

Aus dem

Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene

Uni-Zentrum Naturheilkunde

der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau



Immunologische Effekte verschiedener Mistelextrakte in  
Wechselwirkung mit humanen Tumorzellüberständen –  
ein Modell mit Dendritischen Zellen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der Albert-Ludwigs-Universität

Freiburg im Breisgau

vorgelegt 2015  
von Sophie Rieger  
geboren in Köln



Dekanin Prof. Dr. Kerstin Krieglstein

Erster Gutachter PD Dr. med. Roman Huber

Zweiter Gutachter Prof. Dr. med. Dipl. Biol. Christoph M. Schempp

Jahr der Promotion 2015



Gewidmet

meiner Mutter und meiner Großmutter,  
für Orte, an denen man atmen kann.

## Danksagung

In der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit wurde ich von vielen Menschen begleitet und unterstützt. Mein Dank gilt all den Menschen, die diesen Weg mit mir zusammen gegangen sind.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. med. Roman Huber am Unizentrum Naturheilkunde, der mich in der Durchführung dieser Dissertation stets unterstützt und gefördert hat und mir immer mit wertvollem Rat zur Seite stand.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Carsten Gründemann am Unizentrum Naturheilkunde für viele hilfreiche und anregende Gespräche und die ausgezeichnete Betreuung.

Mein Dank gilt außerdem Barbara Sauer, die mir eine große Hilfe im Labor war.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Herstellern der Mistelpräparate, dem Verein für Krebsforschung (Hiscia, Arlesheim, Schweiz) und der ABNOBA GmbH, Pforzheim, die mir ihre Präparate freundlicherweise zur Verfügung gestellt haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die immer und in jeder Lebenslage mit viel Unterstützung, Geduld und Liebe für mich da ist und die dadurch wesentlich zu der Vollendung dieser Arbeit beigetragen hat.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	10
Abstract.....	11
1. Einleitung.....	12
1.1 Tumorerkrankungen in Deutschland sowie Bedarf an Komplementärmedizin .....	12
1.2 Die Mistel.....	13
1.3 Dendritische Zellen .....	14
1.4 Der Einfluss von Tumorzellen auf das Immunsystem .....	15
1.5 Ziele der Arbeit .....	15
2. Material.....	17
2.1 Chemikalien.....	17
2.2 Antikörper und Färbereagenzien .....	18
2.3 Medien und Puffer .....	18
2.4 Mistelpräparate .....	19
2.4.1 Iscador Qu spez® .....	19
2.4.2 AbnobaViscum® Fraxini .....	19
3. Methoden.....	20
3.1 Aufreinigung der Buffy Coats .....	20
3.2 Zellzahlbestimmung.....	20
3.3 CD14-Selektion .....	21
3.4 Herstellung der Ansätze .....	22
3.4.1 Mature Dendritische Zellen .....	22
3.4.2 IL-6 .....	23
3.4.3 Mistelextrakte .....	23

3.4.4 Tumorzellüberstände.....	23
3.4.5 Mediumkontrolle .....	24
3.5 Zytotoxizitätsfärbung.....	25
3.6 Bestimmung der Expression der Oberflächenmarker CD83, CD86 und CD14 .....	26
3.7 Ansetzen von Co-Kulturen Dendritischer Zellen und CD4+ T-Zellen .....	27
3.8 Statistische Auswertung.....	29
4. Ergebnisse .....	30
4.1 Stimulierbarkeit Dendritischer Zellen im gewählten System.....	30
4.2 Hemmbarkeit Dendritischer Zellen im gewählten System.....	32
4.3 Einfluss des Mistelpräparates Iscador Qu spez® auf den Reifungszustand Dendritischer Zellen.....	33
4.3.1 Einfluss verschiedener Konzentrationen von Iscador Qu spez® .....	33
4.3.2 Zeitkinetische Effekte der Gabe von Iscador Qu spez® .....	35
4.3.3 Effekte der additiven Gabe von Iscador Qu spez® .....	37
4.4 Einfluss der Tumorzellüberstände auf die Reifung Dendritischer Zellen.....	39
4.5 Aufhebung der tumorinduzierten Reifungsinhibition durch Iscador Qu spez® .....	41
4.5.1 Zeitkinetische Effekte der Gabe von Iscador Qu spez® in Kombination mit Tumorzellüberständen.....	43
4.5.2 Effekte der additiven Gabe von Iscador Qu spez® in Kombination mit Tumorzellüberständen.....	49
4.6 Konzentrationsabhängige Zytotoxizität von AbnobaViscum® Fraxini .....	55
4.7 Einfluss verschiedener Konzentrationen von AbnobaViscum® Fraxini auf den Reifungszustand Dendritischer Zellen.....	57
4.8 Aufhebung der tumorinduzierten Reifungsinhibition durch verschiedene Konzentrationen von AbnobaViscum® Fraxini .....	60
4.9 Einfluss unterschiedlich behandelter Dendritischer Zellen auf CD4+ T-Zellen in Co-Kultur .....	67
4.9.1 Einfluss auf die Proliferationsrate der CD4+ T-Zellen .....	67
4.9.2 Einfluss auf die Zytokinsekretion der CD4+ T-Zellen.....	70

5. Diskussion .....	71
5.1 Zur Eignung der gewählten Methoden .....	71
5.2 Reifungsinduktion von Dendritischen Zellen durch die getesteten Mistelpräparate .....	72
5.3 Reifungsinhibition von Dendritischen Zellen durch Tumorzellüberstände .....	74
5.4 Aufhebbarkeit der tumorinduzierten Reifungsinhibition durch die getesteten Mistelpräparate.....	75
5.5 Wirkung mit Mistelextrakt oder Tumorzellüberstand behandelte Dendritischer Zellen auf CD4+ T-Zellen in Co-Kultur .....	76
5.6 Klinische Anwendbarkeit und Ausblick .....	77
6. Abkürzungsverzeichnis .....	79
7. Literaturverzeichnis.....	81
8. Erklärung.....	85

## Zusammenfassung

**Hintergrund und Fragestellung:** Mistelpräparate werden in der Komplementärmedizin häufig bei Tumorpatienten eingesetzt. Sie haben unter anderem immunstimulierende Effekte.

Dendritische Zellen stellen die wichtigsten Antigenpräsentierenden Zellen des menschlichen Immunsystems dar und spielen eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung einer Tumorerkrankung.

Das Ziel der vorliegenden in vitro Studie war, die Fragestellung aufzuklären, in welcher Weise ein Einfluss von Mistelextrakten auf die Reifung Dendritischer Zellen stattfindet. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob Mistelextrakte den immunsuppressiven Einfluss von Tumorzellüberständen auf Dendritische Zellen aufheben können.

**Material und Methoden:** Immature Dendritische Zellen wurden aus Monozyten gesunder Spender generiert und mit den Mistelextrakten Iscador Qu spez® und AbnobaViscum® Fraxini sowie mit Tumorzellüberständen behandelt. Der Reifungszustand der Zellen wurde nach drei Tagen Inkubation anhand der Messung der Oberflächenmarker CD83, CD86 und CD14 mithilfe eines Durchflusszytometers festgestellt.

**Ergebnisse:** Es konnte anhand der Oberflächenmarker CD83, CD86 und CD14 sowohl eine Reifungsinhibition der Dendritischen Zellen durch Inkubation mit Tumorzellüberständen, als auch eine Reifungsinduktion durch Inkubation mit den Mistelextrakten gezeigt werden. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass bei einer Vorinkubation mit Mistelextrakt die hemmende Wirkung des Tumorzellüberstandes teilweise aufgehoben werden kann.

**Fazit:** Die Ergebnisse der vorliegenden Studie liefern Erkenntnisse über den möglichen Wirkmechanismus der Mistel auf das Immunsystem von Tumorpatienten. Allerdings gilt es zusätzlich nachzuweisen, ob die anhand der Oberflächenmarker nachgewiesene Reifung der Dendritischen Zellen sich tatsächlich auch in deren verbesserter Funktion widerspiegelt. Maßgeblich bleibt die Optimierung des therapeutischen Einsatzes von Mistelpräparaten im Rahmen der Tumorbekämpfung.

## Abstract

**Background and aims:** Mistletoe preparations are frequently used with tumor patients as part of complementary therapies. Amongst others they have immunostimulatory effects.

Dendritic cells represent the most important antigen-presenting cells of the human immune system and play a crucial role in combatting cancer.

The aim of the present in vitro study was to investigate the impact of mistletoe extracts on the maturation of dendritic cells. Furthermore it should be examined whether mistletoe extracts are able to neutralize the immunosuppressive effects of tumor cell supernatants on dendritic cells.

**Materials and Methods:** Immature dendritic cells were generated from monocytes of healthy donors and treated with the mistletoe extracts Iscador Qu spez® and AbnobaViscum® Fraxini as well as with tumor cell supernatants. The level of maturity was measured after three days of incubation by analyzing the surface markers CD83, CD86 and CD14 by flow cytometry.

**Results:** It could be shown that incubating dendritic cells with tumor cell supernatant inhibited maturation and that their maturation was induced by incubating them with the mistletoe extracts.

Furthermore it could be shown that pre-incubation with the mistletoe extract partially compensated the inhibitory effect of the tumor cell supernatant.

**Conclusion:** The results of the present study provide a potential mode of action of mistletoe preparations on the immune system of tumor patients. However it should be additionally investigated whether the measured maturation of dendritic cells is also reflected in an improved cell function. The optimisation of the therapeutic use of mistletoe preparations remains the relevant aim of further studies.

# 1. Einleitung

## 1.1 Tumorerkrankungen in Deutschland sowie Bedarf an Komplementärmedizin

In Deutschland ist aufgrund des demographischen Wandels ein jährlicher Anstieg der Krebsinzidenz zu verzeichnen. Laut Robert Koch Institut lag die Zunahme der Krebsinzidenz zwischen 2000 und 2010 unter Männern bei 21% und unter Frauen bei 14%. Während die Anzahl an Krebsneuerkrankungen für das Jahr 2010 bei knapp 480.000 lag, wird für das Jahr 2015 ein Anstieg auf über 500.000 erwartet (RKI, 2015).

Aufgrund modernster Therapieverfahren geht die Krebssterblichkeit zwar zurück, liegt mit über 200.000 Todesfällen pro Jahr aber an zweiter Stelle der führenden Todesursachen in Deutschland (Deutsches Krebsforschungszentrum, 2013).

Aus diesem Grund wird weiterhin nach modifizierten und neuen Therapieverfahren gesucht, die die herkömmlichen Therapien wie Operationen, Chemotherapie und Radiotherapie ergänzen können.

Eine Richtung neuer Therapieverfahren besteht in Substanzen, die die Immunabwehr gegenüber Tumoren aktivieren beziehungsweise die tumorbedingte Immunsuppression aufheben (Desbois et al., 2015; Lindsay et al., 2015; Rini, 2014).

Weiterhin besteht ein Bedarf an Therapien, die die Lebensqualität von Tumorpatienten und die Verträglichkeit der Standardtherapien verbessern. Einen wichtigen Bestandteil stellen hier komplementärmedizinische Behandlungsverfahren dar, worunter die Misteltherapie, als am häufigsten angewandte komplementärmedizinische Krebstherapie, eine besonders wichtige Stellung einnimmt (Kienle und Kiene, 2003).

Rund 40% der Krebspatienten in Europa und den USA greifen, meist begleitend zu einer Chemo- oder Radiotherapie, auf komplementärmedizinische Behandlungsverfahren zurück (Kienle und Kiene, 2003; Schlaeppli et al., 2005). Im deutschsprachigen Raum gehört die Misteltherapie zu den am häufigsten angewendeten komplementären Verfahren (Schlaeppli et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden daher Präparate aus der Mistel (*Viscum album*) näher untersucht.

## 1.2 Die Mistel

Bei *Viscum album* L. handelt es sich um die in Europa am weitesten verbreitete Mistel, welche als immergrüner Halbschmarotzer auf verschiedenen Wirtsbäumen wächst (Kienle und Kiene, 2003).

Der genaue Wirkmechanismus der Mistelpräparate im menschlichen Organismus ist noch nicht eindeutig geklärt. Mistellektine, Glykoproteine, die aus einer zytotoxischen A-Kette und einer zuckerbindenden B-Kette bestehen, welche mittels Disulfidbrücken verbunden sind (Franz, 1986; Samtleben et al., 1985), sind für die meisten nachgewiesenen zytotoxischen und immunmodulierenden Effekte wesentlich (Huber et al., 2005).

Mittels der B-Kette bindet Mistellektin I-III an Kohlenhydratresiduen der Zelloberfläche und bringt per Rezeptor-mediiertes Endozytose das gesamte Mistellektin in die Zelle (Franz, 1991; Stirpe et al., 1992). Die A-Kette inhibiert die Proteinsynthese in der Zelle durch Inaktivierung der Ribosomen, was in den programmierten Zelltod, der Apoptose mündet (Franz, 1990; Stirpe et al., 1992). Neben den Mistellektinen sind Viscotoxine und Polysaccharide als weitere immunmodulierende Inhaltsstoffe beschrieben (Kienle und Kiene, 2003).

Der Mistel werden allgemein immunstimulierende Eigenschaften zugesprochen. Unter Misteltherapie wurde eine verstärkte Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen beobachtet sowie eine erhöhte Anzahl und Aktivität von Immunzellen, wie zum Beispiel T-Lymphozyten und Natürliche Killerzellen (Kim et al., 2012).

Mistelextrakte werden seit den 1920er Jahren in der Anthroposophischen Medizin und seit 1978 in der Phytotherapie parenteral zur unterstützenden Behandlung von Tumorpatienten angewendet (Büssing, 2000; Kienle und Kiene, 2003) und haben hierfür in Deutschland auch eine Zulassung. Neben zahlreichen *in vitro* Effekten wie der Induktion von Apoptose in Tumorzellen, einer Hemmung der tumorinduzierten Angiogenese und einer Stimulierung des zellulären Immunsystems (Kienle und Kiene, 2003), fand sich bei der Anwendung von Mistelextrakten auch eine klinische Wirksamkeit. Zwei placebokontrollierte Doppelblindstudien zeigten eine Verbesserung der Lebensqualität bei Patientinnen mit Mammakarzinom unter Chemotherapie (Horneber et al., 2008).

In verschiedenen Studien zeigten sich bei entsprechender Dosierung pro-apoptotische Effekte der Lektine auf Krebszellen (Yau et al., 2015).

### 1.3 Dendritische Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Mistelpräparaten auf den Reifungszustand Dendritischer Zellen (DC) betrachtet.

Bei DC handelt es sich um die potentesten Antigen-präsentierenden Zellen des menschlichen Immunsystems (Lechmann et al., 2002a; Murphy, 2012; Oosterhoff et al., 2012). Sie entstehen entweder aus Monozyten oder aus myeloiden Vorläuferzellen (Kaufmann, 2014).

DC sind in der Lage, über Phagozytose und Makropinozytose Antigene aufzunehmen (Liu and Roche, 2015). Die über diesen Prozess ausgelöste Stimulierung lässt sie zu maturen Zellen reifen, die auf äußerst effektive Weise T-Lymphozyten aktivieren können (Kaufmann, 2014; Liu and Roche, 2015). Die Aktivierung der T-Lymphozyten erfolgt über die Präsentation von Antigenen (Liu and Roche, 2015; Murphy, 2012). Durch diese Fähigkeit sind DC entscheidend an der Aktivierung des erworbenen Immunsystems beteiligt und stellen eine wichtige Verbindung zwischen dem erworbenen und angeborenen Teil des menschlichen Immunsystems dar (Murphy, 2012).

Auf ihrer Oberfläche exprimieren DC eine Vielzahl von Molekülen. Einige dieser Moleküle dienen als Marker für aktivierte DC, darunter das Glykoprotein CD83 und das co-stimulierende Molekül CD86 (Lechmann et al., 2002b). Die Expression beider Moleküle wird während des Reifungsprozesses zu maturen DC hochreguliert, eine Entwicklung, die entscheidend für die T-Zell-Aktivierung ist (Lechmann et al., 2002a; Zhou and Tedder, 1996).

Neben diesen beiden Markern wurde in der vorliegenden Arbeit außerdem das Oberflächenmolekül CD14 untersucht. CD14 wird typischerweise auf Monozyten exprimiert. Während der Entwicklung von Monozyten zu DC, wie sie in diesem in vitro Modell generiert wurde, wird die Expression von CD14 herunter reguliert (Chapuis et al., 1997; Santin et al., 1999).

## **1.4 Der Einfluss von Tumorzellen auf das Immunsystem**

Die Funktion von DC wird unter dem Einfluss von Tumoren häufig beeinträchtigt (Stein et al., 2002). Diese Schwächung des Immunsystems ist eine der Strategien von Tumoren, der natürlichen Immunantwort zu entgehen.

Um der Bekämpfung durch das Immunsystem zu entkommen, sezernieren Tumorzellen verschiedene, unter anderem immunsuppressive, Substanzen (Sombroek et al., 2002). Zu diesen Substanzen gehört zum Beispiel der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), welcher die Proliferation und Differenzierung endothelialer Zellen anregt (Cross and Claesson-Welsh, 2001) und somit Neoangiogenese und Gefäßversorgung des Tumors unterstützt (Duffy et al., 2004). In einigen Studien wird VEGF außerdem die Eigenschaft zugesprochen, DC in ihrer Fähigkeit, T-Zellen zu stimulieren, hemmen zu können (Gabrilovich et al., 1996).

Weitere von Tumorzellen sezernierte Substanzen sind Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), welches neben verschiedenen immunmodulatorischen Effekten auch die Funktion und Differenzierung von DC hemmen kann (Kalinski, 2012; Sombroek et al., 2002) und verschiedene Interleukine, welche inaktivierend auf das Immunsystem wirken (Elluru et al., 2008). Einige Interleukine können ebenfalls DC in ihrer Reifung und Funktion hemmen, darunter unter anderem IL-6 (Oosterhoff et al., 2012). Aus diesem Grund wurde IL-6 in der vorliegenden Arbeit als Kontrolle zur Darstellung der Hemmbarkeit von DC verwendet.

Für die Krebstherapie stellt die Fähigkeit von Tumoren, dem Immunsystem zu entgehen, ein großes Problem dar. Aus diesem Grund sollte ein besonderes Augenmerk auf Substanzen liegen, die das Immunsystem stärken, um den Körper somit darin zu unterstützen, den Tumor selbst zu bekämpfen.

## **1.5 Ziele der Arbeit**

Hinsichtlich ihrer stimulierenden Eigenschaften auf DC ist die Mistel bisher nur in zwei Studien untersucht worden (Elluru et al., 2008; Stein et al., 2002), was unter anderem ausschlaggebend dafür war, sich in der vorliegenden Arbeit diesem Thema zu widmen.

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, welchen Einfluss Mistelextrakte auf die Reifung von aus Monozyten generierten DC haben. Zuerst sollte untersucht werden, welche

Konzentrationen der Mistelpräparate zytotoxisch sind und welche Konzentrationen für die Experimente verwendet werden können.

Im Anschluss sollte herausgefunden werden, ob die Mistelpräparate in diesen nicht zytotoxischen Konzentrationen einen stimulierenden Einfluss auf die Reifung von DC haben.

Zum anderen sollte der Einfluss von Tumorzellüberständen zweier Tumorzelllinien auf dieselben Reifungsparameter untersucht werden. Angenommen wurde, dass die Tumorüberstände eine Reifungsinhibition der DC zur Folge hätten.

Des Weiteren sollte auf der Basis dieser beiden Ansätze untersucht werden, ob es möglich ist, durch die Zugabe der Mistelpräparate die Hemmung der DC durch die Tumorzellüberstände aufzuheben.

## 2. Material

### 2.1 Chemikalien

Material	Handelsname	Hersteller
CD14 Selection Kit	EasySep® Human CD14 Selection Kit	Stemcell Technologies, Grenoble, Frankreich
CD4 Enrichment Kit	EasySep® Human CD4 <sup>+</sup> T Cell Enrichment Kit	
GM-CSF	Leukine® Sargramostim	Bayer HealthCare Pharmaceuticals, Seattle, USA
Interleukin-4	Recombinant Human IL-4	PeproTech®, Hamburg, Deutschland
Interleukin-6	Recombinant Human IL-6	
Interleukin-1 $\beta$	Recombinant Human IL-1 $\beta$	
TNF- $\alpha$	Recombinant Human TNF- $\alpha$	
LPS	Lipopolysaccharide (LPS) from E. coli	Sigma-Aldrich®, Taufkirchen, Deutschland
CPT	Camptothecin	Tocris Bioscience, R&D Systems, Abingdon, England
Triton X 100	Triton X 100	Carl Roth, Heidelberg, Deutschland
FCS	Fetal Bovine Serum Gold	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin	Penicillin/Streptomycin (100x)	
Trypsin	Trypsin/EDTA (10x)	
PHA	Phytohemagglutinin-L (PHA-L)	Roche Applied Sciences, Deutschland

## 2.2 Antikörper und Färbereagenzien

Material	Handelsname	Hersteller
Anti-human-CD14-APC	CD14 APC (Clone 61D3)	Affymetrix eBioscience®, Hatfield, England
Anti-human-CD83-FITC	Anti-Human CD83 FITC (Clone HB15e)	
Anti-human-CD86-PE	Anti-Human CD86 (B7-2) PE (Clone IT2.2)	
Annexin V FITC	Annexin V-FITC	
Propidiumjodid	Propidium Iodide (PI) Staining Solution	
CFSE	5-(and 6)-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFDA SE	

## 2.3 Medien und Puffer

Material	Zusammensetzung	Hersteller
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PBS, Dulbeccos (1x) ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	PAA, Pasching, Österreich
Lymphoprep™	Lymphoprep™	AXIS-SHIELD PoC AS, Oslo, Norwegen
CellGro®	GMP Dendritic Cell Medium (DC)	CellGenix, Freiburg, Deutschland
MACS-Puffer	PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> 2% FCS, 0,2% NaN <sub>3</sub> , 0,5% FCS, 2mM EDTA	Aus eigener Herstellung
FACS-Puffer	PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> mit 2% FCS, 0,1% NaN <sub>3</sub>	Aus eigener Herstellung
RPMI 1640	RPMI 1640 Medium (1x)	Gibco® by Life Technologies™, Darmstadt, Deutschland
10x Binding Buffer	10x Binding Buffer for Annexin V	Affymetrix ebioscience, Hatfield, England

## **2.4 Mistelpräparate**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Mistelpräparate untersucht und ihre Wirkung auf den Reifungszustand von DC getestet.

Es handelt sich bei beiden Präparaten um Injektionslösungen zur subkutanen Injektion.

Beide Präparate sind für die klinische Anwendung zugelassen und werden im Rahmen von Krebstherapien eingesetzt.

### **2.4.1 Iscador Qu spez®**

Das Präparat Iscador Qu 5 mg spezial®, Ch.-B. 21111 (MHD 04.2014) wurde für diese Arbeit freundlicherweise vom Verein für Krebsforschung (Hiscia, Arlesheim, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

Iscador Qu spez® ist ein fermentierter wässriger Auszug aus *Viscum album ssp. album*, der Eichenmistel.

1 ml Injektionslösung enthält 5mg des Pflanzenextraktes. Der Mistellektingehalt beträgt für dieses Präparat 74ng/mg Pflanzenextrakt.

### **2.4.2 AbnobaViscum® Fraxini**

Das zweite Mistelpräparat, AbnobaViscum® Fraxini 20mg, Ch.-B. 306 A32 (MHD 05.2016) beziehungsweise AbnobaViscum® Fraxini 2mg, Ch.-B. 306 A36 (MHD 05.2016), wurde freundlicherweise von der ABNOBA GmbH, Pforzheim zur Verfügung gestellt.

Das Präparat wird aus dem Press-Saft aus Mistelkraut von der Esche hergestellt.

Der Lektingehalt beträgt 470ng/mg Pflanzenextrakt.

## **3. Methoden**

### **3.1 Aufreinigung der Buffy Coats**

Zur Gewinnung von Monozyten, aus denen DC generiert werden sollten, wurden Buffy Coats verwendet. Diese stammten von gesunden Blutspendern und wurden von der Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Freiburg nach Bewilligung des Ethikantrages 55/14 zur Verfügung gestellt.

Buffy Coats sind Lymphozytenkonzentrate, welche durch Zentrifugieren von Vollblut gewonnen werden. Dieses Lymphozytenkonzentrat kann zu transfusionsmedizinischen Zwecken nicht verwendet werden. Über das Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation können daraus Periphere Mononukleäre Zellen (PBMC) gewonnen werden.

Hierzu wurde das Lymphozytenkonzentrat 1:4 mit PBS (Phosphate Buffered Saline) verdünnt und dann in 50ml Falcon Tubes jeweils 25ml davon über 20ml Lymphoprep® geschichtet, ohne dass sich die beiden Flüssigkeiten vermischten.

Anschließend wurden die Tubes für 20 Minuten bei 500 g ohne Bremse und Beschleunigung zentrifugiert. Dabei entstanden drei Schichten. Lymphoprep® hat bei Raumtemperatur eine Dichte von 1,077g/ml. Da Erythrozyten und Granulozyten eine höhere Dichte haben, sinken sie bei dem Zentrifugationsprozess nach unten. In der mittleren, trüben Interphase befinden sich die PBMCs, welche eine geringere Dichte als Lymphoprep® aufweisen und in der obersten Phase befindet sich das Plasma.

Die oberste Schicht wurde verworfen und dann die mittlere PBMC-reiche Schicht abpipettiert.

Anschließend wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen. Das dritte Mal wurde statt bei 300 g bei nur 115 g zentrifugiert, um die Thrombozyten zu entfernen.

Das Zellpellet wurde in PBS suspendiert und eine Zellzählung durchgeführt.

### **3.2 Zellzahlbestimmung**

Zur Zählung der Zellen wurde eine 1:10 und eine 1:100 Verdünnung der Zellsuspension mit 2% Essigsäure und 0,2% Trypanblau in PBS angefertigt. Die Essigsäure lysiert die Erythrozyten und Trypanblau färbt die toten Zellen blau an.

Es wurden anschließend je 10µl der beiden Verdünnungen in jeweils eine der beiden Zählkammern einer Neubauerzählkammer pipettiert und unter dem Lichtmikroskop in vier Quadranten ausgezählt, ohne dabei die blau angefärbten, toten Zellen mitzuzählen.

Darüber konnte die Gesamtzahl der Zellen bestimmt werden und es ergab sich das Volumen der Zellsuspension, das für die CD14-Selektion eingesetzt werden musste.

### **3.3 CD14-Selektion**

Die CD14-Selektion, über die die Monozyten isoliert werden sollten, erfolgte mithilfe des EasySep® Human CD14 Selection Kit (Stemcell Technologies, Grenoble, Frankreich).

Das jeweils benötigte Volumen der Zellsuspension wurde in ein Falcon Tube überführt und einmal mit MACS-Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in einem der Zellzahl entsprechenden Volumen MACS-Puffer (1ml pro  $1 \times 10^8$  Zellen) resuspendiert und in ein Falcon Polyesterol-Röhrchen überführt. Nun wurden 100µl CD14-Antikörper-Tetramere aus dem Selection Kit pro  $1 \times 10^8$  Zellen dazugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieses Antikörper-Tetramer besteht aus einem CD14-Antikörper mit einem gekoppelten anti-Dextran-Antikörper.

Die Monozyten, die zur Generierung von DC gewonnen werden sollten, exprimieren auf ihrer Oberfläche das CD14-Oberflächenantigen. Es handelt sich hierbei um einen Lipopolysaccharid-Rezeptor, der auf myelomonozytischen Zellen zu finden ist und an den die hinzugefügten Antikörper binden.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 50µl Dextran-umhüllte Magnetbeads pro  $1 \times 10^8$  Zellen hinzugefügt und weitere zehn Minuten inkubiert. Die Magnetbeads wiederum binden an den anti-Dextran-Antikörper, also indirekt an die CD14-positiven Zellen.

Nach der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension mit MACS-Puffer auf 2,5ml aufgefüllt und das Polyesterol-Röhrchen für fünf Minuten in den EasySep®-Magneten gestellt. Ohne das Röhrchen aus dem Magneten zu nehmen, wurde dann der Überstand verworfen und nur die Zellen, die über den CD-14-Antikörper an die Magnetbeads gebunden waren, wurden durch die Anziehungskraft des Magneten im Röhrchen gehalten.

Anschließend wurde der letzte Schritt noch einmal wiederholt, die Zellen dann in 1ml CellGro®-Medium aufgenommen und erneut eine Zellzahlbestimmung durchgeführt.

Der Anteil an Monozyten in den aufgereinigten PBMCs lag durchschnittlich bei  $28 \pm 10,29\%$ .

