

Abschlussbericht (Dezember 2017) zum Forschungsvorhaben, gefördert durch die ISUS - Innovationsstiftung Ulrike Sauer

„Functional and therapeutic effects of different mistletoe preparations in the treatment of glioblastoma”

Ziel dieses Forschungsvorhaben war es, die therapeutisch relevanten Effekte verschiedener Mistelpräparate auf das Glioblastom (GBM) zu untersuchen, diese Effekte miteinander zu vergleichen und mögliche toxische Nebenwirkungen zu erkennen. Ein weiteres Ziel des Forschungsvorhabens war die Wirksamkeit der adjuvanten Mistel-Therapie im experimentellen GBM zu evaluieren, d.h. zu bestimmen, inwieweit Mistelpräparate die Radio-Chemotherapie, die standardmäßig in der Klinik angewandt wird, unterstützen und ob Mistelpräparate den therapeutischen Effekt der Radio-Chemotherapie fördern bzw. potenzieren. Letzteres ist vor allem im Hinblick auf eine in den USA und Deutschland geplante klinische Studie zur konkomitanten Behandlung von GBM-Patienten mit den Mistelpräparaten ISCADOR P und ISCADOR Qu von essentieller Bedeutung.

Der Erfolg des Forschungsvorhabens wird durch mehrere wissenschaftliche Publikationen und Buchkapitel (siehe 11. Im Projektverlauf entstandene Publikationen) nachgewiesen. Ein Manuskript, in dem Daten zur adjuvanten Therapie des GBM *in vitro* und *in vivo* gezeigt sind, wurde mittlerweile bei *BMC Complementary and Alternative Medicine* eingereicht und befindet sich im Begutachtungsprozess. Ein weiteres Manuskript, das die anti-tumoralen, immun-stimulierenden Effekte von Mistelpräparaten im experimentellen GBM zeigt, ist derzeit in Vorbereitung. Weiterhin wurden Ergebnisse dieses Forschungsprojekts auf nationalen und internationalen Kongressen vorgestellt (siehe hierzu Kapitel 12 und 13 des Berichts). Die Ergebnisse dieses Forschungsvorhabens haben dazu geführt, dass in einer geplanten klinischen Studie zur Evaluation der therapeutischen Effekte der adjuvanten Misteltherapie von GBM-Patienten, ISCADOR Qu als Pharmazeutikum hinzugefügt wurde. Diese Studie soll in Deutschland (Dr. Gunver Kienle, Freiburg) und in USA (Boston) durchgeführt werden.

Die Ergebnisse des Forschungsvorhabens sind nachfolgend zusammenfassend dargestellt.

1. Verwendete Mistelpräparate

Für unsere Studien haben wir folgende Mistelpräparate verwendet. ISCADOR Qu und P sind Extrakte der Mistelpflanze und unterscheiden sich vor allem hinsichtlich ihres Mistellektin/Viscumin (ML) Gehalts. Die Extrakte enthalten neben Viscuminen auch Viscotoxine und diverse andere Komponenten in geringer Konzentration. Aviscumine hingegen ist rekombinantes, im Bakterium *E. coli* produziertes und zur GMP-Qualität gereinigtes ML-1. Natives ML-1 wurde aus Eschenmisteln isoliert und für Laborzwecke gereinigt (Tabelle 1).

Substanz	Hersteller	Wirtsbaum	Charakteristika
ISCADOR Qu	ISCADOR AG	Eiche	<ul style="list-style-type: none">• Hoher ML-Gehalt• Fermentierter Extrakt• Enthält neben glykosylierten Mistellektinen auch Viscotoxine, Flavenoide und Triterpene
ISCADOR P	ISCADOR AG	Pappel	<ul style="list-style-type: none">• Sehr geringer ML-Gehalt• Fermentierter Extrakt• Enthält neben glykosylierten Mistellektinen auch Viscotoxine, Flavenoide und Triterpene
Aviscumine	Melema Pharma GmbH	-----	<ul style="list-style-type: none">• Rekombinantes ML-1• In <i>E. coli</i> produziert• Keine Glykosylierung
Natives ML-1	Abnoba AG	Esche	<ul style="list-style-type: none">• Isoliertes, gereinigtes ML-1• Glykosyliert

Tabelle 1: Verwendete Mistelpräparate

2. Zytotoxische Effekte der Mistelpräparate

Um die Zelltod-induzierenden Eigenschaft der Mistelpräparate in Tumorzellen zu bestimmen, aber auch die Toxizität auf nicht-malignen Zellen, wurden sieben GBM- und drei nicht-neoplastische Zelllinien mit steigenden Konzentrationen an ISCADOR Qu, Aviscumine und nativem ML-1 für 24 h bzw. 48 h behandelt und anschließend die Zelldichte als ein Maß für überlebende Zellen bestimmt. Die Ergebnisse der 48 h-Behandlung sind exemplarisch in Abb. 1 und die IC₅₀-Werte (die Konzentration bei der 50% der Zellen sterben) in Tabelle 2 gezeigt. Mistelpräparate induzieren, in Abhängigkeit von ihrer Konzentration, Zelltod sowohl in GBM-Zellen als auch in Nicht-Tumorzellen. Einige der GBM-Zellen sind sehr sensitiv für ML-induziertem Zelltod (LNT-229, LN-319, MZ-18, SMA-560), andere hingegen wenig sensitiv (LN-308, T98G, LN-319). Das Sensitivitätsspektrum von Nichttumorzellen wie der astrozytären Zelllinie SV-GA, von humanen mikrovaskulären Perizyten aus dem Gehirn oder Hirngefäß-Endothelzellen befindet sich im Bereich der Sensitivität die wir für GBM-Zellen ermittelt haben. Auch für ISCADOR P wurden diese Experimente durchgeführt. Wie schon im ersten Förderteil und von Podlech et al 2012 publiziert, zeigte sich für ISCADOR P kein zytotoxischer Effekt, jedoch auch keine anti-tumorale Wirkung (Podlech et al, 2012, Schötterl et al, 2017). Daher werden die Daten für ISCADOR P nicht gezeigt.

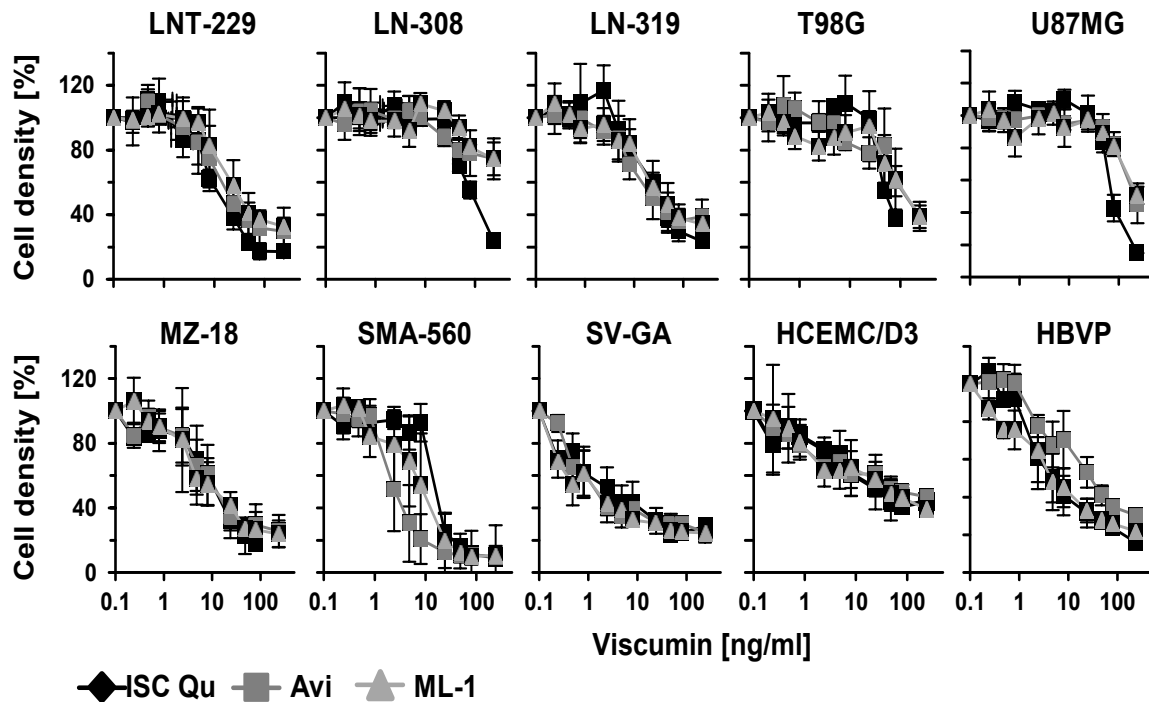


Abb. 1: Mistelpräparate induzieren Zelltod in GBM-Zellen und Nicht-Tumorzellen. Die Zellen wurden mit steigender Konzentration ISCADOR Qu (ISC Qu), Aviscumine (Avi) und nativem ML-1 behandelt und nach 48 h die Zelldichte mittels Kristallviolett färbung bestimmt. Die Zellen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Sensitivität für die getesteten Mistelpräparate. LNT-229, LN-308, LN-319, T98G, U87MG und MZ-18 sind humane GBM-Zelllinien mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund. SMA-560 ist eine murine GBM-Zelllinie. SV-GA (Astrozytenzelllinie), HCEMC/D3 (Gehirn-Endothelzelllinie) und HBVP (primäre vaskuläre Perizyten aus dem Gehirn) sind humane nicht-neoplastische Zellen. (n=3; SD)

Zelllinie	IC ₅₀ 24 h			IC ₅₀ 48 h		
	ISCADOR Qu [ng/ml ML]	Aviscumine [ng/ml]	Natives ML-1 [ng/ml]	ISCADOR Qu [ng/ml ML]	Aviscumine [ng/ml]	Natives ML-1 [ng/ml]
LNT-229	37.09	95,60	>240	10.50	17.78	29.73
LN-308	139.72	>240	>240	83.13	>240	>240
LN-319	71.36	>240	>240	24.64	18.23	27.95
U87MG	140.60	>240	>240	81.03	>240	>240
T98G	101.19	>240	>240	51.24	158.81	113.11
MZ-18	35.45	>240	>240	11.56	10.94	9.97
SMA-560	35.70	10.23	19.25	17.31	2.69	8.25
SV-GA	65.95	>240	>240	2.36	1.37	1.02
HBVP	28.86	>240	58.37	4.85	23.59	5.01
hCEMC/D3	>240	>240	>240	27.92	105.12	42.02
PBMCs	26.45	171.35	144.22	6.50	18.81	23.74

Tabelle 2: Sensitivität von GBM-Zellen und Nicht-Tumorzellen. Dargestellt sind IC₅₀ Werte für ISCADOR Qu, Aviscumine und nativem ML-1 in GBM-Zelllinien (rot) und humanen Nicht-Tumorzellen (grün) 24 und 48 h nach Zugabe der Mistelpräparate in das Kulturmedium. Die Berechnungen erfolgten aus den Daten dreier unabhängiger Experimente.

Mistelpräparate induzieren auch in Nicht-Tumorzellen Zelltod und rufen somit möglicherweise unerwünschte toxische Effekte in Nichttumor-Geweben hervor. Dies haben wir im Folgenden untersucht. Hierzu haben wir Hippokampus-Hirngewebeschnitte von Mäusen verwendet und mit steigender Konzentration ISCADOR Qu, ISCADOR P, Aviscumine oder nativem ML-1 für 24 oder 48 Stunden behandelt. Abschließend wurden mittels Propidiumiodid-Färbung tote Zellen gefärbt und manuell ausgezählt. Ein signifikanter Anstieg toter Zellen nach Mistelbehandlung war nur für erhöhte ISCADOR Qu Konzentrationen (> 24 ng/ml ML), die weit über der in Zellkulturen bestimmten IC₅₀ Werte für Nichttumorzellen (Tabelle 2) liegen, erkennbar. Ein sehr geringer, nicht signifikanter Anstieg an toten Zellen war auch nach Behandlung mit Aviscumine und nativem ML-1 erkennbar (Abb. 2). ISCADOR P zeigte erst bei extrem hoher Dosierung Zelltod-Induktion (Daten nicht gezeigt). Wir haben diese Versuche auch mit humanem gesundem Hirngewebe durchgeführt, welches in Tübingen wenige Male im Jahr nach Operation eines Epilepsiepatienten zur Verfügung steht, jedoch war hier das basale Niveau an toten Zellen in diesem Gewebe so hoch, dass keine korrekte Aussage zur Zelltodinduktion durch Mistelpräparate gemacht werden konnte.

Im Gegensatz zu Aviscumine und nativem ML-1 enthält ISCADOR Qu als ein Extrakt der Eichenmistel neben Viscuminen auch noch weitere zytotoxisch wirksame Komponenten wie Viscotoxine und Inhaltsstoffe (z.B. Triterpene oder Flavonoide), die die Zelltod-induzierende Wirkung von Viscuminen fördern (Tabelle 1). Dies lässt die Vermutung zu, dass die unerwünschte, ISCADOR Qu-vermittelte Zytotoxizität im gesunden Hirngewebe vor allem durch Komponenten wie Viscotoxine erzielt wird. Um dieses zu untersuchen, haben wir einen Antikörper verwendet, der die Viscumin-Funktion neutralisiert. Wie in Abbildung 3 erkennbar, verhindert die Zugabe des Viscumin-neutralisierenden Antikörpers Zelltod-Induktion, welche durch hohe Konzentrationen an Aviscumine erreicht wird. Die zytotoxische Wirkung von ISCADOR Qu konnte durch Addition des Antikörpers nur partiell aufgehoben werden, ein Hinweis, dass die Zelltod-Induktion nach Applikation hoher ISCADOR Qu Konzentrationen auch durch die im Extrakt vorhandenen Viscotoxine hervorgerufen wird.

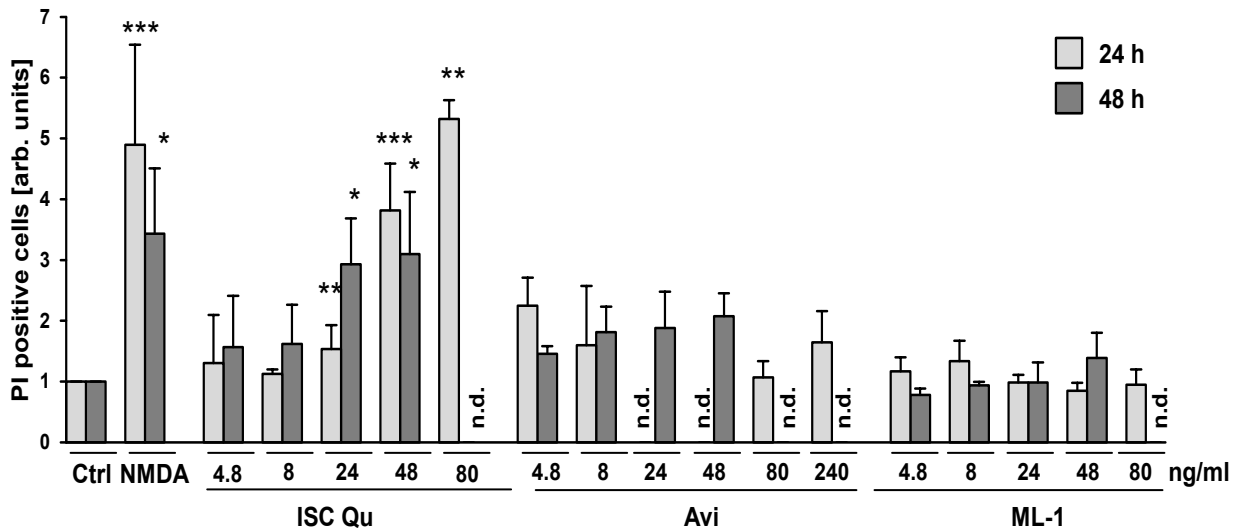


Abb. 2: Induktion von Zelltod durch Mistel-präparate in murinen hippocampalen Hirnge-webeschnitten. Hirngewebe-kulturen des Hip-pokampus wurden mit steigender Konzentration ISCADOR Qu (ISC Qu), Aviscumine (Avi) oder nativem ML-1 behandelt. Tote Zellen wurden nach 24 und 48 h mikroskopisch ausgezählt. Behandlung der Gewebekulturen mit NMDA (10 μM, 30 min) diente als Positivkontrolle für Zelltodinduktion in Nervenzellen. (n=3; SD; Student's t-test *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001).

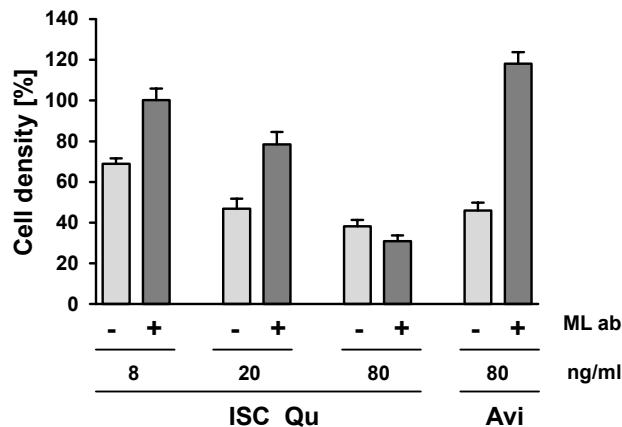


Abb. 3: Hemmung der Viscumin-Toxizität mittels eines Viscumin-spezifischen, neutralisierenden Antikörpers. LNT-229 GBM-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit des Viscumin-Antikörpers für 48 h mit ISCADOR Qu (ISC Qu) oder Aviscumine (Avi) behandelt. Die Zelldichte, ein Maß für überlebende Zellen, wurde mittels Kristallviolett-färbung bestimmt. Aviscumine induzierte Toxizität kann durch Zugabe des Antikörpers vollständig aufgehoben werden. ISCADOR Qu induzierter Zelltod wird nur partiell durch Zugabe des Antikörpers verhindert, da die im Extrakt enthaltene Viscotoxine und weitere Komponenten bei höheren Konzentrationen ebenfalls Zelltod vermitteln.

Die verstärkte Toxizität von ISCADOR kann auch darauf beruhen, dass ISCADOR Qu besser von Zielzellen aufgenommen wird als Aviscumine oder natives ML-1. Um dies zu untersuchen haben wir LNT-229-GBM-Zellen mit ISCADOR Qu, Aviscumine oder nativem ML-1 behandelt und die Aufnahme von Viscuminen in die Zelle mittels konfokaler LaserScan-Mikroskopie untersucht. Wie in Abb. 4 erkennbar, ist die Aufnahme von nativem

ML-1 anfangs besser als die ISCADOR Qu- oder Aviscumine-Aufnahme, nach sechs Stunden war die aufgenommene Menge an Viscuminen für alle drei Substanzen in etwa gleich. Dies spricht nicht dafür, dass die Toxizität von Mistelpräparaten von ihrer Aufnahme in die Zielzellen abhängt und weist ebenso darauf hin, dass zytotoxische Effekte auf Normalgewebe vermutlich durch die in den Mistelextrakten vorhandenen Viscotoxine vermittelt werden. Da Viscotoxine in Aviscumine oder nativem ML-1 nicht vorhanden sind, sollten die beiden letzteren Präparate im Nicht-Tumorgewebe von Patienten keinen unerwünschten Zelltod hervorrufen.

