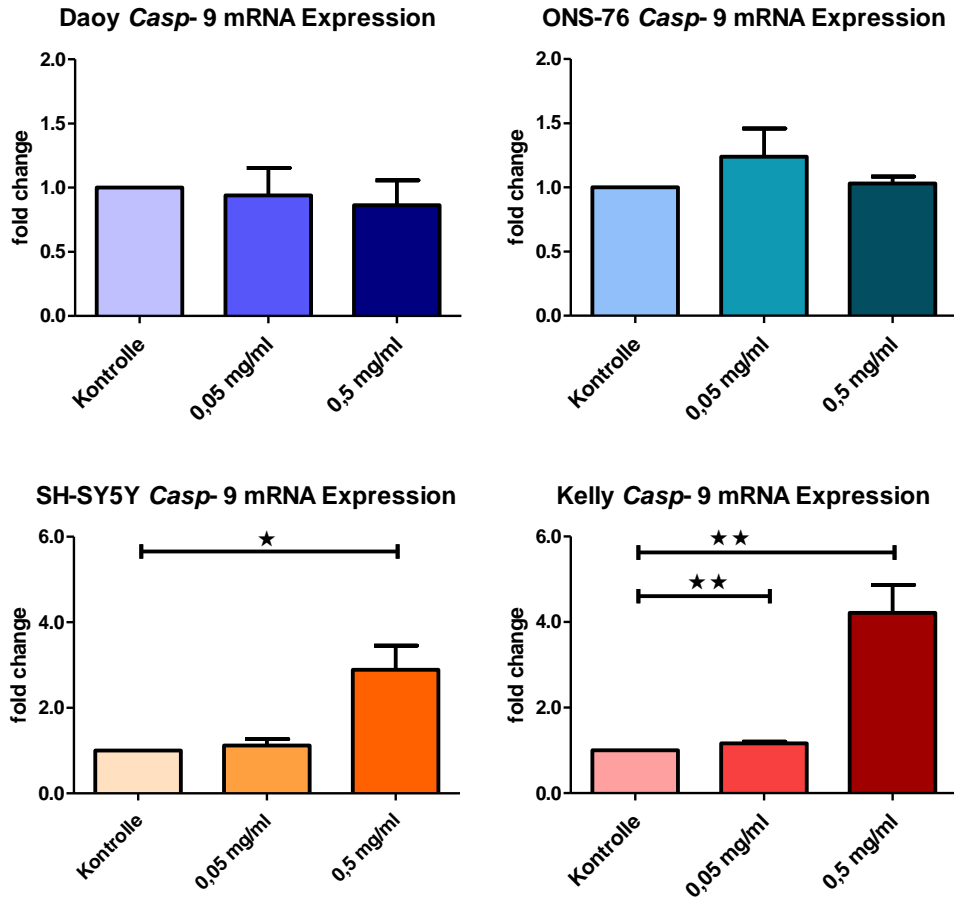


Abb. 22: Expression der mRNA, die für Caspase-9 (Casp-9) codiert, in den Medulloblastomzelllinien Daoy und ONS-76 und den Neuroblastomzelllinien SH-SY5Y und Kelly nach 24-stündiger Behandlung mit aVF (0,05 und 0,5 mg/ml) (n = 5).



## ERGEBNISSE

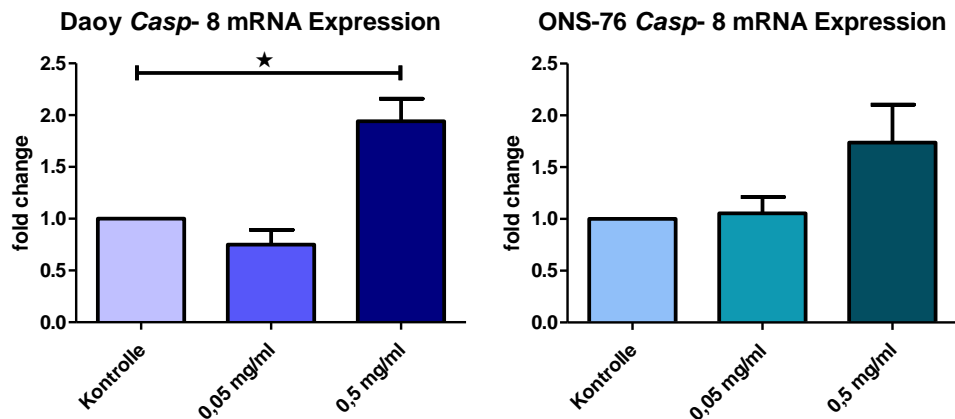


Abb. 23: Expression der mRNA, die für Caspase-8 (Casp-8) codiert, in den Medulloblastomzelllinien Daoy und ONS-76 und den Neuroblastomzelllinien SH-SY5Y und Kelly nach 24-stündiger Behandlung mit aVF (0,05 und 0,5 mg/ml) (n = 5).

### 5.2.5 Analyse der apoptotischen Spaltung von Procaspase-8, -9 und PARP

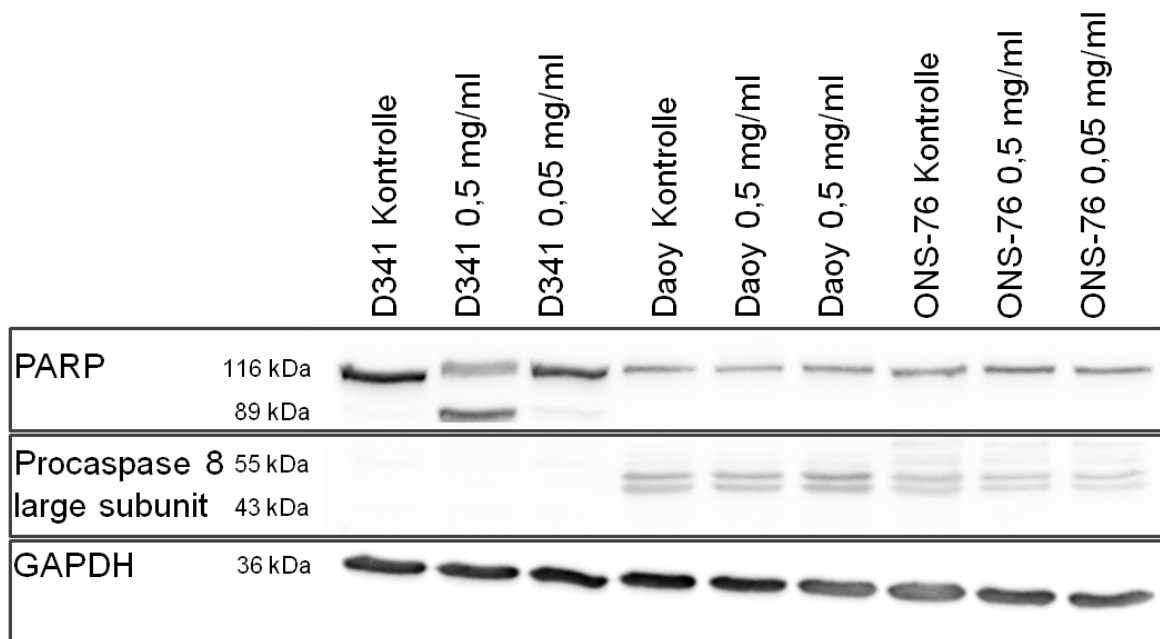
Caspasen stellen eine Familie intrazellulärer Proteasen dar. Sie spielen sowohl während der intrinsischen, als auch während der extrinsischen Apoptose eine entscheidende Rolle. Die extrinsische Apoptose ist durch die autokatalytische Spaltung des Caspase-8 Proenzym nach Dimerisierung im „death-inducing signaling complex“ (DISC) gekennzeichnet. Ausgangspunkt des intrinsischen Apoptosewegs ist die Aktivierung der Procaspase-9 im Apoptosom. Ein weiterer früh auftretender Marker des programmierten Zelltods ist die Proteolyse des Caspase Substrats Poly- (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) (Kaufmann et al., 1993), einem monomeren nukleären Zinkfingerprotein. Während der Apoptose kommt es zu einer Spaltung des intakten PARP-Proteins (116 kDa), in zwei 89 kDa und 24 kDa große Spaltprodukte.

Um eine Spaltung der Caspasen-8 und -9, sowie des Apoptosemarkers PARP auf Proteinebene mittels Western Blot-Analyse zu untersuchen, wurden Zelllysate 24 h nach Behandlung mit aVF gewonnen.

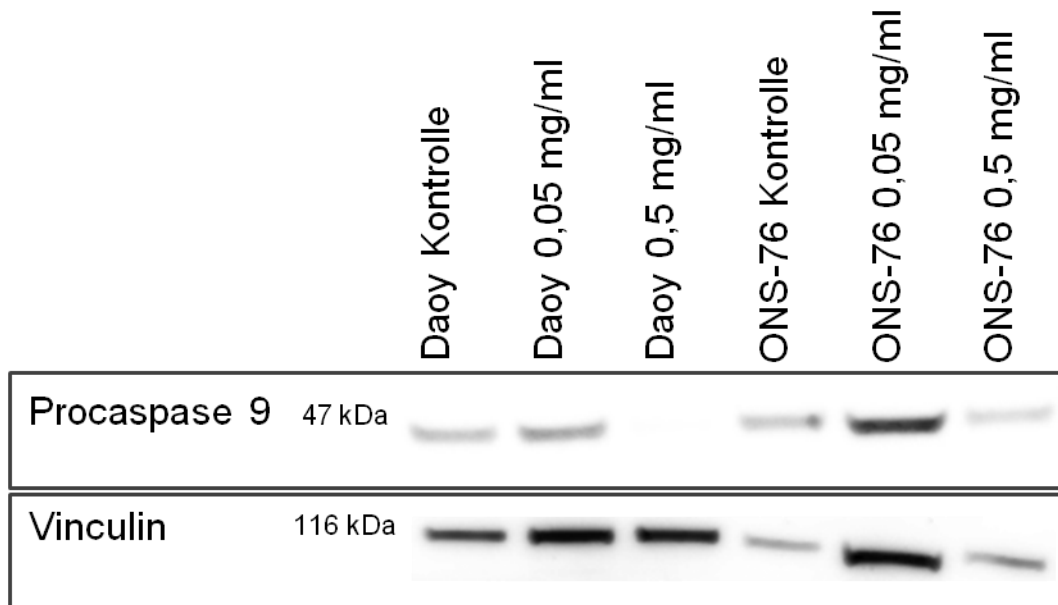
Hierbei konnte eine Bande des 89 kDa großen Spaltprodukts von PARP in der Suspensionszelllinie D341, nach Behandlung mit 0,5 mg/ml aVF, detektiert werden (Abb. 24). Bei den beiden anderen Medulloblastomzelllinien konnte jedoch keine Bande eines PARP Bruchstücks ausgemacht werden.

## ERGEBNISSE

Weiterhin konnte bei Daoy und ONS-76 keine dosisabhängige Prozessierung der Procaspase-8 nachgewiesen werden (Abb. 24). Die Medulloblastomzelllinie D341 wurde hierbei als Negativkontrolle für Caspase-8 mitgeführt, da diese Zellen keine Caspase-8 exprimieren (Grotzer et al., 2000). Eine Untersuchung der Procaspase-9 Prozessierung ergab zwar unter Behandlung mit 0,5 mg/ml aVF ein völliges Verschwinden der Bande des intakten Enzyms (47 kDa) in der Zelllinie Daoy und ein Verblässen der Bande in der Zelllinie ONS-76, ein Nachweis des Spaltproduktes der Procaspase-9 bei 37 kDa konnte allerdings in beiden Zelllinien nicht gefunden werden (Abb. 25).



**Abb. 24: Untersuchung der apoptotischen Spaltung von PARP und der Prozessierung der Procaspase-8 auf Proteinebene durch Western-Blot Analyse. Als Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der Taschen mit Proteinen wurde GAPDH verwendet.**



**Abb. 25: Detektion der Procaspase-9, 24 h nach Behandlung mit aVF durch Western Blot Analyse. Als Ladungskontrolle wurde Vinculin verwendet.**

### 5.2.6 Auswirkungen der Mistelbehandlung auf die mitochondriale Integrität

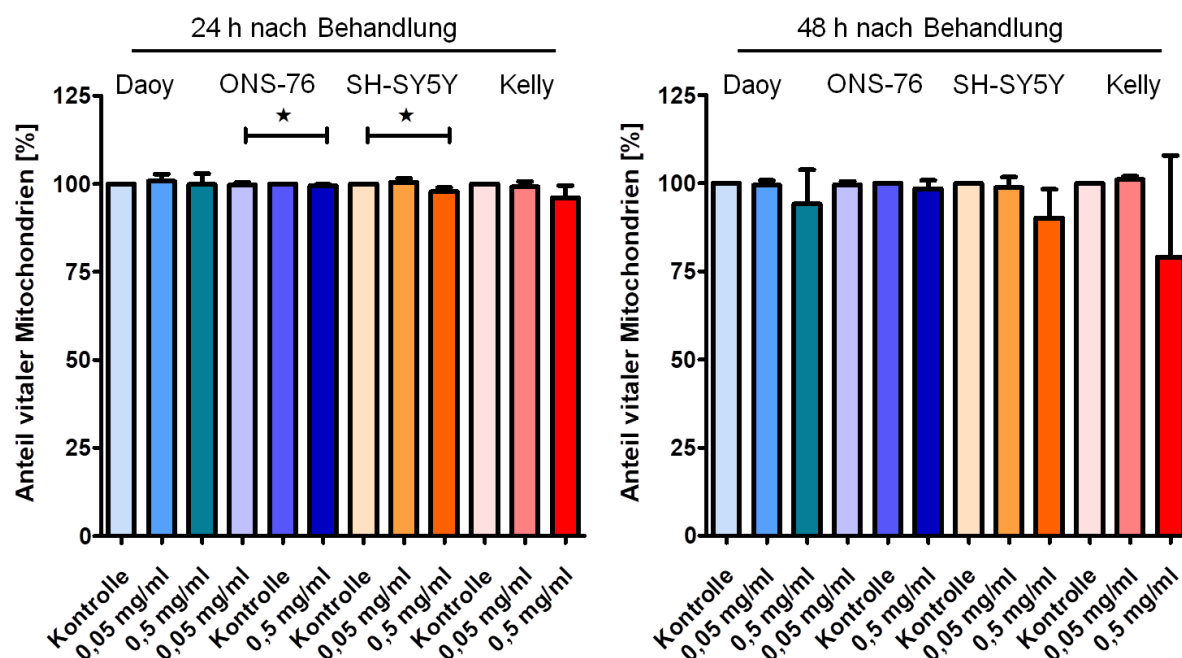
Mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Mitotracker Deep Red® lassen sich vitale Mitochondrien selektiv anfärben. Ein Rückgang der Fluoreszenzaktivität korreliert somit mit dem Anteil vitaler Mitochondrien.

Eine Behandlung mit der aVF Konzentration 0,05 mg/ml zeigte in allen untersuchten Zelllinien keine statistisch signifikanten Effekte auf die Integrität des mitochondrialen Membranpotentials (Abb. 26) (n = 6). Bei Kelly Zellen kam es im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen zu einem Verlust von 0,9 % vitaler Mitochondrien und in ONS-76 Zellen von 0,2 %. Nach einer Behandlungszeit von 48 h konnte in SH-SY5Y Zellen ein Rückgang der Fluoreszenzaktivität von durchschnittlich 1,2 % gemessen werden, in Daoy Zellen um 0,5 % und in ONS-76 Zellen um 0,4 %. Nur bei Kelly Zellen konnte kein Effekt auf die Vitalität der Mitochondrien ausgemacht werden.

Nach einer Behandlungszeit von 24 h mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml aVF kam es zu einem signifikanten Verlust der mitochondrialen Integrität in den Zelllinien ONS-76 (0,51 %) und SH-SY5Y (2,2 %). In Daoy Zellen betrug die Abnahme der Fluoreszenzaktivität, unter einer aVF Konzentration von 0,5 mg/ml, 0,1 % und in Kelly Zellen 9,7 %, was jedoch im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen keine statistische

## ERGEBNISSE

Signifikanz erreichte. Nach einer Behandlungszeit von 48 h kam es durch die Mistelkonzentration 0,5 mg/ml in Daoy Zellen zu einer Erniedrigung des Anteils vitaler Mitochondrien um 16 %, in ONS-76 um 1,5 %, in SH-SY5Y um 9,8 % und in Kelly Zellen um 20,9 %. Die Effekte waren jedoch nicht statistisch signifikant.



**Abb. 26:** Einflüsse des Mistelextraktes aVF in den Konzentrationen 0,05 und 0,5 mg/ml auf die mitochondriale Integrität nach 24-stündiger bzw. 48-stündiger Behandlung. Hierbei wurde der Anteil vitaler Mitochondrien durch selektive Färbung (Mitotracker Deep Red®) im Durchflusszytometer quantifiziert (n = 6).

### 5.3 Analyse der antimetastatischen Eigenschaften

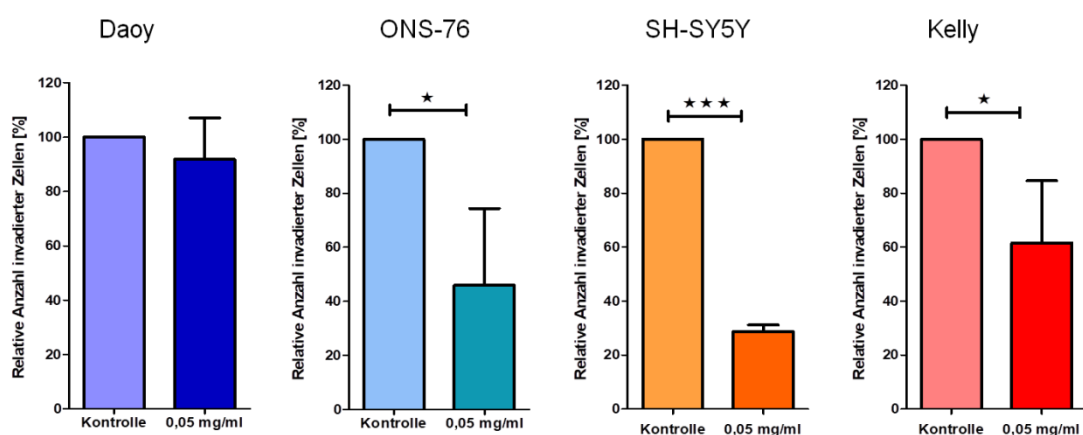
#### 5.3.1 Migrations- und Invasionsanalyse im Transwell-assay

Beim Boyden Chamber Transwell-assay handelt es sich um ein Zwei-Kompartiment-System, welches durch eine poröse Membran getrennt ist. Die Zellen wandern aus der oberen Kammer durch die Membran hindurch in die untere zweite Kammer, in der ein Chemoattraktant platziert wird, der die Zellen anlockt. Durch diesen Versuchsaufbau lassen sich Einflüsse auf die Migration untersuchen und quantifizieren. Um zusätzlich Auswirkungen auf das invasive Verhalten von Tumorzellen zu analysieren, kann die Membran mit einer Matrigelschicht versehen werden, welche die extrazelluläre Matrix (ECM) darstellt.

## ERGEBNISSE

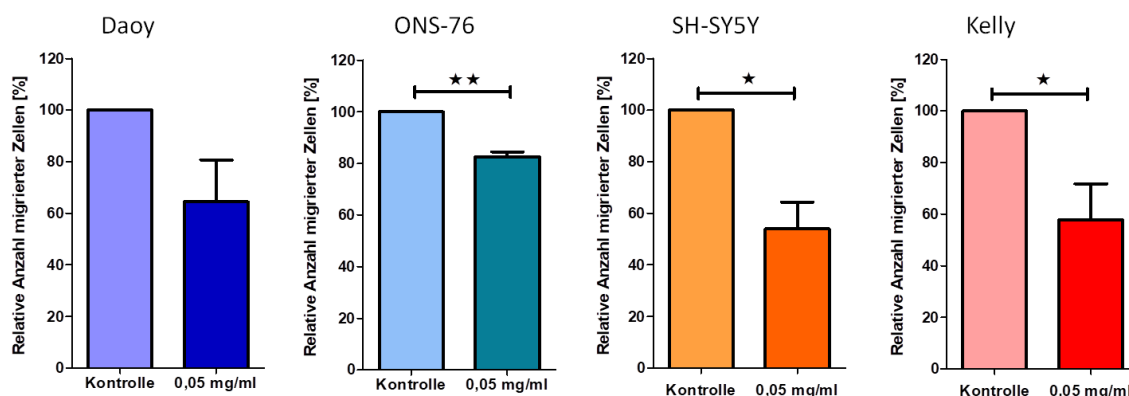
Für diese Versuche wurden die Zellen mit der aVF Konzentration 0,05 mg/ml behandelt und nach 48 h im Boyden Chamber Invasions-Versuch (Abb. 27) bzw. nach 24 h im Boyden Chamber Migrations-Versuch (Abb. 28) fixiert und mit dem Kernfarbstoff DAPI gefärbt. Eine Quantifizierung erfolgte durch Auszählung der Zellen am Boden des Transwells unter dem Fluoreszenzmikroskop. Dabei wurden die behandelten Zellen in Relation zur unbehandelten Kontrolle gesetzt (n = 3). In der Tumorzelllinie Daoy konnte durch die Mistelbehandlung eine Abnahme der Invasivität um 8,2 %, in ONS-76 um 54 %, in SH-SY5Y um 71,4 % und in Kelly um 38,5 % gemessen werden. Bei den Zellen ONS-76 und Kelly konnte für die Behandlung ein signifikanter Rückgang der invasiven Eigenschaften errechnet werden. In der Zelllinie SH-SY5Y war diese Beobachtung sogar hochsignifikant.

Im zweiten Boyden Chamber Versuchsaufbau, ohne Matrigelschicht, konnten ausschließlich Auswirkungen der Mistelbehandlung auf die Tumorzellmigration studiert werden (Abb. 28). Auch hier konnte in den Zellen ONS-76, SH-SY5Y und Kelly ein signifikanter Rückgang der Migration unter einer aVF Behandlung mit 0,05 mg/ml im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen beobachtet werden. Dabei wurde die Wanderungstendenz der Tumorzellen in ONS-76 Zellen um 17,5 %, in SH-SY5Y um 46,1 % und in Kelly Zellen um 42,2 % vermindert. Bei der Zelllinie Daoy konnte ebenso eine Verminderung des migratorischen Potenzials um 35,6 % im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen registriert werden. Hierbei konnte jedoch keine statistische Signifikanz erreicht werden.



**Abb. 27: Grafische Darstellung der Resultate des Versuchsaufbaus eines Boyden Chamber Invasions-assays (n = 3). Die Zellen, die durch eine Matrigelschicht und eine poröse Membran gewandert sind, werden nach 48 h am Boden der Transwells ausgezählt. Die Anzahl der invadierten, unbehandelten Kontrollzellen wird hierbei zu der Anzahl von Mistel behandelten Zellen (aVF 0,05 mg/ml) in Relation gesetzt.**

## ERGEBNISSE

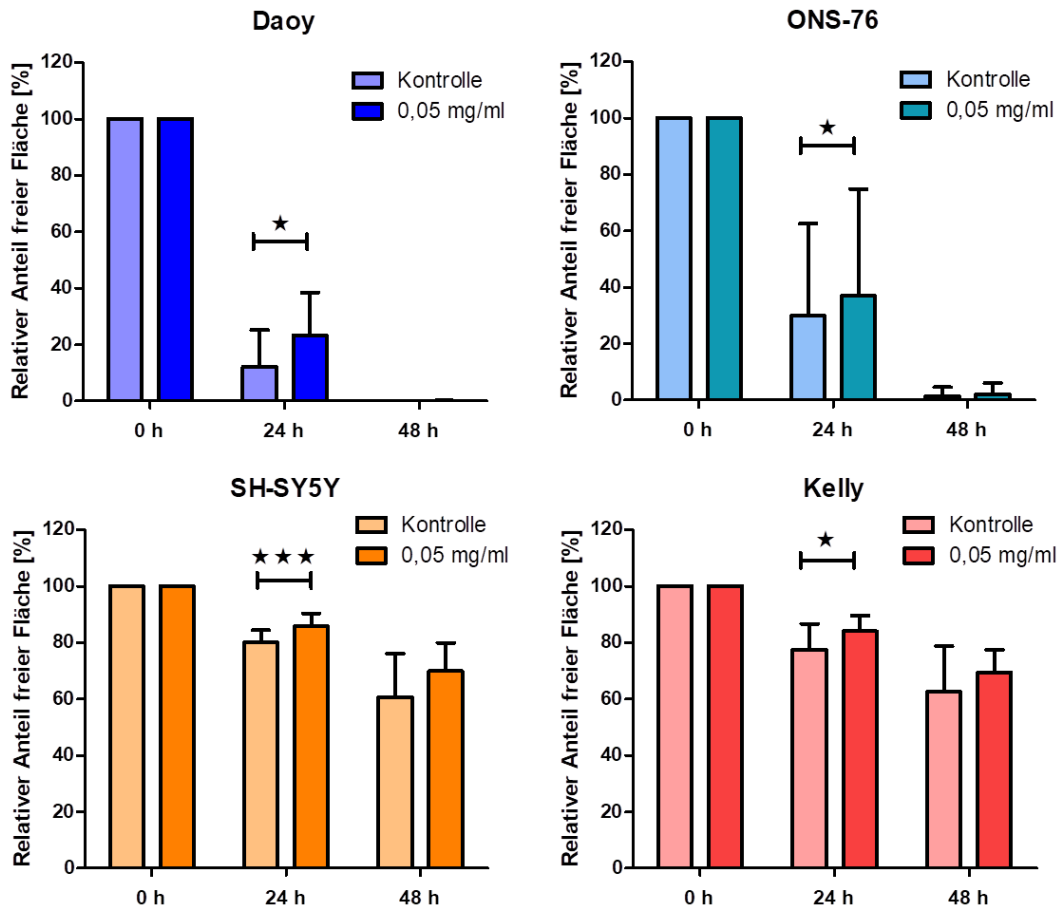


**Abb. 28: Grafische Darstellung der Resultate eines Boyden Chamber Migrationsassays (n = 3). Die Zellen wandern hierbei durch eine poröse Membran in ein zweites Kompartiment. Die gewanderten Zellen werden nach 24 h ausgezählt und die Anzahl der unbehandelten Zellen zu mit aVF 0,05 mg/ml behandelten Zellen in Relation gesetzt.**

### 5.3.2 Migrationsanalyse im Scratch “Wound Healing assay”

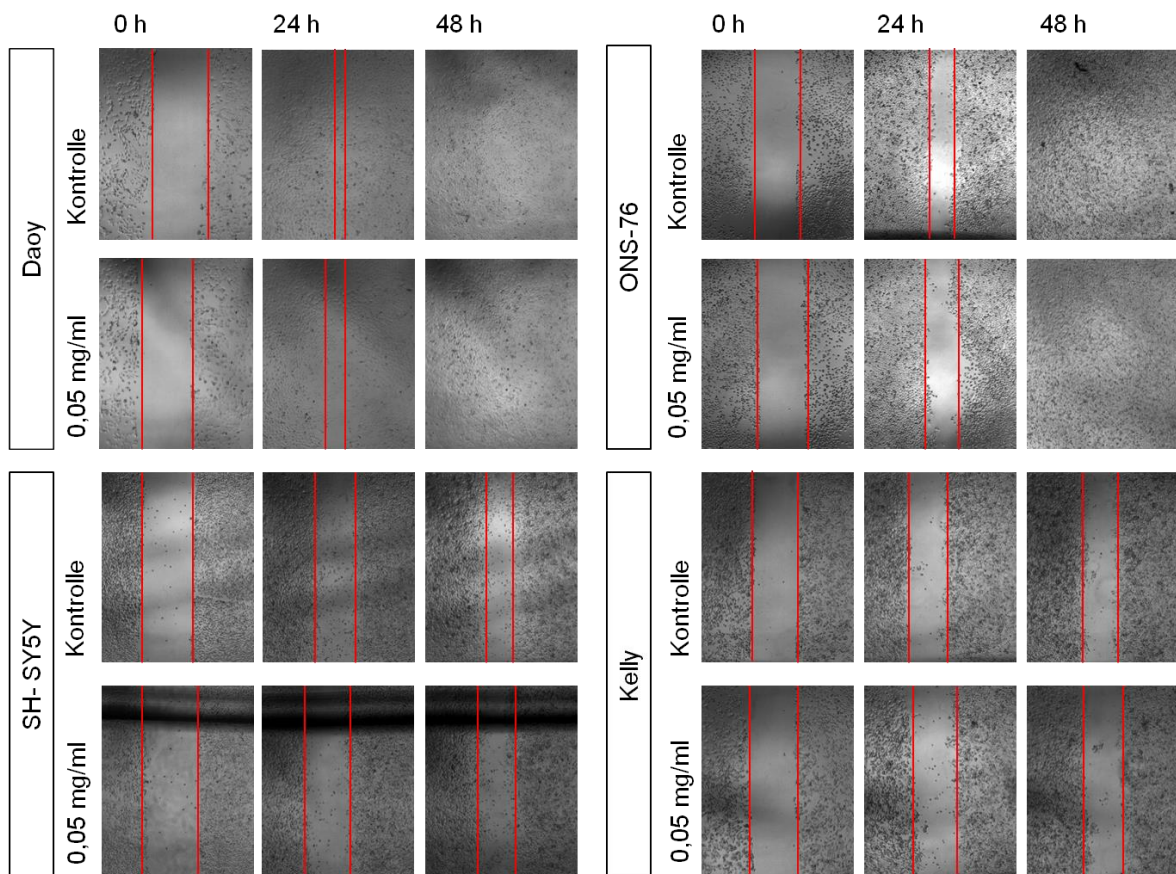
Der Scratch-assay stellt einen weiteren Versuchsaufbau dar, um Einflüsse des Mistelextraktes auf das Migrationsverhalten zu untersuchen. Eine Beurteilung des „Wundverschlusses“ erfolgte insgesamt über einen Zeitraum von 48 h. Hierbei konnte 24 h nach Setzen des Kratzers in allen vier untersuchten Zelllinien (Daoy, ONS-76, SH-SY5Y und Kelly) ein statistisch signifikanter Rückgang der Migration unter Behandlung mit 0,05 mg/ml aVF festgestellt werden (Abb. 29) (n = 8). In der Zelllinie SH-SY5Y war die Migrationsverlangsamung unter der Behandlung im Vergleich zur Kontrolle sogar hochsignifikant ( $p < 0,0001$ ). Die Verminderung der Migrationstendenz im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen betrug in Daoy Zellen 11 %, in ONS-76 Zellen 5 %, in SH-SY5Y Zellen 6 % und in Kelly Zellen 7 %. Nach 48 h waren in den beiden Medulloblastomzelllinien allerdings sowohl in den unbehandelten Kontrollen als auch in den behandelten Zellen die zuvor freige kratzten Bereiche komplett zugewachsen. In den Neuroblastomzelllinien SH-SY5Y und Kelly konnte nach dieser Zeit noch eine Verzögerung des Flächenverschlusses durch die Behandlung beobachtet werden, diese war jedoch nicht statistisch signifikant. Die Migrationsverzögerung betrug dabei in Relation zu den unbehandelten Kontrollzellen in der Tumorzelllinie SH-SY5Y 9 % und in Kelly Zellen 7 %.

## ERGEBNISSE



**Abb. 29: Grafische Darstellung der softwaregestützten Auswertung (ImageJ) des Migrationsareals beim Scratch-assay (n = 8). Das Ausmaß der Migration von aVF (0,05 mg/ml) behandelten Medulloblastomzellen (Daoy und ONS-76) und Neuroblastomzellen (Kelly und SH-SY5Y) aus den Randbereichen in den freigekehrten Bereich wurde durch Aufnahmen zu Zeitpunkten von 0 h, 24 h und 48 h nach dem Kratzen überwacht. Die freien Flächen des Kratzers wurden mit der ImageJ-Software (n = 8) quantifiziert.**

## ERGEBNISSE



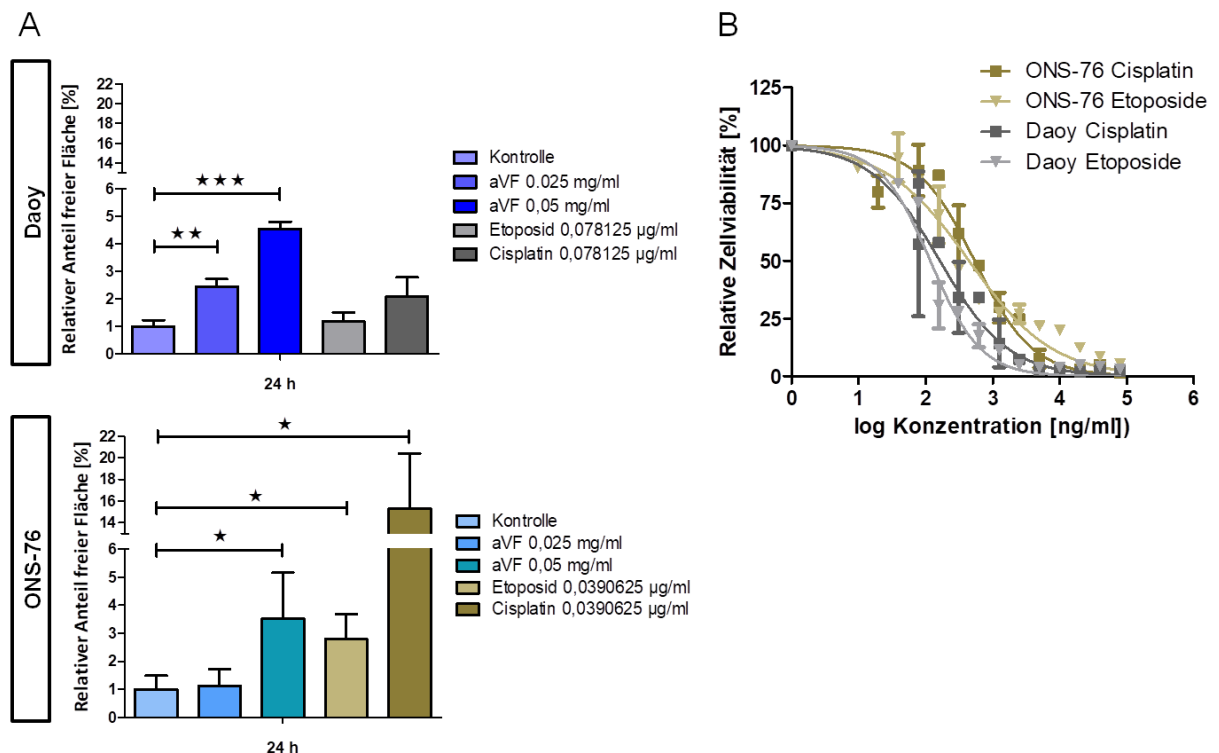
**Abb. 30: Mikroskopische Fotodokumentation des „Wundverschlusses“ im Scratch-assay über einen Zeitverlauf von 48 h an einem ausgewählten Beispiel. Die Tumorzellen Daoy, ONS-76, SH-SY5Y und Kelly wurden hierbei mit aVF in den Konzentrationen 0,05 und 0,5 mg/ml behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die nach Einwanderung (Migration) von Zellen aus den Randbereichen verbleibenden freien Flächen des Kratzers sind in der Abbildung mit roten Strichen eingegrenzt und wurden anschließend mit dem Softwareprogramm ImageJ quantifiziert.**

Die Scratch Migrations-assays wurden für die Zelllinien Daoy und ONS-76 unter Verwendung des aVF Extraktes der Chargennummer: 609 A04 (Gesamtleckingehalt:  $12,52 \pm 1,80$ ; Kapitel 5.1.1) wiederholt ( $n = 8$ ) und der Wundverschluss nach einer Behandlungszeit von 24 h begutachtet (Abb. 31 A). Dabei wurden die Zytostatika Etoposid und Cisplatin in Konzentrationen, die zuvor keinen Einfluss auf die Zellviabilität gezeigt hatten, als Positivkontrollen verwendet. Effekte der beiden Zytostatika auf die Zellviabilität beider Medulloblastomzelllinien wurden im Voraus in MTT-assays überprüft und die  $IC_{50}$  Werte berechnet ( $n = 3$ ): ONS-76 Cisplatin =  $0,542 \mu\text{g/ml}$ ; ONS-76 Etoposid =  $0,446 \mu\text{g/ml}$ ; Daoy Cisplatin =  $0,164 \mu\text{g/ml}$ ; Daoy Etoposid =  $0,118 \mu\text{g/ml}$  (Abb. 31 B). Die Daten wurden hierbei auf die jeweilige freie Fläche zu Beginn des



## ERGEBNISSE

Experiments normalisiert und sind in Relation zu unbehandelten Kontrollen dargestellt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass aVF einen dosisabhängigen Effekt auf die Zellmigration ausübt. In Daoy Zellen konnte nach einer Inkubationszeit von 24 h durch eine aVF Konzentration von 0,025 mg/ml eine um das 2,4-fache größere freie Fläche als in unbehandelten Zellen gemessen werden (Abb. 31 A). Auch durch eine Behandlung mit 0,05 mg/ml aVF, bei der ein 4,6-fach größerer Anteil freier Flächen als in den Kontrollproben detektiert wurden, konnte das migratorische Potenzial signifikant gesenkt werden. In ONS-76 Zellen konnte eine Konzentration von 0,025 mg/ml aVF die Migration der Tumorzellen kaum reduzieren (Abb. 31 A). Konzentrationen von 0,05 mg/ml aVF führten jedoch zu einer Hemmung der Migration der ONS-76 Zellen um das 3,5-fache im Vergleich zu unbehandelten Zellen, was statistische signifikant war ( $p = 0,0465$ ).



