

**Struktur und biologische Aktivitäten der chitinbindenden  
Mistellektine**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2003

vorgelegt von

Mirita Franz

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Dezember 2003

Dekan: Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. W. Voelter

2. Berichterstatter: PD Dr. S. Stoeva

Meiner Familie

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Wolfgang Voelter an der Abteilung für Physikalische Biochemie am Physiologisch-chemischen Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen in der Zeit von April 2000 bis November 2003 angefertigt.

Von Oktober 2000 bis September 2002 wurde die Arbeit durch das Land Baden-Württemberg nach dem Landesgraduiertenförderungsgesetz gefördert.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Wolfgang Voelter danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Des Weiteren bin ich ihm sehr dankbar für sein allzeit reges Interesse und seine freundliche und tolerante Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit.

Großer Dank gilt außerdem Frau PD Dr. Stanka Stoeva und Herrn Dr. Roland Wacker für die sehr gute wissenschaftliche Betreuung, die vielen Anregungen und ihre fortwährende Hilfsbereitschaft bei allen Problemen und Fragen.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an die ehemalige Auszubildende Frau Simone Vollmer für die selbständige und qualitativ hochwertige Mitarbeit im Labor, insbesondere bei der Durchführung der Validierung. Herzlich danken möchte ich auch Frau Heike Jaeger, Herrn Daniel Weber und Herrn Benjamin Rau für ihre stetige Mithilfe und die zuverlässige Durchführung der ihnen anvertrauten Aufgaben während ihrer Ausbildung in unserem Labor.

Die Durchführung der Antikörpertests erfolgte unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Reinhild Klein an der Abteilung für Innere Medizin II der Universitätsklinik Tübingen, wofür ich ihr sehr zu Dank verpflichtet bin.

Herrn Dr. Rainer Scheer und Herrn Sebastian Jäger (staatl. gepr. LM-Chemiker) vom Carl-Gustav-Carus-Institut in Niefern-Öschelbronn danke ich für die Bereitstellung der Abnobaviscum<sup>®</sup>-Mistelpräparate, die Informationen, mit deren Hilfe die Validierung durchgeführt wurde und die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Für die Zusammenarbeit bei der Durchführung der antifungalen Tests möchte ich mich herzlichst bedanken bei Frau Dipl. Biol. Andrea Schell und Herrn Dr. Dominik Begerow von der Abteilung für spezielle Botanik und Mykologie des Botanischen Instituts der Universität Tübingen.

Bei Herrn Prof. Dr. Christian Betzel und Frau Dr. Ruth Krauspenhaar vom Institut für Physiologische Chemie der Universitätsklinik Hamburg bedanke ich mich sehr für die Zusammenarbeit bei der Modellierung der cbML3-Kette.

Besonders großer Dank gilt meinem Mann Herrn Dr. Karsten Wachtel und meinem Sohn Arik, meinen Eltern und meinen Freunden Frau Dipl. Psych. Dipl. Päd. Stefanie Wekenmann und Herrn Dipl. Theol. Christian Handschuh für die vielseitige Unterstützung während der Fertigstellung dieser Arbeit und für ihr Verständnis und ihre Geduld.



## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	III
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die Botanik der Mistel	1
1.2 Die medizinische Bedeutung der Mistel seit der Antike	2
1.3 Inhaltsstoffe der Mistel	2
1.3.1 Mistellektin I (MLI)	6
1.3.2 Mistellektin II (MLII) und Mistellektin III (MLIII)	9
1.3.3 Die chitinbindenden Mistellektine	10
1.4 Medizinisch angewandte Mistelextrakte	11
1.4.1 Abnobaviscum <sup>®</sup> -Präparate	11
1.4.2 Iscador <sup>®</sup> -Präparate	12
1.4.3 Helixor <sup>®</sup> -, Iscucin-Viscum <sup>®</sup> - und Vysorel <sup>®</sup> -Präparate	12
1.4.4 Eurixor <sup>®</sup> - und Plenosol <sup>®</sup> -Präparate	12
1.5 Ziel dieser Arbeit	14
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1 Material	16
2.1.1 Geräte	16
2.1.2 Materialien	16
2.2 Methoden	20
2.2.1 Herstellung des Mistelextrakts	20
2.2.2 Kationenaustauschchromatographie zur Vorfraktionierung von Mistelproteinen	20
2.2.3 Isolierung der chitinbindenden Mistellektine (cbMLs) durch Affinitätschromatographie	20
2.2.4 Nachreinigung der chitinbindenden Mistellektine über RP HPLC	21
2.2.4.1 Nachreinigung der affinitätsgereinigten cbMLs unter gleichzeitiger Auftrennung in die Isoformen	21
2.2.4.2 Nachreinigung der cbMLs bei niedriger TFA-Konzentration	21
2.2.5 Proteinbestimmung nach Bradford	21
2.2.6 Hämagglutininierungstest	22
2.2.7 Aminosäureanalyse	22
2.2.8 Reduktion und Alkylierung von Cysteinresten	23
2.2.9 Enzymatische Spaltung der alkylierten cbML-Isoformen	23

---

2.2.10 Massenspektrometrie	23
2.2.11 Aminosäuresequenzanalyse	24
2.2.12 Datenbanksuche nach homologen Proteinen und Sequenzalignment	24
2.2.13 Modellierung der Struktur einer unverkürzten cbML-Kette	25
2.2.14 Isolierung und Quantifizierung der cbMLs aus Mistelextrakten und die Validierung dieser Methode	25
2.2.14.1 Reinigung von Roh-Chitin	25
2.2.14.2 Mikroisolierung der chitinbindenden Mistellektine im „Batch“-Verfahren	25
2.2.14.3 Erstellung einer Kalibriergeraden zur Quantifizierung der cbMLs in Mistelextrakten	26
2.2.14.4 Systemeignungstest	26
2.2.14.5 Validierung	27
2.2.14.6 Statistische Auswertung der Ergebnisse	29
2.2.15 Antikörpertests gegen cbML3, MLI und MLIII	31
2.2.15.1 Antikörperdetektion	31
2.2.15.2 Patienten	32
2.2.16 Test auf antifungale Wirkungen der chitinbindenden Mistellektine	34
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>36</b>
3.1 Isolierung der chitinbindenden Mistellektine	36
3.2 Primärstruktur der cbML-Isoformen und „Molecular Modeling“	44
3.3 Isolierung und Quantifizierung der chitinbindenden Mistellektine aus Mistelextrakten und die Validierung dieser Methode	52
3.4 Bildung von anti-cbML-Antikörper bei Tumorpatienten während einer Mistelextrakttherapie	69
3.5 Antifungale Eigenschaften der chitinbindenden Mistellektine	76
<b>4. Diskussion</b>	<b>79</b>
4.1. Isolierung und Strukturaufklärung der cbML-Isoformen	79
4.2. Quantifizierung der chitinbindenden Mistellektine in Mistelpräparaten und die Validierung dieser Methode	84
4.3. Wirkung der chitinbindenden Mistellektine auf das spezifische Immunsystem	88
4.4. Biologische Aktivitäten der chitinbindenden Mistellektine	90
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>94</b>
<b>6. Literatur</b>	<b>97</b>

**Abkürzungen**

A/Ala	Alanin
a	Jahre
A <sub>595</sub>	Absorption bei 595 nm
Abb.	Abbildung
AC	Affinitätschromatographie
<i>Ac</i> -AMPs	<i>Amaranthus caudatus</i> antimikrobielle Peptide
AHC	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxymzimtsäure
AK	Antikörper
aq. bidest.	aqua bidestilliert
AS	Aminosäure
ASA	Aminosäureanalyse
AU	Absorptionseinheiten
BSA	Rinderserumalbumin
C/Cys	Cystein
cbMLs	chitinbindende Mistellektine
<i>Cs</i>	<i>Candida sake</i>
D/Asp	Asparaginsäure
d	Schichtdicke der Küvette
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DC	Dünnschichtchromatographie
dest.	destilliert
<i>Dh</i>	<i>Debaryomyces hanessii</i>
DHB	2.5-Dihydroxybenzoesäure
DIN	Deutsche Industrienorm
DLA cells	Dalton's lymphoma ascites Tumorzellen
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E/Glu	Glutaminsäure
eE-CBP	<i>Euonymus europaeus</i> L. chitinbindendes Protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
F/Phe	Phenylalanin

---

G/Gly	Glycin
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Acetyl-Galaktosamin
Glc	Glukose
GlcNAc	N-Acetyl-Glukosamin
H/His	Histidin
h	Stunde
HAc	Essigsäure
HCl	Salzsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HU	Hämagglutinierende Einheiten
I/Ile	Isoleucin
IC <sub>50</sub>	„inhibition concentration“ auf 50% der Ausgangszellen/-organismen
ICH	International conference on harmonization
IEC	Ionenaustauschchromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i. v.	intravenös
K/Lys	Lysin
Konf	Konfidenzintervall
L/Leu	Leucin
LC	Flüssigchromatographie
LC-Fragment	Endoproteinase LysC-Fragment
LD <sub>50</sub>	letale Dosis auf 50% der Ausgangsindividuen
LGL	Large granular lymphocytes
Lys	Lysin
M/Met	Methionin
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorptionsionisation
min	Minute
<i>Mj</i>	<i>Microstroma juglandis</i>

---

ML	Mistellektin
MG	Molekulargewicht
MS	Massenspektroskopie
m/z	Masse zu Ladungs-Verhältnis
N/Asn	Asparagin
NaCl	Natriumchlorid
NAG3	Tri-N-Acetylchitotriose
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
n. s.	nicht signifikant
OD	optische Dichte
P/Pro	Prolin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
Pn-AMPs	<i>Pharbitis nil</i> L. antimikrobielle Peptide
PTH	Phenylthiohydantoin
Q/Gln	Glutamin
R/Arg	Arginin
RIP	Ribosomen-inaktivierendes Protein
RP	Umkehrphase („reversed phase“)
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S/Ser	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssp.	Subspecies
T/Thr	Threonin
TEMED	N,N,N',N', Tetramethylethylendiamin
<i>Tf</i>	<i>Tremella foliacea</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TOF	Flugzeit
TRIS	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
Typ II RIPs	Typ II Ribosomen-inaktivierende Proteine
UDA	<i>Urtica dioica</i> Agglutinin

UV	Ultraviolett
V/Val	Valin
VisalbCBA	<i>Viscum album</i> chitinbindendes Agglutinin
VS	Verdünnungsstufe
VT	Viscotoxine
W/Trp	Tryptophan
WGA	Weizenkeimagglutinin („wheat germ agglutinin“)
Wk	Wachstumskontrolle
Y/Tyr	Tyrosin

## 1. Einleitung

### 1.1 Die Botanik der Mistel

Die Gattung Mistel (*Viscum*) gehört zur Familie der Mistelgewächse (*Viscaceae*) und diese zur Ordnung der Sandelholzartigen (*Santalales*). Die Mistelgewächse mit ihren 40 Gattungen und ca. 1400 Arten sind vor allem in den Tropen verbreitet. In Mitteleuropa sind z. B. die Gattungen *Loranthus* mit der Riemenblume (*Loranthus europaeus*) und *Viscum* mit der Weißen Mistel (*Viscum album* L.) vertreten [1-3].

*Viscum album* L. ist eine immergrüne, zweihäusige Pflanze mit kleinen, unscheinbaren Blüten und länglich-ovalen Blättern von monofazialen Bau. Aus den weiblichen Blüten gehen klebrige, weißliche Scheinbeeren hervor, während die männlichen die Pollen enthalten, die durch Wind, Fliegen und andere Insekten verbreitet werden und so zur Befruchtung führen. Die Mistel ist ein Hemiparasit, der auf Bäumen wächst und diesen Wasser und Mineralsalze entzieht, selbst aber zur Photosynthese befähigt ist. Die Verbreitung der im Spätherbst/Winter herangereiften Beeren erfolgt durch Vögel (Mönchsgrasmücke, Misteldrossel, Wacholderdrossel, Seidenschwanz). Der Keimling sitzt dem Wirt mit einer Haftscheibe, die aus dem Hypokotyl entstanden ist, auf und findet durch daraus auswachsende Senker Anschluß an das Leitgewebe des Baums. Misteln bilden kleine, stark verzweigte Büsche von runder Form mit Durchmessern bis zu über einem Meter. Ihre Lebensdauer kann bis zu 30 Jahre betragen, in seltenen Fällen sogar 70 Jahre [1-3]. *Viscum album* L. lässt sich, je nach Wirtsbaum und Verbreitungsgebiet in verschiedene Subspezies (ssp.) gliedern [1-3]:

#### *Viscum album* L. ssp. *album* (Laubholzmistel)

Die Laubbaummistel wächst vor allem auf Apfelbäumen, Pappeln und Weiden, außerdem sieht man sie auf Birken, Weißdorn, Linden, Ahorn-, Mandel- und Walnussbäumen, seltener auf Eichen. Ihre runden Beeren haben eine weiß-gelbliche Farbe, die Blätter sind bräunlich-grün und haben eine Lebensdauer von ungefähr 1.5 Jahren.

#### *Viscum album* L. ssp. *abietis* (Tannenmistel)

Diese Subspezies kommt ausschließlich auf Tannen vor, in Mitteleuropa vor allem auf Weißtannen. Sie haben große weiße Beeren und dunkelgrüne, lappige Blätter, die erst nach mehr als zwei Jahren abfallen.

### *Viscum album* L. ssp. *austriacum* (Kiefernmistel)

Die Kiefernmistel sieht man in Deutschland vor allem auf der Waldkiefer, ansonsten wächst sie auf allen Kiefernarten. Ihre Beeren sind klein und haben eine gelbliche Farbe. Die schmalen, bräunlich-grünen Blätter haben eine etwas kürzere Lebensdauer als die der Tannenmistel.

Außerdem gibt es die Koreanische Mistel (*Viscum album* L. var. *coloratum*), die auf einigen asiatischen Laubbäumen wächst [1, 2, 4-6].

## **1.2 Die medizinische Bedeutung der Mistel seit der Antike**

Bezeichnungen wie Donner- oder Hexenbesen, Drudenfuß, „omnia sanatem“ (Alles-Heilende), „Maretakken“ (Mahr = Nachtgespenst; Takken = Zacken, Spitze, Zweig), „herbe du serpent“ (Schlangenkraut) oder Bocksfutter, die die Mistel im Lauf der Zeit seit der Antike erhielt, machen deutlich, welche kultische und mystische, aber auch medizinische Bedeutung diese Pflanze schon seit jeher für die Menschen hatte. Sie taucht in keltisch-gallischen und germanischen Mythen und Sagen, wie der Edda, auf. Das Aufhängen von Mistelzweigen zwischen Weihnachten und Neujahr ist ein aus England stammender Brauch und soll Glück bringen („no mistletoe, no luck“). Bereits Hippokrates (460-377 v. Chr.) empfahl Mistelextrakte gegen die „Milzsucht“. Im Mittelalter wurde die Mistel in fast allen Kräuterbüchern erwähnt. Verschiedene Mistelpräparate wurden gegen Epilepsie („die fallende Sucht“) und sogenannte Frauenleiden eingesetzt, außerdem gegen Ohrenschmerzen, Knochenbrüche und Tumore [7]. Anfang des 20. Jahrhunderts wurde die blutdrucksenkende Wirkung von Mistelpräparaten beschrieben [8]. 1920 legte dann Rudolph Steiner den Grundstein für den Einsatz von Mistelpräparaten in der Krebstherapie [9]. Von nun an konzentrierten sich weltweit viele Wissenschaftler auf die Aufklärung der Inhaltsstoffe der Mistel, insbesondere der Weißen Mistel (*Viscum album* L.), und deren tumorhemmenden, cytotoxischen und immunmodulatorischen Wirkungen. In der Zwischenzeit werden Misteltherapien vor allem in der onkologischen Nachsorge durchgeführt. Sie erfolgen adjuvant und/oder palliativ, meistens in Kombination mit Strahlen- und Chemotherapien.

## **1.3 Inhaltsstoffe der Mistel**

Bis heute wurden zahlreiche Inhaltsstoffe der Mistel isoliert, identifiziert und z. T. strukturell und pharmakologisch charakterisiert:

Mistelbeeren enthalten als Hauptbestandteil ein **Glykogalaktopentosan**, außerdem **Oleanol-, Cerotin-, Linol- und Linolensäure** [10]. Die Blätter und Stengel enthalten **Monosaccharide** und **Zuckeralkohole** (Glukose, Mannosid, Inosit), **Sterine** und **Triterpene** ( $\beta$ -Sistosterin und  $\beta$ -Amyrin, Oleanolsäure), verschiedene **Pflanzensäuren** (u. a. Anis-, Kaffee-, Shikimi-, Protocatechusäure) [10] und freie **Aminosäuren**, vor allem Arginin (40%), Asparaginsäure (11%) und Prolin (10%), jedoch u. a. kein Tryptophan, Asparagin, Glutamin, Histidin [10, 11]. Zu den für die Mistel charakteristischen und medizinisch bedeutsamen Inhaltsstoffen zählen biogene Amine, Flavonoide, Membranlipide, Alkaloide, Phenylpropane, Lignine und Lignane, außerdem Polysaccharide und Proteine, insbesondere Viscotoxine und Lektine (Tabelle 1). Unter den **biogenen Aminen** findet man u. a. Cholin, Acetylcholin,  $\beta$ -Phenylamin,  $\gamma$ -Aminobuttersäure, Histamin und Tyramin. Sie werden in Zusammenhang mit einer möglichen blutdrucksenkenden Wirkung von Mistelextrakten gebracht [10]. Zu den in der Mistel enthaltenen **Flavonoiden** zählen vor allem die Glukoside des Quercetins und seiner Methylether, die im Tierversuch eine tumorhemmende Wirkung zeigten und die Kollagenase IV inhibierten [1, 10, 12]. Die einzigen gut charakterisierten **Alkaloide** sind Nicotinsäuremethylester und Viscumamid, isoliert aus *Viscum album* Linn. var. *coloratum* Ohwi, einer japanischen Mistel [1, 13]. Viscumamid ist ein aus 3 Molekülen Leucin und 2 Molekülen Isoleucin bestehendes cyclisches Peptid, über dessen pharmakologische Wirkung aber bisher nichts bekannt ist. **Phenylpropanverbindungen** und **Lignane**, darunter Syringeninglykoside und Eleutherosid E, haben Bedeutung bei der Charakterisierung und Chargenkontrolle von Mistelpräparaten über HPLC-Fingerprintanalyse [1, 14]. Über ein spezielles Verfahren zur Herstellung von Mistelextrakten wurden chlorophyllhaltige Vesikel isoliert, die vor allem **Membranlipide** aus Chloroplasten enthielten und *in vitro* die Proliferation von CD4<sup>+</sup>-T-Lymphocyten mistelbehandelter Tumorpatienten stimulierten. Dabei handelte es sich um eine antigenabhängige oligoklonale Stimulation [15]. Den Hauptteil der in der Mistel enthaltenen **Polysaccharide** findet man in den Beeren, darunter Arabinogalaktane, deren Grundgerüst sich aus  $\beta(1\rightarrow6)$ -D-Galaktose-Ketten zusammensetzt, die über ein Rhamnogalakturonan miteinander verknüpft sind (mittleres Molekulargewicht: ca. 110 kDa). Außerdem kommen geringe Mengen veresterte  $\alpha(1\rightarrow4)$ -D-Galakturonane (Molekulargewicht: ca. 42 kDa) vor. Die Blätter und Stengel der Mistel enthalten weitaus weniger Polysaccharide, darunter mehr D-Galakturonane und dafür wenig Arabinogalaktane [1, 16]. Verschiedene *in vitro*-Tests demonstrierten eine Stimulierung der Aktivität von humanen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, NK-Zellen und Phagocyten durch Polysaccharide der Mistel [10, 16-19].

**Tabelle 1.** Übersicht über medizinisch wirksame Komponenten der Mistel.

<b>Pharmakologisch relevante Mistelinhaltsstoffe</b>	<b>Wirkung</b>	<b>Literatur</b>
<b>Biogene Amine</b> (u. a. Cholin, Acetylcholin, $\beta$ -Phenylamin, $\gamma$ -Aminobuttersäure, Histamin, Tyramin)	<b>Blutdrucksenkung?</b>	<b>[10]</b>
<b>Flavonoide</b> (v. a. Glukoside des Quercetins bzw. dessen Methylether)	<b>Tumorhemmung</b> (im Tierversuch) <b>Inhibierung der Kollagenase IV</b>	<b>[1, 10, 12]</b>
<b>Alkaloide</b> (v. a. Nicotinsäuremethylester, Viscumamid)		<b>[1, 13]</b>
<b>Phenylpropanverbindungen, Lignane</b>	<b>Charakterisierung von Mistelextrakten über HPLC-Fingerprintanalyse</b>	<b>[1, 14]</b>
<b>Chlorophyllhaltige Vesikel</b> (Membranlipide)	<b><i>in vitro</i>-Stimulation von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen</b>	<b>[15]</b>
<b>Polysaccharide</b> (Arabinogalaktane, veresterte $\alpha(1\rightarrow4)$ -D-Galakturonane)	<b><i>in vitro</i>-Stimulation von Phagocyten, CD4<sup>+</sup>-T- und NK-Zellen</b>	<b>[1, 10, 16-19]</b>
<b>Viscotoxine</b> (Viscotoxine A1, A2, A3, B, 1-PS)	<b>nekrotisch</b> <b><i>in vitro</i>-Stimulation phagozytischer humaner Granulozyten</b> <b>Unterstützende Wirkung auf NK-Zellen</b> <b>DNA-Stabilisierung</b>	<b>[1, 20-35]</b>
<b>Lektine der Typ II RIPs</b> (Mistellektine I, II, III)	<b>apoptotisch</b> <b><i>in vitro</i>- und <i>in vivo</i>-Stimulierung weiterer Teile des Immunsystems</b>	<b>[1, 36-46, 48-93]</b>
<b>Chitinbindende Mistellektine</b> (VisalbcBA, cbMLs)	<b>cytotoxisch?</b>	<b>[47, 95-97]</b>

Die **Viscotoxine** sind basische Proteine, gehören zur Familie der Thionine und haben ein Molekulargewicht von ca. 5 kDa. Ihre isoelektrischen Punkte liegen bei pH 11. Sie bestehen

aus ca. 46 Aminosäuren und haben drei intramolekulare Disulfidbrücken, die für die außerordentlich hohe strukturelle Stabilität dieser Peptide verantwortlich sind [1]. Bisher sind die sich in nur wenigen Aminosäuren unterscheidenden Aminosäuresequenzen der vier Viscotoxine A1, A2, A3 und B aus *Viscum album* L. ssp. *album* und Viscotoxin 1-PS aus *Viscum album* L. ssp. *austriacum* bekannt [20-25]. Von Viscotoxin A3 existiert bereits eine NMR-Struktur [26]. Viscotoxine permeabilisieren Zellmembranen, was zum nekrotischen Zelltod führt [27-29]. Der LD<sub>50</sub>-Wert liegt bei i.v.-Gabe im Tierversuch mit Mäusen bei ca. 0.1 mg/kg Körpergewicht [1]. In einer Konzentration > 25 µg/ml erhöhen Viscotoxine *in vitro* die Phagozytose-Aktivität humaner Granulozyten [30-31], und in nichttoxischen Konzentrationen unterstützen sie die cytotoxische Wirkung von NK-Zellen auf eine noch undefinierte Art und Weise [32]. Im Blut von mit Mistelextrakten behandelten Tumorpatienten ließen sich Antikörper vom IgG-Typ gegen die Viscotoxine A1, A2, A3 und B nachweisen [33-34]. Antikörper vom IgE-Typ wurden nur gegenüber Viscotoxin B gefunden [34]. Viscotoxine binden über ionische Wechselwirkungen an DNA und stabilisieren diese dadurch [35].

**Lektine** sind Proteine, die Kohlenhydratstrukturen erkennen und an diese spezifisch und reversibel binden. Sie gehören aber weder zu den Immunglobulinen, noch zu den Enzymen und kommen bei fast allen Lebewesen vor, sowohl bei Viren und Bakterien, als auch bei Pflanzen, Tieren und Menschen [1]. Das erste Lektin wurde von Stillmark aus dem Samen von *Ricinus communis* isoliert und Hämagglutinin genannt [36], eine Bezeichnung, die eine wichtige Eigenschaft von divalenten Lektinen hervorhebt, nämlich die Fähigkeit, Erythrocyten zu aggregieren. In *Viscum album* L. wurden erstmals im Jahre 1956 Substanzen mit hämagglutinierenden Eigenschaften beschrieben und Phythämagglutinine genannt [37], und Vester *et al.* isolierten Proteinfractionen aus der Mistel mit hohen kanzerostatischen Eigenschaften [38]. Mittels Affinitätschromatographie an fixierten Plasmaproteinen konnten Franz *et al.* ein Mistellektin mit agglutinierenden und cytotoxischen Eigenschaften isolieren [39]. Wenige Jahre später gelang es schließlich, drei Lektine mit unterschiedlichen Molekulargewichten und Zuckerspezifitäten aus der europäischen Mistel zu isolieren [40], die alle zur selben Proteinfamilie gehören [41] und als Mistellektine I, II und III (MLI, MLII, MLIII) bezeichnet werden. Sie hämagglutinieren humane Erythrocyten, sind hochtoxisch und gehören zu den Typ II Ribosomen-inaktivierenden Proteinen (Typ II RIPs), bestehend aus einer A(„active“)- und einer B(„binding“)-Kette. Erstere besitzt enzymatische Aktivität, d. h. sie führt als N-Glykosidase in der 28 S rRNA eukaryontischer Ribosomen eine Apurinstelle ein, inaktiviert dadurch die große Ribosomenuntereinheit und hemmt die Proteinsynthese [42-

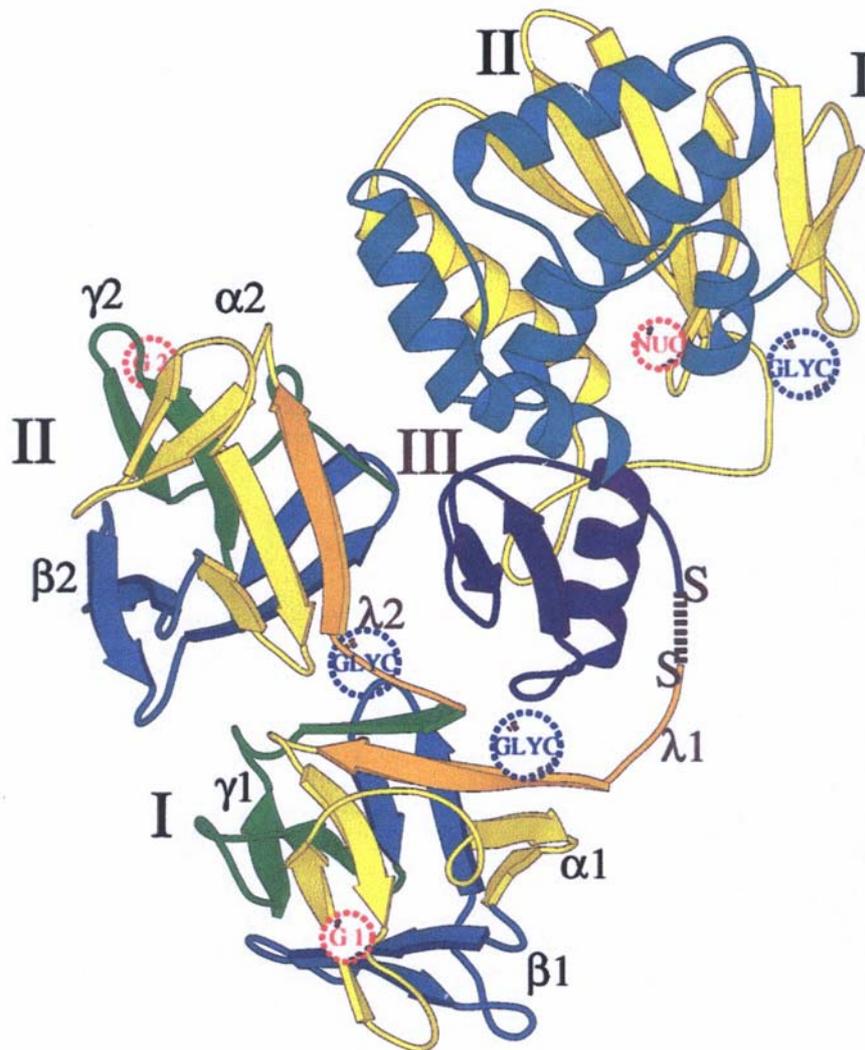
45]. Die für Lektine typische Eigenschaft der Zuckerbindung erfolgt über die B-Kette. Sie bindet spezifisch an Zelloberflächenrezeptoren und ermöglicht dadurch die Aufnahme der A-Kette in die Zelle [42]. Aufgrund ihrer verschiedenen Zuckerspezifitäten lassen sich MLI, MLII und MLIII mittels Affinitätschromatographie aus Mistelextrakten isolieren [40, 46]. Vor wenigen Jahren wurde ein weiteres Mistellektin isoliert, welches sich von den Typ II RIPs stark unterscheidet, jedoch zu den chitinbindenden Pflanzenproteinen homolog ist [47].

### 1.3.1 Mistellektin I (MLI)

Mistellektin I, ein Glykoprotein und das bisher am besten untersuchte Mistellektin, besteht aus einer 254 Aminosäure langen A-Kette (MLIA) mit einem Molekulargewicht von 29650 Da und einer, in Abhängigkeit von der Glykosylierung, bis zu 32915 Da schweren B-Kette (MLIB) aus 264 Aminosäuren. Die Primärsequenzen der A- und B-Kette wurden sowohl über N-terminale Sequenzierung nach Edman, als auch mit molekularbiologischen Methoden bestimmt [48-50]. Die Ergebnisse zeigten eine hohe Homologie zu Ricin aus *Ricinus communis*, ebenfalls ein Typ II Ribosomen-inaktivierendes Protein [42, 51]. Auf der Grundlage der Röntgenstruktur von Ricin [52-53] wurde zunächst ein dreidimensionales Modell von MLI erstellt [54] und dann, kurze Zeit später, ebenfalls die Röntgenstrukturdaten des Mistellektins ermittelt (Abb. 1) [55]. Die globuläre A-Kette besteht aus drei Domänen (AI, AII, AIII) mit  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblattstrukturen, während die, aus zwei Domänen (BI, BII) mit jeweils drei homologen Subdomänen ( $\alpha$ 1/2,  $\beta$ 1/2,  $\gamma$ 1/2) und zwei Linkerregionen ( $\lambda$ 1/2) aufgebaute B-Kette nur  $\beta$ -Sekundärstrukturelemente hat. Die Dimerbildung der beiden Untereinheiten von MLI erfolgt über eine Disulfidbrückenverknüpfung, die zwischen Cys247 der A-Kette und Cys5 der B-Kette liegt. Letztere besitzt außerdem drei intramolekulare Disulfidbrücken (Cys64→Cys81, Cys152→Cys165, Cys192→Cys209), die bezüglich Ricin stark konserviert sind. Die A-Kette hat an Asn112 eine Glykosylierungsstelle, während die B-Kette derer insgesamt drei hat (Asn61, Asn96, Asn136) [56]. Sowohl die Struktur der Oligosaccharide, als auch deren Zuordnung an die jeweiligen N-Glykosylierungsstellen wurden bereits bestimmt [56-57]. Der Kohlenhydratanteil liegt, in Abhängigkeit vom Wirtsbaum, Geschlecht der Mistel und Erntezeit zwischen 4 und 11.8 % [42, 46, 58]. Die B-Kette von MLI besitzt zwei, unterschiedlich stark affine Zuckerbindestellen, spezifisch für D-Galaktose und Galaktosid-enthaltende Di- und Oligosaccharide, wobei die unmodifizierten Hydroxylgruppen am C-2, C-3 und C-4 des D-Galaktopyranosylringes essentiell für die Wechselwirkung zwischen Lektin und Zucker sind [40, 58-60]. Schon in einer Konzentration von 0.25  $\mu$ g/ml hämagglutiniert Mistellektin I humane Erythrocyten der Blutgruppe B [1].

Dabei tritt das divalente Lektin mit den Zuckerstrukturen der Zelloberflächen in Wechselwirkung, was zur Vernetzung der roten Blutkörperchen führt. MLI zeigt gegenüber der Blutgruppe B eine nur schwach ausgeprägt Präferenz.

Von MLI wurden bis zu 25 Isolektine beschrieben, wobei bei einigen die Disulfidverbrückung der beiden Untereinheiten fehlt [61]. Der isoelektrische Punkt von MLI wurde je nach Autor mit pH 6.5-8.0 [1], pH 6.1 [58], pH 6.7-7.2 [46] oder pH 6.9-7.3 [62] angegeben.



**Abb. 1.** „Cartoon“-Darstellung der A- und B-Ketten von MLI [55]. Die drei Domänen der A-Kette (I, II, und III) sind gelb, blau und violett dargestellt. Die homologen Subdomänen der zwei Domänen (I und II) der B-Kette ( $\alpha_{1,2}$ ,  $\beta_{1,2}$  und  $\gamma_{1,2}$ ) sind gelb, blau und grün. Die Linkerregionen  $\lambda_{1,2}$  sind orange, die Disulfidbrücke zwischen der A- und B-Kette ist als blaue unterbrochene Linie dargestellt. Die roten unterbrochenen Kreise entsprechen der Nukleotidbindestelle der A-Kette (NUC) bzw. der niedrig- und hochaffinen Galaktosebindestellen der B-Kette (G1 und G2). Die Glykosilierungsstellen (GLYC) sind als blaue unterbrochene Kreise dargestellt. Spirale:  $\alpha$ -Helix, Pfeil:  $\beta$ -Faltblatt.

Die RNA-Glykosidase-Aktivität der A-Kette und die damit verbundene Inhibierung der Proteinsynthese stellt die molekulare Basis für die cytotoxische Aktivität des Lektins dar [63]. Der LD<sub>50</sub>-Wert liegt unter i.v.-Gabe bei der Maus zwischen 2.4 und 28.7 µg/kg Körpergewicht [1, 64]. MLI ist in hoher Konzentration besonders toxisch für stark proliferierende Zellen, wie Embryonal- und Tumorzellen [65]. Bei *in vitro*-Versuchen lag der LD<sub>50</sub>-Wert für MLI bei verschiedenen Tumorzelllinien im Bereich von 1-100 ng/ml [66], bei Maus-3T3-Zellen sogar bei nur 0.5 ng/ml und bei humanen Molt-4-Zellen zwischen 0.02 und 0.07 ng MLI/ml [64, 67-68]. Die Cytotoxizität von MLI beruht auf der Induktion von Apoptose [27, 66, 68-73]. Bei Molt-4-Zellen beobachtete man eine nekrotisierende Wirkung von, in hoher Dosis vorliegendem MLI, während bei Konzentrationen ≤ 50 pg/ml der programmierte Zelltod induziert wurde [69]. Dieser erfolgt erst 24-72 Stunden nach Beginn der Inkubation mit MLI. Dabei bilden humane Lymphocyten vermehrt mitochondriales Apo2.7 und reaktive Sauerstoffintermediate [27]. Sowohl MLI, als auch MLIII inhibieren die IFN-γ-Produktion in apoptotischen T-Zellen, während die IL-4-Expression unter gleichzeitigem Anstieg des Apoptosemarkers Apo2.7 induziert wird. Der Anteil des antiapoptotischen Bcl-2-Proteins sinkt [74].

Die immunmodulatorische Wirkung von in der Krebstherapie angewandten Mistelextrakten geht vor allem auf die Mistellektine MLI, MLII und MLIII zurück [75-77]. Bei Kaninchen führte die intravenöse Gabe von 0.8 ng/kg ML I zu einem signifikanten Anstieg der NK-Cytotoxizität, der Zunahme der großen granulären Lymphocyten und der Phagocytoseaktivität der Granulocyten, sowie zu einem schnellen Temperaturanstieg von 0.8 °C. Dabei war die B-Kette aktiver als das Holoprotein, während die A-Kette wirkungslos blieb [78]. Einen ähnlichen Effekt zeigten sowohl subkutane als auch intravenöse Gaben eines entsprechende Mengen Mistellektin enthaltenden Extrakts bei Krebspatienten. *In vitro*-Versuche mit humanen mononuklearen Zellen aus peripherem Blut demonstrierten unter der Wirkung von MLI und MLIB einen Anstieg der cytosolischen Aktivität, die mit einer erhöhten Freisetzung von TNF-α, IL-1 und IL-6 einherging [75]. Für diese Cytokinproduktion werden die Monocyten verantwortlich gemacht [79]. In einer peripheren Blutlymphocytenkultur erhöht MLI in Anwesenheit von CD4+- und CD14+-Zellen die Proliferation und cytotoxische Aktivität von CD8+-T-Zellen. Außerdem kann das Lektin synergistisch mit IL-2 die durch T- und CD56+-Zellen vermittelte Cytotoxizität stimulieren [80]. Die Produktion von Superoxidradikalanionen durch humane neutrophile Granulocyten *in vitro* nach Behandlung mit MLI führt im „respiratory burst“ zum Tod von Fremd- und Tumorzellen, die anschließend phagocytiert werden [81].

Aufgrund der niedrigen Mistellektinkonzentrationen in den in der Krebstherapie eingesetzten Mistelextrakten und der Bildung von anti-Mistellektinantikörpern [33, 67, 82] nach subkutanen und intravenösen Applikationen der Präparate kann man davon ausgehen, dass die apoptotische Wirkung der Typ II RIPs keine bedeutende Rolle spielt. Um diesen Effekt zu erreichen, müssten die Lektine bzw. Extrakte intratumoral injiziert werden [68, 83]. Vielmehr liegt der Schwerpunkt der Misteltherapie bei Krebspatienten in der zellulären und humoralen Immunantwort. Subkutane Injektionen sowohl von auf MLI standardisiertem Mistelextrakt, als auch von reinem MLI in nichttoxischen Dosen führen zu einem signifikanten Anstieg von T-Helfer- und NK-Zellen im Blut. Außerdem kommt es zu einer verstärkten Expression von IL-2- und HLA-DQ-Rezeptoren auf lymphatischen Zellen [84-85], die Akutphasenproteine steigen an [85] und der  $\beta$ -Endorphinspiegel nimmt zu [77]. Es gibt aber auch „non-responder“, die nicht auf diese Weise auf MLI oder MLI enthaltende Mistelextrakte ansprechen [77]. Bei anderen Krebspatienten beobachtete man zu Beginn der Misteltherapie die Proliferation der mononuklearen Zellen des peripheren Blutes unter gleichzeitigem Anstieg der Cytokine TNF- $\alpha$  und IL-6, was auf die Aktivität der Monocyten und Macrophagen zurückzuführen ist [86]. Dieser Effekt nahm im Verlauf der Behandlung wieder ab. Immunmodulatorisch wirksame Dosen von MLI verminderten bei Mäusen die Entstehung von Tumoren in Lunge und Leber nach Inokulierung von Sarcom- bzw. Fibrosarcomzellen [87].

### 1.3.2 Mistellektin II (MLII) und Mistellektin III (MLIII)

Bei den Mistellektinen II und III handelt es sich wie bei MLI um Typ II RIPs, die sich in ihren Molekulargewichten und Zuckerspezifitäten unterscheiden. Während MLI Galaktose- und MLIII N-Acetylgalaktosamin-spezifisch sind, zeigt MLII gegenüber beiden Zuckern eine Spezifität [40]. Letzteres hat ein Molekulargewicht von ca. 60 kDa, dabei kommen 27 kDa auf die A- und 32 kDa auf die B-Kette [40, 46]. Der isoelektrische Punkt von MLII liegt zwischen pH 6.2 und 6.6 [46].

MLIII wurde, wie MLI, vollständig sequenziert und besteht ebenfalls aus einer 254 Aminosäure langen A-Kette (MLIIIA) mit einem Molekulargewicht von 28427 Da und einer glykosilierten 30929 Da schweren B-Kette (MLIIIB) aus 262 Aminosäuren [88-89]. MLIIIA zeigt 90% Sequenzidentität gegenüber MLIA, während MLIIIB bezüglich der Sequenz von MLIB 83% zeigt. Die B-Kette hat zwei N-Glykosylierungsstellen (Asn95 und Asn135), die mit einem Hexamannosyloktasaccharid bzw. mit Xylotrimannosylhexasacchariden verknüpft sind. MLIIIA ist nicht glykosiliert und ist mit MLIIIB über eine Disulfidbrücke zwischen

Cys247 der A- und Cys4 der B-Kette miteinander verknüpft. Letztere besitzt vier weitere intramolekulare Disulfidbrückenverknüpfungen. Der isoelektrische Punkt von MLIII liegt im Bereich zwischen pH 5.4 und 5.9 [46]. Der Glykosilierungsgrad beider Lektine liegt bei 6-7% [46]. Auch von MLII und MLIII werden weitere Isolektine beschrieben [61, 62], und beide haben hämagglutinierende Eigenschaften, die jedoch weitaus schwächer ausgeprägt sind als bei MLI [46]. Mono- und polyklonale Antikörper gegen MLI, II und III zeigten eine hohe Kreuzreaktivität zwischen den Mistellektinen [62, 64, 90-91]. Die Fähigkeit der Apoptoseinduktion bei verschiedenen Zelllinien trifft auch auf MLII und MLIII zu [66, 68, 71]. Sowohl bei humanen Lymphocytenkulturen, als auch bei Molt-4-Zellen zeigte Mistellektin III die am stärksten apoptotische Wirkung, gefolgt von Mistellektin II und Mistellektin I [67, 92]. Verglichen mit MLI verursachen die beiden anderen Lektine eine geringfügigere Zunahme der NK-Cytotoxizität nach deren intravenösen Injektion bei Kaninchen, wobei der Anstieg der großen granulären Lymphocyten vergleichbaren Ausmaßes ist. Dabei erhöht sich die Temperatur nach MLII- und MLIII-Injektionen um 0.6 °C bzw. 0.43 °C [77]. Bei der, durch ML III, verursachten Apoptose sind vor allem CD8+-Zellen betroffen. Gleichzeitig treten vermehrt Telomer-Assoziationen auf [93].

### 1.3.3 Die chitinbindenden Mistellektine

Im Jahr 1996 wurde ein weiteres Mistellektin, VisalbCBA (*Viscum album* chitinbindendes Agglutinin), beschrieben, das nicht zu den Typ II RIPs, sondern zur Familie der chitinbindenden Pflanzenproteine gehört [47]. Diese besitzen ein oder mehrere Heveindomänen und zeigen z. T. antimikrobielle Eigenschaften [94]. Die Isolierung von VisalbCBA aus der Mistel erfolgte mittels Kombination klassischer Proteinreinigungsmethoden und Affinitätschromatographie an N-Acetylglukosaminoligomeren, hergestellt aus Chitin von Krabbenschalen [47]. Mittels SDS-PAGE, massenspektrometrischer Analyse und Gelfiltration wurde gezeigt, dass es sich bei diesem Protein um ein Dimer aus zwei identischen Untereinheiten von jeweils 10.8 kDa handelt, das nicht glykosiliert ist. Die N-terminale Sequenzierung der ersten 26 Aminosäuren und der Vergleich mit Primärstrukturen anderer chitinbindender Proteine zeigen eine hohe Homologie untereinander. VisalbCBA ist ein Protein hoher Stabilität, das humane und Kaninchenerythrocyten hämagglutiniert und eine schwache cytotoxische Wirkung gegen MOLT4-Zellen hat [47].

Im Folgenden wurden drei weitere chitinbindende Mistellektine (cbMLs) mittels Affinitätschromatographie an Chitin und anschließender RP HPLC des cbML-Eluats isoliert und charakterisiert [95-97]. Hierbei handelt es sich ebenfalls um Dimere aus zwei, über eine

Disulfidbrücke verbundene identischen Untereinheiten. Die Molekulargewichte der drei chitinbindenden Mistellektine zeigen nur geringfügige Unterschiede und liegen für die nativen Proteine um die 10 kDa. Die Ergebnisse der vollständigen N-terminale Sequenzierung des am häufigsten vertretenen cbML-Proteins stimmen mit der Sequenz der ersten 26 Aminosäuren von VisalbcBA überein und bestätigten die hohe Homologie zu den chitinbindenden Pflanzenproteinen [95-97]. Eine Untereinheit des sequenzierten cbML-Proteins besteht aus 49 Aminosäuren und besitzt eine cystein- und glycinreiche Hevein-ähnliche Domäne. Es ist anzunehmen, dass es sich bei den beschriebenen chitinbindenden Mistellektinen, VisalbcBA und den cbMLs, um dieselben Proteine bzw. Isoformen handelt.

#### **1.4 Medizinisch angewandte Mistelextrakte**

Die kommerziell verwendeten Mistelpräparate unterscheiden sich in ihrer Herstellung und hinsichtlich unterschiedlich therapeutischer Konzepte. Sie werden vor allem in der Krebstherapie zur Unterstützung des geschwächten Immunsystems eingesetzt, um das Allgemeinbefinden der Patienten zu stärken. Im Folgenden werden die wichtigsten, in der Krebstherapie eingesetzten Mistelpräparate beschrieben.