### **3.4 Herstellung der Ansätze**

Die Ansätze wurden in einer 24-Well-Platte hergestellt. Pro Ansatz wurden 250µl Zellsuspension in das Well pipettiert. Zur Herstellung der Zellsuspension wurde das benötigte Volumen der CD14-Selektion mit CellGro®-Medium auf das notwendige Volumen aufgefüllt und das entsprechende Volumen der Zytokine GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor) und IL-4 dazugegeben. Die Menge an GM-CSF und IL-4 wurde über die gewünschte Endkonzentration von 1000 Units/ml GM-CSF und 800 Units/ml IL-4 berechnet. Diese beiden Stoffe dienen dazu, die Differenzierung der Monozyten zu stimulieren und initiieren somit ihre Entwicklung zu immaturren DC (Murphy, 2012; Sallusto and Lanzavecchia, 1994; Santin et al., 1999). Die Ansätze, in denen die zu generierenden DC unbehandelt bleiben sollten, wurden mit 250µl CellGro®-Medium aufgefüllt, um auf ein Endvolumen von 500µl pro Well zu kommen.

Alle Ansätze wurden drei Tage bei 37°C in Brutschrank inkubiert, bevor die Messung erfolgte.

Des Weiteren wurden folgende Ansätze hergestellt:

#### **3.4.1 Mature Dendritische Zellen**

Es wurde ein Ansatz entsprechend der unbehandelten DC hergestellt und an Tag 2 der Inkubationszeit wurde ein Maturierungscocktail aus 500ng LPS/ml, 50ng TNF $\alpha$ /ml und 10ng IL-1 $\beta$ /ml hinzugefügt. Bei IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  handelt es sich um proinflammatorische Zytokine, welche maturierungsfördernd auf immature DC wirken (Dauer et al., 2003). LPS (Lipopolysaccharid) kann über das Lipopolysaccharid-bindende-Protein an das CD14-Oberflächenantigen binden und darüber ebenfalls stimulierend auf die Zellen wirken (Tough et al., 1997).

Dieser Ansatz diente als Positivkontrolle. Anhand von Oberflächenmarkern konnte dargestellt werden, inwieweit DC in ihrer Reifung stimuliert werden können und es konnten Vergleiche mit anderen reifungsinduzierenden Substanzen vorgenommen werden.

### **3.4.2 IL-6**

IL-6 wird neben anderen Zytokinen von verschiedenen Tumorzelllinien sezerniert und wird in der Literatur als möglicher Grund für die tumorinduzierte Hemmung der Reifung von DC diskutiert (Menetrier-Caux et al., 1998).

Es handelt sich bei diesem Ansatz um die Kontrolle, ob DC auch in dem gewählten System in ihrer Reifung inhibiert werden können.

Nach Austestung mehrerer Konzentrationen wurde eine Konzentration von 12,5ng/ml gewählt, da in dieser Konzentration keine Zytotoxizität mehr nachgewiesen werden konnte (Scheffen, 2013), aber noch ein deutlicher Effekt zu sehen war. Es wurde eine Verdünnung von 25ng IL-6/ml CellGro® angefertigt und 250µl in das entsprechende Well pipettiert. Da die IL-6-Verdünnung durch Hinzufügen von 250µl Zellsuspension noch einmal 1:2 verdünnt wurde, lag somit im Well eine Endkonzentration von 12,5ng/ml IL-6 vor.

Die Ergebnisse konnten mit anderen Substanzen, von denen angenommen wird, dass sie die Maturierung von DC inhibieren, verglichen werden.

### **3.4.3 Mistelextrakte**

Im Vorfeld der Versuche wurden mit beiden Präparaten Zytotoxizitätsfärbungen durchgeführt (s. 3.5 und 4.5), um geeignete, nicht mehr im toxischen Bereich liegende Konzentrationen zu finden. Getestet wurde für das Präparat Iscador Qu spez® ein Konzentrationsbereich zwischen 0,03µg/ml und 0,5µg/ml. Für AbnobaViscum® Fraxini wurden Konzentrationen zwischen 0,0076µg/ml und 0,244µg/ml getestet.

Diese Konzentrationen wurden ausgehend von der Originalsubstanz in einer Verdünnungsreihe mit CellGro® hergestellt und je nach Experiment an unterschiedlichen Tagen in die entsprechenden Wells zu der Zellsuspension gegeben.

### **3.4.4 Tumorzellüberstände**

Es wurden die Tumorzelllinien CLB-TUT und CLB-TUG verwendet. Es handelt sich hierbei um Nierenkarzinomzelllinien, wobei die CLB-TUT-Zelllinie aus dem primären Nierenzellkarzinom und die CLB-TUG-Zelllinie aus einer daraus entstandenen

Lymphknotenmetastase gewonnen wurde. Die Arbeitsgruppe von C. Menetrier-Caux in Lyon, die uns freundlicherweise die Zelllinien zur Verfügung gestellt hat, hat in ihrer Studie die gleichen Tumorzelllinien verwendet und den Einfluss der Überstände der Tumorzelllinien in einer Konzentration von 10% auf DC untersucht (Menetrier-Caux et al., 1998).

Für die vorliegende Arbeit wurde eine zweite Konzentration von 2% Tumorzellüberstand verwendet, um nachzuvollziehen, ob bei dieser geringen Konzentration immer noch Effekte auf die DC zu erkennen sind.

Für die Herstellung der Tumorzellüberstände wurden die Tumorzellen 48 Stunden in 10ml Kulturmedium (RPMI 1640 + 100 Units/ml Penicillin + 100µg/ml Streptomycin + 2mM L-Glutamin + 10% FCS, kein Mercaptothanol) bei 37° in einer 75cm<sup>2</sup> Kulturflasche kultiviert. Die Zellkonzentration wurde für CLB-TUT auf 2x10<sup>5</sup>/ml und für CLB-TUG auf 4x10<sup>5</sup>/ml eingestellt. Im Anschluss an die Inkubationszeit adhärten die Zellen am Boden der Kulturflasche und der Überstand konnte problemlos abgenommen werden. Er wurde anschließend fünf Minuten bei 5000 g und 4°C zentrifugiert und je 500µl in Eppendorfgefäße abgefüllt. Diese wurden bei -20°C eingefroren.

Für die Herstellung der Ansätze mit DC wurden die Tumorzellüberstände auf Eis aufgetaut und die entsprechende Verdünnung mit CellGro®-Medium hergestellt, anschließend wurden 250µl der Verdünnung in das entsprechende Well pipettiert.

### **3.4.5 Mediumkontrolle**

Das Kulturmedium, in dem die Tumorzellen kultiviert wurden, enthält unter anderem auch FCS (Fetales Kälberserum), welches eine optimale Umgebung für die Zellen schafft und ihr Wachstum fördert (Schrödel, 2007). Durch die Behandlung der DC mit Tumorzellüberstand wurden diese somit auch unter den Einfluss von FCS gesetzt. Daher wurde eine Mediumkontrolle durchgeführt. Diese sollte eine Einschätzung ermöglichen, inwieweit die Veränderung der Oberflächenmarker der DC auf den Tumorzellüberstand zurückzuführen sind beziehungsweise das Kulturmedium dafür verantwortlich ist.

Dazu wurden DC nur mit Kulturmedium in der gleichen Konzentration, wie sie auch für die Tumorzellüberstände vorlag, inkubiert.

Das Medium wurde vor der Aliquotierung genauso behandelt, wie die Tumorzellüberstände, um Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Es wurden 10ml in eine Kulturflasche abgefüllt und dann ebenfalls 48 Stunden bei 37°C in Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde es für fünf Minuten bei 4°C und 5000 g zentrifugiert und jeweils 500µl in Eppendorfgefäße gefüllt. Wie die Tumorzellüberstände wurde es dann bei -20°C eingefroren.

### 3.5 Zytotoxizitätsfärbung

Für beide Mistelextrakte musste im Vorfeld der Experimente eine Zytotoxizitätsfärbung durchgeführt werden, um den zu verwendenden Konzentrationsbereich herauszufinden.

Über eine Annexin V/Propidiumiodid-Färbung sollte herausgefunden werden, in welcher Dosierung der Mistelextrakte sich der Anteil apoptotischer und der Anteil nekrotischer Zellen nicht mehr von unbehandelten DC unterscheidet. Unter Apoptose versteht man den programmierten Zelltod einer Zelle und unter Nekrose einen durch Schädigung der Zelle stattfindenden Zelltod.

Für Iscador Qu spez® wurde in Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe der entsprechende Konzentrationsbereich ermittelt (Scheffen, 2013). Für AbnobaViscum® Fraxini geschah dies im Rahmen dieser Arbeit.

Die Zytotoxizität der Mistel ist vor allem auf deren Lektin Gehalt zurückzuführen. Mistellektine können in entsprechenden Konzentrationen über unterschiedliche Mechanismen die Proteinbiosynthese von verschiedenen Zellen hemmen und Apoptose induzieren. Allerdings sind noch weitere Inhaltsstoffe enthalten, die potenziell toxisch auf Zellen wirken können, wie beispielsweise Viscotoxine (Kienle und Kiene, 2003).

Aufgrund dessen wurde der zu testende Konzentrationsbereich von AbnobaViscum® Fraxini im Lektin Gehalt ungefähr dem Lektin Gehalt der Konzentrationen von Iscador Qu spez®, die sich als nicht mehr toxisch herausstellten, angepasst. Diese Konzentrationen mussten aber in weiteren Versuchen etwas reduziert werden, da noch eine Toxizität vorlag.

Neben einem Ansatz mit unbehandelten DC und den Ansätzen mit den verschiedenen Mistelkonzentrationen, wurde ein Ansatz mit 1µM CPT (Camptothecin) angefertigt und ein Ansatz, zu dem kurz vor der Messung 1% Triton X-100 hinzugefügt wurde.

Der Ansatz mit CPT diente als Apoptosekontrolle. Triton X-100 wirkt Nekrose-induzierend auf menschliche Zellen und wurde deshalb als Nekrosekontrolle verwendet.

Die Zellen wurden in eine V-Boden-Platte transferiert und nach Zugabe von 50µl PBS nochmals zentrifugiert. Anschließend wurde Annexin V-FITC in einer Verdünnung von 1:50 (in 50µl) mit Binding Buffer zu den Proben gegeben.

Annexin V ist fluoreszenzmarkiert und hat die Eigenschaft, an Phosphatidylserin zu binden. Phosphatidylserin befindet sich bei intakten Zellen vor allem an der zytosolischen Seite der Zellmembran, bei apoptotischen Zellen löst sich diese einseitige Verteilung auf und Phosphatidylserin ist nun auch an der Außenseite der Zellmembran zu finden. Annexin V kann also nur an Zellen binden, die sich in apoptotischen Stadien befinden.

Die Proben wurden 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die entsprechende Probe mit 1% Triton X-100 versetzt. Zu allen Proben wurden 0,02µg Propidiumiodid (PI) hinzugefügt. PI bindet an doppelsträngige DNA, kann aber die Zellmembran nicht durchdringen. Das heißt, es bindet nur an die DNA solcher Zellen, deren Zellmembran defekt ist und die somit nekrotisch sind.

Die Ansätze wurden wiederum für zehn Minuten im Dunkeln inkubiert. Als letztes wurden in FACS-Röhrchen 200µl Binding Buffer 1x vorgelegt und die Zellen direkt dazu pipettiert.

Die Messung erfolgte immer direkt im Anschluss an die Färbung der Proben am BD Accuri™C6 Flow Cytometer (BD Biosciences, USA). Daraufhin konnten die Ansätze bezüglich der Anteile von lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen untereinander verglichen werden.

### **3.6 Bestimmung der Expression der Oberflächenmarker CD83, CD86 und CD14**

Die Messung der Oberflächenmarker CD83, CD86 und CD14 erfolgte mithilfe des BD Accuri™C6 Flow Cytometer.

Dazu wurden die Zellen nach drei Tagen Inkubation geerntet und fünf Minuten bei 300 g zentrifugiert, der Überstand wurde anschließend verworfen. Im Anschluss wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, in eine V-Boden-Platte überführt und noch einmal mit PBS gewaschen.

Anschließend wurden die Zellen mithilfe von Antikörpern gefärbt. Verwendet wurden drei verschiedene fluoreszenzmarkierte Antikörper, der CD83-Antikörper (0,07µg/ml), der FITC-gekoppelt (Fluoreszein-Isothiocyanat) ist, der CD86-Antikörper (0,009µg/ml), der PE-

gekoppelt (Phycoerythrin) ist und der CD14-Antikörper (0,0044µg/ml), der APC-gekoppelt (Allophycocyanin) ist.

Die Zellen wurden mit der Färbelösung 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert und anschließend mit FACS-Puffer gewaschen. Nach diesem Schritt wurden die Zellen in FACS-Puffer resuspendiert. Die Messung erfolgte unmittelbar im Anschluss an die Färbung der Zellen.

Durch die Ermittlung von Größe und Granularität der Zellen durch die Laser des Flow Cytometers war es möglich, die Zellpopulation, die in ihren morphologischen Eigenschaften lebenden DC entspricht, zu gaten und dadurch nur diese Zellen in Bezug auf ihre Expression von Oberflächenantigenen zu beurteilen.

Über Fluoreszenzsignale wurde das Ausmaß der Expression der drei Oberflächenmarker auf der markierten Zellpopulation gemessen.

Die Ergebnisse für den Prozentanteil positiver, also den jeweiligen Marker exprimierenden Zellen und die MFI (Mittlere Fluoreszenzintensität) entsprachen sich weitgehend. Da die MFI Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Ansätzen aber jeweils etwas genauer wiedergab, werden in dieser Arbeit die Ergebnisse ausschließlich in Bezug auf die MFI dargestellt.

### **3.7 Ansetzen von Co-Kulturen Dendritischer Zellen und CD4+ T-Zellen**

Um die Wirkung unterschiedlich behandelter DC auf die Proliferation und die Zytokinsekretion von CD4+ T-Zellen zu untersuchen, wurden aus einem Buffy Coat PBMCs gewonnen und durch CD14-Selektion Monozyten aufgereinigt. Zur Generierung von DC wurden GM-CSF und IL-4 hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen mit unterschiedlichen Substanzen behandelt: Es wurde ein Ansatz unbehandelter DC hergestellt, ein Ansatz, in dem zur Generierung maturer DC ein Reifungscocktail aus 500ng LPS/ml, 50ng TNFα/ml und 10ng IL-1β/ml hinzugefügt wurde, ein Ansatz, der mit 0,25µg/ml Iscador Qu spez® behandelt wurde, Ansätze mit den beiden unterschiedlichen Tumorzellüberständen in Konzentrationen von 10% und 2%, Ansätze, in denen sowohl der jeweilige Tumorzellüberstand als auch 0,25µg/ml Iscador Qu spez® hinzugefügt wurden, Ansätze mit dem Kulturmedium der Tumorzellüberstände in Konzentrationen von 10% und 2%, ein Ansatz mit 12,5ng IL-6 und ein Ansatz mit sowohl 12,5ng IL-6, als auch 0,25µg/ml Iscador Qu spez®. Nach drei Tagen Inkubation wurden PBMCs eines zweiten Spenders

aufgereinigt und mit CFSE (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) gefärbt. Dabei handelt es sich um ein Färbereagenz, welches irreversibel an intrazelluläre Proteine bindet. Teilen sich die CFSE-gefärbten Zellen anschließend, wird der gebundene Farbstoff zu gleichen Teilen auf beide Tochterzellen verteilt und die Fluoreszenzintensität nimmt um die Hälfte ab. Über die Messung der Fluoreszenz kann mithilfe dieses Mechanismus die Proliferationsaktivität nachvollzogen werden.

Im Anschluss an diese Färbung wurde eine CD4-Negativselektion mithilfe des EasySep® Human CD4<sup>+</sup> T Cell Enrichment Kits durchgeführt.

Man geht dabei davon aus, dass der Anteil von CD4<sup>+</sup> T-Zellen an den PBMCs ungefähr 10% beträgt. Das benötigte Volumen der Zellsuspension wurde in ein steriles Polystyrene-Röhrchen überführt und das entsprechende Volumen MACS-Puffer hinzugefügt. Nun wurden 50µl EasySep® CD4-Selection-Antikörper aus dem Enrichment Kit pro ml Zellsuspension dazugegeben und 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Es handelt sich hierbei um bispezifische Antikörper, welche selektiv an Zellen, die den CD4-Oberflächenmarker nicht auf ihrer Oberfläche exprimieren, und zusätzlich an Dextran-umhüllte Magnet-Nanopartikel binden und somit diese beiden Komponenten verbinden. Von den entsprechenden EasySep® Magnet-Nanopartikeln wurden anschließend 100µl pro ml Zellsuspension hinzugefügt und zehn Minuten inkubiert. Die Magnet-Nanopartikel binden nun an die vorher hinzugefügten Antikörper und somit an alle nicht CD4<sup>+</sup> Zellen. Das Polystyrene-Röhrchen wurde zwei Mal für jeweils fünf Minuten in den EasySep® Magneten gestellt und die Flüssigkeit im Anschluss in eine neues Röhrchen transferiert. Die selektierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen, in RPMI-Medium überführt und gezählt.

Mit den auf diese Weise gewonnenen Zellen wurde nun eine Co-Kultur mit den drei Tage vorher generierten DC angesetzt. Die DC wurden geerntet, gewaschen und die Zellen aller Ansätze gezählt. Anschließend wurden die DC mit den CD4<sup>+</sup> T-Zellen in einer 96-Well-Flachbodenplatte in einem Verhältnis von 1:10 in Co-Kultur gegeben.

Neben den Ansätzen mit unterschiedlich behandelten DC wurde ein Ansatz mit ausschließlich CD4<sup>+</sup> T-Zellen angesetzt, um die unstimulierte Zytokinsekretion und Proliferation zu messen. Außerdem wurde ein Ansatz angefertigt, bei dem zu den CD4<sup>+</sup> Zellen 1µl PHA (Phytohemagglutinin-L) dazugegeben wurde. PHA wirkt Mitose-stimulierend und somit kann dieser Ansatz, die Proliferationsrate betreffend, als Positivkontrolle verwendet werden.

Für die Messung der Zytokinsekretion wurden die Ansätze der Co-Kultur nur 24 Stunden inkubiert. Die Überstände wurden nach der Inkubation abgenommen und auf die enthaltenen Zytokine hin untersucht.

Um die Proliferationsrate der CD4+ T-Zellen zu untersuchen, wurden die Ansätze der Co-Kulturen fünf Tage inkubiert, anschließend geerntet und mit 0,25µl CD4-Antikörpern, welche APC-gekoppelt sind, gefärbt. Die durchflusszytometrische Untersuchung erfolgte unmittelbar im Anschluss.

### **3.8 Statistische Auswertung**

Für die statistische Auswertung wurden die Daten mit Microsoft Excel und der Software SPSS (IBM, Version 22.0, Armonk, USA) verarbeitet. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SD der angegebenen Zahl unabhängiger Experimente dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde für Vergleiche einzelner Gruppen untereinander mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) ermittelt, gefolgt von einem Post-hoc-Test. Der Vergleich einzelner Gruppen mit der Kontrollgruppe erfolgte mittels eines einfachen T-Tests. Die Varianzgleichheit wurde anhand eines Levene-Tests bestimmt. Das Signifikanzniveau lag bei \*p < 0,05, \*\*p < 0,01 und \*\*\*p < 0,001.

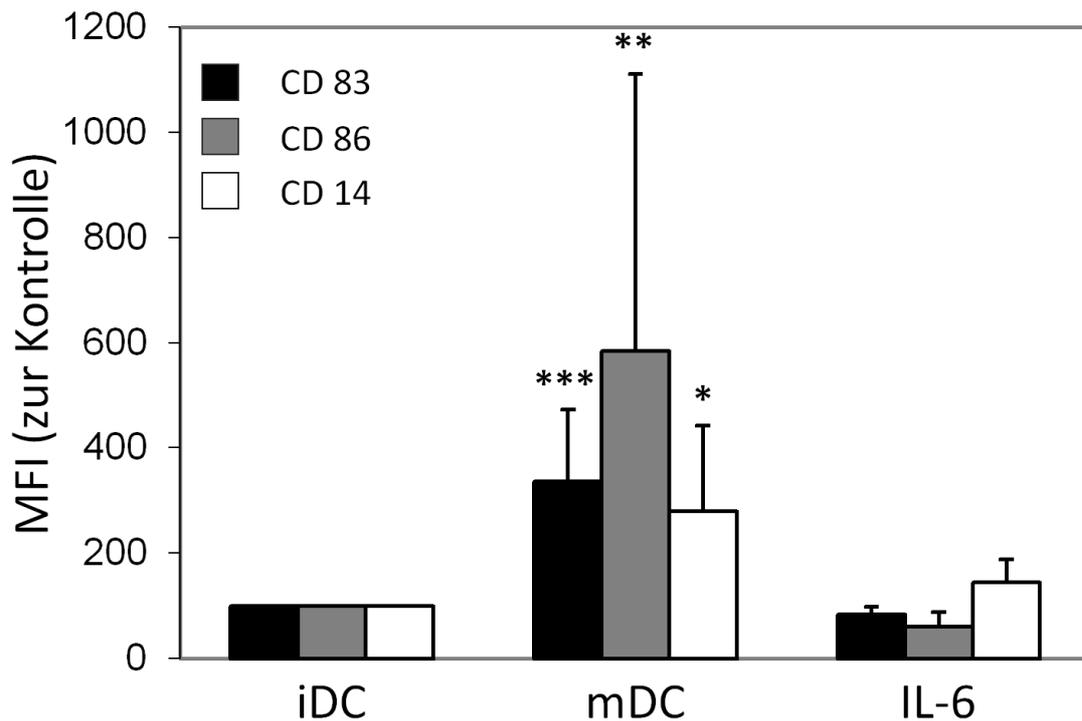
## 4. Ergebnisse

### 4.1 Stimulierbarkeit Dendritischer Zellen im gewählten System

Zunächst sollte nachgewiesen werden, dass es möglich ist, DC in dem verwendeten System zu stimulieren. Die Stimulierbarkeit des Systems diene als Voraussetzung für die Annahme, dass auch durch die Zugabe von Mistextrakten eine Reifung der Zellen bezüglich ihrer Oberflächenmarker möglich ist.

Als Positivkontrolle diene ein Ansatz mit maturen DC, welche durch Zugabe eines Maturierungscocktails, bestehend aus 500ng LPS/ml, 50ng TNF $\alpha$ /ml und 10ng IL-1 $\beta$ /ml, aus immaturen DC generiert wurden. Diese Zellen wurden standardisiert nach drei Tagen Inkubation durchflusszytometrisch hinsichtlich der Oberflächenmarker CD83, CD86 und CD14 untersucht und die Ergebnisse anhand der MFI ausgewertet.

Die Ergebnisse der Positivkontrolle, die in Vergleich mit einem Ansatz aus unbehandelten DC gesetzt wurden, sind in Abb.1 dargestellt. Die MFI der Messungen unbehandelter DC wurden jeweils auf 100% gesetzt.



**Abb. 1: Einfluss von Stimulationscocktail und IL-6 auf die Reifung von DC:** Aus PBMC wurden durch CD14+-Selektion Monozyten aufgereinigt und mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Die Abbildung zeigt zum einen als Kontrolle dienende, nur mit den oben genannten Substanzen behandelte immature Dendritische Zellen (iDC). Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Als Positivkontrolle diente ein Ansatz mit muren Dendritischen Zellen (mDC), welcher zusätzlich mit einem Reifungscocktail, bestehend aus 500ng LPS/ml, 50ng TNF $\alpha$ /ml und 10ng IL-1 $\beta$ /ml behandelt wurde und als Negativkontrolle ein Ansatz, zu welchem zusätzlich 12,5ng/ml IL6 hinzugefügt wurden. Die Inkubationszeit betrug drei Tage, anschließend wurden die DC mit fluoreszenzmarkierten anti-human-CD83-mAK, anti-human-CD86-mAK und anti-human-CD14-mAK gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), der Mittelwert und die positive Standardabweichung ergaben sich aus 14 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001) wurde mit einem einfachen T-Test analysiert.

Die Expression des Reifungsmarkers CD83 war im Vergleich zu den immaturren DC höchstsignifikant (p = 0.000) und die des Reifungsmarkers CD86 hochsignifikant (p = 0.007) erhöht. Der Mittelwert für die Expression von CD83 lag bei  $386,01 \pm 145,12\%$  und für die Expression von CD86 bei  $733,89 \pm 609,33\%$ . Die Ergebnisse für diese beiden Marker zeigen hiermit eine deutliche Aktivierung der Zellen.

Die Expression des Oberflächenmarkers CD14, der typischerweise auf Monozyten exprimiert wird, sollte bei reifen DC abnehmen. In den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Analyse war jedoch eine signifikante Erhöhung der Expression auf muren DC (p = 0.011) zu erkennen. Allerdings war die Zunahme der CD14-Expression deutlich geringer als die

Zunahme der CD83- und CD86-Expression. Sie lag im Durchschnitt bei  $289,28 \pm 198,75\%$ .

Zusammenfassend ist festzustellen, dass eine Reifungsinduktion der DC im Rahmen dieses Versuchssystems möglich ist und die DC durch den Maturierungscocktail dazu stimuliert wurden, sich zu reifen Zellen zu entwickeln.

#### **4.2 Hemmbarkeit Dendritischer Zellen im gewählten System**

Neben Substanzen, die DC in ihrer Reifung aktivieren, sollte auch nachgewiesen werden, dass DC durch den Zusatz von Tumorzellüberständen in ihrer Reifung gehemmt werden können. Um nachzuweisen, dass eine Reifungsinhibition von DC in vitro grundsätzlich möglich ist, wurde eine Kontrolle mit dem Zytokin IL-6 in einer Konzentration von 12,5ng/ml durchgeführt. Die Zellen, die mit IL-6 behandelt wurden, wurden nach drei Tagen Inkubation ebenfalls durchflusszytometrisch untersucht, um die Expression der Oberflächenmarker CD83, CD86 und CD14 zu messen.

Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abb.1 dargestellt. Als Kontrolle diente ebenfalls der Ansatz unbehandelter DC, dessen MFI auf 100% gesetzt wurde.

Es konnte festgestellt werden, dass sowohl die Expression des Oberflächenmarkers CD83 als auch des Oberflächenmarkers CD86 im Vergleich zur Kontrolle abnahm. Die Expression von CD83 lag im Vergleich zur Kontrolle bei  $79,46 \pm 19,47\%$ . Die Expression von CD86 lag noch etwas niedriger und zwar bei  $62,1 \pm 39,32\%$ . Die Expression des Oberflächenmarkers CD14 nahm bei der Negativkontrolle zu und lag bei  $137,95 \pm 59,77\%$ .

Die drei Oberflächenmarker deuten zwar auf eine Reifungsinhibition der DC durch die Zugabe von IL-6 hin, die Unterschiede waren allerdings nicht signifikant.

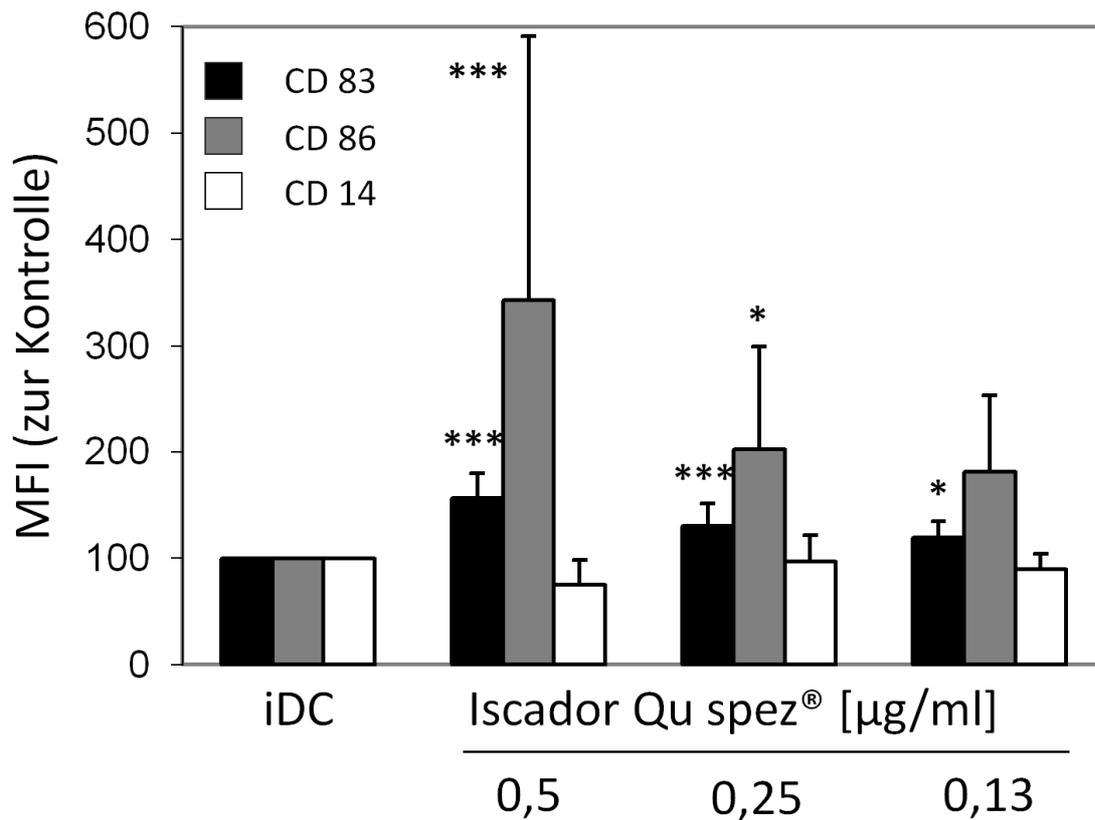
### **4.3 Einfluss des Mistelpräparates Iscador Qu spez® auf den Reifungszustand Dendritischer Zellen**

Die Zytotoxizität von Iscador Qu spez® gegenüber DC wurde bereits in Versuchen anderer Autoren unserer Arbeitsgruppe untersucht (Scheffen, 2013). Es zeigte sich, dass für eine Konzentration von 0,5µg/ml eine Restzytotoxizität vorliegt. Während der Anteil an apoptotischen Zellen in der Kontrolle  $44 \pm 7\%$  betrug, lag der Anteil unter Zugabe des Mistelpräparates in einer Konzentration von 0,5µg/ml bei  $74 \pm 4\%$  und war somit signifikant erhöht. Für eine Konzentration von 0,25µg/ml lag der Anteil bei  $55 \pm 8\%$  und war somit zwar leicht, aber nicht statistisch signifikant erhöht. Für niedrigere Konzentrationen war keine Zytotoxizität mehr nachzuweisen. Die Ergebnisse dieser Versuche wurden für die vorliegende Arbeit verwendet.

