



UNIVERSITÄT KAISERSLAUTERN

Fachbereich Biologie

**Apoptoseinduzierende und antimutagene Wirkung
von *Viscum album* L. auf humane Zellkulturen**



**in der Abteilung für Humanbiologie und Humangenetik
durchgeführte Dissertation**

**vorgelegt von Diplom-Biologin
Petra Hahn**

Kaiserslautern 2000

Apoptoseinduzierende und antimutagene Wirkung von *Viscum album* L. auf humane Zellkulturen

Vom Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation
(D 386)

vorgelegt von Diplom-Biologin
Petra Hahn

Kaiserslautern 2000

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 23. Juni 2000

Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. J. A. Cullum

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. H. Zankl

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. G. Eisenbrand

An dieser Stelle bedanke ich mich herzlich bei allen, die diese Arbeit ermöglicht haben.

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Zankl danke ich für die Vergabe des interessanten Themas und die Betreuung der Arbeit.

Besonderer Dank gilt der Helixor Heilmittel GmbH & Co., Rosenfeld, die die Durchführung des Projektes ermöglichte und die Mistelpräparate zur Verfügung stellte. Insbesondere bedanke ich mich beim Leiter der Abteilung Forschung und Entwicklung, Herrn Dr. P. Goedings, für die gute Zusammenarbeit.

Mein größter Dank gilt Achim und meinen Eltern für ihre immer währende Unterstützung.

Schließlich möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Abteilung für die freundliche Aufnahme und ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Für meine Eltern und Achim

| INHALTSVERZEICHNIS | Seite |
|--|--------------|
| 1 Theoretische Einführung | 1 |
| 1.1 Die Mistel | 1 |
| 1.1.1 Botanik der Mistel | 1 |
| 1.1.1.1 Systematische Stellung und Verbreitung | 1 |
| 1.1.1.2 Lebensweise | 1 |
| 1.1.1.3 Entwicklung und Wachstum | 2 |
| 1.1.1.4 Besonderheiten der Mistel | 3 |
| 1.1.1.5 Die Mistel als Schadpflanze | 4 |
| 1.1.2 Geschichte der Mistel als Arzneimittel | 4 |
| 1.1.3 Wirkstoffe der Mistel | 5 |
| 1.1.3.1 Viscotoxine | 5 |
| 1.1.3.2 Lektine | 6 |
| 1.1.3.3 Vester'sche Proteine | 8 |
| 1.1.3.4 Polysaccharide | 10 |
| 1.1.3.5 Arginin | 10 |
| 1.1.3.6 Vitamin C | 10 |
| 1.1.3.7 Vesikel | 11 |
| 1.1.3.8 Alkaloide | 11 |
| 1.1.3.9 Flavonoide | 11 |
| 1.1.3.10 Phenylpropane, Lignine und Lignane | 11 |
| 1.1.4 Wirksamkeiten der Mistelinhaltsstoffe | 12 |
| 1.1.5 HELIXOR-Mistelpräparate | 14 |
| 1.1.5.1 Zusammensetzung | 14 |
| 1.1.5.2 Herstellungsverfahren | 14 |
| 1.1.5.3 Wirkungsweise | 15 |
| 1.1.5.4 Indikationen | 16 |
| 1.1.5.5 Wahl des Präparates | 17 |
| 1.2 Zelltod: Apoptose und Nekrose | 19 |
| 1.2.1 Nekrose | 19 |
| 1.2.1.1 Inzidenz | 19 |
| 1.2.1.2 Morphologie | 19 |
| 1.2.1.3 Mechanismus | 20 |
| 1.2.2 Apoptose | 20 |
| 1.2.2.1 Inzidenz | 20 |
| 1.2.2.2 Morphologie | 21 |
| 1.2.2.3 Mechanismus | 22 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1.2.2.4 | Genetische Steuerung der Apoptose | 23 |
| 1.3 | Schwesterchromatid-Austausche (SCE) | 25 |
| 1.3.1 | Mechanismus | 25 |
| 1.3.2 | Frequenz und Lokalisierung | 25 |
| 1.3.3 | Ursachen der SCE-Bildung | 26 |
| 1.3.4 | Prinzip der SCE-Färbung (FPG-Technik) | 27 |
| 1.3.5 | Analyse der Zellzyklusverteilung | 29 |
| 1.3.5.1 | Erster Replikationszyklus (M1) | 29 |
| 1.3.5.2 | Zweiter Replikationszyklus (M2) | 30 |
| 1.3.5.3 | Dritter und höhere Replikationszyklen (M3+) | 31 |
| 1.4 | Mikronuklei (MN) | 32 |
| 1.4.1 | Definition | 32 |
| 1.4.2 | Induktion und Entstehung | 32 |
| 1.4.3 | Zytokinese-Block-Methode | 33 |
| 1.5 | Durchflusszytometrie | 35 |
| 1.5.1 | Flüssigkeitssystem | 35 |
| 1.5.2 | Optisches System | 36 |
| 1.5.3 | Signalverarbeitung | 37 |
| 1.5.4 | Zellzyklus | 37 |
| 1.5.5 | Variationskoeffizient (CV) | 39 |
| 1.5.6 | Durchflusszytometrische Messung von Merkmalen apoptotischer Zellen | 39 |
| 1.5.6.1 | DNA-Gehalt | 39 |
| 1.5.6.2 | Protein-Gehalt | 40 |
| 1.5.6.3 | Lichtstreuung | 40 |
| 1.5.6.4 | Veränderungen der Plasmamembran | 41 |
| 1.6 | Fragestellung | 42 |
| 2 | Material und Methoden | 44 |
| 2.1 | Zellkultur | 44 |
| 2.1.1 | Bestimmung der Lebendzellzahl (Trypanblau-Ausschlusstest) | 44 |
| 2.1.2 | Zelllinie MOLT-4 | 44 |
| 2.1.2.1 | Kultivierungsbedingungen | 45 |
| 2.1.2.2 | Versuchsdurchführung | 45 |
| 2.1.2.3 | Aberntung | 45 |
| 2.1.3 | Lymphozytenkultur | 46 |
| 2.1.3.1 | Kultivierungsbedingungen | 46 |
| 2.1.3.2 | Versuchsdurchführung | 46 |
| 2.1.3.3 | Aberntung | 47 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.2 | Durchflusszytometrie | 48 |
| 2.2.1 | Färbeverfahren mit DAPI/Sulforhodamin 101-Lösung | 48 |
| 2.2.2 | Zwei-Parameter-Messung des DNA-und Protein-Gehaltes | 48 |
| 2.2.3 | Auswertung | 48 |
| 2.3 | Zytospinpräparation | 49 |
| 2.4 | Fluoreszenzmikroskopie | 50 |
| 2.5 | SCE-Test | 51 |
| 2.5.1 | Versuchsdesign | 51 |
| 2.5.2 | Blutkulturansatz und Zellkultivierung | 51 |
| 2.5.3 | Aberntung der Kulturen | 52 |
| 2.5.4 | Präparation der Objektträger | 52 |
| 2.5.5 | Differentielle Schwesterchromatid-Färbung (SCE-Färbung) | 52 |
| 2.5.6 | Bestimmung der SCE-Rate | 53 |
| 2.5.7 | Bestimmung der Zellzyklusverteilung | 54 |
| 2.5.8 | Bestimmung des Proliferationsindex | 54 |
| 2.6 | Mikronukleus-Test | 55 |
| 2.6.1 | Versuchsdesign | 55 |
| 2.6.2 | Blutkulturansatz und Zellkultivierung | 55 |
| 2.6.3 | Aberntung der Kulturen | 55 |
| 2.6.4 | Präparation der Objektträger | 56 |
| 2.6.5 | Färbeverfahren | 56 |
| 2.6.6 | Bestimmung des Mitose-Index | 56 |
| 2.6.7 | Bestimmung der Mikronukleus-Rate | 56 |
| 2.7 | Statistische Auswertung | 58 |
| 2.7.1 | Arithmetischer Mittelwert und Standardabweichung | 58 |
| 2.7.2 | t-Test | 58 |
| 2.8 | Reagenzien | 59 |
| 3 | Ergebnisse | 61 |
| 3.1 | Wachstumshemmendes und apoptoseinduzierendes Potential von Helixor A, M und P getestet an der Zelllinie MOLT-4 | 61 |
| 3.1.1 | Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung, Induktion von Apoptose und Zellzyklusbeeinflussung bei einem FKS-Gehalt des Kulturmediums von 15 % | 61 |
| 3.1.1.1 | Bestimmung der Wachstumsrate | 61 |
| 3.1.1.2 | Durchflusszytometrische Analyse | 62 |
| 3.1.1.3 | Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien | 64 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.1.1.4 | Vergleich der durchflusszytometrischen und mikroskopischen Auswertung | 65 |
| 3.1.1.5 | Zellzyklusanalyse | 66 |
| 3.1.2 | Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung, Induktion von Apoptose und Zellzyklusbeeinflussung bei einem FKS-Gehalt des Kulturmediums von 10 % | 67 |
| 3.1.2.1 | Bestimmung der Wachstumsrate | 67 |
| 3.1.2.2 | Durchflusszytometrische Analyse | 68 |
| 3.1.2.3 | Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien | 69 |
| 3.1.2.4 | Vergleich der durchflusszytometrischen und mikroskopischen Auswertung | 70 |
| 3.1.2.5 | Zellzyklusanalyse | 71 |
| 3.1.3 | Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung, Induktion von Apoptose und Zellzyklusbeeinflussung bei einem FKS-Gehalt des Kulturmediums von 5 % | 72 |
| 3.1.3.1 | Bestimmung der Wachstumsrate | 72 |
| 3.1.4 | Durchflusszytometrische Analyse | 73 |
| 3.1.4.1 | Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien | 74 |
| 3.1.4.2 | Vergleich der durchflusszytometrischen und mikroskopischen Auswertung | 75 |
| 3.1.4.3 | Zellzyklusanalyse | 76 |
| 3.1.5 | Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung, Induktion von Apoptose und Zellzyklusbeeinflussung bei einem FKS-Gehalt des Kulturmediums von 2,5 % | 77 |
| 3.1.5.1 | Bestimmung der Wachstumsrate | 77 |
| 3.1.5.2 | Durchflusszytometrische Analyse | 78 |
| 3.1.5.3 | Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien | 79 |
| 3.1.5.4 | Vergleich der durchflusszytometrischen und mikroskopischen Auswertung | 80 |
| 3.1.5.5 | Zellzyklusanalyse | 80 |
| 3.1.5.6 | Vergleichende Betrachtung der Versuchsansätze mit unterschiedlichem FKS-Gehalt des Kulturmediums | 81 |
| 3.2 | Wachstumshemmendes und apoptoseinduzierendes Potential von Helixor A, M und P getestet an humanen Blutlymphozyten | 82 |
| 3.2.1 | Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung, Induktion von Apoptose und Zellzyklusbeeinflussung durch Helixor A, M und P bei Lymphozyten weiblicher Probanden | 82 |
| 3.2.1.1 | Bestimmung der Wachstumsrate | 82 |
| 3.2.1.2 | Durchflusszytometrische Analyse | 83 |
| 3.2.1.3 | Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien | 85 |
| 3.2.1.4 | Vergleich der durchflusszytometrischen und mikroskopischen Auswertung | 86 |
| 3.2.1.5 | Zellzyklusanalyse | 87 |
| 3.2.2 | Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung, Induktion von Apoptose und Zellzyklusbeeinflussung durch Helixor A, M und P bei Lymphozyten männlicher Probanden | 88 |
| 3.2.2.1 | Bestimmung der Wachstumsrate | 88 |
| 3.2.2.2 | Durchflusszytometrische Analyse | 89 |
| 3.2.2.3 | Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien | 90 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.2.2.4 | Vergleich der durchflusszytometrischen und mikroskopischen Auswertung | 91 |
| 3.2.2.5 | Zellzyklusanalyse | 92 |
| 3.2.3 | Vergleich weiblicher und männlicher Probanden | 93 |
| 3.2.3.1 | Vergleich der Wachstumsraten | 93 |
| 3.2.3.2 | Vergleich der durchflusszytometrischen Ergebnisse | 93 |
| 3.2.3.3 | Vergleich der mikroskopischen Ergebnisse | 93 |
| 3.2.3.4 | Vergleich der Zellzyklusanalysen | 94 |
| 3.3 | Wachstumshemmendes und apoptoseinduzierendes Potential von Mistellektin I und III getestet an der Zelllinie MOLT-4 | 95 |
| 3.3.1 | Bestimmung der Wachstumsrate | 95 |
| 3.3.2 | Durchflusszytometrische Analyse | 96 |
| 3.3.3 | Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien | 98 |
| 3.3.4 | Vergleich der durchflusszytometrischen und mikroskopischen Auswertung | 99 |
| 3.3.5 | Zellzyklusanalyse | 99 |
| 3.4 | Wachstumshemmendes und apoptoseinduzierendes Potential von Mistellektin I und III getestet an humanen Lymphozyten | 100 |
| 3.4.1 | Bestimmung der Wachstumsrate | 100 |
| 3.4.2 | Durchflusszytometrische Analyse | 101 |
| 3.4.3 | Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien | 103 |
| 3.4.4 | Vergleich durchflusszytometrischer und mikroskopischer Auswertung | 104 |
| 3.4.5 | Zellzyklusanalyse | 104 |
| 3.5 | SCE-Frequenz, Zellzyklusverteilung und Proliferationsindex humaner Lymphozyten nach Kombinationsbehandlung mit Helixor-Präparaten und Zytostatika | 105 |
| 3.5.1 | Helixor-Präparate | 105 |
| 3.5.1.1 | SCE-Rate | 105 |
| 3.5.1.2 | Zellzyklusverteilung und Proliferationsindex | 106 |
| 3.5.2 | Helixor-Präparate und Cyclophosphamid | 107 |
| 3.5.2.1 | SCE-Rate | 107 |
| 3.5.2.2 | Zellzyklusverteilung und Proliferationsindex | 108 |
| 3.5.3 | Helixor-Präparate und Methotrexat | 109 |
| 3.5.3.1 | SCE-Rate | 109 |
| 3.5.3.2 | Zellzyklusverteilung und Proliferationsindex | 110 |
| 3.5.4 | Helixor-Präparate und 5-Fluorouracil | 111 |
| 3.5.4.1 | SCE-Rate | 111 |
| 3.5.4.2 | Zellzyklusverteilung und Proliferationsindex | 112 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.6 | Mitose-Index und Mikronukleus-Frequenz humaner Lymphozyten nach Kombinationsbehandlung mit Helixor-Präparaten und Zytostatika | 113 |
| 3.6.1 | Helixor-Präparate | 113 |
| 3.6.1.1 | Mitose-Index | 113 |
| 3.6.1.2 | Mikronukleus-Rate | 113 |
| 3.6.2 | Helixor-Präparate und Cyclophosphamid | 114 |
| 3.6.2.1 | Mitose-Index | 114 |
| 3.6.2.2 | Mikronukleus-Rate | 115 |
| 3.6.3 | Helixor-Präparate und Methotrexat | 116 |
| 3.6.3.1 | Mitose-Index | 116 |
| 3.6.3.2 | Mikronukleus-Rate | 116 |
| 3.6.4 | Helixor-Präparate und 5-Fluorouracil | 117 |
| 3.6.4.1 | Mitose-Index | 117 |
| 3.6.4.2 | Mikronukleus-Rate | 117 |
| 4 | Diskussion | 118 |
| 4.1 | Methodik | 118 |
| 4.1.1 | Wahl der Zellkultursysteme | 118 |
| 4.1.2 | Wahl des Kulturmediums und der Kultivierungsbedingungen | 119 |
| 4.1.3 | Wahl der Methode für die Analyse des Zelltodes | 120 |
| 4.2 | Wachstumshemmendes und apoptoseinduzierendes Potential von Helixor A, M und P in Abhängigkeit vom FKS-Gehalt des Kulturmediums getestet an der Zelllinie MOLT-4 | 121 |
| 4.2.1 | Bestimmung der Wachstumsrate | 121 |
| 4.2.2 | Durchflusszytometrische Analyse | 122 |
| 4.2.3 | Mikroskopische Analyse | 122 |
| 4.2.4 | Vergleich der durchflusszytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Auswertung | 124 |
| 4.2.5 | Zellzykluspezifität | 124 |
| 4.2.6 | Einfluss des FKS-Gehaltes im Kulturmedium | 126 |
| 4.2.7 | Einfluss des Lektingehaltes | 127 |
| 4.2.8 | Einfluss des Herstellungsverfahrens | 129 |
| 4.3 | Wachstumshemmendes und apoptoseinduzierendes Potential von Helixor A, M und P getestet an humanen Lymphozyten | 131 |
| 4.3.1 | Bestimmung der Wachstumsrate | 131 |
| 4.3.2 | Durchflusszytometrische Analyse | 132 |
| 4.3.3 | Mikroskopische Analyse | 133 |
| 4.3.4 | Vergleich durchflusszytometrischer und fluoreszenzmikroskopischer Ergebnisse | 133 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 4.3.5 | Zellzyklusspezifität | 134 |
| 4.4 | Wachstumshemmendes und apoptoseinduzierendes Potential von Mistellektin I und III getestet an der Zelllinie MOLT-4 | 135 |
| 4.4.1 | Bestimmung der Wachstumsrate | 135 |
| 4.4.2 | Durchflusszytometrische Analyse | 135 |
| 4.4.3 | Mikroskopische Analyse | 136 |
| 4.4.4 | Vergleich der durchflusszytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Auswertung | 137 |
| 4.4.5 | Zellzyklusspezifität | 137 |
| 4.5 | Wachstumshemmendes und apoptoseinduzierendes Potential von Mistellektin I und III getestet an humanen Lymphozyten | 138 |
| 4.5.1 | Bestimmung der Wachstumsrate | 138 |
| 4.5.2 | Durchflusszytometrische Analyse | 138 |
| 4.5.3 | Mikroskopische Analyse | 139 |
| 4.5.4 | Vergleich der durchflusszytometrischen und mikroskopischen Ergebnisse | 139 |
| 4.5.5 | Zellzyklusspezifität | 139 |
| 4.5.6 | Wirkungsmechanismen der Mistellektine | 140 |
| 4.6 | SCE-Frequenz, Zellzyklusverteilung und Proliferationsindex humaner Lymphozyten nach Kombinationsbehandlung mit Helixor-Präparaten und Zytostatika | 142 |
| 4.6.1 | Individuelle Variabilität der spontanen SCE-Frequenz | 142 |
| 4.6.2 | Induzierte SCE-Rate | 144 |
| 4.6.3 | Zellzyklusanalyse und Proliferationsindex | 147 |
| 4.7 | Mitose-Index und Mikronukleus-Frequenz humaner Lymphozyten nach Kombinationsbehandlung mit Helixor-Präparaten und Zytostatika | 148 |
| 4.7.1 | Mitose-Index | 148 |
| 4.7.2 | Individuelle Variabilität der spontanen Mikronukleus-Rate | 148 |
| 4.7.3 | Induzierte Mikronukleus-Rate | 149 |
| 4.8 | Vergleichende Betrachtung von MN- und SCE-Test | 152 |
| 5 | Zusammenfassung | 154 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 156 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| ADCC | antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity |
| AFC | amniotic fluid cells |
| ALL | akute lymphatische Leukämie |
| AML | akute myeloische Leukämie |
| APA | Abrus precatorius |
| apop. B. | apoptotische Bodies |
| Aqua dest. | Aqua destillata |
| BrdU | 5'-Brom-2-desoxyuridin |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| CB | Cytokinese-Block-Methode |
| CD | cluster of differentiation |
| Ch. B. | Charge-Bezeichnung |
| CLL | chronisch-lymphatische Leukämie |
| CML | chronisch-myeloische Leukämie |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| CP | Cyclophosphamid |
| CRP | c-reaktives Protein |
| CV | coefficient of variation |
| D | Dalton |
| d. h. | das heißt |
| D. I. | DNA-Index |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindol |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| FACS | Fluoreszenz-aktivierter Zellsorter |
| FCM | Flow Cytometry |
| FITC | Fluorescein-5-isothiocyanat |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| FPG | Fluoreszenz-Plus-Giemsa |
| frag. | stark fragmentierter Kern |
| FSC | Vorwärtsstreulicht |
| g | Gramm |

| | |
|-------------|--|
| GalNAc | N-Acetyl-D-galaktosamin |
| GlcNAc | N-Acetylglukosamin |
| GM-CSF | Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor |
| G1/G2-Phase | “gap“-Phasen |
| h | Stunde |
| HA | Helixor Abietis (Tannenmistel) |
| HCl | Salzsäure |
| HM | Helixor Mali (Apfelbaummistel) |
| HP | Helixor Pini (Kiefernmistel) |
| HPG | Hoechst-Plus-Giemsa |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| ID | Inhibitions-Dosis |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| KCl | Kaliumchlorid |
| kD | Kilodalton |
| kg | Kilogramm |
| kond. | stark kondensierter Kern |
| l | Liter |
| LD | Lethal-Dosis |
| M | molar |
| M-Phase | Mitotische-Phase |
| M1 | Erster Replikationszyklus |
| M2 | Zweiter Replikationszyklus |
| M3+ | Dritter und höhere Replikationszyklen |
| m | männlich |
| mg | Milligramm |
| min | Minute (n) |
| ml | Milliliter |
| ML | Mistellektin |
| MN | Mikronukleus |
| MTH | Methotrexat |
| ng | Nanogramm |
| NGF | Nerve-Growth-Factor |
| NK | Natürliche Killerzellen |
| nm | Nanometer |

| | |
|-------------|---|
| o. ä. | oder ähnliches |
| OS | Oligosaccharide |
| o. V. | ohne Verfasser |
| PBMC | peripheral blood mononuclear cells |
| Pen./Strep. | Penicillin/Streptomycin |
| pg | Pikogramm |
| PHA | Phytohämagglutinin |
| PI | Proliferationsindex |
| PS | Phosphatidylserin |
| RC | Ricinus communis |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROI | reactive oxygen intermediates |
| rpm | rounds per minute |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | reverse transcriptase polymerase chain reaction |
| S-Phase | Synthese-Phase |
| SCE | Sister-chromatid exchange |
| SSC | Seitwärtsstreulicht; Saline-Natrium-Citrat |
| SR 101 | Sulforhodamin 101 |
| TA | telomerische Assoziation |
| Tab. | Tabelle |
| TDT | Terminale desoxynukleotidyl-Transferase |
| TNF | Tumor-Nekrose-Faktor |
| u. a. | unter anderem |
| u. ä. | und ähnliches |
| UV | ultraviolett |
| VAL | Viscum album L. |
| vgl. | vergleiche |
| VP-16 | Vester'scher Proteinkomplex-16 |
| VT | Viscotoxine |
| w | weiblich |
| z. T. | zum Teil |
| °C | Grad Celsius |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| µM | mikromolar |
| 5'FU | 5-Fluorouracil |

1 Theoretische Einführung

1.1 Die Mistel

1.1.1 Botanik der Mistel

1.1.1.1 Systematische Stellung und Verbreitung

Nach der systematischen Stellung gehört *Viscum album* L. in die Klasse der Zweikeimblättrigen Bedecktsamer, in die Unterklasse der Rosidae und damit zur Familie der Viscaceae innerhalb der Ordnung der Santalales. Zur Ordnung der Santalales zählen neben Loranthaceae und Viscaceae unter anderem Olacaceae und Santalaceae (Straßburger et al., 1978). Die Gattung *Viscum* selbst besteht aus etwa neunzig Arten, wovon ungefähr zwei Drittel in Afrika (südlich der Sahara) und Madagaskar, der Rest in Australien verbreitet ist. *Viscum album* L., die weißbeerige Mistel, ist besonders in den gemäßigten Zonen Mitteleuropas beheimatet. Barlow (1983) nimmt aufgrund der Chromosomenzahl und der Verbreitung der monözischen und diözischen Arten von *Viscum* an, dass der Ursprung der Gattung im tropischen Südostasien lag. Ihre Verbreitung reicht allerdings von Südkandinavien bis Nordafrika, von Portugal bis Griechenland, von Kleinasien bis zum Kaukasus und weiter findet sie sich im Himalaya, in Indochina, China und Japan. In Amerika wächst *Viscum album* L. nur in Kalifornien, in einem kleinen isolierten Areal, aus Kultivierungsversuchen stammend (Leroi, 1987).

Man unterscheidet botanisch drei Mistelunterarten: Laubholz-, Tannen- und Kiefernmisteln. Wahrscheinlich unterscheiden sich auch die Laubholzmisteln untereinander durch verschiedene Zusammensetzung ihrer Inhaltsstoffe.

1.1.1.2 Lebensweise

Hinsichtlich der Lebensweise gehört *Viscum album* L. zu den parasitischen Blütenpflanzen. Die Mistel ist als Halbparasit von der Wasser- und Mineralienversorgung durch den Wirt abhängig, kann aber selbständig Aminosäuren und Kohlenhydrate durch Photosynthese produzieren (epiphytischer Sprossparasitismus).

Nicht jeder Baum wird von den strauch- oder büschelförmigen Mistelgewächsen gerne als Wirt benutzt. Häufig findet man sie in Mitteleuropa auf Apfelbäumen und Pappeln, wie auch auf Kiefern und Tannen, dagegen äußerst selten auf Eichen und Ulmen. Einige Bäume, wie beispielsweise die Blutbuche oder der Buchsbaum, sind resistent gegenüber Mistelinfektionen (Becker, 1986).

1.1.1.3 Entwicklung und Wachstum

Verbreitet wird die Mistel durch Vögel (Misteldrosseln), die die Mistelbeeren als Nahrung aufnehmen und als Kot wieder ausscheiden. Trifft eine Beere auf ihren Wirt, erfolgt nach der Keimung und Ausbildung der Haftscheibe, über die Wirt und Parasit engen Kontakt haben, die Ausbildung des Senkers, der bis zum Xylem des Wirtes vordringt und somit der Mistel Zugang zu Wasser und Nährstoffen des Wirtes ermöglicht. Die Keimung der Mistel findet, wie bei allen anderen Pflanzen, im Frühjahr statt. Sie wächst zunächst negativ geotrop der Sonne entgegen. Von dem unverzweigten mittelachsenbetonten Wachstum tritt die Mistel ab dem vierten bis fünften Lebensjahr in eine zweite Wachstumsphase ein, in der sie sich gabelförmig verzweigt und blüht. Die jungen, Blütenanlagen tragenden Sprosse führen nach ihrem zunächst negativ geotropen Wachstum Pendelbewegungen aus, die keine Beziehung zum Raum, zum Lichteinfall und zur Schwerkraft aufweisen. Sie ordnen sich dann in ihre endgültige Gestalt, der Kugelform, ein (Luther und Becker, 1987). Die Blütenstände werden im Oktober ausgebildet und blühen zwischen Januar und März. Im Oktober des folgenden Jahres reift die Frucht und kann bis Mai am Busch bleiben. Die Mistel bildet sich im Sommer also vegetativ aus, während die Blüte- und Tragzeit der Früchte im Winter ist. Alle anderen Pflanzen haben demgegenüber einen entgegengesetzten jahreszeitlichen Entwicklungsablauf. Vom Einsetzen der Blütendifferenzierung bis zur reifen Beere benötigt die Mistel als DNA-reichste Blütenpflanze siebzehn Monate, während beispielsweise die Rose nur fünf Monate braucht (Leroi, 1987). Eine Ausnahme stellt der immergrüne Mistelbusch außerdem mit der Tatsache dar, dass er weder eine Wurzel noch eine Samenschale ausbildet.

Die Mistel zeigt somit eine „embryonale“ Morphologie und verzögertes zeitliches Wachstum. Aufgrund ihrer biologischen Sonderstellung sprach der Anthroposoph Rudolf Steiner (1961) der Mistel besondere Kräfte zu, von denen er annahm, dass sie für die Krebsbehandlung von Bedeutung sein könnten. Zu diesem Schluss kam Steiner aufgrund der vergleichenden Betrachtung von Mistelwachstum und Tumorentwicklung. Die Rückbildung der Mistel durch gleichzeitige Entwicklung von generativen und vegetativen Organen führt zu einer strukturell einfacheren Pflanze und hat ihre Parallele in der Tumorentstehung. Dort entstehen aus hochentwickelten differenzierten Zelltypen durch ungeordnete Zellteilung und Herauslösung aus dem Gesamtzellverband Zellen, die phänotypisch dem Embryonalstadium zuzuordnen sind.

1.1.1.4 Besonderheiten der Mistel

Botanisch ist die Mistel eine besondere Pflanze, weil sie einige eigenartige Merkmale aufweist, die aus dem Rahmen der sonstigen Pflanzenwelt fallen:

Die Beziehung zum Licht

In Bezug auf die Photosynthese, die Verwandlung von Kohlendioxid und Wasser mithilfe des Lichtes in organische Substanz, ist *Viscum album* eine „normale Pflanze“. Ihr berühmter Monograph Tubeuf (1923) bezeichnet sie als „eine der allergrünsten Pflanzen“. Tatsächlich hat sie grüne Blätter, grüne Sprosse, grüne Samen, grüne Rindenstränge und das Grün kann noch in ihrem Holz und Senker vorhanden sein.

Die Mistel zeigt jedoch eine ausgesprochene Beziehung zum Licht (Wolff, 1975): Die weitaus meisten Pflanzen müssen in der Dunkelheit keimen; manche können trotz Anwesenheit von Licht keimen. Die Mistel aber braucht zum Keimen Licht.

Die Beziehung zur Erde

Charakteristisch ist, dass der Lebensraum dieses immergrünen Halbschmarotzer stets über der Erde ist (Wolff, 1975; Leroi, 1987). Auch aus dem sonstigen Verhalten kann man ablesen, dass die Mistel keine Beziehung zur Erde hat: Jede höhere Pflanze zeigt Geotropismus und Heliotropismus, das heißt sie richtet sich ein in eine gedachte Achse, die durch den Erdmittelpunkt geht, sich aber der Sonne zuneigt. Das einer Wurzel entsprechende Organ ist bei der Mistel der Senker, der sich im Ast des Wirtsbaumes völlig unabhängig von der räumlichen Lage ausbreitet. Aber auch die Stengel und Blätter zeigen keinerlei Heliotropismus, vielmehr bildet die Mistel einen runden Busch, der sich ohne Rücksicht auf die Verhältnisse von Erde und Sonne durch dichotome Teilung ausbreitet.

Eine Ausnahme stellt der immergrüne Mistelbusch außerdem mit der Tatsache dar, dass er den Erdrhythmus nicht mitmacht und bei den einzelnen Blättern die Blattoberseite gleich der Unterseite ist, was man sonst bei höheren Pflanzen nicht antrifft.

Die Beziehung zum Wasser

Eine starke Beziehung hat die Mistel auch zum Wasser (Wolff, 1975; Leroi, 1987): Oft bevorzugt sie Bäume mit eher feuchtem Standort, zum Beispiel in der Nähe von sumpfigen Gegenden oder an Ufern von Bächen, Flüssen und Seen, aber auch in felsigen Schluchten und an sonnigen Hängen.

Die Mistelblätter verdunsten außerdem sechsmal soviel Wasser wie die Blätter ihres Wirtsbaumes.

1.1.1.5 Die Mistel als Schadpflanze

Loranthaceae und Viscaceae können an befallenen Wald-, Zier- und Obstbäumen auf vielfältige Art Schäden hervorrufen. Hawksworth (1983) nennt folgende Möglichkeiten, die je nach Befallsstärke mehr oder minder deutlich auftreten können:

- Sie beeinträchtigen die Höhe und den Durchmesser.
- Sie setzen die Vitalität des Wirtes herab.
- Sie rufen eine vorzeitige Mortalität hervor.
- Sie mindern die Qualität und die Quantität des produzierten Holzes.
- Sie mindern den Fruchtansatz der infizierten Bäume.
- Sie bereiten den Boden für den Angriff anderer Schädlinge, wie zum Beispiel Insekten und Pilze.

Alle diese Punkte treffen auch für *Viscum album* L. zu. Chervera und Villaescusa (1977) schätzen, dass von Misteln befallene Tannen ein um 42 % geringeres Dickenwachstum haben. In manchen Fällen, wenn die Mistel weite Bereiche der Baumkrone eingenommen hat, kommt es auch zum Absterben der Wirtsbäume, insbesondere dann, wenn ungünstige klimatische Faktoren, wie zum Beispiel eine Trockenperiode, eintreten (Brossier, 1969).

1.1.2 Geschichte der Mistel als Arzneimittel

Wässrige Extrakte aus der Mistel werden seit Hippokrates als Naturheilmittel verwendet. Schon im Mittelalter wurde die Mistel als Heilpflanze gegen Epilepsie, „Milzsucht“, „Brustenge“, Fertilitäts- und Geburtsstörungen eingesetzt. Anfang des 19. Jahrhunderts fand die Mistel als blutdrucksenkendes Mittel Anwendung (Franz, 1985) und wurde bei degenerativen Gelenkserkrankungen verabreicht. 1920 empfahl Rudolf Steiner aufgrund der oben dargestellten biologischen Sonderstellung der Mistel den Einsatz als Krebstherapeutikum. Bis in die heutige Zeit haben sich verschiedene Arzneimittelfirmen verstärkt der Herstellung von Mistelextrakten auf unterschiedlichste Weise zugewandt. In zahlreichen erfahrungsheilkundlichen Berichten ist ihre positive Wirkung bei Krebspatienten beschrieben worden. Neben klinischen Studien haben auch immer mehr wissenschaftliche Arbeitsgruppen die in vitro Wirksamkeitsprüfung der verschiedenen Inhaltsstoffe aufgegriffen.

1.1.3 Wirkstoffe der Mistel

1.1.3.1 Viscotoxine

Proteine gehören zu den wichtigsten bekannten Inhaltsstoffen der Mistel. Die Viscotoxine repräsentieren eine Gruppe von mindestens fünf niedermolekularen Proteinen mit ausgesprochen basischem Charakter, die in der Zellkultur einen zytotoxischen Effekt aufweisen. Das erste Viscotoxin wurde 1948 von Winterfeld und Bijl beschrieben, die es als „Protein, ausschließlich aus Aminosäuren bestehend“ definierten. Die Toxizität dieser sowohl herztöxischen als auch blutdrucksenkenden Substanz betrug 1,8 mg als LD₁₀₀ je kg Kaninchen. Lange Zeit glaubte man, dass nur die Viscotoxine für die toxischen Wirkungen der Mistel verantwortlich seien. Jedoch tragen andere Proteine, wie die erst später entdeckten Lektine, ebenfalls zur Toxizität dieser Pflanze bei.

Die Extraktion der Viscotoxine geschieht durch Zerkleinerung der Pflanze in verdünnter Essigsäure, während die Reinigung durch mehrere Säulenchromatographien erfolgt. Diese Reinigungsmethode wird momentan verbessert mit Hilfe der „High Performance Liquid Chromatography“-Technik (HPLC).

Die Viscotoxine gehören zur Familie der α - und β -Thionine, einer Gruppe hochbasischer cysteinreicher Polypeptide und besitzen drei oder vier Disulfidbrücken (Florack und Stiekema, 1994). Aus den isolierten Proteinfractionen wurden die Viscotoxine A₁, A₂, A₃, B und 1-PS identifiziert, welche aus jeweils einer Polypeptidkette von 46–50 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 5.000 D bestehen (Schaller et al., 1996). Zunächst charakterisierten Samuelsson und Petterson (1970) das Viscotoxin A₃ als basisches Protein mit einem Molekulargewicht von 5.123 D und der Aminosäuresequenz von insgesamt 46 Aminosäuren. Olson und Samuelsson (1970) reinigten und charakterisierten dann Viscotoxin A₂ durch Chromatographie an DEAE-Zellulose, sie fanden ein Molekulargewicht von 4.833 D und Unterschiede zu A₃ in der Sequenz von nur drei Aminosäuren. Im gleichen Jahr wurde schließlich auch Viscotoxin B mit einem Molekulargewicht von 4.856 D identifiziert.

Das Hauptcharakteristikum dieser Substanzen ist ihr Reichtum an Lysin, Arginin und Histidin. Diese positiv geladenen Aminosäuren verleihen den Viscotoxinen ihren stark basischen Charakter und ermöglichen ihnen die Komplexbildung mit Nukleinsäuren. Sie können somit an die außen positiv geladene DNA-Doppelhelix binden. Dieses Verhalten erinnert an Histone, die bei der Regulierung genetischer Prozesse eine wichtige Rolle spielen (Konopa et al., 1980). Aufgrund der Disulfidbrücken einzelner Aminosäuren sind Viscotoxine sehr hitzestabil und weisen eine große Resistenz gegenüber Proteasen wie Trypsin und Chymotrypsin auf (Ribéreau-Gayon, 1986a).

Viscotoxine wirken auch bei Tieren toxisch. Eine intraperitoneale Applikation von 0,8 mg/kg Viscotoxin A bei Mäusen tötet die Hälfte der Tiere. Bei Katzen reichen schon 0,1 mg/kg, um

alle Tiere zu töten. In schwächeren Dosierungen rufen die Viscotoxine eine Hypotension, eine Bradykardie und eine negativ inotrope Wirkung auf den Herzmuskel hervor (Bloksma, 1979).

Das Wachstum von menschlichen Tumorzellen in Zellkultur wird durch Konzentrationen von 1 µg/ml Viscotoxin um 50 % gehemmt. Hela-Zellen können schon durch eine Konzentration von 0,2 µg/ml Viscotoxin um 50 % gehemmt werden (Franz, 1986; Ribéreau-Gayon, 1986a).

1.1.3.2 Lektine

Die ersten Beobachtungen über das Vorkommen von Lektinen in der Mistel wurden 1956 gemacht, und zwar aufgrund einer Agglutination menschlicher Erythrozyten durch wässrige Mistelextrakte. Seither wurde eine bedeutende Forschungstätigkeit entfaltet, um einerseits die chemische Struktur der Mistellektine, andererseits ihre biologische Aktivität aufzuklären. Bei diesen Glykoproteinen werden drei verschiedene Lektine mit unterschiedlicher Zuckeraffinität unterschieden (vgl. Tab. 1): ML-I bindet spezifisch an β -Galaktose, ML-III an N-Acetylgalaktosamin und ML-II kann an beide Zuckerarten binden (Franz et al., 1981). Von den Lektinspezialisten wurden diese Substanzen mit verschiedenen Namen bezeichnet. Einige sprechen von „Mistellektin“, andere von „Viscum-album-Agglutinin“ und einige von „Viscumin“ (Luther und Becker, 1987). Von den drei identifizierten Lektinen ist Lektin I das am meisten vorkommende und das am meisten zytotoxische.

Tab. 1: Eigenschaften der Mistellektine (Franz, 1985)

| Lektin | Molekulargewicht [D] | Kohlenhydratspezifität | Anzahl der Ketten | Molekulargewicht der Ketten [D] | |
|--------|----------------------|--|-------------------|---------------------------------|------------|
| ML-I | 115.000 | D-Galactose | 4 | 34.000 (B) | 29.000 (A) |
| ML-II | 60.000 | D-Galactose N-Acetyl-D-galactosamin | 2 | 32.000 | 27.000 |
| ML-III | 50.000 | N-Acetyl-D-galactosamin | 2 | 30.000 | 25.000 |

Die Lektine bestehen aus je einer A- und einer B-Kette, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Das ML-I kommt als Dimer vor (vgl. Abb. 1). Für die A-Kette sind verschiedene Isoformen beschrieben worden. Die B-Kette ist für die Zuckerbindung und für die Aktivierung der Makrophagen verantwortlich (Metzner et al., 1985). Die Aufgabe der A-Kette mit ihrer enzymatischen Aktivität besteht in der Hemmung der Proteinsynthese und der Stimulation der Lymphozyten zur Zytokinfreisetzung. Nur beide Ketten gemeinsam führen zur Zytotoxizität, da die B-Kette an die Zielzelle bindet und damit erst das Einschleusen der A-Kette ermöglicht wird (Franz, 1986). Die Hemmung der Proteinsynthese beruht auf der RNA-N-Glykosidase-Aktivität der A-Kette, die durch die Spaltung der N-glykosidischen Bindung in der 28-rRNA auf ribosomaler Ebene eingreift (Endo et al., 1988).

Das Gesamtmolekül von Mistellektin I wirkt stark zytotoxisch in der Zellkultur. In der Konzent-

ration von 5 ng/ml hemmt es das Wachstum menschlicher MOLT-4 Leukämiezellen stark. Bei Hepatomzellen der Ratte (HTC) ist eine hundertmal stärkere Konzentration nötig, um den gleichen Effekt zu erzielen. Es scheint, dass der zytotoxische Effekt der Lektine von der Fähigkeit der Zellen zur Bindung dieser Moleküle abhängt. Franz et al. (1982) hatten darauf hingewiesen, dass die zytotoxische Potenz der Lektine in Beziehung steht zur Menge der Galactosyl-Reste auf der Zielzelle.

Mistlektin I ist nicht nur zytotoxisch; es kann auch die immunologischen Eigenschaften gewisser Zellen stimulieren (vgl. Tab. 2). Metzner et al. (1985) haben gezeigt, dass sich Mistlektin I und die B-Kette in schwachen Konzentrationen, wo noch kein zytotoxischer Effekt besteht, an Makrophagen heften und so deren Sekretion von Lymphokinen stimulieren können. Die A-Kette hat keinen Effekt auf die Makrophagen. Hingegen stimuliert sie in sehr schwachen Dosen die Vermehrung der Lymphozyten.

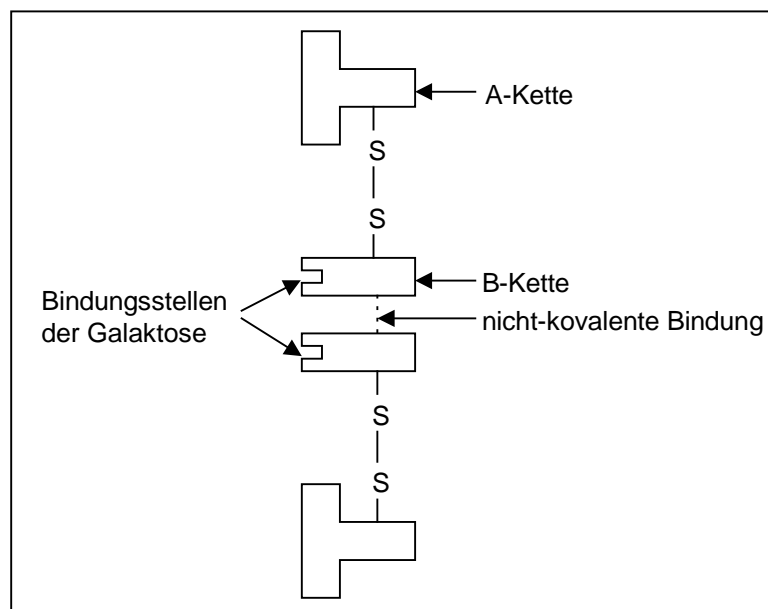


Abb. 1: Strukturmodell für das Mistlektin I (Franz et al., 1982)

Tab. 2: Biologische Eigenschaften von Mistellektin I und seiner A- und B-Kette (Franz, 1985)

| | |
|--------------------------|--|
| Komplettes Lektin | Bestehend aus zwei A- und zwei B-Ketten <ul style="list-style-type: none"> – Bindung an Kohlenhydrate – Aktivierung von Makrophagen – Zytotoxizität |
| A-Kette | Enzym <ul style="list-style-type: none"> – Hemmung der Proteinsynthese – Mitogener Effekt – Produktion von Lymphokinen durch Lymphozyten – keine Bindung an Kohlenhydrate – keine Zytotoxizität |
| B-Kette | Lektin <ul style="list-style-type: none"> – Bindung an Kohlenhydrate – Aktivierung von Makrophagen – keine Zytotoxizität – kein Effekt auf die Proteinsynthese |

1.1.3.3 Vester'sche Proteine

1960 zeigten Vester und Mai, dass ein Mistelextrakt das Wachstum eines Sarkoms bei Ratten verhinderte. Dieser Effekt verschwand aber nach Denaturierung des Extraktes durch Erhitzung oder durch pH-Erhöhung. Zwei Jahre später charakterisierte Vester einen aus zehn verschiedenen Fraktionen bestehenden Proteinkomplex mit einem Molekulargewicht von 60.000 D (vgl. Tab. 3). Darunter befinden sich die drei Hauptkomponenten (6, 7, 8), die über 60 % des Gesamtkomplexes ausmachen und im Molekularbereich von rund 30.000 D liegen. Diese Proteine sind basisch und können sich ähnlich wie Histone an Nukleinsäuren binden. Im Molekulargewicht liegen sie jedoch (mit Ausnahme von Komponente 9 und 10) höher als die üblichen Histone. Vester machte darauf aufmerksam, dass unter den Aminosäuren des Mistelpresssaftes Arginin mit 40,2 % und Prolin mit 10,2 % durch einen ungewöhnlich hohen Anteil auffallen, während Glutamin und Asparagin sowie Tryptophan fehlen. Dieses von Vester „VP-16“ genannte Proteingemisch befindet sich gewissermaßen im Grenzgebiet zwischen teilfraktioniertem Rohextrakt und charakterisierten Wirksubstanzen.

Tab. 3: Proteinkomponenten von VP-16 (Vester, 1977)

| Komponenten | Molekulargewicht [D] | %-Anteil |
|-------------|----------------------|----------|
| 1 | 125.000 | 6,0 |
| 2 | 70.000 | 6,8 |
| 3 | 63.000 | 9,0 |
| 4 | 50.000 | 4,0 |
| 5 | 48.000 | 5,4 |
| 6 | 33.000 | 19,8 |
| 7 | 30.000 | 25,3 |
| 8 | 24.000 | 16,8 |
| 9 | 18.000 | 2,2 |
| 10 | 14.000 | 4,6 |

1968 entdeckten Vester et al., dass bestimmte Viscum-Proteine zu Substanzen mit der höchsten zytostatischen Wirkung gehören, die bekannt sind. In Tabelle 4 sind die Dosis-Effekt-Werte einiger Zytostatika im Vergleich zu VP-16 und VP-161 aufgeführt. Die Charakterisierung dieser Proteinfractionen gelang Vester mittels Elektrophorese und ihre Isolierung mittels Chromatographie.

Tab. 4: Dosis-Effekt-Werte einiger Zytostatika (Vester et al., 1968)

ID₅₀: Die Inhibitions-Dosis 50 in µg/ml entspricht derjenigen Menge eines Präparates, welche die Zellvermehrung nach 40-stündiger Inkubation um 50 % zu hemmen vermag.

Zellen: Mastozyten P-815-Suspensionskultur (100.000 Zellen/ml)

| Substanz | Zellkultur ID ₅₀ [µg/ml] |
|----------------------|-------------------------------------|
| Endoxan | 3,7 |
| 5-Fluor-uracil | 3,7 |
| 6-Mercapto-purin | 3,3 |
| Thioguanosin | 1,9 |
| Thio-TEPA | 1,8 |
| Methotrexat | 6,8 |
| Thioguanin | 4,8 |
| Mechloräthamin | 1,8 |
| Dichlormethotrexat | 2,8 |
| 5-Fluor-desoxyuridin | 1,2 |
| Colchicin | 4,7 |
| Vinealeucoblastin | 4,1 |
| Actinomycin D | 3,2 |
| Viscum-Protein-16 | 1,7 |
| Viscum-Protein-161 | 1,7 |

Der Gesamtkomplex dieser Vester'schen Proteine wirkt gegenüber Tiertumoren toxisch; zum Beispiel wird das Wachstum von implantierten Ascites-Zellen bei Mäusen oder Ratten bereits ab einer Dosierung von 0,3 µg/kg und Tag um 50 % gehemmt. Nach Vesters Berechnungen entspricht dies einer Menge von 76 aktiven Proteinmolekülen pro Tumorzelle. Bei transplantierten Mäusefibroblasten wird eine 50%ige Tumorchemmung durch Injektion von 50 µg VP-16/kg und Tag erreicht. In vitro hemmt VP-16 die Synthese von DNA und RNA bei Ehrlich-Ascites- oder Yoshida-Ascites-Zellen. Die RNA-Synthese wird durch den gesamten Komplex VP-16 gehemmt und auch durch einige seiner einzelnen Fraktionen. Die DNA-Synthese wird hingegen nur durch den Gesamtkomplex gehemmt (Vester, 1977).

Zusätzlich zu seinem zytostatischen Effekt weist VP-16 auch eine sehr starke antigene Wirkung auf. Bei Mäusen und Ratten verursacht dieser Komplex eine erhebliche Thymusvergrößerung. Durch eine Dosis von 1 µg/kg und Tag wird nach 17 Tagen eine dreifache Vergrößerung des Thymusgewichtes erreicht. Hingegen führt eine Dosis von 100 µg/kg zu einem toxischen Effekt mit Zusammenbruch des Immunsystems.

1.1.3.4 Polysaccharide

Der Schleim der Mistelbeere wurde von Mangelot et al. (1948) histochemisch und papierchromatographisch nach Hydrolyse analysiert. Danach besteht dieser klebrige, leimartige Extrakt, der auch als Viscin bezeichnet wird, aus einer Zelloseschicht, die von einer Pektinschicht umkleidet ist. Die Chromatographie erbrachte im Wesentlichen esterifizierte Derivate von D-Galacturonanen mit einem mittleren Molekulargewicht von 42.000 D. Des Weiteren wurde ein Arabinogalactan von 110.000 D isoliert. In den Blättern und Stengeln ist der D-Galacturonan-Gehalt am höchsten, in den Beeren überwiegt der Arabinogalactan-Gehalt. Mistellektin I kann sich an Polysaccharide binden und so Lektin-Arabinogalactan-Komplexe bilden. In verschiedenen Toxizitätstests bei Makrophagen und menschlichen Granulozyten sowie bei Mäusezellen hat der Lektin-Arabinogalactan-Komplex ähnliche Wirkungen wie das reine Lektin.

1.1.3.5 Arginin

Die Mistel enthält einen hohen Anteil an freien Aminosäuren. Vester und Mai (1960) zeigten, dass der Anteil des Arginins am Gesamtgehalt der Aminosäuren 37–40 % ausmacht. Ihre Arbeiten weisen darauf hin, dass Arginin die Resistenz gegenüber Tumoren verstärkt. Diese Resistenz scheint an eine Thymusvergrößerung gebunden zu sein, die zu einer Stimulierung der Immunabwehr führt.

1.1.3.6 Vitamin C

Wie die meisten wilden Beeren, enthält auch die Mistel viel Vitamin C, nämlich ca. 750 mg auf 100 g Beeren. In den Blättern und Stengeln ist der Gehalt geringer, jedoch immer noch beachtlich. Im 10%igen Iscador (entsprechend 100 mg Frischpflanzenextrakt pro ml) betrug der von Flückiger bestimmte Vitamin C-Gehalt 77 mg/l (Leroi, 1987).

Bei der als Vitamin C bezeichneten Ascorbinsäure ($C_6H_8O_6$) handelt es sich um eine wasserlösliche, hitzlabile Hexuronsäure, die durch Oxidation zerstört wird. Unter dem Begriff Vitamin C werden die L-Ascorbinsäure und ihr erstes Oxidationsprodukt, die Dehydro-L-Ascorbinsäure, zusammengefasst, die beide in tierischem und pflanzlichem Gewebe vorkommen und gemeinsam ein Redoxsystem bilden (Pschyrembel, 1994).

Vitamin C spielt eine bedeutende Rolle im Abwehrsystem des Körpers gegen Oxidantien. Es stabilisiert aktive Sauerstoffmoleküle, die zur Induktion und zur Fortpflanzung von Oxidati-

ons-Kettenreaktionen führen. Die wohl wichtigste Reaktion bei der Oxidationsinhibition durch die Ascorbinsäure ist das Abfangen von freien Radikalen, die mit der Tumorentstehung in Verbindung gebracht werden.

1.1.3.7 Vesikel

Im Zuge der Kolloidoptimierung von Mistelpräparaten (bisher erst bei dem Präparat ABNOBA Viscum durchgeführt) treten die genuinen Membransysteme, die sich bei dem angewendeten Homogenisierungsverfahren spontan zu Vesikeln formen, auf. Darunter werden die chlorophyllhaltigen Membranbestandteile der Mistel verstanden, die aber erst während der Präparation ihre endgültige kugelige Form erhalten. Sie sind ca. 50–350 nm groß (Scheffler et al., 1993). Von den Vesikeln ist bisher keine immunologische Kompetenz bekannt. Auch liegen über die tumorhemmenden Einflüsse nur Vermutungen vor (Selawry und Schwartz, 1961).

1.1.3.8 Alkaloide

Da die in geringem Maße vorkommenden Alkaloide sehr labil sind und damit die Bearbeitung im Labor erschwert ist, ist der diesbezügliche Wissensstand eher als niedrig zu bezeichnen.

1.1.3.9 Flavonoide

Bei den Flavonoiden handelt es sich um eine Stoffklasse, die ubiquitär im Pflanzenreich verbreitet ist. Durch unterschiedlichen Oxidationsgrad des heterozyklischen Ringes in den Flavonoiden und durch unterschiedliche Hydroxylierung, Methoxylierung und Glykosidierung ergibt sich eine große Vielfalt innerhalb der Stoffgruppe. Die Flavonoidführung ist häufig Taxon-spezifisch (Harborne, 1973) und eignet sich damit als Marker für die Klassifizierung der Pflanzen. Bereits 1955 hatte Schindler auf das Vorhandensein von Flavonoiden in *Viscum album* L. hingewiesen. Bate-Smith (1962) stellte in einer Übersichtsarbeit über pflanzliche Phenole fest, dass *Viscum album* L. weder Myricetin, Delphinidin oder Cyanidin noch Quercetin enthält. Tronchet (1972) untersuchte papierchromatographisch Misteln von sechs verschiedenen Wirtsbäumen und konnte, ohne sie näher zu charakterisieren, Flavonoide nachweisen. Diese Flavonoide stimmten nicht mit denen der entsprechenden Wirtsbäume überein.

1.1.3.10 Phenylpropane, Lignine und Lignane

Freudenberg (1968) hatte aufgrund des Methoxylwertes der Mistelholzlignine die Vermutung geäußert, dass die Ligninzusammensetzung mit der jeweiligen Wirtspflanze übereinstimmt. Das bedeutet, dass Misteln auf Laubhölzern typische Laubholzlignine mit einem hohen Anteil an Syringylbestandteilen hätten, während Misteln auf Koniferen typische Koniferenlignine mit einem hohen Anteil an Koniferylalkohol hätten. Durch histologische, chemische, chromatographische und spektroskopische Methoden (Becker und Nimz, 1974) konnte jedoch zweifelsfrei geklärt werden, dass sowohl das Lignin der auf Laubhölzern als auch der auf

Nadelhölzern gewachsenen Misteln den Laubholzligninen zuzurechnen ist. Allerdings gibt es Unterschiede in der Ligninzusammensetzung. Aufgrund von ^{13}C -spektroskopischen Daten (Nimz et al., 1974) zeigte sich, dass das Lignin der Kiefernmisteln weniger Syringyleinheiten besitzt als das der anderen Mistellignine.

Die Zusammensetzung der einzelnen Inhaltsstoffe variiert in Abhängigkeit vom Wirtsbaum, dem Herstellungsverfahren des Mistelpräparates sowie den verwendeten Pflanzenteilen (Scheer et al., 1995, Scheffler et al., 1993). Laubholzmisteln enthalten beispielsweise mehr Lektin als Nadelholzmisteln (Schink und Mechelke, 1989; Schink und Mechelke, 1992).

1.1.4 Wirksamkeiten der Mistelinhaltsstoffe

Über tumorhemmende bzw. zytotoxische Effekte von wässrigen Mistelextrakten bzw. dem Mistellektin ist in der Literatur immer wieder berichtet worden (Büssing et al., 1995a; Beuth et al., 1994; Scheffler et al., 1993; Bantel und Breuninger, 1990; Jung et al. 1990; Doser et al., 1989; Franz, 1985). Am besten wurde die zur Behandlung von Tumorpatienten verwendete Mistel *Viscum album* untersucht. Es wurde aber auch mit der Koreanischen Mistel (*Viscum coloratum*) im Maussystem die Hemmung der Metastasierung nachgewiesen (Yoon et al., 1995).

Viele Arbeitsgruppen hatten zunächst Interesse an der Aufklärung des zytotoxischen Effektes. Anhand von Tier- und Zellkulturexperimenten konnte der toxische Einfluss der wässrigen Mistelextrakte sowie der drei Mistellektine aufgezeigt werden (Janssen et al., 1993; Ribéreau-Gayon et al., 1986a + b). Beuth et al. (1991) konnten durch subkutane Injektion von ML-I die Anzahl der inokulierten Tumorkolonien signifikant reduzieren. Fiebig (in Scheffler et al., 1993) zeigte, dass in Nacktmäusen induzierte Tumoren sich durch direkte Injektion des Mistelpräparates auflösen. Es wurde nachgewiesen, dass Mistelextrakte und Mistellektin Zellen durch Apoptose absterben lassen (Janssen et al., 1993; Büssing et al., 1996c).

Kovacs et al. (1991) zeigten die Verbesserung der DNA-Reparatur in Lymphozyten unter Iscadorbehandlung. Büssing et al. (1994) konnten belegen, dass *Viscum album* den Schwesterchromatidaustausch in peripheren mononukleären Zellen reduziert.

Bei der hochdosierten Mistelbehandlung mit dem Präparat Vysorel wurde eine stimmungsaufhellende Wirkung beschrieben (Wolf et al., 1994). Heiny und Beuth (1994a + b) konnten zeigen, dass die ML-I-Behandlung bei Mammakarzinom-Patientinnen zur β -Endorphin- und Zytokinausschüttung führt. Diese Ergebnisse erklären einen psychosomatischen Wirkungspfad von Mistelpräparaten.

In Tierexperimenten hat sich gezeigt, dass Mistelextrakte das Immunsystem aktivieren. Nach intraperitonealer Injektion von Iscador Mali in Mäusen über einen Zeitraum von sechs Tagen nahm deren Thymusgewicht zu (Bloksma et al., 1982). Werden Makrophagen von Mäusen mit *Viscum album* Extrakt inkubiert und injiziert man diese voraktivierten Makrophagen intra-

peritoneal Mäusen, so erhöht sich der Tumorschutz (Kuttan, 1993). Beuth et al. (1991) injizierten Mäusen ML-I und bestimmten die Makrophagentätigkeit mit Hilfe des Chemoluminiszenztestes, der als Maß für die Aktivierung von Zellen die Freisetzung von Sauerstoffradikalen misst. Sie stellten gegenüber unbehandelten Mäusen eine signifikant gesteigerte Chemolumineszenz fest. Beuth et al. (1993b) konnten bei Mäusen, denen sie 1 ng Lektin/kg Körpergewicht subkutan injizierten, eine signifikante Zunahme der Thymozyten/mg Organgewicht messen.

Auch beim Menschen führte die Iscador-Mali Behandlung zu einer deutlich erhöhten Aktivität der Leukozyten im Chemoluminiszenztest (Hajto, 1986a und b; Hajto et al., 1989). Neben der Erhöhung der LGL-Zellfrequenz konnte Hajto (1986a und b) auch eine verstärkte NK- und ADCC-Zellaktivität feststellen (ebenso Hamprecht et al., 1987). Beuth et al. (1992) untersuchten den Einfluss von subkutanen ML-I Injektionen. Nach vierwöchiger Behandlung konnten sie anhand von FACS-Messungen (Fluorescence-activated cell sorter) einen Anstieg der NK- und T-Helferzellen messen. Auch bei Mammakarzinom-Patientinnen wurde eine immunaktive Wirkung des ML-I festgestellt (Beuth et al., 1995). Stein und Berg (1994) konnten zeigen, dass Lymphozyten von Allergikern mit Iscador Pini sehr gut proliferierten. Lymphozyten anderer unbehandelter Probanden zeigten dieses Verhalten nur zum Teil. Iscador Pini führte bei den Allergikern und stimulierten Gesunden zur Freisetzung von TNF- α , IL-6 und GM-CSF. Stein (1995) konnte nachweisen, dass mononukleäre Zellen von mistelbehandelten Tumorpatienten bei Stimulation mit Iscador Pini TNF- α und IL-6 und mit Helixor TNF- α , IL-6 und IL-4 sezernieren. Auch konnte sie den prozentualen Anstieg von pan T- und T-Helfer-Populationen nach in vitro Stimulation mit Iscador Pini mittels FACS-Analyse messen.

Die Freisetzung der Zytokine IL-1 α und β , IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ und GM-CSF nach Behandlung mit Mistelextrakten bzw. -lektin wurde sowohl in Tierexperimenten als auch in klinischen Studien nachgewiesen (Männel et al., 1991; Hajto et al., 1990a; Stein et al., 1998a; Schultze et al., 1991; Ribéreau-Gayon et al., 1997; Hülsen und Born, 1993).

Beuth et al. (1993b) untersuchten die therapeutische Verabreichung von galaktosidspezifischem ML-I auf den Serumspiegel definierter Proteine von Tumorpatienten. Regelmäßige subkutane Injektionen riefen bei allen Patienten eine ausgeprägte Akutphasereaktion hervor. Besonders auffällig war der signifikante Anstieg von c-reaktivem Protein (CRP), Haptoglobin, Coeruloplasmin, des Komplementfaktors C3, Albumin und Ig M im Serum der Patienten unter ML-I-Therapie, während die Serumkonzentrationen von Transferrin, des Komplementfaktors C4 sowie der Immunglobuline Ig G und Ig A eher unauffällige Veränderungen aufwiesen.

1.1.5 HELIXOR-Mistelpräparate

1.1.5.1 Zusammensetzung

HELIXOR ist ein wässriger Frischpflanzenextrakt, der aus Stengeln, Blättern, Blüten und Beeren ein- und zweijähriger Pflanzen ausgelesener weißbeeriger Misteln (*Viscum album* L.) gewonnen wird. Die Herstellung erfolgt ohne bakterielle Fermentation unter Anwendung spezieller Mischverfahren. Die Sterilität wird durch Sterilfiltration gewährleistet, und außer Natriumchlorid zur Isotonisierung werden keinerlei Zusatzstoffe (Konservierungsstoffe o. ä.) zugefügt (o. V., 1995).

Die zur Herstellung einer wässrigen Ampulle Auszuges verwendete Frischpflanzenmenge ist in mg angegeben (so wurden z. B. 100 mg Tannenmistel-Frischpflanze zur Herstellung einer Ampulle HELIXOR A 100 mg verwendet).

Die Verabreichung erfolgt subkutan und jedes Präparat ist in folgenden Dosen erhältlich:

- Ampullen zu 1 ml: 0,01 mg, 1 mg, 5 mg, 10 mg, 20 mg, 30 mg, 50 mg
- Ampullen zu 2 ml: 100 mg

1.1.5.2 Herstellungsverfahren

Je nach Wirtsbaum, Standort und Jahreszeit weisen Inhaltsstoffe der Mistel deutliche Unterschiede auf. Es ist deshalb von größter Bedeutung, definierte Subspezies an konstanten Ernteorten zu bestimmten Zeiten zu ernten.

Die Erntegebiete liegen weitab von industriellen und verkehrsbedingten Emissionen und werden bei ihrer Auswahl auf Schadstoffbelastung untersucht. Von jedem Wirtsbaum werden je zwei Ernten im Winter und im Sommer durchgeführt, wobei nur einwandfreie junge Pflanzenteile verwendet werden. Diese werden handverlesen und in frischem Zustand weiterverarbeitet, um Wertverluste zu vermeiden. Die schonende wässrige Extraktion erfolgt getrennt für die Sommer- und Winterernten jeder Mistelart. Zum optimalen Auszug der Wirkstoffe aus der zerkleinerten Pflanze wird die Flüssigkeit eine Stunde lang verwirbelt. Die so hergestellten Sommer- und Winterextrakte werden mittels spezieller Wirbelverfahren vermischt, dabei wird der Sommersaft in den strömenden Wintersaft eingetropft. Die fünfprozentigen gemischten Säfte werden dann zur Herstellung verschiedener Konzentrationen in einem weiteren Arbeitsgang entsprechend verdünnt und isotonisiert. Danach wird das Produkt sterilfiltriert und ampulliert, wobei eine Hitzesterilisation wegen der empfindlichen Mistelproteine bewusst nicht durchgeführt wird.

Zur Standardisierung wird von jeder Charge der biologische Effekt auf MOLT-4-Zellkulturen untersucht. Im Vergleich zur Bestimmung eines einzelnen Inhaltsstoffes, die bei Vielstoffgemischen wie Mistelextrakten geringe therapeutische Relevanz besitzt, hat dieser Test den großen Vorteil, dass er die Gesamtaktivität von HELIXOR auf ein biologisches System er-

fasst. Außerdem werden Trockenrückstand, pH-Wert, Absorption bei 268 und 366 nm sowie die Osmolarität bestimmt. Chargen, die sich außerhalb der festgelegten Grenzen bewegen, kommen nicht in den Handel.

HELIXOR ist bei sachgemäßer Lagerung (4–25° C im Dunkeln) zwei Jahre haltbar, jede Ampulle ist mit dem Verfallsdatum versehen (o. V., 1995).

1.1.5.3 Wirkungsweise

In Tumorzellkulturen, z. B. an MOLT-4-Leukämiezellen, ist ein dosisabhängiger zytostatischer und zytotoxischer Effekt bei HELIXOR-Konzentrationen im mg-Bereich pro ml nachweisbar. Es ist jedoch nicht zulässig, die Ergebnisse dieser in vitro-Untersuchungen auf die Verhältnisse in vivo zu übertragen, da dieser Effekt in vivo durch Antikörperbildung gegen toxische Mistelproteine neutralisiert wird (Stettin et al., 1990).

Tatsächlich zeigt die klinische Erfahrung, dass Tumorremissionen, wie sie bei Chemotherapie-sensiblen Tumoren beobachtet werden, durch HELIXOR nur ausnahmsweise zu erzielen sind. Auch die Nebenwirkungen der Zytostase fehlen.

Dagegen kann durch HELIXOR bei inoperablen oder metastasierten Tumoren in vielen Fällen eine Verlangsamung der Tumorprogression, oft auch ein Wachstumsstillstand bewirkt werden. Im Vordergrund steht eine deutliche Besserung des Allgemeinzustandes einschließlich der psychischen Befindlichkeit, die auch bei Patienten beobachtet werden kann, deren Tumorverhalten unter der Misteltherapie keine Änderung erfährt. Dies geht einher mit einer in Studien belegten Verlängerung der Überlebenszeit (o. V., 1995).

Zum Verständnis der Mistelwirksamkeit ist zu bedenken, dass bei der Entwicklung eines manifesten Tumors nicht nur die bekannten Faktoren der Karzinogenese (Initiierung durch Karzinogene, Einfluss von Syn- und Kokarzinogenen und Promotoren in der Latenzperiode) eine Rolle spielen, sondern auch die mehr oder weniger ausgeprägten Abwehr- und Regulationsvorgänge des Organismus (Repariemechanismen auf der Ebene der DNA, Immunüberwachung, Faktoren der unspezifischen Resistenz, Vorgänge der Wachstumsregulation und der Regeneration). Ob ein Tumor entsteht oder nicht, ob er sich ausbreitet oder nicht, hängt von der Situation des Gesamtorganismus ab. In dieses Verhältnis zwischen „Wirt“ und Tumor greifen die gängigen onkologischen Therapieverfahren überwiegend auf der Seite des Tumors, die HELIXOR-Therapie auf der Seite des menschlichen Organismus ein. Immunmodulierende Eigenschaften von HELIXOR sind durch zahlreiche Arbeiten belegt (Beuth et al., 1992 + 1993a; Hajto et al., 1990a + b; Hülsen und Born, 1993; Stein und Berg, 1998b). Doch beschränkt sich die Wirksamkeit der HELIXOR-Therapie nicht auf immunmodulierende Wirkungen, was durch therapeutische Erfahrungen wie Beeinflussung der Gesamtbefindlichkeit des Patienten, Linderung von Tumorschmerzen oder Anregung der normalen Knochenmarkstätigkeit ersichtlich wird (o. V., 1995).

Die Beobachtung, dass entzündliche Vorgänge im Körper prinzipiell gefördert werden, trägt

wesentlich zum Verständnis der Mistelwirkung wie auch der Nebenwirkungen bei. Hierbei spielen Zytokine als Mediatoren eine wichtige Rolle: Nachgewiesen wurde u. a. die vermehrte Ausschüttung von $\text{TNF}\alpha$, Interleukin 1 und 6, γ -Interferon und GM-CSF (vgl. Abb. 2). Mit folgenden entzündlichen Reaktionen auf HELIXOR-Injektionen ist zu rechnen (Matthiesen und Tröger, 1995; o. V., 1995):

- Entzündliche Lokalreaktion an der Injektionsstelle, die vorwiegend in der Einleitungsphase auftritt
- Anstieg der Körpertemperatur, zuweilen bis in den febrilen Bereich
- Leukozytenanstieg nach Mistelinjektion mit Vermehrung der Neutrophilen, Eosinophilen und Lymphozyten
- Anstieg der Akut-Phase-Proteine
- Anstieg der zytotoxischen Komplement-Aktivität
- Verstärkung der peritumoralen entzündlichen Reaktionen

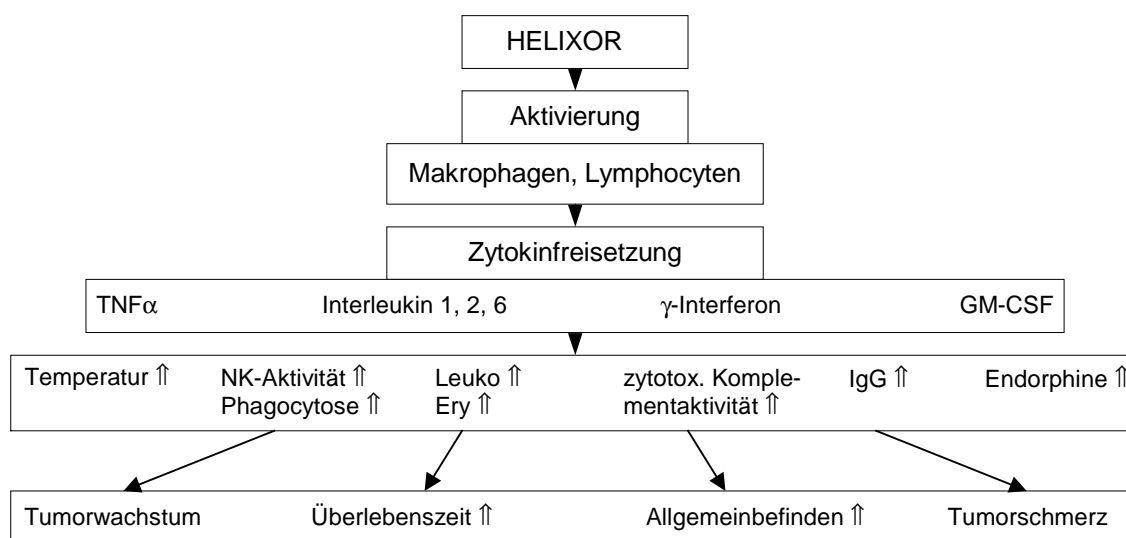


Abb. 2: *Stimulation des Immunsystems durch VAL-Applikation (o. V., 1995)*

1.1.5.4 Indikationen

Gemäß den „Richtlinien für die Therapie mit Helixor“ (o. V., 1995) können grundsätzlich zwei Anwendungsbereiche unterschieden werden:

- onkologische Therapie (Medikamentöse Behandlung von soliden Malignomen; Begleitbehandlung bei malignen Systemerkrankungen wie maligne Lymphome, Plasmozytome und Leukämien; postoperative Rezidivprophylaxe; definierte Präkanzerosen)
- Stimulation des Knochenmarks bei primären Knochenmarkerkrankungen und therapiebedingter Myelosuppression

1.1.5.5 Wahl des Präparates

Aus drei verschiedenen botanischen Subspezies der weißbeerigen Mistel werden folgende HELIXOR-Präparate hergestellt:

- HELIXOR A (Abietis) aus der Tannenmistel (*Viscum album* subspezies abietis, var. *Abietis albae*)
- HELIXOR M (Mali) aus der Apfelbaummistel (*Viscum album* subspezies album, var. *Mali hybridae*)
- HELIXOR P (Pini) aus der Kiefernmistel (*Viscum album* subspezies austriacum, var. *Pini sylvestris*)

Zwischen den einzelnen Sorten sind neben den botanischen Merkmalen folgende Unterschiede bekannt (o. V., 1995):

- * Eine qualitativ und quantitativ differente stoffliche Zusammensetzung
- * Empirisch belegte Unterschiede hinsichtlich der entzündungsstimulierenden Wirkung: Erfahrungsgemäß wirkt HELIXOR M am stärksten entzündungsstimulierend (Lokalreaktion, Fieber), gefolgt von HELIXOR P und HELIXOR A. HELIXOR A dagegen zeigt die beste Verträglichkeit, die stärkste roborierende Wirkung und kommt deshalb für Patienten im Endstadium, mit schlechtem Allgemeinzustand, bei bekannter allergischer Diathese, bei starken Lokalreaktionen oder für eine Desensibilisierung am ehesten in Frage.

