

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung der Apoptoseinduktion im
Rhabdomyosarkommodell: Analyse eines
triterpensäurehaltigen *Viscum album* Gesamtextraktes

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Rahel Mascha Stammer
aus Heidelberg

Datum der Promotion: 16.06.2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
Zusammenfassung	9
Abstract	11
1 Einleitung	13
1.1 Das Rhabdomyosarkom	14
1.1.1 Epidemiologie	14
1.1.2 Klassifikation	14
1.1.3 Klinik und Prognose	15
1.1.4 Therapie	16
1.2 Apoptose	18
1.2.1 Signalwege der Apoptose	19
1.2.2 Regulatoren der Apoptose	20
1.3 Die Mistel	22
1.3.1 Wirkstoffe	23
1.3.1.1 Mistellektine	24
1.3.1.2 Viscotoxine	24
1.3.1.3 Triterpensäuren	25
1.4 Zielsetzung	26
2 Materialien	27
2.1 Geräte	27
2.2 Verbrauchsmaterialien	28
2.3 Chemikalien	28
2.4 Kits	30
2.5 Software	30
2.6 Puffer und Lösungen	30

2.7	SDS-PAGE Gele	31
2.8	Antikörper	32
2.9	Mistelextrakte	32
2.10	Zelllinien	33
2.10.1	RMS-13	33
2.10.2	RH-30	34
2.10.3	TE 671	34
2.11	Zellkulturmedien	34
3	Methoden	35
3.1	Zellbiologische Methoden	35
3.1.1	Zellkultivierung	35
3.1.2	Einfrieren von Zellen	35
3.1.3	Auftauen von Zellen	36
3.1.4	Versuchsansätze	36
3.2	Zellzahlbestimmung	36
3.3	Zytotoxizitätstest mittels LDH-Assay	37
3.4	Durchflusszytometrische Analysen	38
3.4.1	Annexin/PI-Färbung	38
3.4.2	Messung des mitochondrialen Membranpotentials	39
3.4.3	Aktive Caspasefärbung	40
3.4.4	Caspaseinhibitoren	41
3.5	Proteinchemische Methoden	42
3.5.1	Gewinnung von Zelllysaten	42
3.5.2	Proteinbestimmung	42
3.5.3	SDS-PAGE	43
3.5.4	Western-Blot	43
3.5.5	Antikörperdetektion	44

3.5.6	<i>Apoptosis Array</i>	44
3.6	<i>Fractional product</i> nach Webb	44
3.7	Datenauswertung	45
4	Ergebnisse	46
4.1	Inhibierung der Zellproliferation durch Mistelextrakte	46
4.2	Apoptoseinduktion nach Behandlung mit Mistelextrakten	48
4.3	Messung der LDH-Freisetzung nach Inkubation mit Mistelextrakten	52
4.4	Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials nach Behandlung mit Mistelextrakten	53
4.5	Die Rolle der Caspasen bei der Apoptoseinduktion durch Mistelextrakte	56
4.5.1	Aktivierung der Caspasen-3, -8 und -9	56
4.5.2	Hemmung der Apoptoseinduktion durch Caspaseinhibitoren	60
4.6	Einfluss von Mistelextrakten auf das Expressionsprofil Apoptose-assoziiertes Proteine	62
4.6.1	<i>Apoptosis Array</i>	62
4.6.2	Western-Blot und Immunodetektion Apoptose-assoziiertes Proteine	63
4.6.2.1	Expression apoptosehemmender Proteine	64
4.6.2.1	Expression apoptosefördernder Proteine	66
5	Diskussion	68
5.1	ViscumTT hemmt synergistisch die Zellproliferation und induziert Apoptose im Rhabdomyosarkom <i>in vitro</i>	68
5.2	Charakterisierung des Apoptosemechanismus	69
5.3	Mistelextrakte beeinflussen die Expression Apoptose-assoziiertes Proteine ...	74
5.4	Methodische Fehler und Limitierungen	77
5.5	Ausblick	79
6	Schlussfolgerung	81
7	Literaturverzeichnis	82

8	Abbildungsverzeichnis	103
9	Tabellenverzeichnis	104
10	Lebenslauf	105
11	Publikationsliste	107
12	Eidesstattliche Versicherung.....	108
13	Anteilerklärung	109
14	Danksagung	110

Abkürzungsverzeichnis

± SD	Standardabweichung
5-JÜR	5-Jahresüberlebensrate
AIF	<i>Apoptosis-inducing factor</i>
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
Annexin	Annexin V APC
APAF1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
ARMS	Alveoläres Rhabdomyosarkom
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BA	Betulinsäure
BAK1	<i>BCL2 antagonist/killer 1</i>
BAX	<i>BCL2 associated X protein</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL2L1	<i>BCL2 like 1</i>
BID	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>
BIRC5	<i>Baculoviral IAP repeat containing 5</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CAD	<i>Caspase-activated DNase</i>
CASP	Caspase
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
CD	2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin
CLSPN	Claspin
CWS-Guidance	Cooperative Weichteilsarkom Studiengruppe
DIABLO	<i>Diablo IAP-binding mitochondrial protein</i>
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfat
DNS	Desoxyribonukleinsäure

DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Endo G	Endonuklease G
ERMS	embryonales Rhabdomyosarkom
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FOXO1	<i>Forkhead box protein O1</i>
Fp	<i>Fractional product</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HTRA2	<i>High temperature requirement protein A2</i>
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis protein</i>
ICAD	<i>Inhibitor of caspase-activated DNase</i>
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethyl-benzimidazolcarbocyaniniodid
kDa	Kilodalton
LDH	Lactatdehydrogenase
MCL1	<i>Myeloid cell leukemia 1</i>
ML	Mistellektine
MMP	Mitochondriales Membranpotential
MW	Mittelwert
OA	Oleanolsäure
(c)PARP1	(cleaved) Poly (ADP-ribose) Polymerase 1
PAX3	<i>Pax paired box 3</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
Pep A	Pepstatin A
PI	Propidiumiodid
PIC	<i>Protease Inhibitor Cocktail</i>
PMAIP1	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>

PS	Penicillin-Streptomycin
RIPA Buffer	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RMS	Rhabdomyosarkom
<i>rpm</i>	<i>Revolutions per minute</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SRMS	Spindelzelliges/sklerosierendes Rhabdomyosarkom
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TBS(-T)	<i>Tris buffered saline (-Tween)</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TP53	<i>Tumor protein 53</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
VT	Viscotoxine
XIAP	<i>X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

Einleitung:

Rhabdomyosarkome sind die häufigsten Weichteilsarkome bei Kindern und Jugendlichen im Alter unter 15 Jahren und machen etwa 3 % aller Tumorerkrankungen in dieser Altersklasse aus. Das alveoläre Rhabdomyosarkom zählt mit 20-25 % der Fälle zu den häufigsten Entitäten und ist durch einen aggressiven Krankheitsverlauf, häufiges Therapieversagen und eine schlechte Prognose charakterisiert. Um die Prognose der erkrankten Kinder zu verbessern, ist die Erforschung neuer Therapiemöglichkeiten essenziell. Pflanzen enthalten natürlicherweise eine Vielzahl an zytotoxischen Substanzen und bieten somit eine große Bandbreite potentieller Wirkstoffe für die Krebstherapie. Die europäische Mistel, *Viscum album*, wird seit Jahrzehnten in der Tumortherapie verwendet und enthält sowohl lipophile als auch hydrophile Wirkstoffe. Kommerzielle Mistelpräparate basieren auf einem wässrigen Extrakt und enthalten als aktive Substanzen Mistellektine und Viscotoxine. Das zytotoxische Potential der wasserunlöslichen Triterpensäuren wird hierbei nicht genutzt, da sie in den Mistelpräparaten kaum bis gar nicht enthalten sind. Durch Solubilisierung mit Cyclodextrinen wurde eine innovative In-vivo-Nutzung der Triterpensäuren ermöglicht. Ziel dieser Dissertation ist es, die Wirkung eines wässrigen (*viscum*) und eines triterpensäurehaltigen (TT) Mistelextraktes sowie deren Kombination (*viscumTT*) im Rhabdomyosarkommodell *in vitro* zu untersuchen und zu vergleichen.

Methodik:

Die Rhabdomyosarkomzelllinien RMS-13, RH-30 und TE 671 wurden für 24 Stunden mit den Mistelextrakten *viscum*, TT und *viscumTT* in ansteigenden Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden die Zellproliferation mit dem CASY® *Cell Counter* und die Apoptoseinduktion mittels Annexin/PI-Färbung am Durchflusszytometer gemessen. Zur Charakterisierung des Apoptosemechanismus wurden im Durchflusszytometer Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials, die Aktivierung der CASP3, CASP8 und CASP9 sowie die Effektivität von Caspaseinhibitoren untersucht. Zudem wurden Veränderungen im Expressionsprofil Apoptose-assoziiierter Proteine im Western-Blot detektiert.

Ergebnisse:

Die verwendeten Mistelextrakte inhibierten effektiv die Zellproliferation, zudem konnten viscum und viscumTT konzentrationsabhängig Apoptose induzieren. Das Kombinationspräparat viscumTT zeigte dabei synergistische Effekte. Die Apoptoseinduktion erfolgte sowohl durch Aktivierung des extrinsischen als auch des intrinsischen Signalweges. Beweisend hierfür waren die Erniedrigung des mitochondrialen Membranpotentials sowie die Aktivierung der CASP8 und der CASP9. Die Apoptose ließ sich durch Einsatz der Caspaseinhibitoren effektiv hemmen. Weitere Experimente zeigten, dass Mistelextrakte die Proteinexpression von MCL1, BCL2, BCL2L1, XIAP, BIRC5 und CLSPN veränderten. Sie verschoben das Verhältnis zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen zu Gunsten der Apoptose, wobei die Apoptoseinduktion unabhängig von TP53 war.

Schlussfolgerung:

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass insbesondere der triterpensäurehaltige Mistelgesamtextrakt viscumTT eine effektive Substanzkombination im Rhabdomyosarkommodell *in vitro* darstellt, da sie wirkungsvoll Apoptose induzieren kann. Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation tragen zum besseren Verständnis des Wirkmechanismus von viscumTT bei und weisen dessen Wirksamkeit im Rhabdomyosarkommodell nach.

Abstract

Introduction:

Rhabdomyosarcoma is the most common soft tissue sarcoma in children and adolescents in Germany (age <15 years), accounting for 3 % of all pediatric tumors. Alveolar rhabdomyosarcoma is one of the two main histopathologic subtypes and occurs in approximately 20-25 % of the cases. It is associated with aggressive clinical behavior and poor treatment response and outcome, highlighting the need for new therapy approaches. Plants naturally contain numerous cytotoxic compounds, thus offering a great range of potential active substances for cancer treatment. The European mistletoe *Viscum album* is used in complementary cancer therapy for decades and contains hydrophilic as well as lipophilic compounds. Commercial mistletoe preparations are aqueous extracts and contain mainly mistletoe lectins and viscotoxins as active compounds, whereas lipophilic triterpene acids do not occur in significant amounts. Triterpene acids, which also exert cytotoxic effects, were solubilized with cyclodextrins to allow their application in *in vivo* studies. The aim of this study is to analyze and compare the effects of an aqueous mistletoe extract (viscum) and a triterpene-containing extract (TT) as well as the combination thereof (viscumTT) on rhabdomyosarcoma *in vitro*.