##### **1.4.1 Abnobaviscum<sup>®</sup>-Präparate**

Der Wirkstoff dieser Präparate ist ein aus Misteln gewonnener, Phosphat-gepufferter, sterilfiltrierter Preßsaft. Die Pflanzen werden dazu zweimal im Jahr, im Sommer und im Winter, geerntet und die erhaltenen Extrakte 1:1 gemischt. Die Beeren werden dabei mitverarbeitet. Die höchste erhältliche Konzentration in einer zur subkutanen Injektion bestimmten Ampulle ( $\equiv$  1 ml) enthält 15 mg Preßsaft aus 20 mg frischem Mistelkraut (Verdünnungsstufe 2). Das Präparat gibt es in 8 Verdünnungsstufen (2 bis 6, 10, 20 und 30) von 8 verschiedenen Wirtsbäumen. Ein besonderes Verfahren zur Herstellung des Presssafts ermöglicht die Erhaltung der Membranbestandteile der Mistel im wässrigen Milieu. In membrangebundener Form sind empfindliche Substanzen stabiler, d. h. ihre natürliche Konformation bleibt weitgehend erhalten, und damit wird ihre maximale biologische Wirksamkeit erreicht [98]. Wie bereits erwähnt, stimulieren die Vesikel *in vitro* die Proliferation von CD4<sup>+</sup>-T-Lymphocyten mistelbehandelter Tumorpatienten [15]. Die Konzentrationen an toxischen Inhaltsstoffe in diesen Extrakten sind, verglichen mit anderen, am höchsten. Der Viscotoxingehalt in Abnobaviscum<sup>®</sup>-Präparaten der Verdünnungsstufe 2 liegt, in Abhängigkeit vom Wirtsbaum, bei ca. 10-100  $\mu\text{g/ml}$ , die Lektinkonzentration bei 0.3-11  $\mu\text{g/ml}$ . Der Gesamtgehalt der Mistellektine I, II und III wurde über ELISA bestimmt [99].

### 1.4.2 Iscador®-Präparate

Von Iscador® gibt es einmal einen fermentierten wässrigen Auszug aus 0.05-250 mg Mistelkraut/ml (Pflanze:Auszug = 1:5), in dem der Gehalt an ML I, II und III nur noch ca. 10% des Gehalts unfermentierter Extrakte entspricht und, in Abhängigkeit vom Wirtsbaum (und der Konzentration), zwischen 8 (pini) und 565 ng/ml (quercus) liegt [99, 100]. Dabei findet man mehr MLII und MLIII als MLI [90]. Ein nichtfermentierter Mistelextrakt, bei dem es sich um einen frisch verdünnten Preßsaft handelt [100], ist unter dem Namen Iscador® FrF im Handel erhältlich. Bei Iscador® Q FrF liegt der Gehalt der zur Familie der Typ II Ribosomen-inaktivierenden Proteine gehörenden Lektine bei ca. 2.1 µg/ml [99], wobei hier der MLI- gegenüber dem MLII/MLIII-Gehalt höher liegt [90]. Iscador®-Präparate werden aus Winter- und Sommermisteln von vier verschiedenen Wirtsbäumen hergestellt. Der Viscotoxingehalt liegt, je nach Präparation, bei ungefähr 7-10 mg/ml [99].

### 1.4.3 Helixor®, Iscucin-Viscum® - und Vysorel®-Präparate

Helixor®-Präparate sind kaltwässrige Frischpflanzenextrakte, die aus zu verschiedenen Jahreszeiten geernteten Misteln hergestellt werden und zur subkutanen Injektion bestimmt sind. Diese Präparate gibt es in verschiedenen Verdünnungen mit 0.01-100 mg Rohmaterial/Ampulle (≡ 2 ml) von vier unterschiedlichen Wirtsbäumen. Der Gehalt an Viscotoxinen beträgt weniger als 5 µg/ml, der Gesamtgehalt an ML I, II und III (über ELISA bestimmt) liegt bei 215-950 ng/ml [99]. Iscucin-Viscum®, in 9 verschiedenen Konzentrationen von 8 Wirtsbäumen erhältlich, und Vysorel® werden ähnlich hergestellt. Vysorel® gibt es in nur einer Konzentration von drei Wirtsbaumsorten.

### 1.4.4 Eurixor® - und Plenosol®-Präparate

Beides sind wässrige Mistelextrakte, die jeweils in nur einer Konzentration erhältlich sind und zur Behandlung von Gelenkerkrankungen (durch intrakutane Applikation) und von Malignomen (intravenöse Applikation) eingesetzt werden. Eine Ampulle (≡ 1 ml) enthält 1 mg wässrigen Auszug aus Mistelkraut (Pflanze : Auszug = 1 : 1.3).

*Viscum album* L.-Extrakte stimulieren in niedrigen Wirkstoffdosen unspezifisch das Immunsystem [19, 75, 78] und haben DNA-stabilisierende Eigenschaften [101]. In höheren Konzentrationen wirken sie auf kultivierte Tumorzellen und humane Lymphocyten cytostatisch und cytotoxisch [66, 68, 92]. Die Mistellektine vom Typ II RIP werden vor allem für die Apoptoseinduktion der Extrakte verantwortlich gemacht. Bei Helixor®A konnte keine

derartige Wirkung auf kultivierte humane Lymphocyten festgestellt werden, was auf die geringe Lektinkonzentration zurückgeführt wird [92]. Bei anderen *in vitro*-Versuchen mit verschiedenen Tumorzelllinien gibt es, in Abhängigkeit des Wirtsbaums des eingesetzten Mistelextrakts, deutliche Unterschiede hinsichtlich des Ausmaßes der Apoptoseinduktion [66]. Obwohl MLI-III als die am apoptotisch wirksamsten Mistelkomponenten gelten, findet man keinen direkten Zusammenhang zwischen der Lektinkonzentration in verschiedenen Mistelpräparaten und deren cytotoxischen Wirkungen auf kultivierte Lymphocyten. Vielmehr hängt diese mit der Herstellungsart, der Erntezeit und des Wirtsbaums der Extrakte zusammen, was auf den Einfluß anderer biologisch wirksamer Inhaltsstoffe und deren Kombinationen auf die Cytotoxizität schließen lässt [99]. Vergleicht man fermentierte und nichtfermentierte Mistelpräparate hinsichtlich ihrer cytotoxischen Wirkung auf kultivierte Tumorzellen, so ist fermentierter Extrakt effektiver gegenüber HTC („Hepatoma Tissue Culture“-)-Zellen als nichtfermentierter Extrakt. Bei MOLT-4-Zellen verhält es sich genau umgekehrt [100]. Ein Iscador<sup>®</sup>-Präparat verhinderte bei Mäusen eine 20-Methylcholanthren-induzierte Karzinogenese und damit den Tod der Tiere [102]. Eine Mistelkomponente von 5 kDa, isoliert aus Iscador<sup>®</sup> M, reduzierte die mittels DLA-Zellen induzierte Tumorbildung bei Mäusen, zeigte aber keine cytotoxische Aktivität gegenüber normalen Lymphocyten [103].

In der Krebstherapie werden Mistelpräparate aufgrund der üblichen Applikationsarten weniger wegen ihrer cytotoxischen Wirkung [33, 82], als vielmehr aufgrund ihrer immunmodulatorischen Eigenschaften eingesetzt [75, 85]. Von einer Stimulierung des Immunsystems nach Verabreichung eines nichtfermentierten Iscador<sup>®</sup>-Präparats bei Krebspatienten wurde in Abschnitt 1.3.1 berichtet. Dabei beobachtete man eine Erhöhung der Temperatur und einen Anstieg der NK-Cytotoxizität unter gleichzeitiger Zunahme der großen granulären Lymphocyten und der Phagocytoseaktivität der Granulocyten [78]. Ein fermentiertes Präparat von Iscador<sup>®</sup>, das kein MLI und nur wenig MLII/III enthält, zeigt, unabhängig von der Anwesenheit von anti-Mistellektinantikörpern, eine mitogene Wirkung auf periphere Blutmonocyten, insbesondere auf CD4+-T-Zellen und CD14+-Monocyten [104-105]. In Kultur dieser von Tumorpatienten stammenden Monocyten kommt es zu einem Konzentrationsanstieg von TNF- $\alpha$  und IL-6 im Medium [106]. Außerdem ist die Reaktion der Monocyten, die von allergisch reagierenden Patienten stammen, gegenüber Monocyten von nicht-allergischen Personen verstärkt. Weder isoliertes MLI, II oder III noch isolierte Viscotoxine hatten die gleiche mitogene Wirkung wie der fermentierte Iscador<sup>®</sup>-Extrakt, weshalb dieses Präparat ein starkes, weit verbreitetes Antigen vom „non-recall“-Typ enthalten muß [105].

Bei *in vitro*-Versuchen mit Helixor<sup>®</sup>-Präparaten fand man eine Reduktion spontaner und Cyclophosphamid-induzierter durch Schwesterchromatidenaustausche ausgelöste Schädigung der DNA [101, 107-108]. Diese, bei peripheren mononuklearen Zellen des Bluts gefundenen antimutagenen Eigenschaften, sind auf die Wirkung des gesamten Extrakts zurückzuführen, einzelne isolierte Komponenten, wie Lektine und Viscotoxine sind ineffektiv [108-109]. In Gegenwart von 1.1 mM Glucose wird die Insulinausschüttung klonaler Pankreaszellen vom Typ B durch Mistelextrakte stimuliert. Die gleiche Wirkung erzielt man auch nach Erhitzen der Extrakte auf 95°C. Diese verlieren bei so hoher Temperatur ihre hämagglutinierenden Eigenschaften, d. h. es ist unwahrscheinlich, dass ML I, II und III mit ihrer geringen Temperaturstabilität die aktiven Komponenten sind. Weder über den Mechanismus noch über die, die Insulinsekretion stimulierenden Inhaltsstoffe der Extrakte ist Näheres bekannt [110]. Die beschriebenen Wirkungen sowohl der verschiedenen Mistelkomponenten als auch der Gesamtextrakte und synergistische Effekte, wie z.B. von Lektinen und Vesikeln [98, 111] bzw. von Lektinen und Polysacchariden [17] bei der Proliferation und präferentiellen Expansion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen *in vitro*, sprechen für den Einsatz von Gesamtpräparaten anstelle einzelner Komponenten.

### 1.5 Ziel dieser Arbeit

Unter den zahlreichen Inhaltsstoffen der Mistel wurde das Mistellektin I bisher am intensivsten untersucht, während von anderen Komponenten nur wenig bekannt ist. Da aber das Wirkungsspektrum der Mistelextrakte nicht allein auf die Mistellektine vom Typ II RIP zurückgeführt werden kann, ist eine strukturelle und funktionelle Kenntnis möglichst aller potentiell wirksamen Substanzen in den Extrakten von großer Wichtigkeit. Bisher wenig untersuchte Mistelkomponenten sind u. a. die chitinbindenden Mistellektine (cbMLs). Im Rahmen dieser Arbeit sollen die drei cbML-Proteine in ausreichender Menge getrennt voneinander isoliert und einzeln sequenziert werden. Unter Verwendung von Röntgenstruktur- und/oder Hochfeld-NMR-Strukturdaten von, zu den drei Lektinen homologen Proteinen sollen Modelle der cbML-Proteine erstellt werden, da sie einen vorläufigen Raumstrukturvorschlag ermöglichen und wertvolle Informationen, insbesondere für Struktur-Aktivitätsbeziehungen, geben.

Über die physiologisch-pharmazeutische Wirkung dieser chitinbindenden Mistellektine sind derzeit nur vorläufige Daten bekannt [95-97]. Zum einen soll nun untersucht werden, ob diese Proteine im Blut von mit Mistelpräparaten therapierten Tumorpatienten eine Induktion von Antikörpern, analog den Mistellektinen I, II und III und den Viscotoxinen [33-34],

---

hervorrufen. Des Weiteren wurden die antimikrobiellen Eigenschaften von Proteinen mit Heveindomänen bereits erwähnt [94]. Von einigen chitinbindenden Lektinen wurde eine antifungale Wirkung gegenüber verschiedene Pilzarten gezeigt [112-117]. Aufgrund der hohen Homologie zu diesen Proteinen wird eine ähnliche Funktion für die chitinbindenden Mistellektine erwartet, und es sollen analoge Experimente mit diesen durchgeführt werden. Mittels Mikroisolierungen an gereinigtem Chitin und anschließender MALDI MS- bzw. RP HPLC-Analysen wurde gezeigt, dass pharmazeutische Mistelextrakte cbML-Proteine enthalten [96]. Dieses Verfahren soll weiterentwickelt und verbessert werden, um cbML-Gehalte in kommerziellen Mistelextrakten quantitativ zu bestimmen. Anschließend erfolgt die Validierung der Methode.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Aminosäureanalysator LC-3000	Eppendorf Biotronik, Hamburg (Deutschland)
Analysenwaage UM3	Mettler Toledo, Gießen (Deutschland)
Digital-pH-Meter 646	Bachofer, Reutlingen (Deutschland)
Einkanal-Schreiber LKB 2210	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
Elektrophoresesystem	Owl, Portsmouth/NH (USA)
ELISA-Reader (SLT RainBow)	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim (Deutschland)
Feinwaage LA 120S	Sartorius, Goettingen (Deutschland)
Fraktionssammler FOXY II	Isco, Lincoln/Nb (USA)
Gleichstromspannungsquelle E835	Consort, Turnhout (Belgien)
Großbrundschüttelmaschine RS-306	Infors Control AG, Bottmingen, Basel (Schweiz)
Heizblock SHT 200D	Stuart Scientific, Redhill (Großbritannien)
HPLC-System BT 8000	Biotronik, Maintal (Deutschland)
Kühlzentrifuge	Hettich, Tuttlingen (Deutschland)
Lyophilisator	Leibold-Heraeus, Stuttgart (Deutschland)
Massenspektrometer Kratos MALDI II	Shimadzu, Torrance/CA (USA)
Peristaltikpumpe Gilson Minipuls 3	Abimed, Langenfeld (Deutschland)
Photometer Model 3550	Bio Rad, München (Deutschland)
Protein-Sequenator 473A	Applied Biosystems, Weiterstadt (Deutschland)
Schreiber mit Integratorfunktion C-R5A	Biotronik, Maintal (Deutschland)
Ultraschallbad Sonorex RK100	Bandelin, Berlin (Deutschland)
UV-Durchflußdetektor Uvicord SII	LKB Bromma, Bromma (Schweden)
UV/VIS-Spektrometer Lambda 15	Perkin Elmer, Norwalk/CT (USA)
Vortex	Bender und Hobein, Zürich (Schweiz)
Waring Industry Blender	Dynamics CA, New Hartford/CN (USA)

#### 2.1.2 Materialien

##### *LC-Medien*

CM-Sephadex C-50	Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala (Schweden)
Chitin-, „Beads“	New England Biolabs, Beverly/MA (USA)

Chitin aus  
Krabbenschalen, Nr. C7170

Sigma, Deisenhofen (Deutschland)

### ***Chromatographiesäulen***

Aquapore RP 300 C8  
(7 µm, 2.1 x 30 mm)

Applied Biosystems, Weiterstadt (Deutschland)

GromSil 100 C18  
(5 µm, 250 x 4.6 mm)

Grom, Herrenberg-Kayh (Germany)

Leersäule (LC)  
(16 x 270 mm)

Universitätswerkstatt Tübingen (Deutschland)

Parcosil ProRP 300 C4  
(5 µm, 160 x 15 mm)

Serva, Heidelberg (Deutschland)

Vydac 300 C4  
(5 µm, 250 x 2 mm)

Vydac, Hesperia/CA (USA)

### ***Filtration, Dialyse***

Membran-Dialyseschlauch, Spectra/Por<sup>®</sup>

Spectrum, Gardena (USA)

Ultrafree MC Spincups  
(0.22 und 0.45 µm)

Millipore, Eschborn (Deutschland)

Zellutrans Dialyseschlauch  
(Ausschlussgrenze: 1 kDa)

Roth, Karlsruhe (Deutschland)

### ***Chemikalien für die Proteinsequenzierung***

Alle genannten Chemikalien: „sequencing grade“ von Perkin Elmer AB, Weiterstadt (Deutschland):

Acetonitril

20% Acetonitril

BioBrene<sup>™</sup> Plus

Ethylacetat

N-Methylpiperidin in aq. bidest./Methanol

Natriumacetatpuffer, 3 M, pH 3.8

Natriumacetatpuffer, 3 M, pH 4.6

Phenylisothiocyanat (5%) in n-Heptan

Phenylthiohydantoin-Aminosäurestandard

TFA (konz.)

TFA (25%) in aq. bidest.

Tetrahydrofuran (5%) in aq. bidest.

***Proteine, Enzyme, Extrakte***

Endoproteinase LysC, „seq. grade“	Boehringer, Mannheim (Deutschland)
Rinderserumalbumin	Sigma, Deisenhofen (Deutschland) bzw. St. Louis (USA)
Substanz P	Sigma, Deisenhofen (Deutschland)
Papain	Sigma, Deisenhofen (Deutschland)
Ubiquitin	Sigma, Deisenhofen (Deutschland)
monovalente Peroxidase-konjug. antihumane IgG- und IgE-AK	DIANOVA, Hamburg (Deutschland)
Abnobaviscum <sup>®</sup> Betulae-2 (Charge: 603 ABY)	Abnoba Heilmittel GmbH, Pforzheim (Deutschland)
Abnobaviscum <sup>®</sup> Betulae-2 (Charge: 903 B-L)	Abnoba Heilmittel GmbH, Pforzheim (Deutschland)
Abnobaviscum <sup>®</sup> Pini-2 (Charge: 912 ABU)	Abnoba Heilmittel GmbH, Pforzheim (Deutschland)
Abnobaviscum <sup>®</sup> Fraxini-2 (Charge: 005 KLT)	Abnoba Heilmittel GmbH, Pforzheim (Deutschland)
Abnobaviscum <sup>®</sup> Mali-4	Abnoba Heilmittel GmbH, Pforzheim (Deutschland)

***Chemikalien, fertige Lösungen, Medien***

Ortho-Phenylendiamin	Sigma, St. Louis (USA)
Probenverdünnungspuffer (ASA)	Biotronik, Maintal (Deutschland)
Triton X 100	Sigma, St. Louis (USA)
VS 2-Puffer	Abnoba Heilmittel GmbH, Pforzheim (Deutschland)

***Hergestellte Lösungen, Medien***

AHC-DHB-Mischmatrix:	5.7 mg $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure, 1.1 mg 2.5-Dihydroxy-benzoesäure, 1 ml 0.1% TFA/70% Acetonitril in aq. bidest..
Coomassiefärbelösung:	1.25 g Coomassie Brilliantblau G 250, 50 ml Eisessig, 225 ml aq. bidest., 225 ml Methanol.
Entfärbelösung:	50 ml Methanol, 75 ml Eisessig ad 1000 ml aq. bidest..
PBS:	8.0 g NaCl, 0.2 g $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , pH 7.2 ad 1000 ml aq. bidest..
Bradford-Reagenz:	100 mg Coomassie Brilliantblau G 250, 50 ml Ethanol, 100 ml 85% Phosphorsäure.

Modifiziertes Moser B Medium: 0.35 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.15 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.0 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0.3 g NaNO<sub>3</sub>, 0.5 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 0.1 g Ca(Cl<sub>2</sub>) x 2 H<sub>2</sub>O, 50 µg Thiamin, 1 µg Biotin, 100 mg Inosit, 1 mg ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 10 mg FeIII(Cl<sub>3</sub>) x 6H<sub>2</sub>O, 5 mg MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, 10 g Glucose-Monohydrat, 10 g Maltose-Monohydrat, 10 g Saccharose ad 1000 ml aq. bidest..

### ***Pflanzen, Zellen, Organismen***

Mistel (Wirtsbaum: Mischapfel)	Botanischer Garten der Universität Tübingen (Deutschland)
Humanes 60%iges Erythrocytenkonzentrat	Blutbank des Universitätsklinikums Tübingen (Deutschland)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Meyen ex E. C. Hansen) interne Stammnummer: F842	Botanisches Institut, Abteilung für spezielle Botanik und Mykologie, Tübingen (Deutschland)
<i>Debaryomyces hanessii</i> (Zop) Lodder & Kreger-van Rij interne Stammnummer: S563	Botanisches Institut, Abteilung für spezielle Botanik und Mykologie, Tübingen (Deutschland)
<i>Microstroma juglandis</i> (Berenger) Sacc. interne Stammnummer: F3381	Botanisches Institut, Abteilung für spezielle Botanik und Mykologie, Tübingen (Deutschland)
<i>Candida sake</i> (Saito & Ota) van Uden & Buckley interne Stammnummer: F3147	Botanisches Institut, Abteilung für spezielle Botanik und Mykologie, Tübingen (Deutschland)
<i>Tremella foliacea</i> Pers.:Fr. interne Stammnummer: FO25113	Botanisches Institut, Abteilung für spezielle Botanik und Mykologie, Tübingen (Deutschland)

### ***Sonstiges***

Mikrotiterplatten Maxisorp, Nunc (Dänemark)

Alle nicht aufgeführten, aber bei dieser Arbeit verwendeten Chemikalien in p.A.-Qualität sind von Merck AG, Darmstadt (Deutschland).

Die Mistellektine MLI und MLIII wurden von Dr. Roland Wacker (Abteilung für Physikalische Biochemie, Physiologisch-chemisches Institut der Universität Tübingen, Tübingen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Isolierung der Lektine erfolgte aus Misteln des Wirtsbaums Mischapfel mittels Ionenaustausch- und Affinitätschromatographie [46, 88-89].

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Herstellung des Mistelextrakts**

Frische oder gefrorene Blätter und dünne Stengel der Mistel werden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und im Mixer pulverisiert. Das fein gemahlene Pflanzenmaterial wird in aq. bidest. aufgenommen (100 g Mistel/200 ml H<sub>2</sub>O) und bei 4°C 20 bis 24 Stunden gerührt. Anschließend wird die Suspension durch ein feines Baumwolltuch filtriert und bei 6000 x g und 4°C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wird mit konz. Essigsäure auf pH 4.6 eingestellt, einige Minuten stehen gelassen und erneut zentrifugiert (6000 x g, 4°C, 20 min). Der nun klare Extrakt wird sofort weiterverarbeitet.

### **2.2.2 Kationenaustauschchromatographie zur Vorfraktionierung von Mistelproteinen**

Zu 1 l geklärten essigsäuren Mistelextrakt werden 5 g CM-Sephadex C-50 (gequollen in 50 mM NaAc, pH 4.6) gegeben und die Suspension 1 h bei 4°C gerührt. Anschließend wird der Kationenaustauscher über einer Pore 3-Glasfritte abgesaugt und solange mit 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 4.6, gewaschen, bis die Waschlösung farblos ist. Für die Elution der gebundenen Proteine wird das Kationenaustauschmaterial in 50 ml 0.1 M Tris/HCl, 1 M NaCl, pH 8.0 aufgeschlämmt, einige Minuten stehen gelassen und wieder abgesaugt. Dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis das proteinhaltige Eluat einen pH von 8.0 hat. Die Proteinfractionen werden gesammelt, dann direkt weiterverarbeitet oder eingefroren.

### **2.2.3 Isolierung der chitinbindenden Mistellektine (cbMLs) durch Affinitätschromatographie**

Mit einer Fließgeschwindigkeit von 0.6 ml/min wird eine Leersäule (Dimension: 16 x 270 mm) mit 10-15 ml einer Chitin-„Beads“-Suspension gepackt. Anschließend wird das Affinitätsmaterial bei derselben Flussrate mit 100 ml aq. bidest. gespült und mit 150 ml 0.1 M Tris/HCl, 1 M NaCl, pH 8.0 äquilibriert. Die vereinten Proteinfractionen aus Abschnitt 2.2.2 werden mit einer Flussrate von 0.4 ml/min auf die Säule gepumpt. Dann wird mit 0.1 M Tris/HCl, 1 M NaCl, pH 8.0 bei einer Flussrate von 0.6 ml/min solange gewaschen bis die Absorption der Waschlösung bei 280 nm absinkt und über 45-50 min konstant bleibt. Die Elution der cbMLs erfolgt mit 20 mM wässriger Essigsäure bei einer Fließgeschwindigkeit von 0.6 ml/min. Das Eluat wird mehrfach gegen aq. bidest. dialysiert und anschließend lyophilisiert.

## **2.2.4 Nachreinigung der chitinbindenden Mistellektine über RP HPLC**

### **2.2.4.1 Nachreinigung der affinitätsgereinigten cbMLs unter gleichzeitiger Auftrennung in die Isoformen**

Das cbML-Lyophilisat aus Abschnitt 2.2.3 wird in 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O gelöst (Konzentration: 2 mg/ml) und durch ein 0.45 µm Filter-Reaktionsgefäß filtriert. 500µl des Filtrats werden auf eine Parcasil ProRP 300 C4-Säule (5 µm, 160 x 15 mm) injiziert. Die Trennung erfolgt unter den folgenden Bedingungen: Eluent A = 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, Eluent B = 80% Acetonitril in A; Gradient: 20% B für 5 min, dann von 20 auf 35% B in 30 min; Flussrate: 2 ml/min; Detektionswellenlänge: 214 nm. Die manuell gesammelten Proteinfractionen werden lyophilisiert. Identifizierung und Reinheitskontrolle erfolgt mittels N-terminaler Sequenzanalyse und MALDI MS.

### **2.2.4.2 Nachreinigung der cbMLs bei niedriger TFA-Konzentration**

Das cbML-Lyophilisat aus Abschnitt 2.2.3 wird in 0.025% TFA in H<sub>2</sub>O gelöst (Konzentration: 2 mg/ml) und durch ein 0.45 µm Filter-Reaktionsgefäß filtriert. Die Trennung erfolgt über eine Parcasil ProRP 300 C4-Säule (5 µm, 160 x 15 mm) unter den folgenden Bedingungen: Eluent A = 0.025% TFA in H<sub>2</sub>O, Eluent B = 80% Acetonitril in A; Gradient: 15% B für 2 min, von 15 auf 30% B in 38 min, von 30 auf 100% B in 10 min, 100% B für 5 min; Flussrate: 2 ml/min; Detektionswellenlänge: 214 nm. Da bei dieser TFA-Konzentration keine Trennung in die einzelnen cbML-Isoformen möglich ist, werden diese gemeinsam gesammelt und lyophilisiert. N-terminale Sequenzanalyse und MALDI MS werden wieder zur Identifizierung und Reinheitskontrolle eingesetzt.

## **2.2.5 Proteinbestimmung nach Bradford**

Die Proteinbestimmungen für die einzelnen Reinigungsstufen von der Herstellung des Mistelextrakts bis zur Affinitätschromatographie zur Isolierung der chitinbindenden Mistellektine (vgl. Abschnitt 2.2.1 bis 2.2.3) erfolgen nach Bradford [118]. Jeweils 100 µl Probe wird mit 2 ml Bradford-Reagenz versetzt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Eine Eichgerade wird mit BSA als Standard in einer Konzentration von 1–50 µg/100 µl erstellt. Die Probenwerte sollten innerhalb des linearen Bereichs der Geraden liegen, ansonsten muss vorher entsprechend verdünnt werden.

### 2.2.6 Hämagglutininierungstest

Zur Herstellung einer 2%igen Erythrocytensuspension werden 50 µl humanes ca. 60%iges Spendererythrocytenkonzentrat der Blutgruppen A, B bzw. AB zunächst kurz abzentrifugiert. Die Zellen werden in 2 ml kaltem PBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Dieser Vorgang wird noch zweimal wiederholt. Schließlich suspendiert man die Erythrocyten in 1.5 ml kaltem PBS. Für den Test pipettiert man in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte zu je 50 µl 2%iger Erythrocytensuspension je 50 µl einer seriellen zweifachen Verdünnungsreihe der Probe und mischt gut durch. Die Probe wird, falls nötig, zuvor neutralisiert. Nach einer Stunde wird die höchste Verdünnungsstufe, bei der die Lösung gerade noch hämagglutiniert, abgelesen. Diese entspricht dann den hämagglutinierenden Einheiten (HU) der Probe. Soll die Sensitivität des Tests erhöht werden, wird die Erythrocytensuspension mit Papain in einer Konzentration von 0.5 mg/ml versetzt, bei 37°C für 30 min inkubiert und erneut gewaschen.

### 2.2.7 Aminosäureanalyse

Die entsalzte und lyophilisierte Proteinprobe (40-400 µg) wird in ein vorgeglühtes Hydrolyseröhrchen überführt und mit 6 M HCl versetzt. Die Hydrolyse erfolgt unter Vakuum bei 110°C für 24 h. Anschließend wird die Probe getrocknet. Der Rückstand wird in Probenverdünnungspuffer nach Herstellerangaben (Biotronik, Maintal) aufgenommen und, nach Filtration durch ein 0.22 µm-Filter-Reaktionsgefäß, zur Aminosäureanalyse eingesetzt. Die Aminosäure Tryptophan ist unter den verwendeten sauren Hydrolysebedingungen nicht stabil und kann deshalb nicht nachgewiesen werden. Die Aminosäureanalyse wird mit einem LC 3000 Aminosäureanalysator durchgeführt. Die Aminosäuren werden dabei durch Ionenaustauschchromatographie an einem Sulfonat-basierten Kationenaustauscher aufgetrennt. Die Elution erfolgt nach Herstelleranweisungen durch erhöhte Salzkonzentration in den Elutionspuffern. In einer Nachsäulenderivatisierung werden die Aminosäuren mit Ninhydrin umgesetzt, wobei primäre Aminosäuren einen blauen Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 570 nm, sekundäre Aminosäuren einen Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 440 nm bilden (Nachweisgrenze < 1 nmol/AS).

### 2.2.8 Reduktion und Alkylierung von Cysteinresten

Für die Reduktion und S-Pyridylethylierung der cbML-Isoformen werden jeweils 2.5-3 mg Proteinlyophilisat aus Abschnitt 2.2.4.1 in 950-980  $\mu\text{l}$  0.25 M Tris/HCl, 6 M Guanidiniumchlorid, 1 mM EDTA, pH 8.5 gelöst. Nach Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol (ca. 100-fach molarer Überschuss bezogen auf die Cysteinreste) werden die Ansätze mit Stickstoff begast und fest verschlossen 16 h bei Raumtemperatur im Dunkeln geschüttelt. Dann wird unter Stickstoffbegasung Vinylpyridin in 100-fach molarem Überschuss, bezogen auf die erwarteten Cysteinreste, zugegeben und die Proben weitere 4 h im Dunkeln bei Raumtemperatur geschüttelt. Zur Entsalzung der S-pyridylethylierten Proteine werden diese auf eine Aquapore RP 300 C8-Säule (7 $\mu\text{m}$ , 2.1 x 30 mm) injiziert und unter folgenden Bedingungen eluiert: Eluent A = 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, Eluent B = 80% Acetonitril in A; Gradient: 0% B für 5 min, dann von 0 auf 100% B in 10 min, 100% B für 15 min; Flussrate: 0.2 ml/min; Detektionswellenlänge: 214 nm. Die Fraktionen mit den modifizierten Proteinen werden gesammelt und lyophilisiert.

### 2.2.9 Enzymatische Spaltung der alkylierten cbML-Isoformen

Je 200  $\mu\text{g}$  der S-pyridylethylierten cbML-Isoformen werden in je 500  $\mu\text{l}$  25 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 5% Acetonitril, pH 8.5, gelöst. Dann wird Endoproteinase LysC in einem Enzym:Substrat-Verhältnis von 1:40 zugegeben, und die Spaltansätze werden bei 37°C 16 h geschüttelt. Nach Abstoppen der Reaktion mit TFA erfolgt die Trennung der Fragmente mittels RP HPLC. Dazu werden die Proben auf eine Grom-Sil 100 C18-Säule (5 $\mu\text{m}$ , 250 x 4.6 mm) injiziert und die Spaltpeptide unter den folgenden Bedingungen getrennt: Eluent A = 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, Eluent B = 80% Acetonitril in A; Gradient: 0% B für 5 min, dann von 0 auf 50% B in 50 min und von 50 auf 100% B in 10 min; Flussrate: 0.75 ml/min; Detektionswellenlänge: 214 nm. Die Fraktionen werden manuell gesammelt und lyophilisiert.

### 2.2.10 Massenspektrometrie

Massenspektren werden mit einem MALDI-Flugzeitmassenspektrometer der Firma Shimadzu aufgenommen [119]. Die in der Matrix eingebetteten Probenmoleküle werden über einen fokussierten gepulsten Stickstofflaser der Wellenlänge 337 nm (Energiedichte:  $10^6$ - $10^8$

W/cm<sup>2</sup>) mit einer Pulsdauer von 3-4 ns ionisiert. Die Molekülonen werden mittels einer Saugspannung von 20 keV beschleunigt, wobei ein Detektor am Ende des Flugrohrs deren Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) bestimmt. Kalibriert wird extern mit Substanz P (m/z = 1348.7) und Rinderubiquitin (m/z = 8565.9). Als Matrix wird ein Gemisch aus  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure und 2.5-Dihydroxybenzoesäure in 50% Acetonitril und 0.1% TFA verwendet [120]. Von dieser werden 1  $\mu$ l auf einen Probenträger aufgetragen und an der Luft getrocknet. Dann werden 1  $\mu$ l möglichst salzarme Probenlösung in 0.1% TFA auf den Matrixfilm aufgetragen und ebenfalls getrocknet. Anschließend wird die Probe im Massenspektrometer vermessen.

### 2.2.11 Aminosäuresequenzanalyse

Die N-terminale schrittweise Proteinsequenzierung nach Edman [121] wird mit einem automatisierten „Liquid pulse“-Sequenator der Firma Applied Biosystems (Modell 473A) durchgeführt. Auf ein mit BioBrene<sup>TM</sup> Plus vorbehandeltes Glasfaserfilter wird die Probe, 10-30 pmol gelöst in ca. 30  $\mu$ l 0.1% TFA, aufgetragen. Unter Einwirkung von N-Methylpiperidin reagiert Phenylisothiocyanat mit dem zu sequenzierenden Peptid zu einem Phenylthiocarbamoylderivat. Konzentrierte TFA setzt anschließend die um eine Aminosäure verkürzte Peptidkette und ein Anilinothiazolinonaminosäurederivat frei, welches nach Überführung in eine Konvertierungskammer schließlich durch 25% TFA und bei 62°C in das Phenylthiohydantoinderivat umgewandelt wird. Die Identifizierung dieser PTH-Aminosäuren erfolgt über ein integriertes HPLC-System. Die Detektion erfolgt bei 269 nm. Die Auswertung erfolgt graphisch unter manueller Kontrolle mit Hilfe der Retentionszeiten eines PTH-Aminosäurestandards als Referenz.

### 2.2.12 Datenbanksuche nach homologen Proteinen und Sequenzalignment

Die Suche nach Proteinen, die zur Sequenz der cbMLs homolog sind, erfolgt mittels des Programms PSI-BLAST [122] bei NCBI (National Center for Biotechnology Information). Mit Hilfe der Software ClustalX [123] und Genedoc [124] wird ein multiples Sequenzalignment erstellt.

### **2.2.13 Modellierung der Struktur einer unverkürzten cbML-Kette**

Eine komparative Modellierung der unverkürzten cbML-Kette erfolgt mittels des SWISS-MODEL-Programms [125-127] und den Koordinaten bekannter Raumstrukturen homologer Proteine. Mit Hilfe der Programme FRODO [128] und WHATIF [129] wird das Modell optimiert, vor allem im Bereich des C-Terminus und an Deletions- und Insertions-Stellen. Die Optimierung der polaren und hydrophoben Wechselwirkungen dient als Richtlinie bei der Ausrichtung der substituierten Seitenketten. Um schließlich die Rückgratkonformationen innerhalb der bevorzugten und zusätzlich erlaubten Bereiche des Ramachandran-Diagramms zu überprüfen, wird das Modell mit Hilfe des Programms PROCHECK [130] analysiert.

### **2.2.14 Isolierung und Quantifizierung der cbMLs aus Mistelextrakten und die Validierung dieser Methode**

#### **2.2.14.1 Reinigung von Roh-Chitin**

Die Reinigung von Roh-Chitin erfolgt, in Anlehnung an Skujins [131], in modifizierter Form [95-96]. Dazu werden 50 g Roh-Chitin in 200 ml 37% HCl suspendiert und während einem Zeitraum von 4 Stunden bei 4°C ab und zu gerührt. Anschließend wird die Suspension durch eine mit Glaswolle gefüllte Säule gefiltert und das Filtrat in 50% eiskaltem Ethanol ausgefällt. Nach Zentrifugation bei 1000 x g für 10 min wird das Präzipitat mit aq. bidest. neutral gewaschen, in 50 ml 20%igem Ethanol aufgenommen und gekühlt gelagert.

#### **2.2.14.2 Mikroisolierung der chitinbindenden Mistellektine im „Batch“-Verfahren**

150 µl Chitinsuspension (Abschnitt 2.2.14.1) werden in einem 2 ml-Eppendorfcup für 1 min bei 8000 x g abzentrifugiert. Dann wird das Chitin in 2 ml wässriger 0.5 M NaCl-Lösung resuspendiert und wieder 1 min bei 8000 x g abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wird noch zweimal wiederholt. Zwei oder vier ml Mistelextrakt werden zum Chitin gegeben und dieses gut resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur wird wieder bei 8000 x g für 1 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Chitinpellet wird zuerst dreimal mit 1.5 M Ammoniumacetatlösung, pH 5.5, dann zweimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen.

Die Desorption der gebundenen cbMLs erfolgt durch Zugabe von 50 µl 0.1% TFA zum Chitin, welches gut resuspendiert, 10 min unter Schütteln inkubiert und schließlich für 3 min bei 8000 x g abzentrifugiert wird. Der Überstand wird in ein weiteres Eppendorfcup überführt und der Vorgang noch zweimal wiederholt, wobei die 50 µl-Fractionen vereint werden. Das cbML-Eluat wird durch ein 0.22 µm-Filter-Reaktionsgefäß filtriert und auf eine VYDAC 300 C4-Säule (5 µm, 250 x 2 mm) vollständig injiziert. Die Trennung erfolgt unter den folgenden Bedingungen: Eluent A = 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O, Eluent B = 80% Acetonitril in A; Gradient: 20% B für 2 min, dann von 20 auf 80% B in 20 min und schließlich von 80 auf 100% B in 15 min; Flussrate: 0.25 ml/min; Detektionswellenlänge: 214 nm. Die manuell gesammelten Proteinfractionen werden lyophilisiert. Identifizierung und Reinheitskontrolle erfolgt mittels N-terminaler Sequenzanalyse der ersten acht Aminosäuren und MALDI MS.

Die Flächen unter den Peaks werden mit Hilfe eines Integrators berechnet. Die Quantifizierung erfolgt mittels einer Kalibriergeraden, erstellt mit einer cbML-Standardlösung in einer Konzentration von 0.05 mg/ml in 0.1% TFA.

#### **2.2.14.3 Erstellung einer Kalibriergeraden zur Quantifizierung der cbMLs in Mistelextrakten**

Zunächst wird eine cbML-Standardlösung der Konzentration 0.05 mg/ml in 0.1% TFA in aq. bidest. hergestellt. Von dieser werden 30, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 200 und 250 µl auf die VYDAC 300 C4-Säule injiziert und, wie bereits in Abschnitt 2.2.14.2 beschrieben, getrennt und analysiert. Es werden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt und eine Kalibriergerade erstellt.

#### **2.2.14.4 Systemeignungstest**

##### ***Verschleppung und Säulen,,memory“***

Nach jeder Injektion verschiedener Mengen eines cbML-Standards (0.05 mg/ml in 0.1% TFA in Wasser) wird 250 µl 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O injiziert, um zu prüfen, ob Verschleppungen stattfinden oder die Säule Proben,,memorys“ zeigt. Außerdem wird nach jedem HPLC-Lauf, bei dem eine Analysenprobe injiziert wurde, ebenfalls 250 µl wässrige TFA auf die Säule aufgetragen und das Chromatogramm auf Verschleppungen und Säulen,,memorys“ überprüft.

##### ***Reinheit des Extraktionsmediums (VS 2-Puffer)***

Um das Extraktionsmedium auf seine Reinheit hin zu untersuchen, werden drei Aufarbeitungen mit VS 2-Puffer (statt Mistelextrakt) nach Abschnitt 2.2.14.2 durchgeführt.

### ***Systempräzision***

Verschiedene Mengen (zwischen 1.5 und 15 µg Protein, jeweils Sechsfachbestimmungen) einer cbML-Standardlösung der Konzentration 0.05 mg/ml in 0.1% FA in H<sub>2</sub>O werden an verschiedenen Tagen auf die RP-Säule injiziert und die Fläche der Peaks berechnet. Die relativen Standardabweichungen sollen dabei unter 6% liegen.

#### **2.2.14.5 Validierung**

Für die Durchführung der Validierung wurden folgende Mistelextrakte der Abnoba Heilmittel GmbH verwendet:

- Abnobaviscum<sup>®</sup> Betulae-2 (Charge: 603 ABY)
- Abnobaviscum<sup>®</sup> Betulae-2 (Charge: 903 B-L)
- Abnobaviscum<sup>®</sup> Pini-2 (Charge: 912 ABU)
- Abnobaviscum<sup>®</sup> Fraxini-2 (Charge: 005 KLT)

Die Spezifikationen wurden von Dr. Rainer Scheer und Sebastian Jäger (Carl-Gustav-Carus-Institut, Niefern-Öschelbronn, Deutschland) vorgegeben.

### ***Bestimmung der Spezifität***

Vor der 30minütigen Inkubation (vgl. Abschnitt 2.2.14.2) werden zu je 2 ml Betulae-Extrakt (Charge: 603 ABY) 200 µl eines MLI-Standards der Konzentration 0.5 mg/ml bzw. 200 µl eines Viscotoxinstandards zupipettiert (99.4 µg/ml) und die Mikroisolierung, wie beschrieben, fortgesetzt (Dreifachbestimmungen). Als Vergleichswert dienen die Ergebnisse einer Neunfachbestimmung mit je 2 ml desselben Extrakts ohne Zugabe von MLI oder Viscotoxinen. Zusätzlich wird die unter 2.2.14.2 beschriebene Analysenmethode mit 500 µl MLI-Standard (Doppelbestimmung) bzw. 500 µl Viscotoxinstandard (Doppelbestimmung) ohne Extraktzugabe durchgeführt.

Spezifikation: Die Isolierung und Quantifizierung der cbMLs aus Mistelextrakten darf durch die Anwesenheit von MLI und Viscotoxinen nicht beeinflusst werden.

### ***Bestimmung der Robustheit***

Die Robustheit der Methode wird in diesem Fall über die Stabilität des cbML-Eluats vor der HPLC-Injektion bestimmt. Dazu wird das Proteineluat 1, 10 und 14 Tage bei 4°C gelagert und erst dann auf die RP-Säule injiziert. Es werden Neun-(1 Tag) und Dreifachbestimmungen (10 und 14 Tage) von Betulae-Extrakt (Charge: 603 ABY) durchgeführt. Die Analysen erfolgen aus jeweils 2 ml Mistelextrakt.

Spezifikation: Die Robustheit der Methode ist gewährleistet, wenn das cbML-Eluat mindestens 3 Tage bei 4°C gelagert werden kann. Der Test auf Robustheit erfolgt nach dem t-Test [132].

### ***Methodenpräzision***

Zur Bestimmung der Methodenpräzision werden je neun Analysen mit Betulae- und Fraxini-Extrakt (Chargen: 603 ABY bzw. 005 KLT) und sechs Analysen mit Pini-Extrakt (Charge: 912 ABU) durchgeführt. Von den Sorten Betulae und Pini werden jeweils 2 ml für die Analysen eingesetzt, von der Sorte Fraxini 4 ml.

Spezifikation: Die relativen Standardabweichungen der ausreißer- und trendfreien Werte der Mehrfachbestimmungen sollen nicht größer als 6% betragen.

### ***Laborpräzision***

Zwei verschiedene Personen führen jeweils neun Isolierungen und Quantifizierungen mit Betulae-Extrakt (Charge: 603 ABY) durch. Die eine Analysenserie erfolgt unter identischen Bedingungen innerhalb eines kurzen Zeitintervalls (ca. 5 Tage), während die andere Testserie im Verlauf von zwei Monaten durchgeführt wird. Außerdem werden sowohl Puffer als auch das Säulenmaterial während dieser Zeit erneuert.

Spezifikation: Die relativen Standardabweichungen der ausreißer- und trendfreien Werte sollen nicht größer als 6% betragen und die Analysenergebnisse müssen Robustheit (nach dem t-Test) und Varianzhomogenität (nach dem F-Test) aufweisen.

### ***Linearität***

Für die Bestimmung der Linearität werden verschiedene Verdünnungsstufen, entsprechend 20-150% theoretischem cbML-Gehalt, von Betulae-, Pini- und Fraxini-Extrakt analysiert und die Ergebnisse mit dem theoretischen Gehalt an cbMLs verglichen. Der Referenzwert (100%) entspricht dem cbML-Gehalt in unverdünntem Extrakt. Betulae-Extrakt der Charge 603 ABY wird 1:5 (20%), 2:5 (40%), 1:2 (50%), 3:5 (60%) und 4:5 (80%) mit VS 2-Puffer verdünnt, und von jeder Verdünnungsstufe werden analog Abschnitt 2.2.14.2 2 ml für die Isolierung und Quantifizierung eingesetzt. Für einen Wert bei 150% cbML-Gehalt wird dem Extrakt vor der Analyse die entsprechende Menge eines cbML-Standards zugefügt. Pini- und Fraxini-Extrakt (Charge: 912 ABU und 005 KLT) werden bei einer Verdünnung von 1:2 (50%) mit VS 2-Puffer und bei 150% cbML-Gehalt untersucht, während Betulae-Extrakt der Charge 903 B-L bei 50 und 130% theoretischem cbML-Gehalt analysiert werden.

