

Krebshemmende Mistelproteine

Aus der Arbeit des Vereins für Krebsforschung, Arlesheim,
Institut Hiscia

Paul Balthasar / Norma Priemer

1. Einleitung

Dr. *Rudolf Steiner* hat 1920 in einem Vortrag vor Ärzten und Medizinstudenten eine Angabe über die Mistel als Krebsheilmittel gemacht. Seit jener Zeit bemühten sich verschiedene Forscher um die Ausarbeitung dieses Medikamentes.

In den sechziger Jahren hat die Arbeitsgruppe um *Frédéric Vester* die Mistelfrischsäfte mit chemischen und biochemischen Methoden untersucht (*Vester 1960*, *Selawry 1961*, *Vester 1968 a* und *b*). Diese Arbeiten wurden von dem damaligen Leiter des Forschungsinstitutes Hiscia, *A. Leroi*, durch wichtige Hinweise und praktische Anteilnahme unterstützt (*Vester 1960*).

Die Arbeitsgruppe um *Vester* hat festgestellt, dass in der Mistel bzw. in den Mistelfrischsäften drei krebshemmende Prinzipien vorhanden sind: die Proteine, die Kohlenhydrate und die Lipide (*Selawry 1961*). Da die Proteinfraction den grössten Anteil an Wirksamkeit hat (ebendort), ist diese Arbeitsgruppe eingehender auf die Proteine eingegangen und hat dazu einen Aufarbeitungsweg von mindestens 16 Stufen entwickelt, der erlaubt, einen cancerostatisch hochwirksamen Proteinkomplex aus den Mistelfrischsäften zu isolieren (*Vester 1968 a*). Die Mistelproteine haben neben den cancerostatischen, d. h. spezifisch tumorhemmenden, zytostatische und toxische Eigenschaften, die weitgehend voneinander unabhängig sind (*Vester 1968 b*). Dieser Proteinkomplex kann noch weiter von nichtaktiven Begleitsubstanzen gereinigt werden, wobei an Hand der trägerfreien Elektrophorese das cancerostatische von dem toxischen Prinzip zum Teil getrennt werden kann (*Stoll 1970*).

Eine Arbeitsgruppe um *K. Winterfeld* (Universität Bonn) hat auf einem anderen Arbeitsweg aus Mistelfrischsäften auch cancerostatisch aktive Proteinfractionen isolieren können, die aber eine geringere Wirksamkeit aufweisen als die nach *Vester et al.* isolierten Proteine (*Winterfeld 1963*).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zuerst, die Arbeiten von *Vester et al.*, vor allem den Extraktionsweg bis zum Proteinkomplex 16 (*Vester 1968 a*), im Rahmen unserer Möglichkeiten zu wiederholen; dann war weiter ein Vergleich zu ziehen zwischen den biochemischen und biologischen Eigenschaften der extrahierten Proteine und den entsprechenden Eigenschaften der Frischsäfte, aus denen sie isoliert worden sind.

Unsere Überprüfungskriterien waren:

- a) der Extraktionsweg als solcher;
- b) die Ausbeute an Protein 16;
- c) die Elementaranalyse des Proteinkomplexes;
- d) die krebshemmende Wirksamkeit der Proteine;
- e) die toxische Wirksamkeit der Proteine.

Falls die Mistelproteine sich nach dem von *Vester* angegebenen Weg extrahieren lassen würden, war als weiterer Punkt die Frage zu untersuchen, ob dieselben, den Mistelextrakten zugesetzt, zu einer Verstärkung der zytostatischen Wirkung dieser

Säfte führen könnten. Die schwerwiegenden Nebenwirkungen wie vor allem die Immunsuppression der herkömmlichen Zytostatika sind ja bekannt, und darum lag es nahe, sich die Frage zu stellen, ob es möglich ist, die herkömmlichen Zytostatika durch ein solches Vorgehen zu ersetzen.