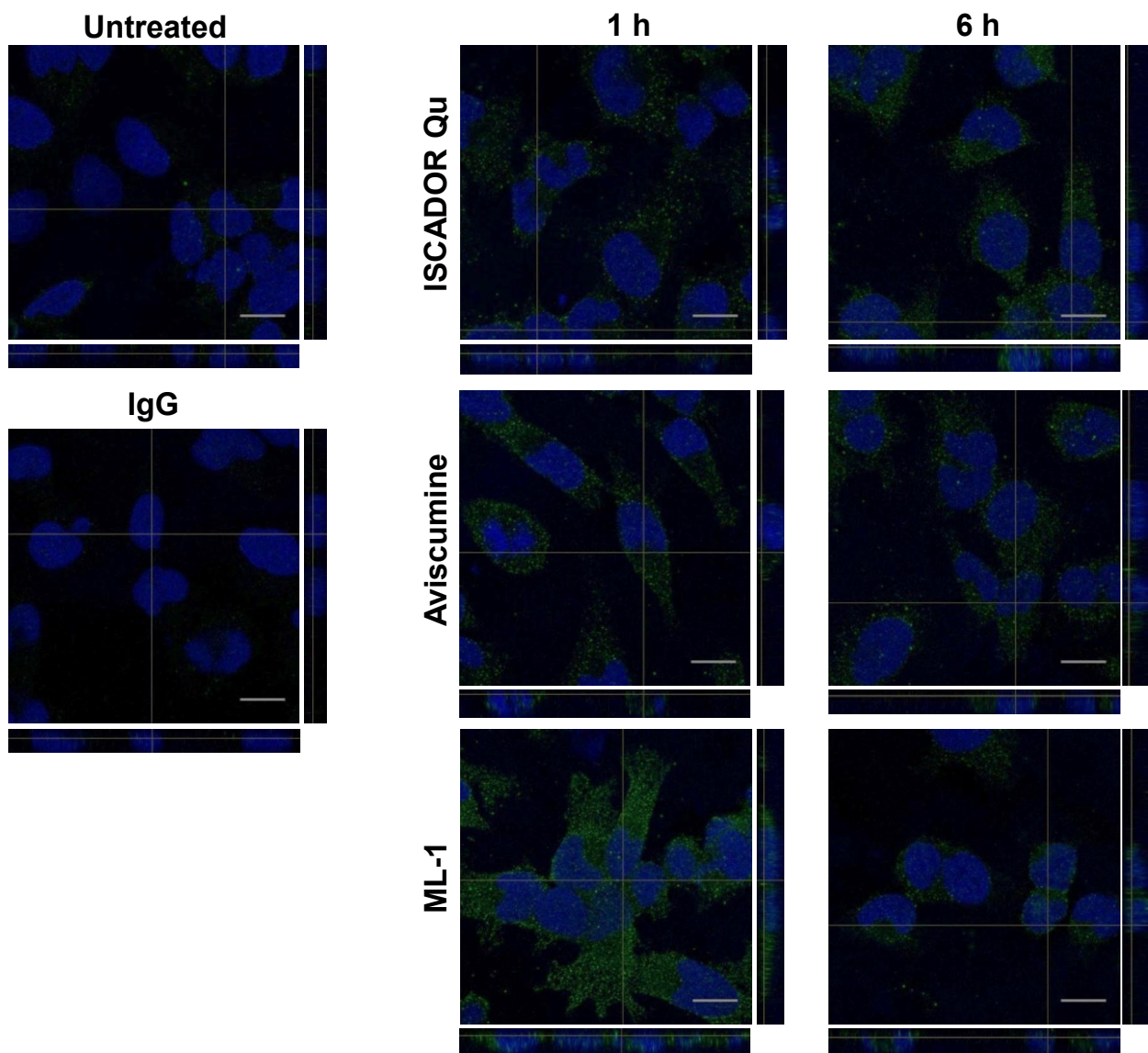


Abb. 4: Aufnahme von Viscumin in GBM-Zellen. LNT-229-GBM-Zellen wurden für 1 oder 6 h mit ISCADOR Qu, Aviscumine oder nativem ML-1 behandelt. Die Aufnahme von Viscumin in die Zellen wurde mit einem Viscumin-spezifischen Antikörper und konfokaler Lasermikroskopie nachgewiesen. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen (untreated) und Zellen, die behandelt wurden, aber mit einem unspezifischen Kontrollantikörper (IgG) gefärbt wurden. Die schmalen Abbildungen unterhalb und rechts der Bilder zeigen einen Querschnitt durch die Zellen und belegen die intrazelluläre Lokalisation der Viscumine (blau: DNA des Zellkerns, grün: Viscumin).
Schötterl et al. In J Oncol 2017

3. Wird der Viscumin-Rezeptor CD75s in Geweben exprimiert und bestimmt die Konzentration an CD75s die Sensitivität von Zielzellen für Viscumin-induzierten Zelltod?

Warum zeigen einige GBM-, aber auch Nicht-Tumorzellen, hochgradige Sensitivität für ML-induzierten Zelltod, wohingegen in anderen Zellen, bei gleicher Viscumin-Konzentration, kaum Zelltod induziert wird? Auch interessierte uns die Frage, warum Aviscumine und natives ML-1 unter Kulturbedingungen Zelltod auch in Nicht-Tumorzellen induzieren, jedoch Normalgewebe durch Aviscumine oder natives ML-1 nicht geschädigt wird. Unsere Hypothese lautete, dass die Sensitivität für Viscumin-induzierten Zelltod durch die Konzentration des Viscumin-Rezeptors CD75s auf der Zelloberfläche bzw. im Gewebe bestimmt wird. Hierzu haben wir die Expression von CD75s in diversen GBM-Zelllinien, in Nicht-Tumorzellen (Perizyten aus dem Gehirn), im gesunden Gehirn (Mensch und Maus) und in Biopsiegewebe von GBM-Patienten bestimmt. Alle GBM-Zellen, aber auch Perizyten unter Zellkulturbedingungen, exprimieren CD75s (Abb. 5A). Hierbei korreliert der Grad der CD75s-Expression mit dem Grad des durch die Viscumin-Behandlung induzierten Zelltods (Abb. 5D). CD75s wäre somit möglicherweise ein Marker, um die Wirksamkeit der Misteltherapie im GBM-Patienten zu bestimmen.

Im gesunden Gehirn von Maus und Mensch konnten wir CD75s nicht nachweisen, auch nicht in Gefäßen (dort sind im Gewebe die Perizyten lokalisiert). Für eine nicht vorhandene Expression von CD75s im gesunden Gehirn spricht funktionell auch das Ergebnis einer Toxizitätsstudie in der Maus. Dort haben wir hohe Konzentrationen an Mistelpräparaten direkt in das Hirn von Mäusen injiziert und konnten weder pathologisch noch verhaltensphysiologisch Differenzen zwischen Kontroll- und Aviscumine-injizierten Mäusen erkennen.

Im Gegensatz zum Normal-Hirngewebe sind Tumorzellen in 6 von 7 untersuchten Gewebeproben von GBM-Patienten CD75s-positiv. Mit diesem Ergebnis lässt sich erklären, warum unter Zellkultur-Bedingungen in Nicht-Tumorzellen durch Viscumin Zelltod induziert wird. Wir vermuten, dass in der Zellkultur CD75s auf allen Zellen hochreguliert wird und damit auch nur unter Zellkulturbedingungen Nicht-Tumorzellen sensitiv für Viscumin-induzierten Zelltod sind. GBM-Zellen hingegen zeigen sowohl in Zellkulturen als auch *in situ* im Tumor CD75s Expression und sollten damit auch im Tier und im GBM-Patienten vulnerabel für Viscumin-induzierten Zelltod sein.

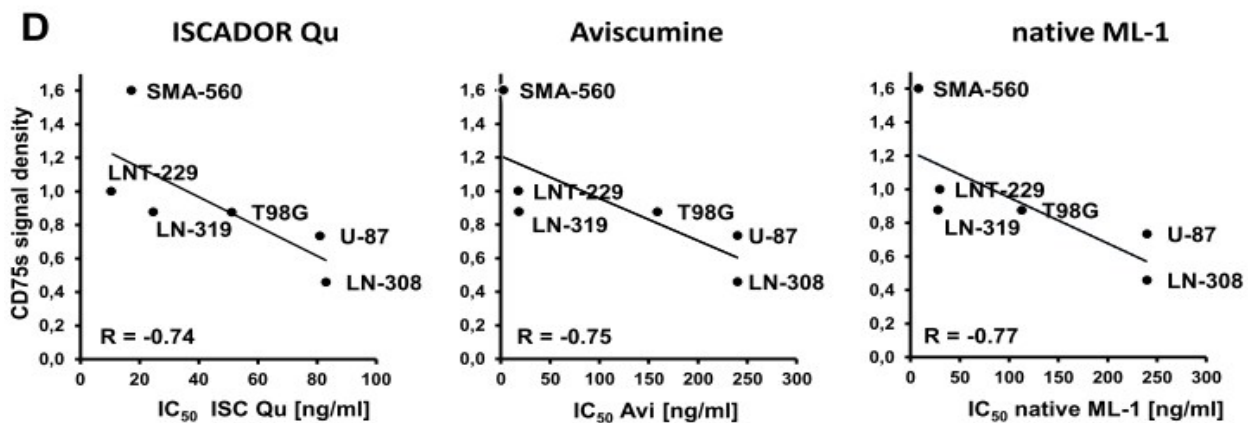
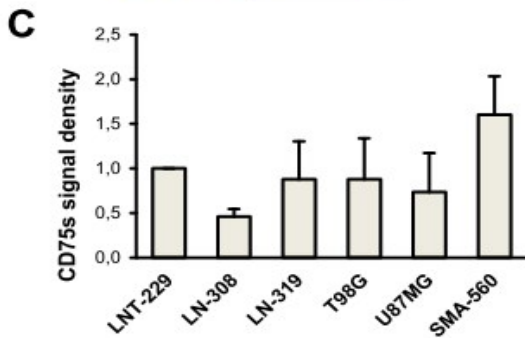
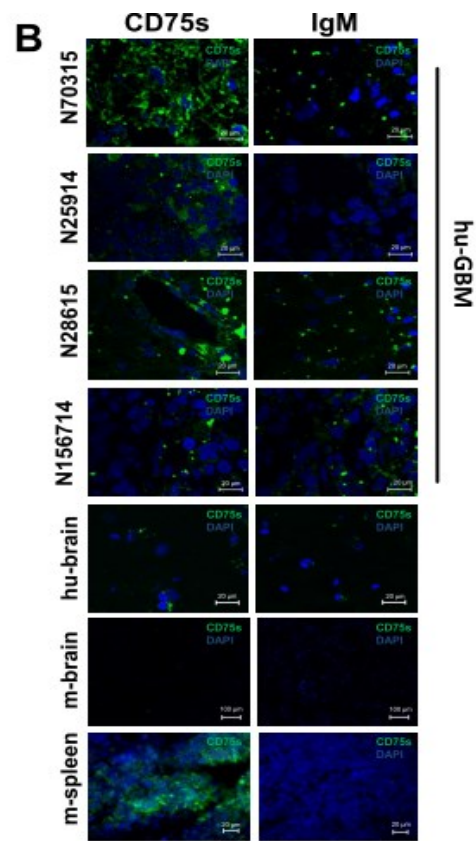
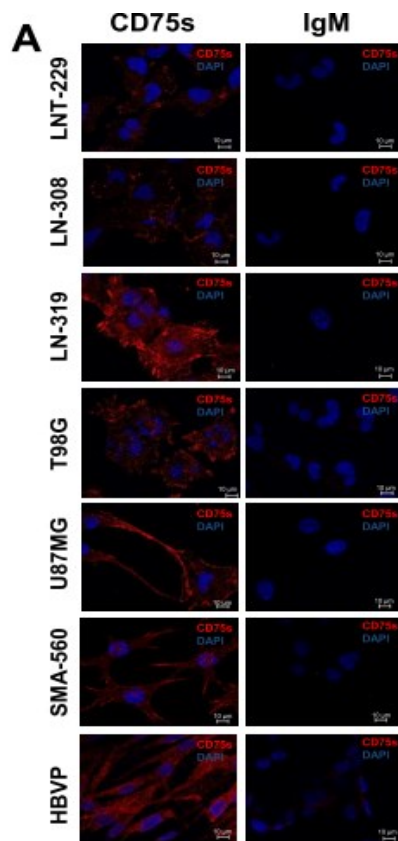


Abb. 5: Expression des Viscumin-Rezeptors CD75s. A. Humane und murine GBM-Zellen sowie humane mikrovaskuläre Hirnperizyten (HBVP) wurden mit einem CD75s-spezifischen oder dem Kontrollantikörper (IgM) gefärbt (blau: DNA des Zellkerns, rot: CD75s). B. Beispiele für die CD75s Expression in humanem Glioblastom-Gewebe, Normalhirn und Milz (hu = Mensch, m = Maus). Als ein bekannt CD75s-positives Organ wurde Milzgewebe verwendet (blau: DNA des Zellkerns, grün: CD75s). C. Quantifizierung der CD75s-Expression (n=3; SD). D. Die Regressionsgeraden zeigen die Korrelation der CD75s Expression zur Sensitivität für Viscumin-induzierten Zelltod. Der Korrelationskoeffizient R gibt das Maß der Korrelation an und liegt für alle drei Mistelpräparate im Bereich einer starken Korrelation (n=3).

Wir haben weiterhin untersucht, ob die CD75s Expression mit dem Mutationsstatus der untersuchten Gliome korreliert, konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen der CD75s Expression und den uns bekannten Mutationen erkennen.

	primary/ secondary GBM	IDH ^{R132H} mutation	IDH sequence	MGMT status	CD75s expression
N28615	pGBM	negative	n.d.	unmethylated	+
N70315	pGBM	negative	n.d.	unmethylated	++
N156714	pGBM	negative	n.d.	unmethylated	-
N125014	pGBM	negative	n.d.	unmethylated	-/+
N152509	sGBM	positive	n.d.	methylated	++
N25914	sGBM	negative	R132G	methylated	++
N165014	sGBM	negative	R132G	methylated	+
hu brain	-----	-----	-----	unmethylated	-

Tabelle 3: Mutationsspektrum und CD75s-Expression im GBM-Gewebe. Die CD75s Expression variiert in verschiedenen Gliomen und wurde anhand der Fluoreszenzintensivität definiert als negativ (-), leicht positiv (+/-), positiv (+) und stark positiv (++). pGBM: primäres GBM; sGBM: sekundäres, progredientes GBM

4. Effekte der Mistelpräparate auf die GBM-Zell-Proliferation

Therapeutische Effekte in der Tumorthherapie werden nicht nur durch Zelltod-Induktion in den Tumorzellen erzielt (zytotoxischer Effekt), sondern auch durch Verminderung der Zellteilungsrate der Krebszellen (zytostatischer Effekt). Dieser zytostatische Effekt wird durch die meisten verwendeten Chemotherapeutika erzielt. Auch TMZ, das standardmäßig in der Behandlung des GBM eingesetzte Chemotherapeutikum, wirkt zytostatisch. Der zytostatische Effekt wird oft durch schon geringe Konzentrationen des Therapeutikums erzielt. Um zu evaluieren, ob Mistelpräparate zytostatisch wirken, haben wir LNT-229 (Mensch) und SMA-560 (Maus) Gliomzellen für 24 h mit geringen ISCADOR Qu-, Aviscumine- oder nativem ML-1-Konzentrationen behandelt, die Agenzien anschließend entfernt und dann analysiert, ob und wie schnell sich die Tumorzellen teilen. Beide untersuchten GBM-Zelllinien werden schon durch geringe Konzentrationen an ISCADOR Qu bzw. Aviscumine in ihrer Zellteilung gehemmt, natives ML-1 hingegen vermittelt keinen zytostatischen Effekt (Abb. 7).

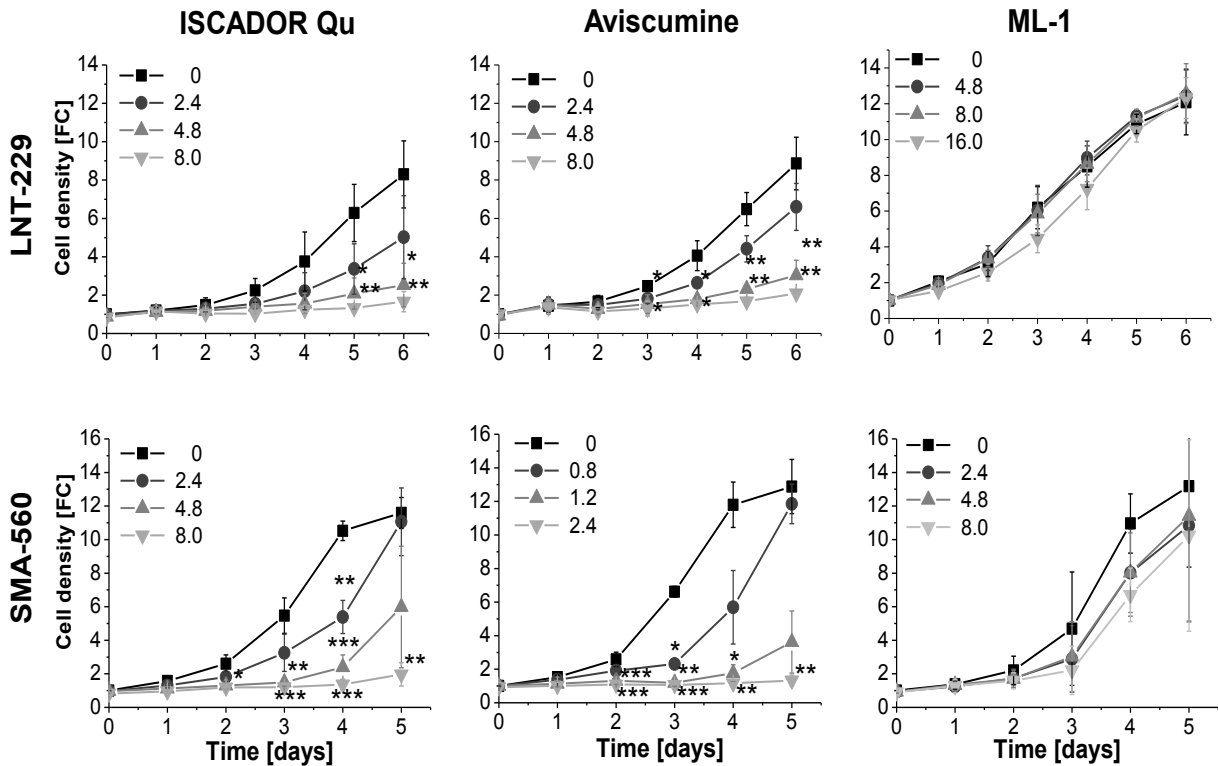


Abb. 7: ISCADOR Qu und Aviscumine hemmen die GBM-Zellteilung. LNT-229- oder SMA-560 GBM-Zellen wurden für 24 h mit steigender Konzentration (0-8 bzw. 16 ng/ml) ISCADOR Qu, Aviscumine oder ML-1 behandelt. Danach wurde alle 24 h die Zelldichte bestimmt (n=3; SD; Student's t-test *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001).