Spezifikation: Liegt eine lineare Beziehung vor, so werden Regressionsgeraden nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate erstellt. Die Verteilung der Analysenwerte um diese Geraden soll zufällig sein, wobei der Korrelationskoeffizient der Kurve mindestens 0.95 beträgt.

### ***Richtigkeit (Wiederfindung)***

Die Richtigkeit der Methode wird gefolgert aus den Ergebnissen zur Spezifität, Präzision und Wiederfindung. Die Bestimmung der Wiederfindung erfolgt aus den Werten, mit denen die Linearität ermittelt wurde.

Spezifikation: Die Wiederfindungsrate muss mindestens 90% betragen.

### ***Nachweis- und Bestimmungsgrenze***

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze der cbMLs wird über die Werte, die den linearen Bereich der Analysenmethode bestimmen, ermittelt.

Spezifikation: Die Nachweisgrenze darf maximal 0.2 µg/ml und die Bestimmungsgrenze maximal 0.5 µg/ml betragen.

### ***Arbeitsbereich***

Der Arbeitsbereich entspricht hier der niedrigsten und höchsten Menge an cbMLs, die mit dem Chitin inkubiert werden kann und wird aus den Ergebnissen der Linearität abgeleitet.

Spezifikation: Der Arbeitsbereich soll zwischen 1 und 8 µg cbML liegen.

## **2.2.14.6 Statistische Auswertung der Ergebnisse**

Die statistische Interpretation der einzelnen Ergebnisse erfolgt durch das Computerprogramm VALIDAT 2000 (Version 2.020.0929) [132], das den DIN- und ICH-Richtlinien für Validierungen analytischer Methoden entspricht [133-134]. Es werden Mittelwerte und relativen Standardabweichungen berechnet. Letztere sollen 6% nicht überschreiten. Es werden Trendtests nach Neumann und Ausreißertests nach Dixon durchgeführt. Tests auf Robustheit werden nach Horwitz bzw. dem t-Test und die Varianzhomogenität nach dem Bartlett- bzw. F-Test bestimmt. Für die Bestimmung der Linearität werden Regressionsgeraden nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate erstellt, Achsenabschnitt a und Steigungsmaß b bestimmt und die Korrelationskoeffizienten und Reststandardabweichungen berechnet [132, 135-136].

**Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient** [132, 135-136]

Mittelwert  $\bar{X}$  einer Meßreihe:  $x_1, \dots, x_n$ :  $\bar{X} = 1/n \sum_{i=1}^n x_i$ .

Standardabweichung (Varianz)  $s$  einer Messreihe:  $s = (1/(n-1) \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2)^{1/2}$ .

Variationskoeffizient (relative Standardabweichung):  $V = s/\bar{X}$ , alle  $x > 0$ .

**Ausreißertest nach Dixon** [132, 135-136]

- Ordnung der Werte nach Größe:  $x_1 \leq x_2 \leq \dots \leq x_n$ , wenn der fragliche Wert (Ausreißer) nach unten abweicht bzw.  $x_1 \geq x_2 \geq \dots \geq x_n$ , wenn der fragliche Wert (Ausreißer) nach oben abweicht.

- Bestimmung der Prüfgröße  $Q$ ; für  $n \leq 7$ :  $Q = |(x_1 - x_2)/(x_1 - x_n)|$ ,

für  $8 \leq n \leq 10$ :  $Q = |(x_1 - x_2)/(x_1 - x_{n-1})|$ .

- Wenn  $Q > Q(P, n) \Rightarrow$  Ausreißer vorhanden ( $x_1$ );  $Q(P, n) =$  Tabellenwert (Schranke) des Dixon-Tests.

**Trendtest nach Neumann** [132, 135]

- Zeitlich aufeinanderfolgende Werte  $x_1, x_2, \dots, x_i, \dots, x_n \Rightarrow$  mittlere quadratische sukzessive Differenzstreuung:  $\Delta^2 = \sum (x_i - x_{i+1})^2 / (n-1)$

- Bestimmung der Prüfgröße  $W$ ;  $W = \Delta^2 / s^2 = \sum (x_i - x_{i+1})^2 / \sum (x_i - \bar{X})^2$

- Wenn  $W < W_m(P, n) \Rightarrow$  Trend vorhanden;  $W_m(P, n) =$  Tabellenwert (Schranke) des Trendtests nach Neumann.

**Horwitztest auf Robustheit** [132]

Wenn relative Standardabweichung  $V <$  durch Horwitz definierte maximale relative Standardabweichung  $\Rightarrow$  Verfahren ist robust.

**t-Test auf Robustheit** [132]

- Anzahl der Testreihen  $k = 2$  (bei gleichem oder ungleichem Stichprobenumfang je Reihe).

- Bestimmung der Prüfgröße  $t$ ; wenn  $t \leq t_{\alpha, 2n-2} \Rightarrow$  Verfahren ist robust;  $t_{\alpha, 2n-2} =$  Tabellenwert (Schranke) des t-Tests.

**Bartletttest auf Varianzhomogenität** [132, 135-136]

- Anzahl der Testreihen  $k > 2$  (bei gleichem oder ungleichem Stichprobenumfang je Reihe).

- Bestimmung der Prüfgröße  $\chi^2$ ; wenn  $\chi^2 > \chi^2(P, k-1) \Rightarrow$  keine Homogenität;  $\chi^2(P, k-1) =$  Tabellenwert (Schranke) des Bartletttests.

### ***F-Test auf Varianzhomogenität*** [132, 135-136]

- Anzahl der Testreihen  $k = 2$  (bei gleichem oder ungleichem Stichprobenumfang je Reihe).
- Bestimmung der Prüfgröße  $F$ :  $F = \max(s_1^2/s_2^2; s_2^2/s_1^2)$  mit  $FG_1 = n_1 - 1 = v_1$  und  $FG_2 = n_2 - 1 = v_2$ ;  $s_1^2 =$  größere Stichprobenvarianz.
- Wenn  $F > F_{\alpha, FG_1, FG_2} \Rightarrow$  keine Homogenität;  $F_{\alpha, FG_1, FG_2} =$  Tabellenwert (Schranke) des F-Tests mit  $\alpha =$  vorgewählte Irrtumswahrscheinlichkeit.

### ***Regressionsanalyse nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate*** [132, 135-136]

- Gleichung einer Geraden wird gesetzt als  $y = a + bx \Rightarrow$  lineare Regression

$$\begin{array}{ccc} & | & | \\ & \text{Zielgröße} & \text{Einflussgröße} \\ & \text{(abhängig Variable)} & \text{(unabhängige Variable)} \end{array}$$

- Die Parameter  $a$  und  $b$  und der Korrelationskoeffizient  $r$  werden aus den Stichproben nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate anhand der sog. Normalgleichungen geschätzt. Schließlich wird die Reststandardabweichung  $s^2_{y \cdot x}$  berechnet.

### ***Bestimmung der Wiederfindungsrate*** [132]

- Berechnung der Wiederfindungsrate über das Steigungsmaß  $b$ .
- Berechnung der Standardabweichungen von Achsenabschnitt  $a$  und Steigungsmaß  $b$  ( $s_a, s_b$ ).
- Bestimmung der Prüfgrößen  $t_a$  und  $t_b$ ;  $t_a = |a|/s_a$  bzw.  $t_b = |1-b|/s_b$ ; wenn  $t_a \leq t_{95\%(n-1)} \Rightarrow$  kein konstanter systematischer Fehler bzw. wenn  $t_b \leq t_{95\%(n-3)} \Rightarrow$  kein proportionaler systematischer Fehler;  $t_{95\%(n-1)}$  bzw.  $t_{95\%(n-3)} =$  Tabellenwert (Schranke) der t-Verteilung.

### ***Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze*** [132].

Die Bestimmung der Nachweis ( $X_N$ )- und Bestimmungsgrenze ( $X_B$ ) erfolgt nach dem Kalibrierkurvenverfahren (DIN 32645).

## **2.2.15 Antikörpertests gegen cbML3, MLI und MLIII**

### **2.2.15.1 Antikörperdetektion**

Die Detektion von Antikörpern gegen MLI, MLIII und die chitinbindenden Mistellektine erfolgt mittels eines ELISA [82]. Unter den cbML-Isoformen wird nur das cbML3 getestet.

Die Proteine werden in 0.1 M Hydrogencarbonatpuffer, pH 9.6, in einer Konzentration von 1 µg/ml gelöst. Mit diesen Lösungen werden Mikrotiterplatten über Nacht bei 4°C beschichtet (100 µl/„well“). Dann werden die Platten dreimal mit PBS (60 mM), pH 7.4, welches 1% BSA enthält, gewaschen und anschließend 60 min bei Raumtemperatur in diesem Puffer inkubiert (150 µl/„well“). Dadurch werden freie Bindungsstellen auf den Platten blockiert. Für die Bestimmung der IgG-Antikörper werden nach der Entfernung des Puffers Patientenserum in einer Verdünnung von 1:400 (mit PBS) zugegeben (100 µl/„well“, jeweils Doppelbestimmungen). Für die Bestimmung der IgE-Antikörper werden die Seren zuvor 1:5 (mit PBS) verdünnt. Die Inkubationszeit beträgt bei Raumtemperatur jeweils 90 min. Dann werden die Platten dreimal mit PBS, pH 7.4, welches 0.5% BSA und 0.2% Triton X 100 enthält, gewaschen (150 µl/„well“). Anschließend erfolgt eine 60minütige Inkubation mit monovalenten Peroxidase-konjugierten antihumanen IgG- und IgE-Antikörpern der Ziege (gelöst in aq. bidest. nach Herstellerangaben, dann 1:2000 verdünnt mit PBS) bei Raumtemperatur (100 µl/„well“). Dann werden die Platten wieder dreimal mit PBS, 0.5% BSA, 0.2% Triton X 100, pH 7.4, gewaschen (150 µl/„well“). Schließlich wird das Substrat ortho-Phenylendiamin (0.5 mg/ml in 0.2 M Citratpuffer, pH 5.0) zugegeben (150 µl/„well“). Die Messung erfolgt bei einer Wellenlänge von 495 nm im ELISA-Reader. Die Ergebnisse werden als optische Dichte (OD) x 1000 angegeben.

### 2.2.15.2 Patienten

Die Tests erfolgten mit Seren von 26 Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen (Lungenkrebs n = 8, Darmkrebs n = 3, Prostatakarzinom n = 2, Nierenzellkarzinom n = 2, Basaliom n = 2, andere n = 9). Alle Patienten bekamen mindestens 18 Wochen lang subkutane Injektionen von 3 x 1 Ampulle pro Woche Abnobaviscum<sup>®</sup> Mali-4 (0.2 mg Presssaft/Ampulle) verabreicht. Abnobaviscum<sup>®</sup> Mali-4 enthält ungefähr 0.02-0.04 µg/ml cbMLs, 0.08 µg/ml MLI und MLIII und 1 µg/ml Viskotoxine (mündliche Mitteilung von Dr. Rainer Scheer Carl-Gustav-Carus-Institut, Niefern-Öschelbronn, Deutschland). Keiner der Probanden wurde zuvor mit Mistelpräparaten therapiert und war während der letzten 8 Monate bestrahlt oder chemotherapeutisch behandelt worden. Die klinischen Daten dieser Patienten zeigt Tabelle 2.

Die Seren wurden vor Beginn der Misteltherapie den Patienten entnommen und untersucht. Die Tests auf anti-cbML3-Antikörper erfolgten bei 22 der 26 Fällen, außerdem nach 3, 6, 9, 12 und 18 Wochen, und bei 20 der 22 Patienten wurden die Seren auch nach 24 Wochen Mistelextrakttherapie analysiert. Im Fall von MLI und MLIII wurden 22 der 26 Seren nach 3,

6, 9 und 12 und bei 20 dieser 22 Fälle nach 18 und 24 Wochen auf anti-MLI- und -MLIII-Antikörper hin untersucht. Von den 20 Patientenseren wurden 7 zusätzlich nach der 31. Therapiewoche gegen MLI und MLIII getestet.

**Tabelle 2. Klinische Daten der 26 mit Abnobaviscum® Mali-4 behandelten Tumorpatienten, deren Seren für die Antikörpertests untersucht wurden.** T0-T4: aufsteigende Tumorgröße bzw. Eindringtiefe; N0-N3: aufsteigende regionale Lymphknotenmetastasierung; M0-M3: aufsteigender Fernmetastasierungsgrad; G1-3: Differenzierungsgrad (1 = stark differenziert, 3 = undifferenziert); p: nach erfolgter Exstirpation.

Patient (Nr.)	Alter (a)	Geschlecht	Art des Tumors	Stadium	Versuchszeitraum (Wochen)
1	71	m	zahlreiche Metastasen, Primärtumor unbekannt	zahlreiche Metastasen	24
2	47	f	Lungenkrebs	pT1cN0M0	24
3	59	f	Lungenkrebs	pT1cN0M0, G1-2	24
4	59	m	Basaliom	lokal	24
5	67	m	Leberzellkarzinom	Metastasen	18
6	73	f	Darmkrebs	pT3N0M0, G2-3	> 31
7	39	f	Zervixkarzinom	pT1bG2N0M0	> 31
8	57	f	Lungenkrebs	pT1cG1/2N1bcM0	24
9	61	m	Stimmbandleukoplakie	lokal	24
10	60	f	Darmkrebs	Karzinom in situ	24
11	57	m	Nierenzellkarzinom	zahlreiche Metastasen	> 31
12	64	f	Harnblasenkarzinom	Grad II, keine Metastasen	> 31
13	58	f	Lungenkrebs	Sarkom, keine Metastasen	24
14	68	f	Gallenblasenkarzinom	pT4N2M1	18
15	81	f	Darmkrebs	pT4pN3G3N1M1	24
16	67	f	Lungenkrebs	pT1cG2N0M0	24
17	44	f	Basaliom	lokal	> 31
18	74	m	Prostatakarzinom	pT3G2NxMx	18
19	72	m	Nierenzellkarzinom	pT2G2pN0(0/3)pMx	18
20	60	f	Lungenkrebs	T2N1(2/15)M0	24
21	69	m	zahlreiche Myelome		24
22	73	m	Magenkrebs	pT2G3pN0M0	> 31
23	32	m	Synovialiom	keine Metastasen	18
24	48	f	Lungenkrebs	pT2N1(11/19)M0G3	24
25	56	m	Prostatakarzinom	pT2cG1bN0M0	> 31
26	76	f	Lungenkrebs	pT1cN0M0	18

Die Studie wurde in Übereinstimmung mit den Richtlinien, die in Helsinki postuliert wurden, durchgeführt, und alle Patienten bestätigten schriftlich, dass sie mit den Untersuchungen und Tests einverstanden sind.

Die Bestimmung der optimalen Antigen-, Serum- und anti-Serumkonzentrationen erfolgt über serielle Verdünnungsreihen. Bei allen darauffolgenden Tests dienen drei Seren mit hohem, mittlerem und niedrigem Antikörpertiter und außerdem eine Negativkontrolle als Standardseren.

Als Kontrolle dienten die Seren von 38 gesunden Blutspendern. Die Mittelwerte plus der zweifachen Standardabweichung der mit diesen Seren gemessenen OD wurden als obere Grenze des normalen Bereichs definiert. Normale Werte für anti-cbML3-Antikörper entsprechen einer  $(OD) \times 1000 < 500$ , für anti-MLI-Antikörper einer  $(OD) \times 1000 < 400$  und für anti-MLIII-Antikörper  $(OD) \times 1000 < 300$ .

Die statistische Auswertung erfolgt mittels der nicht parametrischen Tests von Wilcoxon und Mann-Whitney [135-136]. Es werden Prüfgrößen  $U$  berechnet. Die Nullhypothese wird verworfen, wenn  $U \leq U(m,n; \alpha)$ , wobei  $U(m,n; \alpha)$  der Tabellenwert (Schranke) des Tests nach Wilcoxon und Mann-Whitney ist. P-Werte von weniger als 0.05 werden als signifikant gewertet. Der P-Wert ist die wahre aus den Daten gewonnene (empirische) Irrtumswahrscheinlichkeit.

### **2.2.16 Test auf antifungale Wirkungen der chitinbindenden Mistellektine**

Die Tests auf eine antifungale Wirkung [113, 116] der cbMLs werden mit fünf verschiedenen Pilzarten - *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hanesii* und *Candida sake* aus der Gruppe der Ascomyceten, *Microstroma juglandis* und *Tremella foliacea* aus der Gruppe der Basidiomyceten – unter sterilen Bedingungen durchgeführt: Die Stämme werden 24 h in 100 ml-Schikanekolben in Moser B-Flüssigmedium bei 22°C auf einer rotierenden Schüttelmaschine (70 U/min) vorkultiviert.

Für die Versuche werden die Kulturen mit dem genannten Medium so verdünnt, dass sie bei 595 nm eine OD von 0.004 haben. Je 20 µl verschiedener Konzentrationen der cbMLs, HPLC-gereinigt nach Abschnitt 2.2.4.2 und gelöst in H<sub>2</sub>O, werden zu jeweils 180 µl Pilzkultur pipettiert und die Ansätze in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit Deckel bei 22°C auf der Schüttelmaschine mit 70 U/min inkubiert. Es werden pro Konzentration und Pilzsorte Zwanzigfachbestimmungen durchgeführt. Nach 48, 72 bzw. 96 h wird die OD bei 595 nm gemessen. Der Nullabgleich erfolgt gegen 180 µl Medium mit 20 µl Wasser (Referenz).

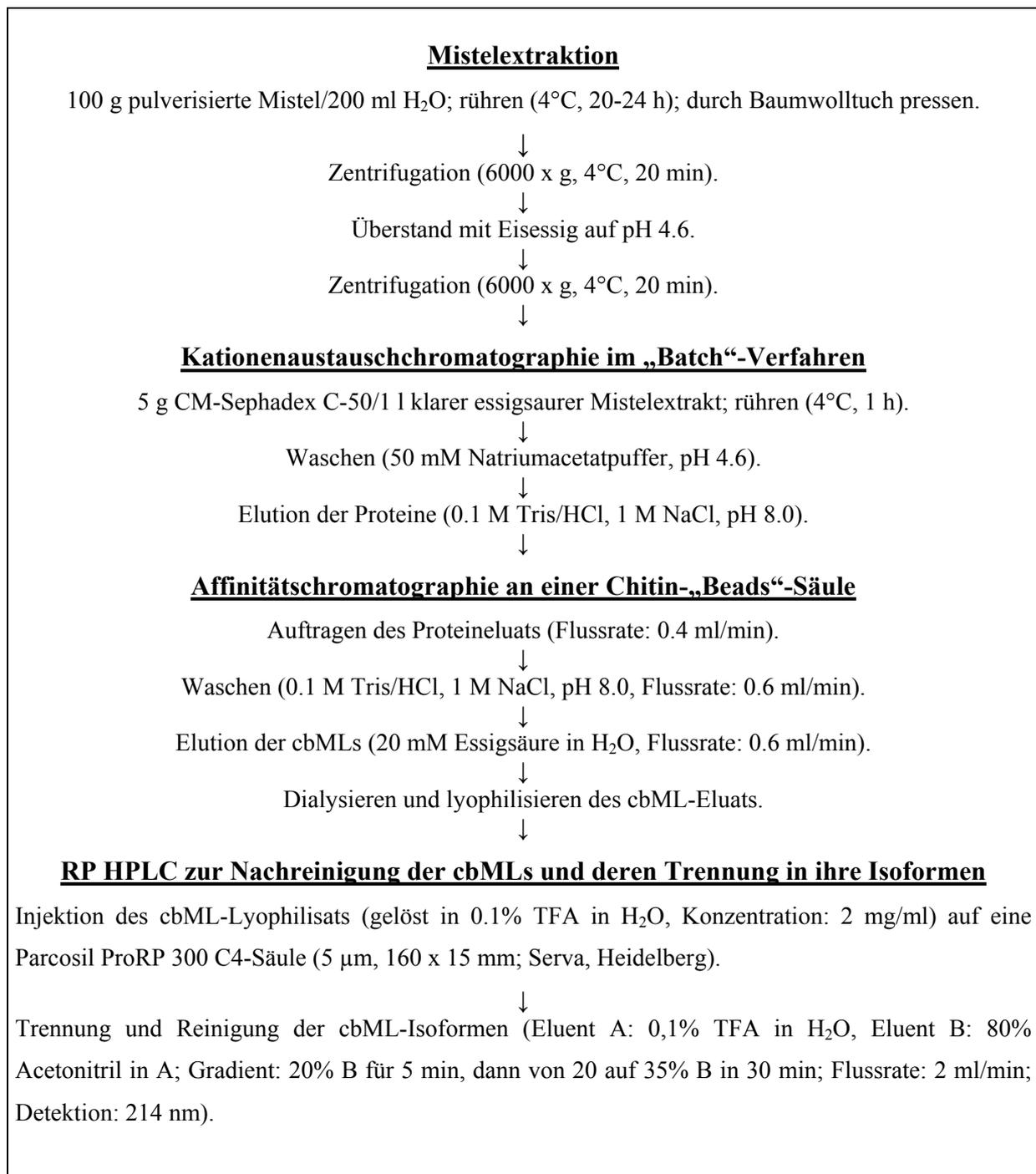
---

Pro Stamm werden 24 Wachstumskontrollen durchgeführt, bei denen zu den Kulturen jeweils 20  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  anstelle der Proteinlösung zupipettiert werden. Für die Sterilkontrollen werden 20  $\mu\text{l}$  Proteinlösung (Endkonzentration 5  $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ ) zu 180  $\mu\text{l}$  Moser B-Flüssigmedium pipettiert. Wachstums- und Sterilkontrollen werden wie oben beschrieben inkubiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Isolierung der chitinbindenden Mistellektine

Die Reinigung der chitinbindenden Mistellektine erfolgte nach einem Aufarbeitungsschema, wie in Abbildung 2 dargestellt.

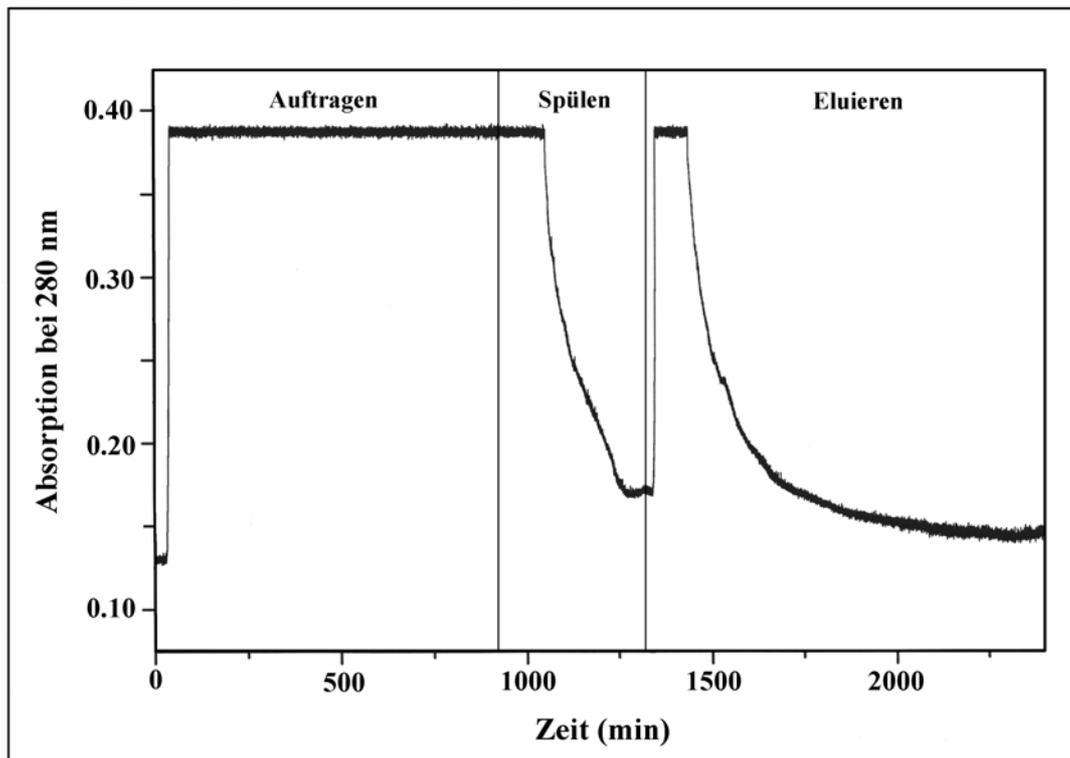


**Abb. 2. Aufarbeitungsschema zur Isolierung der chitinbindenden Lektine aus Misteln.**

Ausgangsmaterial für die Isolierung der Lektine waren Misteln des Wirtsbaums Mischapfel, die zu verschiedenen Jahreszeiten geerntet wurden. Wie unter Abschnitt 2.2.1 beschrieben, erfolgte die Extraktion aus dem pulverisierten Pflanzenmaterial, welches in aq. bidest. aufgenommen, bis zu 24 h bei 4°C gerührt, durch ein Baumwolltuch gepresst und schließlich zentrifugiert wurde. Um die Proteine in dem getrübbten dunkelbraunen Extrakt von anderen Komponenten zu trennen, wurde eine Kationenaustauschchromatographie im „Batch“-Verfahren durchgeführt. Dazu wurde der Extrakt mit konz. Essigsäure auf einen pH von 4.6 eingestellt und zentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit dem Ionenaustauscher versetzt und die gebundenen Proteine nach einer einstündigen Inkubation und mehrmaligem Waschen durch Erhöhung des pH-Werts und der Ionenkonzentration wieder eluiert. Die vereinten Proteinfractionen wurden auf eine nach Abschnitt 2.2.3 vorbereitete Chitin-„Beads“-Säule aufgetragen und diese anschließend gespült, um andere Komponenten, die nicht spezifisch an das Affinitätsmaterial gebunden haben, zu entfernen. Die Elution der cbMLs erfolgte durch Reduktion des pH-Wertes auf ungefähr 3.3 (Abb. 3). Anschließend wurde das Eluat dialysiert und lyophilisiert. Für jeden Reinigungsschritt wurden der Proteingehalt und der Hämagglutinationstiter bestimmt. Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse einer cbML-Isolierung aus 500 g Mistel des Wirtsbaums Mischapfel.

Durch das Ansäuern des Rohextrakts auf pH 4.6 fielen vor allem störende Begleitkomponenten aus, aber auch ein beträchtlicher Anteil an Proteinen, der in dem Beispiel von Tabelle 3 bei ungefähr 50% lag. Gleichzeitig blieb der Hämagglutinationstiter nahezu konstant, d. h. der Hauptteil der für die hämagglutinierende Aktivität verantwortlichen Lektine präzipitierte nicht und blieb im Überstand des zentrifugierten angesäuerten Mistelextrakts. Der Ionenaustauscherschritt hatte einen weiteren Proteinverlust von über 50% zur Folge. Den  $HU_{ges.}$ -Wert des Rohextrakts findet man aber im Kationenaustauschereluat vollständig wieder, d. h. bis zu diesem Reinigungsschritt kam es zu keinem erkennbaren Verlust der hämagglutinierenden Lektinmenge. Diese ließ sich auch vollständig im Durchlauf, nach dem Auftragen der Proteinfraction auf die Chitin-„Beads“-Säule, wiederfinden, während das AC-Eluat keine hämagglutinierende Aktivität zeigte. Erst nach vorangegangener Sensibilisierung des Bluts durch Papain erhielt man für die cbML-Fraktion 8 HU, entsprechend 17600 HU (786 HU/mg Protein) für die gesamte Eluatmenge.

Trotz der relativ niedrigen Wiederfindungsrate von knapp über 20% der ursprünglichen Proteinmenge im IEC-Eluat, ist die Ionenaustauschchromatographie ein notwendiger Schritt: man erhält klare hellgelbe Proteinfractionen, bei Raumtemperatur stabil bis zu 4 Tagen, d. h. optimal für die anschließende, teilweise bis zu 72 h dauernde Affinitätschromatographie.



**Abb. 3. Isolierung der chitinbindenden Mistellektine (cbMLs) durch Affinitätschromatographie (AC) von Mistelproteinen.** Im Anschluß an eine Kationenaustauschchromatographie von geklärtem Pflanzenextrakt, hergestellt aus 0.5 kg Misteln (Wirtsbaum: Mischapfel), wurden ca. 400 ml Proteineluat auf eine AC-Säule aufgetragen (vgl. Abb.2). Säulenmaterial: Chitin-„Beads“; Säulendimension: 16 x 270 mm, Bettvolumen: 70 ml; Spülpuffer: 0.1 M Tris/HCl, 1 M NaCl, pH 8.0, Elutionspuffer: 20 mM HAc in H<sub>2</sub>O; Flussrate: 0.6 ml/min (Spülen und Eluieren) bzw. 0.4 ml/min (Auftragen); Detektion:  $\lambda$  = UV bei 280 nm.

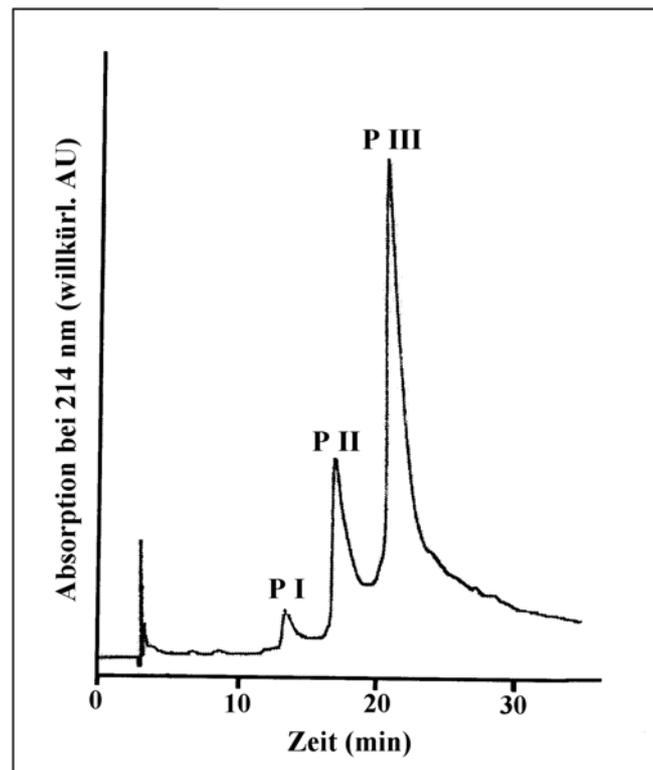
**Tabelle 3. Proteingehalte und Hämagglutininertiter der einzelnen Reinigungsstufen zur Isolierung der chitinbindenden Mistellektine (vgl. Abschnitt 2.2.1-2.2.3, Abb. 2).** Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford [118]. Eine Eichgerade wurde mit BSA als Standard erstellt. Für die Hämagglutinationstests wurde humanes Spenderblut der Blutgruppe B (Rhesusfaktor negativ) verwendet. Zu je 50  $\mu$ l 2%iger Erythrocytensuspension wurden je 50  $\mu$ l einer seriellen zweifachen Verdünnungsreihe der jeweiligen Probe pipettiert und gut durchgemischt. Nach einer Stunde wurde die höchste Verdünnungsstufe, bei der die Lösung gerade noch hämagglutiniert, abgelesen.

AC: Affinitätschromatographie, IEC: Ionenaustauschchromatographie, HU: Hämagglutinierende Einheiten.

Reinigungsstufe	Volumen (ml)	Proteingehalt (mg/ml)	Proteingehalt <sub>ges.</sub> (mg)	HU/50 $\mu$ l	HU <sub>ges.</sub>	HU/mg Protein
Rohextrakt	800	2.03	1625.6	8	128000	79
Extrakt, pH 4.6	780	1.04	813.5	8	124800	153
Durchlauf IEC	780	0.37	290.5	0	0	0
IEC-Eluat	400	0.89	354.4	16	128000	361
Durchlauf AC	400	0.80	318.6	16	128000	402
AC-Eluat	110	0.20	22.4	0	0	0

Durch die Entfernung störender Begleitkomponenten verkürzen sich außerdem die Spülzeiten der Chitin-, „Beads“-Säule nach dem Auftragen des IEC-Eluats, was zu einer erhöhten cbML-Ausbeute führt. Weiterhin lässt sich das Affinitätsmaterial mehrfach verwenden (bis zu 15 cbML-Isolierungen aus jeweils 500 g Misteln), während es nach einer, direkt aus dem Rohextrakt durchgeführten Isolierung der cbMLs, ohne vorheriger Ionenaustauschchromatographie, aufgrund nicht wieder zu entfernender Verunreinigungen direkt entsorgt werden muß.

Die weitere Reinigung der noch leicht hellbraunen affinitätsgereinigten und lyophilisierten chitinbindenden Mistellektine erfolgte über RP HPLC auf einer C4-Säule. Dabei werden oft auftretende Verunreinigungen durch die Mistellektine vom Typ II RIP und durch die Viscotoxine endgültig aus der cbML-Fraktion entfernt, da sie unter den eingesetzten Bedingungen mit höheren Retentionszeiten eluieren (Daten nicht gezeigt). Bei einer TFA-Konzentration von 0.1% und unter dem in Abschnitt 2.2.4.1 beschriebenen linearen Acetonitrilgradienten erhielt man drei getrennte Proteinfractionen (Abb. 4). Die Hauptfraktion, PIII, wurde nach einer Retentionszeit von ungefähr 22 min eluiert, während



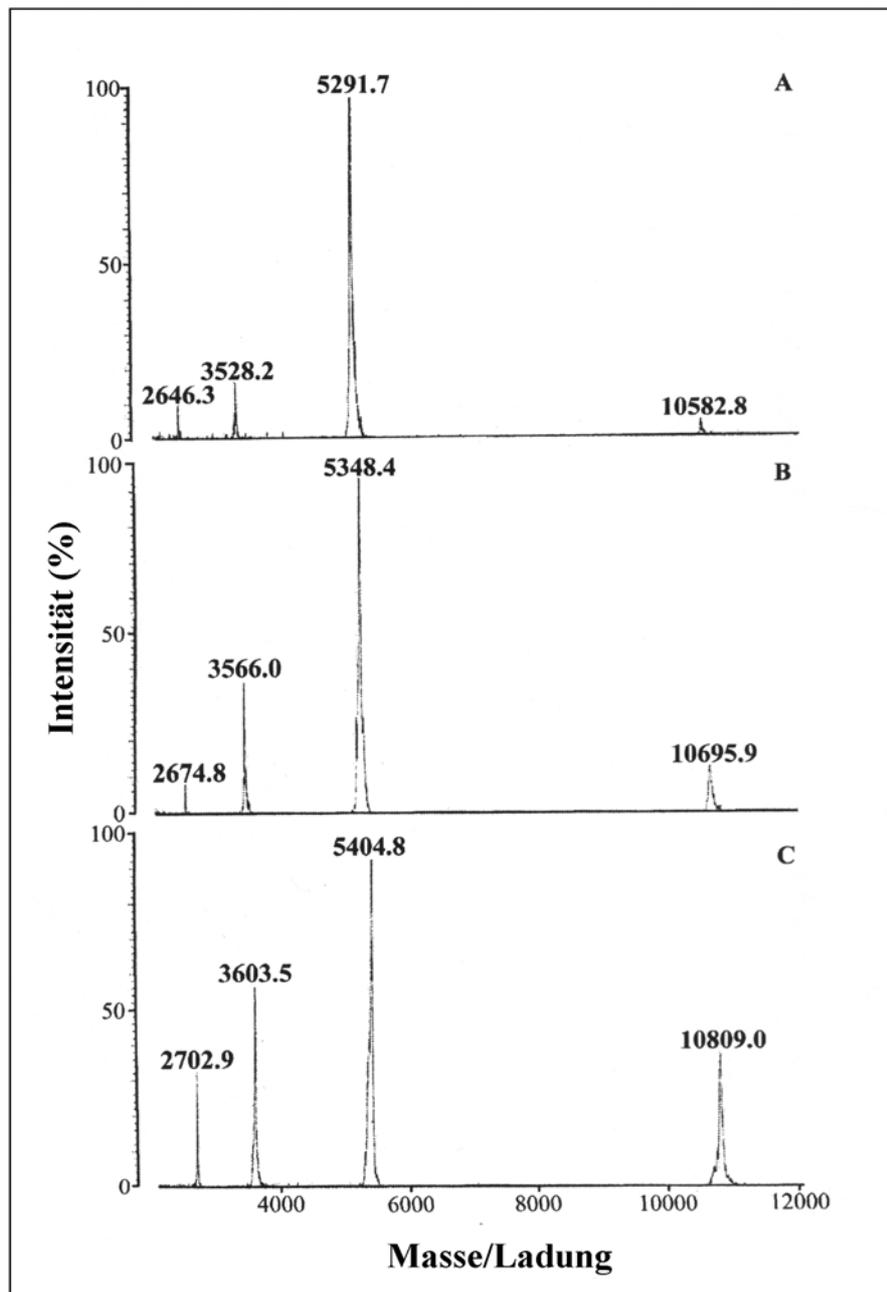
**Abb. 4. HPLC-Chromatogramm der cbML-Isoformen, isoliert über Affinitätschromatographie an Chitin-, „Beads“.** Es wurden 1 mg in 500 µl 0.1% TFA gelöstes Proteinlyophilisat aufgetragen. Säule: Parcosil ProRP 300 C4 (5 µm, 160 x 15 mm; Serva, Heidelberg). Elutionspuffer A: 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O; Elutionspuffer B: 80% CH<sub>3</sub>CN in A; Gradient: 20% B für 5 min, dann von 20 auf 35% B in 30 min. Flußrate: 2.0 ml/min. Detektion: UV bei  $\lambda = 214$  nm.

die Fraktionen PI und PII nach 14 bzw. 18 min erschienen. Die Identifizierung und Reinheitskontrolle erfolgte mittels MALDI MS (Abb. 5) und N-terminale Sequenzanalyse (Daten nicht gezeigt). Das MALDI MS-Spektrum des größten HPLC-Peaks, PIII, zeigte m/z-Werte von 10809.0, 5404.8, 3603.5 und 2702.9 Da, entsprechend einfach-, zweifach-, dreifach- und vierfachgeladenen Molekülonen (Abb. 5C). PI und PII, die beiden kleineren HPLC-Proteinfraktionen ergaben ein ähnliches MALDI MS-Profil mit etwas niedrigeren Molekülmassen von 10582.8 bzw. 10695.9 Da (Abb. 5A und 5B). Die MALDI MS-Spektren der drei Fraktionen wiesen keine Verunreinigungen auf. N-terminale Sequenzanalysen der ersten 40 Aminosäuren zeigten für jede der drei Proteinfraktionen identische Ergebnisse (vgl. Abschnitt 3.2), und es werden auch hier keine Verunreinigungen durch andere Proteine gefunden.

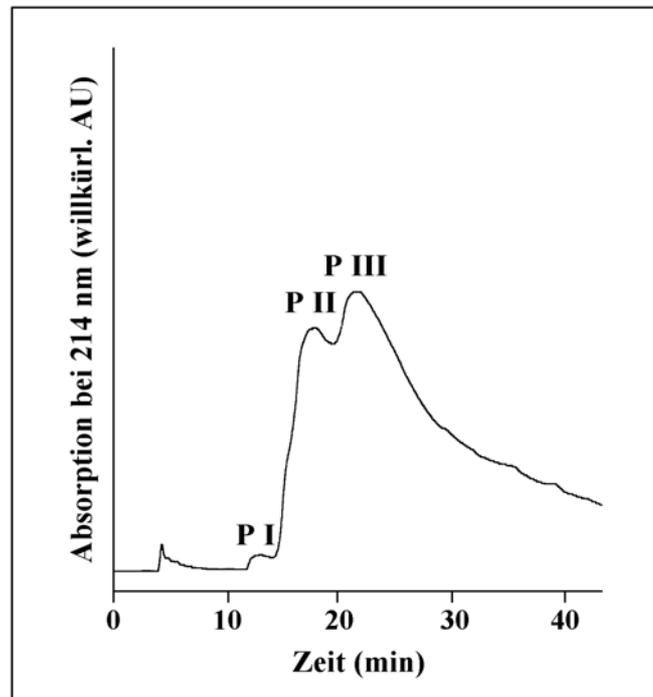
Erfolgt die HPLC-Nachreinigung der affinitätsgereinigten cbMLs bei niedrigerer TFA-Konzentration, so werden die cbML-Isoformen nicht mehr ausreichend voneinander getrennt und man erhält ein Chromatogramm wie in Abb. 6 gezeigt. Die Trennung wurde bei einer TFA-Konzentration von 0.025% und einem etwas anderen Acetonitrilgradienten unter sonst gleichen Bedingungen wie bei der HPLC-Nachreinigung in Abb. 4 durchgeführt. Auch in diesem Fall wurden Identität und Reinheit mittels MALDI MS und N-terminaler Sequenzierung der ersten 40 Aminosäuren geprüft und bestätigt. Da aber die drei HPLC-Fraktionen PI-PIII nicht ausreichend getrennt voneinander gesammelt werden konnten, erhielt man MALDI MS-Spektren, die auch Peaks der jeweils anderen cbML-Isoformen mit den entsprechenden m/z-Werten enthielten (Daten nicht gezeigt).

Der pH der vereinten cbML-Isoformfraktionen nach einer HPLC-Aufreinigung mit 0.025% TFA beträgt ungefähr 3.2. Dies entspricht einem um 0.8 Einheiten höheren pH als bei einer Trennung mit 0.1% TFA. Peumans et al. gehen davon aus, dass VisalbcBA (wobei es sich bei VisalbcBA und den cbMLs mit hoher Wahrscheinlichkeit um dieselben Proteine bzw. Isoformen handelt) im pH-Bereich zwischen 1 und 12 stabil sei [47]. Der Grund hierfür liegt v. a. in der hohen Anzahl an Disulfidbrücken und der damit verbundenen kompakten globulären Struktur der chitinbindenden Mistellektine (vgl. Abschnitt 3.2). Der Vergleich mit homologen Proteinen, wie z. B. den *Ac*-AMPs, von denen bereits bekannt ist, dass sie ebenfalls im Bereich zwischen pH 2 und 11 stabil sind [113], unterstützen diese Aussage. Da aber bisher keine Untersuchungen durchgeführt worden sind, die die strukturelle und die funktionelle Stabilität der cbMLs im genannten pH-Bereich eindeutig bestätigen, kann nicht uneingeschränkt davon ausgegangen werden, dass das Lektin sowohl bei stark saurem, als auch bei pH 12 stabil ist. Aus diesem Grund wurde bei Experimenten, bei denen auf eine

Trennung der cbML- Isoformen verzichtet werden konnte, die HPLC-Nachreinigung mit 0.025% TFA durchgeführt.



**Abb. 5. MALDI MS-Spektren der HPLC-gereinigten cbML-Isoformen (vgl. Abb. 4).** (A) PI (cbML1); (B) PII (cbML2); (C) PIII (cbML3). Matrix:  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycimtsäure/2.5-Dihydroxybenzoesäure(AHC/DHB)-Mischmatrix in 50% Acetonitril und 0.1% TFA. Anzahl der Pulse: 50. Laserstärke: 74. Wellenlänge des N<sub>2</sub>-Lasers: 337 nm. M/z-Werte: einfachgeladene Molekülonen  $[MH]^+$   $\rightarrow$  10582.8 (A), 10695.9 (B), 10809.0 (C); zweifachgeladene Molekülonen  $[MH_2]^{2+}$   $\rightarrow$  5291.7 (A), 5348.4 (B), 5404.8 (C); dreifachgeladene Molekülonen  $[MH_3]^{3+}$   $\rightarrow$  3528.2 (A), 3566.0 (B), 3603.5 (C); vierfachgeladene Molekülonen  $[MH_4]^{4+}$   $\rightarrow$  2646.3 (A), 2674.8 (B), 2702.9 (C).



**Abb. 6. HPLC-Chromatogramm der cbML-Isoformen, isoliert über Affinitätschromatographie an Chitin-„Beads“.** Es wurden 1 mg in 500  $\mu$ l 0.025% TFA gelöstes Proteinlyophilisat aufgetragen. Säule: Parcosil ProRP 300 C4 (5  $\mu$ m, 160 x 15 mm; Serva, Heidelberg). Elutionspuffer A: 0.025% TFA in H<sub>2</sub>O; Elutionspuffer B: 80% CH<sub>3</sub>CN in A; Gradient: 15% B für 2 min, dann von 15 auf 30% B in 38 min und von 30 auf 100% B in 10 min, 100% B für 5 min. Flußrate: 2.0 ml/min. Detektion: UV bei  $\lambda = 214$  nm.

Um die Reinheit der Proteinlyophilisate nach der HPLC-Nachreinigung zu überprüfen und deren Proteingehalte zu bestimmen, wurden Aminosäureanalysen durchgeführt. Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der Aminosäureanalyse von cbML3. Der Vergleich der Aminosäurezusammensetzung stimmt mit der, über N-terminaler Sequenzanalyse ermittelten sehr gut überein (vgl. Abschnitt 3.2) [95-97], was die hohe Reinheit des Lyophilisats bestätigt. Der Proteingehalt liegt bei knapp 80%. Die restlichen 20% sind vor allem auf den Feuchtigkeitsgehalt und Verluste bei den einzelnen Überführungsschritten, z. B. zwischen Abwiegen und Hydrolysevorgang, zurückzuführen. Die Aminosäureanalysen der cbML1- und cbML2-Lyophilisate ergaben Proteingehalte von 81.5% bzw. 79.0%. Auch in diesen Fällen konnte eine hohe Reinheit der Lyophilisate festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Hämagglutinationstests von in PBS gelöstem nach Abschnitt 2.2.4.2 HPLC-gereinigtem cbML-Lyophilisat (Konzentration: 0.1-1 mg/ml) mit unbehandeltem Blut verschiedener Blutgruppen waren negativ. Nach Sensibilisierung von Erythrocyten der Blutgruppe B (Rhesusfaktor negativ) mittels Papain erhielt man bei einer cbML-Konzentration von 0.8 mg/ml 64 HU, entsprechend 1600 HU/mg cbMLs. Peumans et al. [47] geben an, dass das chitinbindende Mistellektin in einer Konzentration von 5  $\mu$ g/ml unbehandeltes humanes Blut

hämagglutiniert. Dies konnte auch nach wiederholten Tests mit verschiedenen Blutgruppen nicht bestätigt werden.