Methods:

The rhabdomyosarcoma cell lines RMS-13, RH-30 and TE 671 were incubated with viscum, TT and viscumTT in increasing concentrations for 24 hours. Inhibition of proliferation was determined by CASY® Cell Counter analysis. Apoptosis was assessed by Annexin/PI staining, JC-1 staining, measurement of CASP3, CASP8 and CASP9 activity as well as caspase inhibitor assays. To elucidate the underlying molecular mechanisms further, western blot analyses were performed to observe altered expression of apoptotic-associated proteins.

Results:

Viscum and viscumTT inhibited cell proliferation and induced apoptosis effectively in a dose-dependent manner, whereas TT showed only inhibitory effects. ViscumTT further displayed a synergistic effect. Viscum and viscumTT induced apoptosis via the extrinsic and intrinsic signaling pathways, evidenced by the loss of mitochondrial membrane potential, activation of CASP8 and CASP9. Caspase inhibitor assays reduced apoptosis significantly. Furthermore, viscum and viscumTT altered the expression of MCL1, BCL2, BCL2L1, XIAP, BIRC5 and CLSPN, thus changing the ratio of pro- and anti-apoptotic proteins and shifting the balance towards apoptosis in a TP53-independent manner.

Conclusion:

The present study showed that especially the whole mistletoe extract viscumTT can effectively induce apoptosis and may therefore be considered a promising substance in an *in vitro* model of rhabdomyosarcoma. These findings contribute to a better understanding of the underlying mechanisms of action and demonstrate the effectiveness of viscumTT in rhabdomyosarcoma.

1 Einleitung

Jedes Jahr erkranken in Deutschland im Durchschnitt etwa 2000 Kinder und Jugendliche unter 15 Jahren an Krebs [1]. Maligne Neoplasien sind die zweithäufigste Todesursache in dieser Altersklasse [2]. Die Prognose der an Krebs erkrankten Kinder verbesserte sich durch Therapieoptimierungsstudien in den letzten Jahrzehnten stetig. Trotzdem bleibt die Suche nach neuen Behandlungsmethoden gegen maligne Neoplasien Gegenstand der aktuellen Forschung, da einige Entitäten weiterhin eine schlechte Prognose aufweisen [1, 3].

Die Präparate der europäischen Mistel, *Viscum album*, sind die am häufigsten eingesetzte komplementärmedizinische Methode in der Krebstherapie von Erwachsenen und werden neben konventionellen Chemotherapeutika in der klinischen Praxis verwendet [4, 5]. In der pädiatrischen Onkologie gibt es in Hinblick auf die Komplementärmedizin wenig evidenzbasierte Methoden, dennoch werden sie vermehrt in die onkologische Therapie integriert [6]. Interessanterweise enthalten Mistelextrakte jedoch eine Vielzahl von zytotoxischen und immunologisch aktiven Substanzen, für die eine Vielzahl von präklinischen Studien vorliegen [5, 7].

Ziel dieser Arbeit ist es, die Wirksamkeit eines neu entwickelten Mistelextraktes, welcher sich aus einem wässrigen und triterpensäurehaltigen Extrakt zusammensetzt, im Rhabdomyosarkommodell zu untersuchen.

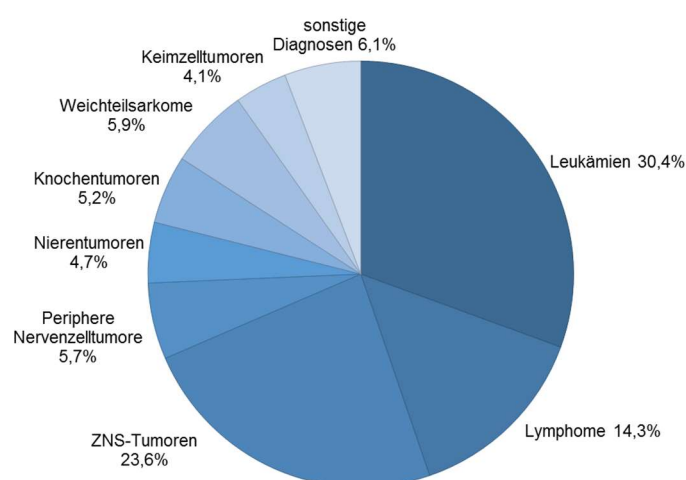


Abbildung 1. Relative Häufigkeiten der Diagnosehauptgruppen von 2009-2015 (modifiziert nach Kaatsch *et al.*, 2016). Abgebildet sind die relativen Häufigkeiten der gemeldeten Erkrankungsfälle eingeteilt in die Diagnosehauptgruppen. Ausgewertet wurden die Daten von insgesamt 14.791 Patienten unter 18 Jahren, die dem Deutschen Krebsregister in den Jahren 2009-2015 gemeldet wurden [1]. ZNS = Zentrales Nervensystem.

1.1 Das Rhabdomyosarkom

Das Rhabdomyosarkom (RMS) ist eine maligne Tumorerkrankung, die vor allem im Kindes- und Jugendalter auftritt [8] und zu der Gruppe der Weichteilsarkome zählt [9]. Es handelt sich um einen primitiven mesenchymalen Tumor [10], dessen genauer Zellursprung unbekannt ist. Es wird angenommen, dass sich das RMS aus den Vorläuferzellen der Skelettmuskulatur entwickelt, da es Charakteristika der myogenen Differenzierung aufweist [11, 12]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sich das RMS sowohl aus muskulären [13] als auch aus nichtmuskulären Vorläuferzellen [14, 15] entwickeln kann. Es kann nahezu überall im Körper auftreten und ist nicht an das Vorhandensein quergestreifter Muskulatur gebunden [16, 17]. Das RMS tritt größtenteils sporadisch auf, zu einem geringeren Anteil ist es mit familiären Syndromen wie dem Li-Fraumeni-Syndrom, der Neurofibromatose Typ I, dem Noonan-Syndrom, dem Beckwith-Wiedemann Syndrom oder dem Costello-Syndrom assoziiert [16, 18-20].

1.1.1 Epidemiologie

Laut den Daten des Deutschen Kinderkrebsregisters machen Weichteilsarkome 5,9 % aller Krebserkrankungen bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland aus und sind somit die dritthäufigste solide Tumorerkrankung in dieser Altersklasse. Das RMS ist mit 51 % das häufigste Weichteilsarkom bei Kindern unter 15 Jahren, dies entspricht 3 % aller kindlichen Krebserkrankungen. Die standardisierte Inzidenz betrug in den Jahren 2006 bis 2015 fünf pro eine Million Kindern unter 15 Jahren in Deutschland. Der Altersmedian lag bei Diagnosestellung bei fünf Jahren und drei Monaten. Jungen erkranken etwa 30 % häufiger als Mädchen, das Geschlechterverhältnis liegt bei 1,3:1 [1].

1.1.2 Klassifikation

Das RMS umfasst eine Gruppe heterogener Tumore, die sich in Bezug auf das Erkrankungsalter, die primäre Tumorlokalisation, das Metastasierungsverhalten und die Prognose unterscheiden [21-23]. Die häufigsten histologischen Entitäten sind mit 53-70 % das embryonale RMS (ERMS) und mit 20-25 % das alveoläre RMS (ARMS) [17, 21, 24]. Das ERMS tritt vor allem bei Kindern unter 10 Jahren auf und ist häufig im Kopf- und Halsbereich sowie im Urogenitaltrakt lokalisiert [21, 25]. Das ERMS ist mit zahlreichen Mutationen, wie dem Verlust der Heterozygotie des Chromosoms 11p15.5,

assoziiert [10, 26]. Das ARMS tritt vor allem bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen auf und ist typischerweise am Stamm und den Extremitäten lokalisiert [19]. Als häufigste genetische Mutation findet sich bei etwa 60 % der ARMS-Fälle die Translokation t(2;13)(q35;q14) mit dem Fusionsprotein *Pax paired box 3 (PAX3)/Forkhead box protein O1 (FOXO1)* [27]. PAX3/FOXO1 ist ein aktiver Transkriptionsfaktor, dessen Aktivität zur gestörten Differenzierung und Proliferation myogener Zellen führt [10, 28]. Patienten mit einem positiven FOX3/FOXO1-Fusionsstatus haben eine schlechtere [12, 29], die fusionsnegativen haben eine deutlich bessere Prognose [30].

1.1.3 Klinik und Prognose

Das klinische Erscheinungsbild des RMS ist sehr variabel und abhängig von der primären Lokalisation, der Ausdehnung des Tumors sowie von dem Alter des Patienten. RMS manifestieren sich meist als zunehmende, schmerzlose Schwellung. Die Mehrheit der Symptome tritt im Zusammenhang mit der Kompression lokaler Strukturen durch den Tumor auf. RMS sind nicht mit klassischen paraneoplastischen Syndromen assoziiert [3]. Sie treten zu 40 % im Kopf-Hals-Bereich, 20 % im Urogenitaltrakt, 20 % an den Extremitäten und zu 20 % an anderen Lokalisationen auf [25]. Das RMS metastasiert sowohl hämatogen als auch lymphogen [19], wobei am häufigsten die Lunge, gefolgt von Knochen, Knochenmark und Lymphknoten, betroffen ist [17, 25]. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung haben die meisten Patienten Mikrometastasen in regionären Lymphknoten [31] und ungefähr 16 % bereits Fernmetastasen gebildet [22, 32].

Die Prognose des RMS ist abhängig von vielen Faktoren, wie dem Alter der Patienten, der Tumorphistologie, dem Tumorstadium und der primären Lokalisation [33]. Die mediane 5-Jahresüberlebensrate (5-JÜR) beträgt 74 %, das Langzeitüberleben (10 Jahre) liegt bei 72 % [1]. Die Prognose variiert jedoch stark innerhalb der Risikogruppen. So haben Patienten mit lokalisierten Erkrankungen aus der Niedrigrisikogruppe eine 5-JÜR von ca. 95 % [34], wohingegen sie bei Patienten mit einem ARMS aus der Hochrisikogruppe auf 65 % sinkt [35]. Bei Patienten mit metastasierter Erkrankung sinkt die 5-JÜR weiter drastisch ab, Patienten mit einem ARMS haben eine Überlebensrate kleiner 20 % und diejenigen mit einem ERMS eine Überlebensrate von 40 % [32]. Patienten mit einem Rezidiv haben ebenfalls eine sehr schlechte Prognose, die 5-JÜR beträgt 17 % [23].

Zudem leiden die Patienten unter den Langzeitschäden der Therapie. Sie können funktionelle oder kosmetische Defizite davontragen oder Zweitkarzinome entwickeln [31]. Aus diesem Grund sind regelmäßige Kontrolluntersuchungen im Verlauf und nach Abschluss der Therapie notwendig [36].