#### **4.3.1 Einfluss verschiedener Konzentrationen von Iscador Qu spez®**

Als erstes wurde der Einfluss verschiedener Konzentrationen des Mistelpräparates Iscador Qu spez® auf die Reifung von DC untersucht. Ausgewählt wurden die Konzentrationen 0,13µg/ml, 0,25µg/ml und 0,5µg/ml. Somit also auch eine Konzentration (0,5µg/ml), für die noch eine zytotoxische Wirkung nachweisbar war. Es sollte untersucht werden, ob eine Dosisabhängigkeit der Wirkung des Mistelpräparates vorliegt und welche Wirkung eine zytotoxische Dosis des Präparates auf die Oberflächenmarker der DC haben würde. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abb.2 zusammengefasst.

Es war eine Dosisabhängigkeit bezüglich der Wirkung des Mistelpräparates auf zwei der drei untersuchten Oberflächenmarker zu erkennen. Die innerhalb der einzelnen Gruppen festgestellten Unterschiede waren für den Marker CD83 höchstsignifikant ( $p = 0.000$ ) und für den Marker CD86 hochsignifikant ( $p=0.001$ ). Außerdem wurde deutlich, dass bis zu der niedrigsten untersuchten Konzentration eine Wirkung im Sinne einer Reifungsinduktion der Dendritischen Zellen vorliegt. Als Kontrolle dienten unbehandelte, immature DC.



**Abb. 2: Auswirkung verschiedener Konzentrationen des Mistelpräparates Iscador Qu spez® auf den Reifungszustand Dendritischer Zellen:** Aus PBMC wurden durch CD14+-Selektion Monozyten aufgereinigt und mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Die Abbildung zeigt zum einen als Kontrolle dienende, nur mit den oben genannten Substanzen behandelte immature Dendritische Zellen (iDC). Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Außerdem sind drei, zusätzlich mit 0,5µg/ml, 0,25µg/ml und 0,13µg/ml Iscador Qu spez® behandelte Ansätze Dendritischer Zellen dargestellt. Die Inkubationszeit betrug drei Tage, anschließend wurden die DC mit fluoreszenzmarkierten anti-human-CD83-mAK, anti-human-CD86-mAK und anti-human-CD14-mAK gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), der Mittelwert und die positive Standardabweichung ergaben sich aus 14 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001) wurde mittels einfaktorier ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test analysiert.

Die Expression des Oberflächenmarkers CD83 stieg für die Konzentrationen 0,5µg/ml und 0,25µg/ml höchstsignifikant (p = 0.000) und für die Konzentration 0,013 signifikant (p = 0.043). Sie lag für Iscador Qu spez® 0,5µg/ml bei 156,54 ± 23,39%, für eine Konzentration von 0,25µg/ml bei 130,54 ± 20,92% und für die Konzentration von 0,13µg/ml bei 119,6 ± 14,93%. Die Expression des Oberflächenmarkers CD86 lag für eine Konzentration von 0,5µg/ml bei 343,16 ± 247,96%, für 0,25µg/ml bei 202,11 ± 97,55% und für 0,13µg/ml bei 181,12 ± 72,97%. Für eine Konzentration von 0,5µg/ml war der Unterschied höchstsignifikant (p = 0.000) und für 0,25µg/ml signifikant (p = 0.029). Für die niedrigste

Konzentration lag kein signifikanter Unterschied vor.

Für den Oberflächenmarker CD14 lag keine strenge Dosisabhängigkeit vor. Am niedrigsten exprimiert wurde CD14 auf den mit der höchsten Iscadorkonzentration behandelten Zellen. Die MFI betrug hier  $75,2 \pm 22,9\%$ . Für eine Konzentration von  $0,25\mu\text{g/ml}$  sank die Expression allerdings nicht wie erwartet, sondern lag bei  $96,69 \pm 24,73\%$ . Für die niedrigste Konzentration von  $0,13\mu\text{g/ml}$  lag sie bei  $89,9 \pm 14,27\%$ . Die Unterschiede waren nicht signifikant.

Es ist festzuhalten, dass eine Reifungsinduktion hinsichtlich der Oberflächenmarker der immaturen DC durch alle drei Konzentrationen des Mistelpräparates bewirkt wurde. Ausgenommen des CD14 Oberflächenmarkers lag eine eindeutige Dosisabhängigkeit vor.

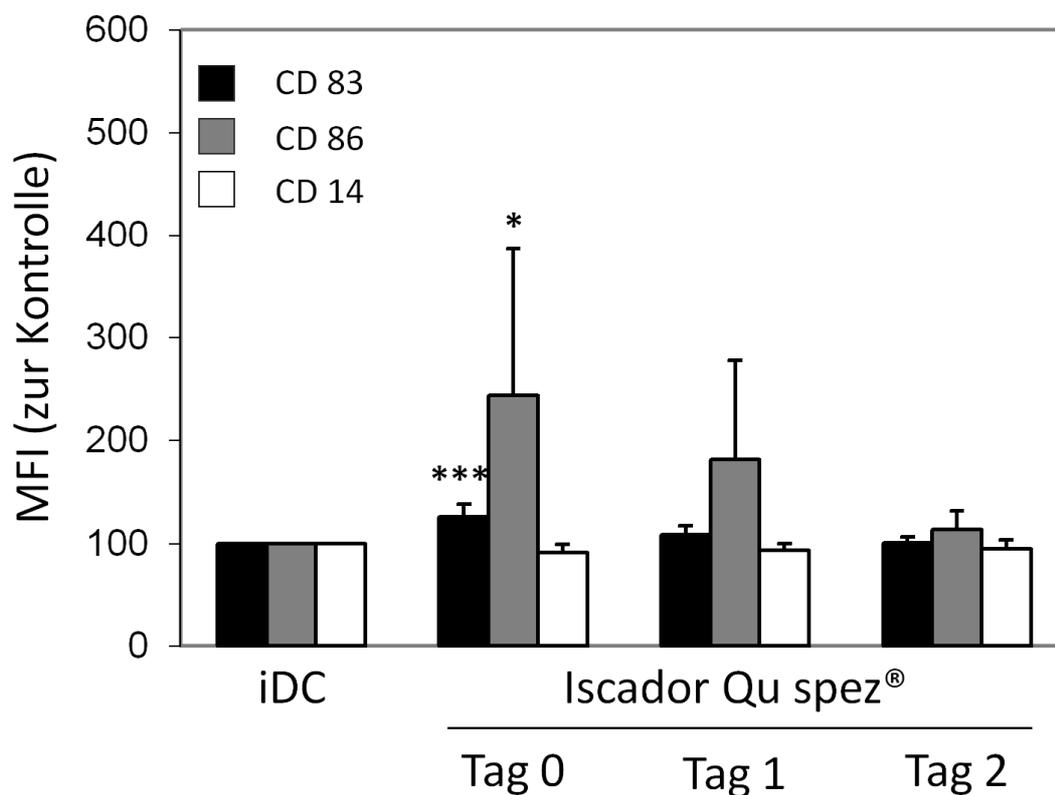
#### **4.3.2 Zeitkinetische Effekte der Gabe von Iscador Qu spez®**

Für die anschließenden Versuche wurde in dieser Arbeit eine Iscadorkonzentration von  $0,25\mu\text{g/ml}$  verwendet. Dies war die erste nicht mehr toxische Konzentration.

Es wurde ein Versuchsansatz durchgeführt, in dem der Einfluss der Inkubationszeit auf die Reifung der DC untersucht wurde. Dazu wurden neben GM-CSF und IL-4 zur Generierung der DC aus Monozyten an verschiedenen Tagen  $0,25\mu\text{g/ml}$  Iscador Qu spez® zu den Ansätzen gegeben. Die Zeitpunkte der Gabe waren für einen Ansatz der Tag 0, für einen weiteren Ansatz der Tag 1 und für einen dritten Ansatz der Tag 2. An Tag 3 wurden alle Ansätze durchflusszytometrisch untersucht.

Es ließ sich feststellen, dass eine eindeutige Abhängigkeit der Reifung von der Inkubationszeit vorlag. Je früher die Gabe des Mistelpräparates erfolgte, desto stärker war die Reifungsinduktion. Für den Oberflächenmarker CD83 lagen innerhalb der verglichenen Gruppen höchstsignifikante Unterschiede ( $p = 0.000$ ) vor. Somit konnte die Kinetik für CD83 als signifikant gewertet werden. Die Ergebnisse sind in Abb.3 dargestellt.

Als Kontrolle dienten unbehandelte DC, deren MFI für die jeweiligen Marker auf 100% gesetzt wurde.



**Abb. 3: Zeitkinetische Effekte der Gabe von Iscador Qu spez®:** Aus PBMC wurden durch CD14+-Selektion Monozyten aufgereinigt und mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Die Abbildung zeigt zum einen als Kontrolle dienende, nur mit den oben genannten Substanzen behandelte immature Dendritische Zellen (iDC). Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Daneben sind drei Ansätze Dendritischer Zellen dargestellt, welche an Tag 0, Tag 1 oder Tag 2 der dreitägigen Inkubationszeit mit 0,25µg/ml Iscador Qu spez® behandelt wurden. Anschließend wurden die DC mit fluoreszenzmarkierten anti-human-CD83-mAK, anti-human-CD86-mAK und anti-human-CD14-mAK gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), der Mittelwert und die positive Standardabweichung ergaben sich aus 5 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001) wurde mittels einfaktorier ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test analysiert.

Die Expression des Oberflächenmarkers CD83 betrug für eine Inkubationszeit von drei Tagen  $126,27 \pm 11,87\%$ , für eine Inkubationszeit von zwei Tagen  $108,66 \pm 8,78\%$  und für die kürzeste Inkubationszeit von einem Tag  $101,09 \pm 5,61\%$ . Für die dreitägige Inkubationszeit war diese Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle höchstsignifikant ( $p = 0.000$ ). Die Expression des Oberflächenmarkers CD86 lag für eine Inkubationszeit von drei Tagen bei  $244,09 \pm 142,75\%$ , für eine Inkubationszeit von zwei Tagen bei  $181,86 \pm 96,5\%$  und für eine Inkubationszeit von einem Tag bei  $113,46 \pm 18,45\%$ . Auch hier stieg der Oberflächenmarker nur nach drei Tagen Inkubation mit dem Mistelpräparat signifikant an ( $p = 0.047$ ).

Hinsichtlich der Expression des Oberflächenmarkers CD14 lag nur ein leichter Einfluss der Inkubationszeit vor. Nach drei Tagen Inkubation lag die Expression von CD14 bei  $91,27 \pm 7,68\%$ , nach zwei Tagen Inkubation bei  $93,67 \pm 6,63\%$  und nach einem Tag Inkubation bei  $95,09 \pm 8,88\%$ , diese Unterschiede waren allerdings nicht signifikant.

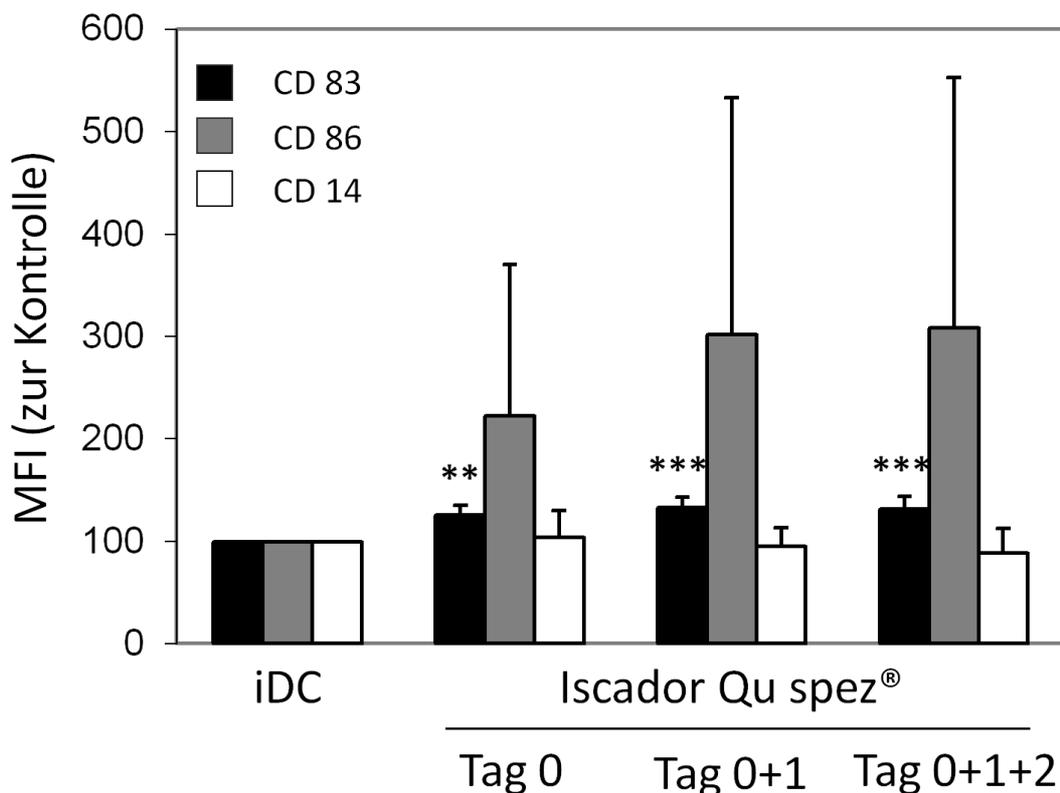
Anhand aller drei Oberflächenmarker ist also zu erkennen, dass die reifungsinduzierende Wirkung des Mistelpräparates umso stärker ist, je länger die Inkubationszeit ist. Wurde das Mistelpräparat für lediglich einen Tag zu den Zellen gegeben, war kaum mehr ein Effekt auf die Reifung der DC nachzuweisen.

#### **4.3.3 Effekte der additiven Gabe von Iscador Qu spez®**

In einem weiteren Versuchsansatz sollte die Wirkung einer additiven Gabe von Iscador Qu spez® untersucht werden. Dazu wurde neben dem Kontrollansatz aus unbehandelten DC ein Ansatz hergestellt, bei dem nur einmal an Tag 0  $0,25\mu\text{g/ml}$  Mistelextrakt hinzugefügt wurden, ein weiterer Ansatz, bei dem die Gabe an Tag 1 wiederholt wurde und ein dritter Ansatz, bei dem zusätzlich zu den Gaben an Tag 0 und 1 noch an Tag 2 jeweils die Gabe des Mistelextraktes erfolgte. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte für alle Ansätze nach drei Tagen Inkubation. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abb.4 dargestellt. Es stellte sich heraus, dass eine additive Gabe von Iscador Qu spez® im Gegensatz zur Einmalgabe keine Verstärkung der Reifungsinduktion bewirkt.

Der Oberflächenmarker CD83 war für alle drei Gruppen im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. Die Expression erhöht sich durch eine zwei- und dreimalige Gabe im Vergleich zur Einmalgabe leicht. Wurde das Mistelpräparat lediglich einmal gegeben, betrug die MFI durchschnittlich  $125,74 \pm 9,74\%$ , was einem hochsignifikanten Anstieg im Vergleich zur Kontrolle entsprach ( $p = 0.001$ ). Wurde die Gabe nach einem Tag Inkubation wiederholt, betrug die MFI  $132,86 \pm 10,61\%$ , ( $p = 0.000$  im Vergleich zur iDC-Kontrolle) und bei einer erneuten Wiederholung nach zwei Tagen Inkubation  $132,07 \pm 11,77\%$  ( $p = 0.000$  im Vergleich zur iDC-Kontrolle). Etwas stärkere Unterschiede waren bezüglich des Mittelwerts des Oberflächenmarkers CD86 zu sehen, es lag allerdings ebenfalls kein signifikanter Unterschied innerhalb der Gruppen und auch kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur iDC-Kontrolle vor. Die MFI für diesen Marker betrug nach nur einmaliger Mistelgabe  $222,6 \pm 147,19\%$ . Nach einer zweimaligen Mistelgabe lag die MFI bei  $301,95 \pm 231,3\%$  und wurde das Mistelpräparat insgesamt drei Mal gegeben, betrug die MFI  $307,89 \pm 244,69\%$ . Für den

Oberflächenmarker CD14 war ein leichter Rückgang der Expression bei wiederholter Gabe des Mistelpräparates zu erkennen, welcher aber für keine der Gruppen signifikant war. Die Expression des Oberflächenmarkers betrug für die einmalige Gabe  $115,9 \pm 29,04\%$ , für die zweimalige Gabe  $104,45 \pm 18,4\%$  und für die dreimalige Gabe  $99,05 \pm 27,22\%$  im Vergleich zur iDC-Kontrolle. Insgesamt kann festgestellt werden, dass eine Mehrfachgabe von Iscador Qu spez® keinen Vorteil bringt.



**Abb. 4: Effekte der additiven Gabe von Iscador Qu spez®:** Aus PBMC wurden durch CD14+-Selektion Monozyten aufgereinigt und mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Die Abbildung zeigt zum einen als Kontrolle dienende, nur mit den oben genannten Substanzen behandelte immature Dendritische Zellen (iDC). Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Darüber hinaus zeigt die Abbildung drei Ansätze Dendritischer Zellen, welche entweder nur an Tag 0, an Tag 0 und Tag 1 oder an Tag 0, Tag 1 und Tag 2 der dreitägigen Inkubationszeit mit  $0,25\mu\text{g/ml}$  Iscador Qu spez® behandelt wurden. Anschließend wurden die DC mit fluoreszenzmarkierten anti-human-CD83-mAK, anti-human-CD86-mAK und anti-human-CD14-mAK gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), der Mittelwert und die positive Standardabweichung ergaben sich aus 5 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ) der Unterschiede zwischen iDC-Kontrolle und Behandlungsgruppen wurde mittels einfaktorieller ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test analysiert.

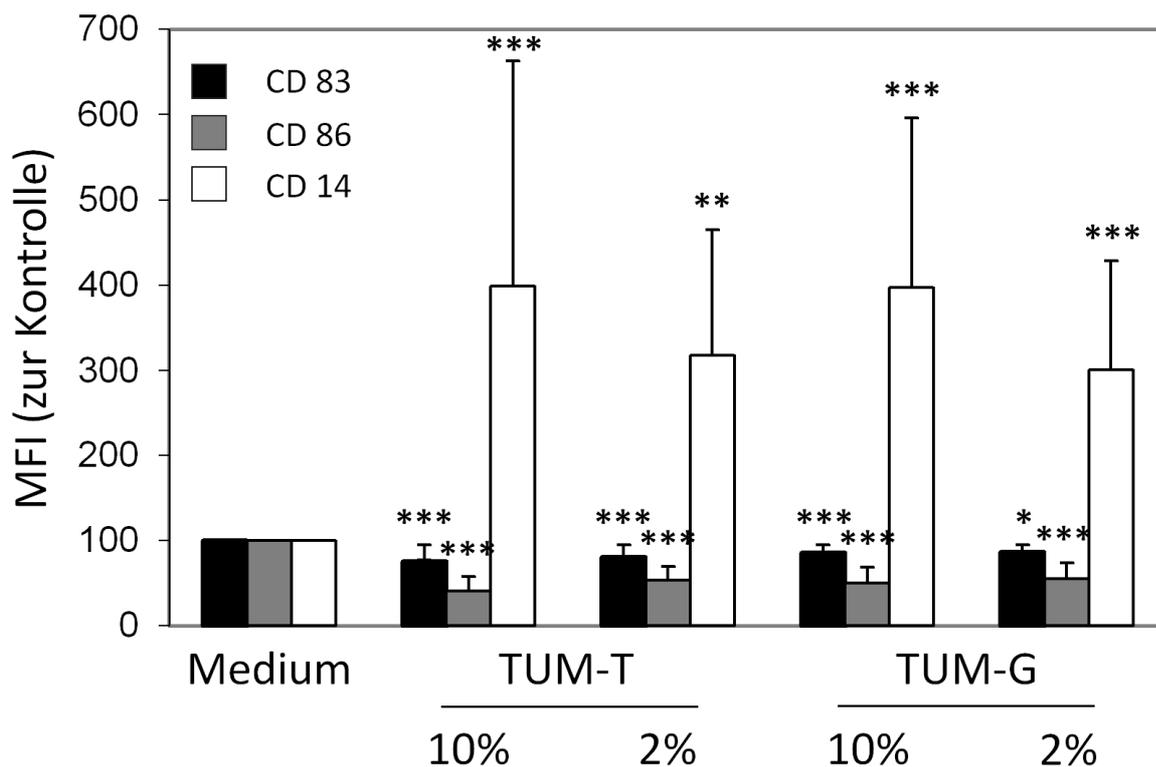
#### 4.4 Einfluss der Tumorzellüberstände auf die Reifung Dendritischer Zellen

Neben dem Einfluss von Mistelextrakten sollte auch die Wirkung verschiedener Tumorzellüberstände auf die Reifung von DC untersucht werden.

Die untersuchten Tumorzellüberstände, TUM-T und TUM-G, wurden jeweils in einer Konzentration von 10% und 2% in ihrer Wirkung getestet. Als Kontrolle diente jeweils ein Ansatz, bei dem zu den DC die entsprechende Konzentration an Kulturmedium (10% und 2%) gegeben wurde. Bei dem Medium handelte es sich um das Medium, in dem die Tumorzellen inkubiert wurden. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Effekte auf das Kulturmedium zurückzuführen sind und nicht auf den Tumorzellüberstand selbst. Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Die Ergebnisse sind in Abb.5 dargestellt.

Es ist für beide Tumorzellüberstände eine deutliche, dosisabhängige Reifungsinhibition der DC zu erkennen, welche im Vergleich der Gruppen untereinander bezüglich aller drei Marker höchstsignifikant ist ( $p = 0.000$ ).

Nach dreitägiger Inkubation der Zellen mit dem Überstand der Tumorzelllinie TUM-T in einer Konzentration von 10% ergab sich bei der durchflusszytometrischen Analyse für den Oberflächenmarker CD83 eine durchschnittliche MFI von  $76,04 \pm 13,12\%$  und in einer Konzentration von 2% eine MFI von  $85,87 \pm 8,15\%$ . Die Unterschiede beider Konzentrationen dieses Tumorzellüberstandes verglichen zur Kontrolle waren höchstsignifikant ( $p = 0.000$ ). Für den Oberflächenmarker CD86 lag für eine Konzentration von 10% eine MFI von  $40,75 \pm 16,68\%$  vor und für eine Konzentration von 2% eine MFI von  $53,35 \pm 15,93\%$ , diese Unterschiede waren ebenfalls höchstsignifikant ( $p = 0.000$ ). Die Expression des Oberflächenmarkers CD14 stieg im Vergleich zur Kontrolle stark an. Die MFI lag für eine Konzentration von 10% bei  $398,76 \pm 264\%$  ( $p = 0.000$ ). Für eine Konzentration von 2% lag die MFI bei  $317,91 \pm 147,46\%$  ( $p = 0.001$ ).



**Abb. 5: Einfluss der Tumorzellüberstände auf die Reifung Dendritischer Zellen:** Aus PBMC wurden durch CD14+-Selektion Monozyten aufgereinigt und mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Als Kontrolle diente in dem in dieser Abbildung dargestellten Experiment ein Ansatz Dendritischer Zellen, welcher neben den oben genannten Substanzen lediglich mit dem Kulturmedium der Tumorzellüberstände inkubiert wurde. Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Daneben werden Ansätze Dendritischer Zellen, welche mit 10% und 2% des Tumorzellüberstandes TUM-T und mit 10% und 2% des Tumorzellüberstandes TUM-G inkubiert wurden, gezeigt. Die Inkubationszeit betrug drei Tage, anschließend wurden die DC mit fluoreszenzmarkierten anti-human-CD83-mAK, anti-human-CD86-mAK und anti-human-CD14-mAK gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), der Mittelwert und die positive Standardabweichung ergaben sich aus 17 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ) wurde mittels einfaktorieller ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test analysiert.

Die durchflusszytometrische Analyse nach drei Tagen Inkubation mit dem Tumorzellüberstand der Tumorzelllinie TUM-G ergab vergleichbare Ergebnisse (Abb.5).

Bezüglich des Oberflächenmarkers CD83 sank bei einer Konzentration von 10% die MFI auf  $80,0 \pm 10,71\%$  und war damit höchstsignifikant erniedrigt ( $p = 0.000$ ), für eine Konzentration von 2% betrug sie  $86,7 \pm 7,57\%$ , was einem signifikanten Unterschied entsprach ( $p = 0.039$ ).

Die Expression von CD86 war ebenfalls erniedrigt. Nach Inkubation der Zellen mit einer Konzentration von 10% des Tumorzellüberstandes betrug die MFI  $50,22 \pm 18,47\%$  und bei einer Konzentration von 2%  $54,85 \pm 18,53\%$  (jeweils  $p = 0.000$ ).

Der Oberflächenmarker CD14 ist im Vergleich zur Kontrolle in beiden Gruppen höchstsignifikant angestiegen ( $p = 0.000$ ). Für eine Konzentration von 10% des Tumorzellüberstandes lag die MFI durchschnittlich bei  $397,21 \pm 199,12\%$  und für eine Konzentration von 2% bei  $301,4 \pm 127,15\%$ .

Es ist festzustellen, dass die Überstände beider Tumorzelllinien höchstsignifikant dosisabhängig eine starke Hemmung der Reifung von DC in Bezug auf die Expression der drei untersuchten Oberflächenmarker bewirken.

#### **4.5 Aufhebung der tumorinduzierten Reifungsinhibition durch Iscador Qu spez®**

Durch die vorigen Versuche konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Iscador Qu spez® eine Reifungsinduktion der DC bewirkt, während die Inkubation mit verschiedenen Tumorzellüberständen eine Reifungsinhibition zur Folge hat. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob durch gleichzeitige Inkubation der Zellen mit Tumorzellüberstand und Mistelpräparat die tumorinduzierte Reifungsinhibition aufgehoben werden kann.

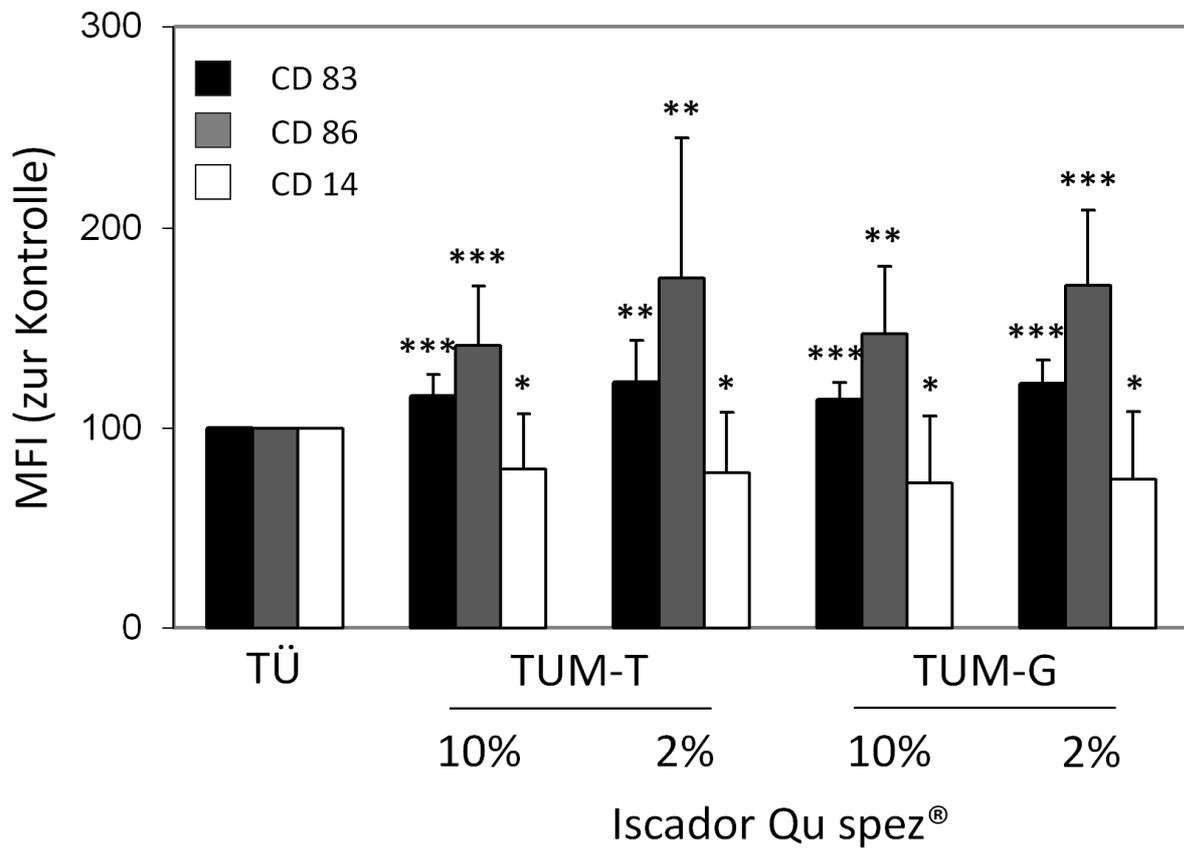
Es wurden sowohl Ansätze mit Überständen der Tumorzelllinie TUM-T als auch der Tumorzelllinie TUM-G jeweils in 10%iger und 2%iger Konzentration angesetzt. Neben den Tumorzellüberständen wurde zu allen Ansätzen gleichzeitig Iscador Qu spez® in einer Konzentration von  $0,25\mu\text{g/ml}$  gegeben. Als Kontrolle diente jeweils ein Ansatz, der lediglich mit der entsprechenden Konzentration des Tumorzellüberstandes behandelt wurde, ohne dass eine Zugabe des Mistelpräparates erfolgte. Die Kontrolle wurde jeweils auf 100% gesetzt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb.6 dargestellt.