**Tabelle 4. Ergebnisse der Aminosäureanalyse (ASA) von cbML3.** Es wurden 299.7 µg lyophilisierte Proteinprobe mit 6 M HCl versetzt und unter Vakuum bei 110°C für 24 h hydrolysiert. Die Aminosäureanalyse der getrockneten und in Probenverdünnungspuffer (Biotronik, Maintal) gelösten Probe erfolgte in einem LC 3000 Aminosäureanalysator (Eppendorf Biotronik, Hamburg). Die Berechnungen erfolgten auf der Grundlage der vollständigen N-terminalen Sequenzierung (Abb. 8, Abschnitt 3.2). Asparagin und Glutamin werden unter den Hydrolysebedingungen als Asparagin- und Glutaminsäure bestimmt.

AS: Aminosäure, C: Konzentration, Asx: Asparagin und Asparaginsäure, Glx: Glutamin und Glutaminsäure.

AS	C (AS) (nmol/ml)	Anzahl (AS) theoretisch <sup>1</sup>	Anzahl (AS) experimentell	Theor. mol. Anteil AS (%)	Exp. mol. Anteil AS (%)	Gewichts- anteil AS (µg)
Asx	880.12	12	12.10	12.2	12.3	30.39
Thr	415.27	6	5.71	6.1	5.8	12.60
Ser	368.82	6	5.07	6.1	5.2	9.64
Glx	718.39	10	9.87	10.2	10.1	27.82
Gly	883.61	12	12.14	12.2	12.4	15.14
Ala	312.69	4	4.30	4.1	4.4	6.67
Cys	1298.00	18	17.84	18.4	18.2	40.15
Val	5.29	0	0.07	0	0.1	0.16
Met	6.42	0	0.09	0	0.1	0.25
Ile	141.46	2	1.94	2.0	2.0	4.80
Leu	264.62	4	3.64	4.1	3.7	8.99
Tyr	144.51	2	1.99	2.0	2.0	7.08
Phe	4.92	0	0.07	0	0.1	0.22
His	161.82	2	2.22	2.0	2.3	6.66
Lys	323.29	4	4.44	4.1	4.5	12.43
Arg	616.24	8	8.47	8.2	8.6	28.88
Pro	293.92	4	4.04	4.1	4.1	8.56
Trp		4	4.00 <sup>2</sup>	4.1	4.1	16.26
Summe		98	98.0	100.0	100.0	236.7
Probenvolumen (µl)		300.0				
Probenmenge (µg)		299.7				
Proteingehalt (%)		79.0				

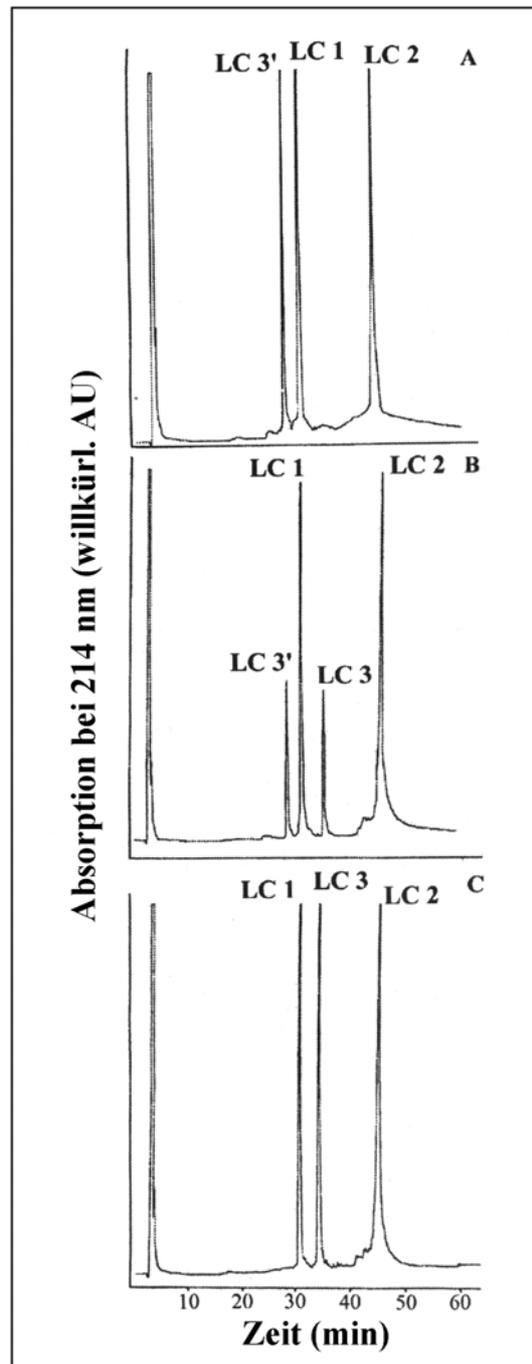
<sup>1</sup> vgl. Sequenzbestimmung in Abschnitt 3.2; <sup>2</sup> entspricht dem theor. Wert, da Trp unter den sauren Hydrolysebedingungen instabil ist.

### 3.2 Primärstruktur der cbML-Isoformen und „Molecular Modeling“

Zuerst erfolgte die Bestimmung der Primärstruktur der Hauptisoform der chitinbindenden Mistellektine (cbML3) durch N-terminale schrittweise Proteinsequenzierung nach Edman ohne vorheriger Spaltung des Proteins in kleinere Peptide, wodurch die Primärsequenz der ersten 40 Aminosäuren ermittelt werden konnte: I D H R C G R E A T P P G K L C N D G R C C S Q W G W C G T T Q A Y C S G K C Q. Die folgenden Edmanabbauschritte lieferten keine eindeutigen Ergebnisse mehr.

Für eine vollständige Sequenzierung der Hauptisoform wurde diese dann gemäß Abschnitt 2.2.8 reduziert und die freien Cysteinreste anschließend mittels Vinylpyridin alkyliert. Nach der Entsalzung des Ansatzes mittels RP HPLC erfolgte der Verdau des Proteins mit Endoproteinase LysC. Dieses Enzym ist eine Serin-Protease und spaltet bei einem pH-Optimum von 7.0-9.0 spezifisch Peptidbindungen C-terminal an Lysinresten. Man erhielt drei Spaltfragmente, die über HPLC auf einer C18-Säule getrennt wurden (Abb. 7 C). LC1-cbML3, das erste aus 14 Aminosäureresten bestehende Spaltpeptid entspricht der cbML3-Sequenz von Position 1 bis 14. Das zweite LysC-Fragment (LC2-cbML3, 24 Aminosäurereste) ist mit dem mittleren Teil von cbML3 an Position 15 bis 38 identisch. Die vollständigen Aminosäuresequenzen erhielt man durch Überlappung des dritten Fragments (LC3-cbML3; 11 Aminosäurereste) an den Positionen 39 und 40 mit den Sequenzdaten des intakten Moleküls (Abb. 8). Die mittels MALDI MS bestimmten Massen der LysC-Fragmente LC1-3 von cbML3 entsprechen den auf der Basis der Sequenzdaten berechneten Werten (Tabelle 5).

Für die vollständige Sequenzierung der beiden anderen Isoformen cbML1 und cbML2 wurde auf gleiche Weise verfahren, wie bei der Bestimmung der Primärstruktur von cbML3. Das HPLC-Chromatogramm der S-pyridylethylierten, mit Endoproteinase LysC verdauten Proteine zeigen die Abbildungen 7 A und 7 B. Im Fall von cbML1 wurden ebenfalls drei Spaltfragmente (LC1, LC2 und LC3') gefunden, während aus dem Verdau von cbML2 vier Spaltpeptide (LC1, LC2, LC3 und LC3') resultierten. Die Ergebnisse der MALDI MS-Analysen der LysC-Fragmente von cbML1 und cbML2 wurden mit denen der Hauptisoform verglichen (Tabelle 5). Die molekularen Massen der LysC-Fragmente LC1 und LC2 stimmen bei allen drei cbML-Isoformen überein, d. h. cbML1-3 sind bis zur Position 38 identisch, wie auch die Ergebnisse der N-terminalen Sequenzanalysen bestätigten (Abb. 8). LC3'-cbML1 hat ein Molekulargewicht von 1487.9 Da, d. h. 113.5 Da weniger als das Fragment LC3 der Hauptisoform cbML3 (Molekulargewicht: 1601.4 Da). Die Ergebnisse der Sequenzierung zeigten, dass beide Fragmente bis zur Position 48 identisch sind. Die Sequenz von LC3' endet



**Abb. 7. HPLC-Trennung der Endoproteinase LysC-Spaltfragmente der Lektinisoformen cbML1 (A), cbML2 (B) und cbML3 (C).** Zu je 200  $\mu\text{g}$  der S-pyridylethylierten cbML-Isoformen (vgl. Abschnitt 2.2.8), gelöst in je 500  $\mu\text{l}$  25 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 5% Acetonitril, pH 8,5, wurde Endoproteinase Lys C (Enzym:Substrat-Verhältnis von 1:40) zugegeben. Die Spaltansätze wurden bei 37°C 16 h geschüttelt. Die Reaktion wurde mit TFA abgestoppt und die Fragmente mittels RP HPLC getrennt. Säule: Grom-Sil 100 C18 (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm; Grom, Herrenberg-Kayh). Elutionspuffer A: 0,1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ ; Elutionspuffer B: 80%  $\text{CH}_3\text{CN}$  in A; Gradient: 0% B für 5 min, dann von 0 auf 50% B in 50 min, schließlich von 50 auf 100% B in 10 min. Flußrate: 0,75 ml/min. Detektion: UV bei  $\lambda = 214 \text{ nm}$ .

dann an dieser Stelle, während bei LC3 noch ein Leucinrest folgt, der genau der Massendifferenz beider Fragmente entspricht. Fügt man jeweils die drei Peptidfragmente in

der richtigen Reihenfolge wieder zusammen, so erhält man für cbML1 eine 48 Aminosäurereste lange Kette und für cbML3 eine um ein Leucinrest längere Kette bei ansonsten identischer Sequenz.

	5	10	15	20	25	30	35	40	45
CbML1-3	IDHRCGREATPPGKLCNDGRCCSQWGWCGTTQAYCSGKQC...								
LC1	IDHRCGREATPPGK								
LC2			LCNDGRCCSQWGWCGTTQAYCSGK						
LC3								CQSQCDCNRDL	
LC3'								CQSQCDCNRD	
CbML3	IDHRCGREATPPGKLCNDGRCCSQWGWCGTTQAYCSGKQCQSQCDCNRDL								

**Abb. 8. Ergebnisse der N-terminalen Aminosäuresequenzierung von cbML1, cbML2 und cbML3 und deren Spaltfragmente LC1-3 und LC3' nach Verdau mit Endoproteinase LysC.** Die vollständige Primärstruktur ist am Beispiel der Hauptisoform des chitinbindenden Mistellektins cbML3 dargestellt. Diese erhielt man durch Überlappung der Sequenzen der Fragmente und den Ergebnissen der N-terminalen Sequenzierung der nativen Proteine.

**Tabelle 5. Vergleich der theoretisch und experimentell bestimmten molekularen Massen der LysC (LC)-Fragmente der S-pyridylethylierten Derivate von cbML1, cbML2 und cbML3.** Für die Reduktion und S-Pyridylethylierung wurden jeweils 2.5-3 mg Proteinlyophilisat, gelöst in 0.25 M Tris/HCl, 6 M Guanidiniumchlorid, 1 mM EDTA, pH 8.5, mit  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt und unter Sauerstoffausschluss 16 h bei RT im Dunkeln geschüttelt. Nach Zugabe von Vinylpyridin wurden die Proben weitere 4 h im Dunkeln bei RT geschüttelt. Für den Verdau mit Endoproteinase LysC wurden die entsalzten Cys-modifizierten cbML-Isoformen in je 500  $\mu$ l 25 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 5% Acetonitril, pH 8.5, gelöst, mit Endoproteinase Lys C (Enzym:Substrat-Verhältnis von 1:40) versetzt und bei 37°C 16 h geschüttelt. Die Reaktion wurde mit TFA beendet und die Fragmente mittels RP HPLC über eine Grom-Sil 100 C18-Säule (5  $\mu$ m, 250 x 4.6 mm; Grom, Herrenberg-Kayh) getrennt. Die Berechnungen der theoretischen Massen erfolgten auf der Grundlage der N-terminalen Sequenzierung der einzelnen Fragmente (Abb. 8). Aufgrund der Cys-Modifikationen ergeben sich zusätzliche Massen von 105.1 Da/S-Pyridylethylierung. Die experimentellen Werte resultierten aus MALDI MS-Messungen und entsprechen den m/z-Werten der einfachgeladenen Molekülonen der LysC-Fragmente LC1-3 und LC3'.

Isoform	Molekulargewicht (Cys-modifiziert) (Da)					
	LC1 (AS 1-14)		LC2 (AS 15-38)		LC3'/3 (AS 39-48/49)	
	theor. [M]	exp. [MH] <sup>+</sup>	theor. [M]	exp. [MH] <sup>+</sup>	theor. [M]	exp. [MH] <sup>+</sup>
cbML1	1641.9	1643.1	3153.7	3154.8	1486.7	1487.9
cbML2	1641.9	1642.8	3153.7	3155.0	1486.7	1487.8
					1599.8	1601.3
cbML3	1641.9	1643.0	3153.7	3154.9	1599.8	1601.4

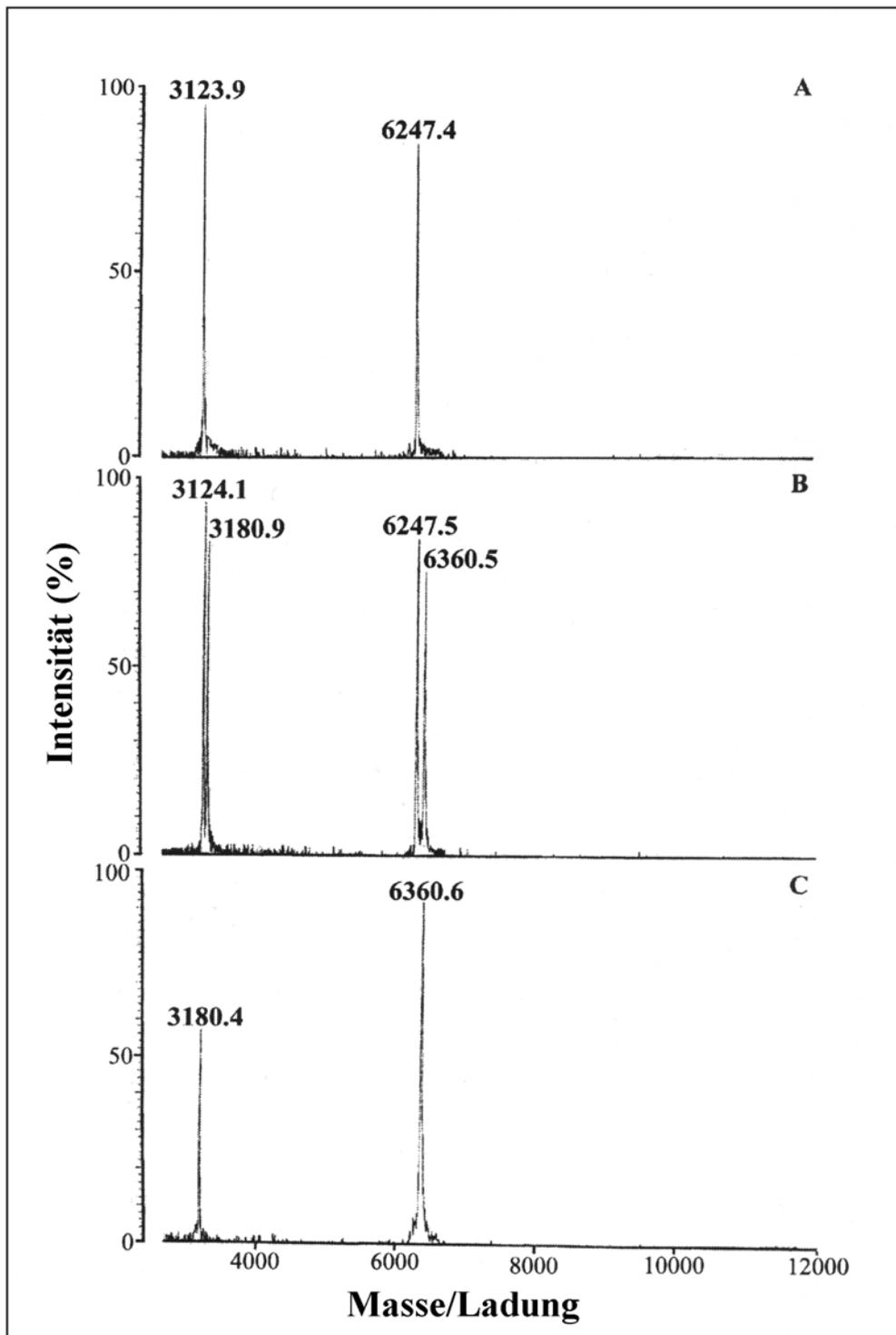
Nach der Spaltung der modifizierten zweiten Isoform (cbML2) erhielt man sowohl das LC3- als auch das LC3'-Fragment (Abb. 7 B und 8), d. h. cbML2 enthält sowohl die verkürzte, als auch die vollständige Kette.

Im Fall von cbML1 und cbML3 ergaben MALDI MS-Analysen der S-pyridylethylierten, nicht gespaltenen cbML-Isoformen Spektren mit eindeutigen Peaks bei 6247.4 Da bzw. 6360.6 Da, während bei cbML2 zwei Massenpeaks bei 6247.5 Da und 6360.5 Da auftraten (Tabelle 6, Abb. 9). Subtrahiert man jeweils 945.9 Da, entsprechend der zusätzlichen Masse aufgrund der Modifizierungen der reduzierten Isoformen, so erhält man die Hälfte der molekularen Massen der intakten, nicht reduzierten Proteine. Das heißt, dass die cbML-Isoformen aus jeweils zwei Polypeptidketten von ungefähr 5 kDa bestehen, wobei für die Bildung der dimeren Strukturen offensichtlich Disulfidbrücken verantwortlich sind.

**Tabelle 6. Vergleich der theoretisch und experimentell bestimmten molekularen Massen der nativen cbML-Isomere und der S-pyridylethylierten Derivate von cbML1, cbML2 und cbML3.** Für die Reduktion und S-Pyridylethylierung wurden jeweils 2.5-3 mg Proteinlyophilisat, gelöst in 0.25 M Tris/HCl, 6 M Guanidiniumchlorid, 1 mM EDTA, pH 8.5, mit  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt und unter Sauerstoffausschluss 16 h bei RT im Dunkeln geschüttelt. Nach Zugabe von Vinylpyridin wurden die Proben weitere 4 h im Dunkeln bei RT geschüttelt und anschließend mittels RP HPLC über eine Aquapore RP 300 C8-Säule (7 $\mu$ m, 2.1 x 30 mm; Applied Biosystems, Weiterstadt) wieder entsalzt. Die Berechnungen der theoretischen Massen erfolgten auf der Grundlage der vollständigen N-terminalen Sequenzierung der cbML-Isoformen (Abb. 8). Aufgrund der Cys-Modifikationen ergeben sich zusätzliche Massen von 105.1 Da/S-Pyridylethylierung. Die experimentellen Werte resultierten aus MALDI MS-Messungen und entsprechen den m/z-Werten der einfachgeladenen Molekülonen der Lektindimere bzw. Cys-modifizierten Monomere.

Isoform	Molekulargewicht [MH] <sup>+</sup> (Da)			
	Dimer		Monomer	
	1-48/49		1-48/49 (Cys-modifiziert)	
	theor. [M]	exp. [MH] <sup>+</sup>	theor. [M]	exp. [MH] <sup>+</sup>
cbML1	10597.8	10582.8	6246.2	6247.4
cbML2	10711.0	10695.9	6246.2	6247.5
			6359.3	6360.5
cbML3	10824.2	10809.0	6359.3	6360.6

Es wurden also drei Isoformen der chitinbindenden Mistellektine isoliert und deren Primärstruktur mittels Sequenz- und MALDI MS-Daten ermittelt: die erste Isoform, cbML1, besteht aus zwei verkürzten Polypeptidketten von jeweils 48 Aminosäureresten. CbML2 ist ein Heterodimer, zusammengesetzt aus einer verkürzten (1-48) und einer um einen Leucinrest



**Abb. 9. MALDI MS-Spektren der reduzierten und S-pyridylethylierten chitinbindenden Mistellektine cbML1 (A), cbML2 (B) und cbML3 (C).** Matrix:  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure/2.5-Dihydroxybenzoesäure(AHC/DHB)-Mischmatrix in 50% Acetonitril und 0.1% TFA. Anzahl der Pulse: 50. Laserstärke: 74. Wellenlänge des  $N_2$ -Lasers: 337 nm. M/z-Werte: einfachgeladene Molekülonen  $[MH]^+$   $\rightarrow$  6247.4 (A), 6247.5 bzw. 6360.5 (B), 6360.6 (C); zweifachgeladene Molekülonen  $[MH_2]^{2+}$   $\rightarrow$  3123.9 (A), 3124.1 bzw. 3180.9 (B), 3180.4 (C).

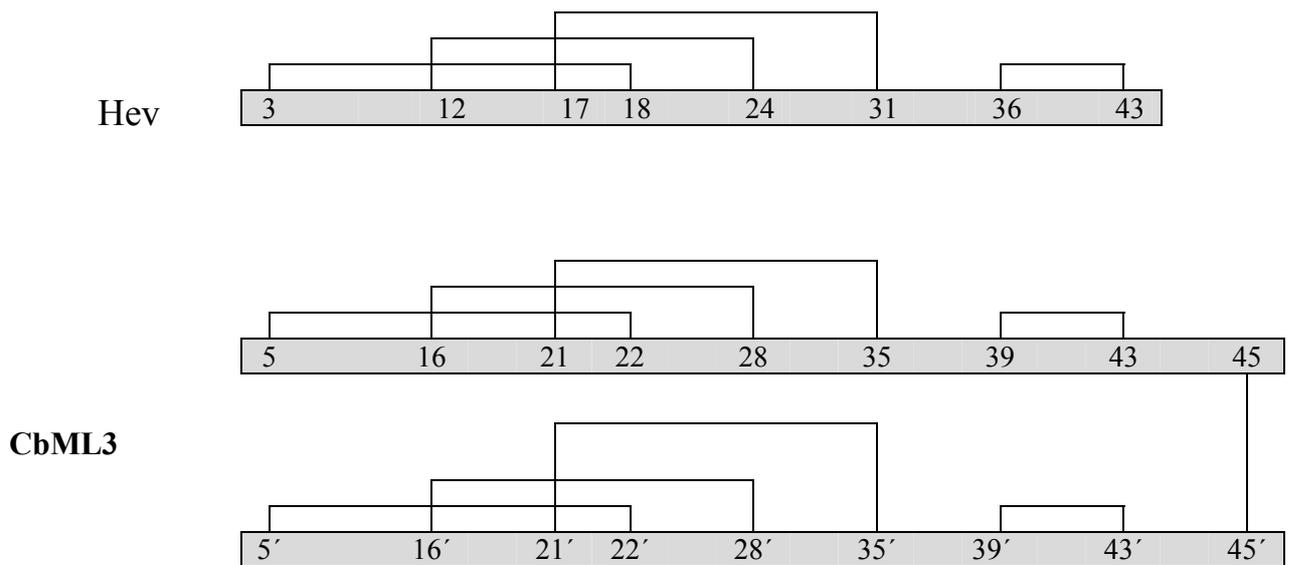
längeren Kette (1-49). CbML3, die Hauptisoform, besteht aus zwei unverkürzten Polypeptidketten. Die Sequenzen der cbML-Isoformen enthalten eine relativ hohe Anzahl an Cystein (9)- und Glycin (6)-Resten (Abb. 8).

Auf der Suche nach zu den cbMLs homologen Proteinen stieß man auf Hevein mit einer Sequenzidentität von 55% [137] und auf viele Lektine mit chitinbindenden Domänen, wie z. B. von *Sambucus nigra*, Hevein-ähnliches Fruchtprotein der Holunderbeere (52% Sequenzidentität; Aminosäurereste 27-70) [138], das Weizenkeimlektin (48% Sequenzidentität; Isolektin 1, Aminosäurereste 87-129) [139] oder das Brennessellektin aus *Urtica dioica* (39% Sequenzidentität; Aminosäurereste 22-65) [140] (Tabelle 7). Bei diesen Proteinen sind sowohl die Cysteinreste, als auch die Disulfidbrücken hochkonserviert [94].

**Tabelle 7. Sequenzalignment von cbML3 und homologen Proteinen: HEV**, Hevein (Zugangsnr. in der Swiss-Datenbank: P02877) [137]; **WGA**, Weizenkeimlektin (Isolektin 1, Reste 87 bis 129; Zugangsnr. in der Swiss-Datenbank: P10968) [139]; **NL**, Nessellectin (Reste 22 bis 65; Zugangsnr. in der Swiss-Datenbank: P11218) [140] and **SN-HLPf**, *Sambucus nigra* Hevein-ähnliches Fruchtprotein (Reste 27 bis 70; Zugangsnr. in der Swiss-Datenbank: Q9SYS5) [138]. Die Nummerierung der Aminosäuren und die markierten Sekundärstrukturelemente beziehen sich auf das cbML3-Modell (Abb. 8). Die hochkonservierten Aminosäurereste sind grau untermalt.  $\alpha$ :  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ :  $\beta$ -Faltblatt.

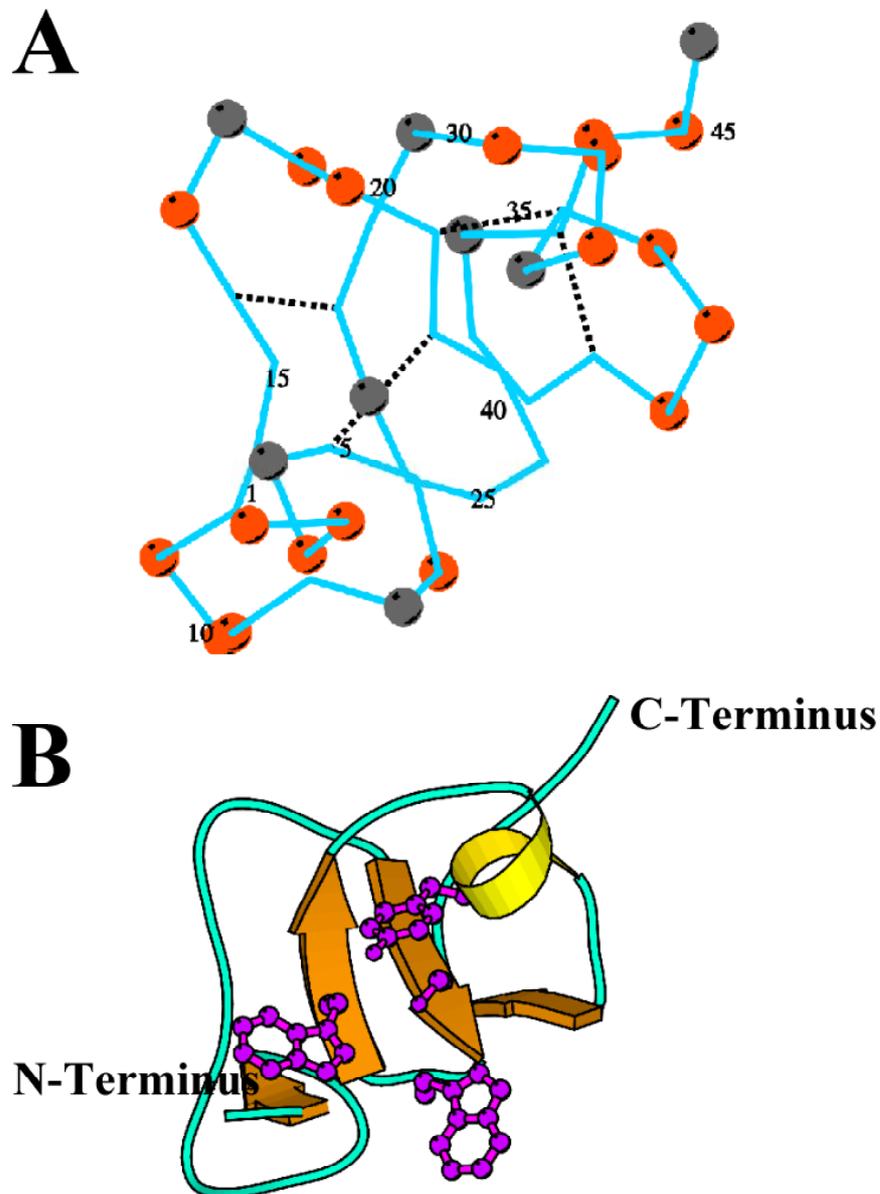
		10		20		30		40	
cbML	I D H R	C G R E A T P P	G K L	C N D G R	C C S Q W G W	C G T T Q A Y C	- - S G K C	Q S - Q C	D C N R D L
HEV	- - E Q	C G R Q A G	- - G K L	C P N N L	C C S Q W G W	C G S T D E Y C	S P D H N C	Q S - N C	K D
WGA	- - I K	C G S Q A G	- - G K L	C P N N L	C C S Q W G F	C G L G S E F C	- - G G G C	Q S G A C	S T D
NL	S A Q R	C G S Q G G	- - G G T	C P A L W	C C S I W G W	C G D S E P Y C	- - G R T C	E N - K C	W S G
SN-HLPf	G P W Q	C G R D A G	- - G A L	C H D N L	C C S F W G F	C G S T Y Q Y C	- - E D G C	Q S - Q C	R D T
		↓		↓	↓ ↓	↓	↓	↓	↓
		22		28	35 5	16	21	43	39
	← $\beta$ →			← $\beta$ →	← $\beta$ →	← $\alpha$ →	← $\beta$ →		

Auf deren Grundlage wurde eine entsprechende Disulfidbrückenverknüpfung bei den chitinbindenden Mistellektinen angenommen (Abb. 10): in jeder Kette der cbML-Dimere bilden acht Cysteinreste vier Disulfidbrücken (Reste 5(5')→22(22'), 16(16')→28(28'), 21(21')→35(35'), 39(39')→43(43')). Die Cysteine an den Positionen 45 und 45' verbinden die beiden Polypeptidketten über eine weitere Disulfidbrücke. Der Unterschied von  $15 \pm 0.2$  Da zwischen den theoretisch, auf der Grundlage der Sequenzen, bestimmten Molekulargewichten und den mittels MALDI MS experimentell bestimmten Massen von cbML1, cbML2 und cbML3 bestätigt das Vorhandensein von insgesamt neun Disulfidbrücken pro cbML-Molekül, einer intermolekularen und acht intramolekularen.



**Abb. 10. Hevein und cbML3 mit den identifizierten bzw. postulierten Disulfidbrückenverknüpfungen.**

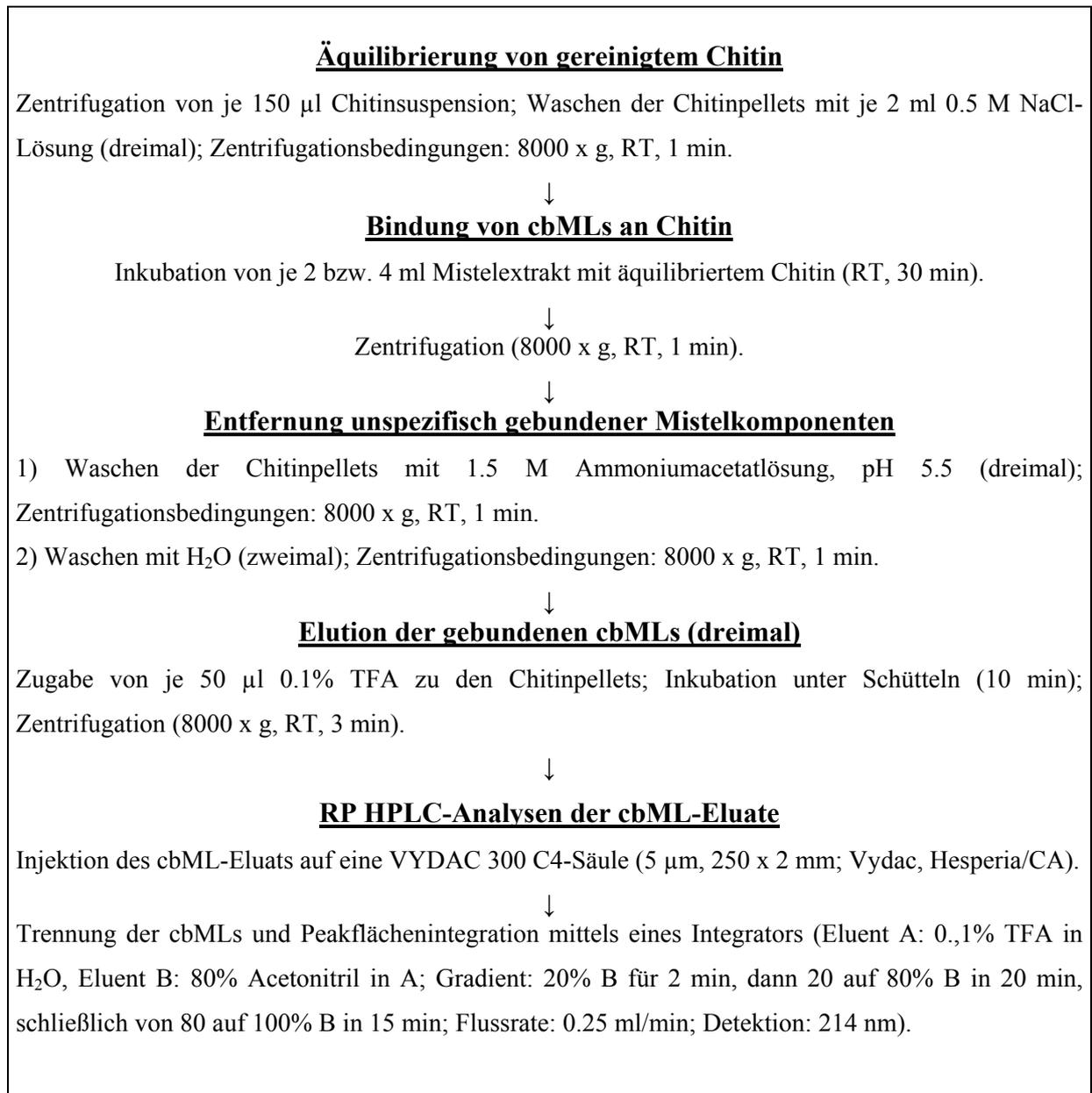
Zwischen den drei cbML-Isomeren und Hevein besteht eine hohe Sequenzhomologie. Auf der Grundlage der bereits durch Röntgen- und NMR-Spektroskopie ermittelten Raumstrukturen von Hevein [141-142] wurde ein dreidimensionales Modell der cbML3-Monomere erstellt (Abb. 11). Mit Ausnahme zweier Prolininsertionen an den Positionen 11 und 12 in cbML3 (Tabelle 7), durch die an dieser Stelle eine andere Faltung der Schleifenkonformation verursacht wird, haben alle anderen Sequenzunterschiede kaum eine Auswirkung auf die Proteinfaltung. Das Strukturmodell zeigt vier kurze  $\beta$ -Faltblätter und eine  $\alpha$ -Helix. Die vier konservierten intramolekularen Disulfidbrücken stabilisieren die dreidimensionale Struktur von cbML3 (Tabelle 7, Abb. 10). Mit hoher Wahrscheinlichkeit liegt bei diesem Lektin zwischen Asp18 und Arg20 eine Salzbrücke vor, während beim Hevein keine gefunden wurde. Die Berechnung der Lösungsmittelzugänglichkeit ergab beim cbML3 eine niedrige Exposition der Disulfidbrücken bildenden Cysteinreste. Der dem Hevein fehlende Cys45-Rest von cbML3 ist an der Oberfläche exponiert und bildet mit dem Cys45'-Rest des zweiten Monomers eine Disulfidbrücke (Abb. 10). Wie bereits bei Hevein [143] und WGA [144-145] gezeigt wurde, bilden die Aminosäurereste Ser23, Trp25, Trp27 (im Fall von WGA: Phe) und Tyr34 (im Fall von WGA: Phe) (Tabelle 7) das Bindungszentrum, welches spezifisch ist für N-Acetylneuraminsäure und GlcNAc. Im Fall des chitinbindenden Mistellektins zeigt das dreidimensionale Modell, dass die erwähnten Aminosäurereste eine ähnliche Funktion haben und für die spezifische Bindung von GlcNAc und GlcNAc-enthaltenen Kohlenhydraten verantwortlich sind (Abb. 11).



**Abb. 11. Strukturmodelle unverkürzter cbML3-Monomere.** Die comparative Modellierung der Kette erfolgte mit Hilfe des SWISS-MODEL-Programms [125-127] und den Koordinaten der über Röntgen- und NMR-Spektroskopie ermittelten Raumstrukturen von Hevein [141-142]. Mit Hilfe der Programme FRODO [128] und WHATIF [129] wurde das Modell optimiert. Zur Überprüfung der Rückgratkonformationen wurde das Modell mit Hilfe des Programms PROCHECK [130] analysiert. **(A)  $C_{\alpha}$ -„Trace“ des cbML3-Monomer.** Die roten Kugeln entsprechen den weniger konservativen Aminosäureaustauschen in Bezug auf Hevein. Die konservativen Aminosäureaustausche sind durch graue Kugeln markiert. Die gestrichelten Linien entsprechen den Disulfidbrücken. **(B) „Cartoon“-Darstellung des cbML3-Monomers.** Die Aminosäurereste Ser23, Trp25, Trp27 und Tyr34 sind in violetter Farbe dargestellt und bilden die Zucker-Bindungsstelle bei chitinbindenden Proteinen.

### 3.3 Isolierung und Quantifizierung der chitinbindenden Mistellektine aus Mistelextrakten und die Validierung dieser Methode

Um den cbML-Gehalt in Mistelextrakten zu bestimmen, wurde eine Methode entwickelt, bei der die Proteine aus wenigen Millilitern Extrakt isoliert und anschließend mittels RP HPLC analysiert und quantifiziert wurden (Abb. 12).

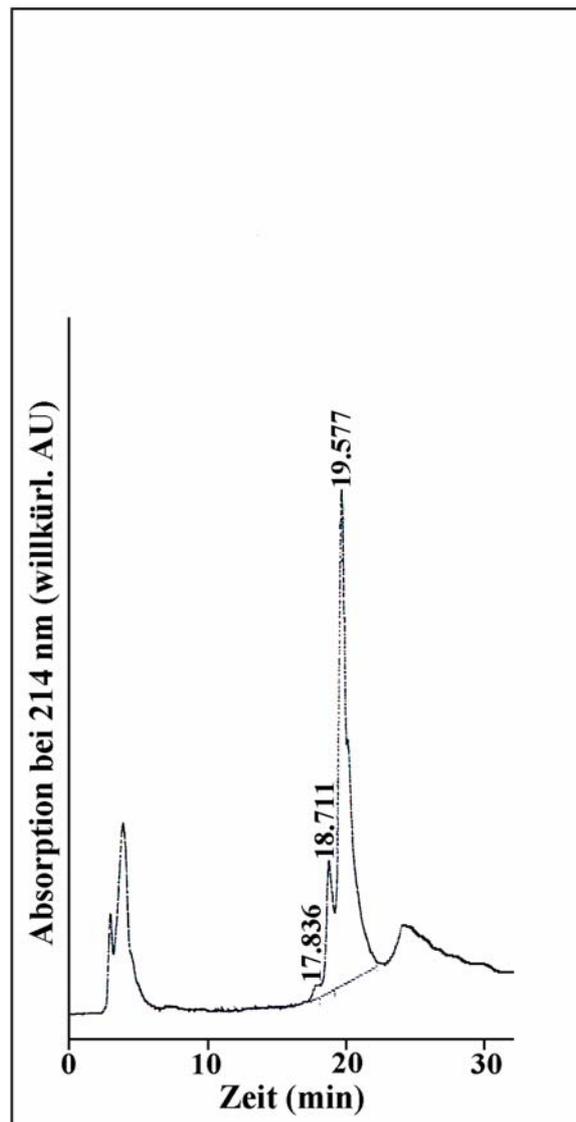


**Abb. 12. Aufarbeitungsschema zur Mikroisolierung und Quantifizierung der chitinbindenden Mistellektine aus Mistelextrakten.**

2 bzw. 4 ml Mistelextrakt wurden mit gereinigtem äquilibriertem Chitin inkubiert und dieses anschließend dreimal mit Ammoniumacetatlösung und zweimal mit aq. bidest. gewaschen. Schließlich wurden die gebundenen cbMLs mit 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O eluiert. Das Eluat wurde

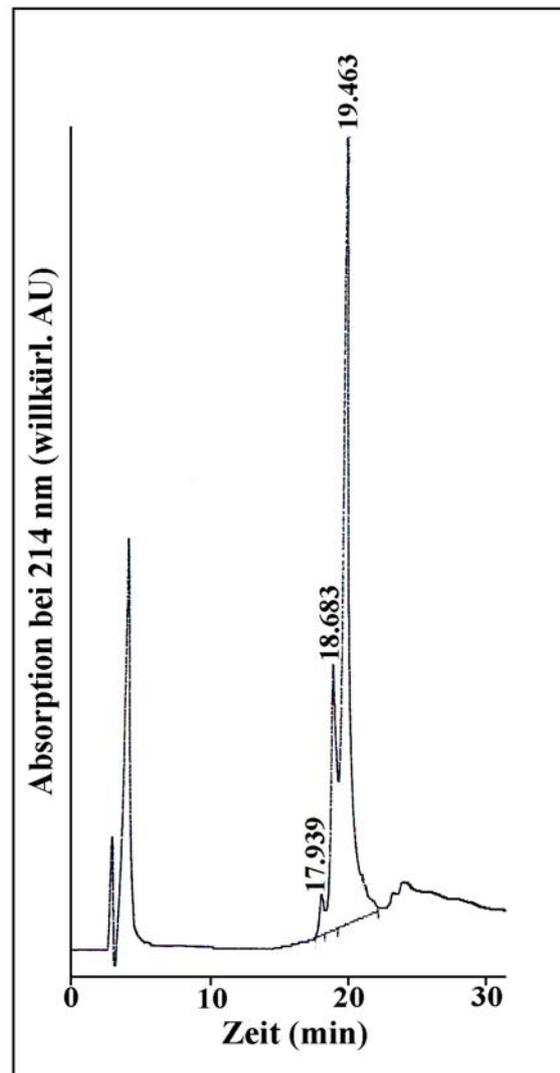
filtriert und vollständig auf eine RP C4-Säule injiziert. Die Trennung erfolgte unter dem in Abschnitt 2.2.14.2 beschriebenen Acetonitrilgradienten.

Die Identität der isolierten Proteinfraktionen wurde mittels MALDI MS und Sequenzierung der ersten acht N-terminalen Aminosäuren überprüft (Daten nicht gezeigt). Die Elution der chitinbindenden Mistellektine erfolgte zwischen 17 ( $\equiv$  65% B) und 22 Minuten ( $\equiv$  80% B), wie auch die Flächenintegration zur Gehaltsbestimmung (Abb. 13-15). Danach wurden zum



**Abb. 13.** HPLC-Chromatogramm and Integrationsprofil der cbML-Isoformen, isoliert über Mikroaffinitätschromatographie aus 2 ml Abnobaviscum<sup>®</sup> Betulae-2 (Charge: 603 ABY). Säule: Vydac 300 C4 (5  $\mu$ m, 250 x 2.0 mm; Vydac, Hesperia/CA). Elutionspuffer A: 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O; Elutionspuffer B: 80% CH<sub>3</sub>CN in A; Gradient: 20% B für 2 min, dann von 20 auf 80% B in 20 min und von 80 auf 100% B in 15 min. Flußrate: 0.25 ml/min. Detektion: UV bei  $\lambda = 214$  nm. Berechnete Peakflächen der cbML-Isoformen: 17.836 min: 105755 AU x min; 18.711 min: 1168145 AU x min; 19.577 min: 6862702 AU x min; Summe: 8136602 AU x min.