Ansonsten haben sich die folgenden Hinweise als Basis der Therapie mit HELIXOR bewährt (Kast und Hauser, 1990a; o. V., 1995):

HELIXOR A für männliche Patienten und folgende Indikationen, unabhängig vom Geschlecht:

- Kopf- und Halstumoren
z. B. Hirntumoren, Tumoren des HNO-Bereiches, Schilddrüsenkarzinom
- Leukämien (außer CLL)
z. B. akute Leukämien (ALL, AML), chronisch myeloische Leukämie (CML)
- Paraproteinämien
z. B. Plasmozytom, Makroglobulinämie Waldenström, bestimmte Formen von Non-Hodgkin-Lymphomen: Lymphoplasmozytoide (Immunozytom) und plasmozytische maligne Lymphome
- Desensibilisierung bei Allergien

HELIXOR M für weibliche Patienten (ausgenommen die bei HELIXOR A und HELIXOR P angeführten Indikationen).

HELIXOR P für folgende Indikationen, unabhängig vom Geschlecht:

- Hauttumoren
z. B. malignes Melanom, Basaliom, Spinaliom, Plattenepithelkarzinom der Haut-Schleimhaut-Übergänge
- Neoplasien des lymphatischen Systems
z. B. Morbus Hodgkin und Non-Hodgkin-Lymphom, chronisch lymphatische Leukämie (CLL), Thymom, Appendixkarzinom
- Sonstige Tumoren
Mammakarzinom bei asthenischer Konstitution, Morbus Paget der Mamma, inflammatorisches Mammakarzinom, Hodenkarzinom (Seminom, embryonales oder Teratokarzinom)
- Anregung der Knochenmarkfunktion

1.2 Zelltod: Apoptose und Nekrose

1.2.1 Nekrose

1.2.1.1 Inzidenz

Die Nekrose (abgeleitet von griechisch *nekrosis* für Tod, Tötung, Absterben) wird auch als "accidental cell death" bezeichnet und beschreibt das pathologisch bedingte Absterben von Zellen. Bei dieser passiven, degenerativen und katabolischen Form des Zelltodes gehen Gewebe infolge einer plötzlichen mechanischen Verletzung oder einer anderen irreparablen Schädigung zugrunde. Das nekrotisch bedingte Absterben von Zellen wird nach einer Schädigung durch Hypoxie, Hyperthermie oder Ischämie beobachtet und kann durch eine Vielzahl physikalischer und chemischer Traumata, Sauerstoffmangel, Blockierung der oxidativen Phosphorylierung und der Glykolyse sowie durch Hemmung von Krebs-Kreislauf-Enzymen ausgelöst werden (Wyllie et al., 1980; Trump und Berezsky, 1992; Darzynkiewicz et al., 1997; Duke et al., 1997).

1.2.1.2 Morphologie

Die frühesten morphologischen Veränderungen des nekrotischen Zelltodes schließen leichte zytoplasmatische Oedembildung, Ausdehnung des endoplasmatischen Retikulums, Anschwellung der Mitochondrien, Auflösung der Ribosomen, Trennung der Polysomen, verstärkte Autophagozytose, unregelmäßige Kondensierung des Kernchromatins und schließlich die langsame Auflösung des Nukleus (Karyolyse) ein (Wyllie et al., 1980).

Unter dem Mikroskop sind nekrotische Zellen durch die charakteristische Schwellung zu erkennen, die auftritt, weil Organellen wie insbesondere die Mitochondrien und die Zelle selbst sich aufblähen und zerplatzen. Wegen der massiven Membranschädigung vermag sie nämlich ihren Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt nicht mehr zu kontrollieren, und vor allem Natrium- und Calcium-Ionen, die normalerweise hinausbefördert werden, dringen nun ungehindert ein und mit ihnen Wasser, was die Membranen schließlich bersten lässt (Duke et al., 1997). Die aus dem Verlust der Membranintegrität und des osmotischen Gleichgewichtes resultierende Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration hemmt gewisse enzymatische Reaktionswege wie zum Beispiel die ATP-Produktion, während die Proteolyse stimuliert wird (Schwartz und Osborne, 1993). Somit ist zugleich auch ein entzündlicher Prozess charakteristisch für Nekrosen, denn durch die Freisetzung von Zellfragmenten in das umliegende Gewebe und die verstärkte Produktion von proteolytischen Enzymen kommt es zu entzündlichen Reaktionen: Im Organismus umherwandernde Immunzellen sammeln sich an den geschädigten Körperzellen und verschlingen sie. An sich hilft die damit einhergehende Entzün-

dung, einen Infektionsherd zu begrenzen und anfallende Zelltrümmer zu entfernen; doch können die Immunzellen und die von ihnen abgegebenen Stoffe mitunter auch benachbartem gesundem Gewebe erheblich schaden (Duke et al., 1997).

1.2.1.3 Mechanismus

Das hervorstechendste morphologische Ereignis bei der Nekrose ist das zelluläre Anschwellen und der Defekt ist im essentiellen Verlust der Zellvolumen-Kontrolle zu sehen. Dieser Verlust der selektiven Membranpermeabilität und des osmotischen Gleichgewichtes ist Basis vieler Tests zur Viabilität von Suspensionszellen: Solche Essays beeinhaltet den Ausschluss von Vitalfarbstoffen (z. B. Trypanblau) und die Fähigkeit, zuvor radioaktiv markierte Substanzen (z. B. Chrom), zurückzubehalten. Die Ergebnisse dieser Tests (Transmembran-Defekte, anormale Permeabilität für Marker-Moleküle) zeigen, dass der Verlust der Membranintegrität aufgrund des Zusammenbruchs der zellulären Energieversorgung morphologischen Veränderungen der Nekrose vorausgeht und diese auch verursacht. Auf den Verlust der Membranintegrität und der Homeostase folgt die nun irreparable Schädigung der Mitochondrien ("point of no return"), d. h. der nekrotischen Zelle wird die Quelle des oxidativen Metabolismus und die Möglichkeit, das osmotische Gleichgewicht wiederherzustellen, endgültig genommen (Wyllie et al., 1980; Darzynkiewicz et al., 1997).

1.2.2 Apoptose

1.2.2.1 Inzidenz

Kerr et al. erkannten 1972, dass es sich bei dem Zellsterben während der Entwicklung und bei dem im reifen Organismus um einen gleichartigen Vorgang handelt, der lebenslang abläuft, und führten den Begriff Apoptose als Gegensatz zur Mitose ein. Die Zusammensetzung von griechisch apo (ab, weg, los) und ptosis (Senkung), die ein Abfallen wie das welker Blätter bezeichnet, sollte den Unterschied zur Nekrose verdeutlichen. Bei der Apoptose handelt es sich um einen aktiven, energieabhängigen Prozess, der sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen abläuft, im Gewebe verteilte Einzelzellen befällt und im Gegensatz zur Nekrose keine Entzündung hervorruft. Dieser auch als "cell suicide" (Lennon et al., 1991) bezeichnete programmierte Zelltod tritt während der Embryogenese und Metamorphose auf, bei der normalen Zellerneuerung im Gewebe, der Entwicklung des Immunsystems und der terminalen Differenzierung myeloischer Zellen. Des Weiteren können auch ionisierende Strahlung, zytotoxische Chemikalien und der Entzug spezifischer Wachstumsfaktoren (Lymphozyten ohne IL-2, hämopoetische Vorläuferzellen ohne IL-3, Fibroblasten ohne Serum, Prostatazellen ohne Steroidhormone) oder die Zugabe physiologischer Regulationshormone (Lymphozyten werden Glycocorticoiden ausgesetzt) Apoptose induzieren (Arends und Wyllie, 1991). Auch funktionell lösen viele Zelltypen und Mechanismen des Im-

munsystems Apoptose aus, z. B. zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK). Der programmierte Zelltod ist in wachsenden und regressiven Tumoren nachweisbar und beeinflusst die Expansion der Tumor-Zell-Population über das Gleichgewicht Zell-Gewinn und -Verlust (Wyllie, 1985). Außerdem stellt die Apoptose die Art des Tumor-Zelltodes nach zytotoxischer Therapie dar (induziert in experimentellen B- und T-Leukämiezellen bei Behandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen ein spezifisches Oberflächenepitop Apo-1; Trauth et al., 1989; Debatin et al., 1990).

1.2.2.2 Morphologie

Die morphologischen Veränderungen während der Apoptose verlaufen nach Arends et al. (1990) in drei unterschiedlichen Phasen:

Phase 1:

In den frühen Apoptosestadien schrumpft die Zelle, löst sich von ihren Nachbarn und es kommt zum Verlust von speziellen Membranstrukturen, wie z. B. der Mikrovilli und Pseudopodien. Durch Abnahme des Zellvolumens kommt es zur Kondensierung des Zytoplasmas, zur Verdichtung zytoplasmatischer Organellen und zur Auflösung der Nukleoli. Das Chromatin kondensiert sich in Schollen an der Kernperipherie und der Kern nimmt häufig eine Halbmond- oder Sichelform an. Durch Ausdehnung des glatten endoplasmatischen Retikulums und Bildung von Vesikeln, die mit der Zellmembran verschmelzen, erscheinen auf der Zelloberfläche charakteristische Bläschen. Im Gegensatz zur Nekrose bleiben die Mitochondrien und Ribosomen in diesem Stadium der Apoptose morphologisch unverändert und intakt. Die Zellmembran wird nicht durchlässig für Vitalfarbstoffe und die apoptotischen Zellen rufen innerhalb des Gewebes keine akute entzündliche Reaktion hervor.

Phase 2:

Das zweite Stadium der Apoptose kann mit dem ersten überlappen und ist durch verstärkte Bläschenbildung auf der Zelloberfläche und Lappung der Zelle (Zeiose), sowie durch Fragmentierung des Zellkerns (Karyorrhexis) gekennzeichnet. Diese Kernfragmente werden dann mit Zytoplasma und Organellen zu membranumhüllten apoptotischen Bodies gepackt und abgespalten. In vivo erfolgt dann die schnelle Phagozytose durch Nachbarzellen oder Makrophagen, wodurch eine entzündliche Reaktion im umliegenden Gewebe verhindert wird.

Phase 3:

Im letzten Stadium des programmierten Zelltodes kommt es zur fortschreitenden Degenerierung der restlichen Kern- und Zytoplasmastrukturen. In kultivierten Zellen manifestiert sich dies durch Risse in der Membran und die daraus resultierende Durchlässigkeit für Vitalfarbstoffe („sekundäre Nekrose“).

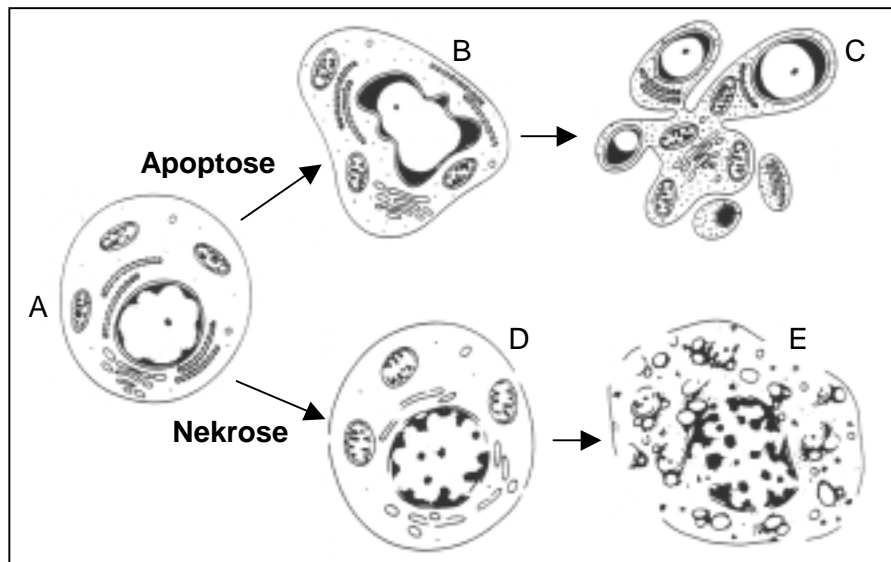


Abb. 3: Morphologische Veränderungen der Apoptose und Nekrose (Darzynkiewicz et al., 1997)

A. normale Zelle; B. Schrumpfung der Zelle, Kondensierung des Chromatins, Organellen unversehrt C. Abschnürung apoptotischer Bodies, Fragmentierung des Chromatins, Organellen intakt, keine Freisetzung des Zellinhalts D. Anschwellen der Zelle, Chromatin wenig verändert, Organellen geschädigt E. Zelle lysiert, Abbau des Chromatins, Freisetzung des Zellinhalts.

1.2.2.3 Mechanismus

Die biochemischen Vorgänge der Apoptose sind weit weniger gut definiert als die morphologischen Veränderungen, wahrscheinlich weil dieser Prozess typischerweise verstreute Einzelzellen innerhalb des Gewebes befällt, welche in der Mehrzahl von lebenden Zellen umgeben sind, die sie rasch phagozytieren. Trotzdem können sechs charakteristische Ereignisse des apoptotischen Zelltodes beschrieben werden (Arends und Wyllie, 1991):

Zunahme der zellulären Dichte:

Durch die auffallende Abnahme des Zellvolumens apoptotischer Zellen wurde diese Art des Zelltodes anfänglich auch als "shrinkage necrosis" (Kerr et al., 1972) bezeichnet.

Denn in apoptotischen Zellen kommt es zur Ausdehnung des endoplasmatischen Retikulums (ER) und zur Bildung von Vesikeln, die mit der Plasma-Membran verschmelzen und ihren Inhalt extrazellulär entleeren (Morris et al., 1984). Dieser schnelle und selektive Export von Flüssigkeit und intrazellulären Ionen, jedoch nicht von Makromolekülen und Organellen in das ER, könnte durch ein Ionen-Transport-System geregelt werden. In diesem Stadium zeigen die apoptotischen Zellen jedoch keine erhöhte Durchlässigkeit für Vitalfarbstoffe oder verstärkten Verlust von zuvor angesammeltem radioaktiv markiertem Chrom.

Intrazelluläre Veränderungen und Reaktionen der Signalmechanismen:

Die Wahrnehmung physiologisch tödlicher Reize wird vermutlich durch Zell-Typ- und Stimulus-spezifische Rezeptoren vermittelt. Mögliche intrazelluläre Signalmechanismen für die Auslösung des programmierten Zelltodes sind Ionen-Fluss, Veränderungen in der Aktivität

von Protein-Kinasen und der Expression und Aktivität von Onkogenen. In apoptotischen Zellen kommt es beispielsweise zu einem moderaten, aber nicht nachlassenden Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration, während bei der Nekrose der Calcium-Gehalt schnell um das Tausendfache ansteigt.

Stilllegung der Protein- und RNA-Synthese:

Schon in den frühen Apoptosestadien kommt es zur Einstellung der gesamten Protein- und RNA-Synthese-Tätigkeit.

Chromatin-Spaltung:

Internukleosomale Chromatin-Spaltung durch endogene Endonukleasen wird beinahe ausschließlich bei der Apoptose beobachtet. Die Spaltung internukleosomaler Linker-DNA erzeugt Ketten von Oligonukleosomen mit DNA-Längen von 180–200 Basenpaaren und Vielfachen davon. Diese DNA-Fragmente können als typische „Chromatin-Leiter“ mittels Gel-Elektrophorese nachgewiesen werden (Arends und Wyllie, 1991).

Transglutaminase-Aktivität:

Mit dem Einsetzen der Apoptose kommt es zur Induktion und Aktivierung von Gewebe-Transglutaminasen (Ca²⁺-abhängige Protein-Glutamin γ -Glutamyltransferase), die zytoplasmatische Proteine über ϵ -(γ -glutamyl)-Lysin-Bänder miteinander vernetzen und die Bildung von Proteinscaffolds bewirken. Während des programmierten Zelltodes kommt es somit zu einem Anstieg von Transglutaminase mRNA und Protein, der Enzymaktivität und Protein-gebundenem (γ -glutamyl)-Lysin (Arends und Wyllie, 1991; Darzynkiewicz et al., 1997).

Veränderungen der Zelloberfläche:

Charakteristisch für apoptotische Zellen ist die schnelle Erkennung und Phagozytose durch ihre Nachbarzellen oder Makrophagen, die bevorzugt an apoptotische Zellen binden. Die Erkennung apoptotischer Nager-Thymozyten geschieht beispielsweise durch Zucker-abhängige Mechanismen, gehemmt durch N-acetylglukosamine (GlcNAc) oder sein Dimer, N,N'-diacetylchitobiose, aber nicht durch Mannose oder Fucose und nur in geringem Umfang durch andere Monosaccharide, eingeschlossen Galaktose (Duvall und Wyllie, 1986). So scheinen Glykan-Gruppen an der Zelloberfläche freigesetzt zu werden und als Erkennungssignal zu funktionieren, um eine Anheftung und nachfolgende Phagozytose durch Makrophagen zu ermöglichen.

1.2.2.4 Genetische Steuerung der Apoptose

Während der normalen Entwicklung des Nematoden *Caenorhabditis elegans* sterben 131 von 1090 somatischen Zellen durch Apoptose (Ellis et al., 1991; Yuan et al., 1993). Dabei sind die Gene *ced-3*, *ced-4* und *nuc-1* notwendig für den programmierten Zelltod in *C. elegans*, während ihr Antagonist *ced-9* den Zelltod verhindert (Hengartner und Horvitz, 1994).

Das durch *ced-9* kodierte Protein hat Sequenzähnlichkeiten mit dem Proto-Onkogen *bcl-2*, welches den Zelltod bei Säugern verhindert (Cohen, 1997). Das *ced-3*-Protein hat deutliche Sequenzähnlichkeit mit der Cystein-Protease ICE/Caspase-1 aus der Familie der Interleukin-1 β -converting Enzyme bei Säugern, welche bei Überexpression Apoptose auslöst (Yuan et al., 1993; Nicholson und Thornberry, 1997). Für *ced-4* wurde bisher kein homologes Gen bei Säugern identifiziert.

Die Überexpression des Proto-Onkogens *bcl-2* erhöht die Überlebenszeit von B-Zell-Vorläuferzellen beim Entzug von Wachstumsfaktoren und ist beteiligt an der Verhinderung des programmierten Zelltodes bei T-Zellen, Thymozyten und Zellen des Burkitt-Lymphoms (Sen und D'Incalci, 1992). Sen und D'Incalci (1992) vermuten, dass verstärkte *bcl-2*-Expression die Überlebenszeit von Zellen bei gleichzeitiger Unterdrückung der *c-myc*-Expression durch Mobilisierung von Ca²⁺-Ionen von den Mitochondrien zum Zytoplasma erhöht.

Das Proto-Onkogen *c-myc*, normalerweise in die Zelltransformation, -differenzierung und Zellzyklus-Progression verwickelt, nimmt auch eine zentrale Rolle während des programmierten Zelltodes ein (Bissonnette et al., 1992). Das heißt eine Überexpression von *c-myc* kann in Mitose oder Apoptose resultieren und ist abhängig vom Vorhandensein anderer Wachstumsstimuli. Bei der Anwesenheit solcher Stimuli wirkt *c-myc* als klassisches Proto-Onkogen und stimuliert die Mitose, bei ihrer Abwesenheit induziert *c-myc* Apoptose (Kerr et al., 1994).

Das Produkt des Tumorsuppressor-Gens p53 arretiert hauptsächlich in der G1-Phase des Zellzyklus die Zellproliferation und kann stattdessen die Zelldifferenzierung anregen (Cohen, 1993; Kerr et al., 1994). DNA-Defekte regen die betroffene Zelle zur Herstellung des Proteines p53 an, das seinerseits die Aktivierung des Apoptoseprogrammes veranlassen kann (Duke et al., 1997).

Das Produkt des Genes Fas ist ein Plasmamembranprotein homolog zu den Rezeptoren des Tumor-Nekrose-Faktors (TNFR) und des Nerve-Growth-Faktors (NGFRI) und gehört somit zur humanen Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor/Nerve-Growth-Faktor-Rezeptor-Superfamilie von Zelloberflächenproteinen (Cohen, 1993; Kerr et al., 1994). Fas ist identisch mit dem Oberflächenmolekül APO-1 bzw. CD95 des Menschen und ist in die Zellmembran von T-Lymphozyten eingebettet (Duke et al., 1997). Durch die Bindung von spezifischen Antikörpern an Fas kann Apoptose natürlich oder mittels Transfektion ausgelöst werden (Cohen, 1993).

Schließlich sind auch Gene wie TRPM-2 und RP-2 oder RP-8 bekannt, deren Expression in apoptotischen Zellen ebenfalls zunimmt, jedoch ist ihre Aufgabe während dieses Prozesses noch ungeklärt (Cohen, 1993).

1.3 Schwesterchromatid-Austausche (SCE)

1.3.1 Mechanismus

Schwesterchromatid-Austausche (Sister-Chromatid Exchange = SCE) repräsentieren das Ergebnis eines reziproken Austausches von DNA-Molekülen zwischen homologen Genloci zweier Schwesterchromatiden innerhalb eines replizierten Chromosoms (Latt, 1981).

Es handelt sich demnach um Ereignisse, die mit Brüchen in den DNA-Molekülen beider Schwesterchromatiden einhergehen. Die Ligation der Chromatidbruchstücke ist dabei streng auf Chromatiden der gleichen Polarität beschränkt (Kato, 1977b).

Der SCE-Test an Metaphase-Chromosomen wurde durch die Einführung der BrdU-Färbetechnik erleichtert und wird seit geraumer Zeit für in vitro-Untersuchungen potentieller mutagener Karzinogene eingesetzt. Obwohl die Schwesterchromatid-Austausche auf Metaphase-Chromosomen als ein Ergebnis von DNA-Schäden und DNA-Reparatur aufzutreten scheinen, sind die exakten molekularen und biochemischen Mechanismen der SCE-Entstehung und ihre biologische Bedeutung noch unklar (Latt, 1974 + 1981; Bender et al., 1992).

Da es sich bei SCEs immer um symmetrische Austausche an einem Genort zwischen zwei Schwesterchromatiden ohne DNA-Verlust handelt (Cole et al., 1983), resultieren sie in keinerlei Änderung der Gesamt-Chromosomen-Morphologie (Hedner et al., 1982). Des Weiteren stellten Shiraishi und Sandberg 1979 fest, dass SCEs nicht zu Veränderungen des funktionellen Genoms führen, so dass sie nicht als Mutationen im engeren Sinne bezeichnet werden können.

Man geht davon aus, dass es sich bei der Bildung von SCEs um einen Synthese-Phase-abhängigen Prozess handelt, der eng mit DNA-Replikationsvorgängen verknüpft ist (Kato, 1980) und wohl auf irgendeine Weise mit DNA-Reparaturmechanismen in Verbindung steht (Ardito et al., 1980). Demnach treten SCEs während der S-Phase des Zellzyklus entweder an der Replikationsgabel oder aber an Stellen auf, an denen die Replikation inkomplett ist (Painter, 1980).

1.3.2 Frequenz und Lokalisierung

Die SCE-Frequenz innerhalb eines Chromosoms ist positiv mit dessen Länge korreliert. Heterochromatische Regionen sind besonders sensitiv für Schädigungen und brechen daher, z. B. unter dem Einfluss energiereicher Strahlung, bevorzugt (Latt, 1974).

1.3.3 Ursachen der SCE-Bildung

Da SCEs durch subtoxische Konzentrationen verschiedener biologischer, chemischer und physikalischer Agentien induziert werden können, stellt die SCE-Analyse ein schnelles, sensibles und quantitatives Verfahren zur Erfassung genetischer Schäden dar (Carrano et al., 1978). Nach Kato (1977a) können SCE-erzeugende Substanzen in verschiedene Gruppen eingeteilt werden:

Ionisierende Strahlung:

Hierzu rechnet man Röntgenstrahlen, γ - und β -Strahlen. Diese Strahlentypen erhöhen die SCE-Rate nur geringfügig, verursachen aber in größerem Ausmaß strukturelle Chromosomenaberrationen und wirken unabhängig vom Zellzyklus.

UV-Licht:

Die Bestrahlung von Zellen mit UV-Licht während der Synthese-Phase führt zu einem starken Anstieg der SCE-Rate, der über mehrere Zellgenerationen erhalten bleibt und auf die Entstehung von Pyrimidin-Dimeren zurückzuführen ist. Die SCEs entstehen in der auf die Bestrahlung folgenden Replikation. Die Anzahl der Chromosomenaberrationen wird wenig oder gar nicht beeinflusst.

Chemische Substanzen:

Chemikalien, die einen Anstieg der SCE-Rate induzieren, können aufgrund ihrer unterschiedlichen Wirkungsweise in drei verschiedene Klassen eingeteilt werden:

- **Chemikalien des UV-Strahlen-Typus:**
Die Wirkungsweise dieser Agentien ist mit der der UV-Strahlen vergleichbar. Sie führen zu einer starken Erhöhung der SCE-Rate, verursachen aber keine oder nur wenige Chromosomenaberrationen und sind Synthese-Phase-abhängig. In dieser Substanzklasse können DNA-alkylierende (z. B. Mitomycin C) und DNA-interkalierende (z. B. Acridinorange) Chemikalien unterschieden werden.
- **Chemikalien des Röntgenstrahlen-Typus:**
Die Wirkung dieser Substanzen (z. B. Bleomycin) ist mit der der Röntgenstrahlen vergleichbar. Sie erzeugen in großem Umfang Chromosomenaberrationen, während die SCE-Rate kaum beeinflusst wird. Diese Agentien wirken unabhängig vom Zellzyklus.
- **Chemikalien des „Übergangs“-Typus:**
Diese Gruppe von Verbindungen nimmt eine Mittelstellung zwischen dem UV-Strahlen-Typ und dem Röntgenstrahlen-Typ ein. Hierzu gehören Substanzen, die sowohl SCEs als auch Chromosomenaberrationen auslösen können.

Steroide:

Östradiol und Testosteron erhöhen beide die SCE-Rate in transformierten Lungenzellen von chinesischen Hamstern, Dihydroepiandrosteron und Progesteron dagegen nur bei gleichzeitigem Zusatz von Mitomycin C oder UV-Licht. Wie weit diese im Tierversuch gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind, ist allerdings noch nicht bekannt (Latt, 1981).

Metabolische Aktivierung:

Viele Substanzen können ihre genotoxische Wirkung erst nach einer metabolischen Aktivierung entfalten und dann auch SCEs induzieren (Ames et al., 1975).

Defekte in DNA-Reparaturmechanismen:

Auch Defekte in Reparaturmechanismen können zu einer Erhöhung der SCE-Frequenz führen, dies ist z. B. für Lymphomzelllinien und lymphoblastische Leukämien beschrieben (Latt, 1981).

1.3.4 Prinzip der SCE-Färbung (FPG-Technik)

Um Schwester-Chromatid-Austausche auf den Chromosomen erkennen zu können, müssen die beiden Schwesterchromatiden unterschiedlich markiert werden. Heute setzt man 5'-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) als Thymidinanalogon zur Differenzierung von Schwesterchromatiden ein (vgl. Abb. 4). BrdU wird anstelle des Thymidins in die DNA eingebaut, wobei die einzubauende BrdU-Menge von der eingesetzten BrdU-Konzentration abhängt. Das im Überschuss zugegebene BrdU wird nur als Substituent des exogenen Thymidins, das nicht von der Zelle selbst synthetisiert wird, eingebaut, so dass der Substitutionsanteil scheinbar immer kleiner als zwanzig Prozent ist. Die Inkorporationsrate kann aber erhöht werden, wenn die endogene Thymidinsynthese gehemmt oder verlangsamt wird (Wolff, 1982).

Der Einbau des BrdUs anstelle des Thymidins in die DNA verändert die Chromatinstruktur und -stabilität durch verzögerte Spiralisierung der DNA-Doppelhelix, wodurch sich folglich beide Schwesterchromatiden in ihrem Spiralisationsmuster unterscheiden (Latt, 1974).

Auch die Fluoreszenz-Plus-Giemsa (FPG)-Methode, bei der man mit dem Lichtmikroskop auswertbare Dauerpräparate erhält, beruht auf dem Einbau des thymidinanalogen 5'-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) anstelle des Thymidins bei der DNA-Replikation in die neusynthetisierte DNA, so dass nach zwei Replikationsrunden in der Anwesenheit von BrdU die Schwesterchromatiden voneinander unterscheidbar werden. Zu diesem Zweck bietet man den zu untersuchenden Zellen für die Dauer von zwei Replikationszyklen BrdU im Überschuss an. Nach zwei Replikationsrunden mit BrdU im Überschuss sind dann die Chromatiden mit bifilar (zweistrangig) substituierter DNA (hier wurde BrdU anstelle des Thymidins in beide Stränge eingebaut) weniger kondensiert und färben sich daher schwächer mit Giemsa an (Perry und Evans, 1975) als die Schwesterchromatiden mit unifilar (einstrangig) substituierter DNA (hier wurde BrdU ersatzweise in nur einen DNA-Strang eingebaut).

Bei der FPG-Technik werden die Präparate mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 behandelt, anschließend mit UV-Licht bestrahlt und nach Inkubation in heißer (60 °C) Salzlösung mit Giemsa angefärbt. Die Metaphase-Chromosomen des zweiten Zellzyklus erscheinen daraufhin als sogenannte „Harlekin“-Chromosomen, d. h. die beiden Chromatiden eines Chromosoms bestehen aus je einer hellen (bifilar substituierten) und einer dunkler (unifilar substituierten) angefärbten Chromatide.

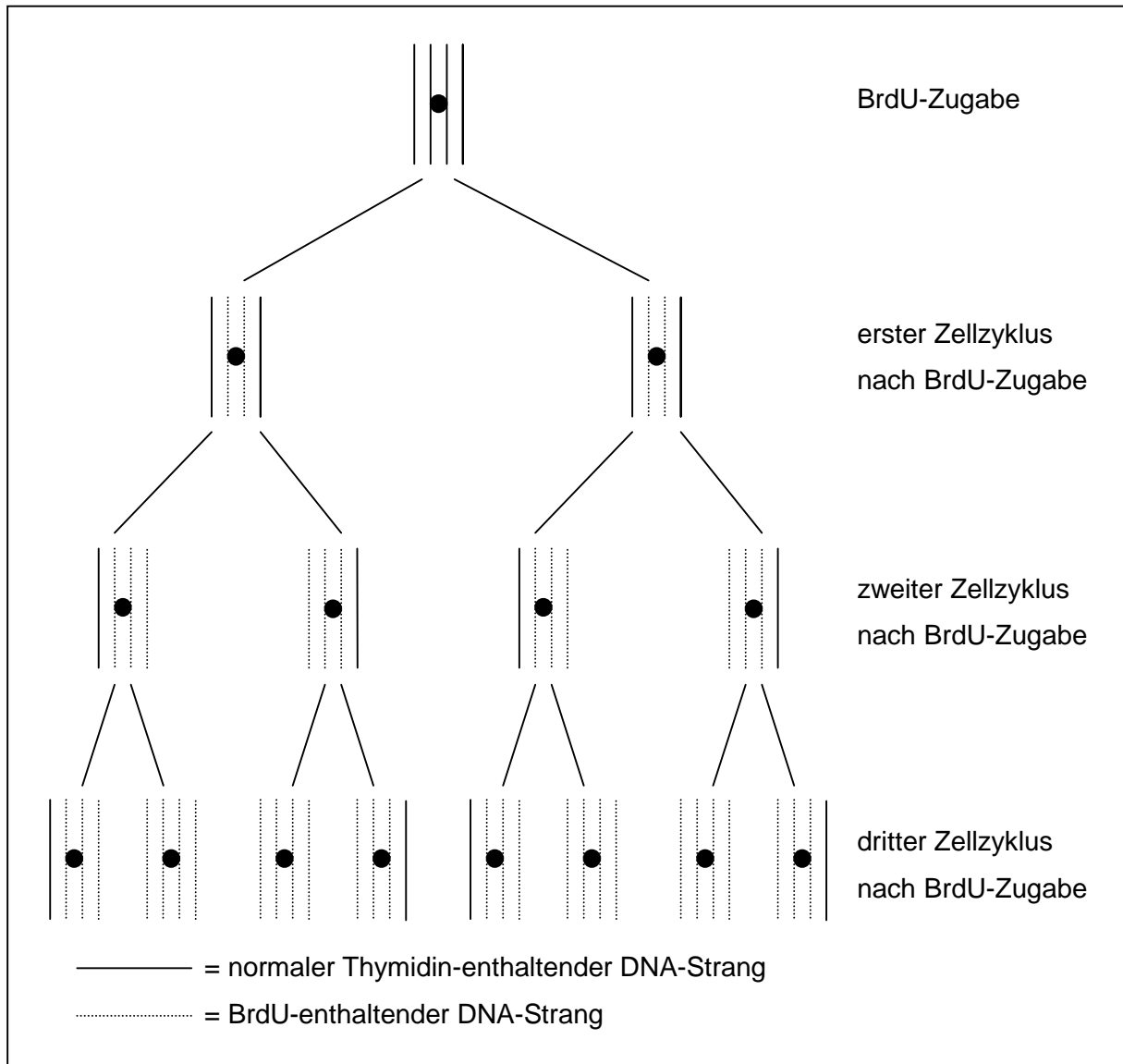


Abb. 4: Schematische Darstellung des BrdU-Einbaus in den einzelnen Replikationszyklen

Der der FPG-Färbung zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht endgültig geklärt. Es ist zum Beispiel noch unklar, ob letztendlich die BrdU-substituierte DNA selbst oder eine durch BrdU bedingte Veränderung des chromosomalen Proteins für die differentielle Anfärbbarkeit der Schwesterchromatiden verantwortlich ist. Auch die Bedeutung des Fluorochroms Hoechst 33258 ist noch weitgehend ungeklärt. Sicher ist eigentlich nur, dass es sich überwiegend an die AT-reichen Frequenzen der DNA anlagert (Comings, 1975).

Grundsätzlich wurden zwei Grundmechanismen für die differentielle Schwesterchromatid-Differenzierung vorgeschlagen. Zum einen soll die Prozedur, die zur differentiellen Färbung angewandt wird, einen exzessiven DNA-Verlust bei den bifilar substituierten Chromatiden bewirken. Die Färbung wäre dann proportional der in der Chromatide zurückbleibenden DNA-Menge. Zum anderen könnte ein durch die BrdU-Inkorporation in die DNA bedingter Umbau chromosomaler Proteine auf irgendeine Weise die Bindungsfähigkeit von Giemsa an die Chromosomen beeinflussen, was ebenfalls zur differentiellen Anfärbung führen würde.

1.3.5 Analyse der Zellzyklusverteilung

Neben der Bestimmung der SCE-Frequenz bietet die differentielle Schwesterchromatid-Färbung auch die Möglichkeit, die zelluläre Kinetik zu untersuchen (Beek und Obe, 1979). Denn die einzelnen Metaphasen können anhand des unterschiedlichen BrdU-Einbaus in die Chromatiden bei der DNA-Neusynthese und der daraus resultierenden unterschiedlichen Anfärbbarkeit der Chromosomen verschiedenen Replikationszyklen zugeordnet werden. Dies kann zur Analyse eventuell hemmender oder fördernder Einflüsse von Mutagenen und/oder Karzinogenen auf den Zellzyklus genutzt werden.

1.3.5.1 Erster Replikationszyklus (M1)

Während der ersten Synthese-Phase wird BrdU in jeweils einen der beiden DNA-Stränge der Chromatiden eingebaut (vgl. Abb. 5). Demnach sollte der BrdU-Gehalt nach dieser ersten Synthesephase in den beiden Chromatiden eines Chromosoms zumindest ungefähr gleich sein, da jetzt jede Chromatide aus einem DNA-Strang mit und einem ohne BrdU besteht. Dies resultiert dann in einer gleichmäßig dunklen Färbung beider Chromatiden.



Abb. 5: Metaphase des ersten Replikationszyklus (1000fache Vergrößerung)

1.3.5.2 Zweiter Replikationszyklus (M2)

Während der zweiten Synthese-Phase wird in Gegenwart von BrdU wieder in jeweils einen DNA-Strang jeder Chromatide BrdU eingebaut (vgl. Abb. 6). Nun besteht jedes Chromosom aus einer unifilar und einer bifilar substituierten Chromatide. Die Chromatide, in deren gesamter DNA-Doppelhelix BrdU eingebaut wurde, erscheint nach der Färbung hell im Vergleich zur nur unifilar substituierten Schwesterchromatide, die sich dunkler anfärbt. Auf diese Weise entstehen die für den zweiten Zellzyklus typischen „Harlekin“-Chromosomen.

Da die Schwesterchromatiden während dieses Stadiums aufgrund ihres differentiellen Färbegrades unterschieden werden können, dienen die Metaphasen des zweiten Replikationszyklus zur Auszählung der SCEs, die als alternierende Farbwechsel entlang der Chromosomen zu erkennen sind.



Abb. 6: Metaphase des zweiten Replikationszyklus (1000fache Vergrößerung)

1.3.5.3 Dritter und höhere Replikationszyklen (M3+)

Nach der dritten Replikationsrunde in der Anwesenheit von BrdU besteht die Hälfte der Chromosomen aus zweifach substituierter DNA (vgl. Abb. 7). Da bei ihnen beide Chromatiden nur schwach angefärbt werden, erscheinen diese Chromosomen einheitlich hell, soweit nicht noch ein SCE sichtbar ist. Die andere Hälfte der Chromosomen entspricht farblich denen des zweiten Zellzyklus („Harlekin“-Chromosomen).

Bei den Metaphasen späterer Zellzyklen nimmt die Anzahl der Chromosomen, bei denen beide Chromatiden doppelt substituiert sind, immer mehr zu, während die „Harlekin“-Chromosomen immer seltener werden.

Wegen des Anteils der gleichmäßig hell gefärbten Chromosomen ist eine genaue Bestimmung der SCE-Häufigkeit pro Metaphase nicht mehr möglich.

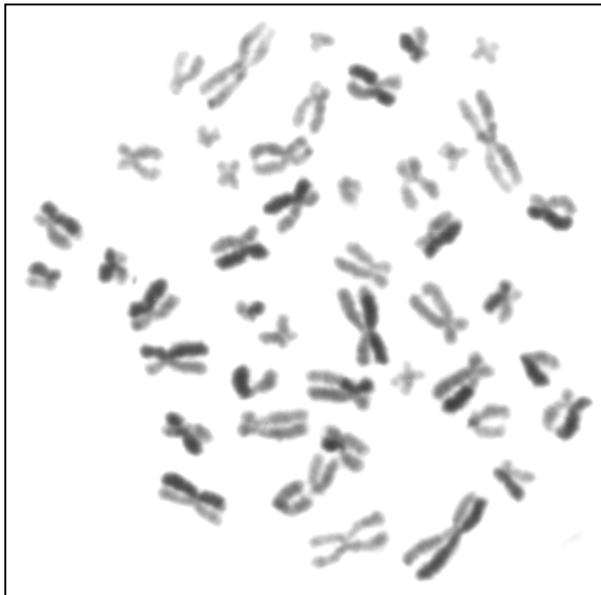


Abb. 7: Metaphase des dritten Replikationszyklus (1000fache Vergrößerung)

1.4 Mikronuklei (MN)

1.4.1 Definition

Mikronuklei sind zytoplasmatische Chromatinmassen, die im Verlauf einer Mitose nicht von einem der beiden Tochterkerne eingeschlossen werden, sondern als kleine Sekundärkerne im Zytoplasma auftreten. Sie entstehen in sich teilenden Zellen, wenn diese azentrische Chromatid- und Chromosomenfragmente bzw. auch ganze Chromosomen mit inaktiviertem Zentromer enthalten, welche nicht in der Lage sind, während der Mitose zu einem der beiden Spindelpole zu wandern, sondern in der Äquatorialebene zurückbleiben (Heddle et al., 1978a + b).

1.4.2 Induktion und Entstehung

Die Entstehung von Mikronuklei kann sowohl durch Klastogene (chromosomenbrechende Substanzen) als auch durch Aneugene (Aneuploidie-erzeugende Agentien; Spindelgifte) ausgelöst werden; allerdings nur unter der Voraussetzung, dass die betreffenden Zellen unter dem Mutageneinfluss noch mindestens eine Zellteilung durchlaufen. Demnach lassen sich die Mikrokerne aufgrund ihrer Entstehungs-Voraussetzungen in zwei Klassen einteilen, in klastogen- und aneugen-induzierte Mikronuklei.

Die durch klastogene Agentien induzierten Mikrokerne enthalten hauptsächlich azentrische Chromosomenfragmente, welche aus Chromosomenbrüchen resultieren. Aufgrund des Zentromerverlustes besitzen azentrische Chromosomenfragmente keine Ansatzstelle für die Spindelfasern und aus diesem Grund können sie während der Anaphase nicht zu einem der beiden Spindelpole wandern, sondern bleiben in der Äquatorialebene liegen, was ihre Aufnahme in einen der beiden Tochterkerne verhindert. Die Zuordnung solcher Fragmente zu einer der beiden Tochterzellen, in deren Zytoplasma dann ein oder mehrere Mikronuklei entstehen, erfolgt zufällig (Yamamoto und Kikuchi, 1980).

Die durch aneugene Agentien induzierten Mikronuklei enthalten immer ganze Chromosomen bzw. Chromatiden. Durch Schädigungen des Spindelapparates kann es während der Mitose zu Chromosomen-Fehlverteilungen kommen, z. B. können Spindelgifte wie Colchizin dazu führen, dass einzelne Chromosomen bzw. Chromatiden in der Äquatorialebene liegenbleiben ("anaphase-lagging"). Auch hier erfolgt die Zuordnung dieser Chromatiden oder Chromosomen zu einer der beiden Tochterzellen, in deren Zytoplasma sich dann ein oder mehrere Mikrokerne bilden, zufällig (Heddle et al., 1978a).

Insgesamt können nach Heddle et al. (1991) vier verschiedene Mechanismen unterschieden werden, die zur Entstehung von Mikrokernen oder Mikrokern-ähnlichen Strukturen führen:

- Mitotischer Verlust von azentrischen Chromosomen
- Mitotischer Verlust ganzer Chromosomen (durch "chromosome lagging" oder inaktive Kinetochore)
- Auswirkungen von Chromosomenbrüchen und -austauschen (z. B. durch feste Chromosomenbrücken oder ineinander verwickelte Chromosomen), die wiederum zu azentrischen Fragmenten führen
- Apoptose

1.4.3 Zytokinese-Block-Methode

Zur Bestimmung der Mikrokern-Rate wurde in der vorliegenden Arbeit die nach Fenech und Morley (1985a und b) modifizierte Cytochalasin-Block-Methode angewandt. Bei dieser Blockierungsmethode wird Cytochalasin B eingesetzt, um die Zytokinese der sich teilenden Zellen nach vollendeter Karyokinese zu blockieren. Diese arretierten Zellen sind leicht an ihrer Größe und den zwei in einer gemeinsamen Zytoplasmahülle liegenden Kernen zu erkennen (vgl. Abb. 8 + 9).

Cytochalasin ist ein Inhibitor der Aktin-Polymerisation, welche für die Bildung des Mikrofilament-Ringes, der das Zytoplasma zwischen den Tochterkernen während der Zytokinese einschnürt, benötigt wird (Kelly und Sambrock, 1973). Da Cytochalasin B zur Blockierung der Zytokinese durch Hemmung der Plasmateilung nach der Telophase führt, entstehen nach der ersten Mitose unter Cytochalasin-Einwirkung Doppelkerne. Dadurch wird eine Unterscheidung zwischen Zellen, die sich nach der Cytochalasin-Zugabe genau einmal geteilt haben und den übrigen Zellen gewährleistet. Außerdem ermöglicht der Einsatz von Cytochalasin B bei proliferierenden Zellpopulationen die Ansammlung aller sich teilenden Zellen im zweikernigen Stadium.

Das Cytochalasin B scheint erst in einem sehr späten Stadium in den Prozess der Zytokinese einzugreifen. Der „kontraktile Ring“ um den Äquator der sich in Teilung befindenden Zelle bildet sich wie bei ungestörten Teilungsvorgängen aus. Die Zellmembran wird so weit eingeschnürt, dass eine Teilungsfurche entsteht. Die endgültige Trennung der beiden Tochterzellen wird allerdings verhindert. Man kann erkennen, dass sie über eine schmale Plasmabrücke miteinander verbunden bleiben und sich auf beiden Seiten der Zytoplasmabrücke jeweils einer der beiden Tochterkerne befindet. Sie vereinigen sich dann wieder vollständig, so dass zweikernige Zellen entstehen.

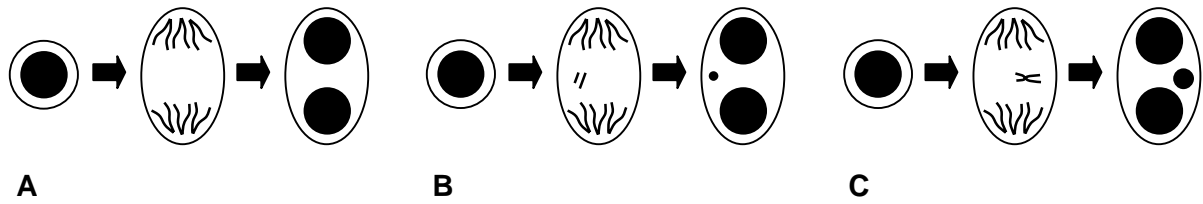


Abb. 8: Schematische Darstellung der Entstehung von Mikronuklei bei der Zytokinese-Block-Methode.
 A. normale Karyogenese ohne Zytokinese, keine MN-Bildung B. MN-Bildung aus einem azentrischen Chromosomenfragment C. MN-Bildung aus einem ganzen Chromosom

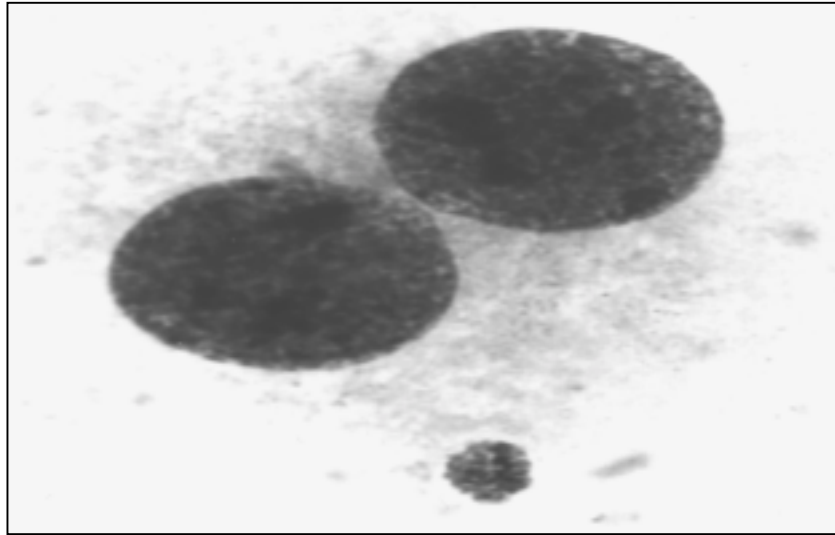


Abb. 9: Doppelkernige Zelle mit Mikronukleus (1000fache Vergrößerung)

1.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine relativ junge Technologie und stellt ein optisches Messsystem dar, das Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Partikel analysiert. In den 60er und 70er Jahren dieses Jahrhunderts entwickelten mehrere Arbeitsgruppen unabhängig voneinander Geräte zur Messung von Tumorzellen, Lymphozyten und Bakterien mithilfe von Protein-, Nukleinfarbstoffen und fluoreszenzmarkierten Antikörpern.

Das Anwendungsspektrum reicht von der Lymphozytentypisierung über Zellzyklusanalysen bis zu funktionellen Untersuchungen wie beispielsweise intrazellulären Stoffwechselfvorgängen. Nach Schmitz und Rohde (1994) stammen diese Entwicklungen im Wesentlichen aus den Laboratorien von Herzenberg (Stanford, USA, Charakterisierung und Isolierung von T- und B-Lymphozyten), von Göhde und Dittrich (Münster, Zellproliferation), Kamensky (Boston, Identifikation von Tumorzellen) und von Valet und Kachel (München, Erarbeitung multiparametrischer zellulärer Funktionsanalysen).

Für die Funktion eines Durchflusszytometers sind im Wesentlichen folgende Punkte zu berücksichtigen:

- Vollständige Erfassung der Zelle durch die Lichtquelle und die Detektoren.
- Sicherstellung der Analyse einzelner Zellen, d. h. Vermeidung der gleichzeitigen Messung mehrerer Zellen oder von Zellaggregaten.
- Zuordnung der von verschiedenen Detektoren gemessenen Signale zu einer gegebenen Zelle.
- Eine möglichst hohe Spezifität und Selektivität der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe für die zu analysierenden Parameter.
- Proportionalität zwischen den zu untersuchenden Parametern, der eingelagerten Farbstoffmenge und der Fluoreszenzintensität des jeweiligen Farbstoffes.

Das Gerät ist in folgende Bauteile gegliedert:

- Flüssigkeitssystem
- Optisches System
- Signalverarbeitung

1.5.1 Flüssigkeitssystem

Das Flüssigkeitssystem besteht, vereinfacht ausgedrückt, aus zwei Leitungen. Über eine Zuleitung drückt eine Pumpe kontinuierlich „Trägerflüssigkeit“ (bzw. Hüllstromflüssigkeit) durch die Messkammer und weiter in den Abfallbehälter. Eine zweite Leitung dient zum Transport der Zellen vom Probenröhrchen zur Messkammer, in der sich beide Leitungen

vereinen. Die Zellsuspension wird entweder über ein Ansaugsystem oder ohne zwischengeschaltete Ventile mittels Überdruck in die Messkammer, üblicherweise eine Quarzküvette, transportiert. Hier liegt die kritischste Stelle des ganzen Durchflusszytometers. Das Ende der Stahlkapillare (zweite Leitung) ist auf das Zentrum des Lumens der Küvette gerichtet. Unmittelbar nach dem Verlassen der Kapillare erfasst die laminar durch die Küvette strömende Trägerflüssigkeit die Zellsuspension. Hierbei verengt sich der Probenstrom auf das Zentrum der Küvette und erfährt eine Beschleunigung von wenigen Zentimetern in der Sekunde auf etwa sieben Meter/Sekunde. Dieser Vorgang, auch als „hydrodynamische Fokussierung“ bezeichnet, gewährleistet, dass die Zellen als Einzelzellen den Messpunkt an einer definierten Stelle passieren. Der Messpunkt ist der Ort, an dem der fokussierte Lichtstrahl auf die Zelle trifft. Auf diese Weise wird jeder Partikel einzeln durch die optimale Fokussierungsebene des Objektivs geleitet (Schmitz und Rohde, 1994).

1.5.2 Optisches System

Das optische System gliedert sich in einen Anregungs- und einen Detektionsteil. Der Anregungsteil dient der Strahlformung. Bei Geräten mit einem Laser als Lichtquelle verformen prismatische Strahlexpander bzw. Linsen den Laserstrahl so, dass er im Messpunkt einen horizontal-elliptischen Durchmesser von etwa $20 \times 60 \mu\text{m}$ besitzt. Dieser Strahlquerschnitt stellt einen Kompromiss zwischen einer hohen räumlichen Auflösung (Unterscheidung nah aufeinanderfolgender Zellen) und einer noch ausreichenden Signalintensität dar.

Der Detektionsteil besteht aus zwei Baugruppen, und zwar aus einem Bereich zur Messung des Vorwärtsstreulichts (axial zum anregenden Laserstrahl) und einem zweiten Bereich (orthogonal dazu) für die Messung von Seitwärtsstreulicht und Fluoreszenz (Schmitz und Rohde, 1994).

In dieser Arbeit wurde zur Bestimmung des sogenannten Sub-G1-Peaks und zur Zellzyklusanalyse ein Durchflusszytometer Modell PAS-III der Firma Partec (Münster) verwendet. Als Lichtquelle diente hierbei eine stromstabilisierte 100 Watt Quecksilberhochdrucklampe (HBO 100/2L, Partec). Je nach eingesetzten Fluorochromen wurden die Filter- und Spiegelsysteme geändert. Der Vorteil dieses optischen Systems liegt in der hohen Leuchtdichte, welche ein von 240–800 nm nutzbares Spektrum liefert und somit nach geeigneter Erregerfilterung alle zur Färbung von Zellinhaltsstoffen geeigneten Fluorochrome anregen kann. Die Nachteile der einfachen Quecksilberhochdrucklampen sind die kurze Lebensdauer, die geringe Strahlungsintensität im wichtigen Blaubereich und die mit zunehmendem Alter auftretende Vergrößerung der Elektrodenabstände und das daraus resultierende Flackern des Lichtes.

1.5.3 Signalverarbeitung

Aufgrund der Fluoreszenzanregung des Farbstoffes emittiert jede Zelle ein Lichtsignal proportional zur stöchiometrisch gebundenen Fluorochrommenge, welches in einem Photomultiplier verstärkt und in ein elektrisches Signal umgewandelt wird. Die Empfindlichkeit des Photomultipliers ist abhängig von der angelegten Hochspannung. Passiert ein Partikel die Messpore, so steigt das Fluoreszenzlicht bis auf ein Maximum an und fällt anschließend auf das Gleichgewichtsniveau zurück, wobei das zugehörige Signal eine konstante Dauer hat. Die Durchflussrate (Partikel/Zeit) wird über die eingehenden Signale berechnet und digital angezeigt. Die so gewonnenen Daten werden in Form von Histogrammen visualisiert und abgespeichert.

1.5.4 Zellzyklus

Das Zeitintervall zwischen zwei Teilungen einer proliferierenden Zelle heißt Generationszeit oder Zykluszeit. In der Zellzyklusanalyse können durchflusszytometrisch verschiedene Phasen unterschieden werden (vgl. Abb. 10):

- G₀/1-Phase:
Als G₀/1-Phase ("gap" 1) wird der Zeitraum bezeichnet, der zwischen der letzten mitotischen Teilung und dem Beginn der DNA-Synthese einer Zelle liegt. Die Zelle hat in diesem Intervall den einfachen diploiden DNA-Gehalt (2c).
- S-Phase:
In der sich an die G₁-Phase anschließenden Synthese-Phase wird die DNA repliziert und der DNA-Gehalt steigt kontinuierlich bis zum Erreichen des doppelten diploiden DNA-Gehaltes (4c).
- G₂-Phase:
Die Zelle tritt nach der S-Phase in die sogenannte G₂-Phase ("gap" 2) ein, in der der DNA-Gehalt nicht mehr verändert wird. In diesem Intervall verbleibt die Zelle zum Synthetisieren mitotisch aktiver Enzyme sowie zum postreplikativen Repair.
- M-Phase:
Während der Mitose teilt sich die Zelle in zwei einfache, diploide Tochterzellen, die in die G₁-Phase eines neuen Zellzyklus eintreten oder in die Ruhe-Phase G₀ zurückgehen.

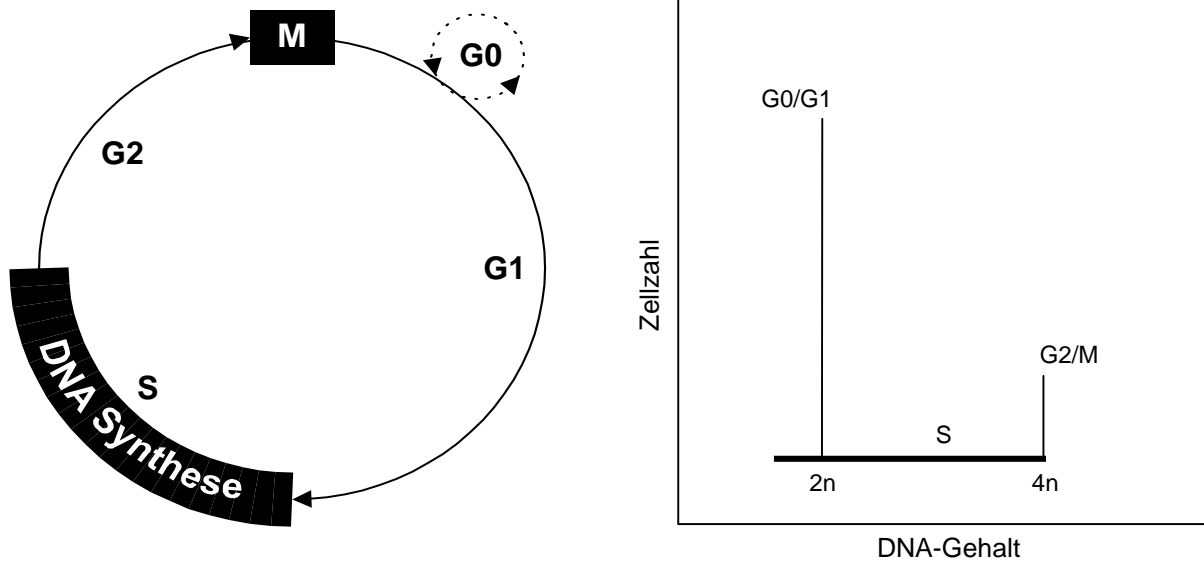


Abb. 10: Schematische Darstellung der Zellzyklusphasen und des entsprechenden 1-Parameter-Histogrammes.

Apoptotische Zellen können bei DNA-Gehaltsmessungen als sogenannter Sub-G1-Peak (vgl. Abb. 11) erfasst werden (Darzynkiewicz et al., 1992).

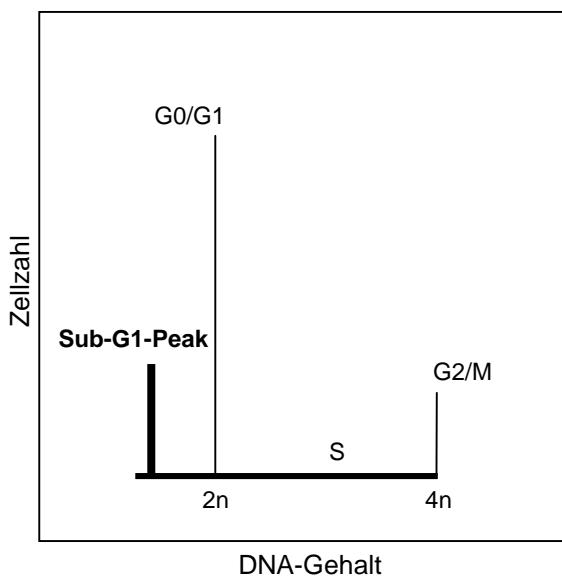


Abb. 11: Schematische Darstellung eines 1-Parameter-Histogrammes mit Sub-G1-Peak.

Bei der simultanen Messung des DNA- und Protein-Gehaltes mithilfe der durchflusszytometrischen 2-Parameter-Messung (vgl. Abb. 12) ist es zudem möglich, G0- und M-Phase-Zellen aufgrund ihres unterschiedlichen Proteinmusters von G1- bzw. G2-Phase-Zellen zu unterscheiden (Zucker et al., 1988).

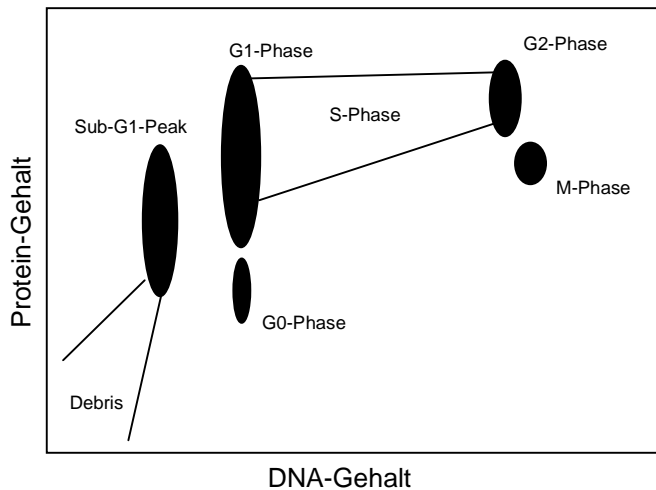


Abb. 12: Schematische Darstellung eines 2-Parameter-Dot-Plots bei der Messung des DNA-Gehaltes gegen den Protein-Gehalt.

1.5.5 Variationskoeffizient (CV)

Ein entscheidendes Kriterium für die Genauigkeit einer durchflusszytometrischen Ein-Parameter-Messung ist der Variationskoeffizient (VK, engl.: coefficient of variation, CV), der an der Breite des G0/G1-Peaks bestimmt wird. Die Größe des CV-Wertes gibt eine standardisierte Auskunft über die Breite einer Werteverteilung, bezogen auf deren Mittelwert und wird nach folgender Formel berechnet:

$$CV = \frac{\text{Breite des G0/1-Peaks bei halber maximaler Höhe} \times 100}{\text{Kanalnummer mit den meisten gemessenen G0/1-Zellen} \times 2,35} \quad [\%]$$

Je kleiner der gemessene CV-Wert ist, um so besser ist die Auflösung und Reproduzierbarkeit der Messung, was gleichbedeutend mit einer genaueren Aussagekraft – die Messergebnisse betreffend – ist. Durchflusszytometrische Messungen mit einem CV-Wert über 5,0 % sollten daher von der Auswertung ausgeschlossen werden.

1.5.6 Durchflusszytometrische Messung von Merkmalen apoptotischer Zellen

Neben den in 1.5 aufgeführten Anwendungsmöglichkeiten wird die Durchflusszytometrie als Methode der Wahl angesehen, um die verschiedenen Aspekte des programmierten Zelltodes zu untersuchen (Darzynkiewicz et al., 1997). Von Vorteil ist dabei die schnelle Multiparameter-Analyse großer Zellpopulationen, wobei durch den Einsatz verschiedener Fluorochrome die charakteristischen Veränderungen der Zellmorphologie, der Struktur der Plasmamembran, des Stofftransportes und der DNA-Degradierung untersucht werden können.

1.5.6.1 DNA-Gehalt

Die durchflusszytometrische Detektion des programmierten Zelltodes beruht auf der Messung des zellulären DNA-Gehaltes, da es während der Apoptose zur charakteristischen

Fragmentierung der DNA in Bruchstücke von oligonukleosomaler Größe kommt. Die vorherige Detergenzbehandlung der Zellen ermöglicht eine Permeabilisierung der Kernmembran, eine Auflockerung des Chromatins und eine bessere Anlagerung der Fluoreszenzfarbstoffe. Durch diese Vorbehandlung wird die degradierte DNA freigesetzt, gelangt zunächst aus dem Kern in das Zytoplasma und wird nach Herstellung einer Kernsuspension schließlich ganz entfernt. Aus diesem Grund weisen apoptotische Zellpopulationen einen reduzierten DNA-Gehalt auf und können nach der Färbung der zellulären DNA im Histogramm als Sub-G1-Peak identifiziert werden (Nicoletti et al., 1991; Zhu und Anasetti, 1995). Der Anteil dieser degradierten DNA-Fraktion kann zwischen verschiedenen Apoptosestadien, unterschiedlichen Zellsystemen und verschiedenen Apoptoseinduktoren variieren. Da die durchflusszytometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes auch Informationen über die Zellzyklusverteilung nichtapoptotischer Zellen liefert, sind anhand dieser Untersuchungsmethode auch Aussagen über die Zellzykluspezifität der apoptoseinduzierenden Substanz möglich.

1.5.6.2 Protein-Gehalt

Die simultane durchflusszytometrische Messung des DNA- und Protein-Gehaltes ermöglicht aufgrund der differentiellen Färbung mit den Fluoreszenzfarbstoffen DAPI und Sulforhodamin 101 eine Unterscheidung apoptotischer und nekrotischer Zellen im 2-Parameter-Dot Plot (Darzynkiewicz et al., 1992). Hierbei können nekrotische Zellen von apoptotischen Zellen wegen ihres höheren DNA/Proteinverhältnisses unterschieden werden. Denn nekrotische Zellen haben aufgrund der Zerstörung der Membranintegrität einen reduzierten Protein-Gehalt, während sich der DNA-Gehalt zunächst nicht stark verändert. Dagegen weisen apoptotische Zellen neben ihrem erniedrigten DNA-Gehalt auch einen deutlich reduzierten Protein-Gehalt auf.

1.5.6.3 Lichtstreuung

Trifft der Lichtstrahl des Durchflusszytometers auf eine Zelle, streut sie aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften Licht mit unterschiedlicher Quantität und Qualität. Die der Lichtstreuung zugrundeliegenden physikalischen Theorien sind komplex und beschreiben die beobachteten Phänomene (Zellgröße, Zellform, Zelloberfläche, Granularität) nicht vollständig. Dennoch ist die Messung der Lichtstreuung für die physikalische und funktionelle Charakterisierung von Zellen für viele Anwendungen von hohem Wert. Folgende Zelleigenschaften beeinflussen die Lichtstreuung:

- Querschnittsfläche
- Refraktionsindex
- Struktur der Membran (Faltung)
- Intrazelluläre Bestandteile (Granula, Vakuolen)

Das Licht wird nicht in alle Richtungen gleichmäßig gestreut. Die Lichtstreuung ist am größten im Kleinwinkelbereich (0–10°) des einfallenden Lichtstrahls (Vorwärtsstreulicht, Forward Angle Light Scatter, FSC), ein geringerer Teil des Lichts streut seitwärts (90°) dazu (Seitwärtsstreulicht, Side Scatter, SSC). Die Bildung der Vorwärts- und Seitwärtslichtstreuung beruht auf unterschiedlichen physikalischen Gegebenheiten der Zellen und liefert dadurch auch unterschiedliche Informationen: Das Vorwärtsstreulicht ist sensitiv für die Querschnittsfläche und gibt Hinweise über die Zellgröße, während das Seitwärtsstreulicht mit dem Refraktionsindex korreliert und Informationen über die Granularität, die Membranfaltung und die äußere Form liefert (Schmitz und Rohde, 1994).

Diese Lichtstreuung verändert sich während des Zelltodes und mittels beider Lichtstreuparameter werden morphologische Veränderungen wie das Anschwellen oder Schrumpfen von Zellen, Risse der Zytoplasmamembran, Chromatinkondensierung, Kernfragmentierung sowie die Bildung und Abschnürung apoptotischer Körperchen reflektiert. Der nekrotische Zelltod geht dabei mit einem initialen Anstieg der Lichtstreuung (Anschwellung der Zellen) einher und diesem folgt ein schneller Abfall (Riss der Plasmamembran, Freisetzung der Zellbestandteile) sowohl des Vorwärts- als auch des Seitwärtsstreulichtes (Darzynkiewicz et al., 1997). Während des programmierten Zelltodes wird dagegen der Abfall des Vorwärtsstreulichtes nicht von einem gleichzeitigen Abfall des Seitwärtsstreulichtes begleitet. In späteren Apoptosestadien ist jedoch die Streulicht-Intensität in beide Richtungen erniedrigt.

1.5.6.4 Veränderungen der Plasmamembran

Ein weiteres charakteristisches Unterscheidungsmerkmal von lebenden und toten Zellen ist der Verlust der Transportfunktion und der Plasmamembranintegrität. Da die intakte Membran lebender Zellen geladene kationische Farbstoffe wie zum Beispiel Trypanblau oder Propidiumjodid ausschliessen kann, werden diese zur Bestimmung der Viabilität herangezogen (Büssing et al., 1998b; Hülsen und Mechelke, 1982). Während des programmierten Zelltodes zeigt die Plasmamembran zu Beginn keine großen Veränderungen bezüglich Struktur und Integrität (Kerr et al. 1972; Whyllie et al., 1980). Im weiteren Verlauf kommt es jedoch zu Störungen der Transportfunktion bis hin zu einem kompletten Verlust der Ausschlussfähigkeit dieser geladenen Fluorochrome. In dieser Phase zeigen apoptotische Zellen eine erhöhte Aufnahme gegenüber Kontrollzellen und man kann nekrotische (intensive Färbung) von apoptotischen (moderate Färbung) und lebenden Zellen (minimale Färbung) unterscheiden.

1.6 Fragestellung

Viscum album L. (VAL)-Präparate finden zunehmend Verbreitung in der adjuvanten Tumortherapie. Ihnen wird neben einer immunstimulierende Potenz (Hamprecht et al., 1987; Hajto et al., 1989; Hajto et al., 1990a; Metzner et al., 1985) auch eine zytostatische (Hülsen und Mechelke, 1982; Doser et al., 1989; Janssen et al., 1993) und DNA-stabilisierende Wirkung (Büssing et al., 1994) zugeschrieben. Der VAL-induzierte Zelltod erfolgt sowohl durch die Induktion des programmierten Zelltodes als auch durch eine direkte/indirekte Zellmembranschädigung (Büssing et al., 1996a; Janssen et al., 1993). Bei den Mistellektinen, die vermutlich vornehmlich für die zytotoxischen und zytostatischen Effekte auf Tumorzellen verantwortlich sind (Ribéreau-Gayon, 1992), handelt es sich um Glykoproteine ohne Immunglobulin-Charakter, die spezifisch bestimmte freie oder Zellmembran-gebundene Zuckerarten zu „erkennen“ und sich an diese reversibel zu binden vermögen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob für die Mistellektin-sensitive Leukämiezelllinie MOLT-4 und kultivierte Blutlymphozyten gesunder Probanden nach 72 h Inkubation mit den drei Mistelextrakten Helixor Abietis, Mali und Pini sowie den isolierten Mistellektinen I und III eine konzentrationsabhängige Wachstumshemmung und Induktion des programmierten Zelltodes nachgewiesen werden kann. Außerdem stellte sich die Frage, ob beim direkten Vergleich der drei Frischpflanzenextrakte eventuelle wirtsbaum-spezifische oder geschlechtsspezifische Unterschiede festgestellt werden können. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob durch eine Reduzierung des FKS-Gehaltes im Kultivierungsmedium die toxische Aktivität der Mistelextrakte verstärkt werden könnte. Denn auch das Serum enthält Zuckerderivate, die in der Lage sind, die Lektine zu binden und dadurch könnte die toxische Wirkung gegenüber den Leukämiezellen verringert werden. Schließlich war von Interesse, welche Auswirkungen die Induktion des programmierten Zelltodes auf die Zellzykluskinetik humaner Lymphozyten und der Leukämiezellen hat und in welchen Stadien des programmierten Zelltodes sich die apoptotischen Zellpopulationen hauptsächlich befinden. Denn die Bestimmung betroffener Zellzyklusphasen spielt eine wesentliche Rolle bei der Charakterisierung von Antitumormedikamenten und beim Entwurf neuer Antitumorstrategien.

Die Bestimmung der Wachstumsrate wurde mittels Trypanblau-Ausschlusstest durchgeführt. Zur quantitativen Erfassung der Apoptoserate und zur Bestimmung der Phasenspezifität wurde als kostengünstige und effektive Methode die durchflusszytometrische 2-Parameter-Messung des DNA- und Protein-Gehaltes angewandt. Als vergleichende Methode zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Apoptoserate wurde die fluoreszenzmikroskopische Auswertung herangezogen, die außerdem eine Einteilung der apoptotischen Zellpopulation in unterschiedliche Stadien ermöglicht. Die Untersuchung der Zellzykluskinetik erfolgte mit-

hilfe der durchflusszytometrischen 1-Parameter-Messung.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte dann eine mögliche antimutagene und DNA-stabilisierende Wirkung der Helixor-Präparate Abietis, Mali und Pini auf isolierte Blutlymphozyten gesunder Probanden analysiert werden. Denn diese Schutzeffekte könnten von klinischer Bedeutung sein und eine adjuvante Applikation von VAL-Extrakten während und/oder nach der konventionellen Chemotherapie als sinnvolle Maßnahme rechtfertigen, wenn sie selektiv für normale PBMC gelten. Zur Mutagenitätsprüfung wurde der Mikronukleus-Test nach Countryman und Heddle (1976) und der SCE-Test verwendet, die beide als sensitive Methoden zum Nachweis potentieller Mutagene gelten. Deshalb sollte sowohl die Mikrokern- als auch die SCE-Rate nach 71 h Kultivierung humaner Lymphozyten gesunder weiblicher und männlicher Probanden mit den Frischpflanzenextrakten in therapeutisch verwendeten Konzentrationen bestimmt werden. Auch hier war von speziellem Interesse, ob mögliche wirtsbaumspezifische oder geschlechtsspezifische Unterschiede nachgewiesen werden können. Des Weiteren sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Mistelpräparate auf die MN- und SCE-Rate nach einer Kombinationsbehandlung mit den Zytostatika Cyclophosphamid, 5-Fluorouracil bzw. Methotrexat haben, die eine starke Zunahme der Mikrokern- und SCE-Frequenz sowie eine deutliche Proliferationshemmung induzieren.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Bestimmung der Lebendzellzahl (Trypanblau-Ausschlusstest)

Zum Einfrieren und Aussähen der Zellen in einer definierten Dichte sowie zur Bestimmung der Wachstumsrate nach Versuchsablauf musste deren Lebendzellzahl bestimmt werden. Dies erfolgte in einer Zählkammer mit Netzeinteilung nach Neubauer und einer Färbung mit dem Azofarbstoff Trypanblau, wodurch tote Zellen (Trypanblau-positive) von ungefärbten Zellen (Trypanblau-negative) unterschieden werden können.