**Abb. 31: Effekte von aVF auf den Wundverschluss im Scratch-assay durch Messung der Breite des Kratzbereichs zu Beginn (0 h) und 24 h nach der Behandlung (n = 8). (A) Graphische Darstellung und statistische Auswertung der durch das Softwareprogramm ImageJ ermittelten freigebliebenen Flächen aus unter dem Mikroskop gewonnenen Bilddaten. (B) MTT-Dosis-Wirkungskurven zur Überprüfung von Effekten auf die Zellviabilität der gewählten Konzentrationen.**

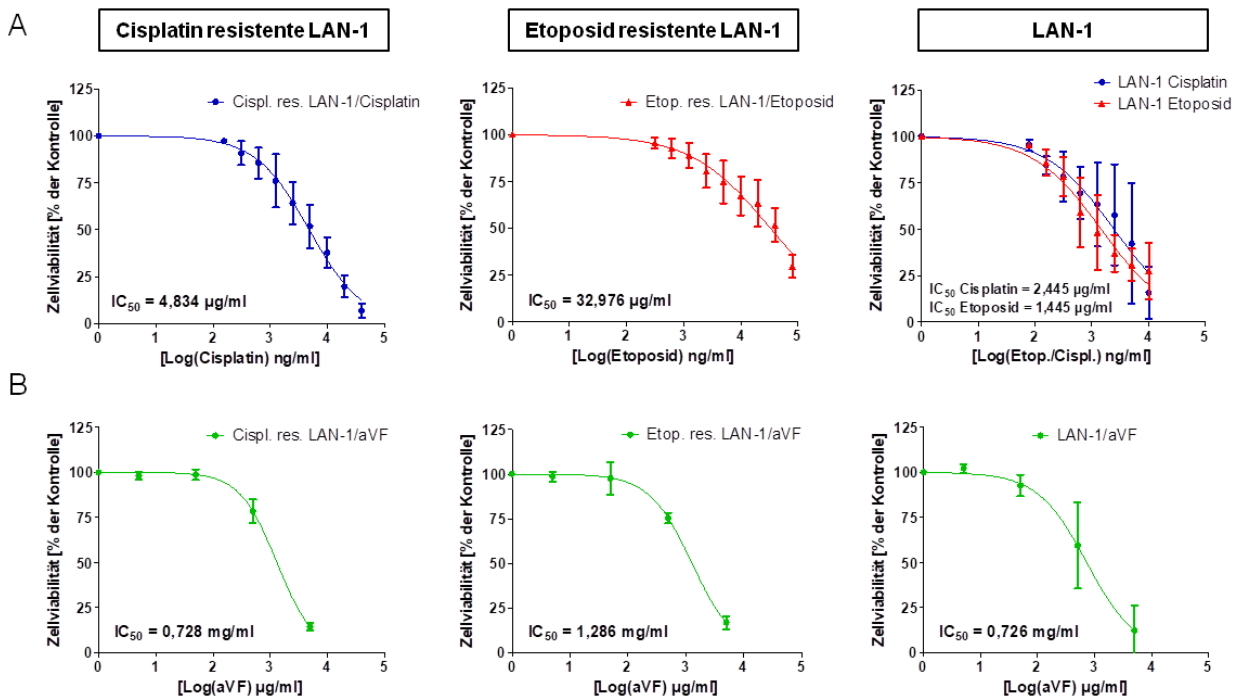
## 5.4 Wechselwirkungen von aVF mit einer Chemotherapie

### 5.4.1 Responsivität gegenüber Monotherapien aus aVF oder Chemotherapeutikum

Um das Ansprechen der Tumorzelllinie LAN-1 und ihrer chemotherapie-resistenten Subzelllinien auf eine Monotherapie aus dem entsprechenden Zytostatikum (Cisplatin bzw. Etoposid) oder aVF zu untersuchen, wurden die Zellen 24 h nach dem Ausplattieren behandelt und nach einer Inkubationszeit von 72 h MTT-assays durchgeführt (n = 3). Aus den erhaltenen Zellviabilitätsdaten wurde jeweils die halbmaximale Hemmkonzentration ( $IC_{50}$ ) durch nicht-lineare Regression errechnet. Hierbei zeigte sich die gegenüber Cisplatin-resistent gezüchtete LAN-1 Zelllinie im Vergleich zur Ursprungszelllinie, doppelt so stark resistent gegenüber Cisplatin ( $IC_{50} = 4,834 \mu\text{g/ml}$  bzw.  $2,445 \mu\text{g/ml}$ ). In der Gegenüberstellung wiesen die Etoposid-resistenten Zellen sogar eine 23-fache höhere Resistenz gegenüber dem Topoisomerase (II)-Hemmstoff auf, als die Ursprungszelllinie ( $IC_{50} = 32,976 \mu\text{g/ml}$  bzw.  $1,445 \mu\text{g/ml}$ ) (Abb. 32 A).

Wurden die drei Zelllinien mit einer Monotherapie aus aVF behandelt (Abb. 32 B), konnte man bei den Cisplatin resistenten LAN-1 Zellen feststellen, dass sie im Vergleich zur LAN-1 Ursprungszelllinie gleich stark auf die Mistelbehandlung ansprachen ( $IC_{50} = 0,728 \text{ mg/ml}$  bzw.  $0,726 \text{ mg/ml}$ ). Gegenüber einer aVF Behandlung zeigten sich die Etoposid resistenten LAN-1 Zellen im Vergleich zu LAN-1 Ursprungszellen um den Faktor 1,8 weniger empfindlich ( $IC_{50} = 1,286 \text{ mg/ml}$ ).

## ERGEBNISSE



**Abb. 32: Dosis-Wirkungskurven der parentalen Zelllinie LAN-1 und ihrer Chemotherapie- (Cisplatin, Etoposid) resistenten Subzelllinien nach Monotherapie mit dem jeweiligen Zytostatikum (Cisplatin bzw. Etoposid) (A) oder aVF (B) (n = 3).**

### 5.4.2 Quantifikation von Synergieeffekten bei kombinierter Chemotherapie und aVF Behandlung

Eine quantitative Analyse der kombinatorischen Effekte zwischen aVF und der jeweiligen Chemotherapie aus Cisplatin bzw. Etoposid auf LAN-1 Zellen und hieraus resistent gezüchteter Subzelllinien (Cisplatin resistente LAN-1 Zellen und Etoposid resistente LAN-1 Zellen), erfolgte auf der Basis von MTT-Zellviabilitäts-assays 72 h nach der Kombinationstherapie. Hierzu wurden die in der Literatur gängigsten Referenzmodelle verwendet.

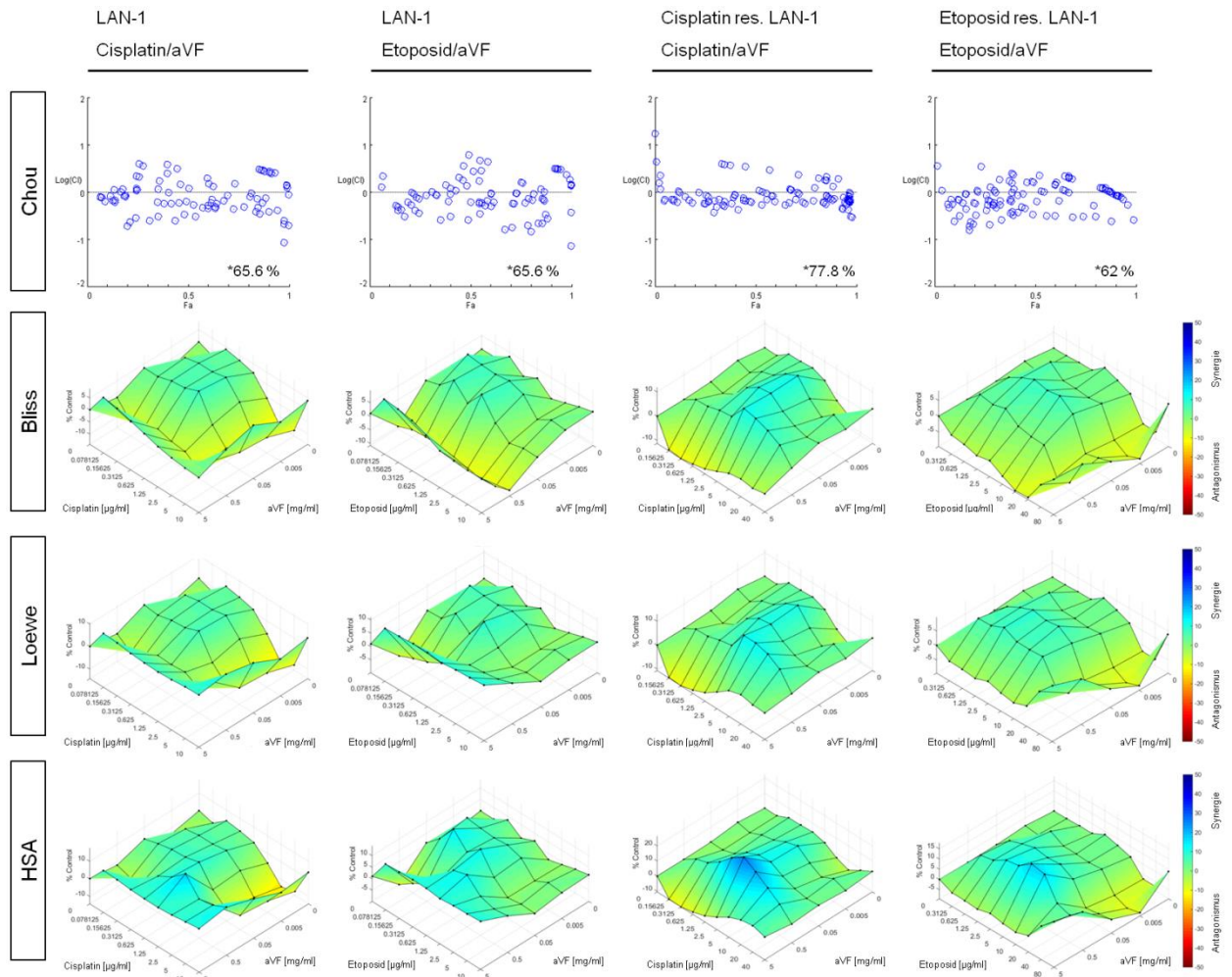
Hierbei konnten bei der LAN-1 Ursprungszelllinie nach dem Modell nach Chou sowohl für Kombinationen aus Cisplatin und aVF, als auch für Kombinationen aus Etoposid und aVF in 65,6 % der Mischungsverhältnisse ein Synergismus festgestellt werden. Bei einer kombinatorischen Behandlung der Cisplatin-resistenten LAN-1 Zellen mit Cisplatin und aVF konnten 77,8 % der Mischungsverhältnisse als synergistisch charakterisiert werden. Eine Kombinationstherapie aus Etoposid und aVF auf Etoposid resistente LAN-1 Zellen

## ERGEBNISSE

konnte mit diesem Modell zu 62 % synergistische Mischungsverhältnisse detektieren (Abb. 33).

Wurden die MTT-Zellviabilitätsdaten der Kombinationsbehandlungen durch die Software Combobenefit auf Basis der Referenzmodelle Loewe-Additivität, Bliss-Unabhängigkeit und HSA untersucht, konnten zwar für einige Mischungsverhältnisse negative „Synergie-Scores“ berechnet werden, die einen Antagonismus anzeigen, jedoch wurden für die Mehrzahl der Kombinationen positive Werte berechnet (Abb. 33). In der Matrixdarstellung, die eine Kennzeichnung der statistischen Signifikanz erlaubt, wird deutlich, dass in keiner der Behandlungen signifikant-antagonistische Interaktionen berechnet werden konnten (Abb. 34). Die meisten Kombinationsverhältnisse wurden als additiv gekennzeichnet. Für Kombinationen zwischen aVF und Etoposid auf LAN-1 Ursprungszellen wurden insbesondere für die Mistelkonzentration 5 mg/ml durch die Referenzmodelle Loewe und HSA signifikant synergistische Verhältnisse gefunden. Außerdem konnte für Kombinationen von 0,5 mg/ml aVF und Cisplatin (2,5–20 µg/ml) auf Cisplatin-resistente LAN-1 Zellen ein signifikanter Synergismus durch alle Modelle berechnet werden.

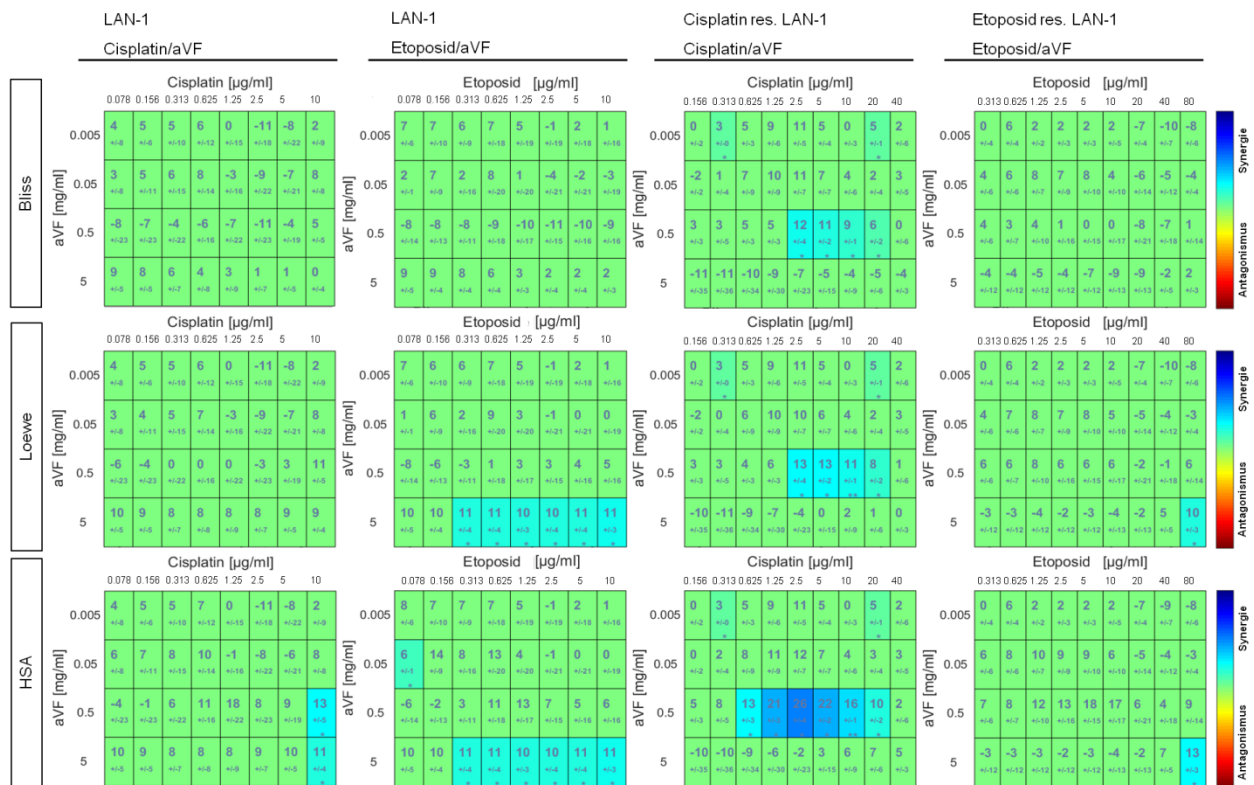
# ERGEBNISSE



\* Prozentsatz mit einem Kombinationsindex (CI) < 1

**Abb. 33: Synergieanalyse einer kombinierten Wirkung von Etoposid bzw. Cisplatin mit aVF auf LAN-1 Zelllinien basierend auf verschiedenen Referenzmodellen (n = 3). Zur Bestimmung synergistischer Verhältnisse nach dem Referenzmodell nach Chou wurde die Software CompuSyn verwendet und die errechneten Kombinationsindizes visualisiert (Log des Kombinationsindex (CI) versus Fa (Fraktion der beeinträchtigten Zellen; englisch = fraction affected)). Der Anteil synergistischer kombinatorischer Verhältnisse (CI < 1) wurde in Prozent angegeben. Die auf den mathematischen Grundlagen nach Bliss, Loewe und HSA basierenden Modelle wurden mit Hilfe der Software Combenefit ausgewertet und dargestellt. Die Oberflächendiagramme zeigen die errechneten Synergiewerte (Differenz zwischen der vorhergesagten Additivität und der beobachteten Effekte) der jeweiligen Kombinationen als positive (blau gekennzeichnet) Bereiche oder als negative Bereiche (gelb bis rot gekennzeichnet).**

# ERGEBNISSE



**Abb. 34: Matrix-Synergieanalyse auf Basis der Referenzmodelle Bliss, Loewe und HSA (n = 3). In der Darstellung ist der Synergie/Antagonismus-score für jede Kombination und ihre statistische Signifikanz gekennzeichnet. Das Signifikanzniveau ist durch Sterne kenntlich gemacht.**

## 5.4.3 Auswirkungen von aVF auf die mRNA Expression verschiedener ABC-Transporter

ABC-Transporter kanalisieren unter ATP-Verbrauch den Transport von körpereigenen Stoffen oder Xenobiotika über Membranbarrieren, teilweise gegen einen Konzentrationsgradienten, und haben somit einen wichtigen Einfluss bei der Verteilung von Arzneistoffen. Sie sorgen für den Influx von Substanzen in die Zelle oder die Exkretion (Efflux) in den Extrazellulärraum. Bei der Behandlung mit Chemotherapeutika kann es durch eine gesteigerte Expression von Arzneimitteltransportern zu einem gesteigerten Efflux und einer Detoxifizierung der antitumoralen Wirkstoffe kommen. Sie tragen somit maßgeblich zur Multi-Drug Resistance (MDR) und konsequenterweise zu einem möglichen Therapieversagen bei. Neben ihrer Funktion bei der „Entgiftung“ von zytotoxischen Substanzen wird vermutet, dass sie zum malignen Phänotyp des Neuroblastoms beitragen können (Huynh et al., 2012). Es konnte weiterhin gezeigt

## ERGEBNISSE

werden, das ABCC1 und ABCC4 direkte transkriptionelle Targets von *MYCN* darstellen (Yu et al., 2015). Um Auswirkungen von aVF auf die mRNA Expression verschiedener ABC Transporter zu untersuchen, wurden Real Time PCRs (qRT-PCR) nach Exposition mit aVF in der LAN-1 Ursprungszelllinie und ihrer chemotherapie-resistent gezüchteten Subzelllinien durchgeführt.

Die Analyse der Daten (n = 4) zeigte, dass die Mistelbehandlung die Expression verschiedener Transporter nur sehr leicht, beeinflusst (Abb. 35). So konnte in Cisplatin-resistenten LAN-1 Zellen eine schwache, aber nicht signifikante, zum Teil dosisabhängige, Hochregulation der mRNA Level von ABCB1, ABCC1, ABCC4 und MVP aufgezeigt werden. In parentalen LAN-1 Zellen wurde die Expression von ABCB1 ebenfalls geringfügig erhöht, von ABCC1 hingegen geringfügig dosisabhängig reduziert. In allen drei Zelllinien hatte eine Behandlung mit aVF die wenigsten Auswirkungen auf die mRNA Expression von GSTO1. Eine weitere Beobachtung dieses Experiments war, dass durch den Erwerb der Etoposid Resistenz die „fold changes“ der mRNA Expression von ABCB1 im Vergleich zur Chemotherapie-naiven LAN-1 Ursprungszelllinie um das durchschnittlich 400-fache höher waren. Dieses Ergebnis kann der unten stehenden Abbildung 35 jedoch nicht entnommen werden, da die „fold changes“ auf die jeweils unbehandelte Kontrolle normalisiert dargestellt wurden. Durch eine aVF Exposition mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml wurden die Werte um ca. 25 % abgesenkt, was jedoch keine statistische Signifikanz erreichte. Insgesamt hatte eine Mistelbehandlung keine signifikanten Auswirkungen auf die Regulation der untersuchten ABC-Transporter.

## ERGEBNISSE

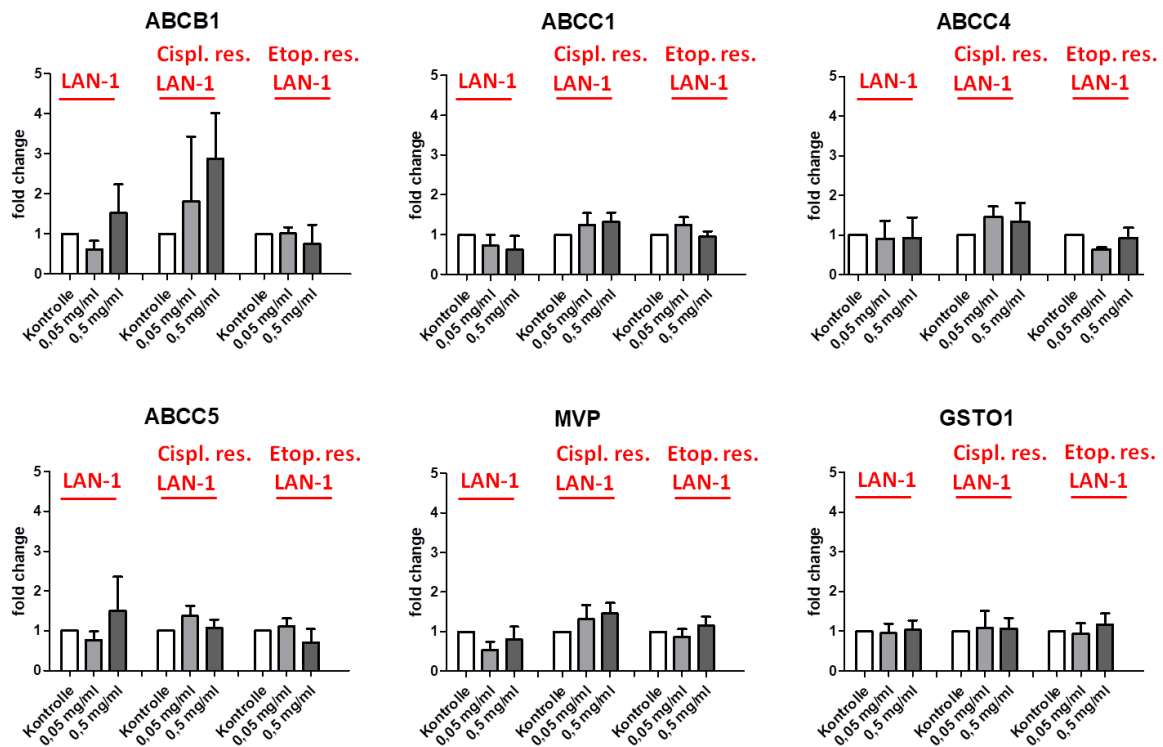


Abb. 35: Relative Quantifizierung der mRNA-Expressionsraten verschiedener ABC-Transporter der Zelllinie LAN-1 und ihrer chemotherapie-resistent gezüchteten Subzelllinien durch qRT-PCR nach Behandlung mit aVF (0,05 und 0,5 mg/ml) (n = 4).

### 5.5 Wechselwirkungen von aVF mit einer Strahlentherapie

#### 5.5.1 Quantifikation von Synergieeffekten zwischen einer Kombinationstherapie aus Bestrahlung und aVF

Eine Radiotherapie ist neben der Operation und der Chemotherapie eine wichtige Säule der Tumorthherapie. Um mögliche Synergismen zwischen einer komplementär verabreichten Misteltherapie und einer Strahlentherapie quantitativ zu untersuchen, wurden kombinatorische Effekte sowohl mit der Methode nach Chou et al. und der Software CompuSyn, als auch auf Basis der Referenzmodelle Loewe, Bliss und HSA mithilfe der Software Combenefit aus MTT-Daten bewertet (n = 2), wobei für beiden Auswertungen der gleiche Datensatz verwendet wurde. Nach dem Modell nach Chou konnten für Daoy in 12,5 % der Mischungsverhältnisse ein synergistisches Verhältnis festgestellt werden. Für ONS-76, SH-SY5Y und Kelly betrug der Prozentsatz synergistischer Kombinationen 6,3; 4,2; bzw. 10,4 (Abb. 36). Insgesamt wurden



## ERGEBNISSE

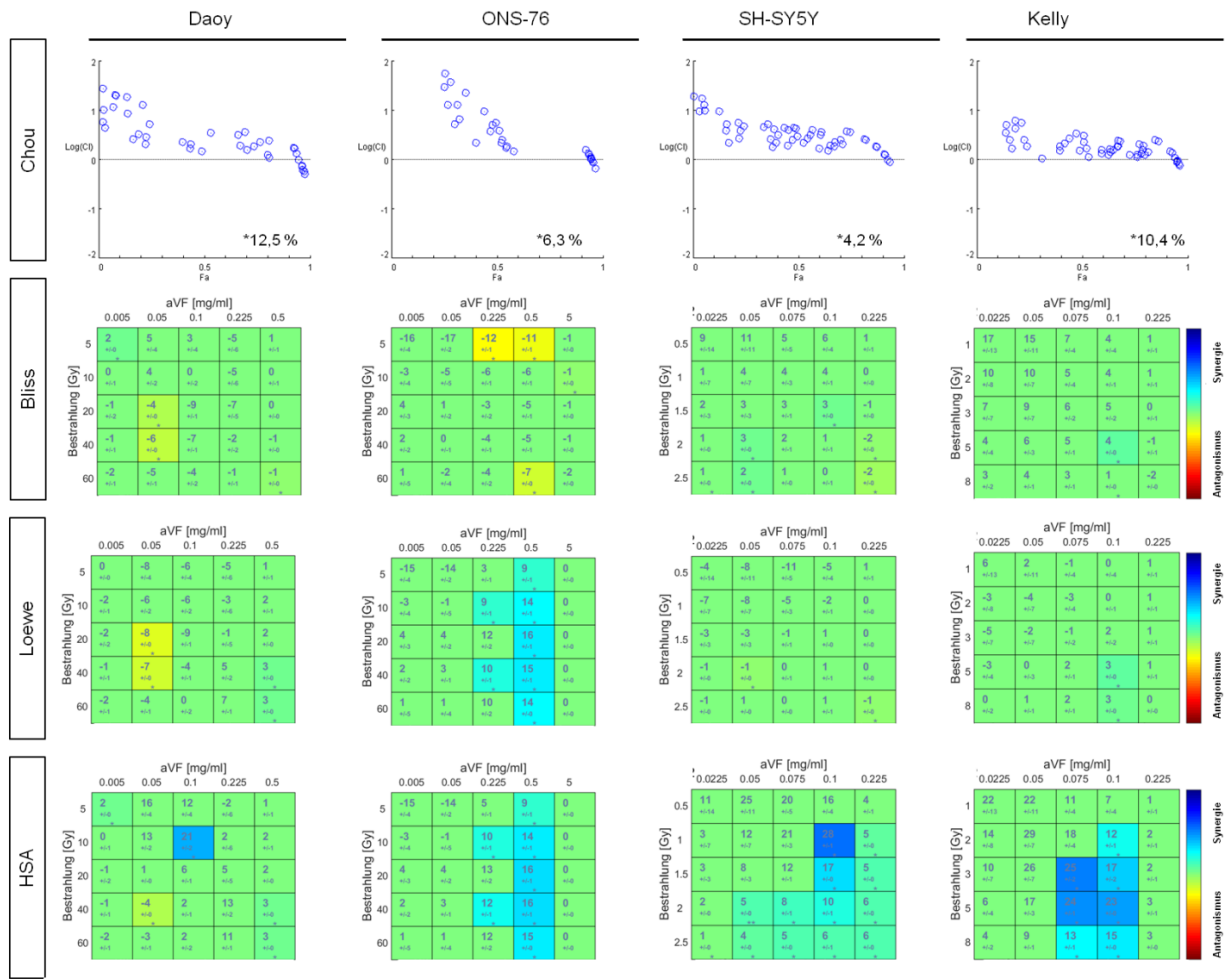
Kombinationen aus aVF und Bestrahlung durch die Methode nach Chou als antagonistisch gewertet.

Auch durch die Software Combenefit konnten für die Zelllinie Daoy durch die Referenzmodelle Bliss, Loewe und HSA signifikant antagonistische Mischungsverhältnisse für Kombinationen aus 0,05 mg/ml aVF und Strahlendosen von 20–40 Gy aufgezeigt werden (Abb. 36). Für eine Kombinationsbehandlung aus 0,1 mg/ml aVF und einer Strahlendosis von 10 Gy konnte das Modell nach HSA jedoch signifikant synergistische Effekte detektieren. In ONS-76 Zellen wurden für Mistelkonzentrationen von 0,225 und 0,5 mg/ml und einer Strahlendosis von 5 bzw. 60 Gy antagonistische Kombinationsverhältnisse durch das Bliss Modell gefunden, jedoch wurden durch die Modelle HSA und Loewe insbesondere für aVF Konzentrationen von 0,5 mg/ml über den gesamten Strahlungsbereich hinweg (5–60 Gy) signifikant synergistische Kombinationsverhältnisse berechnet.

In den beiden Neuroblastomzelllinien SH-SY5Y und Kelly konnten durch die Modelle Bliss und Loewe insgesamt kaum Effekte gemessen werden, die von den erwarteten Effekten der Monotherapien abwichen. Allerdings wurden für die höchste eingesetzte aVF Konzentration von 0,225 mg/ml in SH-SY5Y Zellen und den höchsten eingesetzten Bestrahlungsdosen von 2 bzw. 2,5 Gy antagonistische Effekte angezeigt. In Kelly Zellen konnten für Mistelkonzentrationen von 0,1 mg/ml und den höchsten Strahlendosen von 5 bzw. 8 Gy jedoch synergistische Effekte gemessen werden. Auf Basis des HSA-Modells konnten in SH-SY5Y Zellen insbesondere für aVF Konzentrationen von 0,1 mg/ml und einer Strahlendosis von 1 Gy signifikant synergistische Effekte aufgezeigt werden. Allerdings wurden durch das HSA Modell alle eingesetzten aVF Dosen von 0,0225–0,225 mg/ml in Kombination mit der höchsten applizierten Bestrahlung von 2,5 Gy als signifikant synergistisch charakterisiert. Auch in Kelly Zellen konnte das HSA Modell vor allem für die aVF Konzentrationen 0,1 mg/ml bzw. 0,075 mg/ml und Strahlendosen von 3–8 Gy signifikant synergistische Effekte errechnen (Abb. 36).

Bei der Bewertung der Daten für die Zelllinie ONS-76 muss erwähnt sein, dass die Software Combenefit hier eine Warnung einer schlechten Umsetzung der Berechnung ausgab, da für die Ermittlung der „Synergyscores“ Dosis-Wirkungsbeziehungen nach dem  $E_{max}$  Modell nach Hill ( $Y = 100/(1+10^{((\text{Log}IC50-X)*\text{HillSlope}))})$ ) der jeweiligen Einzelwirkungen herangezogen werden. In Abbildung 37 wird für die Zelllinie ONS-76 deutlich, dass die Dosis-Wirkungskurve keinen sigmoidalen Verlauf, kein Maximum und kein Minimum besitzt und somit die darauf basierende Synergieanalyse nicht aussagekräftig ist.