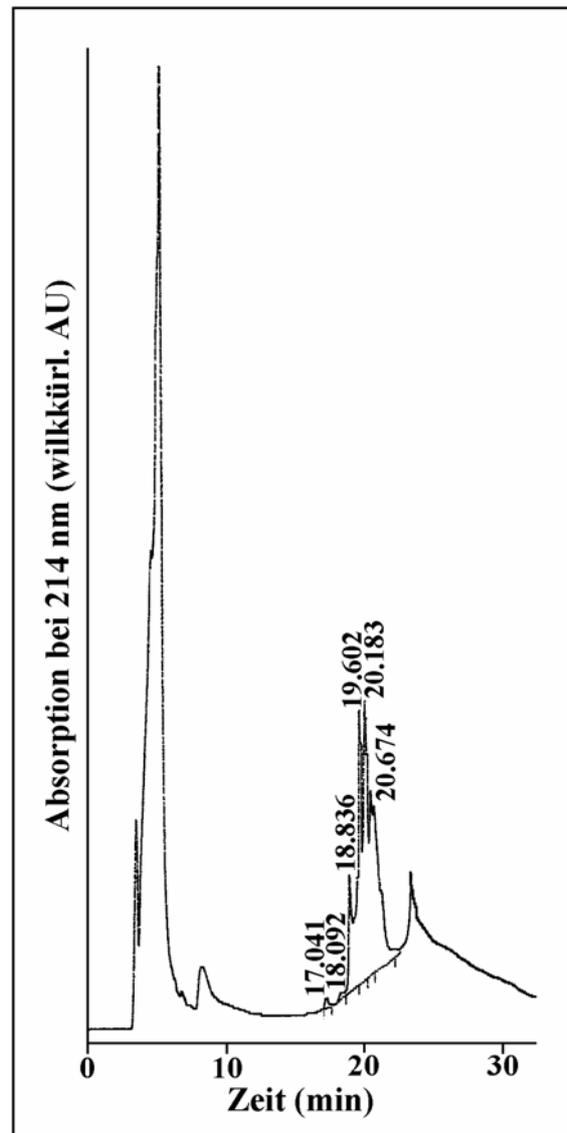
Teil Chitinfragmente, in seltenen Fällen auch Viscotoxine oder MLI, die unspezifisch an das Affinitätsmaterial gebunden haben eluiert. Da diese Verunreinigungen aber weder störten noch für die Quantifizierungen relevant waren (s. u.), wurde in den Abbildungen 13-15 auf die Darstellung des Chromatogrammschnitts nach der dreißigsten Minute verzichtet.



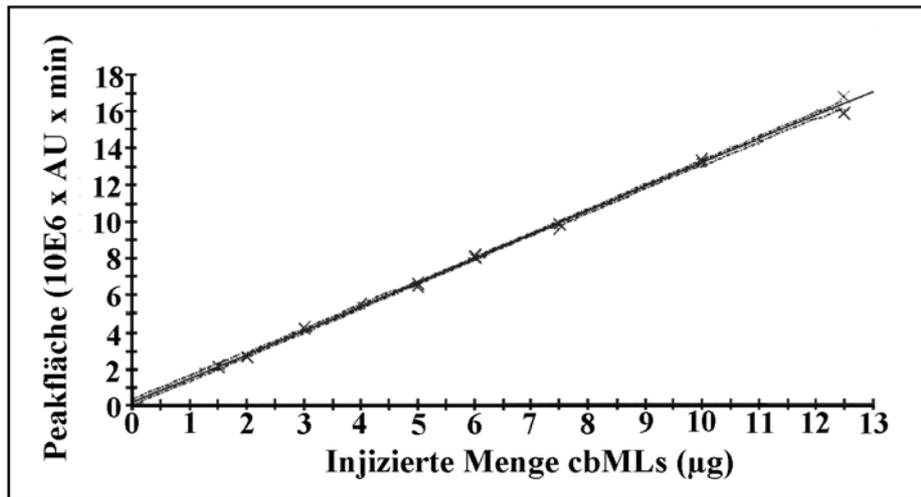
**Abb. 14.** HPLC-Chromatogramm und Integrationsprofil der cbML-Isoformen, isoliert über Mikroaffinitätschromatographie aus 2 ml *Abnobaviscum*<sup>®</sup> Pini-2 (Charge: 912 ABU). Säule: Vydac 300 C4 (5  $\mu$ m, 250 x 2.0 mm; Vydac, Hesperia/CA). Elutionspuffer A: 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O; Elutionspuffer B: 80% CH<sub>3</sub>CN in A; Gradient: 20% B für 2 min, dann von 20 auf 80% B in 20 min und von 80 auf 100% B in 15 min. Flußrate: 0.25 ml/min. Detektion: UV bei  $\lambda = 214$  nm. Berechnete Peakflächen der cbML-Isoformen: 17.939 min: 236572 AU x min; 18.683 min: 2051030 AU x min; 19.463 min: 8546651 AU x min; Summe: 10834253 AU x min.

Für die Quantifizierung wurde eine Kalibriergerade mit einer cbML-Standardlösung (0.05 mg/ml in 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O) erstellt (Abb. 16). Der Standard enthielt die Isoformen cbML1-3

und wurde bei 4°C gelagert. Unter diesen Bedingungen konnte er mindestens drei Monate lang verwendet werden.



**Abb. 15.** HPLC-Chromatogramm und Integrationsprofil der cbML-Isoformen, isoliert über Mikroaffinitätschromatographie aus 4 ml *Abnoba viscum*<sup>®</sup> Fraxini-2 (Charge: 005 KLT). Säule: Vydac 300 C4 (5 µm, 250 x 2.0 mm; Vydac, Hesperia/CA). Elutionspuffer A: 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O; Elutionspuffer B: 80% CH<sub>3</sub>CN in A; Gradient: 20% B für 2 min, dann von 20 auf 80% B in 20 min und von 80 auf 100% B in 15 min. Flußrate: 0.025 ml/min. Detektion: UV bei λ = 214 nm. Berechnete Peakflächen der cbML-Isoformen: 17.041 min: 38399 AU x min; 18.092 min: 20903 AU x min; 18.836 min: 853794 AU x min; 19.602 min: 1838745 AU x min; 20.183 min: 1577286 AU x min; 20.674 min: 2062346 AU x min; Summe: 6391473 AU x min.



**Abb. 16. Kalibriergerade zur Quantifizierung der chitinbindenden Mistellektine in Mistelextrakten.** Es wurden 30, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 200 und 250 µl einer cbML-Stammlösung der Konzentration 0.05 mg/ml auf eine RP-C4-Säule aufgetragen und mittels HPLC getrennt (Doppelbestimmungen). Säule: Vydac 300 C4 (5 µm, 250 x 2.0 mm; Vydac, Hesperia/CA). Elutionspuffer A: 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O; Elutionspuffer B: 80% CH<sub>3</sub>CN in A; Gradient: 20% B für 2 min, dann von 20 auf 80% B in 20 min und von 80 auf 100% B in 15 min. Flußrate: 0.025 ml/min. Detektion: UV bei λ = 214 nm. Die über einen Integrator berechneten Peakflächen wurden gegen die injizierten Proteinmengen aufgetragen. Daten der linearen Kalibrierfunktion  $y = a + bx$ : Achsenabschnitt  $a = 183945.091$ ; Steigung  $b = 1291516.984$ ;  $\text{Konf}(0)=[5994.912; 361895.270]$

Die Abbildungen 13-15 zeigen Beispiele von HPLC Trennungen der cbML-Isoformen, die zuvor aus je 2 ml Abnobaviscum<sup>®</sup> Betulae-2 (Charge: 603 ABY) bzw. Abnobaviscum<sup>®</sup> Pini-2 (Charge: 912 ABU) und 4 ml Abnobaviscum<sup>®</sup> Fraxini-2 (Charge: 005 KLT) isoliert worden waren. Im Fall von Abb. 13 beträgt die Summe der Flächenintegrationen zwischen 17 und 22 Minuten 8136602 AU x min. Dies entspricht einem Gehalt an cbMLs von 3.079 µg in 1 ml Betulae-Extrakt. Im Fall von Abb. 14 erhält man als Flächensumme 10834253 AU x min und im Fall von Abb. 15 6391473 AU x min. Dies entspricht einem Gehalt an cbMLs von 4.123 µg in 1 ml Pini-Extrakt und von 1.202 µg in 1ml Fraxini-Extrakt.

Es sollte nun gezeigt werden, dass die beschriebene Methode zur Isolierung und Quantifizierung der chitinbindenden Mistellektine aus Extrakten valide ist. Die Validierung erfolgte gemäß den Anforderungen für Arzneimittelzulassungen. Auf der Grundlage der ICH-Richtlinien für Validierungen analytischer Methoden wurden die Spezifität, die Robustheit, die Methoden- und Laborpräzision, die Linearität und die Richtigkeit der Methode untersucht und der Arbeitsbereich und die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ermittelt [133-134]. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Computerprogramms VALIDAT 2000 (Version 2.020.0929) ausgewertet und interpretiert [132].

Die Durchführung der Validierung erfolgte mit Mistelextrakten der Abnoba Heilmittel GmbH in den Sorten Betulae, Pini und Fraxini (jeweils Verdünnungsstufe 2). Betulae-Extrakt (Charge: 603 ABY and 903 B-L) enthielt 3.1 µg/ml cbMLs (Neunfach- bzw. Einzelbestimmungen), Pini-Extrakt der Charge 912 ABU enthielt 4.0 µg/ml (Sechsfachbestimmung) und die Sorte Fraxini (Charge: 005 KLT) 1.1 µg/ml cbMLs (Neunfachbestimmung; Tabelle 8). Die Analysen wurden von einer Person durchgeführt und deren Ergebnisse bei den entsprechenden Validierungspunkten miteinbezogen (z. B. als Referenzwert).

Eine Auswertung der Ergebnisse der Validierungsanalysen darf jedoch nur erfolgen, wenn zuvor ein Systemeignungstest bestanden wurde. Zum einen mußte gewährleistet sein, dass weder Verschleppung noch Säulen„memorys“ auftreten. Dazu wurde nach jeder Injektion verschiedener Mengen eines cbML-Standards auf die RP C4-Säule ein HPLC-Lauf mit 250 µl wässriger TFA durchgeführt. Auf diese Weise wurde auch nach jeder Analyse während der gesamten Validierung verfahren. In keinem der Fälle wurden Verschleppungen oder Proben„memorys“ beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren wurde überprüft, ob das Extraktionsmedium, ein isotonischer Ascorbat-Phosphat-Puffer der Verdünnungsstufe 2 (VS 2-Puffer), welcher zur Herstellung der hier untersuchten Mistelextrakte der Abnoba Heilmittel GmbH verwendet wurde, frei von Verunreinigungen durch die chitinbindenden Mistellektine ist. Dazu wurden drei Analysen mit VS 2-Puffer nach Abschnitt 2.2.14.2 durchgeführt. Da die Chromatogramme keine Proteinpeaks mit den entsprechenden Retentionszeiten zeigten (Daten nicht gezeigt), konnte davon ausgegangen werden, dass keine cbML-Proteine im VS 2-Puffer vorhanden waren.

Um zu zeigen, dass die Systempräzision gewährleistet ist, wurden unterschiedliche Mengen einer cbML-Standardlösung an verschiedenen Tagen auf die RP C4-Säule injiziert und die Flächen der Peaks berechnet. Es wurden jeweils Sechsfachbestimmungen durchgeführt, wobei die Variationskoeffizienten unter 5% lagen (Daten nicht gezeigt).

Für die Validierung wurde zunächst die **Spezifität** der Methode untersucht, d. h. ob die cbMLs auch in Gegenwart von MLI und Viscotoxinen eindeutig quantifiziert werden können. Dazu wurden vor der 30minütigen Inkubation zu Betulae-Extrakt der Charge 603 ABY MLI- bzw. Viscotoxinlösung zupipettiert und die Mikroisolierung, wie beschrieben, fortgesetzt. Zusätzlich wurden Analysen mit 500 µl MLI-Standard bzw. 500 µl Viscotoxinstandard ohne Extraktzugabe durchgeführt (Doppelbestimmung). Dabei sollte überprüft werden, ob eine dieser Komponenten ebenfalls mit der Methode isoliert und zeitgleich mit den chitinbindenden Mistellektinen eluiert wird. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 9. MLI hatte keinen

**Tabelle 8. Neun-, Sechs- bzw. Einzelbestimmungen von Abnobaviscum<sup>®</sup> Betulae-2 (Charge: 603 ABY und 903 B-L), Abnobaviscum<sup>®</sup> Pini-2 (Charge: 912 ABU) und Abnobaviscum<sup>®</sup> Fraxini-2 (Charge: 005 KLT).** Je 2 ml Betulae bzw. Pini- und 4 ml Fraxini-Extrakt wurden mit äquilibriumiertem Chitin inkubiert, und nach einigen Waschschriften (dreimal mit Ammoniumacetatlösung, zweimal mit H<sub>2</sub>O) wurden die gebundenen cbMLs mit 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O wieder eluiert. Die Quantifizierung der Proteine erfolgte mittels RP HPLC über eine Vydac 300 C4-Säule (250 x 2.0 mm, 5 µm; Vydac, Hesperia/CA). Elutionspuffer A: 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O; Elutionspuffer B: 80% CH<sub>3</sub>CN in A; Gradient: 20% B für 2 min, dann von 20 auf 80% B in 20 min und von 80 auf 100% B in 15 min. Flußrate: 0.025 ml/min. Detektion: UV bei λ = 214 nm. Die Quantifizierung erfolgte über Peakflächenintegration und anschließender Umrechnung auf den cbML-Gehalt mit Hilfe einer Kalibriergeraden (vgl. Abb. 16).

Abnobaviscum <sup>®</sup> Extrakt (Sorte und Charge)	Betulae (603 ABY)	Betulae (903 B-L)	Pini (912 ABU)	Fraxini (005 KLT)	
CbML- Gehalt (µg/ml)	1.Wert	3.182	3.130	4.040	1.114
	2.Wert	3.079		3.947	1.053
	3.Wert	3.183		3.897	1.044
	4.Wert	3.010		4.123	1.121
	5.Wert	3.103		4.028	1.133
	6.Wert	3.097		4.107	1.194
	7.Wert	3.134			1.005
	8.Wert	2.989			1.008
	9.Wert	3.085			1.032
Anzahl der Werte	9	1	6	9	
Mittelwert X (µg/ml cbMLs)	3.096	3.130	4.023	1.078	
Relative Standard- abweichung V (%)	2.157	0	2.199	6.025	
Ausreißertest nach Dixon [132, 135-136]					
Q-Wert für den kleinsten x-Wert	0.110	-	0.220	0.021	
Q-Wert für den größten x-Wert	0.004	-	0.072	0.328	
Tabellenwert Q (P, n) (5%-einseitig)	0.512	-	0.560	0.512	
Ausreißer	nein	-	nein	nein	
Trendtest nach Neumann [132, 135]					
Testgröße W	2.566	-	1.984	1.479	
Tabellenwert W <sub>m</sub> (P, n) (5%-einseitig)	1.024	-	0.890	1.024	
Trend	nein	-	nein	nein	

Einfluss auf das HPLC-Chromatogramm bzw. die Ausbeuten an cbMLs. MLI wurde weder mit der unter Abschnitt 2.2.14.2 beschriebenen Methode isoliert, noch beeinflusste MLI die Quantifizierungsergebnisse der chitinbindenden Mistellektine. Auch die Viscotoxine wurden

mit der Analysenmethode nicht erfasst, denn nach den Elutionsschritten mit 0.1% TFA in Wasser konnten sie massenspektrometrisch nicht detektiert werden. Jedoch wurden cbMLs als Verunreinigungen im Viscotoxinstandard nachgewiesen: die chitinbindenden Mistellektine wurden massenspektrometrisch im Eluat nach durchgeführter Mikroisolierung aus 500 µl Viscotoxinstandard (ohne Extraktzugabe) detektiert (Daten nicht gezeigt). Außerdem erhielt man bei der anschließenden chromatographischen Analyse ein typisches cbML-Chromatogramm (Abb. 17). Die zwischen 17 und 22 Minuten gesammelten Fraktionen zeigten im Massenspektrometer ausschließlich charakteristische cbML-Massenpeaks (Daten nicht gezeigt). Nach Zugabe von 200 µl Viscotoxinstandard zu 2 ml Abnobaviscum® Betulae-2 (Charge: 603 ABY) und anschließender Analyse erhöhte sich außerdem der durchschnittliche cbML-Gehalt von 3.1 auf 3.3 µg/ml, was wiederum die cbML-Verunreinigung im Viscotoxinstandard bestätigte (vgl. Tabelle 9).

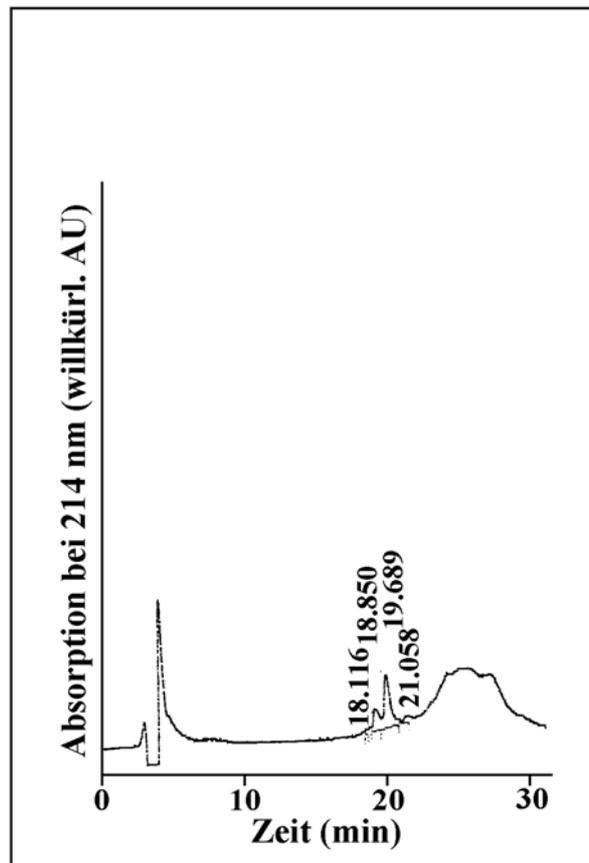
**Tabelle 9. Quantifizierung der cbMLs in Betulae-Extrakt (Charge: 603 ABY; cbML-Gehalt: 3.096 µg/ml) nach Zugabe von MLI bzw. Viscotoxinen (jeweils Dreifachbestimmungen).** Die Konzentrationen der Standardlösungen waren im Fall von MLI 0.5 mg/ml und im Fall der Viscotoxine 99.4 µg/ml. Von den Proteinlösungen wurden je 200 µl zu jeweils 2 ml Extrakt pipettiert (Dreifachbestimmungen, **A**). Als Vergleichswert diente die Neunfachbestimmung von Abnobaviscum® Betulae-2 der Charge 603 ABY (3.096 µg/ml cbMLs; Tabelle 8). Außerdem wurden Analysen mit 500 µl MLI- bzw. 500 µl Viscotoxinstandardlösung durchgeführt (Doppelbestimmungen, **B**). Die Isolierung der cbMLs mittels Mikroaffinitätschromatographie und deren Quantifizierung über RP HPLC erfolgte, wie in Abschnitt 2.2.14.2 beschrieben (vgl. auch Tabelle 8, Abb. 12-16).

**A**

Probe	Betulae (Charge: 603 ABY)	Betulae Charge: 603 ABY) + MLI	Betulae Charge: 603 ABY) + VT
Anzahl der Meßwerte	9	3	3
Mittelwert X der Ergebnisse (µg/ml cbMLs)	3.096	3.147	3.304
Relative Standardabweichung V (%)	2.157	1.571	2.401
Mittelwert der Mittelwerte (µg/ml)	3.182		
Relative Standardabweichung des gesamten Mittelwerts (%)	3.406		

**B**

Probe	500 µl MLI-Standardlösung	500 µl Viscotoxin-Standardlösung
Anzahl der Meßwerte	2	2
Mittelwert X der Ergebnisse (µg/ml cbMLs)	-	0.642
Relative Standardabweichung V (%)	-	7.930



**Abb. 17.** HPLC-Chromatogramm und Integrationsprofil des Eluats, das aus 500  $\mu$ l Viscotoxinstandard über Mikroaffinitätschromatographie an gereinigtem Chitin erhalten wurde. Säule: VYDAC 300 C4 (5  $\mu$ m, 250 x 2.0 mm; Grom, Herrenberg Kayh). Elutionspuffer A: 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O; Elutionspuffer B: 80% CH<sub>3</sub>CN in A; Gradient: 20% B für 2 min, dann von 20 auf 80% B in 20 min und von 80 auf 100% B in 15 min. Flussrate: 0.025 ml/min. Detektion: UV bei  $\lambda = 214$  nm.

Es zeigte sich also, dass die Zugabe von MLI bzw. Viscotoxinen zum Extrakt die cbML-Bestimmung nicht stört, d. h. die chitinbindenden Mistellektine können spezifisch in der Gegenwart von MLI und Viscotoxinen nachgewiesen werden.

Zur Überprüfung der **Robustheit** der Methode wurden die cbML-Eluate hinsichtlich ihrer Stabilität vor der Injektion auf die RP C4-Säule untersucht. Sie wurden 10 bzw. 14 Tage bei 4°C gelagert, dann filtriert und mittels HPLC analysiert. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen mit Betulae-Extrakt der Charge 603 ABY durchgeführt. Als Referenzwert diente der Mittelwert der neun Analysen desselben Extrakts (Tabelle 8), bei denen die Eluate maximal einen Tag bei 4°C gelagert wurden. Tabelle 10 zeigt, dass die cbML-Eluate bis zum 10. Tag nach der Reinigung ohne erkennbaren Verlust gekühlt gelagert werden können, bevor sie in die HPLC injiziert werden. Jedoch nahm nach vierzehntägiger Lagerung der detektierbare cbML-Gehalt im Eluat um ca. 10% ab: wurden ein Tag bzw. 10

**Tabelle 10. Stabilitätsbestimmung der cbML-Eluate.** Die chitinbindenden Mistellektine wurden aus jeweils 2 ml Betulae-Extrakt (Charge: 603 ABY; cbML-Gehalt: 3.096 µg/ml) mittels Mikroaffinitätschromatographie isoliert (vgl Abschnitt 2.2.14.2) und das Eluat max. 1 Tag (Neunfachbestimmung) bzw. 10 und 14 Tage (jeweils Dreifachbestimmungen) bei 4°C gelagert. Nach diesen Lagerungszeiten wurden die HPLC-Analysen und Quantifizierungen, wie in Abschnitt 2.2.14.2 beschrieben (vgl. auch Tabelle 8, Abb. 12-16), durchgeführt.

Lagerungszeit (Tage)	1	10	14
Anzahl der Messungen	9	3	3
Mittelwert X der Ergebnisse (µg/ml cbMLs)	3.096	3.070	2.777
Relative Standardabweichung V (%)	2.157	0.306	1.735
Trend <sup>1</sup>	nein	-	-
Ausreißer <sup>2</sup>	nein	-	-
Robustheit <sup>3</sup>	ja	ja	ja
Mittelwert aller Mittelwerte (µg/ml cbMLs)	3.027		
Relative Standardabweichung des ges. Mittelwerts (%)	11.347		
Ausreißer <sup>2</sup>	nein		
Test auf Varianzhomogenität nach Bartlett [132, 135-136]			
Wert $\chi^2$ für Varianzhomog. nach Bartlett	4.945		
Tabellenwert $\chi^2(P, k-1)$ für Bartlett	5.990		
Varianzhomogenität	ja		
t-Test auf Robustheit [132]			
	1, 10 und 14 Tage		1 und 10 Tage
Wert t für t-Test auf Robustheit	34.956		0.640
Tabellenwert t-Test ( $t_{\alpha, 2n-2}$ ) (5%-zweiseitig)	3.890		2.228
Robustheit	nein		ja

<sup>1</sup> Trendtest nach Neumann [132, 135]

<sup>2</sup> Ausreißertest nach Dixon [132, 135-136]

<sup>3</sup> Horwitztest auf Robustheit [132]

Tage nach der Isolierung durchschnittlich 3.1 µg cbMLs in 1 ml Extrakt (Mittelwert) detektiert, so konnten zwei Wochen später nur noch 2.8 µg/ml (Mittelwert) bestimmt werden. Die Ergebnisse erfüllen die Spezifikation, da die cbML-Eluate mindestens drei Tag gekühlt gelagert werden können, ohne dass Verluste auftreten.

Die **Methodenpräzision** wird anhand der Wiederholbarkeit unabhängiger Analysen bestimmt. Es wurden Sechs- bzw. Neunfachbestimmungen von Abnobaviscum<sup>®</sup> Betulae-2 (Charge: 603 ABY), Abnobaviscum<sup>®</sup> Pini-2 (Charge: 912 ABU) und Abnobaviscum<sup>®</sup> Fraxini-2 (Charge: 005 KLT) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden bereits in Tabelle 8 aufgeführt. Die Analysen wurden von einer Person unter identischen Versuchsbedingungen durchgeführt. Die relativen Standardabweichungen lagen bei 2.2% im Fall der Sorten Betulae und Pini und bei 6.0% im Fall von Fraxini. Tests nach Neumann und Dixon [132, 135-136] zeigten weder einen Trend noch Ausreißer. Damit sind die Spezifikationen erfüllt, und die Präzision der Methode ist gewährleistet.

Um die **Laborpräzision** zu prüfen, führten zwei unabhängige Analytiker jeweils Neunfachbestimmungen von je 2 ml Betulae-Extrakt der Charge 603 ABY durch. Die Ergebnisse der ersten Person entsprechen den Werten der Tabelle 8. Die zweite Versuchsreihe wurde im Verlauf von zwei Monaten durchgeführt, wobei sowohl das RP-Säulenmaterial als auch die Waschpuffer erneuert wurden (Tabelle 11). Die Mittelwerte der Neunfachbestimmungen waren 3.096 bzw. 3.145 µg/ml. Es ließen sich weder Trends noch Ausreißer feststellen. Robustheit war gewährleistet und die Konfidenzintervalle überlappten (Abb. 18). Der Mittelwert der gesamten 18 ausreißerfreien Messungen war 3.120 µg/ml mit einem Variationskoeffizient von 3.4%, Robustheit und Varianzhomogenität waren gewährleistet. Es wurde damit gezeigt, dass die Analysenmethode nicht von der durchführenden Person abhängt, vorausgesetzt der jeweilige Analytiker arbeitet präzise und zuverlässig. Auch Erneuerungen des RP-Säulenmaterials und der Waschpuffer hatten keinen Einfluss auf die Analysenergebnisse. Die Tatsache, dass manche Isolierungen und Quantifizierungen im Abstand von bis zu zwei Monaten durchgeführt worden waren hatte ebenfalls keinen nennenswerten Effekt auf die Ergebnisse.

Für die Bestimmung der **Linearität** der Methode waren Analysen bei mindestens fünf verschiedenen Konzentrationen notwendig. Dazu wurde Abnobaviscum<sup>®</sup> Betulae-2 (Charge: 603 ABY) 1:5, 2:5, 3:5 und 4:5 mit VS-2 Puffer verdünnt, so daß der theoretische cbML-Gehalt bei 0.6 (≡ 20%), 1.2 (≡ 40%), 1.5 (≡ 50%), 1.9 (≡ 60%) und 2.5 (≡ 80%) µg/ml lag. 3.1 µg/ml (≡ 100%) entsprach dem durchschnittlichen cbML-Gehalt in unverdünntem Betulae-Extrakt der Charge 603 ABY (Tabelle 8). Für einen theoretischen cbML-Gehalt von 150% (≡ 4.7%) wurde die entsprechende Menge eines cbML-Standards dem Betulae-Extrakt vor den Analysen zugefügt. Von jeder Verdünnung wurden 2 ml eingesetzt. Die Ergebnisse zeigten, mit Ausnahme der Messung bei 150% cbML-Gehalt, eine hohe Übereinstimmung zwischen den theoretischen und den Analysenwerten (Tabelle 12). Für den 150%-Wert ergab sich eine

**Tabelle 11. Bestimmung der Laborpräzision.** Zwei Analytiker führten jeweils neun Isolierungen und Quantifizierungen der cbMLs in Betulae-Extrakt (Charge: 603 ABY; cbML-Gehalt: 3.096 µg/ml), wie in Abschnitt 2.2.14.2 beschrieben (vgl. auch Tabelle 8, Abb. 12-16), durch. Die erste Person beendete die Versuchsreihe innerhalb weniger Tage unter identischen Bedingungen. Die Analysen der zweiten Person wurden in einem Zeitraum von zwei Monaten durchgeführt. Währenddessen wurden Säulenmaterial und Waschpuffer erneuert.

Analytiker	1	2
Anzahl der Messungen	9	9
Mittelwert X der Ergebnisse (µg/ml cbMLs)	3.096	3.145
Relative Standardabweichung V (%)	2.157	2.210
Trend <sup>1</sup>	nein	nein
Ausreißer <sup>2</sup>	nein	nein
Robustheit <sup>3</sup>	ja	ja
Mittelwert beider Mittelwerte (µg/ml cbMLs)	3.120	
Relative Standardabweichung des gesamten Mittelwerts (%)	3.373	
Ausreißer <sup>2</sup>	nein	
t-Test auf Robustheit [132]		
Wert t für t-Test auf Robustheit	1.544	
Tabellenwert t-Test ( $t_{\alpha,2n-2}$ ) (5%-zweiseitig)	2.120	
Robustheit	ja	
F-Test auf Varianzhomogenität [132, 135-136]		
Wert F für Varianzhomog. nach F-Test	1.083	
Tabellenwert für F-Test ( $F_{\alpha,FGv1,FGv2}$ )	3.440	
Varianzhomogenität	ja	

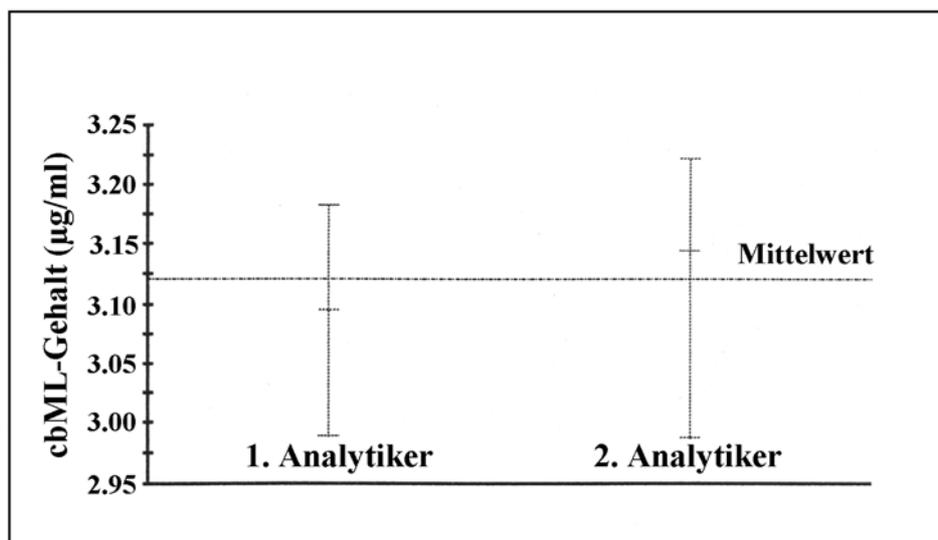
<sup>1</sup> Trendtest nach Neumann [132, 135]

<sup>2</sup> Ausreißertest nach Dixon [132, 135-136]

<sup>3</sup> Test auf Robustheit nach Horwitz [132]

Abweichung von über 10%. Die Berechnung der Regressionsgerade erfolgte aus den Werten der ersten sechs Verdünnungsstufen, da diese eine lineare Beziehung zeigten (Abb. 19). Der Korrelationskoeffizient für diese Kurve lag bei 0.998 (Tabelle 12).

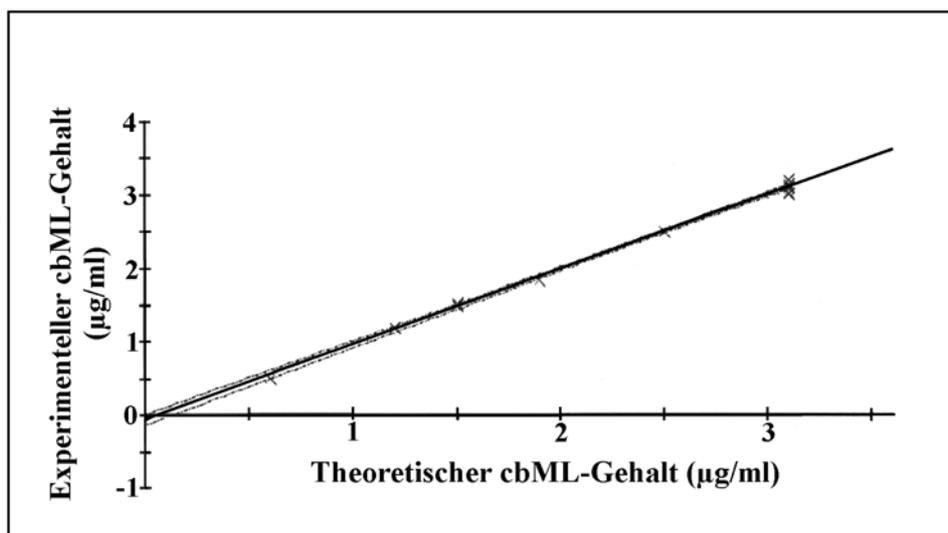
Eine Einzelanalyse des Betulae-Extrakts der Charge 903 B-L ergab ebenfalls einen cbML-Gehalt von 3.1 µg/ml. Es wurden zusätzlich zwei Einzelbestimmungen bei 130% ( $\equiv$  4.0 µg/ml) und bei 50% ( $\equiv$  1.6 µg/ml) cbML-Gehalt durchgeführt, deren Ergebnisse ein lineares Verhältnis in diesem Bereich zeigten (Tabelle 13). Man erhielt eine Regressionsgerade mit einem Korrelationskoeffizienten von 1.00 (Abb. 20).



**Abb. 18.** Verteilung der Analysenwerte von Neunfachbestimmungen zweier Analytiker zur Bestimmung der Laborpräzision. Die Messungen wurden mit Betulae-Extrakt der Charge 603 ABY (cbML-Gehalt: 3.096 µg/ml) durchgeführt und erfolgten im Verlauf von zwei Monaten. Die Isolierung der cbMLs mittels Mikroaffinitätschromatographie und deren Quantifizierung über RP HPLC erfolgte, wie in Abschnitt 2.2.14.2 beschrieben (vgl. auch Tabelle 8, Abb. 12-16). Die erste Person beendete die Versuchsreihe innerhalb weniger Tage unter identischen Bedingungen. Die Analysen der zweiten Person wurden in einem Zeitraum von zwei Monaten durchgeführt. Währenddessen wurden Säulenmaterial und Waschpuffer erneuert. Die vertikalen Balken geben den Bereich an, in dem sich die neun Analysenwerte jedes Analytikers verteilen. Die horizontale, unterbrochene Linie entspricht dem Mittelwert aller 18 Messungen, die horizontale Linie in der Mitte jedes vertikalen Balkens zeigt den Mittelwert der Ergebnisse jeder Analysenreihe.

**Tabelle 12.** Ergebnisse der Analysen verschiedener Verdünnungsstufen von Betulae-Extrakt (Charge 603 ABY; cbML-Gehalt: 3.096 µg/ml) zur Bestimmung der Linearität. Der Extrakt wurde 1:5, 2:5, 1:2, 3:5 und 4:5 mit VS 2-Puffer verdünnt ( $\equiv$  0.6, 1.2, 1.5, 1.9 und 2.5 µg/ml cbMLs). Für den Wert bei 150% cbML-Gehalt ( $\equiv$  4.7 µg/ml) wurde die entsprechende Menge einer cbML-Standardlösung zum Extrakt zugegeben. Es wurden Ein-, Drei- bzw. Neunfachbestimmungen (vgl. Tabelle 8) durchgeführt. Die Isolierung der cbMLs und deren Quantifizierung über RP HPLC erfolgte, wie in Abschnitt 2.2.14.2 beschrieben (vgl. auch Tabelle 8, Abb. 12-16). Die Auswertung der Analyseergebnisse erfolgt über eine Regressionsgerade nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate:  $y = a + bx$ ;  $a$  = Achsenabschnitt,  $b$  = Steigung.

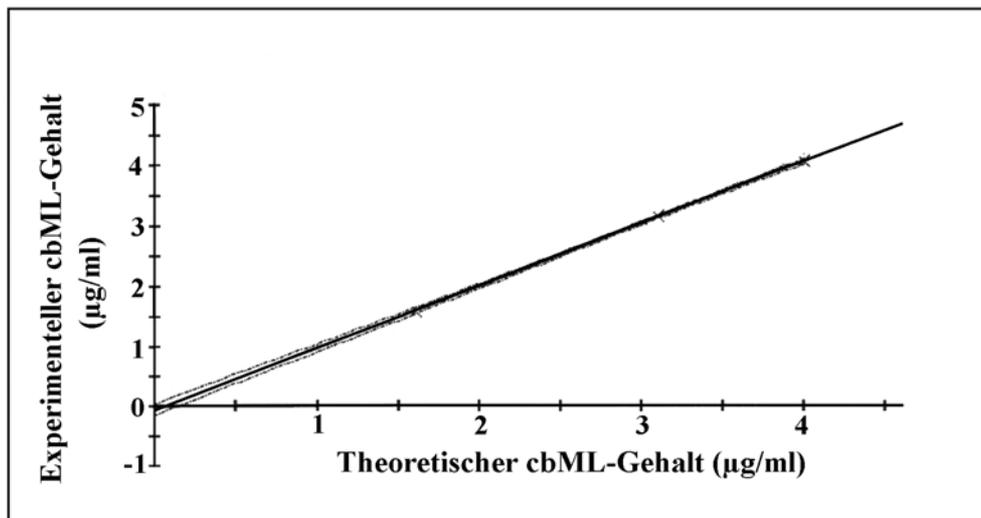
Theoretischer cbML-Gehalt in Betulae-Extrakt (Charge: 603 ABY) (µg/ml)	0.6	1.2	1.5	1.9	2.5	3.1	4.7
Anzahl der Messungen	1	1	3	1	1	9	3
Mittelwert X der Ergebnisse (µg/ml cbMLs)	0.492	1.181	1.501	1.824	2.482	3.096	4.106
Statistische Kenndaten über den linearen Bereich von 0.6 µg/ml bis 3.1 µg/ml							
Steigung b	1.019						
Achsenabschnitt a	-0.062						
Korrelationskoeffizient r	0.998						
Reststandardabw. $s^2_{y-x}$	0.057						



**Abb. 19.** Regressionsgerade über den linearen Bereich der Analysenergebnisse verschiedener Verdünnungsstufen des Betulae-Extrakts der Charge 603 ABY mit einem cbML-Gehalt von 3.096 µg/ml (vgl. Tabelle 12). Der Extrakt wurde 1:5, 2:5, 1:2, 3:5 und 4:5 mit VS 2-Puffer verdünnt, so dass der theoretische cbML-Gehalt bei 0,6, 1,2, 1,5, 1,9 und 2,5 µg/ml lag. Die Isolierung der cbMLs mittels Mikroaffinitätschromatographie und deren Quantifizierung über RP HPLC erfolgte, wie in Abschnitt 2.2.14.2 beschrieben (vgl. auch Tabelle 8, Abb. 12-16). Die gemessenen Werte sind über den jeweiligen theoretischen cbML-Gehalt aufgetragen. Daten der Regressionsgeraden  $y = a + bx$ : Achsenabschnitt  $a = -0,062$ ; Steigung  $b = 1,019$ ;  $\text{Konf}(0) = [-0,137; 0,013]$ .

**Tabelle 13.** Bestimmung der Linearität über verschiedene Verdünnungsstufen des Betulae-Extrakts der Charge 903 B-L (cbML-Gehalt: 3.13 µg/ml). Dieser wurde einmal 1:2 mit VS 2-Puffer verdünnt ( $\equiv 1,6$  µg/ml cbMLs). Für einen Wert bei 130% ( $\equiv 4,0$  µg/ml cbMLs) wurde die entsprechende Menge einer cbML-Standardlösung dem Extrakt vor der Analyse zugefügt. Der dritte Wert (100%) entsprach dem cbML-Gehalt in unverdünntem Extrakt (Tabelle 8). Es wurden Einzelbestimmungen durchgeführt. Die Isolierung der cbMLs mittels Mikroaffinitätschromatographie und deren Quantifizierung über RP HPLC erfolgte, wie in Abschnitt 2.2.14.2 beschrieben (vgl. auch Tabelle 8, Abb. 12-16). Die Auswertung der Analysenergebnisse erfolgte über eine Regressionsgerade nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate:  $y = a + bx$ ;  $a$  = Achsenabschnitt,  $b$  = Steigung.

Theoretischer cbML-Gehalt in Betulae-Extrakt (Charge: 903 B-L) (µg/ml)	1.6	3.1	4.0
Experimenteller cbML-Gehalt in Betulae-Extrakt (Charge: 903 B-L) (µg/ml)	1.579	3.130	4.044
Statistische Kenndaten			
Steigung $b$	1.028		
Achsenabschnitt $a$	-0.063		
Korrelationskoeffizient $r$	1.000		
Reststandardabw. $s_{y-x}^2$	0.009		



**Abb. 20. Regressionsgerade der Analysenergebnissen von drei verschiedenen Verdünnungsstufen des Betulae-Extrakts der Charge 903 B-L mit einem cbML-Gehalt von 3.13 µg/ml (Einzelbestimmungen).** Dieser wurde einmal 1:2 mit VS 2-Puffer verdünnt, so dass der theoretische cbML-Gehalt 1.6 µg/ml entsprach. Für einen Wert bei 130% ( $\equiv$  4.0 µg/ml cbMLs) wurde die entsprechende Menge einer cbML-Standardlösung dem Extrakt vor der Analyse zugefügt. Der dritte Wert (100%) entsprach dem cbML-Gehalt in unverdünntem Extrakt. Die Isolierung der cbMLs mittels Mikroaffinitätschromatographie und deren Quantifizierung über RP HPLC erfolgte, wie in Abschnitt 2.2.14.2 beschrieben (vgl. auch Tabelle 8, Abb. 12-16). Die gemessenen Werte sind über den jeweiligen theoretischen cbML-Gehalt aufgetragen. Daten der Regressionsgeraden  $y = a + bx$ : Achsenabschnitt  $a = -0.063$ ; Steigung  $b = 1.028$ ;  $\text{Konf}(0) = [-0.159; 0.033]$

Die Ergebnisse demonstrieren Linearität im Bereich von 0.6 bis 4.0 µg/ml cbML-Gehalt. Um dies zu bestätigen, wurden noch zwei weitere Mistelextraktarten untersucht: Abnobaviscum<sup>®</sup> Pini-2 der Charge 912 ABU und Abnobaviscum<sup>®</sup> Fraxini-2 der Charge 005 KLT. Von jedem Extrakt wurden Analysen bei 50, 100 und 150% cbM-Gehalt durchgeführt, deren Ergebnisse in Tabelle 14 und 15 zusammengefasst sind. Pini zeigte Linearität im Bereich 2.0 µg/ml bis 4.1 µg/ml und Fraxini von 0.6 µg/ml bis 1.7 µg/ml cbML-Gehalt, wodurch die Ergebnisse, die für den Betulae-Extrakt ermittelt wurden bestätigt werden. Daher ist für die cbML-Bestimmung Linearität im Bereich zwischen 0.6 und 4.1 µg/ml gegeben.

Die **Wiederfindungsrate** der Analysenmethode entspricht dem Grad der Übereinstimmung zwischen definierten Referenzwerten und den gefundenen Messwerten. Die Wiederfindung wurde für die Sorte Betulae (Charge: 603 ABY) im Bereich von 0.6 bis 3.1 µg/ml cbMLs, für die Sorte Pini (Charge: 912 ABU) im Bereich von 2.0 bis 4.1 µg/ml cbMLs und für die Sorte Fraxini-2 (Charge: 005 KLT) im Bereich von 0.6 bis 1.7 µg/ml cbMLs bestimmt. Diese Konzentrationsintervalle lagen im bereits ermittelten linearen Bereich der Methode. Das 100%-Niveau (Referenzwert) entsprach dem durchschnittlichen cbML-Gehalt in 1 ml Abnobaviscum<sup>®</sup>-Extrakt der jeweiligen Sorte (Tabelle 8). Aus Tabelle 16 sind die Wiederfin-

**Tabelle 14. Analysenergebnisse von drei verschiedenen Verdünnungsstufen von Pini-Extrakt der Charge 912 ABU (cbML-Gehalt: 4.086 µg/ml).** Der Extrakt wurde einmal 1:2 mit VS 2-Puffer verdünnt, so dass der theoretische cbML-Gehalt 2.0 µg/ml entsprach. Für einen Wert bei 150% ( $\equiv$  6.2 µg/ml cbMLs) wurde die entsprechende Menge einer cbML-Standardlösung dem Extrakt vor der Analyse zugefügt. Der dritte Wert (100%) entsprach dem cbML-Gehalt in unverdünntem Extrakt (Tabelle 8). Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Isolierung der cbMLs mittels Mikroaffinitätschromatographie und deren Quantifizierung über RP HPLC erfolgte, wie in Abschnitt 2.2.14.2 beschrieben (vgl. auch Tabelle 8, Abb. 12-16). Die Auswertung der Analysenergebnisse erfolgte über eine Regressionsgeraden nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate:  $y = a + bx$ ; a = Achsenabschnitt, b = Steigung.