Während der Zellteilung unterlaufen Zellen verschiedene Stadien des Zellzyklus. Zwei Kontrollpunkte, in denen gemessen wird, ob Reparaturen notwendig sind, ob bei der Verdopplung der DNA in der S-Phase Fehler unterlaufen sind und ob die Zelle bereit zur Teilung ist, sind die G₁-Phase, die vor der Synthese-(S)-Phase durchlaufen wird und die G₂-Phase, die vor der eigentlichen Teilung der Zelle in der Mitose-(M)-Phase erfolgt (Abb. 8).

CDK/Cyclin-Komplexe im Wirbeltier-Zellzyklus

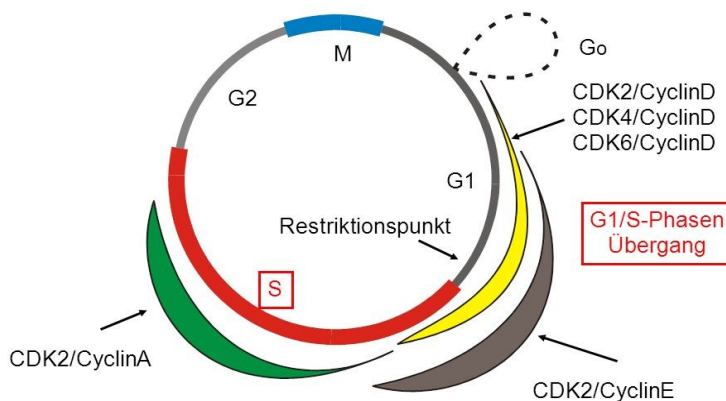


Abb. 8: Zellzyklus. Der Zyklus sich teilender Zellen wird in Interphase und Mitosephase (M) unterteilt. Die Interphase wird wiederum in G₁-, S- und G₂-Phase gegliedert. Diverse Proteine wie Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) regulieren den Übergang der einzelnen Phasen. Quelle: <http://slideplayer.com/slide/870776>.

Verminderte Zellteilung geht einher mit einem Arrest der Zellen in G₁ und/oder G₂. Gemessen werden können arretierte Zellen nicht direkt in der G₂-Phase, sondern in der sogenannten „G₂/M-Phase“ des Zellzyklus. Der Arrest dort beruht zum einerseits auf einem Stop in der G₂-Phase, andererseits verharren die Zellen aufgrund von Defekten des Mitoseapparats in der M-Phase. Der Arrest von Zellen in der G₁- und G₂/M-Phase kann mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden. Wir haben LNT-229-GBM-Zellen für 24 h bzw. 48 h mit Mistelpräparaten behandelt und anschließend gemessen, welcher Anteil der behandelten Zellen in der G₁- und/oder G₂/M-Phase arretiert ist. Während natives ML-1 erwartungsgemäß keinen Zellzyklusarrest induziert (da es wie in Abb. 7 ersichtlich die Zellteilungsrate von GBM-Zellen nicht beeinflusst), wirken sowohl ISCADOR Qu als auch Aviscumine schon in geringen Konzentrationen zytostatisch. Nach Behandlung mit ISCADOR Qu oder Aviscumine ist der Anteil an G₂/M-Zellen signifikant höher als in Kontrollzellen (Abb. 9). Ebenso befinden sich weniger GBM-Zellen in der S-Phase. Wir sahen ebenfalls, dass in der S-Phase die Synthese der zu verdoppelnden DNA verlangsamt ist (Daten nicht gezeigt). Die zytostatischen Effekte von ISCADOR Qu und Aviscumine wurden durch Zugabe des Antikörpers, der die Wirkung von Viscumin neutralisiert, komplett aufgehoben. Dies beweist, dass der zytostatische Effekt von Mistelpräparaten Viscumin-spezifisch ist und nicht durch Viscotoxine oder andere Komponenten in Mistelextrakten hervorgerufen wird.

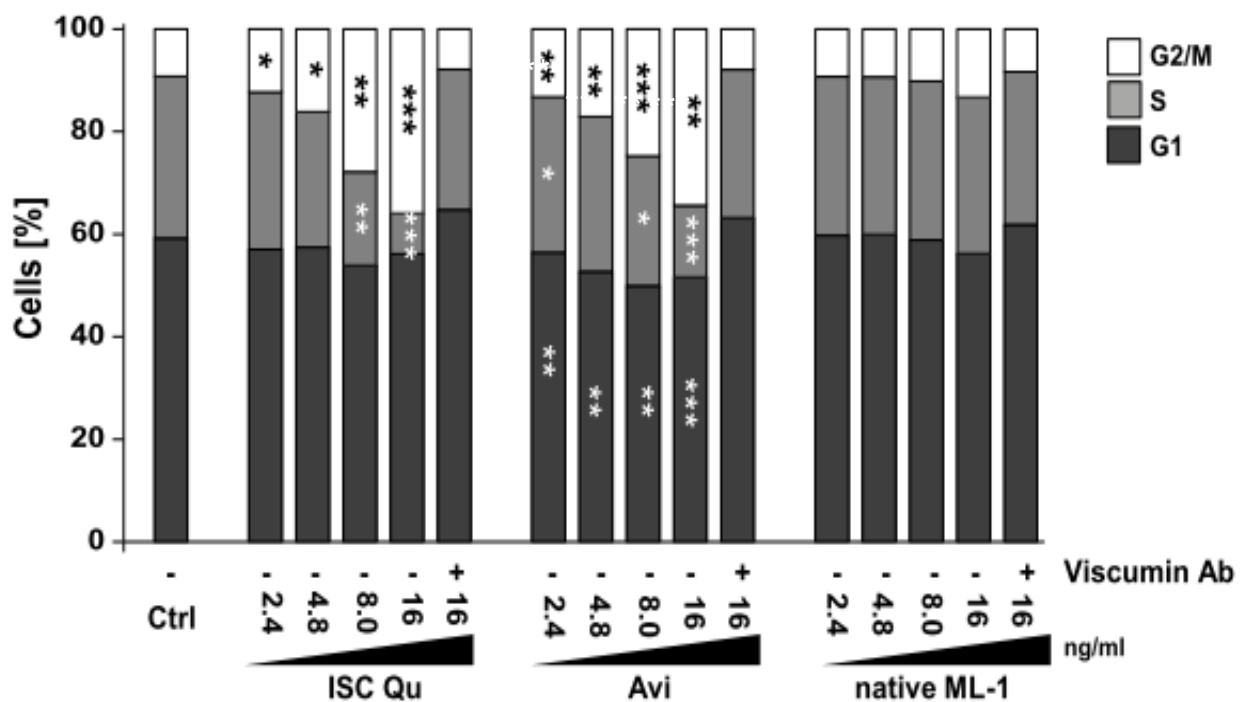


Abb. 9: Mistelpräparate wirken zytostatisch. LNT-229 GBM-Zellen wurden für 48 h mit ISCADOR Qu (ISC Qu), Aviscumine (Avi) oder ML-1 behandelt und der Anteil der Zellen in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus bestimmt. Die Hemmung des Zellzyklus kann durch Zugabe eines Viscumin-spezifischen Antikörpers (Viscumin Ab) verhindert werden (n=3; Student's t-test *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001).

Mittels PCR-basiertem Mikroarray und anschließender Validierung durch quantitative RT-PCR haben wir untersucht, ob die Expression Zellzyklus-regulierender Faktoren durch Mistelpräparate reguliert wird (Abb. 10). Cycline der D-Familie sind essentiell für den Übergang von der G₁- in die S-Phase, verschiedene D-Cycline haben dabei redundante Wirkung. Cyclin D1 (CCND1) wurde durch die Mistelbehandlung hochreguliert, dies korreliert mit dem geringeren Anteil an G₁-Zellen nach Viscumin-Behandlung. Erhöhte CCND1 Expression könnte auch erklären, warum die DNA-Synthese in der S-Phase in Viscumin-behandelten GBM-Zellen verlangsamt ist da Zellen, die ohne korrekte Kontrolle in der G₁-Phase direkt in die S-Phase übergehen, die in der Zelle vorhandenen Schäden vor Neusynthese der DNA nicht korrekt reparieren. Diese Zellen benötigen dann ggf. länger für die DNA-Synthese und würden aufgrund nicht reparierter Schäden mit großer Wahrscheinlichkeit am zweiten Kontrollpunkt (G₂/M) arretieren.

Die Expression der Cycline D2 (CCND2) und D3 (CCND3) sowie der im GBM stark exprimierten Proteinkinase ATM war nach Mistelbehandlung reduziert. In der Literatur wurde gezeigt, dass die Hemmung von ATM das GBM-Zellwachstum reduziert und GBM-Zellen für Bestrahlung und Chemotherapie sensibilisiert (Biddlestone-Thorpe, Sajjad et al. 2013; Eich, Roos et al. 2013; Blake, Stricker et al. 2016). Die Expression der Histon-Deacetylase 6 (HDAC6) war nach Viscumin-Behandlung ebenso geringer. HDAC6 ist eine Tubulin spezifische Deacetylase. Tubulin ist ein wichtiger Bestandteil des Spindelapparates in der Mitose-(M)-Phase (Telles and Seto 2012; Wang, Hu et al. 2016; Marampon, Megiorni et al. 2017). Wenn dieser Spindelapparat aufgrund fehlender Deacetylierung nach Herabregulation von HDAC6 nicht korrekt ausgebildet wird, können Zellen die Mitose nicht durchlaufen und arretieren in der M-Phase, bevor sie aufgrund der dann auftretenden sogenannten „mitotischen Katastrophe“ sterben. Die Expression der Phosphatase PPP2CA, einem Tumorsuppressor-Protein, das das Wachstum von Tumorzellen reguliert und für den korrekten Durchlauf der G₂-Phase wichtig ist (Bononi, Agnoletto et al. 2011), wurde durch die Viscumin-Behandlung in GBM-Zellen verringert. Interessanterweise wurde die Expression der oben beschriebenen Zellzyklus-regulierenden Proteine auch durch natives ML-1 moduliert, obwohl natives ML-1 keinen Zellzyklusarrest induzierte (Fig.7). Dies deutet darauf hin, dass die bislang identifizierten, in Viscumin-behandelten GBM-Zellen differenziell regulierten Zellzyklus-Regulatoren alleinig wahrscheinlich nicht hinreichend sind, den G₂/M-Arrest einzuleiten. Vermutlich sind weitere Viscumin-regulierte, bislang nicht identifizierte Proteine an der Induktion des Zellzyklus-Arrests nach Viscumin-Behandlung beteiligt. Hier müssen weitere Untersuchungen folgen, um den genauen Mechanismus der Proliferationshemmung durch Mistelpräparate aufzuklären.

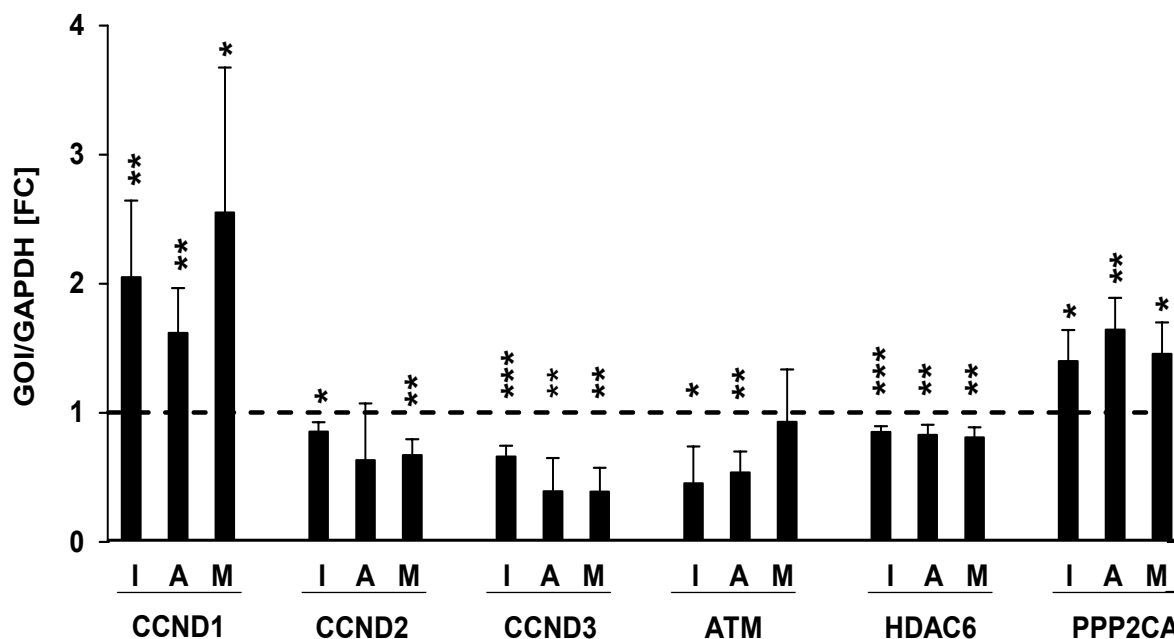


Abb. 10: Expression Zellzyklus-regulierender Faktoren nach Viscumin-Behandlung. LNT-229 GBM-Zellen wurden für 24 h mit ISCADOR Qu (I), Aviscumine (A) oder nativem ML-1 (M) behandelt (8 ng/ml) und anschließend die Expression Zellzyklus-regulierender Gene mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Die gestrichelte Linie zeigt die Basalexpression in unbehandelten Kontrollzellen. (n=3; SD; Student's t-test *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001)

5. Hemmung der GBM-Zellmotilität

Ein malignes Charakteristikum des GBM ist sein invasives Wachsen in das gesunde Hirngewebe, welches eine komplette operative Resektion oder Totalbestrahlung des Tumors ausschließt (Tonn and Goldbrunner 2003). Für das invasive Wachsen ist die Einwanderung (Migration) von GBM-Zellen entlang von Gefäßen und Axonen verantwortlich. Ein Ansatz, die GBM-Zellinvasion zu hemmen besteht darin die Fähigkeit der GBM-Zellen zu migrieren zu blockieren oder zumindest abzuschwächen. Wir haben untersucht, ob Mistelpräparate diese Eigenschaft besitzen. Die Behandlung von LNT-229- oder SMA-560-GBM-Zellen mit subtoxischen Konzentrationen an ISCADOR Qu, Aviscumine oder nativem ML-1 resultierte in einer signifikanten Verminderung der Gliomzellmotilität, hierbei wurde durch die Behandlung mit ISCADOR Qu der beste Effekt erzielt (Abb. 11). Durch Zugabe des Viscumin-neutralisierenden Antikörpers während der Behandlung wurde der migrationshemmende Effekt der Mistelpräparate aufgehoben, ein Beweis, dass in den Präparaten vorhandenes Viscumin für diesen Effekt verantwortlich ist.

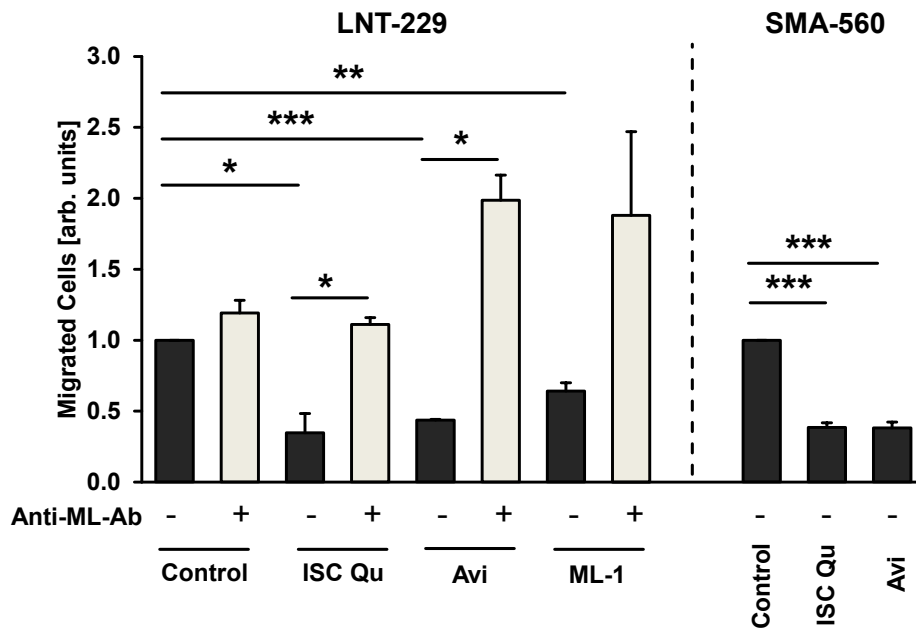


Abb. 11: Mistelpräparate reduzieren GBM Zell-Migration. LNT-229 oder SMA-560 GBM-Zellen wurden für 24 h mit ISCADOR Qu (ISC Qu), Aviscumine (Avi) oder nativem ML-1 (8 ng/ml) behandelt und anschließend Zellmigration bestimmt. Addition des Viscumin-neutralisierenden Antikörpers während der Behandlung hebt die Viscumin-vermittelte Hemmung der Zellmigration auf (n=3; SD; Student's t-test *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001). Schötterl et al. In J Oncol 2017

Mittels eines PCR-basierten Expressions-Mikroarrays und anschließender Validierung der Mikroarray-Daten durch quantitative RT-PCR wurden in Viscumin-behandelten GBM-Zellen diverse differenziell reguliert Gene identifiziert, die an Prozessen der Zellmigration beteiligt sind oder Migrationsprozesse regulieren (Abb. 12). Die mRNA der Matrix-Metalloproteinasen (MMP) -2 und -14, sowie für *tissue inhibitors of MMP 2* (TIMP2) werden durch die Mistelbehandlung in GBM-Zellen herabreguliert. MMPs sind essentiell für den Abbau der extrazellulären Matrix (ECM), einer Matrix, in die alle Zellen im Gewebe eingebettet sind. Erst der Abbauprozess der ECM ermöglicht Zellmigration und -invasion. TIMP2 induziert, zusammen mit MMP-14, die Aktivierung von MMP-2. Reguliert werden MMPs auch über den TGF- β -Signalweg. Der TGF- β -Signalweg wurde in GBM-Zellen ebenfalls durch Viscumin moduliert, so wurden nach Viscumin-Zugabe in GBM-Zellen TGF- β 1, TGF- β 2 und der TGF- β Rezeptor 2 (TGFB2) herabreguliert und daher möglicherweise das im GBM Migration-fördernde Signal über den TGF- β Signalweg abgeschwächt (Abb. 12). Weitere nach Viscumin-Behandlung differenziell regulierte Faktoren wie CEACAM1 und EPHRB2 steuern Zelladhäsion und sind somit auch an der Regulation der Zellmotilität beteiligt.