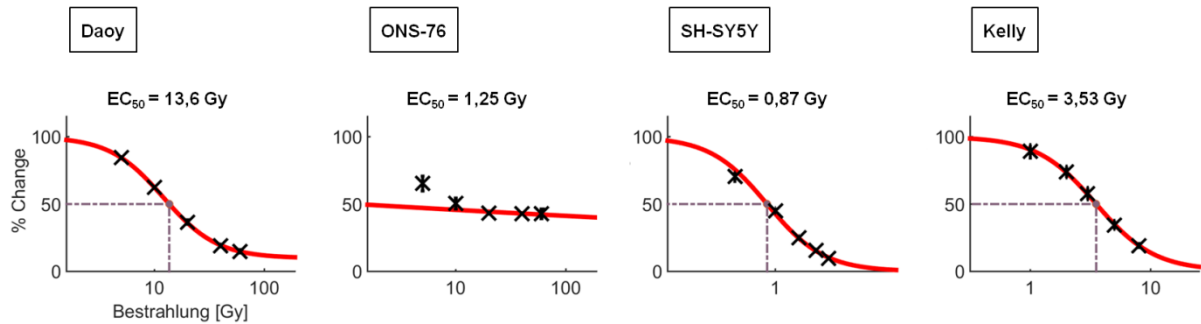
# ERGEBNISSE



\*Prozentsatz mit einem Kombinationsindex (CI) < 1

**Abb. 36: Synergieanalyse einer kombinatorischen Behandlung aus Bestrahlung und Mistelbehandlung auf die Medulloblastomzelllinien Daoy und ONS-76 sowie die Neuroblastomzelllinien SH-SY5Y und Kelly auf Basis der Referenzmodelle Chou, Bliss-Unabhängigkeit, Loewe-Additivität und HSA unter Verwendung der Softwareprodukte CompuSyn und Combeneft. In der Darstellung nach Chou sind die errechneten Kombinationsindices (CI) halblogarithmisch (y-Achse) gegen die Mortalität (Fraction affected (Fa)) auf der x-Achse dargestellt. Kombinationen mit CI-Werten unter 1 sind per Definition synergistisch und sind unterhalb der eingezeichneten Linie visualisiert, CI-Werte > 1 zeigen Antagonismus an und befinden sich oberhalb dieser Linie. Der Prozentsatz von Kombinationen mit CI-Werten < 1 ist für jede Zelllinie mit einem Sternchen gekennzeichnet. In der Matrixanalyse der Modelle Bliss, Loewe und HSA sind signifikante Unterschiede zwischen errechnetem und experimentell ermitteltem Effekt ebenfalls mit einem Sternchen gekennzeichnet. Synergistische bzw. antagonistische Verhältnisse sind mit einem graduellen Farbcode versehen (Antagonismus gelb bis rot, Synergismus blau).**

## ERGEBNISSE



**Abb. 37: Dosis-Wirkungskurven mit Angabe der EC<sub>50</sub>-Werte auf Basis von MTT-Daten, 72 h nach Bestrahlung der Tumorzellen, generiert mit der Software Combenefit.**

### 5.5.2 Effekte unterschiedlicher Behandlungszeitpunkte einer Misteltherapie

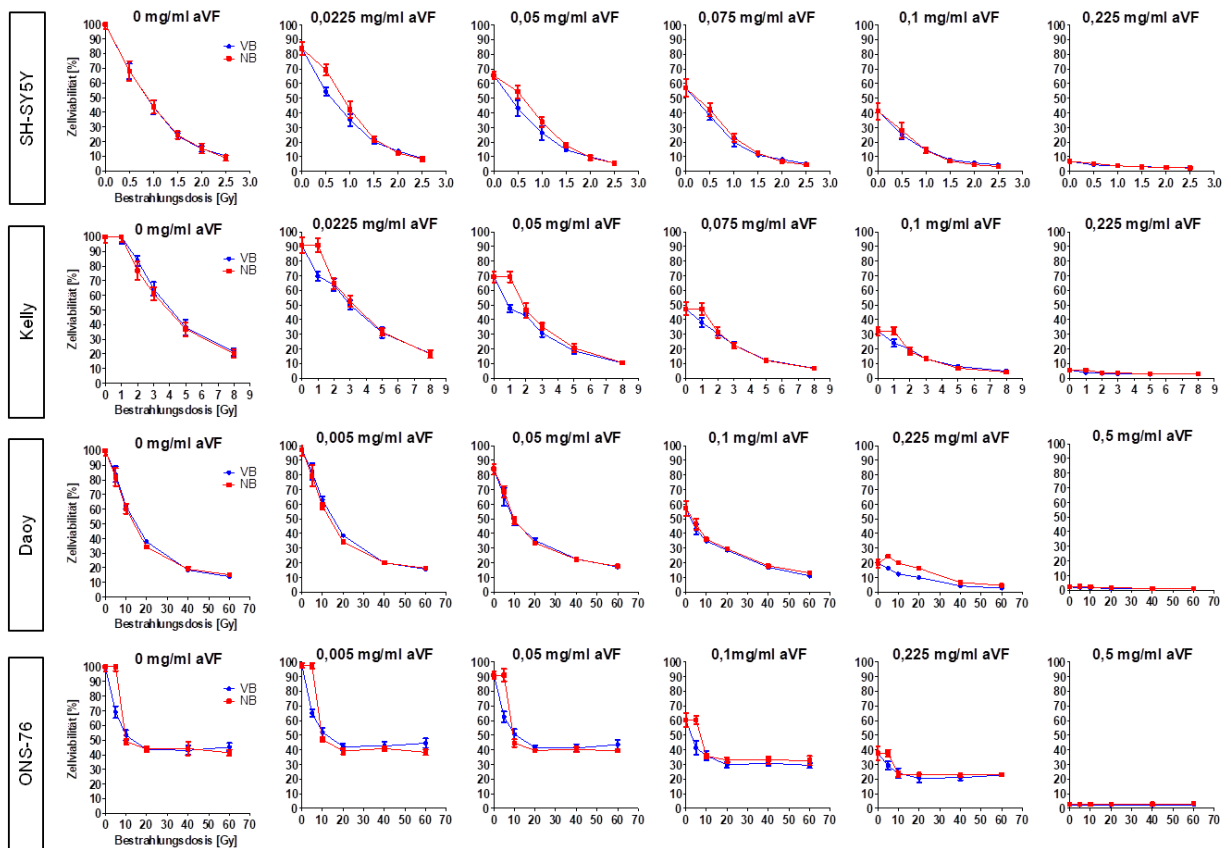
Aufgrund von Literaturhinweisen zu strahlenprotektiven Effekten von Mistelextrakten sollte analysiert werden, ob eine Behandlung mit aVF, die direkt vor einer Strahlentherapie appliziert wird, Auswirkungen auf das Behandlungsergebnis im Vergleich zu einer Behandlung nach einer Bestrahlung hat. Hierzu wurden die Zellen eine halbe Stunde vor der Bestrahlung mit Mistel behandelt (Behandlung vor Bestrahlung = VB), oder direkt nach der Bestrahlung (Behandlung nach Bestrahlung = NB). Nach einer Inkubationszeit von 72 h wurden MTT-assays durchgeführt. Die Neuroblastomzelllinien SH-SY5Y und Kelly und die Medulloblastomzelllinien Daoy und ONS-76 wurden sowohl steigenden Bestrahlungsdosen als auch steigenden aVF Konzentrationen ausgesetzt (zu den verwendeten Behandlungsdosen siehe Kapitel 4.8.1). Dabei wurden die Daten auf unbestrahlte/unbehandelte Zellen normalisiert.

Bei einem Vergleich der Kurvenverläufe der Dosis-Wirkungskurven konnte gezeigt werden, dass der Zeitpunkt der Behandlung keine signifikanten Einflüsse auf die Zellviabilität hat (Abb. 38). Unter beiden Behandlungskonditionen kam es unter einer Mistelmonotherapie in allen Zelllinien zu einem von der aVF Dosis abhängigen Abfall beider Viabilitätskurven (VB und NB).

Betrachtet man nun die Regression der Kurven nach einer Bestrahlungsmonotherapie, so zeigte sich hier ebenfalls eine dosisabhängige Verringerung der Zellviabilität bei beiden Behandlungskonditionen. Auffällig waren hier jedoch die Zellviabilitätskurven bei steigenden Strahlendosen in der Medulloblastomzelllinie ONS-76. Hier kam es bei Strahlendosen über 10 Gy zu einem statischen Zustand, bei dem die Zellviabilität bei

## ERGEBNISSE

beiden Behandlungsvarianten (VB und NB) auf einem Wert von ca. 40 % verblieb. Auch hohe Strahlendosen von 60 Gy konnten keinen weiteren Abfall der Kurven und einen Rückgang der gemessenen Zellviabilität herbeiführen. Allerdings konnte die Zellviabilität durch gleichzeitige aVF Applikation dosisabhängig reduziert werden. Dabei konnten durch eine Behandlung mit den Mistelkonzentrationen 0,005 und 0,05 mg/ml keine hemmenden Effekte auf die Zellviabilität in ONS-76 Zellen registriert werden. Konzentrationen von über 0,1 mg/ml aVF ließen jedoch beide Kurven abfallen. Eine Dosis von 0,5 mg/ml aVF verursachte einen kompletten Verlust der Viabilität, allerdings schon durch alleinige Gabe.



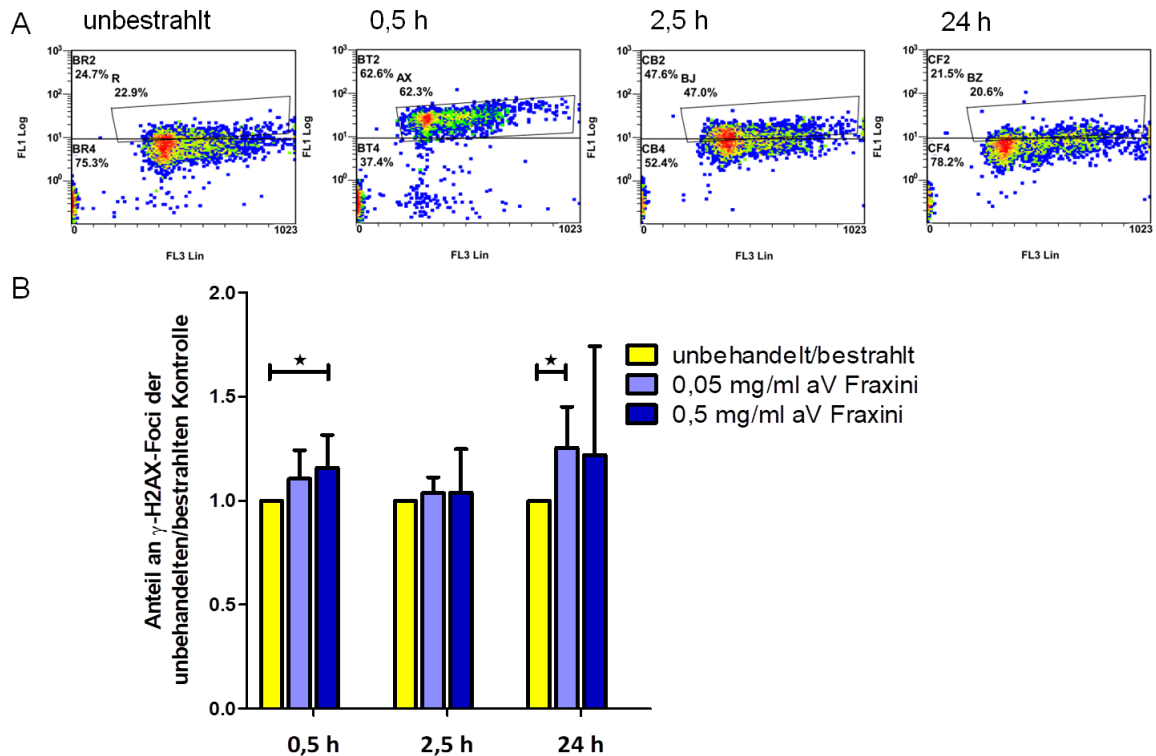
**Abb. 38:** Analyse der Einflussnahme des Behandlungszeitpunktes auf den Therapieerfolg einer kombinierten Mistel und Bestrahlungsexposition. In der Abbildung ist die Zellviabilität nach simultaner Bestrahlung mit steigenden Strahlendosen und nach Applikation steigender aVF Konzentrationen in den Behandlungskonditionen, Behandlung vor der Bestrahlung (VB) und Behandlung nach der Bestrahlung (NB), in Relation zur unbehandelten und unbestrahlten Kontrolle zusammengefasst.

### 5.5.3 Einfluss von aVF auf die Reparaturreffizienz strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche

Obwohl DNA-Einzelstrangbrüche quantitativ häufiger sind, stellen DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) für Zellen den schwerwiegendsten Schaden nach einer Exposition mit ionisierenden Strahlen dar (Frankenberg et al., 1981). Ein frühes Ereignis während des Bestrebens der Zellen diesen Schaden zu reparieren, ist die Phosphorylierung des Histons H2AX an flankierenden Stellen des Doppelstrangbruchs (Paull et al., 2000). Das phosphorylierte Histon H2AX wird auch als  $\gamma$ -H2AX bezeichnet. Die Anzahl an  $\gamma$ -H2AX-Foci korreliert somit mit der Anzahl an DSB. Um der Fragestellung nachzugehen, ob eine Mistelbehandlung Auswirkungen auf die Reparaturreffizienz von strahlenbedingten DSB aufweist, wurde mithilfe des unter Kapitel 4.9.2 beschriebenen Versuchsaufbaus die Anzahl von  $\gamma$ -H2AX-Foci im Durchflusszytometer von strahlenexponierten (1 Gy) SH-SY5Y Zellen zu den Zeitpunkten 0,5 h, 2,5 h und nach 24 h, nach Strahlenexposition, bei gleichzeitiger Behandlung mit aVF in den Konzentrationen 0,05 und 0,5 mg/ml, quantifiziert (n = 4). Dabei wurde auf unbehandelte, aber bestrahlte Zellpopulationen gated und auf diese normalisiert. In Abb. 39 A ist eine auf diese Weise erstellte Reparaturkinetik veranschaulicht. Nach einer Zeit von 24 h sollten dabei alle DSB repariert sein. Zu beachten ist, dass auch unbestrahlte Zellen DSB aufweisen können, die während der Replikation auftreten (MacPhail et al., 2003).

Als Resultat konnte in den mit aVF behandelten Zellen zum Messzeitpunkt 0,5 h nach Bestrahlung eine von der Misteldosis abhängige größere Anzahl von  $\gamma$ -H2AX-Foci in den aVF exponierten Zellen als in den unbehandelten Kontrollen detektiert werden (Abb. 39 B). Für eine Misteldosis von 0,5 mg/ml war der Unterschied statistisch signifikant. Zum Messzeitpunkt 2,5 h nach Strahlenexposition konnten zwischen den mit aVF behandelten Proben und den Kontrollen, allerdings keine Unterschiede ausgemacht werden. Nach einem Zeitraum von 24 h nach Bestrahlung konnte eine signifikant größere Anzahl an  $\gamma$ -H2AX-Foci in Zellen, die mit 0,05 mg/ml aVF behandelt wurden, als in unbehandelten Kontrollen gemessen werden.

## ERGEBNISSE

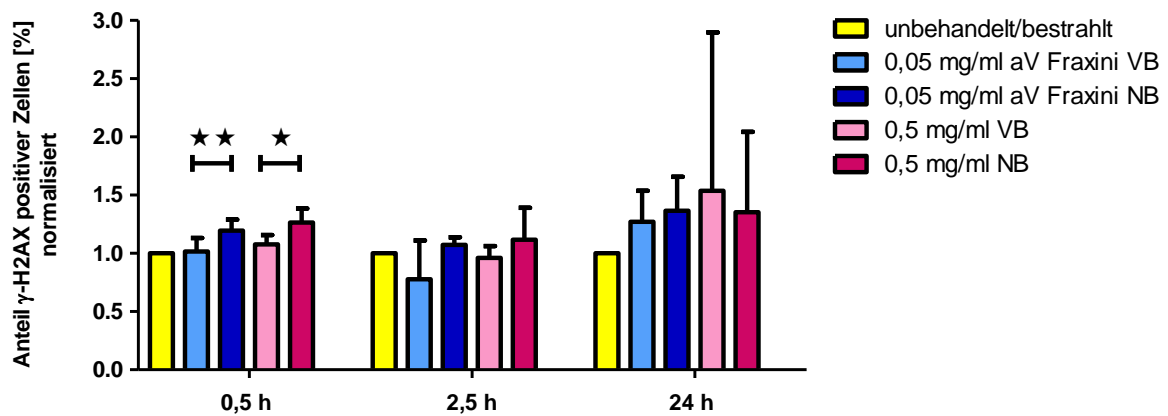


**Abb. 39: (A) Reparaturkinetik von strahleninduzierten (1 Gy) DSB in SH-SY5Y Zellen durch Quantifikation von  $\gamma$ -H2AX-Foci nach PI/FITC Doppelfärbung, unbestrahlt und 0,5 h; 2,5 h und 24 h nach Bestrahlung ohne Mistelbehandlung. (B) Quantitative Analyse von aVF Auswirkungen auf die Reparatureffizienz von DSB anhand von FACS-basierten Fluoreszenzmessungen (n = 4). Die Daten wurden auf bestrahlte Zellpopulationen normalisiert, die nicht mit aVF behandelt wurden.**

In einem weiteren Versuchsaufbau sollte weiterhin eine mögliche Einflussnahme des Zeitpunktes einer Mistelbehandlung auf die Reparatureffizienz strahleninduzierter DSB aufgezeigt werden. Hierzu wurde erneut die Menge an  $\gamma$ -H2AX –Foci zu den Zeitpunkten 0,5, 2,5 und 24 h nach einer Bestrahlung in SH-SY5Y Zellen und simultaner aVF Exposition (0,05 und 0,5 mg/ml) in den Behandlungskonditionen vor Bestrahlung (VB) und nach Bestrahlung (NB) quantifiziert (n = 4). Zum Messzeitpunkt 0,5 h nach Bestrahlung ließ sich ein statistisch signifikanter Unterschied unter Behandlung mit beiden aVF Konzentrationen von vor der Strahlenexposition behandelten Zellen zu nach der Bestrahlung behandelten Zellen erkennen, wobei in den VB-Zellen eine geringere Menge an  $\gamma$ -H2AX-Foci detektiert wurde, was auf eine schnellere Reparatur, oder eine geringere Bildung von DSB schließen lässt (Abb. 40). Nach einer Zeit von 2,5 h und 24 h nach Bestrahlung ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen beiden Therapieregimen ausmachen, daher wird insgesamt davon ausgegangen, dass der

## ERGEBNISSE

Zeitpunkt der Mistelbehandlung keine nennenswerten Einflüsse auf die Reparatureffizienz strahlenbedingter Doppelstrangbrüche nimmt.



**Abb. 40: Quantitative Analyse der Auswirkungen verschiedener Behandlungszeitpunkte auf die Reparatur von DSB, durch Bestimmung der Menge an  $\gamma$ -H2AX-Foci (n = 4). Die Zellen wurden entweder vor der Bestrahlung mit einer Dosis von 1 Gy mit aVF in den angegebenen Konzentrationen behandelt (VB), oder nach der Bestrahlung (NB).**

### 5.5.4 Einflüsse einer Mistelbehandlung in Kombination mit einer Radiotherapie auf die Ausbildung von Tumorzellkolonien

Mit dem Koloniebildungsversuch wurden Einflüsse einer Mistelbehandlung auf die klonogene Aktivität („surviving fraction“) von SH-SY5Y Zellen bei simultaner Bestrahlung untersucht (n = 6). Gleichzeitig sollten Einflüsse des Behandlungszeitpunktes einer Mistelbehandlung im zeitlichen Bezug zu einer Strahlentherapie untersucht werden. Die Neuroblastomzellen wurden dazu, wie unter Kapitel 4.9.3 beschrieben, behandelt und die Kolonien wurden nach dem Anfärben ausgezählt. Dabei wurden zwei verschiedene Versuchsaufbauten gewählt. Zum einem wurden die SH-SY5Y Zellen nur für 30 Minuten mit aVF behandelt, indem der Mistelextrakt nach dieser Zeit vor dem Ausplattieren im 6-well Format ausgewaschen wurde, zum anderen wurden die Zellen nach einer initialen Inkubationszeit von 30 Minuten mit dem Mistelextrakt in einem Wachstumsmedium ausgesät, welches aVF in den angegebenen Konzentrationen enthielt. Der zweite Versuchsaufbau wurde als Dauertherapie gekennzeichnet, da aVF bis zum Auszählen der

## ERGEBNISSE

Kolonien nach 10 Tagen auf den Zellen verblieb. Bei der Auswertung wurden die Daten wurden auf unbehandelte, unbestrahlte Proben normalisiert.

Wurden die Neuroblastomzellen kurzzeitig (30 min) einer Kombination aus 0,05 mg/ml aVF und Bestrahlung (1 Gy) ausgesetzt, konnten keine Unterschiede in der Überlebensfraktion zwischen einer Kombinationsbehandlung (surviving fraction 33,1 %) und einer Strahlenmonotherapie (surviving fraction 31,2 %) ausgemacht werden (Abb. 41 A). Eine reine Mistelbehandlung war einer Strahlenmonotherapie, als auch einer Kombinationsbehandlung, signifikant unterlegen.

Bei einer Mistelkonzentration von 0,1 mg/ml war jedoch die kurzzeitige Kombinationstherapie (surviving fraction 20,2 %) einer Strahlenmonotherapie (surviving fraction 31,2 %) hochsignifikant überlegen (Abb. 41 B). Wurden die Zellen mit einer Monotherapie aus aVF 0,1 mg/ml behandelt, war die Anzahl gebildeter Kolonien erneut signifikant höher als unter einer reinen Strahlentherapie, oder der Kombinationstherapie.

Wurde der Mistelextrakt auf den Kolonien belassen (Dauertherapie), konnte eine Misteldosis von 0,05 mg/ml in der Kombination mit Bestrahlung jedoch die Anzahl gebildeter Kolonien signifikant stärker reduzieren als eine Strahlenmonotherapie (Abb. 41 C). Die surviving fraction betrug bei einer Kombinationsbehandlung 20 % und bei der reinen Bestrahlung 31,2 %. Eine Monotherapie aus 0,05 mg/ml aVF die in dieser Dauertherapie auf den Zellen blieb, konnte die Anzahl gebildeter Kolonien im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant reduzieren ( $p = 0,0047$ ). Die beschriebenen Effekte konnten durch eine Dauertherapie mit einer Mistelkonzentration von 0,1 mg/ml in Kombination mit der Bestrahlung noch gesteigert werden (Abb. 41 D). Die Überlebensfraktion lag hier bei durchschnittlich 0,3 %. Bei einer Dauertherapie mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml konnte ebenfalls beobachtet werden, dass eine Mistelmonotherapie zu einer stärkeren Reduktion der Koloniebildung führte als eine Bestrahlungsmonotherapie (surviving fraction 26,7 % bzw. 31,2 %). Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant ( $p = 0,0577$ ).



## ERGEBNISSE

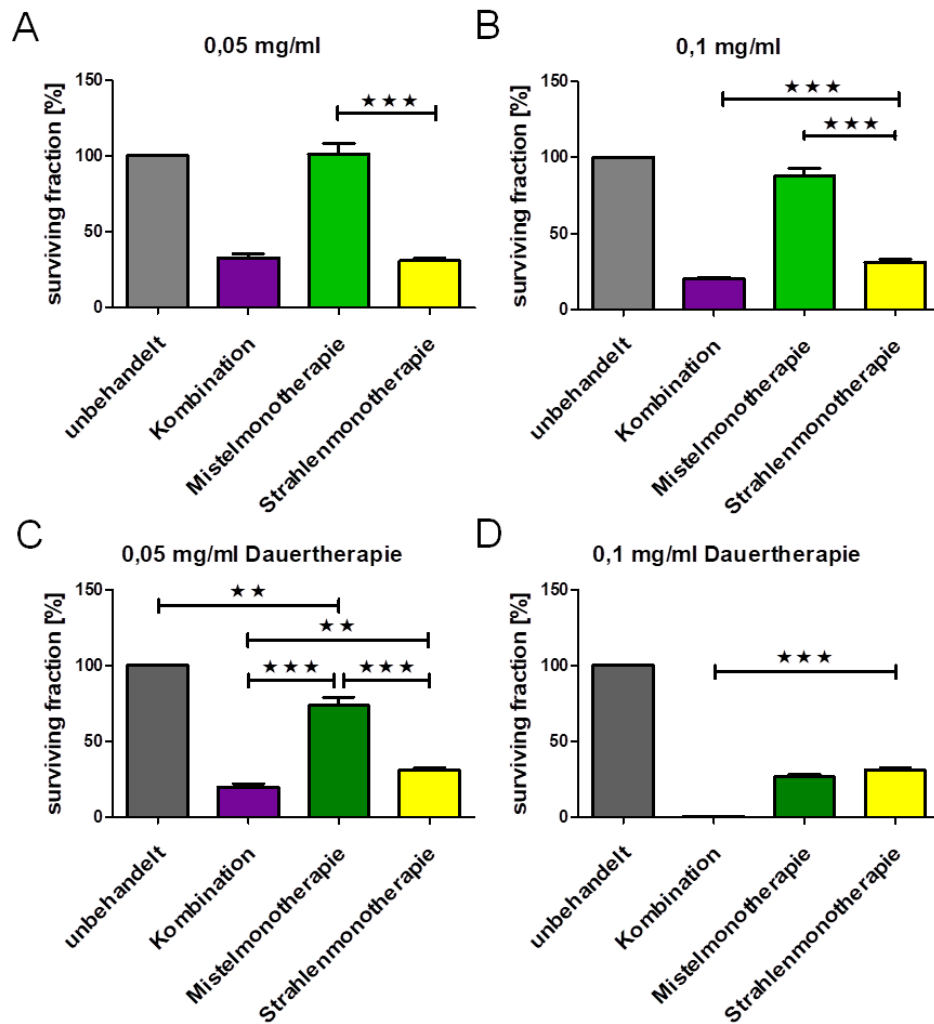


Abb. 41: Darstellung der relativen Überlebensrate („surviving fraction“), durch Auszählung von gebildeten Kolonien. Eine Kolonie entspricht dabei einer Anzahl von mindestens 50 Zellen. Die Zellen wurden entweder einer Monotherapie aus Bestrahlung (1 Gy) oder Mistelbehandlung in den über dem jeweiligen Diagramm angegebenen Konzentrationen oder einer Kombination aus beiden Therapien, unterworfen (n = 6). Es wurde dabei jeweils auf unbehandelte/unbestrahlte Zellen normalisiert (surviving fraction = 100 %).

### 5.6 Resultate der *in vivo* Wirkungen von aVF

#### 5.6.1 *In vitro* Charakterisierung der murinen Neuroblastomzelllinie C1300

Um die Einflüsse von aVF auf die murine Tumorzelllinie C1300 *in vivo* zu untersuchen, sollte sie zuvor in *in vitro* Experimenten auf ihr Ansprechen gegenüber einer aVF

## ERGEBNISSE

Behandlung untersucht werden ( $n = 8$ ). Um sicherzustellen, dass sich die Zellen während der *in vitro* Versuche in einer exponentiellen Wachstumsphase befinden und um die optimale Zelldichte für ein 96-well Template zu bestimmen, wurden Wachstumskurven mit unterschiedlichen Zellzahlen mithilfe des MTT-assays erstellt (Abb. 42). Für die Bestimmung des  $IC_{50}$  Wertes wurde schließlich eine Zellzahl von 3000 Zellen/well gewählt und mit seriellen Verdünnungen von aVF behandelt. Ein  $IC_{50}$ -Wert von 0,399 mg/ml kennzeichnete hierbei, im Vergleich mit humanen Neuroblastomzelllinien, eine geringe Empfindlichkeit gegenüber dem Mistelextrakt.

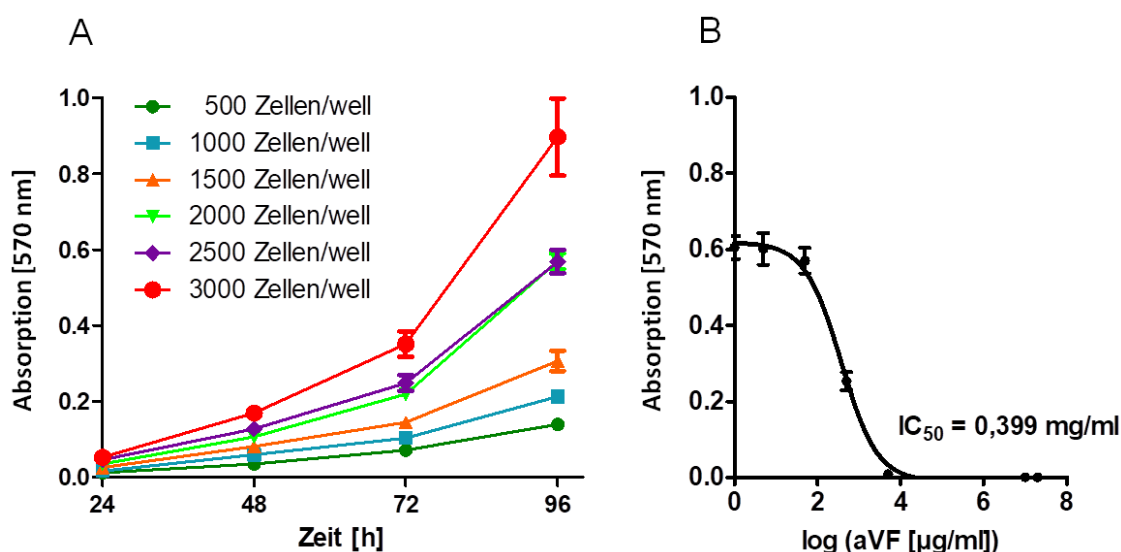


Abb. 42: Testung des *in vitro* Ansprechens der murinen Neuroblastomzelllinie C1300. (A) Proliferations-assay von C1300 Zellen mit verschiedenen Zellzahlen im 96-well Maßstab über einen Zeitraum von 96 h ( $n = 8$ ). (B) Dosis-Wirkungsbeziehungen im MTT-Zellviabilitäts-assay nach Behandlung der Zellen mit seriellen Verdünnungen des Mistelextraktes, 24 h nach der Aussaat, zur Bestimmung des  $IC_{50}$  Wertes ( $n = 8$ ).

### 5.6.2 Resultate der *in vivo* Toxizitätstests

Der erste *in vivo* Toxizitätstest mit steigenden Konzentrationen aVF von 0,1–50 mg/ml ergab eine gute Verträglichkeit der Behandlung. Der Extrakt wurde 2-mal wöchentlich in einem Volumen von 200  $\mu$ l *i. p.* einer Maus appliziert. Eine gegebene Dosis wurde nur zweimalig verabreicht. Die Versuchsdauer betrug 39 Tage. Es konnten während der Versuchsdauer keinerlei Nebenwirkungen der Mistelinjektionen beobachtet werden.

## ERGEBNISSE

In einem zweiten Toxizitätstest wurde der Mistelextrakt gewichtsadaptiert und in einer konstanten Dosis (10–40 mg/ml) während der Versuchsdauer verabreicht. Die Tiere wurden dazu in drei Gruppen aufgeteilt ( $n = 3$ ). Es wurde dabei während der gesamten Versuchszeit eine gute Verträglichkeit der Therapie bei den Mäusen, die eine Zieldosis von 10 mg/ml erhielten, dokumentiert. Aus der Kohorte, die eine Zieldosis von 20 mg/ml aVF erhielt, fiel Maus Nr. 4 mit einem schlechten Habitus auf und musste an Versuchstag 19 aus dem Versuch genommen werden. Zwei weitere Mäuse, welche 40 mg/ml aVF erhielten, fielen ebenfalls mit schlechtem Habitus auf (Maus Nr.: 7 und 8) und wurden ebenfalls vorzeitig aus dem Versuch genommen. Die Versuchsdauer dieses Toxizitätstests betrug insgesamt 40 Tage.

### 5.6.3 Reduktion des Tumorgewichts und des Tumorumfanges

Um Auswirkungen einer Mistelbehandlung in Bezug auf Tumorgewicht,- und -volumen auf das murine Neuroblastom zu untersuchen, wurden die Tumorzellen als Allograft s.c. inokuliert. Es wurde ein sehr ausgeprägter Tumorangang mit rasch wachsenden Tumoren beobachtet.

Die Mäuse erhielten eine Dosis von 50 mg/ml aVF *i. p.* in einem Volumen von 200  $\mu$ l, was einer Dosis von 500 mg/kg KG entspricht, bzw. PBS als Kontrolle, verabreicht. Die Injektionen erfolgten zweimal wöchentlich an Versuchstag 2, 6, 9 und 13. Der Versuch sollte dabei zu einem Zeitpunkt abgebrochen werden an dem eine Maus aus einer der Gruppen ein Abbruchkriterium (siehe Kapitel 4.10.4) erfüllte. Hierbei vertrugen alle Versuchstiere die Behandlung sehr gut, der Grund der Beendigung des Versuchs war die Tumorgröße. Das Tumorgewicht wurde anschließend bei allen Tieren durch Wägung auf einer Feinwaage nach Tumorexzision am Tag des Versuchsabbruchs bestimmt. Das Tumorumfang wurde mithilfe einer digitalen Schieblehre in drei Dimensionen ermittelt und gemäß der Formel für ellipsoide Tumoren (siehe Kapitel 4.10.5) berechnet. Durch das extreme Tumorstadium betrug die Versuchsdauer nur 14 Tage. Die Mistelinjektionen, mit deren Applikation einen Tag nach der Tumorzelleinbettung begonnen wurde, erfolgten insgesamt daher nur viermalig.

Es kam zu einer durchschnittlichen Verringerung des Tumorgewichts um 0,253 g (Median Kontrollgruppe ( $n = 5$ ): 1,892 g; IQR = 0,595; Median Verumgruppe ( $n = 5$ ): 1,639 g; IQR = 0,421). Dies entspricht einer Verringerung des Tumorgewichts um 13,4 % (Abb. 43 A).

Das Volumen der Tumoren konnte hingegen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant minimiert werden (Median Kontrollgruppe: 1407  $\text{mm}^3$ ; IQR = 389; Median Verumgruppe: 991,3  $\text{mm}^3$ ; IQR = 421,6). Dies entspricht einem Rückgang um 415,7  $\text{mm}^3$  (30 %) (Abb. 43 B).

## ERGEBNISSE

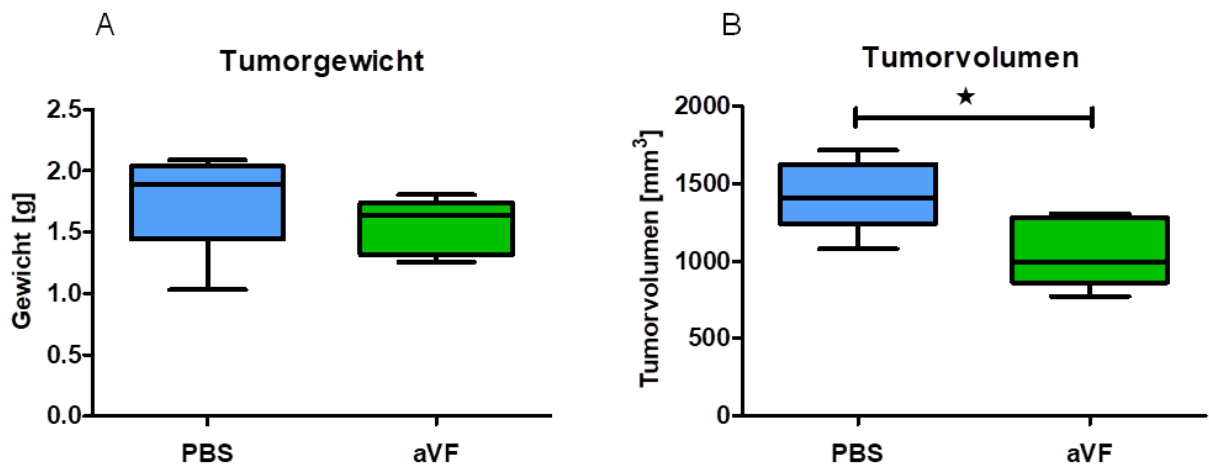


Abb. 43: Resultate der Wirkungen des Mistelextraktes *in vivo* (n = 5). (A) Einfluss der aVF Behandlung auf das Tumorgewicht. (B) Einfluss der aVF Behandlung auf das Tumolvolumen (p = 0,0437).