Für beide Tumorzellüberstände war eine Aufhebung der tumorinduzierten Reifungsinhibition durch die Zugabe des Mistelpräparates festzustellen.

Für die Ansätze, die mit einer Konzentration von 10% des Überstandes der Tumorzelllinie TUM-T behandelt wurden, stieg die MFI der beiden Reifungsmarker CD83 und CD86 im Vergleich zur Kontrolle höchstsignifikant an ( $p = 0.000$ ), die MFI des Oberflächenmarkers CD14 sank im Vergleich zur Kontrolle signifikant ( $p = 0.031$ ). Die MFI des Oberflächenmarkers CD83 lag bei  $116,12 \pm 10,63\%$  und die des Oberflächenmarkers CD86 bei  $141,17 \pm 29,97\%$ . Die MFI des Oberflächenmarkers CD14 sank im Vergleich zur Kontrolle auf  $79,51 \pm 27,77\%$ .

Wurden die Ansätze nur mit einer Konzentration von 2% des Tumorzellüberstandes behandelt, waren für den CD83- und CD86-Marker hochsignifikante ( $p = 0.003$ ) und für den

CD14-Marker signifikante ( $p = 0.031$ ) Effekte des Mistelpräparates feststellbar. Die MFI des Oberflächenmarkers CD83 stieg auf  $122,73 \pm 21,01\%$  und die des Oberflächenmarkers CD86 auf  $175,25 \pm 69,64\%$ . Die MFI des Oberflächenmarkers CD14 hingegen sank auf  $77,69 \pm 30,16\%$  der Kontrolle.



**Abb. 6: Wirkung von Iscador Qu spez® auf die tumorinduzierte Reifungsinhibition Dendritischer Zellen:** Aus PBMC wurden durch CD14+-Selektion Monozyten aufgereinigt und mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Die Abbildung zeigt einerseits einen der Kontrolle dienenden Ansatz Dendritischer Zellen, welcher neben den oben genannten Substanzen nur mit Tumorzellüberstand (TÜ) behandelt wurde. Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Dieser Ansatz wurde mit den beiden Tumorzellüberständen TUM-T und TUM-G, jeweils in 10%iger und 2%iger Konzentration durchgeführt, der Übersicht halber wurden diese vier Ansätze in der Abbildung aber zu einem zusammengefasst.

Daneben sind vier ebenfalls mit diesen Tumorzellüberständen behandelte Ansätze Dendritischer Zellen dargestellt, welche aber zusätzlich mit  $0,25\mu\text{g/ml}$  Iscador Qu spez® behandelt wurden. Die Inkubationszeit betrug drei Tage, anschließend wurden die DC mit fluoreszenzmarkierten anti-human-CD83-mAK, anti-human-CD86-mAK und anti-human-CD14-mAK gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), der Mittelwert und die positive Standardabweichung ergaben sich aus 12 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ) wurde mittels einfaktorier ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test analysiert.

Vergleichbare Werte ergaben sich für den Tumorzellüberstand der zweiten Tumorzelllinie TUM-G.

Nach Behandlung mit 10% dieses Tumorzellüberstandes lag die MFI des Oberflächenmarkers CD83 bei  $114,34 \pm 8,21\%$  ( $p = 0.000$ ), die MFI des Oberflächenmarkers CD86 bei  $146,82 \pm 34,13\%$  ( $p = 0.001$ ) und die MFI des Oberflächenmarkers CD14 bei  $72,65 \pm 33,34\%$  des Kontrollwertes ( $p = 0.025$ ).

Wurde eine Konzentration von 2% des Tumorzellüberstandes für die Ansätze verwendet, betrug die MFI des Oberflächenmarkers CD83  $122,09 \pm 11,96\%$  und die MFI des Oberflächenmarkers CD86  $171,45 \pm 37,65\%$  (jeweils  $p = 0.000$ ). Die MFI des Oberflächenmarkers CD14 sank signifikant auf  $74,6 \pm 33,46\%$  des Kontrollwertes ( $p = 0.027$ ).

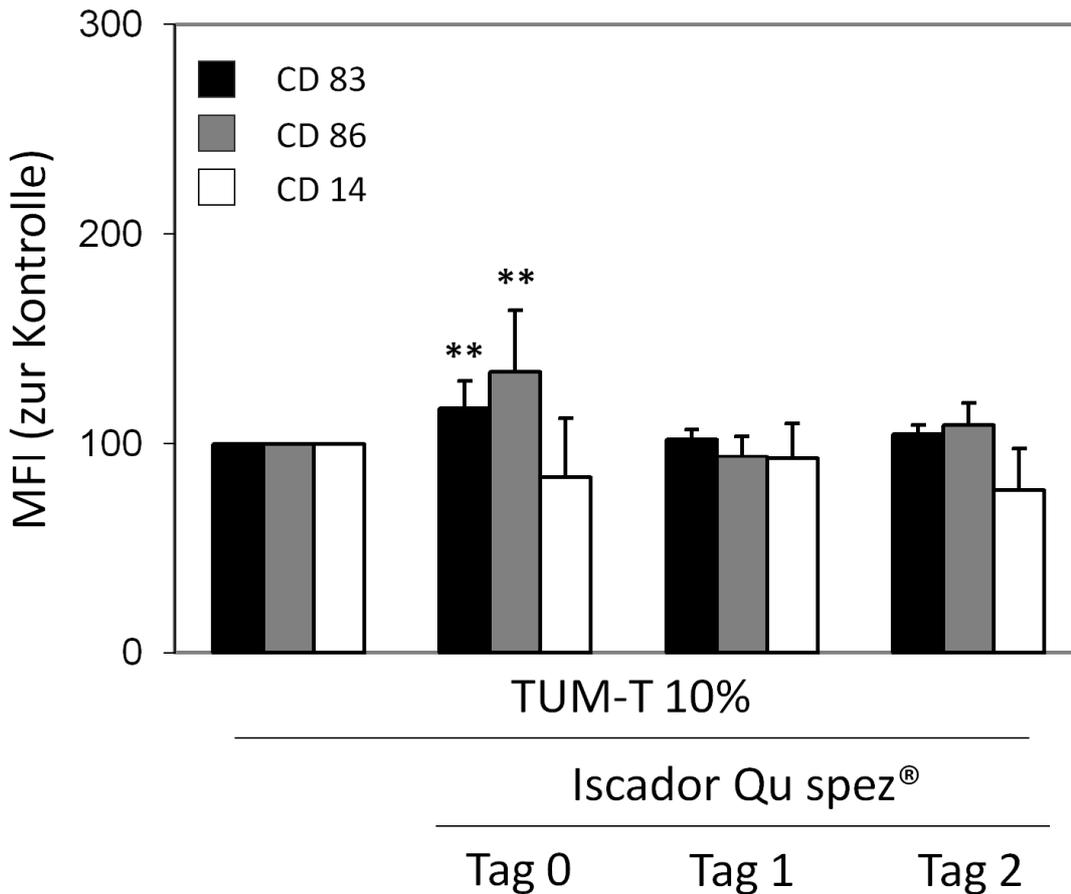
Insgesamt kann festgestellt werden, dass eine Aufhebung der Reifungsinhibition durch die Tumorzellüberstände mittels der Zugabe des Mistelpräparates möglich ist. Dies gilt sowohl für die Überstände der Tumorzelllinie TUM-T als auch für die Überstände von TUM-G. Die Konzentration des Tumorzellüberstandes (2% oder 10%) spielt dabei keine wesentliche Rolle.

#### **4.5.1 Zeitkinetische Effekte der Gabe von Iscador Qu spez® in Kombination mit Tumorzellüberständen**

In Anlehnung an die in 4.3.2 beschriebenen Versuche, in denen der Einfluss der Inkubationszeit von Iscador Qu spez® untersucht wurde, sollte nun herausgefunden werden, ob die Inkubationszeit des Mistelpräparates auch in Kombination mit der Gabe von Tumorzellüberständen einen Einfluss hat.

Verwendet wurden die gleichen Konzentrationen der Tumorzellüberstände wie für die in 4.5 erläuterten Versuche sowie dieselbe Mistelkonzentration, die an drei unterschiedlichen Tagen zu den Ansätzen gegeben wurde. Als Kontrolle diente ebenfalls jeweils ein Ansatz, der nur mit Tumorzellüberstand behandelt wurde.

Es stellte sich heraus, dass auch für diesen Versuchsansatz die Inkubationszeit eine Rolle spielt. Es war ein deutlich stärkerer Effekt des Mistelpräparates zu erkennen, wenn die Inkubationszeit drei Tage betrug. Zwischen einer Inkubationszeit von einem und zwei Tagen war kein Unterschied mehr festzustellen (Abb.7).



**Abb. 7: Zeitkinetische Effekte der Gabe von Iscador Qu spez® in Kombination mit dem Tumorzellüberstand**

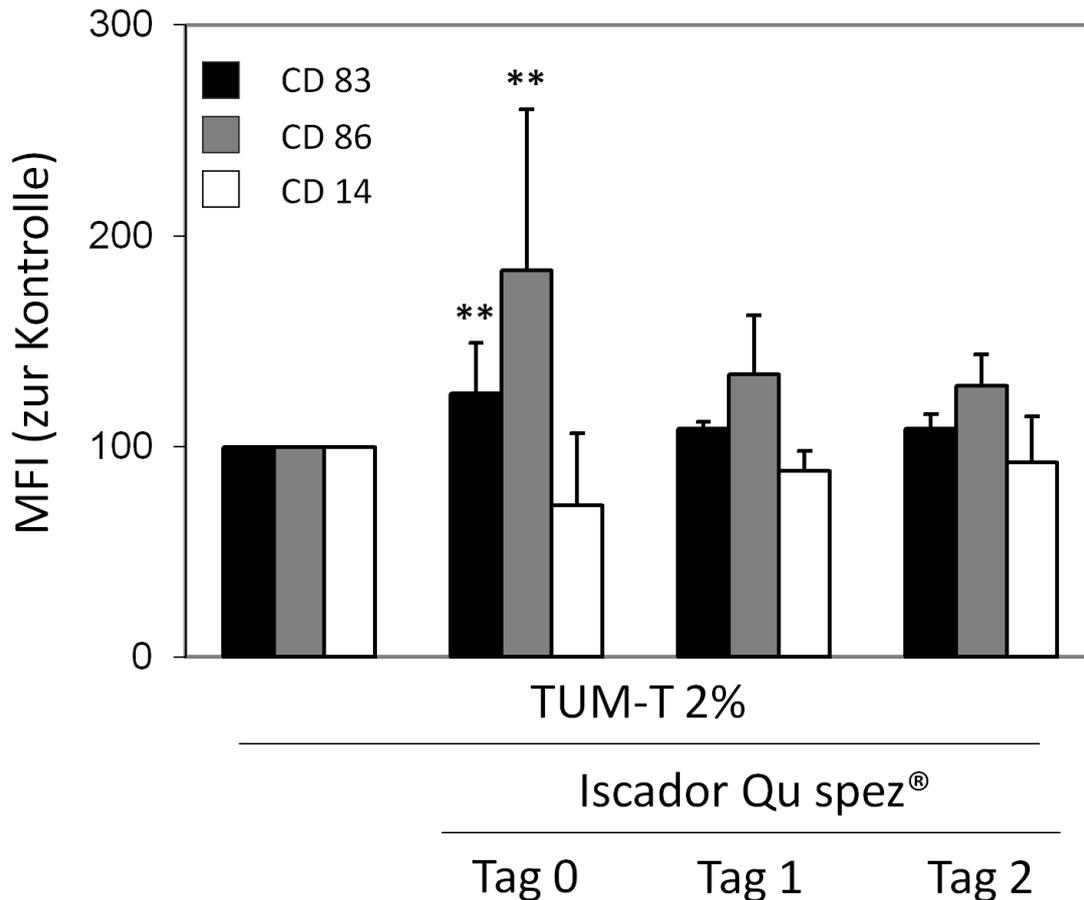
**TUM-T in 10%iger Konzentration:** Aus PBMC wurden durch CD14+-Selektion Monozyten aufgereinigt und mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. In der Abbildung ist einerseits ein der Kontrolle dienender Ansatz Dendritischer Zellen dargestellt, welcher zusätzlich zu den oben genannten Substanzen lediglich mit dem Tumorzellüberstand TUM-T in 10%iger Konzentration behandelt wurde. Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Außerdem sind drei weitere mit TUM-T 10% behandelte Ansätze dargestellt, zu welchen entweder an Tag 0, an Tag 1 oder an Tag 2 der dreitägigen Inkubationszeit 0,25µg/ml Iscador Qu spez® hinzugefügt wurden. Anschließend wurden die DC mit fluoreszenzmarkierten anti-human-CD83-mAK, anti-human-CD86-mAK und anti-human-CD14-mAK gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Der Mittelwert und die positive Standardabweichung ergaben sich aus 7 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001) wurde mittels einfaktorieller ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test analysiert.

Die Unterschiede zwischen den Zeitpunkten, zu denen das Mistelpräparat gegeben wurde, waren hochsignifikant ( $p = 0.007$  für CD83) beziehungsweise signifikant ( $p = 0.01$  für CD86). Die MFI des Oberflächenmarkers CD83 lag nach drei Tagen Inkubation mit dem Mistelpräparat bei  $117,16 \pm 12,82\%$ , nach zwei Tagen Inkubation bei  $102,12 \pm 4,86\%$  und nach einem Tag Inkubation bei  $104,79 \pm 4,06\%$ . Im Vergleich der Gruppen mit der Kontrolle war lediglich die MFI nach dreitägiger Inkubation hochsignifikant erhöht ( $p = 0.003$ ). Die MFI des Oberflächenmarkers CD86 stieg nach drei Tagen Inkubation mit dem Mistelpräparat auf  $134,44 \pm 29,38\%$  und war damit im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls hochsignifikant erhöht ( $p = 0.009$ ). Nach zwei Tagen Inkubation lag sie bei  $93,65 \pm 9,97\%$  und nach einem Tag Inkubation bei  $109,15 \pm 10,41\%$ . Bezüglich des Oberflächenmarkers CD14 waren keine signifikanten Unterschiede verglichen mit der Kontrolle festzustellen. Die MFI lag nach drei Tagen Inkubation bei  $83,53 \pm 28,59\%$ , nach zwei Tagen Inkubation bei  $92,9 \pm 16,89\%$  und nach einem Tag Inkubation bei  $77,46 \pm 20,2\%$ .

Die Ergebnisse der Experimente mit demselben Tumorzellüberstand in 2%iger Konzentration sind in Abb.8 dargestellt. Es fanden sich bezüglich des Vergleiches der Gruppen untereinander für CD83 und CD86 signifikante Unterschiede ( $p = 0.02$  und  $p = 0.015$ ). Im Vergleich zur Kontrolle stieg die MFI des Oberflächenmarkers CD83 nach drei Tagen Inkubation auf  $125,19 \pm 24,14\%$  ( $p = 0.007$ ), nach zwei Tagen Inkubation auf  $108,42 \pm 3,5\%$  (nicht signifikant) und nach einem Tag auf  $108,44 \pm 7,13\%$  (nicht signifikant).

Die MFI des Oberflächenmarkers CD86 lag nach drei Tagen Inkubation mit dem Mistelpräparat bei  $184,09 \pm 76,16\%$  ( $p = 0.005$ ), nach zwei Tagen Inkubation lag sie bei  $134,46 \pm 27,63\%$  und nach einem Tag Inkubation bei  $128,85 \pm 15,07\%$  (jeweils nicht signifikant).

Die MFI des Oberflächenmarkers CD14 sank abhängig von der Inkubationszeit des Mistelpräparates, sie lag nach drei Tagen Inkubation bei  $72,19 \pm 34,14\%$ , nach zwei Tagen Inkubation bei  $88,61 \pm 9,28\%$  und nach einem Tag Inkubation bei  $92,5 \pm 21,93\%$ . Signifikante Veränderungen lagen für diesen Oberflächenmarker jedoch nicht vor.

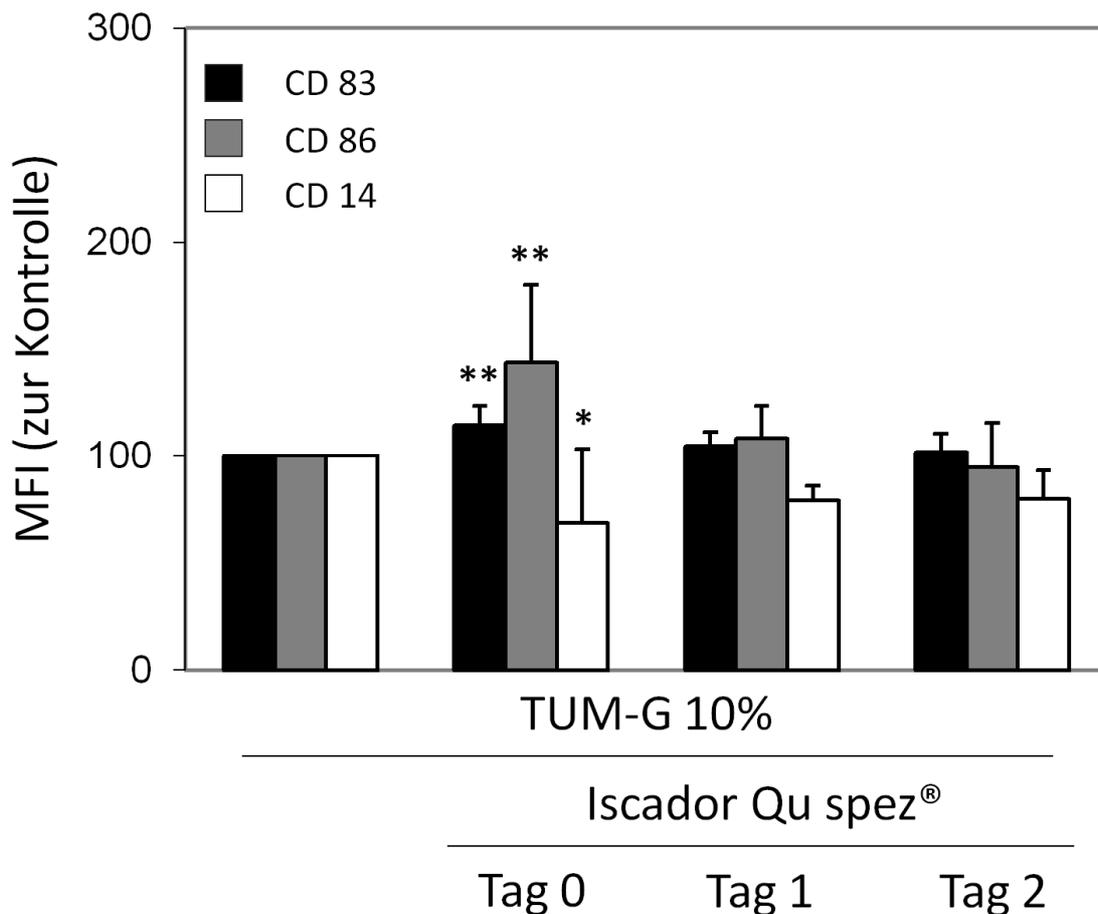


**Abb. 8: Zeitkinetische Effekte der Gabe von Iscador Qu spez® in Kombination mit dem Tumorzellüberstand TUM-T in 2%iger Konzentration:** Aus PBMC wurden durch CD14+-Selektion Monozyten aufgereinigt und mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. In der Abbildung ist einerseits ein der Kontrolle dienender Ansatz Dendritischer Zellen dargestellt, welcher neben den oben genannten Substanzen allein mit dem Tumorzellüberstand TUM-T in 2%iger Konzentration behandelt wurde. Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Außerdem sind drei weitere mit TUM-T 2% behandelte Ansätze dargestellt, zu welchen entweder an Tag 0, Tag 1 oder Tag 2 der dreitägigen Inkubationszeit 0,25µg/ml Iscador Qu spez® hinzugefügt wurden. Anschließend wurden die DC mit fluoreszenzmarkierten anti-human-CD83-mAK, anti-human-CD86-mAK und anti-human-CD14-mAK gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), der Mittelwert und die positive Standardabweichung ergaben sich aus 8 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001) wurde mittels einfaktorieller ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test analysiert.

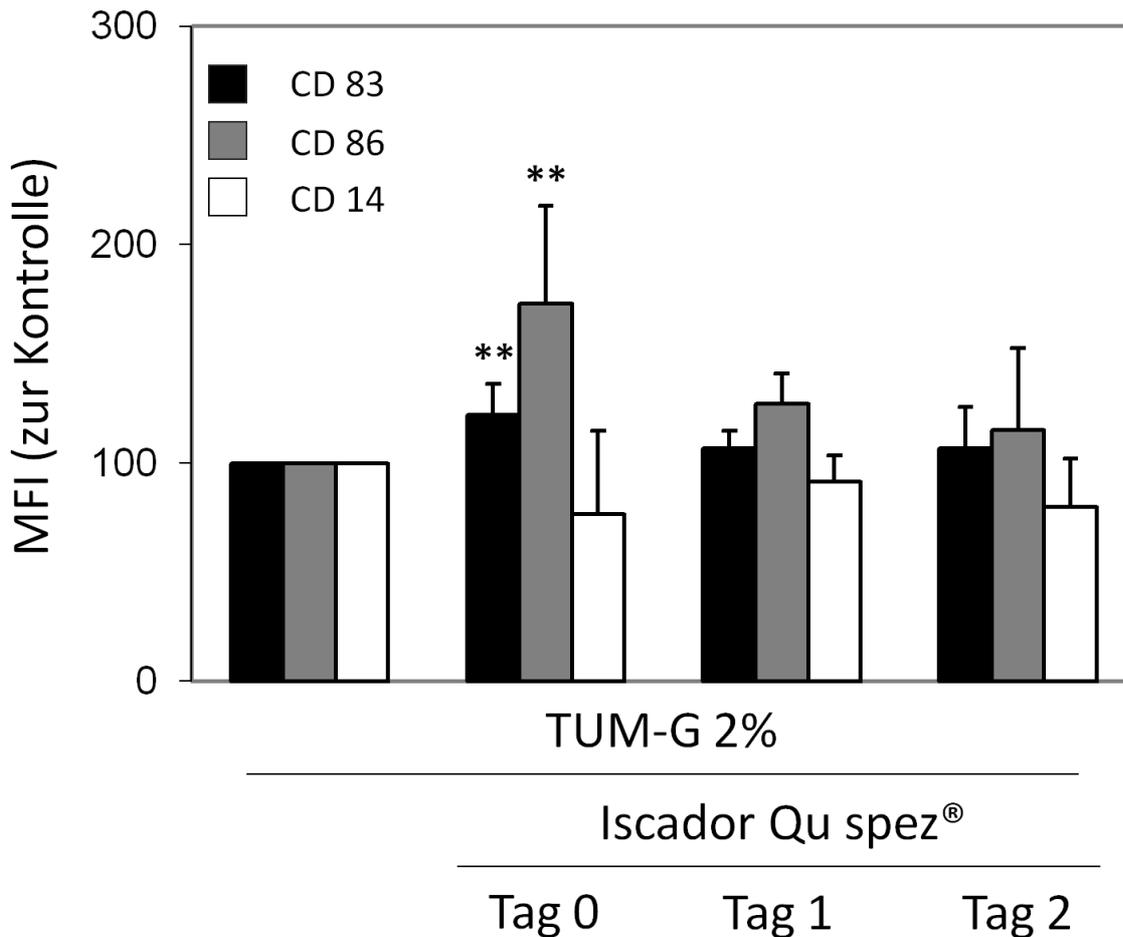
Vergleichbare Ergebnisse ergaben sich für die mit dem Überstand der Tumorzelllinie TUM-G inkubierten Ansätze. Die Ergebnisse sind für die 10%ige Konzentration dieses Tumorzellüberstandes in Abb.9 dargestellt. Es war ein in Abhängigkeit der Zeit hochsignifikanter Unterschied der Expression der Oberflächenmarker CD83 (p = 0.005) und CD86 (p = 0.009) erkennbar. Die MFI des Oberflächenmarkers CD83 war nach drei Tagen Inkubation mit dem Mistelpräparat im Vergleich zur Kontrolle hochsignifikant erhöht (p = 0.002) und lag bei  $114,6 \pm 8,96\%$ . Nach zwei Tagen Inkubation lag sie bei  $104,94 \pm 6,4\%$

und nach einem Tag Inkubation bei  $101,91 \pm 8,91\%$ . Die MFI des Oberflächenmarkers CD86 lag nach drei Tagen Inkubation bei  $143,91 \pm 36,42\%$  verglichen mit der Kontrolle ( $p = 0,006$ ), nach zwei Tagen Inkubation lag sie bei  $108,45 \pm 15,29\%$  und nach einem Tag Inkubation bei  $94,76 \pm 20,84\%$ .

Für den Oberflächenmarker CD14 ergab sich nach drei Tagen Inkubation mit dem Mistelpräparat eine MFI von  $68,67 \pm 34,66\%$ , nach zwei Tagen eine MFI von  $79,06 \pm 7,08\%$  und nach einem Tag Inkubation eine MFI von  $79,86 \pm 13,52\%$ .



**Abb. 9: Zeitkinetische Effekte der Gabe von Iscador Qu spez® in Kombination mit dem Tumorzellüberstand TUM-G in 10%iger Konzentration:** Aus PBMC wurden durch CD14+-Selektion Monozyten aufgereinigt und mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. In der Abbildung ist einerseits ein der Kontrolle dienender Ansatz Dendritischer Zellen dargestellt, welcher neben den oben genannten Substanzen allein mit dem Tumorzellüberstand TUM-G in 10%iger Konzentration behandelt wurde. Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Außerdem sind drei weitere mit TUM-G 10% behandelte Ansätze dargestellt, zu welchen entweder an Tag 0, Tag 1 oder Tag 2 der dreitägigen Inkubationszeit  $0,25\mu\text{g/ml}$  Iscador Qu spez® hinzugefügt wurden. Anschließend wurden die DC mit fluoreszenzmarkierten anti-human-CD83-mAK, anti-human-CD86-mAK und anti-human-CD14-mAK gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), der Mittelwert und die positive Standardabweichung ergaben sich aus 7 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ) wurde mittels einfaktorier ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test analysiert.



**Abb. 10: Zeitkinetische Effekte der Gabe von Iscador Qu spez® in Kombination mit dem Tumorzellüberstand TUM-G in 2%iger Konzentration:** Aus PBMC wurden durch CD14+-Selektion Monozyten aufgereinigt und mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. In der Abbildung ist einerseits ein der Kontrolle dienender Ansatz Dendritischer Zellen dargestellt, welcher neben den oben genannten Substanzen allein mit dem Tumorzellüberstand TUM-G in 2%iger Konzentration behandelt wurde. Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Außerdem sind drei weitere mit TUM-G 2% behandelte Ansätze dargestellt, zu welchen entweder an Tag 0, Tag 1 oder Tag 2 der dreitägigen Inkubationszeit 0,25µg/ml Iscador Qu spez® hinzugefügt wurden. Anschließend wurden die DC mit fluoreszenzmarkierten anti-human-CD83-mAK, anti-human-CD86-mAK und anti-human-CD14-mAK gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), der Mittelwert und die positive Standardabweichung ergaben sich aus 7 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ) wurde mittels einfaktorieller ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test analysiert.

Die Ergebnisse für die 2%ige Konzentration des Tumorzellüberstandes TUM-G sind in Abb.10 zu sehen.