1.1.4 Therapie

Die Therapie des RMS erfolgt in Deutschland gemäß den standardisierten Therapieempfehlungen der Cooperativen Weichteilsarkom Studiengruppe (CWS-*Guidance*) der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie. Das Therapieregime wird an die Risikogruppe des Patienten angepasst und umfasst die Kombination aus operativer Tumorentfernung, Chemo- und Strahlentherapie. Die Einteilung der Risikogruppen erfolgt anhand des Patientenalters, der Histologie, Tumorlokalisierung, Tumorgröße, Metastasierung und dem postchirurgischen Exzisionsbefund. Tabelle 1 bietet einen Überblick über die Risikostratifizierung und die risikoadaptierte Therapie des RMS. Die Chemotherapeutika werden als Kombinationstherapie appliziert. Häufig eingesetzte Substanzen sind Dactinomycin, Vincristin, die Alkylanzien Cyclophosphamid und Ifosfamid und Anthrazykline wie Doxorubicin und Epirubicin. Bei Therapieversagen oder bei Patienten mit Metastasen werden zusätzlich Platinderivate (Carboplatin) und Etoposid eingesetzt. Die lokale Therapie besteht aus chirurgischen Maßnahmen, unter Umständen in Kombination mit Strahlentherapie, und kann entweder vor oder nach dem Beginn der Chemotherapie erfolgen. Die Evaluation der lokalen Therapie ist abhängig von der Ausbreitung und Lokalisation des Tumors. Alle Risiko- und Hochrisikopatienten und Patienten mit metastasierender Erkrankung erhalten eine Strahlentherapie [36].

Tabelle 1

Risikostratifizierung und risikoadaptierte Therapie des Rhabdomyosarkoms modifiziert nach den Therapieempfehlungen der CWS [36]

Risikogruppe	Pathologie	Tumor-lokalisierung	Tumorgröße & Patientenalter	postoperativer Befund	N-Status	M-Status	Therapie
Niedrig	ERMS SRMS	alle	≤ 5 cm und < 10 Jahre	I	N0	M0	Chemotherapie + Operation
Standard	ERMS SRMS	alle	> 5 cm und/oder ≥ 10 Jahre	I	N0	M0	Chemotherapie + Operation ± Bestrahlung
	ERMS SRMS	günstig	alle	II, III	N0	M0	Chemotherapie + Operation ± Bestrahlung
	ERMS SRMS	ungünstig	≤ 5 cm und < 10 Jahre	II, III	N0	M0	Chemotherapie + Operation ± Bestrahlung
Risiko	ERMS SRMS	ungünstig	> 5 cm und/oder ≥ 10 Jahre	II, III	N0	M0	Chemotherapie + Operation + Bestrahlung
	ERMS SRMS	alle	alle	II, III	N1	M0	Chemotherapie + Operation + Bestrahlung
	ARMS	alle	alle	I, II, III	N0	M0	Chemotherapie + Operation + Bestrahlung
Hochrisiko	ARMS	alle	alle	II, III	N1	M0	Chemotherapie + Operation + Bestrahlung
Metastasierende Erkrankung	alle	alle	alle	alle	alle	M1	Chemotherapie + Operation + Bestrahlung

Anmerkung. ERMS = embryonales Rhabdomyosarkom; SRMS= spindelzelliges/sklerosierendes Rhabdomyosarkom; ARMS= alveoläres Rhabdomyosarkom; N= Nodus, M=Metastase
 Postoperativer Befund: I= primäre komplette Resektion im Gesunden (R0-Resektion)
 II= mikroskopischer Nachweis von Tumorzellen am Schnitttrand (R1-Resektion) oder R0-Resektion bei Lymphknotenmetastasen
 III= makroskopischer Nachweis von Tumorzellen am Schnitttrand (R2-Resektion)
 Lymphknotenstatus: N0= Keine regionären Lymphknotenmetastasen
 (N-Status) N1= Regionäre Lymphknotenmetastasen
 Metastasierung: M0= Keine Fernmetastasen
 (M-Status) M1= Fernmetastasen
 Günstige Tumorlokalisierung: Orbita, Kopf- und Halsbereich ausgenommen parameningeale Lokalisationen, paratestikuläre Lokalisation, weibliches Genital
 Ungünstige Tumorlokalisierung: alle anderen Lokalisationen

1.2 Apoptose

Der Begriff Apoptose wurde 1972 von Kerr *et al.* eingeführt und beschreibt den Vorgang des programmierten Zelltodes [37], der unter Energieaufwand nach einem genetischen Programm abläuft [38]. Die Apoptose ist ein physiologischer Vorgang, der u.a. während der embryonalen Entwicklung, der Differenzierung und Homöostase von Geweben sowie bei der Reifung des Immunsystems und der Abwehr von Pathogenen auftritt [38]. Zudem spielt die Apoptose eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Krebs, wobei ein Zusammenhang zwischen Apoptoseresistenz und der Tumorgenese besteht [38-40].

Ausgelöst durch Todessignale kommt es zu charakteristischen, morphologischen Veränderungen der Zelle. Zunächst löst sich die Zelle aus dem Zellverband, da Proteine des Zytoskelettes sowie Adhäsionsmoleküle degradiert werden [41]. Die Zelle schrumpft und rundet sich ab [38]. Es kommt zur Verdichtung des Zytoplasmas und zur Karyopyknose mit anschließender Karyorrhexis [42]. Durch Abschnürungen der Plasmamembran („*membrane-blebbing*“) werden degradierte zytoplasmatische oder nukleosolische Zellbestandteile in sogenannte Apoptosekörperchen verpackt [38]. Diese Apoptosekörperchen werden anschließend von Makrophagen und benachbarten Zellen erkannt, phagozytiert und degradiert [41, 42]. Bei diesem Abbauprozess dienen negativ geladene Phospholipidmoleküle als wichtiges Erkennungsmerkmal. Im Zuge der Apoptose translozieren sie von der Innen- zur Außenseite der Plasmamembran, wodurch die Zelle für den schnellen Abbau markiert wird [42, 43]. Durch den geordneten Abbau der Zellen gelangen keine zytoplasmatischen Bestandteile in das Interstitium und die Makrophagen produzieren keine Zytokine, somit wird keine Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe hervorgerufen [38, 42]. Mögliche Auslöser der Apoptose können u.a. der Entzug von Wachstumsfaktoren, ionisierende Strahlung, oxidativer Stress und DNS-Schäden sein [38, 44].

Eine weitere Form des Zelltodes ist die Nekrose. Im Gegensatz zur Apoptose handelt es sich hierbei jedoch um einen passiven, unkontrollierten Prozess, der normalerweise eine große Anzahl von Zellen betrifft [38, 40]. Durch den frühen Verlust der Plasmamembranintegrität strömen unkontrolliert Ionen und Wasser gemäß dem osmotischen Gradienten in den intrazellulären Raum und führen zur Schwellung der Zelle und Zellorganellen [45]. Diese Vorgänge führen letztlich zur Zellyse, wobei der Zellinhalt

in das umliegende Gewebe freigesetzt wird. Als Folge wird durch die Aktivierung des Immunsystems eine lokale Entzündungsreaktion ausgelöst [38, 41].

1.2.1 Signalwege der Apoptose

Hauptmediatoren der Apoptose sind die *cysteinyI-aspartate specific proteases* (Caspasen) [46]. Sie liegen als inaktive Zymogene in der Zelle vor und können über verschiedene Signalwege aktiviert werden, die letztlich durch Initiierung einer Signalkaskade in einer gemeinsamen Endstrecke, der Exekutionsphase, münden. Die Aktivierung der Caspasen kann über den extrinsischen und den intrinsischen Signalweg erfolgen [42, 47]. Die Initiatorcaspasen stehen zu Beginn der Signalkaskade und aktivieren die Effektorcaspasen [48]. Es wird zwischen den Initiatorcaspasen Caspase-2 (CASP2), Caspase-8 (CASP8), Caspase-9 (CASP9), Caspase-10 (CASP10) und den Effektorcaspasen Caspase-3 (CASP3), Caspase-6 (CASP6), Caspase-7 (CASP7) unterschieden [38]. Die Aktivierung der Effektorcaspasen hat die Spaltung ihrer Substrate zur Folge und führt zu morphologischen Veränderungen der Zelle und letztlich zum Zelltod [49]. Zu den Substraten zählen u.a. Zytokeratine und Proteine des Zytoskeletts sowie der *inhibitor of caspase-activated DNase* (ICAD) [38, 49]. Durch Spaltung von ICAD entfällt dessen Hemmung auf die *Endonuklease caspase-activated DNase* (CAD). CAD wird daraufhin freigesetzt und degradiert die chromosomale Desoxyribonukleinsäure (DNS) [49]. Auch die Poly (ADP-ribose) Polymerase 1 (PARP1), ein an der DNS-Reparatur beteiligtes Enzym [50], wird im Zuge der Apoptose durch die aktive CASP3 in das Spaltprodukt *cleaved* PARP1 (cPARP1) gespalten [51, 52].

Der extrinsische Signalweg wird durch Bindung von Liganden an membranständige Todesrezeptoren vermittelt. Die Todesrezeptoren gehören zu der *tumor necrosis factor* (TNF)-Superfamilie und umfassen TNF-, CD95- (Fas) und *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL)-Rezeptoren [38, 53, 54]. Die Rezeptoren besitzen intrazellulär eine sogenannte Todesdomäne, welche die Weiterleitung des Signals von der Zelloberfläche an die intrazelluläre Signalkaskade vermittelt [38, 54]. Durch die Bindung der Liganden an die Rezeptoren kommt es an der Innenseite der Plasmamembran zur Rekrutierung von intrazellulären Adaptermolekülen wie dem *Fas-associated protein with death domain* (FADD) an die Todesdomäne und zur Bildung des multimeren *death-inducing signaling complex* (DISC) [42, 47, 55]. Am DISC kommt es zur Aktivierung der

Initiatorcaspasen CASP8 sowie CASP10 und folglich zur Weiterleitung des Todessignals über die Caspase-Kaskade [38, 55].

Der intrinsische Signalweg wird durch Stimuli wie DNS-Schäden, ionisierende Strahlung, Chemotherapeutika und den Mangel an Wachstumsfaktoren ausgelöst [38, 44]. Es kommt zu Veränderungen der mitochondrialen Membran, die in der Bildung von Membranporen, dem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) und der Freisetzung proapoptotischer Proteine resultieren [38, 54]. Aus dem Intermembranraum der Mitochondrien gelangen daraufhin u.a. die Proteine Cytochrom c, *high temperature requirement protein A2* (HTRA2) und *diablo IAP-binding mitochondrial protein* (DIABLO) in das Zytosol [42, 47]. Zu einem späteren Zeitpunkt werden zudem der *apoptosis-inducing factor* (AIF) und die Endonuklease G (Endo G) freigesetzt, die in den Nukleus translozieren und die DNS caspase-unabhängig fragmentieren [38, 54]. Cytochrom c bildet mit dem *apoptotic protease activating factor 1* (APAF1) und der Procaspase-9 das sogenannte Apoptosom, was zur Aktivierung der CASP9 führt. Das Apoptosom spaltet die Procaspase-3 und induziert somit die Apoptose [44, 55].

Durch Querverbindungen stehen der extrinsische und intrinsische Apoptosesignalweg miteinander in Verbindung und können sich somit gegenseitig beeinflussen. Ein Beispiel hierfür ist die Spaltung des Proteins *BH3-interacting domain death agonist* (BID) in seine trunkierte Form tBID durch die CASP8 oder CASP10. tBID interagiert mit den Proteinen *BCL2 associated X protein* (BAX) und *BCL2 antagonist/killer 1* (BAK1) und induziert somit die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran [38, 53].