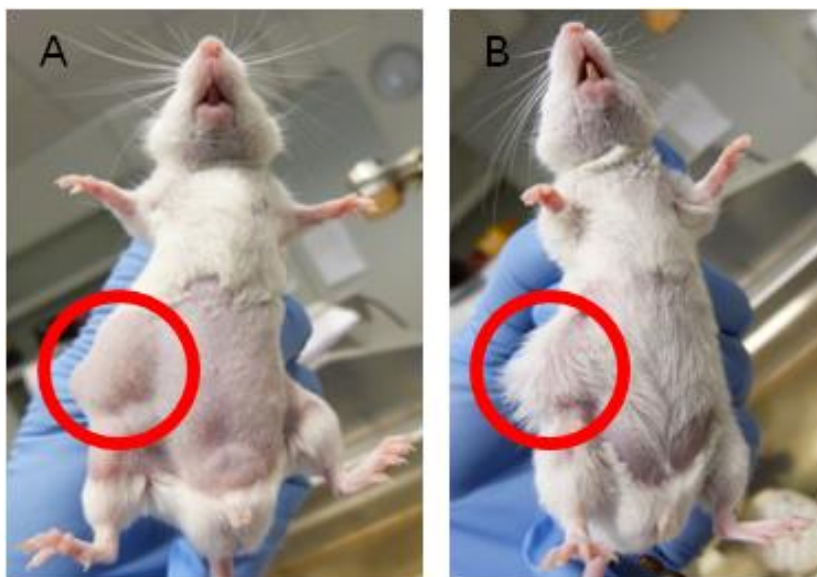


Abb. 44: Beispielhafte Darstellung der Tumoren zweier männlicher Versuchstiere bei Beendigung des Experiments. (A) Placebogruppe; Tumorgewicht 1,992 g. (B) Verumgruppe; Tumorgewicht 1,3805 g.

### 5.6.4 Verlängerung des Gesamtüberlebens

Zur Untersuchung der Beeinflussung des Gesamtüberlebens durch eine Misteltherapie wurden zwei Versuche mit unterschiedlichen aVF Konzentrationen durchgeführt. Es wurden dabei  $1 \times 10^5$  C1300 Zellen/100 $\mu$ l Matrigel s.c. inokuliert.

Die Abbruchgründe wurden wie folgt in Tab. 25 gekennzeichnet:

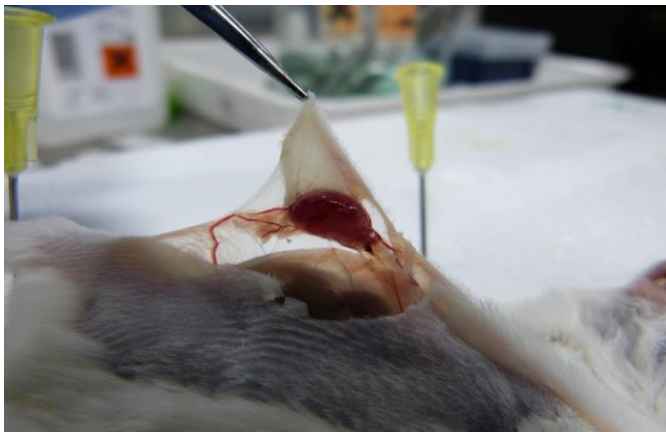
1. Schlechter Habitus
2. Tumorgroße
3. Tumor droht Haut zu durchbrechen

Die Angaben des Alters und des Gewichts beziehen sich auf den Beginn des entsprechenden Versuchs unmittelbar vor der Tumorzellinokulation.

#### Erster Langzeitversuch:

Die Mäuse erhielten einen Tag nach der *subcutanen* Tumorzelleinbettung, je nach eingeteilter Gruppe, 200  $\mu$ l aVF einer Konzentration von 5 mg/ml ( $n = 7$ ), 50 mg/ml ( $n = 7$ ), oder PBS ( $n = 6$ ) als Kontrolle *i. p.* verabreicht. Eine Maus wurde aus dem laufenden Versuch genommen, wenn sie ein Abbruchkriterium (siehe Kapitel 4.10.4) erreicht hatte.

Die *subcutan* applizierten Tumorzellen zeigten einen starken Tumorangang mit gut vaskularisierten Tumoren (Abb. 45).



**Abb. 45: Murines Neuroblastom 13 Tage nach der *subcutanen* Einbettung**

## ERGEBNISSE

**Tab. 25: Ergebnisse des ersten Langzeitversuchs zur Einflussnahme von aVF auf das Gesamtüberleben (Kontr. = Kontrolle/PBS; Mistelkonzentrationen numerisch in [mg/ml]).**

Maus Nr.	Gruppe	Tage im Versuch	Tumorgewicht bei Abbruch [g]	Geschlecht	Alter [Wochen]	Gewicht [g]	Grund des Abbruchs
1	Kontr.	31	1,8025	w	15,6	21,5	2
2	Kontr.	21	2,7469	w	15,6	19,6	2
3	Kontr.	26	2,4708	m	15,6	25,6	2
4	Kontr.	20	3,1695	m	12,4	25,4	2
5	Kontr.	22	1,3040	m	7,4	18,8	3
6	Kontr.	22	2,0560	w	7,4	16,6	2
7	5	20	1,2652	w	15,6	21,6	2
8	5	26	1,8405	w	15,6	20,0	3
9	5	22	2,0150	m	15,6	26,0	2
10	5	21	1,9469	m	15,6	24,0	2
11	5	29	2,2374	w	12,4	17,9	2
12	5	25	2,5402	m	7,4	20,0	2
13	5	20	1,5888	w	7,4	16,3	2
14	50	25	1,0251	w	15,6	21,5	3
15	50	15	0,0562	w	15,6	21,0	1
16	50	17	0,0586	m	15,6	26,6	1
17	50	24	1,0729	m	12,4	25,3	1
18	50	19	/	m	7,4	20,8	1
19	50	14	0,0832	m	7,4	18,2	1
20	50	10	/	w	7,4	14,8	1

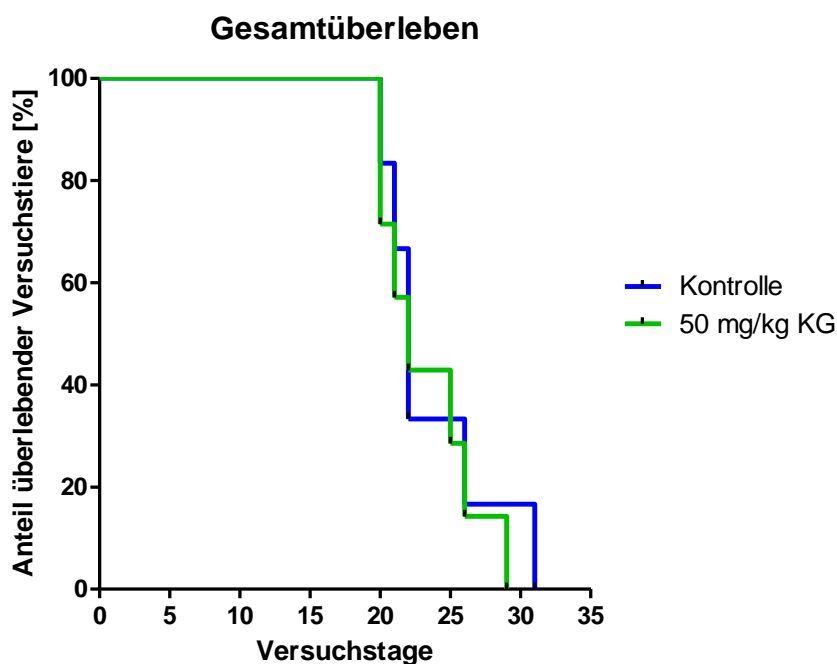
In Tabelle 25 sind die Ergebnisse zu Effekten von aVF auf das Gesamtüberleben der einzelnen Versuchsgruppen zusammengefasst.

Auffällig war, dass in diesem Langzeitexperiment die aVF Konzentration von 50 mg/ml, welche bei einem durchschnittlichen Körpergewicht der Mäuse von 20 g, einer Dosis von 500 mg/kg KG entspricht, von allen Tieren dieser Gruppe sehr schlecht vertragen wurde. Sie fielen alle mit einem reduzierten Allgemeinzustand auf und wurden daher sofort aus

## ERGEBNISSE

dem Versuch genommen. Maus Nr. 20 schied aus diesem Grund als Erste aus dem Versuch aus, eine Bestimmung des Tumorgewichts war aufgrund der Größe des Tumors nicht möglich. Auch bei Maus Nr. 18 war eine Wägung des Tumors nicht möglich. Eine Begutachtung des Organstatus ergab, dass die Tiere aus der 50 mg/ml Gruppe Symptome einer beginnenden Peritonitis aufwiesen. Die *i. p.* Applikation von 200  $\mu$ l dieser Konzentration wurde jedoch in der Kurzzeittherapie gut vertragen. Im nachstehenden Kaplan-Meier Diagramm (Abb. 46) wurde aus den oben genannten Gründen auf eine Darstellung dieser Versuchsgruppe verzichtet.

Geht man von einem durchschnittlichen Gewicht eines Versuchstieres von 20 g aus, entspricht die applizierte Konzentration von 5 mg/ml in einem Volumen von 200  $\mu$ l einer Dosis von 50 mg/kg KG. Die Therapie von tumortragenden Mäusen mit einer Konzentration von 5 mg/ml aVF hatte keinerlei Einfluss auf die Länge des Gesamtüberlebens. Das mediane Überleben der Kontrollgruppe betrug 22 Tage, das mediane Gesamtüberleben der Mistel-behandelten Tiere wurde ebenfalls mit 22 Tagen errechnet.



**Abb. 46:** Auswirkung von niedrig konzentrierten Mistelapplikationen auf die Länge des Gesamtüberlebens im syngenem Neuroblastommausmodell. Die Versuchstiere wurden entweder mit einer Mistelkonzentration von 5 mg/ml (dies entspricht 50 mg/kg KG (n = 7)), oder PBS (n = 6) als Kontrolle *i. p.* behandelt.

## ERGEBNISSE

### Zweiter Langzeitversuch:

Im zweiten Versuch erhielten die Mäuse, einen Tag nach der Einbettung der Neuroblastomzellen, 200 µl aVF einer Konzentration von 10 mg/ml (n = 3), 20 mg/ml (n = 4), oder PBS (n = 3) als Kontrolle. Eine Maus wurde aus dem laufenden Versuch genommen, wenn sie ein Abbruchkriterium (siehe Kapitel 4.10.4) erreicht hatte.

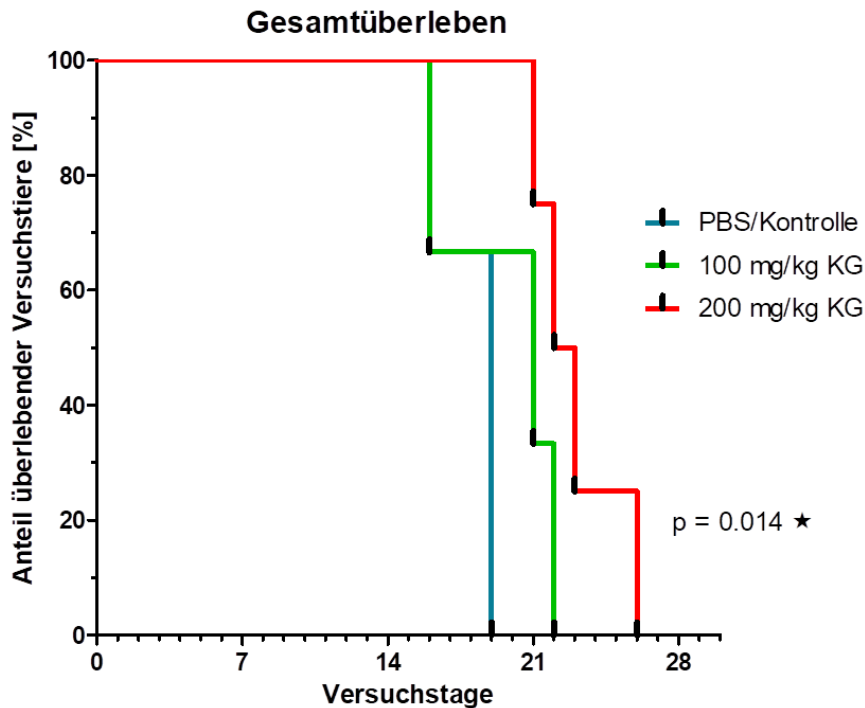
**Tab. 26: Ergebnisse des zweiten Langzeitversuchs zur Einflussnahme von aVF auf das Gesamtüberleben (Kontr. = Kontrolle/PBS; Mistelkonzentrationen numerisch in [mg/ml]).**

Maus Nr.	Gruppe	Tage im Versuch	Tumor-gewicht [g]	Ge-schlecht	Alter [Wochen]	Gewicht [g]	Grund des Abbruchs
1	Kontr.	19	1,700	m	10,7	23	2
2	Kontr.	19	2,806	w	10,7	17	2
3	Kontr.	16	1,128	w	10,7	20	2
4	10	22	2,102	m	10,7	21	2
5	10	16	1,317	w	10,7	21	2
6	10	21	2,821	w	10,7	19	2
7	20	22	2,573	m	10,7	23	2
8	20	23	4,900	m	10,7	26	2
9	20	26	2,483	w	10,7	20	2
10	20	21	3,922	w	10,7	20	2

In diesem Versuch wurde auch die höchste applizierte Dosis von 20 mg/ml von allen Tieren gut vertragen. Der Versuch erstreckte sich über insgesamt 26 Tage. Der Grund des Versuchsabbruchs war bei allen Mäusen die Größe des Tumors (Tab. 26). Dabei überlebten die Versuchstiere der 20 mg/ml Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant am längsten (Abb. 47). Das mediane Überleben betrug in dieser Gruppe 22,5 Tage. Das Gesamtüberleben verlängerte sich in der 10 mg/ml Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zwar um zwei Tage, dies erreichte allerdings keine statistische Signifikanz. Das mediane Überleben lag in der 10 mg/ml Gruppe bei 21 Tagen und in der Gruppe, die PBS zur Kontrolle appliziert bekam, bei 19 Tagen.

Geht man erneut von einem durchschnittlichen Gewicht eines Versuchstieres von 20 g aus, entspricht die applizierte aVF Konzentration von 10 mg/ml in einem Volumen von 200 µl einer Dosis von 100 mg/kg KG und eine Konzentration von 20 mg/ml wiederum einer Dosis von 200 mg/kg KG.





**Abb. 47: Auswirkung von mittelstark dosiertem aVF (10 mg/ml und 20 mg/ml) auf die Länge des Gesamtüberlebens. Die Konzentrationen wurden hierbei gut toleriert. Es kam zu keinem Versuchsabbruch durch Unverträglichkeit. Die Versuchstiere die eine Dosis von 200 mg/kg KG aVF (20 mg/ml) erhielten (n = 4), überlebten mit einer statistischen Signifikanz länger (p = 0,014) als die Kontrollgruppe (n = 3).**

#### 5.6.4.1 Auswirkung der Mistelbehandlung auf die Körpertemperatur der Mäuse

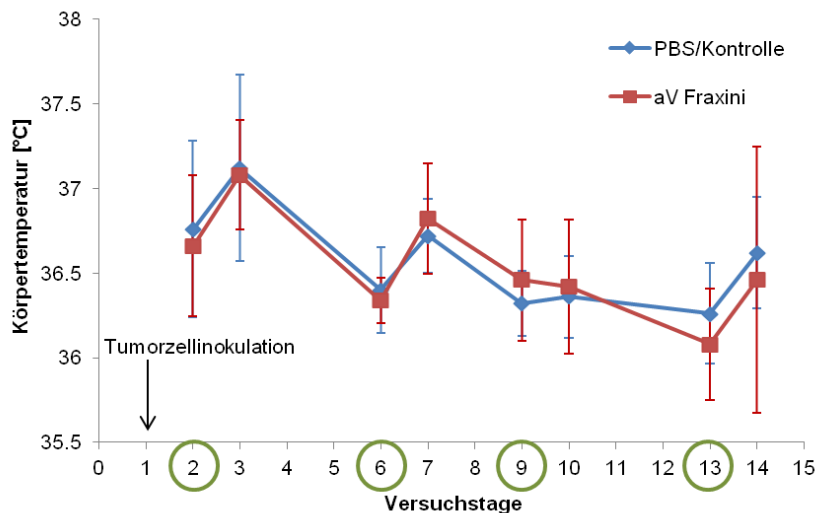
Da eine häufig beschriebene Nebenwirkung von Misteltherapien beim Menschen in einer Fieberreaktion besteht, wurde die Temperatur der Versuchstiere ab dem Zeitpunkt der Wirkstoffapplikation durch Messung mit einem Infrarotthermometer an der frei rasierten Bauchseite bestimmt. Hier sollte überprüft werden, ob es auch im Tiermodell zu einer Temperaturerhöhung durch Mistelgabe kommt. Aus den bei dem Versuch zur Einflussnahme von aVF auf Tumorgewicht- und volumen bestimmten Körpertemperaturen wurde eine Fieberkurve erstellt (Abb. 48).

Mäuse besitzen eine Basaltemperatur von 36,5–37,2 °C. Bei höheren Körperkerntemperaturen von 37,8–39,3 °C haben Mäuse Fieber.

Als Resultat dieser Untersuchung konnte keine Beeinflussung der Misteltherapie auf die Temperatur der Hautoberfläche an der Bauchseite festgestellt werden. Die

## ERGEBNISSE

Temperaturverläufe waren nahezu synchron und zeigten sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Verumgruppe zu keinem Zeitpunkt eine Temperatur über 37,2 °C. Die höchsten Temperaturwerte wurden an Versuchstag 3 beobachtet. Hier wurde bei den mit Mistel behandelten Tieren eine Temperatur von durchschnittlich 37,08 °C gemessen, allerdings betrug die Körpertemperatur der Kontrolltiere ebenfalls 37,12 °C.



**Abb. 48: Fieberkurve des Versuchs zur Analyse der Effekte von aVF auf Tumorgewicht,- und volumen (Kapitel 5.6.3). Die Misteltherapie erfolgte 24 h nach *subcutaner* Einbettung der murinen Neuroblastomzelllinie C1300. Versuchstage, an denen eine Mistelinjektion verabreicht wurde (Versuchstag 2, 6, 9 und 13), sind mit einem grünen Kreis markiert.**

### 5.6.4.2 Beeinflussung von Blutparametern im Langzeitexperiment

In den Versuchen zur Beeinflussung des Tumorgewichts- und volumens durch eine Misteltherapie (siehe Kapitel 5.6.3) konnte durch eine kurzzeitige Hochdosismisteltherapie (500 mg/kg KG) keine immunologische Reaktion in Form einer Fieberreaktion festgestellt werden. Durch stichprobenartige Überprüfung wurde im Versuch zur Beeinflussung des Gesamtüberlebens (Kapitel 5.6.4) kontrolliert, ob eine niedrig dosierte Gabe von 200 µl einer Konzentration von 5 mg/ml aVF eine Veränderung von Blutparametern im Vergleich zur Kontrolle, die mit PBS behandelt wurden, bewirkt. Die Blutgewinnung erfolgte einmalig an Versuchstag 24 h durch Punktion des retrobulbären Venenplexus.

Die Stichprobe ergab auch hier keine immunologische Veränderung in Bezug auf die Leukozytenanzahl (Tab. 27). Lediglich der prozentuale Anteil an Monozyten stieg leicht

## ERGEBNISSE

innerhalb der Leukozytenfraktion bei mit Mistel behandelten (50 mg/kg KG) Versuchstieren an.

**Tab. 27: Blutwerte der aVF 5 mg/ml (50 mg/kg KG) Gruppe im Vergleich zur PBS behandelten Kontrolle:**

Laborwert	Maus Nr. 15 Therapie: PBS/Kontrolle	Maus Nr. 12 Therapie: 50 mg/kg KG	Maus Nr. 8 Therapie: 50 mg/kg KG	Einheit	Legende
WBC	8,5	7,4	7,5	10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	Leukozyten
RBC	9,36	9,13	10,06	10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	Erythrozyten
HGB	14,6	13,9	15	g/dl	Hämoglobin
HCT	49,2	49,8	54,1	%	Hämatokrit
PLT	1978	1843	1705	10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	Thrombozyten
MCV	53	55	54	µm <sup>3</sup>	mittleres Erythrozytenvolumen
MCH	15,6	15,2	14,9	pg	mittlerer Hämoglobingehalt pro Erythrozyt
MCHC	29,7	27,9	27,7	g/dl	mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
RDW	11,8	11,2	11,6	%	Erythrozytenverteilungsbreite
MPV	4,8	5,1	5	µm <sup>3</sup>	mittleres Thrombozytenvolumen
<b>Diff:</b>					
% LYM	50,2	46,3	52,8	%	Lymphozytenanteil
% MO	6,5	8,7	8,1	%	Monozytenanteil
% GRA	43,3	45	39,1	%	Granulozytenanteil
#LYM	4,2	3,4	3,9	10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	Lymphozytenzahl/µl
#MO	0,5	0,6	0,6	10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	Monozytenzahl/µl
#GRA	3,8	3,4	3	10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	Granulozytenzahl/µl

## 6 DISKUSSION

Extrakte der Mistel *Viscum album L.* werden seit rund 100 Jahren bei onkologischen Erkrankungen eingesetzt. Trotz der häufigen Anwendung von Mistelbehandlungen als komplementäre Therapieform, speziell in europäischen Ländern, gibt es nur wenige Untersuchungen zur Effektivität und Sicherheit einer Mistelbehandlung in der Kinderonkologie.

In der vorliegenden Studie wurden daher die antitumorale Wirkungen auf pädiatrische Tumorzellen mit speziellem Focus auf Neuroblastom- und Medulloblastomzelllinien, des lektinreichen und häufig applizierten Mistelextraktes abnobaVISCUM Fraxini (aVF) einer präklinischen Evaluierung, hinsichtlich der Wirksamkeit *in vitro und in vivo*, unterzogen.

Mistelapplikationen werden in der Regel zusätzlich zur konventionellen Chemo- und Radiotherapie angewendet. Ein onkologisches Therapiekonzept beinhaltet in der Regel eine Polychemotherapie, zum einen um die Wirksamkeit des einzelnen Zytostatikums durch synergistische Effekte zu unterstützen, aber auch um die Nebenwirkungen einer einzelnen Substanz zu minimieren und die Entstehung von Resistenzen vorzubeugen. Dies birgt jedoch auch das Risiko von Interaktionen. Wechselwirkungen zwischen Chemotherapeutika und anderen Arzneimitteln sind aufgrund der geringen therapeutischen Breite und akuten Toxizität der Zytostatika von großer klinischer Bedeutung und sind gerade in der Pädiatrie mit Hinblick auf behandlungsbedingte Langzeitschäden von enormer Wichtigkeit. Diese Wechselwirkungen können sowohl die Wirkung der konventionellen Therapien verstärken, als auch abschwächen und können somit für den Therapieerfolg entscheidend sein. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Interaktionen von Mistelbehandlungen mit einer Chemotherapie oder Bestrahlung auf Neuroblastomzellen untersucht, um zum Sicherheitsprofil von Mistelanwendungen in der pädiatrischen Onkologie beizutragen.

### 6.1 Untersuchung der Zytotoxizität verschiedener Mistelpräparate

Die Glykosylierung, bei der Kohlenhydrate kovalent mithilfe verschiedener Glykosyltransferasen an Proteine gebunden werden, stellt eine der häufigsten posttranslationalen Modifikationen dar. Die Glykane beeinflussen die physikochemischen Eigenschaften der Proteine, wie Faltung und Löslichkeit und spielen eine entscheidende Rolle bei zellulären Erkennungsereignissen wie der Zelladhäsion, Zell-Zell-Kommunikation und Rezeptor-Ligand-Interaktionen (Yang et al., 2011).

## DISKUSSION

Mistellektin-I wurde ursprünglich als D-Galactose spezifisch beschrieben, weitere Untersuchungen von Müthing et al. zeigen jedoch, dass die B-Kette präferenziell an  $\alpha$ 2,6-sialylierte Neolacto-Ganglioside bindet (Müthing et al., 2002). In vielen Tumorentitäten findet sich ein verändertes Glykosylierungsmuster der Tumorzellen, wobei es sowohl zu einer krebsassoziierten Über- und Unterexpression als auch Neoexpression von Glykanen kommen kann, die normalerweise auf embryonales Gewebe beschränkt sind (Dube, Bertozzi, 2005). Ein häufiges Ereignis der aberranten Glykosylierung auf Krebszellen stellt dabei die Hypersialylierung dar, die mit Krankheitsstadium und Prognose in Verbindung gebracht werden kann (Rodrigues, Macauley, 2018).

In der vorliegenden Arbeit konnten zum ersten Mal die Wirkungen des lektinreichen Extraktes *abnobaVISCUM Fraxini* (aVF) auf Tumorzelllinien verschiedener pädiatrischer und adulter Tumorentitäten vergleichend analysiert werden (Kapitel 5.1.2). Es konnte eine dosisabhängige Zytotoxizität beobachtet werden. Dabei waren alle untersuchten Tumorzellen empfänglicher gegenüber einer Behandlung mit dem Mistelpräparat aVF als normale humane Fibroblasten. Die Tumorzellen des pädiatrischen Zelllinien-Panels reagierten empfindlicher auf eine Behandlung mit aVF als die adulten Krebszellen. Es konnte keine Tumorentität ausgemacht werden, die besonders empfindlich respektive resistent gegenüber aVF war. Das Ansprechen und die Effizienz schienen eher abhängig von der entsprechenden Zelllinie zu sein. Dies kann möglicherweise mit dem unterschiedlichen Glykosylierungsmuster der Zelllinien zusammenhängen. Weitere Untersuchungen sollten diese Kausalität klären.

In der Literatur finden sich mehrere Berichte darüber, dass Mistelextrakte, die von verschiedenen Wirtsbäumen gewonnen werden, sich in ihrer Zytotoxizität unterscheiden und dass die Effekte mit dem Lektin Gehalt der Präparate korrelieren (Büssing, Schietzel, 1999; Hülsen et al., 1986).

Um die Wirksamkeit, des in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten Mistelextraktes aVF, auf Tumorzelllinien verschiedener Tumorentitäten auch im Vergleich zu anderen Mistelpräparaten abschätzen zu können, wurden die  $IC_{50}$ -Werte der Mistelpräparate *Iscucin Tiliae* und *Iscucin Pini* mit den  $IC_{50}$  Werten von aVF in Verhältnis gesetzt (Kapitel 5.1.3). Zudem sollte untersucht werden, ob der Gesamtlektin Gehalt mit der gefundenen Zytotoxizität korreliert. Daher wurde zunächst der Lektin Gehalt aller Präparate durch einen Sandwich ELISA bestimmt (Kapitel 5.1.1).

*Iscucin*-Präparaten werden im klinischen Alltag im Gegensatz zu aVF vergleichsweise selten für onkologische Erkrankungen eingesetzt. Bei ihrer Anwendung stehen die immunmodulatorischen Eigenschaften der Arzneimittel im Vordergrund.

## DISKUSSION

Die Iscucine werden aus getrocknetem Pflanzenmaterial durch Mazeration hergestellt. Bei aVF hingegen handelt es sich um einen Frischpflanzenpresssaft. Die Mistelpräparate unterscheiden sich somit nicht nur durch ihren Gesamtlektiningehalt, sondern auch durch ihre unterschiedlichen Herstellungsverfahren. Da es sich bei Mistelextrakten um Vielstoffgemische unterschiedlicher pharmakologisch aktiver Substanzen handelt, können sich die drei untersuchten Mistelpräparate neben dem Gesamtlektiningehalt auch durch das Muster weiterer Inhaltsstoffe voneinander unterscheiden.

Vergleicht man die mittleren  $IC_{50}$ -Werte eines mit aVF behandelten Zelllinien-Panels (pädiatrisch,  $IC_{50} = 0,238$  mg/ml; adult,  $IC_{50} = 0,581$  mg/ml) mit denen von Iscucin Tiliae (pädiatrisch,  $IC_{50} = 0,314$  mg/ml; adult,  $IC_{50} = 1,146$  mg/ml) und Iscucin Pini (pädiatrisch,  $IC_{50} = 8,16$  mg/ml; adult,  $IC_{50} = 16,07$  mg/ml), so konnte ein Zusammenhang zwischen den gemessenen Gesamtlektiningehalten und der beobachteten Zytotoxizität hergestellt werden. Der Lektiningehalt der verwendeten Charge 404 A24 von aVF war mit  $12,46$   $\mu$ g/ml durchschnittlich 1,5-mal so hoch wie von Iscucin Tiliae (gemessener Gesamtlektiningehalt  $8,1$   $\mu$ g/ml). Dabei wirkte das aVF auf pädiatrische Tumorzelllinien durchschnittlich 1,3-mal potenter und auf adulte Tumorzellen 2-mal stärker als Iscucin Tiliae.

Bei der Untersuchung der antitumoralen Wirkungen von Iscucinen verschiedener Wirtsbäume auf Medulloblastomzelllinien konnten Zuzak et al. ebenfalls eine Abhängigkeit der zytotoxischen Eigenschaften vom Gesamtlektiningehalt der Präparate zeigen (Zuzak et al., 2006). Hierbei konnte das lektinreiche Iscucin Tiliae die stärksten Effekte auf Daoy Zellen erzielen, während die beiden lektinärmeren Iscucine, Pini und Abietis, die geringste Effektivität zeigten.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit ein Zusammenhang zwischen der Lektinkonzentration der Präparate und der gemessenen Zytotoxizität bestätigt werden. Iscucin Tiliae und aVF wiesen in allen untersuchten Tumorzellen niedrigere  $IC_{50}$ -Werte als Iscucin Pini auf.

Jedoch konnte eine absolute Korrelation nicht beobachtet werden. So enthält die Zubereitung aVF eine durchschnittliche 6,5-mal höhere Gesamtlektinkonzentration als Iscucin Pini (gemessener Gesamtlektiningehalt  $1,9$   $\mu$ g/ml), aber aVF wirkt 34-mal effektiver auf pädiatrische- und 28-mal stärker auf adulte Tumorzellen.

Möglicherweise beeinflussen weitere sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe die zytotoxische Wirkung. Auch das Lektinmuster könnte die Unterschiede in der zytotoxischen Effektivität zwischen den Laubbaummisteln und den Kiefernmisteln erklären. So enthalten Kiefernmisteln höhere Gehalte an ML-II und III, während in Laubbaummisteln das ML-I

## DISKUSSION

vorrangig zu finden ist (Scheer et al., 1995). Auch Thies et al. beschrieben ML-I als zytotoxischer gegenüber Melanomzellen, als ML-II und ML-III (Thies et al., 2005).

Hieraus kann geschlussfolgert werden, dass die Stärke der zytotoxischen Effekte von Mistelzubereitungen auf Tumorzellen nicht allein auf den Gesamtlektiningehalt zurückzuführen ist.

### **6.2 Charakterisierung antiproliferativer Effekte von aVF**

In den weiteren Untersuchungen wurde ein Focus auf die Neuroblastomzellen SH-SY5Y und Kelly und die Medulloblastomzelllinien ONS-76 und Daoy gelegt.

Durch eine Behandlung mit seriellen aVF Verdünnungen und Bestimmung der Zellviabilität nach einer Inkubationszeit von 72 h konnte anhand der  $IC_{50}$ -Werte festgestellt werden, dass beide Neuroblastomzelllinien empfindlicher auf eine Mistelbehandlung reagierten als die beiden Medulloblastomzelllinien (Kapitel 5.1.2). Diese Beobachtung konnte durch den xCELLigence-assay, welcher die Parameter Proliferation, Adhärenz und Spreitung gleichzeitig untersucht und in Form eines dimensionslosen Wertes präsentiert, verdeutlicht werden (Kapitel 5.1.5).

Dabei reagierte die Zelllinie ONS-76 am unempfindlichsten auf eine aVF Exposition. Der  $IC_{50}$ -Wert lag mit 0,577 mg/ml um das 2,6-fache höher als der  $IC_{50}$ -Wert von Daoy (0,224 mg/ml). Die Zelllinien SH-SY5Y und Kelly wiesen  $IC_{50}$ -Werte von 0,097 bzw. 0,057 mg/ml auf. Während Mistelkonzentrationen von 0,05 mg/ml in SH-SY5Y, Kelly und Daoy Zellen zu einem sofortigen Abfall der Kurve im xCELLigence-assay führten, reagierten ONS-76 Zellen mit einem zwar verlangsamten, jedoch stetigen Anstieg der Kurve.

Die Unterschiede in der Sensitivität der untersuchten Neuroblastom- und Medulloblastomzelllinien gegenüber einer Behandlung mit aVF, wurden weiterhin durch einen BrdU-assay untermauert, bei dem es, mit Ausnahme der ONS-76 Zellen, bei den Zelllinien SH-SY5Y, Kelly und Daoy zu einer signifikanten Verminderung der Proliferation durch eine Mistelkonzentration von 0,5 mg/ml kam (Kapitel 5.1.4).

### 6.2.1 Charakterisierung des durch aVF ausgelösten Zelltodes

Die Auslösung des programmierten Zelltods (Apoptose) in Tumorzellen durch eine Behandlung mit Mistelextrakten wurde bereits von mehreren Autoren beschrieben. Eine umfangreiche Übersichtsarbeit findet sich von Arndt Büssing (Büssing, 1996).

In der vorliegenden Arbeit konnten durch aVF ausgelöste, konzentrationsabhängige Apoptose-induzierende Effekte auf alle der vier untersuchten Neuroblastom- und Medulloblastomzelllinien nachgewiesen werden (Kapitel 5.2.1).

So kam es nach einer Behandlungszeit von 48 h mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml aVF in den Zelllinien Daoy, SH-SY5Y und Kelly zu einem signifikanten Anstieg des Anteils von Zellen in der subG1 Phase des DNA-Histogramms. Auch in ONS-76 Zellen kam es zur Induktion von Apoptose. Eine Überprüfung der Caspase-abhängigkeit durch Zugabe eines PAN-Caspase Inhibitors konnte für alle Zelllinien eine Caspase-abhängigkeit der durch aVF getriggerten Apoptose demonstrieren (Kapitel 5.2.2).

Diese Beobachtung steht im Einklang mit Untersuchungen von Kleinsimon et al., bei denen ebenfalls eine caspase-abhängige Apoptoseinduktion durch Mistelextrakte in den Osteosarkomzelllinien Saos-2 und 143B beobachtet werden konnte (Kleinsimon et al., 2017). Auch Stammer et al. konnten für die Alveoläre Rhabdomyosarkom Zelllinie RMS-13 eine caspase-abhängige Apoptoseinduktion (Stammer et al., 2017) detektieren.

Um die zugrunde liegenden Apoptosemechanismen genauer zu untersuchen, wurde die Induktion der Hauptapoptosewege in dieser Arbeit weiter analysiert. Im Caspase-Glo-assay konnte eine signifikant erhöhte Aktivität der Caspase-8 bei der Medulloblastomzelllinie Daoy gemessen werden (Kapitel 5.2.3) und auch in der qPCR stiegen die mRNA Level in dieser Zelllinie für Caspase-8 signifikant an (Kapitel 5.2.4). Die Caspase-9 Aktivität stieg in Daoy zwar ebenfalls an, allerdings wurde die Caspase-9 mRNA Konzentration nicht beeinflusst. Die zweite untersuchte Medulloblastomzelllinie ONS-76 zeigte für beide Initiatorcaspasen einen signifikanten Aktivitätsverlust, wobei es zu einem Anstieg der Caspase-8 mRNA Level kam. Hieraus kann geschlossen werden, dass in Medulloblastomzellen durch eine Mistelbehandlung sowohl der intrinsische, als auch der extrinsische Apoptoseweg induziert wird, wobei dem Caspase-8 Signalweg eine stärkere Rolle zuzukommen scheint.