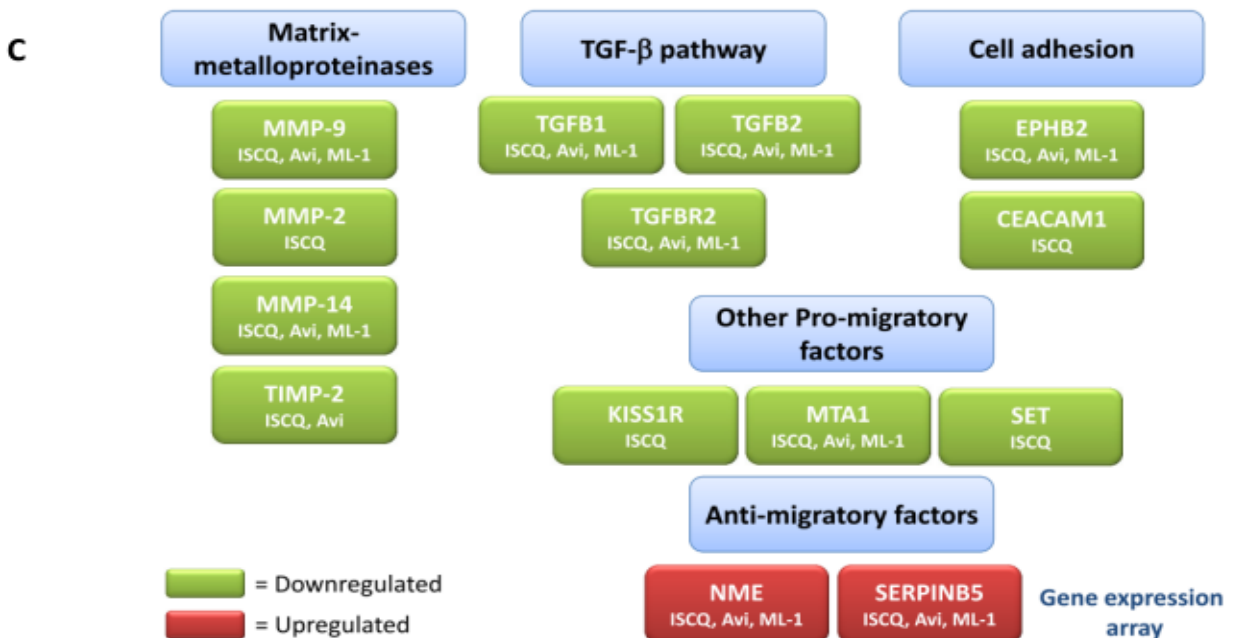
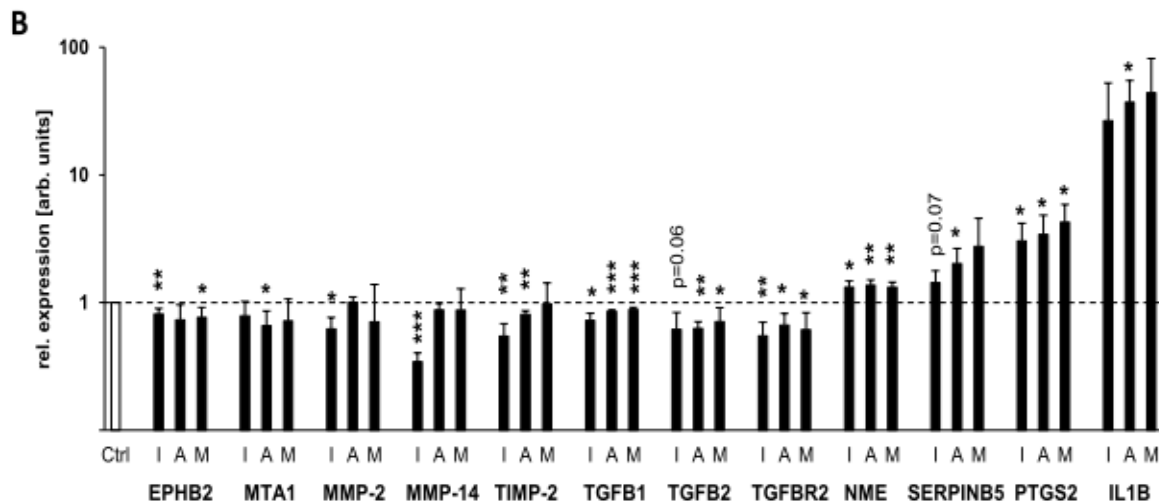
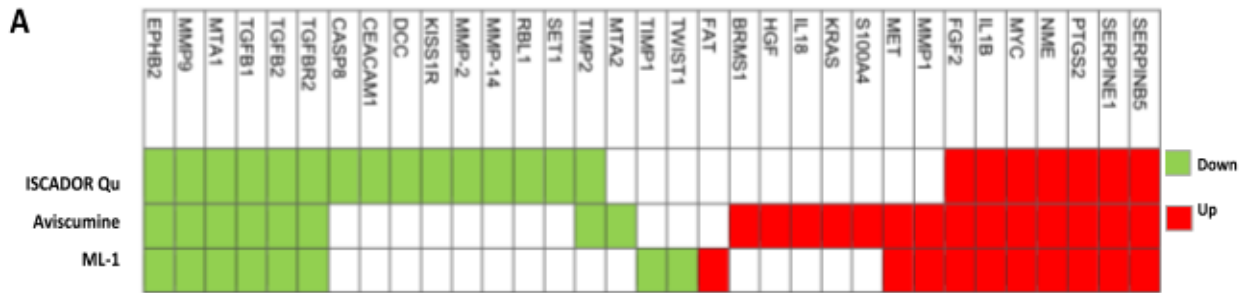


Abb. 12: Mistelpräparate modulieren die Expression Migration-regulierender Gene. A. Differenziell exprimierte, motilitäts-assoziierte Gene in Viscumin-behandelten LNT-229 GBM-Zellen. I: ISCADOR Qu, A: Aviscumine, M: natives ML-1 (8 ng/ml. Grün: Herabregulation, rot: Hochregulation. B. RT-qPCR differenziell exprimierter Gene (n=3; SD; Student's t-test *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001). Schötterl et al. In J Oncol 2017

Die Regulation migrationsrelevanter Gene durch Mistelpräparate ist nicht nur auf mRNA-Ebene, sondern auch auf Proteinebene erkennbar. Die Sekretion von TGF- β , MMP-2, TIMP2 und MMP-14 sowie die Expression von SMAD2, einem intrazellulären TGF- β -Signalvermittler, war nach Viscumin-Behandlung signifikant reduziert (Abb. 13, 14). Diese Ergebnisse haben wir im Januar 2017 im *International Journal of Oncology* veröffentlicht.

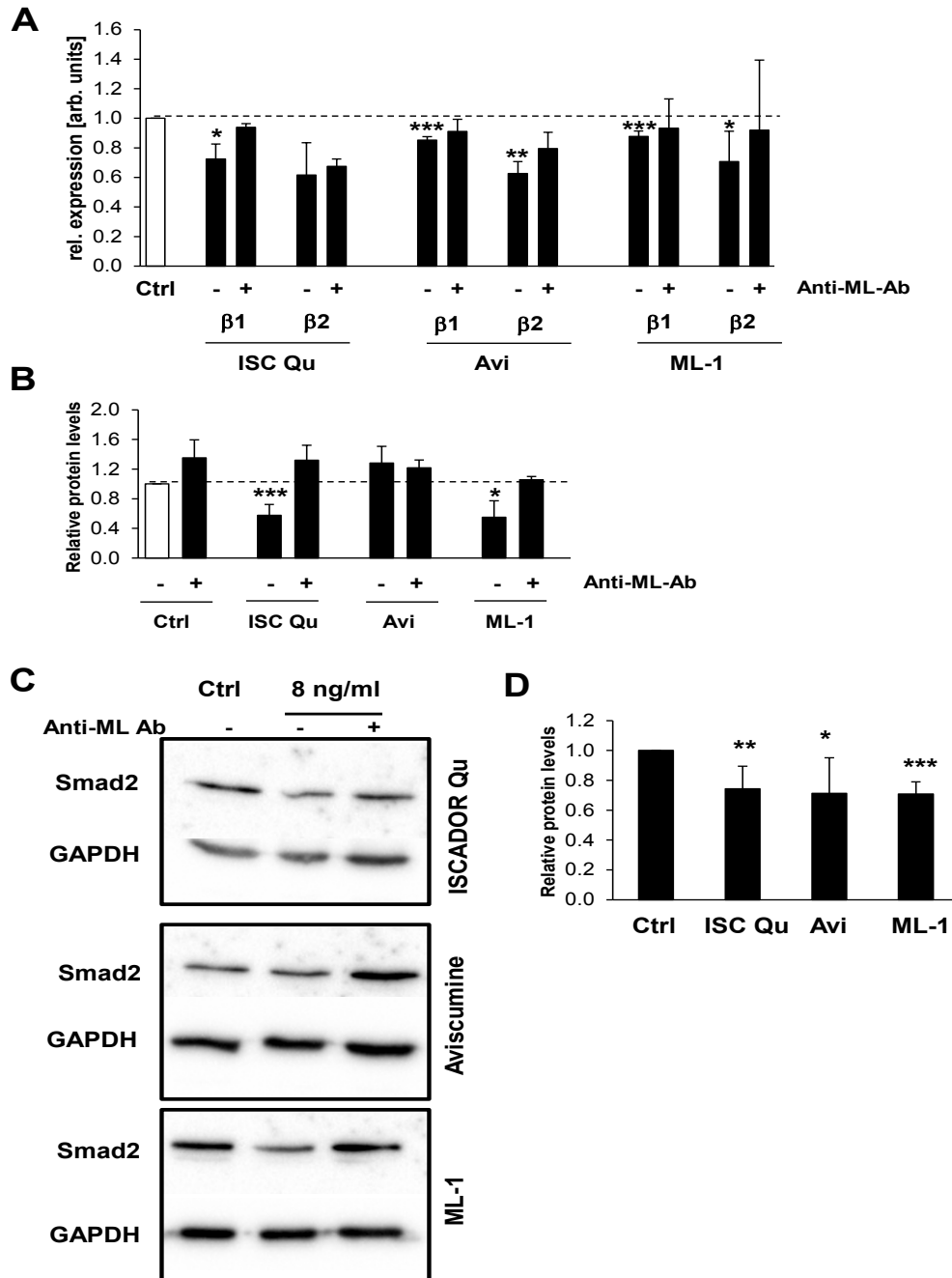


Abb. 13: Mistelpräparate hemmen den pro-migratorischen TGF- β Signalweg. A. TGF- β mRNA nach Inkubation von LNT-229 Zellen mit ISCADOR Qu (ISC Qu), Aviscumine (Avi) oder nativem ML-1 (8 ng/ml). B. TGF- β -Sekretion Viscumin-behandelten LNT-229 Zellen (ELISA). C. Smad2-Proteinexpression in Viscumin-behandelten LNT-229 Zellen. D. Quantifizierung der Smad2-Expression. A-C. Viscumin-induzierte Effekte können durch Zugabe des Viscumin-neutralisierenden Antikörpers aufgehoben werden (n=3; SD; Student's t-test *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001). Schötterl et al. In J Oncol 2017

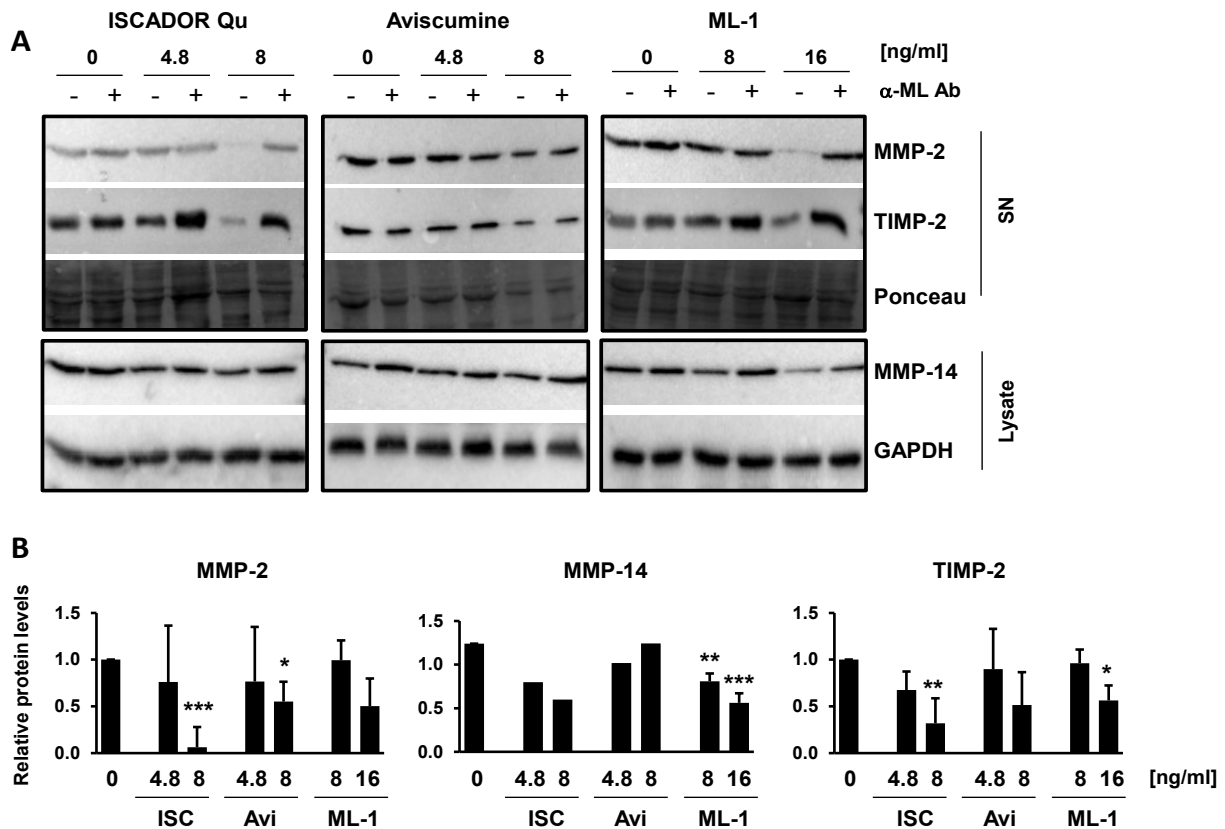


Abb. 14: Mistelpräparate reduzieren die Expression von MMPs. A. LNT-229-Zellen wurden mit ISCADOR Qu (ISC), Aviscumine (Avi) oder nativem ML-1 behandelt. Die Expression von MMP-2, TIMP-2 und MMP-14 wurde im Immunoblot bestimmt. Viscumin-vermittelte Effekte werden durch Zugabe des Viscumin-neutralisierenden Antikörpers aufgehoben. (SN = Zellkulturüberstände für den Nachweis sezernierter Proteine, Lysate = Nachweis intrazellulärer Protein). B. Quantifizierung der MMP-2-, MMP-14- und TIMP-2-Expression (n=3; SD; Student's t-test *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001). Schötterl et al. In J Oncol 2017

6. Mistelpräparate und anti-tumorale Immuneffekte

a. Einfluss von Mistelpräparaten auf das durch Natürliche Killer (NK)-Zellen vermittelte Killing von GBM Zellen

Aus der Literatur ist bekannt, dass Mistelpräparate immunstimulierend wirken (Bussing 2006). Auf diesem Mechanismus beruhen die meisten der Viscumin-basierten Therapieansätze, insbesondere jene zur Behandlung immunogener Tumoren wie dem malignen Melanom oder dem Pankreaskarzinom. Im Gegensatz zu den beiden oben genannten Tumorentitäten ist das GBM ein immunsuppressiver Tumor. Wir haben in diesem Teilprojekt des Forschungsvorhabens evaluiert, ob und in wieweit Mistelpräparate die Immunantwort gegen das GBM fördern können. Schon in der ersten Förderperiode zeigten wir, dass ISCADOR Qu, nicht aber ISCADOR P, das NK-Zell-vermittelte Killing von GBM-Zellen fördert. NK-Zellen sind Zellen des angeborenen Immunsystems und wichtige Zellen bei der Bekämpfung von Krebszellen. Den verstärkten NK-Zell-Killing Effekt für ISCADOR Qu-behandelten GBM-Zellen haben wir im zweiten Teil der Förderperiode reproduziert und zeigen ebenfalls, dass auch Aviscumine die anti-tumorale NK-Zell-Aktivität fördert (Abb. 15).

Der Viscumin-vermittelte anti-tumorale Effekt dabei war umso größer, je geringer die basale anti-tumorale Aktivität der verwendeten NK-Zellen der unterschiedlichen Spender war.