Durchführung:

- 10 µl der jeweiligen Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau versetzen (bei zu großer Zelldichte der Suspension diese vor Zugabe von Trypanblau nochmals 1:10 bzw. 1:100 verdünnen)
- 5 min Inkubation bei Raumtemperatur
- 10 µl dieser Mischung in die Neubauer-Zählkammer pipettieren, die sich durch kapillare Ansaugung des Tropfens füllt
- ungefärbte Zellen in den vier Eckquadraten mit je 16 Kleinstquadraten im Umkehrmikroskop bei 20facher Vergrößerung auszählen und daraus den Mittelwert berechnen

Die Zellzahl pro ml errechnet sich dann wie folgt:

$$\text{Zellzahl [Zellen/ml]} = \text{Mittelwert} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Der Trypanblau-Ausschlusstest dient auch zur Bestimmung der Zytotoxizität, da er die Unterscheidung von lebenden und toten Zellen ermöglicht. Unter dem Umkehrmikroskop werden Trypanblau-positive und -negative Zellen in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und hieraus der Prozentsatz an Trypanblau-negativen Zellen in Bezug auf die Gesamtzahl der gezählten Zellen errechnet:

$$\% \text{ lebende Zellen} = \frac{\text{Trypanblau-negative Zellen}}{\text{Trypanblau-negative Zellen} + \text{Trypanblau-positive Zellen}} \times 100$$

2.1.2 Zelllinie MOLT-4

Diese Leukämiezelllinie wurde 1972 aus peripherem Blut eines 19-jährigen Mannes mit akuter lymphoblastischer Leukämie von Minowada et al. isoliert und etabliert (Minowada et al., 1977). Es handelt sich hierbei um eine stabile T-Zell-Leukämie mit einem tetraploiden Kary-

otyp ($2n = 95$, D.I. = 2,12) und hoher terminaler desoxynukleotidyl-Transferase (TDT)-Aktivität (Bindung an Schaf-Erythrozyten und Rosettenbildung).

2.1.2.1 Kultivierungsbedingungen

Die Zelllinie MOLT-4 wurde als Suspension in RPMI 1640-Medium, versetzt mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin, in 850 ml Gewebekulturflaschen (Vorratsflaschen) bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Begasung im Brutschrank kultiviert. Dazu wurde jeweils montags eine Zelldichte von 3×10^4 Zellen/ml eingestellt. Der Mediumwechsel erfolgte mittwochs und freitags, indem 9/10 der Suspension verworfen und durch frisches Medium ersetzt wurden. Die Zellen wurden erst nach drei Wochen Kultivierungsdauer für die Versuche eingesetzt und nicht länger als zehn Wochen kultiviert, um Veränderungen der Zelllinie, die mit zunehmender Kulturdauer verstärkt auftreten können, zu vermeiden. Zu Beginn dieser Arbeit wurden die MOLT-4-Zellen subkultiviert und in Portionen von 10^8 Zellen/ml in RPMI 1640-Medium mit 10 % DMSO und 20 % FKS zuerst für drei Tage bei -70 °C, danach in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Alle Versuche wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um eine Kontamination der Zellkulturen zu vermeiden. Die verwendeten Lösungen wurden auf 37 °C vorgewärmt, und die Zentrifugation der Zellen erfolgte für 10 min bei 1.000 Upm, um eine mechanische Schädigung zu vermeiden.

2.1.2.2 Versuchsdurchführung

Zur Untersuchung der Apoptoseinduktion und der Zellzykluskinetik wurde die Suspensionskultur in einer Zelldichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml in 250 ml Kulturflaschen à 10 ml ausgesät. Vier Stunden nach dem Passagieren wurden – außer bei den Kontrollansätzen – die verschiedenen Konzentrationen der zu testenden Mistelextrakte Helixor A, M und P (2,5–200 µg/ml) und der Mistellektine I und III (0,05–10 ng/ml) mit Hilfe von Eppendorf-Pipetten unter sterilen Bedingungen zugesetzt. Nach 72 h Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurden die Kulturen abgeerntet.

Die jeweiligen Versuche wurden für jede Substanz dreimal an unterschiedlichen Passagen der Leukämiezelllinie MOLT-4 durchgeführt.

2.1.2.3 Aberntung

Nach Ablauf der 72 h Kultivierungsdauer wurden die Suspensionskulturen vorsichtig aus den Kulturflaschen in Zentrifugenröhrchen überführt. Danach erfolgte der unter 2.1.1 beschriebene Trypanblau-Ausschlusstest zur Bestimmung der Lebendzellzahl und der Wachstumsrate. Vor der durchflusszytometrischen Messung und der morphologischen Untersuchung mittels Fluoreszenzmikroskopie mussten die verschiedenen Testansätze fixiert werden.

Durchführung:

- Zellsuspension 10 min bei 1.000 Upm abzentrifugieren
- Überstand abpipettieren
- Zellpellet in 5 ml 70%igem eiskalten Ethanol auf dem Vortexer resuspendieren und 24 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixieren

Die so fixierten Zellsuspensionen konnten dann mehrere Monate bei $+4$ bis $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt und sowohl für die DNA-Durchflusszytometrie als auch für die fluoreszenzmikroskopische Auswertung eingesetzt werden.

2.1.3 Lymphozytenkultur

Die Isolierung von Lymphozyten aus heparinisiertem Vollblut von zehn weiblichen und zehn männlichen gesunden Probanden erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Nach dem Zentrifugieren erscheinen im Zentrifugenröhrchen vier Phasen: In der obersten Schicht erhält man das Plasma, in der zweiten eine weißliche Bande mononukleärer Zellen mit den Lymphozyten, in der dritten Schicht befindet sich das Ficoll-Trennmedium und schließlich in der vierten die Erythrozyten und Granulozyten.

Durchführung:

- 10 ml Vollblut im Verhältnis 1:1 mit vorgewärmten RPMI 1640-Fertigmedium mischen
- 10 ml Ficolltrennmedium vorsichtig mit der Zellsuspension überschichten
- 30 min bei 2.000 Upm abzentrifugieren (ohne Bremse)
- die oberste Schicht abpipettieren und verwerfen
- mononukleäre Bande vorsichtig absaugen und in ein Zentrifugenröhrchen überführen
- Lymphozyten in 20 ml vorgewärmten Medium resuspendieren und 10 min bei 1.500 Upm abzentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet erneut in 20 ml Medium vorsichtig resuspendieren und 10 min bei 1.000 Upm abzentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet in 20 ml Medium resuspendieren

2.1.3.1 Kultivierungsbedingungen

Nach Isolierung der Lymphozyten wurde die Zellzahl auf $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml Medium eingestellt, und die Kultivierung in RPMI 1640-Fertigmedium, versetzt mit 5 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin, erfolgte in 24er Multiwells (inklusive Zusatz von 0,25 ml PHA/Ansatz) für 72 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2 -Begasung im Brutschrank.

2.1.3.2 Versuchsdurchführung

Die isolierten Lymphozyten wurden nach Bestimmung der Zellzahl direkt für die jeweiligen Versuchsansätze eingesetzt. Hierzu wurden unter sterilen Bedingungen jeweils 5×10^5 Zellen, 0,25 ml PHA und die verschiedenen Konzentrationen der Mistelextrakte Helixor A, M und P (50–200 $\mu\text{g/ml}$) bzw. der Mistellektine I und III (0,05–20 ng/ml) in je eine Vertiefung der Multiwells pipettiert, diese wieder verschlossen und für 72 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

Diese Versuchsansätze wurden für jede Substanz an Lymphozytenkulturen von zehn weiblichen und zehn männlichen gesunden Probanden durchgeführt.

2.1.3.3 Aberntung

Nach 72 h Inkubationsdauer wurden die Lymphozytensuspensionen kurz mit einer Eppendorf-Pipette resuspendiert und aus der Multischale in Zentrifugenröhrchen überführt. Danach erfolgte der unter 2.1.1 beschriebene Trypanblau-Ausschlusstest zur Bestimmung der Lebendzellzahl und der Wachstumsrate. Vor der durchflusszytometrischen Messung und der morphologischen Untersuchung mittels Fluoreszenzmikroskopie mussten die verschiedenen Testansätze ebenfalls fixiert werden.

Durchführung:

- Zellsuspension 10 min bei 1.000 Upm abzentrifugieren
- Überstand abpipettieren
- Zellpellet in 2 ml 70%igem eiskalten Ethanol auf dem Vortexer resuspendieren und 24 h bei -20 °C fixieren

2.2 Durchflusszytometrie

2.2.1 Färbeverfahren mit DAPI/Sulforhodamin 101-Lösung

Bei der in dieser Arbeit angewandten Zwei-Parameter-Messung wird der DNA- und Protein-Gehalt der in Suspension vorliegenden Zellen bzw. Zellkerne gemessen. Der Farbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) wurde von Stöhr et al. (1977) und Otto (1994), Sulforhodamin 101 von Freeman und Crissman (1975) und Stöhr et al. (1977) in die Durchflusszytometrie zur DNA- bzw. Protein-Gehaltsbestimmung eingeführt. Die simultane Fluoreszenzmessung von DNA- und Protein-Gehalt ist mit den Farbstoffen DAPI und Sulforhodamin 101 möglich, da sich die Emissionsspektren der beiden Farbstoffe deutlich voneinander unterscheiden und somit gut durch die Teilerkante zu trennen sind. DAPI bindet DNA-spezifisch an Adenin- und Thymin-Sequenzen, sein Exzitationsoptimum liegt bei 350 nm und sein Emissionsoptimum bei 480 nm. Sulforhodamin 101 bindet an Proteinstrukturen und sein Exzitationsoptimum liegt bei 580 nm, sein Emissionsoptimum bei 620 nm.

Durchführung:

- 0,5 ml der fixierten Zellsuspension entnehmen und in ein Zentrifugenröhrchen überführen
- 10 min bei 1.000 Upm abzentrifugieren, Überstand vollständig verwerfen
- Zellpellet in 0,5 ml HR-A/Detergenzlösung aufnehmen und resuspendieren
- 10 min Inkubation bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln
- Zugabe von 2 ml HR-B/Färbelösung, 30 min bei Raumtemperatur färben

2.2.2 Zwei-Parameter-Messung des DNA- und Protein-Gehaltes

Die DNA-Durchflusszytometrie wurde an einem PAS III-Gerät der Firma Partec (Münster) durchgeführt. Nach einem Vorlauf des Gerätes von mindestens einer Stunde zur Stabilisierung wurde ein konstanter Partikelfluss von 100 bis 200 Zellen pro Sekunde durch die Messkammer geschleust, wobei der Zellstrom regelmäßig im Okular kontrolliert wurde. Für jede Messung wurden 5.000 Lymphozyten bzw. 10.000 Leukämiezellen ausgewertet. Die Daten der jeweiligen Messungen wurden gespeichert und die Histogramme zur Beurteilung der Messung ausgedruckt.

2.2.3 Auswertung

Im Anschluss an die durchflusszytometrische Messung wurden die gespeicherten Daten transformiert und mittels des Multi-Cycle-Computerprogramms von Rabinowitsch (1990; Phoenix Flow Systems, San Diego, Kalifornien) und des WinMDI-Computerprogramms (J. Trotter, Version 2.3, 1996) ausgewertet. Das Multi-Cycle-Programm basiert auf dem Prinzip der Kurvenanpassung, welche das DNA-Histogramm als Summe dreier analytischer Funkti-

onen darstellt, die die G0/G1-, S- und G2/M-Phasenverteilung beschreiben. Mithilfe des WinMDI-Programmes wurden spezielle Regionen (Gates) für apoptotische Bereiche definiert und der Prozentsatz der Ereignisse in diesen berechnet.

2.3 Zytospinpräparation

Zur Auswertung der einzelnen Apoptosestadien mussten die fixierten MOLT-4-Zellen und humanen Lymphozyten für die Fluoreszenzmikroskopie auf Objektträger aufgebracht werden. Hierzu wurden die Zellsuspensionen mithilfe einer Zytozentrifuge (Cytospin 3, Shandon) auf Objektträger zentrifugiert. Die Zellen befanden sich anschließend in einem gut auswertbaren, runden Bereich in der Mitte des Objektträgers.

Durchführung:

- Beschriftete Objektträger zusammen mit einem Filter und einem Trichter in einen Objektträgerhalter einspannen und in der Zytozentrifuge befestigen
- 50 µl der Zellsuspension mit 100 µl HR-A/Detergenzlösung mischen, 10 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 100 µl dieser Mischung in den jeweiligen Trichter des Objektträgerhalters pipettieren
- 4 min bei 1.200 Upm aufzentrifugieren
- Objektträger entnehmen (Zelldichte im Umkehrmikroskop kontrollieren) und 10 min auf der Heizplatte (55 °C) trocknen lassen
- Objektträger bis zur Färbung bei +4 °C im Kühlschrank aufbewahren

2.4 Fluoreszenzmikroskopie

Zur mikroskopischen Auswertung der unterschiedlichen Apoptosestadien wurden die Zytospinpräparate der Testansätze (Vgl. 2.3) mit DAPI/Sulforhodamin 101-Färbelösung eingebettet und an einem Zeiss Axioskop Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Für diese fluoreszenzmikroskopische Untersuchung wurde das gleiche Färbeverfahren angewendet wie für die DNA-Durchflusszytometrie, um eine Vergleichbarkeit der beiden Methoden zu gewährleisten. Das Zeiss Fluoreszenzmikroskop ist mit drei Single-Band-Pass-Filtern (Chroma Technology) für blaue, grüne und rote Fluoreszenzanregung und einem Doppel-Band-Pass-Filter für gleichzeitige Anregung von grüner und roter Fluoreszenz ausgestattet. Von jedem Testansatz für die Zelllinie MOLT-4 und die Lymphozytenkulturen wurden 1.000 Zellen fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet und daraus prozentuale Mittelwerte errechnet. Dabei wurden normale Zellen, Zellen mit stark kondensiertem Kern, Zellen mit fragmentiertem Kern sowie apoptotische Bodies erfasst (vgl. Abb. 13). Sowohl die Leukämiezelllinie MOLT-4 als auch humane Lymphozyten zeigen im normalen Zustand nur einen kleinen Zytoplasmasaum. Apoptotische Zellen mit stark kondensiertem Kern weisen dagegen einerseits einen deutlich größeren Zytoplasmasaum mit durch die Kondensierung stärker fluoreszierendem Kern auf. Außerdem kann das Chromatin in Schollen an der Kernperipherie kondensieren und der Kern nimmt Halbmondform an. Von Zellen mit stark fragmentiertem Kern spricht man, wenn dieser aus mindestens vier Fragmenten besteht und ebenfalls eine stärkere Kondensierung aufweist.

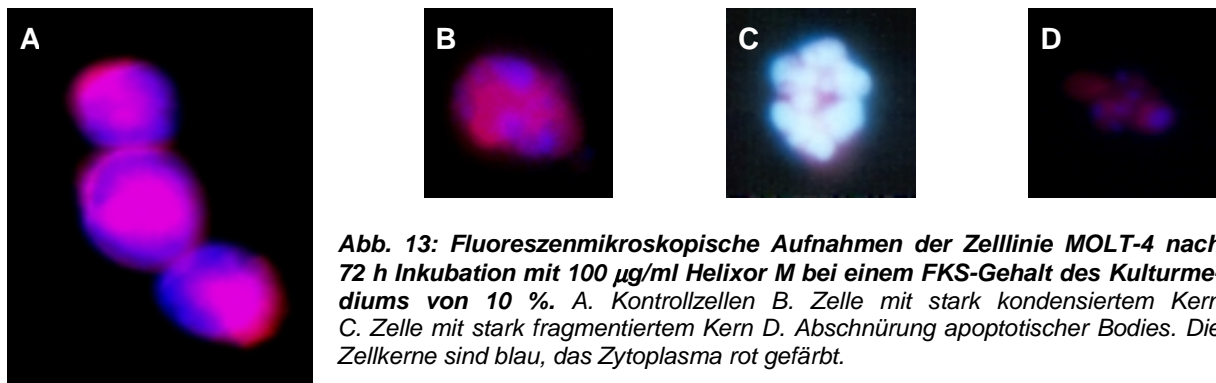


Abb. 13: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zelllinie MOLT-4 nach 72 h Inkubation mit 100 µg/ml Helixor M bei einem FKS-Gehalt des Kulturmediums von 10 %. A. Kontrollzellen B. Zelle mit stark kondensiertem Kern C. Zelle mit stark fragmentiertem Kern D. Abschnürung apoptotischer Bodies. Die Zellkerne sind blau, das Zytoplasma rot gefärbt.

2.5 SCE-Test

Zur Durchführung der SCE-Tests wurden heparinisierte Blutproben von jeweils fünf gesunden weiblichen und fünf gesunden männlichen Probanden im Alter zwischen 25 und 35 Jahren verwendet. Die zehn Probanden waren Nichtraucher, konsumierten nicht übermäßig Kaffee oder Alkohol, nahmen keine Medikamente ein und waren keiner mutagenen Belastung am Arbeitsplatz sowie übermäßiger körperlicher Anstrengung ausgesetzt. Diese Probanden waren nicht identisch mit den zehn Testpersonen für den MN-Test.

2.5.1 Versuchsdesign

Die Durchführung des SCE-Testes erfolgte in vier verschiedenen Ansätzen, wobei jeder Ansatz aus Vollblutkulturen von jeweils fünf weiblichen und fünf männlichen Probanden bestand. Im ersten Versuchsansatz wurde die Wirkung der drei Mistelextrakte Helixor Abietis, Mali und Pini im Konzentrationsbereich von 2,5–20 µg/ml getestet. Im zweiten Ansatz folgte eine Kombinationsbehandlung der einzelnen Mistelextrakte im Konzentrationsbereich von 2,5–20 µg/ml mit dem Zytostatikum Cyclophosphamid (40 µg/ml), im dritten Ansatz eine Kombinationsbehandlung der einzelnen Mistelpräparate mit dem Zytostatikum 5-Fluorouracil (5 µg/ml) und im vierten Ansatz eine Kombinationsbehandlung der Mistelextrakte und Methotrexat (3 µg/ml).

2.5.2 Blutkulturansatz und Zellkultivierung

Durchführung:

- Vollblutkulturansatz aus 8 ml RPMI 1640-Fertigmedium (mit 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 % FKS), 0,2 ml Phytohämagglutinin und 0,8 ml Vollblut
- Zugabe der Mistelextrakte Helixor A, M und P in den Konzentrationen 2,5/5/7,5/10/15/20 µg/ml und der Zytostatika Cyclophosphamid (40 µg/ml), 5-Fluorouracil (5 µg/ml) und Methotrexat (3 µg/ml)
- Kultivierung für 71 h im Brutschrank bei 95 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂ und 37 °C (täglich mindestens einmal durch vorsichtiges Schwenken mischen)
- 24 h nach Kulturbeginn:
Zugabe von 0,1 ml einer 9×10^{-4} molaren Bromdesoxyuridin-Lösung pro Kulturbehälter unter sterilen Bedingungen, so dass die Endkonzentration 3 µg/ml Kultur beträgt (Behälter wieder verschließen, vorsichtig schwenken und zur weiteren Inkubation in den Brutschrank stellen)
- 69 h nach Kulturbeginn bzw. zwei Stunden vor dem Abernten:
Zugabe von 0,2 ml einer 0,001%igen Colcemilösung pro Kulturbehälter (Behälter wieder verschließen, vorsichtig schwenken und zur weiteren Inkubation in den Brutschrank stellen)
- Abernten der Vollblutansätze nach insgesamt 71 h Kulturdauer

2.5.3 Aberntung der Kulturen

Durchführung:

- Blutkulturbehälter sorgfältig schwenken und den Inhalt in ein Zentrifugenröhrchen überführen
- 10 min bei 1.000 Upm abzentrifugieren, den Überstand bis auf 0,5 cm über dem Zellpellet abpipettieren und werfen
- Sediment in ca. 5 ml einer auf 37 °C vorgewärmten 0,0375 molaren KCl-Lösung, die das Aufquellen der Zellen durch Wasseraufnahme bewirkt, vorsichtig resuspendieren und dann die Zentrifugenröhrchen verschließen
- 20 min Hypotoniebehandlung im 37 °C-warmen Wasserbad
- 10 min bei 1.000 Upm abzentrifugieren, KCl-Lösung mit der Pipette entfernen und werfen
- Vorsichtige Zugabe frisch angesetzter, gekühlter Methanol-Eisessig-Lösung (im Verhältnis 3:1) tropfenweise an den oberen inneren Rand des Zentrifugenröhrchens (Zentrifugenröhrchen dabei ständig drehen, um ein Verklumpen der Zellen zu vermeiden), danach vorsichtig resuspendieren und die Röhrchen verschließen
- 30-minütige Fixierung bei 4°C
- 10 min bei 1.000 Upm abzentrifugieren, Überstand abpipettieren und werfen
- Erneute Zugabe von Fixans (Methanol-Eisessig-Lösung), resuspendieren und 10 min bei 1.000 Upm abzentrifugieren
- Vorgang wiederholen, bis Sediment möglichst weiß erscheint
- Zellen nach letztem Abpipettieren in ca. 5 ml frischem Fixans resuspendieren, Röhrchen verschließen und die Zellsuspension bis zum Auftropfen auf Objektträger bei 4 °C aufbewahren.

2.5.4 Präparation der Objektträger

Durchführung:

- Zellsuspension ca. 5 min bei 1.000 Upm abzentrifugieren, Überstand werfen und entsprechend der Sedimentmenge mit mehreren Tropfen Fixans resuspendieren
- Aus 80–100 cm Höhe ca. 10–12 Tropfen der Zellsuspension auf gereinigte und nasse Objektträger fallenlassen
- Trocknung der Objektträger auf der Heizplatte bei 55 °C
- Zelldichte im Umkehrmikroskop kontrollieren und unter Umständen die Zellsuspension vor der Herstellung weiterer Präparate verdünnen
- Reicht die Spreitung nicht aus, wird aus größerer Höhe aufgetropft; weisen die Chromosomen einen stark lichtbrechenden Saum auf oder sind störende Proteinpartikel auf dem Präparat erkennbar, wird die Fixierung wiederholt

2.5.5 Differentielle Schwesterchromatid-Färbung (SCE-Färbung)

Um die in den Chromosomen auftretenden Schwesterchromatid-Austausche sichtbar zu machen, wurde die von Perry und Wolff (1974) beschriebene Fluoreszenz-Plus-Giemsa (FPG)-Methode eingesetzt. Zur Verbesserung der Färbung wurden die Präparate vor der Anfärbung gealtert. Hierzu wurden die Objektträger für mindestens 24 h bei 37 °C im Trockenschrank aufbewahrt.

Durchführung:

- Objektträger für 10 min in eine mit Aluminiumfolie abgedunkelte Küvette mit Fluorochrom-Gebrauchslösung stellen
- Präparate zweimal in Phosphatpuffer spülen, dann mit der betroffenen Seite nach oben nebeneinander in eine flache Kunststoffwanne legen und ca. 1 cm hoch mit Phosphatpuffer bedecken
- 25minütige UV-Behandlung der Präparate (Abstand 40 cm, Wellenlänge 254 nm)
- 90minütige Inkubation der Objektträger in einer mit 2 x SSC-Lösung gefüllten Küvette bei 60 °C im Wasserbad
- Objektträger in Aqua dest. spülen, um eventuell vorhandene Kristalle zu entfernen
- Rückseite der Objektträger zur Entfernung von Salzurückständen mit einem fusselfreien Tuch abwischen und lufttrocknen
- Trockene Objektträger für 10 min in 7%iger Giemsa-Lösung färben, in Aqua dest. spülen und lufttrocknen

2.5.6 Bestimmung der SCE-Rate

Zur Ermittlung der SCE-Rate wurden pro Proband 50 Mitosen des zweiten Replikationszyklus (mit den dafür typischen „Harlekin“-Chromosomen) bei 1.000facher Vergrößerung auf SCEs pro Mitose an HPG (= Hoechst-Plus-Giemsa)-gefärbten und verschlüsselten Präparaten untersucht.

Zur Auswertung wurden nur solche Metaphasen herangezogen, welche vollständig waren und deren Chromosomen sich nicht überlagerten, da ansonsten keine exakte Erfassung der SCE-Rate möglich war.

Zur Identifizierung der Schwesterchromatid-Austausche wurden folgende Kriterien herangezogen:

- Einem hellen Abschnitt auf einer dunklen Chromatide muß an der entsprechenden Stelle auf der hellen Schwesterchromatide ein dunkler Bereich gegenüberliegen.
- Ein Hell-Dunkel-Wechsel an einer Chromatide, der nicht auch analog an der gleichen Stelle auf der dazugehörigen Schwesterchromatide erkennbar ist, wird fehlerhafter Färbung zugeschrieben und demzufolge nicht als SCE gewertet.
- Als SCE zählt man nicht die ausgetauschten Bereiche, sondern die Bruchereignisse, die dazu notwendig waren. Hierbei wird jeder Hell-Dunkel-Wechsel als ein SCE gezählt, so dass nicht terminal liegende Austausche als zwei SCEs gewertet werden.
- Ein Hell-Dunkel-Wechsel im Zentromerbereich der Chromosomen wird nicht als SCE gezählt, da dieser auf eine eventuelle Verdrillung der beiden Chromatiden im Zentromer zurückzuführen sein könnte.

2.5.7 Bestimmung der Zellzyklusverteilung

Neben der Bestimmung der SCE-Rate wurden die HPG-gefärbten Präparate auch zur Bestimmung der Zellproliferationskinetik (Anzahl der Zellteilungen innerhalb eines bestimmten Zeitraums) herangezogen (Beek und Obe, 1979).

Um das Verhältnis der Mitosen im ersten, zweiten und dritten Replikationszyklus zu bestimmen, wurden pro Versuchsperson 100 Mitosen bei 1.000facher Vergrößerung analysiert und den einzelnen Zellteilungszyklen zugeordnet.

Die Chromatiden färben sich entsprechend der Anzahl der durchlaufenen Replikationszyklen infolge unterschiedlich starker Inkorporation von BrdU verschieden stark an. Hierdurch wird es möglich, die Mitosen verschiedenen Zellteilungszyklen zuzuordnen.

Dem ersten Zellzyklus (M1) wurden die Mitosen zugerechnet, die nur Chromosomen enthielten, deren beide Chromatiden gleichmäßig dunkel gefärbt waren, woraus sich schließen ließ, dass sich diese Zellen seit der BrdU-Zugabe nur einmal geteilt hatten. Da die Einwirkzeit des BrdU bis zur Aberntung 47 h betrug und die Zellen sich in dieser Zeit einmal geteilt hatten, lag die Zyklusdauer dieser Zellen bei 47 h.

Dem zweiten Zellzyklus (M2) wurden die Mitosen zugeordnet, deren Chromosomen alle das typische „Harlekin-Muster“ aus einer dunklen und einer hellen Chromatide aufwiesen. Diese Zellen hatten sich im Verlauf der BrdU-Inkubation zweimal geteilt, woraus man auf eine durchschnittliche Zyklusdauer von 23,5 h schließen konnte.

Dem dritten oder höheren Zellzyklen (M3+) wurden die Mitosen zugeordnet, bei denen mindestens die Hälfte der Chromosomen aus zweifach BrdU-substituierten Chromatiden bestanden und aus diesem Grund hell erschienen. Diese Zellen hatten sich im Verlauf der BrdU-Inkubation mindestens dreimal geteilt. Für Mitosen des dritten Zellzyklus ergab sich eine durchschnittliche Zellzyklusdauer von 15,5 h.

Durch die Ermittlung der Zellzyklusverteilung kann man Aufschluss darüber gewinnen, ob eine Substanz auf das Zellteilungsverhalten hemmend (wenn sich die Mitosen nach der Zugabe im Zellzyklus M1 ansammeln) oder fördernd (wenn sich die Mitosen im Zellzyklus M3+ ansammeln) auswirkt. Dieses Testverfahren wird auch als „Lymphozyten-Proliferations-Kinetik-Test“ (= LPK-Test) bezeichnet.

2.5.8 Bestimmung des Proliferationsindex

Die Ermittlung der Zellzyklusverteilung ermöglicht die Berechnung des Proliferationsindex (PI) nach folgender Formel:

$$PI = \frac{1 \times M1 + 2 \times M2 + 3 \times M3}{\text{Anzahl der Metaphasen}}$$

2.6 Mikronukleus-Test

Zur Durchführung des Mikronukleus-Testes wurden heparinisierte Blutproben von fünf gesunden weiblichen und fünf gesunden männlichen Probanden im Alter zwischen 25 und 35 Jahren verwendet. Die zehn Probanden waren Nichtraucher, konsumierten nicht übermäßig Kaffee oder Alkohol, nahmen keine Medikamente ein und waren keiner mutagenen Belastung am Arbeitsplatz sowie übermäßiger körperlicher Belastung ausgesetzt.

2.6.1 Versuchsdesign

Die Durchführung des MN-Testes erfolgte in vier verschiedenen Ansätzen, wobei jeder Ansatz aus Vollblutkulturen von jeweils fünf weiblichen und fünf männlichen Probanden bestand. Im ersten Versuchsansatz wurde die Wirkung der drei Mistelextrakte Helixor Abietis, Mali und Pini im Konzentrationsbereich von 2,5–20 µg/ml getestet. Im zweiten Ansatz folgte eine Kombinationsbehandlung der einzelnen Mistelextrakte im Konzentrationsbereich von 2,5–20 µg/ml mit dem Zytostatikum Cyclophosphamid (40 µg/ml), im dritten Ansatz eine Kombinationsbehandlung der einzelnen Mistelpräparate mit dem Zytostatikum 5-Fluorouracil (5 µg/ml) und im vierten Ansatz eine Kombinationsbehandlung der Mistelextrakte und Methotrexat (3 µg/ml).

2.6.2 Blutkulturansatz und Zellkultivierung

Durchführung:

- Vollblutkulturansatz aus 8 ml RPMI 1640-Fertigmedium (mit 1 % Penicillin/Streptomycin, 5 % FKS), 0,2 ml Phytohämagglutinin und 0,8 ml Vollblut
- Zugabe der Mistelextrakte Helixor A, M und P in den Konzentrationen 2,5/5/7,5/10/15/20 µg/ml und der Zytostatika Cyclophosphamid (40 µg/ml), 5-Fluorouracil (5 µg/ml) und Methotrexat (3 µg/ml)
- Kultivierung für 71 h im Brutschrank bei 95 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂ und 37 °C (täglich mindestens einmal durch vorsichtiges Schwenken mischen)
- Nach 47 h (24 h vor dem Abernten):
- Zugabe von 13,5 µl einer Cytochalasin B-Lösung (Stammlösung: 1 mg Cytochalasin B/0,5 ml DMSO) pro Kulturbehälter unter sterilen Bedingungen, so dass die Endkonzentration 3 µg/ml Kultur beträgt (Behälter wieder verschließen, vorsichtig schwenken und zur weiteren Inkubation in den Brutschrank stellen)
- Abernten der Vollblutansätze nach insgesamt 71 h Kulturdauer

2.6.3 Aberntung der Kulturen

Das Abernten unterschied sich von 2.5.3 nur in folgenden Arbeitsschritten:

- Hypotoniebehandlung 10 min im Wasserbad (37 °C) mit 0,05 molarer KCl
- Verwendung von Fixans (Methanol-Eisessig-Gemisch) im Verhältnis 9:1, um das Zytoplasma der Zellen möglichst wenig zu schädigen

2.6.4 Präparation der Objektträger

Durchführung:

- Zellsuspension ca. 5 min bei 1000 Upm abzentrifugieren, Überstand verwerfen und entsprechend der Sedimentmenge mit mehreren Tropfen Fixans resuspendieren
- Aus 10–25 cm Höhe ca. 6–8 Tropfen der Zellsuspension auf gereinigte und nasse Objektträger im Abstand von ca. 1,5–2 cm fallenlassen
- Trocknung der Objektträger auf der Heizplatte bei 55 °C
- Zelldichte im Umkehrmikroskop kontrollieren und unter Umständen die Zellsuspension vor der Herstellung weiterer Präparate verdünnen

2.6.5 Färbeverfahren

Als Färbeverfahren wurde die Normal-Giemsa-Färbung angewendet, die sofort nach Trocknung der Objektträger ohne weitere Vorbehandlung erfolgen konnte.

Durchführung:

- Präparate für 10 min in die Färbelösung stellen, die jeweils frisch hergestellt und in eine Glasküvette überführt wird
- Objektträger kurz in Aqua dest spülen und lufttrocknen
- Bei zu schwacher Färbung kann nachgefärbt werden, bei zu starker Färbung ist eine Entfärbung durch eine aufsteigende Ethanolreihe (70 %, 80 % und 99 %) möglich

2.6.6 Bestimmung des Mitose-Indexes

Zur Ermittlung des Mitose-Indexes (durchschnittliche Mitosen-Anzahl pro 1.000 Interphasekerne) wurden die Normal-Giemsa gefärbten Objektträger bei 650facher Vergrößerung ausgewertet. Es wurden alle Mitosen gezählt, die bei 1.000 Interphasekernen auftraten. Kleine, dunkle und sehr stark kondensierte, stark lichtbrechende oder fragmentierte Zellkerne wurden bei der Zählung nicht berücksichtigt, da es sich hierbei wahrscheinlich um tote bzw. teilungsunfähige Zellen handelte und solche Kerne nicht immer von Färbeartefakten unterscheidbar sind.

Pro Ansatz wurden vier Objektträger ausgewertet, so dass 4.000 Interphasekerne mit den dazwischen liegenden Mitosen ausgewertet wurden. Aus den vier Zählungen wurde dann der durchschnittliche Mitose-Index berechnet.

2.6.7 Bestimmung der Mikronukleus-Rate

Unter der Mikrokern-Rate versteht man die Anzahl der pro 500 Doppelkerne (bei der Zytokinese-Block-Methode) auftretenden Mikrokerne. Zur Ermittlung der Mikrokern-Rate wurden ausschließlich Doppelkerne herangezogen, Einfach- oder Mehrfachkerne wurden nicht berücksichtigt. Pro Ansatz wurden vier Objektträger ausgezählt, so dass insgesamt 2.000 Doppelkerne ausgewertet wurden. Aus den vier Zählungen wurde dann die durchschnittliche Mikrokern-Rate errechnet. Auch hier erfolgte die Auswertung an Normal-Giemsa-gefärbten

verschlüsselten Präparate bei 650- und 1000facher Vergrößerung.

Zur Klassifizierung der Mikrokerne wurden folgende Kriterien nach Countryman und Heddle (1976) eingehalten:

- Die Färbungsintensität des Mikrokerns darf die des Hauptkerns nicht überschreiten. In der Regel zeigt der Mikrokern einen helleren Farbton als der Hauptkern.
- Der Durchmesser des Mikrokerns darf maximal ein Drittel des Hauptkerndurchmessers betragen.
- Der Mikrokern darf keine lichtbrechende Reflexion aufweisen (d. h. nicht glänzen) und er darf nicht dunkler als der Hauptkern gefärbt sein, um eine Verwechslung mit anderen gefärbten Partikeln auszuschließen.
- Die Entfernung des Mikrokerns zum zugehörigen Hauptkern darf den dreifachen Hauptkerndurchmesser nicht überschreiten.
- Mikrokern und Hauptkern dürfen sich nicht berühren.
- Beim Hauptkern dürfen nicht mehr als zwei Mikronuklei liegen.

2.7 Statistische Auswertung

2.7.1 Arithmetischer Mittelwert und Standardabweichung

Mittelwert und Standardabweichung stellen wichtige Kennwerte einer Stichprobe dar.

Der Mittelwert bestimmt die durchschnittliche Größe der Stichprobenwerte und ist als deren arithmetisches Mittel definiert. Das arithmetische Mittel ist die Summe aller Beobachtungen, geteilt durch die Anzahl dieser Beobachtungen.

Die Standardabweichung steht für die Streuung der Stichprobenwerte um das arithmetische Mittel. Sie ist die positive Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung.

2.7.2 t-Test

Die Teststatistik eines Student'schen t-Testes dient zum Vergleich zweier Mittelwerte aus normalverteilten Grundgesamtheiten (Bronstein und Semendjajew, 1989). Als besonders empfindlicher Test spricht dieser Test schon auf sehr geringe Unterschiede an. Voraussetzung für seine Anwendung ist, dass die Einzelbeobachtungen unabhängig voneinander und normalverteilt sind. Dieses Testverfahren wurde eingesetzt, um die Signifikanz der Veränderung in der Zellzyklusverteilung, der Apoptoseinduktion, der Mikrokern-Rate, der SCE-Rate und des Mitoseindex nach Inkubation der Zellen mit den verschiedenen Substanzen zu überprüfen.

Die Signifikanzgrenzen (Irrtumswahrscheinlichkeit in Prozent) wurden folgendermaßen festgelegt:

Wenn t gleich oder größer als der zugehörige Tabellenwert war, wurde der Unterschied bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von

5 % ($p \leq 0,05$) als schwach signifikant,

1 % ($p \leq 0,01$) als signifikant,

0,1 % ($p \leq 0,001$) als hoch signifikant

eingestuft. War t kleiner als der zugehörige Wert des 5 % Niveaus, so galten die Unterschiede nicht als signifikant.

2.8 Reagenzien

- RPMI 1640-Fertigmedium (Gibco)
- Foetales Kälberserum (Gibco)
- Penicillin/Streptomycin-Lösung (Gibco-BRL)
- Trypanblau (Sigma)
- Dimethylsulfoxid (Sigma)
- HR-A/Detergenzlösung (Partec, Münster)
- HR-B/Färbelösung (Partec, Münster)
[DAPI/Sulforhodamin 101]
- Ficoll Histopaque 1077 (Sigma)
- Ethanol (EtOH, 99,8 % p. a.)
- Cyclophosphamid (Sigma)
- 5-Fluorouracil (Sigma)
- Methotrexat (Sigma)
- Cytochalasin B (C₂₉H₃₇O₅)-Stammlösung (2mg/ml):
2 mg Cytochalasin B
1 ml DMSO
- Colcemid-Lösung: 10 µg/ml (Serva)
- KCl-Lösung (0,0375 M):
1,398 g KCl
500 ml Aqua dest.
- KCl-Lösung (0,05 M):
1,864 g KCl
500 ml Aqua dest.
- Sörensen-Puffer (pH = 6,8)
Lösung A: 19,08 g KH₂HPO₄
1 l Aqua dest.
Lösung B: 11,88 g Na₂HPO₄
1 l Aqua dest.
50 ml Lösung A und 49,2 ml Lösung B mischen
- Giensa Färbelösung:
5 ml Giensa (Merck)
65 ml Sörensen-Puffer (pH = 6,8)
30 ml Aqua dest.

- 7 %ige Giemsa-Lösung:
7 ml Giemsa (Merck)
93 ml Phosphatpuffer (pH = 6,8)
- BrdU-Stammlösung:
13,5 mg BrdU (Merck)
5 ml Aqua dest.
- BrdU-Gebrauchslösung:
0,5 ml BrdU-Stammlösung
5 ml Aqua dest.
- Speziallösung:
2,237 g KCl (Merck)
8,766 g NaCl (Merck)
in 1 l Aqua dest.
- Hoechst-Stammlösung (4 °C):
5 mg Hoechst-Farbstoff 33258
100 ml Speziallösung
- Fluorochrom-Gebrauchslösung:
Hoechst-Stammlösung 1:100 mit Speziallösung verdünnen
- Stammlösung A (4 °C):
45,36 g KH_2PO_4 in 1 L Aqua dest.
- Stammlösung B (4 °C):
59,33 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ in 1 l Aqua dest.
- Phosphat-Puffer (pH = 6,8):
100 ml Stammlösung A (4 °C)
100 ml Stammlösung B (4 °C)
800 ml Aqua dest.
- 2 x SSC (Salz-Sodium-Citrat) (4 °C):
17,528 g NaCl
8,820 g Na-Citrat $\times \text{H}_2\text{O}$
in 1 l Aqua dest.

3 Ergebnisse

3.1 Wachstumshemmendes und apoptoseinduzierendes Potential von Helixor A, M und P getestet an der Zelllinie MOLT-4

3.1.1 Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung, Induktion von Apoptose und Zellzyklusbeeinflussung bei einem FKS-Gehalt des Kulturmediums von 15 %

3.1.1.1 Bestimmung der Wachstumsrate

Die Auswertung des Trypanblau-Ausschlusstestes ergab für Helixor A eine schwach signifikante Wachstumshemmung bei 10 $\mu\text{g/ml}$, die ab 20 $\mu\text{g/ml}$ signifikant und ab 100 $\mu\text{g/ml}$ hoch signifikant wurde. Für Helixor M konnte eine signifikante Abnahme der Wachstumsrate bei 10 $\mu\text{g/ml}$, die ab 20 $\mu\text{g/ml}$ hoch signifikant wurde, nachgewiesen werden. Helixor P bewirkte eine schwach signifikante Wachstumshemmung der Zelllinie MOLT-4 bei 2,5 $\mu\text{g/ml}$, die bei 5 $\mu\text{g/ml}$ signifikant und ab 10 $\mu\text{g/ml}$ hoch signifikant wurde.

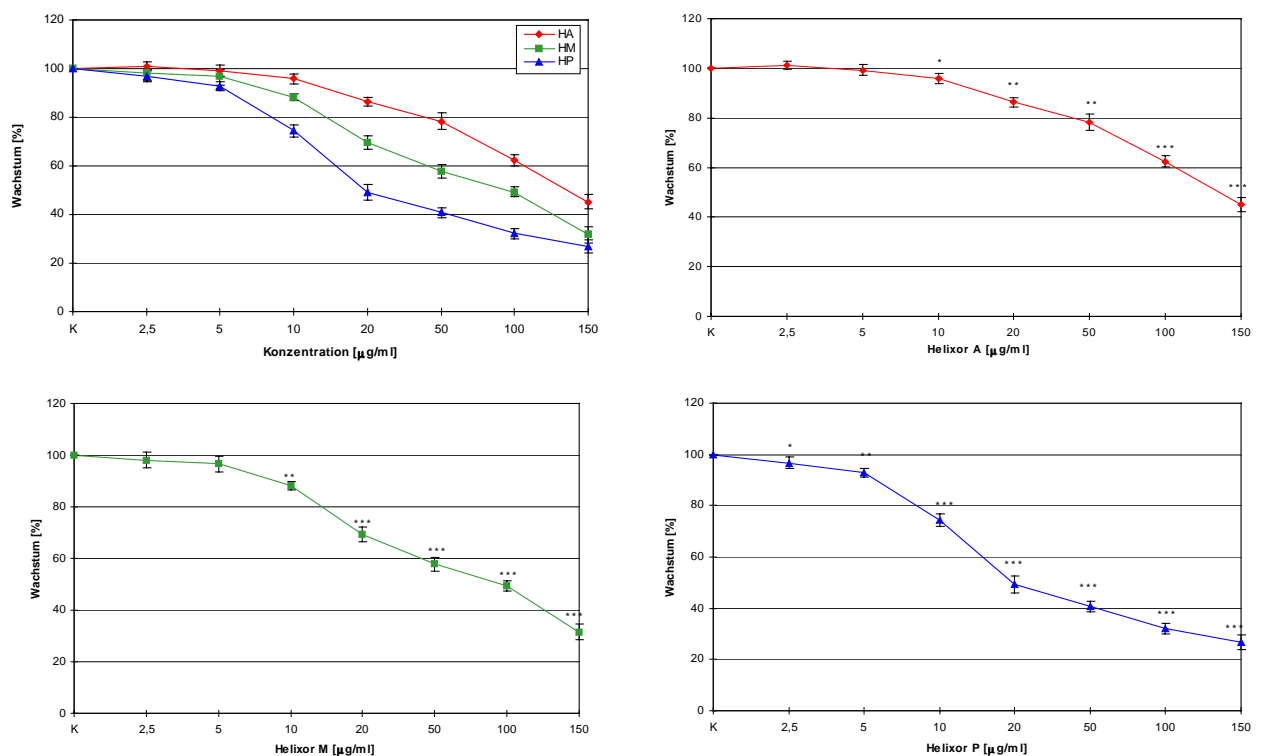


Abb. 14: Wachstumsrate der Zelllinie MOLT-4 nach 72 h Inkubation mit Helixor A, M und P bei einem FKS-Gehalt von 15 %. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.1.1.2 Durchflusszytometrische Analyse

Das apoptoseinduzierende Potential der Mistelextrakte *Helixor Abietis*, *Mali* und *Pini* auf die Zelllinie MOLT-4 bei einem FKS-Gehalt des Kulturmediums von 15 % konnte im 1-Parameter-Histogramm als Sub-G1-Peak nachgewiesen werden. Die Auswertung der 2-Parameter-Dot Plots zeigte außerdem, dass sowohl Zellen aus der G0/G1- als auch aus der S- und G2/M-Phase in Apoptose übergehen. Der Sub-G1-Bereich wurde um diese Population erweitert (Abb. 15, HP 100 µg/ml, schwarzes Gate), zu Beginn jeder Messreihe festgelegt und nicht mehr verändert.

Diese Ergebnisse zur Untersuchung der Phasenspezifität sind direkt vergleichbar mit den nachfolgenden Versuchen bei reduziertem FKS-Gehalt des Kulturmediums (vgl. 3.1.2.2, 3.1.3.2 und 3.1.4.2), weshalb dort auf eine erneute graphische Darstellung der Dot Plots verzichtet wird.

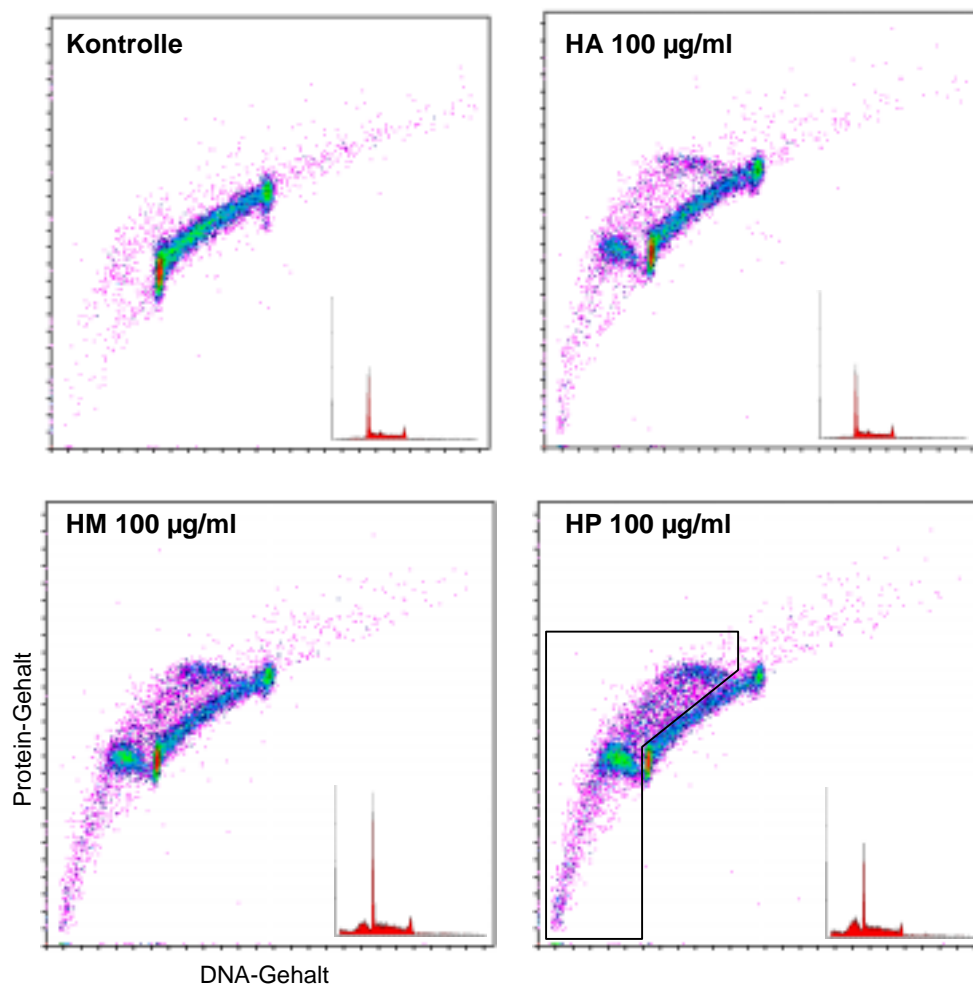


Abb. 15: Histogramme der 1- und 2-Parameter-Messung nach 72 h Inkubation der Zelllinie MOLT-4 mit *Helixor A*, *M* und *P* bei einem FKS-Gehalt von 15 %. Das bei HP 100 µg/ml eingezeichnete Gate zeigt den erweiterten Sub-G1-Bereich.

Die quantitative Auswertung ergab für Helixor A einen schwach signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen ab 150 $\mu\text{g/ml}$ und für Helixor M einen schwach signifikanten Anstieg ab 100 $\mu\text{g/ml}$, der sich bei einer Konzentration von 150 $\mu\text{g/ml}$ signifikant erhöhte. Für den Extrakt Helixor P konnte ab 20 $\mu\text{g/ml}$ ein schwach signifikanter und ab 100 $\mu\text{g/ml}$ signifikanter Anstieg der apoptotischen Zellpopulation gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden.

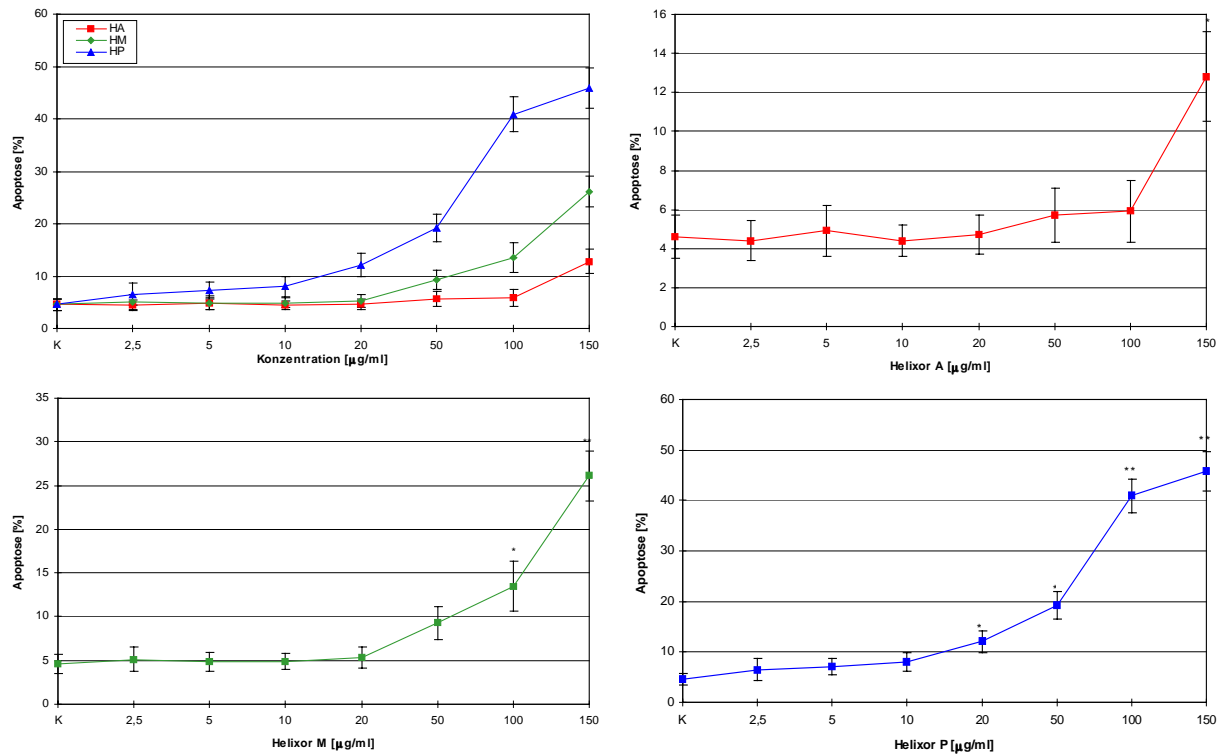


Abb. 16: Durchflusszytometrische Auswertung des Sub-G1-Bereiches der Zelllinie MOLT-4 nach 72 h Inkubation mit Helixor A, M und P bei einem FKS-Gehalt von 15 %. * = schwach signifikante, ** = signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.1.1.3 Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien

Die morphologische Auswertung der apoptotischen Zellpopulation ergab für alle drei getesteten Mistelextrakte eine Zusammensetzung aus Zellen mit stark kondensiertem Kern, stark fragmentiertem Kern und apoptotischen Bodies, wobei jeweils der Anteil an fragmentierten Kernen überwog.

Beim Frischpflanzenextrakt Helixor A stieg der Anteil stark kondensierter Kerne ab einer Konzentration von 150 $\mu\text{g/ml}$ signifikant an, der Prozentsatz fragmentierter Kerne (ab 150 $\mu\text{g/ml}$) und apoptotischer Körperchen (ab 20 $\mu\text{g/ml}$) veränderte sich schwach signifikant. Das Präparat Helixor M zeigte bei einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ einen schwach signifikanten Anstieg stark kondensierter und fragmentierter Kerne, der sich mit zunehmender Konzentration signifikant erhöhte. Der Anteil apoptotischer Bodies stieg ab 20 $\mu\text{g/ml}$ schwach signifikant gegenüber der Kontrolle und erhöhte sich ab 50 $\mu\text{g/ml}$ signifikant. Der Extrakt Helixor P bewirkte eine schwach signifikante Zunahme stark kondensierter Kerne ab 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (bei 10 $\mu\text{g/ml}$ signifikant) und einen schwach signifikanten Anstieg stark fragmentierter Kerne ab 5 $\mu\text{g/ml}$, der bei den Konzentrationen 20, 100 und 150 $\mu\text{g/ml}$ signifikant war. Der prozentuale Anteil apoptotischer Bodies war ab einer Konzentration von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ schwach signifikant und bei den Konzentrationen 20, 50 und 150 $\mu\text{g/ml}$ signifikant erhöht.

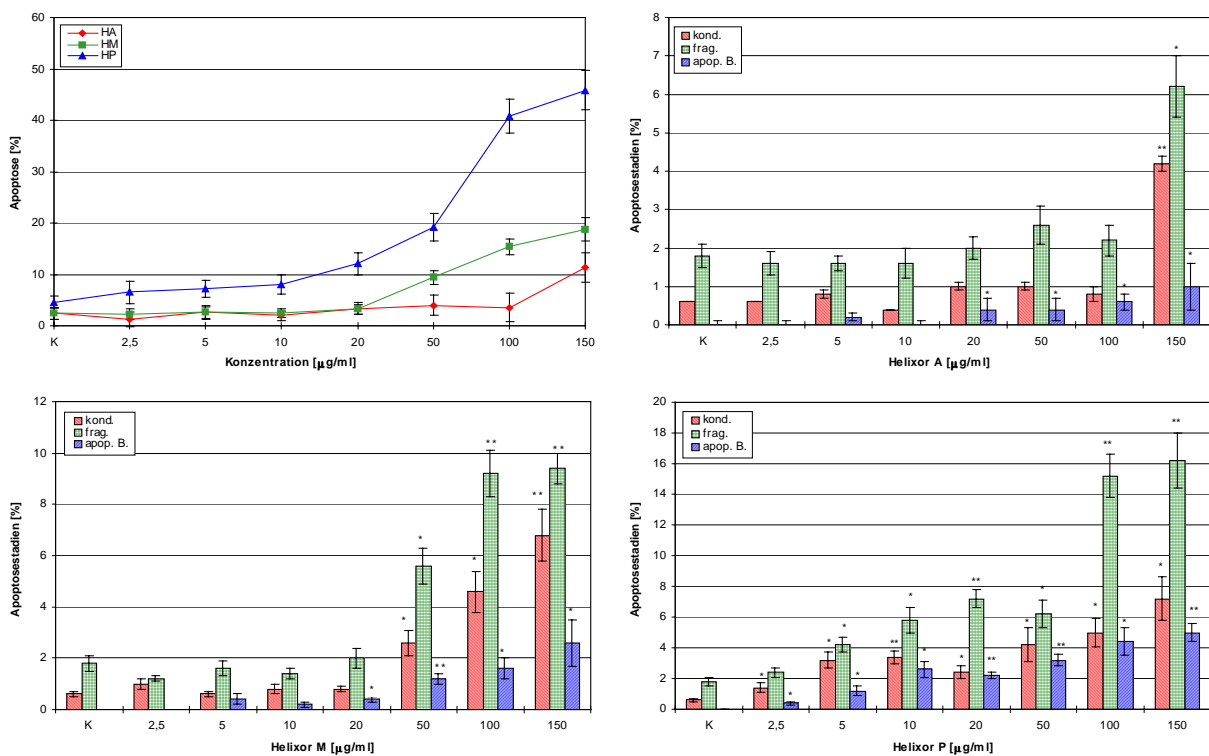


Abb. 17: Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien der Zelllinie MOLT-4 nach 72 h Inkubation mit Helixor A, M und P bei einem FKS-Gehalt von 15 %. * = schwach signifikante, ** = signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.1.1.4 Vergleich der durchflusszytometrischen und mikroskopischen Auswertung

Der Summenvergleich aller mikroskopisch erfassten Apoptosestadien mit der durchflusszytometrischen Bestimmung des Sub-G1-Peaks wies für Helixor A keinen signifikanten Unterschied in der quantitativen Auswertung auf. Für den Mistelextrakt Helixor M konnte ein schwach signifikanter Unterschied zwischen der mikroskopischen und durchflusszytometrischen Auswertung bei einer Konzentration von 150 $\mu\text{g/ml}$ und für Helixor P konnte eine signifikante Differenz bei 100 und 150 $\mu\text{g/ml}$ festgestellt werden.

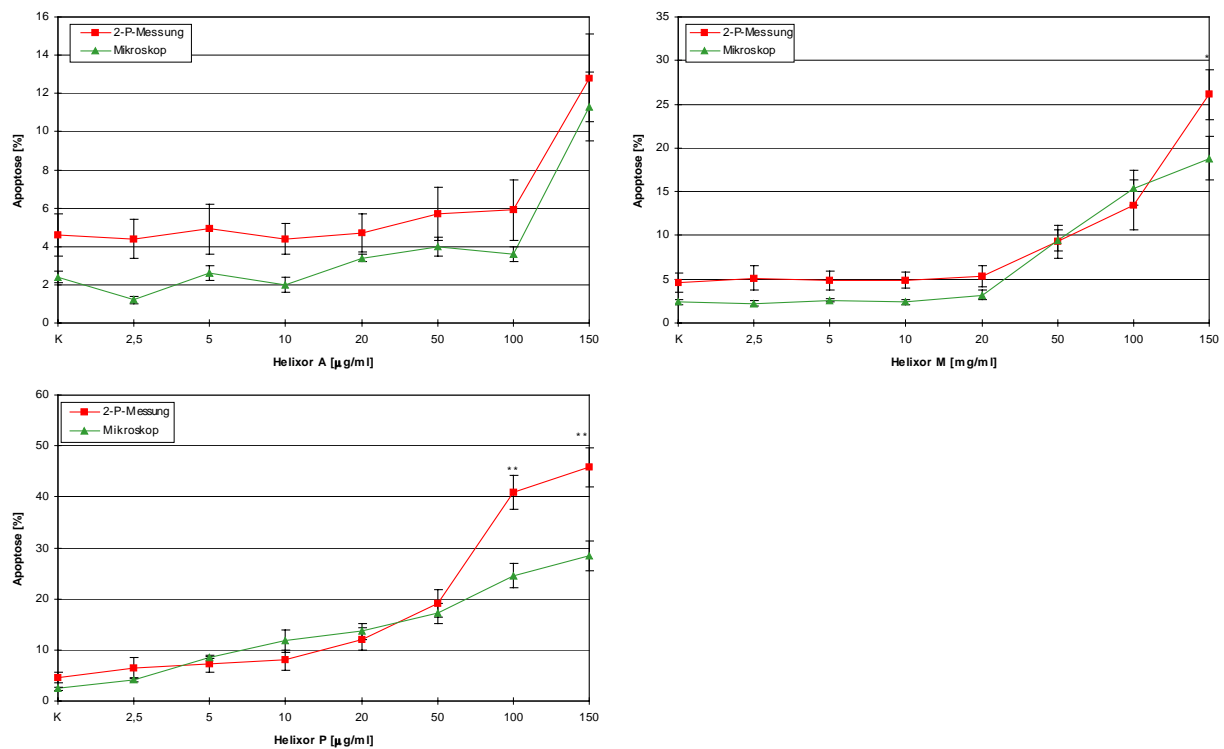


Abb. 18: Vergleich der durchflusszytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der durch Helixor A, M und P induzierten Apoptose bei der Zelllinie MOLT-4. * = schwach signifikante, ** = signifikante Differenz zwischen Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie.

3.1.1.5 Zellzyklusanalyse

Die Auswertung der Ein-Parameter-Histogramme mit dem Multi-Cycle-Programm zeigte für alle Helixor-Präparate leichte Schwankungen in den prozentualen Anteilen der einzelnen Zellzyklusphasen, es traten jedoch keine signifikanten Veränderungen gegenüber der Kontrolle, insbesondere nach dem signifikanten Anstieg der apoptotischen Zellpopulation, auf.

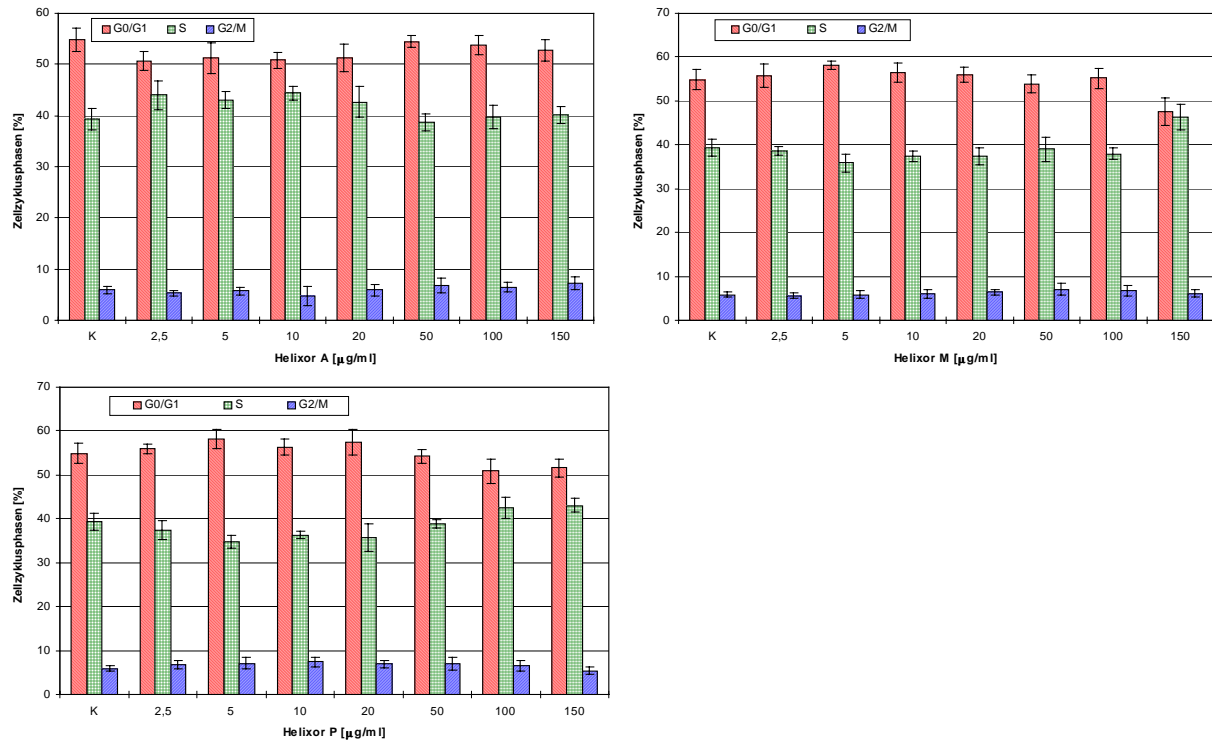


Abb. 19: Zellzyklusanalyse der Zelllinie MOLT-4 nach 72 h Inkubation mit Helixor A, M und P bei einem FKS-Gehalt von 15 %.

3.1.2 Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung, Induktion von Apoptose und Zellzyklusbeeinflussung bei einem FKS-Gehalt des Kulturmediums von 10 %

3.1.2.1 Bestimmung der Wachstumsrate

Die Bestimmung der Wachstumsrate zeigte für Helixor A eine schwach signifikante Abnahme bei 10 $\mu\text{g/ml}$, die ab 20 $\mu\text{g/ml}$ signifikant und ab 100 $\mu\text{g/ml}$ hoch signifikant wurde. Für Helixor M war eine schwach signifikante Wachstumshemmung bei 5 $\mu\text{g/ml}$ festzustellen, die bei 10 $\mu\text{g/ml}$ signifikant und ab 20 $\mu\text{g/ml}$ hoch signifikant wurde. Das Präparat Helixor P bewirkte eine schwach signifikante Abnahme der Wachstumsrate ab 2,5 $\mu\text{g/ml}$, die bei 5 $\mu\text{g/ml}$ signifikant und ab 10 $\mu\text{g/ml}$ hoch signifikant wurde.

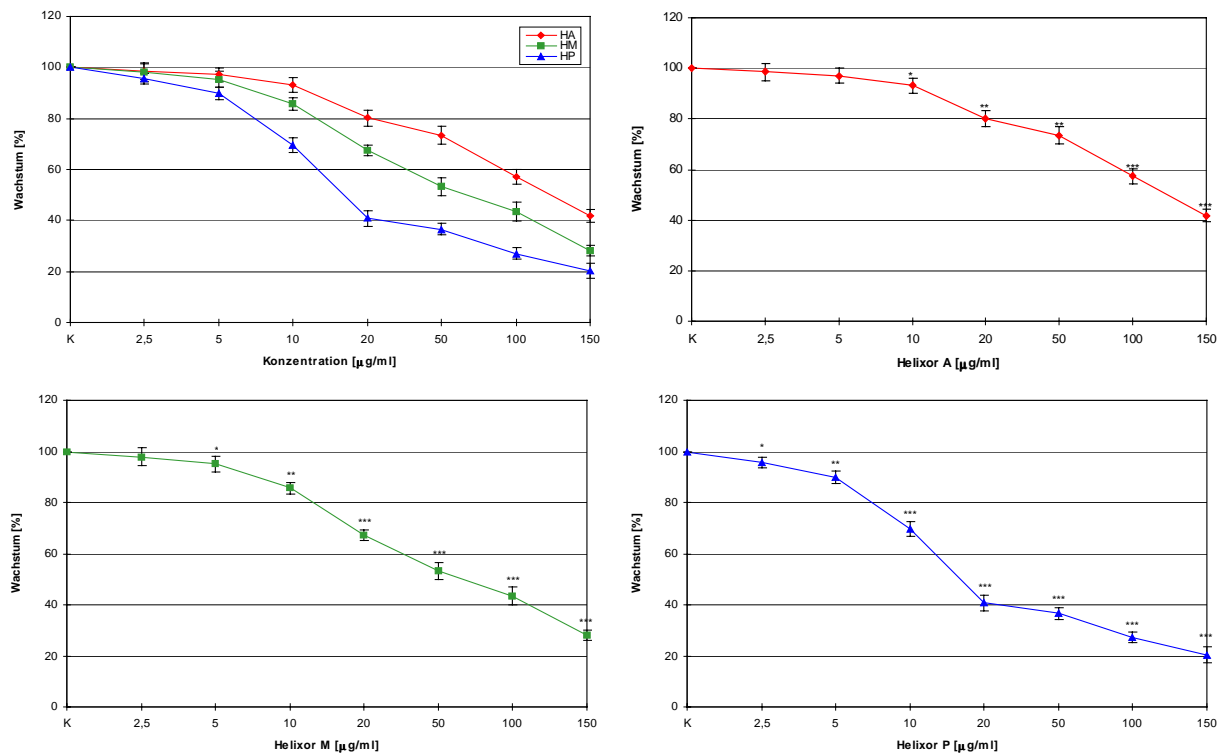


Abb. 20: Wachstumsrate der Zelllinie MOLT-4 nach 72 h Inkubation mit Helixor A, M und P bei einem FKS-Gehalt von 10 %. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.1.2.2 Durchflusszytometrische Analyse

Das apoptoseinduzierende Potential der Mistelextrakte Helixor Abietis, Mali und Pini auf die Zelllinie MOLT-4 bei einem FKS-Gehalt des Kulturmediums von 10 % konnte im 1-Parameter-Histogramm als Sub-G1-Peak nachgewiesen werden. Die Auswertung der 2-Parameter-Dot Plots zeigte außerdem, dass sowohl Zellen aus der G0/G1- als auch aus der S- und G2/M-Phase in Apoptose übergehen (vgl. Abb. 15).

Die quantitative Auswertung ergab für Helixor A ab einer Konzentration von 150 $\mu\text{g/ml}$ eine schwach signifikante Erhöhung, für Helixor M ab 100 $\mu\text{g/ml}$ eine schwach signifikante bzw. ab 150 $\mu\text{g/ml}$ eine signifikante und für Helixor P ab 10 $\mu\text{g/ml}$ eine schwach signifikante bzw. ab 50 $\mu\text{g/ml}$ eine signifikante Erhöhung der apoptotischen Zellpopulation, die durchflusszytometrisch als Sub-G1-Peak nachgewiesen werden konnte.

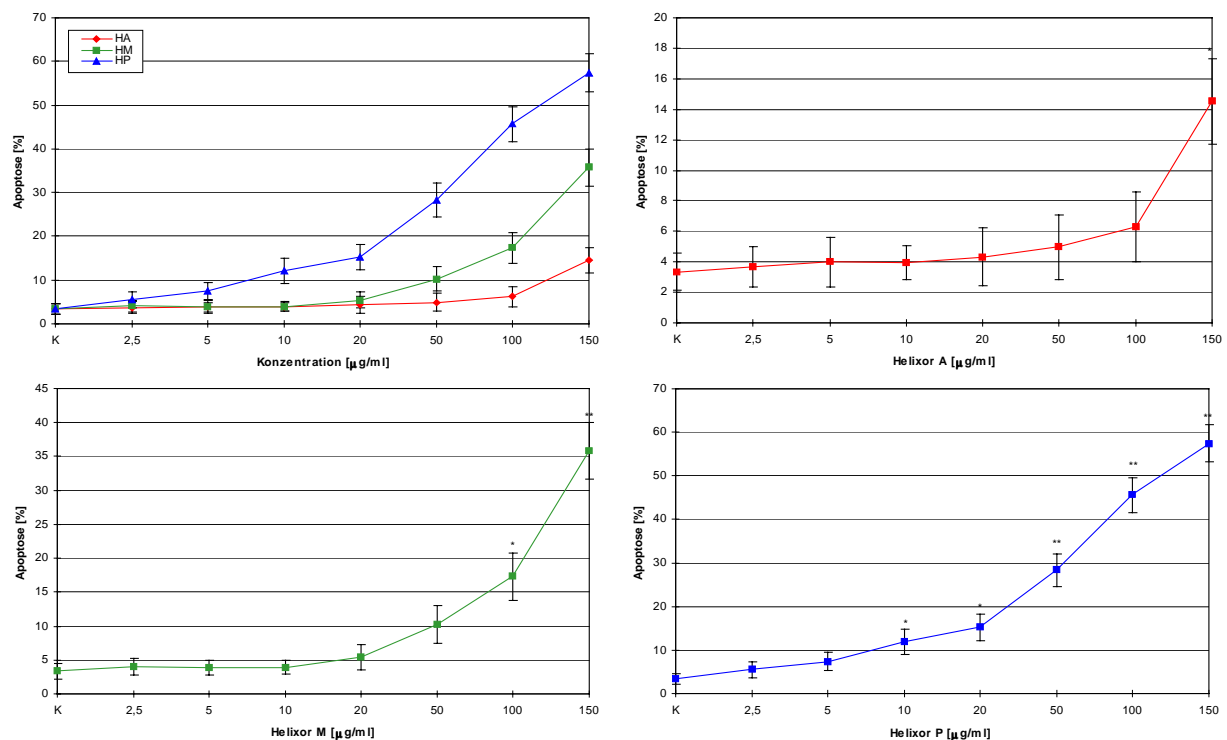


Abb. 21: Durchflusszytometrische Auswertung des Sub-G1-Bereiches der Zelllinie MOLT-4 nach 72 h Inkubation mit Helixor A, M und P bei einem FKS-Gehalt von 10 %. * = schwach signifikante, ** = signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.1.2.3 Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der einzelnen Apoptosestadien zeigte, dass sich die durchflusszytometrisch detektierte apoptotische Zellpopulation sowohl aus Zellen mit stark kondensiertem oder fragmentiertem Kern als auch aus apoptotischen Bodies zusammensetzte. Für den Mistelextrakt Helixor A war ein signifikanter bzw. schwach signifikanter Anstieg stark kondensierter und fragmentierter Kerne ab einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ zu erkennen, die Anzahl apoptotischer Bodies erhöhte sich schon ab 50 $\mu\text{g/ml}$ schwach signifikant. Das Präparat Helixor M induzierte einen schwach signifikanten bzw. signifikanten Anstieg der stark kondensierten Kerne ab einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$, der fragmentierten Kerne ab 50 $\mu\text{g/ml}$ und der apoptotischen Bodies bereits ab 10 $\mu\text{g/ml}$. Helixor P zeigte schon ab einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ einen schwach signifikanten Anstieg früher Apoptosestadien mit stark kondensiertem Kern, einen schwach signifikanten Anstieg der fragmentierten Kerne ab 5 $\mu\text{g/ml}$, der sich ab einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ signifikant erhöhte und einen signifikanten Anstieg apoptotischer Bodies ab 10 $\mu\text{g/ml}$.