1.2.2 Regulatoren der Apoptose

Die Apoptose wird durch zahlreiche Proteine mit pro- oder antiapoptotischer Wirkung beeinflusst, die miteinander interagieren, wobei insbesondere ihr Verhältnis zueinander entscheidend für die Apoptoseregulation ist. [42].

Die Mitglieder der *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2)-Proteinfamilie regulieren den intrinsischen Signalweg und können die Apoptose sowohl fördern als auch verhindern, indem sie das MMP beeinflussen [42, 44]. Anhand ihrer Funktion werden u.a. die antiapoptotischen Proteine BCL2, *BCL2 like 1* (BCL2L1) und *myeloid cell leukemia 1* (MCL1) von den proapoptotischen Proteinen wie BAK1, BAX, BID und *phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1* (PMAIP1) unterschieden [44, 54]. BAX und BAK1 können durch Oligomerisierung Poren in der äußeren Mitochondrienmembran bilden und beeinflussen

somit das MMP [54, 56]. BCL2, BCL2L1 und MCL1 können die Porenbildung der Mitochondrienmembran hemmen, indem sie entweder direkt mit BAX und BAK1 interagieren oder über Interaktion mit BID oder PMAIP1. BID und PMAIP1 können wiederum BAX und/oder BAK1 direkt stimulieren oder wirken indirekt über die Hemmung der antiapoptotischen BCL2-Proteine [56, 57].

Das *tumor protein* p53 (TP53) spielt eine wichtige Rolle in der Apoptoseinduktion, indem es zum einen die Expression beteiligter Proteine wie *baculoviral IAP repeat containing 5* (BIRC5) und PMAIP1 reguliert [54]. Zum anderen interagiert TP53 direkt mit BCL2, BCL2L1 sowie MCL1 und antagonisiert deren Wirkung [54, 58]. Außerdem interagiert es direkt mit BAX und induziert dessen Oligomerisierung [44, 58].

Die *inhibitor of apoptosis protein* (IAP)-Familie reguliert sowohl den extrinsischen als auch den intrinsischen Apoptoseweg, indem sie entweder direkt die CASP3, CASP6, CASP7 und CASP9 hemmen [38, 54] oder deren Degradierung fördern [42, 54]. Zudem inhibieren sie die Wirkung proapoptotischer Proteine wie DIABLO. Zu ihnen gehören die Proteine *X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein* (XIAP) und BIRC5 [59]. Wird die Apoptose induziert, werden sie autoubiquitiniert und degradiert [60, 61]. DIABLO ist ein direkter Inhibitor der IAP-Familie. Durch Permeabilisierung der Mitochondrienmembran wird er in das Zytoplasma entlassen und fördert so die Apoptose [42, 54, 55]. Die Serinprotease HTRA2 wird auf Apoptosestimuli hin aus Mitochondrium freigesetzt und spaltet u.a. die Mitglieder der IAP-Familie [58].

1.3 Die Mistel

Die europäische weißbeerige Mistel *Viscum album* ist ein immergrüner Halbparasit aus der Familie der Mistelgewächse (Viscaceae), Ordnung der Sandelholzartigen (Santalales). Sie wächst auf Laub- und Nadelbäumen in Europa, Asien und Nordafrika. Es gibt drei Unterarten der Mistel, die sich in ihrer Wirtsspezifität unterscheiden: *Viscum album* spp. *album* (Laubbäume), *Viscum album* spp. *abietis* Beck. (Tannen) und *Viscum album* spp. *austriacum* Wiesb. Vollmann (Pinien) [62].

Zu den bekanntesten Eigenschaften der wässrigen Mistelextrakte zählen ihre immunmodulierenden und zytotoxischen Effekte, die in zahlreichen präklinischen Tests belegt wurden [5]. Die zytotoxische Wirkung von wässrigen Mistelextrakten konnte bei akuten Leukämien [63], beim multiplen Myelom [64], Zungenkarzinom [65] und Harnblasenkarzinom [66] *in vitro* nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten antitumorale Wirkungen der Mistelextrakte bei akuten Leukämien [67], Brustkrebs [68], malignes Melanom [69] und Pankreaskarzinom [70] *in vivo* beschrieben werden.

Seit Jahrtausenden werden Mistelextrakte als Heilmittel verwendet. Erste schriftliche Nachweise belegen den Einsatz der Mistel als Heilpflanze bei Milzkrankheiten und Menstruationsbeschwerden durch Hippokrates (460-377 v. Chr.) [71]. Anfang der 1920er Jahre etablierten Ita Wegmann und der Begründer der anthroposophischen Medizin, Rudolf Steiner, die Anwendung von Mistelextrakten in der Tumorthherapie [71, 72]. Heutzutage zählen Mistelpräparate zu den am häufigsten eingesetzten Arzneimitteln in der Krebstherapie [73], jedoch mit umstrittener klinischer Wirksamkeit [4, 74]. Mistelpräparate werden meistens als Adjuvans zur konventionellen Krebstherapie eingesetzt [4]. Therapeutische Indikationen sind die Verbesserung der Lebensqualität, die Stärkung des Immunsystems und die Reduktion unerwünschter Arzneimittelwirkungen konventioneller Krebstherapien [4, 75, 76]. Mistelpräparate werden häufig subkutan appliziert, einige Präparate sind auch für eine intravenöse Applikation zugelassen [77]. Für die intratumorale und intrakavitäre Gabe besteht zurzeit noch keine Herstellerzulassung [76, 77]. Die intratumorale Applikation hochdosierter Mistelextrakten zeigte sowohl im Tierversuch [70] als auch beim Patienten [78] positive Effekte auf das Tumorwachstum und es konnte vereinzelt über (Teil-) Remissionen berichtet werden.

In klinischen Studien konnten eine Verbesserung der Lebensqualität und eine Reduktion unerwünschter Arzneimittelwirkungen der konventionellen Tumorthapien nach Behandlung mit Mistelextrakten nachgewiesen werden. In Bezug auf die Verlängerung der Überlebenszeit zeigten sich in einigen Studien tendenziell positive Effekte, die Ergebnisse sind jedoch nicht eindeutig [4, 79, 80]. So konnten Tröger *et al.* in einer kontrollierten, randomisierten Studie eine Verlängerung des Überlebens nach subkutaner Misteltherapie bei Patienten mit Pankreaskarzinomen beobachten [81]. Kunz *et al.* konnten in einer Fallserienstudie eine (partielle) Remission des Tumors bei Patienten mit Basalzellkarzinom nach topischer Anwendung eines lipophilen Mistelextraktes beobachten [82]. Um den positiven Effekt der Misteltherapie auf das Überleben zu belegen, bedarf es jedoch weiterer prospektiver Studien.

Da Mistelpräparate als Adjuvantien eingesetzt werden, ist die Wirkung der gemeinsamen Anwendung von Mistelpräparaten und Chemotherapeutika von besonderem Interesse. Sowohl in präklinischen [83, 84] als auch klinischen Studien [85] konnte bewiesen werden, dass Mistelpräparate zu keiner Wirkungseinschränkung konventioneller Chemotherapeutika führen. Darüber hinaus gelang *in vitro* der Nachweis wirkungsverstärkender Effekte von Mistelextrakten auf konventionelle Chemotherapeutika in verschiedenen Tumormodellen wie der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) [86], Brustkrebs [87], chronischen myeloischen Leukämie [88] und dem Lungenkarzinom [89].

1.3.1 Wirkstoffe

Die Mistel enthält eine Vielzahl biologisch aktiver Substanzen wie Mistellektine (ML) [90], Viscotoxine (VT) [91], Triterpensäuren [92, 93], Flavonoide [94, 95], Oligo- und Polysaccharide [96, 97]. Kommerzielle Mistelpräparate basieren auf einem wässrigen Mistelextrakt, wobei Mistel-spezifische Substanzen wie ML sowie VT als Markersubstanzen dienen und in definierten Konzentrationen enthalten sind. Andere Wirkstoffe hingegen sind in unbekanntem [98] oder wie im Falle der lipophilen Triterpensäuren aufgrund ihrer Wasserunlöslichkeit nur in sehr geringen Mengen enthalten [99]. Die Zusammensetzung und Konzentration der einzelnen Wirkstoffe variieren in den Mistelpräparaten je nach Wirtsbaum, Jahreszeitpunkt der Ernte, den verwendeten Pflanzenbestandteilen und dem Herstellungsverfahren [72, 100, 101].

1.3.1.1 Mistellektine

Lektine sind Glykoproteine, die in einer Vielzahl von Geweben vorkommen [102]. ML sind die am besten erforschten Bestandteile der Mistel und hauptsächlich für die Zytotoxizität der Mistelpräparate verantwortlich [103]. Aus der Mistel lassen sich die Lektine ML I, ML II und ML III gewinnen, die sich in ihrem Molekulargewicht und in ihrer Bindungsspezifität für Kohlenhydrate unterscheiden [90]. Die ML bestehen je aus einer A- und einer B-Kette, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind [102]. Die B-Ketten binden spezifisch Kohlenhydrate; ML I bindet an D-Galaktose, ML II an N-Acetyl-D-Galaktosamin sowie D-Galaktose und ML III an N-Acetyl-D-Galaktosamin [90]. Durch die Bindung der B-Ketten an membranständige Rezeptoren erfolgt die Aufnahme von ML in die Zelle [104, 105]. Die A-Ketten hemmen die 60s-Untereinheit der Ribosomen und inhibieren somit die Proteinbiosynthese der Zelle. Daher werden ML zu den Typ-II Ribosomen-inaktivierenden Proteinen gezählt [106, 107].

Die zytotoxische Wirkung von ML und rekombinanten ML konnte in diversen Tumormodellen, wie etwa bei akuten myeloischen Leukämien (AML) [108], Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs [109], Brustkrebs [110] und hepatozellulären Karzinomen [111] *in vitro* nachgewiesen werden. *In vivo* konnte eine antitumorale Wirkung von ML u.a. auf das Harnblasenkarzinom [112], Lymphom [113] und Ovarialkarzinom [114] belegt werden. Neben der zytotoxischen Wirkung besitzen ML auch antiinflammatorische und immunmodulierende Eigenschaften [106, 115-119]. Ferner konnte eine signifikante Hemmung der Angiogenese durch ML sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden [120].

1.3.1.2 Viscotoxine

VT sind ein weiterer Bestandteil der Mistel. Es handelt sich bei den VT um kleine Polypeptide, die aus 46 Aminosäuren bestehen und zu der Gruppe der Thionine gehören. In den Pflanzen dienen die Thionine vor allem der Abwehr von Pathogenen [121]. Anhand der Aminosäuresequenz werden sieben Isomere unterschieden: VT A1, A2, A3, B, B2, C1 und 1-PS [122, 123]. VT zeichnen sich durch große Beständigkeit gegenüber Hitze und Proteasen aus [102] und besitzen darüber hinaus zytotoxische Wirkungen. Diese resultieren aus der Interaktion mit den Phospholipiden der Zellmembran, wodurch es zur Permeabilisierung derselben kommt [124]. Nach Behandlung mit VT konnten die Induktion der Nekrose und Apoptose bei Zervix- [125] und Yoshida-Karzinomzellen [126]

sowie bei humanen Lymphozyten nachgewiesen werden [124]. VT haben ebenfalls immunmodulierende Effekte, sie aktivieren NK-Zellen und zytotoxische T-Zellen [127].