Die Caspase-8 defizienten Neuroblastomzellen reagierten beide durch einen dosisabhängigen Anstieg der Caspase-9 Aktivität, als auch durch einen signifikanten und ebenfalls dosisabhängigen Anstieg der Caspase-9 mRNA Expression.



## DISKUSSION

Auch andere Autoren fanden für *Viscum* Extrakte bzw. isoliertes Mistellektin-I eine Induktion sowohl des intrinsischen, als auch des extrinsischen Signalweges (Bantel et al., 1999; Delebinski et al., 2015; Kleinsimon et al., 2017; Stammer et al., 2017). Interessant dabei war, dass die Aktivitätserhöhung der entsprechenden Caspasen von der jeweiligen Zelllinie abhängig war. So wurde in RMS-13 (Alveoläres Rhabdomyosarkom) durch eine Behandlung mit *Viscum* Extrakt eine stärkere Aktivität der Caspase-8 gegenüber der Caspase-9 gemessen (Stammer et al., 2017), ebenso in 143B und Saos-2 Zellen (Osteosarkom) (Kleinsimon et al., 2017). Delebinski et al. fanden in HL-60 Zellen eine äquivalente Aktivitätserhöhung beider Caspasen nach einer Behandlungszeit von 18 h (Delebinski et al., 2015) und auch Twardziok et al. konnten eine nahezu gleichwertige Aktivitätserhöhung der Caspasen-8 und -9 in TC-71 und MHH-ES-1 Ewing Sarkom Zellen nach 24-stündiger *Viscum* Extrakt Exposition nachweisen (Twardziok et al., 2016). Darüber hinaus beschrieben Bantel et al. eine Caspase-8 Induktion durch isoliertes ML-I, die unabhängig von CD95 oder anderen Todesrezeptoren verläuft (Bantel et al., 1999). Alle letztgenannten Autoren konnten ferner einen dosisabhängigen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials durch *Viscum* Extrakt bzw. ML-I beobachten.

Diese Ergebnisse konnten wiederum durch die vorliegende Arbeit bestätigt werden, indem sowohl für die Neuroblastomzelllinien Kelly und SH-SY5Y, als auch für die Medulloblastomzelllinien Daoy und ONS-76 eine Verringerung der mitochondrialen Vitalität durch aVF gezeigt werden konnte (Kapitel 5.2.6). Die Beeinflussung des mitochondrialen Signalweges ist ein weiterer Hinweis auf die Induktion und Involvierung der intrinsischen Apoptose während einer Misteltherapie.

Auswirkungen von aVF auf die Caspasen-8 und -9, sowie auf die Spaltung von PARP, als Marker für eine Apoptoseinduktion auf Proteinebene, konnten in dieser Arbeit nicht eindeutig beantwortet werden (Kapitel 5.2.5). Zwar konnte nach einer Inkubationszeit von 24 h ein PARP-Spaltprodukt in der Medulloblastomzelllinie D341 durch Behandlung mit aVF in einer Konzentration von 0,5 mg/ml detektiert werden und die Proteinbande der intakten Procaspase-9 verschwand in Daoy und verblasste in ONS-76 Zellen, aber Spaltprodukte der Caspase-9 und ebenfalls der Caspase-8 konnten nicht nachgewiesen werden.

In der Studie von Bantel et al. kam es nach einer Expositionszeit von 5–6 h mit ML-I zu einer nachweisbaren Spaltung der Procaspasen-8 und -9 in Jurkat Zellen (immortalisierte T-Lymphozyten-Zelllinie) (Bantel et al., 1999). Eine Analyse von Spaltprodukten dieser Caspasen nach einer Zeit von 24 h in der vorliegenden Arbeit könnte daher ungeeignet und der Untersuchungszeitpunkt zu spät gewählt sein.

## DISKUSSION

Die in dieser Arbeit aufgezeigten apoptotischen Vorgänge könnten ein charakteristisches Merkmal von Pflanzenlektinen sein, da eine vergleichbare Apoptoseinduktion von Gastman et al. auch für Weizenlektin (WGA) beschrieben wurde (Gastman et al., 2004). Auch hier wurde die Apoptose über den mitochondrialen Signalweg getriggert und war unabhängig von Fas. Unter einer Behandlung mit WGA kam es zu einem Verlust der mitochondrialen Integrität und einer Aktivierung der Caspase-9. Weiterhin konnte in einer Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2017 durch Shi et al. ein Modell einer für eine Gruppe von zwölf Pflanzenlektinfamilien gemeinsamen Apoptoseinduktion präsentiert werden (Shi et al., 2017). Die Mistellektine wurden dabei zur Ricin-B Familie gerechnet. Dabei beschreiben die Autoren drei Hauptsignalwege der Apoptoseinitiierung durch die Lektine: direkte Ribosomeninaktivierung, Endozytose-abhängige mitochondriale Dysfunktion und eine Bindung an Zuckerliganden von Zelloberflächen.

### **6.2.2 Antimetastatische Eigenschaften des Mistelextraktes aVF**

Die Loslösung von Tumorzellen aus dem Primärtumor und die lokale Invasion in benachbarte Regionen stellen den ersten Schritt eines kaskadenartigen Prozesses dar, der schließlich zu einer lymphogenen, oder hämatogenen Metastasierung mit Bildung eines Sekundärtumors führt. Es kommt dabei zu einer Wanderung (Migration) der neoplastischen Zellen in funktionell unterschiedliche Kompartimente durch Lyse und Penetration der extrazellulären Matrix mithilfe von Integrinen und Matrixmetalloproteasen (MMP). Die Verhinderung einer Tumorzellabsiedelung vom Primärtumor ist in sofern von enormer Wichtigkeit, da 90 % aller Krebspatienten an einer Metastasierung versterben (Chaffer, Weinberg, 2011).

In dieser Arbeit wurde das *in vitro* Potenzial des Mistelextraktes aVF auf die Migration und Invasion von Neuroblastom- und Medulloblastomzelllinien untersucht. Dabei wurden Einflüsse einer Mistelbehandlung auf die Invasivität der Tumorzellen mithilfe des Boyden Chamber Transwell-assays untersucht. Auswirkungen auf die Migration der Zellen wurden ebenfalls mit einem modifizierten Boyden Chamber assay analysiert, bei dem die poröse Membran nicht mit einer Matrigelschicht überzogen war (Kapitel 5.3.1). Zusätzlich wurde die Migration mit dem Scratch Wundheilungs-assay untersucht (Kapitel 5.3.2).

In den Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Migration im Scratch Wundheilungs-assay durch eine 24-stündige Behandlung mit aVF einer Konzentration von 0,05 mg/ml in allen untersuchten Zelllinien signifikant reduzieren konnte.

## DISKUSSION

Auch im Boyden Chamber Migrations-assay konnte die Wanderungstendenz aller Tumorzellen 24 h nach der Behandlung mit einer Misteldosis von 0,05 mg/ml in allen untersuchten Tumorzelllinien vermindert werden, jedoch war dies nur für bei ONS-76, SH-SY5Y und Kelly statistisch signifikant.

Weiterhin konnte die Invasivität in allen vier Zelllinien durch aVF einer Konzentration von 0,05 mg/ml herabgesetzt werden. Auch hier konnte nur für die Zelllinie Daoy keine statistische Signifikanz erreicht werden. Bemerkenswert ist hierbei, dass der Mistelextrakt die invasiven Eigenschaften in ONS-76 Zellen um 54 %, in Daoy Zellen jedoch nur um 8,2 % reduzierte, obwohl ONS-76 Zellen, im Vergleich zu Daoy, als stärker invasiv beschrieben wurden (Zanini et al., 2013).

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen antimetastatischen Eigenschaften des Mistelextraktes auf Medulloblastom und Neuroblastomzellen stehen im Einklang mit früheren Studienergebnissen an anderen Tumorzelllinien. So konnten Podlech et al. eine signifikante Verminderung der *in vitro* Migration und Invasion des lektinreichen Mistelpräparates Iscador Q (Iscador AG, Lörrach) auf die humane Glioblastomzelllinie LNT-229 und die murine Astrozytomzelllinie SMA-560 im Boyden Chamber Migrationsversuch nach einer Behandlungszeit von 24 h zeigen (Podlech et al., 2012). Die Autoren erklären sich diese Effekte durch eine reduzierte Expression und Aktivität von MMP-2 und MMP-9 und einer Herunterregulation von TIMP-2 auf Proteinebene, welches als Aktivator von MMP-2 fungieren kann. Des Weiteren konnten die *in vitro* beobachteten antimetastatischen Wirkungen wässriger Mistelextrakte und auch von reinem ML-I auch *in vivo* bestätigt werden (Beuth et al., 1991; Braun et al., 2001). Die Autoren konnten für die Präparate Helixor ME-A und ME-P (Helixor Arzneimittel GmbH) einen dosisabhängigen und statistisch signifikanten Rückgang der pulmonalen und hepatischen metastatischen Besiedlung nach intravenöser Inokulation von Lymphosarkom RAW 117-H10 und L-1 Sarkom Zellen in BALB/c Mäuse beobachten. Die Tiere wurden 24 h nach der Tumorzellinjektion *s. c.* oder *i. p.* mit den Mistelextrakten behandelt.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit nachgewiesen werden, dass bereits geringe Konzentrationen von aVF (0,05 mg/ml) eine Hemmung der Zellmotilität in den untersuchten pädiatrischen Tumorzelllinien bewirken.

### **6.3 Analyse möglicher Interaktionen zwischen aVF und einer Chemotherapie**

#### **6.3.1 Effekte von aVF auf zytostatikaresistente Neuroblastomzelllinien**

Ein onkologisches Therapieregime ist oft dadurch gekennzeichnet, dass mehrere Medikamente gleichzeitig eingesetzt werden (Polychemotherapie). Von einer Kombination chemisch unterschiedlicher Arzneistoffe mit verschiedenen Angriffszielen an den Tumorzelle verspricht man sich eine bessere Wirksamkeit, eine Vermeidung der Resistenzentstehung durch Induktion von „Bypass-Mechanismen“, eine Überwindung bestehender Resistenzen und eine Dosisreduktion der Arzneimittel in der Kombination (Cadagan, Merry, 2013). Bei der gleichzeitigen Verabreichung mehrerer Arzneistoffe ist immer mit Interaktionen zu rechnen. Dies trifft auch auf pflanzliche Arzneimittel zu. In der Literatur sind zahlreiche Wechselwirkungen zwischen phytopharmazeutischen Zubereitungen oder CAM und konventionell eingesetzten Wirkstoffen dokumentiert (Haefeli, Carls, 2014; Izzo, Ernst, 2009; Moses, McGuire, 2010). Ein Synergismus der Arzneimittelinteraktion wird dabei definiert als eine Wechselwirkung zwischen zwei oder mehreren Medikamenten, die darin resultiert dass die Gesamtwirkung der Medikamente größer ist als die Summe der Einzelwirkungen (Tallarida, 2011). Aufgrund ihres medizinischen Potenzials werden synergistische Wirkstoffpaare sowohl durch experimentelle als auch durch theoretische Ansätze gesucht (Cokol et al., 2011). Eine synergistische Wechselwirkung kann dabei vorteilhaft oder schädlich sein. So kann es zu einer gegenseitigen Verstärkung der Arzneimittelleffekte kommen, jedoch sind ebenso abschwächende Interaktionen möglich, die den Therapieerfolg gefährden können. Speziell in der Kinderonkologie sollte nicht nur die akute Toxizität der applizierten Zytostatika und ihre enge therapeutische Breite bedacht werden, denn sie beherbergen ein besonderes Risiko für schwere unerwünschte Arzneimittelwirkungen. Auch mögliche Spätfolgen der Therapie wie z. B. Nephro- Kardio- Oto- Hepatotoxizität, Infertilität und kognitive Einschränkungen, haben eine große Tragweite (Landier et al., 2004). Die Erkennung und Dokumentation von Arzneimittelwechselwirkungen sind daher essenziell.

Um klinisch relevante Wechselwirkungen zwischen dem Mistelextrakt aVF und konventioneller Chemotherapie (Etoposid und Cisplatin) auf Neuroblastomzellen zu untersuchen, wurden kombinatorische Effekte in Bezug auf die Zytotoxizität in der etablierte Zelllinie LAN-1 und daraus gegenüber Etoposid bzw. Cisplatin resistent gezüchteten Subzelllinien durch Verwendung der Softwarepakete CompuSyn und Combebenefit analysiert. Mit ihrer Hilfe kann das Ausmaß der kombinierten Effekte auf Basis unterschiedlicher Referenzmodelle berechnet und quantifiziert werden. So werden

## DISKUSSION

Interaktionen zwischen mehreren Wirkstoffen entweder als synergistisch oder antagonistisch eingestuft, je nachdem, wie sehr sich die beobachtete Kombinationsreaktion von der erwarteten Reaktion unter der Nullhypothese, dass die beiden Substanzen nicht interagieren, unterscheidet (Tang et al., 2015). Drei der populärsten Modelle, Loewe-Additivität, Bliss-Unabhängigkeit und HSA, sind in das Softwareprogramm Combenefit implementiert (Di Veroli et al., 2016). Das Softwareprogramm CompuSyn arbeitet mit der Methode nach Chou et al. (Chou, Martin, 2004).

Dabei führen die Modelle aufgrund inhärenter Unterschiede der empirischen oder biologischen Modellannahmen allerdings unweigerlich zu einer Inkonsistenz bei der Quantifizierung des Grades der Interaktion (Tang et al., 2015).

Als Ergebnis ließ sich feststellen, dass die unterschiedlichen Modelle überwiegend additive bis synergistische Kombinationsverhältnisse auf die Ursprungszelllinie LAN-1 und beide chemotherapie-resistent gezüchteten Subzelllinien identifizieren konnten (Kapitel 5.4.2). In den klinischen Kontext übersetzt hieße dies, dass zumindest für die zellautonomen Effekte, die Kombinationsbehandlung aus aVF und Chemotherapie die Wirkung der Chemotherapie verstärkt und keinesfalls abschwächt.

Das Programm CompuSyn konnte sowohl Kombinationen aus aVF und Cisplatin, als auch Kombinationen aus aVF und Etoposid auf LAN-1 Zellen zu 65,6 % als synergistisch charakterisieren. Auch Kombinationen aus aVF und Etoposid wirkten auf Etoposid resistente LAN-1 Zellen zu 62 % synergistisch. In Cisplatin resistenten LAN-1 Zellen wurden sogar 77,8 % der Kombinationen aus aVF und Cisplatin als synergistisch gekennzeichnet.

Auch mit dem Softwareprogramm Combenefit konnten die meisten Kombinationen aus aVF und Etoposid bzw. Cisplatin auf alle drei Zelllinien als additiv charakterisiert werden, dabei konnten keine signifikant antagonistischen Kombinationen aufgezeigt werden. Bei der parentalen LAN-1 Zelllinie konnte vor allem für aVF Konzentrationen von 5 mg/ml und Etoposid durch die Referenzmodelle „Loewe“ und „HSA“ signifikant synergistische Interaktionen festgestellt werden. Des Weiteren wurden durch alle Modelle signifikant synergistische Wechselwirkungen zwischen Cisplatin und aVF Konzentrationen von 0,5 mg/ml auf Cisplatin resistente LAN-1 Zellen gefunden. Die durch das Programm Combenefit generierten detaillierten Arzneimittelsynergienmuster könnten somit Hinweise zu Dosisoptimierungen liefern.

## DISKUSSION

Es lässt sich jedoch festhalten, dass keines der verwendeten Referenzmodelle eine Allgemeingültigkeit aufweist. Sie sollten daher als Datenexplorationsansätze verstanden werden, die Hinweise auf synergistische Arzneimittelkombinationen geben können, die weitere mechanistische Untersuchungen rechtfertigen.

Die hier beobachteten synergistischen Effekte einer Mistelbehandlung mit einer Chemotherapie konnten auch von anderen Autoren dokumentiert werden. So konnten Bantel et al. eine Verstärkung der zytotoxischen Effekte von Etoposid durch isoliertes Mistellektin-I in Jurkat Zellen (ALL) aufzeigen (Bantel et al., 1999). Unter Verwendung der Methode nach Chou konnten Srdic-Rajic et al. antagonistisch-zytotoxische Effekte einer Kombination aus hohen Dosen eines wässrigen *Viscum* Extraktes und hohen Dosen Doxorubicin auf *BCR-ABL* positive K567 (CML) Zellen messen, während niedrigere Konzentrationen der Einzelsubstanzen in der Kombination z. T. sogar stark synergistisch wirkten (Srdic-Rajic et al., 2016). Auch Weissenstein et al. untersuchten in einer *in vitro* Studie Wechselwirkungen einer Kombinationstherapie aus klinisch relevanten Dosen eines Mistelpräparates und einer Standardchemotherapie. Als Standardchemotherapeutika wurden bei Mammakarzinomzelllinien Doxorubicin, bei Pankreaskarzinomzelllinien Gemcitabin, bei Prostatakarzinomzelllinien Mitoxantron und Docetaxel und bei Lungenkarzinomzelllinien Docetaxel und Cisplatin gewählt. Die Kombinationsbehandlung mit niedrig dosiertem Iscador Mistelextrakt im Dosisbereich von 0,1–10 µg/ml zeigte keine Interaktionen mit der Standardchemotherapie. Höhere Konzentrationen über 10 µg/ml Iscador zeigten partiell additive Effekte, allerdings werden von den Autoren bei der üblicher *subcutanen* Applikation von Mistelpräparaten nur Konzentrationen von 0,1–1 µg/ml als klinisch relevant angesehen, da durch Verteilungsvorgänge das Erreichen höherer Konzentrationen am Wirkort als unwahrscheinlich angesehen wird. Die Interaktionen wurden anhand von Dosiswirkungskurven illustriert und ausgewertet. Eine Quantifizierung synergistischer Effekte wurde allerdings nicht vorgenommen (Weissenstein et al., 2014). In dieser Arbeitsgruppe wurden auch die *in vitro* Wechselwirkungen zwischen Trastuzumab und Iscador auf Her-2 positive Mammakarzinomzellen mit der gleichen Methode untersucht. Auch hier konnte durch den Mistelextrakt keine Verminderung der antitumoralen Effektivität des monoklonalen Antikörpers beobachtet werden (Weissenstein et al., 2016).

Insgesamt scheinen Mistelextrakte in Kombination mit Chemotherapeutika keine stark antagonistischen Interaktionen aufzuweisen, sondern zeigen *in vitro* eher synergistische Effekte.

## DISKUSSION

Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Arbeit vorwiegend unterstützende Effekte einer Kombinationstherapie aus aVF und einer Chemotherapie aus Cisplatin oder Etoposid auf Neuroblastomzellen, auch bei bestehender Chemotherapieresistenz, festgestellt werden.

### **6.3.2 Wirkungen einer Mistelbehandlung auf ABC-Transporter bei Auftreten einer Zytostatikaresistenz**

Ein klinisch bedeutsames Problem einer Zytostatikatherapie besteht in der Entwicklung einer Unempfindlichkeit (Resistenz) von Tumorzellen gegenüber den gegen sie gerichteten Wirkstoffen. Hierbei kann die Resistenz bereits vor Behandlungsbeginn bestehen (primäre Resistenz), oder durch die Chemotherapie selbst ausgelöst werden (sekundäre Resistenz) (Alisi et al., 2013). Ein Mechanismus der sogenannten „Multi Drug Resistance“, wird durch die erhöhte Expression von transmembranären Exportpumpen (ABC-Transportern), welche Xenobiotika forciert aus der Zelle entfernen können, hervorgerufen (Sharom, 2008). Die Folge ist ein Therapieversagen. Da Misteltherapien auch bei krebserkrankten Kindern oft zusammen mit der konventionellen Chemotherapie verabreicht werden, sollte eine mögliche Beeinflussung von ABC-Transportern durch Mistelextrakt untersucht werden.

Bei Neuroblastomen mit schlechter Prognose spielt eine Amplifikation des Onkogens *MYCN* eine große Rolle. Interessant ist dabei, dass zahlreiche ABC-Transporter als transkriptionelle Targets für *MYCN* fungieren. So scheinen *ABCC1* und *ABCC4* neben ihrer Funktion in der Chemotherapieresistenz prognostische Bedeutung im Neuroblastom zu besitzen (Munoz et al., 2007). Diese Transporter stellen somit potenzielle Kandidaten für eine therapeutische Intervention dar (Yu et al., 2015). Eine Maßnahme um die durch ABC-Transporter vermittelte Chemotherapieresistenz zu überwinden und die Tumorzellen wieder gegenüber zytostatischen Substraten dieser Transporter empfänglich zu machen besteht in ihrer Inhibition. Modulatoren von ABC-Transportern haben somit das Potenzial, die Wirksamkeit von Krebsmedikamenten zu erhöhen (Sun et al., 2012).

In der Literatur sind zahlreiche Wirkstoffe mit inhibitorischen Eigenschaften auf ABC-Transporter beschrieben, darunter finden sich auch einige Pflanzeninhaltsstoffe beispielsweise Quercetin, Resveratrol, Curcumin und Ginsenoside (Wu et al., 2008).

In dieser Arbeit wurde die Einflussnahme einer Misteltherapie auf die Expression verschiedener ABC-Transporter und somit auf die durch diese Transporter vermittelte

## DISKUSSION

Chemoresistenz in Neuroblastomzelllinien untersucht (Kapitel 5.4.3). Hierzu wurden LAN-1 Zellen und ihre die bereits beschriebenen chemotherapieresistenten Subzelllinien verwendet (siehe Kapitel 4.1.7).

Als Resultat fand sich eine sehr schwache Erhöhung der mRNA Level bei Cisplatin resistenten LAN-1 Zellen der Transporter ABCB1, ABCC1, ABCC4 und MVP durch die Misteltherapie. Die mRNA Expression von ABCC1 wurde hingegen in der LAN-1 Ursprungszelllinie durch die Mistelexposition dosisabhängig leicht reduziert. Dies ist insofern beachtenswert, da ABCC1 eine prognostische Bedeutung zukommt und es sich bei LAN-1 Zellen um eine Neuroblastomzelllinie handelt, in der *MYCN* amplifiziert vorliegt. Die gegenüber Etoposid resistenten LAN-1 Zellen wiesen ca. 400-fach höhere ABCB1 mRNA Level als die parentalen LAN-1 Zelllinie auf. Durch Applikation einer aVF Konzentration von 0,5 mg/ml konnte dieser Wert um ca. 25 % abgesenkt werden. Insgesamt konnten jedoch keine statistisch signifikanten Veränderungen der mRNA Expression durch die aVF Behandlung ermittelt werden, daher werden die Ergebnisse als klinisch nicht relevant gewertet.

In der Literatur findet sich eine Studie von Valentiner et al., die zeigen konnte, dass die Mistellektine zytotoxische Eigenschaften gegenüber Kolonkarzinomzellen HT 29 aufweisen, und zwar auch wenn sie MDR-1 überexprimieren: HAT 29<sup>mdr+</sup> (erworbene MDR durch Inkubation mit steigenden Konzentrationen eines Induktors), oder HAT 29S<sup>F1m</sup> (transfiziert mit dem MDR-1 Gen). Dabei zeigten MDR-transfizierte und auch *mock*-transfizierte Zellen die gleichen Ansprechraten wie die sensitiven Kontrollzellen HT 29<sup>mdr-</sup> (Valentiner et al., 2002). Weiterhin kann die Schlussfolgerung in dieser Arbeit, zur biologischen Insignifikanz der Beeinflussung von ABC-Transportern durch eine Mistelbehandlung durch eine Studie von Nehman et al. gestützt werden. Die Autoren untersuchten mögliche Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen den Mistellektinen-I, -II und-III und einer zufälligen Phagen-Display Peptidbibliothek. Hierbei konnte eine Affinität zum membranständigen organischen Anionentransporter MRP5 (= ABCC5) beobachtet werden. Jedoch waren die modulierenden Effekte der Mistellektine auf die Effluxpumpe geringfügig (1–6 %), sodass diese ebenfalls als biologisch unbedeutsam eingeschätzt wurden (Nehmann et al., 2009).

Insgesamt wird aus den erhobenen Daten geschlussfolgert, dass eine Misteltherapie keine Auswirkungen auf die Entwicklung einer Chemotherapieresistenz durch Einflussnahme auf die Expression zellulärer ABC-Transporter hat und hierdurch keine Wechselwirkungen zu erwarten sind.



#### 6.4 Analyse von Interaktionen zwischen aVF und einer Radiotherapie

Es gibt Hinweise, dass verabreichte Pflanzeninhaltsstoffe mit einer Strahlentherapie wechselwirken können. Sie können dabei radiosensibilisierend wirken und dadurch Strahlungseffekte verstärken oder radioprotektiv wirken, indem sie Zellen vor Strahlenschäden schützen (Hazra et al., 2012). Das Phänomen, das Mistelinhaltsstoffe die Verträglichkeit einer Strahlentherapie verbessern und radioprotektiv wirken können konnte bereits im Mausmodell beobachtet werden. So konnte das 60-Tage Überleben von Ganzkörper  $\gamma$ -bestrahlter Mäuse durch wasserlösliche Polysaccharide aus *Viscum album* L. einer Dosis von 25 mg/kg durch einmalige *intraperitoneale* Gabe 15 Minuten vor der Bestrahlung einer  $LD_{50/30d}$  um 95 % verlängert werden und verlängerte das durchschnittliche Überleben von Mäusen, die tödlichen Strahlendosen ausgesetzt wurden (Narimanov et al., 1992).

Die Verbesserung der Verträglichkeit von Radiotherapie-induzierten Nebenwirkungen durch eine Mistelbehandlung ist zum Teil auf die Ausschüttung von Zytokinen und  $\beta$ -Endorphin zurückzuführen (Heiny, Beuth, 1994), sowie auf eine Beeinflussung hämatopoetische Zellen durch Stimulation der Neutropoese (Vehmeyer et al., 1998; Weber et al., 1996). Durch Iscador (Iscador AG, Lörrach) konnte beispielsweise eine strahleninduzierte Myelosuppression verkürzt werden (Rentea et al., 1981). Auch DNA-stabilisierende Effekte und eine verstärkte Reparatur strahleninduzierter Doppelstrangbrüche könnten eine klinische Bedeutung haben. So konnten Kovacs et al. einen statistisch signifikanten Anstieg der Reparatureffizienz in Lymphozyten von Mammakarzinompatientinnen nach einer Behandlung mit Iscador zeigen (Kovacs et al., 1991). Diese Ergebnisse konnten später *in vitro* bestätigt werden, ebenso bei durch Cyclophosphamid induzierte DNA-Schäden (Kovacs, 2002). Eine DNA-stabilisierende Wirkung von *Viscum album* Extrakten wurde von Büssing et al. durch Untersuchung der Schwesterchromatidaustauschrates (SCE = sister chromatid exchange) in PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) von gesunden Probanden, die *in vitro* mit PHA (Phytohämagglutinin) stimuliert wurden, dokumentiert. Eine Inkubation mit Helixor (Helixor Heilmittel GmbH, Rosenfeld) konnte die SCE signifikant und dosisabhängig reduzieren, die als Indikator für zytogenetische Schäden und Mutagenität herangezogen wurde (Büssing et al., 1994; Perry, Evans, 1975). Ebenso konnte eine Verminderung der SCE in Cyclophosphamid behandelten PBMC durch Helixor erzielt werden (Büssing et al., 1995). Inwieweit die beschriebenen radioprotektiven Effekte einer Mistelexposition Einflüsse auf das Tumorgeschehen und eine Metastasierung haben, ist nach wie vor unklar und wird kontrovers diskutiert. So gaben schon Kienle und Kiene zu bedenken, dass die

## DISKUSSION

beobachteten Effekte auf mononukleäre Zellen beschränkt sein könnten (Kienle, Kiene, 2003).

Um der Frage nach möglichen synergistischen Effekten einer Mistelbehandlung mit einer Bestrahlungstherapie und einer radioprotektiven Wirkung von Mistelextrakten auf pädiatrische Tumorzellen nachzugehen, wurden zunächst Auswirkungen auf die Zellviabilität einer Kombinationstherapie durch MTT-Zellviabilitäts-assays untersucht und mögliche synergistische Effekte mithilfe der Softwareprodukte CompuSyn und CombeneFit ausgewertet und beurteilt (Kapitel 5.5.1).

Es konnte festgestellt werden, dass die Neuroblastomzellen sowohl empfindlicher auf eine Strahlentherapie, als auch auf eine Mistelbehandlung reagierten, als die Medulloblastomzellen.

Insgesamt waren die Ergebnisse schwierig zu beurteilen. Durch die Software CompuSyn wurden für die Medulloblastomzelllinien Daoy und ONS-76 und die Neuroblastomzelllinien SH-SY5Y und Kelly nur in 12,5–4,2 % aller Kombinationsverhältnisse synergistische Effekte ( $CI < 1$ ) festgestellt. Das Modell nach „Bliss“, welches in der Software CombeneFit implementiert ist, zeigte nur vereinzelt schwach antagonistische Effekte auf, während das „HSA“ Modell in den Zelllinien ONS-76, SH-SY5Y und Kelly verstärkt synergistische Effekte berechnen konnte (Abb. 36). Die Dosis-Wirkungs Beziehung von bestrahlten ONS-76 Zellen gaben einen Hinweis darauf, dass der eingesetzte MTT-assay möglicherweise nicht geeignet ist den durch Bestrahlung induzierten Zelltod zu untersuchen (Abb. 37).

Um mögliche strahlenschützende Wirkungen einer Misteltherapie zu untersuchen, wurden zytotoxische Effekte in den Zelllinien durch eine Mistelbehandlung vor einer Strahlentherapie mit denen von Mistelapplikationen nach einer Bestrahlung verglichen (Kapitel 5.5.2). Auch hier wurden MTT-Daten zugrunde gelegt.

Hierbei konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Behandlungskonditionen ausgemacht werden. Es wird daher geschlussfolgert, dass der Behandlungszeitpunkt einer Misteltherapie keine Auswirkungen auf den Therapieerfolg zu nehmen scheint.

Jedoch fiel auch hier bei der Zelllinie ONS-76 auf, dass die Dosis-Wirkungskurven zwar durch steigende aVF Konzentrationen dosisabhängig abfielen, sich jedoch bei steigenden Bestrahlungsdosen ein statischer Zustand einstellte, da bei Strahlendosen über 10 Gy eine konstante Zellviabilität von ca. 40 % durch den MTT-assay gemessen wurde und selbst durch hohe Strahlendosen von 60 Gy keine weitere Verringerung der Zellviabilität erreicht werden konnte (Abb. 38).

## DISKUSSION

Aus diesem Ergebnis konnte abgeleitet werden, dass der MTT-assay insgesamt nicht zuverlässig geeignet ist, um die bei einem Bestrahlungstod der Tumorzellen erzielten Effekte darzustellen, da diese hierbei oft erst durch eine Kumulation von Strahlenschäden, durch die sogenannte mitotische Katastrophe (klonogener Zelltod), protrahiert absterben. Die Zellen bleiben jedoch zunächst metabolisch aktiv, es ist also eine Zellviabilität messbar. Schließlich sterben die Zellen durch die entstandenen Defekte, die nicht mehr repariert werden können (Ianzini, Mackey, 1998; Vakifahmetoglu et al., 2008). Da den Ergebnisse der zuvor durchgeführten Versuche zur Untersuchung von Synergismen zwischen einer Mistelbehandlung und einer Bestrahlung ebenfalls MTT-Daten zugrunde gelegt wurden, besteht die Gefahr falscher Rückschlüsse und Interpretationen der Ergebnisse, da die mitotische Katastrophe neben der Apoptose die Hauptursache eines Strahlentodes von Tumorzellen darstellt (Eriksson, Stigbrand, 2010).

Um der Frage nach einer strahlenprotektiven Wirkung von aVF durch eine von mehreren Autoren beschriebene verstärkte DNA-Reparatur nachzugehen, wurde die Reparatureffizienz strahleninduzierter Doppelstrangbrüche in SH-SY5Y Neuroblastomzellen nach Mistel-Exposition untersucht (Kapitel 5.5.3).

Hierbei konnte eine dosisabhängige Verzögerung der Doppelstrangbruchreparatur in Tumorzellen, die mit dem Mistelextrakt inkubiert wurden, beobachtet werden. Somit könnten sich die Effekte in Tumorzellen und mononukleären Zellen unterscheiden, da wie beschrieben von Kovacs et al. eine Steigerung der Reparatureffizienz in Lymphozyten nach Bestrahlung oder Cyclophosphamid verursachten DNA-Schäden gemessen wurde. Diese Beobachtungen sollten in weiteren Studien näher untersucht werden.

In einem weiteren Versuchsaufbau wurden Auswirkungen einer Kombinationstherapie aus Mistelextrakt und Röntgenbestrahlung auf das klonogene Überleben untersucht (Kapitel 5.5.4). Dieser Versuchsaufbau schien im Vergleich zum MTT-assay besser geeignet um die zeitlich verzögerten Effekte einer Bestrahlung auf die Tumorzellen zu untersuchen. Die Neuroblastomzellen blieben entweder unbehandelt, erhielten eine Kombinationstherapie aus aVF einer Konzentration von 0,05 mg/ml oder 0,1 mg/ml und einer Strahlendosis von 1 Gy, oder eine Monotherapie aus Mistelextrakt oder Bestrahlung. Dabei wurden die Tumorzellen entweder nur kurz für 30 Minuten mit dem Mistelextrakt behandelt oder der Mistelextrakt blieb, in Form einer Dauertherapie, auf den Zellen bis zum Auszählen der Kolonien nach 10 Tagen.

Bei einer niedrigen Misteldosis von 0,05 mg/ml und einer Inkubationszeit von 30 Minuten hatte eine Kombinationstherapie keine Vorteile gegenüber der reinen Bestrahlung. Wurde

## DISKUSSION

die Misteldosis jedoch erhöht, dann war eine Kombinationstherapie mit einer Misteldosis von 0,1 mg/ml einer Bestrahlungsmonotherapie hochsignifikant überlegen.

Wurde der Misteleextrakt als Dauertherapie länger auf den Tumorzellen belassen, so verstärkten sich auch die Effekte auf das klonogenen Überleben. Nun reichte auch eine Konzentration von 0,05 mg/ml aVF in der Kombination aus, um das klonogene Überleben signifikant gegenüber einer reinen Bestrahlung zu reduzieren. Bei einer Mistelkonzentration von 0,1 mg/ml in der Dauertherapie und in Kombination mit Bestrahlung betrug das klonogene Überleben nur noch 0,3 % in Relation zu unbehandelten Kontrollen. Die aVF Konzentration von 0,1 mg/ml war in der Dauerbehandlung einer Bestrahlungsmonotherapie ebenbürtig. Die erhaltenen Ergebnisse des Koloniebildungstests verdeutlichen, dass die kombinierte Exposition von aVF und Bestrahlung, synergistische Effekte bezüglich des klonogenen Zelltodes auf Neuroblastomzellen hat.

Schötterl et al. untersuchten ebenfalls synergistische Effekte in Bezug auf das klonogene Überleben. Kombination aus mistelhaltigen Arzneimitteln (Iscador, rekombinantes oder natives ML-I) und einer Temozolomid basierten Radio-Chemotherapie wirkten auf Gliom Zellen synergistisch bis additiv nach der Methode nach Webb (Schötterl et al., 2019).