Bei allen getesteten Mistelextrakten hatte der Prozentsatz der Zellen mit stark fragmentiertem Kern den größten Anteil an der apoptotischen Zellpopulation.

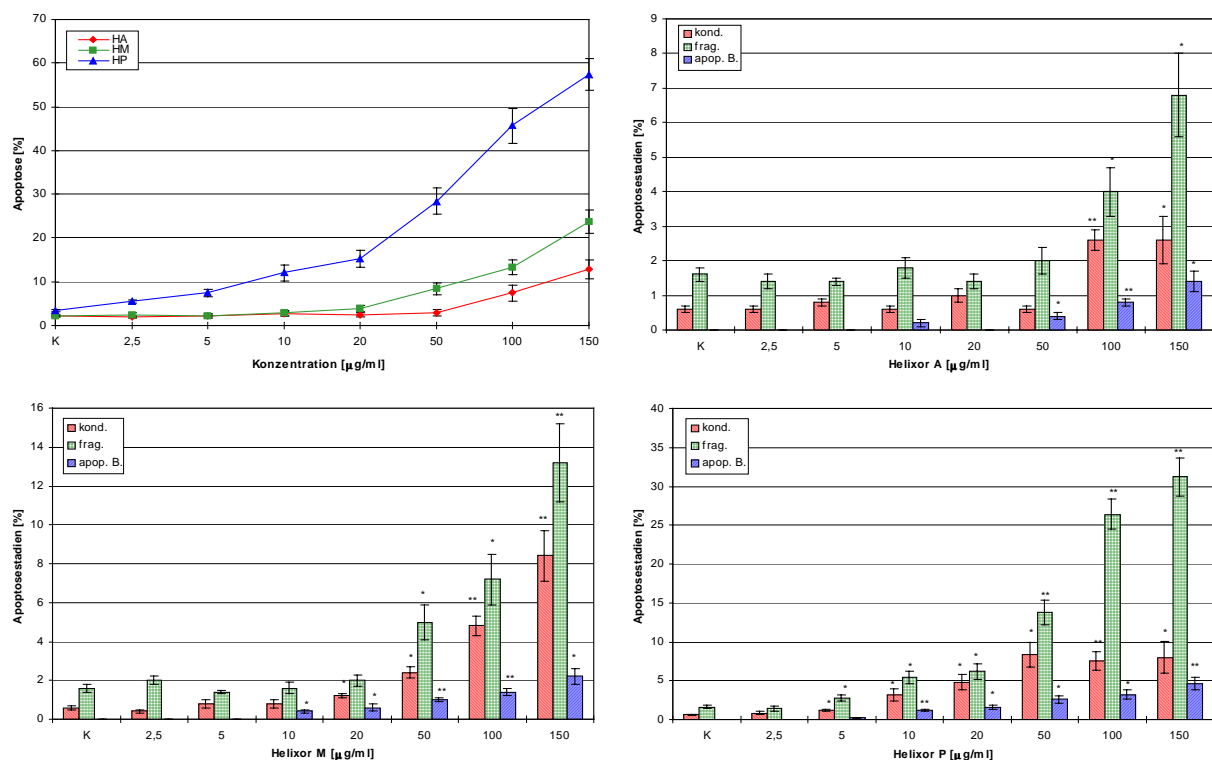


Abb. 22: Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien der Zelllinie MOLT-4 nach 72 h Inkubation mit Helixor A, M und P bei einem FKS-Gehalt von 10 %. * = schwach signifikante, ** = signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.1.2.4 Vergleich der durchflusszytometrischen und mikroskopischen Auswertung

Der direkte Vergleich der durchflusszytometrischen Ergebnisse mit der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung zeigt nach Addierung der einzelnen Apoptosestadien keine signifikanten Unterschiede für das Präparat Helixor A, dagegen konnte für Helixor M eine schwach signifikante Differenz bei 150 $\mu\text{g/ml}$ bzw. für Helixor P bei 100 und 150 $\mu\text{g/ml}$ nachgewiesen werden.

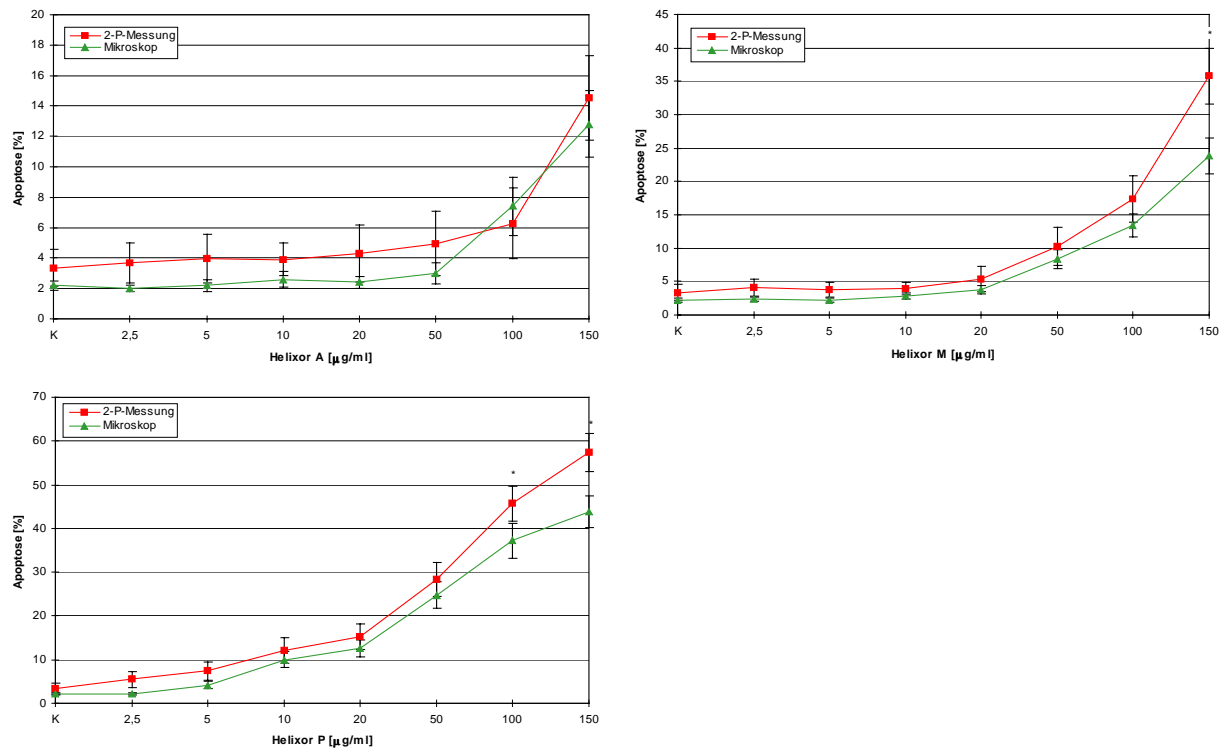


Abb. 23: Vergleich der durchflusszytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der durch Helixor A, M und P induzierten Apoptose bei der Zelllinie MOLT-4. * = schwach signifikante Differenz zwischen Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie.

3.1.2.5 Zellzyklusanalyse

Unter Einwirkung des Präparates Helixor A konnten keine signifikanten Veränderungen bezüglich der einzelnen Zellzyklusphasen festgestellt werden, während der Extrakt Helixor M einen schwach signifikanten Abnahme der G0/1-Phase und einen schwach signifikanten Anstieg der S-Phase-Zellen bei einer Konzentration von 150 $\mu\text{g/ml}$ bewirkte, die Veränderungen der G2/M-Phase waren dagegen nicht signifikant. Das Präparat Helixor P wies bereits im Konzentrationsbereich von 100 $\mu\text{g/ml}$ eine signifikante Abnahme der G1-Phase und eine schwach signifikante Zunahme der S-Phase auf, die Zahl der G2/M-Zellen stieg erst ab der höchsten Konzentration schwach signifikant an.

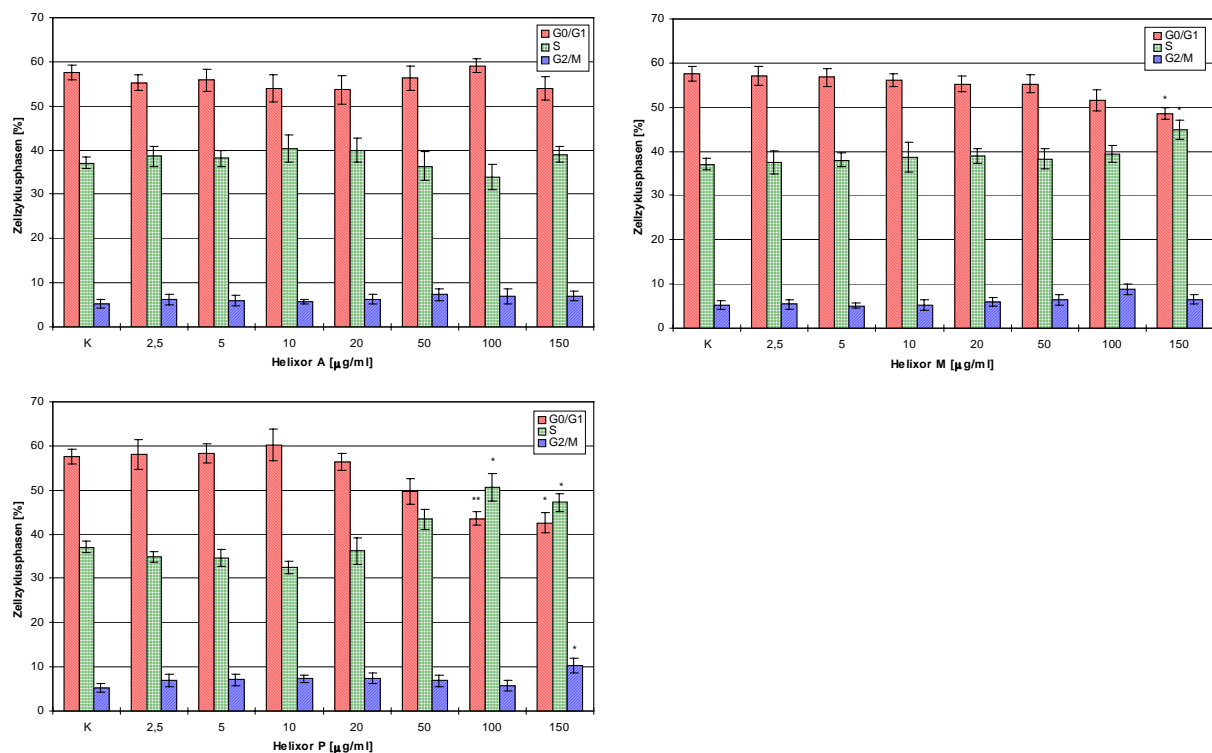


Abb. 24: Zellzyklusanalyse der Zelllinie MOLT-4 nach 72 h Inkubation mit Helixor A, M und P bei einem FKS-Gehalt von 10 %. * = schwach signifikante, ** = signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.1.3 Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung, Induktion von Apoptose und Zellzyklusbeeinflussung bei einem FKS-Gehalt des Kulturmediums von 5 %

3.1.3.1 Bestimmung der Wachstumsrate

Die Auswertung des Trypanblau-Ausschlusstestes zeigte für den Mistelextrakt Helixor A eine signifikante Abnahme der Wachstumsrate bei 2,5 und 10 $\mu\text{g/ml}$, bei den anderen Konzentrationen war die Wachstumshemmung hoch signifikant. Für die Präparate Helixor M und P konnte im gesamten Konzentrationsbereich eine hoch signifikante Abnahme der Wachstumsrate festgestellt werden.

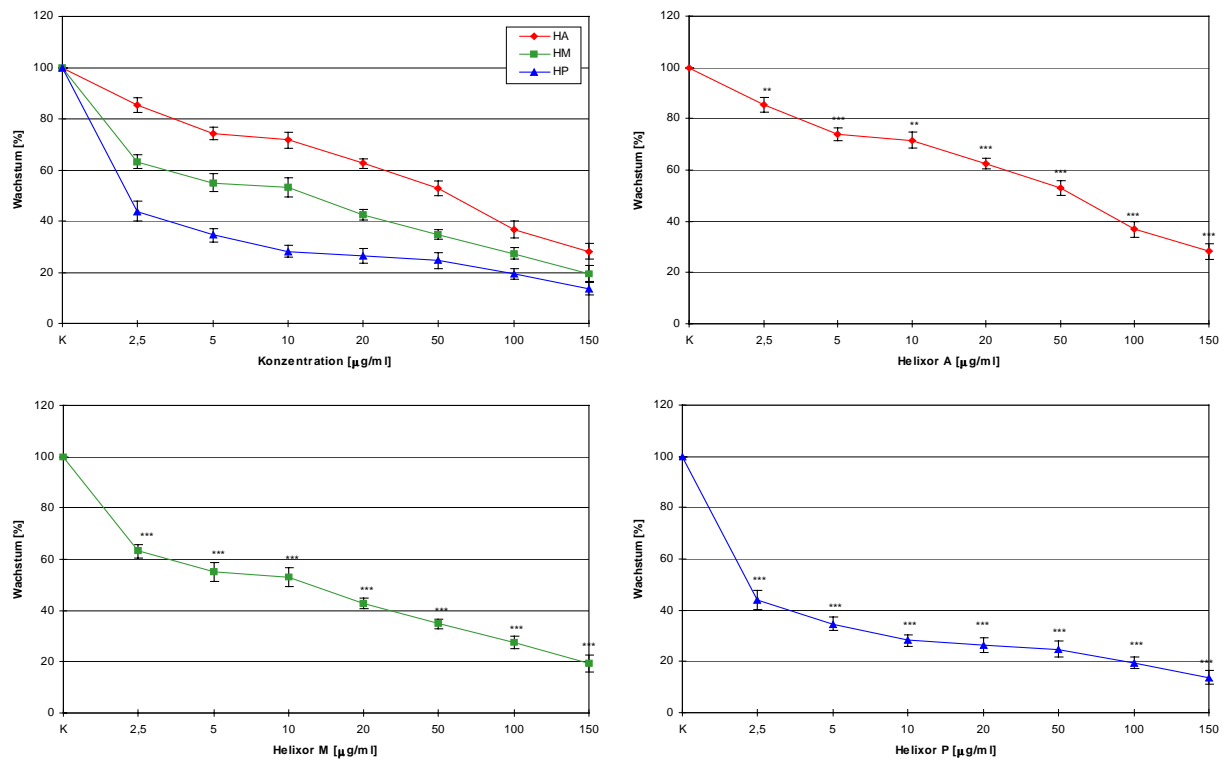


Abb. 25: Wachstumsrate der Zelllinie MOLT-4 nach 72 h Inkubation mit Helixor A, M und P bei einem FKS-Gehalt von 5 %. ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.1.4 Durchflusszytometrische Analyse

Das apoptoseinduzierende Potential der Mistelextrakte Helixor Abietis, Mali und Pini auf die Zelllinie MOLT-4 bei einem FKS-Gehalt des Kulturmediums von 5 % konnte im 1-Parameter-Histogramm als Sub-G1-Peak nachgewiesen werden. Die Auswertung der 2-Parameter-Dot Plots zeigte außerdem, dass sowohl Zellen aus der G0/G1- als auch aus der S- und G2/M-Phase in Apoptose übergehen (vgl. Abb. 15).

Die quantitative Auswertung der apoptotischen Zellpopulationen ergab für Helixor A eine schwach signifikante Erhöhung ab 50 $\mu\text{g/ml}$ und eine signifikante ab 150 $\mu\text{g/ml}$. Das Präparat Helixor M zeigte dagegen schon ab einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ eine schwach signifikante und ab 50 $\mu\text{g/ml}$ eine signifikante Zunahme der apoptotischen Zellen. Der Extrakt Helixor P wies mit einer signifikanten dosisabhängigen Zunahme der apoptotischen Population bereits ab 5 $\mu\text{g/ml}$ das stärkste apoptoseinduzierende Potential auf.

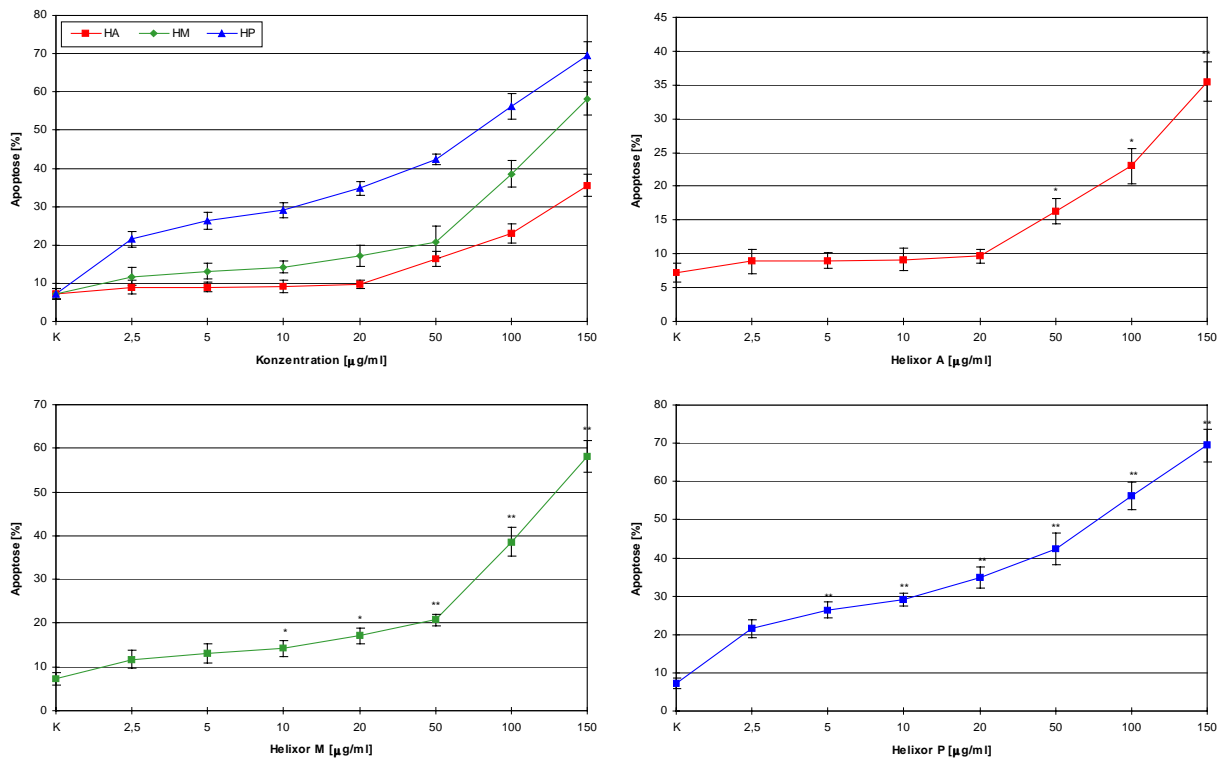


Abb. 26: Durchflusszytometrische Auswertung des Sub-G1-Bereiches der Zelllinie MOLT-4 nach 72 h Inkubation mit Helixor A, M und P bei einem FKS-Gehalt von 5 %. * = schwach signifikante, ** = signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.1.4.1 Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien

Die morphologische Auswertung der apoptotischen Zellpopulation ergab für die drei getesteten Frischpflanzenextrakte eine Zusammensetzung aus Zellen aller erfassten Apoptosestadien, wobei auch hier die prozentualen Anteile stark fragmentierter Kerne überwogen. Für das Präparat Helixor A konnte ab einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ eine schwach signifikante Zunahme von Zellen mit stark kondensiertem Kern und eine signifikante Zunahme stark fragmentierter Kerne und apoptotischer Körperchen nachgewiesen werden. Die Untersuchungen mit Helixor M resultierten in einer schwach signifikanten Erhöhung von stark kondensierten Kernen und apoptotischen Bodies ab 20 $\mu\text{g/ml}$ und einer signifikanten Erhöhung stark fragmentierter Kerne bereits bei der niedrigsten Konzentration von 2,5 $\mu\text{g/ml}$. Der Extrakt Helixor P bewirkte einen hoch signifikanten Anstieg stark fragmentierter Kerne bei einer Konzentration von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ und signifikante Zunahmen bei höheren Konzentrationen. Bei den prozentualen Anteilen von stark kondensierten Kernen und apoptotischen Bodies kam es ebenfalls zu schwach signifikanten und signifikanten Erhöhungen ab 5 bzw. 2,5 $\mu\text{g/ml}$.

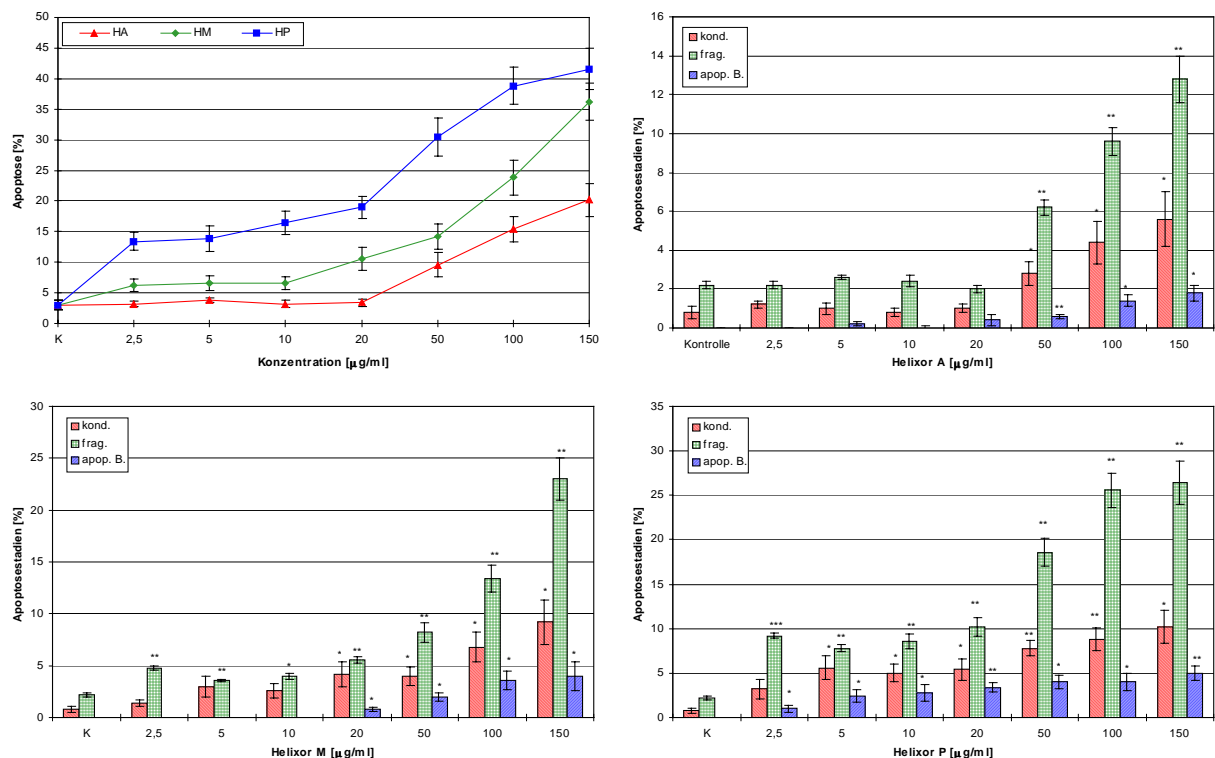


Abb. 27: Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien der Zelllinie MOLT-4 nach 72 h Inkubation mit Helixor A, M und P bei einem FKS-Gehalt von 5 %. * = schwach signifikante, ** = signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.1.4.2 Vergleich der durchflusszytometrischen und mikroskopischen Auswertung

Beim direkten Vergleich der durchflusszytometrischen Ergebnisse mit der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung nach Addierung der einzelnen Apoptosestadien wiesen beide Methoden in den gleichen Konzentrationsbereichen den schwach signifikanten bzw. signifikanten Anstieg apoptotischer Zellpopulationen nach, es traten jedoch schwach signifikant bzw. signifikant höhere Apoptosewerte bei der Durchflusszytometrie gegenüber der Fluoreszenzmikroskopie auf.

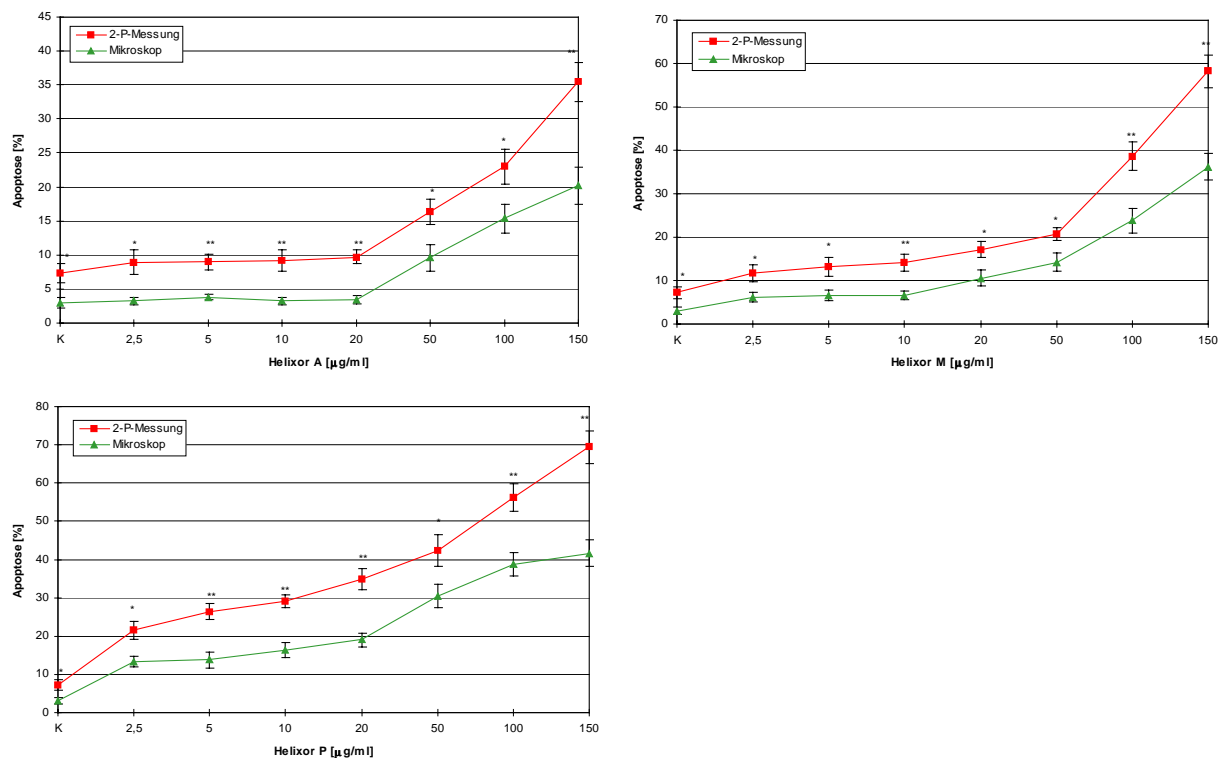


Abb. 28: Vergleich der durchflusszytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der durch Helixor A, M und P induzierten Apoptose bei der Zelllinie MOLT-4. * = schwach signifikante, ** = signifikante Differenz zwischen Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie.

3.1.4.3 Zellzyklusanalyse

Die Inkubation mit dem Extrakt Helixor A bewirkte lediglich einen schwach signifikanten Anstieg der S-Phase-Zellen, während für die Zellen der G0/1- und G2/M-Phase keine eindeutigen Dosiseffekte bezüglich der Zellzykluskinetik nachgewiesen werden konnten. Die Zellzyklusverteilung zeigte nach Behandlung mit Helixor M ab 100 µg/ml einen schwach signifikanten Anstieg der G0/1- und S-Phase-Zellen. Für das Präparat Helixor P konnte ab 10 µg/ml eine schwach signifikante Zunahme der G0/1-Phase und eine schwach signifikante Erhöhung der S-Phase ab 2,5 µg/ml (ab 15 µg/ml signifikant) festgestellt werden.

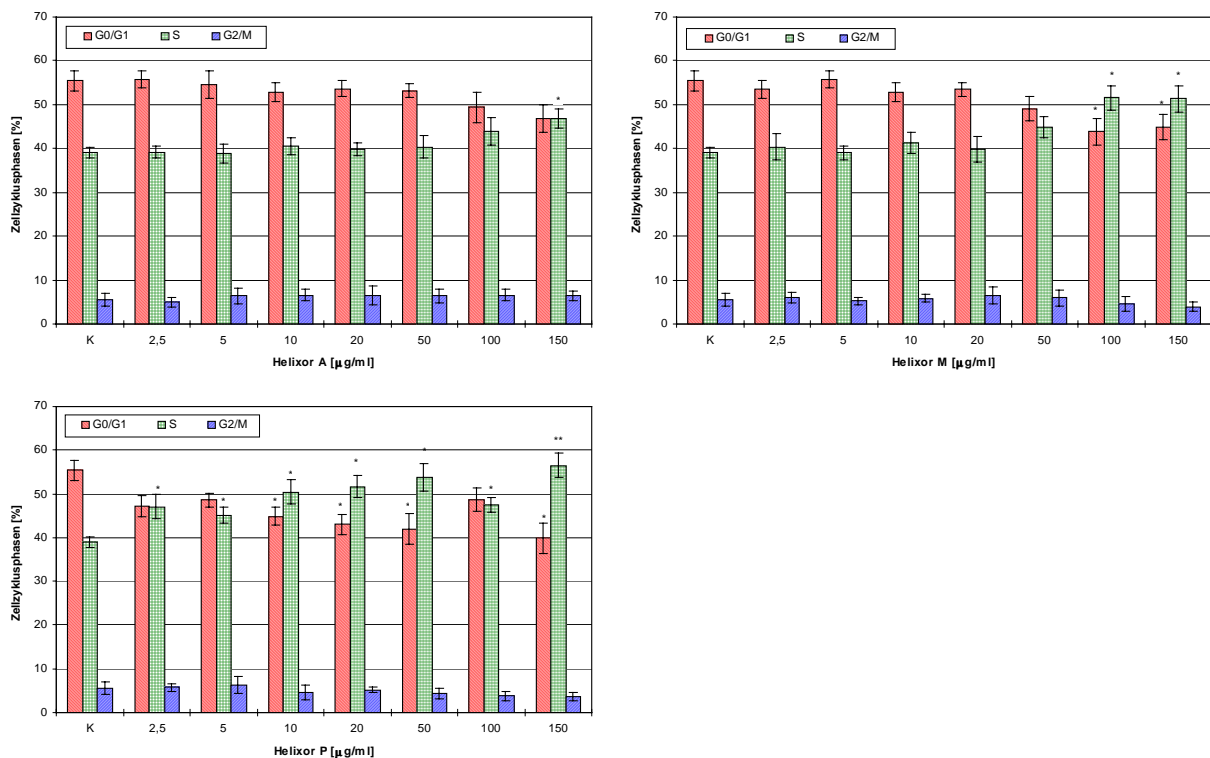


Abb. 29: Zellzyklusanalyse der Zelllinie MOLT-4 nach 72 h Inkubation mit Helixor A, M und P bei einem FKS-Gehalt von 5 %. * = schwach signifikante, ** = signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.1.5 Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung, Induktion von Apoptose und Zellzyklusbeeinflussung bei einem FKS-Gehalt des Kulturmediums von 2,5 %

3.1.5.1 Bestimmung der Wachstumsrate

Die Auswertung des Trypanblau-Ausschlusstestes ergab für den Extrakt Helixor A eine signifikante Abnahme der Wachstumsrate bei 2,5 µg/ml, die ab 5 µg/ml hoch signifikant wurde. Die Präparate Helixor M und P bewirkten im gesamten Konzentrationsbereich eine hoch signifikante Wachstumshemmung.

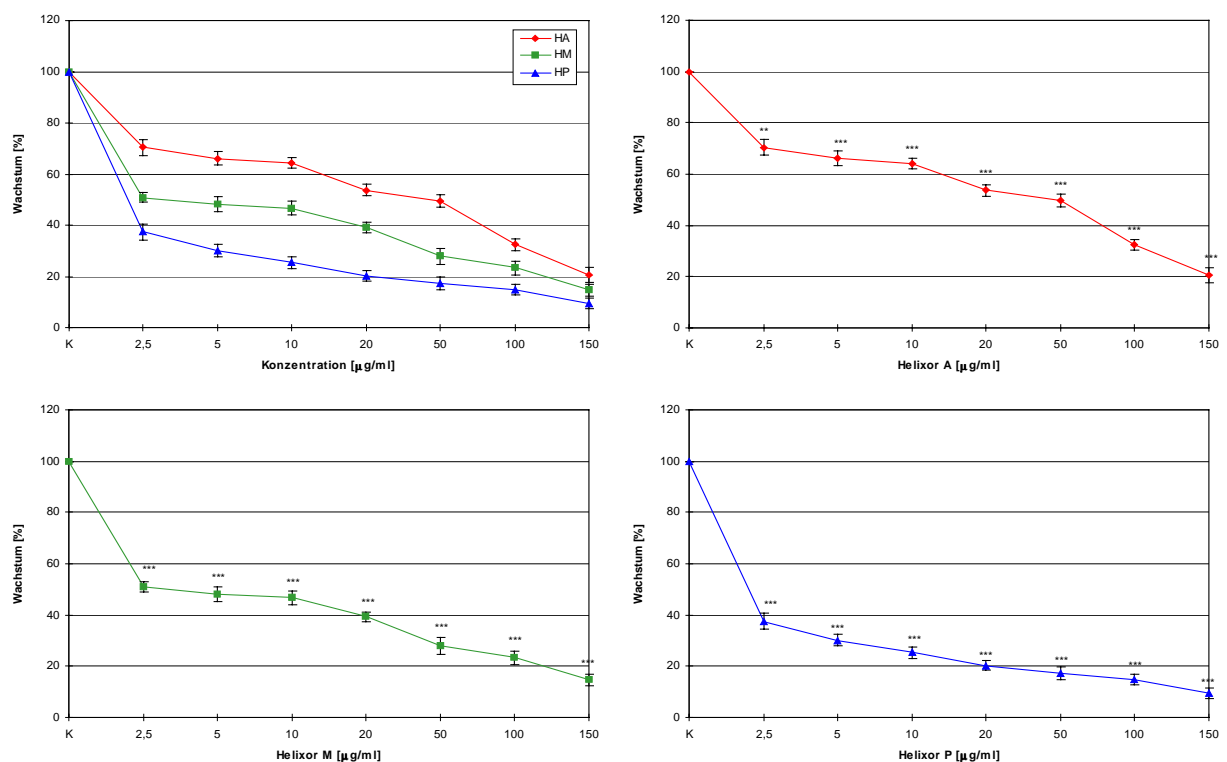


Abb. 30: Wachstumsrate der Zelllinie MOLT-4 nach 72 h Inkubation mit Helixor A, M und P bei einem FKS-Gehalt von 2,5 %. ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.1.5.2 Durchflusszytometrische Analyse

Das apoptoseinduzierende Potential der Mistelextrakte Helixor Abietis, Mali und Pini auf die Zelllinie MOLT-4 bei einem FKS-Gehalt des Kulturmediums von 2,5 % konnte im 1-Parameter-Histogramm als Sub-G1-Peak nachgewiesen werden. Die Auswertung der 2-Parameter-Dot Plots zeigte außerdem, dass sowohl Zellen aus der G0/G1- als auch aus der S- und G2/M-Phase in Apoptose übergehen (vgl. Abb. 15).

Die quantitative Auswertung der apoptotischen Population ergab für Helixor A schon ab 5 $\mu\text{g/ml}$ eine schwach signifikante Erhöhung, welche kontinuierlich anstieg und ab 50 $\mu\text{g/ml}$ signifikant wurde. Bei dem Mistelextrakt Helixor M trat die schwach signifikante Erhöhung der Apoptoserate bereits bei 2,5 $\mu\text{g/ml}$ auf und wurde ab 10 $\mu\text{g/ml}$ signifikant. Das Präparat Helixor P zeigte im Konzentrationsbereich von 2,5 bis 150 $\mu\text{g/ml}$ durchgehend einen signifikanten Anstieg der apoptotischen Zellpopulation gegenüber der Kontrolle.

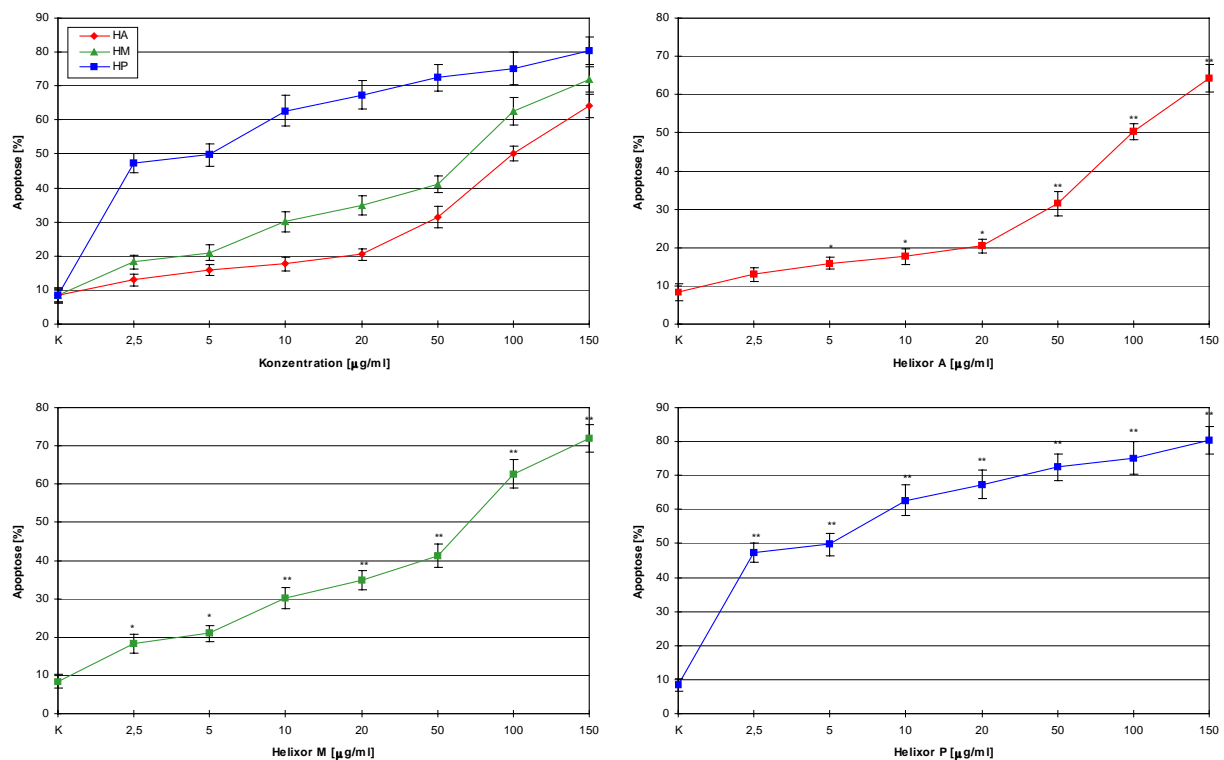


Abb. 31: Durchflusszytometrische Auswertung des Sub-G1-Bereiches der Zelllinie MOLT-4 nach 72 h Inkubation mit Helixor A, M und P bei einem FKS-Gehalt von 2,5 %. * = schwach signifikante, ** = signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.1.5.3 Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der einzelnen Apoptosestadien zeigte, dass sich die durchflusszytometrisch detektierten apoptotischen Zellpopulationen sowohl aus Zellen mit stark kondensiertem oder fragmentiertem Kern als auch aus apoptotischen Bodies zusammensetzten.

Die Untersuchungen mit dem Extrakt Helixor A resultierten in einem schwach signifikanten bzw. signifikanten (100 $\mu\text{g/ml}$) Anstieg der Zellen mit stark kondensiertem Kern ab 2,5 $\mu\text{g/ml}$, einem signifikanten Anstieg der fragmentierten Population ab 2,5 $\mu\text{g/ml}$ bzw. einem hoch signifikanten Anstieg ab 50 $\mu\text{g/ml}$ und einem schwach signifikanten bzw. signifikanten Anstieg der apoptotischen Bodies ab 2,5 $\mu\text{g/ml}$. Mit dem Mistelpräparat Helixor M konnten schwach signifikante bzw. signifikante Erhöhungen der kondensierten Kerne und apoptotischer Körperchen und signifikante bzw. hoch signifikante Erhöhungen der fragmentierten Kerne ab 2,5 $\mu\text{g/ml}$ nachgewiesen werden. Der Extrakt Helixor P lieferte im gesamten Konzentrationsbereich von 2,5 bis 150 $\mu\text{g/ml}$ einen schwach signifikanten Anstieg von Zellen mit stark kondensiertem Kern, eine hoch signifikante Erhöhung stark fragmentierter Kerne ab 2,5 $\mu\text{g/ml}$ bzw. signifikant ab 50 $\mu\text{g/ml}$ und eine schwach signifikante bzw. signifikante Zunahme apoptotischer Bodies ab 2,5 $\mu\text{g/ml}$.

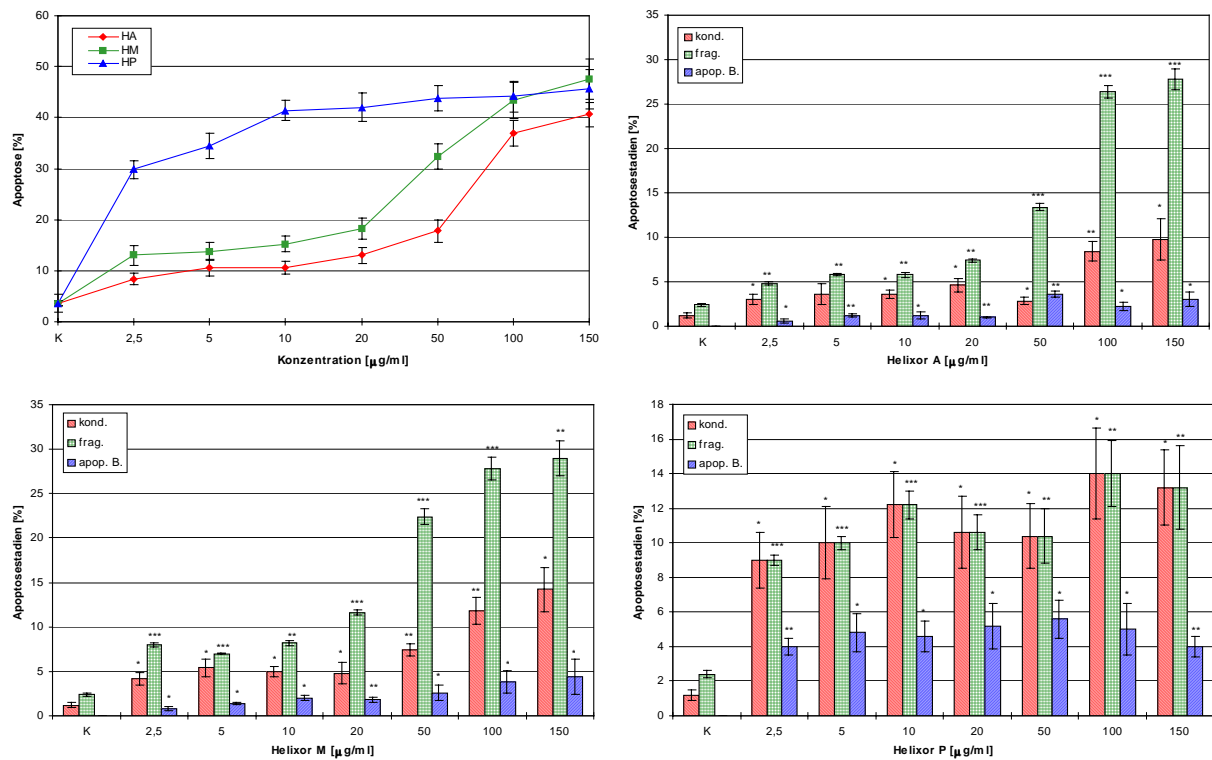


Abb. 32: Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien der Zelllinie MOLT-4 nach 72 h Inkubation mit Helixor A, M und P bei einem FKS-Gehalt von 2,5 %. * = schwach signifikante, ** = signifikante, * = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.**

3.1.5.4 Vergleich der durchflusszytometrischen und mikroskopischen Auswertung

Der direkte Vergleich der durchflusszytometrischen Ergebnisse mit der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung zeigte nach Addierung der einzelnen Apoptosestadien schwach signifikante bzw. signifikante Unterschiede zwischen Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie.

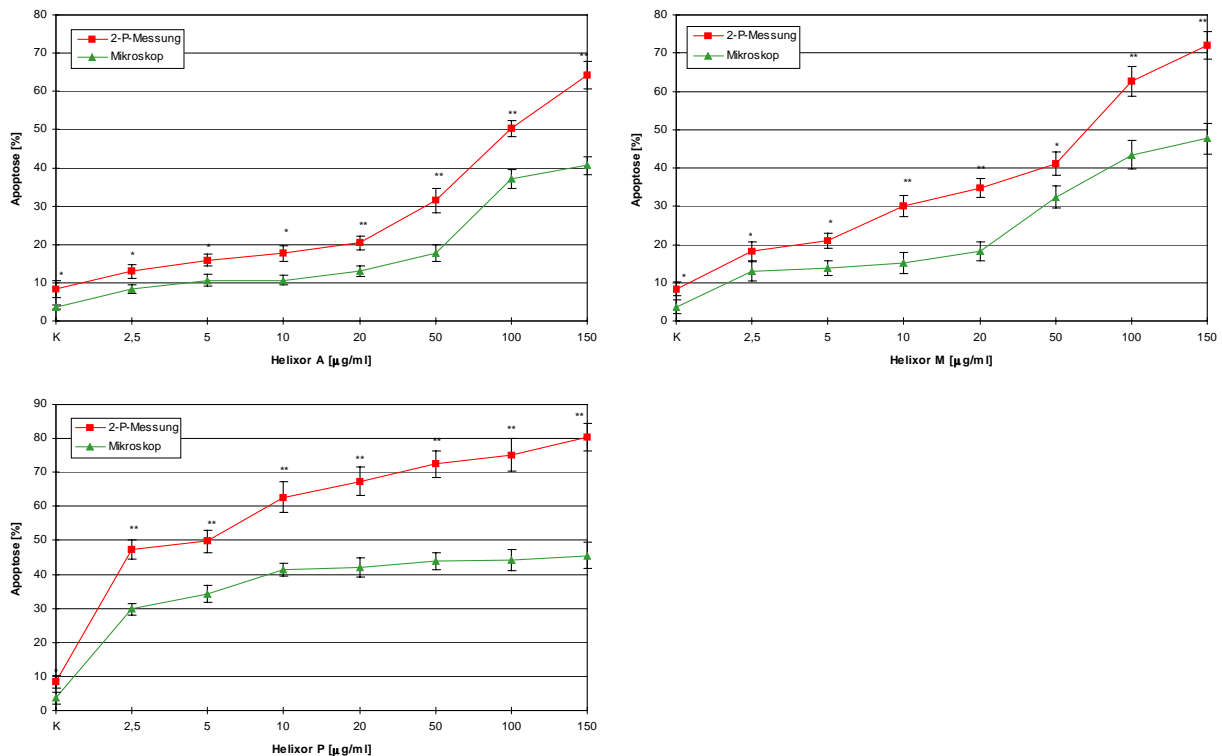


Abb. 33: Vergleich der durchflusszytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der durch Helixor A, M und P induzierten Apoptose bei der Zelllinie MOLT-4. * = schwach signifikante, ** = signifikante Differenz zwischen Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie.

3.1.5.5 Zellzyklusanalyse

Die Zellzyklusanalyse ergab für den Mistelextrakt Helixor A eine schwach signifikante Abnahme der G2/M-Zellen bei einer Konzentration von 150 µg/ml, während die G0/1- und S-Phase nur unwesentlich von den Zellzyklusdaten der Kontrolle abwichen. Für den Extrakt Helixor M war eine schwach signifikante Zunahme der G0/1-Phase bei 150 µg/ml, eine schwach signifikante Zunahme der S-Phase bei 50 µg/ml und eine schwach signifikante Abnahme der G2/M-Phase bei 50 und 100 µg/ml festzustellen. Die Untersuchungen mit dem Präparat Helixor P lieferten ebenfalls eine schwach signifikante Zunahme der G0/1-Phase-Zellen ab 100 µg/ml, einen schwach signifikanten Anstieg der S-Phase-Zellen bei 20 µg/ml und eine schwach signifikante Erhöhung der G2/M-Phase-Zellen ab 20 µg/ml.

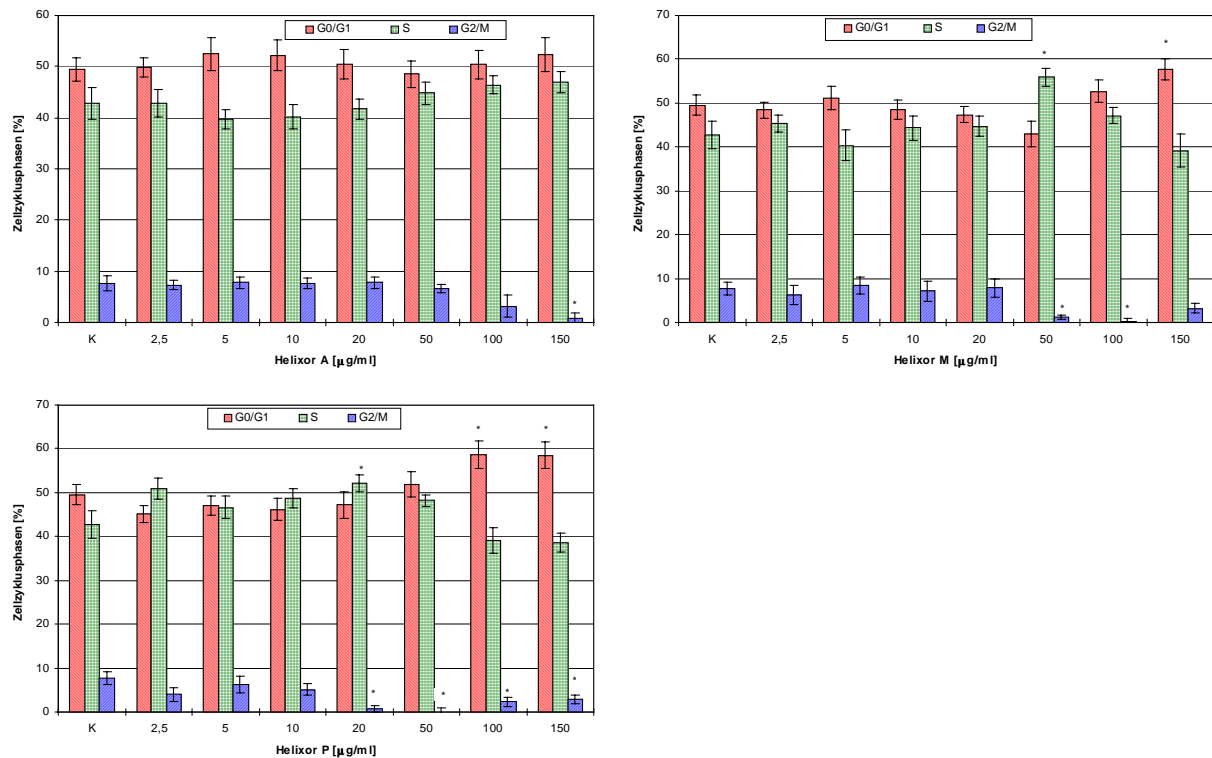


Abb. 34: Zellzyklusanalyse der Zelllinie MOLT-4 nach 72 h Inkubation mit Helixor A, M und P bei einem FKS-Gehalt von 2,5 %. * = schwach signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.1.5.6 Vergleichende Betrachtung der Versuchsansätze mit unterschiedlichem FKS-Gehalt des Kulturmediums

Die stufenweise Reduzierung des FKS-Gehaltes im Kultivierungsmedium RPMI 1640 von 15 % auf 10 %, 5 % und schließlich 2,5 % ergab eine deutliche dosisabhängige Verstärkung des wachstumshemmenden und apoptoseinduzierenden Potentials der Mistelextrakte Helixor A, M und P. Die weitere Herabsetzung des Serumgehaltes auf 1 % und 0,5 % (Ergebnisse nicht dargestellt) führte zum Absterben der Leukämiezellen, so dass die Versuchsdurchführung nicht mehr möglich war. Außerdem konnte mit verstärkter Reduzierung des FKS-Gehaltes auch eine Zunahme der Spontanapoptose im Kontrollansatz festgestellt werden. Um einerseits die optimale Wirkung des Mistelextraktes zu gewährleisten und andererseits die Rate der Spontanapoptose im Kontrollansatz so gering wie möglich zu halten, wurde deshalb für die nachfolgenden Versuche mit MOLT-4- bzw. Lymphozytenkulturen zur Apoptosebestimmung (vgl. 3.2, 3.3, 3.4) ein FKS-Gehalt von 5 % festgelegt.

3.2 Wachstumshemmendes und apoptoseinduzierendes Potential von Helixor A, M und P getestet an humanen Blutlymphozyten

3.2.1 Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung, Induktion von Apoptose und Zellzyklusbeeinflussung durch Helixor A, M und P bei Lymphozyten weiblicher Probanden

3.2.1.1 Bestimmung der Wachstumsrate

Die Analyse des Trypanblau-Ausschlusstestes ergab für die drei getesteten Frischpflanzenextrakte bei einem FKS-Gehalt des Kulturmediums von 5 % eine hoch signifikante Wachstumshemmung im gesamten Konzentrationsbereich.

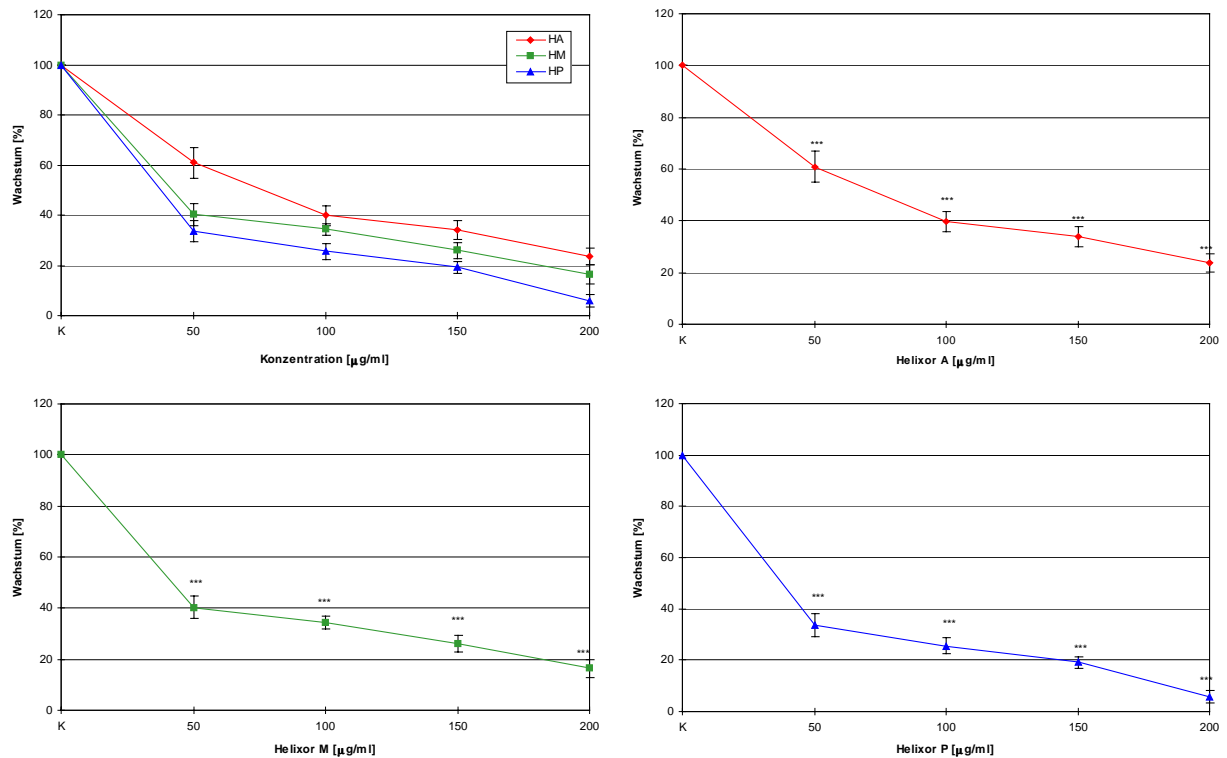


Abb. 35: Wachstumsrate humaner Lymphozyten weiblicher Probanden nach 72 h Inkubation mit Helixor A, M und P. *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.2.1.2 Durchflusszytometrische Analyse

Das apoptoseinduzierende Potential der Mistelextrakte Helixor A, M und P auf humane Lymphozyten weiblicher Probanden konnte durch das Auftreten eines Sub-G1-Peaks im 1-Parameter-Histogramm und eine G0/1-Phasenspezifität im 2-Parameter-Dot Plot nachgewiesen werden. Dieser Bereich wurde zu Beginn jeder Messreihe festgelegt und nicht mehr verändert (Abb. 36, HP 100 $\mu\text{g/ml}$, schwarzes Gate).

Diese Ergebnisse zur Untersuchung der Phasenspezifität sind direkt vergleichbar mit dem nachfolgendem Versuch bei humanen Lymphozyten männlicher Probanden (vgl. 3.2.2.2), weshalb dort auf eine erneute graphische Darstellung der Dot Plots verzichtet wird.

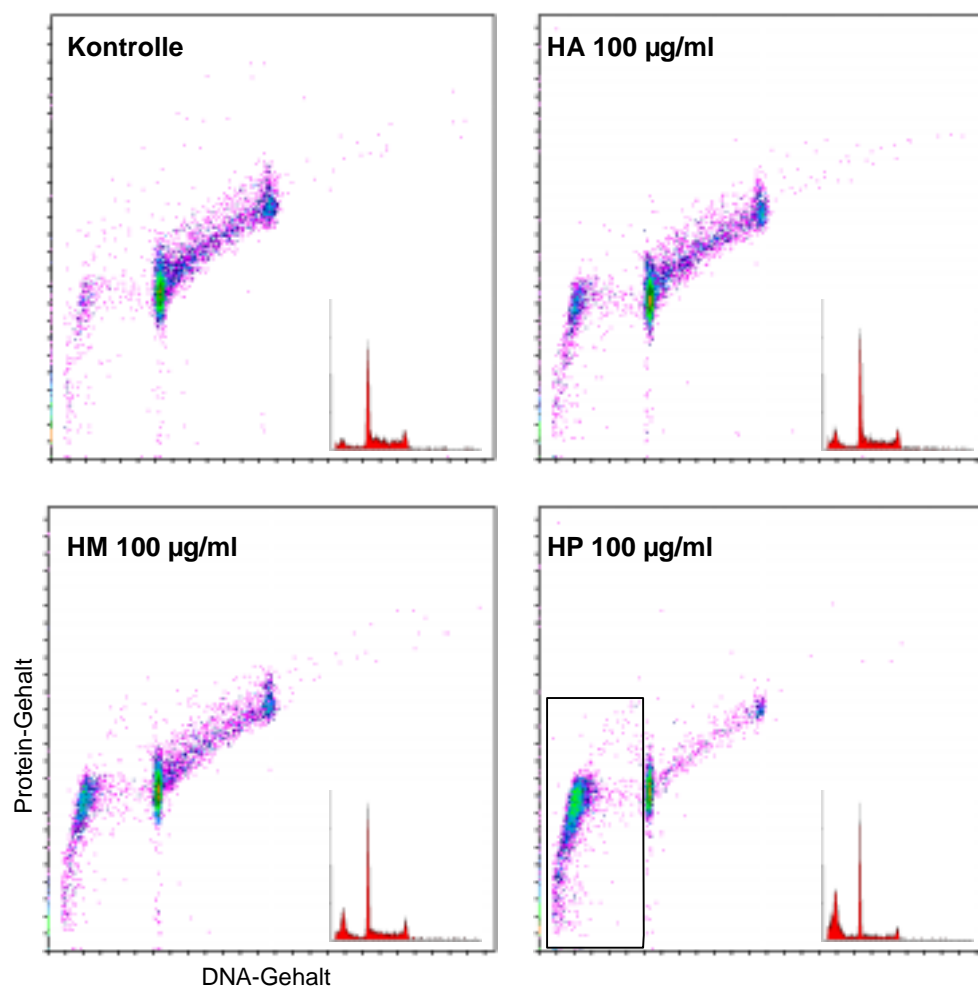


Abb. 36: Histogramme der 1- und 2-Parameter-Messung nach 72 h Inkubation humaner Lymphozyten weiblicher Probanden mit Helixor A, M und P. Das bei HP 100 $\mu\text{g/ml}$ eingezeichnete Gate zeigt den Sub-G1-Bereich.

Die quantitative Auswertung zeigte einen signifikanten Anstieg der Apoptoserate für Helixor A ab einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$, der ab 100 $\mu\text{g/ml}$ hoch signifikant wurde. Die Präparate Helixor M und P wiesen dagegen im gesamten Konzentrationsbereich eine hoch signifikante Erhöhung der apoptotischen Zellpopulation auf.

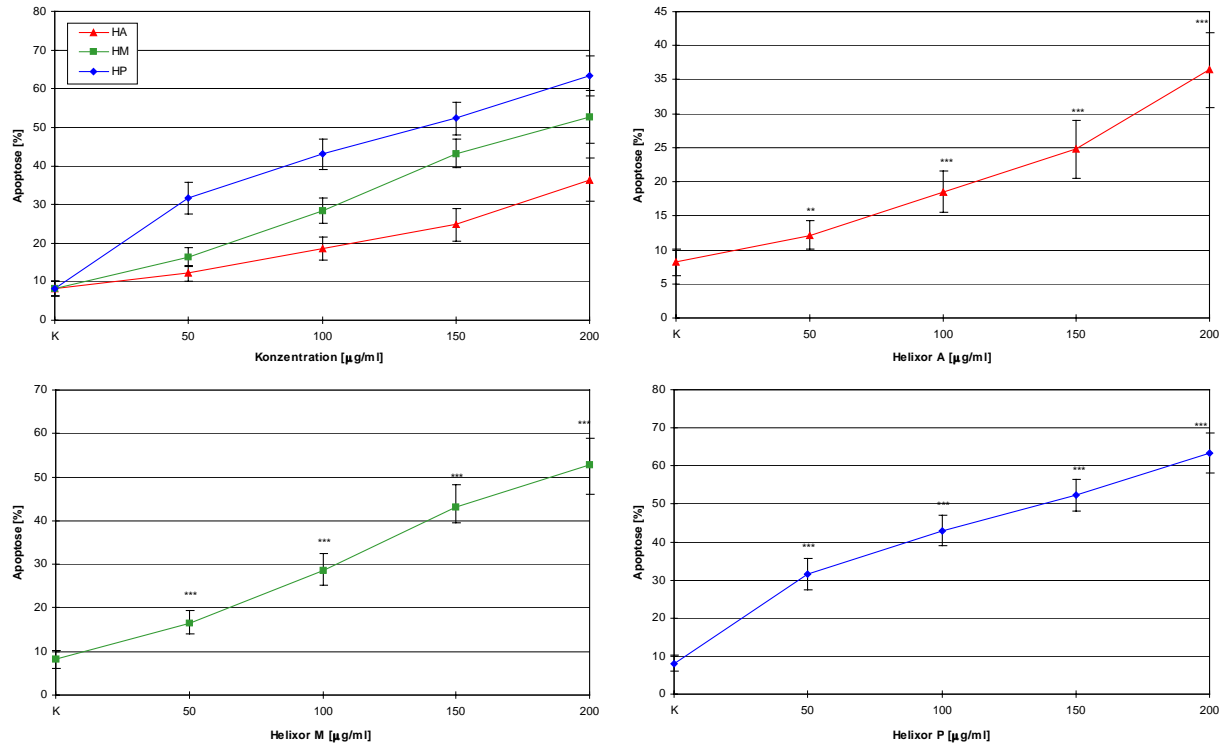


Abb. 37: Durchflusszytometrische Auswertung des Sub-G1-Bereiches humaner Lymphozyten weiblicher Probanden nach 72 h Inkubation mit Helixor A, M und P. ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.2.1.3 Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der einzelnen Apoptosestadien ergab für die drei untersuchten Frischpflanzenextrakte einen deutlich dosisabhängigen Anstieg an Zellen mit stark kondensiertem und Zellen mit stark fragmentiertem Kern, auch die Anzahl apoptotischer Bodies nahm zu.

Helixor A zeigte einen signifikanten Anstieg stark kondensierter Kerne ab 50 $\mu\text{g/ml}$, der ab 100 $\mu\text{g/ml}$ hoch signifikant wurde, die Erhöhung stark fragmentierter Kerne war ab einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ und die Zunahme apoptotischer Bodies ab 100 $\mu\text{g/ml}$ hoch signifikant. Für die Extrakte Helixor M und Helixor P konnte ein hoch signifikanter Anstieg aller untersuchten Apoptosestadien ab einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ nachgewiesen werden.

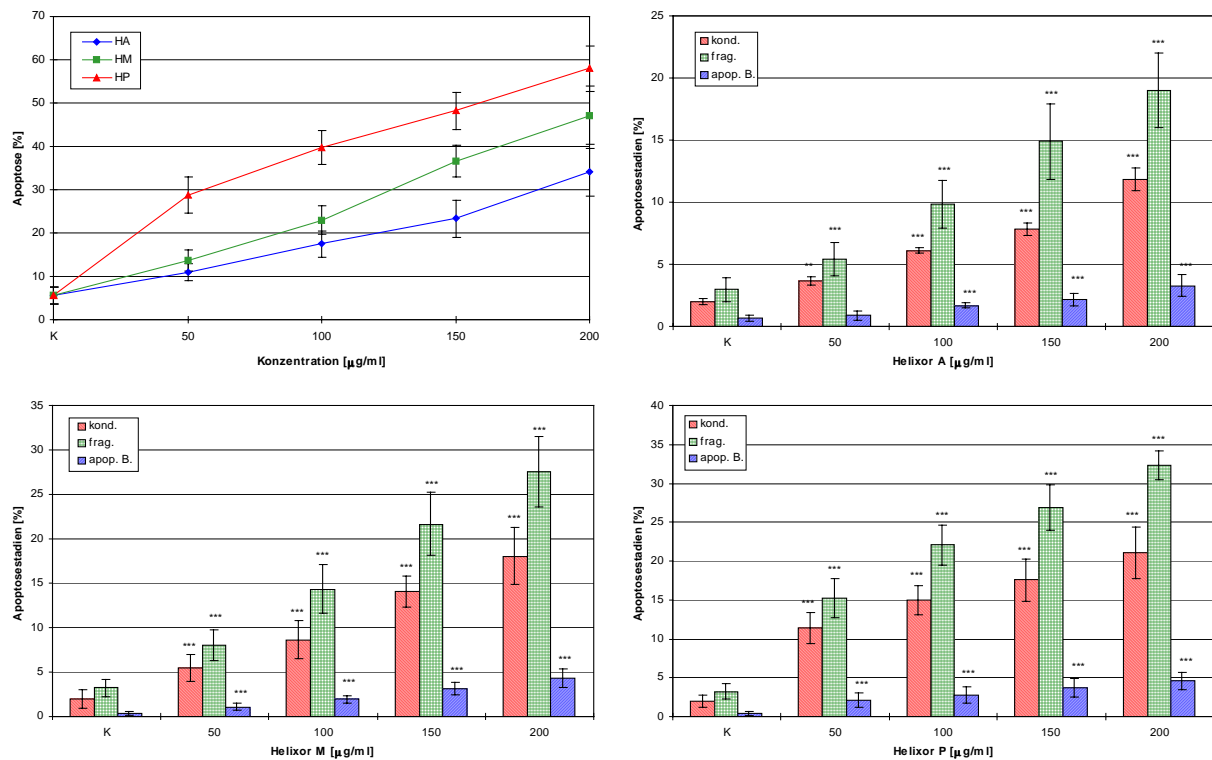


Abb. 38: Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien humaner Lymphozyten weiblicher Probanden nach 72 h Inkubation mit Helixor A, M und P. ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.2.1.4 Vergleich der durchflusszytometrischen und mikroskopischen Auswertung

Der direkte Vergleich der durchflusszytometrischen Ergebnisse mit der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung zeigte nach Addierung der einzelnen Apoptosestadien keinen signifikanten Unterschied für den Frischpflanzenextrakt Helixor A. Bei den Präparaten Helixor M und P wiesen beide Methoden in den gleichen Konzentrationsbereichen den hoch signifikanten Anstieg apoptotischer Zellpopulationen auf, die Werte für die Durchflusszytometrie waren jedoch teilweise schwach signifikant bzw. signifikant höher als die Werte der Fluoreszenzmikroskopie.

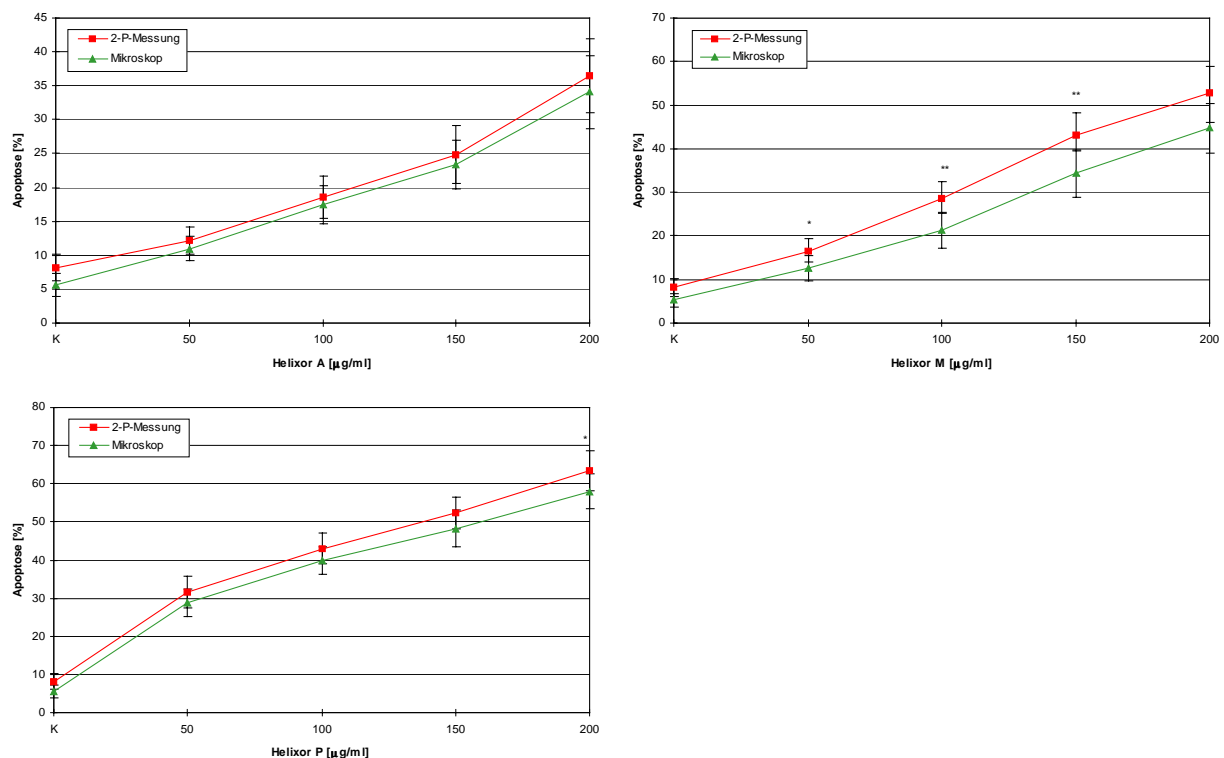


Abb. 39: Vergleich der durchflusszytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der durch Helixor A, M und P induzierten Apoptose bei humanen Lymphozyten weiblicher Probanden. * = schwach signifikante, ** = signifikante Differenz zwischen Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie.