Es ergaben sich für den Oberflächenmarker CD83 signifikante ( $p = 0.017$ ) und für den Oberflächenmarker CD86 hochsignifikante ( $p = 0.002$ ) Unterschiede innerhalb der Gruppen. Es lag somit ein signifikanter Unterschied bezüglich der Inkubationsdauer vor. Die MFI des Markers CD83 war nach drei Tagen Inkubation auf  $122,28 \pm 14,03\%$  erhöht ( $p = 0.006$ ),

nach zwei Tagen lag sie bei  $106,94 \pm 7,95\%$  und nach einem Tag Inkubation bei  $106,75 \pm 19,13\%$ .

Die MFI des Oberflächenmarkers CD86 betrug nach drei Tagen Inkubation  $172,96 \pm 44,98\%$ , dieser Unterschied war im Vergleich zur Kontrolle hochsignifikant ( $p = 0.001$ ). Nach zwei Tagen Inkubation lag die MFI bei  $127,05 \pm 13,83\%$  und nach einem Tag Inkubation bei  $115,12 \pm 37,72\%$ .

Die MFI des Oberflächenmarkers CD14 sank nach drei Tagen Inkubation mit dem Mistelpräparat auf  $76,33 \pm 38,64\%$ , nach zwei Tagen Inkubation auf  $91,7 \pm 11,7\%$  und nach einem Tag Inkubation auf  $79,67 \pm 22,62\%$ . Diese Unterschiede waren nicht signifikant.

Es lässt sich sagen, dass signifikante Effekte des Mistelpräparates bezüglich der Aufhebung der tumorzellinduzierten Reifungsinhibition nur nach drei Tagen Inkubationszeit erkennbar waren. Auch nach zwei Tagen und nach einem Tag Inkubation waren noch leichte Effekte feststellbar, die Messwerte unterschieden sich aber nicht wesentlich von den Kontrollen.

#### **4.5.2 Effekte der additiven Gabe von Iscador Qu spez® in Kombination mit Tumorzellüberständen**

Des Weiteren sollte getestet werden, ob der Effekt des Mistelpräparates durch eine Wiederholung der Gabe gesteigert werden kann.

Es wurden von jedem Tumorzellüberstand in beiden Konzentrationen jeweils vier Ansätze hergestellt. Ein Ansatz wurde jeweils unbehandelt gelassen und diente als Kontrolle. Zu den drei weiteren Ansätzen wurden zum gleichen Zeitpunkt wie die Tumorzellüberstände  $0,25\mu\text{g/ml}$  Iscador Qu spez® hinzugefügt, bei zwei Ansätzen wurde diese Gabe nach einem Tag wiederholt und bei einem Ansatz erfolgte am Tag darauf eine dritte Gabe des Mistelextraktes.

Die Ergebnisse der Experimente mit der Tumorzelllinie TUM-T sind für die 10%ige Konzentration in Abb. 11 dargestellt.

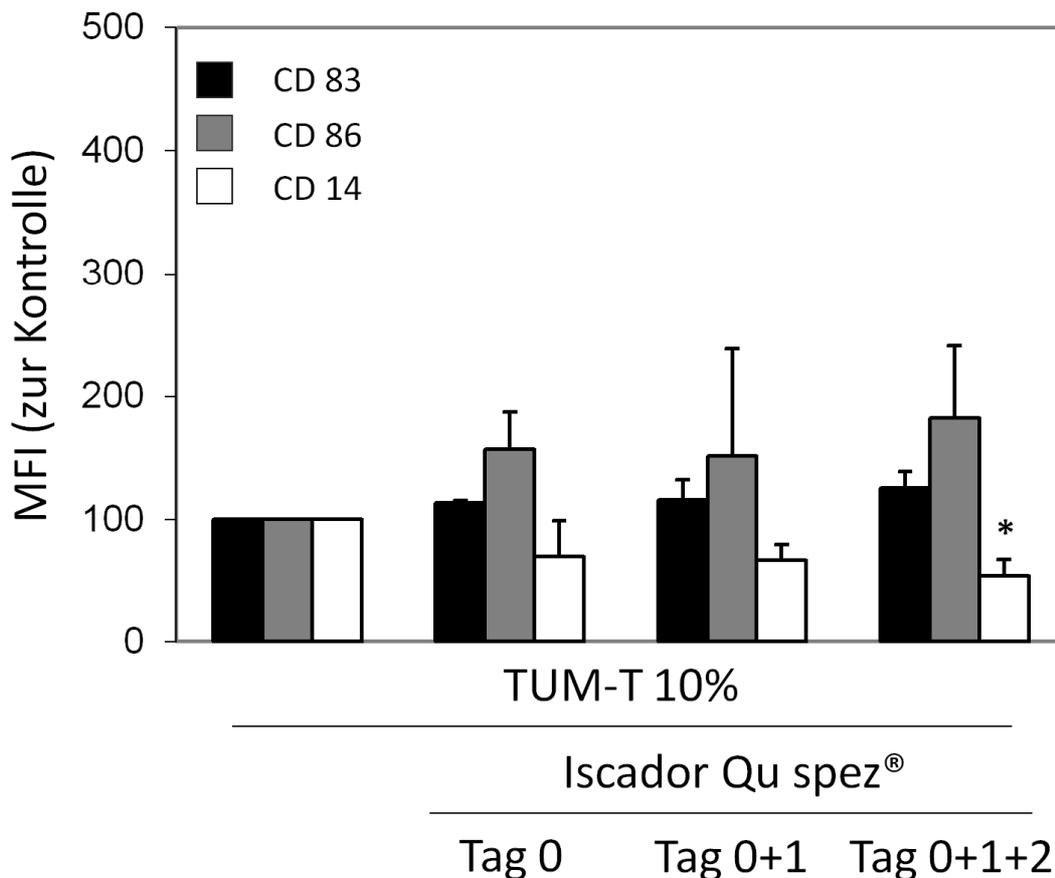
Insgesamt war eine leichte, jedoch nicht signifikante Steigerung des reifungsstimulierenden Effektes bei wiederholter Gabe von Iscador Qu spez® festzustellen.

Die MFI des Oberflächenmarkers CD83 stieg nach einmaliger Gabe im Vergleich zur Kontrolle auf  $113,68 \pm 1,76\%$ , nach zweimaliger Gabe auf  $115,68 \pm 16,82\%$  und nach dreimaliger Gabe auf  $125,56 \pm 13,61\%$ .

Die MFI des Oberflächenmarkers CD86 stieg nach einmaliger Mistelgabe auf  $156,87 \pm 30,38\%$

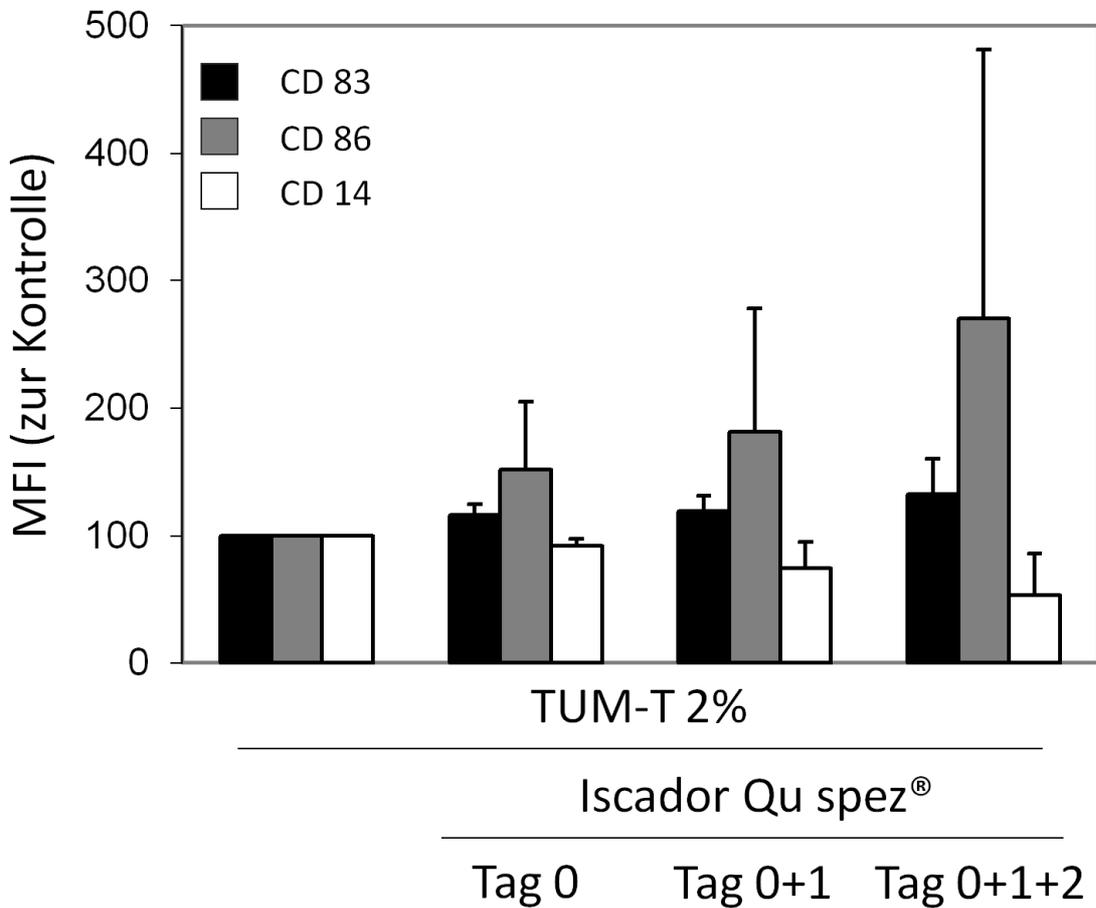
der Kontrolle, nach einmaliger Wiederholung der Gabe auf  $151,88 \pm 87,18\%$  und nach dreimaliger Gabe auf  $182,37 \pm 58,72\%$ .

Die MFI des Oberflächenmarkers CD14 sank nach einmaliger Gabe des Präparates auf  $70,12 \pm 28,79\%$ , nach zweimaliger Gabe auf  $66,95 \pm 12,71\%$  und nach einer dritten Gabe auf  $54,02 \pm 13,51\%$ , dieser Wert war der einzig im Vergleich zur Kontrolle signifikante Wert ( $p = 0.027$ ) in dieser Versuchsreihe.



**Abb. 11: Effekte der additiven Gabe von Iscador Qu spez® in Kombination mit dem Tumorzellüberstand TUM-T in 10%iger Konzentration:** Aus PBMC wurden durch CD14+-Selektion Monozyten aufgereinigt und mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. In der Abbildung ist einerseits ein der Kontrolle dienender Ansatz Dendritischer Zellen dargestellt, welcher neben den oben genannten Substanzen allein mit dem Tumorzellüberstand TUM-T in 10%iger Konzentration behandelt wurde. Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Außerdem sind drei weitere mit TUM-T 10% behandelte Ansätze dargestellt, zu welchen entweder an Tag 0, an Tag 0 und Tag 1 oder an Tag 0, Tag 1 und Tag 2 der dreitägigen Inkubationszeit  $0,25\mu\text{g/ml}$  Iscador Qu spez® hinzugefügt wurden. Anschließend wurden die DC mit fluoreszenzmarkierten anti-human-CD83-mAK, anti-human-CD86-mAK und anti-human-CD14-mAK gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), der Mittelwert und die positive Standardabweichung ergaben sich aus 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ) wurde mittels einfaktorieller ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test analysiert.

Bezüglich des Tumorzellüberstandes TUM-T in einer Konzentration von 2% (Abb.12) waren die additiven Effekte des Präparates ebenfalls deutlich erkennbar, aber nicht signifikant.

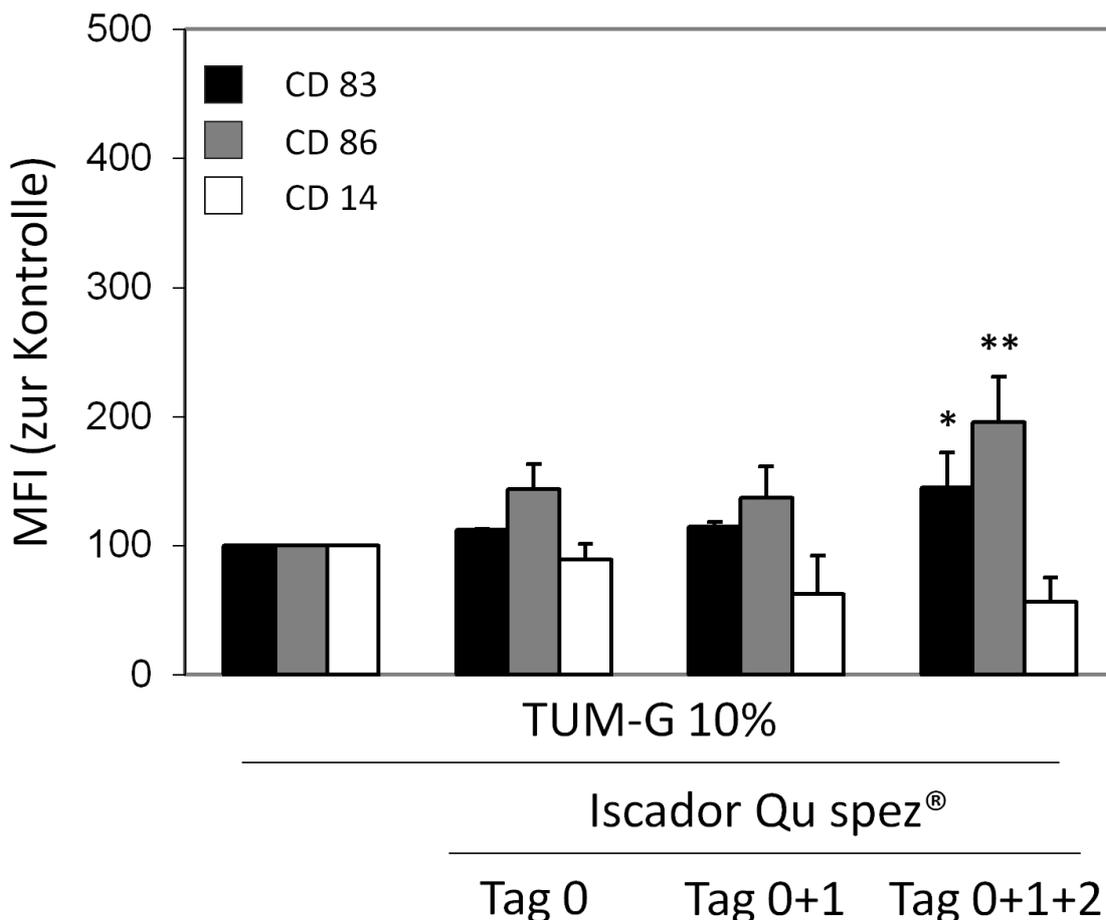


**Abb. 12: Effekte der additiven Gabe von Iscador Qu spez® in Kombination mit dem Tumorzellüberstand TUM-T in 2%iger Konzentration:** Aus PBMC wurden durch CD14+-Selektion Monozyten aufgereinigt und mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. In der Abbildung ist einerseits ein der Kontrolle dienender Ansatz Dendritischer Zellen dargestellt, welcher neben den oben genannten Substanzen allein mit dem Tumorzellüberstand TUM-T in 2%iger Konzentration behandelt wurde. Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Außerdem sind drei weitere mit TUM-T 2% behandelte Ansätze dargestellt, zu welchen entweder an Tag 0, an Tag 0 und Tag 1 oder an Tag 0, Tag 1 und Tag 2 der dreitägigen Inkubationszeit 0,25µg/ml Iscador Qu spez® hinzugefügt wurden. Anschließend wurden die DC mit fluoreszenzmarkierten anti-human-CD83-mAK, anti-human-CD86-mAK und anti-human-CD14-mAK gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), der Mittelwert und die positive Standardabweichung ergaben sich aus 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001) wurde mittels einfaktorieller ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test analysiert.

Die MFI des Oberflächenmarkers CD83 stieg nach einmaliger Gabe des Mistelpräparates auf  $116,17 \pm 8,84\%$ , nach zweimaliger Gabe auf  $119,72 \pm 11,56\%$  und nach dreimaliger Gabe auf  $132,94 \pm 27,33\%$  im Vergleich zur Kontrolle. Betreffend den Oberflächenmarker CD86 stieg die MFI nach nur einer Gabe auf  $151,69 \pm 52,98\%$ , nach zweimaliger Gabe auf  $181,61 \pm$

96,06% und nach drei Gaben auf  $269,73 \pm 211,3\%$ . Die MFI des Oberflächenmarkers CD14 sank nach einmaliger Gabe des Mistelpräparates auf  $92,33 \pm 5,18\%$ , nach zweimaliger Gabe auf  $75,13 \pm 20,48\%$  und nach drei Gaben auf  $53,8 \pm 32,48\%$  des Kontrollwertes.

Für den Tumorzellüberstand TUM-G in 10%iger Konzentration sind die Ergebnisse in Abb.13 dargestellt.



**Abb. 13: Effekte der additiven Gabe von Iscador Qu spez® in Kombination mit dem Tumorzellüberstand TUM-G in 10%iger Konzentration:** Aus PBMC wurden durch CD14+-Selektion Monozyten aufgereinigt und mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. In der Abbildung ist einerseits ein der Kontrolle dienender Ansatz Dendritischer Zellen dargestellt, welcher neben den oben genannten Substanzen allein mit dem Tumorzellüberstand TUM-G in 10%iger Konzentration behandelt wurde. Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Außerdem sind drei weitere mit TUM-G 10% behandelte Ansätze dargestellt, zu welchen entweder an Tag 0, an Tag 0 und Tag 1 oder an Tag 0, Tag 1 und Tag 2 der dreitägigen Inkubationszeit  $0,25\mu\text{g/ml}$  Iscador Qu spez® hinzugefügt wurden. Anschließend wurden die DC mit fluoreszenzmarkierten anti-human-CD83-mAK, anti-human-CD86-mAK und anti-human-CD14-mAK gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), der Mittelwert und die positive Standardabweichung ergaben sich aus 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ) wurde mittels einfaktorieller ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test analysiert.

Es ergab sich für den Oberflächenmarker CD83 ein signifikanter ( $p = 0.024$ ) und für den Oberflächenmarker CD86 ein hochsignifikanter Unterschied innerhalb der Gruppen ( $p = 0.007$ ).

Verglichen mit der Kontrolle stieg die MFI des Oberflächenmarkers CD83 nach einmaliger Gabe von Iscador Qu spez® auf  $111,83 \pm 1,17\%$ , nach einmaliger Wiederholung der Gabe auf  $114,67 \pm 3,31\%$  und nach zweimaliger Wiederholung auf  $144,68 \pm 27,95\%$ , was einem signifikanten Unterschied zur Kontrolle entspricht ( $p = 0.012$ ).

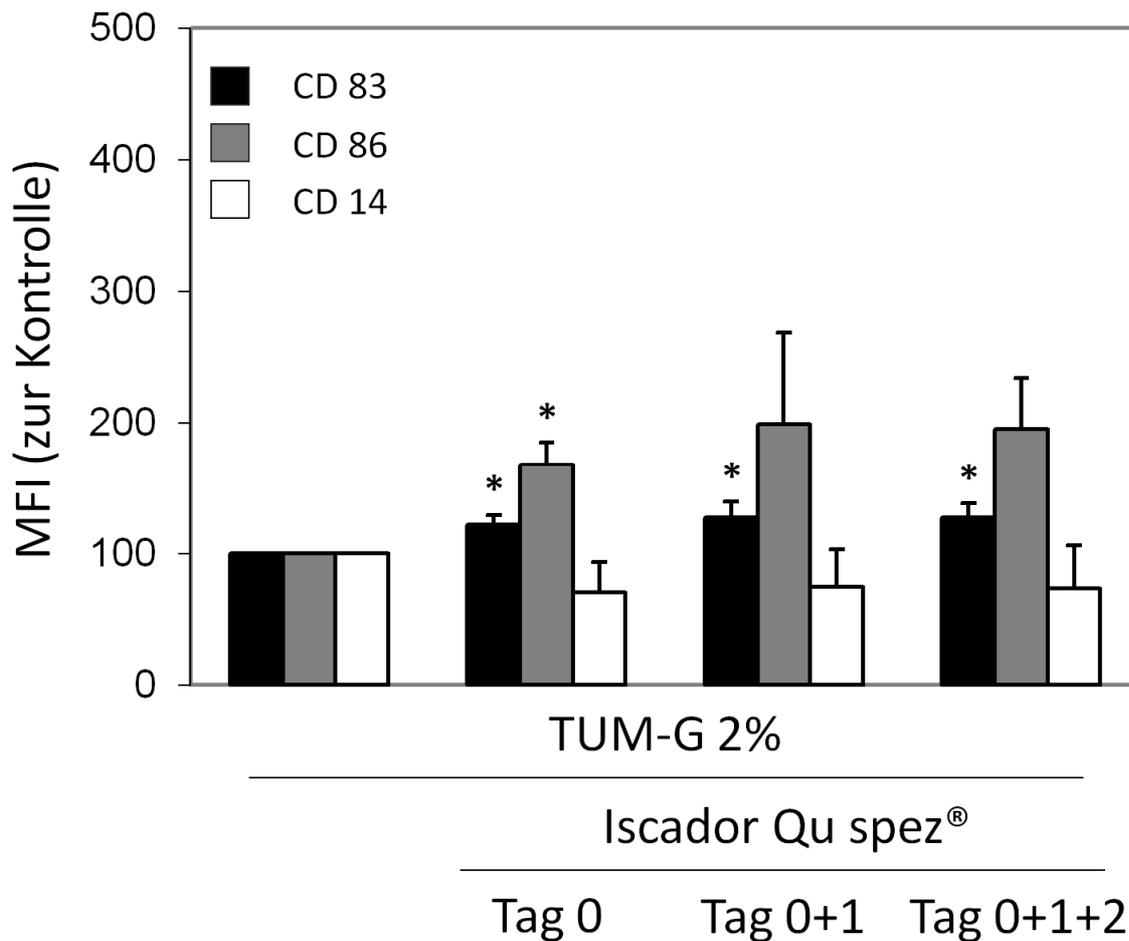
Die MFI des Oberflächenmarkers CD86 stieg nach einmaliger Gabe des Mistelextraktes auf  $143,26 \pm 19,72\%$ , nach zweimaliger Gabe auf  $136,81 \pm 24,49\%$  und nach dreimaliger Gabe auf  $195,96 \pm 35,31\%$ , diese Erhöhung ist im Vergleich mit der Kontrolle hochsignifikant ( $p = 0.003$ ). Die MFI des Oberflächenmarkers CD14 lag nach einmaliger Gabe des Mistelpräparates bei  $89 \pm 12,25\%$ , nach zweimaliger Gabe bei  $62,52 \pm 29,77\%$  und nach dreimaliger Gabe bei  $56,36 \pm 18,89\%$  der Kontrolle.

Bei 2%iger Konzentration des Tumorzellüberstandes war der Unterschied der einzelnen Gruppen lediglich bezüglich des Oberflächenmarkers CD83 signifikant ( $p = 0.017$ ). Die Ergebnisse sind in Abb.14 dargestellt. Die MFI des Oberflächenmarkers CD83 stieg nach nur einer Gabe auf  $121,65 \pm 7,25\%$ , nach einer zweiten Gabe auf  $127,21 \pm 12,14\%$  und nach einer dritten Gabe auf  $127,47 \pm 10,99\%$  der Kontrolle. Die Werte aller drei Gruppen waren zur Kontrolle signifikant verändert ( $p = 0.044$ ,  $p = 0.015$  und  $p = 0.014$ ).

Die MFI des Oberflächenmarkers CD86 stieg nach einmaliger Gabe des Mistelpräparates auf  $167,91 \pm 16,8\%$ , nach zweimaliger Gabe auf  $198,83 \pm 70,03\%$  und nach dreimaliger Gabe auf  $194,99 \pm 38,85\%$ . Signifikant war lediglich der Anstieg nach einmaliger Gabe ( $p = 0.045$ ).

Die MFI des Oberflächenmarkers CD14 sank nach einmaliger Gabe des Präparates auf  $70,56 \pm 22,94\%$ , nach zwei Gaben auf  $74,46 \pm 28,65\%$  und nach dreimaliger Gabe auf  $73,38 \pm 32,55\%$  des Kontrollwertes. Signifikante Unterschiede lagen für diesen Marker nicht vor.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bezüglich der Überstände beider Tumorzelllinien eine Steigerung des Effektes von Iscador Qu spez® durch eine mehrfache Gabe erreicht werden kann. Diese Effektsteigerung durch Wiederholung der Gabe war allerdings größtenteils nicht signifikant.

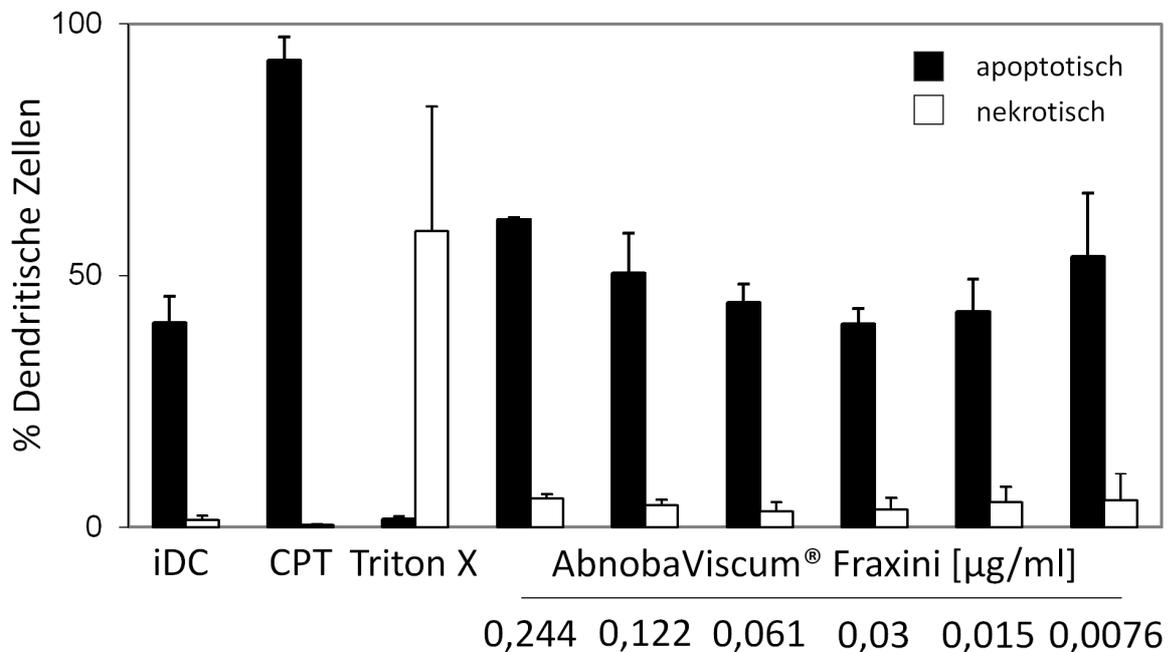


**Abb. 14: Effekte der additiven Gabe von Iscador Qu spez® in Kombination mit dem Tumorzellüberstand TUM-G in 2%iger Konzentration:** Aus PBMC wurden durch CD14+-Selektion Monozyten aufgereinigt und mit GM-CSF und IL-4 zu Dendritischen Zellen (DC) kultiviert. In der Abbildung ist einerseits ein der Kontrolle dienender Ansatz Dendritischer Zellen dargestellt, welcher neben den oben genannten Substanzen allein mit dem Tumorzellüberstand TUM-G in 2%iger Konzentration behandelt wurde. Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Außerdem sind drei weitere mit TUM-G 2% behandelte Ansätze dargestellt, zu welchen entweder an Tag 0, an Tag 0 und Tag 1 oder an Tag 0, Tag 1 und Tag 2 der dreitägigen Inkubationszeit 0,25µg/ml Iscador Qu spez® hinzugefügt wurden. Anschließend wurden die DC mit fluoreszenzmarkierten anti-human-CD83-mAK, anti-human-CD86-mAK und anti-human-CD14-mAK gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), der Mittelwert und die positive Standardabweichung ergaben sich aus 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001) wurde mittels einfaktorieller ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test analysiert.

#### 4.6 Konzentrationsabhängige Zytotoxizität von AbnobaViscum® Fraxini

Um herauszufinden, ob die gefundenen Effekte spezifisch für Iscador Qu spez® sind oder nicht, wurde noch ein anderes Mistelpräparat, AbnobaViscum® Fraxini, untersucht. Zunächst wurde die Zytotoxizität von AbnobaViscum® Fraxini bestimmt. Getestet wurden Konzentrationen zwischen 0,0076µg/ml und 0,244µg/ml. Höhere Konzentrationen wurden in einem Vorversuch eingesetzt, mussten allerdings aufgrund von starker Zytotoxizität verworfen werden.

In Abb.15 sind die Ergebnisse bezüglich des Anteils apoptotischer und nekrotischer Zellen dargestellt.