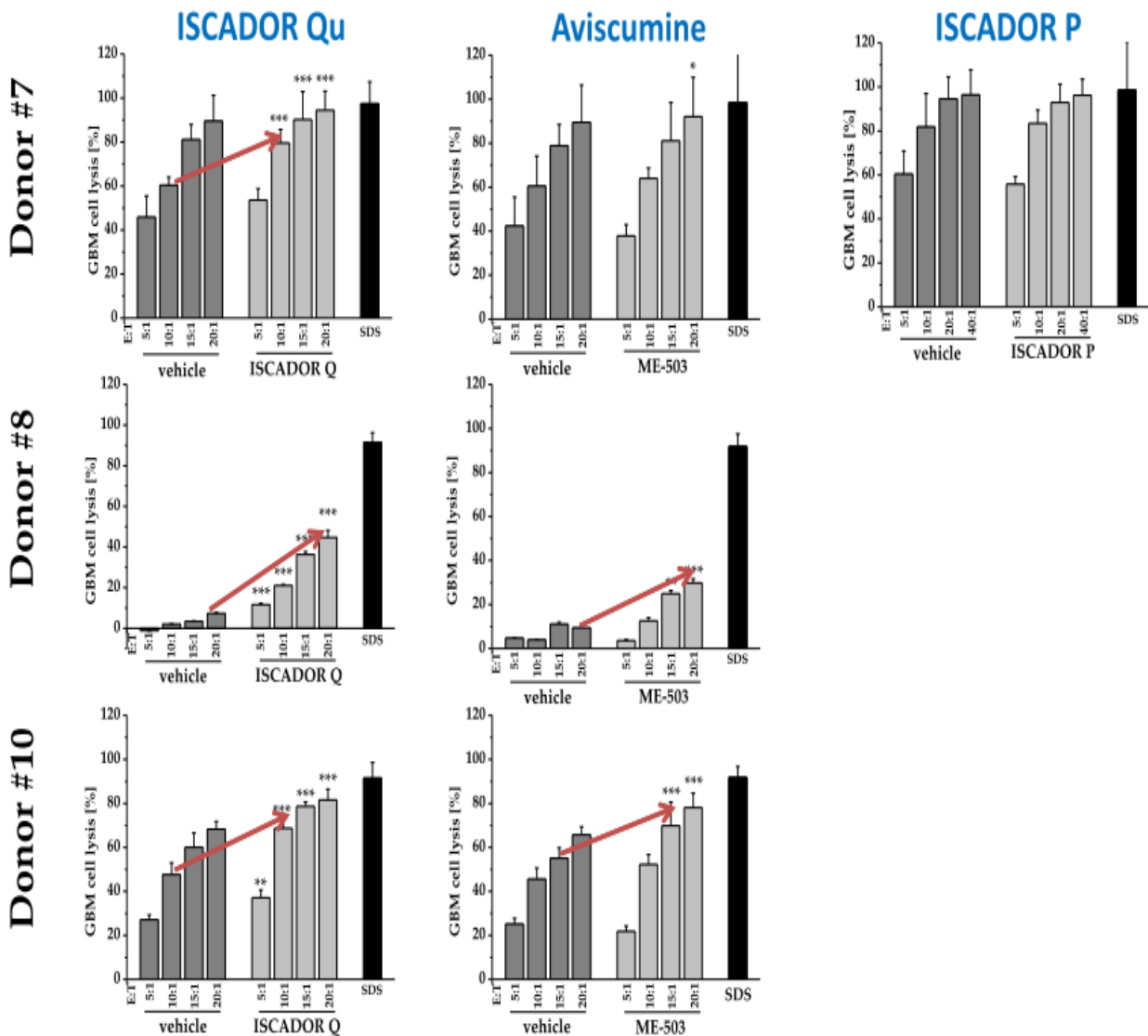


Abb. 15: NK-Zell-vermitteltes Killing von LNT-229-Zellen. NK-Zell-vermittelte LNT-229-Zellyse 24 h nach Behandlung der Tumorzellen mit ISCADOR Qu, Aviscumine oder ISCADOR P. Gezeigt sind die Daten dreier unabhängiger Experimente unter Verwendung von NK-Zellen dreier verschiedener Spender. Als Lyse-Positiv-Kontrolle diente SDS. (SD; Student's t-test *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001)
Schötterl et al. In „Die Mistel in der Tumorthherapie IV“, 2016

Das Killing von GBM-Zellen durch NK-Zellen wird durch die Bindung von Rezeptoren auf NK-Zellen (den NKG2D-Proteinen) an Liganden auf Tumorzellen (NKG2DL Proteine wie MICA, MICB, ULBPs) sowie durch Aktivierungs-Transmembranproteine auf NK-Zellen (NKP30, 44, 46) vermittelt. Verstärken Mistelpräparate die Bindung der NK-Zell-Rezeptoren an ihre Liganden auf den Tumorzellen? Oder verstärkten Mistelpräparate die Wirkung der Aktivierungsproteine NKP30, 44 oder 46? Dies haben wir untersucht, indem wir während der Killing-Periode blockierende Antikörper sowohl für die NK-Rezeptoren als auch für die Aktivierungsproteine zu den Kulturen gegeben haben. Abb. 16 zeigt, dass Viscumin nicht

spezifisch die Aktivität eines der Rezeptoren, Liganden oder Aktivierungsproteine moduliert, da die Viscumin-vermittelte Verstärkung des NK-Zell-vermittelten Killings von GBM-Zellen durch Zugabe der entsprechenden Antikörper nicht beeinflusst wurde. Die Blockierung von NKG2D reduziert sowohl in Kontroll- als auch in Viscumin-behandelten GBM-Zellen das Killing. Erst wenn die Aktivität aller Bindungs- und Aktivierungsfaktoren neutralisiert wird findet kein Killing von Tumorzellen mehr statt. Dieser Effekt ist jedoch auch in Kontroll-behandelten Zellen sichtbar (in der Abb. der rechte Dreierblock) und daher Viscumin-unabhängig. Wir schließen daraus, dass Viscumine wie ein „unspezifischer Klebstoff“ wirken indem sie die Interaktion von NK- und GBM-Zellen stärken und derart das NK-Zell-vermittelte Killing von GBM-Zellen fördern. Die Ergebnisse dieses Projektteils wurden Ende 2016 als ein Kapitel im Kongress-Berichtsbuch „Die Mistel in der Tumorthherapie IV“ veröffentlicht.

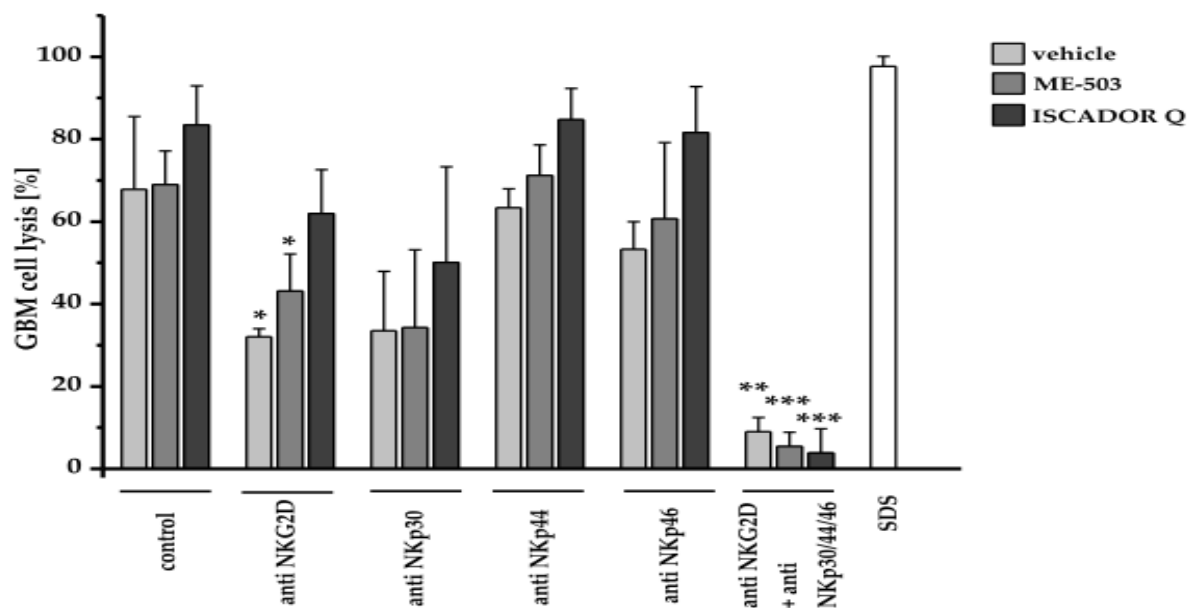


Abb. 16: Blockierung aller interagierenden (NKG2D) und aktivierenden (NKp) Oberflächenproteine auf NK-Zellen hemmen das NK-Zell-vermittelte Killing von GBM-Zellen. NK Zellen wurden für 30 min mit Blockierungs-Antikörpern behandelt bevor sie im Killing-Assay mit Kontroll- oder Viscumin-behandelten GBM-Zellen kokultiviert wurden. Als Kontrolle für das vollständige Killing von LNT-,29-Zellen wurde das Detergens SDS verwendet (n=3; SD; Student's t-test *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001).
Schötterl et al. In „Die Mistel in der Tumorthherapie IV“, 2016

b. Einfluss von Mistelpräparaten auf das T-Zell-„Priming“ und das T-Zell vermittelte Killing von GBM Zellen

T-Zellen sind Immunzellen des erworbenen Immunsystems und ebenso potente Kämpfer gegen Krebszellen. Nur wenige T-Zellen sind tumor-spezifisch, und erst nach Aktivierung dieser tumor-spezifischen T-Zellen (nach Bindung der T-Zellen auf Antigene auf Zielzellen und weiterer Aktivierung durch stimulierende Zytokine) fangen spezifische T-Zellen an sich zu teilen (zu expandieren) und können dann den Tumor angreifen.

GBM-Zellen hingegen haben „*Escape*“-Strategien entwickelt um dem T-Zell-Angriff zu entkommen. Sie sezernieren Faktoren die T-Zellen in ihrer Aktivität und -Zellteilung hemmen, die verhindern dass T-Zellen aktiviert werden oder die T-Zellen sogar töten. Für die Mistel-basierte T-Zell-Immuntherapie gilt, was für NK-Zellen schon beschrieben wurde: Die in der Literatur beschriebenen immunstimulierenden Eigenschaften von Mistelpräparaten wurden vor allem für immunogene Tumore wie Melanome oder Pankreaskarzinome gezeigt. Ob daher im immunsuppressiven GBM Mistelpräparate die anti-tumorale T-Zell-Aktivität fördern war bisher nicht bekannt und wurde in diesem Teilprojekt untersucht.

Die Versuche hierzu, die ähnlich wie oben für NK-Zellen beschrieben ablaufen, haben wir mit 4-5 verschiedenen T-Zell-Spendern durchgeführt und es zeigte sich innerhalb der Spender eine große Heterogenität in der basalen anti-tumoralen Aktivität der T-Zellen. Im Gegensatz zu NK-Zellen müssen vor dem Killing-Assay T-Zellen aktiviert werden, damit Zellteilung stattfindet und genügend tumor-spezifische T-Zellen für einen Angriff gegen den Tumor vorhanden sind. Dieses nennt man „*Priming*“. Die Behandlung von LNT-229-Zellen mit ISCADOR Qu, Aviscumine oder nativem ML-1 verstärken sowohl das „*Priming*“ von T-Zellen und auch das T-Zell-vermittelte Killing von GBM-Zellen (Abb. 17). Dieser Effekt ist nach ISCADOR Qu-Behandlung deutlicher erkennbar als nach Aviscumine-Behandlung (rote Pfeile). Auch hier war die Viscumin-vermittelte Verstärkung des T-Zell-vermittelten GBM-Zell-Killings umso größer je geringer die basale anti-tumorale Aktivität der T-Zellen der verschiedenen Spender war (Daten nicht gezeigt). Für die Behandlung mit nativem ML-1 wurde der anti-tumorale, T-Zell-basierte Immuneffekt nur sehr schwach verstärkt und für T-Zellen einiger Spender war für natives ML-1 keine Stimulation erkennbar. Interessant und positiv für eine angedachte GBM-Therapie mit Mistelpräparaten war unsere Beobachtung, dass T-Zellen, die während der „*Priming*“-Periode mit Viscumin-behandelten GBM-Zielzellen in Berührung gekommen waren, auch GBM-Zellen besser angriffen, die noch niemals mit Mistelpräparaten in Kontakt gekommen waren (Abb. 17).

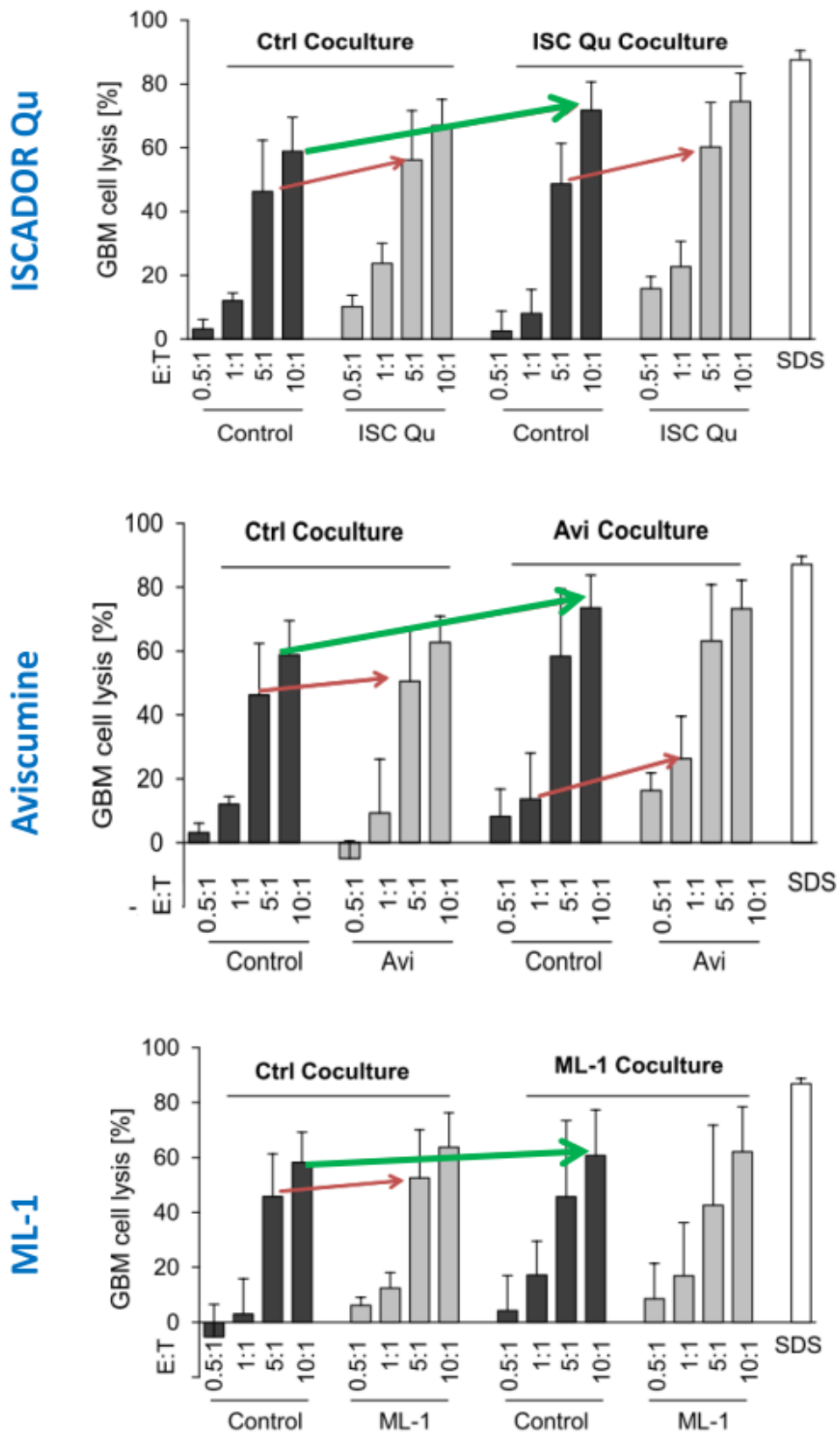


Abb. 17: Mistelpräparate fördern das T-Zell-„Priming“ sowie das T-Zell-vermittelte Killing von GBM-Zellen. T-Zellen wurden mit unbehandelten oder Viscumin-behandelten LNT-229-GBM-Zellen kokultiviert (ISC Qu = ISCADOR Qu; Avi = Aviscumine, ML-1 = natives ML-1). Der Killing-Assay mit „geprimten“ T-Zellen wurde dann mit Viscumin- oder unbehandelten GBM-Zellen durchgeführt (n=3; drei verschiedene Spender, SD).

Im Folgenden untersuchten wir unter Verwendung eines PCR-basierten Mikroarrays bzw. quantitativer RT-PCR, ob Mistelpräparate in GBM-Zellen die Expression immunmodulierender Faktoren regulieren. Vor allem entzündungsfördernde (proinflammatorische) Gene wie die Interleukine (IL)-6, -8 und -10 und der Tumornekrose-Faktor TNF, welcher Immunreaktionen fördert, wurden durch die Viscumin-Behandlung in GBM-Zellen hochreguliert (Abb. 18).

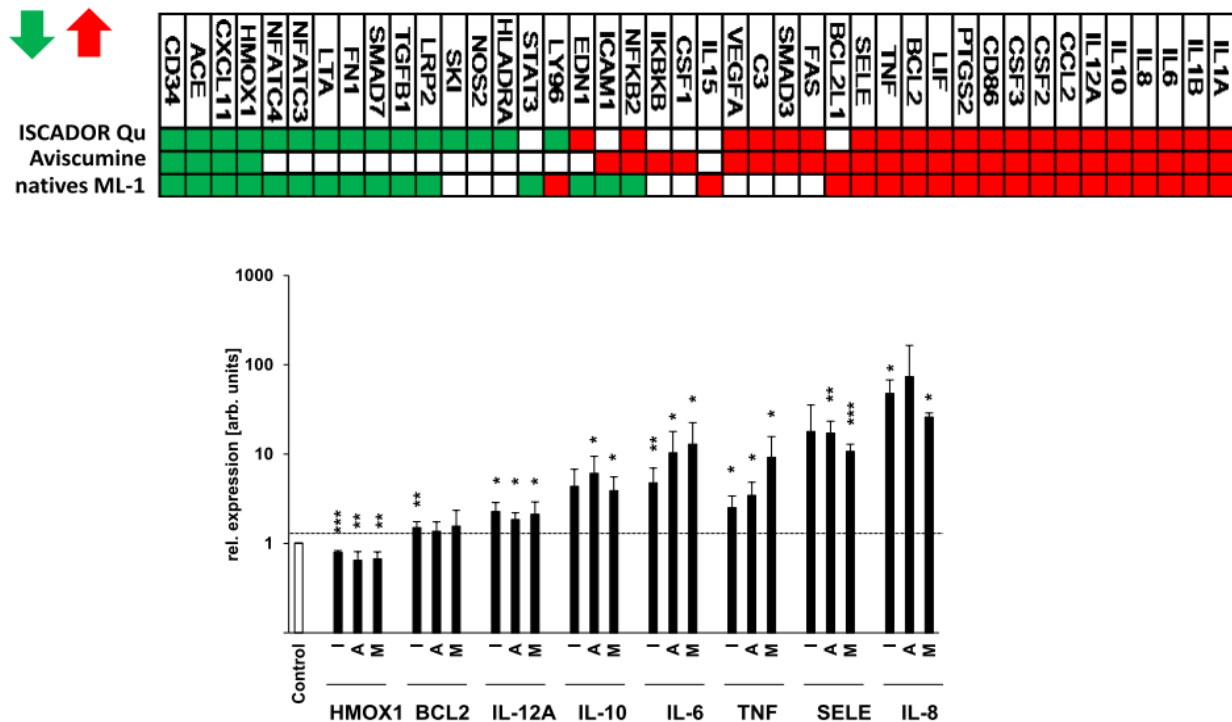


Abb. 18: Mistelpräparate regulieren die Expression von Immunmodulatoren A. Differenziell exprimierte Gene in LNT-229 GBM-Zellen nach Behandlung mit ISCADOR Qu (ISC Qu), Aviscumine (Avi) oder nativem ML-1 (8 ng/ml, 24 h). B. Validierung differenziell regulierter Gene mittels qRT-PCR (n=3; SD; Student's t-test *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001).