3.2.1.5 Zellzyklusanalyse

Die Auswertung der Ein-Parameter-Histogramme ergab für den Extrakt Helixor A einen schwach signifikanten Anstieg der G0/1-Phase ab 150 $\mu\text{g}/\text{m}$, der ab 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ signifikant wurde. Der prozentuale Anteil an G2/M-Zellen nahm bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ signifikant und ab 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hoch signifikant ab. Für die Zellen der S-Phase konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden. Helixor M wies ab 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eine signifikante Erhöhung der G0/1-Phase-Zellen auf, der ab 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hoch signifikant wurde, einen schwach signifikanten Abfall der S-Phase-Zellen ab 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, der ab 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ signifikant wurde und eine hoch signifikante Abnahme der G2/M-Phase-Zellen ab 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Das Präparat Helixor P bewirkte einen hoch signifikanten Anstieg der G0/1-Phase ab 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, eine signifikante Abnahme der S-Phase bei 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, die ab 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hoch signifikant wurde und eine hoch signifikante Abnahme der G2/M-Phase ab 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

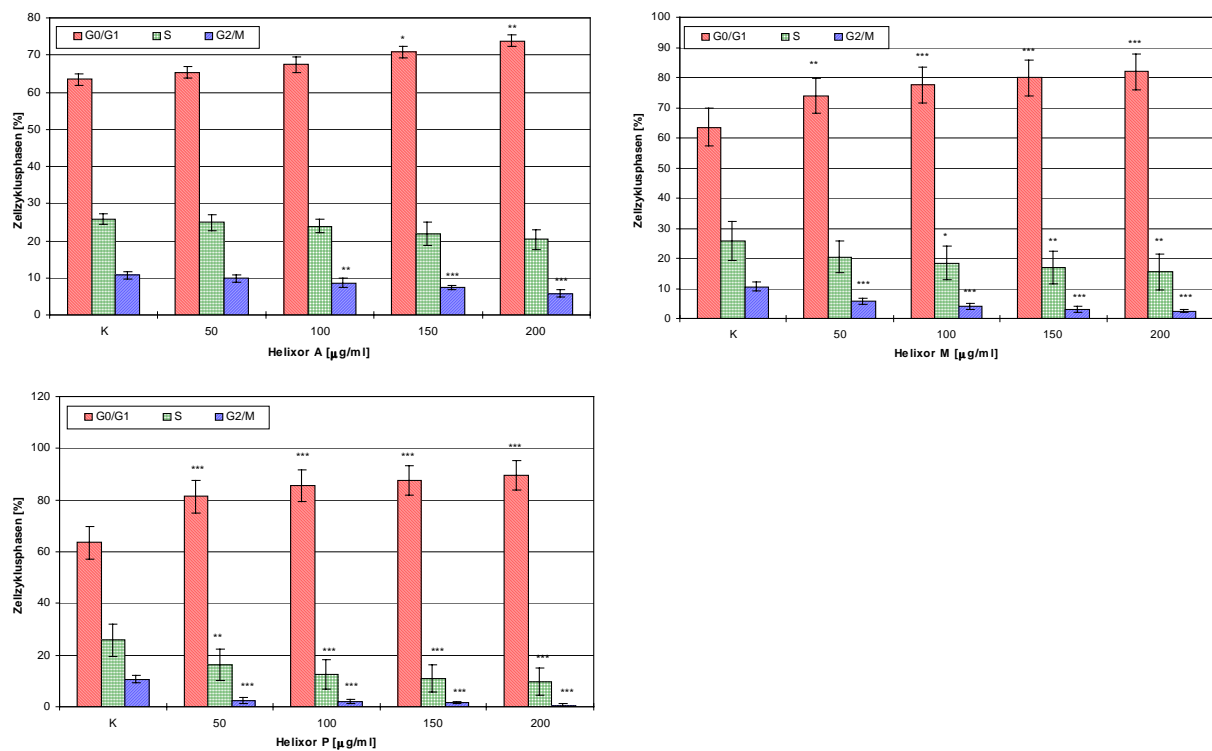


Abb. 40: Zellzyklusanalyse humaner Lymphozyten weiblicher Probanden nach 72 h Inkubation mit Helixor A, M und P. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.2.2 Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung, Induktion von Apoptose und Zellzyklusbeeinflussung durch Helixor A, M und P bei Lymphozyten männlicher Probanden

3.2.2.1 Bestimmung der Wachstumsrate

Die Analyse des Trypanblau-Ausschlusstestes zeigte für die drei getesteten Frischpflanzenextrakte eine hoch signifikante Wachstumshemmung im gesamten Konzentrationsbereich.

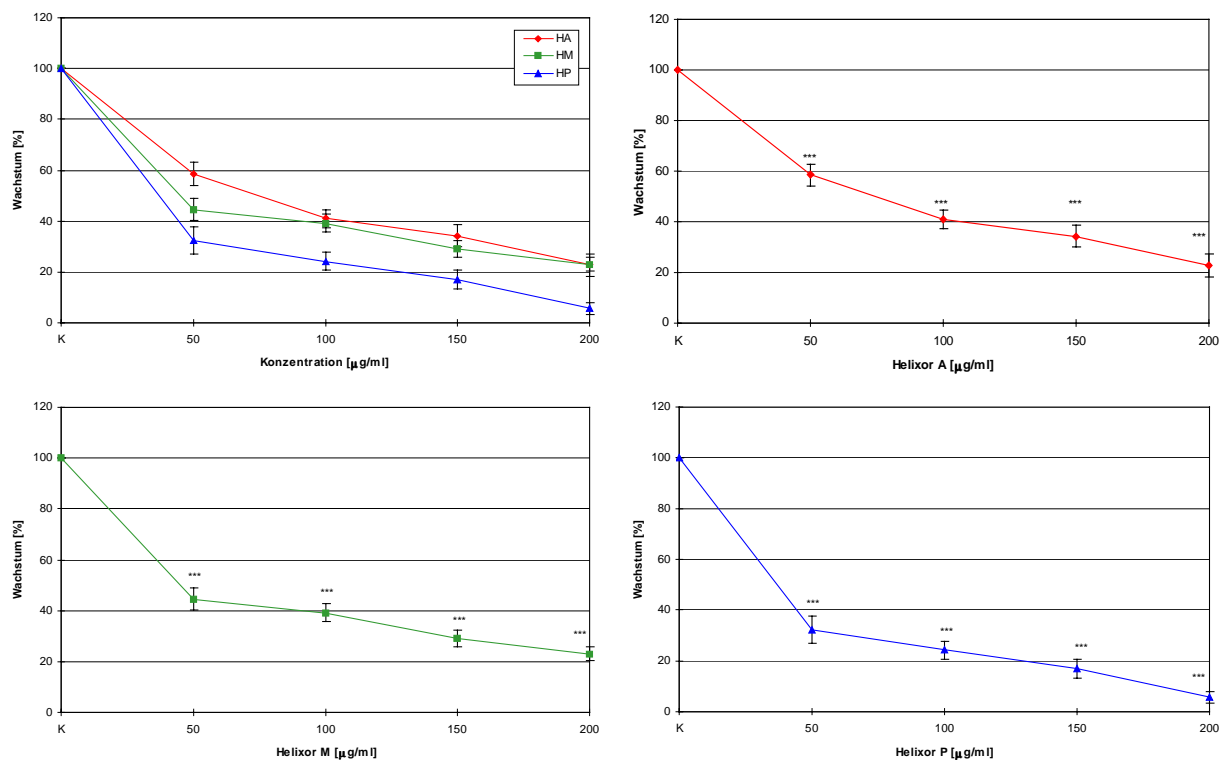


Abb. 41: Wachstumsrate humaner Lymphozyten männlicher Probanden nach 72 h Inkubation mit Helixor A, M und P. *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.2.2.2 Durchflusszytometrische Analyse

Das apoptoseinduzierende Potential der Mistelextrakte Helixor A, M und P auf humane Lymphozyten männlicher Probanden konnte durch das Auftreten eines Sub-G1-Peaks im 1-Parameter-Histogramm und eine G0/1-Phasenspezifität im 2-Parameter-Dot Plot nachgewiesen werden (vgl. Abb. 36).

Die quantitative Auswertung ergab einen signifikanten Anstieg der Apoptoserate für Helixor A ab einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$, der ab 100 $\mu\text{g/ml}$ hoch signifikant wurde. Die Präparate Helixor M und P wiesen dagegen im gesamten Konzentrationsbereich eine hoch signifikante Erhöhung der apoptotischen Zellpopulation auf.

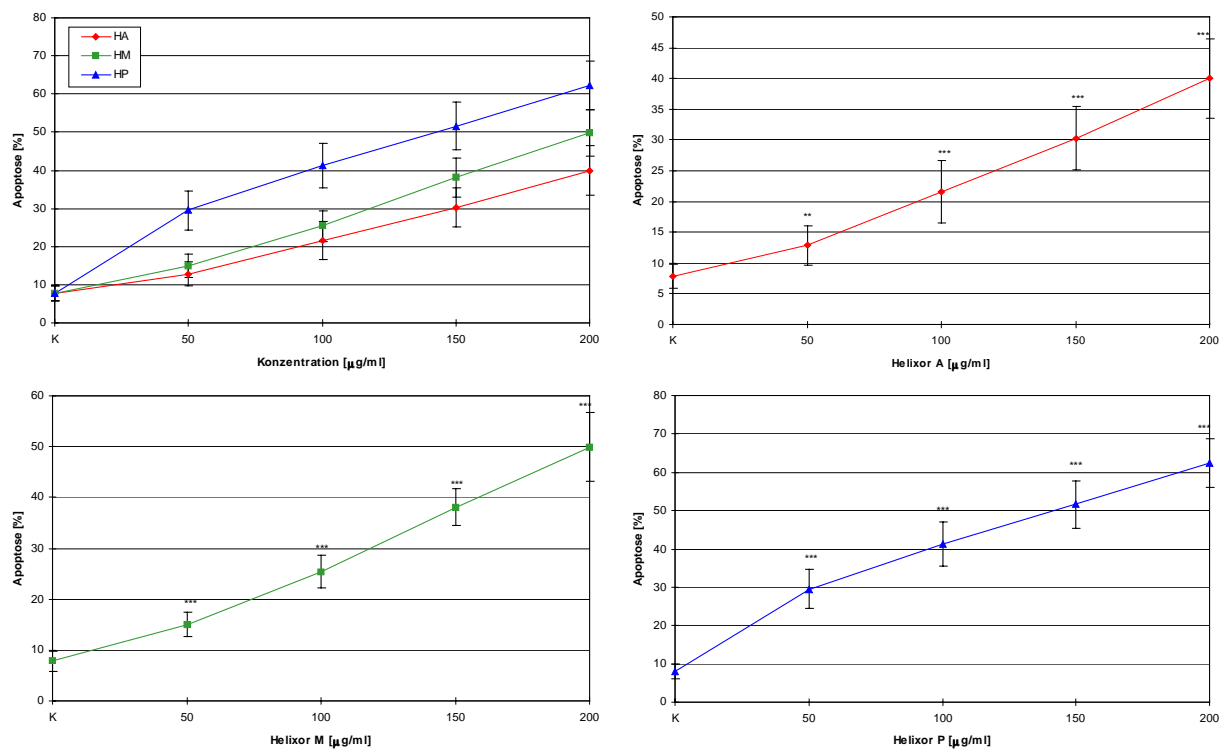


Abb. 42: Durchflusszytometrische Auswertung des Sub-G1-Bereiches humaner Lymphozyten männlicher Probanden nach 72 h Inkubation mit Helixor A, M und P. ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.2.2.3 Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der einzelnen Apoptosestadien ergab für die drei untersuchten Frischpflanzenextrakte ebenfalls einen deutlich dosisabhängigen Anstieg an Zellen mit stark kondensiertem und Zellen mit stark fragmentiertem Kern, auch die Anzahl apoptotischer Bodies nahm zu.

Das Präparat Helixor A bewirkte zunächst eine schwach signifikante Erhöhung stark kondensierter Kerne bei 50 $\mu\text{g/ml}$, die ab 100 $\mu\text{g/ml}$ hoch signifikant wurde. Zellen mit stark fragmentiertem Kern traten ab einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ signifikant bzw. ab 100 $\mu\text{g/ml}$ hoch signifikant vermehrt auf, und die signifikante Zunahme apoptotischer Bodies konnte bei 100 $\mu\text{g/ml}$ nachgewiesen werden. Die Untersuchungen mit dem Mistelextrakt Helixor M zeigten einen hoch signifikanten Anstieg stark kondensierter und stark fragmentierter Kerne ab einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$, die Erhöhung apoptotischer Bodies war ab 50 $\mu\text{g/ml}$ signifikant und wurde ab 150 $\mu\text{g/ml}$ hoch signifikant. Die Inkubation der Lymphozyten mit Helixor P resultierte in einem hoch signifikanten Anstieg aller detektierten Apoptosestadien im gesamten Konzentrationsbereich.

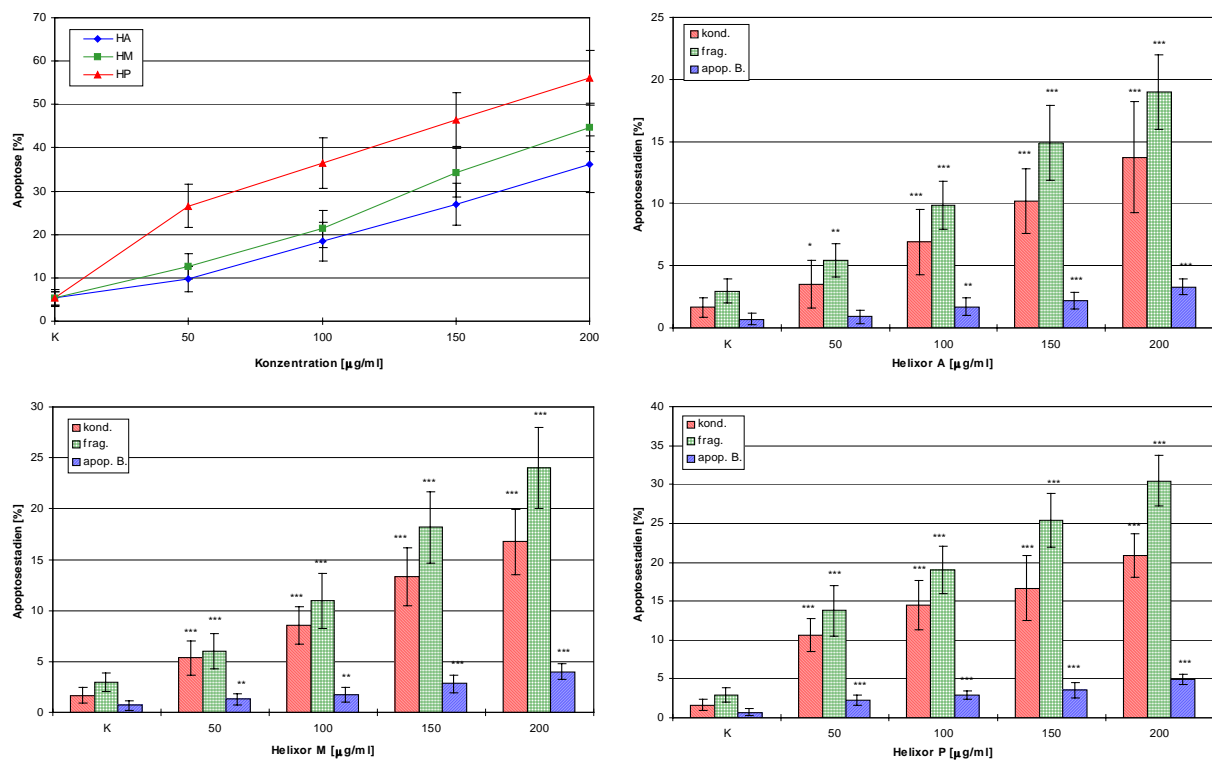


Abb. 43: Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien humaner Lymphozyten männlicher Probanden nach 72 h Inkubation mit Helixor A, M und P. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.2.2.4 Vergleich der durchflusszytometrischen und mikroskopischen Auswertung

Der direkte Vergleich der durchflusszytometrischen Ergebnisse mit der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung zeigte nach Addierung der einzelnen Apoptosestadien keinen signifikanten Unterschied, beide Methoden wiesen in den gleichen Konzentrationsbereichen den signifikanten und hoch signifikanten Anstieg apoptotischer Zellpopulationen auf.

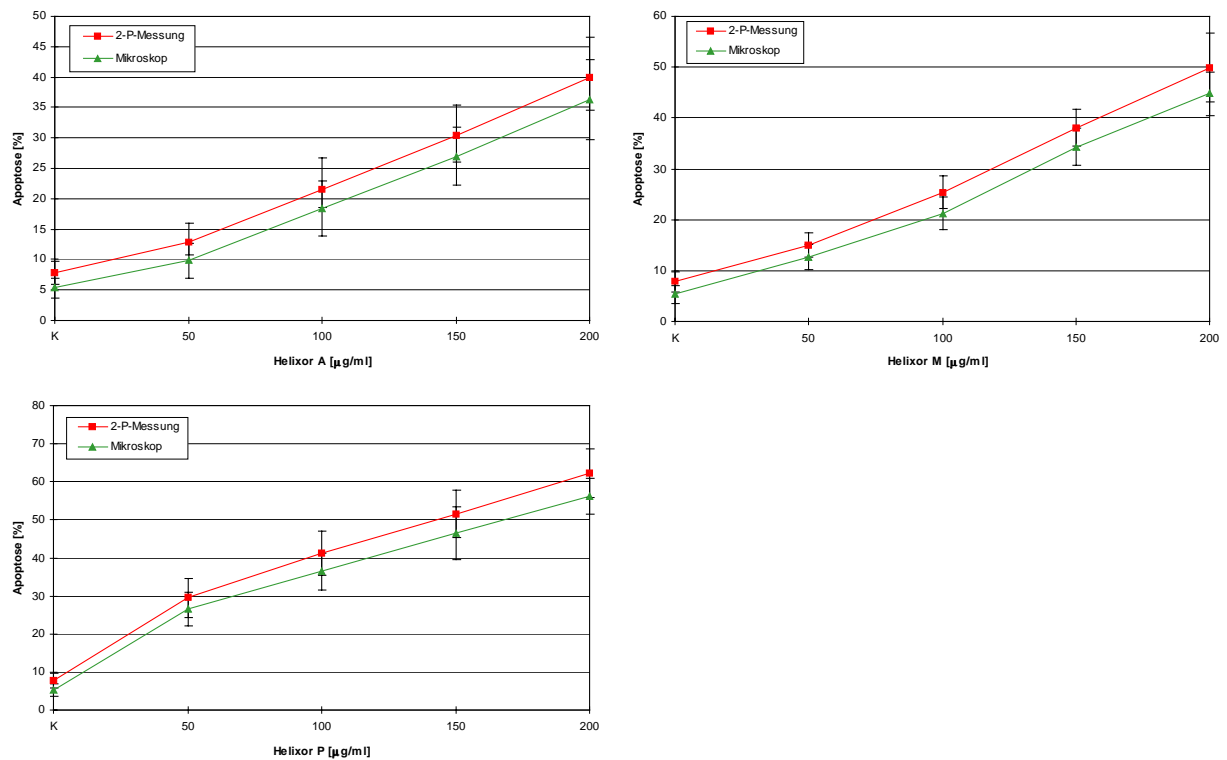


Abb. 44: Vergleich der durchflusszytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der durch Helixor A, M und P induzierten Apoptose bei humanen Lymphozyten männlicher Probanden.

3.2.2.5 Zellzyklusanalyse

Die Zellzyklusanalyse ergab für den Frischpflanzenextrakt Helixor A lediglich einen schwach signifikanten Anstieg der Zellen in der G0/1-Phase, der prozentuale Anteil der Zellen in der S- und G2/M-Phase veränderte sich nicht signifikant. Für Helixor M konnte dagegen eine schwach signifikante Zunahme der G0/1-Phase ab 50 µg/ml festgestellt werden, der ab 100 µg/ml signifikant und ab 200 µg/ml hoch signifikant wurde. Die S-Phase zeigte nur einen schwach signifikanten Abfall bei der höchsten Konzentration, während auch hier die G2/M-Zellen keine signifikante Veränderung aufwiesen. Das Präparat Helixor P bewirkte eine hoch signifikante Erhöhung der G0/1-Phase-Zellen im gesamten Konzentrationsbereich und eine schwach signifikante Abnahme der S-Phase, die ab 100 µg/ml signifikant bzw. ab 200 µg/ml hoch signifikant wurde.

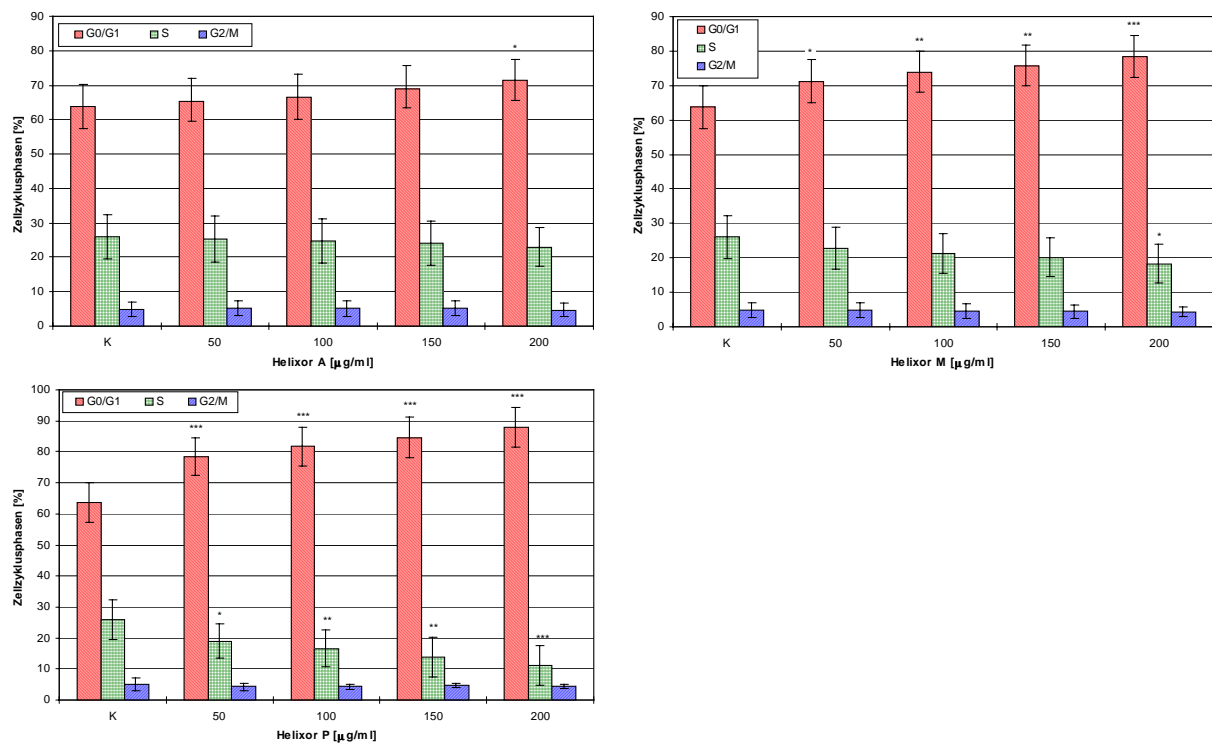


Abb. 45: Zellzyklusanalyse humaner Lymphozyten männlicher Probanden nach 72 h Inkubation mit Helixor A, M und P. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.2.3 Vergleich weiblicher und männlicher Probanden

3.2.3.1 Vergleich der Wachstumsraten

Der direkte Vergleich weiblicher und männlicher Probanden ergab eine signifikant geringere Wachstumshemmung der Lymphozyten männlicher Probanden (m) nach Inkubation mit Helixor Mali in den Konzentrationen 100 und 200 $\mu\text{g/ml}$ gegenüber Lymphozyten weiblicher Probanden (w). Für die Präparate Helixor A und P waren keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede feststellbar.

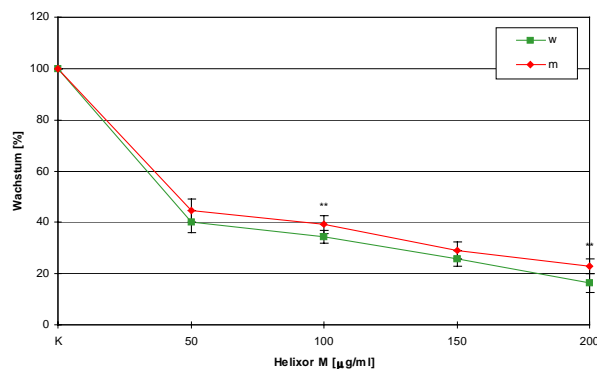


Abb. 46: Wachstumsrate humaner Lymphozyten weiblicher und männlicher Probanden nach 72 h Inkubation mit Helixor M. ** = signifikante Differenz zwischen Lymphozyten weiblicher und männlicher Probanden.

3.2.3.2 Vergleich der durchflusszytometrischen Ergebnisse

Beim direkten Vergleich des apoptoseinduzierenden Potentials der Frischpflanzenextrakte Helixor A, M und P konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Lymphozytenkulturen männlicher und weiblicher Probanden festgestellt werden.

3.2.3.3 Vergleich der mikroskopischen Ergebnisse

Auch bei der mikroskopischen Auswertung der einzelnen Apoptosestadien ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Probanden.

3.2.3.4 Vergleich der Zellzyklusanalysen

Beim direkten Vergleich der Zellzyklusdaten ergab sich bereits für den Kontrollansatz ein hoch signifikanter Unterschied bezüglich der G2/M-Phase bei Lymphozyten weiblicher und männlicher Probanden. Auch unter Einwirkung des Präparates Helixor A bei Lymphozyten weiblicher Probanden (w) war der Anteil an G2/M-Phase-Zellen bei einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ hoch signifikant, bei 100 $\mu\text{g/ml}$ signifikant und bei 150 $\mu\text{g/ml}$ schwach signifikant erhöht gegenüber den G2/M-Werten bei Lymphozyten männlicher Probanden (m). Unter Einwirkung des Extraktes Helixor M war der Prozentsatz an Zellen der G2/M-Phase bei Lymphozyten weiblicher Probanden bei der höchsten Konzentration signifikant niedriger als der Wert bei Lymphozyten männlicher Probanden. Der Frischpflanzenextrakt Helixor P bewirkte eine signifikante Abnahme der Zellen der G2/M-Phase bei Lymphozyten weiblicher Probanden gegenüber männlichen Probanden bei einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$, die ab 100 $\mu\text{g/ml}$ hoch signifikant war.

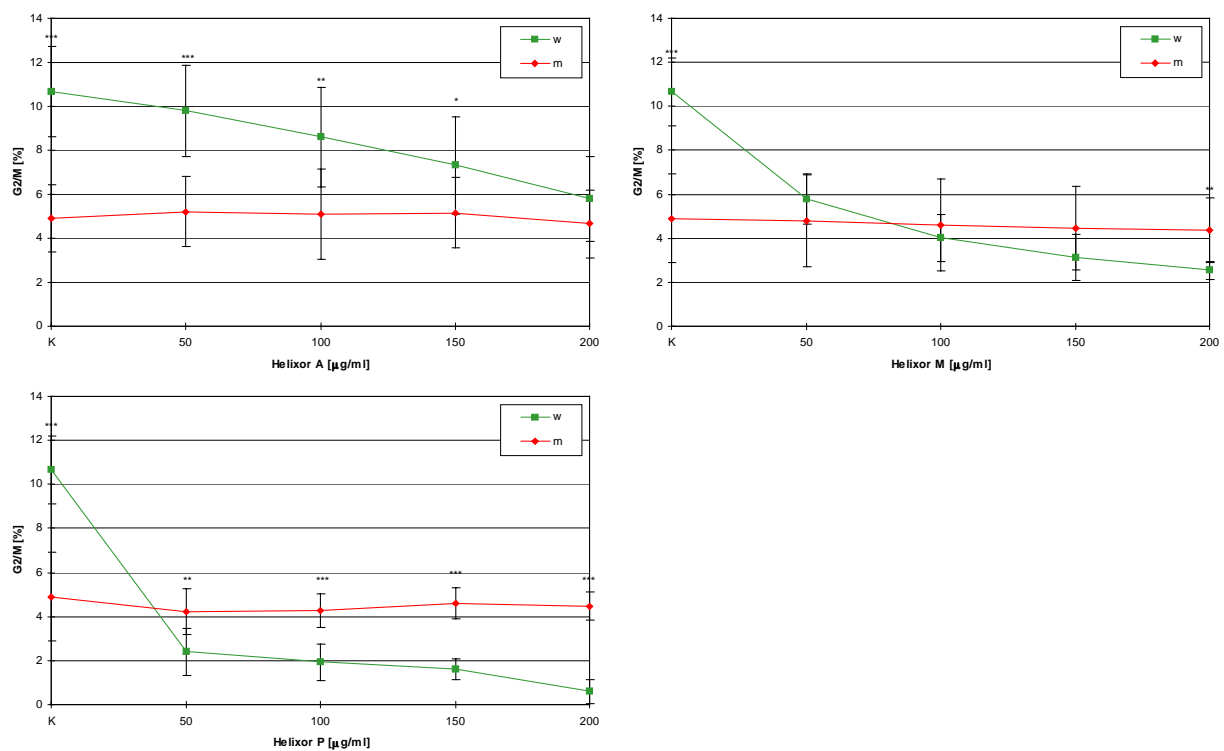


Abb. 47: Prozentuale Anteile der G2/M-Phase humaner Lymphozyten weiblicher und männlicher Probanden nach 72 h Inkubation mit Helixor A, M und P. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zwischen Lymphozyten weiblicher und männlicher Probanden.

3.3 Wachstumshemmendes und apoptoseinduzierendes Potential von Mistellektin I und III getestet an der Zelllinie MOLT-4

3.3.1 Bestimmung der Wachstumsrate

Nach Bestimmung der Wachstumsrate mithilfe des Trypanblau-Ausschlusstestes konnte für beide Lektine eine signifikante Abnahme ab 0,05 ng/ml, die ab 0,5 ng/ml hoch signifikant wurde, festgestellt werden.

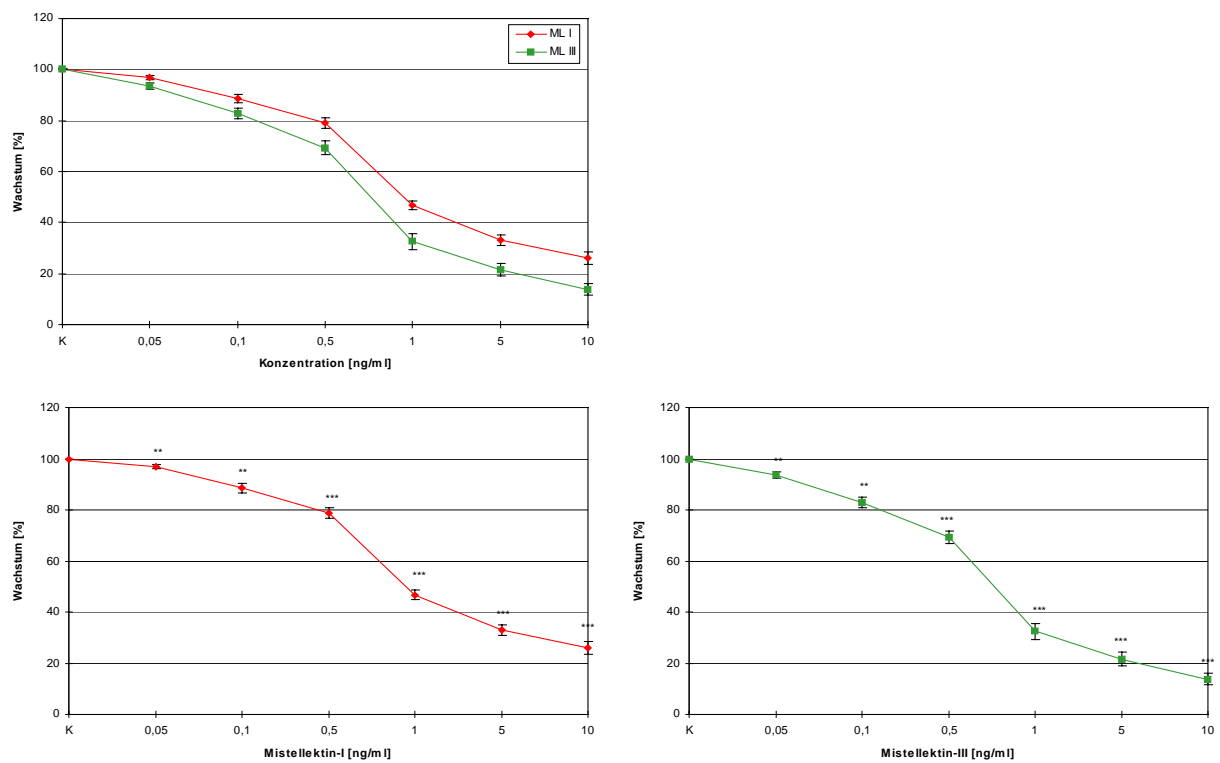


Abb. 48: Wachstumsrate der Zelllinie MOLT-4 nach 72 h Inkubation mit Mistellektin I und III. ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.3.2 Durchflusszytometrische Analyse

Das apoptoseinduzierende Potential der Mistellektine I und III auf die Leukämiezellen konnte durch das Auftreten eines Sub-G1-Peaks nachgewiesen werden. Im 2-Parameter-Dot Plot war außerdem erkennbar, dass die apoptotischen Zellen sowohl aus der G0/G1- als auch aus der S-Phase austraten. Der Sub-G1-Bereich wurde um diese Population erweitert (Abb. 49, ML III 1 ng/ml, schwarzes Gate), zu Beginn jeder Messreihe festgelegt und nicht mehr verändert.

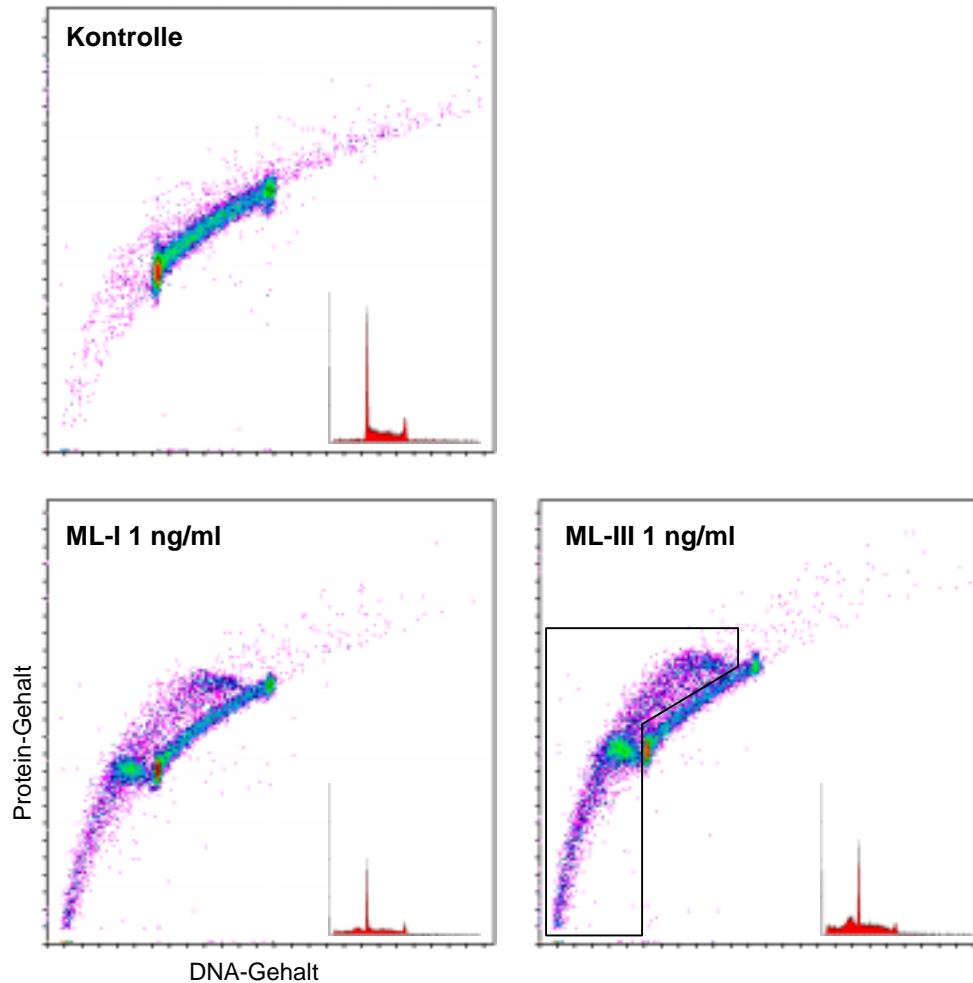


Abb. 49: Histogramme der 1- und 2-Parameter-Messung nach 72 h Inkubation der Zelllinie MOLT-4 mit ML-I und ML-III. Das bei ML III 1 ng/ml eingezeichnete Gate zeigt den erweiterten Sub-G1-Bereich.

Die quantitative Auswertung ergab für ML-I einen signifikanten Anstieg der apoptotischen Zellpopulation ab einer Konzentration von 0,5 ng/ml und für ML-III eine schwach signifikante Erhöhung bei 0,1 ng/ml bzw. eine signifikante Erhöhung ab 0,5 ng/ml.

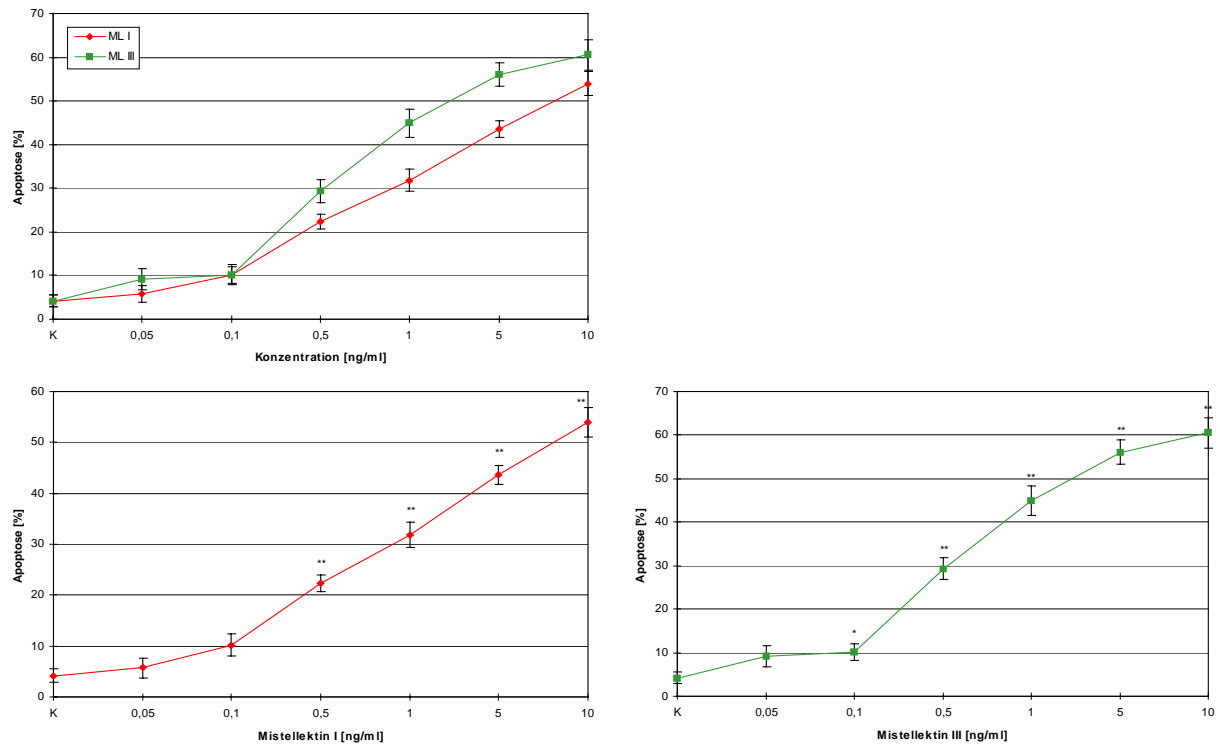


Abb. 50: Durchflusszytometrische Auswertung des Sub-G1-Bereiches der Zelllinie MOLT-4 nach 72 h Inkubation mit Mistellektin I und III. * = schwach signifikante, ** = signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.3.3 Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien

Die morphologische Auswertung der apoptotischen Zellpopulationen ergab für die beiden getesteten Lektine eine Zusammensetzung aus Zellen aller erfassten Apoptosestadien, wobei auch hier die prozentualen Anteile stark fragmentierter Kerne überwogen.

Nach Inkubation mit ML-I konnte eine schwach signifikante (0,1 ng/ml) bzw. signifikante Zunahme (ab 0,5 ng/ml) stark kondensierter Kerne und ein schwach signifikanter (0,5 und 5 ng/ml) bzw. ein signifikanter Anstieg (0,1; 1 und 10 ng/ml) apoptotischer Bodies nachgewiesen werden. Der konzentrationsabhängige Anstieg der Zellen mit stark fragmentiertem Kern war schon ab 0,05 ng/ml schwach signifikant und wurde ab 0,1 ng/ml signifikant bzw. ab 5 ng/ml hoch signifikant. ML-III bewirkte einen schwach signifikanten Anstieg stark kondensierter Kerne ab 0,1 ng/ml, der ab 1 ng/ml signifikant wurde und eine schwach signifikante Erhöhung apoptotischer Körperchen ab 0,05 ng/ml, die ab 5 ng/ml signifikant wurde. Auch hier war die Zunahme an Zellen mit stark fragmentiertem Kern schon ab einer Konzentration von 0,05 ng/ml schwach signifikant und wurde ab 0,5 ng/ml signifikant bzw. ab 5 ng/ml hoch signifikant.

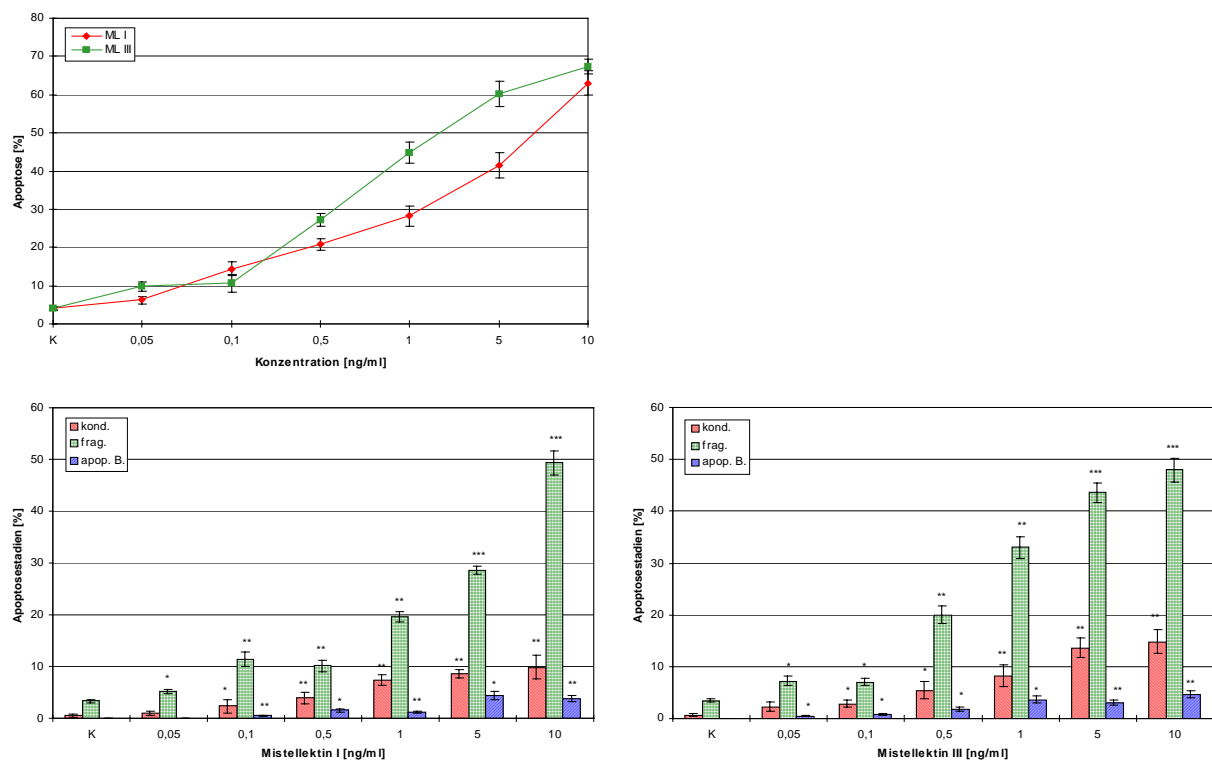


Abb. 51: Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien der Zelllinie MOLT-4 nach 72 h Inkubation mit Mistellektin I und III. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.3.4 Vergleich der durchflusszytometrischen und mikroskopischen Auswertung

Der Summenvergleich aller erfassten Apoptosestadien mit der durchflusszytometrischen Bestimmung des Sub-G1-Peaks zeigte für die beiden getesteten Mistellektine schwach signifikante Unterschiede zwischen Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie bei einer Konzentration von 10 ng/ml.

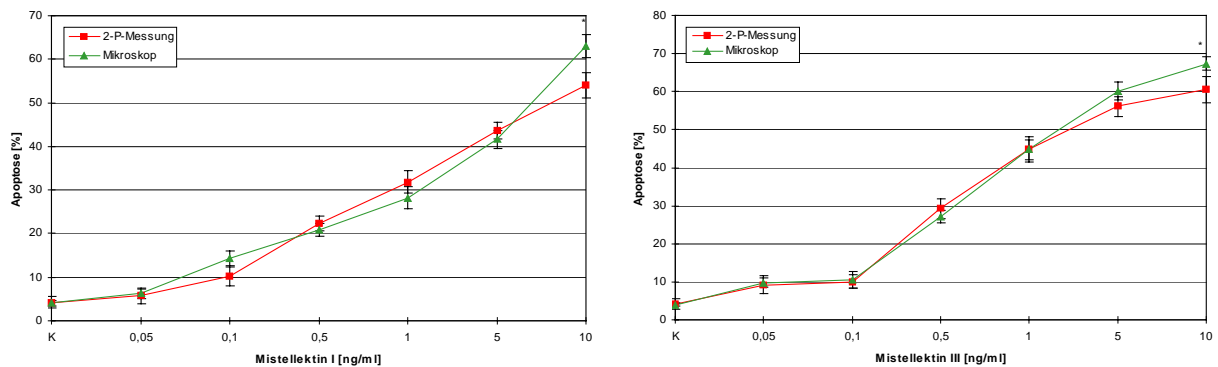


Abb. 52: Vergleich der durchflusszytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der durch Mistellektin I und III induzierten Apoptose bei der Zelllinie MOLT-4. * = schwach signifikante Differenz zwischen Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie.

3.3.5 Zellzyklusanalyse

Die Zellzyklusanalyse der DNA-Messung wies für ML-I eine schwach signifikante Abnahme der G0/1-Phase ab 1 ng/ml, eine schwach signifikante Zunahme der S-Phase ab 1 ng/ml und eine schwach signifikante Abnahme der G2/M-Phase ab 10 ng/ml auf. ML-III induzierte eine schwach signifikante Abnahme der G0/1-Zellen ab 1 ng/ml, die ab 10 ng/ml signifikant wurde, eine schwach signifikante Zunahme der S-Zellen ab 1 ng/ml, die ab 5 ng/ml signifikant wurde und eine schwach signifikante Abnahme der G2/M-Zellen ab 5 ng/ml.

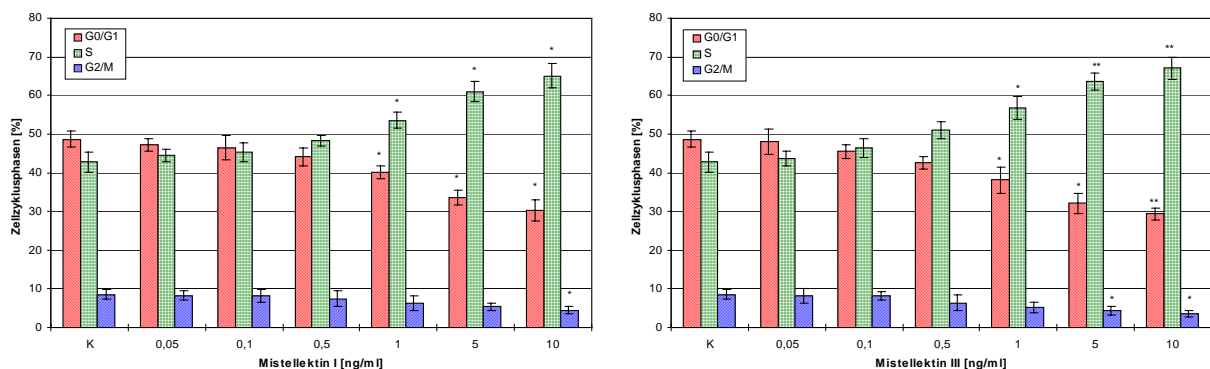


Abb. 53: Zellzyklusanalyse der Zelllinie MOLT-4 nach 72 h Inkubation mit Mistellektin I und III. * = schwach signifikante, ** = signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.4 Wachstumshemmendes und apoptoseinduzierendes Potential von Mistellektin I und III getestet an humanen Lymphozyten

3.4.1 Bestimmung der Wachstumsrate

Die Auswertung des Trypanblau-Ausschlusstestes ergab für beide Lektine eine hoch signifikante Wachstumshemmung im gesamten Konzentrationsbereich, es traten jedoch keine geschlechtsspezifischen Unterschiede zwischen Lymphozytenkulturen weiblicher und männlicher Probanden auf.

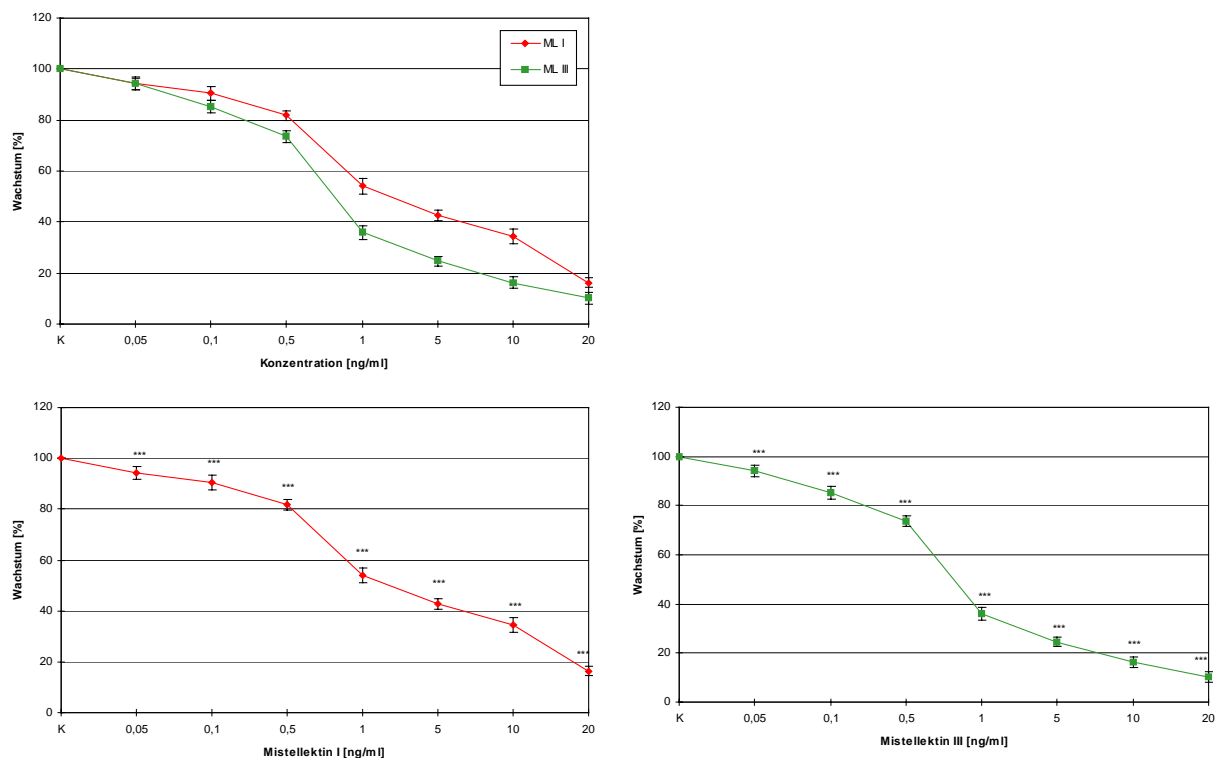


Abb. 54: Wachstumsrate humaner Lymphozyten nach 72 h Inkubation mit Mistellektin I und III. *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.4.2 Durchflusszytometrische Analyse

Das apoptoseinduzierende Potential der getesteten Mistellektine auf humane Lymphozyten konnte durch das Auftreten eines Sub-G1-Peaks im 1-Parameter-Histogramm nachgewiesen werden. Bei der Analyse der 2-Parameter-Dot Plots wurde außerdem ersichtlich, dass die apoptotischen Zellen sowohl aus der G0/G1-Phase als auch aus der S- und G2/M-Phase austreten. Der Sub-G1-Bereich wurde um diese Population erweitert (Abb. 55, ML III 1 ng/ml, schwarzes Gate), zu Beginn jeder Messreihe festgelegt und nicht mehr verändert. Es konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede für die beiden isolierten Lektine festgestellt werden.

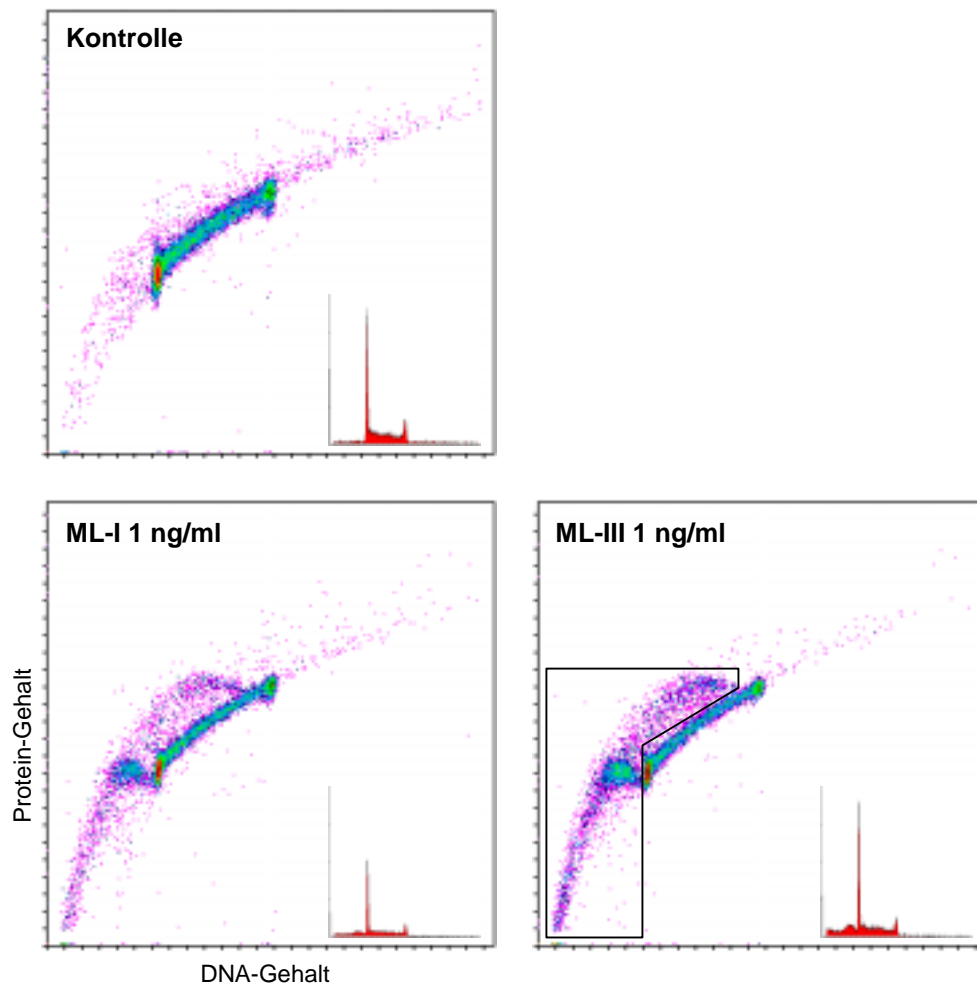


Abb. 55: Histogramme der 1- und 2-Parameter-Messung nach 72 h Inkubation humaner Lymphozyten mit Mistellektin I und III. Das bei ML III 1 ng/ml eingezeichnete Gate zeigt den erweiterten Sub-G1-Bereich.

Die quantitative Auswertung ergab für ML-I eine signifikante Erhöhung der apoptotischen Zellpopulation ab 0,05 ng/ml, die ab 0,1 ng/ml hoch signifikant wurde und für ML-III eine hoch signifikante Zunahme im gesamten Konzentrationsbereich.

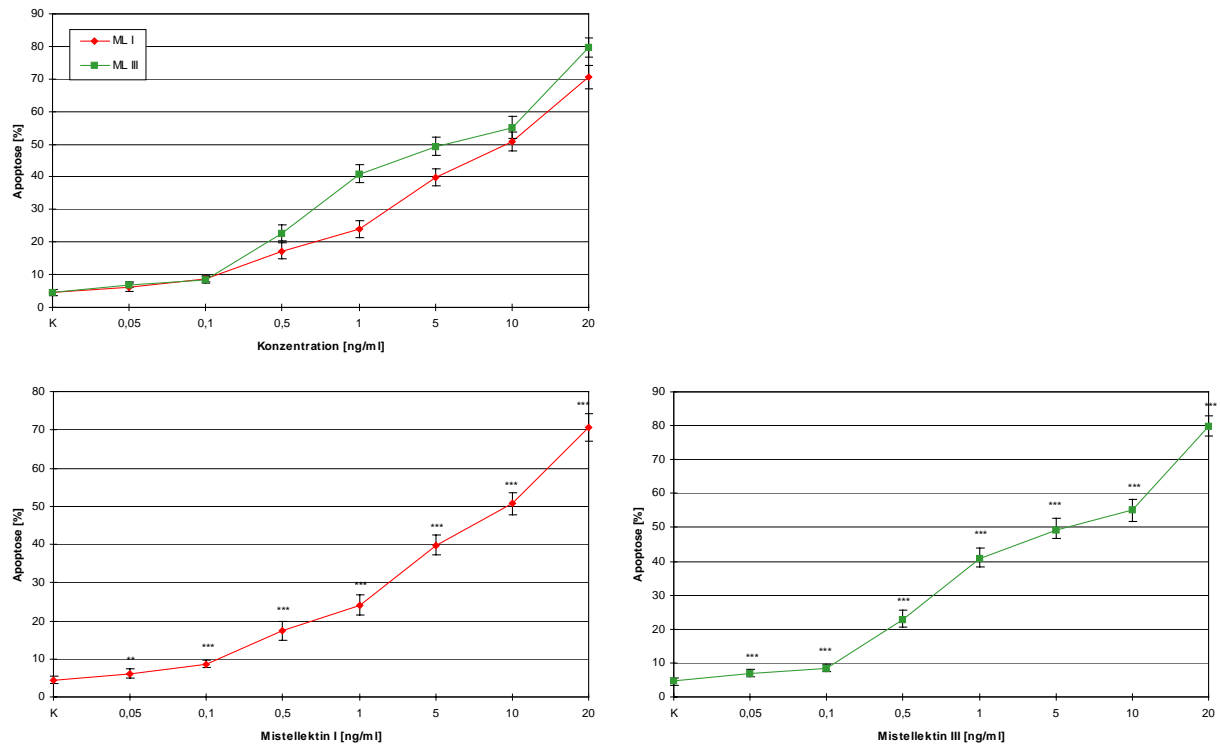


Abb. 56: Durchflusszytometrische Auswertung des Sub-G1-Bereiches humaner Lymphozyten nach 72 h Inkubation mit Mistellektin I und III. ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.4.3 Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien

Die morphologische Auswertung der apoptotischen Zellpopulationen ergab für die beiden getesteten Lektine eine Zusammensetzung aus Zellen aller erfassten Apoptosestadien, wobei auch hier die prozentualen Anteile stark kondensierter Kerne und stark fragmentierter Kerne überwogen. Nach Inkubation mit ML-I konnte eine signifikante Zunahme stark kondensierter Kerne ab 0,1 ng/ml, die ab 0,5 ng/ml hoch signifikant wurde, nachgewiesen werden. Die Anzahl an Zellen mit stark fragmentiertem Kern war ab einer Konzentration von 0,05 ng/ml signifikant bzw. ab 0,1 ng/ml hoch signifikant erhöht und der Anteil an apoptotischen Körperchen war ab 0,1 ng/ml schwach signifikant bzw. ab 0,5 ng/ml hoch signifikant erhöht. Die Untersuchungen mit ML-III zeigten einen schwach signifikanten Anstieg stark kondensierter Kerne bei 0,1 ng/ml (ab 0,5 ng/ml hoch signifikant), eine schwach signifikante Erhöhung stark fragmentierter Kerne bei 0,05 ng/ml (ab 0,1 ng/ml hoch signifikant) und eine signifikante Erhöhung apoptotischer Bodies bei 0,1 ng/ml (ab 0,5 ng/ml hoch signifikant). Auch die morphologische Bestimmung der Apoptoserate ergab keine geschlechtsspezifische Wirkung der Mistellektine I und III.

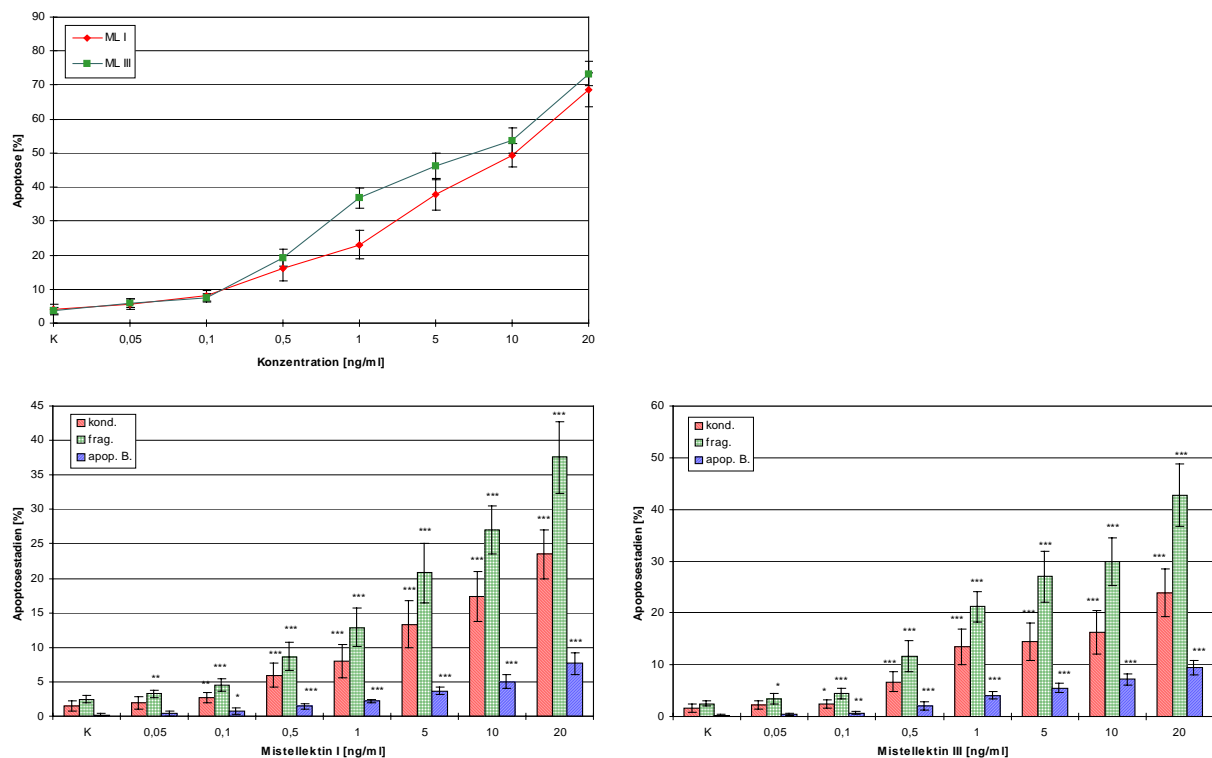


Abb. 57: Mikroskopische Auswertung einzelner Apoptosestadien humaner Lymphozyten nach 72 h Inkubation mit Mistellektin I und III. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.4.4 Vergleich durchflusszytometrischer und mikroskopischer Auswertung

Der Summenvergleich aller erfassten Apoptosestadien mit der durchflusszytometrischen Bestimmung des Sub-G1-Peaks zeigte für die beiden getesteten Mistellektine keine signifikanten Unterschiede in der quantitativen Auswertung.

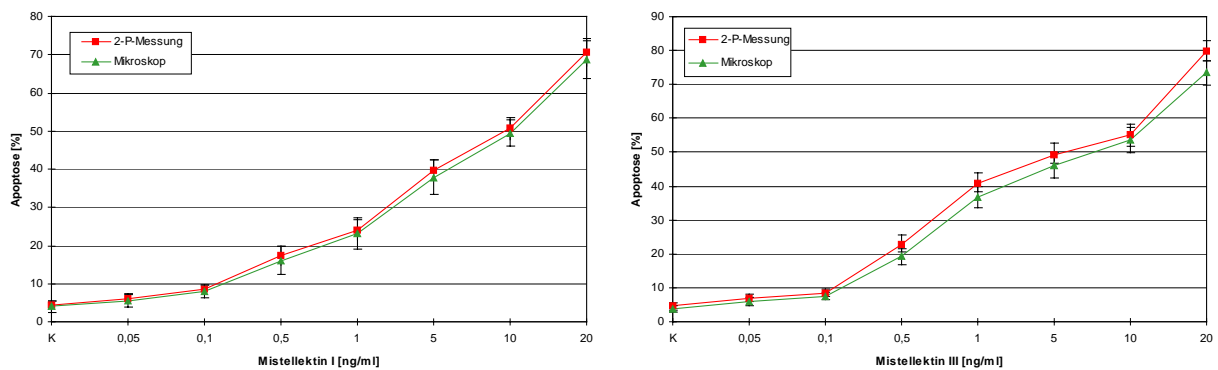


Abb. 58: Vergleich der durchflusszytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der durch Helixor A, M und P induzierten Apoptose bei humanen Lymphozyten. * = schwach signifikante, ** = signifikante Differenz zwischen Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie.

3.4.5 Zellzyklusanalyse

Die Zellzyklusanalyse ergab für ML-I einen schwach signifikante Abnahme der G0/1-Phase bei 1 ng/ml, die ab 5 ng/ml hoch signifikant wurde, eine signifikante Erhöhung der S-Phase bei 1 ng/ml, die ab 5 ng/ml hoch signifikant wurde und eine schwach signifikante Abnahme der G2/M-Phase, die bei 1 ng/ml signifikant bzw. ab 5 ng/ml hoch signifikant wurde. ML-III bewirkte eine signifikante Abnahme der G0/1-Phase bei 1 ng/ml, die ab 5 ng/ml hoch signifikant wurde, eine schwach signifikante Zunahme der S-Phase bei 0,5 ng/ml, die ab 1 ng/ml hoch signifikant wurde und eine hoch signifikante Abnahme der G2/M-Phase ab einer Konzentration von 0,5 ng/ml.

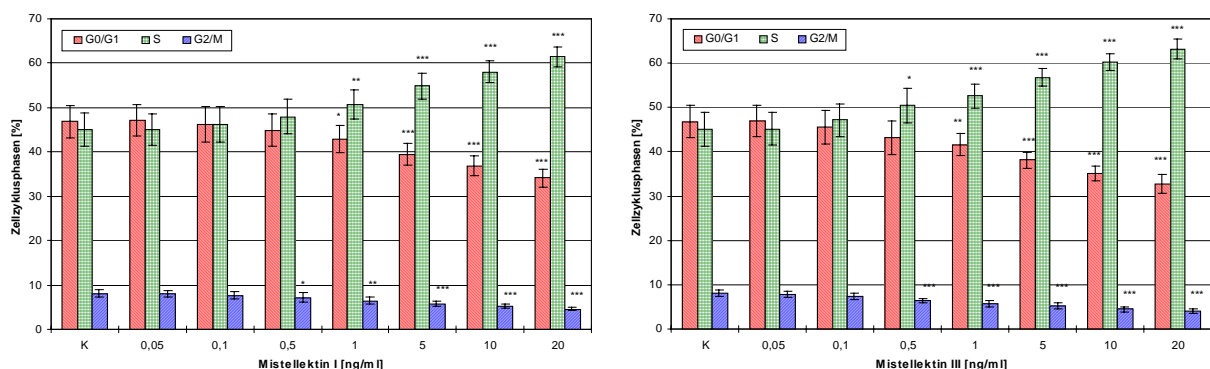


Abb. 59: Zellzyklusanalyse humaner Lymphozyten nach 72 h Inkubation mit Mistellektin I und III. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.5 SCE-Frequenz, Zellzyklusverteilung und Proliferationsindex humaner Lymphozyten nach Kombinationsbehandlung mit Helixor-Präparaten und Zytostatika

3.5.1 Helixor-Präparate

3.5.1.1 SCE-Rate

Im eingesetzten Konzentrationsbereich von 2,5 bis 20 $\mu\text{g/ml}$ bewirkte Helixor A eine schwach signifikante Abnahme der SCE-Rate ab 2,5 $\mu\text{g/ml}$, die ab 10 $\mu\text{g/ml}$ signifikant war. Helixor M induzierte eine bei 5 $\mu\text{g/ml}$ schwach signifikante bzw. ab 7,5 $\mu\text{g/ml}$ signifikante und Helixor P eine ab 5 $\mu\text{g/ml}$ schwach signifikante und ab 10 $\mu\text{g/ml}$ signifikante Verringerung der SCE-Rate. Es konnten keine signifikanten geschlechtsspezifischen oder wirtsbaumspezifischen Unterschiede festgestellt werden.

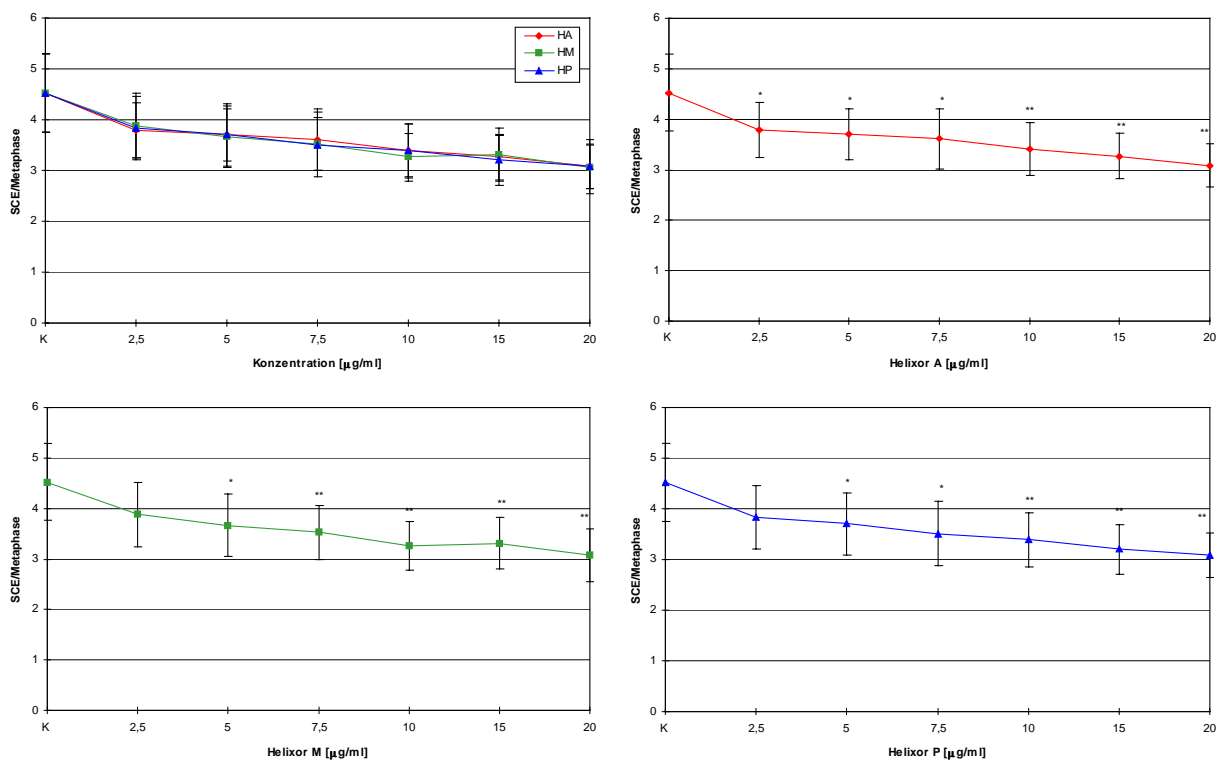


Abb. 60: SCE-Rate humaner Lymphozyten nach 71 h Inkubation mit Helixor A, M und P. * = schwach signifikante, ** = signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.5.1.2 Zellzyklusverteilung und Proliferationsindex

Die verwendeten Frischpflanzenextrakte bewirkten keine signifikanten Veränderungen der Zellzyklusverteilung und des Proliferationsindexes.