Eine abschließende Bewertung der kombinatorischen Wirkungen von Bestrahlung und Misteltherapie und die Übertragbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse sind trotz der deutlichen Ergebnisse des Koloniebildungstests schwierig.

Neuroblastome werden als strahlensensible Tumoren beschrieben, dennoch werden lokalisierte Neuroblastome der Stadien 1–3 ohne *MYCN* Amplifikation heutzutage kaum bestrahlt. Bei der in dieser Studie verwendeten Zelllinie SH-SY5Y handelt es sich um eine strahlensensible Zelllinie mit kurzen  $IC_{50}$ -Bestrahlungszeiten, die allerdings keine *MYCN* Amplifikation aufweist. Diese Teilstudie hat daher eher einen explorativen als confirmatorischen Charakter.

Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Studie vor allem eine Bestrahlungstherapie unterstützende Wirkungen des Mistelextraktes aVF bei simultaner Verabreichung auf Neuroblastomzellen aufgezeigt werden. In der Literatur gefundene radioprotektive Effekte und eine erhöhte DNA-Reparatur konnten durch die Experimente in den Tumorzellen nicht bestätigt werden. Auch konnte keine Beeinflussung der durch eine Bestrahlung ausgelösten zytotoxischen Effekte durch den Zeitpunkt einer Mistelbehandlung festgestellt werden.

### 6.5 Untersuchung des *in vivo* Potenzials von aVF

Zur Erforschung der Wirkungen von *Viscum album* Gesamtextrakten wurden bereits zahlreiche Tierversuche mit zum Teil gemischten und inkonsistenten Ergebnissen durchgeführt. In den meisten dieser Studien wurden Mistel-Extrakte entweder durch *subcutane* Injektion oder durch *intraperitoneale* Gabe verabreicht, wobei ebenso aus dem Extrakt isolierte Einzelsubstanzen, wie z. B. Mistellektine, Viscotoxine oder Polysaccharide, getestet wurden. Allein zur Erforschung der Therapiesicherheit von Hochdosismistelapplikationen wurden 48 Tierstudien durchgeführt, 34 davon beschäftigen sich mit Mistelgesamtextrakten (Kienle et al., 2011). Zur Beschreibung antitumoraler Eigenschaften der Mistel werden verschiedene Parameter herangezogen. Es finden sich Untersuchungen zur Überlebenszeitverlängerung, Tumorkontrolle, Rezidivprophylaxe, Metastasenhemmung und lokaler Tumorrogression (Kienle, Kiene, 2003).

Die Eignung des in dieser Arbeit verwendeten Neuroblastom-Tiermodell zur Erforschung von antitumoralen Effekten einer Misteltherapie in Bezug auf das Tumorgewicht, das Tumolvolumen und die Überlebenszeit wird nachfolgend diskutiert.

Da bekannt ist, dass Mistelpräparate immunstimulierende Eigenschaften aufweisen, die durch aktive Immunüberwachung zu antitumoralen Effekten beitragen können (Kienle, Kiene, 2003), wurde ein immunkompetentes Mausmodell für *in vivo*-Studien gewählt. Allgemeine Vorteile von Maus-Allotransplantatmodellen sind das Fehlen von Artenunverträglichkeit, eine gute Nachahmung der Mikroumgebung des Tumors und ein schneller Krankheitsverlauf. In den *in vitro* Experimenten zur Ansprechbarkeit von Neuroblastomzelllinien auf eine Misteltherapie mit aVF zeigte sich, dass die murinen C1300 Zellen resistenter waren, als alle getesteten humanen Neuroblastomzelllinien, jedoch empfindlicher als murine Fibroblasten. Die gut charakterisierten murinen C1300 Zellen, ähneln histologisch der menschlichen Neuroblastom-Krankheit, indem sie Katecholamine metabolisieren, sich spontan zurückbilden und niedrige Werte von Klasse-I-Antigenen exprimieren (Beltinger, Debatin, 2001). Aber auch dieses Tumormodell weist Einschränkungen auf, da eine Übertragbarkeit der Ergebnisse des Tiermodells an Aussagekraft verliert, da C1300 Zellen das menschliche Neuroblastom genetisch nicht rekapitulieren, da sie keine der bei einer menschlichen Krankheit beschriebenen genetischen Veränderungen aufweisen. Außerdem wurden die Zellen nicht an einer orthotopen Stelle implantiert, die es ermöglicht eine lokale und metastatische Ausbreitung zu untersuchen. Die ektope, *subcutane* Inokulation der murinen Neuroblastomzellen hatte jedoch im Vergleich zur orthotopen Applikation den Vorteil die Entwicklung des Volumens der aggressiv wachsenden Tumoren besser überwachen zu können und wurde daher als besser geeignet angesehen.

## DISKUSSION

Am häufigsten werden Mistelpräparate *subcutan* verabreicht. Da das Erreichen systemischer zytotoxischer Konzentrationen über diesen Anwendungsweg unwahrscheinlich ist, wird die antitumorale Wirkung der Mistel oft auf ihre immunstimulierenden Eigenschaften zurückgeführt (Kienle, Kiene, 2003). Es gibt zahlreiche Hinweise auf direkte zytotoxische, dosisabhängige Effekte der Mistelextrakte. Bei einer *subcutanen* Anwendung ist jedoch das applizierbare Volumen begrenzt. Hohe Dosen von *intravenösen* Anwendungen werden als effektiver angesehen und werden in der klinischen Praxis mit zunehmender Häufigkeit auch bei Kindern eingesetzt (Zuzak et al., 2018). Bislang gibt es jedoch noch wenige Studien zur Sicherheit dieser Hochdosis-Misteltherapien (Huber et al., 2017).

In Tiermodellen werden *i. p.* Injektionen oft als eine geeignete Alternative zur *i. v.* Verabreichung beschrieben, da sie die Anwendung höherer Dosen ermöglichen, durch die vergleichsweise rasche Anflutung eine schnelle Absorption ermöglichen und daher *intravenöse* Hochdosis-Anwendungen nachahmen können.

Beim Menschen gibt es nur wenige Studien, bei denen Mistelextrakte *intrapitoneal* verabreicht wurden. Allerdings wird Zurückhaltung bei der Mistelgabe über diesen Applikationsweg empfohlen. Matthes et al. berichten in einer retrospektiven Fallserie von zwölf Patienten mit malignem Aszites, dass bei zwei Personen nach wenigen Wochen unter *intrapitonealer* Misteltherapie ein Ileus als Folge eines malignen Konglomerattumors diagnostiziert wurde (Matthes, 2001).

Bei der Bewertung der Sicherheit und Verträglichkeit von *intrapitonealen* Mistelanwendungen lässt sich schließen, dass zur weiteren Untersuchung der Auswirkungen der dosisabhängigen Zytotoxizität von aVF bei schnell wachsenden Tumoren der *i. p.* Weg der Mistelanwendung in Tierversuchen überdacht werden muss.

Im hier verwendeten *in vivo* Neuroblastom-Mausmodell zeigten Dosisescalationsstudien, dass eine Kurzzeittherapie (< 15 d) mit hohen Dosen (> 20 mg/ml) *intrapitoneal* gut verträglich war, aber Langzeitanwendungen von schweren Darmnebenwirkungen begleitet wurden (Kapitel 5.6.2 und 5.6.4).

Obwohl eine *subcutane* Mistelgabe bei Menschen an der Injektionsstelle lokale Entzündungsreaktionen hervorruft und eine orale Einnahme von Pflanzenteilen der Mistel irritative Magen-Darm Störungen hervorruft (Evens, Stellpflug, 2012), konnte eine oft bei Menschen beobachtete Fieberreaktion bei den immunkompetenten A/J-Mäusen nicht beobachtet werden (Kapitel 5.6.4.1). Jedoch könnten diese Beobachtungen auch auf die anderen immunologischen Eigenschaften des Tiermodells zurückzuführen sein, da auch in einem Mausmodell an immunkompetenten C57BL/6 Mäusen zur Erforschung von akut entzündlichen Reaktionen durch Endotoxin Injektionen, anders als bei Menschen keine

## DISKUSSION

schnelle physiologische Reaktion in Form von Fieber, Tachykardie und leichter Hypotonie ausgelöst werden konnte (Copeland et al., 2005). So gilt auch der Mensch bezüglich der pyrogenen Reaktion auf Endotoxin als das empfindlichste aller Modelle gegenüber den Auswirkungen von Endotoxin (Wolff, 1973). Auch konnten keine nennenswerten Veränderungen der stichprobenartig erhobenen Blutparameter im Tiermodell festgestellt werden (Kapitel 5.6.4.2).

Zur Beurteilung der Effektivität der aVF Behandlungen wurden Auswirkungen der Misteltherapie auf das Tumorgewicht- und volumen, als auch auf das Gesamtüberleben der Versuchstiere untersucht.

In einem vergleichbaren immunkompetenten, syngenem Maus-Modell konnten Delebinski et al. bereits nach s.c. Injektionen der spontan metastasierenden, hybriden Neuroblastomzelllinie NXS-2 in A/J Mäusen, eine Reduktion der Metastasierung durch *intraperitoneale* Behandlung mit einem experimentellen Triterpensäure-reichen Extrakt beobachten (Delebinski et al., 2013). Jedoch ist hier der Anteil der Triterpensäuren an den beobachteten Effekten unklar und kann daher nicht dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten kommerziell erhältlichen Mistelextrakt aVF verglichen werden. Hinzu kommt, dass Triterpensäuren in den meisten kommerziell erhältlichen Mistelextrakten nur in geringer Menge enthalten sind.

Als Ergebnis führte eine „Hochdosismisteltherapie“ von 500 mg/kg KG in der vorliegenden Arbeit bei den extrem rasch wachsenden *subcutan* applizierten Neuroblastomen nach nur viermaliger Gabe zu einer Verringerung des Tumorgewichts um 13,4 % und zu einer statistisch signifikanten Verringerung des Tumolvolumens um 30 % (Kapitel 5.6.3).

Insgesamt kommt bei der Beurteilung der *in vivo* Effektivität auf die Parameter Tumorgewicht- und volumen den Effekten auf das Tumorgewicht eine größere Bedeutung zu, da hier wesentlich genauere Aussagen getroffen werden können. Dies ist dadurch begründet, dass das Tumolvolumen in der Regel mit einer Schieblehre in drei Dimensionen gemessen und dann über eine Näherungsformel errechnet wird, während das Tumorgewicht nach dem Herauspräparieren ausgewogen werden kann. In der vorliegenden Studie war die Regression des Tumorgewichtes in der Verumgruppe zwar nicht signifikant ( $p = 0,2092$ ), allerdings waren die Versuchsgruppen mit jeweils fünf Tieren sehr klein und die statistische Aussagekraft gering. Daher sollten die ermutigenden Ergebnisse bezüglich einer Tumorgewichtsverkleinerung auf die aggressiv wachsenden Neuroblastome durch einen größeren Stichprobenumfang nachvollzogen werden.

## DISKUSSION

In Bezug auf die Reduktion von Tumorzellen- und gewicht konnten auch andere Autoren antitumorale Effekte von in der Klinik oft verwendeten anthroposophischen Mistelextrakten im Tiermodell beschreiben. So injizierten Zarkovic et al. murine Mammakarzinomzellen *s. c.* in beide Hinterbeine von CBA/HZgr Mäusen, dabei wurden die Tumorzellen auch *i. v.* injiziert, um artifizielle Lungenmetastasen zu erhalten. Die Mäuse wurden mit dem Mistelpräparat Isorel M (LUKAS Heil-Betriebsstätte GmbH) *subcutan* ab dem Folgetag behandelt. Die Autoren beschreiben einen signifikanten Rückgang der Lungenmetastasen, allerdings konnten sie keine Auswirkungen auf das Tumorzellen an den Beinen feststellen (Zarkovic et al., 2001).

Beuth et al. injizierten BT474 Tumorzellen (Humanes duktales Mammakarzinom) *subcutan* in BALB/c Mäuse und behandelten *intratumoral* mit den Mistelpräparaten Helixor ME-A und ME-M (Helixor Heilmittel GmbH). Hierbei konnte das Tumorgewicht mit beiden Extrakten signifikant reduziert werden, ohne dass Nebenwirkungen der Therapie notiert werden konnten (Beuth et al., 2006).

Weitere interessante Ergebnisse auf pädiatrische Tumoren in Bezug auf eine Verkleinerung des Tumorzellen, allerdings in immunsupprimierten Maus-Modellen, konnten Stammer et al. in zwei *s. c.* implantierten, Patienten-abgeleiteten Xenografts in NMRI-nu/nu Mäuse des Alveolären Rhabdomyosarkoms erzielen. Hierbei konnte ein von Apfelbäumen gewonnener *Viscum* Extrakt das Tumorzellen verkleinern und war einer intravenösen Behandlung mit Doxorubicin überlegen. Eine signifikante Verkleinerung des Tumorzellen konnte jedoch nur mit dem in dieser Arbeitsgruppe erforschten Triterpenangereicherten Mistelextrakt *ViscumTT* erreicht werden.

Eine weitere Studie aus dieser Arbeitsgruppe konnte im Ewing Sarkom Xenograft Modell, bei dem die etablierte Zelllinie TC-71 *s. c.* in immunsupprimierte NOD/SCID IL2 $\gamma$  Mäuse implantiert wurde, nach *intratumoraler* Applikation alle 2-3 Tage mit steigenden Konzentrationen an *Viscum* Extrakt eine signifikante Reduktion des Tumorzellen erzielen. Dabei wurden insgesamt fünf Wirkstoffdosen gegeben. Die Mistelbehandlung war einer, einmaligen intravenösen Gabe mit Doxorubicin vergleichbar (Twardziok et al., 2016).

In der vorliegenden Arbeit konnte das Gesamtüberleben durch eine Mistelbehandlung mit aVF einer Dosis von 200 mg/kg KG (200  $\mu$ l einer aVF Konzentration von 20 mg/ml) signifikant verlängert werden (Kapitel 5.6.4). Auch die Applikation einer Dosis von 100 mg/kg Kg (200  $\mu$ l einer aVF Konzentration von 10 mg/ml) konnte die Überlebenszeit um 2 Tage im Vergleich zur Kontrollgruppe verlängern. Mistelkonzentrationen von 50 mg/kg KG (200  $\mu$ l einer aVF Konzentration von 5 mg/ml) hatten jedoch keinen Einfluss auf die Überlebensdauer.



## DISKUSSION

Die hier gefundenen lebenszeitverlängernden Effekte einer Mistelbehandlung bei einer Tumorerkrankung, konnten durch Studien von Seifert et al. bestätigt werden. Die Autoren beschreiben eine signifikante Verlängerung des medianen Überlebens von immundefizienten männlichen CB-17 SCID/SCID nach Transplantation von humanen NALM-6 (ALL) Zellen. Dabei wurden die Versuchstiere einen Tag nach der Tumorzellinjektion, im Versuchszeitraum von 60 Tagen, alle vier Tage *intraperitoneal* mit verschiedenen Dosen (1–100 mg/kg KG) der wässrigen Mistelextrakte MT-P und MT-A (Helixor) oder mit PBS bzw. Cyclophosphamid (100 mg/kg KG) als Kontrollen, behandelt. Als Resultat konnten beide Extrakte in allen applizierten Konzentrationen das Überleben verlängern. In der Gruppe, die das Präparat MT-A erhielten konnten drei Langzeitüberlebende identifiziert werden, die Dosen über 50 mg/kg KG erhielten. Bei diesen Tieren konnten bei der Autopsie keine Anzeichen von Leukämie oder Lymphom festgestellt werden (Seifert et al., 2008).

Eine Übertragung der in der vorliegenden Arbeit gefundenen Daten und applizierten Misteldosen vom Tiermodell auf die klinische Situation beim Menschen ist schwierig.

Da die Misteldosierungen bei den Versuchstieren durch das Auftreten Dosis-limitierender Nebenwirkungen bei aVF Konzentrationen auf weniger als 20 mg/ml (200 mg/kg KG) begrenzt sind, sollte man dies bei einer Übertragung von am Menschen applizierbare Dosen bedenken.

In einer Phase I-Studie der European Organization for Research and Treatment of Cancer New Drug Development Group wurde Patienten mit fortgeschrittenen und progressiven soliden Tumoren eine zentrale 1-stündige Infusion mit rekombinantem Mistellektin-I (Aviscuminum) zweimal wöchentlich verabreicht (Schöffski et al., 2004). Hierbei wurden Dosen bis zu 5600 ng/kg KG als sicher befunden. Bei einer Aviscumindosis von 6400 ng/kg KG konnte jedoch eine dosislimitierende Toxizität registriert werden.

Messungen des Gesamtlektingehalts der für die *in vivo* Versuche in dieser Arbeit verwendeten aVF Charge 211 A06 in der vorliegenden Arbeit, durch einen Sandwich-ELISA, ergaben einen Gesamtlektingehalt von 15,4 µg/ml. Eine hier applizierte Dosis von 20 mg/ml in einem Volumen von 200 µl entspricht somit einer Lektinkonzentration von 3080 ng/kg KG Maus, die auch beim Menschen eine sichere Dosis wäre.

Pharmakokinetische Untersuchungen von Huber et al. ergaben jedoch Unterschiede in der kurzen Halbwertszeit von natürlichen Mistel-Lektinen im Vergleich zu rekombinantem ML-I, das nicht glykosyliert ist (Huber et al., 2010). Daher sind die Sicherheitsdaten der verabreichten Dosen im hier durchgeführten Tierversuch rein indikativ, können aber als erste präklinische Hinweise auf eine systemische Verträglichkeit dienen, wenn sie auf Humanstudien übertragen werden.

## DISKUSSION

Zur Beurteilung, der *in vivo* Wirksamkeit und Sicherheit von aVF Anwendungen, lässt sich zusammenfassen, dass eine kurzzeitige Behandlung einer Hochdosistherapie von den Versuchstieren gut vertragen wurde, jedoch bei einer längeren *intraperitonealen* Anwendung die Dosis reduziert werden muss. Trotz des aggressiven Tumorwachstums und der insgesamt geringen Anzahl der Mistelapplikationen konnte eine Therapie mit aVF sowohl das Tumolvolumen als auch die Überlebenszeit signifikant verlängern. Die *in vivo* Effektivität von Mistelbehandlungen auf die experimentellen Neuroblastome wird somit als gut bewertet.

### 6.6 Schlussfolgerungen

Obwohl Mistelzubereitungen bereits seit Jahren nicht nur in der Erwachsenenmedizin, sondern auch bei Kindern zunehmend verabreicht werden, gibt es bislang nur wenig Daten zu ihrer Effektivität und Sicherheit. Die bisherigen Forschungsergebnisse und explorativen klinischen Erfahrungen weisen auf eine vergleichsweise gute Verträglichkeit auch bei intravenöser Gabe hoher Dosierungen hin.

Die vorgelegte Studie konnte erste präklinische Daten für aVF als adjuvante therapeutische Behandlung in einem breiten Panel von pädiatrischen Tumorzelllinien auch im Vergleich zu Tumorzellen der Erwachsenenonkologie zeigen. Dabei erwiesen sich pädiatrische Tumorzelllinien gegenüber einer Behandlung mit dem Mistelextrakt empfindlicher als humane Fibroblasten und als adulte Tumorzellen. Hierbei schien der Gesamtlektin Gehalt von Mistelextrakten maßgeblich zur zytotoxischen Effektivität beizutragen, da der mistellektinreichste Extrakt aVF insgesamt niedrigere  $IC_{50}$ -Werte vorweisen konnte als die beiden Iscucin Präparate. In den untersuchten Neuroblastom- und Medulloblastomzellen konnte eine Reduktion der Zellproliferationsrate und eine Induktion der Caspase-vermittelten Apoptose demonstriert werden. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die induzierte Apoptose über beide Hauptsignalwege unter Beteiligung der Mitochondrien abläuft. Antimetastatische Eigenschaften von aVF konnten durch eine dosisabhängige Reduktion der Migration und Invasivität in den Krebszellen nachgewiesen werden. Wurden LAN-1 Neuroblastomzellen einer Kombination aus Chemotherapie (Cisplatin bzw. Etoposid) und Mistelbehandlung unterworfen konnten keine relevanten Wechselwirkungen verzeichnet werden, da vor allem synergistisch/additive Effekte, selbst bei bestehender Zytostatikaresistenz, detektiert wurden. Weiterhin konnte keine Modulation der ABC-Effluxpumpen gemessen werden. Eine Mistelgabe, selbst bei bereits bestehender Chemotherapieresistenz, schien somit

## DISKUSSION

keine Resistenzbildung zu induzieren oder diese zu verstärken. Die Kombination aus Mistelbehandlung und Bestrahlung führte zu einer Verringerung der Koloniebildung in der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y und zu einer Verzögerung der Reparaturgeschwindigkeit von strahleninduzierten Doppelstrangbrüchen. Auch der Behandlungszeitpunkt einer Mistelgabe hatte keine Einflüsse auf die zytotoxischen Effekte einer Bestrahlungstherapie. Eine zeitgleiche Behandlung aus Mistelextrakt-Gabe und Bestrahlung schien somit keine radioprotektiven Effekte und DNA-Reparatur fördernden Eigenschaften in den Neuroblastomzellen zu verursachen, wie sie in der Literatur für mononukleären Zellen des peripheren Blutes bei Kombinationen aus Mistelextrakt und Bestrahlung beschrieben wurden. *In vivo*-Experimente unter Verwendung eines syngenem Mausmodells zeigten eine Reduktion des Tumorwachstums bei kurzzeitig applizierten hochdosierten aVF-Gaben und eine signifikant verlängerte Überlebenszeit bei Neuroblastom-tragenden Tieren. Obwohl die Sicherheitsdaten der verabreichten Dosen dieser Tierversuche rein indikativ sind, könnten sie als erste präklinische Hinweise auf eine systemische Verträglichkeit dienen, wenn sie auf Humanstudien übertragen werden.

Trotz dieser vielversprechenden Beobachtungen muss noch viel Forschung zum Einsatz von Mistelpräparaten als unterstützende Behandlung bei Kindern betrieben werden. Insbesondere Dosisverträglichkeit und Kombinationen mit konventionellen Therapien (Chemo-, Strahlentherapie) müssen in weiteren Studien aufgeklärt werden.

Die erhobenen präklinischen Daten können jedoch zur Therapiesicherheit von Mistelanwendungen in der pädiatrischen Onkologie beitragen und stellen einen ermutigenden Ansatz für weitere Forschungen dar.

### 7 ZUSAMMENFASSUNG

Misteltherapien werden in der pädiatrischen Onkologie zwar mit zunehmender Häufigkeit auch in Kombination mit einer Radio- oder Chemotherapie verabreicht, allerdings gibt es bislang noch unzureichende Daten zur Effektivität und möglichen Wechselwirkungen. Die zytotoxischen Effekte des Mistelextraktes *abnobaVISCUM Fraxini* (aVF) auf ein breites Panel aus pädiatrischen und adulten Tumorzelllinien wurden mithilfe von MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid) assays untersucht. An den Zelllinien SH-SY5Y, Kelly, ONS-76 und Daoy wurden Auswirkungen auf die Zellproliferation mittels Bromdesoxyuridin-assays und xCELLigence System und Effekte auf die Zellzyklusverteilung, sowie die Caspase-vermittelte Apoptose mithilfe der Durchflusszytometrie unter Einsatz eines PAN Caspase Inhibitors analysiert. Effekte auf die mitochondriale Integrität und die *in vitro* Migration und Invasion der Tumorzellen wurden durch Mitotracker Deep Red® Färbung, sowie Boyden Chamber und Scratch assays studiert. Ein syngenes Neuroblastom-Mausmodell diente zur Untersuchung der *in vivo* Wirkungen des Mistelextraktes. Für eine quantitative Synergieanalyse der kombinatorischen Effekte zwischen aVF und einer Chemotherapie aus Cisplatin bzw. Etoposid auf LAN-1 Neuroblastomzellen und hieraus resistent gezüchteter Subzelllinien aus MTT-Daten wurden die in der Literatur gängigsten Referenzmodelle nach Chou, Loewe, Bliss und HSA verwendet. Die Analyse von Effekten auf die m-RNA (messenger ribonucleic acid) Expression verschiedener ABC-Transportproteine (adenosine triphosphate-binding cassette), sowie der Initiatorcaspasen 8 und 9 erfolgte durch Real Time PCR (polymerase chain reaction) und Auswirkungen auf die strahleninduzierte DNA-Doppelstrangbruchreparatur (deoxyribonucleic acid) wurden durch Quantifikation von  $\gamma$ H2AX Foci am Durchflusszytometer untersucht. Der Koloniebildungstest diente zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen aVF und einer Bestrahlung. In dieser Arbeit konnte eine dosisabhängige und lektinabhängige Abnahme der Zellviabilität der pädiatrischen und adulten Tumorzellen durch aVF, festgestellt werden. Weiterhin kam es zu einer caspasenabhängigen Erhöhung der Apoptoserate und einer Beeinflussung der Aktivität und der Expression der Initiatorcaspasen 8 und 9, sowie einer Hemmung der Invasion und Migration. Im Neuroblastom-Mausmodell kam es zu einer Verringerung des Tumorwachstums und einer Verlängerung der Überlebenszeit. Auch bei bestehender Chemotherapie-Resistenz konnten für Kombinationen aus einer Chemo- oder Radiotherapie mit aVF vor allem unterstützende Effekte, beobachtet werden. Die erhobenen Daten lassen den Schluss zu, dass eine Misteltherapie, einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz bei der komplementären Behandlung solider kindlicher Tumoren darstellt.

## 8 SUMMARY

Mistletoe therapies are increasingly used in combination with radio- or chemotherapy in pediatric oncology, but there are still insufficient data on efficacy and possible interactions. The cytotoxic effects of the mistletoe extract abnobaVISCUM Fraxini (aVF) on a broad panel of pediatric and adult tumor cell lines were investigated using MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assays. On the SH-SY5Y, Kelly, ONS-76, and Daoy cell lines, effects on cell proliferation were analyzed by Bromodeoxyuridine (BrdU) assays and xCELLigence system, and effects on cell cycle distribution, as well as caspase-mediated apoptosis were analyzed by flow cytometry using a PAN caspase inhibitor. Effects on mitochondrial integrity and *in vitro* migration and invasion of tumor cells were studied by Mitotracker Deep Red® staining, as well as Boyden Chamber and Scratch assays. A syngeneic neuroblastoma mouse model was used to study the *in vivo* effects of the mistletoe extract. For a quantitative synergistic analysis of the combinatorial effects between aVF and chemotherapy consisting of cisplatin or etoposide on LAN-1 neuroblastoma cells and subcell lines grown resistant thereto from MTT data, the most common reference models in the literature according to Chou, Loewe, Bliss, and HSA were used. Analysis of effects on m-RNA (messenger ribonucleic acid) expression of various ABC transport proteins (adenosine triphosphate-binding cassette), as well as initiator caspases 8 and 9 was performed by real-time PCR (polymerase chain reaction), and effects on radiation-induced DNA (deoxyribonucleic acid) double-strand break repair were examined by quantification of γH2AX foci by flow cytometry. The colony formation assay was used to study the interactions between aVF and irradiation. In this work, a dose-dependent and lectin-dependent decrease in cell viability of pediatric and adult tumor cells by aVF, was detected. Furthermore, there was a caspase-dependent increase in the rate of apoptosis and effects on the activity and expression of initiator caspases 8 and 9, as well as an inhibition of invasion and migration could be shown. In the neuroblastoma mouse model, a reduction in tumor growth and a prolongation of survival could be demonstrated. Even in the presence of chemotherapy resistance, mainly supportive effects, were observed for combinations of chemotherapy or radiotherapy with aVF. The collected data allow the conclusion that mistletoe therapy represents a promising therapeutic approach in the complementary treatment of solid childhood tumors.

## 9 LITERATURVERZEICHNIS

1. Agapov, I.I., Tonevitsky, A.G., Maluchenko, N.V., Moisenovich, M.M., Bulah, Y.S., Kirpichnikov, M.P. (1999): Mistletoe lectin A-chain unfolds during the intracellular transport. *FEBS letters* 464, 63-66.
2. Albini, A., Iwamoto, Y., Kleinman, H.K., Martin, G.R., Aaronson, S.A., Kozlowski, J.M., McEwan, R.N. (1987): A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer research* 47, 3239-3245.
3. Albrecht, H., Gerhard, I. (Eds.) (1996): *Grundlagen der Misteltherapie: Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung*. Stuttgart: Hippokrates Verlag.
4. Alisi, A., Cho, W.C., Locatelli, F., Fruci, D. (2013): Multidrug resistance and cancer stem cells in neuroblastoma and hepatoblastoma: *International journal of molecular sciences* 14, 24706-24725.
5. Altieri, D.C. (2003): Validating survivin as a cancer therapeutic target: *Nature reviews. Cancer* 3, 46-54.
6. Amer, B., Juvik, O.J., Dupont, F., Francis, G.W., Fossen, T. (2012): Novel aminoalkaloids from European mistletoe (*Viscum album* L.): *Phytochemistry Letters* 5, 677-681.
7. Arnhold, V., Schmelz, K., Proba, J., Winkler, A., Wünschel, J., Toedling, J., Deubzer, H.E., Künkele, A., Eggert, A., Schulte, J.H., Hundsdoerfer, P. (2018): Reactivating TP53 signaling by the novel MDM2 inhibitor DS-3032b as a therapeutic option for high-risk neuroblastoma: *Oncotarget* 9, 2304-2319.
8. Bailey, P., Cushing, H. (1925): Medulloblastoma cerebelli: A common type of midcerebellar glioma of childhood. *Archives of Neurology & Psychiatry* 14, 192-224.
9. Bantel, H., Engels, I.H., Voelter, W., Schulze-Osthoff, K., Wesselborg, S. (1999): Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer research* 59, 2083-2090.
10. Baylin, S., Bestor, T.H. (2002): Altered methylation patterns in cancer cell genomes: cause or consequence? *Cancer cell* 1, 299-305.

## LITERATURVERZEICHNIS

11. Becker, H. (2000): European Mistletoe: Taxonomy, Host Trees, Parts Used, Physiology. In: Büssing, A. (Ed.): Mistletoe. *The Genus Viscum*. Medicinal and aromatic plants Vol. 16; S. 31-45. Amsterdam u.a.: Harwood.
12. Bellamy, C.O., Malcomson, R.D., Harrison, D.J., Wyllie, A.H. (1995): Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Seminars in cancer biology* 6, 3-16.
13. Beltinger, C., Debatin, K.M. (2001): Murine models for experimental therapy of pediatric solid tumors with poor prognosis. *International journal of cancer* 92, 313-318.
14. Berenbaum, M.C. (1989): What is synergy? *Pharmacological reviews* 41, 93-141.
15. Berthold, F., Spix, C., Kaatsch, P., Lampert, F. (2017): Incidence, Survival, and Treatment of Localized and Metastatic Neuroblastoma in Germany 1979-2015: *Paediatric drugs* 19, 577-593.
16. Beuth, J., Ko, H.L., Gabius, H.J., Pulverer, G. (1991): Influence of treatment with the immunomodulatory effective dose of the beta-galactoside-specific lectin from mistletoe on tumor colonization in BALB/c-mice for two experimental model systems. *In vivo (Athens, Greece)* 5, 29-32.
17. Beuth, J., Ko, H.L., Schneider, H., Tawadros, S., Kasper, H.U., Zimst, H., Schierholz, J.M. (2006): Intratumoral application of standardized mistletoe extracts down regulates tumor weight via decreased cell proliferation, increased apoptosis and necrosis in a murine model. *Anticancer research* 26, 4451-4456.
18. Bhat, N., McGregor, L. (2017): Neuroblastoma: The Clinical Aspects. In: Gowda, C. (Ed.): *Neuroblastoma - Current State and Recent Updates*. InTech.
19. Biedler, J.L., Helson, L., Spengler, B.A. (1973): Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer research* 33, 2643-2652.
20. Bigner, S.H., Mark, J., Friedman, H.S., Biegel, J.A., Bigner, D.D. (1988): Structural chromosomal abnormalities in human medulloblastoma. *Cancer genetics and cytogenetics* 30, 91-101.
21. Bliss, C.I. (1939): The toxicity of poisons applied jointly: *Annals of Applied Biology* 26, 585-615.

## LITERATURVERZEICHNIS

22. Bokoch, G.M. (1998): Caspase-mediated activation of PAK2 during apoptosis: proteolytic kinase activation as a general mechanism of apoptotic signal transduction?: *Cell Death And Differentiation* 5, 637-645.
23. Bown, N., Cotterill, S., Lastowska, M., O'Neill, S., Pearson, A.D., Plantaz, D., Meddeb, M., Danglot, G., Brinkschmidt, C., Christiansen, H., Laureys, G., Speleman, F., Nicholson, J., Bernheim, A., Betts, D.R., Vandesompele, J., van Roy, N. (1999): Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma: *The New England journal of medicine* 340, 1954-1961.
24. Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding: *Analytical biochemistry* 72, 248-254.
25. Braun, J.M., Ko, H.L., Schierholz, J.M., Weir, D., Blackwell, C.C., Beuth, J. (2001): Application of standardized mistletoe extracts augment immune response and down regulates metastatic organ colonization in murine models. *Cancer letters* 170, 25-31.
26. Brisse, H.J., McCarville, M.B., Granata, C., Krug, K.B., Wootton-Gorges, S.L., Kanegawa, K., Giammarile, F., Schmidt, M., Shulkin, B.L., Matthay, K.K., Lewington, V.J., Sarnacki, S., Hero, B., Kaneko, M., London, W.B., Pearson, A.D.J., Cohn, S.L., Monclair, T. (2011): Guidelines for imaging and staging of neuroblastic tumors: Consensus report from the International Neuroblastoma Risk Group Project: *Radiology* 261, 243-257.
27. Brodeur, G.M. (1995): Molecular basis for heterogeneity in human neuroblastomas. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)* 31A, 505-510.
28. Brodeur, G.M., Pritchard, J., Berthold, F., Carlsen, N.L., Castel, V., Castelberry, R.P., Bernardi, B. de, Evans, A.E., Favrot, M., Hedborg, F. (1993): Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment: *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 11, 1466-1477.
29. Büssing, A. (1996): Induction of apoptosis by the mistletoe lectins: A review on the mechanisms of cytotoxicity mediated by *Viscum album* L: *Apoptosis* 1, 25-32.
30. Büssing, A. (Ed.) (2000): *Mistletoe: The Genus Viscum. Medicinal and aromatic plants Vol. 16.* Amsterdam u.a.: Harwood.
31. Büssing, A., Azhari, T., Ostendorp, H., Lehnert, A., Schweizer, K. (1994): *Viscum album* L. extracts reduce sister chromatid exchanges in cultured peripheral blood



- mononuclear cells. *European journal of cancer* (Oxford, England: 1990) 30A, 1836-1841.
32. Büssing, A., Raak, C., Ostermann, T. (2012): Quality of life and related dimensions in cancer patients treated with mistletoe extract (iscador): A meta-analysis: Evidence-based complementary and alternative medicine: *eCAM* 2012, 219402.
  33. Büssing, A., Regnery, A., Schweizer, K. (1995): Effects of *Viscum album* L. on cyclophosphamide-treated peripheral blood mononuclear cells in vitro: sister chromatid exchanges and activation/proliferation marker expression. *Cancer letters* 94, 199-205.
  34. Büssing, A., Schaller, G., Pfuller, U. (1998): Generation of reactive oxygen intermediates (ROI) by the thionins from *Viscum album* L. *Anticancer research* 18, 4291-4296.
  35. Büssing, A., Schietzel, M. (1999): Apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts from different host trees, correlate with their content of toxic mistletoe lectins. *Anticancer research* 19, 23-28.
  36. Büssing, A., Stein, G.M., Stumpf, C., Schietzel, M. (1999): Release of interleukin-6 in cultured B-chronic lymphocytic leukaemia cells is associated with both activation and cell death via apoptosis. *Anticancer Res* 19, 3953-3959.
  37. Büssing, A., Stein, G.M., Wagner, M., Wagner, B., Schaller, G., Pfuller, U., Schietzel, M. (1999): Accidental cell death and generation of reactive oxygen intermediates in human lymphocytes induced by thionins from *Viscum album* L. *European journal of biochemistry* 262, 79-87.
  38. Büssing, A., Suzart, K., Bergmann, J., Pfuller, U., Schietzel, M., Schweizer, K. (1996): Induction of apoptosis in human lymphocytes treated with *Viscum album* L. is mediated by the mistletoe lectins. *Cancer letters* 99, 59-72.
  39. Büssing, A., Wagner, M., Wagner, B., Stein, G.M., Schietzel, M., Schaller, G., Pfuller, U. (1999): Induction of mitochondrial Apo2.7 molecules and generation of reactive oxygen-intermediates in cultured lymphocytes by the toxic proteins from *Viscum album* L. *Cancer letters* 139, 79-88.
  40. Cadagan, D., Merry, S. (2013): Circumvention of inherent or acquired cytotoxic drug resistance in vitro using combinations of modulating agents. *Anticancer Res* 33, 4381-4387.