Mistelpräparate vermitteln auf Immunzellen jedoch auch negative Effekte. Die Behandlung von Immunzellen aus dem Blut gesunder Spender mit schon geringen Konzentrationen an ISCADOR Qu oder Aviscumine hemmte die T-Zell-Aktivierung, induzierte Zelltod und verminderte das Killing von GBM-Zellen durch Immunzellen (Abb. 19).

Die Expression des Viscumin-Rezeptors CD75s korreliert mit der Sensitivität für Viscumin-induzierten Zelltod und Immunzellen weisen eine besonders hohe CD75s Expression auf ((Hajto, Fodor et al. 2011) und gezeigt in Abb. 5 im Milzgewebe). Dies könnte erklären warum Immunzellen sehr empfindlich auf die Behandlung mit Mistelpräparaten reagieren. Welcher Effekt (anti-tumorale Immunstimulation oder Immunzell-Killing) letztendlich zum Tragen kommt, kann nur im lebenden Organismus untersucht werden. Es gibt jedoch diverse Hinweise in der Literatur, dass der Effekt der anti-tumoralen Immunstimulation

überwiegt (Huber, Rostock et al. 2006). Ein Manuskript, in dem wir diese Daten zusammen mit Tierversuchsdaten zeigen, ist derzeit in Vorbereitung.

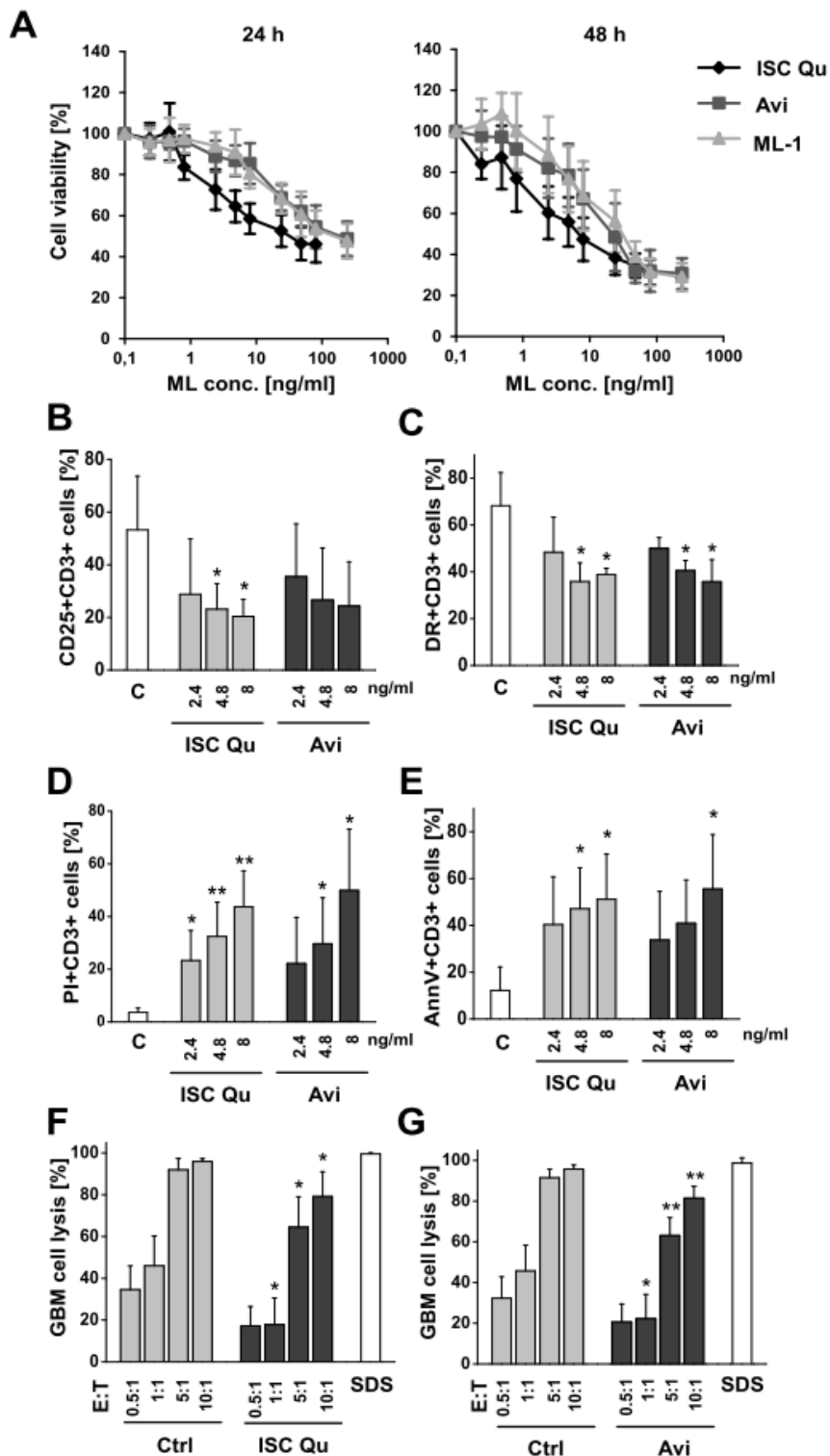


Abb. 19: Negative Effekte von Mistelpräparaten auf Immunzellen. A. Humane Immunzellen (PBMCs) wurden für 24 oder 48 h mit steigender Konzentration an ISCADOR Qu (ISC Qu), Aviscumine (Avi) oder nativem ML-1 behandelt und Zellviabilität gemessen. B/C. Expression der T-Zell-Aktivierungsmarker CD25 (B) und DR (C) nach Behandlung mit ISC Qu oder Aviscumine (48h). D/E. Durchflusszytometrische Bestimmung von Apoptose und Zelltod (D) nach Viscumin-Behandlung. F/ G. Reduziertes Killing von LNT-229 GBM-Zellen nach Behandlung der tumor-spezifischen T-Zellen mit ISCADOR QU (F) oder Aviscumine (G). Viscuminbehandlung: 2.4 ng/ml, 24h; n=3; SD; Student's t-test *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001).

7. Effekte von Mistelpräparaten auf GBM-induzierte Angiogenese

Erst Angiogenese, d.h. das Entsprießen neuer Blutgefäße in den Tumor, fördert deren massives Größenwachstum, da durch neugebildete Gefäße Tumorzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen optimal versorgt werden und somit proliferieren können. In der ersten Förderperiode zeigten wir, dass ISCADOR Qu die Expression Angiogenese-regulierende Gene moduliert. Dies konnten wir im Folgeprojekt validieren und zeigten, dass Aviscumine ähnliche Effekte vermittelt. Insbesondere die Expression der potenten Angiogenese-Faktoren *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) und Angiopoietin-1 wurde durch ISCADOR Qu und Aviscumine auf mRNA-Ebene reduziert. Um funktionell zu ermitteln ob die Herabregulation dieser Faktoren Einfluss auf angiogene Prozesse hat, haben wir den „Tube-Formation-Assay“ gewählt, mit dem *in vitro* in der Zellkultur Angiogenese-Prozesse analysiert und quantifiziert werden können (Abb. 20).

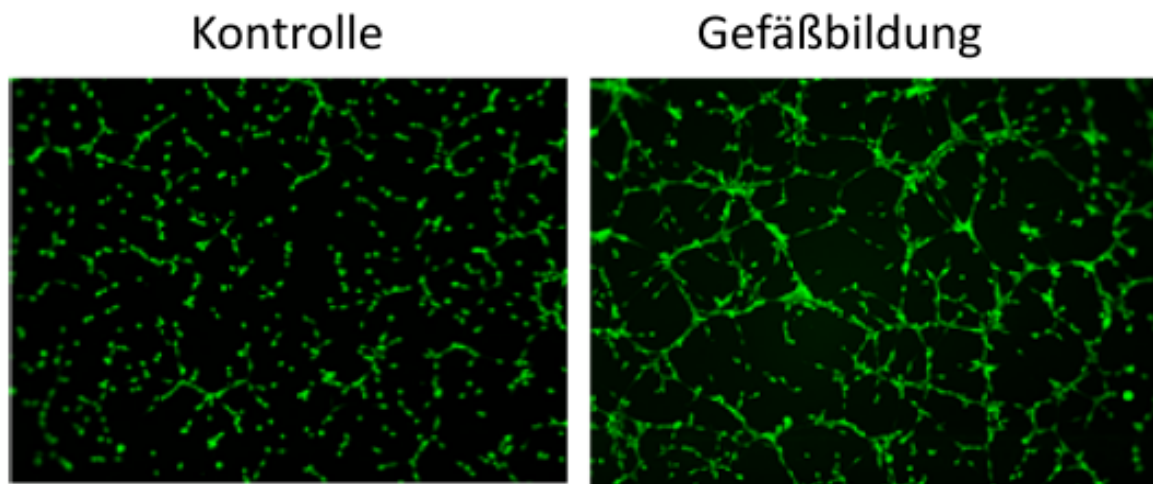


Abb. 20. Gefäßbildung *in vitro* im „Tube-Formation-Assay“

Hierzu haben wir GBM-Zellen mit Mistelpräparaten behandelt, von diesen Kulturen das Medium gesammelt und zunächst den Gehalt an VEGF im Medium bestimmt. Nur in GBM-Zellen mit geringer basaler VEGF-Expression (LNT-229, LN-308) war nach ISCADOR Qu oder Aviscumine Behandlung eine signifikante Reduktion der VEGF-Produktion erkennbar. In GBM-Zellen mit hoher basaler VEGF-Expression konnten wir nach Behandlung der Zellen mit Mistelpräparaten nur eine schwache (U87MG) oder keine (T98G) Reduktion der VEGF-Produktion erkennen. Der Viscumin-vermittelte hemmende Effekt auf die Gefäßbildung war ebenso nur in LNT-229- und LN-308-GBM-Zellen erkennbar (Abb. 21).

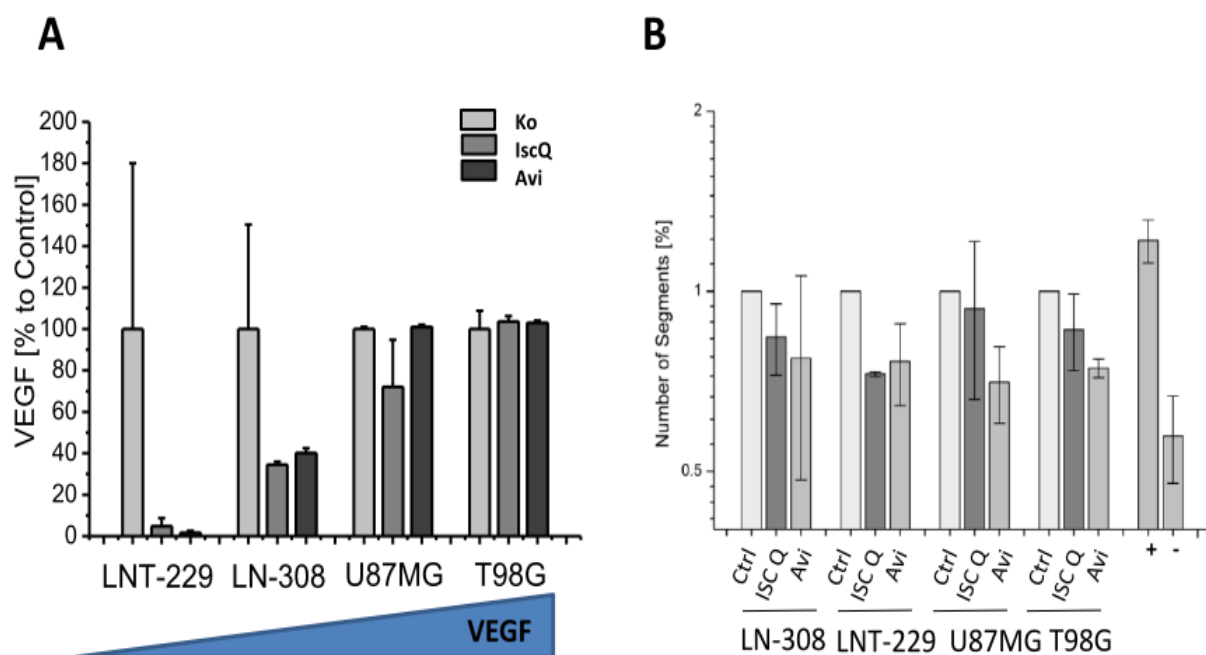


Abb. 21: Effekte von Mistelpräparaten auf angiogene Prozesse. A. GBM-Zellen wurden mit ISCADOR Qu (ISC Q) oder Aviscumine (Avi) behandelt und die VEGF Sekretion mittels ELISA bestimmt. B. hCMEC/D3 Endothelzellen wurden in Zellüberständen Viscumin-behandelter und unbehalteter GBM-Zellen kultiviert und mithilfe des „Tube-Formation-Assays“ Gefäßbildung *in vitro* bestimmt (n=3. SD).

8. Synergistische und additive Effekte der adjuvanten Mistelbehandlung

Die Misteltherapie wird in der Praxis fast ausschließlich adjuvant in Begleitung zur Radio-Chemotherapie (im GBM Bestrahlung des Tumors und Applikation des Zytostatikums Temozolomid, TMZ), verabreicht. Es stellt sich dann im Weiteren die Frage, ob Mistelpräparate die Wirkungen der Radio-Chemotherapie modulieren indem sie entweder die Wirkung der Therapie abschwächen (antagonistische Wirkung), keine Wirkung zeigen oder aber die Wirkung der Therapie verstärken (additive oder superadditive = synergistische Wirkung). Dieses zu wissen ist auch für die Planung der adjuvanten Misteltherapie von essentieller Bedeutung. Sollten Mistelpräparate die Wirkung der Radiochemotherapie potenzieren, müsste möglicherweise die Dosis der Bestrahlung bzw. des Chemotherapeutikums reduziert werden, um unerwünschte Nebenwirkung auf Nicht-Tumorgewebe zu vermeiden oder zu minimieren. Zunächst haben wir untersucht, inwieweit die parallele Behandlung von GBM-Zellen mit TMZ und Mistelpräparaten die zytotoxische Wirkung von TMZ moduliert. Eine Behandlung der GBM-Zellen mit ISCADOR Qu in Kombination mit TMZ zeigt mehr als die additive Wirkung der beiden Einzelsubstanzen, d.h. beide Substanzen wirkten synergistisch. Für Aviscumine konnten wir diesen Effekt nur bei sehr hohen Aviscumine-Konzentrationen beobachten (Abb. 22).

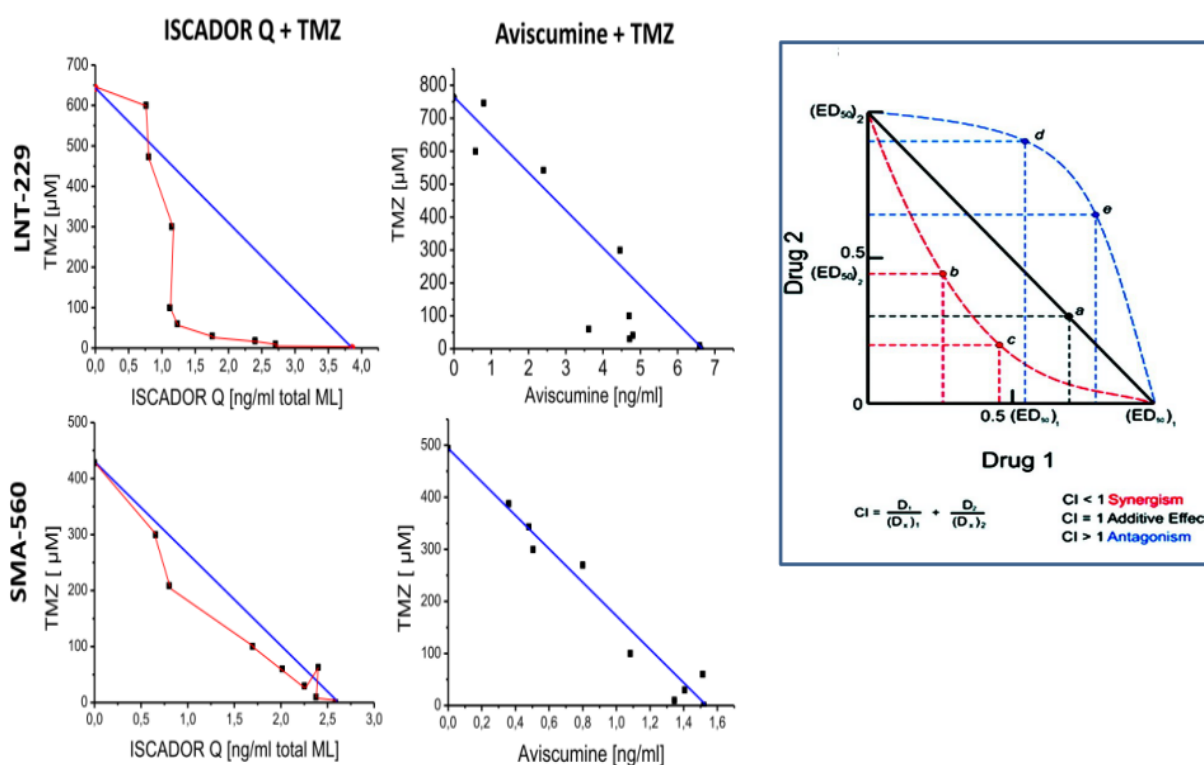


Abb. 22: Additive und synergistische Wirkung der adjuvanten Misteltherapie in GBM-Zellen. LNT-229- oder SMA-560-Zellen wurden mit unterschiedlichen TMZ- und/oder ISCADOR Qu- bzw. Aviscumine-Konzentrationen behandelt und Zelltod bestimmt. Synergistische Effekte wurden mittels Isobogramm-Analyse ermittelt. Die Berechnungen erfolgten aus den Daten dreier unabhängiger Experimente. Das Inlay rechts dient als ein Dokumentationsbeispiel für die Darstellung antagonistischer, additiver und synergistischer Effekte. Quelle: Pharmacological Reviews September 2006, 58 (3) 621-681.