**Abb. 15: Konzentrationsabhängige Zytotoxizität von AbnobaViscum® Fraxini:** Die Abbildung zeigt die Ansätze, welche zur Findung der Zytotoxizitätsgrenze des Mistelpräparates AbnobaViscum® Fraxini angefertigt wurden. Aus PBMC wurden durch CD14+-Selektion Monozyten aufgereinigt und mit GM-CSF und IL-4 zu immaturren Dendritischen Zellen kultiviert. Zum einen sind Ansätze Dendritischer Zellen, welche mit 0,244µg/ml, 0,122µg/ml, 0,061µg/ml, 0,03µg/ml, 0,015µg/ml oder 0,0076µg/ml AbnobaViscum® Fraxini behandelt wurden, dargestellt. Außerdem ist ein Ansatz un behandelter Dendritischer Zellen (iDC), ein als Apoptosekontrolle dienender Ansatz Dendritischer Zellen, welcher mit 1µM des zytostatisch wirkenden Camptothecins (CPT) behandelt wurde und ein als Nekrosekontrolle dienender Ansatz Dendritischer Zellen, welcher mit 1% Nekrose-induzierend wirkendem Triton X-100 versetzt wurde, dargestellt. Die Inkubationszeit betrug drei Tage, anschließend wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Annexin V und Propidium-Jodid gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Gezeigt ist der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen, der Mittelwert und die positive Standardabweichung ergaben sich aus 4 unabhängigen Experimenten. Für dieses Experiment wurde keine statistische Analyse durchgeführt.

Als Kontrolle diente ein Ansatz unbehandelter DC, ein Apoptosekontrollansatz, für den die Zellen mit CPT behandelt wurden und ein Nekrosekontrollansatz, in welchem zu den Zellen Triton X-100 gegeben wurde.

Der Anteil apoptotischer Zellen lag bei den unbehandelten DC bei durchschnittlich  $40,73 \pm 5,21\%$ , beim Apoptosekontrollansatz lag dieser Anteil bei  $92,78 \pm 4,61\%$  und beim Nekrosekontrollansatz bei  $1,63 \pm 0,45\%$ . Für die getesteten Konzentrationen von AbnobaViscum® Fraxini näherten sich die Werte ab einer Konzentration von  $0,061\mu\text{g/ml}$  dem Wert der nicht behandelten DC an.

Bei einer Konzentration von  $0,244\mu\text{g/ml}$  lag der Anteil apoptotischer Zellen noch bei  $61,15 \pm 0,49\%$ , für eine Konzentration von  $0,122\mu\text{g/ml}$  bei  $50,5 \pm 7,85\%$ , für  $0,061\mu\text{g/ml}$  bei  $44,63 \pm 3,65\%$ , für  $0,0305\mu\text{g/ml}$  bei  $40,45 \pm 2,96\%$ , für  $0,015\mu\text{g/ml}$  bei  $42,8 \pm 6,44\%$  und für eine Konzentration von  $0,0076\mu\text{g/ml}$  bei  $53,7 \pm 12,84\%$ .

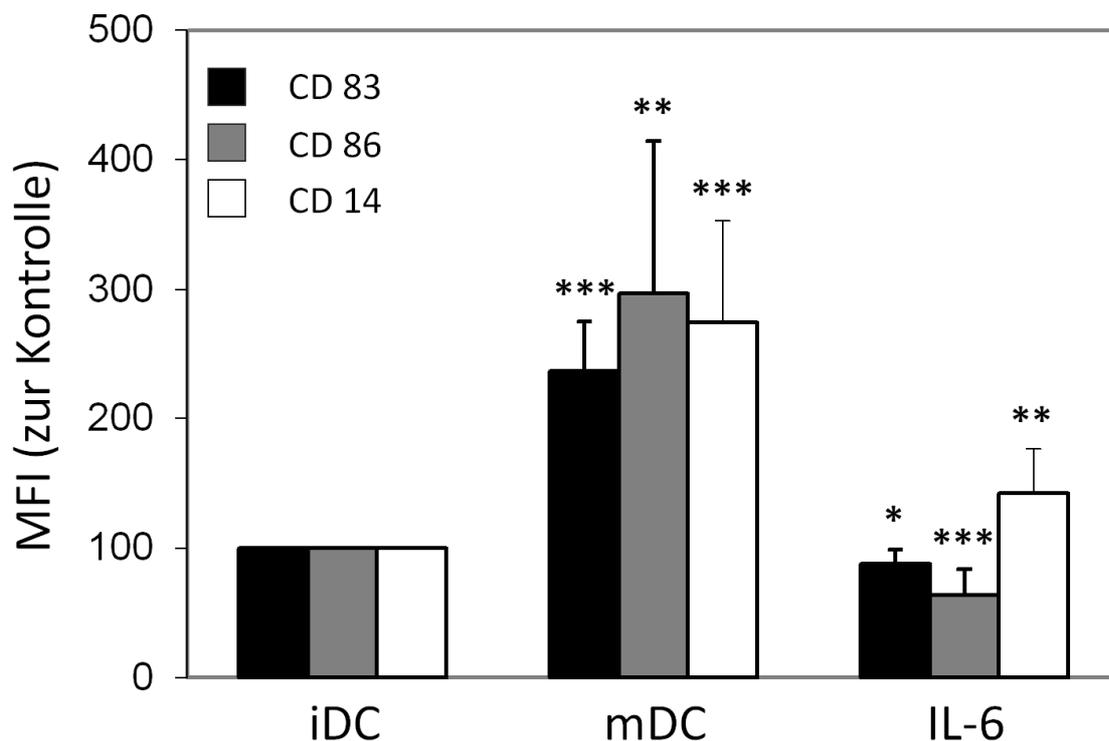
Neben dem Anteil apoptotischer Zellen wurde auch der Anteil nekrotischer Zellen gemessen. Während der Anteil nekrotischer Zellen bei dem Ansatz mit unbehandelten DC bei durchschnittlich  $1,5 \pm 0,81\%$  und bei dem Apoptosekontrollansatz bei  $0,5 \pm 0,14\%$  lag, betrug dieser für die Nekrosekontrolle  $58,8 \pm 24,82\%$ . Der Anteil nekrotischer Zellen lag für alle getesteten Konzentrationen von AbnobaViscum® Fraxini leicht über dem Wert der unbehandelten DC. Der Anteil nahm mit sinkender Konzentration nicht ab, sondern stieg für die beiden niedrigsten Konzentrationen wieder leicht an.

Für eine Konzentration von  $0,244\mu\text{g/ml}$  lag der Anteil nekrotischer Zellen bei  $5,7 \pm 0,85\%$ , für  $0,122\mu\text{g/ml}$  bei  $4,4 \pm 0,98\%$ , für  $0,061\mu\text{g/ml}$  bei  $3,15 \pm 1,86\%$ , für  $0,0305\mu\text{g/ml}$  bei  $3,55 \pm 2,29\%$ , für  $0,015\mu\text{g/ml}$  bei  $4,93 \pm 3,01\%$  und für eine Konzentration von  $0,0076\mu\text{g/ml}$  bei  $5,33 \pm 5,31\%$ .

#### 4.7 Einfluss verschiedener Konzentrationen von AbnobaViscum® Fraxini auf den Reifungszustand Dendritischer Zellen

Entsprechend der Versuchsreihe, die mit dem Präparat Iscador Qu spez® durchgeführt wurde, wurde auch für das Mistelpräparat AbnobaViscum® Fraxini getestet, ob DC im gewählten System stimulierbar und hemmbar sind.

Die Ergebnisse dieser Tests sind in Abb.16 dargestellt.

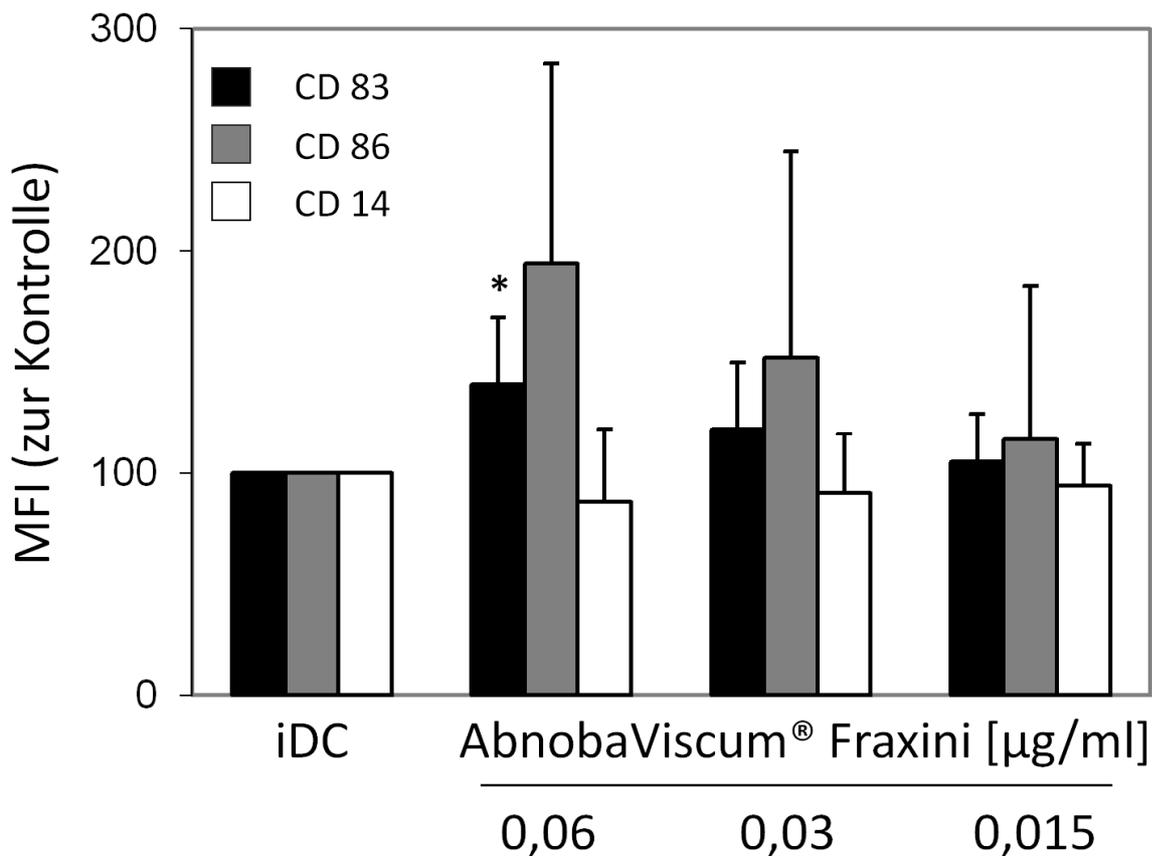


**Abb. 16: Einfluss von Stimulationscocktail und IL-6 auf die Reifung von DC:** Aus PBMC wurden durch CD14+-Selektion Monozyten aufgereinigt und mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Die Abbildung zeigt einerseits der Kontrolle dienende, nur mit den oben genannten Substanzen behandelte immature Dendritische Zellen (iDC). Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Als Positivkontrolle diente ein Ansatz mit muren Dendritischen Zellen (mDC), welcher zusätzlich mit einem Reifungscocktail, bestehend aus 500ng LPS/ml, 50ng TNF $\alpha$ /ml und 10ng IL-1 $\beta$ /ml behandelt wurde und als Negativkontrolle ein Ansatz, zu welchem zusätzlich 12,5ng/ml IL6 hinzugefügt wurden. Die Inkubationszeit betrug drei Tage, anschließend wurden die DC mit fluoreszenzmarkierten anti-human-CD83-mAK, anti-human-CD86-mAK und anti-human-CD14-mAK gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), der Mittelwert und die positive Standardabweichung ergaben sich aus 7 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001) wurde mit einem einfachen T-Test analysiert.

Als Positivkontrolle diente wiederum ein Ansatz, in welchem immature DC mithilfe eines reifungsinduzierenden Zytokincocktails aus 500ng LPS/ml, 50ng TNF $\alpha$ /ml und 10ng IL-1 $\beta$ /ml zu maturen DC generiert wurden. Als Negativkontrolle dienten mit 12,5ng/ml IL-6 behandelte DC. Die Ergebnisse zeigten, dass die Expression der Reifungsmarker CD83 und CD86 für die Positivkontrolle im Vergleich zu den unbehandelten, immaturen DC deutlich erhöht exprimiert wurden. Der Mittelwert für die Expression von CD83 lag bei  $246,67 \pm 37,41\%$  ( $p = 0.000$ ). Für die Expression von CD86 lag die MFI bei  $316,75 \pm 125,42\%$  ( $p = 0.001$ ). Die Expression des Oberflächenmarkers CD14 nahm trotz des Maturierungscoktails wie auch schon in den Versuchsreihen mit Iscador Qu spez $\text{\textcircled{R}}$  zu. Sie lag bei  $262,21 \pm 71,31\%$ . Betrachtet man die Expression aller drei Marker, kann zwar eine Reifungsinduktion der Zellen festgestellt werden, die Ergebnisse für den Oberflächenmarker CD14 sind allerdings auf diesem Hintergrund nur eingeschränkt beurteilbar.

Die Ergebnisse der Negativkontrolle entsprachen wiederum weitgehend den Ergebnissen der Negativkontrolle von Iscador Qu spez $\text{\textcircled{R}}$ . Es konnte festgestellt werden, dass die Expression der Oberflächenmarker CD83 und CD86 im Vergleich zur Kontrolle abnahm. Die Expression von CD83 lag im Vergleich zur Kontrolle bei  $86,87 \pm 8,74\%$  ( $p = 0.012$ ) und für den Oberflächenmarker CD86 bei  $59,96 \pm 16,15\%$  ( $p = 0.000$ ). Die Expression des Oberflächenmarkers CD14 stieg bei der Negativkontrolle hochsignifikant an ( $p = 0.007$ ) und lag bei  $148,22 \pm 32,47\%$ . Die Expression aller drei Oberflächenmarker zeigte eine Reifungsinhibition der DC durch die Zugabe von IL-6.

Auf der Basis der Zytotoxizitätsfärbung für das Präparat AbnobaViscum $\text{\textcircled{R}}$  Fraxini wurden die Konzentrationen 0,061 $\mu\text{g/ml}$ , 0,0305 $\mu\text{g/ml}$  und 0,015 $\mu\text{g/ml}$  ausgewählt, um den Einfluss des Präparates auf den Reifungszustand von DC zu untersuchen. Als Kontrolle diente ein lediglich mit IL-4 und GM-CSF behandelter Ansatz von DC. Die Inkubationszeit betrug für alle Ansätze drei Tage. Die Messergebnisse des Kontrollansatzes wurden auf 100% gesetzt. Es sollte untersucht werden, ob das Mistelpräparat AbnobaViscum $\text{\textcircled{R}}$  Fraxini eine reifungsinduzierende Wirkung auf DC hat und ob eine Dosisabhängigkeit vorliegt. Die Ergebnisse sind in Abb.17 dargestellt.



**Abb. 17: Auswirkung verschiedener Konzentrationen des Mistelpräparates AbnobaViscum® Fraxini auf den Reifungszustand Dendritischer Zellen:** Aus PBMC wurden durch CD14+-Selektion Monozyten aufgereinigt und mit GM-CSF und IL-4 zu Dendritischen Zellen (DC) kultiviert. Die Abbildung zeigt einerseits der Kontrolle dienende, nur mit den oben genannten Substanzen behandelte, immature Dendritische Zellen (iDC). Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Außerdem sind drei zusätzlich mit 0,06µg/ml, 0,03µg/ml und 0,015µg/ml AbnobaViscum® Fraxini behandelte Ansätze Dendritischer Zellen dargestellt. Die Inkubationszeit betrug drei Tage, anschließend wurden die DC mit fluoreszenzmarkierten anti-human-CD83-mAK, anti-human-CD86-mAK und anti-human-CD14-mAK gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), der Mittelwert und die positive Standardabweichung ergaben sich aus 7 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001) wurde mittels einfaktorieller ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test analysiert.

Insgesamt konnte festgestellt werden, dass ein reifungsinduzierender Effekt vorlag, der mit steigender Dosis zunahm. Für die geringste Konzentration war keine reifungsinduzierende Wirkung mehr festzustellen. Eine signifikante Dosisabhängigkeit lag nur für den Reifungsmarker CD83 vor (p = 0.02).

Die Expression des Reifungsmarkers CD83 lag für die höchste Konzentration von 0,061µg/ml bei 133,39 ± 15,16%, für eine Konzentration von 0,0305µg/ml bei 111,22 ± 8,44% und für 0,015µg/ml bei 98,13 ± 4,75%. Lediglich bezüglich der höchsten Konzentration war der Anstieg der MFI signifikant (p = 0.012).

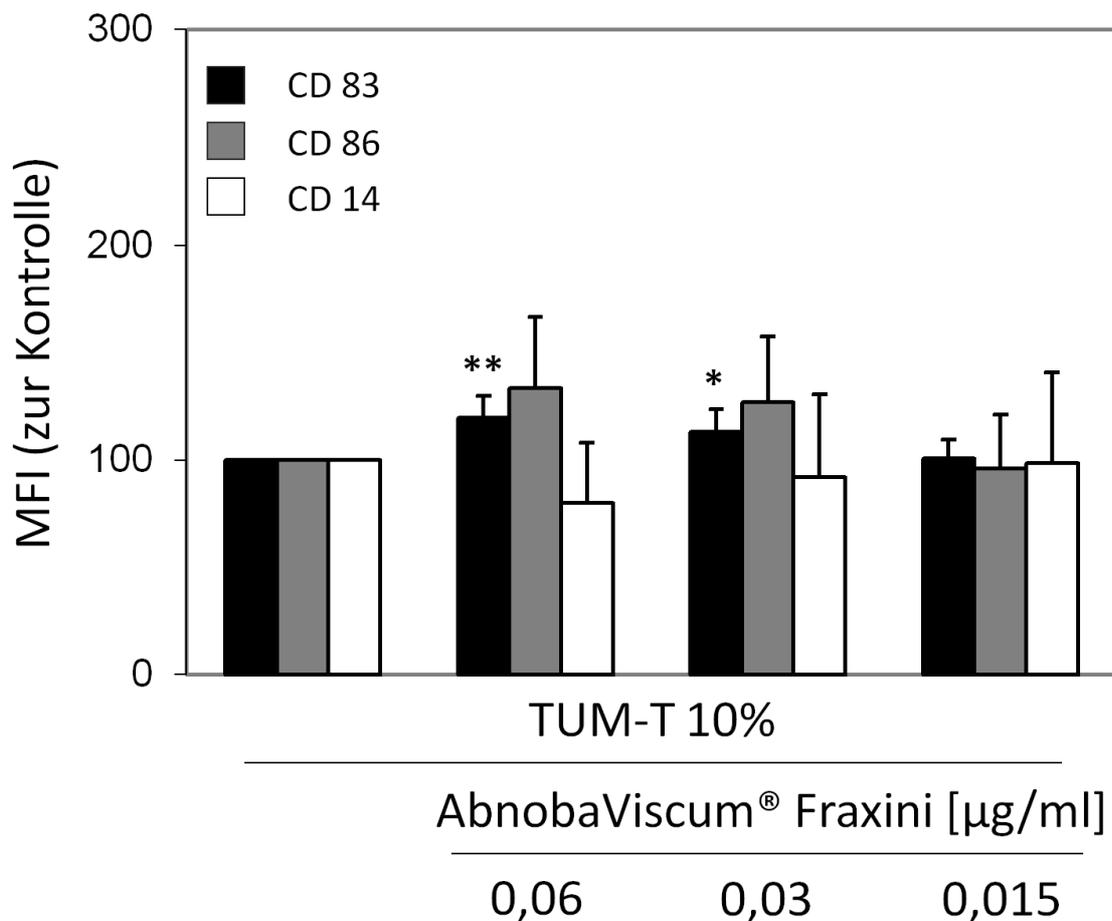
Die Expression des Reifungsmarkers CD86 lag für eine Konzentration von 0,061µg/ml bei  $180,57 \pm 44,8\%$ , für 0,0305µg/ml bei  $127,94 \pm 18,02\%$  und für 0,015µg/ml bei  $95,67 \pm 14,7\%$ . Bezüglich des Oberflächenmarkers CD14 betrug die MFI für die höchste Konzentration  $73,94 \pm 25,92\%$ , für eine Konzentration von 0,0305µg/ml lag sie bei  $79,9 \pm 19,65\%$  und für die niedrigste Konzentration von 0,015µg/ml lag die Expression bei  $85,76 \pm 13,35\%$ . Insgesamt wird deutlich, dass auch durch das Präparat AbnobaViscum® Fraxini eine Reifungsinduktion von DC möglich ist, auch wenn aufgrund geringerer Versuchszahlen die Werte teilweise nicht signifikant waren.

#### **4.8 Aufhebung der tumorinduzierten Reifungsinhibition durch verschiedene Konzentrationen von AbnobaViscum® Fraxini**

Neben der alleinigen Wirkung von AbnobaViscum® Fraxini auf DC sollte auch untersucht werden, ob es möglich ist, mit dem Präparat die tumorinduzierte Reifungsinhibition aufzuheben.

Dazu wurden dieselben Tumorzellüberstände in den gleichen Konzentrationen verwendet, wie für die Versuchsreihe mit Iscador Qu spez®. Es wurde jeweils ein Kontrollansatz angefertigt, in welchem zu den immaturen DC nur der jeweilige Tumorzellüberstand gegeben wurde und außerdem drei Ansätze, in denen zusätzlich die drei unterschiedlichen Konzentrationen des Mistelpräparates hinzugefügt wurden.

Wurden die Zellen mit dem Überstand der Tumorzelllinie TUM-T in einer Konzentration von 10% sowie mit dem Mistelpräparat behandelt, waren für die Marker CD83 und CD86 dosisabhängige Effekte des Mistelpräparates bezüglich der Aufhebung der Reifungsinhibition zu erkennen. Die Dosisabhängigkeit war für den Marker CD83 höchstsignifikant ( $p = 0.000$ ) und für den Marker CD86 signifikant ( $p = 0.024$ ). Die Ergebnisse hierzu sind in Abb.18 dargestellt.



**Abb. 18: Wirkung verschiedener Konzentrationen von AbnobaViscum® Fraxini auf die tumorinduzierte Reifungsinhibition Dendritischer Zellen durch den Tumorzellüberstand TUM-T in 10%iger Konzentration:** Aus PBMC wurden durch CD14+-Selektion Monozyten aufgereinigt und mit GM-CSF und IL-4 zu Dendritischen Zellen (DC) kultiviert. Die Abbildung zeigt einen der Kontrolle dienenden Ansatz Dendritischer Zellen, welcher nur mit dem Tumorzellüberstand TUM-T in 10%iger Konzentration behandelt wurde. Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Daneben sind drei Ansätze Dendritischer Zellen dargestellt, welche zusätzlich noch mit 0,06µg/ml, 0,03µg/ml oder 0,015µg/ml AbnobaViscum® Fraxini behandelt wurden. Die Inkubationszeit betrug drei Tage, anschließend wurden die DC mit fluoreszenzmarkierten anti-human-CD83-mAK, anti-human-CD86-mAK und anti-human-CD14-mAK gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), der Mittelwert und die positive Standardabweichung ergaben sich aus 7 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001) wurde mittels einfaktorieller ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test analysiert.

Die MFI des Oberflächenmarkers CD83 lag für eine Konzentration des Mistelpräparates von 0,061µg/ml im Vergleich zur Kontrolle bei  $123,87 \pm 8,5\%$  ( $p = 0.001$ ). Für eine Konzentration von 0,0305µg/ml lag die MFI bei  $115,35 \pm 10\%$  ( $p = 0.019$ ). Für die niedrigste Konzentration von 0,015mg/ml war die MFI nicht signifikant erhöht und lag bei  $103,71 \pm 6,63\%$ .

Die MFI des Oberflächenmarkers CD86 stieg im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls an und lag für eine Konzentration von 0,061µg/ml bei  $147,2 \pm 26,72\%$ , für eine Konzentration von

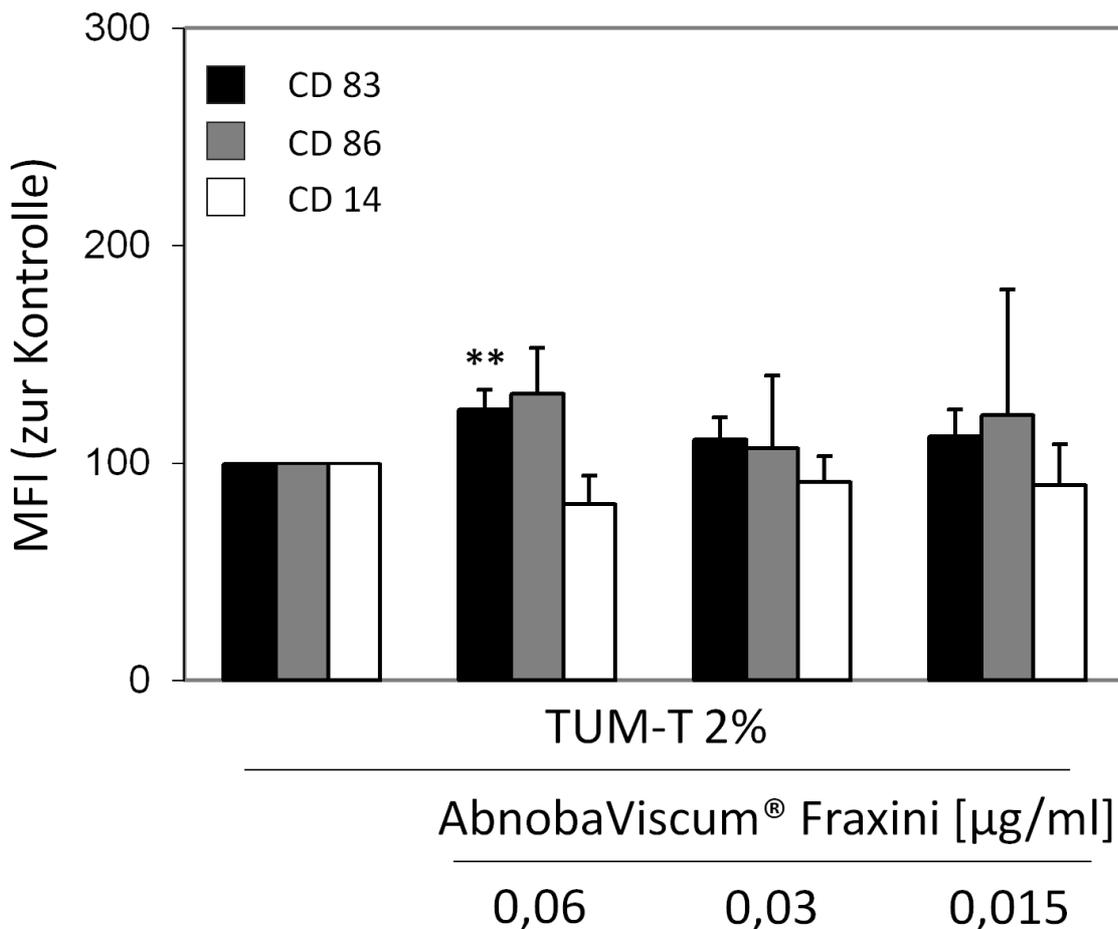
0,0305µg/ml bei  $129,44 \pm 28,31\%$  und für eine Konzentration von 0,015µg/ml bei  $106,96 \pm 20,61\%$ . Diese Unterschiede waren allerdings nicht signifikant. Die MFI des Oberflächenmarkers CD14 sank verglichen mit den Kontrollwerten, war aber nicht signifikant verändert. Sie lag für eine Konzentration von 0,061µg/ml bei  $71,64 \pm 28,75\%$ , für eine Konzentration von 0,0305µg/ml bei  $80,89 \pm 18,16\%$  und für eine Konzentration von 0,015µg/ml bei  $84,93 \pm 7,43\%$ .

Die Aufhebung der reifungshemmenden Wirkung des Tumorzellüberstandes TUM-T in 10% auf DC war also für die höchste verwendete Konzentration (0,061µg/ml) am ausgeprägtesten. Für eine Konzentration von 0,0305µg/ml waren noch leichte Effekte zu erkennen, die niedrigste Konzentration von 0,015µg/ml zeigte nur noch eine sehr geringe Wirkung.

Wurde der Tumorzellüberstand nur in einer Konzentration von 2% zu den Ansätzen gegeben, waren für alle verwendeten Konzentrationen des Mistelpräparates Effekte im Sinne einer Aufhebung der Reifungsinhibition zu erkennen, allerdings waren diese nicht streng dosisabhängig. Die Ergebnisse sind in Abb.19 dargestellt.