Theoretischer cbML-Gehalt in Pini-Extrakt (Charge: 912 ABU) (µg/ml)	2.0	4.1	6.2
Anzahl der Messungen	3	3	3
Mittelwert X der Ergebnisse (µg/ml cbMLs)	1.945	4.086	4.433
Statistische Kenndaten über den linearen Bereich von 0.6 µg/ml bis 3.1 µg/ml			
Steigung b	1.020		
Achsenabschnitt a	-0.094		
Korrelationskoeffizient r	0.999		
Reststandardabw. $s^2_{y-x}$	0.044		

**Tabelle 15. Analysenergebnisse von drei verschiedenen Verdünnungsstufen von Fraxini-Extrakt der Charge 005 KLT (cbML-Gehalt: 1.15 µg/ml).** Der Extrakt wurde einmal 1:2 mit VS 2-Puffer verdünnt ( $\equiv$  0.6 µg/ml cbMLs). Für einen Wert bei 150% ( $\equiv$  1.7 µg/ml cbMLs) wurde die entsprechende Menge einer cbML-Standardlösung dem Extrakt vor der Analyse zugefügt. Der dritte Wert (100%) entsprach dem cbML-Gehalt in unverdünntem Extrakt (Tabelle 8). Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Isolierung der cbMLs mittels Mikroaffinitätschromatographie und deren Quantifizierung über RP HPLC erfolgte, wie in Abschnitt 2.2.14.2 beschrieben (vgl. auch Tabelle 8, Abb. 12-16). Die Auswertung der Analysenergebnisse erfolgte über eine Regressionsgeraden nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate:  $y = a + bx$ ; a = Achsenabschnitt, b = Steigung.

Theoretischer cbML-Gehalt in Fraxini-Extrakt (Charge: 005 KLT) (µg/ml)	0.6	1.1	1.7
Anzahl der Messungen	3	3	3
Mittelwert X der Ergebnisse (µg/ml cbMLs)	0.518	1.150	1.541
Statistische Kenndaten			
Steigung b	0.921		
Achsenabschnitt a	0.025		
Korrelationskoeffizient r	0.981		
Reststandardabw. $s^2_{y-x}$	0.093		

dungsraten für den linearen Bereich der einzelnen Sorten ersichtlich, deren Berechnungen aus den Ergebnissen zur Bestimmung der Linearität erfolgte (Tabelle 12, 14-15). Im linearen Bereich der Methode, d. h. zwischen 0.6 und 4.1 µg/ml cbML-Gehalt, lagen die Wiederfindungsraten bei 98% im Fall von Betulae und Pini und bei 94% im Fall von Fraxini. Damit ist die Spezifikation erfüllt und zusammen mit den Ergebnissen zur Spezifität und Präzision bestätigt dies gleichzeitig die Richtigkeit der Analysenmethode.

**Tabelle 16. Bestimmung der Wiederfindungsraten über den linearen Bereich der Analysenmethode.** Die Berechnungen erfolgten im Fall von Betulae (Charge: 603 ABY; cbML-Gehalt: 3.096 µg/ml) mit den Werten von 0.6 bis 3.1 µg/ml cbML-Gehalt (Tabelle 12), und im Fall der Sorten Pini (Charge: 912 ABU; cbML-Gehalt: 4.086 µg/ml) und Fraxini (Charge: 005 KLT; cbML-Gehalt: 1.15 µg/ml) mit den Werten von 2.0 bis 4.1 µg/ml (Tabelle 14) bzw. von 0.6 bis 1.7 µg/ml cbML-Gehalt (Tabelle 15).

Abnobaviscum®- Extrakt (Sorte und Charge)	Betulae (603 ABY)	Pini (912 ABU)	Fraxini (005 KLT)
Anzahl der Werte <sup>1</sup>	16	6	9
Steigung b	1.019	1.020	0.921
Achsenabschnitt a	-0.062	-0.094	0.025
Korrelationskoeffizient r	0.998	0.999	0.981
Wiederfindungsrate (%)	98.416	98.449	93.785
Vertrauensbereich der Wiederfindungsrate	98.416 ± 2.537	98.449 ± 2.013	93.785 ± 6.637
Konstanter systematischer Fehler der Methode	nein	nein	nein
Proportionaler systematischer Fehler der Methode	nein	nein	nein

<sup>1</sup> Die Werte entsprechen denen aus der Bestimmung der Linearität (Tabelle 12, 14-15)

Auf der Grundlage der Ergebnisse zur Bestimmung der Linearität über verschiedene Verdünnungsstufen des Betulae-Extrakts der Charge 603 ABY (Tabelle 12) lassen sich auch die **Nachweis- und Bestimmungsgrenze** der chitinbindenden Mistellektine und der **Arbeitsbereich** angeben. Damit beträgt die niedrigste zu detektierende Menge der cbMLs in den Extrakten 0.13 µg/ml. Die niedrigste Konzentration, die quantitativ mit genügender Präzision und Richtigkeit bestimmt werden kann liegt bei 0.46 µg/ml cbMLs (Tabelle 17). Die Analysenmethode ist im Bereich zwischen 0.6 und 4.1 µg/ml cbMLs linear. Bei den Inkubationsschritten werden im Fall von Betulae jeweils 2 ml Extrakt mit äquilibriertem gereinigten Chitin inkubiert, d. h., dass der **Arbeitsbereich** zwischen 1.2 und 8.2 µg liegt.

Dies entspricht der Menge an chitinbindenden Mistellektinen, die auf das Chitin aufgetragen werden kann.

**Tabelle 17. Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze aus den Ergebnissen zur Bestimmung der Linearität mit Betulae der Charge 603 ABY mit einem cbML-Gehalt von 3.096 µg/ml (Tabelle 12).**

Theoretischer cbML-Gehalt in Betulae (Charge: 603 ABY) (µg/ml)	0.6	1.2	1.5	1.9	2.5	3.1
Anzahl der Werte <sup>1</sup>	1	1	3	1	1	9
Steigung b	1.019					
Achsenabschnitt a	-0.062					
Korrelationskoeffizient <sup>1</sup>	0.998					
Nachweisgrenze $X_N$ (µg/ml)	0.13					
Bestimmungsgrenze $X_B$ (µg/ml)	0.46					

<sup>1</sup> Die Werte entsprechen denen aus der Bestimmung der Linearität (Tabelle 12)

### 3.4 Bildung von anti-cbML-Antikörper bei Tumorpatienten während einer Mistelextrakttherapie

Die Bildung von Antikörpern gegen MLI und Viscotoxinen bei Tumorpatienten, die mit Mistelextrakten therapiert worden sind, wurde bereits beschrieben (vgl. Abb. 21) [33-34, 82]. Es sollte nun gezeigt werden, ob Antikörper auch gegen die chitinbindenden Mistellektine im Verlauf einer Mistelextrakttherapie gebildet werden, wobei die Tests nur mit cbML3 durchgeführt wurden. Bei cbML1 und cbML2 erwartet man aufgrund ihrer fast identischen Primärstrukturen gegenüber cbML3 annähernd gleiche Ergebnisse. Parallel wurden Antikörpertests gegen MLI und MLIII durchgeführt. Aufgrund der hohen Homologie zwischen diesen beiden Typ 2 RIPs, waren ähnliche Testergebnisse zu erwarten im Unterschied zu den cbMLs, welche völlig andere strukturelle Eigenschaften besitzen.

Für die Tests bekamen 26 Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen mindestens 18 Wochen lang das Mistelpräparat Abnobaviscum<sup>®</sup> Mali-4 injiziert, wobei die meisten Patienten lokale Reaktionen und Grippe-ähnliche Symptome entwickelten. Schwere Nebenreaktionen wurden bei keinem der untersuchten Personen festgestellt.

Die Seren der Patienten wurden vor Beginn der Misteltherapie untersucht, dann, im Fall von cbML3, vom Zeitpunkt ab der ersten Injektion nach 3, 6, 9, 12, 18 (bei jeweils 22 der 26 Patienten) und nach 24 Wochen (bei 20 der 22 Patienten). Im Fall von MLI und MLIII erfolgten die Analysen ebenfalls nach 3, 6, 9 und 12 (bei jeweils 22 der 26 Patienten) und

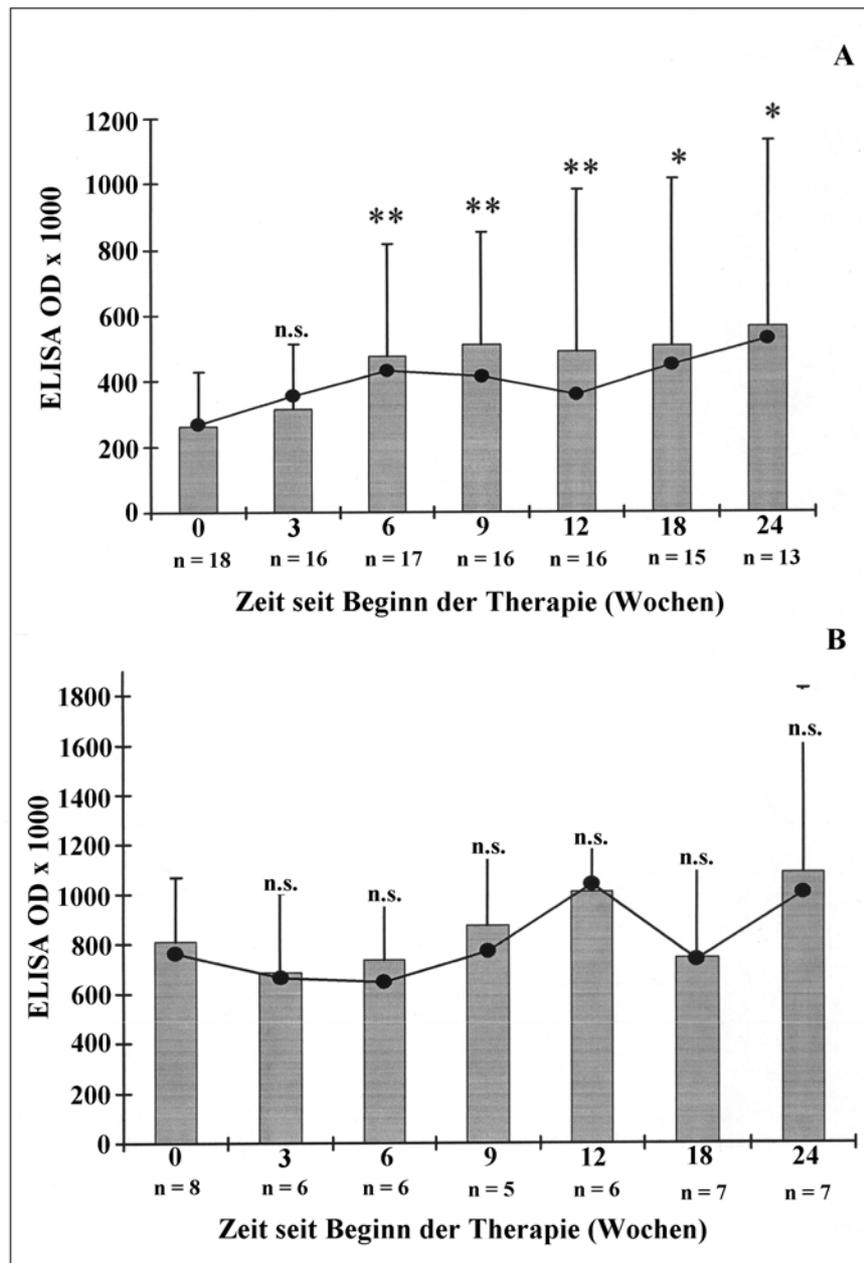


Für die Bestimmung sowohl der IgG- als auch der IgE-Antikörper wurden die Seren zunächst mit cbML3, MLI bzw. MLIII inkubiert. Als sekundäre Antikörper wurden Peroxidase-konjugierte antihumane IgG- bzw. IgE-Antikörper der Ziege zugegeben. Die Detektion erfolgte bei 495 nm im ELISA-Reader mit ortho-Phenylendiamin als Substrat (Abb. 21).

Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl 2 der 38 gesunden Blutspender (5%, Daten nicht gezeigt), als auch 8 der 26 getesteten Patienten (31%) bereits vor jeglichem Kontakt mit Mistelpräparaten IgG-Antikörper gegen cbML3 hatten. Im Verlauf der Behandlung mit Mistelextrakten stieg der Anteil an Patienten, deren Seren mit cbML3 reagierten auf 65% an (Tabelle 18). Von den 18 zu Beginn anti-cbML3-negativ-Patienten entwickelten 54% Antikörper nach Ablauf der 24wöchigen Therapie. Abbildung 22 A zeigt einen signifikanten Anstieg des Antikörpertiters. Bei den 8 Patienten, deren Seren bereits vor Beginn der Mistelextraktinjektionen anti-cbML3-Antikörper des IgG-Typs aufwiesen, änderte sich der Antikörpertiter im Verlauf der Therapie unwesentlich (Abb. 22 B): nach 3 Wochen reagierten die Seren zweier Patienten (33%) zwar negativ, aber nach 24 Wochen hatten immer noch insgesamt 86% der Patienten, deren Seren schon vor Beginn der Misteltherapie positiv reagierten, IgG-Antikörper gegen cbML3 im Blut.

**Tabelle 18. Verlauf der anti-cbML3-Antikörperentwicklung vom IgG-Typ bei 26 Tumorpatienten während einer Misteltherapie.** Im Verlauf der mehrwöchigen Behandlung wurde den Probanden regelmäßig das Präparat Abnobaviscum<sup>®</sup> Mali-4 injiziert. Die Seren der Patienten wurden vor Beginn der Misteltherapie untersucht, dann vom Zeitpunkt ab der ersten Injektion nach 3, 6, 9, 12, 18 (bei jeweils 22 der 26 Patienten) und nach 24 Wochen (bei 20 der 22 Patienten). Für die Bestimmung der IgG-Antikörper wurden die Seren mit cbML3 (1µg/ml) inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation mit Peroxidase-konjugierten antihumanen IgG-Antikörper der Ziege. Die Messung der Ansätze erfolgte bei 495 nm im ELISA-Reader mit ortho-Phenylendiamin als Substrat (vgl. Abb. 21).

Behandlungswoche	Anzahl der Patienten mit positivem anti-cbML3-AK-Titer/Anzahl der getesteten Patienten (in Prozent)		
	gesamt	anti-cbML3-negativ vor Therapiebeginn	anti-cbML3-positiv vor Therapiebeginn
0	8/26 (31)	0/18 (0)	8/8 (100)
3	7/22 (32)	3/16 (19)	4/6 (67)
6	9/22 (41)	5/17 (29)	5/6 (83)
9	12/22 (55)	7/16 (44)	4/5 (80)
12	13/22 (59)	7/16 (44)	6/6 (100)
18	10/22 (45)	5/15 (33)	5/7 (71)
24	13/20 (65)	7/13 (54)	6/7 (86)



**Abb. 22. Entwicklung des anti-cbML3-Antikörpertiters in den Seren von 26 Tumorpatienten im Verlauf einer Mistelextraktbehandlung.** Während der mehrwöchigen Behandlung wurde den Probanden regelmäßig das Präparat Abnobaviscum<sup>®</sup> Mali-4 injiziert. Die Seren der Patienten wurden vor Beginn der Misteltherapie untersucht, dann vom Zeitpunkt ab der ersten Injektion nach 3, 6, 9, 12, 18 (bei jeweils 22 der 26 Patienten) und nach 24 Wochen (bei 20 der 22 Patienten). Für die Bestimmung der IgG-Antikörper wurden die Seren mit cbML3 (1 µg/ml) inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation mit Peroxidase-konjugierten antihumanen IgG-Antikörper der Ziege. Die Messung der Ansätze erfolgte bei 495 nm im ELISA-Reader mit ortho-Phenylendiamin als Substrat (vgl. Abb. 21). (A) anti-cbML3 negativ vor Beginn der Therapie (n = 18). (B) anti-cbML3 positiv vor Beginn der Therapie (n = 8). Mittelwert (Säule), Standardabweichung (Balken) und der Median (•) sind angegeben; \* P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001; n. s.: nicht signifikant.

Die Tests mit MLI und MLIII zeigten eine andere Entwicklung der IgG-Antikörperbildung: vor Beginn der Therapie hatten von den 38 gesunden Blutspendern keiner (Daten nicht

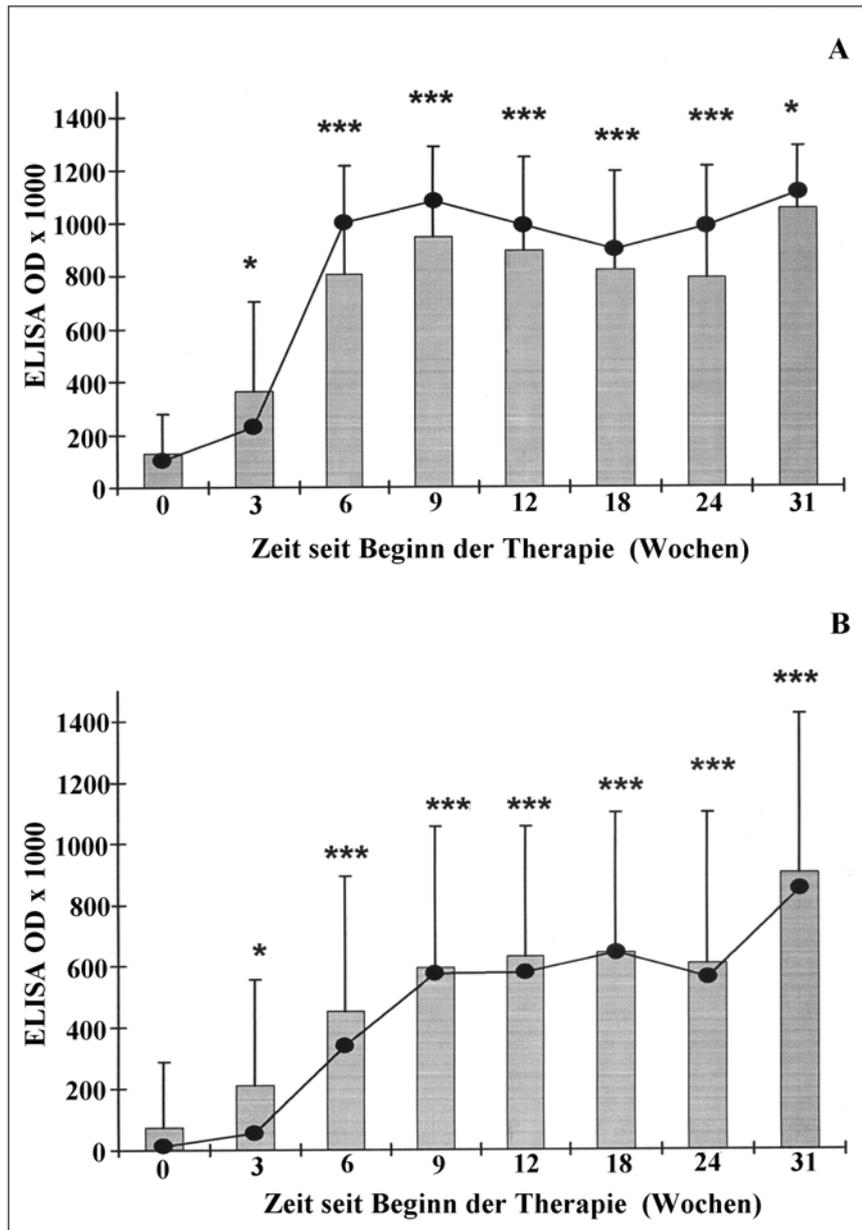
gezeigt) und nur vier bzw. einer der 26 Patienten anti-MLI- bzw. -MLIII-Antikörper im Blut. Nach Ablauf der 31. Woche zeigten aber 100 bzw. 86% der Seren ein positives Testergebnis (Tabelle 19). Der Antikörpertiter stieg im Verlauf der Zeit signifikant an (Abb. 23).

**Tabelle 19. Verlauf der anti-MLI- und anti-MLIII-Antikörperentwicklung vom IgG-Typ in 26 Tumorpatienten während einer Misteltherapie.** Während der mehrwöchigen Behandlung wurde den Probanden regelmäßig das Präparat Abnobaviscum® Mali-4 injiziert. Die Seren der Patienten wurden vor Beginn der Misteltherapie untersucht, dann vom Zeitpunkt ab der ersten Injektion nach 3, 6, 9 und 12 (bei jeweils 22 der 26 Patienten) und nach 18 und 24 Wochen (bei 20 der 22 Patienten). Außerdem wurden die Seren von 7 der 20 Patienten nach der 31. Therapiewoche erneut auf anti-MLI- und -MLIII-Antikörper hin untersucht. Für die Bestimmung der IgG-Antikörper wurden die Seren mit MLI bzw. MLIII (jeweils 1 µg/ml) inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation mit Peroxidase-konjugierten antihumanen IgG-Antikörper der Ziege. Die Messung der Ansätze erfolgte bei 495 nm im ELISA-Reader mit ortho-Phenylendiamin als Substrat (vgl. Abb. 21).

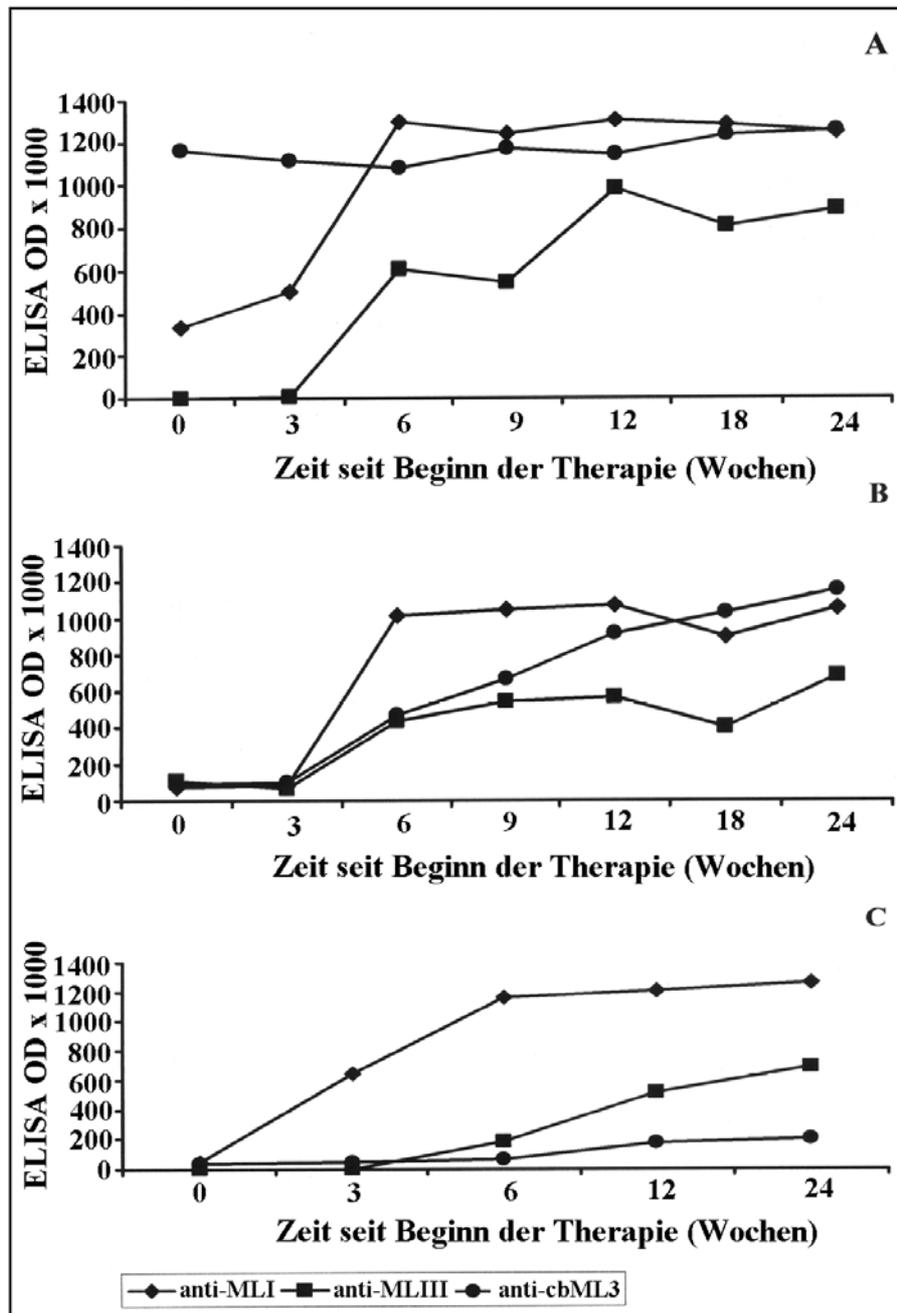
Behandlungswoche	Anzahl der Patienten mit positivem anti-MLI/MLIII-AK-Titer/Anzahl der getesteten Patienten (in Prozent)	
	anti-MLI	anti-MLIII
0	4/26 (15)	1/26 (4)
3	11/22 (50)	5/22 (23)
6	20/22 (91)	13/22 (59)
9	21/22 (96)	16/22 (74)
12	21/22 (95)	17/22 (77)
18	17/20 (86)	15/20 (76)
24	18/20 (90)	14/20 (70)
31	7/7 (100)	6/7 (86)

Im Fall der IgG-Antikörperbildung gegen cbML3 erhielt man drei verschiedene Entwicklungsmuster: Patienten, die anti-cbML3-negativ waren und im Verlauf der Misteltherapie Antikörper gegen cbML3 entwickelten, Patienten mit einem positiven anti-cbML3-Antikörpertiter vor und nach der Therapie und Patienten, deren Seren sowohl vor als auch nach der Misteltherapie negativ reagierten. Die Abbildungen 24 A-C zeigen zu jedem dieser drei Fälle ein Patientenbeispiel. Man erkennt deutlich, dass es keinen Zusammenhang zwischen der anti-cbML3- und der anti-MLI- bzw. -MLIII-Antikörperentwicklung vom IgG-Typ gibt.

MLI induziert die Bildung von IgE-Antikörper. In diesem Fall reagierten 7 der 26 Patienten positiv. Im Unterschied dazu wurden bei 4 Patienten anti-MLIII- und bei nur einem anti-cbML3-Antikörper des IgE-Typs detektiert (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 23. Entwicklung des anti-MLI- (A) und anti-MLIII-Antikörpertiters (B) in den Seren von 26 Tumorpatienten im Verlauf einer Mistelextraktbehandlung.** Während der mehrwöchigen Behandlung wurde den Probanden regelmäßig das Präparat Abnobaviscum<sup>®</sup> Mali-4 injiziert. Die Seren der Patienten wurden vor Beginn der Misteltherapie untersucht, dann vom Zeitpunkt ab der ersten Injektion nach 3, 6, 9 und 12 (bei jeweils 22 der 26 Patienten) und nach 18 und 24 Wochen (bei 20 der 22 Patienten). Außerdem wurden die Seren von 7 der 20 Patienten nach der 31. Therapiewoche erneut auf anti-MLI- und -MLIII-Antikörper hin untersucht. Für die Bestimmung der IgG-Antikörper wurden die Seren mit MLI bzw. MLIII (jeweils 1 µg/ml) inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation mit Peroxidase-konjugierten antihumanen IgG-Antikörper der Ziege. Die Messung der Ansätze erfolgte bei 495 nm im ELISA-Reader mit ortho-Phenylendiamin als Substrat (vgl. Abb. 21). Mittelwert (Säule), Standardabweichung (Balken) und der Median (•) sind angegeben; \* P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001.



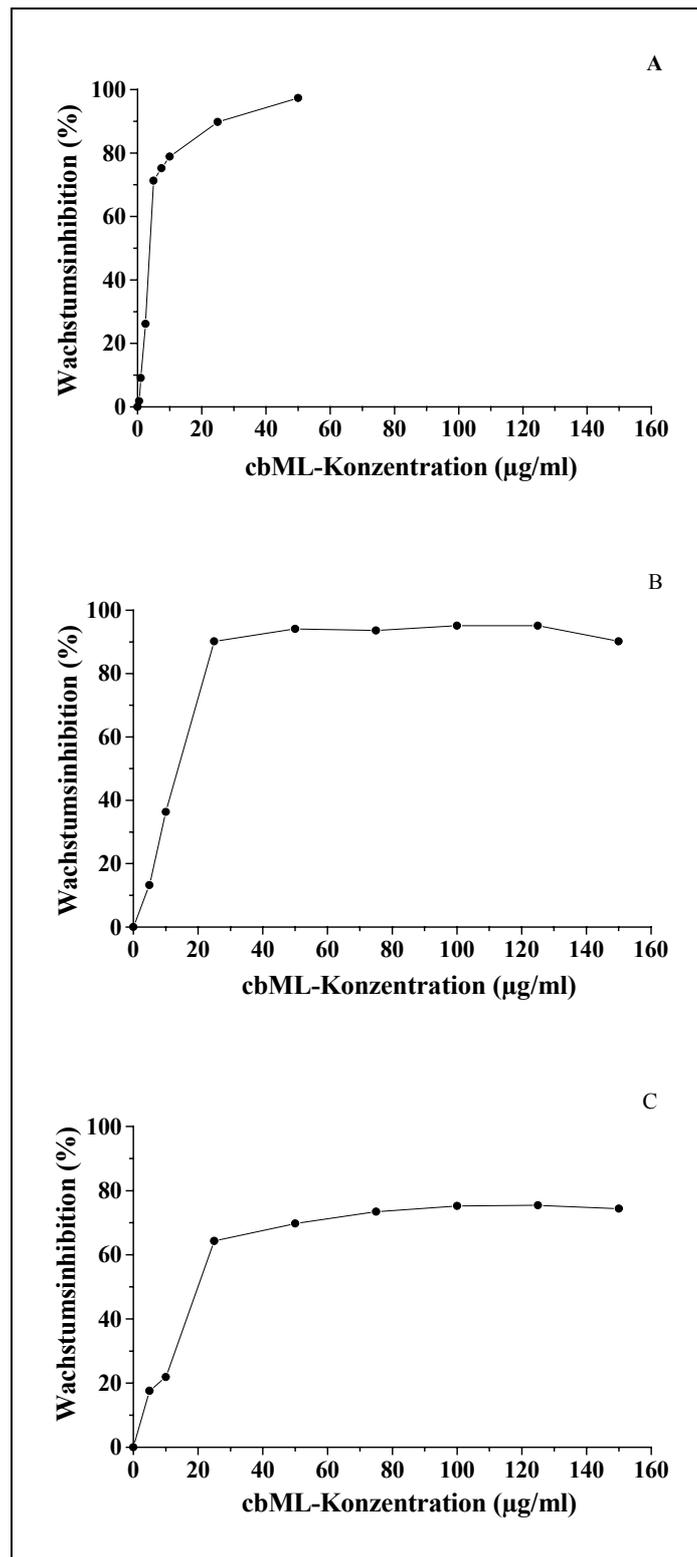
**Abb. 24.** Verlauf der IgG-Antikörperentwicklung gegen das chitinbindende Mistellektin cbML3 bei drei verschiedenen Tumorpatienten während einer Mistelextrakttherapie. Parallel sind die anti-MLI- und anti-MLIII-Antikörpertiter eingezeichnet. Die Bestimmung der IgG-Antikörper erfolgte nach dem Schema in Abbildung 21. (A) Der Patient hatte sowohl vor Beginn, als auch während der Therapie Antikörper gegen cbML3. Gegen MLI bzw. MLIII waren vor Behandlungsbeginn keine Antikörper nachweisbar. Die Antikörpertiter stiegen erst während der Therapie signifikant an. (B) Der Patient hatte weder gegen cbML3, noch gegen MLI und MLIII Antikörper vor Therapiebeginn. In allen drei Fällen stiegen die Antikörpertiter während der Mistelextraktbehandlung an. (C) Vor Beginn der Mistelextraktbehandlung hatte der Patient weder gegen cbML3, noch gegen MLI und MLIII Antikörper. Nur in den letzten beiden Fällen stieg der Antikörpertiter während der Therapie signifikant an.

### 3.5 Antifungale Eigenschaften der chitinbindenden Mistellektine

Die Bestimmung der antifungalen Aktivität erfolgte mit cbML-Lyophilisat, das bei niedriger TFA-Konzentration HPLC-gereinigt worden war (vgl. Abschnitt 2.2.4.2), d. h. es lag ein Isoformengemisch vor. In Konzentrationen von 0.5–300 µg/ml wurde in aq. bidest. gelöstes cbML-Lyophilisat mit fünf verschiedenen Pilzarten inkubiert, die entweder zu den *Ascomyceten* (Schlauchpilze) oder zu den *Basidiomyceten* (Ständerpilze) gehören und als Hauptkomponente Chitin in ihren Zellwänden enthalten [3]. Zu Versuchsbeginn lagen die Pilze in einer so niedrigen Konzentration vor, dass ihre optischen Dichten (OD) bei 595 nm einen Wert von nur 0.004 hatten. Die Inkubationszeiten hingen von der Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Pilzarten in Abwesenheit der cbML-Isoformen ab (Wachstumskontrollen). Bei *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida sake* erfolgte aufgrund der hohen Zelldichte die Auswertung bereits nach 48 Stunden, bei *Tremella foliacea* und *Debaryomyces hanesii* nach 72 und bei *Microstroma juglandis*, einer sehr langsam wachsenden Pilzart, erst nach 96 Stunden. Bei *Tremella foliacea* und *Candida sake* inhibierten die chitinbindenden Mistellektine auch bei Proteinkonzentrationen von bis zu 200 bzw. 300 µg/ml das Zellwachstum nicht. Im Gegenteil, bei *Tremella foliacea* wie auch bei *Candida sake* findet man bei cbML-Konzentrationen zwischen 10 und 75 µg/ml bzw. bei 200 µg/ml sogar ein verstärktes Pilzwachstum, das bei höheren Lektinkonzentrationen aber wieder zurückgeht (Tabelle 20). Ob das Wachstum dieser Pilzarten tatsächlich unter bestimmten cbML-Konzentrationen angeregt wird oder ob es sich dabei einfach um ein Artefakt handelt, bleibt zu untersuchen. Die anderen drei Pilzarten wurden bereits bei cbML-Konzentrationen von 2.5 (*Saccharomyces cerevisiae*) und 10 µg/ml (*Debaryomyces hanesii*, *Microstroma juglandis*) bis zu einem Drittel in ihrem Wachstum reduziert (Tabelle 20). Bei 50 bzw. 150 µg cbML/ml zeigten die Zelldichten von *Saccharomyces cerevisiae* und *Microstroma juglandis* kaum mehr einen Anstieg, d. h. in diesen Konzentrationen verursachten die chitinbindenden Mistellektine eine fast 100%ige Hemmung des Pilzwachstums. Die maximale Wachstumsinhibition von *Debaryomyces hanesii* ist bei 100 µg cbML/ml erreicht und liegt bei 75%. Die graphische Darstellung der antifungalen Aktivität der chitinbindenden Mistellektine in Abhängigkeit von der Lektinkonzentration zeigen die Abbildungen 25 A-C. Aus den Diagrammen läßt sich der IC<sub>50</sub>-Wert für die jeweilige Pilzart bestimmen. Dieser liegt für *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) bei ungefähr 3.5 µg/ml, für *Microstroma juglandis* (Mj) bei ungefähr 14 µg/ml und für *Debaryomyces hanesii* (Dh) bei ungefähr 20 µg/ml.

**Tabelle 20. Bestimmung der durch cbMLs verursachten Wachstumshemmung bei fünf verschiedenen Pilzarten.** Diese wurden mit jeweils acht verschiedenen Proteinkonzentrationen inkubiert. Die Tests wurden mit den Pilzarten *Saccharomyces cerevisiae*, *Microstroma juglandis*, *Debaryomyces hanesii*, *Tremella foliacea* und *Candida sake* durchgeführt. Nach Inkubationszeiten von 48 (*Sc*, *Cs*), 72 (*Dh*, *Tf*) bzw. 96 h (*Mj*) wurden die OD der Testansätze bei 595 nm gemessen und mit den Wachstumskontrollen (Proteinkonzentration = 0 µg/ml) verglichen.  
Wachstumshemmung in % =  $(A_{595}(\text{Wk}) - A_{595}(\text{Test})) / A_{595}(\text{Wk}) \times 100$ .

Pilzart	cbML-Konzentration (µg/ml)	Absorption bei 595 nm (Mittelwert)	Relative Standardabweichung (%)	Wachstumshemmung (%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ( <i>Sc</i> )	0 (Wk)	0.492	8.5	0
	0.5	0.483	14.3	1.8
	1	0.447	15.3	9.1
	2.5	0.363	14.5	26.2
	5	0.141	13.8	71.3
	7.5	0.122	17.4	75.2
	10	0.104	21.3	78.9
	25	0.050	26.8	89.8
	50	0.013	32.4	97.4
<i>Microstroma juglandis</i> ( <i>Mj</i> )	0 (Wk)	0.204	12.2	0
	5	0.177	12.2	13.2
	10	0.130	11.1	36.3
	25	0.020	28.4	90.2
	50	0.012	36.5	94.1
	75	0.013	46.7	93.6
	100	0.010	46.0	95.1
	125	0.010	57.4	95.1
	150	0.020	19.0	90.2
<i>Debaryomyces hanesii</i> ( <i>Dh</i> )	0 (Wk)	0.602	7.2	0
	5	0.496	7.2	17.6
	10	0.470	9.6	21.9
	25	0.215	8.8	64.3
	50	0.182	9.5	69.8
	75	0.160	9.7	73.4
	100	0.149	7.1	75.2
	125	0.148	9.1	75.4
	150	0.154	6.9	74.4
<i>Tremella foliacea</i> ( <i>Tf</i> )	0 (Wk)	0.255	7.8	0
	10	0.351	7.4	-37.6
	25	0.319	4.5	-25.1
	50	0.287	6.6	-12.5
	75	0.286	3.7	-12.2
	100	0.263	7.7	-3.1
	125	0.241	9.3	5.5
	150	0.260	8.9	-2.0
	200	0.262	6.2	-2.7
<i>Candida sake</i> ( <i>Cs</i> )	0 (Wk)	0.700	6.8	0
	100	0.763	5.6	-9
	200	0.807	8.2	-15.3
	300	0.746	5.2	-6.6



**Abb. 25.** Graphische Darstellung der, durch die chitinbindenden Mistellektine (cbMLs) verursachten Wachstumshemmung gegenüber *Saccharomyces cerevisiae* (A), *Microstroma juglandis* (B) und *Debaryomyces hanessii* (C) in Abhängigkeit von der cbML-Konzentration. Je 20 µl verschiedener Konzentrationen der in H<sub>2</sub>O gelösten cbMLs werden zu je 180 µl Pilzkultur pipettiert und die Ansätze bei 22°C unter Schütteln inkubiert (jeweils Zwanzigfachbestimmungen). Nach 48 (*Sc*), 72 (*Dh*) bzw. 96 h (*Mj*) wird die OD bei 595 nm gemessen. Wachstumsinhibition in % =  $(A_{595}(\text{Wk}) - A_{595}(\text{Test})) / A_{595}(\text{Wk}) \times 100$ .

## 4. Diskussion

Zahlreiche Studien befassten und befassen sich mit den medizinisch wirksamen Inhaltsstoffen in Mistelextrakten, und insbesondere den Mistellektinen der Typ II Ribosomen-inaktivierenden Proteine, aber auch den Viscotoxinen und Polysacchariden wurde großes Interesse geschenkt. Vor wenigen Jahren wurde eine weitere Mistelkomponente isoliert, ein chitinbindendes Mistellektin (VisalbcBA), bestehend aus zwei identischen Untereinheiten, deren Molekulargewichte zu 10.8 kDa angegeben wurden und je eine Hevein-Domäne besitzen [47]. In Anlehnung an die von Peumans et al. entwickelte Methode zur Reinigung dieses Proteins aus Mistelextrakten mittels Affinitätschromatographie an Chitin wurde das chitinbindende Mistellektin für weitere Untersuchungen, sowohl im Hinblick auf die Struktur, als auch auf biologische Aktivitäten in größerem Umfang isoliert [95-97]. Nach einem weiteren Reinigungsschritt mittels RP HPLC zeigte es sich, dass das Eluat der Affinitätssäule in Wirklichkeit ein Gemisch von mindestens drei chitinbindenden Lektinen (cbMLs) enthält. MALDI MS-Messungen der Proteine und die Ermittlung der vollständigen Primärsequenzen demonstrierten, dass es sich bei diesen Proteinen um Dimere aus zwei Untereinheiten handelt, deren Sequenzen mit den ersten 26 N-terminalen Aminosäuren von VisalbcBA übereinstimmen. Die ermittelten Molekulargewichte der cbML-Untereinheiten liegen bei nur 5 kDa, d. h. der Hälfte des Molekulargewichts, das für VisalbcBA angegeben wurde. [47, 95-97]. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass letzteres in Form eines Komplexes aus zwei Molekülen vorlag, u. U. assoziiert mit in Mistelextrakten vorkommenden N-Acetylglukosamin-enhaltenden Kohlenhydraten oder Chitinbausteinen, die als Verunreinigungen nach der Affinitätschromatographie im sauren Eluat vorlagen. Derartige Interaktionen werden durch das Acetonitril bei der RP HPLC-Trennung verhindert. Mit großer Wahrscheinlichkeit handelte es sich bei VisalbcBA um eines der cbML-Isoformen oder aber um ein Gemisch von diesen.

### 4.1. Isolierung und Strukturaufklärung der cbML-Isoformen

In dieser Arbeit wurden größere Mengen der drei chitinbindenden Mistellektine cbML1-3 in reiner Form isoliert. Dazu wurden die bereits beschriebenen Reinigungsmethoden [47, 95-97] in modifizierter und vereinfachter Form angewandt. Auf eine Abtrennung der Mistellektine I, II und III vor dem Affinitätsschritt über eine Chitinsäule konnte verzichtet werden, da mögliche Verunreinigungen durch die Typ II RIPs im cbML-Eluat spätestens nach den RP HPLC-Analysen entfernt wurden. Identifizierung und Reinheitskontrollen erfolgten über

MALDI MS, ASA und N-terminale Sequenzanalysen. Auf SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen wurde verzichtet, da aus früheren Analysen, bei denen sowohl Glycin- als auch Tricine-SDS-PAGE angewandt wurde, keine befriedigenden Ergebnisse erzielt wurden. Die cbML-Isoformen zeigten im Gel eine ausgedehnte Bande zwischen 12 und 18 kDa, die im Bereich von 13 kDa am intensivsten war. Wahrscheinlich verhinderte die hohe Anzahl an Disulfidbrücken (vgl. Abschnitt 3.2) eine vollständige Entfaltung der Proteine durch SDS, so dass die cbML-Isoformen nicht in linearen sondern in unterschiedlich globulären Formen durch das Gel wanderten. Deshalb erhielt man keine scharfen Banden, die zudem durch den erhöhten Siebeffekt im höheren Molekulargewichtsbereich lagen (theoretisch zwischen 10.5 und 11 kDa). Eine SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen ergab ebenfalls keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Man erhielt zwar schärfere Banden, die aber im Bereich von ungefähr 7.5 kDa anstelle der erwarteten 5 kDa lagen. Dies liegt vermutlich an einer unvollständigen Reduktion der zahlreichen Disulfidbrücken, was wiederum die Entfaltung der cbML-Untereinheiten verhindert [96]. Auf ein ähnliches Problem könnte auch das zu hoch ermittelte Molekulargewicht von VisalbCBA zurückgeführt werden [47]. Ähnliche Überschätzungen der auf SDS-PAGE-Analysen basierenden Molekulargewichte findet man bei den zu den cbMLs homologen Reislektinen, was auf die zahlreichen Cystein- und Glycinreste zurückgeführt wird [146-147].

Die Ausbeuten bei den Aufreinigungen lagen zwischen 2 und 5 mg HPLC-gereinigtes Gesamtlektin/500 g Mistel, wobei 1-2 % cbML1, 14-20 % cbML2 und 80-84 % cbML3 isoliert wurden. MALDI MS-Daten der drei HPLC-gereinigten Proteine zeigten symmetrische Peaks bei 10582.8 Da für cbML1, 10695.9 Da für cbML2 und 10809.0 Da für cbML3. Die Ergebnisse der Primärsequenzbestimmungen mittels N-terminaler Sequenzierung nach Edman in Kombination mit MALDI MS-Analysen bestätigten, dass es sich bei allen drei Lektinen um Dimere handelt, deren cystein- und glycinreiche ca. 5 kDa schwere Untereinheiten über Disulfidbrücken verknüpft sind. CbML1 und cbML3 sind Homodimere, aufgebaut aus je zwei zuckerfreien Polypeptidketten von 48- bzw. 49-Aminosäureresten, während cbML2 ein Heterodimer ist, bestehend aus einer verkürzten (48 AS) und einer vollständigen (49 AS) Kette. Die Sequenzen aller cbML-Untereinheiten sind bis zur 48. Aminosäure identisch. Die um eine Aminosäure längeren Polypeptidketten haben an Position 49 einen Leucinrest. Dies erklärt auch das Verhalten der drei Isolektine während der RP HPLC-Reinigung: cbML3 hat, aufgrund seiner zwei zusätzlichen hydrophoben Aminosäuren, die höchste Retentionszeit, während cbML1 zuerst eluiert, da ihm die zwei Leucinreste fehlen. Die vollständige Primärstruktur der drei cbML-Isoformen cbML1, cbML2 und cbML3

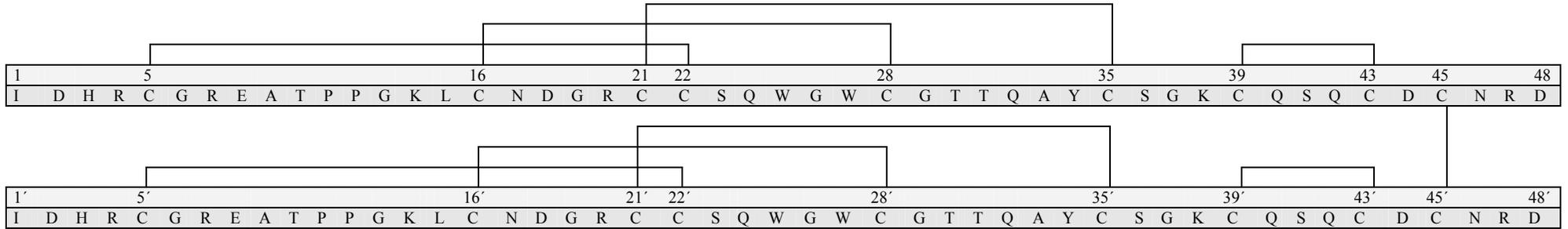
mit ihren postulierten Disulfidbrückenverknüpfungen zeigt Abbildung 26. Unter den zahlreichen zu den chitinbindenden Mistellektinen homologen Proteinen gibt es kleinere mit nur einer Hevein-Domäne, wie z. B. Hevein aus *Hevea brasiliensis* und die chitinbindenden antimikrobiellen Peptide (*Ac*-AMP bzw. *Pn*-AMP) aus *Amaranthus caudatus* und *Pharbitis nil* L., von denen ebenfalls jeweils eine um eine Aminosäure verkürzte Form existiert [113, 116, 148]. Entweder stammen die verschiedenen Isoformen von verschiedenen Genen ab, oder aber es gibt nur eines, und die zusätzliche C-terminale Aminosäure ist das Resultat posttranslationaler Prozesse. Vielleicht verkürzen aber auch Carboxypeptidasen während der Reinigung der Proteine diese um eine Aminosäure.