In der Therapie des GBM wirkt TMZ vor allem als Zytostatikum, es reduziert, ähnlich wie die Bestrahlung des Tumors, die Zellteilungsrate der Tumorzellen. Wir haben daher im Folgenden untersucht, ob adjuvant zur Bestrahlung und Chemotherapie verabreichte Mistelpräparate die zytostatische Wirkung der Radio-Chemotherapie unterstützen. Hierzu haben wir das „klonogene Überleben,, (das Auswachsen einer Tumorzellpopulation aus einer einzelnen Tumorzelle) als ein Maß des zytostatischen Effekts gemessen. Die Behandlung Viscumin-sensitiver GBM-Zellen (LNT-229 und SMA560) zeigte, dass ISCADOR Qu, Aviscumine als auch natives ML-1, in Kombination mit Bestrahlung und TMZ, synergistisch wirken. In moderat-Viscumin-sensitiven LN-308-GBM-Zellen vermittelt die adjuvante Viscumin-Therapie hingegen einen additiven Effekt (Abb. 23). Diese Resultate lassen vermuten, dass auch in GBM-Patienten Mistelpräparate den Effekt der standardmäßig in der Klinik angewandten Therapie mittels Tumorbestrahlung und TMZ verstärken. Es muss daher darüber nachgedacht werden, ob bei einer Kombinationstherapie mit Mistelpräparaten evtl. eine geringere TMZ-Dosierung verwendet werden sollte, um unerwünschte Nebenwirkungen der Chemotherapie zu vermeiden.

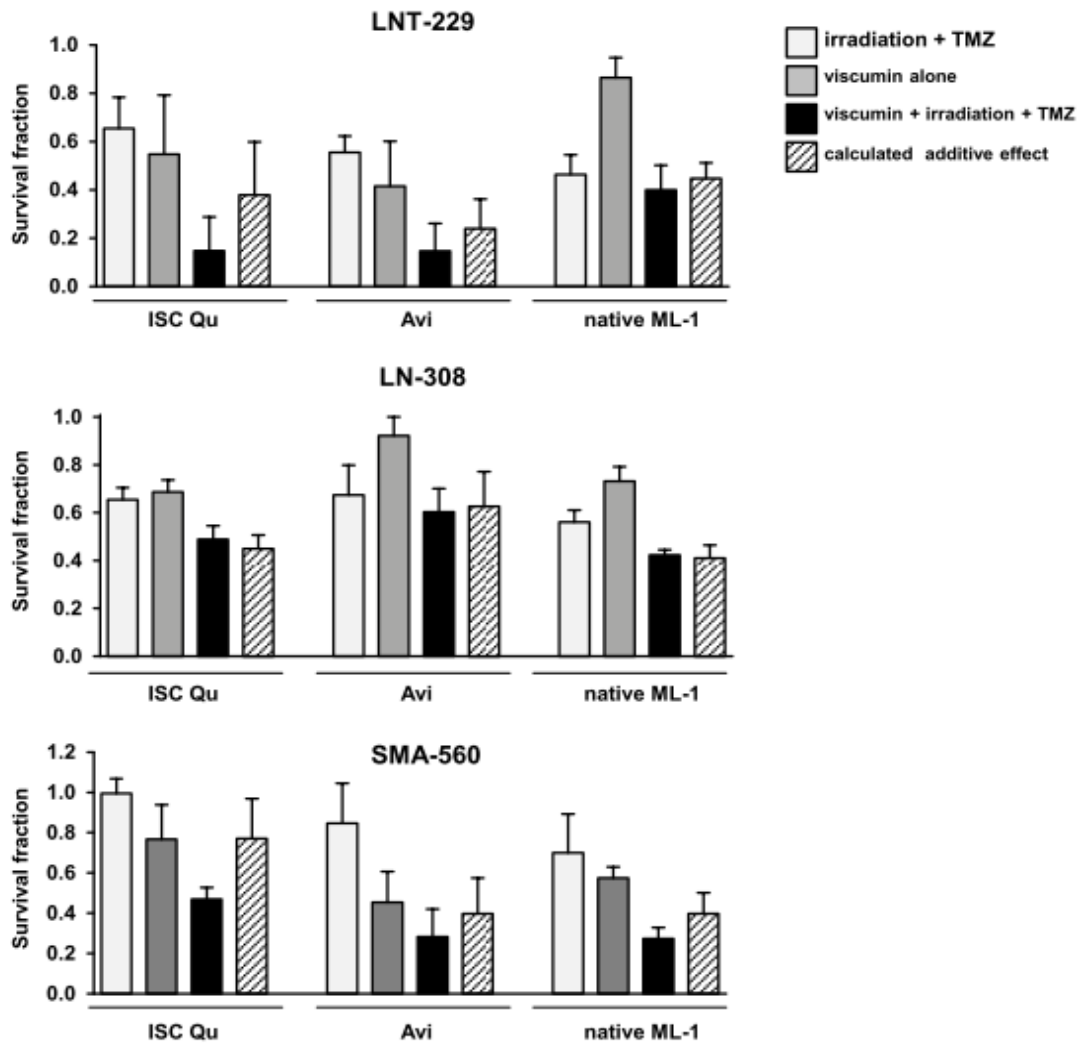


Abb. 23: Adjuvante Misteltherapie verstärkt den zytostatischen Effekt der Radio-Chemotherapie *in vitro*. GBM-Zellen wurden bestrahlt und erhielten TMZ (hellgrau), Viscumin-Monotherapie (dunkelgrau) oder Viscumin in Kombination mit Bestrahlung und TMZ (schwarz). Der additive Wert der drei Einzelbehandlungen wurde nach Webb et al (1960) berechnet (gestreift). LNT-229: 3 Gy, 3 μ M TMZ, 3.6 ng/ml ISC Qu or Avi, 4.8 ng/ml natives ML-1; LN-308: 1.5 Gy, 10 μ M TMZ, 16 ng/ml ISC Qu, Avi oder natives ML-1; SMA-560: 3 Gy, 30 μ M TMZ, 6.5 ng/ml ISC Qu, 1.5 ng/ml Avi oder 2 ng/ml natives ML-1. Zeigt die Dreifachbehandlung eine niedrigere Überlebensrate (survival fraction) als der kalkulierte additive Wert gilt die Aussage des synergistischen Effekts. Wenn die beiden Behandlungsschemata eine ähnliche Überlebensrate von GBM-Zellen induzieren handelt es sich um einen additiven Effekt (n=3; SD).

9. Die adjuvante Misteltherapie verlängert das Überleben von GBM-Mäusen

Die positiven Ergebnisse *in vitro* ermutigten uns, den anti-tumoralen Effekt der adjuvanten Misteltherapie auch im Tiermodell zu untersuchen, dieses wurde im Folgenden in orthotopen Maus-GBM-Modellen getestet. In ersten Tierversuchen (Jahre 1-3 der verlängerten Projektförderung) arbeiteten wir mit geringen Konzentrationen an ISCADOR Qu und Aviscumine, konnten jedoch mit dieser Niedrigdosis-Viscumine-Monotherapie im Tier nur geringe Erfolge hinsichtlich Lebensverlängerung erzielen. Im Weiteren haben wir dann für zwei verschiedene Applikationsformen (intra-tumorale oder subkutane Viscumin-Injektion)

den Effekt der adjuvanten Misteltherapie (in Kombination mit fokussierter Tumorbestrahlung und TMZ-basierter Chemotherapie) evaluiert. Wir haben zunächst die Toxizität sowohl von ISCADOR Qu als auch von Aviscumine nach Hochdosis-Injektion (> 700 ng Viscumin) in das Gehirn gesunder Mäuse analysiert. Für Aviscumine wurden weder pathologische noch verhaltensphysiologische Änderungen beobachtet. Dies galt zunächst auch für ISCADOR Qu, wir beobachteten jedoch später in Tumormäusen ein verfrühtes Sterben der Mäuse nach Hochdosis-ISCADOR Qu-Applikation. Daher wurde für das Therapiemodell der intra-tumoralen Visumin-Injektion in Kombination mit Bestrahlung und TMZ-Gabe nur Aviscumine verwendet. Natives ML-1 wurde, erstens aufgrund seiner *in vitro* meist geringen Wirkung und zweitens, da es als in der Klinik zugelassenes Therapeutikum nicht erhältlich ist, in den Tierversuchen nicht verwendet.

Für das Modell der adjuvanten, intra-tumoralen Misteltherapie wurden NMRI-Nacktmäusen LNT-229-Zellen in das rechte Striatum injiziert. Immundefiziente NMRI-Mäuse werden verwendet, da humane Tumorzellen nur in diesen Mäusen Tumoren bilden. Nach Anwachsen des Tumors wurden die Mäuse wie in Abb. 24 A gezeigt behandelt. Auch wenn die Verlängerung des medianen Überlebens der GBM-Mäuse durch adjuvante Misteltherapie in diesem Tiermodell kein Signifikanzniveau von 5% Fehlerwahrscheinlichkeit erreichte, so ist doch deutlich ein Trend zu verlängertem Überleben schon bei Hochdosis-Aviscumine-Monotherapie erkennbar (62 Tage in der Aviscumine-Gruppe versus 46,6 Tage in der Kontrollgruppe). Aviscumine zeigte dabei sogar bessere Effekte als die Bestrahlung des Tumors (62 Tage in der Aviscumine-Gruppe versus 57 Tage in der Bestrahlungsgruppe). LNT-229-GBM-Zellen sind sehr sensitiv für die Behandlung mit TMZ, daher wurde mit der TMZ-Monotherapie ein sehr guter Effekt hinsichtlich Lebensverlängerung bei den Tieren erzielt (75 Tage in der TMZ-Gruppe versus 46,5 Tage in der Kontrollgruppe). Trotzdem wurde in der adjuvanten Mistel-Anwendung durch Aviscumine eine Verlängerung des medianen Überlebens um weitere 6,5 Tage erreicht (90,5 Tage in der Aviscumine + TMZ + Bestrahlungs-Gruppe versus 84 Tage in der TMZ + Bestrahlungs-Gruppe, Abb. 24 B/C). Möglicherweise ist der Effekt der adjuvanten, intra-tumoral applizierten Aviscuminetherapie in TMZ-resistenten Tumoren deutlich besser als in TMZ-sensitiven Tumoren, dieses müsste jedoch in einem weiteren Tierversuch, z.B. für TMZ-resistente LN-308-Gliome, untersucht werden.

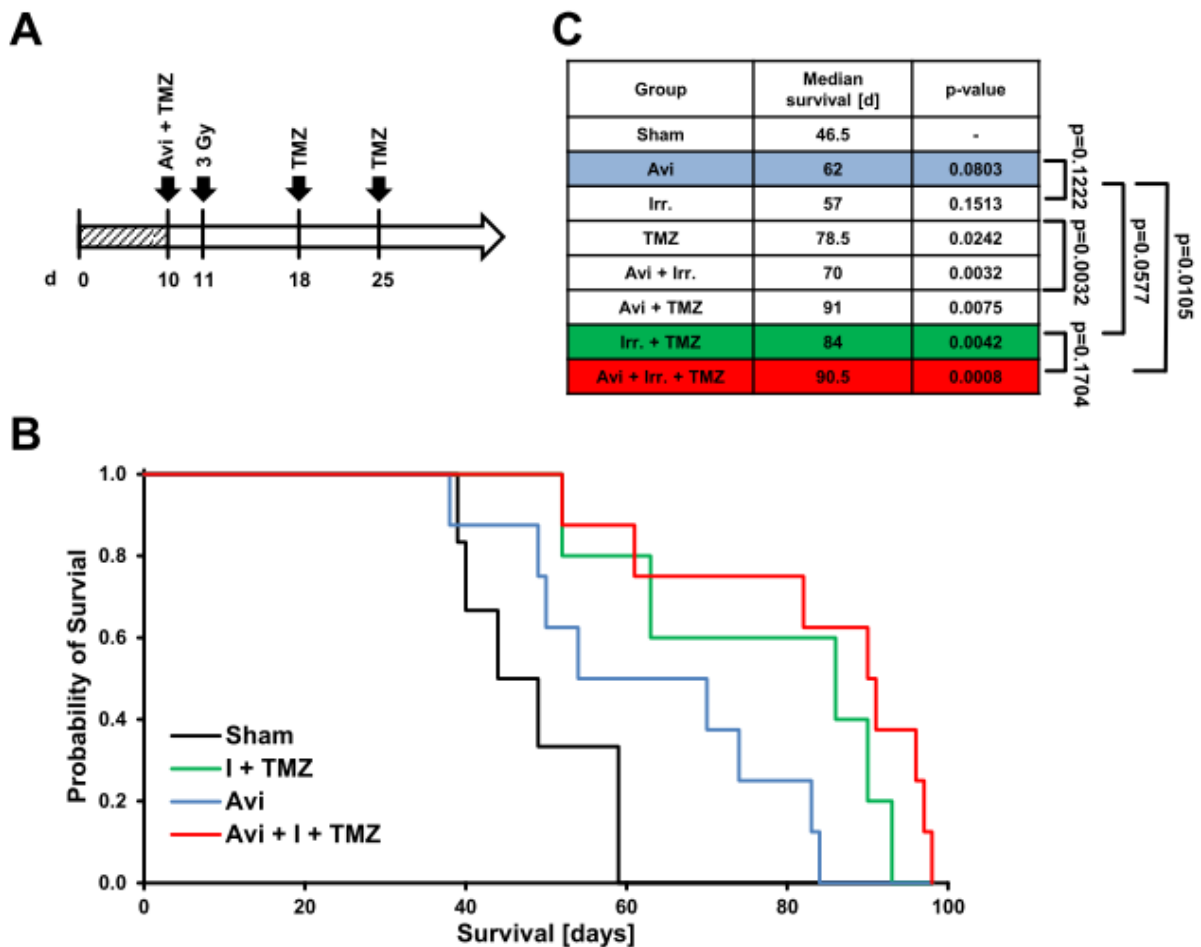


Abb. 24: Intratumorale Injektion von Aviscumine verlängert das mediane Überleben von LNT-229-GBM-Mäusen. A. Behandlungsschema. Aviscumine: 0,72 ng intratumoral; Bestrahlung: 3Gy; TMZ 2x wöchentlich 1,5 mg/kg intraperitoneal. B. Kaplan-Meier Überlebenskurven (Sham: Kontroll-behandlung; I: Bestrahlung, Avi: Aviscumine, TMZ: Temozolomid. C. Medianes Überleben. Signifikanz-analyse mittels log-rank Test (p-value; n=6-8 Mäuse).

Im Modell der immun-defizienten NMRI-Nacktmaus können immunstimulierende Effekte der Misteltherapie nicht untersucht werden. Um anti-tumorale Immuneffekte der adjuvanten Misteltherapie zu evaluieren haben wir ein murines, syngenes, hochaggressives Maus-GBM-Modell verwendet (SMA-560 GBM-Zellen in der syngenen VM/Dk-Maus). Wie oben beschreiben wurden SMA560-Zellen intrastriatal implantiert. Nachdem die Tumoren angewachsen waren, wurden die Mäuse wie in Abb. 25 A abgebildet behandelt. Die Misteltherapie erfolgt durch subkutane Injektionen von ISCADOR Qu in steigender Dosierung analog zum Therapiemodell, welches in der Klinik für Krebspatienten angewandt wird. Die Applikation der subkutanen Injektion wurde gewählt, da hiermit eine optimale Immunstimulation erreicht wird (Bussing 2006).

ISCADOR Qu-Monotherapie im immunkompetenten GBM-Maus-Modell verlängerte das mediane Überleben der Tiere um die gleiche Spanne wie die alleinige Bestrahlung des Tumors. Zwar lebten die Mäuse nur 2 Tage länger, dies ist im hier verwendeten,

hochaggressiven GBM-Modell jedoch schon ein zählbarer Effekt. TMZ-Monotherapie zeigt in diesem Modell keinen Therapieeffekt da SMA-560-Zellen hochgradig TMT-resistent sind. Die adjuvante Therapie mit ISCADOR Qu resultierte in diesem Modell in einer signifikanten Verlängerung des Überlebens, verglichen mit Monotherapie-Ansätzen oder der Radio-Chemotherapie. In SMA-560/VMDK-Gliommäusen wurde ein vergleichbares Experiment auch via subkutanen Aviscumine-Injektionen in steigender Dosierung durchgeführt, auch hier war ein Trend zu verlängertem Überleben bei adjuvanter Aviscumine-Therapie erkennbar (Daten nicht gezeigt).

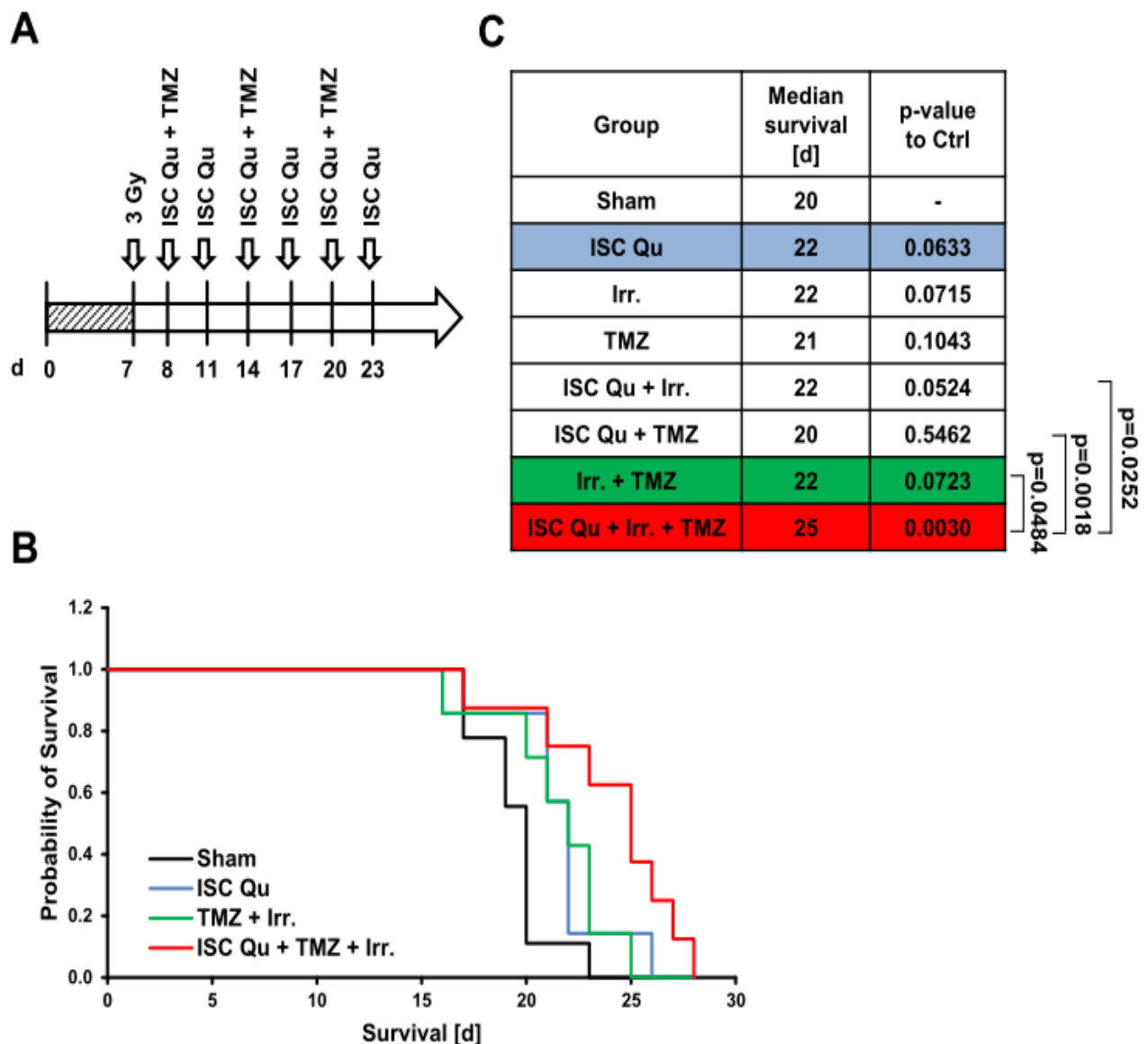


Abb. 25: Subkutane Injektionen von ISCADOR Qu verlängern das mediane Überleben von SMA-560-VMDK-GBM-Mäusen. A. Behandlungsschema . ISCADOR Qu: steigende Dosierung, subkutan, 2 x wöchentlich Bestrahlung: 3Gy; TMZ 2x wöchentlich 2,5 mg/kg intra-peritoneal. B. Kaplan-Meier Überlebenskurven (Sham: Kontrollbehandlung; I: Bestrahlung, Avi: Aviscumine, TMZ: Temozolomid. C. Medianes Überleben. Signifikanzanalyse mittels log-rank Test (p-value; n=6-8 Mäuse)