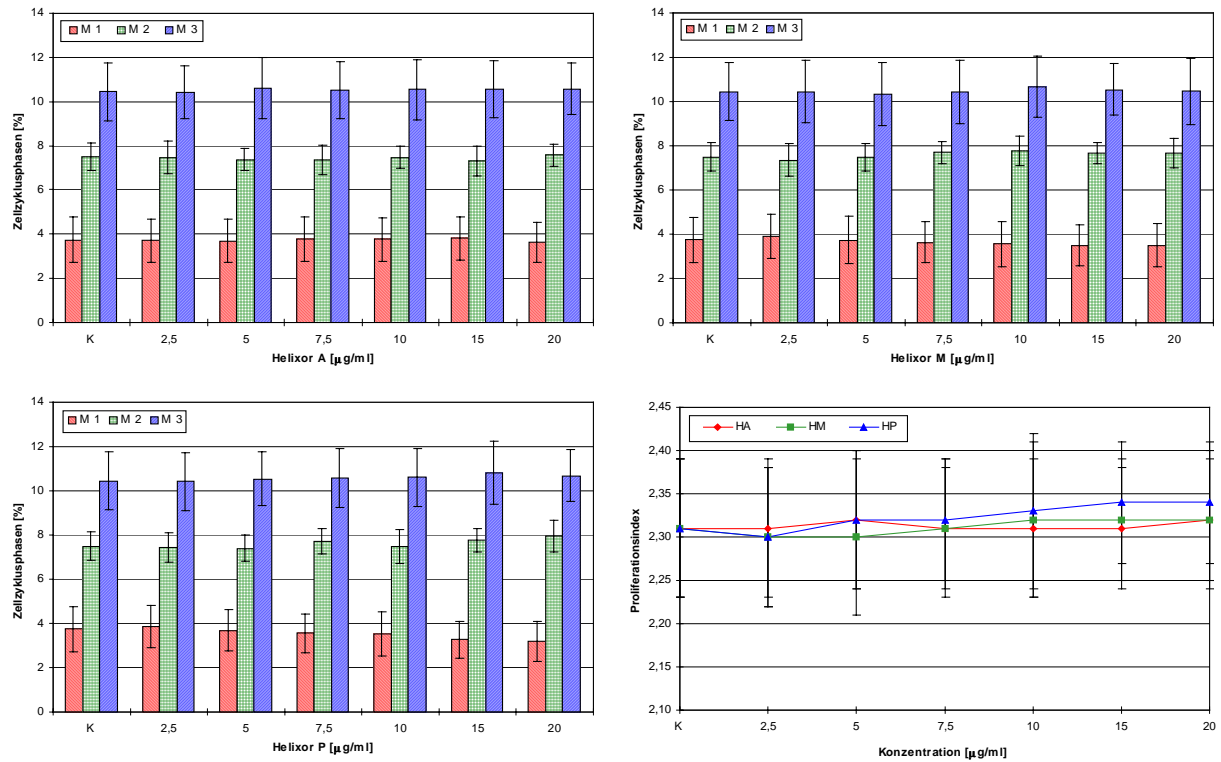


Abb. 61: Zellzyklusverteilung und Proliferationsindex humaner Lymphozyten nach 71 h Inkubation mit Helixor A, M und P.

3.5.2 Helixor-Päparate und Cyclophosphamid

3.5.2.1 SCE-Rate

Die Bestimmung der SCE-Rate ergab für den Extrakt Helixor A eine schwach signifikante Abnahme bei 15 $\mu\text{g/ml}$, die ab 20 $\mu\text{g/ml}$ signifikant war, für Helixor M bzw. P eine schwach signifikante Verringerung ab 10 $\mu\text{g/ml}$, die ab 20 $\mu\text{g/ml}$ signifikant war. Es konnten keine signifikanten geschlechtsspezifischen oder wirtsbaumspezifischen Unterschiede nachgewiesen werden.

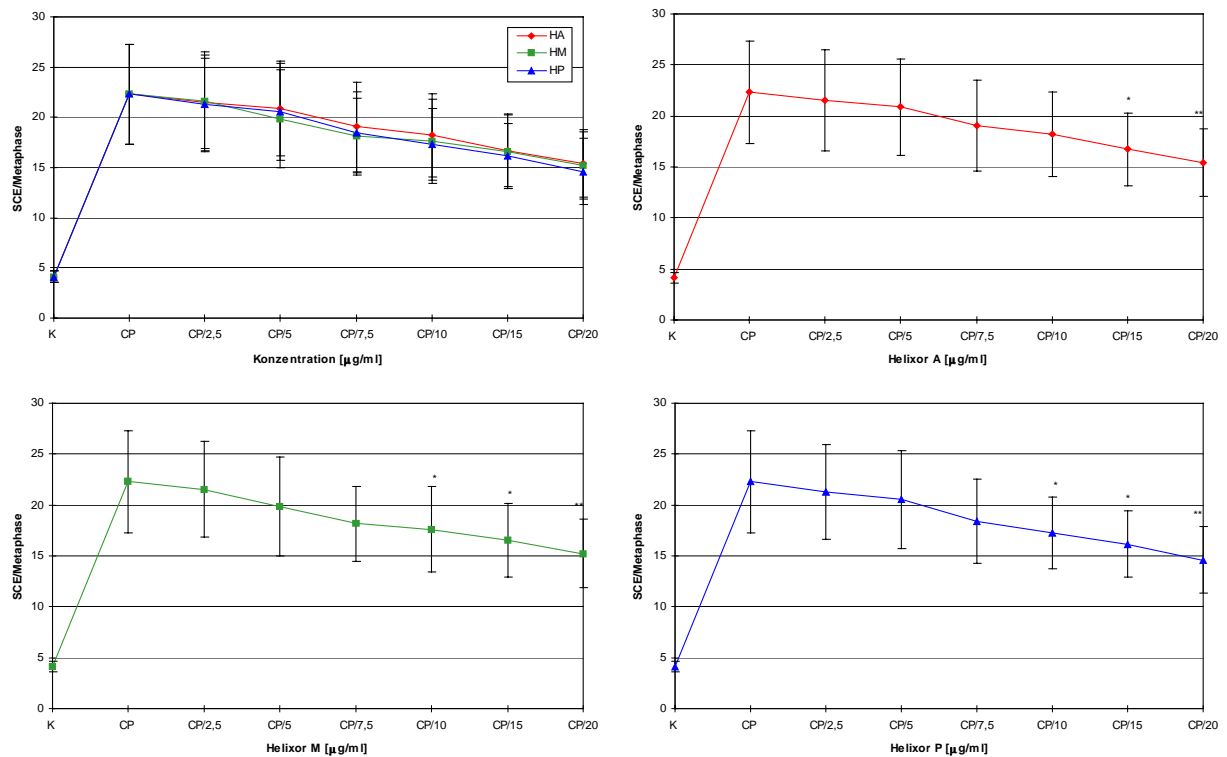


Abb. 62: SCE-Rate humaner Lymphozyten nach 71 h Inkubation mit Helixor A, M, P und Cyclophosphamid. * = schwach signifikante, ** = signifikante Differenz zur Positivkontrolle.

3.5.2.2 Zellzyklusverteilung und Proliferationsindex

Die Analyse der Zellzyklusdaten und der Proliferationsindizes zeigte keine signifikanten Veränderungen gegenüber der Positivkontrolle.

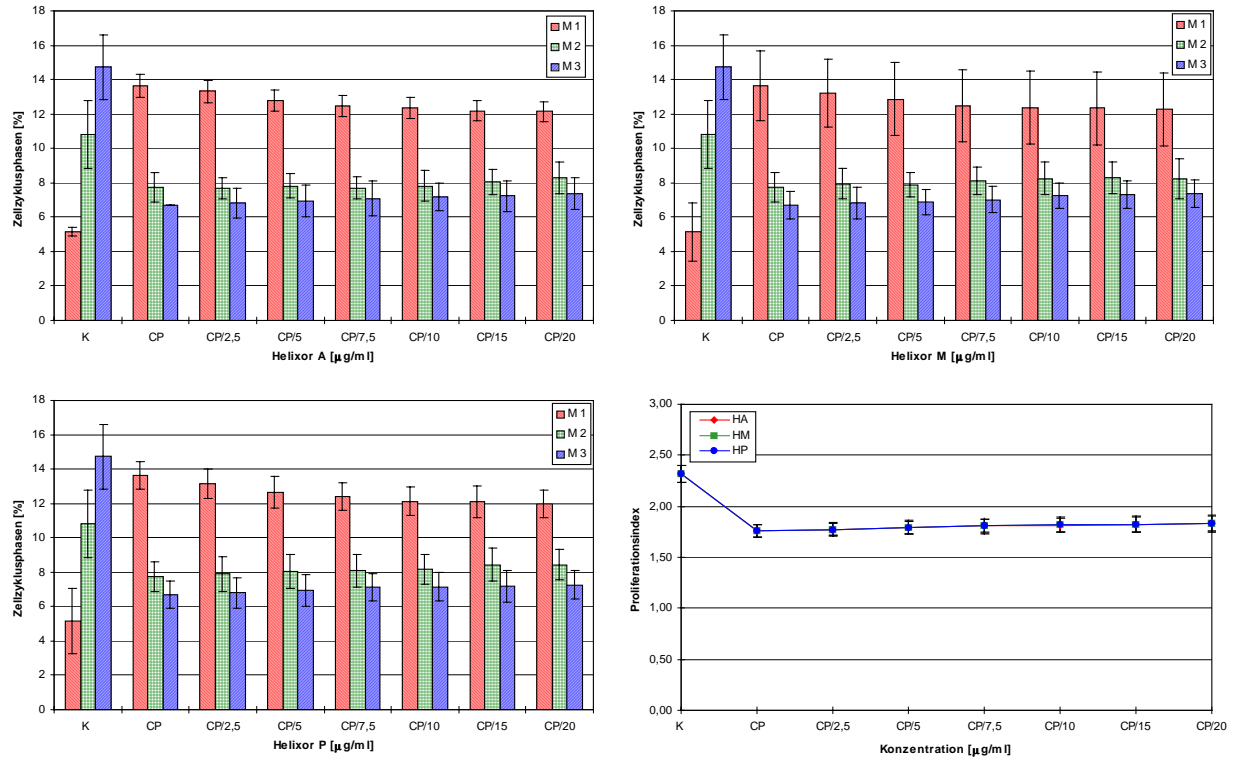


Abb. 63: Zellzyklusverteilung und Proliferationsindex humaner Lymphozyten nach 71 h Inkubation mit Helixor A, M, P und Cyclophosphamid.

3.5.3 Helixor-Präparate und Methotrexat

3.5.3.1 SCE-Rate

Die Berechnung der SCE-Rate ergab für Helixor A eine schwach signifikante Abnahme bei 7,5 µg/ml, die ab 10 µg/ml signifikant und ab 20 µg/ml hoch signifikant wurde. Der Extrakt Helixor M bewirkte eine schwach signifikante Verringerung der SCE-Rate ab 10 µg/ml, die bei 15 µg/ml signifikant und bei 20 µg/ml hoch signifikant war. Helixor P zeigte eine schwach signifikante Abnahme der SCE-Rate ab 7,5 µg/ml, die bei 15 µg/ml signifikant bzw. bei 20 µg/ml hoch signifikant wurde. Es konnten keine signifikanten geschlechtsspezifischen oder wirtsbaumspezifischen Unterschiede festgestellt werden.

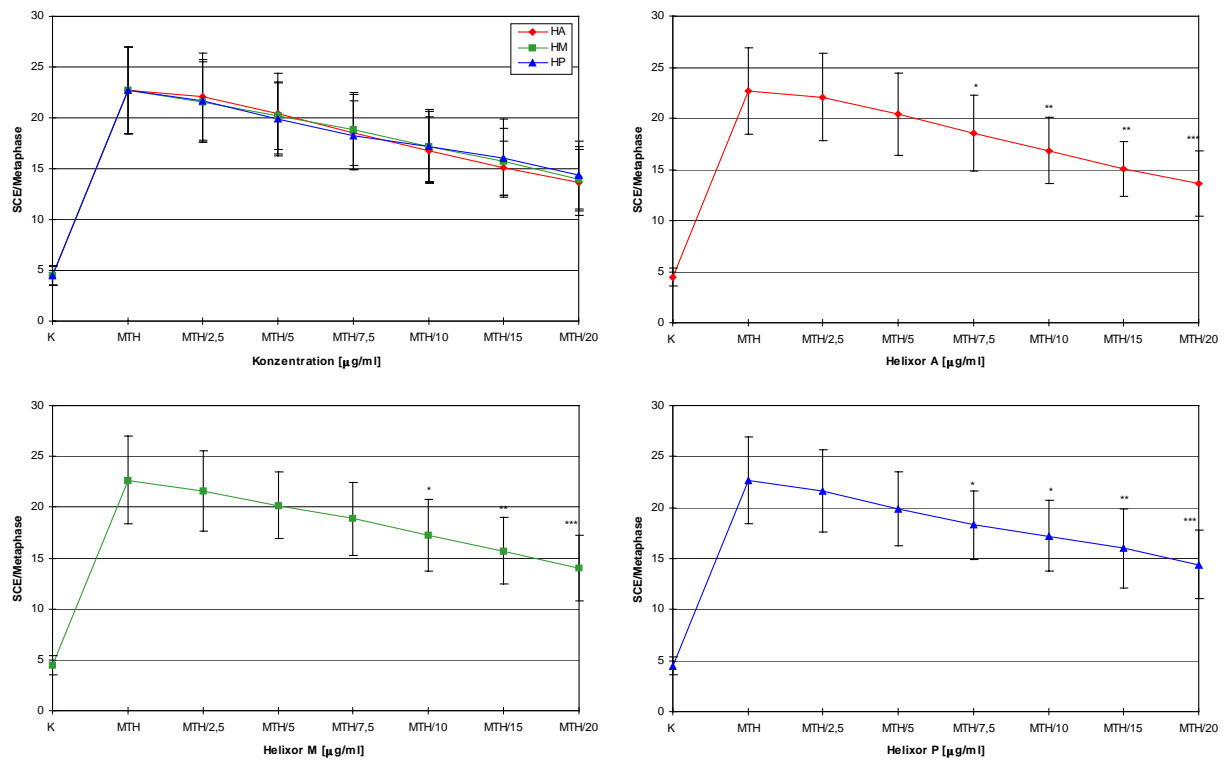


Abb. 64: SCE-Rate humaner Lymphozyten nach 71 h Inkubation mit Helixor A, M, P und Methotrexat. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Positivkontrolle.

3.5.3.2 Zellzyklusverteilung und Proliferationsindex

Die durch die drei Mistextrakte induzierten Veränderungen der SCE-Rate hatten keine signifikanten Einflüsse auf die Zellzyklusverteilung und den Proliferationsindex.

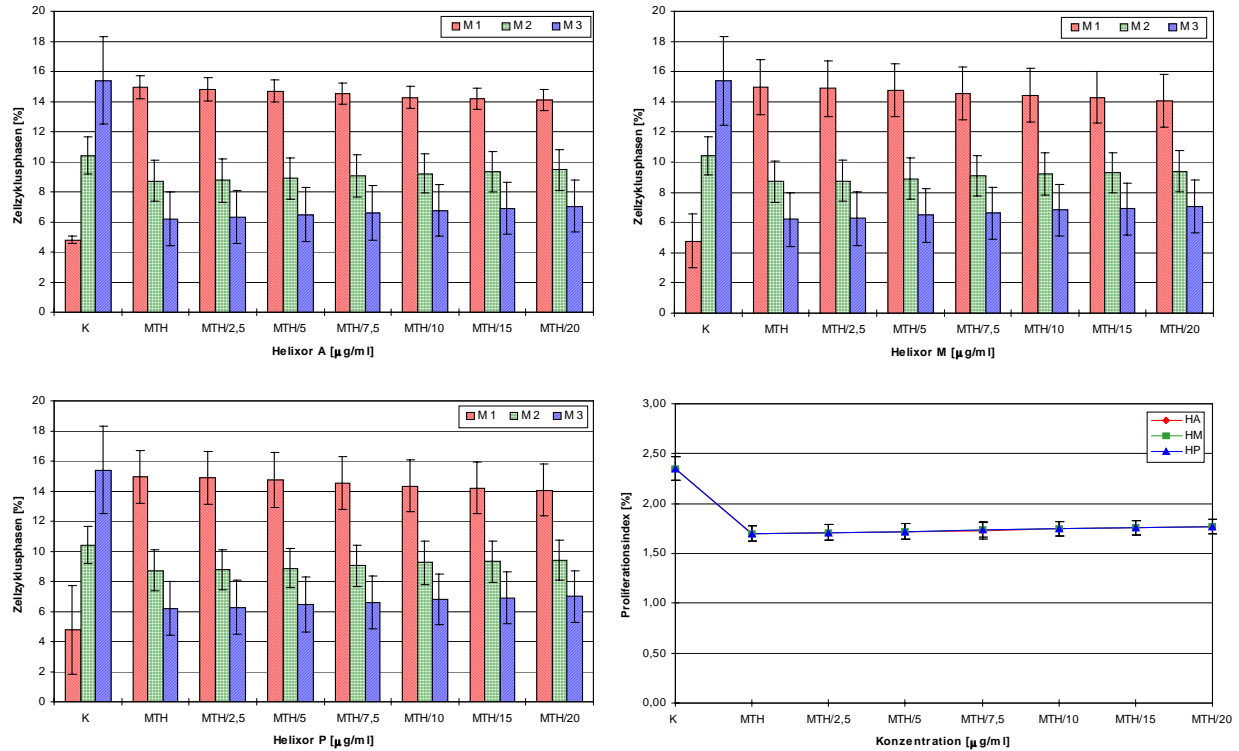


Abb. 65: Zellzyklusverteilung und Proliferationsindex humaner Lymphozyten nach 71 h Inkubation mit Helixor A, M, P und Methotrexat.

3.5.4 Helixor-Präparate und 5-Fluorouracil

3.5.4.1 SCE-Rate

Nach der Kombinationsbehandlung der Lymphozyten mit den Mistelextrakten und dem Zytostatikum 5-Fluorouracil zeigten Helixor A und M signifikante Abnahmen der SCE-Rate bei 7,5 $\mu\text{g/ml}$, die ab 10 $\mu\text{g/ml}$ hoch signifikant waren. Für das Präparat Helixor P ergab sich eine schwach signifikante Verringerung bei 5 $\mu\text{g/ml}$, die bei 7,5 $\mu\text{g/ml}$ signifikant und ab 10 $\mu\text{g/ml}$ hoch signifikant war. Es konnten keine signifikanten geschlechtsspezifischen oder wirtsbaumspezifischen Unterschiede nachgewiesen werden.

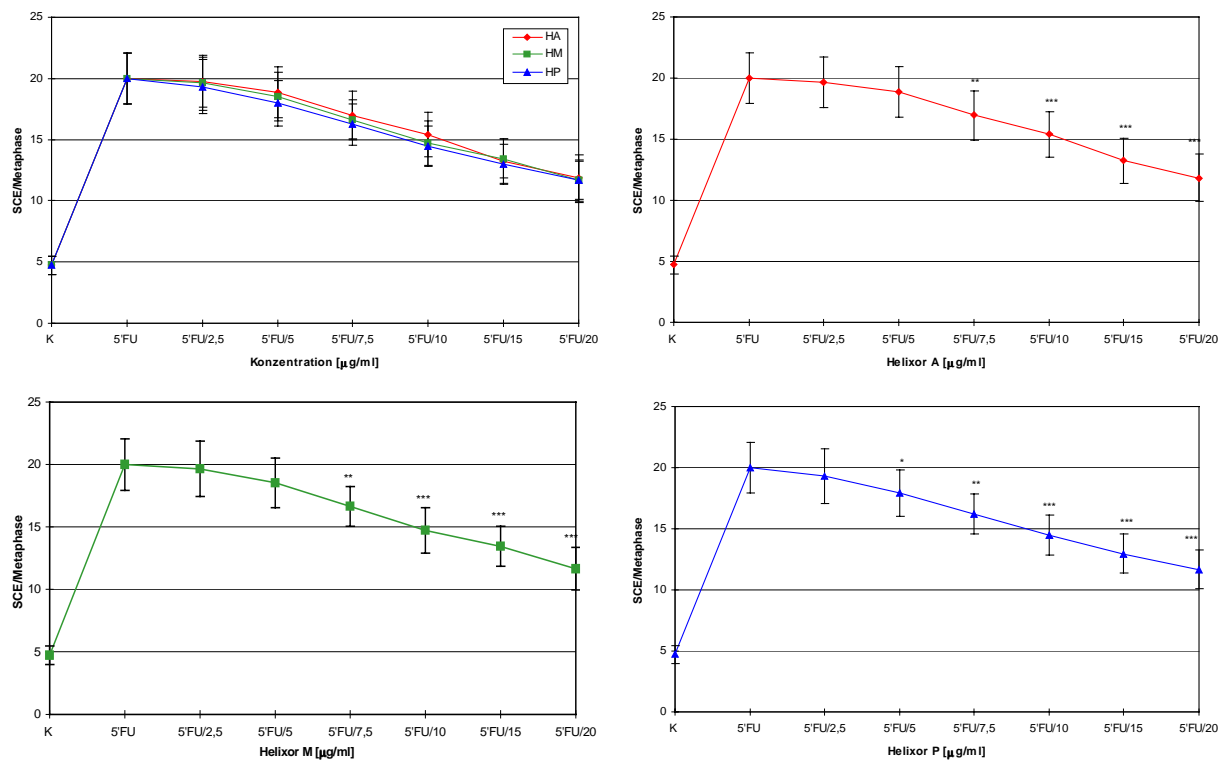


Abb. 66: SCE-Rate humaner Lymphozyten nach 71 h Inkubation mit Helixor A, M, P und 5-Fluorouracil. * = schwach signifikante, ** = signifikante, *** = hoch signifikante Differenz zur Positivkontrolle.

3.5.4.2 Zellzyklusverteilung und Proliferationsindex

Die Analyse der Zellzyklusdaten und der Proliferationsindizes wies keine signifikanten Veränderungen auf.

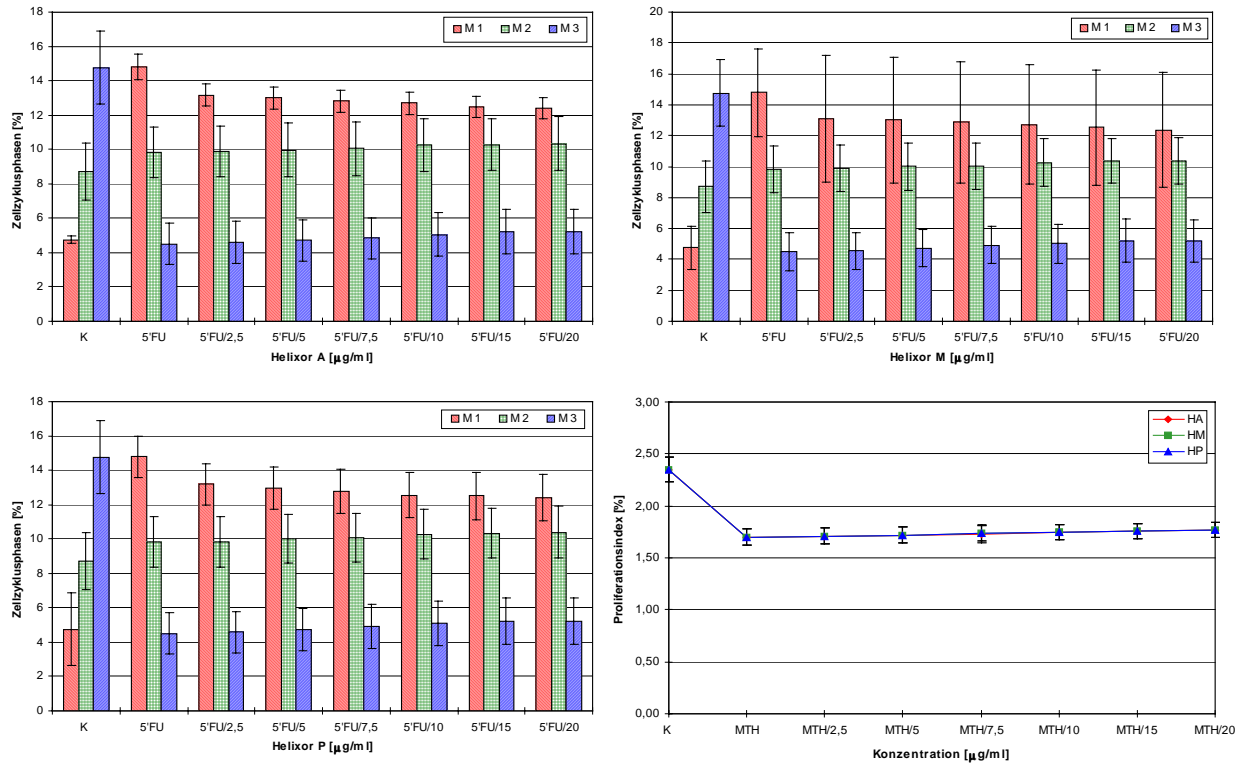


Abb. 67: Zellzyklusverteilung und Proliferationsindex humaner Lymphozyten nach 71 h Inkubation mit Helixor A, M, P und 5-Fluorouracil.

3.6 Mitose-Index und Mikronukleus-Frequenz humaner Lymphozyten nach Kombinationsbehandlung mit Helixor-Präparaten und Zytostatika

3.6.1 Helixor-Präparate

3.6.1.1 Mitose-Index

Im eingesetzten Konzentrationsbereich ergaben sich keine signifikanten Veränderungen des Mitose-Indexes gegenüber der Positivkontrolle.

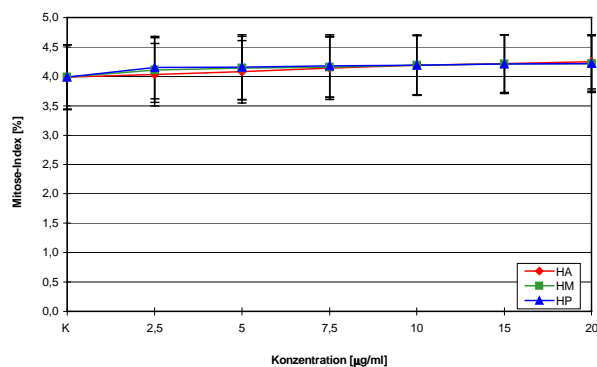


Abb. 68: Mitose-Index humaner Lymphozyten nach 71 h Inkubation mit Helixor A, M und P.

3.6.1.2 Mikronukleus-Rate

Die Auswertung des Mikronukleus-Testes zeigte für die drei Mistelextrakte eine schwach signifikante Abnahme der Mikrokern-Rate ab einer Konzentration von 10 µg/ml. Es konnten keine signifikanten geschlechtsspezifischen oder wirtsbaumspezifischen Unterschiede festgestellt werden.

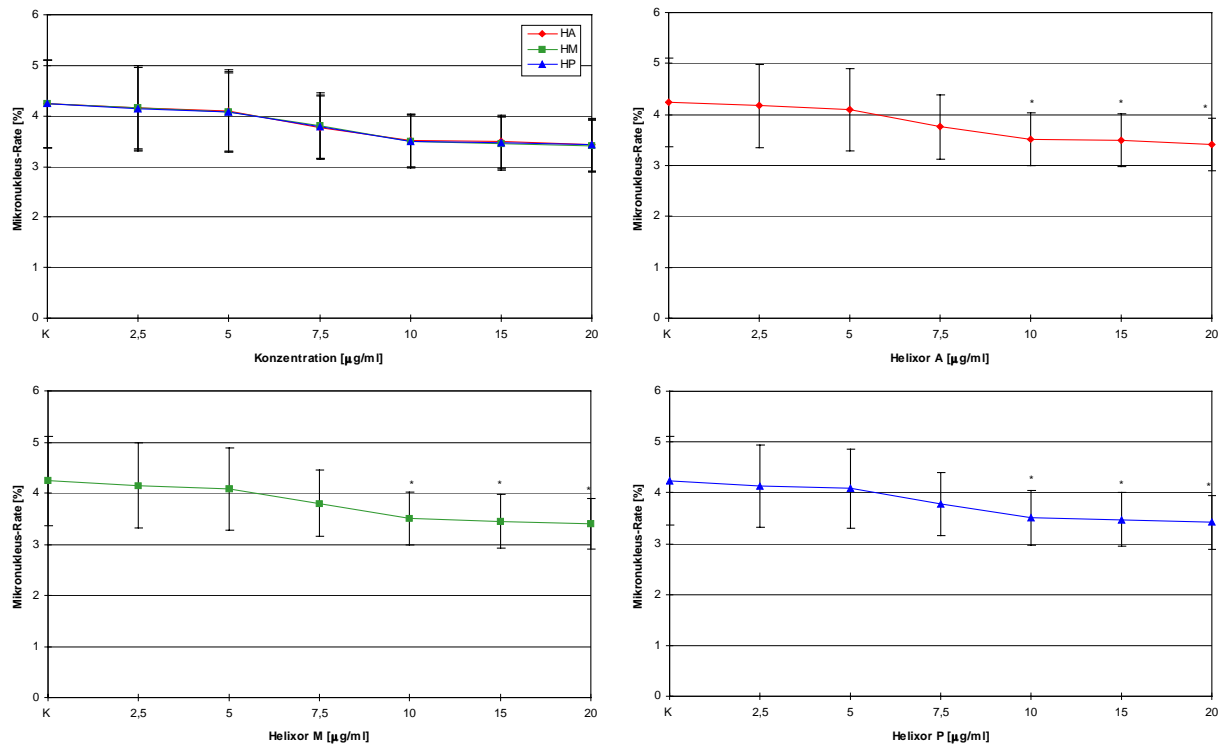


Abb. 69: Mikronukleus-Rate humaner Lymphozyten nach 71 h Inkubation mit Helixor A, M und P. * = schwach signifikante Differenz zur Kontrolle.

3.6.2 Helixor-Präparate und Cyclophosphamid

3.6.2.1 Mitose-Index

Die Berechnung des Mitose-Indexes zeigte leichte Erhöhungen unter Einwirkung der drei Mistelextrakte, die aber als nicht signifikant eingestuft werden konnten.

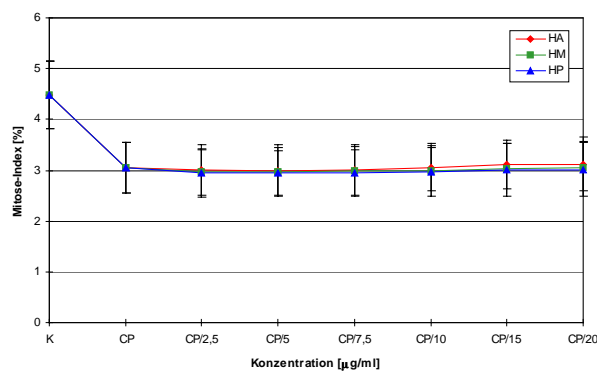


Abb. 70: Mitose-Index humaner Lymphozyten nach 71 h Inkubation mit Helixor A, M, P und Cyclophosphamid.

3.6.2.2 Mikronukleus-Rate

Die Auswertung des Mikronukleus-Testes ergab für die drei Frischpflanzenextrakte eine signifikante Verringerung der Mikrokern-Rate bei einer Konzentration von 7,5 $\mu\text{g/ml}$, die ab 10 $\mu\text{g/ml}$ hoch signifikant war. Es konnten keine signifikanten geschlechtsspezifischen oder wirtsbaumspezifischen Unterschiede nachgewiesen werden.

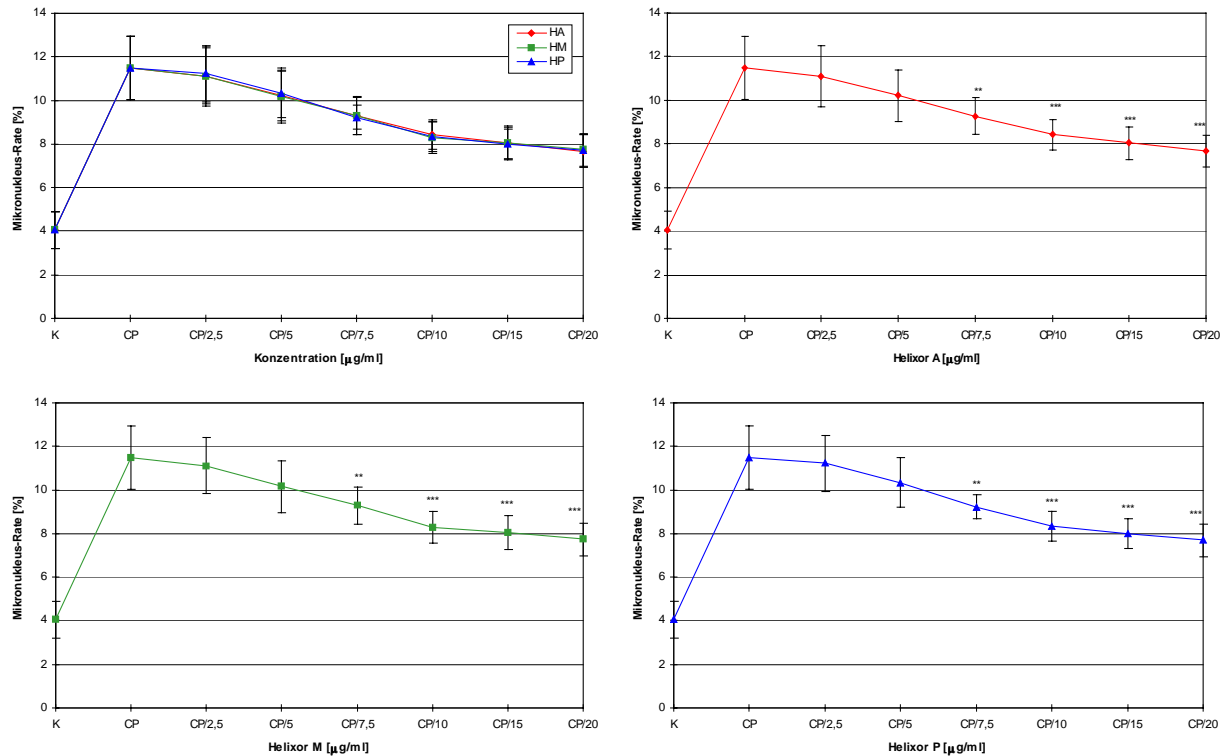


Abb. 71: Mikronukleus-Rate humaner Lymphozyten nach 71 h Inkubation mit Helixor A, M, P und Cyclophosphamid. ** = signifikante, * = hoch signifikante Differenz zur Positivkontrolle.**

3.6.3 Helixor-Präparate und Methotrexat

3.6.3.1 Mitose-Index

Die Kombinationsbehandlung der Lymphozyten mit Helixor-Präparaten und Methotrexat hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Mitose-Index.

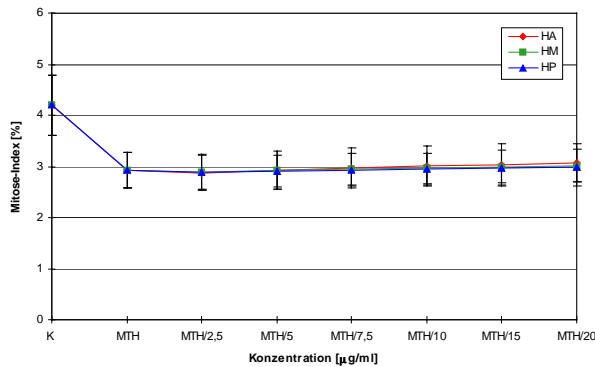


Abb. 72: Mitose-Index humaner Lymphozyten nach 71 h Inkubation mit Helixor A, M, P und Methotrexat.

3.6.3.2 Mikronukleus-Rate

Die Auswertung des Mikrokern-Testes ergab für die drei Mistelextrakte eine signifikante Abnahme der Mikronukleus-Rate ab einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Es konnten keine signifikanten geschlechtsspezifischen oder wirtsbaumspezifischen Unterschiede festgestellt werden.

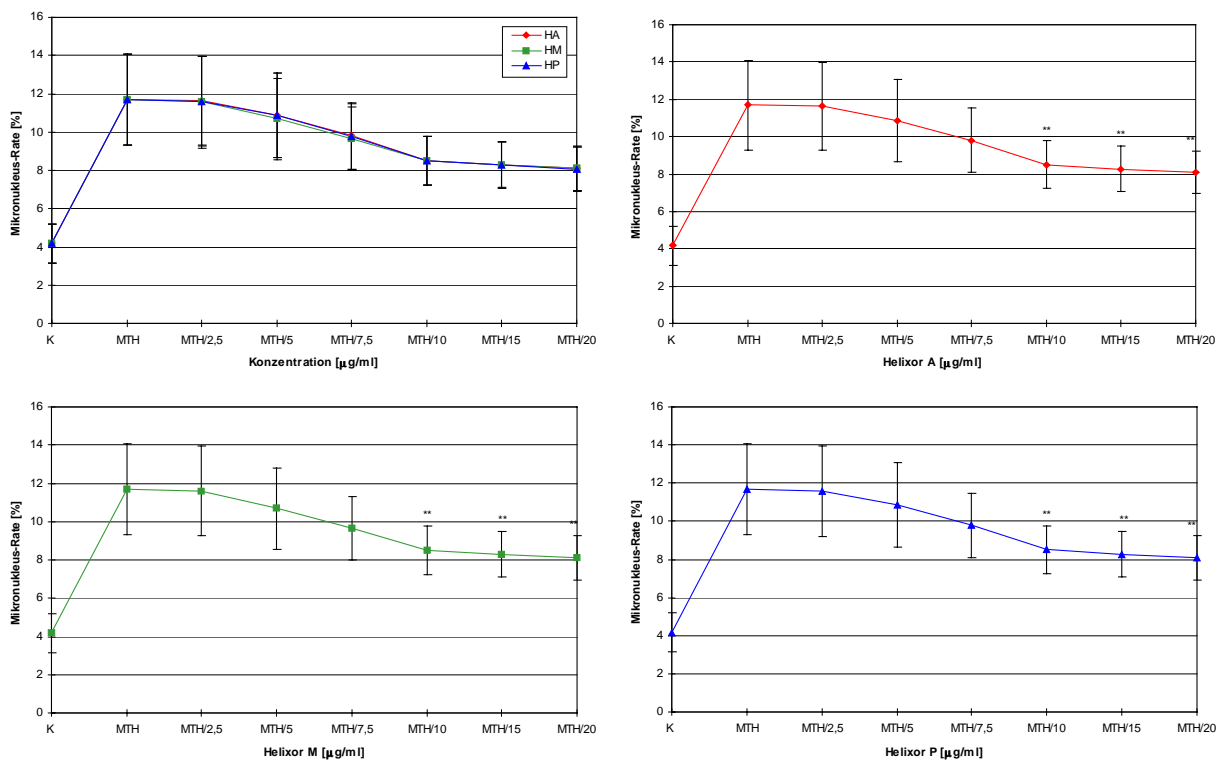


Abb. 73: Mikronukleus-Rate humaner Lymphozyten nach 71 h Inkubation mit Helixor A, M, P und Methotrexat. ** = signifikante Differenz zur Positivkontrolle.

3.6.4 Helixor-Präparate und 5-Fluorouracil

3.6.4.1 Mitose-Index

Nach der Bestimmung des Mitose-Indexes konnten für keinen der getesteten Mistelextrakte signifikante Veränderungen nachgewiesen werden.

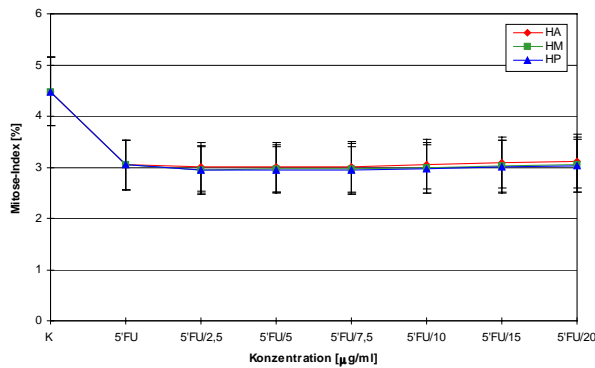


Abb. 74: Mitose-Index humaner Lymphozyten nach 71 h Inkubation mit Helixor A, M, P und 5-Fluorouracil.

3.6.4.2 Mikronukleus-Rate

Die Auswertung ergab für Helixor A, M und P eine hoch signifikante Verringerung der Mikronukleus-Rate ab einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$. Es traten keine signifikanten geschlechts-spezifischen oder wirtsbaumspezifischen Unterschiede auf.

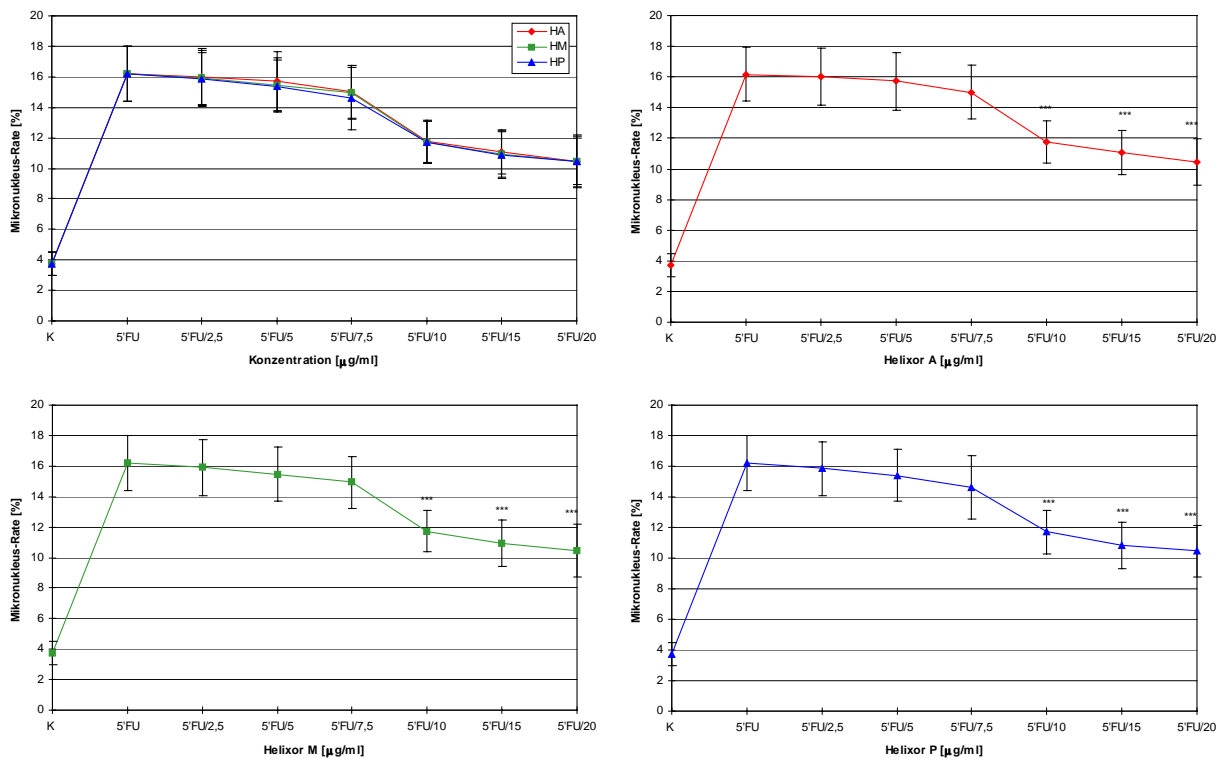


Abb. 75: Mikronukleus-Rate humaner Lymphozyten nach 71 h Inkubation mit Helixor A, M, P und 5-Fluorouracil. *** = hoch signifikante Differenz zur Positivkontrolle.

4 Diskussion

4.1 Methodik

Bei der Planung des Versuchskonzeptes dieser Arbeit sollten die Helixor-Extrakte ursprünglich an unbehandelten Patienten mit malignen Lymphomen in einer in vivo Studie getestet werden. Hierbei sollten die isolierten Blutlymphozyten von Patienten, die mindestens ein Jahr ohne Misteltherapie waren, vor und nach einer einwöchigen Mistelmonotherapie mit Helixor P durchflusszytometrisch und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet werden. Außerdem sollte eine Immunstatus-Bestimmung (CD₂/CD₁₉; CD₅/CD₁₉; CD₈/CD₅₆; CD₄/CD₈) im Institut für Immunologie und Genetik am Westpfalz Klinikum durchgeführt werden. Dieses Projekt scheiterte jedoch an der mangelhaften Patientenzahl mit dem gewünschten Krankheitsbild und des festgelegten behandlungsfreien Zeitraumes. Außerdem konnte bei Aufnahme der Patienten die persistierende Toxizität einer vorangegangenen Chemotherapie meist nicht ausgeschlossen werden.

Versuchsweise wurde die apoptoseinduzierende Potenz der Mistelextrakte Helixor A, M und P auch an Ficoll-isolierten Blutlymphozyten von B-CLL-Patienten in vitro getestet, eine Weiterführung dieser Experimente war jedoch aus verschiedenen Gründen nicht möglich: Erstens stand nicht ausreichend Analysematerial von unbehandelten B-CLL-Patienten mit Erstdiagnose zur Verfügung und die individuellen Schwankungen waren zu hoch. Des Weiteren waren schon in den Kontrollansätzen aufgrund des Zellzerfalls die Werte für die Spontanapoptose so hoch (20 bis 30 %), dass daraus keine aussagekräftigen Ergebnisse gewonnen werden konnten. Auch die Arbeitsgruppe Collins (1989) stellte dies an in vitro kultivierten B-Zellen von Patienten mit chronisch-lymphatischer Leukämie fest und Kumar et al. (1987) verzeichneten ähnliche Ergebnisse bei kultivierten Zellen einer akuten lymphoblastischen Leukämie.

4.1.1 Wahl der Zellkultursysteme

Zur Untersuchung des wachstumshemmenden und apoptoseinduzierenden Potentials mussten neben der Wahl der Methode auch geeignete Zellsysteme ausgesucht werden. Viele in der Literatur beschriebene Untersuchungen mit Mistelextrakten und -lektinen wurden an humanen Lymphozyten (Möckel et al., 1997; Büssing et al., 1994; Büssing et al., 1997b; Büssing et al., 1998b; Stein et al., 1994; Stein und Berg, 1997a; Stein und Berg, 1998b; Stein und Berg, 1999) und der humanen Leukämiezelllinie MOLT-4 (Janssen et al., 1993; Doser et al., 1989; Möckel et al., 1997; Ribéreau-Gayon et al., 1986a und b; Ribéreau-Gayon et al., 1995; Urech et al., 1995) durchgeführt. Aber auch die Ratten-Hepatomezellen HTC (Ribéreau-Gayon et al., 1986b), die Leukämiezelllinien U937 (Janssen, et al., 1993) und L1210

(Jonas und Walzel, 1992; Paprocka et al., 1992), die Melanomzelllinie B16F10 (Zarkovic et al., 1997), Brustkrebszellen (Schumacher et al., 1995), Monozyten (Ribéreau-Gayon et al., 1996), humane Fibroblasten (Bantel und Breuninger, 1990) und Amnionzellen (Büssing et al., 1995e) kamen zum Einsatz.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes und die Leukämiezelllinie MOLT-4 aufgrund ihrer hohen Sensitivität für Mistellektine (Möckel et al., 1997; Urech et al., 1995) als Zellsysteme ausgewählt. Ein weiterer Vorteil der Leukämiezellen und der Lymphozyten ist in der Kultivierung als Suspension zu sehen, denn dies ermöglicht die schnelle Verfügbarkeit großer Zellmengen und ein einfaches Ansetzen, Abernten und Passagieren während der Versuchsdurchführung. Bei Monolayerkulturen kann es dagegen zu einem selektiven Verlust apoptotischer Zellen (Darzinkiewicz et al., 1998) und zur zusätzlichen Schädigung der Zellen während der Trypsinierung und Aberntung kommen. Außerdem ist bei dieser Kultivierungsmethode die Bestimmung der Zellzahl bei Versuchsansatz und -abernntung aufgrund des Anhaftens der Zellen deutlich schwieriger und ungenauer gegenüber Suspensionskulturen. Nachteile der Suspensionskultur sind beispielsweise Veränderungen der Zelllinie bei langer Kultivierungsdauer sowie häufigem Einfrieren und Auftauen der Zellen. Auch eine zu hohe oder zu geringe Zelldichte kann zu veränderter Sensitivität der Zellen gegenüber Apoptoseinduktoren führen. Schließlich kann auch die Verwendung von Zellen, die über mehrere Passagen kultiviert wurden, zu genetischen Instabilitäten in Zellkulturen führen. Aus diesem Grund wurde die Zelllinie MOLT-4 nur in der 3. bis 10. Passage nach dem Auftauen für die Apoptoseinduktion eingesetzt.

4.1.2 Wahl des Kulturmediums und der Kultivierungsbedingungen

Zu Beginn dieser Untersuchungen wurde in Vorversuchen der Einfluss des verwendeten Mediums und unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen getestet. Hierbei wurde die Wirkung des RPMI 1640-Fertigmediums und des RPMI 1640-Grund- und Nährmediums auf die Wachstums- und Apoptoserate von MOLT-4-Zellen nach 72 h Inkubation mit Helixor A, M und P verglichen. Die Ergebnisse (nicht dargestellt) ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Medien, deshalb wurde für die nachfolgenden Versuche die ausschließliche Verwendung des RPMI 1640-Fertigmediums festgelegt, da die Herstellung des Grundmediums u. a. durch zweistündiges Rühren der RPMI-Lösung, pH-Werteinstellung und Sterilfiltration relativ zeitaufwendig ist.

Die Kultivierung der Leukämiezellen wurde zunächst in 50 ml und 250 ml Kulturflaschen sowie in Petrischalen getestet, wobei sich die Verwendung von 250 ml Kulturflaschen für eine 72 h Kultivierung der MOLT-4-Zellen als am geeignetsten erwies, da darin die Gefahr der Kontamination geringer war als bei der Verwendung von Petrischalen und eine größere Ausbreitung der Zellen möglich war als in 50 ml Kulturflaschen.

Die Kultivierung der isolierten Lymphozyten gelang dagegen am besten in 24er Multiwells, während die Vollblutkulturen für den SCE- und Mikronukleus-Test routinemäßig in Mehrzweckkulturtöpfchen mit Lamellenstopfen angesetzt wurden.

4.1.3 Wahl der Methode für die Analyse des Zelltodes

Die optimale Methode zur Identifizierung verschiedener Formen des Zelltodes ist abhängig von dem ausgewählten Zellsystem, der Wirkungsweise des eingesetzten Agens, der Art des Zelltodes, der Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit und den labortechnischen Möglichkeiten (Art des Durchflusszytometers usw.).

Die durchflusszytometrische Identifizierung apoptotischer Zellen anhand von DNA-Gehaltsanalysen erwies sich jedoch schon in früheren Untersuchungen als geeignet für die Zelllinie MOLT-4 (Hahn, 1996) und auch die Arbeitsgruppe Büssing et al. (1996c) verwendete die durchflusszytometrische Messung als Methode der Wahl zur Analyse des programmierten Zelltodes bei diesen Leukämiezellen. Des Weiteren ist die durchflusszytometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes eine einfache, schnelle und kosteneffektive Methode und ermöglicht außerdem die Analyse der Zellzyklusdaten und zellzykluspezifischer Effekte bestimmter Substanzen an den DNA-Histogrammen.

Da jedoch der Begriff der Apoptose von Kerr et al. (1972) ursprünglich basierend auf der Analyse der Zellmorphologie definiert wurde und die charakteristischen Veränderungen während des programmierten Zelltodes gut erkennbar sind, sollte nach Darzynkiewicz et al. (1997) immer auch die mikroskopische Untersuchung zur Identifizierung apoptotischer und nekrotischer Zellen herangezogen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die in unserem Labor routinemäßig durchgeführte simultane Messung von DNA- und Protein-Gehalt anhand der durchflusszytometrischen 2-Parameter-Messung zur Identifizierung apoptotischer Zellen angewandt. Diese Methode ermöglicht im Gegensatz zur 1-Parameter-Messung eine Unterscheidung zwischen nekrotischen und apoptotischen Zellen: Apoptotische Zellen synthetisieren Enzyme, die für die Degradierung der DNA notwendig sind und weisen daher einen höheren Protein-Gehalt auf (Darzynkiewicz et al., 1997). Außerdem ist im frühen Stadium der Apoptose auch eine Abgrenzung zu Kernfragmenten und Zellbestandteilen möglich, da die Integrität der zytoplasmatischen Membran, die bei der Nekrose verloren geht, weitgehend intakt bleibt (Vermees und Haanen, 1994). Die ausgewerteten Daten der 2-Parameter-Dot Plots wurden dann mit den Ergebnissen der mikroskopischen Auswertung der einzelnen Apoptosestadien anhand von Zytospinpräparaten der fixierten Zellsuspensionen verglichen.

4.2 Wachstumshemmendes und apoptoseinduzierendes Potential von Helixor A, M und P in Abhängigkeit vom FKS-Gehalt des Kulturmediums getestet an der Zelllinie MOLT-4

4.2.1 Bestimmung der Wachstumsrate

Die Auswertung des Trypanblau-Ausschlusstestes zeigte, dass der Extrakt aus der Kiefernmistel Helixor P die stärkste wachstumshemmende Wirkung hatte, gefolgt von dem Präparat aus der Apfelbaummistel und die schwächste Wirkung hatte der Extrakt aus der Tannenmistel. Für die drei Frischpflanzenextrakte konnte eine dosisabhängige Wirkung nachgewiesen werden, d. h. mit zunehmender Helixor-Konzentration und abnehmender FKS-Konzentration nahm jeweils die wachstumshemmende Wirkung zu. Beim Vergleich der beiden Versuche mit dem höchsten und dem niedrigsten FKS-Gehalt von 15 bzw. 2,5 % war für alle drei Mistelextrakte bei der höchsten Konzentration von 150 µg/ml eine Abnahme der Wachstumsrate um mehr als 50 % zu verzeichnen.

Untersuchungen von Ulrich und Mechelke (1980) an Monolayerkulturen zeigten, dass Helixor P das Wachstum von humanen HeLa-Zellen und L929-Zellen stärker hemmt als das Wachstum normaler humaner Fibroblasten. Nach diesen ersten Resultaten analysierten Hülßen und Mechelke (1982) den Einfluss des Frischpflanzenextraktes Helixor M auf Suspensionskulturen humaner Leukämiezellen und Myelomzellen. Sie wiesen ebenfalls mithilfe des Trypanblau-Ausschlusstestes eine dosisabhängige Wachstumshemmung und eine Verminderung des Anteils lebender Zellen nach 72 h Behandlung im Konzentrationsbereich von 10–500 µg/ml nach.

Janssen et al. (1993) untersuchten den wachstumshemmenden Effekt von therapeutisch verwendeten Mistelextrakten (ABNOBA Viscum) sowie von Mistellektin auf Tumorzellen in der Gewebekultur. Sowohl das Kiefernmistelpräparat und der Extrakt aus der Apfelbaummistel als auch Mistellektin hemmten das Wachstum von allen getesteten Tumorlinien (B-Zell-Hybridome, P815, EI-4, Ke37, MOLT-4 und U937). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Wachstumshemmung auf die Induktion des programmierten Zelltodes in den untersuchten Tumorzellen zurückzuführen ist. 20 h nach Inkubation mit den Mistelpräparaten war in den Tumorzellen die für Apoptose charakteristische Fragmentierung der DNA in Bruchstücke von 200 Basenpaaren nachweisbar.

Diese Ergebnisse belegen, dass Mistelextrakte und Mistellektin einen aktiven suizidalen Zelltod auslösen. Neben den bereits dokumentierten immunstimulierenden Effekten von Mistelpräparaten stellt die Induktion von Apoptose einen zweiten potentiell wichtigen Mechanismus der Wirkungsweise von Mistelextrakten dar.

4.2.2 Durchflusszytometrische Analyse

Die charakteristische intensive Fragmentierung der DNA im Verlauf der Apoptose ist die Basis für die in dieser Arbeit eingesetzte durchflusszytometrische Messung zur Bestimmung des DNA-Gehaltes, wobei die niedermolekularen DNA-Fragmente vor der Färbung extrahiert bzw. entfernt wurden. Die Fixierung der Zellen in 70%igem Alkohol hielt die degradierte DNA nicht vollständig im apoptotischen Zellkern bzw. der apoptotischen Zelle fest. Durch die anschließende Detergenzbehandlung mit HR-A-Lösung und die Färbung mit DAPI/Sulforhodamin 101 blieben apoptotische Zellkerne mit einem reduzierten DNA-Gehalt zurück, die als sogenannter Sub-G1-Peak im hypodiploiden Bereich des 1-Parameter-Histogrammes nachgewiesen werden konnten (Nicoletti et al., 1991; Zhu und Anasetti, 1995). Des Weiteren konnten im ausgewerteten 1-Parameter-Histogramm die prozentualen Anteile der einzelnen Zellzyklusphasen und des Debris erfasst werden.

Die durchflusszytometrische 2-Parameter-Messung ermöglichte außerdem eine Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellkernen, da diese einen deutlich geringeren Protein-Gehalt aufweisen, der unterhalb des Protein-Gehaltes normaler G0/1-Zellen liegt und deshalb im Bereich der Abszisse zu finden ist. Der erhöhte Protein-Gehalt apoptotischer Zellen kann auf die Aktivierung von Transglutaminasen zurückgeführt werden, welche die zytoplasmatischen Proteine apoptotischer Zellkerne vernetzen (Arends und Wyllie, 1991).

Anhand der durchflusszytometrisch gewonnenen Ergebnisse konnte nachgewiesen werden, daß die wachstumshemmende Wirkung der Helixor-Präparate weitgehend auf die Induktion des programmierten Zelltodes zurückzuführen ist. Die Analyse des 2-Parameter-Dot Plots ergab das stärkste apoptoseinduzierende Potential für den Extrakt Helixor P, das schwächste für das Präparat Helixor A und der Extrakt Helixor M nahm eine Mittelstellung ein. Die Auswertung zeigte auch hier, dass die Wirkung der drei Präparate mit zunehmender Helixor-Konzentration und abnehmender FKS-Konzentration zunimmt.

4.2.3 Mikroskopische Analyse

Die ersten Beschreibungen des apoptotischen Zelltodes beruhen auf der Untersuchung der charakteristischen morphologischen Veränderungen der Zellen wie beispielsweise Größe, Form, Lappung, Chromatinkondensation, Kernfragmentierung, Zytoplasmasaum und Fluoreszenzintensität (Kerr et al., 1972). Trotz der zahlreichen Möglichkeiten zur Detektion des programmierten Zelltodes gilt die licht- oder elektronenmikroskopische Analyse der Apoptose immer noch als eine der sichersten Untersuchungsmethoden und sie sollte deshalb immer parallel mit anderen Methoden eingesetzt werden, insbesondere bei der quantitativen durchflusszytometrischen Bestimmung der Apoptoserate (Darzynkiewicz et al., 1997).

Für die vergleichende fluoreszenzmikroskopische Auswertung wurden die fixierten Zellen nach einer kurzen Detergenzbehandlung mittels Zytocentrifuge auf Objektträger aufgebracht

und anschließend mit der Färbelösung DAPI/Sulforhodamin 101 inkubiert. Hierbei verhinderte die Detergenzbehandlung eine Verklumpung der Zellen und die Zytozentrifugation ermöglichte eine flache Ausbreitung der Zellen, so dass charakteristische morphologische Veränderungen einfach zu erkennen waren. Mithilfe der simultanen DAPI/Sulforhodamin 101-Färbung konnten die apoptotischen Merkmale gut hervorgehoben werden und als direkter Vergleich zu den durchflusszytometrisch gewonnenen Ergebnissen herangezogen werden.

Die mikroskopische Auswertung liefert außerdem Informationen über die prozentualen Anteile der verschiedenen Apoptosestadien bei unterschiedlichen Zelltypen und verschiedenen Apoptoseinduktoren. Hierbei können stark kondensierte Kerne, die einen deutlich größeren Zytoplasmasaum und einen aufgrund der Kondensierung stärker fluoreszierenden Kern aufweisen, identifiziert werden. Außerdem kann das Chromatin in Schollen in der Kernperipherie vorliegen und der Kern Halbmondform annehmen. Stark fragmentierte Kerne dagegen bestehen aus mindestens vier Fragmenten und zeigen ebenfalls eine deutlich stärkere Kondensierung als normale Zellen. Apoptotische Bodies sind schließlich durch die Abschnürung vom Hauptkern, die stärkere Chromatinkondensierung und den vergrößerten Zytoplasmasaum zu erkennen. Schwierigkeiten bei der Identifizierung dieser apoptotischer Körperchen können dann auftreten, wenn sie durch die Zentrifugation verstreut neben normalen Zellen vorliegen und eine Verwechslung mit Mikrokernen möglich ist.

Auch die fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der drei verschiedenen Apoptosestadien in der vorliegenden Arbeit unterstrich die dosisabhängige Wirkung der drei Mistelextrakte und bestätigte die durchflusszytometrisch gewonnenen Ergebnisse. Bei der Addition der Zellen mit stark kondensiertem Kern, stark fragmentiertem Kern und apoptotischer Bodies konnten die höchsten Werte für Helixor P, gefolgt von Helixor M und Helixor A, festgestellt werden. Der direkte Vergleich der vier Versuche mit unterschiedlichem FKS-Gehalt (15, 10, 5 und 2,5 %) zeigte, dass sich die apoptotische Zellpopulation hauptsächlich aus Zellen mit stark fragmentierten und stark kondensierten Kernen zusammensetzte, während der Prozentsatz apoptotischer Bodies eher gering war. Die prozentualen Anteile der drei untersuchten Apoptosestadien nahmen ebenfalls mit steigender Helixor-Konzentration und abfallender FKS-Konzentration dosisabhängig zu, wobei immer der Prozentsatz an stark fragmentierten Kernen überwog.

Diese Resultate bestätigen auch Ergebnisse aus der Literatur, dass die Zelllinie MOLT-4 nur wenige apoptotische Bodies bildet (Catchpole und Stewart, 1993). Auch Chapman et al. (1995) stellten fest, dass verschiedene Zelltypen eine unterschiedlich starke Neigung zur Formung apoptotischer Bodies zeigen. Bei diesen Untersuchungen bildete beispielsweise die Zelllinie HL-60 sehr schnell apoptotische Bodies, die Zelllinie MOLT-4 dagegen so gut wie gar keine.

4.2.4 Vergleich der durchflusszytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Auswertung

Der direkte Vergleich der durchflusszytometrisch und fluoreszenzmikroskopisch gewonnenen Ergebnisse zeigte bei einem FKS-Gehalt von 15 % und 10 % nur schwach signifikante bzw. signifikante Differenzen bei den höchsten Konzentrationen von Helixor M und Helixor P. Die weiteren Versuche mit 5 % und 2,5 % FKS wiesen jedoch schwach signifikante und signifikante Differenzen zwischen Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie im gesamten Konzentrationsbereich aller drei Frischpflanzenextrakte auf. Gründe für diese höheren Apoptoseraten bei der Durchflusszytometrie gegenüber der mikroskopischen Auswertung könnten darin bestehen, dass durchflusszytometrisch schon sehr frühe Apoptosestadien (starke Kondensierung) erfasst wurden, die morphologisch mittels fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung noch nicht als solche identifiziert werden konnten und deshalb zu niedrigeren Apoptoseraten führten. Des Weiteren könnte es auch zur Verwechslung von apoptotischen Bodies mit Mikrokernen gekommen sein und damit zu einem niedrigeren Prozentsatz apoptotischer Körperchen bei der mikroskopischen Auszählung. Im Allgemeinen waren sie jedoch aufgrund ihres Zytoplasmasaumes und der stärkeren Chromatinkondensierung gut von Mikrokernen zu unterscheiden.

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte durchflusszytometrische Methode zur Bestimmung der Apoptoserate basiert auf der simultanen DNA- und Protein-Messung apoptotischer Zellpopulationen. Partikel mit einem erniedrigten DNA-Gehalt werden als apoptotische Zellen bezeichnet (Nicoletti et al., 1991). Dies gilt für Zellen, die vor der Detergenzbehandlung einer Fixierung mit Alkohol oder Aceton unterzogen werden, denn eine Detergenz- oder Hypertoniebehandlung vor der Fixierung führt zur Lyse der Zellen. Da der Kern apoptotischer Zellen oft fragmentiert ist und mehrere Chromatinfragmente in einer Zelle vorhanden sein können, korrespondiert der Prozentsatz an Signalen mit erniedrigtem DNA-Gehalt (Sub-G1-Peak) dann nicht mit dem apoptotischen Index. Außerdem kann die Lyse von mitotischen Zellen oder Zellen mit Mikrokernen einzelne Chromosomen oder MN freisetzen, welche dann aufgrund ihres DNA-Gehaltes im Sub-G1-Bereich als apoptotische Zellen identifiziert werden (Darzynkiewicz et al., 1997).

4.2.5 Zellzyklusspezifität

Die 2-Parameter-Analyse des DNA- und Protein-Gehaltes ermöglicht die Identifizierung apoptotischer Zellen in Bezug auf die betroffenen Zellzyklusphasen. Die Bestimmung betroffener Zellzyklusphasen spielt eine wesentliche Rolle bei der Charakterisierung von Antitumormedikamenten. Viele Agentien unterschiedlicher Klassen wurden bereits bezüglich ihrer Zellzyklusspezifität und Fähigkeit zur Induktion von Apoptose untersucht. Beispielsweise in-

duzieren UV-Licht, Hyperthermie und 5-Azazytidin (2–6 μM) spezifisch Apoptose von G1-Phase Zellen; S-Phasenspezifität wurde nachgewiesen für Camptothecin, Teniposid, Amsacrin, Mitoxantron, Cytarabin, Hydroxyurea und 5-Azazytidin ($> 10 \mu\text{M}$) und G2/M-Phasenspezifität für γ -Strahlung, TNF und H7 (Serin/Threonin-Kinase Inhibitor). Keine Phasenspezifität zeigen dagegen die Substanzen Fostriecin, Cisplatin, Cycloheximid und Genistein (Halicka et al., 1997).

Bei den Untersuchungen zur Konzentrationskinetik an der Zelllinie MOLT-4 wiesen die Helixor-Extrakte A, M und P keine Phasenspezifität bezüglich ihrer Apoptoseinduktion auf. Alle Zellzyklusphasen waren von der Induktion des programmierten Zelltodes betroffen. Auch die Herabsetzung des FKS-Gehaltes in verschiedenen Stufen bewirkte keine Veränderung dieser apoptotischen Potenz, die apoptotischen Zellen traten sowohl aus der G0/1- als auch aus der Synthese- und G2/M-Phase aus.

Verschiedene Kontrollelemente stellen den geordneten Ablauf der vielfältigen Prozesse im Verlauf des Zellzyklus sicher. Am Ende jeder einzelnen Phase befinden sich Kontrollpunkte, an denen die Zelle prüft, ob die zurückliegende Phase vollständig und fehlerlos abgeschlossen wurde. Erst nach Überwindung dieser Checkpoints kann der Eintritt in die nächste Zellzyklusphase stattfinden. Fehlerhaftes Funktionieren dieser Kontrollmechanismen kann nicht nur zur Schädigung der Einzelzelle, sondern auch des Gesamtorganismus führen (Darzynkiewicz, 1995).

Die Analyse der Zellkinetik ergab bei einem FKS-Gehalt von 15 % keine signifikanten Veränderungen der Zellzyklusverteilung. Die Reduzierung des FKS-Gehaltes auf 10 % führte bei den Präparaten Helixor M und P zu einer schwach signifikanten Abnahme der G1-Phase-Zellen und einer schwach signifikanten Zunahme der S-Phase-Zellen. Die weitere Herabsetzung des FKS-Gehaltes auf 5 % bewirkte bei allen getesteten Mistelextrakten eine schwach signifikante Abnahme der G0/1-Phase und eine schwach signifikante Akkumulation der Zellen in der Synthese-Phase. Bei einem FKS-Gehalt von 2,5 % kam es schließlich bei den Präparaten Helixor M und P zu einer schwach signifikanten Akkumulation der Zellen in der G0/1-Phase und bei allen drei Extrakten zu einer schwach signifikanten Abnahme der G2/M-Phase. Eine mögliche Erklärung könnte in der Funktion des Kontrollmechanismus in der G1-Phase liegen. Dieser Restriktionspunkt am Ende der G1-Phase verhindert, dass die Zelle unter ungünstigen Bedingungen in die S-Phase eintritt. Zellen akkumulieren beispielsweise auch in der G1-Phase, wenn zu wenig Nahrung zur Verfügung steht oder das Zellwachstum zu dicht ist (Darzynkiewicz, 1995). Es ist auch denkbar, dass nicht nur der Restriktionspunkt in der G1-Phase eine Rolle spielt, sondern weitere Kontrollmechanismen. Ein Restriktionspunkt in der frühen Synthese-Phase könnte die DNA-Replikation der Zelle verhindern und somit eine Akkumulation der MOLT-4-Zellen in der S-Phase erklären.

Setzt man den initialen DNA-Schaden der Zelle in Relation zur jeweiligen Zellzyklusposition,

können nach Halicka et al. (1997) drei verschiedene Apoptosetypen unterschieden werden: In der Homo-Phase-Apoptose durchlaufen die betroffenen Zellen noch in derselben Zellzyklusphase, in der sie vom jeweiligen Agens angegriffen werden, die einzelnen Apoptosestadien. In der Homo-Zyklus-Apoptose durchlaufen die Zellen Apoptose während des gleichen Zellzyklus, innerhalb dessen sie geschädigt wurden, d. h. vor oder während der ersten Mitose. Schließlich durchlaufen betroffene Zellen in der post-mitotischen Apoptose im nachfolgenden Zellzyklus Apoptose, meist an den G1- oder G2-Checkpoints dieser Zyklen. Die Identifizierung der jeweiligen Zellzyklusphase, in der die Zelle in Abhängigkeit vom eingesetzten Antitumoragens ihr Apoptosepotential aktiviert, ist aus verschiedenen Gründen von speziellem Interesse: Erstens sind Informationen über die Zellzyklusspezifität eines Medikamentes hilfreich beim Entwurf von Behandlungsprotokollen, welche unterschiedliche Agentien kombinieren. Denn Kombinationsbehandlungen mit Medikamenten, die auf unterschiedliche Zellzyklusphasen abzielen, erscheinen effektiver als Kombinationen, die die gleiche Zellzyklusphase angreifen. Außerdem sind beim Entwurf von neuen Antitumorstrategien, die die regelmäßige Behandlung mit verschiedenen Medikamenten, eine Zellsynchronisation oder -rekrutierung in den Zellzyklus beinhalten, Informationen über die Zellzyklusspezifität der beteiligten Agentien essentiell. Schließlich sind für das Verständnis der Wirkungsweise von Antitumormedikamenten Informationen über ihre Zellzyklusspezifität, sowohl in Bezug auf ihre zytostatischen Effekte als auch ihre Fähigkeit zur Induktion des programmierten Zelltodes, erforderlich.

4.2.6 Einfluss des FKS-Gehaltes im Kulturmedium

Im ersten Versuchsabschnitt dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss der Zusatz unterschiedlicher FKS-Konzentrationen im Medium auf die apoptoseinduzierende und wachstumshemmende Potenz der drei Helixor-Extrakte hat.

Die erhaltenen Resultate zeigten, dass die Zugabe von FKS zu einem serumfreien Kulturmedium eine deutliche dosisabhängige Hemmung der zytotoxischen Aktivität der Mistelextrakte Helixor A, M und P bei MOLT-4-Zellen bewirkte. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass das Serum Zuckerderivate enthält, welche sich an die in den Mistelpräparaten in unterschiedlichen Mengen vorhandenen Lektine binden. Die aktiven Bestandteile des FKS in diesem System scheinen Glykoproteine oder Glykolipide zu sein, welche sich entweder an die Lektine binden und somit ihre zytotoxische Aktivität hemmen oder aber mit den Lektinen über deren Oberflächenrezeptoren interagieren.

Diese Ergebnisse stimmen überein mit früheren Studien von Ribéreau-Gayon et al. (1995), bei denen ML-I, ML-II und ML-III eine 40fach niedrigere Zytotoxizität gegenüber MOLT-4-Zellen zeigten, die in RPMI 1640-Medium, versetzt mit 10 % FKS, kultiviert wurden, verglichen mit ihrer zytotoxischen Aktivität gegenüber der gleichen Zelllinie, die in serumfreien

Ultraculture-Medium gezüchtet wurde. Bei diesen Versuchen mit serumfreiem Ultraculture-Medium zeigte ML-III die stärkste zytotoxische Aktivität, während ML-I und ML-II etwa sieben bis zehnfach weniger toxisch wirkten. Die Zugabe von 10 % FKS setzte die Toxizität von ML-I um das 50fache und von ML-II und ML-III um das 30fache herab, d. h. die Zugabe größerer Mengen FKS erzeugte einen dosisabhängigen Schutz gegenüber der Zytotoxizität der drei eingesetzten Mistellektine.