Die chitinbindenden Mistellektine zeigen hohe Sequenzhomologien zu Hevein und anderen Proteinen mit Hevein-ähnlichen Domänen (Tabelle 7). Zu den invarianten Aminosäureresten zählen die Cysteinreste an den Positionen 5, 16, 21, 22, 28, 35, 39 und 43 und die Glycinreste an den Positionen 6, 13, 19, 26, 29 und 37. Der Serinrest an Position 23 und die aromatischen Aminosäuren an den Positionen 25, 27 und 34 sind ebenfalls hochkonserviert.

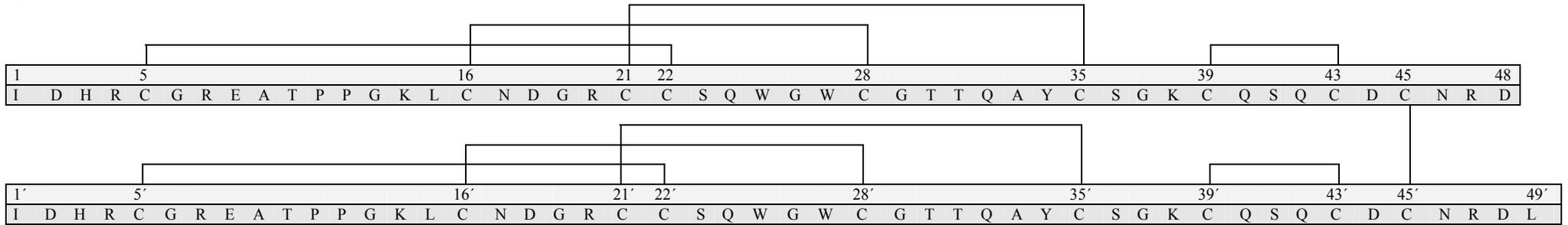
Unter den zu den cbMLs homologen Proteinen zählen die mit nur einer Hevein-ähnlichen Domäne, wie das Hevein selbst [137] und die bereits erwähnten antimikrobiellen Peptide [113, 116], des Weiteren Kartoffelproteine (*Win1* und *Win2*), die als Reaktion auf eine Beschädigung der Pflanze gebildet werden [149] und viele basische Chitinasen [94]. Das Brennesselagglutinin enthält zwei Hevein-ähnliche Domänen pro Untereinheit [140], und einige Getreideagglutinine haben pro Monomer vier oder sieben hintereinander aufgereichte Hevein-ähnliche Domänen [94, 150-152]. In allen Proteinen bilden die acht Cysteinreste intramolekulare Disulfidbrücken, deren Lage, vor allem die ersten sechs Cysteinreste betreffend, keine Variationsmöglichkeit offen lässt. Beim cbML3 liegen die Verbrückungen damit zwischen Cys5→Cys22, Cys16→Cys28 und Cys21→Cys35 (Abbildung 10). Bei der Lage der Intramolekularbrücken bildenden C-terminalen Cysteinreste gibt es Variationen: im Fall von cbML3 liegt die Verbrückung zwischen Cys39→Cys43 (Abbildung 10). Die antimikrobiellen Peptide von *Amaranthus caudatus* *Ac*-AMP1 und *Ac*-AMP2, z. B. besitzen keine vierte C-terminale intramolekulare Disulfidbrückenverknüpfung [113], während aus der Rinde von *Euonymus europaeus* L. ein kleines chitinbindendes Polypeptid mit einer Hevein-ähnlichen Domäne isoliert wurde, das insgesamt fünf intramolekulare Disulfidbrücken hat [117]. CbML1, cbML2 und cbML3 haben noch je einen neunten Cysteinrest an den Positionen 45 bzw. 45'. Diese sind verantwortlich für die Dimerbildung durch Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken, d. h. die cbML-Proteine sind die ersten sequenzierten chitinbindenden Lektine, deren Hevein-ähnliche Domänen kovalent miteinander verbunden



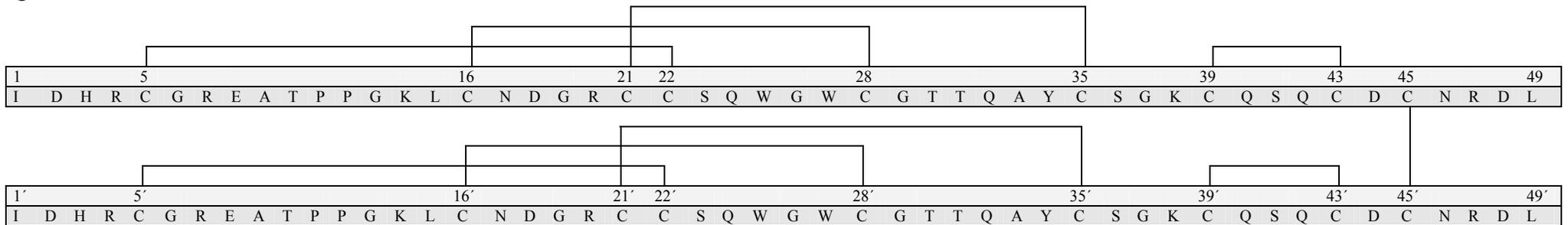
A



B



C

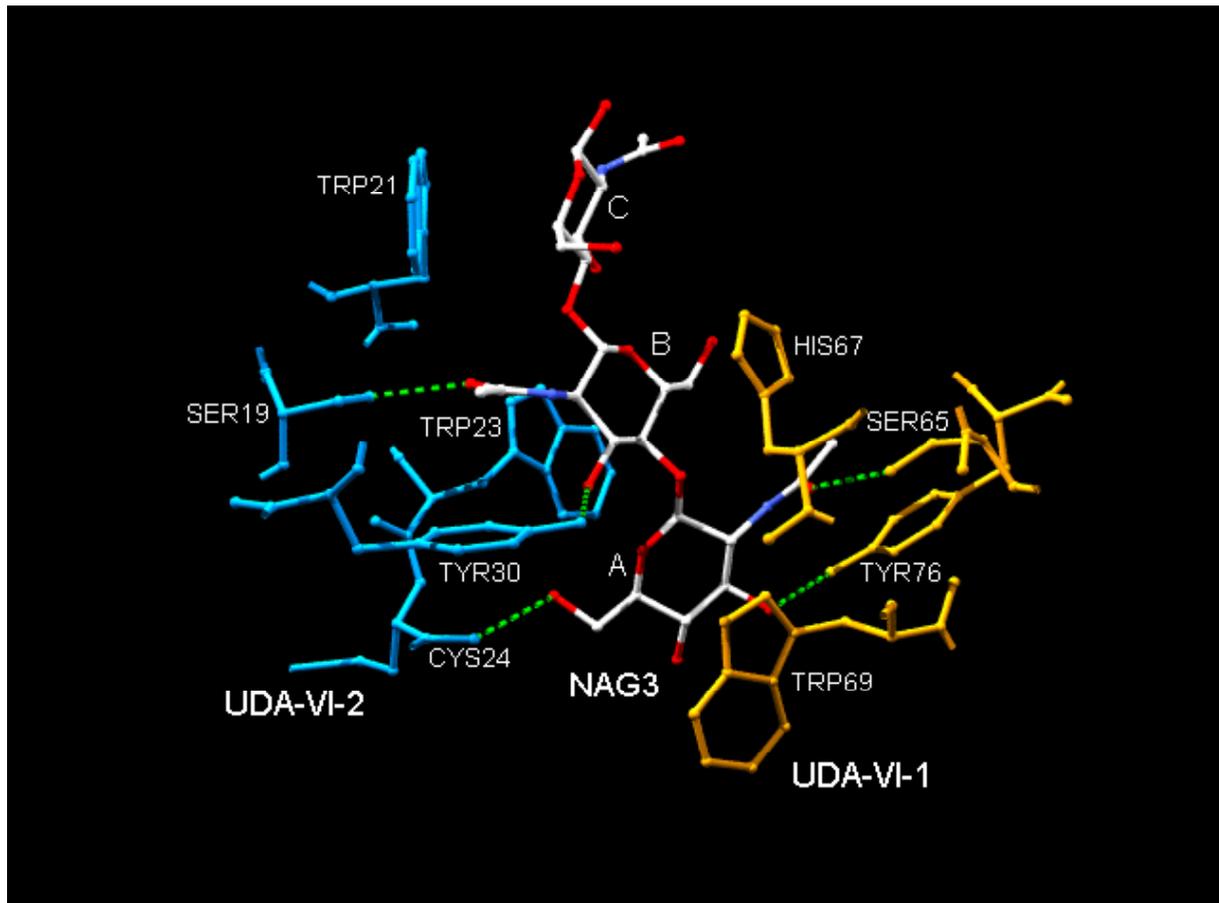


**Abb. 26. Primärstruktur von cbML1 (A), cbML2 (B) und cbML3 (C). Die postulierten Disulfidbrücken sind eingezeichnet.**



sind. Aufgrund der zahlreichen Disulfidbrücken haben chitinbindende Lektine mit Hevein-ähnlichen Domänen eine hohe Thermostabilität [47, 117, 153].

Chitin ist ein  $\beta(1\rightarrow4)$ -verknüpftes N-Acetylglukosaminpolymer, das, in Abhängigkeit von seiner Kettenlänge, unterschiedlich viele chitinbindende Proteinmoleküle hochaffin binden kann [154]. Beim Vergleich dreier Lektine mit Hevein-ähnlichen Domänen hinsichtlich ihrer Affinität zu Chitin konnte gezeigt werden, dass diese bei Peptiden mit verkürzten C-terminalen Domänen, wie z. B. bei den antimikrobiellen Peptiden aus *Amaranthus caudatus*, schwächer ist, als bei Lektinen mit einer vollständigen Bindedomäne mit vier Disulfidbrücken [155]. Ein entsprechendes Resultat findet man, wenn einer der aromatischen Aminosäurereste durch einen Alaninrest ersetzt wird. Bei Hevein und WGA bilden die Aminosäurereste Ser23, Trp25, Trp27 (im Fall von WGA: Phe) und Tyr34 (im Fall von WGA: Phe) (Tabelle 7) das Bindungszentrum, das spezifisch ist für N-Acetylneuraminsäure, N-Acetylglukosamin und N-Acetylglukosamin-enthaltene Kohlenhydrate [143-145]. Studien mit Kristallen eines Brennesselisolektins (UDA-VI), das zwei Hevein-ähnliche Domänen besitzt, im Komplex mit Tri-N-Acetylchitotriose (NAG3) bestätigen, dass die Triade aus den drei aromatischen Aminosäureresten wesentlich für die Zuckerbindung ist: die Tryptophanreste sind für die Positionsbestimmung und Orientierung der Pyranoseringe zuständig, während der Tyrosinrest den Sauerstoff der Hydroxylgruppe am C3 erkennt und zur Fixierung der Acetylgruppe des Zuckers beiträgt, zusammen mit dem Serinrest, der eine Wasserstoffbrücke zum Acetylsauerstoffatom ausbildet (Abb. 27) [156]. Die Wechselwirkungen zwischen der Acetylgruppe und den Aminosäureresten Serin und Tyrosin sind wesentlich für die Zuckerspezifität von UDA-VI und, mit großer Wahrscheinlichkeit, der meisten anderen chitinbindenden Proteine mit Hevein-ähnlichen Domänen, so auch der cbML-Proteine. Für die Aufklärung der Raumstruktur der chitinbindenden Mistellektine und deren Wechselwirkungen mit Zuckern sind jedoch Daten aus Röntgenstruktur- und NMR-Untersuchungen notwendig.



**Abb. 27. Struktur der Protein-Zucker-Wechselwirkung zwischen UDA-VI und NAG3 (Bindung eines Zuckermoleküls durch zwei Brennesselisolectine).** Die Aminosäurereste sind blau (UDA-VI-2) bzw. gelb (UDA-VI-1), das Grundgerüst des Zuckers ist weiß, die Sauerstoffatome sind rot, die Stickstoffatome der N-Acetylgruppen blau und die Zuckerreste, ausgehend vom nichtreduzierenden Ende, mit A, B und C gekennzeichnet. Die grünen unterbrochenen Linien stellen die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Lektinen und NAG3 dar [156].

#### 4.2. Quantifizierung der chitinbindenden Mistellektine in Mistelpräparaten und die Validierung dieser Methode

In einigen im Handel erhältlichen Mistelpräparaten wurden die chitinbindenden Mistellektine bereits nachgewiesen [96]. Dazu wurden diese zunächst mittels Affinitätschromatographie an gereinigtem Chitin im „Batch“-Verfahren isoliert und anschließend über MALDI MS und Glycin-SDS-Gelelektrophorese analysiert. Zur Quantifizierung wurde die Umkehrphasen-hochleistungsflüssigchromatographie (RP HPLC) eingesetzt. Um den cbML-Gehalt in nur 1-2 ml Extrakt genau zu bestimmen, wurde diese Analysenmethode, d. h. Isolierung der cbMLs über Mikroaffinitätschromatographie und anschließender Quantifizierung mittels RP HPLC weiterentwickelt und verbessert. Für die Analysen wurden Mistelextrakte der Abnoba Heilmittel GmbH von den Sorten Betulae (Wirtsbaum: Birke), Pini (Wirtsbaum: Fichte) und Fraxini (Wirtsbaum: Esche), jeweils Verdünnungsstufe 2, verwendet, da hier der cbML-

Gehalt, verglichen mit Iscador<sup>®</sup>-, Helixor<sup>®</sup>- und Eurixor<sup>®</sup>-Präparaten, am höchsten ist [96]. Abnobaviscum<sup>®</sup> Pini der Charge 912 ABU enthielt am meisten chitinbindende Mistellektine (ca. 4 µg/ml), gefolgt von der Sorte Betulae mit ungefähr 3 µg/ml (Charge 603 ABY und 903 B-L), während die cbML-Konzentration in Abnobaviscum<sup>®</sup> Fraxini der Charge 005 KLT relativ niedrig war (ca. 1 µg/ml). Weitere cbML-Gehaltsbestimmungen anderer Chargen sowohl derselben als auch anderer Sorten von Abnobaviscum<sup>®</sup>-Präparaten lieferten vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Pini-Extrakte enthalten am meisten chitinbindende Mistellektine, dicht gefolgt von Abnobaviscum<sup>®</sup> Betulae und Mali (Wirtsbaum: Apfel). In der Sorte Fraxini ist die cbML-Konzentration verhältnismäßig gering, d. h. verglichen mit Laubbaummisteln, ist der cbML-Gehalt in Nadelbaummisteln am höchsten, während es sich bei den Mistellektinen vom Typ II RIP genau umgekehrt verhält: hier ist der Gehalt an MLI-III in der Sorte Fraxini am höchsten und in der Sorte Pini am niedrigsten (mündliche Mitteilung von Dr. Rainer Scheer, Carl-Gustav-Carus-Institut, Niefern-Öschelbronn, Deutschland).

Bei der Isolierung der cbMLs wird vor der Inkubation der Extrakte mit dem Chitin dieses mit 0.5 M Natriumchloridlösung äquilibriert. Danach wird das Affinitätsmaterial mit einem 1.5 M Ammoniumacetatpuffer, pH 5.5, gewaschen, um unspezifisch gebundene Mistelkomponenten zu entfernen. Wird NaCl anstelle des Ammoniumacetats im Waschpuffer eingesetzt, so wird weniger als 10% der chitinbindenden Mistellektine im Eluat wiedergefunden (Daten nicht gezeigt). Verwendet man den Ammoniumacetat-Puffer sowohl zur Äquilibrierung als auch zum Waschen des Chitins vor der Elution, so hat dies keinen Einfluß auf die cbML-Ausbeuten, jedoch erhält man ein mit Viscotoxinen verunreinigtes cbML-Eluat (Daten nicht gezeigt). Offensichtlich verhindert der leicht saure Ammoniumacetatpuffer über eine Verstärkung der Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und den N-Acetylglukosamineinheiten des Chitins das Auswaschen der bereits gebundenen cbML-Proteine, gleichzeitig aber verstärkt er die unspezifische Bindung von Viscotoxinen. Bei einer Erniedrigung der Ammoniumacetatkonzentration im Waschpuffer von 1.5 M auf 0.5 M findet man ca. 11% weniger cbMLs im Eluat, während eine Reduktion auf 1.0 M oder eine Erhöhung auf 2.0 M Ammoniumacetat im Waschpuffer keine signifikanten Einflüsse auf die Ergebnisse hatten (Daten nicht gezeigt). Die Verwendung einer 0.5 M Natriumchloridlösung zur Äquilibrierung und eines 1.5 M Ammoniumacetatpuffers (pH 5.5) zur Spülung nach der Inkubation haben sich hinsichtlich der hohen Wiederfindungsraten der cbMLs bei gleichzeitig möglichst niedriger Verunreinigungen durch Viscotoxine bewährt. Dabei bleibt die Frage nach der genauen Funktion der Pufferionen und des pHs bei den Wechselwirkungen zwischen

Chitin und den spezifisch und unspezifisch gebundenen Proteinen offen. Deren Klärung wäre eine gute Voraussetzung für weitere Optimierungsschritte bezüglich Wahl der Ionenart, der Konzentrationen bzw. der Höhe des pH-Wertes.

Der bei der Quantifizierung mittels RP HPLC verwendete Acetonitrilgradient wurde so gewählt, dass die Isoformen in möglichst kurzen Abständen eluierten, d. h. auf eine Basislinientrennung wurde verzichtet und die cbML-Proteine zusammen erfaßt. Gleichzeitig eluierten eventuelle Verunreinigungen (Viscotoxine, Mistellektine vom Typ II RIP) mit deutlich anderen Retentionszeiten als die chitinbindenden Mistellektine (Daten nicht gezeigt). Methoden, die zur Quantifizierung von Komponenten in Arzneimitteln eingesetzt werden, müssen im Allgemeinen validiert werden. Darunter versteht man, den formalen und systematischen Beweis zu erbringen, dass die Analysenmethode die beabsichtigte Evaluation von Qualitätsmerkmalen des zu analysierenden Produkts mit angemessener und definierter Verlässlichkeit ermöglicht. Nachdem die Methode zur Isolierung und Quantifizierung kleinster Mengen der cbMLs in Mistelextrakten zunächst einem Systemeignungstest unterworfen worden war, erfolgte deren Validierung, basierend auf den aktuellen DIN- und ICH-Richtlinien für die „Validierung analytischer Methoden“ [133-134]. Dazu gehört die Bestimmung der Spezifität und der Robustheit der Analysenmethode, außerdem deren Überprüfung hinsichtlich ihrer Präzision und Richtigkeit. Des Weiteren wurde der lineare Bereich, die Nachweis- und Bestimmungsgrenze und der Arbeitsbereich bestimmt. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Computerprogramm VALIDAT 2000 (Version 2.020.0929) [132].

Die Spezifität einer Methode ist gewährleistet, wenn die zu analysierende Substanz auch in Gegenwart anderer Komponenten, z. B. von Proteinen, Kohlenhydraten, Matrixmolekülen usw., einwandfrei bestimmt werden kann. In diesem Fall wurde das Mistellektin I und die Viscotoxine hinsichtlich ihrer Eigenschaften als potentielle Störfaktoren bei der Quantifizierung der cbMLs in Mistelextrakten untersucht. MLI könnte aufgrund seiner Kohlenhydrataffinität während des ersten Chromatographieschritts einen Einfluß auf die quantitative Bindung der cbMLs haben. Die Viscotoxine findet man z. T. nach dem Affinitätschromatographieschritt als Verunreinigungen im cbML-Eluat wieder [96], d. h. auch bei diesen Proteinen treten unspezifische Wechselwirkungen zum Chitin auf. Trotzdem blieben die Ergebnisse der Analysenmethode nach Zugabe hoher Konzentrationen an MLI und Viscotoxinen zu den Extrakten unbeeinflusst, d. h. die Spezifität der Methode ist gegeben.

Im Allgemeinen wurden 6-12 Mikroisolierungen gleichzeitig angesetzt, d. h. am Ende des Affinitätschromatographieschritts lagen bis zu 12 Eluate vor, die nacheinander mittels RP HPLC analysiert wurden. Bis zu ihren Injektionen, die z. T. erst 2-3 Tage später erfolgten, wurden die Proben gekühlt gelagert. Dies setzt aber voraus, dass die cbML-Eluate während diesem Zeitraum stabil bleiben, d. h. dass die Methode robust ist. Die Untersuchungsergebnisse zeigten, dass erst nach zwei Wochen kühler Lagerung 10% weniger cbMLs detektiert werden, als bei RP HPLC-Analysen 0, einen oder 10 Tage nach der Mikroreinigung an Chitin. Der Grund für den Lektinverlust nach 14 Tagen liegt wahrscheinlich an der Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten, die ausfallen und bei der Zentrifugation des Eluats durch ein 0.22 µm Filter-Reaktionsgefäß zurückbleiben. Zusätzlich kommt es zu Wechselwirkungen zwischen den cbML-Aggregaten und der Kunststoffwand der Reaktionsgefäße.

Die Präzision einer Analysenmethode wird unterteilt in die Methoden- und Laborpräzision. Erstere demonstriert die hohe Übereinstimmung der Ergebnisse von mindestens sechs Analysen, die unter identischen Bedingungen mit denselben Extrakten durchgeführt werden. In diesem Fall wurden Mehrfachbestimmungen dreier verschiedener Extraktarten jeweils einer Charge durchgeführt. Dabei erhielt man nur im Fall von Betulae- und Pini-Extrakt Variationskoeffizienten, die weit unter der definierten Höchstgrenze von 6% blieben. Bei der Sorte Fraxini resultierte ein Variationskoeffizient, der auf die erste Stelle nach dem Komma gerundet bei 6.0% lag. Da in diesem Extrakt der cbML-Gehalt sehr niedrig war, fielen Abweichungen der Analysenwerte stärker ins Gewicht, was zu einem höheren Variationskoeffizienten führte. Bei der Bestimmung der Laborpräzision wurde gezeigt, dass die Ergebnisse der Analysen unabhängig vom Analytiker, dem Tag der Versuchsdurchführung und der Erneuerung sowohl des RP-Säulenmaterials als auch der Waschpuffer sind.

Die Linearität der Analysenmethode (0.6 bis 4.1 µg/ml cbML-Gehalt) und der Arbeitsbereich (1.2 bis 8.2 µg cbMLs) reichen aus, um den cbML-Gehalt in verschiedenen Mistelextrakten zu bestimmen. Statistische Berechnungen auf der Grundlage der Linearitätsergebnisse ergaben eine Bestimmungsgrenze von 0.46 µg/ml und eine Nachweisgrenze von 0.13 µg/ml. Für eine Erweiterung sowohl des linearen, als auch des Arbeitsbereichs, müsste die Kapazität des Affinitätsmaterials erhöht werden. Setzt man mengenmäßig mehr Chitin ein, so könnte zum einen mehr Lektin gebunden werden, außerdem erhöhen sich bei niedrigeren cbML-Konzentrationen die Wechselwirkungen zwischen Protein und Chitin, da pro Zeiteinheit mehr Zusammenstöße erfolgen. Dies könnte man auch dadurch erreichen, dass man die

Mikroisolierung im Säulen- anstelle im „Batch“-Verfahren durchführt. Die bereits erwähnten Pufferoptimierungen und längere Inkubationszeiten könnten zusätzlich die Affinität der cbMLs zum Chitin erhöhen.

Bei dem beschriebenen Analysenverfahren handelt es sich um eine spezifische und präzise Methode mit einer definierten Linearität und einer Wiederfindungsrate von über 90%, die den Anforderungen genügen. Damit ist die Richtigkeit der Methode zur Isolierung und Quantifizierung der chitinbindenden Mistellektine in Extrakten gewährleistet.

Diese Ergebnisse sind valide für die in Abschnitt 2.2.14.1 bis Abschnitt 2.2.14.3 beschriebene Analysenmethode, die Mistelextrakte der Abnoba Heilmittel GmbH und das Labor, in welchem die Tests durchgeführt wurden, d. h. bei Änderungen einer dieser Parameter muss erneut eine Validierung durchgeführt werden.

Der cbML-Gehalt, der mittels der beschriebenen Analysenmethode in Mistelpräparaten bestimmt werden kann, liegt in einem relativ engen Bereich, welcher durch die bereits beschriebenen Optimierungsmethoden nach oben und unten erweiterbar ist. Weitaus empfindlicher wären ELISA-Tests, bei denen die chitinbindenden Mistellektine ohne vorherigen Isolierungen direkt im Extrakt quantifiziert werden könnten.

#### **4.3. Wirkung der chitinbindenden Mistellektine auf das spezifische Immunsystem**

Zahlreiche Studien befassten sich mit den immunmodulatorischen Eigenschaften verschiedener Komponenten in Mistelextrakten, insbesondere der Mistellektine vom Typ II RIP und der Viscotoxine (Abschnitt 1.3 und Abschnitt 1.4). In dieser Arbeit wurde die Wirkung von cbML3 auf das spezifische Immunsystem von Tumorpatienten, die mit Mistelextrakten behandelt wurden, untersucht und mit MLI und MLIII verglichen. Von früheren Studien ist bekannt, dass letztere die Bildung von anti-MLI- und -MLIII-Antikörper vom IgG- und IgE-Typ hervorrufen [82, 157]. Es konnte nun gezeigt werden, dass cbML3 die anti-cbML3-Antikörperbildung induziert, insbesondere vom IgG-, in einem Fall auch vom IgE-Typ. Aufgrund der vernachlässigbaren strukturellen Unterschiede zwischen den drei chitinbindenden Mistellektinen kann von vergleichbaren antigenen Eigenschaften ausgegangen werden, während zwischen den cbMLs und den Mistellektinen vom Typ II RIP aufgrund der vollständig verschiedenen Strukturen keine Kreuzreaktivität zu erwarten ist. Dies wird bekräftigt durch die Tatsache, dass der Verlauf der Antikörperbildung gegen cbML3 nicht mit jener gegen MLI oder MLIII korrelierte, was gleichzeitig ein Indiz dafür ist, dass die HPLC-gereinigte cbML3-Fraktion frei war von Kontaminationen durch MLI- und MLIII-Epitope. Während anti-MLI- und -MLIII-Antikörper fast ausschließlich in Seren von

mit Mistelextrakten behandelten Patienten detektiert wurden, fand man bei ungefähr einem Drittel der Patienten bereits vor Beginn der Therapie anti-cbML3-Antikörper, obwohl sie noch nie mit Mistelpräparaten behandelt worden waren. Diese Personen müssten also eine Art „natürliche Immunität“ gegen chitinbindende Mistellektine haben. Der Grund könnte auch die hohe Sequenzhomologie dieser Lektine gegenüber Proteinen mit Hevein-ähnlicher Domäne sein, denn diese kommen z. T. ubiquitär vor, wie das Latexprotein Hevein oder Proteine aus Bananen- [158], Holunder- [138], Avocado- [159], Kastanien- [159], Kartoffel- [149], Reis- [146-147] und Brennnesselgewächsen [140]. Vorläufige Untersuchungen zeigten schließlich, dass anti-cbML3-Antikörper enthaltende Seren mit rekombinantem Hevein reagierten (mündliche Mitteilung von Dr. Monika Raulf-Heimsoth, Berufsgenossenschaftliches Forschungsinstitut für Arbeitsmedizin, Bochum, Deutschland), was die Annahme bekräftigt, dass die chitinbindenden Mistellektine ein „kreatives Epitop“ besitzen. Des Weiteren induzierte cbML3 verstärkt die Proliferation von Lymphocyten bei Personen, die nie zuvor mit Mistelextrakten in Berührung gekommen waren (Daten nicht gezeigt). Die „natürliche Immunität“ war jedoch weniger bei den gesunden (nur 5%), als vielmehr bei den kranken Probanden (31%) vorhanden. Um dieses Phänomen zu erklären bedarf es weiterer Studien.

Von den 18 Patienten, die vor Beginn der Misteltherapie anti-cbML3-negativ waren, entwickelten 54% Antikörper gegen das chitinbindende Mistellektin. Diese zeigten jedoch keine Kreuzreaktivität mit Hevein (Daten nicht gezeigt), d. h. dass die chitinbindenden Mistellektine mit hoher Wahrscheinlichkeit mindestens zwei verschiedene Epitope haben. Dabei wird das eine von natürlichen oder kreuzreagierenden Antikörpern erkannt, das andere Epitop induziert eine spezifische Immunreaktion, die nur im Zusammenhang mit einer Misteltherapie erfolgt. Mistelextrakte enthalten also Komponenten, deren hochkonservierte Epitope entweder durch das natürliche Immunsystem oder durch T- und B-Gedächtniszellen erkannt werden. In wie weit dies eine klinische und therapeutische Relevanz hat bleibt offen.

Im Unterschied zu den homologen Proteinen Hevein [160-161] und den Klasse I Chitinasen aus der Esskastanie und der Avocadofrucht [159], erfolgte durch cbML3 eine vernachlässigbar gering ausgeprägte Induktion von IgE-Antikörpern, obwohl für die allergenen Eigenschaften der zuerst genannten Proteine die Hevein-Domäne verantwortlich gemacht wird. Als potentielle Antigene, die nur in seltenen Fällen zu einer Induktion von IgE-Antikörpern führen, könnten die cbMLs verantwortlich sein für die in einzelnen Fällen auftretenden allergischen Nebenreaktionen bei der Anwendung von Mistelpräparaten [162].

#### 4.4. Biologische Aktivitäten der chitinbindenden Mistellektine

Viele Pflanzen enthalten kleine cystein- und glycinreiche Proteine mit antimikrobiellen Eigenschaften, die sie vor phytophathogenen Organismen schützen. Thionine [163], Pflanzen„defensins“ [164-165] und Lektine [94, 112, 115, 166-167] gehören zu diesen antimikrobiellen Proteinen. Von vielen chitinbindenden Lektinen mit Hevein-ähnlichen Domänen sind antifungale Eigenschaften bekannt. Aufgrund der hohen Homologie zu diesen Lektinen, wurden die cbMLs hinsichtlich einer solchen Wirkung untersucht. Bei drei von insgesamt fünf getesteten Pilzarten erfolgte eine Inhibition des Wachstums durch die chitinbindenden Mistellektine. Dabei resultierten  $IC_{50}$ -Werte zwischen 3.5 und 20  $\mu\text{g/ml}$ , d. h. sie lagen im Bereich der Ergebnisse, die man für die antifungalen Aktivitäten der chitinbindenden Proteine aus *Amaranthus caudatus* (*Ac*-AMPs), *Pharbitis nil* L. (*Pn*-AMPs) und *Euonymus europaeus* L. (*Ee*-CBP) erhielt [113, 116-117]. *Saccharomyces cerevisiae* wurde von den cbMLs sogar um mehr als das doppelte stärker inhibiert als von den *Pn*-AMPs. Gegenüber Hevein haben die cbMLs eine bis zu 300fach höhere antifungale Aktivität [112]. Auch UDA [168] und SN-HLPf [138] zeigen eine schwächere Inhibition gegenüber Pilzen. Exakte Vergleiche zwischen den verschiedenen chitinbindenden Proteine hinsichtlich ihrer antifungalen Wirkung sind jedoch nicht immer möglich, da die Analysen mit z. T. unterschiedlichen Pilzarten gemacht wurden, auch wenn die meisten getesteten Organismen chitinhaltige Zellwände haben. Außerdem können Unterschiede sowohl bei den Versuchsdurchführungen, als auch bei den Isolierungsverfahren für diese Effekte verantwortlich sein. Obwohl *Candida sake* und *Tremella foliacea* Chitin enthalten, fand man unter den getesteten cbML-Konzentrationen keine Wachstumsinhibition. Um jedoch endgültige Aussagen hinsichtlich einer antifungalen Wirkung gegenüber diesen Pilze machen zu können, müsste man weitere Tests durchführen, bei denen die Lektinkonzentrationen noch höher liegen. Die spezifischen Aktivitäten sowohl der *Ac*-AMPs, der *Pn*-AMPs als auch von *Ee*-CBP werden durch Kationen inhibiert [113, 116-117]. Eine  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration von nur 1 mM im Medium bewirkte schon eine 5-6fach geringere antifungale Aktivität, während der antagonistische Effekt bei Kaliumionen schwächer ausgeprägt ist. In diesem Fall erhöhte KCl erst bei einer Konzentration von 50 mM die  $IC_{50}$ -Werte auf das Dreifache [113]. Im modifizierten Moser B-Medium liegt die  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration bei ca. 0.6 mM und der Gehalt an Kaliumionen beträgt ungefähr 4.2 mM, d. h. die Verringerung der Ionenkonzentration könnte die Aktivität der cbML-Proteine erhöhen, vorausgesetzt die Aktivität der Mistellektine wird ebenfalls durch Kationen inhibiert, was noch zu untersuchen bleibt. Die antifungalen Aktivitäten der *Ac*-AMPs, der *Pn*-AMPs und des *Ee*-CBP werden nach einer zehnmütigen

Hitzebehandlung bei 100°C zerstört [113, 116-117], während bei Hevein die maximale Temperatur bei nur 90°C liegen darf, ohne dass es zu einem Aktivitätsverlust kommt [112]. Wie bereits erwähnt, ist die hohe Hitzebeständigkeit auf die vielen konservierten Disulfidbrücken der relativ kleinen Proteine zurückzuführen. Diese sind überhaupt Voraussetzung für die antifungale Wirkung der Proteine: Pn-AMPs und Ac-AMPs verlieren ihre Aktivität nach Behandlung mit reduzierenden Reagenzien [113, 116]. Geringe Unterschiede findet man hingegen in der pH-Beständigkeit der chitinbindenden Lektine. Während die Proteine aus *Pharbitis nil* L. ihre antifungale Wirkung verlieren, nachdem sie einem pH von 2 ausgesetzt worden waren [116], hatte der geringe pH-Wert keine Auswirkung auf die Aktivität der Ac-AMPs [113]. Ee-CBP ist zwischen pH 2 und pH 11 stabil [117], und für das chitinbindende Lektin der Mistel wird eine pH-Stabilität von 1-12 angegeben [47]. Für die Bestimmung der Wiederfindungsrate der cbML-Proteine nach deren Mikroreinigung aus Abnobaviscum<sup>®</sup>-Extrakten wurde diesen zuvor eine genau definierte Menge cbML-Standard zugesetzt (vgl. Abschnitt 2.2.14.5). Obwohl dieser bei hoher TFA-Konzentration HPLC-gereinigt, d. h. einem pH von 2.4 ausgesetzt wurde, erhält man Wiederfindungsraten, die zwischen 90 und 100% liegen (vgl. Abschnitt 3.3). Daraus lässt sich folgern, dass der niedrige pH-Wert die Bindungsaffinität der chitinbindenden Mistellektine zu Chitin wenn überhaupt, dann nur geringfügig beeinflusste. Da aber keine genaueren Daten über die pH-Stabilität vorliegen, weder von VisalbcBA noch von den cbMLs, wurde für die Bestimmung der antifungalen Aktivität cbML-Lyophilisat, das bei niedriger TFA-Konzentration HPLC-gereinigt worden war (Abschnitt 2.2.4.2), eingesetzt, d. h. es lag ein Isoformengemisch vor, das aus ca. 1-2 % cbML1, 14-20 % cbML2 und 80-84 % cbML3 bestand. Die chitinbindenden Mistellektine werden bei dieser Reinigungsmethode einem pH von ca. 3.2 ausgesetzt. Aufgrund der vernachlässigbaren Sequenzunterschiede von cbML1, cbML2 und cbML3 sollte kein Unterschied der cbML-Isoformen hinsichtlich ihrer Bioaktivitäten zu erwarten sein. Andererseits zeigten die beiden Peptide aus *Pharbitis nil* L. deutliche Unterschiede in ihren IC<sub>50</sub>-Werten, obwohl Pn-AMP1, verglichen mit Pn-AMP2, nur einen zusätzlichen Serinrest am C-Terminus hat bei ansonsten identischer Sequenzfolge [116]. Bei den Peptiden aus *Amaranthus caudatus* findet man wiederum ähnlich ausgeprägte antifungale Wirkungen. Ac-AMP1 und Ac-AMP2 unterscheiden sich nur um einen zusätzlichen Argininrest am C-Terminus [113]. Ob nun der zusätzliche Leucinrest, der die drei cbML-Isoformen voneinander unterscheidet, einen Einfluß auf die Stärke der antifungalen Aktivitäten der einzelnen Proteine hat, bleibt ebenfalls zu untersuchen.

Antifungale Pflanzenproteine haben unterschiedliche Wirkungsweisen. Die meisten chitinbindenden Proteine mit fehlender Enzymaktivität, wie z. B. das Hevein, treten mit den Zellwänden der Pilzhyphen in Wechselwirkung, indem sie z. B. an neu entstandene Chitinketten binden bzw. diese vernetzen und so die Organismen am Wachstum hindern [112]. Thionine - kleine stark basische Proteine mit zahlreichen Cysteinresten - wiederum führen zur Permeabilisierung von Zellmembranen, was zum Austritt von Zellplasma und schließlich dem Tod der Organismen führt [169]. Eine derartige Wirkung zeigen auch die Pn-AMPs, obwohl sie eigentlich der Gruppe der antifungalen Lektine mit Hevein-ähnlicher Domäne ohne enzymatischer Aktivität zuzuordnen sind [116]. Wahrscheinlich haben die chitinbindenden Mistellektine eine dem Hevein vergleichbare Wirkung, die auf einer Behinderung des Zellwachstums durch physikalische Wechselwirkungen mit den Pilzhyphen beruht, obwohl eine Zerstörung der Membranen, wie sie durch die Proteine aus *Pharbitis nil* L. verursacht wird, nicht ausgeschlossen ist.

*In vitro* demonstrierten die cbML-Proteine ihre Eigenschaften als potente Inhibitoren auf das Wachstum von Pilzen. *In vivo* besteht ihre mögliche Funktion in der Abwehr von phytophathogenen fungalen Organismen.

Eine schwache Hämagglutininierung der bei niedriger TFA-Konzentration HPLC-gereinigten cbML-Proteine findet man erst nach Sensibilisierung des Bluts mit Papain, obwohl eine relative starke Aktivität beschrieben wurde [47]. Wahrscheinlich ist diese auf Verunreinigungen durch die stark hämagglutinierenden Mistellektine I, II und III in der VisalbcBA-Fraktion zurückzuführen. Unter den zu den cbMLs homologen Proteinen findet man beim Hevein und dem Hevein-ähnlichen Fruchtprotein der Holunderbeere (SN-HLPf) im Unterschied zu den Lektinen UDA und WGA, ebenfalls keine hämagglutinierende Aktivität [112, 138]. Letztere enthalten mindestens zwei, Hevein und SN-HLPf nur jeweils eine Zuckerbindestellen pro Molekül. Bei der Hämagglutininierung von Erythrocyten kommt es zu deren Vernetzung, indem die Lektine an die kohlenhydrathaltigen Oberflächenantigene binden. Dazu sind mindestens zwei Kohlenhydratbindestellen erforderlich. Diese Voraussetzung erfüllen auch die chitinbindenden Mistellektine mit jeweils einer Zuckerbindestelle pro Monomer. Trotzdem hämagglutinieren sie erst in relativ hohen Konzentrationen humanes Blut, das zuvor sensibilisiert werden muß. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich in der geringen Spezifität der cbMLs gegenüber den endständigen, leicht zugänglichen Zuckern der Kohlenhydratstrukturen an den Erythrocytenoberflächen [96].

Mistelextrakte stimulieren in Gegenwart von Glukose die Insulinausschüttung klonaler Pankreaszellen vom Typ B [110]. Die Eigenschaft geht auch nach dem Erhitzen dieser

---

Extrakte auf 95°C nicht verloren. Die Mistellektine I, II und III verlieren bei solchen Temperaturen zum großen Teil ihre biologischen Aktivitäten, während diese bei chitinbindenden Lektinen mit Hevein-ähnlichen Domänen erhalten bleiben. Hier liegt ein Ansatzpunkt für Untersuchungen hinsichtlich weiterer biologischer Aktivitäten von cbML1, cbML2 und cbML3 in Form einer Stimulation von insulinproduzierenden Zellen bei diabetischen Patienten.

## 5. Zusammenfassung

Mistelpräparate werden vor allem in der adjuvanten Onkologie eingesetzt, d. h. zusätzlich zu Chemo- und Strahlentherapien. Aufgrund ihrer immunstimulierenden und schmerzlindernden Wirkung verbessern die Extrakte das Allgemeinbefinden und damit die Lebensqualität der Patienten. Zahlreiche Mistelkomponenten wurden bereits isoliert und charakterisiert. Insbesondere den Mistellektinen aus der Familie der Typ II Ribosomen-inaktivierenden Proteine (MLI, MLII und MLIII) gilt, aufgrund ihrer immunmodulatorischen und cytotoxischen Eigenschaften, seit Jahrzehnten großes Interesse.

Vor wenigen Jahren wurde ein weiteres Lektin aus der Weißen Mistel (*Viscum album* L.) isoliert, das zu den chitinbindenden Proteinen mit Hevein-ähnlichen Domänen homolog ist. Weitere Untersuchungen zeigten, dass es mindestens drei Isoformen der chitinbindenden Mistellektine gibt: cbML1, cbML2 und cbML3. Deren Isolierung erfolgt mittels Affinitätschromatographie an Chitin und anschließender Umkehrphasenhochleistungsflüssigchromatographie (RP HPLC), wobei die drei Isoformen am Ende in hochreiner Form getrennt voneinander vorliegen. Die Bestimmung der Primärstruktur der cbML-Proteine erfolgte mittels N-terminaler schrittweiser Sequenzierung nach Edman in Kombination mit MALDI MS-Analysen. Die Lektine bestehen aus jeweils zwei Polypeptidketten von 48 bzw. 49 Aminosäureresten, die über eine intermolekulare Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind. Die Sequenzen der Monomere sind bis zur 48. Aminosäure identisch und enthalten jeweils neun Cystein- und sechs Glycinreste und außerdem vier intramolekulare Disulfidbrücken. Der zusätzliche Aminosäurerest an Position 49 der längeren Polypeptidketten ist ein Leucinrest. CbML1 besteht aus zwei verkürzten Ketten, während cbML3 aus zwei Monomeren von je 49 Aminosäuren aufgebaut ist. CbML2 enthält eine verkürzte und eine vollständige Polypeptidkette. Die chitinbindenden Proteine zeigen eine 55%ige Sequenzhomologie zu dem Latexprotein Hevein aus *Hevea brasiliensis*, das aus einer Proteinkette mit 43 Aminosäureresten aufgebaut ist. Auf der Grundlage von NMR- und Röntgenstrukturdaten von Hevein wurde ein dreidimensionales Modell eines cbML3-Monomers erstellt, wobei die Austausch von 26 Aminosäureresten wenig Auswirkung auf die Faltung der Kette hat. Die hochaffine Zuckerbindungsstelle ist stark konserviert. Unterschiede findet man in der Schleifenregion und in dem Bereich, der für die Dimerbildung der cbML-Proteine verantwortlich ist.