1.3.1.3 Triterpensäuren

Lipophile Triterpene sind Sekundärmetabolite und kommen natürlicherweise in vielen Pflanzenarten vor [128]. Die Triterpensäuren gehören zu der großen, heterogenen Gruppe der Terpene und bestehen aus einem Grundgerüst aus sechs Isopreneinheiten ($C_{30}H_{48}$) [129]. In den Pflanzen werden sie durch Zyklisierung von Squalen gebildet und kommen in hohen Konzentrationen in der Cuticula der Blätter, der Stammrinde und in den Fruchtschalen vor. Pflanzen mit einem natürlich hohen Anteil an Triterpensäuren sind Birken, Olivenbäume, Rosmarin und die Mistel [130]. Sie dienen den Pflanzen als Schutz vor mechanischen Einflüssen sowie gegen Pathogene [131, 132]. Zu den Triterpensäuren zählen u.a. die Oleanolsäure (OA) und Betulinsäure (BA). Aufgrund ihrer zytotoxischen und zytostatischen Wirkung auf diverse Krebszelllinien, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, gelten die Triterpensäuren als eine vielversprechende Therapiemöglichkeit in der Krebsbehandlung [128]. *In vitro* konnte die zytotoxische Wirkung von OA und ihrer Derivate auf folgende Tumorzelllinien gezeigt werden: Neuroblastom [133, 134], Osteosarkom [135], Ewing-Sarkom [136], akute Leukämien [137-139], Bronchialkarzinom [140], malignes Melanom [141, 142], Brustkrebs [143] und Magenkarzinom [144]. *In vivo* konnte die antitumorale Wirkung von OA beim Osteosarkom [145], Gallenblasenkarzinom [146], hepatozellulären Karzinom [147] und Pankreaskarzinom [148] erfasst werden. Zudem wurde eine antiangiogene Wirkung für OA und ihre Derivate *in vitro* [149] und *in vivo* [150] beschrieben. OA besitzt weiterhin antiinflammatorische, antivirale sowie antibakterielle Eigenschaften und fördert die Wundheilung [129, 132, 151, 152]. Für BA und ihre Derivate wurden ähnliche Eigenschaften aufgezeigt [128, 153, 154].

1.4 Zielsetzung

Die Prognose des RMS hat sich in den letzten Jahrzehnten nur leicht verbessert. In Deutschland liegt die Langzeitüberlebensrate (15 Jahre) derzeit bei 71 % [1]. Die Prognose variiert stark innerhalb der einzelnen Risikogruppen und verschlechtert sich mit dem Fortschreiten der Erkrankung dramatisch. Insbesondere das ARMS spricht schlecht auf konventionelle Therapien an und metastasiert häufig.

Pflanzen können natürlicherweise zytotoxische Substanzen enthalten und stellen somit eine Quelle für neue Agenzien in der adjuvanten Tumorthherapie dar. Beispiele für etablierte Substanzen in diesem Bereich, die ursprünglich aus Pflanzen isoliert wurden, sind Vincaalkaloide wie Vinblastin und Vincristin (aus *Catharanthus roseus*) [155], Paclitaxel (aus *Taxus brevifolia*) [156] und Etoposid (aus *Podophyllum peltatum*) [157]. Auch die europäische Mistel enthält biologisch aktive Substanzen mit nachgewiesener zytotoxischer Wirkung. Die Zytotoxizität von kommerziellen, wässrigen Mistelpräparaten wird v.a. den ML und VT zugeschrieben. Die lipophilen Triterpensäuren hingegen sind in den kommerziellen Präparaten aufgrund ihrer Wasserunlöslichkeit kaum enthalten, ihr zytotoxisches Potential wird somit nicht genutzt. Durch die Bindung an 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (CD) gelang es, die Triterpensäuren zu solubilisieren und so ihre Bioverfügbarkeit zu erhöhen [138, 142].

Ziel dieser Dissertation ist es, die Grundlage für neue Therapieansätze in der Behandlung des RMS zu erproben. In dieser Arbeit soll der neu entwickelte Mistelgesamtextrakt, viscumTT, in Bezug auf seine zytotoxische Wirkung im RMS untersucht werden. ViscumTT ist ein Gemisch aus einem wässrigen Mistelextrakt (viscum) und einem triterpensäurehaltigen Extrakt (TT). Um zu analysieren, ob dieser Mistelgesamtextrakt den wässrigen Mistelextrakten in seiner Wirksamkeit überlegen ist, werden zusätzlich die beiden Einzelextrakte TT und viscum untersucht.

Zunächst wird der Einfluss der drei verschiedenen Extrakte auf die Zellproliferation und die Zellviabilität untersucht. Anschließend wird überprüft, ob die Mistelextrakte im Rhabdomyosarkommodell Apoptose induzieren können. In den darauffolgenden Versuchen werden zur Charakterisierung des Apoptosemechanismus durchflusszytometrische und biochemische Methoden eingesetzt.

2 Materialien

2.1 Geräte

Biologische Sicherheitswerkbank, Maxisafe 2020	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
CO ₂ -Inkubator, Heraeus Cytoperm 2	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Durchflusszytometer, FACSCalibur™	BD Bioscience, Heidelberg
<i>Freezing Container</i> , Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Lichtmikroskop Nikon TMS	Nikon, Tokio
Mastercycler® gradient, <i>thermo cycler</i>	Eppendorf, Hamburg
<i>Microplate Reader</i> , Multiskan Ascent	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Mikrotiterplatten-Schüttler, Microplate Genie™ 1	Scientific Industries, New York
<i>Molecular Imager</i> ®, ChemiDoc™	Bio-Rad Laboratories, München
Multikanalpipette, Eppendorf Research®	Eppendorf, Hamburg
Multipipette® Plus	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter, inoLab® 720	WTW, Weilheim
Pipetten, Research Plus (10-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe, Pipetboy	Integra Bioscience, Fernwald
PowerPac 3000	Bio-Rad Laboratories, München
Schüttler, Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach
Tischzentrifuge	NeoLab, Heidelberg
ThermoMixer Comfort®	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories, München
Vortex Genie 1 Touchmixer	Scientific Industries, New York
Vortex Mixer SA7	Bibby Scientific, Staffordshire
Waage Navigator™	OHAUS CORPORATION, Parsippany
Zentrifuge, Heraeus Megafuge 8	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Zentrifuge, Mikro 22R	Hettich Lab Technology, Tuttlingen
Zentrifuge, Rotana 460K	Hettich Lab Technology, Tuttlingen
Zellzählgerät, CASY® <i>Cell Counter</i>	Schärfe System, Reutlingen

2.2 Verbrauchsmaterialien

Zellkulturplatten (6-, 12-, 96-well)	BD Bioscience, Heidelberg
CASY-Cups	Roche Diagnostics, Mannheim
FACS-Röhrchen	BD Bioscience, Heidelberg
Falcon (15-, 50 ml)	BD Bioscience, Heidelberg
Kanülen (0,9 x 40 mm, 0,4 x 20 mm)	BD Bioscience, Heidelberg
Kryoröhrchen, CryoPure 1,6 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Mini-PROTEAN® Tetra cell	Bio-Rad Laboratories, München
Reagiergefäß, SafeSeal (0,5-, 1,5-, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten (5-, 10-, 25 ml)	BD Bioscience, Heidelberg
Skalpell	Heinz Herenz, Hamburg
Spritzen (5-, 10 ml)	BD Bioscience, Heidelberg
Sterilfilter, Millex®GV 0,22 µm Durapore®	Merk Millipore, Darmstadt
PVDF Membran	
TransBlot® Turbo™ Midi Format 0,2 µm	Bio-Rad Laboratories, München
Nitrocellulose Packs	
Pipettenspitzen (10-, 100-, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen (75-, 175 cm ²)	BD Bioscience, Heidelberg
Zellkulturschalen (58,9 cm ²)	Corning® Incorporated, Corning

2.3 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von *pro analysi* Qualität. Alle weiteren, nicht gelisteten Chemikalien waren Produkte der Firmen Merck, Sigma Aldrich und Carl Roth.

Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
Annexin V APC (Annexin)	BD Bioscience, Heidelberg
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Steinheim
Bradford Reagenz	Bio-Rad Laboratories, München
Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP)	Sigma Aldrich, Steinheim
<i>Complete Protease Inhibitor Cocktail</i> (PIC)	Roche Diagnostics, Mannheim
Coulter® Isoton® II Diluent	Beckham Coulter, Krefeld
<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (DMEM), Gibco®	Life technologies™, Carlsbad

Dimethylsulfat (DMSO)	Sigma Aldrich, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth, Karlsruhe
Dulbecco's PBS, Gibco®	Life technologies™, Carlsbad
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
FACS-Flow	BD Bioscience, Heidelberg
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethyl- benzimidazolcarbocyaniniodid (JC-1)	AAT Bioquest, Sunnyvale
Laemmli Puffer, 4-fach	Bio-Rad Laboratories, München
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin (PS), Gibco®	Life technologies™, Carlsbad
Pepstatin A (Pep A)	Sigma Aldrich, Steinheim
<i>Precision Plus Protein™ Dual Color Standard</i>	Bio-Rad Laboratories, München
Propidiumiodid (PI)	Sigma Aldrich, Steinheim
<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i> (RIPA Buffer)	Sigma Aldrich, Steinheim
Roti® Block	Carl Roth, Karlsruhe
Roti® Free	Carl Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 40 (Acrylamid)	Carl Roth, Karlsruhe
RPMI Medium 1640, Gibco®	Life technologies™, Carlsbad
<i>Super-Signal® West Dura Extended</i> <i>Duration Substrate (ECL)</i>	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad Laboratories, München
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA 0,05 %, Gibco®	Life technologies™, Carlsbad
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe
Caspaseinhibitoren	R&D Systems, Minneapolis

2.4 Kits

<i>Cytotoxicity Detection Kit (LDH)</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Green Caspase-3, -8, -9 Staining Kit</i>	PromoKine, Heidelberg
<i>Proteome Profiler™ Array, Human Apoptosis Array Kit</i>	R&D Systems, Minneapolis

2.5 Software

Adobe Photoshop CS6	Adobe Systems Inc., San Jose
CellQuest®	BD Bioscience, Heidelberg
FlowJo® 7.2.5	Tree Star Inc., Ashland
ImageLab™ 5.0	Bio-Rad Laboratories, München
Microsoft Office 2011	Microsoft Corporation, Redmond
SigmaPlot™ 12.5	Systat Software, San Jose

2.6 Puffer und Lösungen

Zur Herstellung der Lösungen und Puffer wurde deionisiertes Wasser verwendet. Die 10-fach Puffer wurden vor ihrem Gebrauch mit deionisiertem Wasser auf 1-fach Puffer verdünnt.