4.2.7 Einfluss des Lektin gehaltes

In Europa findet man die weißbeerige Mistel (*Viscum album* L.) auf 74 verschiedenen Wirtsbäumen (Luther und Becker, 1987). Unterschiede zwischen Misteln verschiedener Wirtsbäume sind hinreichend beschrieben, so beispielsweise von Goedings (1993 und 1994) hinsichtlich Morphologie und Mineralstoffgehalt, von Luther und Becker (1987) und Lorch (1993) für den Flavonoidgehalt, von Schaller et al. (1996) für die Menge an Viscotoxinen sowie von Ziska und Franz (1985) und von Schink und Mechelke (1992) für die Lektine.

Die Unterschiede in den Lektinanteilen der verschiedenen Mistel extrakte hängen ab von der Herkunft (Wirtsbaum), von der Blattdicke der Mistel (dünnblättrige Misteltypen haben einen höheren Lektin gehalt als dickblättrige Misteltypen) und auch in großem Maße von dem Zeitpunkt der Ernte, d. h. die Misteln, die im Winter geerntet werden, haben einen höheren Lektin gehalt als Misteln aus der „Sommerernte“ (Luther und Becker, 1987; Kast und Hauser, 1990a; Scheer et al., 1992). Anhand von Übersichtschromatographien lassen sich nicht nur die drei Mistelrassen (Laubholz-, Kiefern- und Tannenmistel) unterscheiden, sondern auch Laubholzmisteln untereinander (Scheer et al., 1995). Luther und Becker (1987) erhielten die höchsten Lektinausbeuten bei Winterernten von Misteln der Wirtsbäume Robinie, Roteiche und Birke, den geringsten Anteil bei Sommerernten und Misteln der Wirtsbäume Ahorn, Pappel, Kiefer und Weißtanne. Ziska und Franz (1985) berichteten über ähnliche Ergebnisse hinsichtlich des Erntezeitpunktes, aber leicht differierend bezüglich der Wirtspflanze, denn sie erhielten die höchsten Lektinausbeuten bei den Wirtsbäumen Roteiche, Pappel und Linde.

Eine quantitative Analyse der Lektinmuster von Scheer et al. (1995) zeigte, dass in den Laubholzmistel-Präparaten Mistellektin I dominiert, während das Kiefernmistel-Präparat ausschließlich ML-II/III enthält. Präparate aus Tannenmisteln enthalten beide Lektin gruppen in etwa gleicher Höhe.

Neben Wirtsbaum und Erntezeitpunkt ist auch das Herstellungsverfahren qualitätsbestimmend für das Produkt, sind doch synergistische Effekte zwischen herstellungsbedingten Komponenten (Vesikeln) und Inhaltsstoffen der Pflanze (Lektine) beschrieben (Scheffler et al., 1995). Von Scheer (1994) konnte aufgezeigt werden, dass zwar aufgrund der Prozess-Standardisierung Präparate einheitlichen Lektin gehaltes zu realisieren sind, dass aber je

nach Wirtsbaum unterschiedliche Produkte mit unterschiedlichem Lektiningehalt und -muster resultieren. So enthalten Präparate aus Eichenmisteln bei gleichem Herstellungsverfahren mehr als 50mal soviel Lektin als solche aus Kiefernmisteln.

Schließlich ist die Stabilität der Wirkstoffe sehr verschieden, wobei auch Verarbeitung und Lagerung zu Veränderungen in der Zusammensetzung führen können (Ribéreau-Gayon et al., 1997; Kast und Hauser, 1990a und b).

Beim Vergleich der drei getesteten Frischpflanzenextrakte in dieser Arbeit zeigte das Präparat aus der Kiefernmistel Helixor Pini die stärkste wachstumshemmende und apoptoseinduzierende Wirkung auf die Leukämiezelllinie MOLT-4, gefolgt von dem Präparat aus der Apfelbaummistel Helixor Mali und schließlich Helixor Abietis, dem Extrakt aus der Tannenmistel, welcher die schwächste apoptoseinduzierende Potenz aufwies. Diese Ergebnisse korrelierten mit dem unterschiedlichen Lektiningehalt der drei Frischpflanzenextrakte, die vom Hersteller folgendermaßen angegeben wurden: Die verwendete Charge des Präparates Helixor A (Ch.-B.: 970368) hatte einen Lektiningehalt von 319 ng/ml, der Extrakt Helixor M (Ch.-B.: 970433) einen Lektiningehalt von 359 ng/ml, während der Lektiningehalt des Präparates Helixor P (Ch.-B.: 970984) 977 ng/ml betrug. Dieser um das 2,7- bzw. 3fach höhere Lektiningehalt des Extraktes Helixor Pini gegenüber den Präparaten Helixor Mali bzw. Abietis kann die deutlich stärkere wachstumshemmende und apoptoseinduzierende Wirkung der Kiefernmistel erklären. Auch die Tatsache, dass Kiefernmisteln ausschließlich ML-II/ML-III enthalten, während in Laubholzmisteln Lektin I überwiegt und in Tannenmisteln beide Lektingruppen in gleicher Menge vorkommen (Scheer et al., 1995), kann die Ursache für die erheblich höhere Apoptoserate beim Kiefernextrakt sein. Demgegenüber zeigte der Frischpflanzenextrakt Helixor Mali jedoch eine deutlich stärkere apoptoseinduzierende Potenz als das Präparat Helixor Abietis, aber der Lektiningehalt der Apfelbaummistel ist nur um 40 ng/ml höher als der der Tannenmistel. Außerdem konnte für den Extrakt Helixor Abietis auch bei nur leicht erhöhten Apoptoseraten (FKS-Gehalt von 10 und 15 %) trotzdem eine deutliche Wachstumshemmung der Leukämiezellen nachgewiesen werden. Dies zeigt auf, dass der Lektiningehalt zwar einen entscheidenden Einfluss auf die wachstumshemmende und apoptoseinduzierende Wirkung der verschiedenen Mistelpräparate hat, aber auch andere Inhaltsstoffe beeinflussen die Zytotoxizität der Pflanzenextrakte stark.

Büssing et al. (1996c) untersuchten ebenfalls die apoptoseinduzierende Potenz von Helixor-Extrakten verschiedener Wirtspflanzen mit unterschiedlichem Lektiningehalt an Lymphozytenkulturen gesunder männlicher und weiblicher Probanden. Auch hier hatten der Pini- und der Mali-Extrakt bei einer Endkonzentration von 100 µg/ml im Vergleich zum Abietis-Extrakt eine deutlich stärkere apoptoseinduzierende Potenz. Diese korrelierten jedoch nicht mit dem ML-Gehalt, da das Helixor A mit 5.400 ng/ml einen ähnlichen Gesamt-ML-Gehalt wie das Helixor M (5.200 ng/ml) aufwies, während für das Helixor P mit 8.500 ng/ml sogar eine wesentlich

höhere ML-Konzentration gefunden werden konnte. Diese Ergebnisse zeigen, dass es hinsichtlich der apoptoseinduzierenden Potenz ausgeprägte wirtsbaumspezifische Unterschiede gibt und dass diese in einem gewissen Umfang mit dem Lektingehalt der Gesamtextrakte zusammenhängen, aber der ML-Gehalt keine eindeutige Korrelation mit der apoptoseinduzierenden Kapazität zeigt. Somit scheinen andere Inhaltsstoffe aus den verschiedenen Mistelextrakten und/oder deren komplexe Interaktionen für die hier beschriebenen Unterschiede von Relevanz zu sein.

Diese Ergebnisse bestätigen auch die Untersuchungen von Scheffler et al. (1995) bezüglich einer Korrelation zwischen dem unterschiedlichen Lektingehalt verschiedener Wirtsbäume und der Kolonie-Wachstumshemmung von Tumorzellen. *Viscum album* L. *Mali*, *Quercus* und *Abietis* wurden an insgesamt 44 menschlichen Tumoren in einem Kolonieassay in vitro getestet. Dabei wurde die Anzahl an Tumorzellkolonien bestimmt, die nach Behandlung der Tumorzellen mit dem Prüfpräparat während sechs bis fünfzehn Tagen in einem Doppelschichtagar heranwuchsen. Diese Zahl wurde zur unbehandelten Kontrolle ins Verhältnis gesetzt. Die Ergebnisse machten deutlich, dass die Organbereiche unterschiedlich sensibel sind, dass aber individuelle Unterschiede diesen Effekt überlagern. Insgesamt waren Lungen-, Mamma- und Keimdrüsentumoren sowie Melanome sensibler als Magen-Darm-Tumoren. Überraschenderweise erwiesen sich Mistelpräparate von der Tanne, die gegenüber den *Mali*-Präparaten einen deutlich geringeren Lektingehalt hatten, ähnlich wirksam wie die *Mali*-Extrakte. Dieser Befund führte dazu, zu untersuchen, ob es eine Korrelation zwischen dem unterschiedlichen Lektingehalt der untersuchten Präparate verschiedener Wirtsbäume und der Kolonie-Wachstumshemmung der Tumorzellen gibt. Die Ergebnisse zeigten, dass der Lektingehalt schlecht mit der Wachstumshemmungsrate korrelierte. In einem weiteren Versuch wurden die Tumorexplanate von fünfzehn Patienten direkt mit *Viscum album* *Pini*, *Abietis* und *Quercus*, die den drei Lektinstufen der untersuchten Präparate entsprachen, parallel getestet. Dabei zeigte sich, dass jeweils in etwa gleich vielen Fällen die drei geprüften Präparate am stärksten wirksam waren. Falls die Hemmungswirkung vom Lektingehalt abhängig wäre, müsste stets das *Quercus*-Präparat das am schwächsten wirksame sein, dies war jedoch nicht der Fall. Somit wird deutlich, dass zwar der Lektingehalt der Arzneimittel einen Einfluss auf die Zytotoxizität an Zelllinien hat, dass aber die individuellen Unterschiede mit anderen Faktoren aus den Mistelpräparaten, die nicht mit den Lektinen korreliert sind, zusammenhängen müssen.

4.2.8 Einfluss des Herstellungsverfahrens

Mittlerweile sind in Deutschland sieben verschiedene Mistelextrakt-Präparate erhältlich, die hinsichtlich ihres Herstellungsverfahrens unterschieden werden können: *ABNOBA Viscum*, ein Präparat aus den Presssäften der Mistel; *Eurixor* und *Plenosol*, zwei wässrige Extrakte

aus Mistelkraut; *Iscucin-Viscum*, eine Zubereitung aus Mistel-Auszügen; *Isorel*, ein kaltwässriger Frischpflanzenextrakt; *Helixor*, ein wässriger Frischpflanzenextrakt und *Iscador*, ein wässriger Extrakt, der einer Milchsäuregärung durch *Lactobacillus plantarum* unterzogen wird (Luther und Becker, 1987).

Ribéreau-Gayon et al. (1986b) analysierten die Wirkung von fermentiertem und nichtfermentiertem *Iscador Quercus* auf HTC- und MOLT-4-Zellen bezüglich der wachstumshemmenden Wirkung und erhielten folgende Ergebnisse: Das Wachstum der HTC-Zellen wurde stärker gehemmt durch den fermentierten *Iscador*-Extrakt, das Wachstum der MOLT-4-Zellen dagegen stärker durch den unfermentierten Extrakt. Hierbei betrug der Lektin Gehalt im fermentierten Eichenextrakt 100 ng/ml und im unfermentierten Präparat 1.000 ng/ml. Außerdem erzeugte der unfermentierte Extrakt bei den HTC-Zellen in größerem Maße Zytolyse als der fermentierte Extrakt, während die MOLT-4-Zellen eine stärkere Resistenz gegen Zell-Lyse aufwiesen als die HTC-Zellen, jedoch auch sensitiver gegenüber dem unfermentierten *Iscador* waren. Die Untersuchung des [³H]-Thymidineinbaus ergab für die Rattenhepatomzellen eine stärkere Wirkung des fermentierten *Iscador* gegenüber dem unfermentierten Präparat, während bei den Leukämiezellen das Gegenteil beobachtet wurde. Beim Einsatz des gereinigten isolierten Lektins zeigte sich eine 100fach niedrigere Sensitivität der HTC-Zellen gegenüber den humanen Leukämiezellen, die schon bei einer Lektinkonzentration von 1 ng/ml eine deutliche Wachstumshemmung aufwiesen.

Für diese unterschiedlichen Wirkungen der einzelnen Mistelextrakte können verschiedene Faktoren verantwortlich gemacht werden: Der Mistelsaft zur *Iscador*-Herstellung wird durch Milchsäuregärung (pH-Verschiebungen) aufgearbeitet und zur Sterilisierung entweder erwärmt oder keimfiltriert. Insbesondere die Lenkung des Gärprozesses, die Gestaltung des Mischprozesses und die Methode der Keimfiltrierung beeinflussen die Zusammensetzung wichtiger Zwischensubstanzen bzw. der Endprodukte. Außerdem spielt die individuelle Zusammensetzung der Wirkstoffe eine wichtige Rolle, da diese vom jeweiligen Wirtsbaum abhängen und von Charge zu Charge variieren können. Schließlich müssen auch die Charakteristika der verwendeten Zelllinie und ihre Stoffwechselaktivität berücksichtigt werden, da beispielsweise der zytotoxische Effekt der Lektine von der Fähigkeit der Zellen zur Bindung dieser Moleküle abhängt.

In den Untersuchungen von Büssing et al. (1996c) hatten vesikelhaltige Presssäfte (ABNO-BA *Viscum*, vgl. 1.1.3.7) und die wässrigen *Viscum album* R-Extrakte die stärkste Killing-Potenz gegenüber isolierten Lymphozyten gesunder Probanden. Hinsichtlich der Apoptoseinduktion zeigten sich zwischen den fermentierten VAL-Extrakten (*Iscador*) und den nichtfermentierten *Helixor*-Extrakten keine wesentlichen qualitativen Unterschiede. Einer der auffälligsten Befunde war jedoch die deutlich höhere apoptoseinduzierende Potenz des nichtfermentierten *Quercus*-Extraktes im Vergleich zum fermentierten *Quercus*-Extrakt. Es ist je-

doch bekannt, dass mit dem Prozess der bakteriellen Fermentierung ein gradueller Verlust der wachstumshemmenden Wirkung einhergeht (Ribéreau-Gayon et al., 1986b). Dies ist zu erklären durch einen deutlich geringeren Lektin Gehalt fermentierter gegenüber nichtfermentierter Extrakte (Ribéreau-Gayon et al., 1986b; Büssing et al., 1996c). Jung et al. (1990) vermuteten, dass es durch den Prozess der Fermentierung zur Komplexbildung von Lektinen und Viscotoxinen, und damit zur Reduktion der zytotoxischen Aktivität, kommen könnte. Eine geringere zytotoxische Wirkung fermentierter Extrakte impliziert aber nicht fehlende Wirksamkeit. Urech et al. (1995) konnten zeigen, dass gerade die Yoshida-Sarkomzellen eine ausgesprochene Sensitivität gegenüber den Viscotoxinen aufweisen, während sie gegenüber den Mistellektinen weitgehend unempfindlich sind. Zudem belegen die Arbeiten von Stein und Berg (1994), dass lediglich der fermentierte, weitgehend lektinfreie VAL-Extrakt Iscador P die Proliferation kultivierter Lymphozyten gesunder Probanden stimuliert, während wässrige Auszüge aus Kiefern- und Apfelbaummisteln oder deren Presssäfte bei unbehandelten Probanden nicht so effektiv sind.

4.3 Wachstumshemmendes und apoptoseinduzierendes Potential von Helixor A, M und P getestet an humanen Lymphozyten

4.3.1 Bestimmung der Wachstumsrate

Die Auswertung des Trypanblautestes ergab sowohl bei Lymphozyten weiblicher als auch männlicher Probanden die stärkste Wachstumshemmung für den Extrakt aus der Kiefernmistel, gefolgt von dem Präparat aus der Apfelbaummistel und dem Extrakt aus der Tannenmistel. Geschlechtsspezifische Unterschiede zwischen Lymphozytenkulturen weiblicher und männlicher Spender konnten beim direkten Vergleich der Wachstumsraten unter Einwirkung des Mistelpräparates Helixor Mali festgestellt werden: Bei den Konzentrationsansätzen mit 100 und 200 µg/ml HM war die Wachstumsrate von Lymphozyten weiblicher Probanden signifikant niedriger gegenüber den Wachstumsraten der Lymphozyten männlicher Probanden. Für die Extrakte Helixor A und P konnten keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede nachgewiesen werden.

Auch die Arbeitsgruppe Büssing (1995d) wies nach, dass geschlechtsspezifische Unterschiede im Ansprechen auf *Viscum album* L.-Extrakte berücksichtigt werden müssen. Die Autoren konnten eine ausgeprägte Hemmung des [³H]-Thymidineinbaus in die DNA von Lymphozyten weiblicher Probanden nachweisen, während die Proliferationshemmung der Zellen männlicher Probanden weniger ausgeprägt war.

Diese Ergebnisse unterstreichen zumindest ansatzweise die geschlechtsspezifische Anwendung von Helixor M bei weiblichen Patienten in der Krebstherapie, wie sie auch vom Hersteller empfohlen wird (o. V., 1995). Es konnte jedoch keine geschlechtsspezifische Wirkung

von Helixor A bei Lymphozyten männlicher Testpersonen festgestellt werden, welche die von Herstellerseite empfohlene Verabreichung von Helixor A bei männlichen Patienten belegen würde. Aus der Literatur ist bisher keine wissenschaftliche Erklärung für diese geschlechtsspezifische Wirkung der Helixor-Mistelpräparate bekannt. In diesem Zusammenhang muß jedoch auch berücksichtigt werden, dass die Zellkinetik humaner Lymphozyten individuellen Schwankungen unterliegt, die durch exogene und genetische Faktoren bedingt sein können. Untersuchungen von Ganguly (1993) zur Proliferationskinetik humaner Lymphozytenkulturen zeigten, dass Lymphozyten weiblicher Probanden gegenüber männlichen Probanden eine höhere Proliferationsgrundrate aufweisen. Weitere beeinflussende Faktoren könnten das schwankende Mengenverhältnis zwischen B- und T-Lymphozyten, deren unterschiedliches Proliferationsverhalten und Sensitivitätsunterschiede zwischen den verschiedenen Lymphozytensubpopulationen (Stoffwechselaktivität, Permeabilität der Zellmembran, DNA-Reparaturkapazität) darstellen (Santesson et al., 1979).

4.3.2 Durchflusszytometrische Analyse

Die Auswertung der durchflusszytometrischen 2-Parameter-Messung ergab die stärkste apoptoseinduzierende Potenz für den Frischpflanzenextrakt Helixor P und die schwächste für Helixor A. Beim direkten Vergleich der Apoptosewerte von Lymphozyten weiblicher und männlicher Probanden konnten keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede festgestellt werden. Das heißt die mikroskopisch nachgewiesene stärkere Wachstumshemmung durch den Extrakt Helixor M bei Lymphozytenkulturen weiblicher Blutspender resultierte nicht in einer erhöhten Rate apoptotischer Zellen gegenüber den Werten männlichen Testpersonen. Somit kann aus der Abnahme der Wachstumsrate einer Zellpopulation nicht generell auf eine Erhöhung der Apoptoserate geschlossen werden.

Beim Vergleich dieser Ergebnisse der Lymphozytenkulturen mit denen der Zelllinie MOLT-4 kann festgestellt werden, dass bei den Lymphozyten männlicher und weiblicher Probanden höhere Konzentrationen der drei Mistelextrakte verwendet werden mussten, um ähnliche Apoptoseraten zu erzielen wie bei den Leukämiezellen. Dies lässt sich sicherlich damit begründen, dass es sich bei den Leukämiezellen um ein Zellsystem handelt, welches schon lange Zeit in Kultur ist, während die peripheren Lymphozyten erst wenige Stunden vor Kulturansatz dem lebenden Organismus entnommen wurden. Außerdem liegen in den Vollblutkulturen verschiedene Lymphozytensubpopulationen vor, deren Mengenverhältnis und Proliferationsverhalten sehr unterschiedlich sein kann (Evans et al., 1975). Aber auch andere Faktoren, wie beispielsweise der Differenzierungsgrad der Zelllinie sowie ihre Stoffwechselaktivität, die Sensitivität für die jeweiligen Mistelpräparate und die unterschiedliche Bindungskapazität proliferierender Zellen gegenüber Mistellektinen können das Apoptosepotential entscheidend beeinflussen.

4.3.3 Mikroskopische Analyse

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Apoptoserate bestätigte die durchflusszytometrisch gewonnenen Ergebnisse und ergab ebenfalls keine geschlechtsspezifischen Unterschiede bezüglich der apoptoseinduzierenden Potenz der Helixor-Extrakte *Abietis*, *Mali* und *Pini* auf Lymphozytenkulturen gesunder weiblicher und männlicher Probanden. Die morphologische Betrachtung der einzelnen Apoptosestadien zeigte bei beiden Testgruppen und allen verwendeten Mistelpräparaten den höchsten Prozentsatz an Zellen mit stark fragmentiertem Kern, gefolgt von Zellen mit stark kondensiertem Kern, während apoptotische Bodies wie bei der Zelllinie MOLT-4 nur zu einem geringen Prozentsatz auftraten. Die Anteile der verschiedenen Apoptosestadien nahmen unter Einwirkung der drei Frischpflanzenextrakte dosisabhängig zu.

4.3.4 Vergleich durchflusszytometrischer und fluoreszenzmikroskopischer Ergebnisse

Der direkte Vergleich der durchflusszytometrischen und mikroskopischen Apoptosewerte bei weiblichen Probanden wies bei einzelnen Ansätzen schwach signifikante bzw. signifikante Unterschiede auf, die allerdings methodisch verursacht sein könnten. Denn obwohl die Versuche immer unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, bestand trotzdem die Möglichkeit von Abweichungen. Da es sich bei der Apoptose um einen sehr empfindlichen Prozess handelt, können schon geringe zeitliche Abweichungen dazu führen, dass sich die Zellen in einem anderen apoptotischen Stadium befanden. Des Weiteren könnten auch bei der Präparation der Zellen mittels Zytocentrifuge und der Färbung Unterschiede entstanden sein (unterschiedliche Fluoreszenzintensität aufgrund des jeweiligen Kondensierungs- und Fragmentierungsgrades) und so zu Abweichungen bei der Auswertung geführt haben. Erstaunlicherweise traten jedoch bei den Lymphozytenkulturen männlicher Probanden keine signifikanten Differenzen zwischen Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie auf.

Ähnlich wie bei der Mitose handelt es sich auch bei der Apoptose um einen Vorgang von kurzer Dauer. Die Zeitspanne, während der apoptotische Zellen ihre charakteristischen Merkmale aufweisen, die ihre Identifizierung ermöglichen, hängt von der gewählten Detektionsmethode, dem jeweiligen Zelltyp und dem Apoptoseinduktor ab. Verlangsamt beispielsweise eine eingesetzte Substanz den apoptotischen Prozess, z. B. durch Beeinflussung der Endonukleolyse oder der Proteolyse, wird auch die Zeitspanne verändert, in der man apoptotische Zellen identifizieren kann. Somit erfasst man je nach Art der Detektionsmethode und dem Detektionszeitpunkt nicht wirklich alle Zellen, die apoptotisch absterben. Es handelt sich also sowohl bei der Durchflusszytometrie als auch bei der morphologischen Auswertung immer nur um Richtwerte. Leider gibt es nach Darzynkiewicz et al. (1997) keine Methode, um apoptotische Zellen zu einem festgelegten Zeitpunkt anzureichern.

4.3.5 Zellzyklusspezifität

Die Untersuchungen zur Konzentrationskinetik an Lymphozytenkulturen gesunder Probanden ergaben im Vergleich zur Zelllinie MOLT-4 eine G1-Phasenspezifität bezüglich der Apoptoseinduktion bei allen drei getesteten Mistelextrakten.

Die Auswertung der 1-Parameter-Histogramme zeigte für die Lymphozytenkulturen weiblicher Probanden bei der höchsten Konzentration für Helixor A eine signifikante Zunahme der G1-Zellen und eine hoch signifikante Abnahme der G2/M-Zellen; für Helixor M eine hoch signifikante Zunahme der G1-Phase, eine signifikante Abnahme der Synthese-Phase und eine hoch signifikante Abnahme der G2/M-Phase; für Helixor P eine hoch signifikante Akkumulation der Zellen in der G1-Phase und damit verbundene hoch signifikante Abnahme der S- und G2/M-Phase. Die Analyse der Lymphozytenkulturen männlicher Probanden ergab bei der höchsten Konzentration für Helixor A eine schwach signifikante Zunahme der G1-Zellen; für Helixor M eine hoch signifikante Zunahme der G1-Phase und eine schwach signifikante Abnahme der Synthese-Phase; für Helixor P eine hoch signifikante Akkumulation der Zellen in der G1-Phase und eine hoch signifikante Abnahme der Zellen der Synthese-Phase.

Diese Akkumulierung der Zellen in der G1-Phase könnte mit Genkomplexen in Verbindung gebracht werden, die entstandene Schäden erkennen und die Zelle am G1-Checkpoint arretieren, bis die DNA-Schäden wieder behoben sind oder die Zelle direkt zum apoptotischen Abbau veranlassen (Darzynkiewicz, 1995). Eine wichtige Funktion nimmt bei diesem Mechanismus das Tumorsuppressor-Gen p53 ein. Wird das Protein durch DNA-Schäden aktiviert, veranlasst es entweder eine Arretierung des Zellzyklus in G1 bzw. G2 oder initialisiert den Apoptosemechanismus (Evan und Littlewood, 1998). Büssing et al. (1998b) untersuchten die Expression des Proteines p53 in humanen Lymphozyten nach 72 h Inkubation mit Helixor-Extrakten, stellten jedoch keine Zunahme der intrazellulären p53-Konzentration fest.

Bezüglich der G2/M-Phase traten im Vergleich zu den weiblichen Lymphozytenkulturen bei männlichen Probanden keine signifikanten Veränderungen auf. Beim direkten Vergleich der G2/M-Werte weiblicher und männlicher Probanden war schon der Kontrollwert weiblicher Probanden hoch signifikant höher als der Kontrollwert männlicher Probanden. Nach Zugabe der Mistelextrakte nahm der prozentuale Anteil der G2/M-Phase weiblicher Blutspender signifikant bzw. hoch signifikant ab gegenüber den Werten männlicher Testpersonen. Diese Unterschiede könnten einerseits damit begründet werden, dass periphere Blutlymphozyten intra- und interindividuellen Schwankungen unterliegen und die Lymphozytenkulturen der weiblichen Testpersonen an einem anderen Tag angesetzt wurden als die Kulturen der männlichen Blutspender und damit anderen Kultivierungs- und Transportbedingungen unterlagen. Andererseits könnten diese signifikanten Differenzen bezüglich der G2/M-Phase auch mit einer unterschiedlichen Sensitivität gegenüber den Mistelextrakten zusammenhängen und weitere Hinweise auf eine mögliche geschlechtsspezifische Wirkung darstellen.

4.4 Wachstumshemmendes und apoptoseinduzierendes Potential von Mistellektin I und III getestet an der Zelllinie MOLT-4

4.4.1 Bestimmung der Wachstumsrate

Die Auswertung des Trypanblautestes nach 72 h Inkubation der Zelllinie MOLT-4 ergab eine dosisabhängige Wachstumshemmung durch die Mistellektine I und III, wobei für ML-III eine stärkere Wirkung festgestellt werden konnte.

Doser et al. (1989) konnten nachweisen, dass Kulturen der humanen Leukämiezelllinie MOLT-4 nach 72 h Behandlung mit partiell und hochgereinigten Lektinen aus *Viscum album* L. eine dosisabhängige Reduktion der Lebendzellzahl zeigten. Die LD₅₀ von partiell gereinigtem Lektin betrug 27,8 ng/ml, die von hochgereinigtem Lektin 1,3 ng/ml. Bei einem wässrigen Mistelpräparat (Helixor M) wurde die 140fache Proteinkonzentration, verglichen mit hochgereinigtem Lektin, benötigt, um ähnliche zytotoxische Wirkungen auf die MOLT-4-Zellen zu erreichen. Die Zytotoxizität von hochgereinigtem Lektin konnte besonders durch D-Galaktose und Laktose gehemmt werden, die Zytotoxizität des Mistelpräparates und von partiell gereinigtem Lektin besonders durch Laktose und N-Acetyl-D-galaktosamin (GalNAc). Zwei Lektinfraktionen mit nahezu gleich starker zytotoxischer Wirkung auf MOLT-4-Zellen aber unterschiedlicher Kohlenhydrat-Affinität wurden mittels Affinitätschromatographie aus dem Mistelpräparat isoliert: Mistellektin I, mit einer Affinität zu D-Galaktose und GalNAc und Mistellektin II mit einer Affinität zu GalNAc. Die Lektinfraktionen und das Mistelpräparat hemmten die Proteinsynthese der MOLT-4-Zellen stärker als ihre DNA-Synthese.

Außerdem zeigte eine MOLT-4-Subpopulation, die gegen zytotoxische Dosen sowohl des Mistelpräparates als auch der Mistellektine resistent war, einen geringeren Gehalt an GalNAc und N-Acetyl-D-glucosamin in ihren zellulären Glykoproteinen, die wahrscheinlich für die Bindung der zytotoxischen Lektine verantwortlich sind. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass hauptsächlich Lektine für die zytotoxische Wirkung des Mistelpräparates verantwortlich sind (Doser et al., 1989).

4.4.2 Durchflusszytometrische Analyse

Die durchflusszytometrische 2-Parameter-Messung ergab einen signifikanten Anstieg der apoptotischen Zellpopulation nach Behandlung mit ML-I ab einer Konzentration von 0,5 ng/ml und für ML-III eine schwach signifikante Zunahme apoptotischer Zellen bereits ab 0,1 ng/ml, wobei im direkten Vergleich für ML-III jeweils höhere Apoptosewerte verzeichnet werden konnten.

Diese Ergebnisse stimmen überein mit den Untersuchungen von Dietrich et al. (1992), die über eine Apoptoseinduktion durch alle drei Mistellektine bei der Zelllinie MOLT-4 berichten,

wobei ML-III die stärkste Potenz zeigte.

Büssing (1996b) schließt aus verschiedenen *in vitro*-Studien, dass die Mistellektine als Hauptfaktoren für die Induktion des programmierten Zelltodes verantwortlich gemacht werden können. Denn erstens zeigte der gesamte Pflanzenextrakt sowohl mit als auch ohne Viscotoxine gleiche Effizienz. Zweitens bewirkten Mistelextrakte mit niedrigerem Lektiningehalt immer einen geringeren Anstieg der apoptotischen Zellpopulation mit hypodiploidem DNA-Gehalt als Mistelpräparate mit einem höheren Lektiningehalt. Drittens zeigten von den isolierten Einzelkomponenten (ML-I, ML-II, ML-III, Viscotoxine und Oligosaccharide) nur die drei Mistellektine eine Apoptoseinduzierende Wirkung.

Da man nun folgern könnte, dass die Menge des gebundenen ML auf der Zelloberfläche das zytotoxische Potential beeinflusst, untersuchten Göckeritz et al. (1994) die Bindungskapazität von FITC-markierten Mistellektinen bei humanen Lymphozyten. Hier zeigte sich, dass ML-I die größte Bindungsfähigkeit aufwies, gefolgt von ML-II und ML-III. Des Weiteren war bei Zellen in der Ruhephase die Menge des gebundenen Lektins geringer als bei proliferierenden Zellen, d. h. die Korrelation zwischen der höheren Bindungskapazität proliferierender Zellen gegenüber Mistellektinen und einem höheren Apoptosepotential wird offensichtlich. Jedoch korrelierte das zytotoxische Potential der Mistellektine nicht mit den Unterschieden in der Menge der gebundenen ML-I, ML-II und ML-III bei proliferierenden Zellen. Somit könnte neben der unterschiedlichen Zuckerspezifität, der Bindung und intrazellulären Aufnahme der B-Kette auch der Abbau der Moleküle ein bestimmender Faktor sein.

4.4.3 Mikroskopische Analyse

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der einzelnen Apoptosestadien in Lymphozytenkulturen war vergleichbar mit den Ergebnissen der Leukämiezellen nach Behandlung mit den Mistelextrakten, d. h. auch hier überwog der Anteil an Zellen mit stark fragmentiertem Kern, während nur ein geringer Prozentsatz an apoptotischen Zellen auftrat. Auch mit dieser Methode konnte ein stärkeres Apoptoseinduzierendes Potential des Mistellektin III gegenüber Mistellektin I nachgewiesen werden.

Auch Möckel et al. (1997) untersuchten mikroskopisch die Wirkung von ML-I auf die humane Leukämiezelllinie MOLT-4 hinsichtlich der Induktion des programmierten Zelltodes und konnten nachweisen, dass Apoptose und Zytotoxizität bei niedrigen und mittleren Konzentrationen korrelierten, während bei langen Inkubationszeiten und hohen Konzentrationen von ML-I überwiegend nekrotische Effekte auftraten. Die Ergebnisse zeigten, dass im Konzentrationsbereich niedriger Toxizität der durch ML-I induzierte Zelltod quantitativ auf apoptotische Prozesse zurückgeführt werden kann. Die immunmodulatorische Aktivität von ML-I untersuchten Möckel et al. (1997) *in vitro* durch Messung der Zytokin-Freisetzung. Im niedrig toxischen Bereich zeigte ML-I immunstimulierende Aktivität bei PBMC und THP-1. RT-PCR (re-

verse transcriptase polymerase chain reaction) mit THP-1-Zellen bestätigte, dass die Zytokin-Induktion durch ML-I auf der transkriptionellen Ebene reguliert wird. Diese Befunde lassen darauf schließen, dass in Blutzellen sowohl Apoptose als auch zelluläre Signalübermittlung innerhalb desselben Konzentrationsbereichs von ML-I induziert werden.

Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Ribéreau-Gayon et al. (1997) bestätigen die in dieser Arbeit belegte stärkere Wirkung des ML-III gegenüber ML-I, denn die Autoren analysierten ebenfalls die apoptoseinduzierenden und wachstumshemmenden Effekte der drei Mistellektine auf die Zelllinie MOLT-4 licht- und elektronenmikroskopisch. Bei der Verwendung von serumfreiem Medium wurde eine dosisabhängige Wachstumshemmung der Leukämiezellen durch Lektinkonzentrationen im pg-Bereich und die für den programmierten Zelltod charakteristische Bläschenbildung der Membran nachgewiesen. Unter diesen Bedingungen zeigte ML-III eine zehnfach höhere apoptotische Potenz gegenüber ML-I, während das Mistellektin II eine Mittelstellung einnahm.

4.4.4 Vergleich der durchflusszytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Auswertung

Die durchflusszytometrisch ermittelte Apoptoserate korrelierte gut mit den fluoreszenzmikroskopisch erfassten apoptotischen Zellpopulationen, denn lediglich bei der höchsten Konzentration von ML-I und ML-III waren die Apoptosewerte schwach signifikant höher als die Apoptoseraten der 2-Parameter-Messung. Als Ursachen für diese leicht erhöhte Apoptoserate könnten eine falsch-positive Interpretation der Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen Kondensierungs- und Fragmentierungsstadien und verstreut vorliegende apoptotische Körperchen, die als Einzelzellen erfasst wurden, angeführt werden.

4.4.5 Zellzyklusspezifität

Bei den Untersuchungen der Konzentrationskinetik an der Leukämiezelllinie MOLT-4 zeigten Mistellektin I und III keine Phasenspezifität bezüglich ihres apoptoseinduzierenden Potentials, d. h. die apoptotischen Zellen traten aus allen Phasen des Zellzyklus aus.

Die Auswertung der 1-Parameter-Histogramme ergab für beide Lektine eine Akkumulation der Zellen in der Synthese-Phase und eine damit verbundene Abnahme der G1- und G2/M-Phase-Zellen. Eine solche Akkumulierung der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus lässt auf einen Ausfall bzw. eine Verminderung der Funktionsfähigkeit der Kontrollelemente am Ende der G1-Phase schließen. Diese Kontrollmechanismen verhindern normalerweise am Restriktionspunkt der G1-Phase einen Eintritt der Zellen in die Synthese-Phase unter ungünstigen Bedingungen. Aufgrund der gehemmten Proteinsynthese und der unvollständigen DNA-Replikation können die Zellen schließlich nicht in die G2/M-Phase eintreten und verbleiben in der S-Phase (Darzynkiewicz, 1995).

4.5 Wachstumshemmendes und apoptoseinduzierendes Potential von Mistellektin I und III getestet an humanen Lymphozyten

4.5.1 Bestimmung der Wachstumsrate

Die Auswertung des Trypanblautests ergab eine hoch signifikante Wachstumshemmung humaner Lymphozyten nach 72 h Inkubation mit Mistellektin I und III im gesamten Konzentrationsbereich. Diese Ergebnisse korrelierten gut mit den Versuchen an der Zelllinie MOLT-4 (vgl. 4.4) und zeigten ebenfalls eine stärkere Wachstumshemmung durch Mistellektin III, während jedoch insgesamt die prozentualen Wachstumsraten der Lymphozyten höher waren als die der Leukämiezellen und so auf eine stärkere Resistenz gegenüber den Lektinwirkstoffen hinweisen. Diese Unterschiede könnten mit einer höheren Bindungskapazität gegenüber Mistellektinen (größere Menge Galactosyl-Reste auf der Zielzelle) und schnellerer intrazellulären Aufnahme der B-Kette durch die MOLT-4-Zellen begründet werden. Bei der Bestimmung der Wachstumsrate traten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede auf.

4.5.2 Durchflusszytometrische Analyse

Die quantitative Auswertung der 2-Parameter-Dot Plots zeigte eine signifikante bzw. hoch signifikante Zunahme der apoptotischen Zellpopulation bereits ab einer Konzentration von 0,05 ng/ml ML I bzw. ML III, wobei wiederum Mistellektin III die stärkste apoptoseinduzierende Potenz aufwies. Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Probanden festgestellt werden.

Da Ähnlichkeiten im Mechanismus zum Ricin-induzierten Zelltod zu vermuten sind, untersuchten schon Büssing et al. (1996c) durchflusszytometrisch den DNA-Gehalt kultivierter Lymphozyten gesunder Probanden nach Zugabe gereinigter toxischer Proteine aus VAL, wie dem ML-I, ML-II, ML-III, den Viscotoxinen, aber auch den Oligosacchariden aus der Mistel. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Mistellektine für die Induktion des apoptotischen Zelltodes 72 h kultivierter Lymphozyten gesunder Probanden verantwortlich sind, während die Viscotoxine und Oligosaccharide zu keiner Apoptoseinduktion führten. Das N-Acetyl-D-galaktosamin-spezifische ML-III zeigte auch hier die stärkste apoptoseinduzierende Potenz, gefolgt vom D-Galaktose- und N-Acetyl-D-galaktosamin-spezifischen ML-II und dem D-Galaktose-spezifischen ML-I.

Obwohl man eine homogene Verteilung der Kohlenhydrat-Bindungsstellen auf den Oberflächenrezeptoren der Zelle für die B-Kette dieses toxischen Proteins erwarten würde, variiert offensichtlich die Sensitivität verschiedener Zellen für die Bindung der B-Kette. Büssing et al. (1998a) stellten bei Lymphozyten gesunder Probanden ein selektives Absterben von CD8⁺ CD62L^{lo}-Zellen durch das N-Acetyl-D-galaktosamin-spezifische ML-III fest, während sich das

D-Galaktose-spezifische ML-I weniger effektiv zeigte. Dieses selektive Absterben kann jedoch nicht nur mit der Hemmung der Proteinsynthese alleine begründet werden, da diese Population nicht von Ribosomen-inhibierenden-Proteinen wie dem Lektin von Ricinus communis (RC₁₂₀), dem Lektin von Abrus precatorius (APA), Abrin A und Inhibitoren der RNA, DNA und/oder Proteinsynthese wie beispielsweise Actinomycin D, Mitomycin C und Cycloheximid angegriffen wurde. Die Autoren schlossen aus diesen Ergebnissen, dass CD8⁺-Zellen mit ‚Memory‘-Phänotyp (CD62L^{lo}) sensitiver sind für das ML-III-vermittelte Absterben als ihre CD8⁺ CD62L^{hi} Gegenspieler, die CD4⁺-T- und CD19⁺-B-Zellen. Diese Zellen exprimieren möglicherweise einen anderen Rezeptor mit fehlenden oder inaktivierten N-Acetyl-D-galaktosamin-Bindungsstellen auf CD8⁺-Zellen mit ‚normalem‘ Phänotyp.

4.5.3 Mikroskopische Analyse

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der einzelnen Apoptosestadien zeigte, dass wiederum die Zellen mit stark fragmentiertem Kern den Hauptanteil an der apoptotischen Zellpopulation einnahmen, während die Rate apoptotischer Bodies stets unter der 10 %-Marke blieben. Die Zusammensetzung der apoptotischen Zellpopulation wies keine signifikanten Unterschiede zwischen Lymphozyten weiblicher und männlicher Probanden auf, so dass die geschlechtsspezifische Wirkung der Helixor-Präparate wohl nicht auf die Lektine zurückzuführen ist.

4.5.4 Vergleich der durchflusszytometrischen und mikroskopischen Ergebnisse

Bei der direkten Gegenüberstellung korrelierten die durchflusszytometrisch ermittelten Apoptoseraten sehr gut mit den fluoreszenzmikroskopisch ausgezählten Apoptosestadien, denn es traten keinerlei signifikante Unterschiede auf.

4.5.5 Zellzyklusspezifität

Die Untersuchungen zur Konzentrationskinetik an peripheren Blutlymphozyten gesunder Probanden ergaben für das aus 25 Isolektinen bestehende Mistellektin I und das aus 15 Isolektinen bestehende Mistellektin III keine Phasenspezifität bezüglich ihres apoptoseinduzierenden Potentials, d. h. die apoptotischen Zellen traten aus allen Phasen des Zellzyklus aus und waren als charakteristischer „Schweif“ im 2-Parameter-Dot Plot zu erkennen.

Die quantitative Auswertung der 1-Parameter-Histogramme wies eine Arretierung der Zellen in der Synthese-Phase auf (vgl. 4.4.5), die für ML-I ab einer Konzentration von 1 ng/ml signifikant und für ML-III bereits bei 0,5 ng/ml schwach signifikant war. Verbunden mit dieser prozentualen Zunahme der S-Phase war eine Abnahme der G0/1- und G2/M-Rate zu verzeichnen.

4.5.6 Wirkungsmechanismen der Mistellektine

Untersuchungen mit Zellkulturen und Tiermodellen zeigten auf, dass ML-I verschiedene Typen zellulärer Antworten auslöst, welche die adjuvanten Effekte von Mistelextrakten in der Krebstherapie unterstützen könnten. ML-I übt einerseits eine breitgefächerte immunstimulierende Aktivität aus (Beuth, 1997). Die Inkubation von Monozyten des peripheren Blutes oder von monozytischen Zelllinien mit ML-I resultierte in einer erhöhten Expression zahlreicher Zytokine, beispielsweise Interleukin-1, Interleukin-6, TNF- α und GM-CSF (Hajto et al., 1990a; Ribéreau-Gayon et al., 1996; Stein und Berg, 1997a). Außerdem wurde eine Zunahme der NK-Zellen und der Phagozytose-Aktivität beobachtet und es konnte nachgewiesen werden, dass die Zugabe von ML-I eine Ausschüttung von β -Endorphin in das Zytoplasma bewirkt (Heiny und Beuth, 1994b). Dieses Oligopeptid hat eine stimmungsaufhellende Wirkung im Zentralnervensystem und somit könnte die ML-I Verabreichung eine Verbesserung der Lebensqualität von Krebspatienten bewirken.

In zahlreichen Studien wurden andererseits auch die zytostatischen und zytotoxischen Effekte des ML-I auf verschiedene Tumorzelllinien nachgewiesen und es konnte belegt werden, dass diese zytotoxische Wirkung durch die Induktion des programmierten Zelltodes herbeigeführt wird. Die Inkubation verschiedener Zelllinien mit ML-I resultierte in einem Zelltod, der mit typischen apoptotischen Veränderungen wie Zell-Schrumpfung, Chromatin-Kondensation und internukleosomaler DNA-Spaltung verbunden war (Janssen et al., 1993; Büssing et al., 1996c; Möckel et al., 1997). In diesen Studien konnte jedoch nicht geklärt werden, über welche Mechanismen und Signaltransduktionswege das Mistellektin den programmierten Zelltod induziert.

Untersuchungen der Arbeitsgruppen Cohen (1997) und Nicholson (1997) zeigten, dass der apoptotische Zelltod essentiell durch eine Gruppe von Proteasen, die sogenannten Caspasen (vgl. 1.2.2.4) kontrolliert wird, welche gegenwärtig als zentrale Auslöser vieler apoptotischer Wirkungswege angesehen werden. In Säugerzellen kommen mindestens zwölf verschiedene Caspase-Typen vor. Hierbei handelt es sich um Cystein-Proteasen, die ihre Substrate an Aspartatresten spalten. Caspasen werden als inaktive Proenzyme synthetisiert und proteolytisch zu einem aktiven Komplex geformt, der aus zwei heterodimerischen Untereinheiten von etwa 10 und 20 kD zusammengesetzt ist. Bisher wurde eine zunehmende Zahl von Proteinen identifiziert, die durch Caspasen gespalten werden und einigen dieser Proteasen konnte eine apoptotische Wirkungsweise zugeschrieben werden. Bantel et al. konnten 1999 nachweisen, dass die Behandlung von leukämischen T- und B-Zelllinien mit ML-I Apoptose induzierte, wofür eine vorherige Aktivierung von Proteasen der Caspase-Familie erforderlich war. Die Beteiligung dieser Caspasen konnte durch die Verwendung eines Peptid-Caspase-Inhibitors, welcher den ML-I-induzierten Zelltod fast vollständig verhinderte, nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde eine proteolytische Aktivierung von Caspase-8,

Caspase-9 und Caspase-3 festgestellt. Aufgrund der Regulatorwirkung der Caspase-8 während des programmierten Zelltodes untersuchten die Autoren außerdem eine mögliche Rezeptor-Beteiligung bei der Wirkungsweise des Mistellektin I. Sie stellten jedoch fest, dass die Caspase-8-Aktivierung durch ML-I über einen Rezeptor-unabhängigen Mechanismus geregelt wird, da der ML-I-induzierte Zelltod auch in CD95 resistenten Zellklonen nicht abgeschwächt wurde. Vielmehr scheint Mistellektin I einen Mitochondrien-kontrollierten Mechanismus auszulösen, da während dieses Prozesses eine schnelle Ausschüttung von Cytochrom C in das Zytosol induziert wird.

Büssing et al. (1996a) vermuten, dass die in humanen Lymphozyten auftretende Apoptose nach Zugabe von VAL Rezeptor-vermittelt zu sein scheint. Denn in kultivierten Lymphozyten wurde innerhalb von 2–3 min nach Zugabe von 20 µg/ml ML-I ein deutlicher Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration $[Ca^{2+}]_i$ beobachtet (Göckeritz et al., 1994). Der Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$ war durch die Zugabe der zuckerbindenden B-Kette des ML und durch das ML-I-Hololektin zu induzieren, nicht jedoch durch die toxische A-Kette. Unter Verwendung von Thymozyten der Ratte wurden diese Ergebnisse von Timoshenko und Gabius (1995) bestätigt. Stirpe et al. (1980) vermuten, dass der Ca^{2+} -Influx durch normale Calcium-Kanäle eine Voraussetzung für den Eintritt des ML-I in das Zytosol ist. Somit kommt es, B-Ketten-vermittelt, zur frühen Aktivierung der Zelle mit Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$.

Büssing et al. (1998b und 1999a) zeigten außerdem auf, dass ML-III in einer Konzentration von 10 ng/ml bei 72 h kultivierten Lymphozyten keinen Anstieg der SCE-Frequenz induziert, jedoch die Chromosomenstabilität durch Telomerverlust vermindert und damit eine Zunahme telomerischer Assoziationen (TA) sowie von C-Anaphasen bewirkt. Des Weiteren wurde eine Abnahme der Bcl-2 und p53-Konzentration und eine zunehmende Expression des Mitochondrien-Membranproteins Apo2.7 (7A6 Antigen) festgestellt. Die Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials und der Membranpermeabilität induzierten außerdem die mitochondriale Erzeugung von reaktiven Sauerstoff-Zwischenprodukten (reactive oxygen intermediates = ROI) und die schnelle Expression von Phosphatidylserin (PS)-Resten auf der Oberfläche der äußeren Plasmamembran. Diese Veränderungen scheinen Teil der Degradierungsphase der Apoptose zu sein und führen schließlich zur Fragmentierung der DNA (Kroemer et al., 1997; Lizard et al., 1995). Die Autoren schlossen aus diesen Ergebnissen, dass die ML-III vermittelte Zytotoxizität über zwei verschiedene Wirkungswege ablaufen könnte: Der erste Mechanismus scheint rezeptorgebunden zu sein, geht mit Veränderungen der Zellmembran einher und induziert Apoptose. Dieser Pfad ist wahrscheinlich unabhängig von der Protein- und RNA-Synthese und auch das Proto-Onkogen Bcl-2 bzw. das Tumorsuppressor-Gen p53 sind wohl unbeteiligt. Der zweite Wirkungsweg resultiert in Chromosomenabnormalitäten wie TAs und einer Abnahme der Telomersignalintensität in den überlebenden Zellen und führt im weiteren Verlauf zum programmierten Zelltod.

4.6 SCE-Frequenz, Zellzyklusverteilung und Proliferationsindex humaner Lymphozyten nach Kombinationsbehandlung mit Helixor-Präparaten und Zytostatika

Schwester-Chromatid-Austausche treten meist bei fehlgeleiteter DNA-Replikation auf. Die Bestimmung der SCE-Rate ist somit ein Marker für genotoxische Effekte, die auf chromosomaler Ebene nachweisbar sind.

Obwohl SCEs durch verschiedene Mutagene induziert werden, wobei die quantitative Beziehung zwischen der Anzahl der Mutationen und der der SCEs bei unterschiedlichen Chemikalien schwankt, wird die SCE-Analyse als ein sensibler Test zur Untersuchung genetischer Schäden, die zu Mutationen und Krebsentstehung führen können, angesehen (Bradley et al., 1979).

4.6.1 Individuelle Variabilität der spontanen SCE-Frequenz

Die SCE-Raten normaler Individuen variieren stark. Ein bedeutender Anteil der auftretenden Variationen bei den SCE-Frequenzen gesunder Individuen kann durch verschiedene technische Faktoren, die die SCE-Darstellung beeinflussen können (wie z. B. unterschiedliche Kulturbedingungen und Färbetechniken) verursacht werden.

Wenn SCEs spontan auftreten, wird beispielsweise ein beachtlicher Teil durch das zuge setzte BrdU selbst induziert (Wolff et al., 1974). Entscheidend ist dabei die pro Zelle zur Verfügung stehende BrdU-Menge. Carrano et al. (1980) halten eine BrdU-Konzentration von 100 μM auf circa 3×10^6 Lymphozyten pro Kultur für optimal. Da jedoch die Lymphozytenanzahl pro Bluteinheit kein konstanter Faktor ist, ist es schwierig, solche Richtwerte einzuhalten.

Bezüglich der Kulturdauer und der Blutaufbewahrung in der Zeit zwischen Abnahme und dem Ansetzen der Blutkultur wurde keine Beeinflussung der SCE-Frequenz festgestellt (Carrano et al., 1980). Das Blut konnte während dieser Studie ohne erkennbare Differenzen 8–24 Stunden bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank (4 °C) aufbewahrt werden.

Andere Faktoren, wie die Zusammensetzung des eingesetzten Kulturmediums, z. B. Seren und Antibiotika (Obe, 1970), die zur Stimulierung der Lymphozyten eingesetzten Mitogene (Deknudt und Kamra, 1983), Lichteinfluss (Ikushima et al., 1977), die Temperatur (Speit, 1980), die Zellproliferationsrate und die Färbemethode (Morgan und Crossen, 1981) sollen die SCE-Rate stark beeinflussen.

Solche mit den Kulturbedingungen und der Herstellung der Präparate in Zusammenhang stehenden Umstände als mögliche Quellen für inter- und intraindividuelle Schwankungen können für die hier durchgeführten Untersuchungen weitgehend ausgeschlossen werden, da auf die Konstanzhaltung dieser Faktoren während der Versuchsreihe geachtet wurde.

Für die bei spontanen SCE-Raten auftretenden interindividuellen Differenzen werden in der Literatur neben den oben genannten labortechnischen Gründen viele weitere Faktoren genannt, welche die SCE-Basisfrequenz beeinflussen können: So wird beispielsweise der allgemeine Lebensstil als beeinflussender Faktor aufgeführt (Speit et al., 1986). Eine veränderte SCE-Rate konnte beispielsweise durch die Einnahme von Medikamenten (Husum et al., 1985) oder oraler Verhütungsmittel (Murthy und Prema, 1979), Alkohol- und Kaffeekonsum (Wolff, 1982), virale Infektionen (Kurvink et al., 1978), Rauchen (Husgafvel-Pursiainen et al., 1980) und den Umgang mit Pestiziden (Larripa et al., 1983) nachgewiesen werden. Oftmals wirken sich auch chemische Belastungen am Arbeitsplatz aus, z. B. bei Laborangestellten, Krankenhauspersonal oder Arbeitern der chemischen Industrie (Wolff, 1982).

Derartige Beeinflussungen, die mit der Lebensweise der Probanden in Zusammenhang stehen, konnten bei der vorliegenden Untersuchung weitgehend ausgeschlossen werden, da nur Blutproben von Spendern verwendet wurden, die keine Medikamente einnahmen, Nichtraucher und gesund waren, nicht übermäßig Alkohol und Kaffee konsumierten und bei denen keine chemische Belastung am Arbeitsplatz vorlag.

Bezüglich eines möglichen Einflusses des Alters der Probanden auf die SCE-Rate finden sich in der Literatur z. T. widersprüchliche Aussagen. Während die Untersuchungen von de Arce (1981) und Waksvik et al. (1981) auf einen Alterseffekt hinweisen, konnten zahlreiche andere Arbeitsgruppen (Morgan und Crossen, 1977; Hollander et al., 1978) keine Beeinflussung der SCE-Frequenz durch das Alter der Testpersonen feststellen. Bei Vergleichen zwischen Kindern und Erwachsenen wurden bei den Kindern allerdings grundsätzlich signifikant weniger SCEs gefunden (Funes-Cravioto et al., 1977; Ardito et al., 1980; Husgafvel-Pursiainen et al., 1980).

Indem das Alter der Probanden auf 25–35 Jahre beschränkt wurde, konnte auch das Alter als ein die SCE-Rate beeinflussender Faktor für die vorliegenden Untersuchungen ausgeschlossen werden.

Während Hedner et al. (1982) von höheren SCE-Werten bei Frauen im Vergleich zu Männern berichten, konnten bei anderen Untersuchungen keine Unterschiede bezüglich des Geschlechtes festgestellt werden (Morgan und Crossen, 1977; de Arce, 1981; Waksvik et al., 1981).

Auch bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen traten keine geschlechtsspezifischen Differenzen auf.

Carrano et al. (1980) vermuten interzelluläre Unterschiede als primäre Quelle für große intraindividuelle Schwankungen und geben als wahrscheinliche Ursachen die unterschiedliche von den einzelnen Lymphozyten aufgenommene BrdU-Menge und die unterschiedlichen „Vorgeschichten“ der einzelnen Lymphozyten an.

Außerdem liegen in den Kulturen verschiedene Lymphozytensubpopulationen vor, deren

Verteilung zahlenmäßig sehr unterschiedlich sein kann (Evans und O'riardan, 1975).

Santesson et al. (1979) berichten von einer schnelleren Zellproliferation und einer fast zweifach erniedrigten SCE-Rate bei humanen B-Lymphozyten im Vergleich zu T-Lymphozyten. Demnach tragen unterschiedliche Mengenverhältnisse von B- und T-Lymphozyten im zu untersuchenden Blut auch mit zu den differierenden SCE-Werten bei.

Bei den vorliegenden Untersuchungen zur Bestimmung der SCE-Rate traten nur relativ geringe intraindividuelle Schwankungen auf, die jeweils unter der Signifikanzgrenze lagen.

4.6.2 Induzierte SCE-Rate

In den vorliegenden Untersuchungen wurde der SCE-Test eingesetzt, um eine mögliche antimutagene und DNA-stabilisierende Wirkung auf mononukleäre Blutzellen nach Behandlung mit verschiedenen Mistelextrakten nachzuweisen und eventuelle wirtsbaumspezifische und geschlechtsspezifische Unterschiede in der Wirkungsweise zu analysieren. Des Weiteren wurde untersucht, welche Auswirkungen die Mistelextrakte nach einer Kombinationsbehandlung mit den Zytostatika Cyclophosphamid, 5-Fluorouracil und Methotrexat, die einen signifikanten Anstieg der SCE-Rate induzieren, auf kultivierte Lymphozyten gesunder Probanden haben.

Die Bestimmung der SCE-Rate humaner Lymphozyten nach 71 h Inkubation mit den Frischpflanzenextrakten ergab eine ab 5 µg/ml schwach signifikante und ab 10 µg/ml signifikante Abnahme der SCE-Frequenz für alle getesteten Helixor-Präparate gegenüber dem Kontrollansatz. Beim direkten Vergleich der drei verwendeten Mistelextrakte konnten keine wirtsbaumspezifischen und geschlechtsspezifischen Unterschiede bezüglich der Reduzierung der SCE-Rate festgestellt werden. Hieraus kann geschlossen werden, dass im Gegensatz zur apoptoseinduzierenden Wirkung nicht die Lektine, sondern andere Inhaltsstoffe der Mistelpresssäfte bzw. ein Zusammenwirken mehrerer Wirkstoffe für diese DNA-stabilisierende Potenz verantwortlich sind. Denn auch die für die Bestimmung der SCE-Rate verwendeten Chargen der Helixor-Präparate wiesen einen unterschiedlichen Lektinegehalt auf.

Auch Büssing et al. (1994) untersuchten den Effekt der Mistelextrakte Helixor Abietis und Pini auf die SCE-Rate, die Zellzyklusverteilung und den Proliferationsindex an Lymphozytenkulturen gesunder Probanden. Die Autoren stellten ebenfalls eine signifikante Abnahme der SCE-Rate unter Einwirkung der beiden Mistelpräparate fest, die jedoch keinen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung und den Proliferationsindex hatte. Die Abnahme der SCE-Frequenz konnte weder auf Veränderungen der Lymphozyten-Subpopulationen, zytostatische Effekte der beiden Frischpflanzenextrakte noch auf beschleunigte Proliferation der Phytohämagglutinin-stimulierten mononukleären Blutzellen zurückgeführt werden. Beim direkten Vergleich der beiden Mistelextrakte konnten ebenfalls keine wirtsbaumspezifischen Unterschiede nachgewiesen werden.

Auch im zweiten Versuchsabschnitt, nach einer Kombinationsbehandlung der peripheren Lymphozyten mit den Mistelextrakten und den einzelnen Zytostatika, konnte eine signifikante bzw. teilweise hoch signifikante Abnahme der SCE-Rate im Konzentrationsbereich von 7,5–20 µg/ml HA, HM bzw. HP gegenüber der Positivkontrolle nachgewiesen werden. Die differierenden Ergebnisse bei den drei verwendeten Zytostatika lassen sich mit den unterschiedlichen Standardabweichungen erklären, die beispielsweise bei dem Versuchsansatz mit 5-Fluorouracil deutlich geringer waren und dadurch in einer hoch signifikanten Verringerung der SCE-Frequenz resultierten. Der direkte Vergleich der drei verwendeten Frischpflanzenextrakte aus der Tannemistel, der Apfelmistel und der Kiefernmistel ergaben auch hier keine signifikanten wirtsbaumspezifischen oder geschlechtsspezifischen Unterschiede und bestätigen die Ergebnisse des vorangegangenen Versuches ohne Zytostatikazusatz.

Schon 1995 (b) analysierten Büssing et al. den Einfluss auf die SCE-Rate humaner Lymphozyten nach einer Kombinationsbehandlung mit dem Zytostatikum Cyclophosphamid und dem Mistelpräparat Helixor A. Der getestete Frischpflanzenextrakt Helixor Abietis bewirkte ebenfalls eine signifikante Abnahme der unter Einwirkung des Cyclophosphamids induzierten Erhöhung der SCE-Rate, jedoch keine Erhöhung des Proliferationsindex, der durch CP signifikant reduziert wurde.

Die Arbeitsgruppe Büssing (1995e) untersuchte auch Fruchtwasserzellen (AFC) von zehn Schwangeren, die sich einer Amniozentese unterziehen mussten. Die Schwesterchromatid-Austauschrates der Amnionzellen blieb nach Zusatz einer therapeutischen Konzentration (20 µg/ml) des *Viscum album* L.-Präparates Iscador P stabil, fiel jedoch nach Gabe höherer Dosierungen (200 und 2.000 µg/ml) signifikant ab. Da der Proliferationsindex auch bei extremen Dosierungen stabil blieb, ist die SCE-Reduktion nicht auf zytostatische Effekte des Medikamentes zurückzuführen. Es fanden sich keinerlei Hinweise auf eine mögliche zytogenetische Schädigung oder auf mutagene Auswirkungen.

Kovacs et al. (1991) verzeichneten einen verminderten [³H]-Thymidin-Einbau in die DNA von UV-geschädigten Lymphozyten bei Brustkrebs-Patientinnen vor der Behandlung und einen Anstieg des Einbaus nach Zugabe von Mistelextrakten. Die Autoren untersuchten Änderungen im DNA-Repair während der Therapie mit dem Immunomodulator Iscador M. Als Parameter für die Messung des DNA-Repairs diente der Einbau von [³H]-Thymidin in die DNA unstimulierter Lymphozyten nach UV-Schädigung. Zwölf von vierzehn Patientinnen zeigten einen signifikanten Anstieg im DNA-Repair, während sich die Werte für die spontane DNA-Synthese im Laufe der Behandlung nicht änderten. Dies kann einerseits mit einer Stimulierung des Repairs durch Lymphokine oder Zytokine zusammenhängen, die von aktivierten Leukozyten sekretiert werden, oder andererseits auf einer Änderung der Empfindlichkeit gegen exogene Agentien beruhen, die in weniger Schäden resultiert.

Wildfeuer und Mayerhofer (1994) stellten dagegen fest, dass [³H]-Thymidin im Lymphozyten-

Transformationstest während der Inkubation mit verschiedenen Helixor-Konzentrationen (100–1.000 µg/ml) im Vergleich zur Kontrolle nicht vermehrt eingebaut wurde.

Obwohl der exakte Mechanismus für die Entstehung von Schwester-Chromatid Austausch noch nicht völlig geklärt ist, scheinen eindeutige Zusammenhänge zwischen der DNA-Synthese, den DNA-Reparaturprozessen und der Bildung von SCEs zu bestehen (Raposa, 1978). In der Literatur ist für einige Substanzen eine Reduktion Mutagen-induzierter SCEs beschrieben worden, so für das Retinol (Huang, 1987), für das Terpen β -Myrcen (Kauderer et al., 1991), für Casein und bovines Serum-Albumin (Bosselaers et al., 1994), für das Ginsenosid Rh₂ (Zhu et al., 1995) sowie für die Östrogen-Isoflavone Genistein und Daidzein aus Sojabohnen (Giri und Lu, 1995). Der Mechanismus der im Tiermodell nach intraperitonealer Injektion der Östrogen-Isoflavone Genistein und Daidzein beobachteten Reduktion Karzinogen-induzierter SCEs (Giri und Lu, 1995) ist unklar. Erwähnenswert, aber in seiner Bedeutung unklar, ist das Vorkommen verschiedener Flavonoide in VAL (Matthiessen und Tröger, 1995). Die Ergebnisse von Zhu et al. (1995) zur Wirkung des Ginsenosids Rh₂ auf die SCE-Rate humaner Lymphozyten sind vergleichbar mit den vorliegenden Untersuchungen zur Wirkung der Mistelextrakte Helixor A, M und P. Die Arbeitsgruppe Zhu stellte nach 72 h Inkubation humaner Lymphozyten mit dem Ginsenosid Rh₂ und dem SCE-Induktor Mitomycin C eine signifikante Abnahme der SCE-Frequenz um ca. 20 % fest.

Die Ursache für die Abnahme der SCE-Frequenz mononukleärer Zellen des peripheren Blutes gesunder Probanden bei Zugabe steigender Helixor-Konzentrationen ist noch unklar, aber möglicherweise könnten komplexe Prozesse der Zell-Zell-Interaktion eine wichtige Rolle spielen. Denn gereinigte Lektine aus *Viscum album L.* bewirken eine Ausschüttung von TNF- α , IL-1, IL-6 und IFN- γ durch mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (Hajto et al., 1990a + b). Dabei induzieren die Zytokine IL-2, IFN- γ und TNF- α eine Zunahme der Zellproliferation und der SCE-Rate (Mertens et al., 1993; Morris et al., 1990; Lazutka und Rudaiene, 1992), während IFN- α und IFN- β die SCE-Frequenz reduzieren (Wang et al., 1991; Mertens et al., 1993). Büssing et al. (1996e) konnten jedoch in den Überständen kultivierter mononukleärer Zellen, die mit CP behandelt worden waren, außer einer leicht verbesserten TNF- α Aktivität nach VAL-Applikation keine vermehrte Freisetzung des TNF- α oder IL-1 β feststellen. Die SCE-reduzierenden Zytokine IFN- α und IFN- β waren in den Kulturüberständen gar nicht nachweisbar. Dennoch lässt sich nicht ausschließen, dass komplexe Interaktionen an den beobachteten Effekten beteiligt sind. Außerdem könnte die Abnahme der SCE-Frequenz auch auf einer Zunahme des DNA-Repairs, einer Abnahme der Sensitivität gegenüber exogenen Agentien oder einem verstärkten Schutz der Lymphozyten-DNA selbst beruhen und somit in weniger DNA-Schäden resultieren.

Eine therapeutische Wirkungsweise dieser antimutagenen Substanz könnte deshalb die Stabilisierung der DNA mononukleärer Blutzellen bedeuten und von klinischer Relevanz sein,

wenn diese Schutzwirkung selektiv für gesunde mononukleäre Blutzellen gilt und nicht für maligne Zellen. Denn die Stabilisierung in therapeutischen Konzentrationen könnte somit den negativen Effekten von Chemotherapie und Bestrahlung durch Schutz der DNA peripherer mononukleärer Blutzellen und Steigerung des DNA-Repairs entgegenwirken. Belege hierfür lieferten bereits die Untersuchungen der Arbeitsgruppe Büssing (1996e), die bei kultivierten leukämischen B-Zellen und der T-Zelllinie Jurkat keine VAL-induzierten protektiven Effekte erzielen konnten. Nach einer Kulturdauer von 96 h zeigte sich unter Verwendung leukämischer Jurkat-Zellen nach gemeinsamer Applikation von CP und VAL sogar eine deutlich verstärkte Zytotoxizität.

4.6.3 Zellzyklusanalyse und Proliferationsindex

Untersuchungen der Proliferationskinetik, welche Aussagen über eine Hemmung des Zellzyklus bzw. eine Verlängerung der Zellzyklusdauer unter dem Einfluss exogener Faktoren zulassen, werden zur Erfassung mutagener Toxizität eingesetzt (Gebhart, 1980a + b).

Die Zellteilung stellt einen kritischen Faktor bei der Mutagenese dar: Wenn sich die Zelle teilt, besteht die Möglichkeit, dass eine zuvor nicht reparierte DNA-Läsion zu einer Mutation führt. Aus diesem Grund ist die Zellteilungsrate für die Mutagenese und somit auch für die Karzinogenese von Bedeutung.

Zur Untersuchung der zellulären Proliferationskinetik wurden in dieser Arbeit nach der HPG-Methode gefärbte Präparate verwendet, die aufgrund der unterschiedlichen Anfärbung der Mitosen aus verschiedenen Teilungszyklen eine Bestimmung der Zellzyklusdauer der einzelnen Zellen erlauben (Crossen und Morgan, 1977).

Die Auswertung der Zellzyklusdaten und die Berechnung des Proliferationsindex ergab bei zunehmenden Helixor-Konzentrationen eine leichte Abnahme der Zellen im ersten Teilungszyklus, eine leichte Zunahme des Zellanteils im zweiten und dritten Teilungszyklus und einen daraus resultierenden Anstieg des Proliferationsindex. Die Unterschiede waren jedoch weder bei der alleinigen Verwendung der Helixor-Extrakte noch bei der Kombinationsbehandlung mit den verschiedenen Zytostatika signifikant. Diese Daten belegen, dass die nachgewiesene Abnahme der SCE-Frequenz nicht auf eine zytotoxische Wirkung der Mistelextrakte, die in therapeutischen Konzentrationen eingesetzt wurden, oder eine beschleunigte Proliferation der Phytohämagglutinin-stimulierten peripheren Blutlymphozyten zurückzuführen ist.

Bei der Betrachtung der Gesamtergebnisse dieses SCE-Testes lässt sich also feststellen, dass die eingesetzten Mistelpräparate eine signifikante Abnahme der unter Einwirkung der Zytostatika Cyclophosphamid, 5-Fluororacil bzw. Methotrexat induzierten Erhöhung der SCE-Rate bewirkten, jedoch keine signifikante Beeinflussung der Zellzyklusverteilung bzw. der Teilungsgeschwindigkeit.

4.7 Mitose-Index und Mikronukleus-Frequenz humaner Lymphozyten nach Kombinationsbehandlung mit Helixor-Präparaten und Zytostatika

4.7.1 Mitose-Index

Die Mitose-Rate gibt im Gegensatz zur Zellzyklusverteilung beim SCE-Test nur über die Proliferationskapazität, d. h. den Anteil der Zellen, der sich teilt, Auskunft, ermöglicht aber keine Aussage über die Geschwindigkeit der ablaufenden Teilungen.

Die Bestimmung des Mitose-Indexes anhand von Normal-Giemsa-gefärbten Präparaten ergab sowohl nach der Behandlung mit den Mistelextrakten als auch nach der Kombinationsbehandlung mit Mistelpräparaten und den einzelnen Zytostatika keine signifikanten Veränderungen. Hieraus kann erstens geschlossen werden, dass die nachgewiesene Abnahme der MN-Frequenz nicht auf zytotoxische Effekte der Mistelpräparate oder eine beschleunigte Proliferation der Phytohämagglutinin-stimulierten mononukleären Zellen zurückzuführen ist. Zweitens wird erkennbar, dass die Mistelextrakte die durch die Zytostatika-Behandlung induzierte MN-Zunahme signifikant reduzieren können, aber keinen Einfluss auf die durch die Zytostatika induzierte Abnahme des Mitose-Indexes haben.

4.7.2 Individuelle Variabilität der spontanen Mikronukleus-Rate

Neben dem Alter, dem Geschlecht, der genetischen Disposition und der individuellen Lebensweise (Ernährung, Alkohol- und Zigarettenkonsum, körperliche Überanstrengung, Schlafdefizit, Infektionen u. ä.) können auch andere Faktoren, die mit der Krankheitsgeschichte oder einer eventuellen mutagenen Belastung am Arbeitsplatz der Probanden zusammenhängen, die Mikrokern-Grundrate beeinflussen. Interindividuelle Unterschiede können auch von der unterschiedlichen Reparaturkapazität gegenüber DNA-Schäden, die zur Bildung von Mikrokernen führen, abhängen (Fenech et al., 1997).

Da alle Probanden zwischen 25 und 35 Jahren alt waren, kann das Alter als ein die Mikrokern-Rate beeinflussender Faktor bei dieser Untersuchung weitgehend ausgeschlossen werden. In der Literatur wird bei Frauen im Vergleich zu Männern von einer erhöhten Mikrokern-Rate berichtet, bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit traten jedoch keine geschlechtsspezifischen Unterschiede bezüglich der Mikronukleus-Frequenz auf. Des Weiteren wurde auch für die Vollblutansätze zur Bestimmung der Mikrokern-Rate darauf geachtet, dass die Probanden Nichtraucher waren, nicht übermäßig Alkohol konsumierten und keine Infektionen und mutagene Belastungen am Arbeitsplatz vorlagen. Individuelle Einflüsse der Lebensweise und der genetischen Veranlagung konnten jedoch sicherlich nicht gänzlich

ausgeschlossen werden und müssen deshalb als Ursachen für interindividuelle Schwankungen angesehen werden.

Da auf die Konstanzhaltung der mit dem Transport der Blutproben, der Blutaufbewahrung, der Kultivierung, der Präparations- und Färbemethoden und der Zählweise zusammenhängenden Faktoren während der Untersuchungsdauer geachtet wurde, konnten diesbezügliche Abweichungen weitgehend ausgeschlossen werden.

4.7.3 Induzierte Mikronukleus-Rate

Der Mikronukleus-Test dient sowohl zur Detektion von Aneugenen als auch Klastogenen. Untersuchungen zur Identifizierung ganzer Chromosomen mittels Kinetochor-Antikörper zeigten, dass ca. 50 % der spontan auftretenden Mikrokerne die Folge von Verlusten ganzer Chromosomen sind, während der Rest wohl aus azentrischen Chromosomenfragmenten entsteht (Fenech et al., 1985a + b).

Da periphere Blutlymphozyten eine maximale Lebensdauer von drei bis vier Jahren haben (Buckton et al., 1967), stellt die spontane Mikrokern-Frequenz akkumulierte genetische Schäden dar, die während der Lebensspanne der Lymphozyten auftreten.