Um den immunstimulierenden Effekt von ISCADOR Qu nach subkutaner Injektion zu zeigen, haben wir die Konzentration von 40 Immun- und Entzündungs-Zytokinen im Serum Kontroll- und ISCADOR Qu-behandelter Mäuse bestimmt. Zehn Zytokine wurden durch ISCADOR Qu differenziell reguliert (Abb. 26). *B lymphocyte chemo-attractant* (BCL) wird mit längerem Überleben von Krebspatienten assoziiert (Bindea, Mlecnik et al. 2013). *Tissue inhibitor of metalloprotease*-(TIMP)-1 ist an der Regulation der Immunantwort beteiligt (Muthing, Meisen et al. 2004) während *Chemokine (C-C motif) ligand*-(CCL)-24 als Chemoattraktans für Eosinophile und ruhende T-Zellen fungiert. *Monokine induced by gamma interferon* (MIG) ist ein T-Zell Attraktans, das im Gliom an Prozessen der T-Zell Infiltration in den Tumor beteiligt ist (Mountz, Cheng et al. 1995). CCL-25/TECK ist ein Lymphozyten-Attraktans und vermutlich an der Reifung von T-Zellen im Thymus beteiligt (Mountz, Zhou et al. 1995). *Chemokine (C-X-C motif) ligand 5*/LIX und *macrophage inflammatory protein*-(MIP)-1 α /CCL3 sind proinflammatorische Zytokine und Neutrophil-Attraktans (Lee, Kim et al. 2017). CX3CL1 induziert im GBM das Einwandern inflammatorischer Monozyten in den Tumor, wohingegen der Verlust des CX3CL1 Rezeptors Tumorwachstum fördert (Zhou and Tedder 1995). *Colony stimulating factor* (CSF)-3 fördert Überleben und Wachstum neutrophiler Zellen sowie die Mobilisierung hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark (Tay, Levesque et al. 2017). Interleukin-6 (IL-6), ein bekanntermaßen durch die Misteltherapie induziertes pro-inflammatorisches und Fieber-induzierendes Zytokin (Hajto, Hostanska et al. 1990), war ebenfalls im Serum ISCADOR Qu-behandelter Mäuse in höheren Konzentration nachweisbar. Das IL-6 Analogon Leptin hingegen, welches im GBM Wachstum fördert (Han, Wang et al. 2012), war als einiges differenziell reguliertes Zytokin in ISCADOR Qu-behandelten Mäusen in geringerer Konzentration vorhanden. Zusammenfassend kann die Aussage getroffen werden, dass subkutane ISCADOR Qu Injektionen immunstimulierend wirken. Dies könnte den Überlebensvorteil ISCADOR Qu behandelte-Mäuse (sowohl in der Monotherapie als auch in der adjuvanten Therapie in Begleitung zur Radio-Chemotherapie) erklären.

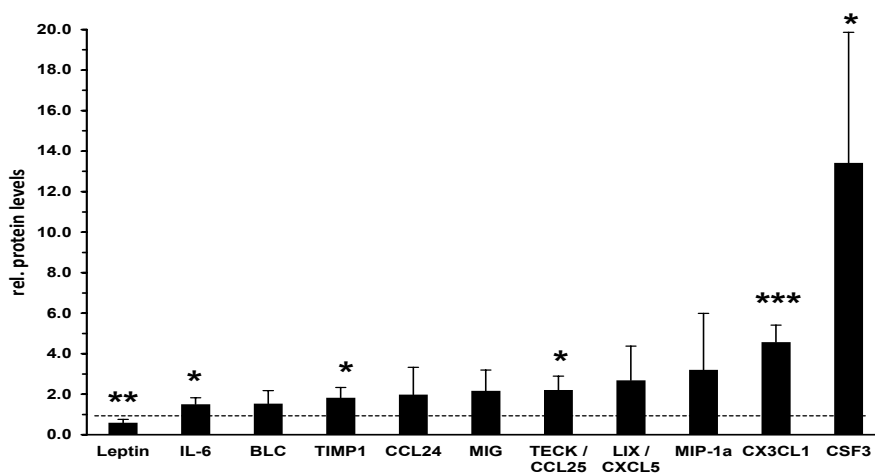


Abb. 26: Änderung der Zytokin-Konzentration im Serum ISCADOR Qu behandelte Mäuse.

Zytokin-Serumkonzentrationen wurden mittels Antikörper-basiertem Mikroarray bestimmt. Die ISCADOR Qu Behandlung der Mäuse Qu erfolgte durch subkutane Injektionen bei steigender Dosierung zwei Mal pro Woche. Die gestrichelte Linie zeigt die Konzentration des jeweiligen Zytokins in kontrollbehandelten Mäusen (4 Mäuse pro Gruppe; SD; Student's t-test *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001).

Zusammenfassend haben wir gezeigt, dass in präklinischen *in vitro* und *in vivo* GBM-Modellen sowohl ISCADOR Qu als auch Aviscumine, angewandt als adjuvante Therapeutika, positive Effekte bei der Behandlung des GBM vermitteln. Gut überlegt werden muss, welche Behandlungsstrategie gewählt wird. So könnten z.B. GBM mit hoher CD75s Expression mit einer intra-tumoralen Aviscumine-Injektion behandelt werden. In diesen Tumoren würde die hohe CD75s Expression Sensitivität für Aviscumin-induzierten Zelltod vermitteln. Aviscumine, welches im gesunden Hirngewebe, im Gegensatz zu ISCADOR Qu, keine toxische Aktivität zeigte und dessen intratumorale Injektion im Mausmodell einen positiven Effekt auf das Überleben von GBM-Mäusen zeigte, vermittelt seine anti-tumorale Wirkung in diesem Ansatz direkt auf die Tumorzellen.

Für die Behandlung CD75s-negativer Gliome bietet sich möglicherweise die subkutane Injektion von ISCADOR Qu an. Hier wird zur Therapie vermehrt der immunstimulierende Effekt der Viscumine genutzt. ISCADOR Qu, welches im gesunden Hirngewebe in höherer Dosis toxisch wirkte, wird bei diesem Ansatz nicht in das Gehirn oder den Tumor, sondern subkutan appliziert. Die Immunstimulation erfolgt somit außerhalb des Gehirns. ISCADOR Qu kommt somit in hoher Konzentration nicht direkt, oder nach dem Transport über die Blut-Hirn-Schranke, in nur geringer Konzentration mit gesunden Nervenzellen und den Tumorzellen in Berührung. In geringer Konzentration wirkt ISCADOR Qu zusätzlich motilitätshemmend (Schotterl, Hubner et al. 2017) und könnte somit, parallel zur anti-tumoralen Immunstimulation, auch bei geringer intra-tumoraler Konzentration, das invasive Wachsen des GBM vermindern.

Die von uns erhobenen Daten sind vielversprechend im Hinblick auf klinische Studien zur Evaluation der Effizienz einer adjuvanten Misteltherapie des GBMs.

10. Klinische Studie

An der Harvard Medical School in Boston, USA und federführend an der Universitätsklinik Freiburg wurde unter Leitung durch Dr. Gunver Kienle und Dr. Roman Huber, beide renommierte Ärzte im Bereich der Alternativmedizin, ein Studienprotokoll für eine klinische Studie zur adjuvanten Misteltherapie des GBM erarbeitet (GLOMIS, Abb. 27). Aufgrund der im vorliegenden Forschungsprojekt erhobenen positiven Daten zur adjuvanten Therapie des GBM mit Mistelpräparaten wurde ISCADOR Qu als ein verwendbares Therapeutikum in die Studie aufgenommen. Wir begrüßen es, dass ein Umdenken in der Schulmedizin erfolgt und die Misteltherapie weiterhin intensiv wissenschaftlich und klinisch bearbeitet wird. Ein Antrag auf Förderung der Finanzierung wurde Anfang 2017 bei der Deutschen Krebsgesellschaft eingereicht, leider wurde dort eine Förderung der Studie nicht bewilligt. Momentan ist Frau

Dr. Kienle, in Zusammenarbeit mit den Ärzten in Boston, auf der Suche nach neuen Sponsoren.



Clinical Trial Protocol

Phase II clinical trial on efficacy and safety of additive mistletoe extract therapy in combination with standard radiotherapy and chemotherapy in patients with newly diagnosed glioblastoma after surgical resection

Protocol Number P001234

GLIOMIS-trial

Neuro-Oncology

EudraCT No.	2016-001931-10
Internal Protocol ID No.	P001234
Protocol Version	V 1.0 / [28.04.2016]
Revision chronology, if applicable	n.a.
Development Phase	Phase II
Sponsor	Medical Center - University of Freiburg represented by the Executive Medical Director (Leitender Ärztlicher Direktor) Hugstetter Str. 49 D-79106 Freiburg
Coordinating Investigator (LKP in accordance with AMG)	Prov. Doz. Dr. med. Roman Huber

Abb. 27: Titelblatt des GLOMIS-Studienprotokolls

11. Zusammenfassung

Wir zeigten im präklinischen, experimentellen GBM-Modell *in vitro* und *in vivo* die Effekte der adjuvanten Misteltherapie. Viscumine induzieren zytostatische und zytotoxische Effekte in Tumorzellen in Abhängigkeit ihrer Konzentration, vermindern GBM-Zell-Migration und -Invasion, stimulieren anti-tumorale Immuneffekte und reduzieren Tumor-Neoangiogenese. Die Sensitivität für Viscumin-induzierten Zelltod korreliert mit der Expression des Rezeptors CD75s. CD75s könnte demnach möglicherweise als ein Marker für die Vorhersage des Ansprechens von Gliomen auf die Misteltherapie herangezogen werden.

In Zellkulturen wirken Viscumine auch auf Nicht-Tumorzellen toxisch, da Zellen unter Zellkulturbedingungen den Viscumin-Rezeptor CD75s hochregulieren. Toxische Effekte auf

gesundes Hirngewebe konnten, zumindest für Aviscumine, sowohl *ex vivo* in Gewebekulturen als auch *in vivo* in Mäusen, nicht festgestellt werden. ISCADOR Qu zeigt Toxizität im Mausgehirn erst in hoher Konzentration, unter diesen Bedingungen kommt der toxische Effekt der im Extrakt enthaltenen Viscotoxine zu Geltung. Viscumine können daher, bei korrekter Anwendung, als sichere Therapeutika angesehen werden.

Die Monotherapie mit Mistelpräparaten, appliziert in höherer Konzentration, zeigte *in vivo* einen Trend zur Überlebensverlängerung GBM-tragender Mäuse. Ein signifikant therapeutischer Effekt wurde erzielt, wenn Mistelpräparate als Adjuvans zur Radio-Chemotherapie angewandt wurden. Überlegt werden muss, welche Applikationsform (intratumoral versus subkutan) für die adjuvante Misteltherapie angewandt wird, in der geplanten klinischen Studie ist, aufgrund einfacher Anwendbarkeit, zunächst die subkutane Injektion vorgesehen.

Die Aussage, ob und in wie weit die adjuvante Misteltherapie Effekte bei der Behandlung von GBM-Patienten hat, kann erst nach Durchführung der GLIOMIS-Studie erfolgen.

12. Im Projektverlauf publizierte Manuskripte

- Schötterl, S., Miemietz, J. T., Veninga V., Ilina E.I., Wirsik, N. S., Romero, I.A., Ehrlich, I., Gall, A., Huber, S.M., Lentzen H., Mittelbronn, M., Naumann, U. Effects of Viscumins on the proliferation of glioblastoma and its combination with radiochemotherapy. (eingereicht bei BMC Complementary and Alternative Medicine)
- Schötterl, S., Hübner, M., Armento, A., Veninga, V., Wirsik, N.M., Bernatz, S., Lentzen, H., Mittelbronn, M., Naumann, U. Viscumins functionally modulate cell motility associated gene expression. *Int. J. Oncol.* 2017; 50: 684-696
- Schötterl, S., Mittelbronn, M., Lentzen, H., Naumann, U. Effects of mistletoe lectins on the natural killer (NK) cell activity against glioma cells. *Die Mistel in der Tumorthherapie IV*, KVC-Verlag Essen 2016; 149-160
- Schötterl, S., Naumann, U. Mistletoe compounds as anticancer drugs: Effects and mechanisms in the treatment of Glioblastoma. *Translational Research in Biomedicine: Mistletoe: From Mythology to Evidence-Based Medicine*, Karger Press, 2015; Vol. 4:48-57
- Podlech, O., Harter, P.N., Mittelbronn, M., Pöschel, S., Naumann, U. Fermented mistletoe extract as a multimodal antitumoral agent in gliomas. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012; 2012:501796.

13. Vorträge und Kongressbeiträge

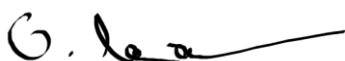
- Jahrestagung Deutsche Krebshilfe, Bonn-Königswinter 2010
- Summer School „Cellular stress responses“, Peking 2014
- ICEPHA Graduate Program „Membrane-Associated Drug Targets in Personalized Cancer Medicine“, Tübingen 2015
- Jahrestagung Deutsche Krebshilfe, Bonn-Königswinter 2015
- EORTC/EANO/ESMO, Istanbul 2015
- FOR2020 Rottenburg, 2015
- 6. Mistelsymposium, Nonnweiler 2015
- 100 Jahre Mistel in der Tumortherapie, DAMiD, Berlin 2017
- HIH Seminar, Tübingen 2017

14. Weitere Literatur

- Biddlestone-Thorpe, L., M. Sajjad, et al. (2013). "ATM kinase inhibition preferentially sensitizes p53-mutant glioma to ionizing radiation." *Clin Cancer Res* 19(12): 3189-3200.
- Bindea, G., B. Mlecnik, et al. (2013). "Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer." *Immunity* 39(4): 782-795.
- Blake, S. M., S. H. Stricker, et al. (2016). "Inactivation of the ATMIN/ATM pathway protects against glioblastoma formation." *Elife* 5.
- Bononi, A., C. Agnoletto, et al. (2011). "Protein kinases and phosphatases in the control of cell fate." *Enzyme Res* 2011: 329098.
- Büssing, A. (2006). "Immune modulation using mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador." *Arzneimittel-Forschung* 56(6A): 508-515.
- Eich, M., W. P. Roos, et al. (2013). "Contribution of ATM and ATR to the resistance of glioblastoma and malignant melanoma cells to the methylating anticancer drug temozolomide." *Mol Cancer Ther* 12(11): 2529-2540.
- Hajto, T., K. Fodor, et al. (2011). "Difficulties and perspectives of immunomodulatory therapy with mistletoe lectins and standardized mistletoe extracts in evidence-based medicine." *Evid Based Complement Alternat Med* 2011: 298972.
- Hajto, T., K. Hostanska, et al. (1990). "Increased secretion of tumor necrosis factors alpha, interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to beta-galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract." *Cancer Res* 50(11): 3322-3326.

- Han, G., L. Wang, et al. (2012). "Leptin promotes human glioblastoma growth through activating Signal Transducers and Activators of Transcription 3 signaling." *Brain Res Bull* 87(2-3): 274-279.
- Huber, R., M. Rostock, et al. (2006). "Immunologic effects of mistletoe lectins: a placebo-controlled study in healthy subjects." *J Soc Integr Oncol* 4(1): 3-7.
- Lee, S. Y., J. K. Kim, et al. (2017). "CD133 Regulates IL-1beta Signaling and Neutrophil Recruitment in Glioblastoma." *Mol Cells* 40(7): 515-522.
- Marampon, F., F. Megiorni, et al. (2017). "HDAC4 and HDAC6 sustain DNA double strand break repair and stem-like phenotype by promoting radioresistance in glioblastoma cells." *Cancer Lett* 397: 1-11.
- Mountz, J. D., J. Cheng, et al. (1995). "Autoimmunity, apoptosis defects and retroviruses." *Advances in experimental medicine and biology* 374: 183-201.
- Mountz, J. D., T. Zhou, et al. (1995). "Regulation of apoptosis in immune cells." *Journal of clinical immunology* 15(1): 1-16.
- Müthing, J., I. Meisen, et al. (2004). "Mistletoe lectin I is a sialic acid-specific lectin with strict preference to gangliosides and glycoproteins with terminal Neu5Ac alpha 2-6Gal beta 1-4GlcNAc residues." *Biochemistry* 43(11): 2996-3007.
- Schötterl, S., M. Hubner, et al. (2017). "Viscumins functionally modulate cell motility-associated gene expression." *Int J Oncol* 50(2): 684-696.
- Tay, J., J. P. Levesque, et al. (2017). "Cellular players of hematopoietic stem cell mobilization in the bone marrow niche." *Int J Hematol* 105(2): 129-140.
- Telles, E. and E. Seto (2012). "Modulation of cell cycle regulators by HDACs." *Front Biosci (Schol Ed)* 4: 831-839.
- Tonn, J. C. and R. Goldbrunner (2003). "Mechanisms of glioma cell invasion." *Acta neurochirurgica. Supplement* 88: 163-167.
- Wang, Z., P. Hu, et al. (2016). "HDAC6 promotes cell proliferation and confers resistance to temozolomide in glioblastoma." *Cancer Lett* 379(1): 134-142.
- Zhou, L. J. and T. F. Tedder (1995). "Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily." *Journal of immunology* 154(8): 3821-3835.

Tübingen, 11. Dezember 2017



Ulrike Naumann