Annexin-Bindungspuffer, 10-fach	10 mM HEPES 140 mM NaCl 2,5 mM CaCl pH 7,4
Blockpuffer	TBST 1-fach 5 % Milchpulver
Elektrophoresepuffer, 10-fach	250 mM Tris-HCL 1 % SDS 1920 mM Glycin pH 8,6
Lysepuffer	RIPA Buffer 20 µl/ml PIC 5 µl/ml Pep A

<i>Phosphate buffered saline (PBS), 10-fach</i>	2,5 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 140 mM NaCl 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,4
Probenpuffer	4-fach Laemmli Puffer 50 nM DTT
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCL 0,4 % SDS pH 6,8
<i>Tris buffered saline (TBS), 10-fach</i>	100 mM Tris-HCl 1,5 M NaCl pH 7,4
TBS-Tween (TBST)	TBS 1-fach 0,1 % Tween
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCL 0,4 % SDS pH 8,85
2.7 SDS-PAGE Gele	
Sammelgel (4,5 %)	4,8 ml Aqua dest. 1,85 ml Sammelgelpuffer 0,83 ml Rotiphorese® Gel 7,5 µl TEMED 60 µl 12,5 % APS
Trenngel (12,5 %)	5,3 ml Aqua dest. 3 ml Trenngelpuffer 3,75 ml Rotiphorese® Gel 10 µl TEMED 96 µl 12,5 % APS

2.8 Antikörper

Die Antikörper wurden je nach Herstellerangaben in 5 % bovinem Serumalbumin (BSA) und TBS oder 5 % Milch und TBST verdünnt. Der β -Aktinantikörper wurde in Rotiblock verdünnt.

Tabelle 2

Primärantikörper der Western-Blot Analyse

Zielprotein	Spezies	Verdünnung	Artikelnummer	Hersteller
β -Aktin	-	1:2500	#A3854	Sigma
BCL2	Kaninchen	1:500	#2870	Cell signaling
BCL2L1	Kaninchen	1:1000	#2764	Cell signaling
BIRC5	Kaninchen	1:500	#2803	Cell signaling
CLSPN	Kaninchen	1:300	#2800	Cell signaling
MCL1	Kaninchen	1:300	sc-819	Santa Cruz
PMAIP1	Maus	1:100	sc-56169	Santa Cruz
PARP1	Kaninchen	1:1000	#9542	Cell signaling
TP53	Maus	1:200	sc-73566	Santa Cruz
XIAP	Maus	1:700	#610716	BD

Tabelle 3

Sekundärantikörper der Western-Blot Analyse

Zielprotein	Spezies	Verdünnung	Artikelnummer	Hersteller
HRP-anti Maus	Ziege	1:2000	#1721011	Bio-Rad, München
HRP-anti Kaninchen	Ziege	1:2000	#1706515	Bio-Rad, München

Anmerkung. HRP= horseradish peroxidase

2.9 Mistelextrakte

Die Mistelextrakte wurden aus einjährigen Misteltrieben des Apfelbaumes, *Malus domestica* Borkh., gewonnen und von der Firma Birken zur Verfügung gestellt. Der Extrakt TT enthielt solubilisierete Triterpensäuren, hauptsächlich OA und zu geringeren Teilen BA. Die Triterpensäuren wurden aus getrockneten Pflanzenbestandteilen extrahiert [130] und anschließend mit CD solubilisiert [138, 142]. OA und BA wurden

mittels Gaschromatographen-Flammenionisationsdetektor quantifiziert [99]. Der viscum-Extrakt war ein wässriger Mistelextrakt, der größtenteils ML I und zu einem geringeren Anteil VT enthielt. Viscum wurde aus gemahlenden Pflanzenbestandteilen gewonnen [138] und der Gehalt von ML I mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) quantifiziert [158]. Das Kombinationspräparat viscumTT wurde durch Mischen der Einzelextrakte TT und viscum hergestellt. Vor der Anwendung wurden die Extrakte in PBS gelöst, dabei dienten ML und OA als Markersubstanzen für die eingesetzten Wirkstoffkonzentrationen von viscum und TT. Die Endkonzentration von OA betrug 4000 µg/ml und die von ML 1000 ng/ml (Tabelle 4) je Stocksolution. Die Mistelextrakte wurden unter der Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen aufgelöst und anschließend mit 0,22 µm Filtern (PVDF Membranen) steril filtriert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C, wobei die Extrakte nicht länger als 14 Tage verwendet wurden.

Tabelle 4

Zusammensetzung der Mistelextrakte

Extrakt	Gelöst in	ML [ng/ml]	VT [ng/ml]	BA [µg/ml]	OA [µg/ml]	CD [mg/ml]
viscum	1,14 ml PBS	1000	221,3	-	-	-
TT	1,16 ml PBS	-	-	172	4000	230
viscumTT	1,14 ml PBS	1000	221,3	-	-	-
	1,16 ml PBS	-	-	172	4000	230

2.10 Zelllinien

2.10.1 RMS-13

Bei der Zelllinie RMS-13 handelt es sich um ein ARMS. Etabliert wurde die Zelllinie aus einer Knochenmarksmetastase eines 17-jährigen Patienten kaukasischer Abstammung. Die RMS-13 sind adhärent wachsende Zellen, die morphologisch Fibroblasten ähneln. Die Zelllinie ist Träger der Mutation t(2;13)(q35;q14) und exprimiert das Fusionsprotein PAX3/FOXO1. Erworben wurden die Zellen bei der *American Type Culture Collection* (ATCC), Manassas, Virginia, USA [159].

2.10.2 RH-30

Diese humane ARMS-Zelllinie wurde aus einer Knochenmarksmetastase eines 17-jährigen männlichen Patienten etabliert. Die Zellen ähneln Epithelzellen und wachsen adhärent als *Monolayer*. Die RH-30 Zelllinie ist Träger der Translokation t(2;13)(q35;14) und exprimiert aufgrund dessen das PAX3/FOXO1-Fusionsprotein. Die Zelllinie wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Leibniz Institut DSMZ), Braunschweig, erworben [160].

2.10.3 TE 671

Ursprünglich wurde diese Zelllinie aus dem Biopsat eines cerebellären Medulloblastoms eines sechsjährigen Mädchens mit kaukasischer Abstammung etabliert. Zytogenetische Untersuchungen ergaben jedoch, dass es sich dabei um ein ERMS handelt [161]. Die adhärennten Zellen ähneln in ihrer Morphologie epithelialen Zellen. Die Zelllinie wurde von der DSMZ erworben [162].

2.11 Zellkulturmedien

RPMI-1640 + L-Glutamin	10 % FKS 1 % PS
DMEM mit 4,5 g/L Glukose + L-Glutamine	10 % FKS 1 % PS
Einfriermedium	90 % FKS 10 % DMSO

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten mit den Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Bei den verwendeten Materialien handelte es sich um steril verpackte Einmalartikel oder sie wurden vor dem Gebrauch autoklaviert.

3.1.1 Zellkultivierung

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 175 bzw. 75 cm² bei 37°C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 85 % in einem CO₂-Inkubator kultiviert. Sie wurden in einem zwei- bis dreitägigem Rhythmus passagiert. Zunächst wurde das alte Medium abgesaugt und verworfen, anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für zwei bis fünf Minuten im CO₂-Inkubator bei 37°C mit 2 ml 0,05 % Trypsin/EDTA inkubiert. Danach wurden die Zellen in frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Mit dem CASY[®] *Cell Counter* wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellzahl je nach Versuchsbedingungen eingestellt. Die verschiedenen Kultivierungsbedingungen der Zelllinien sind zur Übersicht in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5

Kultivierung der Zelllinien

Zelllinie	Medium	Zellzahl
RMS-13	RPMI-1640 + 10 % FKS + 1 % PS	4-5 × 10 ⁶ (175 cm ² Wachstumsfläche)
TE 671	DMEM + 10 % FKS + 1 % PS	1-1,5 × 10 ⁶ (75 cm ² Wachstumsfläche)
RH-30	RPMI-1640 + 10 % FKS + 1 % PS	1,5-2 × 10 ⁶ (75 cm ² Wachstumsfläche)

3.1.2 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden wie bereits beschrieben geerntet und die Zellkonzentration mit dem CASY[®] *Cell Counter* bestimmt. Anschließend wurden die Zellen für fünf Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellzahl wurde auf 2 × 10⁶ Zellen/ml eingestellt und die Zellen in Einfriermedium aufgenommen. Die

Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und zunächst für zwei Stunden bei -80°C gekühlt. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

3.1.3 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen und zügig im Wasserbad aufgetaut. Danach wurden sie in frischem Zellkulturmedium suspendiert und bei 1400 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in Medium resuspendiert und die Zellsuspension in eine Zellkulturflasche überführt. Ein Mediumwechsel wurde am nächsten Tag vorgenommen.

3.1.4 Versuchsansätze

Für alle Versuche wurden die Zellen zunächst geerntet und die Zellzahl gemessen. Im Anschluss daran wurden sie mit einer Zellzahl von 2×10^5 Zellen/ml in Zellkulturplatten ausgesät, das Endvolumen betrug je *well* im *6-well* 2 ml, im *12-well* 1 ml und im *96-well* 100 μl . Wenn nicht anders aufgeführt, wurden die Versuche im *6-well* durchgeführt. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 im CO_2 -Inkubator adhäriert. Es folgten ein Mediumwechsel sowie die Zugabe der Mistelextrakte. Als Markersubstanzen für die eingesetzten Wirkstoffkonzentrationen dienten ML für *viscum* und OA für TT. Die Endkonzentration von OA betrug 30; 35; 40 und 45 $\mu\text{g/ml}$. ML wurde in den Konzentrationen 1,25; 2,5; 5 und 7,5 ng/ml verwendet. Bei jedem Versuch wurde eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Nach Hinzugabe der Mistelextrakte wurden die Ansätze für weitere 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Je nach Versuchsaufbau folgte die weitere Aufbereitung der Zellen.

3.2 Zellzahlbestimmung

Mittels des CASY® *Cell Counters* können Aussagen über die Größe und die Konzentration der Zellen getroffen werden. Gleichzeitig ist es möglich, lebende Zellen, tote Zellen, Zelldebris und Zellaggregate zu quantifizieren und voneinander abzugrenzen. Hierfür werden die Messprinzipien der Widerstandsmessung und die Pulsflächenanalyse miteinander kombiniert. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 100 μl einer Zellsuspension mit 10 ml Elektrolytlösung verdünnt und unter die Messkapillare platziert. Das Gerät führte drei Einzelmessungen durch, bildete den Mittelwert und zeigte die Gesamtzellzahl sowie die Zahl vitaler Zellen pro ml an.

3.3 Zytotoxizitätstest mittels Lactatdehydrogenase-Assay

Der Lactatdehydrogenase (LDH)-Assay diente dem Ausschluss eines nekrotisierenden Effektes nach Behandlung mit Mistelextrakten. Durch Schädigung der Zellmembranintegrität im Rahmen der Nekrose gelangt zytosolische LDH in den Extrazellulärraum. Dieses Enzym ist außerhalb der Zelle relativ stabil und eignet sich daher als Marker für die Zellschädigung, wobei die Menge freigesetzter LDH mit dem Ausmaß der Zellschädigung korreliert. Die LDH-Aktivität lässt sich durch die Umsetzung eines Formazansalzes im Zellkulturmedium nachweisen. Im Rahmen dieser Reaktion kommt es zu einem Farbumschlag, der photometrisch quantifiziert werden kann, wobei die Rotfärbung proportional zu der freigesetzten Menge LDH ist. Dieser Farbumschlag wird im ELISA-Reader bei 490 nm gemessen. Infolge der Nekrose, wäre im Zellkulturmedium frühzeitig ein rascher Anstieg der LDH-Konzentration zu erwarten.