Der Mikronukleus-Test wird heute als ein zuverlässiger Indikator für durch Umwelt-Mutagene induzierte Schäden des Zellgenoms *in vivo* und *in vitro* angesehen (Heddle, 1973; Fenech et al., 1990). Er ist kosteneffektiv, einfach und schnell durchführbar und statistisch präziser als die traditionelle Analyse von Metaphase-Chromosomen bezüglich Chromosomenaberrationen und Schwesterchromatid-Austauschen (Boucher et al., 1993).

Aus diesem Grund wurde der Mikronukleus-Test in dieser Arbeit zur Untersuchung eines möglichen Schutzeffektes von verschiedenen Mistelextrakten auf humane Lymphozyten und nach einer Kombinationsbehandlung der Mistelpräparate mit verschiedenen Zytostatika, die eine hoch signifikante Erhöhung der Mikrokern-Rate induzierten, eingesetzt.

Die Bestimmung der Mikronukleus-Rate nach 71 h Inkubation humaner Lymphozyten gesunder Probanden mit therapeutischen Konzentrationen der Mistelpräparate Helixor A, M und P ergab eine schwach signifikante Abnahme der MN-Frequenz gegenüber dem Kontrollansatz ab einer Konzentration von 10 µg/ml. Beim direkten Vergleich der Extrakte aus der Tannenmistel, der Apfelbaummistel und der Kiefernmistel traten keine wirtsbaumspezifischen oder geschlechtsspezifischen Unterschiede bezüglich der Reduzierung der Mikrokern-Rate auf, so dass diese Schutzwirkung wohl nicht auf den Lektin Gehalt der Frischpflanzenextrakte zurückgeführt werden kann, da dieser zwischen den einzelnen Mistelarten stark variiert (Büssing et al., 1994; Büssing et al., 1995b; Büssing et al., 1996e). Obwohl Mistellektin I als Hauptkomponente für die biologische Aktivität der Mistelextrakte angesehen wird (Hajto et al., 1989), ist sie beispielsweise nur in geringen Mengen im verwendeten Mistelextrakt Helixor Pini gegenüber einem hohen Anteil Mistellektin II/III enthalten. Außer diesen Isolektinen

können noch über eintausend andere von Schink und Mechelke (1992) nachgewiesene Proteine für diese Schutzeffekte der Mistelextrakte bei peripheren Blutlymphozyten in Betracht gezogen werden.

Die Kombinationsbehandlung der mononukleären Blutzellen mit den Mistelextrakten und dem Zytostatikum Cyclophosphamid bewirkte eine signifikante Abnahme der durch CP induzierten Erhöhung der MN-Rate bei einer Konzentration von 7,5 µg/ml, die ab 10 µg/ml hoch signifikant wurde. Bei der Behandlung mit 5-Fluorouracil und Helixor A, M und P zeigte sich eine hoch signifikante Reduzierung der MN-Frequenz ab einer Konzentration von 10 µg/ml und die Untersuchung mit Methotrexat und den Mistelpräparaten ergab eine signifikante Abnahme der Mikronukleus-Frequenz ab 10 µg/ml. Bei der Kombinationsbehandlung der peripheren Lymphozyten mit Mistelextrakten und den verschiedenen Zytostatika konnten keine signifikanten wirtsbaumspezifischen Unterschiede festgestellt werden, d. h. die DNA-stabilisierende Potenz scheint in den Presssäften der verschiedenen Wirtsbäume in gleichem Umfang vorhanden zu sein bzw. zumindest in gleicher Weise zu wirken.

Ein möglicher Grund für diese antimutagene und DNA-stabilisierende Potenz der Helixor-Präparate könnte der hohe Vitamin C-Gehalt der Mistelpresssäfte sein, denn diese antioxidative Substanz wirkt der Entstehung von freien Radikalen entgegen, welche mit der Mutationsentstehung in Verbindung gebracht werden (vgl. 1.1.3.6). Eine Verstärkung des antioxidativen Abwehrsystems durch die Ascorbinsäure könnte zu einer Verminderung der durch die Zytostatika Cyclophosphamid, 5-Fluorouracil und Methotrexat induzierten Erhöhung der Mikrokern- und SCE-Rate geführt haben.

In Tierexperimenten hat sich gezeigt, dass Mistelextrakte das Immunsystem aktivieren. Beuth et al. (1991) injizierten Mäusen ML-I und bestimmten die Makrophagentätigkeit mithilfe des Chemoluminiszenztestes, der als Maß für die Aktivierung von Zellen die Freisetzung von Sauerstoffradikalen misst. Sie stellten gegenüber unbehandelten Mäusen eine signifikant gesteigerte Chemoluminiszenz fest. Auch beim Menschen führte die Iscador Mali-Behandlung zu einer deutlich erhöhten Aktivität der Leukozyten im Chemoluminiszenztest (Hajto et al., 1989).

In der Literatur finden sich zahlreiche Untersuchungen, die sich mit einer möglichen Schutzwirkung der Vitamine C und E gegenüber verschiedenen Mutagenen bzw. Karzinogenen beschäftigen. Beispielsweise konnte die antimutagene Aktivität der Vitamine C und E durch die Ergebnisse von Chromosomenaberrationstests und durch Urin-Mutagenitätsassays nachgewiesen werden. Sram et al. (1983) konnten eine durch Vitamin C verursachte Verminderung der Frequenz der auftretenden Chromosomenaberrationen bei humanen peripheren Lymphozyten und verminderte Urinmutagenität bei Probanden, die verschiedenen Umwelt-Mutagenen ausgesetzt waren, belegen. 1986 zeigte die gleiche Gruppe auch, dass sich das Risiko genetischer Schäden durch Vitamin C-Prophylaxe erheblich reduzieren lässt.

Die Arbeitsgruppen von Green (1994) und Collins (1997) wiesen eine von der Vitamin C-Einnahme abhängige signifikante Abnahme der DNA-Einzelstrangbrüche bei humanen Lymphozyten nach. Ein ähnlicher Schutzmechanismus des Vitamin C konnte auch bei Ficoll-isolierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes festgestellt werden.

Aufgrund ihrer Fähigkeit, die klastogene Aktion alkylierender Agentien zu blockieren, bieten die Vitamine C und E einen natürlichen Schutz vor den klastogenen (und mutagenen bzw. karzinogenen) Wirkungen verschiedener Umwelt-Mutagene (Sram et al., 1983). So konnte bei Mäusen und Ratten nach einer Vitamin C-Verabreichung über das Trinkwasser eine Reduktion der klastogenen Effekte von Röntgenstrahlen beobachtet werden (El-Nahas et al., 1993).

Diemer (1998) untersuchte die Auswirkungen des Zigarettenkonsums und der Supplementierung mit Vitamin C- und Vitamin E-Präparaten auf verschiedene zytogenetische Parameter (Proliferationsverhalten, SCE-Frequenz und Mikrokern-Rate) von Lymphozyten gesunder Raucher und Nichtraucher. Diese in vivo-Studie ergab, dass Mitose-Index und Zellkinetik sich durch die Vitamin-Supplementierung nicht verändern ließen. Auch die SCE-Rate blieb durch die Vitamingaben unbeeinflusst. Dagegen konnte die Mikrokern-Rate bei Rauchern und auch Nichtrauchern mithilfe der Vitaminpräparate deutlich vermindert werden, wobei die Reduzierung der zu beobachtenden Mikrokernmenge bei den rauchenden Probanden größer war als bei den nicht-rauchenden Personen.

Gebhart et al. (1985) setzten die Vitamine C und E als Antiklastogene gegen die Agentien Trenimon und Cyclophosphamid ein. Vergleichende antiklastogene Effekte dieser beiden Vitamine auf die chromosomenschädigende Wirkung von Karzinogenen konnten Shamberger et al. (1973) bei humanen Lymphozyten nachweisen.

Aber auch andere Mistelinhaltsstoffe könnten für diesen antimutagenen Mechanismus der Helixor-Präparate verantwortlich gemacht werden, wie z. B. die Viscotoxine, die Vester'schen Proteine oder andere, noch nicht identifizierte Bestandteile des Mistelpresssaftes. Bei den Viscotoxinen handelt es sich um stark basische zytotoxische Polypeptide, die zur Komplexbildung mit Nukleinsäuren und damit zur Bindung an die außen positiv geladene DNA-Doppelhelix befähigt sind. Sie schützen beispielsweise die native DNA-Struktur gegen Hitzedenaturierung, wobei die Bindung der Viscotoxine an die DNA hauptsächlich ionischer Natur ist und die DNA Konformation durch die Komplexbildung mit den Viscotoxinen nicht verändert wird. Diese Komplexbildung der Viscotoxine ist vergleichbar mit der Interaktion von Histonen, Protaminen, Polylysinen und anderen polykationischen Substanzen mit der DNA-Doppelhelix. Die Bindung an die DNA erfolgt über Phosphatgruppen an der Außenseite der DNA-Doppelhelix und im Gegensatz zur Interaktion mit Histonen, die zur Konformationsänderung führt, bleibt bei der DNA-Viscotoxin-Bindung die B-Typ-Konformation der DNA erhalten (Wojnarowski und Konopa, 1980).

Die Vester'schen Proteine repräsentieren einen Proteinkomplex aus zehn verschiedenen Fraktionen, die zu den Substanzen mit der höchsten zytostatischen Wirkung gehören (vgl. 1.1.3.3). Auch diese Proteingruppe kann sich ähnlich wie Histone an Nukleinsäuren binden und sie könnte damit möglicherweise eine Stabilisierung der DNA-Doppelhelix und eine Verminderung der Sensitivität gegen exogene Agentien bzw. eine Steigerung des DNA-Repairs bewirken und somit eine antimutagene Wirkung im SCE- und MN-Test erklären. Gesicherte Erkenntnisse über den genauen Mechanismus dieser DNA-stabilisierenden Eigenschaften der Mistelextrakte stehen jedoch noch aus und weitere Untersuchungen sind notwendig, um einzelne Inhaltsstoffe des Gesamtextraktes aus *Viscum album L.* für die antimutagene Wirkung verantwortlich machen zu können und zu identifizieren.

4.8 Vergleichende Betrachtung von MN- und SCE-Test

SCE- und MN-Test sind anerkannte Verfahren, um die mutagene Wirkung von Substanzen nachzuweisen.

Studien von Barale et al. (1998) ergaben, dass im Allgemeinen keine Korrelation zwischen MN- und SCE-Rate besteht. Bei der Bildung von SCEs handelt es sich um einen Synthese-Phase-abhängigen Prozess, der in engem Zusammenhang mit der DNA-Replikation und den damit verbundenen Folgen der DNA-Reparaturmechanismen steht (vgl. 1.3.1). Mikronuklei können dagegen in jeder Zellzyklusphase durch eine Vielzahl von Mechanismen entstehen (vgl. 1.4.2). Die Bildung eines Mikronukleus stellt für die betroffene Zelle den Verlust genetischen Materials dar und hat somit in den meisten Fällen deren Tod zur Folge. SCEs hingegen sind das Ergebnis eines reziproken Austauschs von DNA-Molekülen zwischen homologen Genloci zweier Schwesterchromatiden. Dieser Austausch hat keine Veränderung der Chromosomenmorphologie und der genetischen Funktionalität zur Folge.

Trotz unterschiedlicher Entstehungsmechanismen wurde bei einer Vielzahl durchgeführter Untersuchungen eine übereinstimmende Steigerung der SCE- und MN-Rate festgestellt (Cole et al., 1983; Lasne et al., 1984). Diese Beobachtung trifft auch für die hier vorliegenden Ergebnisse zu. Denn es konnte im etwa gleichen Konzentrationsbereich (10–20 µg/ml) eine signifikante bzw. hoch signifikante Abnahme der SCE- und MN-Rate nach 72 h Kombinationsbehandlung humaner Lymphozyten mit den Mistelextrakten *Helixor Abietis*, *Mali* und *Pini* und den Zytostatika Cyclophosphamid, 5-Fluorouracil bzw. Methotrexat nachgewiesen werden.

Nach Morgan und Crossen (1977) soll der SCE-Test sensitiver und somit genauer als der Mikrokern-Test sein, da eine Erhöhung der SCE-Rate bei den von ihnen durchgeführten Untersuchungen in weitaus größerem Maße und bereits in geringeren Konzentrationen feststellbar war als eine Steigerung der Mikrokern-Rate. Dies konnten die vorliegenden Ergebnisse allerdings nur zum Teil bestätigen. Der SCE- und der MN-Test wiesen beide im höch-

ten Konzentrationsbereich der verwendeten Mistelpräparate eine Abnahme der SCE- bzw. MN-Frequenz um ca. 30 % nach. Die Kombinationsbehandlung der isolierten Lymphozyten mit Cyclophosphamid und Helixor A, M und P resultierte in einer signifikanten Abnahme der MN-Rate ab 10 µg/ml, während die SCE-Frequenz bei Helixor A erst ab 15 µg/ml schwach signifikant und bei Helixor M und P ab 10 µg/ml schwach signifikant abnahm. Die Kombinationsbehandlung mit Methotrexat und den Helixor-Extrakten ergab dagegen eine schwach signifikante Abnahme der SCE-Rate durch Helixor A und P ab einer Konzentration von 7,5 µg/ml, während die MN-Rate bei diesen Präparaten erst ab 10 µg/ml signifikant abnahm. Bei Verwendung des Zytostatikums 5-Fluorouracil war schon bei einer Konzentration von 7,5 µg/ml Helixor A, M und P eine signifikante Abnahme der SCE-Rate zu verzeichnen, während die MN-Rate erst ab einer Konzentration von 10 µg/ml hoch signifikant abnahm.

Ein Vorteil des Mikronukleus-Tests gegenüber dem SCE-Verfahren ist sicherlich, dass das bei der Zytokinese-Block-Methode eingesetzte Cytochalasin B weder Mikrokerne noch Chromosomenaberrationen induziert (O'Neill, 1972). Dagegen trägt das zum Sichtbarmachen der SCEs benutzte BrdU selbst zur Bildung von SCEs bei, wobei man allerdings davon ausgeht, dass BrdU in geringen Konzentrationen nur einen geringen Effekt auf die Austauschhäufigkeit hat (Wolff, 1982). Außerdem wird durch den Einbau von BrdU in die DNA die Chromosomenstruktur und -stabilität verändert, die Empfindlichkeit gegenüber Photolyse erhöht (Latt, 1974) und die Zellteilung gehemmt (Kato, 1980; Morgan und Crossen, 1981). Es wurden auch toxische, differenzierungshemmende und mutagene Eigenschaften sowie eine Beeinflussung der Proliferation auf der Ebene der DNA-Replikation festgestellt (Rainaldi und Mariani, 1982).

Als weiterer Vorteil des Mikrokern-Tests gegenüber der SCE-Analyse ist zu nennen, dass die Präparation weniger aufwendig und vor allem auch schneller ist. Die Auswertung der Mikrokerne ist außerdem viel weniger zeitaufwendig als die der SCEs, da Interphasekerne ausgezählt werden, die im Vergleich zu Mitosen viel häufiger auftreten. Beim SCE-Test dürfen dagegen nur vollständige Metaphasen, deren Chromosomen nicht übereinander liegen, bewertet werden. Schließlich kann man Mikrokerne in der Regel gut erkennen und anhand der Auswertungskriterien von Countryman und Heddle (1976) auch leicht identifizieren, wohingegen zur SCE-Identifikation wesentlich mehr Erfahrung benötigt wird.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die apoptoseinduzierende und wachstumshemmende Potenz der Mistelextrakte Helixor Abietis (Tannenmistel), Mali (Apfelbaummistel) und Pini (Kiefernmistel) sowie der isolierten Mistellektine I und III auf die humane Leukämiezelllinie MOLT-4 und isolierte Lymphozyten gesunder Probanden mittels 1- und 2-Parameter-Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Eine mögliche antimutagene und DNA-stabilisierende Wirkung der Frischpflanzenextrakte Helixor A, M und P auf kultivierte Lymphozyten gesunder Versuchspersonen wurde anhand des SCE- und Mikronukleus-Tests untersucht. Sowohl bei der durchflusszytometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Auswertung als auch bei den Mutagenitätstests sollten außerdem eventuelle geschlechtsspezifische und wirtsbaumspezifische Wirkungen der drei unfermentierten Mistelpräparate analysiert werden.

Nach 72 h Inkubation der lymphatischen Leukämiezellen mit den Mistelextrakten Helixor A, M und P (2,5–150 µg/ml) bei unterschiedlichen FKS-Konzentrationen (15–2,5 %) konnte eine dosisabhängige Zunahme der apoptotischen Zellpopulation bei abnehmendem FKS-Gehalt festgestellt werden. Dabei zeigte das Präparat aus der Kiefernmistel die stärkste apoptoseinduzierende und wachstumshemmende Potenz, gefolgt von dem Präparat aus der Apfelbaummistel und dem Extrakt aus der Tannenmistel.

Eine 72 h Kultivierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes gesunder weiblicher und männlicher Probanden mit den drei Helixor-Präparaten (50–200 µg/ml) resultierte ebenfalls in der Induktion des programmierten Zelltodes, wobei auch hier Helixor Pini das stärkste apoptoseinduzierende Potential aufwies. Durchflusszytometrisch und fluoreszenzmikroskopisch konnten keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede nachgewiesen werden. Die Bestimmung der Wachstumsrate mithilfe des Trypanblau-Ausschlusstests ergab jedoch eine signifikant niedrigere Wachstumsrate für Lymphozyten weiblicher Probanden bei Helixor Mali Konzentrationen von 100 und 200 µg/ml.

Für die Leukämiezelllinie MOLT-4 konnte nach 72 h Inkubation mit den Mistellektinen I und III im Konzentrationsbereich von 0,05–20 ng/ml die Induktion des programmierten Zelltodes sowohl durchflusszytometrisch als auch fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden, wobei Mistellektin III die stärkere Wirkung zeigte.

Nach 72 h Kultivierung isolierter Lymphozyten gesunder weiblicher und männlicher Probanden mit den beiden isolierten Lektinen konnte ebenfalls ein signifikanter Anstieg der apoptotischen Zellpopulation verzeichnet werden. Auch hier wies Mistellektin III die stärkere apoptoseinduzierende Potenz auf, signifikante geschlechtsspezifische Unterschiede traten nicht auf.

Die Auswertung des SCE-Tests ergab nach 71 h Inkubation mit den Mistelpräparaten Helixor

A, M und P (2,5–20 µg/ml) eine signifikante Abnahme der SCE-Rate bei Vollblutkulturen gesunder weiblicher und männlicher Probanden. Es traten jedoch keine wirtsbaumspezifischen oder geschlechtsspezifischen Unterschiede auf und auch die Zellzyklusverteilung und das Proliferationsverhalten veränderten sich unter Einwirkung der drei Extrakte nicht.

Nach einer 71 h Kombinationsbehandlung der Helixor-Präparate mit den Zytostatika Cyclophosphamid (40 µg/ml), 5-Fluorouracil (5 µg/ml) bzw. Methotrexat (3 µg/ml) konnte ebenfalls eine Abnahme der SCE-Rate, die durch die drei Zytostatika signifikant erhöht wurde, nachgewiesen werden. Die durch CP, 5'FU und MTH induzierten Veränderungen der Zellzykluskinetik und des Proliferationsindex konnten durch Helixor A, M und P jedoch nicht signifikant beeinflusst werden. Die Bestimmung der SCE-Rate ergab keine wirtsbaumspezifischen oder geschlechtsspezifischen Unterschiede.

Nach Durchführung des Mikronukleus-Tests an Vollblutkulturen gesunder männlicher und weiblicher Blutspender konnte unter Einwirkung der Helixor-Extrakte Abietis, Mali und Pini (2,5–20 µg/ml) eine schwach signifikante Abnahme der MN-Rate festgestellt werden, während der Mitose-Index unbeeinflusst blieb. Auch hier traten keine geschlechtsspezifischen oder wirtsbaumspezifischen Unterschiede auf.

Eine 71 h Kombinationsbehandlung der Lymphozyten mit den Frischpflanzenextrakten (2,5–20 µg/ml) und den Zytostatika CP (40 µg/ml), 5'FU (5 µg/ml) bzw. MTH (3 µg/ml) ergab eine signifikante bzw. hoch signifikante Abnahme der MN-Rate. Geschlechtsspezifische oder wirtsbaumspezifische Unterschiede wurden nicht gefunden. Der Mitose-Index wurde durch die Behandlung nicht wesentlich verändert.

6 Literaturverzeichnis

Ames, B. N./Mc Cann, J./Yamasaki, E. (1975)

Methods for detection carcinogens and mutagens with Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test.
Mutation Research 31, 347–364

Ardito, G./Lamberti, L./Ansaldi, E./Ponzetto, P. (1980)

Sister-chromatid exchanges in cigarette smoking human females and their newborns.
Mutation Research 78, 209–212

Arends, M. J./Morris, R. G./Wyllie, A. H. (1990)

Apoptosis: The role of the endonuklease.
American Journal of Pathology 136 (3), 593–608

Arends, M. J./Wyllie, A. H. (1991)

Apoptosis: Mechanisms and Roles in Pathology.
International Review of Experimental Pathology 42, 223–254

Bantel, E./Breuninger, H. (1990)

In vitro Untersuchungen zur Wirkung eines Mistelpräparates auf Melanomzellen.
Z. Hautkrebs 65 (6), 562–564

Bantel, H./Engels, I. H./Voelter, W./Schulze-Osthoff, K./Wesselborg, S. (1999)

Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis.
Cancer Res 59 (9), 2083–2090

Barale, R./Chelotti, L./Davini, T./Del Ry, S./Andreassi, M. G./Ballardini, M./Bulleri, M./He, J./Baldacci, S./Di Pede, F./Gemignani, F./Landi, S. (1998)

Sister-chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1650 subjects in an Italian population: II. Contribution of sex, age and lifestyle.
Environ Mol Mutagen 31, 228–242

Barlow, B. (1983)

Biographie of Loranthaceae and Viscaceae.
The Biology of Mistletoe, Academic Press, San Diego, 19–46

Bate-Smith, E. C. (1962)

The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance. I. Dicotyledons.
J Linn Soc (Bot.) 58, 95–173

Beek, B./Obe, G. (1979)

SCEs in human leukocyte system: The use of SCEs as possible indicators for mutagenic activities.
Humangenetik 29, 127–134

Becker, H./Nimz, H. (1974)

Untersuchungen des Lignins der Mistel (*Viscum album* L.) in Abhängigkeit von der jeweiligen Wirtspflanze.
Z Pflanzenphysiologie 72, 52–63

Becker, H. (1986)

Botany of European Mistletoe (*Viscum album* L.).
Oncology 43, 2–7

- Bender, M. A./Preston, R. J./Leonard, R. C./Pyatt, B. E./Gooch, P. C. (1992)**
On the distribution of spontaneous SCE in human peripheral blood lymphocytes.
Mutation Research 281, 227–232
- Beuth, J./Ko, H. L./Gabius, H. J./Pulverer, G. (1991)**
Influence of treatment with the immunomodulatory effective dose of the beta-galactoside-specific lectin from mistletoe on tumor colonization in BALB/c-mice for two experimental model systems.
In vivo 5 (1), 29–32
- Beuth, J./Ko, H. L./Gabius, H. J./Burrichter, H./Oette, K./Pulverer, G. (1992)**
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 (8), 658–661
- Beuth, J./Gabius, H. J./Steuer, M./Geisel, J./Steuer, M./Ko, H./Pulverer, G. (1993a)**
Einfluss der Mistellektintherapie auf den Serumspiegel definierter Serumproteine (Akutphaseproteine) bei Tumorpatienten.
Med Klin 88 (5), 287–290
- Beuth, J./Ko, H. L./Tunggal, L./Geisel, J./Pulverer, G. (1993b)**
Vergleichende Untersuchungen zur immunaktiven Wirkung von Galactosid-spezifischem Mistellektin. Reinsubstanz gegen standardisierten Extrakt.
Arzneimittelforschung 43 (2), 166–169
- Beuth, J./Ko, H./Tunggal, L./Buss, G./Jeljaszewicz, J./Steuer, M. K./Pulverer, G. (1994)**
Immunaktive Wirkung von Mistellektin-I in Abhängigkeit von der Dosierung.
Arzneimittel-Forschung 44, 1255–1258
- Beuth, J./Stoffel, B./Ko, H. L./Buss, G./Tunggal, L./Pulverer, G. (1995)**
Immunaktive Wirkung verschiedener Mistellektin I-Dosierungen in Mammakarzinom-Patientinnen.
Arzneimittelforschung/Drug Research 45 (I), 505–507
- Beuth, J. (1997)**
Clinical relevance of immunoactive mistletoe lectin-I.
Anti-Cancer Drugs 8 (1), 53–55
- Bissonnette, R. P./Exheverri, F./Mahboui, A./Green, D. R. (1992)**
Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2.
Nature (Lond.) 359, 552–554
- Bloksma, N./Van Dijk, H./Korst, P./Willers, J. M. (1979)**
Cellular and humoral adjuvant activity of a mistletoe extract.
Immunobiol. 156, 309–319
- Bloksma, N./Schmiermann, P./de Reuver, M./van Dijk, H./Willers, J. (1982)**
Stimulation of humoral and cellular immunity by *Viscum* preparations.
Planta Medica 46, 2–8
- Bosselaers, I. E./Caessens, P. W./Van Boekel, M. A./Alink, G. M. (1994)**
Differential effects of milk proteins, BSA and soy proteins on 4NQO- or MNNG-induced SCEs in V79 cells.
Food. Chem. Toxicol. 32, 905–909

Boucher, R./Livingston, G. K./Que Hee, S. S. (1993)

In vitro micronucleus bioassay of human peripheral lymphocytes for adriamycin in the presence of cyclophosphamide and urines of patients administered anticancer drugs.
Environmental and molecular mutagenesis 21, 372–382

Bradley, M. O./Hsu, I. C./Harris, C. C. (1979)

Relationship between SCE and mutagenicity, toxicity and DNA damage.
Nature 282, 318–320

Bronstein, I. A./Semendjajew, K. A. (1989)

Taschenbuch der Statistik.
Verlag Harri Deutsch, Thun und Frankfurt/Main

Brossier, J. (1969)

Réflexions sur le qui du sapin.
Revue forestière française XXI (6), 558–561

Buckton, K. E./Brown, W. M./Smith, P. G. (1967)

Lymphocyte survival in men treated with x-rays for ankylosing spondylitis.
Nature, 214 (87), 470–473

Büssing, A./Azhari, T./Ostendorp, H./Lehnert, A./Schweizer, K. (1994)

Viscum album L. extracts reduce sister chromatid exchanges in cultured peripheral blood mononuclear cells.
European Journal of Cancer 30A (12), 1836–1841

Büssing, A./Ostendorp, H./Schweizer, K. (1995a)

In-vitro-Effekte von Viscum album L.-Präparationen auf kultivierte Leukämie-Zellen und mononukleäre Zellen des peripheren Blutes.
Tumordiagnostik und Therapie 16, 49–53

Büssing, A./Regnery, A./Schweitzer, K. (1995b)

Effects of Viscum album L. on cyclophosphamide-treated peripheral blood mononuclear cells in vitro: sister chromatid exchanges and activation/proliferation marker expression.
Cancer Letters 94, 199–205

Büssing, A./Schietzel, M./Regnery, A./Schweizer, K. (1995c)

The dual role of Viscum album L. effects: cytostatic and DNA stabilizing properties.
XVI. European Congress of Allergology and Clinical Immunology, 983–987

Büssing, A./Schietzel, M. (1995d)

Viscum album L.: Individuelle Immunreaktionen und spezifische zytostatische Effekte – Konsequenzen für die konventionelle Therapie?
Deutsche Zeitschrift für Onkologie 27 (2), 29–33

Büssing, A./Lehnert, A./Schink, M./Mertens, R./Schweizer, K. (1995e)

Effects of Viscum album L. on rapidly proliferating amniotic fluid cells: Sister chromatid exchange frequency and proliferation index.
Arzneimittelforschung/Drug Research 45 (1), 81–83

Büssing, A./Suzart, K./Bergmann, J./Pfüller, U./ Schietzel, K./Schweizer, K. (1996a)

Induction of apoptosis in human lymphocytes treated with Viscum album L. is mediated by the mistletoe lectins.
Cancer Letters 99, 59–72

Büssing, A. (1996b)

Induction of apoptosis by the mistletoe lectins: A review on the mechanisms of cytotoxicity mediated by *Viscum album* L.
Apoptosis 1, 25–32

Büssing, A./Suzart, K./Schweizer, K./Schietzel, M. (1996c)

Killing und Inflammation: Über die Apoptose-induzierende Potenz von *Viscum album* L.-Extrakten.
Zeitschrift für Onkologie 28 (1), 2–9

Büssing, A./Stumpf, C./Stumpf, R. T./Wutte, H./Schietzel, M. (1996d)

Therapiebegleitende Untersuchung immunologischer Parameter bei Tumor-Patienten nach hochdosierter intravenöser Applikation von *Viscum album* L.-Extrakten.
Zeitschrift für Onkologie 28 (2), 54–59

Büssing, A./Jungmann, H./Suzart, K./Schweizer, K. (1996e)

Suppression of sister chromatid exchange-inducing DNA lesions in cultured peripheral blood mononuclear cells by *Viscum album* L.
J. Exp. Clin. Cancer Res. 15 (2), 107–114

Büssing, A. (1997a)

Mistletoe: A story with an open end.
Anti-Cancer Drugs 8 (1), 1–2

Büssing, A./Suzart, K./Schweizer, K. (1997b)

Differences in the apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts.
Anti-Cancer Drugs 8 (1), 9–14

Büssing, A. (1997c)

Mistletoe therapy and immunological research.
Anti-Cancer Drugs 8 (1), 65

Büssing, A./Suzart, K./Schweizer, K. (1997d)

To live and let die – differences in the apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts.
Anticancer Drugs 8 (1), 9–14

Büssing, A./Stein, G. M./Pfüller, U. (1998a)

Selective killing of CD8+ cells with a `memory` phenotype (CD62L10) by the N-acetyl-galactosamine-specific lectin from *Viscum album* L.
Cell Death and Differentiation 5, 231–240

Büssing, A./Multani, A. S./Pathak, S./Pfüller, U./Schietzel, M. (1998b)

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 an induction of chromosomal affections.
Cancer Letters 130, 57–68

Büssing, A./Schaller, G./Pfüller, U. (1998c)

Generation of reactive oxygen intermediates (ROI) by the thionins from *Viscum album* L.
Anticancer Research 18, 4291–4296

Büssing, A./Wagner, M./Wagner, B./Stein, G. M./Schietzel, M./Schaller, G./Pfüller, U. (1999a)

Induction of mitochondrial Apo2.7 molecules and generation of reactive oxygen-intermediates in cultured lymphocytes by the toxic proteins from *Viscum album* L.
Cancer Letters 139 (1), 79–88

Büssing, A./Stein, G. M./Wagner, M./Wagner, B./Schaller, G./Pfüller, U./Schietzel, M. (1999b)

Accidental cell death and generation of reactive oxygen intermediates in human lymphocytes induced by thionins from *Viscum album* L.
Eur J Biochem 262 (1), 79–87

Carrano, A. V./Thompson, L. H./Lindl, P. A. (1978)

Sister-chromatid exchanges as an indicator of mutagenesis.
Nature 271, 551–553

Carrano, A. V./Minkler, J. L./Stetka, D. G./Moore, D. H. (1980)

Variation in the baseline sister-chromatid exchange frequency in human lymphocytes.
Environmental Mutagenesis 2, 325–337

Catchpole, D. R./Stewart, B. W. (1993)

Etoposide-induced cytotoxicity in two human T-cell leukemic lines: delayed loss of membrane permeability rather than DNA fragmentation as an indicator of programmed cell death.
Cancer Research 53, 4287–4296

Chapman, R. S./Chresta, C. M./Herberg, A. A./Beere, M./Heer, S./Whetton, A. D./Hickman, J. A./Dive, C. (1995)

Further characterisation of the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) assay for the flow cytometric analysis of apoptosis in drug resistant and drug sensitive leukemic cells.
Cytometry 20, 245–256

Chervera, J./Villaescusa, R. (1977)

Inventario de los abetares del valle de Aran afectados por el Muerdago.
Rapport du service de l'I.C.O.N.A. Lerida

Cohen, J. J. (1993)

Apoptosis.
Immunology Today 14 (3), 126–130

Cohen, G. M. (1997)

Caspases: the executioners of apoptosis.
Biochem. J. 326, 1–16

Cole, R. J./Cole, J./Henderson, L./Taylor, N. A./Arlett, C. F./Regan, T. (1983)

A comparison of sister-chromatid exchange and the micronucleus test in mouse foetal liver erythroblasts.
Mutation Research 113, 61–75

Collins, A. R./Duthie, S. J./Fillion, L./Gedik, C. M./Vaughan, N./Wood, S. G. (1997)

Oxidative DNA-damage in human cells: the influence of antioxidants and DNA-repair.
Biochemical Society Transactions 25, 326–331

Collins, R. J./Verschuer, L. A./Harmon, B. V./Prentice, R. L./Pope, J. H./Kerr, J. F. R. (1989)

Spontaneous programmed cell death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro.

British Journal of Haematology 71, 343–350

Comings, D. E. (1975)

Mechanisms of chromosome banding. Hoechst 33258-DNA Interaction.

Chromosoma 52, 229–243

Countryman, P. I./Heddle, J. A. (1976)

The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes.

Mutation Research 41, 321–332

Countryman, P. I./Heddle, J. A. (1977)

A true technique for human lymphocytes.

Human Genetics 35, 197–200

Crossen, P. E./Morgan, W. F. (1977)

Proliferation of PHA- and PWM-stimulated lymphocytes measured by sister-chromatid differential staining.

Cell Immunol 32 (2), 432–438

Darzynkiewicz, Z./Bruno, S./Del Bino, G./Gorczyca, W./Hotz, M. A./Lasota, P. (1992)

Apoptotic cells measured by flow cytometry.

Cytometry 13, 795–808

Darzynkiewicz, Z. (1995)

Apoptosis in antitumor strategies: Modulation of cell cycle and differentiation.

Journal of Cellular Biochemistry 58, 151–159

Darzynkiewicz, Z./Juan, G./Li, X./Gorczyca, W./Murakami, T./Traganos, F. (1997)

Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis).

Cytometry 27, 1–20

Darzynkiewicz, Z./Bedner, E./Traganos, F./Murakami, T. (1998)

Critical aspects in the analysis of apoptosis and necrosis.

Human Cell 11, 3–12

De Arce, M. A. (1981)

The effect of donor sex and age on the number of sister-chromatid exchanges in human lymphocytes growing in vitro.

Human Genetics 57, 83–85

Debatin, K.-M./Goldmann, C. K./Bamford, R./Waldmann, T. A./Krammer, P. H. (1990)

Monoclonal-antibody-mediated apoptosis in adult T-cell leukaemia.

Lancet 335, 497–500

Deknudt, C./Kamra, O. (1983)

Influence of various mitogens on the yield of sister-chromatid exchanges, induced by chemicals in human lymphocytes.

Mutat Res 111 (2), 161–170

Diemer, Kerstin (1998)

Einfluss des Zigarettenkonsums und der Vitamine C und E auf humane Blutlymphozyten.
Diplomarbeit Universität Kaiserslautern

Dietrich, J. B./Ribéreau-Gayon, G./Jung, M. L./Franz, H./Beck, J. P./Anton, R. (1992)

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

Doser, C./Doser, M./Hulsen, H./Mechelke, F. (1989)

Influence of carbohydrates on the cytotoxicity of an aqueous mistletoe drug and purified mistletoe lectins tested on human T-leukemia cells.
Arzneimittelforschung 39 (6), 647–651

Duke, R. C./Ojcius, D. M./Young, J. D. (1997)

Die Apoptose – Regeln und Fehler beim Zellselbstmord.
Spektrum der Wissenschaft 2, 26–35

Duvall, E./Wyllie, A. H. (1986)

Death and the cell.
Immunology Today 7, 115

Ellis, R. E./Yuan, J./Horvitz, H. R. (1991)

Mechanisms and functions of cell death.
Annu Rev Cell Biol 7, 663–698

EI-Nahas, S. M./Mattar, F. E./Mohamed, A. A. (1993)

Radioprotective effect of vitamin C and E.
Mutation Research 301, 143–147

Elsässer-Beile, U./Lusebrink, S./Grussenmeyer, T./Wetterauer, U./Schultze-Seemann, W. (1998)

Comparison of the effects of various clinically applied mistletoe preparations on peripheral blood leukocytes.
Arzneimittelforschung 48 (12), 1185–1189

Endo, Y./Tsurugi, K./Franz, H. (1988)

The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes: the RNA N-glycosidase activity of the protein.
FEBS Letters 231, 378–380

Evans, H. J./O'riardan, M. L. (1975)

Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests.
Mutation Research 31, 135–148

Fenech, M./Morley, A. (1985a)

Solutions to the kinetic problems in the micronucleus assay.
Cytobios 43, 233–246

Fenech, M./Morley, A. (1985b)

Measurements of micronuclei in lymphocytes.
Mut. Res. 147, 29–36

Fenech, M./Denham, J./Francis, W./Morley, A. (1990)

Mikronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes of cancer patients following fractionated partial-body radiotherapy.
Int J Radiat Biol 57, 373–383

Fenech, M./Dreosti, I./Aitken, C. (1997)

Vitamin E supplements and their effect on vitamin-E status in blood and genetic damage in peripheral blood lymphocytes.
Carcinogenesis 18, 359–364

Florack, D. E. A./Stiekema, W. J. (1994)

Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of actions.
Plant Mol Biol 26, 25–37

Franz, H./Ziska, P./Kindt, A. (1981)

Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album* L.).
Biochem. J. 195, 481–484

Franz, H./Ziska, P./Kindt, A. (1982)

A simple method for the preparation of the two different chains of the mistletoe lectin.
Lectins – Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry. Walter de Gruyter & Co., Berlin

Franz, H. (1985)

Inhaltsstoffe der Mistel (*Viscum album* L.) als potentielle Arzneimittel.
Pharmazie 40 (2), 97–104

Franz, H. (1986)

Mistletoe lectins and their A and B chains.
Oncology 43, 23–34

Freeman, D. A./Crissman, H. (1975)

Evaluation of six fluorescent proteins stains for use in flow microfluorimetry.
Stain Technology 50, 279–284

Freudenberg, K. (1968)

Constitution and biosynthesis of lignin.
In: Freudenberg, K./Neish, A. C. (eds.), Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York

Funes-Cravioto, F./Zapata-Gayon, C./Kolmodin-Hedman, B./Lambert, B./Lindstren, J./Norberg, E./Nordenskjold, M./Olin, R./Swensson, A. (1977)

Chromosome aberrations and sister-chromatid exchange in workers in chemical laboratories and an rototyping factory and in children of women laboratory workers.
Lancet. 13 (2), 322–325

Ganguly, B. B. (1993)

Cell division, chromosomal damage and micronucleus formation in peripheral lymphocytes of healthy donors related to donor's age.
Mutat Res 3, 135–148

Gebhart, E./Lösing, J./Wopfner, F. (1980a)

Chromosome studies on lymphocytes of patients under cytostatic therapy. I. Conventional chromosome studies in cytostatic interval therapy.
Human Genetics 55, 53–63

Gebhart, E./Windolph, B./Wopfner, F. (1980b)

Chromosome studies on lymphocytes of patients under cytostatic therapy. II. Studies using the BUDR-labelling technique in cytostatic interval therapy.
Human Genetics 56, 157–167

Gebhart, E./Wagner, K./Grziwok, K./Behnsen, H. (1985)

The action of anticlastogens in human lymphocyte cultures and their modification by rat-liver s9-mix: studies with vitamins C and E.
Mutation Research 149, 83–94

Giri, A. K./Lu, L. J. (1995)

Genetic damage and the inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced genetic damage by the phytoestrogens, genistein and daidzein, in female ICR mice.
Cancer Letters 95, 125–133

Göckeritz, W./Körner, I. J./Kopp, J. (1994)

Mistletoe lectins: Comparative studies on cytotoxicity, receptor binding and their effect on the cytosolic calcium content in human lymphocytes.

In: Van Driesche, E./Fischer, J./Beeckmans, S./Bog-Hansen, T. C. (eds.), *Textrop*, Denmark

Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry 8, 345–354

Goedings, P. (1993)

Die Bilde-Prozesse der Mistel. Teil 1.
Der Merkurstab 46, 566–589

Goedings, P. (1994)

Die Bilde-Prozesse der Mistel. Teil 2.
Der Merkurstab 47, 49–72

Green, M. H. L./Lowe, J. E./Waugh, A. P. W./Aldrige, K. E./Cole, J./Arlett, C. F. (1994)

Effect of diet and vitamin C on DNA strand breakage in freshly-isolated white blood cells.
Mutation Research 316, 91–102

Hahn, P. (1996)

Durchflusszytometrische und zytogenetische Untersuchungen zur Wirkung von Mistletoe-extrakten auf menschliche Zellkulturen.

Diplomarbeit Universität Kaiserslautern

Hajto, T. (1986a)

Immunomodulatory effects of Iscador: a *Viscum album* preparation.
Oncology 43 (1), 51–65

Hajto, T./Lanzrein, C. (1986b)

Natural-killer and antibody-dependent-cell-mediated-cytotoxicity activities and large granular lymphocyte frequencies in *Viscum album*-treated breast-cancer patients.

Oncology 43 (2), 93–97

Hajto, T./Hostanska, K./Gabijs, H. J. (1989)

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 (17), 4803–4808

Hajto, T./Hostanska, K./Frei, K./Rordorf, C./Gabius, H. J. (1990a)

Increased secretion of tumor necrosis factors alpha, interleukin 1 and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to beta-galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract.

Cancer Res. 50 (11), 3322–3326

Hajto, T./Hostanska, K./Gabius, H.-J. (1990b)

Zytokine als Lektin-induzierte Mediatoren in der Misteltherapie.

Therapeutikon 4 (3), 136–145

Halicka, H. D./Seiter, K./Feldman, E. J./Traganos, F./Mittelman, A./Ahmed, T./Darzynkiewicz, Z. (1997)

Cell cycle specificity of apoptosis during treatment of leukemias.

Apoptosis 2 (1), 25–40

Hamprecht, K./Handgretinger, R./Voetsch, W./Anderer, F. A. (1987)

Mediation of human NK-activity by components in extracts of *Viscum album* L.

Int. J. Immunopharmac. 9 (2), 199–209

Harborne, J. B. (1973)

Flavonoids as systematic markers in the angiosperms.

In: Bendz, G. Santesson, J. (eds.) *Chemistry in botanical classification*. Nobel 25, Academic Press, New York

Hawksworth, F. (1983)

Mistletoe as Forest Parasites.

Academic Press, New York

Heddle, J. A. (1973)

A rapid in vivo test for chromosomal damage.

Mutation Research 18, 187–190

Heddle, J. A./Benz, R. D./Countryman, P. I. (1978a)

Measurement of chromosomal breakage in cultured cells by the micronucleus technique.

In: Evans, H. J.(Lloyd, D. C. (eds.): *Mutagen-induced chromosomal damage in man*. Edinburgh University Press, 191–200

Heddle, J. A./Lue, C. B./Saunders, E. F./Benz, R. D. (1978b)

Sensitivity to five mutagens in Franconi's Anemia as measured by the micronucleus method.

Cancer Research 38, 2983–2988

Heddle, J. A./Cimino, M. C./Hayashi, M./Romagna, F./Shelby, M. D./Tucker, J. D./Vanparys, P./Mac Gregor, J. T. (1991)

Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present, and future.

Environmental and Molecular Mutagenesis 18, 277–291

Hedner, K./Högstedt, B./Kolnig, A. M./Mark-Vendel, E./Strömbeck, B./Mittelman, F. (1982)

Sister-chromatid exchanges and structural chromosome aberrations in relation to sex and age.

Human Genetics 62, 305–309

Heiny, B. M./Beuth, J. (1994a)

Mistletoe extract standardized for the galactoside-specific lectin (ML-I) induces beta-endorphin release and immunopotential in breast cancer patients.
Anticancer Res. 14 (3B), 1339–1342

Heiny, B. M./Beuth, J. (1994b)

Das Lektin der Mistel als Immunmodulator: Effektorwirkung auf β -Endorphin- und Zytokinausschüttung bei Mammakarzinom-Patientinnen.
Deutsche Zeitschrift für Onkologie 26, S. 103–108

Hengarter, M. O./Horvitz, H. R. (1994)

C. elegans cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*.
Cell 76, 665–676

Hollander, D. H./Tockman, M. S./Liang, Y. W./Borgaonkar, D. S./Frost, J. K. (1978)

Sister-chromatid exchanges in peripheral blood of cigarette smokers and in lung cancer patients and the effect of chemotherapy.
Human Genetics 44, 165–171

Huang, C. C. (1987)

Retinol (vitamin A) inhibition of dimethylnitrosamine (DMN) and diethylnitrosamine (DEN) induced sister-chromatid exchanges in V79 cells and mutations in Salmonella/microsome assays.
Mutation Research 187, 133–140

Hülsen, H./Mechelke, F. (1982)

The influence of a mistletoe preparation on suspension cell cultures of human leukemia and human myeloma cells.
Arzneimittel-Forschung/Drug Research 32 (II) Nr. 9, 1126–1127

Hülsen, H./Born, U. (1993)

Einfluss von Mistelpräparaten auf die In-vitro-Aktivität der natürlichen Killerzellen von Krebspatienten (Teil 2).
Therapeutikon 7 (10), 434–439

Husgafvel-Pursiainen, K./Mäki-Paakkanen, J./Noppa, H./Sorsa, M. (1980)

Smoking and sister-chromatid exchange.
Hereditas 92, 247–250

Husum, B./Wulf, H. C./Niebuhr, E./Rasmussen, J. A. (1985)

SCE in lymphocytes of patients treated with single, large dosis of diazepam.
Mutation Research 155, 71–73

Ikushima, T. (1977)

Role of sister-chromatid exchanges in chromatid aberration formation.
Nature 268, 235–236

Janssen, O./Scheffler, A./Kabelitz, D. (1993)

In vitro effects of mistletoe extracts and mistletoe lectins. Cytotoxicity towards tumor cells due to the induction of programmed cell death (apoptosis).
Arzneimittelforschung 43 (11), 1221–1227

Jonas, L./Walzel, H. (1992)

Comparative studies on internalization of gold-labelled mistletoe lectin I, its subunits, as well as of an immunotoxin in murine L1210 leukemia cells.
Acta Histochem. Suppl. 41, 73–79

Jung, M. L./Baudino, S./Ribéreau-Gayon, G./Beck, J. P. (1990)

Characterization of cytotoxic proteins from mistletoe (*Viscum album* L.).
Cancer Lett. 51 (2), 103–108

Kast, A./Hauser, S. P. (1990a)

Helixor – Mistelpräparate für die Krebstherapie. Dokumentation Nr. 19.
Schweiz. Rundsch. Med. Prax. 79 (10), 291–295

Kast, A./Hauser, S. P. (1990b)

Vysorel/Isorel – Krebstherapeutikum aus *Viscum album*. Dokumentation Nr. 20.
Schweiz. Rundsch. Med. Prax. 79 (11), 332–334

Kato, H. (1977a)

Spontaneous and induced sister-chromatid exchanges as revealed by the BudR-labelling method.
Int Rev Cytol 49, 55–93

Kato, H. (1977b)

Mechanisms for sister-chromatid exchanges and their relation to the production of chromosomal aberrations.
Chromosoma 59, 179–191

Kato, H. (1980)

Evidence that the replication is the point of sister-chromatid exchange.
Cancer Genetics and Cytogenetics 2, 69–77

Kauderer, B./Zamith, H./Paumgarten, F. J. R./Speit, G. (1991)

Evaluation of the mutagenicity of β -myrcene in mammalian cells in vitro.
Environ. Mol. Mutagen. 18, 28–34

Kelly, F./Sambrock, J. (1973)

Differential effect of cytochalasin B on normal and plasma vitamin E levels in humans.
Am J Clin Nutr 33, 217–219

Kerr, J./Wyllie, A./Currie, A. (1972)

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.
Br. J. Cancer 26, 239–248

Kerr, J. F. R./Winterford, C. M./Harmon, B. V. (1994)

Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy.
Cancer 73 (8), 2013–2026

Konopa, J./Woynarowski, J. M./Lewandowska-Gumieniak (1980)

Isolation of viscotoxins, cytotoxic basic polypeptides from *Viscum album* L.
Hoppe Seyler's Zeitung für Physiologische Chemie 361, 1525–1533

Kovacs, E./Hajto, T./Hostanska, K. (1991)

Improvement of DNA-repair in lymphocytes of breast-cancer patients treated with *Viscum album* extract (Iscaador).
Eur. J. Cancer 27 (12), 1672–1676

Kroemer, G./Zamzami, N./Susin, S. A. (1997)

Mitochondrial control of apoptosis.
Immunol Today 18, 44–51

Kumar, S./Baxter, G. D./Smith, P. J./Pemble, L./Collins, R. J./Prentice, R. L./Lavin, M. F. (1987)

DNA fragmentation in childhood T-cell acute lymphoblastic leukaemia.
Molecular Biology in Medicine 4, 111–121

Kurvink, K./Bloomfield, C. D./Cervenka, J. (1978)

Sister-chromatid exchange in patients with viral disease.
Exp Cell Res 113, 450

Kuttan, G. (1993)

Tumoricidal activity of mouse peritoneal macrophages treated with *Viscum album* extract.
Immunological Investigations 21, 285–296

Larripa, J./Matos, E./Labal de Vinusesa, M./Briex de Salum, S. (1983)

Sister-chromatid exchanges in a human population accidentally exposed to an organophosphorus pesticide.
Rev Brasil Genet VI (4), 719–727

Lasne, C./Gu, Z. W./Venegas, W./Chouroulinkov, I. (1984)

The in vitro micronucleus assay for detection of cytogenetic effects induced by mutagen-carcinogens: comparison with the in vitro sister-chromatid exchange assay.
Mutation Research 130, 273–282

Latt, S. A. (1974)

Sister-chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by mitomycin C.
C Proc Natl Acad Sci 70, 3162–3166

Latt, S. A. (1981)

Sister chromatid exchange formation.
Ann Rev Genet 15, 11–55

Lazutka, J. R./Rudaiene, S. (1992)

Modulation by novobiocin of sister-chromatid exchanges by tumor necrosis factor in human lymphocytes.
Mutation Research 268, 217–221

Lennon, S. V./Martin, S. J./Cotter, T. G. (1991)

Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli.
Cell Proliferation 24, 203–214

Leroi, R. [Hrsg.] (1987)

Misteltherapie – Eine Antwort auf die Herausforderung Krebs. Die Pioniertat Rudolf Steiners und Ita Wegmans.
Verlag Freies Geistesleben, Stuttgart

Lizard, G. L./Fournel, S./Genestier, L./Dhedin, N./Chaput, C./Flacher, M./Mutin, M./Panaye, G./Revillard, J. P. (1995)

Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis.

Cytometry 21, 275–283

Lorch, E. (1993)

Neue Untersuchungen über Flavonoide in *Viscum album* L. ssp. *abietis*, *album* und *austriacum*.

Zeitschrift für Naturforschung 48c, 105–107

Luther, P./Becker, H. (1987)

Die Mistel. Botanik, Lektine, medizinische Anwendung.

Springer-Verlag, Berlin

Mangenot, G./Rebette, J./Rouchier, A. (1948)

Sur le mucilage du gui.

C. R. Acad. Sci Paris 227, 429–441

Matthiessen, P. F./Tröger, W. (1995)

Die Misteltherapie des Krebses.

Kombinierte Tumortherapie, Hrsg. Heinrich Wrba, Hippokrates Verlag Stuttgart

Männel, D. N./Becker, H./Gundt, A./Kist, A./Franz, H. (1991)

Induction of tumor necrosis factor expression by a lectin from *Viscum album* L.

Cancer Immunol. Immunother. 33, 177–182

Mertens, R./Severin, K./Habedank, M. (1993)

Effect of human and recombinant IFN-alpha and IFN-beta on the sister-chromatid exchange (SCE) frequency in amniotic fluid cells in vitro.

Mutations Research 300, 195–200

Metzner, G./Franz, H./Kindt, A./Fahlbusch, B./Süss, J. (1985)

The in vitro activity of lectin 1 from mistletoe (ML 1) and its isolated A and B chains on functions of macrophages and polymorphonuclear cells.

Immunobiol. 169, 461–472

Minowada, J./Tsubota, T./Nakazawa, S./Srivastava, B. I. S./Huang, C. C./Oshimura, M./Sonta, S./Han, T./Sinks, L. F./Sandberg, A. A. (1977)

Establishment and characterization of leukemic T-cell lines, B-cell lines and null-cell line: a progress report on surface antigen study of fresh lymphatic leukemias in man.

Journal of Haematology and Blood Transfusion 20, 241–251

Möckel, B./Schwarz, T./Zinke, H./Eck, J./Langer, M./Lentzen, H. (1997)

Effects of mistletoe lectin I on human blood cell lines on peripheral blood cells. Cytotoxicity, apoptosis and induction of cytokines.

Arzneimittelforschung 47 (10), 1145–1151

Morgan, W. F./Crossen, P. E. (1977)

The incidence of sister-chromatid exchange on cultured human lymphocytes.

Mutation Research 42, 305–312

Morgan, W. F./Crossen, P. E. (1981)

Factors influencing sister-chromatid exchanges in cultured human lymphocytes.

Mutation Research 81, 395–402

Morris, R. G./Duvall, E. D./Hargreaves, A. D./Wyllie, A. H. (1984)

Changes in the cell surface of apoptotic thymocytes.
Ann J Pathol 115, 426–436

Morris, S. M./Aidoo, A./Domon, O. E./McGarrity, L. J./Kodell, R. L./Schol, H. M./Hinson, W. G./Pipkin, J. L./Casciano, D. A. (1990)

Effect of interleukin-2 on cell proliferation, sister-chromatid exchange induction, a nuclear stress protein phosphorylation in PHA-stimulated Fischer 344 rat spleen lymphocytes: modulation by 2-mercaptoethanol.
Environ Mo Mutagen 15, 10–18

Murthy, P. B. K./Prema, K. (1979)

Sister-chromatid exchanges in oral contraceptiva users.
Mutation Research 68, 149–152

Nicoletti, I./Migliorati, G./Pagliacci, M. C./Grignani, F./Riccardi, C. (1991)

A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry.
Journal of Immunological Methods 139, 271–279

Nicholson, D. N./Thornberry, N. A. (1997)

Caspases: killer proteases.
Trends Biochem. Sci. 22, 299–306

Nimz, H./Lüdemann, H.-D./Becker, H. (1974)

Kohlenstoff-13-Kernresonanzspektren von Ligninen, 4. Die Lignine der europäischen Mistel (*Viscum album* L.).
Z Pflanzenphysiologie 73, 226–233

Obe, G. (1970)

Die Wirkung von Streptomycin und Dihydrostreptomycin auf menschliche Chromosomen in vitro.
Molec Gen Genetics 107, 361–365

Olson, T./Samuelsson, G. (1970)

Purification of Viscotoxin Aox2 from the european mistletoe (*Viscum album* L.) by chromatography on DEAE Cellulose.
Acta chem Scand 24, 720–721

O'Neill, F. J. (1972)

Chromosome pulverisation in cultured normal and neoplastic cells treated with cytochalasin B.
J Natl Cancer Inst 49, 1733–1737

o. V. (1995)

Richtlinien für die Therapie mit Helixor. Ein Kompendium der praktischen Misteltherapie.
Helixor Heilmittel GmbH & Co., Rosenfeld

Otto, F. J. (1977)

High-resolution analysis of nuclear DNA employing the fluorochrome DAPI.
Methods in Cell Biology 41, 211–217

Painter, R. B. (1980)

A replication model for sister-chromatid exchange.
Mutation Research 70, 337–341

Paprocka, M./Wiedlocha, A./Walzel, H./Radzikowski, C. (1992)

The activity of two immunotoxins composed of monoclonal antibody MoAb-16 and A-chain of ricin (MoAb-16-RTA) or A-chain of mistletoe lectin 1 (MoAb-16-MLIA).
Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.) 40 (3–4), 223–227

Perry, P./Wolff, S. (1974)

New giemsa method for the differential staining of sister-chromatids.
Nature 251, 156–158

Perry, P./Evans, H. J. (1975)

Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister-chromatid exchange.
Nature 258, 121–125

Pschyrembel – Klinisches Wörterbuch (1994)

Walter de Gruyter Verlag Berlin, New York

Rainaldi, R./Mariani, T. (1982)

The distribution of induced sister-chromatid exchanges: a tool for identifying agents directly interacting with DNA.
Mutation Research 103, 333–337

Raposa, T. (1978)

Sister chromatid exchange studies for monitoring DNA damage and repair capacity after cytostatics in vitro and in lymphocytes of leukemic patients under cytostatic therapy.
Mutat Res 57, 241–251

Ribéreau-Gayon, G./Jung, M. L./Baudino, S./Salle, G./Beck, J. P. (1986a)

Effects of mistletoe (*Viscum album* L.) extracts on cultured tumor cells.
Experientia 42 (6), 594–599

Ribéreau-Gayon, G./Jung, M. L./Di Scala, D./Beck, J. P. (1986b)

Comparison of the effects of fermented and unfermented mistletoe preparations on cultured tumor cells.
Oncology 43 (1), 35–41

Ribéreau-Gayon, G. (1992)

Entwicklung eines Bio-Assay der Lektine.
Referat Wissenschaftliches Symposium „Mistelwirkstoffe und Krebstherapie – Stand der aktuellen Forschung“; Tübingen, 26. September 1992

Ribéreau-Gayon, G./Jung, M.-L./Beck, J.-P./Anton, R. (1995)

Effect of fetal calf serum on the cytotoxic activity of mistletoe (*Viscum album* L.) lectins in cell culture.
Phytotherapy Research 9, 336–339

Ribéreau-Gayon, G./Dumont, S./Müller, C./Jung, M. L./Poindron, P./Anton, R. (1996)

Mistletoe lectins I, II and III induce the production of cytokines by cultured human monocytes.
Cancer Lett 109, 33–38

Ribéreau-Gayon, G./Jung, M. L./Frantz, M./Anton, R. (1997)

Modulation of cytotoxicity and enhancement of cytokine release induced by *Viscum album* L. extracts or mistletoe lectins.
Anti-Cancer Drugs 8 (1), 3–8

Salzer, G./Havelec, L. (1978)

Rezidivprophylaxe bei operierten Bronchuskarzinompatienten mit dem Mistelpräparat Is-cador. Ergebnisse eines klinischen Versuchs aus den Jahren 1969-1971.
Onkologie 1 (6), 264–267

Samuelsson, G./Pettersson, B. (1970)

Separation of viscotoxins from european mistletoe, *Viscum album* L. (Loranthaceae), by chromatography on sulfoethyl Sephadex.
Acta Chem. Scand. 24, 2751–2756

Santesson, B./Lindahl-Kiessling, K./Mattson, A. (1979)

SCE in B- and T-lymphocytes. Possible implications for Bloom's syndrome.
Clin Genet 16, 133–135

Schaller, G./Urech, K./Giannattasio, M. (1996)

Cytotoxicity of different viscotoxins and extracts from European subspecies of *Viscum album* L.
Phytother Res 10, 473–477

Scheer, R./Scheffler, A./Errenst, M. (1992)

Two harvesting times, summer and winter: Are they essential for preparing pharmaceuticals from mistletoe (*Viscum album* L.)?
Planta medica 58 (1), 594

Scheer, R. (1994)

Prozess-Standardisierung: Grundlage einer sachgemäßen Qualitätssicherung von Mistelpräparaten.
Erfahrungsheilkunde 43, 305–310

Scheer, R./Errenst, M./Scheffler, A. (1995)

Wirtsbaumspezifische Unterschiede von Mistelpräparaten.
Deutsche Zeitschrift für Onkologie 27, 143–149

Scheffler, A./Fiebig, H. H./Kabelitz, D./Metelmann, H. R. (1993)

Zur direkten Zytotoxizität von Mistelpräparaten.
Erfahrungsheilkunde 6, 338–346

Scheffler, A./Musielski, H./Scheer, R. (1995)

Synergismus zwischen Lektinen und Vesikeln von *Viscum album* L.
Deutsche Zeitschrift für Onkologie 27 (3), 72–75

Schindler, H. (1955)

Inhaltsstoffe und Prüfungsmethoden homöopathisch verwendeter Arzneipflanzen.
Editio Cantor, Aulendorf

Schink, M./Mechelke, F. (1989)

Sex-correlated differences in the protein pattern of *Viscum album* L. (Mistletoe).
Naturwissenschaften 79, 29–30

Schink, M./Mechelke, F. (1992)

Two-dimensional isolectin patterns of the lectins from *Viscum album* L. (Mistletoe).
Naturwissenschaften 79, S. 80–81

Schmitz, R./Rohde, V. (1994)

Durchflusszytometrie in der klinischen Diagnostik.
Schattauer-Verlag, Stuttgart

Schultze, J. L./Stettin, A./Berg, P. A. (1991)

Demonstration of specifically sensitized lymphocytes in patients treated with an aqueous mistletoe extract (*Viscum album* L.).
Klin. Wochenschr. 69 (9), 397–403

Schumacher, U./Stamouli, A./Adam, E./Peddie, M./Pfüller, U. (1995)

Biochemical, histochemical and cell biological investigations on the actions of mistletoe lectins I, II and III with human breast cancer cell lines.
Glycoconjugate Journal 12, 250–257

Schwartz, L. M./Osborne, B. A. (1993)

Programmed cell death, apoptosis and killer genes.
Immunology Today 14 (12), 582–590

Selawry, O./Schwartz, M. (1961)

Growth inhibition reversal studies with *Viscum album* in cell culture.
Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 3, 267

Sen, S./D'Incalci, M. (1992)

Apoptosis. Biochemical events and relevance to cancer chemotherapy.
FEBS Letters 307, 122–127

Shamberger, R. J./Baugham, F. F./Kalchert, S. L./Willis, C. E./Hoffman, G. C. (1973)

Carcinogen-induced chromosomal breakage decreased by antioxidants.
Proc Natl Acad Sci 70, 1461–1463

Shiraishi, Y./Sandberg, A. A. (1979)

Effects of various chemical agents on sister-chromatid exchanges, chromosome aberrations and DNA-repair in normal and abnormal human lymphoid cell lines.
Journal of the National Cancer Institute 62, 27–35

Speit, G. (1980)

Effect of temperature on sister-chromatid exchange.
Human Genetics 55, 333–336

Speit, R./Düring, R./Mehnert, K. (1986)

Variation in the frequency of sister-chromatid exchanges in repeated human lymphocyte cultures.
Human Genetics 72, 179–181

Sram, R. J./Dobias, L./Pastorkova, A./Rössner, P./Janca, L. (1983)

Effect of ascorbic acid prophylaxis on the frequency of chromosome aberrations in the peripheral lymphocytes of coal-tar workers.
Mutation Research 120, 181–186

Sram, R. J./Cerná, M./Hola, N. (1986)

Effect of ascorbic acid prophylaxis in groups occupationally exposed to mutagens.
Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and applied Mutagenesis, 327–335

Stein, G. M./Berg, P. A. (1994)

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

Stein, G. M. (1995)

Untersuchungen zur Interaktion von Mistelantigenen mit dem Immunsystem.
Dissertation Universität Tübingen

Stein, G. M./Berg, P. A. (1997a)

Mistletoe extract-induced effects on immunocompetent cells: in vitro studies.
Anti-Cancer Drugs 8 (1), 39–42

Stein, G. M./Stettin, A./Schultze, J./Berg, P. A. (1997b)

Induction of anti-mistletoe lectin antibodies in relation to different mistletoe extracts.
Anti-Cancer Drugs 8 (1), 57–59

Stein, G. M./Henn, W./von Laue, B./Berg, P. A. (1998a)

Modulation of the cellular and humoral immune responses of tumor patients by mistletoe therapy.
Eur. J. Med. Res. 3, 194–202

Stein, G. M./Berg, P. A. (1998b)

Modulation of cellular and humoral immune responses during exposure of healthy individuals to an aqueous mistletoe extract.
Eur. J. Med. Res. 3, 307–314

Stein, G. M./Berg, P. A. (1999)

Characterisation of immunological reactivity of patients with adverse effects during therapy with an aqueous mistletoe extract.
Eur J Med Res 4 (5), 169–177

Steiner, R. (1961)

Geisteswissenschaft und Medizin.
Rudolf Steiner Nachlassverwaltung, Dornach

Stettin, A./Schultze, J. L./Stechemesser, E./Berg, P. A. (1990)

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 (18), 896–900

Stirpe, F./Legg, R. F./Onyon, L./Ziska, P./Franz, H. (1980)

Inhibition of protein synthesis by a toxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe).
Biochem. Journal 190, 843–845

Stöhr, M./Eipel, H./Goerttler, K./Vogt-Schaden, M. (1977)

Extended application of flow microfluorometry by means of dual laser excitation.
Histochemistry 51, 305–313

Straßburger, E./Noll, F./Schenk, H./Schimper, A. F. (1978)

Lehrbuch der Botanik.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York 805–806

Timoshenko, A. V./Gabijs, H. J. (1995)

Influence of the galactoside-specific lectin from *Viscum album* and its subunits on cell aggregation and selected intracellular parameters of rat thymocytes.
Planta Med. 61, 130–133

Trauth, B. C./Klas, C./Peters, A. M. J. (1989)

Monoclonal antibody-mediated tumour regression by induction of apoptosis.
Science 245, 301

Tronchet, J. (1972)

L'Equipment flavonique „de surface“ de sujets de *Viscum album* L., developpes sur six hotes differents.
Ann Sci Univ Besonçon Bot 13, 1

Trump, B. F./Berezesky, I. K. (1992)

The role of cytosolic Ca^{2+} in cell injury, necrosis and apoptosis.
Current Opinion in Cell Biology 4, 227–232

Tubeuf, Frh. von K. (1923)

Monographie der Mistel.
R. Oldenburg. München, Berlin

Ulrich, W./Mechelke, F. (1980)

Reaktion der In-vitro-Kulturen von menschlichen Fibroblasten, HeLa-Zellen und von murinen L-Zellen bei Applikation eines Präparates aus *Viscum album* L.
Arzneim.-Forsch. 30 (10), 722–725

Urech, K./Schaller, G./Ziska, P./Giannattasio, M. (1995)

Comparative study on the cytotoxic effect of viscotoxin and mistletoe lectin on tumour cells in culture.
Phytotherapy Research 9, 49–55

Vermes, I./Haanen, C. (1994)

Apoptosis and programmed cell death in health and disease.
Advancer in clinical chemistry 31, 177–228

Vester, F./Mai, W. (1960)

Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe von *Viscum album* L.; I. Freie Aminosäuren.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 322, 273–277

Vester, F./Bohne, L./El-Fouly, M. (1968)

Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe von *Viscum album* L.; IV. Biologisches Verhalten einzelner Proteinfraktionen.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 495–511

Vester, F. (1977)

Über die kanzerostatischen und immunogenen Eigenschaften von Mistelproteinen.
Krebsgeschehen 5, 106–114

Waksvik, H./Magnus, P./Berg, K. (1981)

Effects of age, sex and genes on sister-chromatid exchange.
Clinical Genetics 20, 449–454

Walzel, H./Jonas, L./Rosin, T./Brock, J. (1990)

Relationship between internalization kinetics and cytotoxicity of mistletoe lectin 1 to L1210 leukaemia cells.
Folia Biol. (Praha) 36 (3–4), 181–188

Wang, P./Con, X./Dong, Z./Chen, C. (1991)

A genetic study of human interferon a induced repair of DNA-damage in hepatitis B patients.

Mutation Research 262, 125–128

Wildfeuer, A./Mayerhofer, D. (1994)

Untersuchung des Einflusses von Phytopräparaten auf zelluläre Funktionen der körpereigenen Abwehr.

Arzneimittelforschung 44 (3), 361–366

Winterfeld, K./Bijl, H. (1948)

Viscotoxin, ein neuer Inhaltsstoff der Mistel (*Viscum album* L.).

Ann. 561, 107–115

Wolff, O. [Hrsg.] (1975)

Die Mistel in der Krebsbehandlung.

Vittorio Klostermann Verlag, Frankfurt am Main

Wolf, P./Freudenberg, N./Konitzer, M. (1994)

Analgetische und stimmungsaufhellende Wirkung bei Malignom-Patienten unter hochdosierter *Viscum album*-Infusionstherapie (Vysorel).

Deutsche Zeitschrift für Onkologie 26, 52–54

Wolff, S./Bodyoote, J./Painter, R. B. (1974)

SCE induced in Chinese hamster cells by UV-irradiation of different stages of the cell cycle: the necessity for cells to pass through S.

Mutat Res 25 (1), 73–81

Wolff, S. (1982)

Chromosome aberrations, sister-chromatid exchanges and the lesions that produce them.

In: Wolff, S. (ed.): sister-chromatid exchange, Wiley, New York, 41–57

Wojnarowski, J. M./Konopa, J. (1980)

Interaction between DNA and viscotoxins. Cytotoxic basic polypeptides from *Viscum album* L.

Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 361, 1535–1545

Wyllie, A. H./Kerr, J. F. R./Currie, A. R. (1980)

Cell death: the significance of apoptosis.

International Review of Cytologie 68, 251–307

Wyllie, A. H. (1985)

The biology of cell death in tumours.

Anticancer Research 5, 131–136

Yamamoto, K. I./Kikuchi, Y. (1980)

A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons.

Mutation Research 71, 127–131

Yoon, T. J./Yoo, Y. C./Choi, O. B./Do, M.-S./Kang, T. B./Lee, S. W./Azuma, I./Kim, J. B. (1995)

Inhibitory effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumor angiogenesis and metastasis of haematogenous and non-haematogenous tumor cells in mice.

Cancer Letters 97, 83–91

Yuan, J./Shaham, S./Ledoux, S./Ellis, H. M./Horvitz, H. R. (1993)

The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian Interleukin-1 β -converting enzyme.
Cell 75, 641–652

Zarkovic, N./Zarkovic, K./Grainca, S./Kissel, D./Jurin, M. (1997)

The *Viscum album* L. preparation Isorel inhibits the growth of melanoma B16F10 by influencing the tumour-host relationship.
Anti-Cancer Drugs 8 (1), 17–22

Zhu, H. Z./Takeshita, T./Kitagawa, I./Morimoto, K. (1995)

Suppression of the formation of sister-chromatid exchanges by low concentrations of ginsenoside Rh₂ in human blood lymphocytes.
Cancer Research 55, 1221–1223

Zhu, L./Anasetti, C. (1995)

Cell cycle control of apoptosis in human leukemic T-cells.
The Journal of Immunology 154, 192–200

Ziska, P./Franz, H. (1985)

Determination of lectin contents in commercial mistletoe preparations for cancer therapy using the ELISA technic.
In: Bøg Hansen TC (Hrsg.) *Lectins. Biology Biochemistry Clinical Biochemistry*, Walter de Gruyter, Berlin, New York Vol IV

Ziska, P./Gelbin, M./Franz, H. (1991)

Interaction of mistletoe lectins ML-I, ML II and ML-III with carbohydrates.
In: *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. Vol. 8, 10–13. Editors: H. Franz and T. C. Bøg-Hansen. Walter de Gruyter, Berlin

Zucker, R. M./Elstein, K. H./Easterling, R. E./Massaro, E. J. (1988)

Flow cytometric discrimination of mitotic nuclei by right-angle light scatter.
Cytometry 9, 226–231

Curriculum Vitae



Persönliche Angaben

| | |
|---------------------|-------------------------|
| Name | Petra Hahn |
| Geburtstag und -ort | 09.02.1970 in Pirmasens |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |
| Familienstand | ledig |

Schulbildung

| | |
|-----------|--|
| 1976–1980 | Grundschule West in Pirmasens |
| 1980–1989 | Leibniz-Gymnasium Pirmasens Abschluss: Abitur |

Studium

| | |
|-----------------|---|
| 1990–1996 | Universität Kaiserslautern, Studiengang Diplom-Biologie Hauptfach: Humanbiologie Nebenfächer: Zellbiologie, Zoologie, Psychologie Diplomarbeit in der Abteilung für Humanbiologie und Humangenetik: „Durchflusszytometrische und zytogenetische Untersuchungen zur Wirkung von Mistelextrakten auf menschliche Zellkulturen“ |
| 05/1997–05/2000 | Promotionsstudium an der Universität Kaiserslautern in der Abteilung für Humanbiologie und Humangenetik |

Tätigkeiten

| | |
|-----------------|--|
| 10/1989–02/1990 | Aushilfstätigkeit als Aktenverwalterin beim Arbeitsamt Pirmasens |
| 05/1990–10/1990 | Aushilfstätigkeit als Briefzustellerin beim Postamt Pirmasens |
| 07/1991–09/1991 | Aushilfstätigkeit als Briefzustellerin beim Postamt Pirmasens |
| 07/1992–09/1992 | Aushilfstätigkeit als Briefzustellerin beim Postamt Pirmasens |
| 03/1990–12/1994 | Freie Mitarbeiterin im RES-Projekt der Forschungsgruppe Hagen |
| seit 01/1995 | Freie Mitarbeiterin im RES-Projekt des Roland Berger Forschungs- institutes |

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig durchgeführt und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Kaiserslautern, 23. Juni 2000