2. Material und Methoden

2.1. Extraktionsweg

Der 100%ige Frischsaft wird durch einstündiges Abzentrifugieren (0°C, 3000 U/min) geklärt. Zu dem geklärten Frischsaft (Stufe 0; alle Stufenbezeichnungen sind die nach *Vester* 1968 a) wird unter starkem Rühren Ammoniumsulfat (Merck; p.a.) bis zu einer Endmolarität von 1,0 M gegeben. Nach 24stündigem Stehenlassen scheidet sich ein Proteinniederschlag (Stufe 1) ab, den man anschliessend abzentrifugiert (0°C, 3000 U/min, 1 Stunde). Zu der überstehenden klaren Lösung gibt man wieder unter starkem Rühren Ammoniumsulfat zu, bis zu einer Endmolarität von 1,9 M.

Nach 24 Stunden scheidet sich wieder ein Niederschlag (Stufe 6) ab, der, nach dem Abzentrifugieren und Waschen, während 30 Stunden in einem Dialyseschlauch (Union Carbide Dialysis Membrane ϕ 4,5 cm) bei 2°C (bei 4maligem Wechsel der Vorlage an dest. Wasser) dialysiert wird, die klare Lösung wird eliminiert (Stufe 7).

Der bei der Dialyse entstehende Niederschlag wird von der nichtdialysierbaren Lösung (Stufe 9) abzentrifugiert; ein Äquivalent des Niederschlages wird mit 0,1 M Ammoniumsulfatlösung an Hand eines Homogenisators eingesalzen; die eingesalzene Lösung wird über eine DEAE-Sephadex-Säule von den begleitenden Farbstoffen befreit; der nicht einsalzbare Niederschlag (Stufe 10) wird ausgeschieden. Aus der leichtgefärbten oder farblosen Lösung, die man nach dem Säulendurchgang erhält, werden die zum grössten Teil von den Farbstoffen befreiten Proteine durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat (Endmolarität 3,0 M) ausgefällt, um anschliessend dialysiert und lyophilisiert zu werden.

Der farblose bis hellbeige Proteinkomplex 16 (Stufe 16) kann nach der Lyophilisation während Monaten ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden.

Bemerkung: In dieser Versuchsbeschreibung sind wegen der Übersicht nur die jeweiligen Endstufen angegeben; für eine Gesamtübersicht siehe *Vester* (1968 a). Alle Versuchsschritte sind bei höchstens 4°C durchgeführt worden. Es hat sich weiter als notwendig erwiesen, sich genau an die Vorschriften von *Vester* (1968 a) zu halten, u.a. ist es notwendig, bei der Dialyse Dialysierschläuche (z. B. vom Typ «Union Carbide Dialysis Membrane» ϕ 4,5 cm) zu verwenden und keine Dialysierbecher (Typ «Hollow Fiber Beaker Dow»), da sonst der zu dialysierende Niederschlag sich in den Fiberhaaren festsetzt und damit schwer abzuwaschen ist und zugleich die Dialyse erschwert (*Renold* 1975). Weiter hat sich herausgestellt, dass es wichtig ist, bei dem Abtrennen der begleitenden Farbstoffe sich genau an die von *Vester* angegebenen Säulendimensionen zu halten (ebendort).

2.2. Pflanzenmaterial

Sommersaft: Am 20. Juli 1975 wurden 13 kg *Viscum album Mali* (Blätter und kleine Stengel, bis 15 mm, 10% weibliche Pflanzen, ohne Beeren) geerntet, ausgepresst (ca. 6 l) und der gewonnene Saft zu Portionen von 3 mal 2 Liter tiefgefroren.

Wintersaft: Am 24. November 1975 wurden 7 kg *Viscum album Mali* (Blätter, kleine Stengel, 30% weibliche Pflanzen, ohne Beeren) geerntet, ausgepresst (ca. 2 l) und der gewonnene Saft zu Portionen von 4 mal 500 ml tiefgefroren.

2.3. Elementaranalyse

Die Elementaranalysen wurden von Herrn Thommen im Institut für Organische Chemie, Universität Basel (Mikrolabor), durchgeführt.

2.4. Die krebshemmende Wirksamkeit

Die krebshemmende Wirksamkeit der Proteinfractionen wurde auf Grund ihrer Hemmung der RNA-Synthese bei Yoshida-Asciteszellen der Ratte gemessen; als Indikator wird 2-C^{14} -markiertes Uridin verwendet, das als Vorläufer der RNA-Synthese fungiert. Fluoruracyl dient als Standard. Für die weiteren Versuchsbedingungen siehe *Priemer* (1975). Im folgenden wird der Test Ascitestest genannt.