Der LDH-Assay wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen wie oben beschrieben in einer 96-well Zellkulturplatte ausgesät und nach 24 Stunden die Mistelextrakte pipettiert. Das frische Zellkulturmedium enthielt jetzt 3 % BSA statt fetales Kälberserum (FKS). Nach zweistündiger Inkubationszeit wurde zunächst der Überstand gewonnen und hiervon je 100 µl pro Konzentration in eine neue 96-well Zellkulturplatte überführt. Nachfolgend wurden 100 µl Reaktionsmix je well pipettiert und der Ansatz bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach zehn Minuten wurden dem Ansatz 50 µl Stopplösung je well hinzugegeben und die Absorption im Photometer gemessen. Als Positivkontrolle für die maximale LDH-Aktivität wurde eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt, der 15 Minuten vor Ende der Inkubationszeit 5 µl Lysepuffer hinzugefügt wurde. Als negative Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, als Blindkontrolle reines Zellkulturmedium ohne Zusatz von Zellen oder Mistelextrakten. Substanzkontrollen, die nur Medium und die Mistelextrakte enthielten, wurden ebenfalls von jeder Konzentration mitgeführt.

Von den Probenwerten wurden zunächst die Extinktionswerte der Substanzkontrollen subtrahiert. Ebenso wurden von der Positiv- und der Negativkontrolle die Extinktionswerte der Blindkontrolle abgezogen. Anhand folgender Formel konnte nun die Zytotoxizität ermittelt werden.

$$\text{Zytotoxizität \%} = \frac{\text{Probe} - \text{Negativkontrolle}}{\text{Positivkontrolle} - \text{Negativkontrolle}} \times 100$$

3.4 Durchflusszytometrische Analysen

Ein Großteil der Untersuchungsergebnisse wurde mittels der Durchflusszytometrie, *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS), am FACSCalibur™ erhoben. Im Folgenden wird kurz das Messprinzip dieses Verfahrens erläutert.

Die Durchflusszytometrie dient als Methode zur Untersuchung von Zelleigenschaften wie der Größe, Struktur und Oberflächenbeschaffenheit. Das Prinzip der Messung beruht darauf, dass suspendierte Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen oder mit Antikörpern, die an eine Fluoreszenz gekoppelt sind, markiert und einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt werden. Angeregt durch den Laser emittieren die Zellen optische Signale, die von ihren Zelleigenschaften abhängig sind. Es werden sowohl die Streulichtemissionen (*Forward* und *Sideward Scatter*) als auch die Fluoreszenzemissionen erfasst. Die Fluoreszenzemissionen der Farbstoffe werden über die Fluoreszenzkanäle (FL-1, FL-2 und FL-4) registriert und variieren je nach Emissionsspektrum des Farbstoffs. Dadurch ist es möglich, je nach experimenteller Fragestellung, gleichzeitig mehrere zelluläre Eigenschaften durch unterschiedliche Färbungen zu ermitteln.

3.4.1 Annexin/PI-Färbung

Eine Möglichkeit zur Quantifizierung der Apoptoseinduktion durch Mistelextrakte ist die Zellfärbung mit Annexin V APC (Annexin) und Propidiumiodid (PI) sowie anschließender durchflusszytometrischer Messung. Annexin bindet mit hoher Affinität Calcium-abhängig Phosphatidylserin. Phosphatidylserin befindet sich normalerweise auf der zum Zytosol gerichteten Seite der Zellmembran. Während der Apoptose transloziert Phosphatidylserin auf die Membranoberfläche und bindet Annexin. Durch diese Reaktion werden apoptotische Zellen markiert. Die Kopplung von Annexin an den Fluoreszenzfarbstoff APC ermöglicht die Detektion von Annexin im Durchflusszytometer (FL-4-Kanal). Die zusätzliche Färbung mit PI (FL-2-Kanal) erlaubt die Unterscheidung zwischen nekrotischen, früh- und spätapoptotischen Zellen. PI ist ein interkalierender Farbstoff, der bei erhöhter Permeabilität der Plasmamembran in die Zelle diffundiert und die DNS anfärben kann.

Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben mit den Mistelextrakten inkubiert und nach einem Zeitraum von 24 oder 48 Stunden aufbereitet. Der Versuch wurde bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden geerntet und für fünf Minuten bei 1250 *rpm* zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand

wurde abgesaugt und die Zellen in 100 μ l Annexin-Bindungspuffer aufgenommen. Der Ansatz wurde mit 3 μ l Annexin für 25 Minuten im Dunkeln gefärbt. Die Färbung wurde mit 200 μ l Annexin-Bindungspuffer abgestoppt. Unmittelbar vor der Messung im Durchflusszytometer wurde den Proben 1 μ l PI (1 mg/ml in PBS) hinzugegeben.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit den Softwares CellQuest[®] und FlowJo[®]. Abbildung 2 zeigt schematisch die Auswertung der Annexin/PI-Färbung. Mit zunehmender Apoptoseinduktion nehmen die Fluoreszenzintensitäten im FL-4-Kanal und im FL-2-Kanal zu. Vitale Zellen sind sowohl Annexin als auch PI negativ, sie liegen im linken unteren Quadranten. Frühapoptotische Zellen sind Annexin positiv sowie PI negativ und finden sich im rechten unteren Quadranten. Im rechten oberen Quadranten bildeten sich die spätapoptotischen Zellen ab, die sowohl PI als auch Annexin positiv sind. Nekrotische Zellen sind nur PI positiv und stellen sich im linken oberen Quadranten dar.

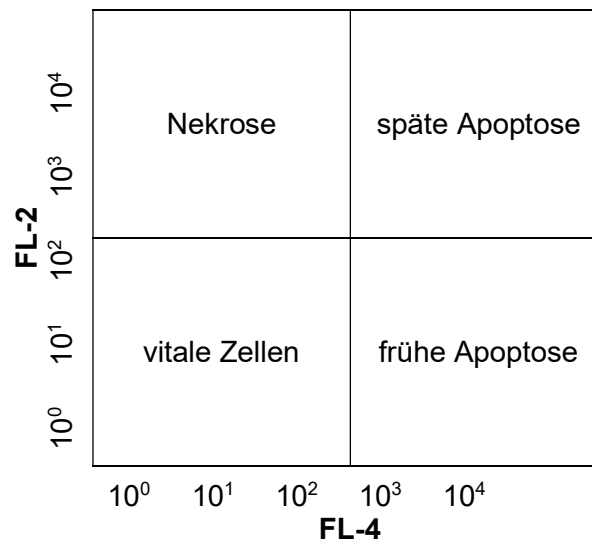


Abbildung 2. Prinzip der Auswertung einer FACS-Analyse. Lebende Zellen bilden sich im linken unteren, apoptotische Zellen im rechten oberen und unteren Quadranten ab. Nekrotische Zellen zeichnen sich links oben ab.

3.4.2 Messung des mitochondrialen Membranpotentials

Das MMP ist ein sensibler Parameter für die Funktionalität der Mitochondrien und verändert sich schon während der frühen Apoptose. Die Messung des MMP erfolgte mit dem lipophilen, kationischen Farbstoff 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethylbenzimidazolcarbocyaniniodid (JC-1), der sich in intakten Mitochondrien anreichert und Aggregate bildet. Diese Aggregate emittieren bei 590 nm eine rote Fluoreszenz (FL-1-Kanal). Kommt es aufgrund apoptotischer Prozesse zu einer Erniedrigung des

MMP, liegt JC-1 vermehrt als Monomer im Zytosol vor. Die Monomere emittieren bei 527 nm ein grünes Licht (FL-2-Kanal). Diese Verschiebungen im Emissionsspektrum können mit dem Durchflusszytometer erfasst werden. Als Positivkontrolle diente Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP). CCCP ist ein Entkoppler (Protonophor), der das MMP erniedrigt, ohne die Zellmembranintegrität zu beeinflussen. Der Versuch wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt und erfolgte bei Raumtemperatur. Nach 24-stündiger Inkubation mit den Mistelextrakten wurden die Zellen trypsiniert und für fünf Minuten bei 20°C und 1250 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 750 µl PBS resuspendiert. Es wurde nun mit 10 µl einer 0,1 mg/ml JC-1-Lösung gefärbt, die Endkonzentration betrug 2 µM JC-1 je FACS-Röhrchen. Eine JC-1-Kontrolle und eine CCCP-Kontrolle (Endkonzentration 50 µM) wurden mitgeführt. Unter Lichtausschluss wurden die Zellen für 30 Minuten bei 37°C gefärbt. Es wurde nochmals mit 4 ml PBS gewaschen und das Pellet in 250 µl Annexin-Bindungspuffer aufgenommen. Die Messung von 10 000 Zellen erfolgte am Durchflusszytometer. Die Daten wurden mit den Softwares CellQuest® und FlowJo® ausgewertet.

3.4.3 Aktive Caspasefärbung

Caspasen besitzen eine zentrale Bedeutung sowohl bei dem extrinsischen als auch intrinsischen Apoptosesignalweg. Zur genaueren Untersuchung der Caspaseaktivität erfolgte die Messung der aktiven Initiatorcaspasen CASP8 und CASP9 sowie der Effektorcaspase CASP3 im Durchflusszytometer. Um die Caspasen anzufärben, wurden an Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelte Caspaseinhibitoren verwendet. Die fluoreszenzmarkierten Inhibitoren können die Zellmembran passieren und irreversibel an die jeweilige aktive Caspase binden. Im Durchflusszytometer konnte nun die Messung des FITC-Farbstoffs und somit der direkte Nachweis der Caspaseaktivität erfolgen. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit viscum, TT und viscumTT inkubiert und anschließend die aktiven Caspasen gemäß dem Herstellerprotokoll gefärbt. Dazu wurden die Zellen zunächst geerntet und für fünf Minuten bei 20°C und 1250 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 µl Waschpuffer aufgenommen und mit 1 µl FITC-LEHD-FMK (CASP9), FITC-IETD-FMK (CASP8) oder FITC-DEVD-FMK (CASP3) gefärbt. Die Färbung wurde nach 30 Minuten bei 37°C mit 1 ml Waschpuffer gestoppt. Es schlossen sich zwei Waschschrte mit je 1 ml Waschpuffer an. Danach wurden die Zellen in 300 µl

Waschpuffer resuspendiert und im FL-1-Kanal des Durchflusszytometer gemessen. Es wurde stets eine ungefärbte Kontrolle mitgeführt. Die Daten wurden mit den Softwares CellQuest® und FlowJo® ausgewertet.