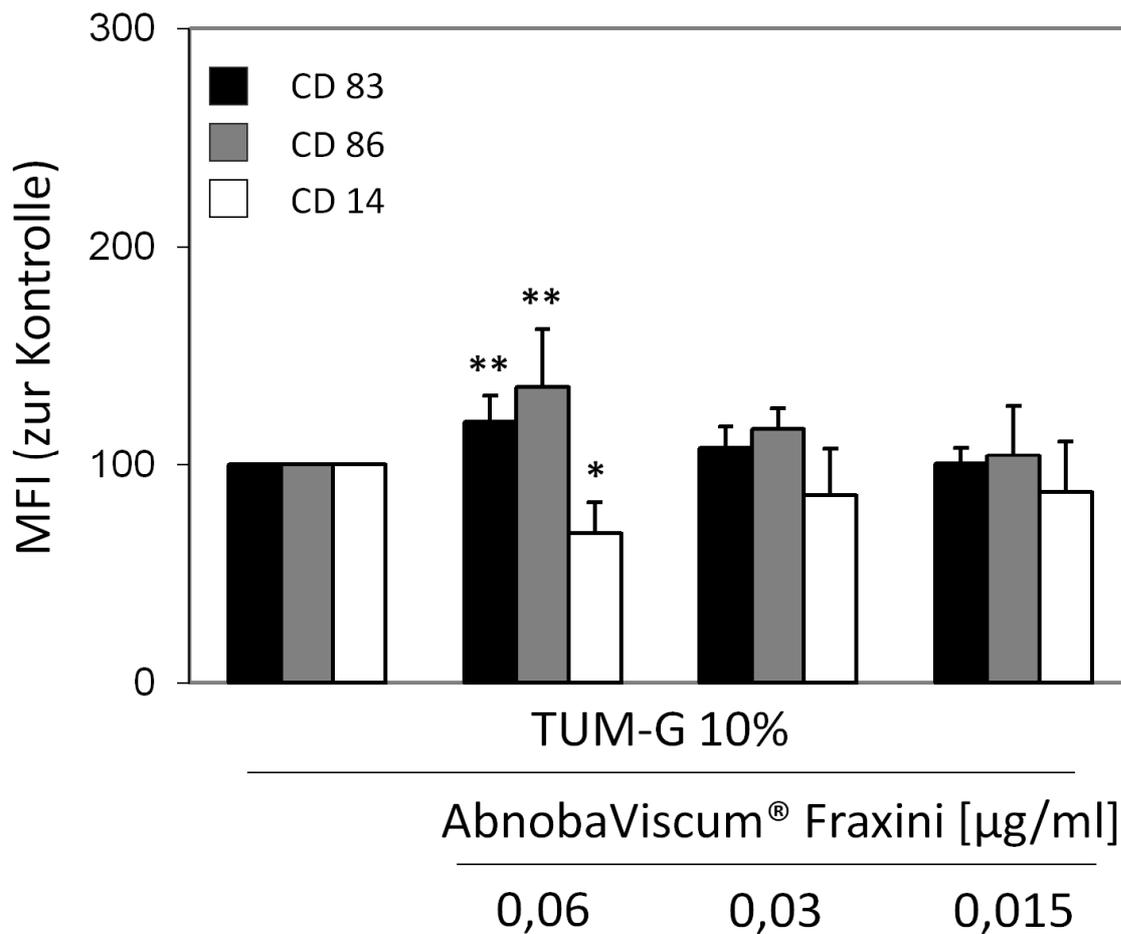
Die Expression des Oberflächenmarkers CD83 lag verglichen mit der Kontrolle für eine Konzentration des Mistelpräparates von 0,061µg/ml bei  $124,98 \pm 9,16\%$  ( $p = 0.001$ ). Für eine Konzentration von 0,0305µg/ml lag die Expression von CD83 bei  $111,18 \pm 9,91\%$  und für eine Konzentration von 0,015µg/ml bei  $112,74 \pm 12,05\%$  (jeweils nicht signifikant). Die Expression des Oberflächenmarkers CD86 stieg verglichen mit der unbehandelten Kontrolle ebenfalls an und lag für eine Konzentration von 0,061µg/ml bei  $132,11 \pm 21,24\%$ , für eine Konzentration von 0,0305µg/ml bei  $107,18 \pm 33,14\%$  und für eine Konzentration von 0,015µg/ml bei  $122,4 \pm 57,52\%$ . Die Unterschiede waren verglichen mit der Kontrolle nicht signifikant. Die Expression des Oberflächenmarkers CD14 sank für eine Konzentration von 0,061µg/ml auf  $80,96 \pm 13,08\%$ , für eine Konzentration von 0,0305µg/ml auf  $91,07 \pm 12,4\%$  und für eine Konzentration von 0,015µg/ml auf  $89,69 \pm 19,13\%$ .

Es ist zwar zu erkennen, dass die größten Effekte durch die höchste Konzentration von AbnobaViscum® Fraxini zu erzielen waren, eine signifikante Dosisabhängigkeit war aber nicht feststellbar.



**Abb. 19: Wirkung verschiedener Konzentrationen von AbnobaViscum® Fraxini auf die tumorinduzierte Reifungsinhibition Dendritischer Zellen durch den Tumorzellüberstand TUM-T in 2%iger Konzentration:** Aus PBMC wurden durch CD14+-Selektion Monozyten aufgereinigt und mit GM-CSF und IL-4 zu Dendritischen Zellen (DC) kultiviert. Die Abbildung zeigt einen der Kontrolle dienenden Ansatz Dendritischer Zellen, welcher nur mit dem Tumorzellüberstand TUM-T in 2%iger Konzentration behandelt wurde. Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Daneben sind drei Ansätze Dendritischer Zellen dargestellt, welche zusätzlich noch mit 0,06µg/ml, 0,03µg/ml oder 0,015µg/ml AbnobaViscum® Fraxini behandelt wurden. Die Inkubationszeit betrug drei Tage, anschließend wurden die DC mit fluoreszenzmarkierten anti-human-CD83-mAK, anti-human-CD86-mAK und anti-human-CD14-mAK gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), der Mittelwert und die positive Standardabweichung ergaben sich aus 5 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001) wurde mittels einfaktorieller ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test analysiert.

Bezüglich des Tumorzellüberstands der Tumorzelllinie TUM-G in einer Konzentration von 10% lag wieder eine strenge Dosisabhängigkeit vor. Diese war für den Oberflächenmarker CD83 hochsignifikant (p = 0,002) und für die Oberflächenmarker CD86 und CD14 signifikant (p = 0,013 und p = 0,044). Die Ergebnisse sind in Abb.20 dargestellt.



**Abb. 20: Wirkung verschiedener Konzentrationen von AbnobaViscum® Fraxini auf die tumorinduzierte Reifungsinhibition Dendritischer Zellen durch den Tumorzellüberstand TUM-G in 10%iger Konzentration:** Aus PBMC wurden durch CD14+-Selektion Monozyten aufgereinigt und mit GM-CSF und IL-4 zu Dendritischen Zellen (DC) kultiviert. Die Abbildung zeigt einen der Kontrolle dienenden Ansatz Dendritischer Zellen, welcher nur mit dem Tumorzellüberstand TUM-G in 10%iger Konzentration behandelt wurde. Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Daneben sind drei Ansätze Dendritischer Zellen dargestellt, welche zusätzlich noch mit 0,06µg/ml, 0,03µg/ml oder 0,015µg/ml AbnobaViscum® Fraxini behandelt wurden. Die Inkubationszeit betrug drei Tage, anschließend wurden die DC mit fluoreszenzmarkierten anti-human-CD83-mAK, anti-human-CD86-mAK und anti-human-CD14-mAK gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), der Mittelwert und die positive Standardabweichung ergaben sich aus 6 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001) wurde mittels einfaktorieller ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test analysiert.

Die MFI des Oberflächenmarkers CD83 lag für eine Konzentration von 0,061µg/ml bei 116,87 ± 11,04% (p = 0.002). Für eine Konzentration von 0,0305µg/ml lag die MFI bei 103,61 ± 5,77% und für eine Konzentration von 0,015µg/ml bei 96,47 ± 6,56%.

Für den Oberflächenmarker CD86 war die MFI für eine Konzentration von 0,061µg/ml ebenfalls hochsignifikant erhöht und lag bei 128,17 ± 29,16% (p = 0.008), für eine Konzentration von 0,0305µg/ml lag sie bei 114,56 ± 10,07% und für eine Konzentration von

0,015µg/ml bei  $98,02 \pm 23\%$ . Die MFI des Oberflächenmarkers CD14 sank für eine Konzentration von 0,061mg/ml verglichen mit der Kontrolle signifikant auf  $74,18 \pm 13,2\%$  ( $p = 0.015$ ), für eine Konzentration von 0,0305µg/ml auf  $81,51 \pm 20,99\%$  und für die niedrigste Konzentration von 0,015µg/ml auf  $82,47 \pm 15,15\%$ .

Für die 2%ige Konzentration des Tumorzellüberstandes fand sich nur für den CD83-Marker eine hochsignifikante Dosisabhängigkeit ( $p = 0.009$ ). Die Ergebnisse sind in Abb.21 dargestellt.

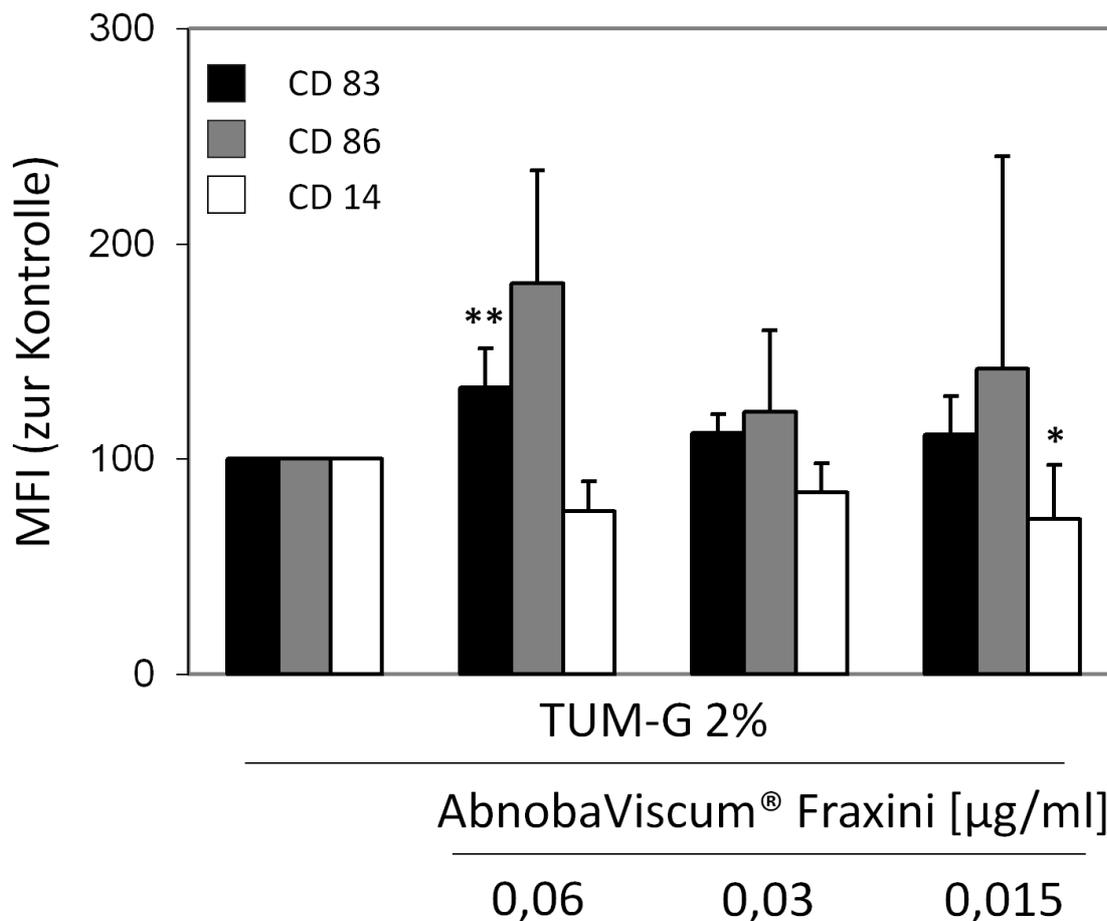
Die Expression des Oberflächenmarkers CD83 lag für die höchste Konzentration von AbnobaViscum® Fraxini von 0,061µg/ml bei  $133,03 \pm 20,67\%$  und war somit im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle hochsignifikant erhöht ( $p = 0.003$ ). Für eine Konzentration von 0,0305µg/ml lag sie bei  $109,73 \pm 6,87\%$  und für die niedrigste Konzentration von 0,015µg/ml bei  $113,29 \pm 20,34\%$ .

Die Expression des Oberflächenmarkers CD86 lag für eine Konzentration von 0,061µg/ml bei  $188,06 \pm 58,45\%$ , für eine Konzentration von 0,0305µg/ml bei  $119,31 \pm 42,95\%$  und für eine Konzentration von 0,015µg/ml bei  $154,06 \pm 109,45\%$ .

Die Expression des Oberflächenmarkers CD14 sank im Vergleich zur Kontrolle bei 0,061µg/ml auf  $77,15 \pm 15,44\%$ , bei einer Konzentration von 0,0305µg/ml auf  $79,48 \pm 8,7\%$  und bei einer Konzentration von 0,015µg/ml auf  $64,35 \pm 21,07\%$ , was einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle darstellte ( $p = 0.034$ ).

Ausgenommen den Oberflächenmarker CD14 lagen für die höchste Konzentration des Mistelpräparates die stärksten Effekte im Sinne einer Reifungsstimulierung der Zellen vor, es zeigte sich jedoch für alle verwendeten Konzentrationen eine gewisse reifungsstimulierende Wirkung.

Es kann festgestellt werden, dass eine Aufhebung der tumorinduzierten Reifungsinhibition durch AbnobaViscum® Fraxini möglich ist. Diese war für die höchste verwendete Konzentration des Präparates am effektivsten. Eine Dosisabhängig ließ sich nur teilweise feststellen, am deutlichsten war diese für den Reifungsmarker CD83 feststellbar.



**Abb. 21: Wirkung verschiedener Konzentrationen von AbnobaViscum® Fraxini auf die tumorinduzierte Reifungsinhibition Dendritischer Zellen durch den Tumorzellüberstand TUM-G in 2%iger Konzentration:** Aus PBMC wurden durch CD14+-Selektion Monozyten aufgereinigt und mit GM-CSF und IL-4 zu Dendritischen Zellen (DC) kultiviert. Die Abbildung zeigt einen der Kontrolle dienenden Ansatz Dendritischer Zellen, welcher nur mit dem Tumorzellüberstand TUM-G in 2%iger Konzentration behandelt wurde. Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Daneben sind drei Ansätze Dendritischer Zellen dargestellt, welche zusätzlich noch mit 0,06µg/ml, 0,03µg/ml oder 0,015µg/ml AbnobaViscum® Fraxini behandelt wurden. Die Inkubationszeit betrug drei Tage, anschließend wurden die DC mit fluoreszenzmarkierten anti-human-CD83-mAK, anti-human-CD86-mAK und anti-human-CD14-mAK gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), der Mittelwert und die positive Standardabweichung ergaben sich aus 5 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001) wurde mittels einfaktorieller ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test analysiert.

## **4.9 Einfluss unterschiedlich behandelter Dendritischer Zellen auf CD4+ T-Zellen in Co-Kultur**

Nachdem der Einfluss von Iscador Qu spez® und Tumorzellüberständen auf den Reifungszustand von DC einzeln und in Kombination untersucht worden war, sollten nun weitere Tests im Rahmen von Co-Kulturen durchgeführt werden. Die grundsätzliche Fragestellung war, ob DC, die vorher mit verschiedenen Substanzen behandelt worden waren, in Co-Kultur befindliche CD4+ T-Zellen auf unterschiedliche Weise in ihrer Proliferation und Zytokinsekretion beeinflussen würden.

### **4.9.1 Einfluss auf die Proliferationsrate der CD4+ T-Zellen**

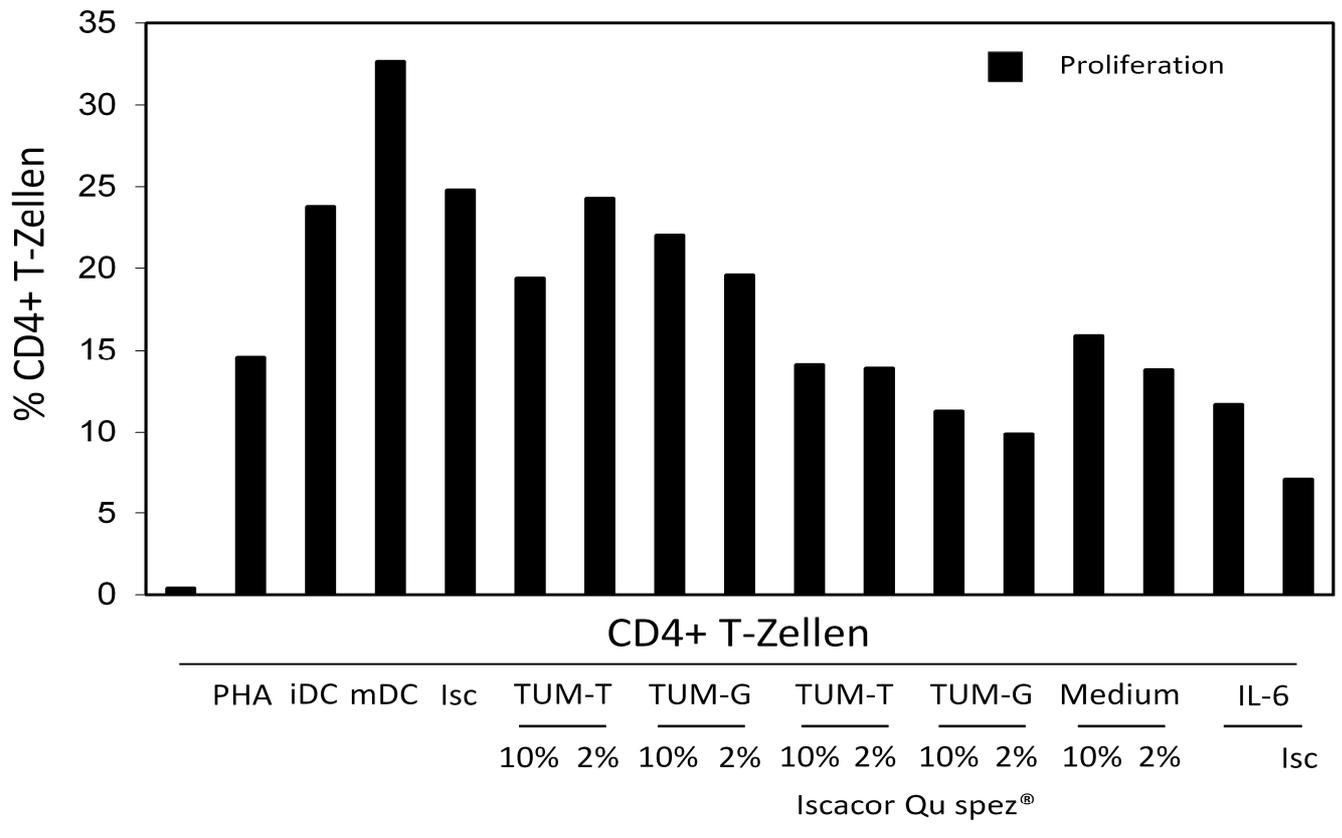
Bezüglich der Proliferationsrate der CD4+ T-Zellen war kein eindeutiges Muster zu erkennen, nach welchem die Stimulierung der Proliferation erfolgt. Die Ergebnisse sind in Abb. 22 dargestellt.

Während komplett unstimulierte CD4+ T-Zellen lediglich eine Proliferationsrate von 0,4% aufwiesen, lag diese bei mit PHA stimulierten Zellen bei 14,6%. Dies ist für mit PHA behandelte Zellen sehr gering, was darauf hinweist, dass eine Inkubation von fünf Tagen mit PHA zu lang sein könnte und die Zellen absterben.

Die Proliferationsrate der CD4+ T-Zellen, die sich mit unbehandelten DC in Co-Kultur befanden, lag bei 23,8%, also deutlich über der Proliferationsrate unstimulierter CD4+ T-Zellen.

Wurden die CD4+ T-Zellen mit maturen DC in Co-Kultur gegeben, lag die Proliferationsrate bei 32,7%, dem höchsten gemessenen Wert.

Mit Iscador Qu spez® behandelte DC bewirkten bei CD4+ T-Zellen eine Proliferationsrate von 24,8%. Dies entsprach in etwa dem Niveau der Zellen, die sich mit unbehandelten DC in Co-Kultur befunden hatten.



**Abb. 22: Einfluss unterschiedlich behandelter Dendritischer Zellen auf CD4+ T-Zellen in Co-Kultur:** Aus PBMC wurden durch CD14+-Selektion Monozyten aufgereinigt und mit GM-CSF und IL-4 zu Dendritischen Zellen (DC) kultiviert. Diese wurden entweder unbehandelt, also immatur (iDC) belassen, mittels 500ng LPS/ml, 50ng TNF $\alpha$ /ml und 10ng IL-1 $\beta$ /ml zu maturen DC (mDC) kultiviert, mit 0,25 $\mu$ g/ml Iscador Qu sapez® (Isc), mit Tumorzellüberständen (TUM-T und TUM-G in 10% und 2%) allein, mit Tumorzellüberständen und 0,25 $\mu$ g/ml Iscador Qu spez®, mit dem Kulturmedium der Tumorzellüberstände (10% und 2%), mit 12,5ng/ml IL-6 oder mit 12,5ng/ml IL-6 und 0,25 $\mu$ g/ml Iscador Qu spez® behandelt. Nach drei Tagen Inkubation wurden aus PBMC eines zweiten Spenders durch CD4+-Selektion CD4+ T-Zellen aufgereinigt und fünf Tage mit den unterschiedlich behandelten DC inkubiert. Außerdem wurde ein Ansatz der CD4+ T-Zellen mit dem Mitosestimulierenden PHA (Phytohemagglutinin-L) angesetzt, in welchem die CD4+-T-Zellen nicht mit DC co-kultiviert wurden. Anschließend wurden die CD4+ T-Zellen mit fluoreszenzmarkierten anti-human-CD4-mAK gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die Proliferationsrate der CD4+ T-Zellen eines Experimentes.

Die Werte der Proliferationsrate der CD4+ T-Zellen für die verschiedenen Tumorzellüberstände lagen bei ungefähr denselben Werten beziehungsweise etwas darunter. DC, die mit dem Überstand der Tumorzelllinie TUM-T in einer Konzentration von 10% behandelt wurden, bewirkten bei den CD4+ T-Zellen eine Proliferationsrate von 19,4%. Für denselben Tumorüberstand in einer Konzentration von 2% lag sie bei 24,3%.

Wurde der Überstand der Tumorzelllinie TUM-G in einer Konzentration von 10% verwendet, lag die Proliferationsrate der CD4+ Zellen bei 22% und für eine Konzentration von 2% bei 19,6%.

Wurden die DC zusätzlich zu den Tumorzellüberständen mit 0,25µg/ml Iscador Qu spez® behandelt, lagen die Proliferationsraten der CD4+ T-Zellen deutlich niedriger.

Für den Tumorzellüberstand TUM-T in einer Konzentration von 10% lag die Proliferationsrate bei 14,1% und in einer Konzentration von 2% bei 13,9%.

Wurden die DC zusätzlich zu dem Mistelpräparat mit dem Tumorzellüberstand TUM-G in einer Konzentration von 10% behandelt, lag die Proliferationsrate der CD4+ T-Zellen bei 11,3% und für eine Konzentration des Tumorzellüberstandes von 2% bei 9,9%.

Wurden die anschließend in Co-Kultur gegebenen DC vorher mit Kulturmedium inkubiert, lag die Proliferationsrate für eine Konzentration des Mediums von 10% bei 15,9% und für eine Konzentration von 2% bei 13,8%. Die Werte lagen also etwas niedriger als die Werte der mit Tumorzellüberständen behandelten Ansätze.

Mit 12,5ng/ml IL-6 versetzte DC bewirkten bei den CD4+ T-Zellen eine Proliferationsrate von 11,7%. Wurden außerdem 0,25µg/ml Iscador Qu spez® dazugegeben, lag sie bei 7,1%.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die Stimulierung der Proliferationsrate der CD4+ T-Zellen durch mit verschiedenen Substanzen behandelte DC keinem festen Schema folgt. Die stärkste Stimulierung wurde durch mature DC erreicht. Die Gabe des Mistelpräparates hatte in diesem Experiment keinen fördernden Einfluss auf die Proliferationsrate.

#### 4.9.2 Einfluss auf die Zytokinsekretion der CD4+ T-Zellen

Nachdem sich die CD4+ T-Zellen 24 Stunden mit unterschiedlich behandelten DC in Co-Kultur befunden hatten, wurden die abgenommenen Überstände auf die Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10 und TNF- $\alpha$  hin untersucht. Diese vier Zytokine werden unter anderem von T-Zellen sezerniert und sie spielen sowohl bei der Aktivierung, Inhibierung und Differenzierung von T-Zellen sowie anderen Immunzellen eine Rolle (Green et al., 2013; de Waal Malefyt et al., 1993).

Die Zytokinmessung ergab, dass kein Einfluss des Misteextrakts auf die Zytokinfreisetzung erkennbar ist. Die Ergebnisse weisen weder darauf hin, dass die Zytokinausschüttung gefördert, noch dass sie gehemmt wird.

Die Ergebnisse sind aus diesem Grund hier nicht dargestellt.

## 5. Diskussion

### 5.1 Zur Eignung der gewählten Methoden

Um den Reifungszustand von DC zu untersuchen wurden Oberflächenmoleküle (CD83, CD86, CD14) analysiert, deren Muster für immature beziehungsweise mature DC jeweils typisch ist (Elluru et al., 2008; Hubo et al., 2013; Prazma et al., 2007). Dass das System funktioniert, sollte anhand von Positiv- und Negativkontrollen nachgewiesen werden. Die spezifischen Reifungsmarker CD83 und CD86 stiegen bei den Positivkontrollen durch die Zugabe der reifungsinduzierenden Zytokine, wie anhand der Literatur zu erwarten, deutlich an. Die Expression von CD14 stieg unter Reifung der DC allerdings auch an, obwohl ihre Expression auf maturen DC geringer sein sollte als auf immaturen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Selektion der Monozyten aus PBMC durch CD14-Selektion diesen Marker schon von vorneherein aktiviert und er im Anschluss stärker exprimiert wird.

Beurteilt man den Reifungsgrad der maturen DC anhand einer Kombination der Expression der drei Marker, liegt dennoch eine deutliche Reifungsinduktion vor, da die Oberflächenmarker CD83 und CD86 sehr viel stärker ansteigen als CD14.

Aus diesen Gründen kann die Positivkontrolle als solche gewertet werden.

Die Negativkontrolle mit IL-6 hat bis auf wenige Ausnahmen bezüglich aller drei Oberflächenmarker funktioniert. Die Expression der beiden Reifungsmarker CD83 und CD86 hat verglichen mit der Kontrolle abgenommen und die Expression des Oberflächenmarkers CD14 ist angestiegen. Ausgewählt wurde IL-6, da es, wie in 4.4.2 beschrieben, neben anderen Stoffen von verschiedenen Tumorzelllinien sezerniert wird und als ein Mechanismus von Tumoren zur Hemmung des Immunsystems diskutiert wird (Oosterhoff et al., 2012; Sombroek et al., 2002). Durch die Untersuchung der drei Oberflächenmarker konnte gezeigt werden, dass IL-6 tatsächlich eine Reifungsinhibition von DC bewirkt.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass der Reifungszustand von DC in dem gewählten System beeinflussbar ist und durch Zugabe bestimmter Substanzen sowohl eine Induktion als auch eine Inhibition der Reifung möglich ist.

Es bleibt kritisch anzumerken, dass die reine Messung von Oberflächenmarkern noch keine Aussage darüber treffen kann, ob auch die Funktion der Zellen beeinflusst wird, sie also effektiver in ihrer Aktivierung von T-Zellen werden. Dies bliebe anhand von weiteren in vitro Funktionstests zu untersuchen.

## 5.2 Reifungsinduktion von Dendritischen Zellen durch die getesteten Mistelpräparate

Durch die Versuche konnte gezeigt werden, dass sowohl Iscador Qu spez® als auch AbnobaViscum® Fraxini bezüglich der gemessenen Oberflächenmarker einen reifungsinduzierenden Effekt auf DC ausüben.

Dieser Effekt ist sowohl abhängig von der Dosis als auch von der Dauer der Inkubationszeit. Für eine klinische Anwendung lässt sich daraus schließen, dass die erwartete Wirkung durch eine erhöhte Dosis eventuell verstärkt werden kann und dass entsprechende Effekte mit einer gewissen Verzögerung zu erwarten sind. Dies begründet sich aus der Erkenntnis, dass nach längerer Inkubationszeit größere Effekte zu erkennen sind. Beachtet werden sollte dabei, dass die Präparate ab einer bestimmten Dosis zytotoxisch wirken können und die Dosis deshalb nicht uneingeschränkt erhöht werden kann.

Eine in kurzen Abständen wiederholte Gabe hat in vitro keinen nennenswerten Vorteil gebracht. Eine erneute Gabe sollte also vielmehr nach Ablauf der Wirkdauer erfolgen, um den Effekt aufrecht zu erhalten. Wie lang der Effekt der Mistelpräparate anhält müsste in weiteren Experimenten untersucht werden. In Studien wird die Häufigkeit der Injektionen von Mistelpräparaten bei Patienten meist mit zwei bis drei Mal wöchentlich beschrieben (Augustin et al., 2005; Piao et al., 2004).