Einige pharmazeutische Mistelpräparate enthalten, in Abhängigkeit von der Art ihrer Herstellung, chitinbindende Mistellektine im Nano- bis Mikrogrammbereich. Es wurde nun

eine Methode etabliert, mit der kleine Mengen cbMLs aus Mistellextrakten durch Mikroaffinitätschromatographie im „Batch“-Verfahren isoliert und anschließend mittels RP HPLC quantifiziert werden können. Gemäß den ICH-Richtlinien wurde eine Validierung dieses Verfahrens durchgeführt, und es wurde gezeigt, dass Spezifität, Robustheit und Präzision gewährleistet sind. Die Linearität dieser Analysenmethode liegt im Bereich von 0.6 bis 4.1 µg/ml cbML-Gehalt in den Extrakten, dabei beträgt die Wiederfindungsrate zwischen 94 und 100%. Aufgrund der Ergebnisse zur Spezifität, Präzision und Wiederfindung ist die Richtigkeit der Methode ebenfalls gewährleistet. Was den Arbeitsbereich der Analysenmethode betrifft, so können minimal 1.2 µg und maximal 8.2 µg cbMLs mit dem Affinitätsmaterial (gereinigtes Chitin) inkubiert werden. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen liegen bei 0.13 bzw. 0.46 µg/ml cbMLs. Die Durchführung der Validierung erfolgte mit drei verschiedenen Sorten von Mistelpräparaten (Betulae, Pini und Fraxini, jeweils Verdünnungsstufe 2) der Abnoba Heilmittel GmbH.

Mistellextrakte haben *in vitro* und *in vivo* immunmodulatorische Eigenschaften, die vor allem auf die Mistellektine I, II und III, aber auch auf die Viscotoxine und Polysaccharide zurückgeführt werden. Untersuchungen hinsichtlich einer Wirkung der chitinbindenden Mistellektine auf die Aktivität von B-Zellen zeigten, dass diese anti-cbML-Antikörper produzieren. Seren von Tumorpatienten, die über mehrere Wochen mit Mistellextrakten behandelt wurden, wurden vor und während der Therapie hinsichtlich ihrer Antikörper (AK) gegen cbML3, MLI und MLIII mittels ELISA untersucht. Von den getesteten Patienten hatten 31% bereits vor Beginn der Mistelbehandlung anti-cbML3-Antikörper vom IgG-Typ, während nur 15 bzw. 4% anti-MLI- und -MLIII-Antikörper aufwiesen. Von den anti-cbML3-negativ-Patienten entwickelten 54% Antikörper gegen das chitinbindende Mistellektin im Verlauf der Therapie, wobei der Antikörpertiter signifikant anstieg. Am Ende der 31. Behandlungswoche wurden bei 100 bzw. 86% der Tumorerkrankten anti-MLI- und -MLIII-Antikörper detektiert. Die chitinbindenden Mistellektine induzieren damit anti-cbML-Antikörper vom IgG-Typ, jedoch mit geringerer Antigenität als die Typ II Ribosomen-inaktivierenden Proteine der Mistel.

Die Tatsache, dass bereits ein Drittel der Tumorpatienten anti-cbML3-Antikörper vor jeglichem Kontakt mit Mistellextrakten hatte, weist auf die Existenz einer „natürlichen Immunität“ hin. Die Antikörper könnten auch durch kreuzreagierende Substanzen, die ubiquitär vorkommen, z. B. Hevein, induziert worden sein.

Die Induktion von IgE-Antikörpern erfolgte im Fall von cbML3 bei nur einem, im Fall von MLI und MLIII bei 7 bzw. 4 von 26 Patienten.

Viele chitinbindende Proteine mit Hevein-ähnlichen Domänen haben antifungale Eigenschaften. Um eine vergleichbare Aktivität der cbML-Proteine zu überprüfen, wurden diese in verschiedenen Konzentrationen mit fünf chitinhaltigen Pilzarten inkubiert. Bei *Tremella foliacea* und *Candida sake* erfolgte keine Wachstumsinhibition unter den getesteten cbML-Konzentrationen von maximal 150 bzw. 300 µg/ml, während bei den anderen drei Pilzarten eine deutliche antifungale Wirkung der chitinbindenden Mistellektine zu erkennen war. Die IC<sub>50</sub>-Werte von 3.5 µg/ml bei *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), 14 µg/ml bei *Microstroma juglandis* (Mj) und 20 µg/ml bei *Debaryomyces hanessii* (Dh) liegen im Bereich jener, die für die antifungalen Proteine aus *Amaranthus caudatus* (Ac-AMPs), *Pharbitis nil* L. (Pn-AMPs) und *Euonymus europaeus* L. (Ee-CBP) erhalten wurden.

---

## 6. Literatur

- [1] Luther, P. und Becker, H., Die Mistel: Botanik, Lektine, medizinische Anwendung. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1987).
- [2] Becker, H., Botany of European mistletoe (*Viscum album* L.). *Oncology*, **43** (Suppl. 1), 2-7 (1986).
- [3] Herder-Lexikon der Biologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford (1994).
- [4] Park, W. B., Ju, Y. J. und Han, S. K., Isolation and characterization of  $\beta$ -galactoside specific lectin from Korean mistletoe (*Viscum album* var. *coloratum*) with lactose-BSA-Sepharose 4B and changes of lectin conformation. *Arch. Pharm. Res.*, **21** (4), 429-435 (1998).
- [5] Lee, H. S., Kim, Y. S., Kim, S. B., Choi, B. E., Woo, B. H. und Lee, K. C., Isolation and characterization of biologically active lectin from Korean mistletoe, *Viscum album* var. *Coloratum*. *Cell. Mol. Life Sci.*, **55**, 679-682 (1999).
- [6] Park, C.-H., Lee, D.-W., Kang, T.-B., Lee, K.-H., Yoon, T.-J., Kim, J.-B., Do, M.-S. und Song, S.-K., cDNA cloning and sequence analysis of the lectin genes of the Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*). *Mol. Cells*, **12** (2), 215-220 (2001).
- [7] Bock, H., Kreütterbuch, Straßburg (1565).
- [8] Gauthier, R., Recherches sur le rôle de la tension arterielle dans la production de l'atherome experimental par l'étude de l'action simultanée de l'adrénaline, substance hypertensive, et de l'extrait „aqueux de gui”, substance hypotensive. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **64**, 1159 (1908).
- [9] Steiner, R., Geisteswissenschaft und Medizin, Phil. Anthr. Verlag, Dornach (1920).
- [10] Matthiessen, P. F. und Tröger, W., Die Misteltherapie des Krebses in: Kombinierte Tumorthherapie. Hrsg.: Wrba, H., 2. Auflage, Hippokrates Verlag Stuttgart (1995).
- [11] Vester, F. und Mai, W., Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe von *Viscum album*, I Freie Aminosäuren. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **322**, 273-277 (1960).
- [12] Becker, H. und Exner, J., Vergleichende Untersuchungen von Misteln verschiedener Wirtsbäume an Hand der Flavonoide und Phenolcarbonsäuren. *Z. Pflanzenphysiol.*, **97**, 417-428 (1980).

- [13] Sakurai, A. und Okumura, Y., Chemical studies on the mistletoe. I. The constituents of *Viscum album* Linn. var. *coloratum* Ohwi epiphyting to *Celtis sinensis* Pers. var. *japonica* Nakai. Reports of Faculty of Science, Shizuoka University, **6**, 63-69 (1971).
- [14] Wagner, H., Feil, B. und Blatt, S., *Viscum album* - die Mistel. Analyse und Standardisierung von Arzneidrogen und Phytopräparaten durch Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und andere chromatographische Verfahren (III). Dtsch. Apoth. Ztg., **124**, 1429-1432 (1984).
- [15] Fischer, S., Scheffler, A. und Kabelitz, D., Oligoclonal in vitro response of CD4 T cells to vesicles of mistletoe extracts in mistletoe-treated cancer patients. Cancer Immunol. Immunother., **44**, 150-156 (1997).
- [16] Jordan, E. und Wagner, H., Structure and properties of polysaccharides from *Viscum album* (L.). Oncology, **43** (Suppl. 1), 8-15 (1986).
- [17] Stein, G. M., Edlund, U., Pfüller, U., Büssing, A. und Schietzel, M., Influence of polysaccharides from *Viscum album* L. on human lymphocytes, monocytes and granulocytes *in vitro*. Anticancer Res., **19**, 3907-3914 (1999).
- [18] Klett, C. Y. und Anderer, F. A., Activation of natural killer cell cytotoxicity of human blood monocytes by a low molecular weight component from *Viscum album* extract. Arzneim.-Forsch./Drug Res., **39**, 1580-1585 (1989).
- [19] Müller, E. A. und Anderer, F. A., A *Viscum album* oligosaccharide activating human natural cytotoxicity is an interferon  $\gamma$  inducer. Cancer Immunol. Immunother., **32**, 221-227 (1990).
- [20] Orru, S., Scaloni, A., Giannattasio, M., Urech, K., Pucci, P. und Schaller G., Amino acid sequence, S-S bridge arrangement and distribution in plant tissues of thionins from *Viscum album*. Biol. Chem., **378**, 989-996 (1997).
- [21] Samuelsson, G. und Pettersson, B. M., The amino acid sequence of viscotoxin B from the European mistletoe (*Viscum album* L, Loranthaceae). Eur. J. Biochem., **21**, 86-89 (1971).
- [22] Samuelsson, G., Seger, L. und Olson, T., The amino acid sequence of oxidized viscotoxin A3 from the European mistletoe (*Viscum album* L, Loranthaceae). Acta Chem. Scand., **22**, 2624-2642 (1968).
- [23] Olson, T. und Samuelsson, G., The amino acid sequence of viscotoxin A2 from the European mistletoe (*Viscum album* L., Loranthaceae). Acta Chem. Scand., **26**, 585-595 (1972).

- 
- [24] Schrader, G. und Apel, K., Isolation and characterization of cDNAs encoding viscotoxins of mistletoe (*Viscum album*). Eur. J. Biochem., **198**, 549-553 (1991).
- [25] Samuelsson, G. und Jayawardene, A. L., Isolation and characterization of viscotoxin 1-PS from *Viscum album*. Acta Pharm. Suec., **11**, 175-184 (1974).
- [26] Romagnoli, S., Ugolini, R., Focolari, F., Schaller, G., Urech, K., Giannattasio, M., ragona, L. und Molinari, H., NMR structural determination of viscotoxin A3 from *Viscum album* L. Biochem. J., **350**, 569-577 (2000).
- [27] Büssing, A., Wagner, M., Wagner, B., Stein, G.M., Schietzel, M., Schaller, G. und Pfüller, U., Induction of mitochondrial Apo2.7 molecules and generation of reactive oxygen-intermediates in cultured lymphocytes by the toxic proteins from *Viscum album* L. Cancer Lett., **139**, 79-88 (1999).
- [28] Büssing, A., Stein, G. M., Wagner, M., Wagner, B., Schaller, G., Pfüller, U. und Schietzel, M., Accidental cell death and generation of reactive oxygen intermediates in human lymphocytes induced by thionins from *Viscum album* L. Eur. J. Biochem., **262**, 79-87 (1999).
- [29] Büssing, A., Schaller, G. und Pfüller, U., Generation of reactive oxygen intermediates (ROI) by the thionins from *Viscum album* L. Anticancer Res., **18**, 4291-4296 (1998).
- [30] Stein, G. M., Schaller, G., Pfüller, U., Wagner, M., Wagner, B., Schietzel, M. und Büssing, A., Characterisation of granulocyte stimulation by thionins from European mistletoe and from wheat. Biochim. Biophys. Acta, **1426**, 80-90 (1999).
- [31] Stein, G. M., Schaller, G., Pfüller, U., Schietzel, M. und Büssing, A., Thionins from *Viscum album* L: influence of the viscotoxins on the activation of granulocytes. Anticancer Res., **19**, 1037-1042 (1999).
- [32] Tabiasco, J., Pont, F., Fournié, J.-J. und Vercellone, A., Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity. Eur. J. Biochem., **269**, 2591-2600 (2002).
- [33] Klein, R., Claßen, K., Berg, P. A., Lüdtker, R., Werner, M. und Huber, R., In vivo-induction of antibodies to mistletoe lectin-1 and viscotoxin by exposure to aqueous mistletoe extracts: a randomised double-blinded placebo controlled phase I study in healthy individuals. Eur. J. Med. Res., **7**, 155-163 (2002).
- [34] Klein, R., Claßen, K., Fischer, S., Errenst, M., Scheffler, A., Stein, G. M., Scheer, R. und von Laue, H. B., Induction of antibodies to viscotoxins A1, A2, A3 and B in tumour patients during therapy with an aqueous mistletoe extract. Eur. J. Med. Res., **7**, 359-367 (2002).

- [35] Woynarowski, J. M. und Konopa, J., Interaction between DNA and viscotoxins. Cytotoxic basic polypeptides from *Viscum album* L. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., **361**, 1535-1545 (1980).
- [36] Stillmark, H., Über Ricin. Arb. Pharmakol. Inst. Dorpat, **3**, 59-64 (1889).
- [37] Krüpe, M., Blutgruppenspezifische pflanzliche Eiweißkörper (Phytoagglutinine). Enke, Stuttgart (1956).
- [38] Vester, F., Seel, A., Stoll, M. und Müller, J. M., Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe von *Viscum album*, III Isolierung und Reinigung cancerostatischer Proteinfractionen. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., **349**, 125-147 (1968).
- [39] Franz, H., Haustein, B., Luther, P., Kuropka, U. und Kindt, A., Isolierung und Charakterisierung von Inhaltsstoffen der Mistel (*Viscum album* L.), I. Affinitätschromatographie von Mistelrohextrakt an fixierten Plasmaproteinen. Acta biol. Med. Germ., **36**, 113-117 (1977).
- [40] Franz, H., Ziska, P. und Kindt, A., Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album* L.). Biochem. J., **195**, 481-484 (1981).
- [41] Dietrich, J. B., Ribéreau-Gayon, G., Jung, M. L., Franz, H., Beck, J. P. und Anton, R., Identity of the N-terminal sequences of the three A chains of mistletoe (*Viscum album* L.) lectins: homology with ricin-like plant toxins and single-chain ribosome-inhibiting proteins. Anti-Cancer Drugs, **3**, 507-511 (1992).
- [42] Barbieri, L., Battelli, M. G. und Stirpe, F., Ribosome-inactivating proteins from plants. Biochim. Biophys. Acta, **1154**, 237-282 (1993).
- [43] Stirpe, F., Legg, R. F., Onyon, L. J., Ziska, P. und Franz, H., Inhibition of protein synthesis by a toxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe). Biochem. J., **190**, 843-845 (1980).
- [44] Franz, H., Kindt, A., Ziska, P., Bielka, H., Benndorf, R. und Venker, L., The toxic A-chain of mistletoe lectin I: Isolation and its effect on cell-free protein synthesis. Acta biol. med. germ., **41**, K9-K16 (1982).
- [45] Endo, Y., Tsurugi, K. und Franz, H., The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes. The RNA N-glycosidase activity of the protein. FEBS Lett., **231**, 378-380 (1988).
- [46] Eifler, R., Pfüller, K., Göckeritz, W. und Pfüller, U., Improved procedures for isolation of mistletoe lectins and their subunits: lectin pattern of the european mistletoe in:

---

Basu, J., Kundu, M. und Chakrabarti, P. (Eds.), Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry. Wiley Eastern Ltd., **9**, 144-151 (1993).

[47] Peumans, W. J., Verhaert, P., Pfüller, U. und Van Damme, E. J. M., Isolation and partial characterization of a small chitin-binding lectin from mistletoe (*Viscum album*). FEBS Lett., **396**, 261–265 (1996).

[48] Soler, M. H., Stoeva, S., Schwamborn, C., Wilhelm, S., Stiefel, T. und Voelter, W., Complete amino acid sequence of the A chain of mistletoe lectin I. FEBS Lett. **399**, 153-157 (1996).

[49] Soler, M. H., Stoeva, S. und Voelter, W., Complete amino acid sequence of the B chain of mistletoe lectin I. Biochem. Biophys. Res. Commun. **246**, 596-601 (1998).

[50] Eck, J., Langer, M., Möckel, B., Baur, A., Rothe, M., Zinke, H. und Lentzen, H., Cloning of the mistletoe lectin gene and characterization of the recombinant A-chain. Eur. J. Biochem., **264**, 775-784 (1999).

[51] Halling, K. C., Halling, A. C., Murray, E. E., Ladin, B. F., Houston, L. L. und Weaver, R. F., Genomic cloning and characterization of a ricin gene from *Ricinus communis*. Nucleic Acid Res., **13**, 8019-8033 (1985).

[52] Montford, W., Villafranca, J.E., Monzingo, A. F., Ernst, S. R., Katzin, B., Rutenber, E., Xuong, N. H., Hamlin, R. und Robertus, J.D., The three-dimensional structure of ricin at 2.8 Å. J. Biol. Chem., **262**, 5398-5403 (1987).

[53] Rutenber, E., Katzin, B. J., Ernst, S., Collins, E. J., Mlsna, D., Ready, M. P. und Robertus, J. D., Crystallographic refinement of ricin to 2.5 Å. Proteins: Structure, Function, and Genetics, **10**, 240-250 (1991).

[54] Eschenburg, S., Krauspenhaar, R., Mikhailov, A., Stoeva, S., Betzel, C. und Voelter, W., Primary structure and molecular modeling of mistletoe lectin I from *Viscum album*. Biochem. Biophys. Res. Commun., **247**, 367-372 (1998).

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

[56] Stoeva, S., Maier, T., Soler, M. H. und Voelter, W., Carbohydrate chains and their binding sites in mistletoe lectin I. Polish J. Chem., **73**, 125-133 (1999).

- [57] Debray, H., Wieruszeski, J.-M., Strecker, G. und Franz, H., Structural analysis of the carbohydrate chains isolated from mistletoe (*Viscum album*) lectin I. Carbohydr. Res., **236**, 135-143 (1992).
- [58] Luther, P., Theise, H., Chatterjee, B., Karduck, D. und Uhlenbruck, G., The lectin from *Viscum album* L. – isolation, characterization, properties and structure. Int. J. Biochem., **11**, 429-435 (1980).
- [59] Ziska, P. und Franz, H., Studies on the interaction of the mistletoe lectin I with carbohydrates. Experientia, **37**, 219 (1981).
- [60] Lee, R. T., Gabius, H.-J. und Lee, Y. C., Ligand binding characteristics of the major mistletoe lectin. J. Biol. Chem., **267**, 23722-23727 (1992).
- [61] Schink, M., Moser, D. und Mechelke, F., Two-dimensional isolectin patterns of the lectins from *Viscum album* L. (mistletoe). Naturwissenschaften, **79**, 80-81 (1992).
- [62] Jordan, E. und Wagner, H., Nachweis und quantitative Bestimmung von Lektinen und Viscotoxinen in Mistelpräparaten. Arzneim.-Forsch./Drug Res., **36**, 428-436 (1986).
- [63] Stirpe, F., Legg, R. F., Onyon, L. J., Ziska, P. und Franz, H., Inhibition of protein synthesis by a toxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe). Biochem. J., **190**, 843–845 (1980).
- [64] Olsnes, S., Stirpe, F., Sandvig, K. und Phil, A., Isolation and characterization of viscumin, a toxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe). J. Biol. Chem., **257**, 13263-13270 (1982).
- [65] Beuth, J., Ko, H. L., Tunggal, L., Jeljaszewicz, J., Steuer, M. K. und Pulverer, G., Einfluß von wässrigen, auf Mistellektin-1 standardisierten Mistelextrakten auf die in-vitro (Tumor) Zellproliferation. J. Oncol., **26**, 1-6 (1994).
- [66] Janssen, O., Scheffler, A. und Kabelitz, D., In vitro effects of mistletoe extracts and mistletoe lectins. Cytotoxicity towards tumor cells due to the induction of programmed cell death (apoptosis). Arzneim.-Forsch./Drug Res., **43**, 1221–1227 (1993).
- [67] Ribéreau-Gayon, G., Jung, M. L., Frantz, M. und Anton, R., Modulation of cytotoxicity and enhancement of cytokine release induced by *Viscum album* L. extracts or mistletoe lectins. Anti-Cancer Drugs, **8** (Suppl. 1), 3-8 (1997).
- [68] Büssing, A., Suzart, K. und Schweizer, K., Differences in the apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts. Anti-Cancer Drugs, **8** (Suppl. 1), 9-14 (1997).

- 
- [69] Möckel, B., Schwarz, T., Zinke, H., Eck, J., Langer, M. und Lentzen, H., Effects of mistletoe lectin I on human blood cell lines and peripheral blood cells. Cytotoxicity, apoptosis and induction of cytokines. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, **47**, 1145–1151 (1997).
- [70] Wenzel-Seifert, K., Lentzen, H. und Seifert, R., In U-937 promonocytes, mistletoe lectin I increases basal  $[Ca^{2+}]_i$ , enhances histamine  $H_1$ - and complement C5a-receptor-mediated rises in  $[Ca^{2+}]_i$ , and induces cell death. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **355**, 190–197 (1997).
- [71] Büssing, A., Vervecken, W., Wagner, M., Wagner, B., Pfüller, U. und Schietzel, M., Expression of mitochondrial Apo2.7 molecules and caspase-3 activation in human lymphocytes treated with the ribosome-inhibiting mistletoe lectins and the cell membrane permeabilizing viscotoxins. *Cytometry*, **37**, 133-139 (1999).
- [72] Bantel, H., Engels, I. H., Voelter, W., Schulze-Osthoff, K. und Wesselborg, S., Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Res.*, **59**, 2083–2090 (1999).
- [73] Vervecken, W., Kleff, S., Pfüller, U. und Büssing, A., Induction of apoptosis by mistletoe lectin I and its subunits. No evidence for cytotoxic effects caused by isolated A- and B-chains. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **32**, 317-326 (2000).
- [74] Stein, G. M., Pfüller, U., Schietzel, M. und Büssing, A., Toxic proteins from European mistletoe (*Viscum album L.*): increase of intracellular IL-4 but decrease of IFN- $\gamma$  in apoptotic cells. *Anticancer Res.*, **20**, 1673-1678 (2000).
- [75] Hajto, T., Hostanska, K., Frei, K., Rordorf, C. und Gabius, H.-J., 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**, 3322–3326 (1990).
- [76] Gabius, S. und Gabius, H.-J., Mistelpräparate als Immunstimulatoren in der Onkologie. *Niedersächsisches Ärzteblatt*, **9**, 1-7 (1991).
- [77] Heiny, B.-M. und Beuth, J., Mistletoe extract standardized for the galactoside-specific lectin (ML-1) induces  $\beta$ -endorphin release and immunopotentialiation in breast cancer patients. *Anticancer Res.*, **14**, 1339-1342 (1994).
- [78] Hajto, T., Hostanska, K. und Gabius, H.-J., Modulatory potency of the  $\beta$ -galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defense system *in vivo* in rabbits and patients. *Cancer Res.*, **49**, 4803–4808 (1989).

- [79] Hajto, T., Hostanska, K., Fischer, J. und Saller, R., Immunomodulatory effects of *Viscum album* agglutinin-I on natural immunity. *Anti-Cancer Drugs*, **8** (Suppl. 1), 43-46 (1997).
- [80] Baxevanis, C. N., Voutsas, I. F., Soler, M. H., Gritzapis, A. D., Tsitsilonis, O. E., Stoeva, S., Voelter, W., Arsenis, P. und Papamichail, M., Mistletoe lectin I-induced effects on human cytotoxic lymphocytes. I. Synergism with IL-2 in the induction of enhanced LAK cytotoxicity. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, **20**, 355–372 (1998).
- [81] Timoshenko, A. V. und Gabius, H.-J., Efficient induction of superoxide release from human neutrophils by the galactoside-specific lectin from *Viscum album*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **374**, 237–243 (1993).
- [82] Stettin, A., Schultze, J. L., Stechemesser, E. und Berg, P.A., Anti-mistletoe lectin antibodies are produced in patients during therapy with an aqueous mistletoe extract derived from *Viscum album L.* and neutralize lectin-induced cytotoxicity in vitro. *Klin. Wochenschr.*, **68**, 896-900 (1990).
- [83] Janssen, O., Fischer, S., Fiebig, H.-H., Scheffler, A. und Kabelitz, D., Cytotoxicity of mistletoe extracts and mistletoe lectins toward tumor cells due to the induction of apoptosis. in: *Effects of antinutrients on the nutritional value of legume diets*. Hrsg.: Bardocz, S., Pfüller, U. und Pusztai, A., Vol. 5, Luxemburg (1998).
- [84] Beuth, J., Ko, H. L., Gabius, H.-J., Burrichter, H., Oette, K. und Pulverer, G., Behavior of lymphocyte subsets and expression of activation markers in response to immunotherapy with galactoside-specific lectin from mistletoe in breast cancer patients. *Clin. Investig.*, **70**, 658–661 (1992).
- [85] Beuth, J., Ko, H. L., Tunggal, L., Geisel, J. und Pulverer, G., Vergleichende Untersuchungen zur immunaktiven Wirkung von Galaktosid-spezifischem Mistlektin. Reinsubstanz gegen standardisierten Extrakt. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, **43**, 166–169 (1993).
- [86] Stein, G. M., Henn, W., Laue, H. B. und Berg, P. A., Modulation of the cellular and humoral immune responses of tumor patients by mistletoe therapy. *Eur. J. Med. Res.*, **3**, 194-202 (1998).
- [87] Beuth, J., Ko, H. L., Gabius, H.-J. und Pulverer, G., Influence of treatment with the immunomodulatory effective dose of the  $\beta$ -galactoside-specific lectin from mistletoe on tumor colonization in BALB/c-mice for two experimental model systems. *In vivo*, **5**, 29-32 (1991).

- 
- [88] Wacker, R., Stoeva, S., Pfüller, K., Pfüller, U. und Voelter, W., Complete structure determination of the A chain of mistletoe lectin III from *Viscum album* L. ssp. *album*. *J. Peptide Sci.*, **9**, in press (2003).
- [89] Wacker, R., Vollständige Primärstrukturaufklärung von Mistellektin-III aus *Viscum album* L.. Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen (2001).
- [90] Jäggy, C., Musielski, H., Urech, K. und Schaller, G., Quantitative determination of lectins in mistletoe preparations. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, **45**, 905–909 (1995).
- [91] Tonevitsky, A. G., Agapov, I., Temiakov, D., Moisenovich, M., Maluchenko, N., Solopova, O., Würzner, G. und Pfueller, U., Study of heterogeneity of lectins in mistletoe preparations by monoclonal antibodies to their A-subunits. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, **49 (II)**, 970-975 (1999).
- [92] Büssing, A., Suzart, K., Bergmann, J., Pfüller, U., Schietzel, M. und Schweizer, K., Induction of apoptosis in human lymphocytes treated with *Viscum album* L. is mediated by the mistletoe lectins. *Cancer Lett.*, **99**, 59-72 (1996).
- [93] Büssing, A., Multani, A. S., Pathak, S., Pfüller, U. und Schietzel, M., Induction of apoptosis by the N-acetyl-galactosamine-specific toxic lectin from *Viscum album* L. is associated with a decrease of nuclear p53 and Bcl-2 proteins and induction of telomeric associations. *Cancer Lett.*, **130**, 57–68 (1998).
- [94] Beintema, J. J., Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins. *FEBS Lett.*, **350**, 159-163 (1994).
- [95] Maier, T., Strukturelle Charakterisierung medizinisch relevanter Mistellektine. Diplomarbeit, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen (1999).
- [96] Franz, M., Isolierung und Charakterisierung des chitinbindenden Lektins aus der Mistel (*Viscum*). Diplomarbeit, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen (2000).
- [97] Voelter, W., Wacker, R., Franz, M., Maier, T. und Stoeva, S., Complete structural characterization of a chitin-binding lectin from mistletoe extracts. *J. Prakt. Chem.*, **342**, 812–818 (2000).
- [98] Fischer, S., Immunstimulation und synergistischer Effekt mit Vesikeln aus Mistelextrakten. *Erfahrungsheilkunde*, **6**, 341-348 (1997).

- [99] Büssing, A. und Schietzel, M., Apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts from different host trees, correlate with their content of toxic mistletoe lectins. *Anticancer Res.*, **19**, 23–28 (1999).
- [100] Ribéreau-Gayon, G., Jung, M.-L., Di Scala, D. und Beck, J.-P., Comparison of the effects of fermented and unfermented mistletoe preparations on cultured tumor cells. *Oncology*, **43** (Suppl 1), 35–41 (1986).
- [101] Büssing, A., Azhari, T., Ostendorp, H., Lehnert, A. und Schweizer, K., *Viscum album* L. extracts reduce sister chromatid exchanges in cultured peripheral blood mononuclear cells. *Eur. J. Cancer*, **30A**, 1836-1841 (1994).
- [102] Kuttan, G., Menon, L. G. und Kuttan, R., Prevention of 20-methylcholanthrene-induced sarcoma by a mistletoe extract, Iscador. *Carcinogenesis*, **17**, 1107-1109 (1996).
- [103] Kuttan, G., Vasudevan, D. M. und Kuttan, R., Isolation and identification of a tumour reducing component from mistletoe extract (Iscador). *Cancer Lett.*, **41**, 307-314 (1988).
- [104] Stein, G. und Berg, P. A., Non-lectin component in a fermented extract from *Viscum album* L. grown on pines induces proliferation of lymphocytes from healthy and allergic individuals in vitro. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **47**, 33-38 (1994).
- [105] Stein, G. M. und Berg, P. A., Mistletoe extract-induced effects on immunocompetent cells: *in vitro* studies. *Anti-Cancer Drugs*, **8** (Suppl 1), 39–42 (1997).
- [106] Stein, G. M., Meink, H., Durst, J. und Berg, P. A., Release of cytokines by a fermented lectin-1 (ML-1) free mistletoe extract reflects differences in the reactivity of PBMC in healthy and allergic individuals and tumour patients. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **151**, 247–252 (1996).
- [107] Büssing, A., Jungmann, H., Suzart, K. und Schweizer, K., Suppression of sister chromatid exchange-inducing DNA lesions in cultured peripheral blood mononuclear cells by *Viscum album* L.. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **15**, 107-114 (1996).
- [108] Büssing, A., Jurin, M., Zarkovic, N., Azhari, T. und Schweizer, K., DNA-stabilisierende Wirkungen von *Viscum album* L. – Sind Mistelextrakte als Adjuvans während der konventionellen Chmotherapie indiziert? *Forsch. Komp.*, **3**, 244-248 (1996).
- [109] Büssing, A., Regnery, A., und Schweizer, K., Effects of *Viscum album* L. on cyclophosphamide-treated peripheral blood mononuclear cells in vitro: sister chromatid exchanges and activation/proliferation marker expression. *Cancer Lett.*, **94**, 199-205 (1995).
- [110] Gray, A. M., und Flatt, P. R., Insulin-secreting activity of the traditional antidiabetic plant *Viscum album* (mistletoe). *J. Endocrinol.*, **160**, 409–414 (1999).

- 
- [111] Fischer, S., Scheffler, A. und Kabelitz, D., Reaktivität von T-Lymphocyten gegenüber Mistelinhaltsstoffen in: Grundlagen der Misteltherapie. Hrsg.: Albrecht, H., und Gerhard, I., Hippokrates Verlag Stuttgart, 213-223 (1996).
- [112] Van Parijs, J., Broekaert, W. F., Goldstein, I. J. und Peumans, W. J., Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta*, **183**, 258-264 (1991).
- [113] Broekaert, W. F., Mariën, W., Terras, F. R. G., de Bolle, M. F. C., Proost, P., van Damme, J., Dillen, L., Claeys, M., Rees, S. B., Vanderleyden, J. und Cammue, B. P. A., Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry*, **31**, 4308-4314 (1992).
- [114] Ponstein, A. S., Bres-Vloemans, S. A., Sela-Buurlage, M. B., van den Elzen, P. J. M., Melchers, L. S. und Cornelissen, B. J. C., A novel pathogen- and wound-inducible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity. *Plant Physiol.*, **104**, 109-118 (1994).
- [115] Peumans, W. J. und van Damme, E. J. M., The role of lectins in plant defence. *Histochem. J.*, **27**, 253-271 (1995).
- [116] Koo, J.-C., Lee, S. Y., Chun, H. J., Cheong, Y. H., Choi, J. S., Kawabata, S.-I., Miyagi, M., Tsunasawa, S., Ha, K. S., Bae, D. W., Han, C.-D., Lee, B. L. und Cho, M. J., Two hevein homologs isolated from the seed of *Pharbitis nil* L. exhibit potent antifungal activity. *Biochim. Biophys. Acta*, **1382**, 80-90 (1998).
- [117] Van den Bergh, K. P. B., Proost, P., van Damme, J., Coosemans, J., van Damme, E. J. M. und Peumans, W. J., Five disulfide bridges stabilize a hevein-type antimicrobial peptide from the bark of spindle tree (*Euonymus europaeus* L.). *FEBS Lett.*, **530**, 181-185 (2002).
- [118] Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
- [119] Hillenkamp, F. und Karas, M., Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods in Enzymology*, **193**, 280-295 (1990).
- [120] Gevaert, K., Demol, H., Puype, M., Broekaert, D., De Boeck, S., Houthaève, T. und Vandekerckhove, J., Peptides adsorbed on reverse-phase chromatographic beads as targets for femtomole sequencing by post-source decay matrix assisted laser desorption ionization-reflectron time of flight mass spectrometry (MALDI-RETTOF-MS). *Electrophoresis*, **18**, 2950-2960 (1997).
- [121] Hunkapiller, M. W. und Hood, L. E., Protein sequence analysis: automated microsequencing. *Science*, **219**, 650-659 (1989).

- [122] Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. J., Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389-3402 (1997).
- [123] Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. und Higgins, D. G., The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 4876-4882 (1997).
- [124] Nicholas, K. B. und Nicholas, H. B. Jr. GeneDoc: A tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the author (1997).
- [125] Guex, N. und Peitsch, M. C., SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis*, **18**, 2714-2723 (1997).
- [126] Peitsch, M. C., Protein modeling by E-mail. *Bio/Technology*, **13**, 658-660 (1995).
- [127] Peitsch, M. C., ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem. Soc. Trans.*, **24**, 274-279 (1996).
- [128] Jones, T. A., A graphics model building and refinement system for macromolecules. *J. Appl. Cryst.*, **11**, 268-272 (1978).
- [129] Vriend, G., A molecular modelling and drug design program. *J. Mol. Graphics.*, **8**, 52-56 (1990).
- [130] Laskowski, R. A., MacArther, M. W., Moss, D. S. und Thornton, J. M., A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, **26**, 283-291 (1993).
- [131] Skujins, J. J., Potgieter, H. J. und Alexander, M., Dissolution of fungal cell walls by a streptomycete chitinase and  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) glucanase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **111**, 358-364 (1965).
- [132] Validat 2000 Onlinehandbuch, Headwork-Consulting GmbH, Bonner Talweg 55, D-53113 Bonn.
- [133] ICH harmonised tripartite guideline: Text on validation of analytical procedures, Q2A. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (1994).
- [134] ICH harmonised tripartite guideline: Validation of analytical procedures: methodology, Q2B. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (1996).
- [135] Sachs, L., *Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 9. Auflage (1999).
- [136] Hartung, J., *Statistik: Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik*. Oldenbourg Verlag München Wien, 13. Auflage (2002).

- 
- [137] Walujono, K., Scholma, R.A., Beintema, J.J., Mariono, A. und Hahn; A.M., Amino acid sequence of hevein. *In*: Proceedings of the International Rubber Conference, Rubber Research Institute of Malaysia. Kuala Lumpur: Rubber Research Institute of Malaysia, **2**, 518-531 (1975).
- [138] Van Damme, E. J. M., Charels, D., Roy, S., Tierens, K., Barre, A., Martins, J. C., Rougé, P., van Leuven, F., Does, M. und Peumans, W. J., A gene encoding a hevein-like protein from elderberry fruits is homologous to PR-4 and class V chitinase genes. *Plant Physiol.*, **119**, 1547-1556 (1999).
- [139] Wright, C. S., Olafsdottir, S., Structural differences in the two major wheat germ agglutinin isolectins. *J. Biol. Chem.*, **261**, 7191-7195 (1986).
- [140] Beintema, J. J. und Peumans, W. J., The primary structure of stinging nettle (*Urtica dioica*) agglutinin. A two-domain member of the hevein family. *FEBS Lett.*, **299**, 131-134 (1992).
- [141] Rodríguez-Romero, A., Ravichandran, K. G. und Soriano-García, M., Crystal structure of hevein at 2.8 Å resolution. *FEBS Lett.*, **291**, 307–309 (1991).
- [142] Andersen, N. H, Cao, B., Rodriguez-Romero, A. und Arreguin B., Hevein: NMR assignment and assessment of solution-state folding for the agglutinin-toxin motif. *Biochemistry*, **32**, 1407–1422 (1993).
- [143] Asensio, L., Canada, F. J., Bruix, M., Rodriguez-Romero, A. und Jimenez-Barbero, J., The interaction of hevein with *N*-acetylglucosamine-containing oligosaccharides – Solution structure of hevein complexed to chitobiose. *Eur. J. Biochem.*, **230**, 621-633 (1995).
- [144] Wright, C. S., 2.2 Å resolution structure analysis of two refined *N*-acetylneuraminyl-lactose - wheat germ agglutinin isolectin complexes. *J. Mol. Biol.*, **215**, 635-651 (1990).
- [145] Wright, C. S. und Jaeger, J., Crystallographic refinement and structure analysis of the wheat germ agglutinin with a bivalent sialoglycopeptide from glycophorin a. *J. Mol. Biol.*, **232**, 620-638 (1993).
- [146] Wilkins, T. A. und Raikhel, N. V., Expression of rice lectin is governed by two temporally and spatially regulated mRNAs in developing embryos. *Plant Cell*, **1**, 541-549 (1989).
- [147] Stinissen, H. M., Peumans, W. J. und Chrispeels, M. J., Subcellular site lectin synthesis in developing rice embryos. *EMBO J.*, **3**, 1979-1985 (1984).
- [148] Soedjanaatmadja, U. M. S, Hofsteenge, J., Jeronimus-Stratingh, C. M., Bruins, A. P. und Beintema, J. J., Demonstration by mass spectrometry that pseudo-hevein and hevein have ragged C-terminal sequences. *Biochim. Biophys. Acta*, **1209**, 144-148 (1994).

- [149] Stanford, A., Bevan, M. und Northcote, D., Differential expression within a family of novel wound-induced genes in potato. *Mol. Gen. Genet.*, **215**, 200-208 (1989).
- [150] Wright, C. S., The crystal structure of wheat germ agglutinin at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **111**, 439-457 (1977).
- [151] Wright, C. S., Gavilanes, F. und Peterson, D. L., Primary structure of wheat germ agglutinin isolectin 2. Peptide order deduced from X-ray structure. *Biochemistry*, **23**, 280-287 (1984).
- [152] Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J., Barre, A. J. und Rougé, P. J., Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **17**, 575-692 (1999).
- [153] Hernández-Arana, A., Rojo-Domínguez, A., Soriano-García, M. und Rodríguez-Romero, A., The thermal unfolding of hevein, a small disulfide-rich protein. *Eur. J. Biochem.*, **228**, 649-652 (1995).
- [154] Asensio, J. L., Canada, F. J., Siebert, H. C., Laynez, J., Povera, A., Nieto, P. M., Soedjanaamadja, U. M., Gabius, H. J. und Jimenez-Barbero, J., Structural basis for chitin recognition by defense proteins: GlcNAc residues are bound in a multivalent fashion by extended binding sites in hevein domains. *Chem. Biol.*, **7**, 529-543 (2000).
- [155] Muraki, M., Morii, H. und Harata, K., Chemically prepared hevein domains: effect of C-terminal truncation and the mutagenesis of aromatic residues on the affinity for chitin. *Protein Eng.*, **13**, 385-389 (2000).
- [156] Harata, K. und Muraki, M., Crystal structures of *Urtica dioica* agglutinin and its complex with tri-*N*-acetylchitotriose. *J. Mol. Biol.*, **297**, 673-681 (2000).
- [157] Stein, G. M., Stettin, A., Schultze, J. und Berg, P. A., Induction of anti-mistletoe lectin antibodies in relation to different mistletoe-extracts. *Anti-Cancer Drugs*, **8** (Suppl.1), 57-59 (1997).
- [158] Lavaud, F., Prevost, A., Cossart, C., Guerin, L., Bernard, J. und Kochman, S., Allergy to latex, avocado pear, and banana: evidence for a 30 kd antigen in immunoblotting. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **95**, 557-564 (1995).
- [159] Diaz-Peralez, A., Collada, C., Blanco, C., Sánchez-Monge, R., Carrillo, T., Aragoncillo, C. und Salcedo, G., Class I chitinases with hevein-like domain, but not class II enzymes, are relevant chestnut and avocado allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **102**, 127-133 (1998).

- 
- [160] Chen, Z., Posch, A., Lohaus, C., Raulf-Heimsoth, M., Meyer, H. E. und Baur, X., Isolation and identification of hevein as a major IgE-binding polypeptide in *Hevea latex*. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **99**, 402–409 (1997).
- [161] Ylitalo, L., Alenius, H., Turjanmaa, K., Palosuo, T. und Regnala, T., IgE antibodies to prohevein, hevein, and rubber elongation factor in children with latex allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **102**, 659–664 (1998).
- [162] Stein, G. M. und Berg, P. A., Characterisation of immunological reactivity of patients with adverse effects during therapy with an aqueous mistletoe extract. *Eur. J. Med. Res.*, **4**, 169-177 (1999).
- [163] Bohlmann, H. und Apel, K., Thionins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, **42**, 227-240 (1991).
- [164] Broekaert, W. F., Terras, F. R. G., Cammue, B. P. A. und Osborn, R. W., Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.*, **108**, 1353-1358 (1995).
- [165] Terras, F. R. G., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N. V., Osborn, R. W., Kester, A., Rees, S. B., Torrekens, S., van Leuven, F., Vanderleyden, J., Cammue, B. P. A. und Broekaert, W. F., Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell*, **7**, 573-588 (1995).
- [166] Peumans, W. J. und van Damme, E. J. M., Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.*, **109**, 347-352 (1995).
- [167] Chrispeels, M. J. und Raikhel, N. V., Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell*, **3**, 1-9 (1991).
- [168] Broekaert, W. F., van Parijs, J., Leyns, F., Joos, H. und Peumans, W. J., A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. *Science*, **245**, 1100-1102 (1989).
- [169] Thevissen, K., Ghazi, A., de Samblanx, C. B., Brownlee, C., Osborn, R. W. und Broekaert, W. F., Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *J Biol. Chem.*, **271**, 15018-15025 (1996).

## **Akademische Lehrer**

Prof. Dr. K. Albert

Prof. Dr. G. Bach

Prof. Dr. E. Bayer

Prof. Dr. H. Bisswanger

Prof. Dr. K. W. Bock

Prof. Dr. P. Bohley

Prof. Dr. V. Braun

Prof. Dr. U. Breyer-Pfaff

Prof. Dr. H. Eckstein

Prof. Dr. K. Eisele

Prof. Dr. G. Gauglitz

Prof. Dr. F. Gönnerwein

Prof. Dr. E. Götz

Prof. Dr. P. Grabmayr

Dr. H. Günzl

Prof. Dr. G. Häfelinger

Prof. Dr. H. Hagenmaier

Prof. Dr. B. Hamprecht

Prof. Dr. Dr. h.c. M. Hannack

Prof. Dr. V. Hoffmann

Prof. Dr. W. Jaeger

Prof. Dr. G. Jung

Prof. Dr. P. Kaiser

Prof. Dr. D. Krug

Prof. Dr. E. Lindner

Prof. Dr. D. Mecke

Prof. Dr. U. Nagel

Prof. Dr. W. Nakel

Prof. Dr. K. Niemax

Prof. Dr. H. Oberhammer

Prof. Dr. E. Pfaff

Prof. Dr. W. Pfeiffer

Prof. Dr. H. Probst

Prof. Dr. H.-J. Reinecke

Prof. Dr. K. Reutter

Prof. Dr. M. Schwarz

Prof. Dr. H. B. Stegmann

Prof. Dr. J. Strähle

Prof. Dr. Dr. h. c. W. Voelter

Prof. Dr. U. Weber

Prof. Dr. Dr. h. c. K. Wegmann

Prof. Dr. J. Werringloer

Prof. Dr. U. Weser

Prof. Dr. W. Wohlleben

---

## Lebenslauf

Name: Mirita Franz

Geboren: 8. November 1972 in Stuttgart

Eltern: Roland Karl Maximilian Franz  
Gertrud Leonie Käthe Franz, geb. Kirchgeßner

Schulbildung: September 1979 - Juli 1983  
Grundschule Stuttgart-Sillenbuch  
September 1983 – Juli 1992  
Ev. Heidehof-Gymnasium Stuttgart; Erlangung der allgemeinen Hochschulreife am 26. Mai 1992

Soziale Tätigkeiten: Juni/Juli 1990  
Praktikum im Charlottenhaus (Frauenklinik) in Stuttgart  
1. Februar 1993 – 30. September 1993  
Schwesternhelferin im Diakonissenkrankenhaus in Stuttgart

Studium: 1. Oktober 1992 – 31. März 1993  
Studium der Elektrotechnik an der Universität Stuttgart  
1. Oktober 1993 – 31. März 1994  
Studium der Biologie an der Universität Hohenheim  
1. April 1994 – 31. März 2000  
Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
Juni 1999  
Abschluss der Diplomprüfungen  
Juli 1999 – März 2000  
Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. W. Voelter am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen mit dem Titel: „Isolierung und Charakterisierung des chitinbindenden Lektins aus der Mistel (*Viscum*)“

Promotion: April 2000 – November 2003  
Anfertigung der vorliegenden Dissertation „Struktur und biologische Aktivitäten der chitinbindenden Mistellektine“ bei Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. W. Voelter am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen  
Oktober 2000 – September 2002  
Förderung nach dem Landesgraduiertenförderungsgesetz durch das Land Baden-Württemberg

Kinder: Arik Franz, geboren am 27. Februar 2001

Heirat: 4. Oktober 2002 mit Dr. med. Karsten Wachtel