## LITERATURVERZEICHNIS

41. Carrasco, L., Vazquez, D., Hernandez-Lucas, C., Carbonero, P., Garcia-Olmedo, F. (1981): Thionins: plant peptides that modify membrane permeability in cultured mammalian cells. *European journal of biochemistry* 116, 185-189.
42. Chaffer, C.L., Weinberg, R.A. (2011): A perspective on cancer cell metastasis: *Science (New York, N.Y.)* 331, 1559-1564.
43. Chang, C.H., Housepian, E.M., Herbert, C., JR (1969): An operative staging system and a megavoltage radiotherapeutic technic for cerebellar medulloblastomas: *Radiology* 93, 1351-1359.
44. Chen, Y., Takita, J., Choi, Y.L., Kato, M., Ohira, M., Sanada, M., Wang, L., Soda, M., Kikuchi, A., Igarashi, T., Nakagawara, A., Hayashi, Y., Mano, H., Ogawa, S. (2008): Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* 455, 971 EP -.
45. Chou, T.C., Martin, N. (2004). *CompuSyn for Drug Combinations: PC Software and User's Guide*. Paramus, (NJ): ComboSyn Inc.
46. Chou, T.C., Talalay, P. (1984): Quantitative analysis of dose-effect relationships: The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in enzyme regulation* 22, 27-55.
47. Chou, T.-C. (2006): Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies: *Pharmacological reviews* 58, 621-681.
48. Chou, T.-C. (2010): Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method: *Cancer research* 70, 440-446.
49. Cohn, S.L., Pearson, A.D.J., London, W.B., Monclair, T., Ambros, P.F., Brodeur, G.M., Faldum, A., Hero, B., Iehara, T., Machin, D., Mosseri, V., Simon, T., Garaventa, A., Castel, V., Matthay, K.K. (2009): The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: An INRG Task Force report: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27, 289-297.
50. Cokol, M., Chua, H.N., Tasan, M., Mutlu, B., Weinstein, Z.B., Suzuki, Y., Nergiz, M.E., Costanzo, M., Baryshnikova, A., Giaever, G., Nislow, C., Myers, C.L., Andrews, B.J., Boone, C., Roth, F.P. (2011): Systematic exploration of synergistic drug pairs: *Molecular systems biology* 7, 544.

## LITERATURVERZEICHNIS

51. Copeland, S., Warren, H.S., Lowry, S.F., Calvano, S.E., Remick, D. (2005): Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans: Clinical and diagnostic laboratory immunology 12, 60-67.
52. Coulon, A., Mosbah, A., Lopez, A., Sautereau, A.-M., Schaller, G., Urech, K., Rougé, P., Darbon, H. (2003): Comparative membrane interaction study of viscotoxins A3, A2 and B from mistletoe (*Viscum album*) and connections with their structures: The Biochemical journal 374, 71-78.
53. Coustan-Smith, E., Kitanaka, A., Pui, C.H., McNinch, L., Evans, W.E., Raimondi, S.C., Behm, F.G., Arico, M., Campana, D. (1996): Clinical relevance of BCL-2 overexpression in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 87, 1140-1146.
54. Cragg, G.M., Newman, D.J. (2005): Plants as a source of anti-cancer agents: Journal of ethnopharmacology 100, 72-79.
55. Daniel, P.T., Wieder, T., Sturm, I., Schulze-Osthoff, K. (2001): The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. Leukemia 15, 1022-1032.
56. Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M.A., Lassota, P., Traganos, F. (1992): Features of apoptotic cells measured by flow cytometry: Cytometry 13, 795-808.
57. Debatin, K.M., Fulda, S. (2006): Zellbiologie. In: Gadner, H., Gaedicke, G., Niemeyer, C., Ritter, J. (Eds.): Pädiatrische Hämatologie und Onkologie; S. 454-470. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
58. Debatin, K.M., Stahnke, K., Fulda, S. (2003): Apoptosis in hematological disorders. Seminars in cancer biology 13, 149-158.
59. Debreczeni, J.E., Girmann, B., Zeeck, A., Kratzner, R., Sheldrick, G.M. (2003): Structure of viscotxin A3: disulfide location from weak SAD data. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography 59, 2125-2132.
60. Delebinski, C.I., Jäger, S., Kemnitz-Hassanin, K., Seeger, Karl-Heinz, Henze, Günter, Lode, Holger N., Seifert, G. (2013): Untersuchung der Wirksamkeit von triterpenhaltigen *Viscum album* L.- Extrakten beim Neuroblastom in vitro und in vivo. In: Scheer, R., Alban, S., Becker, H., Blaschek, W., Kemper, Fritz, H., Kreis, W., Matthes, H., Schilcher, H., Stange, R. (Eds.): Die Mistel in der Tumorthherapie 3. Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung; S. 103-106. KVC-Verl.

## LITERATURVERZEICHNIS

61. Delebinski, C.I., Twardziok, M., Kleinsimon, S., Hoff, F., Mulsow, K., Rolff, J., Jäger, S., Eggert, A., Seifert, G. (2015): A Natural Combination Extract of *Viscum album* L. Containing Both Triterpene Acids and Lectins Is Highly Effective against AML In Vivo: *PloS one* 10, e0133892.
62. Deliorman, D., Çaliş, I., Ergun, F., Tamer, U. (1999): The Comparative Studies on Phenylpropanoid Glycosides of *Viscum Album* Subspecies by High Performance Liquid Chromatography: *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 22, 3101-3114.
63. Deutsches Kinderkrebsregister (2018): Jahresbericht 2018. Mainz, Online-Publikation;  
<http://www.kinderkrebsregister.de/dkkr/ergebnisse/jahresberichte.html>.
64. Di Chen, Liu, X., Yang, Y., Yang, H., Lu, P. (2015): Systematic synergy modeling: Understanding drug synergy from a systems biology perspective: *BMC systems biology* 9, 56.
65. Di Veroli, G.Y., Fornari, C., Wang, D., Mollard, S., Bramhall, J.L., Richards, F.M., Jodrell, D.I. (2016): Combenefit: An interactive platform for the analysis and visualization of drug combinations: *Bioinformatics (Oxford, England)* 32, 2866-2868.
66. Dragan, A.I., Pavlovic, R., McGivney, J.B., Casas-Finet, J.R., Bishop, E.S., Strouse, R.J., Schenerman, M.A., Geddes, C.D. (2012): SYBR Green I: fluorescence properties and interaction with DNA: *Journal of fluorescence* 22, 1189-1199.
67. Dube, D.H., Bertozzi, C.R. (2005): Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics: *Nature reviews. Drug discovery* 4, 477-488.
68. Edlund, U., Hensel, A., Fröse, D., Pfüller, U., Scheffler, A. (2000): Polysaccharides from fresh *Viscum album* L. berry extract and their interaction with *Viscum album* agglutinin I: *Arzneimittel-Forschung* 50, 645-651.
69. Endo, Y., Tsurugi, K., Franz, H. (1988): The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes. The RNA N-glycosidase activity of the protein. *FEBS letters* 231, 378-380.
70. Eriksson, D., Stigbrand, T. (2010): Radiation-induced cell death mechanisms: *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 31, 363-372.
71. Ernst, E., Schmidt, K., Steuer-Vogt, M.K. (2003): Mistletoe for cancer? A systematic review of randomised clinical trials: *International journal of cancer* 107, 262-267.

72. European Medicines Agency: EU Clinical Trials Register, Online-Publikation;  
<https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2004-002711-83/DE#D8>.
73. Evens, Z.N., Stellpflug, S.J. (2012): Holiday plants with toxic misconceptions: The western journal of emergency medicine 13, 538-542.
74. Formigli, L., Papucci, L., Tani, A., Schiavone, N., Tempestini, A., Orlandini, G.E., Capaccioli, S., Orlandini, S.Z. (2000): Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis: Journal of cellular physiology 182, 41-49.
75. Fouquier, J., Guedj, M. (2015): Analysis of drug combinations: Current methodological landscape: Pharmacology research & perspectives 3, e00149.
76. Frankenberg, D., Frankenberg-Schwager, M., Blöcher, D., Harbich, R. (1981): Evidence for DNA double-strand breaks as the critical lesions in yeast cells irradiated with sparsely or densely ionizing radiation under oxic or anoxic conditions. Radiation research 88, 524-532.
77. Franz, H. (1985): Ingredients of mistletoe (*Viscum album* L.) as potential drugs [Inhaltsstoffe der Mistel (*Viscum album* L.) als potentielle Arzneimittel]. Die Pharmazie 40, 97-104.
78. Franz, H. (1986): Mistletoe lectins and their A and B chains. Oncology 43 Suppl 1, 23-34.
79. Franz, H., Ziska, P., Kindt, A. (1981): Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album* L.). The Biochemical journal 195, 481-484.
80. Franz, M., Vollmer, S., Wacker, R., Jäger, S., Scheer, R., Stoeva, S., Voelter, W. (2004): Isolation and quantification of chitin-binding mistletoe lectin from mistletoe extracts and validation of this method: Arzneimittel-Forschung 54, 230-239.
81. Fukunaga, T., Kajikawa, I., Nishiya, K., Watanabe, Y., Suzuki, N., Takeya, K., Itokawa, H. (1988): Studies on the constituents of the European mistletoe, *Viscum album* L. II: Chem. Pharm. Bull. 36, 1185-1189.
82. Fulda, S., Kufer, M.U., Meyer, E., van Valen, F., Dockhorn-Dworniczak, B., Debatin, K.M. (2001): Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer: Oncogene 20, 5865-5877.
83. Gadner, H., Gaedicke, G., Niemeyer, C., Ritter, J. (Eds.) (2006): Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

## LITERATURVERZEICHNIS

84. Gastman, B., Wang, K., Han, J., Zhu, Z., Huang, X., Wang, G.-Q., Rabinowich, H., Gorelik, E. (2004): A novel apoptotic pathway as defined by lectin cellular initiation: *Biochemical and biophysical research communications* 316, 263-271.
85. Giudici, A.M., Regente, M.C., Villalain, J., Pfuller, K., Pfuller, U., La Canal, L. de (2004): Mistletoe viscotoxins induce membrane permeabilization and spore death in phytopathogenic fungi: *Physiologia plantarum* 121, 2-7.
86. Gogvadze, V., Orrenius, S., Zhivotovsky, B. (2006): Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis: *Biochimica et biophysica acta* 1757, 639-647.
87. Gottschling, S., Längler, A., Tautz, C., Graf, N. (2006): Komplementäre und alternative Behandlungsmethoden in der Kinderonkologie [Complementary and alternative medicine in pediatric oncology]: *Klinische Padiatrie* 218, 157-164.
88. Gowda, C. (Ed.) (2017): *Neuroblastoma - Current State and Recent Updates*: InTech.
89. Grandt, D., Schubert, I. (2017): *Arzneimittelreport 2017 Barmer GEK: Schriftenreihe zur Gesundheitsanalyse*: Asgard Verlagsservice GmbH 3.
90. Gratzner, H.G., Leif, R.C., Ingram, D.J., Castro, A. (1975): The use of antibody specific for bromodeoxyuridine for the immunofluorescent determination of DNA replication in single cells and chromosomes. *Experimental cell research* 95, 88-94.
91. Grotzer, M.A., Eggert, A., Zuzak, T.J., Janss, A.J., Marwaha, S., Wiewrodt, B.R., Ikegaki, N., Brodeur, G.M., Phillips, P.C. (2000): Resistance to TRAIL-induced apoptosis in primitive neuroectodermal brain tumor cells correlates with a loss of caspase-8 expression: *Oncogene* 19, 4604-4610.
92. Guggenheim, M. (2013): *Die Biogenen Amine und Ihre Bedeutung für die Physiologie und Pathologie des Pflanzlichen und Tierischen Stoffwechsels*: Springer Berlin Heidelberg.
93. Hacker, G. (2000): The morphology of apoptosis. *Cell and tissue research* 301, 5-17.
94. Haefeli, W.E., Carls, A. (2014): Drug interactions with phytotherapeutics in oncology: *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 10, 359-377.
95. Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

## LITERATURVERZEICHNIS

96. Hazra, B., Ghosh, S., Kumar, A., Pandey, B.N. (2012): The Prospective Role of Plant Products in Radiotherapy of Cancer: A Current Overview: *Front. Pharmacol.* 2.
97. Heiny, B.M., Beuth, J. (1994): Mistletoe extract standardized for the galactoside-specific lectin (ML-1) induces beta-endorphin release and immunopotentiality in breast cancer patients. *Anticancer research* 14, 1339-1342.
98. Hengartner, M.O. (2000): The biochemistry of apoptosis: *Nature* 407, 770-776.
99. Hinch, D.K., Pfüller, U., Schmitt, J.M. (1997): The concentration of cryoprotective lectins in mistletoe (*Viscum album L.*) leaves is correlated with leaf frost hardness: *Planta* 203, 140-144.
100. Hockenbery, D., Nunez, G., Millman, C., Schreiber, R.D., Korsmeyer, S.J. (1990): Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death: *Nature* 348, 334-336.
101. Horneber, M., Bueschel, G., Dennert, G., Less, D., Ritter, E., Zwahlen, M. (2012): How many cancer patients use complementary and alternative medicine: A systematic review and metaanalysis: *Integrative cancer therapies* 11, 187-203.
102. Horneber, M.A., Bueschel, G., Huber, R., Linde, K., Rostock, M. (2008): Mistletoe therapy in oncology: The Cochrane database of systematic reviews, CD003297.
103. Huang, X., Darzynkiewicz, Z. (2006): Cytometric assessment of histone H2AX phosphorylation: a reporter of DNA damage: *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 314, 73-80.
104. Huber, R., Eisenbraun, J., Miletzki, B., Adler, M., Scheer, R., Klein, R., Gleiter, C.H. (2010): Pharmacokinetics of natural mistletoe lectins after subcutaneous injection: *European journal of clinical pharmacology* 66, 889-897.
105. Huber, R., Schlodder, D., Effertz, C., Rieger, S., Tröger, W. (2017): Safety of intravenously applied mistletoe extract - results from a phase I dose escalation study in patients with advanced cancer: *BMC complementary and alternative medicine* 17, 465.
106. Hülsen, H., Doser, C., Mechelke, F. (1986): Differences in the in vitro effectiveness of preparations produced from mistletoes of various host trees. *Arzneimittel-Forschung* 36, 433-436.

## LITERATURVERZEICHNIS

107. Huynh, T., Norris, M.D., Haber, M., Henderson, M.J. (2012): ABCC4/MRP4: A MYCN-regulated transporter and potential therapeutic target in neuroblastoma: *Frontiers in oncology* 2, 178.
108. Ianzini, F., Mackey, M.A. (1998): Delayed DNA damage associated with mitotic catastrophe following X-irradiation of HeLa S3 cells. *Mutagenesis* 13, 337-344.
109. Ionov, Y., Yamamoto, H., Krajewski, S., Reed, J.C., Perucho, M. (2000): Mutational inactivation of the proapoptotic gene BAX confers selective advantage during tumor clonal evolution: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 10872-10877.
110. Ivanov, D.P., Coyle, B., Walker, D.A., Grabowska, A.M. (2016): In vitro models of medulloblastoma: Choosing the right tool for the job: *Journal of Biotechnology* 236, 10-25.
111. Izzo, A.A., Ernst, E. (2009): Interactions between herbal medicines and prescribed drugs: an updated systematic review: *Drugs* 69, 1777-1798.
112. Jacobsen, P.F., Jenkyn, D.J., Papadimitriou, J.M. (1985): Establishment of a human medulloblastoma cell line and its heterotransplantation into nude mice. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 44, 472-485.
113. Jäger, S., Winkler, K., Pfüller, U., Scheffler, A. (2007): Solubility studies of oleanolic acid and betulinic acid in aqueous solutions and plant extracts of *Viscum album* L: *Planta medica* 73, 157-162.
114. Jenkin, D., Shabanah, M.A., Shail, E.A., Gray, A., Hassounah, M., Khafaga, Y., Kofide, A., Mustafa, M., Schultz, H. (2000): Prognostic factors for medulloblastoma. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 47, 573-584.
115. Jordan, E., Wagner, H. (1986): Structure and properties of polysaccharides from *Viscum album* (L.). *Oncology* 43 Suppl 1, 8-15.
116. Kaestner, J., Schlodder, D., Preussler, C., Gruhn, B. (2019): Supportive mistletoe therapy in a patient with metastasised neuroblastoma: *BMJ case reports* 12.
117. Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J.C., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J.M., Dumont, X., Ferrara, P., McKeon, F., Caput, D. (1997): Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 90, 809-819.



## LITERATURVERZEICHNIS

118. Kaiser, G. (2001): Situationsbild der Misteltherapie aus der Sicht eines klinischen Onkologen. In: Scheer, R. (Ed.): Die Mistel in der Tumorthherapie. Grundlagenforschung und Klinik. Essen: KVC-Verl.
119. Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E., Poirier, G.G. (1993): Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer research* 53, 3976-3985.
120. Keij, J.F., Bell-Prince, C., Steinkamp, J.A. (2000): Staining of mitochondrial membranes with 10-nonyl acridine orange MitoFluor Green, and MitoTracker Green is affected by mitochondrial membrane potential altering drugs: *Cytometry* 39, 203-210.
121. Kelly, K.M. (2004): Complementary and alternative medical therapies for children with cancer: *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)* 40, 2041-2046.
122. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26, 239-257.
123. Kienle, G.S.: Stellungnahme zu: Mistletoe therapy in oncology (Cochrane-Review 2008), Online-Publikation; [http://www.ifaemm.de/F9\\_komme.htm](http://www.ifaemm.de/F9_komme.htm).
124. Kienle, G.S., Glockmann, A., Schink, M., Kiene, H. (2009): Viscum album L. extracts in breast and gynaecological cancers: A systematic review of clinical and preclinical research: *Journal of experimental & clinical cancer research: CR* 28, 79.
125. Kienle, G.S., Grugel, R., Kiene, H. (2011): Safety of higher dosages of Viscum album L. in animals and humans--systematic review of immune changes and safety parameters: *BMC complementary and alternative medicine* 11, 72.
126. Kienle, G.S., Kiene, H. (2003): Die Mistel in der Onkologie: Fakten und konzeptionelle Grundlagen; 123 Tab. Stuttgart [u.a.]: Schattauer.
127. Kienle, G.S., Kiene, H.: Gutachten zum HTA-Bericht 44 der Deutschen Agentur für Health Technology Assessment (DAHTA) des Deutschen Instituts für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI) „Misteltherapie als begleitende Behandlung zur Reduktion der Toxizität der Chemotherapiemaligner Erkrankungen“ Dokumentation und Information (DIMDI) „Misteltherapie als begleitende Behandlung zur Reduktion der Toxizität der Chemotherapiemaligner Erkrankungen“, Online-Publikation; [http://www.ifaemm.de/F9\\_komme.htm](http://www.ifaemm.de/F9_komme.htm).

128. Kienle, G.S., Kiene, H. (2010): Review article: Influence of *Viscum album* L (European mistletoe) extracts on quality of life in cancer patients: a systematic review of controlled clinical studies: *Integrative cancer therapies* 9, 142-157.
129. Kienle, G.S., Mussler, M., Fuchs, D., Kiene, H. (2016): Intravenous Mistletoe Treatment in Integrative Cancer Care: A Qualitative Study Exploring the Procedures, Concepts, and Observations of Expert Doctors: *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2016, 4628287.
130. Kim, K.-C., Yook, J.-H., Eisenbraun, J., Kim, B.-S., Huber, R. (2012): Quality of life, immunomodulation and safety of adjuvant mistletoe treatment in patients with gastric carcinoma - a randomized, controlled pilot study: *BMC complementary and alternative medicine* 12, 172.
131. Kleinsimon, S., Kauczor, G., Jaeger, S., Eggert, A., Seifert, G., Delebinski, C. (2017): *Viscum*TT induces apoptosis and alters IAP expression in osteosarcoma in vitro and has synergistic action when combined with different chemotherapeutic drugs: *BMC complementary and alternative medicine* 17, 26.
132. Kondoff, S.I., Milev, M.D., Laleva, L.N., Tzekov, C.C., Kostadinova, C.P., Kirova-Nedyalkova, G.I., Dakova, P.D. (2015): A case of early extraneural medulloblastoma metastases in a young adult: *Asian journal of neurosurgery* 10, 331-333.
133. Korsmeyer, S.J., Wei, M.C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K.J., Schlesinger, P.H. (2000): Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c: *Cell Death And Differentiation* 7, 1166-1173.
134. Kortmann, R.D., Kuhl, J., Timmermann, B., Mittler, U., Urban, C., Budach, V., Richter, E., Willich, N., Flentje, M., Berthold, F., Slavic, I., Wolff, J., Meisner, C., Wiestler, O., Sorensen, N., Warmuth-Metz, M., Bamberg, M. (2000): Postoperative neoadjuvant chemotherapy before radiotherapy as compared to immediate radiotherapy followed by maintenance chemotherapy in the treatment of medulloblastoma in childhood: results of the German prospective randomized trial HIT '91. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 46, 269-279.
135. Kovacs, E. (2002): The in vitro effect of *Viscum album* (VA) extract on DNA repair of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in cancer patients. *Phytotherapy research : PTR* 16, 143-147.

## LITERATURVERZEICHNIS

136. Kovacs, E., Hajto, T., Hostanska, K. (1991): Improvement of DNA repair in lymphocytes of breast cancer patients treated with *Viscum album* extract (Iscador). *European journal of cancer* (Oxford, England: 1990) 27, 1672-1676.
137. Krishan, A. (1975): Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *The Journal of cell biology* 66, 188-193.
138. Kruidering, M., Evan, G.I. (2000): Caspase-8 in apoptosis: the beginning of "the end"?: *IUBMB life* 50, 85-90.
139. Kumar, L.P., Deepa, Syed Fayaz Ahmed J, Moinca, I., Suresh, P., Naidu, K V J R (2015): Medulloblastoma: A common pediatric tumor: Prognostic factors and predictors of outcome: *Asian journal of neurosurgery* 10, 50.
140. Kumar, S. (2006): Caspase function in programmed cell death. *Cell Death And Differentiation* 14, 32 EP -.
141. Künkele, A., Preter, K. de, Heukamp, L., Thor, T., Pajtler, K.W., Hartmann, W., Mittelbronn, M., Grotzer, M.A., Deubzer, H.E., Speleman, F., Schramm, A., Eggert, A., Schulte, J.H. (2012): Pharmacological activation of the p53 pathway by nutlin-3 exerts anti-tumoral effects in medulloblastomas: *Neuro-oncology* 14, 859-869.
142. Kuo, L.J., Yang, L.-X. (2008): Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In vivo* (Athens, Greece) 22, 305-309.
143. Kyhse-Andersen, J. (1984): Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of biochemical and biophysical methods* 10, 203-209.
144. Landier, W., Bhatia, S., Eshelman, D.A., Forte, K.J., Sweeney, T., Hester, A.L., Darling, J., Armstrong, F.D., Blatt, J., Constine, L.S., Freeman, C.R., Friedman, D.L., Green, D.M., Marina, N., Meadows, A.T., Neglia, J.P., Oeffinger, K.C., Robison, L.L., Ruccione, K.S., Sklar, C.A., Hudson, M.M. (2004): Development of risk-based guidelines for pediatric cancer survivors: The Children's Oncology Group Long-Term Follow-Up Guidelines from the Children's Oncology Group Late Effects Committee and Nursing Discipline: *Journal of clinical oncology* : official journal of the American Society of Clinical Oncology 22, 4979-4990.
145. Längler, A., Spix, C., Gottschling, S., Graf, N., Kaatsch, P. (2005): Elternbefragung zur Anwendung alternativer und komplementärer Behandlungsmethoden in der Kinderonkologie in Deutschland [Parents-interview on use of complementary and

- alternative medicine in pediatric oncology in Germany]: *Klinische Padiatrie* 217, 357-364.
146. Längler, A., Spix, C., Seifert, G., Gottschling, S., Graf, N., Kaatsch, P. (2008): Complementary and alternative treatment methods in children with cancer: A population-based retrospective survey on the prevalence of use in Germany: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 44, 2233-2240.
147. Lázcoz, P., Muñoz, J., Nistal, M., Pestaña, A., Encío, I., Castresana, J.S. (2006): Frequent promoter hypermethylation of RASSF1A and CASP8 in neuroblastoma: *BMC cancer* 6, 254.
148. LeBlanc, H.N., Ashkenazi, A. (2003): Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors: *Cell Death And Differentiation* 10, 66-75.
149. Li, L.Y., Luo, X., Wang, X. (2001): Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria: *Nature* 412, 95-99.
150. Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method: *Methods (San Diego, Calif.)* 25, 402-408.
151. Loewe, S. (1953): The problem of synergism and antagonism of combined drugs. *Arzneimittel-Forschung* 3, 285-290.
152. Lorch Elmar (1993): Neue Untersuchungen über Flavonoide in *Viscum album L. ssp. abietis, album und austriacum* / New Investigations on Flavonoids from *Viscum album L. ssp. abietis, album and austriacum* 48.
153. Luther, P., Becker, H. (1987): *Die Mistel: Botanik, Lektine, medizinische Anwendung; mit 56 Tabellen*. Berlin u.a.: Springer.
154. Mabed, M., El-Helw, L., Shamaa, S. (2004): Phase II study of viscum fraxini-2 in patients with advanced hepatocellular carcinoma: *British journal of cancer* 90, 65-69.
155. MacPhail, S.H., Banath, J.P., Yu, Y., Chu, E., Olive, P.L. (2003): Cell cycle-dependent expression of phosphorylated histone H2AX: reduced expression in unirradiated but not X-irradiated G1-phase cells. *Radiation research* 159, 759-767.
156. Maris, J.M., White, P.S., Beltinger, C.P., Sulman, E.P., Castleberry, R.P., Shuster, J.J., Look, A.T., Brodeur, G.M. (1995): Significance of chromosome 1p loss of heterozygosity in neuroblastoma. *Cancer research* 55, 4664-4669.

## LITERATURVERZEICHNIS

157. Marshall, J. (2011): Transwell((R)) invasion assays: Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 769, 97-110.
158. Martel, D., Bussieres, J.-F., Theoret, Y., Lebel, D., Kish, S., Moghrabi, A., Laurier, C. (2005): Use of alternative and complementary therapies in children with cancer: Pediatric blood & cancer 44, 660-668.
159. Matthes, H. (2001): Onkologische Misteltherapie (*Viscum album* L.) aus klinisch-anthroposophischer Sicht. In: Scheer, R. (Ed.): Die Mistel in der Tumorthherapie. Grundlagenforschung und Klinik; S. 253-274. Essen: KVC-Verl.
160. Meitert, J., Peeters, J., Paulides, M., Metzler, M., Beck, J.D., Dörr, H.G., Langer, T. (2009): Nachsorge von Patienten mit Krebs im Kindes- und Jugendalter: Monatsschr Kinderheilkd 157, 329-338.
161. Millard, N.E., Braganca, K.C. de (2016): Medulloblastoma: Journal of child neurology 31, 1341-1353.
162. Morton, D.B., Griffiths, P.H. (1985): Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. The Veterinary record 116, 431-436.
163. Moses, G.M., McGuire, T.M. (2010): Drug interactions with complementary medicines: Aust Prescr 33, 177-180.
164. Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods 65, 55-63.
165. Munoz, M., Henderson, M., Haber, M., Norris, M. (2007): Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer: IUBMB life 59, 752-757.
166. Müthing, J., Burg, M., Möckel, B., Langer, M., Metelmann-Strupat, W., Werner, A., Neumann, U., Peter-Katalinic, J., Eck, J. (2002): Preferential binding of the anticancer drug rViscumin (recombinant mistletoe lectin) to terminally alpha2-6-sialylated neolacto-series gangliosides: Glycobiology 12, 485-497.
167. Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Dixit, V.M. (1998): An induced proximity model for caspase-8 activation. The Journal of biological chemistry 273, 2926-2930.
168. Nakagawara, A. (1998): Topical Topic: The NGF story and neuroblastoma: Med. Pediatr. Oncol. 31, 113-115.

169. Narimanov, A.A., Popova, O.I., Murav'eva, D.A. (1992): Changes in the sensitivity of mice to the action of gamma irradiation by *Viscum album* L. polysaccharides [Izmenenie chuvstvitel'nosti myshei k deistviu gamma-radiatsii s pomoshch'iu polisakharidov omely beloi (*Viscum album* L.)]. *Radiobiologiya* 32, 868-872.
170. Nazaruk, J., Orlikowski, P. (2016): Phytochemical profile and therapeutic potential of *Viscum album* L: Natural product research 30, 373-385.
171. Nehmann, N., Schade, U.M., Pfüller, U., Schachner, M., Schumacher, U. (2009): Mistletoe lectin binds to multidrug resistance-associated protein MRP5. *Anticancer research : international journal of cancer research and treatment* 29, 4941-4948.
172. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F., Riccardi, C. (1991): A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of immunological methods* 139, 271-279.
173. Niwa, H., Tonevitsky, A.G., Agapov, I.I., Saward, S., Pfuller, U., Palmer, R.A. (2003): Crystal structure at 3 Å of mistletoe lectin I, a dimeric type-II ribosome-inactivating protein, complexed with galactose. *European journal of biochemistry* 270, 2739-2749.
174. Northcott, P.A., Shih, D.J.H., Peacock, J., Garzia, L., Morrissy, A.S., Zichner, T., Stutz, A.M., Korshunov, A., Reimand, J., Schumacher, S.E., Beroukhim, R., Ellison, D.W., Marshall, C.R., Lionel, A.C., Mack, S., Dubuc, A., Yao, Y., Ramaswamy, V., Luu, B., Rolider, A., Cavalli, F.M.G., Wang, X., Remke, M., Wu, X., Chiu, R.Y.B., Chu, A., Chuah, E., Corbett, R.D., Hoad, G.R., Jackman, S.D., Li, Y., Lo, A., Mungall, K.L., Nip, K.M., Qian, J.Q., Raymond, A.G.J., Thiessen, N.T., Varhol, R.J., Birol, I., Moore, R.A., Mungall, A.J., Holt, R., Kawachi, D., Roussel, M.F., Kool, M., Jones, D.T.W., Witt, H., Fernandez-L, A., Kenney, A.M., Wechsler-Reya, R.J., Dirks, P., Aviv, T., Grajkowska, W.A., Perek-Polnik, M., Haberler, C.C., Delattre, O., Reynaud, S.S., Doz, F.F., Pernet-Fattet, S.S., Cho, B.-K., Kim, S.-K., Wang, K.-C., Scheurlen, W., Eberhart, C.G., Fevre-Montange, M., Jouvett, A., Pollack, I.F., Fan, X., Muraszko, K.M., Gillespie, G.Y., Di Rocco, C., Massimi, L., Michiels, E.M.C., Kloosterhof, N.K., French, P.J., Kros, J.M., Olson, J.M., Ellenbogen, R.G., Zitterbart, K., Kren, L., Thompson, R.C., Cooper, M.K., Lach, B., McLendon, R.E., Bigner, D.D., Fontebasso, A., Albrecht, S., Jabadó, N., Lindsey, J.C., Bailey, S., Gupta, N., Weiss, W.A., Bogner, L., Klekner, A., van Meter, T.E., Kumabe, T., Tominaga, T., Elbabaa, S.K., Leonard, J.R., Rubin, J.B., Liau, L.M., van Meir, E.G., Fouladi, M., Nakamura, H., Cinalli,

- G., Garami, M., Hauser, P., Saad, A.G., Iolascon, A., Jung, S., Carlotti, C.G., Vibhakar, R., Ra, Y.S., Robinson, S., Zollo, M., Faria, C.C., Chan, J.A., Levy, M.L., Sorensen, P.H.B., Meyerson, M., Pomeroy, S.L., Cho, Y.-J., Bader, G.D., Tabori, U., Hawkins, C.E., Bouffet, E., Scherer, S.W., Rutka, J.T., Malkin, D., Clifford, S.C., Jones, S.J.M., Korbil, J.O., Pfister, S.M., Marra, M.A., Taylor, M.D. (2012): Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes: *Nature* 488, 49-56.
175. Ohta, N., Yagishita, K. (2014): Isolation and Structure of New Flavonoids, Flavoyadorinin-A, Flavoyadorinin-B and Homo-flavoyadorinin-B, in the Leaves of *Viscum album* Linnaeus var. *coloratum* Ohwi Epiphyting to *Pyrus communis* Linnaeus: *Agricultural and Biological Chemistry* 34, 900-907.
176. Ong, Y.L., McMullin, M.F., Bailie, K.E., Lappin, T.R., Jones, F.G., Irvine, A.E. (2000): High bax expression is a good prognostic indicator in acute myeloid leukaemia. *British journal of haematology* 111, 182-189.
177. Orrù, S., Scaloni, A., Giannattasio, M., Urech, K., Pucci, P., Schaller, G. (1997): Amino acid sequence, S-S bridge arrangement and distribution in plant tissues of thionins from *Viscum album*. *Biological chemistry* 378, 989-996.
178. Packer, R.J., Rood, B.R., MacDonald, T.J. (2003): Medulloblastoma: Present concepts of stratification into risk groups: *Pediatric neurosurgery* 39, 60-67.
179. Pal, A., Debreczeni, J.E., Sevana, M., Gruene, T., Kahle, B., Zeeck, A., Sheldrick, G.M. (2008): Structures of viscotoxins A1 and B2 from European mistletoe solved using native data alone: *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 64, 985-992.
180. Park, S.R., Davis, M., Doroshov, J.H., Kummar, S. (2013): Safety and feasibility of targeted agent combinations in solid tumours: *Nature reviews. Clinical oncology* 10, 154-168.
181. Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M., Bonner, W.M. (2000): A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage: *Current Biology* 10, 886-895.
182. Perry, P., Evans, H.J. (1975): Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature* 258, 121-125.
183. Pfüller, U. (2000): Chemical Constituents of European Mistletoe (*Viscum Album* L.). In: Büssing, A. (Ed.): *Mistletoe. The Genus Viscum*. Medicinal and aromatic plants Vol. 16. Amsterdam u.a.: Harwood.