Vergleicht man die Wirkung von Iscador Qu spez® in einer Konzentration von  $0,25\mu\text{g}/\text{ml}$  mit den Ergebnissen der am stärksten wirkenden Konzentration von AbnobaViscum® Fraxini,  $0,06\mu\text{g}/\text{ml}$ , sind beide Präparate ungefähr gleichwertig, obwohl die Konzentration von AbnobaViscum® Fraxini deutlich unter der von Iscador Qu spez® liegt. Die maximale MFI des Oberflächenmarkers CD83 ist fast identisch, sie beträgt  $130,54 \pm 20,92\%$  für Iscador Qu spez® und  $133,39 \pm 15,16\%$  für AbnobaViscum® Fraxini, die maximale MFI des Oberflächenmarkers CD86 liegt für Iscador Qu spez® mit  $202,11 \pm 97,55\%$  etwas höher als der entsprechende Wert für AbnobaViscum® Fraxini, welcher  $180,57 \pm 44,8\%$  beträgt. Die Messwerte für den Oberflächenmarker CD14 sind für AbnobaViscum® Fraxini mit  $73,94 \pm 25,92\%$  etwas niedriger, für Iscador Qu spez® liegt der Wert bei  $96,69 \pm 24,73\%$ . Dies würde gut dazu passen, dass die Wirkung durch einen in beiden Präparaten vorhandenen Inhaltsstoff, wie zum Beispiel die Mistellektine, zurückzuführen ist. Mistellektine sind für die meisten bekannten immunologischen Effekte von Mistelpräparaten verantwortlich (Hajtó et al., 2011), wirken aber schon in Konzentrationen im unteren  $\mu\text{g}$ -Bereich zytotoxisch (Kelter et al.,

2007). In AbnobaViscum® Fraxini ist der Mistellektingehalt deutlich höher als in Iscador Qu spez®, der Lektingehalt von Iscador Qu spez 5 mg beträgt 74ng/mg Pflanzenextrakt, während AbnobaViscum® Fraxini 470ng Lektin/mg Pflanzenextrakt enthält. Die am stärksten auf DC wirkende, nicht zytotoxische Dosis ist bei AbnobaViscum® Fraxini daher geringer als bei Iscador Qu spez®. Ob die Wirkung der Mistelpräparate auf DC durch Mistellektine oder andere Inhaltsstoffe wie die Viscotoxine bedingt ist, würde sich durch Wiederholung der Experimente unter Verwendung spezifischer Mistellektin- bzw Viscotoxinantikörper nachweisen lassen, was zukünftigen Untersuchungen vorbehalten bleibt. Endotoxine, die prinzipiell eine starke Immunstimulation bewirken und in pflanzlichen Präparaten häufig nachweisbar sind (Becker et al., 1988), können als Ursache für die gefundenen Effekte weitgehend ausgeschlossen werden. Zwar findet sich in Iscador Qu spez® eine geringe Konzentration an Endotoxin (Becker, 1988), AbnobaViscum® Fraxini ist jedoch praktisch frei von Endotoxinen (Scheer, 1993).

Bisher wurde der Einfluss eines Mistelpräparates auf die Aktivierung und Reifung Dendritischer Zellen noch in zwei weiteren Studien untersucht. Stein et al. konnten einen Einfluss des Mistelpräparates Helixor® Mali auf die Aktivierung von DC feststellen (Stein et al., 2002). Die Inkubationszeit war mit 5-6 Tagen länger als in dem für diese Arbeit verwendeten Modell (drei Tage) und die Konzentration des Mistelpräparates lag bei 0,1µg/ml, 1µg/ml und 10µg/ml. Es wurden unterschiedliche Experimente durchgeführt, unter anderem mit gereinigtem Mistellektin. Der Versuchsansatz, der den Versuchen in dieser Arbeit von der Grundidee her entspricht, zeigte einen signifikanten Einfluss lediglich auf den Oberflächenmarker CD83. Die Konzentration, die zu einem signifikanten Anstieg dieses Markers führte, lag mit 10µg/ml deutlich über der in dieser Arbeit verwendeten Konzentration von 0,25µg/ml. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei Iscador Qu spez® um ein in Bezug auf DC stärker wirkendes Präparat als Helixor® Mali handelt. Entsprechend der Arbeit von Stein et al. war auch in der vorliegenden Arbeit der Effekt der verschiedenen Präparate am deutlichsten am Oberflächenmarker CD83 zu erkennen.

In der Arbeit von Elluru et al., in der wie in der vorliegenden Arbeit das Mistelpräparat Iscador Qu spez® verwendet wurde, konnte ebenfalls ein Effekt auf die Reifung von DC festgestellt werden (Elluru et al., 2008). Es wurde eine dosisabhängige Induzierung der Oberflächenmarker CD86 und CD80 gezeigt. Einen signifikanten Einfluss auf den Oberflächenmarker CD83 konnten Elluru et al. im Unterschied zu der vorliegenden Arbeit nicht feststellen. Ein Unterschied zu den in der vorliegenden Arbeit dargestellten

Versuchsansätzen war, dass das Mistelpräparat erst nach vier Tagen Inkubation für weitere zwei Tage zu den unreifen DC gegeben wurde. Außerdem wurden deutlich höhere Konzentrationen verwendet. Sie lagen bei 5, 10 und 15 µg/ml, Konzentrationen, die bei den für diese Arbeit durchgeführten Messungen zytotoxisch waren. Es stellt sich die Frage, ob der Versuchsansatz von Ellrulu et al. auch in niedrigeren, nicht mehr toxischen Konzentrationen von Iscador Qu spez® noch Effekte des Mistelpräparates auf den Reifungszustand von DC gezeigt hätte. Wichtig ist jedoch, dass insgesamt auch bei Ellrulu et al. eine Induktion von Reifungsmarkern auf DC durch das Mistelpräparat festgestellt werden konnte.

### **5.3 Reifungsinhibition von Dendritischen Zellen durch Tumorzellüberstände**

Die dreitägige Inkubation der DC mit den Tumorzellüberständen bewirkte eine eindeutige Reifungsinhibition der Zellen in Bezug auf die Expression der Oberflächenantigene. Durch den Vergleich mit der reinen Wirkung des Kulturmediums der Tumorzellen kann sicher gesagt werden, dass die reifungsinhibierenden Effekte auf die Tumorzellüberstände zurückzuführen sind. Vergleicht man die zwei verwendeten Konzentrationen, zeigt sich, dass der reifungshemmende Effekt der Tumorzellüberstände dosisabhängig ist. Die Arbeitsgruppe von C. Menetrier-Caux in Lyon, welche die gleichen Tumorzellen zur Herstellung von Tumorzellüberständen verwendet hat und ebenfalls den Effekt dieser Überstände auf DC untersucht hat, kam anhand der Messung von Oberflächenmarkern gleichermaßen zu dem Ergebnis, dass die Reifung der DC durch die Tumorzellüberstände gehemmt wird (Menetrier-Caux et al., 1998). Die von C. Menetrier-Caux et al. verwendete Konzentration des Tumorüberstandes betrug 10%. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls eine Konzentration von 10% verwendet, zusätzlich aber noch eine Konzentration von 2%. Auch in 2%igen Konzentration konnten noch entsprechende Effekte gezeigt werden, allerdings weniger stark ausgeprägt als in der höheren Konzentration. Eine geringere Menge der von den Tumorzellen sezernierten Substanzen scheint also auch einen geringeren Effekt auf DC zu haben. Es bliebe herauszufinden, ob sich dies auch im menschlichen Körper widerspiegelt, also eine geringere Tumormasse auch einen weniger starken Effekt auf die Funktion von DC hätte als eine größere Tumormasse der gleichen Entität.

Da es sich bei DC um die wichtigsten Antigenpräsentierenden Zellen des menschlichen Immunsystems handelt, ist die Hemmung derselben entscheidend für Tumorzellen, der

Bekämpfung durch das Immunsystem zu entgehen. Es gibt Studien, in denen bereits Tumorzellvakzine mit DC erprobt wurden (Brunner et al., 2000; Schnurr et al.).

#### **5.4 Aufhebbarkeit der tumorinduzierten Reifungsinhibition durch die getesteten Mistelpräparate**

Um der Immunsuppression durch den Tumor entgegenzuwirken, ist es entscheidend, Substanzen zu finden, die diese wieder aufheben.

Aus den Versuchen, die mit den Mistelpräparaten und den Tumorzellüberständen einzeln durchgeführt wurden, wird deutlich, dass die Gabe der Mistelpräparate die Expression der Oberflächenmarker genau entgegengesetzt den Tumorzellüberständen beeinflusst.

Die immunsuppressiven Effekte der Tumorzellüberstände können durch die zusätzliche Gabe der Mistelpräparate revidiert werden. Die Beeinflussung der tumorinduzierten Reifungsinhibition durch Mistelpräparate wurde in dieser Arbeit erstmalig untersucht. Der Effekt der Mistelpräparate ist zeitabhängig. Nur bei früher Gabe gleichzeitig zum Tumorzellüberstand fand sich eine Wirkung. Die Wirkung konnte durch wiederholte Gabe des Mistelpräparates nicht gesteigert werden. Der stimulierende Einfluss der Mistelpräparate kann sich also nur bei weitgehend intakten DC auswirken. Bei einer spezifischen Immunstimulation, wie sie zum Beispiel für Ipilimumab am CTLA-4 Rezeptor nachgewiesen wurde (Buchbinder and McDermott, 2015; Lindsay et al., 2015), könnte man erwarten, dass diese auch noch nach der Immunsuppression stattfindet. Da die Wirkung des Mistelpräparates nur bei gleichzeitiger Gabe mit dem immunsuppressiven Tumorzellüberstand nachweisbar war, handelt es sich hier möglicherweise um einen eher unspezifischen Effekt durch Aktivierung der DC insgesamt. Überträgt man diese Erkenntnisse auf die klinische Situation, bedeutet dies, dass Mistelpräparate umso effektiver wirken sollten, je früher sie angewendet werden.

## 5.5 Wirkung mit Mistelextrakt oder Tumorzellüberstand behandelte Dendritische Zellen auf CD4+ T-Zellen in Co-Kultur

Sowohl die Messung der Proliferationsrate der CD4-Zellen, als auch die Analyse der von den CD4+ T-Zellen sezernierten Zytokine ergaben kein Ergebnis, welches darauf hindeuten würde, dass DC, die vorher mit unterschiedlichen Substanzen behandelt wurden, CD4+ T-Zellen dann auch auf unterschiedliche Weise beeinflussen würden.

Es stellt sich die Frage, ob der unterschiedliche Reifungsgrad der DC, der vorher durchflusszytometrisch ermittelt wurde, tatsächlich keinen Einfluss auf deren Potenz, T-Zellen zu aktivieren, hat oder ob die Methode, mit der die Co-Kultur angelegt wurde, ungeeignet war, um die Fragestellung zu beantworten.

Ein möglicher Ansatz, das System zu optimieren, wäre, die DC und die CD4+ T-Zellen aus PBMCs des gleichen Spenders zu gewinnen. Es ist vorstellbar, dass die Interaktion der Zellen dadurch verändert wird, dass sie von unterschiedlichen Spendern stammen und eine optimale Aktivierung der T-Zellen nur durch autologe DC möglich ist. Diese Frage wäre durch entsprechende Versuche weiter zu klären.

Außerdem sollte getestet werden, ob eindeutigere Ergebnisse durch eine Veränderung der weiteren Rahmenbedingungen, wie beispielsweise die Inkubationszeit, erzielt werden können.

Es zeigte sich, dass die Proliferation der T-Zellen sogar stärker war, wenn nur Tumorzellüberstand zu den DC gegeben worden war, als wenn die DC mit Tumorzellüberstand und Mistelpräparat inkubiert worden waren. Und das, obwohl die durchflusszytometrische Analyse ergab, dass die zusätzlich mit Mistel behandelten DC reifer waren als diejenigen, die nur mit Tumorzellüberstand behandelt worden waren. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Viabilität der DC mit zunehmendem Reifungsgrad abnimmt und unreife Zellen noch ein stärkeres Aktivitätspotenzial haben, da ihre Entwicklung noch nicht abgeschlossen ist. Gegen diese Hypothese spricht, dass die in diesem Experiment zu maturaen DC generierten Monozyten das größte proliferationsinduzierende Potenzial hatten. Die Wirkung von mit Mistelextrakt oder Tumorzellüberstand behandelten DC auf CD4+ T-Zellen in Co-Kultur kann durch die vorliegende Arbeit noch nicht abschließend beantwortet werden.

## 5.6 Klinische Anwendbarkeit und Ausblick

Mistelpräparate werden bei vielen Krebspatienten als ergänzende Therapie angewandt (Kienle and Kiene, 2003).

Das bessere Verständnis des Wirkmechanismus dieser Präparate trägt dazu bei, die Therapie für Patienten zu optimieren und die Patienten zu finden, die von einer Misteltherapie profitieren könnten.

Zwar kann anhand der Ergebnisse dieser Arbeit keine genaue Aussage darüber getroffen werden, inwiefern DC im menschlichen Körper und im Wechselspiel mit vielen anderen Faktoren, die so *in vitro* nicht genau nachgeahmt werden können, durch die Gabe eines Mistelpräparates beeinflusst werden. Aber sie können als Baustein dienen, um die Wirkung der Mistelpräparate auf das menschliche Immunsystem besser zu verstehen.

Zum einen konnte festgestellt werden, dass eine frühe Gabe mit entsprechend längerer Inkubationszeit zumindest *in vitro* einen Vorteil bringt. Zum anderen scheint eine additive Gabe in kurzen Abständen die Wirkung *in vitro* nicht zu beeinflussen. Ob diese Ergebnisse aber direkt auch auf die Klinik übertragen werden können, bliebe mittels *in vivo* Testungen weiter zu untersuchen und ist unter Umständen nicht zu generalisieren. Vielmehr muss für jeden einzelnen Patienten eine individuelle Tumorthherapie gefunden werden. Schon bei den hier dargestellten Versuchen, die jeweils mit DC unterschiedlicher Spender durchgeführt wurden, zeigte sich eine starke Variabilität. Die Messwerte schwankten zum Teil deutlich, was sich in den teils stark um den Mittelwert schwankenden Standardabweichungen ausdrückt und was darauf zurückzuführen ist, dass jeder Spender eine eigene Grundkonstitution, eine individuelle Effektivität seines Immunsystems und eine individuelle Ansprechrate auf Immunmodulatoren mitbringt.

Während die durchgeführten Versuche die zu Anfang aufgeworfene Fragestellung in zufriedenstellendem Maße beantworten konnten, haben die Erkenntnisse, die erzielt wurden, natürlich weitere Fragen aufgeworfen.

Ein Punkt, der genauer untersucht werden sollte, wäre die Wirkung der einzelnen Bestandteile der Mistelpräparate auf die schon untersuchten Parameter. Dadurch könnte Klarheit darüber erreicht werden, welche Substanz oder Substanzen die Wirkung des Präparates ausmachen und ob es eventuell möglich und sinnvoll wäre, Phytopharmaka aus allein diesen Substanzen herzustellen. Nebenwirkungen anderer enthaltener, aber nicht an der Wirkung beteiligter Substanzen, könnten so minimiert werden.

Auch die genaue Zusammensetzung der Tumorzellüberstände sollte weiter aufgeklärt werden. Genauere Kenntnisse über die Hemmung des Immunsystems durch Tumoren könnten neue Ideen dazu, wie diese Hemmung reduziert werden könnte, erbringen.

Außerdem sollten weitere modifizierte Versuche mit Co-Kulturen durchgeführt werden. Nur wenn nachgewiesen werden kann, dass tatsächlich die Aktivität und Potenz der DC durch die Mistel beeinflusst werden können, liegt eine relevante Beeinflussung der Zellen vor. Die Co-Kulturen sollten mit DC und T-Zellen des gleichen Spenders angelegt werden, um möglichst realistische Bedingungen zu schaffen.

Eine weitere Option zur Optimierung des Versuchsaufbaus wäre die Verwendung serumhaltigen Mediums. Somit könnte man in dem vorliegenden Modell möglichst nahe an natürliche Bedingungen herankommen und neue Ansätze für Therapieverbesserungen finden. Insgesamt kann die vorliegende Arbeit als Baustein betrachtet werden, die Krebstherapie weiter zu entwickeln. Die Beantwortung anfangs formulierter Fragestellungen hat neue Fragen und Hypothesen aufgeworfen, deren Erforschung entscheidend für die Erreichung dieses Ziels ist.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen presenting cells
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CD4	Cluster of differentiation 4
CD14	Cluster of differentiation 14
CD80	Cluster of differentiation 80
CD83	Cluster of differentiation 83
CD86	Cluster of differentiation 86
CFSE	Carboxyfluorescein diacetate succinimidylester
CPT	Camptothecin
DC	Dendritische Zellen
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
g	Earth's gravitational force
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
iDC	immature Dendritische Zellen
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 beta
IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
LPS	Lipopolysaccharid
mAK	monoklonale Antikörper
mDC	mature Dendritische Zellen
MFI	Mean Fluorescence Intensity/Mittlere Fluoreszenzintensität

mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
ml	Milliliter
ng	Nanogramm
PBMC	Peripher Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PGE <sub>2</sub>	Prostagliandin E2
PHA	Phytohemagglutinin-L
p	p-Wert
PI	Propidiumjodid
RPMI	RPMI 1640
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
$\mu$ g	Mikrogramm
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

## 7. Literaturverzeichnis

- Augustin, M., Bock, P.R., Hanisch, J., Karasmann, M., and Schneider, B. (2005). Safety and efficacy of the long-term adjuvant treatment of primary intermediate- to high-risk malignant melanoma (UICC/AJCC stage II and III) with a standardized fermented European mistletoe (*Viscum album* L.) extract. Results from a multicenter, comparative, epidemiological cohort study in Germany and Switzerland. *Arzneimittelforschung*. 55, 38–49.
- Becker, H. (1988). [Echinoderms and their toxins]. *Pharm. Unserer Zeit* 17, 145–153.
- Becker, K.-P., Ditter, B., Nimsky, C., Urbaschek, R., and Urbaschek, B. (1988). Untersuchungen zum Endotoxingehalt von Phytopharmaka: Korrelation zu klinisch beobachteten Nebenwirkungen Endotoxin contents of phytopharmaceuticals (plant-derived drugs): correlations with clinically observed side effects (© Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York).
- Brunner, C., Seiderer, J., Schlamp, A., Bidlingmaier, M., Eigler, A., Haimerl, W., Lehr, H.-A., Krieg, A.M., Hartmann, G., and Endres, S. (2000). Enhanced Dendritic Cell Maturation by TNF- $\alpha$  or Cytidine-Phosphate-Guanosine DNA Drives T Cell Activation In Vitro and Therapeutic Anti-Tumor Immune Responses In Vivo. *J. Immunol.* 165, 6278–6286.
- Buchbinder, E.I., and McDermott, D.F. (2015). Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4 Blockade in Melanoma. *Clin. Ther.* 37, 755-763
- Büssing, A. (2000). Mistletoe: The Genus *Viscum*, Medicinal and Aromatic Plants--Industrial Profiles (Harwood Academic), Amsterdam
- Calzascia, T., Pellegrini, M., Hall, H., Sabbagh, L., Ono, N., Elford, A.R., Mak, T.W., and Ohashi, P.S. (2007). TNF- $\alpha$  is critical for antitumor but not antiviral T cell immunity in mice. *J. Clin. Invest.* 117, 3833–3845.
- Chapuis, F., Rosenzweig, M., Yagello, M., Ekman, M., Biberfeld, P., and Gluckman, J.C. (1997). Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur. J. Immunol.* 27, 431–441.
- Cross, M.J., and Claesson-Welsh, L. (2001). FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 201–207.
- Dauer, M., Obermaier, B., Herten, J., Haerle, C., Pohl, K., Rothenfusser, S., Schnurr, M., Endres, S., and Eigler, A. (2003). Mature Dendritic Cells Derived from Human Monocytes Within 48 Hours: A Novel Strategy for Dendritic Cell Differentiation from Blood Precursors. *J. Immunol.* 170, 4069–4076.
- Desbois, M., Champiat, S., and Chaput, N. (2015). [Breaking immune tolerance in cancer]. *Bull. Cancer (Paris)* 102, 34–52.
- Deutsches Krebsforschungszentrum (2013). Krebsstatistiken. <https://www.krebsinformationsdienst.de/grundlagen/krebsstatistiken.php#inhalt5> zugegriffen am 26.04.2015.
- De Waal Malefyt, R., Yssel, H., and de Vries, J.E. (1993). Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 150, 4754–4765.

- Duffy, A.M., Bouchier-Hayes, D.J., and Harmey, J.H. (2004). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Role in Non-Endothelial Cells: Autocrine Signalling by VEGF, in *VEGF and Cancer*, Landes Bioscience, 133-144
- Elluru, S.R., Duong van Huyen, J.-P., Delignat, S., Kazatchkine, M.D., Friboulet, A., Kaveri, S.V., and Bayry, J. (2008). Induction of maturation and activation of human dendritic cells: a mechanism underlying the beneficial effect of *Viscum album* as complimentary therapy in cancer. *BMC Cancer* 8, 161.
- Franz, H. (1986). Mistletoe lectins and their A and B chains. *Oncology* 43 *Suppl* 1, 23–34.
- Franz, H. (1990). 100 Jahre Lektinforschung - eine Bilanz. *Naturwissenschaften* 103–109.
- Franz, H. (1991). Mistletoe Lectins (2). *Adv. Lectin Res.* 4, 33–50.
- Gabrilovich, D.I., Chen, H.L., Girgis, K.R., Cunningham, H.T., Meny, G.M., Nadaf, S., Kavanaugh, D., and Carbone, D.P. (1996). Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat. Med.* 2, 1096–1103.
- Green, A.M., DiFazio, R., and Flynn, J.L. (2013). IFN- $\gamma$  from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 190, 270–277.
- Hajtó, T., Fodor, K., Perjési, P., and Németh, P. (2011). Difficulties and perspectives of immunomodulatory therapy with mistletoe lectins and standardized mistletoe extracts in evidence-based medicine. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2011, 298972.
- Horneber, M.A., Bueschel, G., Huber, R., Linde, K., and Rostock, M. (2008). Mistletoe therapy in oncology. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD003297.
- Huber, R., Rostock, M., Goedl, R., Lüdtke, R., Urech, K., Buck, S., and Klein, R. (2005). Mistletoe treatment induces GM-CSF- and IL-5 production by PBMC and increases blood granulocyte- and eosinophil counts: a placebo controlled randomized study in healthy subjects. *Eur. J. Med. Res.* 10, 411–418.
- Hubo, M., Trinschek, B., Kryczanowsky, F., Tuettenberg, A., Steinbrink, K., and Jonuleit, H. (2013). Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Front. Immunol.* 4, 82.
- Kalinski, P. (2012). Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 188, 21–28.
- Kaufmann, S.H.E. (2014). *Basiswissen Immunologie* (Berlin: Springer).
- Kelter, G., Schierholz, J.M., Fischer, I.U., and Fiebig, H.-H. (2007). Cytotoxic activity and absence of tumor growth stimulation of standardized mistletoe extracts in human tumor models in vitro. *Anticancer Res.* 27, 223–233.
- Kienle, G.S., and Kiene, H. (2003). *Die Mistel in der Onkologie: Fakten und konzeptionelle Grundlagen* (Schattauer).

- Kim, K.-C., Yook, J.-H., Eisenbraun, J., Kim, B.-S., and Huber, R. (2012). Quality of life, immunomodulation and safety of adjuvant mistletoe treatment in patients with gastric carcinoma - a randomized, controlled pilot study. *BMC Complement. Altern. Med.* *12*, 172.
- Lechmann, M., Berchtold, S., Hauber, J., and Steinkasserer, A. (2002a). CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends Immunol.* *23*, 273–275.
- Lechmann, M., Zinser, E., Golka, A., and Steinkasserer, A. (2002b). Role of CD83 in the immunomodulation of dendritic cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *129*, 113–118.
- Lindsay, C.R., Spiliopoulou, P., and Waterston, A. (2015). Blinded by the light: why the treatment of metastatic melanoma has created a new paradigm for the management of cancer. *Ther. Adv. Med. Oncol.* *7*, 107–121.
- Liu, Z., and Roche, P.A. (2015). Macropinocytosis in phagocytes: regulation of MHC class-II-restricted antigen presentation in dendritic cells. *Front. Physiol.* *6*, 1.
- Menetrier-Caux, C., Montmain, G., Dieu, M.C., Bain, C., Favrot, M.C., Caux, C., and Blay, J.Y. (1998). Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* *92*, 4778–4791.
- Murphy, K. (2012). *Janeway's Immunobiology* (Garland Science).
- Oosterhoff, D., Lougheed, S., van de Ven, R., Lindenberg, J., van Crujisen, H., Hiddingh, L., Kroon, J., van den Eertwegh, A.J.M., Hangalapura, B., Scheper, R.J., et al. (2012). Tumor-mediated inhibition of human dendritic cell differentiation and function is consistently counteracted by combined p38 MAPK and STAT3 inhibition. *Oncoimmunology* *1*, 649–658.
- Piao, B.K., Wang, Y.X., Xie, G.R., Mansmann, U., Matthes, H., Beuth, J., and Lin, H.S. (2004). Impact of complementary mistletoe extract treatment on quality of life in breast, ovarian and non-small cell lung cancer patients. A prospective randomized controlled clinical trial. *Anticancer Res.* *24*, 303–309.
- Prazma, C.M., Yazawa, N., Fujimoto, Y., Fujimoto, M., and Tedder, T.F. (2007). CD83 expression is a sensitive marker of activation required for B cell and CD4+ T cell longevity in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *179*, 4550–4562.
- Rini, B. (2014). Future approaches in immunotherapy. *Semin. Oncol.* *41 Suppl 5*, S30–40.
- RKI, Zentrum für Krebsregisterdaten (2015). RKI - Krebs gesamt. [http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Krebs\\_gesamt/krebs\\_gesamt\\_node.html](http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Krebs_gesamt/krebs_gesamt_node.html) zugegriffen am 26.04.2015.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* *179*, 1109–1118.
- Samtleben, R., Kiefer, M., and Luther, P. (1985). Characterization of the different lectins from *Viscum album* (mistletoe) and their structural relationships with the agglutinins from *Abrus precatorius* and *Ricinus communis*. (Walter de Gruyter & Co., Berlin, New York).

- Santin, A.D., Hermonat, P.L., Ravaggi, A., Chiriva-Internati, M., Cannon, M.J., Hiserodt, J.C., Pecorelli, S., and Parham, G.P. (1999). Expression of surface antigens during the differentiation of human dendritic cells vs macrophages from blood monocytes in vitro. *Immunobiology* 200, 187–204.
- Scheer, R. (1993). [The effect of mistletoe lectins on the limulus ameocyte lysate test]. *Arzneimittelforschung*. 43, 795–800.
- Scheffen, M. (2013). Bachelorarbeit: Entwicklung eines Zellkultursystems zur tumorinduzierten Reifungsinhibition von Dendritischen Zellen. Freiburg i.Br.
- Schlaeppli, M., Cerny, T., and Jungi, W. (2005). Komplementärmedizin in der Onkologie–eine Einführung. *Schweiz Med Forum* 5, 686–694.
- Schnurr, M., Galambos, P., and Schloz, P. (2002). Dendritische Zellen – Träger tumorgerichteter Immuntherapie.  
<http://www.aerzteblatt.de/archiv/32916/Dendritische-Zellen-Traeger-tumorgerichteter-Immuntherapie>, zugegriffen am 26.04.2014.
- Schrödel, A. (2007). Die Rolle des fetalen Kälberserums in Zellkulturmedien. *Biol. Unserer Zeit* 37, 289–289.
- Sombroek, C.C., Stam, A.G.M., Masterson, A.J., Lougheed, S.M., Schakel, M.J.A.G., Meijer, C.J.L.M., Pinedo, H.M., van den Eertwegh, A.J.M., Scheper, R.J., and de Gruijl, T.D. (2002). Prostanoids play a major role in the primary tumor-induced inhibition of dendritic cell differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 168, 4333–4343.
- Stein, G.M., Büssing, A., and Schietzel, M. (2002). Activation of dendritic cells by an aqueous mistletoe extract and mistletoe lectin-3 in vitro. *Anticancer Res.* 22, 267–274.
- Stirpe, F., Barbieri, L., Battelli, M.G., Soria, M., and Lappi, D.A. (1992). Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Biotechnol. Nat. Publ. Co.* 10, 405–412.
- Tough, D.F., Sun, S., and Sprent, J. (1997). T Cell Stimulation In Vivo by Lipopolysaccharide (LPS). *J. Exp. Med.* 185, 2089–2094.
- Van Horsen, R., Ten Hagen, T.L.M., and Eggermont, A.M.M. (2006). TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist* 11, 397–408.
- Yau, T., Dan, X., Ng, C.C.W., and Ng, T.B. (2015). Lectins with potential for anti-cancer therapy. *Mol. Basel Switz.* 20, 3791–3810.
- Zhou, L.J., and Tedder, T.F. (1996). CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 2588–2592.

## **8. Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation wurde bisher oder gleichzeitig keiner anderen Fakultät vorgelegt.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Ort, Datum

Unterschrift