## LITERATURVERZEICHNIS

184. Placzek, W.J., Wei, J., Kitada, S., Zhai, D., Reed, J.C., Pellecchia, M. (2010): A survey of the anti-apoptotic Bcl-2 subfamily expression in cancer types provides a platform to predict the efficacy of Bcl-2 antagonists in cancer therapy: *Cell death & disease* 1, e40.
185. Podlech, O., Harter, P.N., Mittelbronn, M., Pöschel, S., Naumann, U. (2012): Fermented mistletoe extract as a multimodal antitumoral agent in gliomas: Evidence-based complementary and alternative medicine : *eCAM* 2012, 501796.
186. Proskuryakov, S.Y., Gabai, V.L. (2010): Mechanisms of tumor cell necrosis. *Current pharmaceutical design* 16, 56-68.
187. Proskuryakov, S.Y., Konoplyannikov, A.G., Gabai, V.L. (2003): Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental cell research* 283, 1-16.
188. Puck, T.T., Marcus, P.I. (1956): Action of x-rays on mammalian cells. *The Journal of experimental medicine* 103, 653-666.
189. Rasband, W.S. (1997-2018). ImageJ. Bethesda, Maryland, USA: U. S. National Institutes of Health, Online-Publikation; <https://imagej.nih.gov/ij/>.
190. Rayan, A., Raiyn, J., Falah, M. (2017): Nature is the best source of anticancer drugs: Indexing natural products for their anticancer bioactivity: *PloS one* 12, e0187925.
191. Rentea, R., Lyon, E., Hunter, R. (1981): Biologic properties of iscador: a *Viscum album* preparation I. Hyperplasia of the thymic cortex and accelerated regeneration of hematopoietic cells following X-irradiation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 44, 43-48.
192. Richardson, M.A., Sanders, T., Palmer, J.L., Greisinger, A., Singletary, S.E. (2000): Complementary/alternative medicine use in a comprehensive cancer center and the implications for oncology: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 18, 2505-2514.
193. Richter, A. (1992): Viscumitol, a dimethyl-ether of muco-inositol from *Viscum album*: *Phytochemistry* 31, 3925-3927.
194. Richter, A., Popp, M. (1992): The physiological importance of accumulation of cyclitols in *Viscum album* L.\*: *New Phytol* 121, 431-438.
195. Rodrigues, E., Macauley, M.S. (2018): Hypersialylation in Cancer: Modulation of Inflammation and Therapeutic Opportunities: *Cancers* 10.



196. Roell, K.R., Reif, D.M., Motsinger-Reif, A.A. (2017): An Introduction to Terminology and Methodology of Chemical Synergy-Perspectives from Across Disciplines: *Frontiers in pharmacology* 8, 158.
197. Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., Bonner, W.M. (1998): DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of biological chemistry* 273, 5858-5868.
198. Romagnoli, S., Ugolini, R., Fogolari, F., Schaller, G., Urech, K., Giannattasio, M., Ragona, L., Molinari, H. (2000): NMR structural determination of viscotoxin A3 from *Viscum album* L. *The Biochemical journal* 350 Pt 2, 569-577.
199. Rose, A., El-Leithy, T., Vom Dorp, F., Zakaria, A., Eisenhardt, A., Tschirdewahn, S., Rübber, H. (2015): Mistletoe Plant Extract in Patients with Nonmuscle Invasive Bladder Cancer: Results of a Phase Ib/Ila Single Group Dose Escalation Study: *The Journal of urology* 194, 939-943.
200. Roussel, M.F., Robinson, G.W. (2013): Role of MYC in Medulloblastoma: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 3.
201. Rutkowski, S., Gerber, N.U., Hoff, K. von, Gnekow, A., Bode, U., Graf, N., Berthold, F., Henze, G., Wolff, J.E.A., Warmuth-Metz, M., Soerensen, N., Emser, A., Ottensmeier, H., Deinlein, F., Schlegel, P.-G., Kortmann, R.-D., Pietsch, T., Kuehl, J. (2009): Treatment of early childhood medulloblastoma by postoperative chemotherapy and deferred radiotherapy: *Neuro-oncology* 11, 201-210.
202. Samuelsson, G. (1973): Mistletoe Toxins: *Systematic Zoology* 22, 566.
203. Samuelsson, G., Pettersson, B. (1970): Separation of viscotoxins from the European mistletoe, *Viscum album* L. (Loranthaceae) by chromatography on sulfoethyl Sephadex. *Acta chemica Scandinavica* 24, 2751-2756.
204. Schad, F., Thronicke, A., Steele, M.L., Merkle, A., Matthes, B., Grah, C., Matthes, H. (2018): Overall survival of stage IV non-small cell lung cancer patients treated with *Viscum album* L. in addition to chemotherapy, a real-world observational multicenter analysis: *PloS one* 13, e0203058.
205. Schaller, G., Urech, K., Giannattasio, M. (1996): Cytotoxicity of Different Viscotoxins and Extracts from the European Subspecies of *Viscum album* L.: *Phytother. Res.* 10, 473-477.
206. Schaller, G., Urech, K., Giannattasio, M., Jäggy, C. (1996): Viscotoxinspektren von *Viscum album* L. auf verschiedenen Wirtsbäumen. *In*: Albrecht, H., Gerhard, I.

- (Eds.): Grundlagen der Misteltherapie. Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung; S. 105-111. Stuttgart: Hippokrates Verlag.
207. Schaller, G., Urech, K., Grazi, G. (2000): Viscotoxine in den drei Unterarten von *Viscum album* L.: Mistelteinn Beiträge zur Mistelforschung. Arlesheim/Schweiz: Kooperative Dürnau.
  208. Scheer, R. (Ed.) (2001): Die Mistel in der Tumorthherapie: Grundlagenforschung und Klinik. Essen: KVC-Verl.
  209. Scheer, R., Alban, S., Becker, H., Blaschek, W., Kemper, Fritz, H., Kreis, W., Matthes, H., Schilcher, H., Stange, R. (Eds.) (2013): Die Mistel in der Tumorthherapie 3: Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung: KVC-Verl.
  210. Scheer, R., Alban, S., Becker, H., Holzgrabe, U., Kemper, Fritz, H., Kreis, W., Matthes, Harald, Schilcher, Heinz (Eds.) (2009): Die Mistel in der Tumorthherapie 2: Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung. Essen: KVC-Verl.
  211. Scheer, R., Errenst, M., Scheffler, A. (1995): Wirtsbaumbedingte Unterschiede von Mistelpräparaten. *Deutsche Zeitschrift für Onkologie* 27; S. 143-149.
  212. Scheffler, A., Richter, C., Beffert, M., Errenst, M., Scheer, R. (1996): Differenzierung der Mistelinhaltsstoffe nach Zeit und Ort. *In*: Albrecht, H., Gerhard, I. (Eds.): Grundlagen der Misteltherapie. Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung; S. 49-77. Stuttgart: Hippokrates Verlag.
  213. Schink, M., Moser, D. (1996): Das Isolektinmuster der Mistellektine. *In*: Albrecht, H., Gerhard, I. (Eds.): Grundlagen der Misteltherapie. Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung; S. 77-85. Stuttgart: Hippokrates Verlag.
  214. Schirrmacher, V. (2019): From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review): *International journal of oncology* 54, 407-419.
  215. Schöffski, P., Riggert, S., Fumoleau, P. (2004): Phase I trial of intravenous aviscumine (rViscumine) in patients with solid tumors: a study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer New Drug Development Group. *Annals of Oncology* 15, 1816-1824.
  216. Schönekaes, K., Micke, O., Mücke, R., Büntzel, J., Glatzel, M., Bruns, F., Kisters, K. (2003): Anwendung komplementärer/alternativer Therapiemassnahmen bei Patientinnen mit Brustkrebs [Use of complementary/alternative therapy methods by patients with breast cancer]: *Forschende Komplementärmedizin und*

klassische Naturheilkunde = Research in complementary and natural classical medicine 10, 304-308.

217. Schötterl, S., Miemietz, J.T., Ilin, E., Wirsik, N.M., Ehrlich, I., Gall, A., Huber, S., Lentzen, H., Mittelbronn, M.G.A., Naumann, U. (2019): Mistletoe-based drugs work in synergy with radio-chemotherapy in the treatment of glioma in vitro and in vivo in glioblastoma bearing mice. Frankfurt am Main: Universitätsbibliothek Johann Christian Senckenberg.
218. Schubert, D., Humphreys, S., Baroni, C., Cohn, M. (1969): In vitro differentiation of a mouse neuroblastoma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 64, 316-323.
219. Schwab, M., Alitalo, K., Klempnauer, K.-H., Varmus, H.E., Bishop, J.M., Gilbert, F., Brodeur, G., Goldstein, M., Trent, J. (1983): Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. Nature 305, 245 EP -.
220. Scripture, C.D., Figg, W.D. (2006): Drug interactions in cancer therapy: Nature reviews. Cancer 6, 546-558.
221. Seeger, R.C., Rayner, S.A., Banerjee, A., Chung, H., Laug, W.E., Neustein, H.B., Benedict, W.F. (1977): Morphology, growth, chromosomal pattern and fibrinolytic activity of two new human neuroblastoma cell lines. Cancer research 37, 1364-1371.
222. Seifert, G., Jesse, P., Längler, A., Reindl, T., Lüth, M., Lobitz, S., Henze, G., Prokop, A., Lode, H.N. (2008): Molecular mechanisms of mistletoe plant extract-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia in vivo and in vitro: Cancer letters 264, 218-228.
223. Seifert, G., Rutkowski, S., Jesse, P., Madeleyn, R., Reif, M., Henze, G., Langler, A. (2011): Anthroposophic supportive treatment in children with medulloblastoma receiving first-line therapy: Journal of pediatric hematology/oncology 33, e105-8.
224. Sharom, F.J. (2008): ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance: Pharmacogenomics 9, 105-127.
225. Shi, Z., Li, W.-W., Tang, Y., Cheng, L.-J. (2017): A Novel Molecular Model of Plant Lectin-Induced Programmed Cell Death in Cancer: Biological & pharmaceutical bulletin 40, 1625-1629.
226. Shimada, H., Nakagawa, A., Peters, J., Wang, H., Wakamatsu, P.K., Lukens, J.N., Matthay, K.K., Siegel, S.E., Seeger, R.C. (2004): TrkA expression in peripheral

- neuroblastic tumors: Prognostic significance and biological relevance: *Cancer* 101, 1873-1881.
227. Simon, T., Hero, B., Schulte, J.H., Deubzer, H., Hundsdoerfer, P., Schweinitz, D. von, Fuchs, J., Schmidt, M., Prasad, V., Krug, B., Timmermann, B., Leuschner, I., Fischer, M., Langer, T., Astrahantseff, K., Berthold, F., Lode, H., Eggert, A. (2017): 2017 GPOH Empfehlungen für Diagnostik und Therapie von Patienten mit neuroblastischen Tumoren [2017 GPOH Guidelines for Diagnosis and Treatment of Patients with Neuroblastic Tumors]: *Klinische Padiatrie* 229, 147-167.
228. Sinzger, M., Vanhoefer, J., Loos, C., Hasenauer, J. (2019): Comparison of null models for combination drug therapy reveals Hand model as biochemically most plausible: *Scientific Reports* 9, 3002.
229. Srdic-Rajic, T., Tisma-Miletic, N., Cavic, M., Kanjer, K., Savikin, K., Galun, D., Konic-Ristic, A., Zoranovic, T. (2016): Sensitization of K562 Leukemia Cells to Doxorubicin by the *Viscum album* Extract: *Phytotherapy research* : PTR 30, 485-495.
230. Stammer, R.M., Kleinsimon, S., Rolff, J., Jager, S., Eggert, A., Seifert, G., Delebinski, C.I. (2017): Synergistic Antitumour Properties of *viscumTT* in Alveolar Rhabdomyosarcoma: *Journal of immunology research* 2017, 4874280.
231. Steinegger, E., Hänsel, R. (2013): *Lehrbuch der Allgemeinen Pharmakognosie*: Springer Berlin Heidelberg.
232. Stirpe, F., Barbieri, L., Battelli, M.G., Soria, M., Lappi, D.A. (1992): Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Bio/technology (Nature Publishing Company)* 10, 405-412.
233. Sun, Y.-L., Patel, A., Kumar, P., Chen, Z.-S. (2012): Role of ABC transporters in cancer chemotherapy: *Chinese journal of cancer* 31, 51-57.
234. Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., Kroemer, G. (1999): Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor: *Nature* 397, 441-446.
235. Tabiasco, J., Pont, F., Fournie, J.-J., Vercellone, A. (2002): Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity. *European journal of biochemistry* 269, 2591-2600.

## LITERATURVERZEICHNIS

236. Tallarida, R.J. (2011): Quantitative methods for assessing drug synergism: *Genes & cancer* 2, 1003-1008.
237. Tang, J., Wennerberg, K., Aittokallio, T. (2015): What is synergy? The Saariselkä agreement revisited: *Frontiers in pharmacology* 6, 181.
238. Taylor, M.D., Northcott, P.A., Korshunov, A., Remke, M., Cho, Y.-J., Clifford, S.C., Eberhart, C.G., Parsons, D.W., Rutkowski, S., Gajjar, A., Ellison, D.W., Lichter, P., Gilbertson, R.J., Pomeroy, S.L., Kool, M., Pfister, S.M. (2012): Molecular subgroups of medulloblastoma: The current consensus. *Acta neuropathologica : pathology and mechanisms of neurological disease* 123, 465-472.
239. Teitz, T., Wei, T., Valentine, M.B., Vanin, E.F., Grenet, J., Valentine, V.A., Behm, F.G., Look, A.T., Lahti, J.M., Kidd, V.J. (2000): Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN: *Nature medicine* 6, 529-535.
240. Thies, A., Nugel, D., Pfüller, U., Moll, I., Schumacher, U. (2005): Influence of mistletoe lectins and cytokines induced by them on cell proliferation of human melanoma cells in vitro: *Toxicology* 207, 105-116.
241. Thompson, C.B. (1995): Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science (New York, N.Y.)* 267, 1456-1462.
242. Thornberry, N.A., Lazebnik, Y. (1998): Caspases: enemies within. *Science (New York, N.Y.)* 281, 1312-1316.
243. Tolbert, V.P., Matthay, K.K. (2018): Neuroblastoma: Clinical and biological approach to risk stratification and treatment: *Cell Tissue Res* 372, 195-209.
244. Tomayko, M.M., Reynolds, C.P. (1989): Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 24, 148-154.
245. Tomlinson, F.H., Jenkins, R.B., Scheithauer, B.W., Keelan, P.A., Ritland, S., Parisi, J.E., Cunningham, J., Olsen, K.D. (1994): Aggressive medulloblastoma with high-level N-myc amplification. *Mayo Clinic proceedings* 69, 359-365.
246. Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C., Croce, C.M. (1984): Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science (New York, N.Y.)* 226, 1097-1099.
247. Twardziok, M., Kleinsimon, S., Rolff, J., Jager, S., Eggert, A., Seifert, G., Delebinski, C.I. (2016): Multiple Active Compounds from *Viscum album* L.

- Synergistically Converge to Promote Apoptosis in Ewing Sarcoma: PloS one 11, e0159749.
248. Urech, K., Jäggy, C., Schaller, G. (2009): Räumliche und zeitliche Dynamik der Viscotoxin- und Mistellektingehalte in der Mistel (*Viscum album* L.). In: Scheer, R., Alban, S., Becker, H., Holzgrabe, U., Kemper, Fritz, H., Kreis, W., Matthes, Harald, Schilcher, Heinz (Eds.): Die Mistel in der Tumortherapie 2. Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung; S. 67-79. Essen: KVC-Verl.
249. Urech, K., Schaller, G., Jaggy, C. (2006): Viscotoxins, mistletoe lectins and their isoforms in mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador: Arzneimittel-Forschung 56, 428-434.
250. Urech, K., Scher, J.M., Hostanska, K., Becker, H. (2005): Apoptosis inducing activity of viscin, a lipophilic extract from *Viscum album* L: The Journal of pharmacy and pharmacology 57, 101-109.
251. Vakifahmetoglu, H., Olsson, M., Zhivotovsky, B. (2008): Death through a tragedy: mitotic catastrophe. Cell Death And Differentiation 15, 1153 EP -.
252. Valentiner, U., Pfüller, U., Baum, C., Schumacher, U. (2002): The cytotoxic effect of mistletoe lectins I, II and III on sensitive and multidrug resistant human colon cancer cell lines in vitro. Toxicology 171, 187-199.
253. Vehmeyer, K., Hajto, T., Hostanska, K., Konemann, S., Loser, H., Saller, R., Wormann, B. (1998): Lectin-induced increase in clonogenic growth of haematopoietic progenitor cells. European journal of haematology 60, 16-20.
254. Vermes, I., Haanen, C., Reutelingsperger, C. (2000): Flow cytometry of apoptotic cell death. Journal of immunological methods 243, 167-190.
255. Wagner, H., Feil, B., Seligmann, O., Petricic, J., Kalogjera, Z. (1986): Phenylpropanes and Lignans of *Viscum album* Cardioactive Drugs V 1: Planta Med 52, 102-104.
256. Wagner, H., Jordan, E. (1988): An immunologically active arabinogalactan from *Viscum album* 'berries': Phytochemistry 27, 2511-2517.
257. Wagner, H., Jordan, E., Feil, B. (1986): Studies on the standardization of mistletoe preparations. Oncology 43 Suppl 1, 16-22.
258. Weber, K., Mengs, U., Schwarz, T., Becker, H., Lentzen, H. (1996): Stimulation of neutropoiesis by a special standardized mistletoe preparation after

- cyclophosphamide chemotherapy in mice. *Arzneimittel-Forschung* 46, 1174-1178.
259. Weißenstein, U., Kunz, M., Urech, K., Baumgartner, S. (2014): Interaction of standardized mistletoe (*Viscum album*) extracts with chemotherapeutic drugs regarding cytostatic and cytotoxic effects in vitro: *BMC complementary and alternative medicine* 14, 6.
260. Weißenstein, U., Kunz, M., Urech, K., Regueiro, U., Baumgartner, S. (2016): Interaction of a standardized mistletoe (*Viscum album*) preparation with antitumor effects of Trastuzumab in vitro: *BMC complementary and alternative medicine* 16, 271.
261. Winterfeld, K., Bijl, L.H. (1949): Viscotoxin, ein neuer Inhaltsstoff der Mistel (*Viscum album* L.): *Justus Liebig's Ann. Chem.* 561, 107-115.
262. Winterfeld, K., Heuken, B. (1960): On the knowledge of viscotoxin. *Archiv der Pharmazie und Berichte der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft* 293/65, 820-826.
263. Wolff, S.M. (1973): Biological effects of bacterial endotoxins in man. *The Journal of infectious diseases* 128, Suppl:259-64.
264. Woodhouse, E.C., Chuaqui, R.F., Liotta, L.A. (1997): General mechanisms of metastasis. *Cancer* 80, 1529-1537.
265. Woynarowski, J.M., Konopa, J. (1980): Interaction between DNA and viscotoxins. Cytotoxic basic polypeptides from *Viscum album* L. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 361, 1535-1545.
266. Wu, C.-P., Calcagno, A.M., Ambudkar, S.V. (2008): Reversal of ABC drug transporter-mediated multidrug resistance in cancer cells: evaluation of current strategies. *Current molecular pharmacology* 1, 93-105.
267. Yadav, B., Wennerberg, K., Aittokallio, T., Tang, J. (2015): Searching for Drug Synergy in Complex Dose-Response Landscapes Using an Interaction Potency Model: *Computational and structural biotechnology journal* 13, 504-513.
268. Yamada, M., Shimizu, K., Tamura, K., Okamoto, Y., Matsui, Y., Moriuchi, S., Park, K., Mabuchi, E., Yamamoto, K., Hayakawa, T. (1989): Establishment and biological characterization of human medulloblastoma cell lines. *No to shinkei = Brain and nerve* 41, 695-702.

## LITERATURVERZEICHNIS

269. Yang, L., Nyalwidhe, J.O., Guo, S., Drake, R.R., Semmes, O.J. (2011): Targeted Identification of Metastasis-associated Cell-surface Sialoglycoproteins in Prostate Cancer: *Mol Cell Proteomics* 10, M110.007294.
270. Yap, T.A., Omlin, A., Bono, J.S. de (2013): Development of therapeutic combinations targeting major cancer signaling pathways: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31, 1592-1605.
271. Yin, N., Ma, W., Pei, J., Ouyang, Q., Tang, C., Lai, L. (2014): Synergistic and antagonistic drug combinations depend on network topology: *PloS one* 9, e93960.
272. Youle, R.J., Strasser, A. (2008): The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death: *Nature reviews. Molecular cell biology* 9, 47-59.
273. Yu, D.M.T., Huynh, T., Truong, A.M., Haber, M., Norris, M.D. (2015): ABC transporters and neuroblastoma: *Advances in cancer research* 125, 139-170.
274. Zanini, C., Ercole, E., Mandili, G., Salaroli, R., Poli, A., Renna, C., Papa, V., Cenacchi, G., Forni, M. (2013): Medullospheres from DAOY, UW228 and ONS-76 cells: increased stem cell population and proteomic modifications: *PloS one* 8, e63748.
275. Zarkovic, N., Vukovic, T., Loncaric, I., Miletic, M., Zarkovic, K., Borovic, S., Cipak, A., Sabolovic, S., Konitzer, M., Mang, S. (2001): An overview on anticancer activities of the *Viscum album* extract Isorel: *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* 16, 55-62.
276. Zuzak, T.J., Rist, L., Eggenschwiler, J., Grotzer, M.A., Viviani, A. (2006): Paediatric medulloblastoma cells are susceptible to *Viscum album* (Mistletoe) preparations. *Anticancer research* 26, 3485-3492.
277. Zuzak, T.J., Wasmuth, A., Bernitzki, S., Schwermer, M., Längler, A. (2018): Safety of high-dose intravenous mistletoe therapy in pediatric cancer patients: A case series: *Complementary Therapies in Medicine* 40, 198-202.



## 10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
ad	adde
ad libitum	nach Belieben
AK	Antikörper
ALK	<i>anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase</i>
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3 related
aVF	abnoBaVISCUM Fraxini
Beh.	Behandlung
bp	base pair (Basenpaare)
BrdU	5-Bromo-2'-desoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
CAM	complementary and alternative medicine (Komplementärmedizin)
cDNA	Copy DNA (komplementäre DNS)
Ch.-B.	Chargen-Bezeichnung
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit
dNTP	2'- Desoxyribonukleotid-5'- Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence (verstärkte Chemilumineszenz)
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay (Enzym-gekoppeltes antikörperbasiertes Nachweisverfahren)
et al.	et aliae/et alii (und andere)
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gy	Gray
h	hour (Stunde)
HRP	Horse radish peroxidase (Meerrettichperoxidase)

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>i. p.</i>	intraperitoneal
<i>i. v.</i>	intravenös
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration
IQR	Inter Quartile Range (Interquartilsabstand)
kDa	Kilo- Dalton
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
LCA	large cell/anaplastic medulloblastoma (großzelliges/anaplastisches Medulloblastom)
LD <sub>50</sub>	Letale dosis für 50 % einer Population
LD <sub>50/30d</sub>	LD <sub>Quote/Verzögerung</sub> ; Dosis, bei der 50 % der Betroffenen nach 30 Tagen versterben
LDS	Lithiumdodecylsulfat
m	männlich
mA	Milliampere
MB	Medulloblastom
MES	2-( <i>N</i> -Morpholino)-ethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	minute (Minute)
ML	Mistellektin
ml	Milliliter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure (Boten-RNA)
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
NB	Neuroblastom
ng	Nanogramm
<i>MYCN</i>	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidiumiodid

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

POD	Peroxidase
QoL	quality of life (Lebensqualität)
rcf	relative centrifugal force (relative Zentrifugalkraft)
RIPA	radioimmunoprecipitation assay buffer (Radioimmunopräzipitations Puffer)
RLU	Relative Light Units
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
ROI	Reaktive Sauerstoffintermediate
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT- PCR	Reverse Transkriptions- PCR
sek	Sekunde
s.c.	subcutan
SCE	Sister chromatid exchange
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	sogenannt
STD	standard deviation (Standardabweichung)
Tab.	Tabelle
TBST	TRIS gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (= 2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol)
TAE Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
u. a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
VAA	Viscum Album Agglutinin
w	weiblich
w/v	Gewicht/Volumen
wt	Wildtyp
x	-mal (Aufzählung)
x-fach g	x-fache Erdbeschleunigung, diese entspricht 9,80665 m/s
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
%	Prozent

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

## 11 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Semiparasitisch wachsende Mistelpflanze .....	15
Abb. 2: Übersicht der postulierten Wirkungen von Mistelinhaltsstoffen .....	19
Abb. 3: Inzidenz kindlicher Tumorerkrankungen. ....	23
Abb. 4: Übersicht beider Hauptapoptosewege. ....	35
Abb. 5: Reduktion des gelb gefärbten MTT zum violett gefärbten Formazan. ....	50
Abb. 6: Morphologische Charakterisierung der Zelllinie LAN-1 und ihrer gegen Cisplatin bzw. Etoposid resistent gezüchteten Subzelllinien. ....	51
Abb. 7: Versuchsaufbau des Boyden Chamber Invasion-assays .....	55
Abb. 8: Chemische Formel von Mitotracker Deep Red®. ....	57
Abb. 9: Schematischer Aufbau des Semi-Dry Western Blots .....	61
Abb. 10: Funktionsprinzip des antikörpervermittelten Farbnachweises der Mistellektine .....	68
Abb. 11: Layout der Behandlung zur Detektion von $\gamma$ -H2AX Foci .....	74
Abb. 12: Behandlungsprinzip des Koloniebildungstests. ....	76
Abb. 13: Mit aVF behandeltes adultes Zelllinien-Panel. ....	85
Abb. 14: Mit aVF behandeltes pädiatrisches Zelllinien-Panel. ....	86
Abb. 15: Mit aVF behandeltes murines Zelllinien-Panel. ....	86
Abb. 16: Dosis-Wirkungskurven der ausgewählten Neuroblastom- und Medulloblastomzelllinien im direkten Vergleich zu humanen Fibroblasten. ....	87
Abb. 17: Auswirkungen einer Behandlung mit aVF auf die Tumorzellproliferation .....	90
Abb. 18: Echtzeitüberwachung der Effekte einer Behandlung mit aVF im xCELLigence System.....	91
Abb. 19: Apoptosenachweis mithilfe durchflusszytometrischer Zellzyklusanalyse .....	92
Abb. 20: Caspasen-abhängigkeit der ausgelösten Apoptose .....	93
Abb. 21: Aktivitätsbestimmung der Caspasen-8 und -9 mittels Caspase-Glo assay .....	94
Abb. 22: Expression der mRNA, die für Caspase-9 (Casp-9) codiert .....	96
Abb. 23: Expression der mRNA, die für Caspase-8 (Casp-8) codiert .....	97
Abb. 24: Untersuchung der apoptotischen Spaltung von PARP und der Prozessierung der Pro-caspase-8 auf Proteinebene durch Western-Blot Analyse. ....	98
Abb. 25: Detektion der Pro-caspase-9 durch Western Blot Analyse .....	99
Abb. 26: Einflüsse des Mistelextraktes aVF auf die mitochondriale Integrität .....	100
Abb. 27: Grafische Darstellung der Resultate des Versuchsaufbaus eines Boyden Chamber Invasions-assays.....	101
Abb. 28: Grafische Darstellung der Resultate eines Boyden Chamber Migrations-assays .	102
Abb. 29: Grafische Darstellung der softwaregestützten Auswertung (ImageJ) des Migrationsareals beim Scratch-assay .....	103

Abb. 30: Mikroskopische Fotodokumentation des „Wundverschlusses“ im Scratch-assay .	104
Abb. 31: Effekte von aVF auf den Wundverschluss im Scratch assay durch Messung der Breite des Kratzbereichs.....	105
Abb. 32: Dosis-Wirkungskurven der parentalen Zelllinie LAN-1 und ihrer Chemotherapie-resistenten Subzelllinien nach Monotherapie mit Cisplatin bzw. Etoposid oder aVF .....	107
Abb. 33: Synergieanalyse einer kombinierten Wirkung von Etoposid bzw. Cisplatin mit aVF auf LAN-1 Zelllinien basierend auf verschiedenen Referenzmodellen. ....	109
Abb. 34: Matrix-Synergieanalyse auf Basis der Referenzmodelle Bliss, Loewe und HSA t.	110
Abb. 35: Relative Quantifizierung der mRNA-Expressionsraten verschiedener ABC-Transporter.....	112
Abb. 36: Synergieanalyse einer kombinatorischen Behandlung aus Bestrahlung und Mistelbehandlung.....	114
Abb. 37: Dosis-Wirkungskurven nach Bestrahlung der Tumorzellen .....	115
Abb. 38: Analyse der Einflussnahme des Behandlungszeitpunktes auf den Therapieerfolg einer kombinierten Mistel und Bestrahlungsexposition.....	116
Abb. 39: Reparaturkinetik von strahleninduzierten (1 Gy) DSB in SH-SY5Y Zellen durch Quantifikation von $\gamma$ -H2AX-Foci nach PI/FITC Doppelfärbung .....	118
Abb. 40: Quantitative Analyse der Auswirkungen verschiedener Behandlungszeitpunkte auf die Reparatur von DSB, durch Bestimmung der Menge an $\gamma$ -H2AX-Foci. ....	119
Abb. 41: Darstellung der relativen Überlebensrate („surviving fraction“), durch Auszählung von gebildeten Kolonien.....	121
Abb. 42: Testung des <i>in vitro</i> Ansprechens der murinen Neuroblastomzelllinie C1300. ....	122
Abb. 43: Resultate der Wirkungen des Mistelextraktes <i>in vivo</i> . ....	124
Abb. 44: Beispielhafte Darstellung der Tumoren zweier männlicher Versuchstiere bei Beendigung des Experiments. ....	124
Abb. 45: Murines Neuroblastom 13 Tage nach der <i>subcutanen</i> Einbettung.....	125
Abb. 46: Auswirkung von niedrig konzentrierten Mistelapplikationen auf die Länge des Gesamtüberlebens im syngenem Neuroblastommausmodell.....	127
Abb. 47: Auswirkung von mittelstark dosiertem aVF auf die Länge des Gesamtüberlebens.. ....	129
Abb. 48: Fieberkurve.....	130

**12 TABELLENVERZEICHNIS**

Tab. 1: Lektine der Mistel und ihre Zuckerspezifitäten. ....	16
Tab. 2: Übersicht der weiteren Mistelinhaltsstoffe. ....	17
Tab. 4: 15-Jahres-Überlebensraten aus dem Deutschen Kinderkrebsregister.....	24
Tab. 5: Stadieneinteilung von Neuroblastomen nach INSS-Kriterien.....	26
Tab. 6: Tumorklassifikation von Medulloblastomen nach Chang. ....	28
Tab. 7: Einteilung der Medulloblastome aufgrund ihres molekulargenetischen Profils.....	29
Tab. 8: Beispiele für verminderten Apoptose bei der Tumorgenese. ....	32
Tab. 9: Zusammensetzung der verwendeten Medien.....	47
Tab. 10: Verwendete Zelllinien und dafür gebrauchte Medien.....	47
Tab. 11: Verwendete Primärantikörper (Western Blot). ....	63
Tab. 12: Verwendete Sekundärantikörper (Western Blot). ....	63
Tab. 13: Gewählte Programme bei der semiquantitativen PCR. ....	65
Tab. 14: Verwendete Primer bei der semiquantitativen PCR.....	65
Tab. 15: Verwendete Primer in der Real Time PCR. ....	67
Tab. 16: Verwendete Fangantikörper des ELISA Verfahrens. ....	69
Tab. 17: Verwendete Detektionsantikörper des ELISA Verfahrens. ....	69
Tab. 19: Einteilung und Bewertung der CI Werte gemäß Chou et al. ....	72
Tab. 18: Verwendete Behandlungsdosen der Kombinationsversuche.....	73
Tab. 20: Injektionsschema zur Ermittlung der MTD.....	79
Tab. 21: Übersicht der Behandlung des zweiten Toxizitätstests.....	80
Tab. 22: Randomisierung der Versuchstiere ....	81
Tab. 23: Gesamtlektingehalte ermittelt durch Sandwich-ELISA. ....	83
Tab. 24: IC <sub>50</sub> -Werte verschiedener Mistelpräparate auf Tumorzelllinien pädiatrischer Tumorentitäten.....	88
Tab. 25: IC <sub>50</sub> -Werte verschiedener Mistelpräparate auf Tumorzelllinien adulter Tumorentitäten.....	88
Tab. 26: Ergebnisse des ersten Langzeitversuchs zur Einflussnahme von aVF auf das Gesamtüberleben. ....	126
Tab. 27: Ergebnisse des zweiten Langzeitversuchs zur Einflussnahme von aVF auf das Gesamtüberleben. ....	128
Tab. 28: Blutwerte:.....	131

### **13 DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof Dr. med. Tycho Zuzak herzlich für die Überlassung dieses anwendungsnahen und spannenden Themas, seine freundliche Art und das tolle Arbeitsklima. Außerdem danke ich ihm für sein Vertrauen und die Möglichkeit des selbstständigen Planens und Entscheidens in unseren Forschungsprojekten.

Herrn Prof. Dr. med. Dirk Reinhardt, Direktor der Kinderklinik III danke ich sehr für seine Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Schramm für seine Unterstützung, seine Begleitung dieser Arbeit, die wissenschaftlichen Diskussionen, wertvollen Ratschläge und seine konstruktive Kritik.

Herrn Dr. Harald Stephan und Frau Dr. Melanie Schwermer danke ich für die aktive und unterstützende Zusammenarbeit und die netten Gespräche.

Ich danke allen ehemaligen und derzeitigen Arbeitskollegen des Hämatologisch-Onkologischen Labors der Kinderklinik III: Frau Prof. Angelika Eggert, Herrn Sebastian Vogt, Frau Stephanie Freund, Frau Sabine Dreesmann, Herrn Simon Schäfers, Frau Ellen Mahlow und Frau Andrea Drothler.

Herrn Prof. Iliakis danke ich für die Möglichkeit im Institut für Medizinische Strahlenbiologie meine Zellen bestrahlen zu dürfen und Herrn Christian Möllers für die nette Einführung in die Geräte.

Ich danke meiner besten Freundin Sandra für das Stück gemeinsamen Lebensweg. Jetzt bist du ein echter Engel.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie für ihre liebevolle und unendliche Unterstützung, ihr Verständnis und ihr Vertrauen in das Gelingen dieser Arbeit.



## **14 LEBENS LAUF**

**Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.**

## LEBENS LAUF

**Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.**

## LEBENS LAUF

**Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.**

## LEBENS LAUF

**Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.**

## LEBENS LAUF

**Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.**

LEBENS LAUF

**Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.**

## LEBENS LAUF

**Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.**