3.4.4 Caspaseinhibitoren

Der Einsatz spezieller Inhibitoren, welche Caspasen irreversibel hemmen, ermöglichte die nähere Analyse der Bedeutung der Caspasen bei der Apoptoseinduktion durch Mistelextrakte. Die Zellen wurden in 12-*well* Zellkulturplatten im Dreifachansatz ausgesät, wobei zwei Ansätze als Kontrollen verwendet wurden, und für 24 Stunden im CO₂-Inkubator adhäriert. Der Versuchsansatz wurde für eine Stunde mit einem Breitspektrum-, CASP8-, CASP9- und CASP10-Inhibitor vorinkubiert (Tabelle 6). Einem Kontrollansatz wurden 5 µM Dimethylsulfat (DMSO) hinzugefügt, da die Inhibitoren in DMSO gelöst waren. Im Anschluss wurden sowohl den Kontrollansätzen als auch dem Versuchsansatz viscum und viscumTT hinzugefügt. Für TT ist keine Messung durchgeführt worden, da in den vorangegangenen Versuchen keine Apoptoseinduktion nach Behandlung mit TT detektiert werden konnte. Nach 24 Stunden wurden die Ansätze wie bereits in Kapitel 3.4.1 beschrieben aufgereinigt, mit Annexin und PI gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Inhibierung der Apoptose wurde anhand der Apoptoseinduktion des Versuchsansatzes im Vergleich zu der des DMSO-Kontrollansatzes berechnet. Die Ergebnisse wurden als Prozent der Kontrolle dargestellt.

Tabelle 6

Wirkstoffkonzentrationen der Caspaseinhibitoren

Inhibitor	Konzentration
Z-VAD-FMK (Breitspektrum-inhibitor)	100 µM
Z-LEHD-FMK (CASP9-Inhibitor)	50 µM
Z-IETD-FMK (CASP8-Inhibitor)	100 µM
Z-AEVD-FMK (CASP10-Inhibitor)	100 µM

3.5 Proteinchemische Methoden

Proteinchemische Methoden dienen neben den durchflusszytometrischen Analysen der Charakterisierung des Apoptosemechanismus. Hierbei wurden Apoptose-assoziierte Proteine untersucht und deren Expression bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen über 24 Stunden mit Mistelextrakten inkubiert und im Nachfolgendem lysiert. Es folgten die gelelektrophoretische Auftrennung und Detektion spezifischer Proteine im Western-Blot.

3.5.1 Gewinnung von Zelllysaten

Zur Gewinnung intrazellulärer Proteine wurde die Integrität der Zellmembran mit einem Lysepuffer zerstört. Der Lysepuffer enthielt zudem Pepstatin A (Pep A) und den *Complete Protease Inhibitor Cocktail* (PIC), um den Abbau der Proteine durch zelleigene Proteinasen während der Aufbereitung zu verhindern. Die Zellen wurden in 58,9 cm² Zellkulturschalen mit einer Zellzahl von $2,78 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät, das Endvolumen betrug 12 ml. Die eingesetzte Zellzahl wurde der Wachstumsfläche entsprechend angepasst. Die Mistelextrakte wurden pipettiert und nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen mit Trypsin geerntet und zweimal mit PBS gewaschen. Der Waschüberstand wurde verworfen und das Pellet in 120-350 µl Lysepuffer resuspendiert. Die Proben wurden für 30 Minuten bei 4°C über Kopf geschüttelt und anschließend für fünf Minuten bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde gewonnen und bei -80°C gelagert oder sofort für weitere Versuche verwendet.

3.5.2 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate erfolgte mit dem Bradford-Test, bei dem es sich um eine photometrische Methode zur quantitativen Proteinbestimmung handelt. Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau bindet an Proteine, wodurch sich sein Absorptionsmaximum verschiebt. Die Intensität der Reaktion ist proportional zu der Menge von gebundenem Protein und kann photometrisch bestimmt werden. Zur Kalibrierung des Tests wurde eine Verdünnungsreihe eingesetzt, die definierte Mengen BSA und Lysepuffer enthielt. Zur Proteinbestimmung wurden 200 µl Bradfordreagenz in eine 96-well Mikrotiterplatte vorgelegt und je 1 µl Proteinextrakt pro Probe bzw. Standard im Dreifachansatz pipettiert. Der Ansatz wurde für eine Minute im Dunkeln inkubiert und anschließend 30 Sekunden geschüttelt. Die Messung der

Extinktion erfolgte bei 595 nm im Photometer und aus den drei Messungen wurde anschließend der Mittelwert gebildet. Die Proteinkonzentration wurde in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ berechnet und auf 20-25 μg Protein eingestellt. Es wurden 5 μl Probenpuffer hinzugegeben und die Proben für zehn Minuten bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Lysate auf Eis gesetzt und entweder direkt verwendet oder bei -80°C gelagert.

3.5.3 SDS-PAGE

Bevor die Proteine immunologisch nachgewiesen werden konnten, mussten sie zunächst der Größe nach über eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt werden. Das zu diesem Zweck verwendete SDS-Polyacrylamidgel bestand aus einem Trenn- und einem Sammelgel, die sich in ihrer Acrylamidkonzentration unterschieden (siehe Kapitel 2.7). Nach dem Gießen der Gele wurden die entstandenen Taschen des Sammelgels mit Elektrophoresepuffer gespült und die Proben sowie ein Proteinmarker in die Taschen pipettiert. Die Kammer wurde mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt und an eine elektrische Spannung angeschlossen. Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte bei 120 V für ungefähr 70 Minuten im Trenngel.

3.5.4 Western-Blot

Im Anschluss an die SDS-PAGE erfolgte das *Western Blotting*, also die Übertragung der Proteine von dem Polyacrylamidgel auf eine Trägermembran. Hierfür wurde das Trans-Blot® Turbo™ Transfer System von Bio-Rad den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Das Transfer System enthielt als Trägermembran eine Nitrocellulosemembran und zwei Unterlagen, die in Puffer getränkt waren und als Ionenreservoir dienten. Die Ionenreservoir, die Nitrocellulosemembran sowie das Polyacrylamidgel wurden in einer Kassette platziert und das ganze System an eine Spannung angeschlossen. Nach sieben Minuten bei 25 V und 2,5 A war die Übertragung der Proteine auf die Membran abgeschlossen.

3.5.5 Antikörperdetektion

Um die antikörpermarkierten Proteinbanden zu detektieren, wurden die Nitrocellulosemembranen zunächst eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockpuffer inkubiert, so dass die unspezifischen freien Bindungsstellen blockiert wurden. Nach Zugabe der Primärantikörper (Tabelle 2) wurden die Membranen über Nacht bei 4°C auf einem Kippschüttler inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit TBST für je zehn Minuten. Anschließend wurden die Membranen eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem an eine *horseradish peroxidase* (HRP) gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert (Tabelle 3). Nach drei weiteren Waschschrten mit TBST wurden die Proteinbanden durch Hinzugabe einer ECL Lösung auf Luminolbasis detektiert. Die HRP katalysierte die Chemilumineszenzreaktion von Luminol, die dabei entstandenen Lichtemissionen wurden mit dem ChemiDoc™ erfasst und die Proteinbanden wurden sichtbar. Das Bandenmuster wurde mit den Softwares ImageLab und Adobe Photoshop ausgewertet.

3.5.6 Apoptosis Array

Mit dem *Proteome Profiler™ Human Apoptosis Array* konnten 35 Apoptose-assoziierte Proteine gleichzeitig detektiert werden. Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben ausgesät und die Mistelextrakte in den Konzentrationen TT 40 µg/ml und viscum 5 ng/ml pipettiert. Für das Experiment wurden 1×10^7 Zellen je Probe in Lysepuffer aufgenommen und bei 4°C für 30 Minuten über Kopf geschüttelt. Im Anschluss wurden die Zellen bei 14 000 rpm und 4°C für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde gewonnen und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Test bestimmt. Es wurden 225 µg Protein je Extrakt auf den *Apoptosis Array* aufgetragen. Alle weiteren Schritte erfolgten gemäß der Herstellerangabe. Die unbehandelte Kontrolle diente als Referenz.

3.6 Fractional Product nach Webb

Zwei verschiedene Wirkstoffe können sich bei Kombination in ihrer Wirkung gegenseitig beeinflussen. Um zu überprüfen, ob die Kombination der Mistelextrakte einen additiven, antagonistischen oder synergistischen Effekt hatte, wurde das *Fractional product* (Fp) nach Webb berechnet [163]. Die Methode basiert auf dem Vergleich des kalkulierten Effektes mit dem spezifischen Effekt. Der kalkulierte Effekt ergibt sich aus den spezifischen Effekten der Einzelsubstanzen und wurde wie folgend berechnet:

$$E_{1,2} = (E_1 + E_2) - (E_1 \times E_2)$$

E_{1,2}: kalkulierter Effekt von viscumTT; E₁: spezifischer Effekt von TT; E₂: spezifischer Effekt von viscum

Das F_p wurde anhand des spezifischen Effekts, also des tatsächlichen Effekts von viscumTT und des kalkulierten Effekts berechnet.

$$F_p = \frac{\textit{spezifischer Effekt}}{\textit{kalkulierter Effekt}}$$

Bei einem additiven Effekt war das F_p gleich eins, bei einem antagonistischen Effekt war es kleiner eins und bei einem synergistischen Effekt größer eins.

3.7 Datenauswertung

Alle Versuche bestehen aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. Eine Ausnahme bildete der *Apoptosis Array*, der nur einmal durchgeführt wurde. Die Daten sind entweder als Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD) oder als repräsentative Ergebnisse dargestellt.

4 Ergebnisse

Ziel dieser Dissertation war es zu untersuchen, ob die hier verwendeten Mistelextrakte, mit Hauptaugenmerk auf den Mistelgesamtextrakt viscumTT, Apoptose im Rhabdomyosarkmodell *in vitro* induzieren können. Darüber hinaus galt es, die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der Apoptoseinduktion zu untersuchen und zu charakterisieren.

4.1 Inhibierung der Zellproliferation durch Mistelextrakte

Zur Verifizierung der Hypothese, dass Mistelextrakte eine zytotoxische Wirkung aufweisen, wurde zunächst überprüft, ob Mistelextrakte das Zellwachstum beeinflussen. Dazu wurden die Zelllinien RMS-13, TE 671 und RH-30 in ansteigenden Konzentrationen mit viscum, TT und viscumTT inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die absoluten Zellzahlen mit dem CASY® *Cell Counter* gemessen.

Sowohl viscum als auch TT hemmten in allen drei Zelllinien die Proliferation (Abbildung 3). TT inhibierte das Zellwachstum um maximal 20 %, wobei der inhibierende Effekt durch Erhöhung der Toxinkonzentration nicht gesteigert werden konnte. Die Proliferationshemmung durch viscum hingegen war abhängig von der eingesetzten Dosis. Das Zellwachstum konnte bei den RH-30 Zellen um maximal 27 % und bei den TE 671 Zellen um 40 % inhibiert werden. Die RMS-13 Zellen reagierten am sensibelsten auf die Behandlung mit viscum, es konnte eine Proliferationshemmung von 60 % erzielt werden.

Das Kombinationspräparat viscumTT zeigte den stärksten antiproliferativen Effekt. Die maximale Inhibierung der Proliferation betrug bei der Zelllinie TE 671 60 %. Bei den Zelllinien RMS-13 und RH-30 konnte das Zellwachstum um bis zu 80 % reduziert werden. Bei allen drei Zelllinien konnte in den höchsten Konzentrationen eine synergistische Wirkung ($F_p > 1$) von viscumTT beobachtet werden (Abbildung 3).

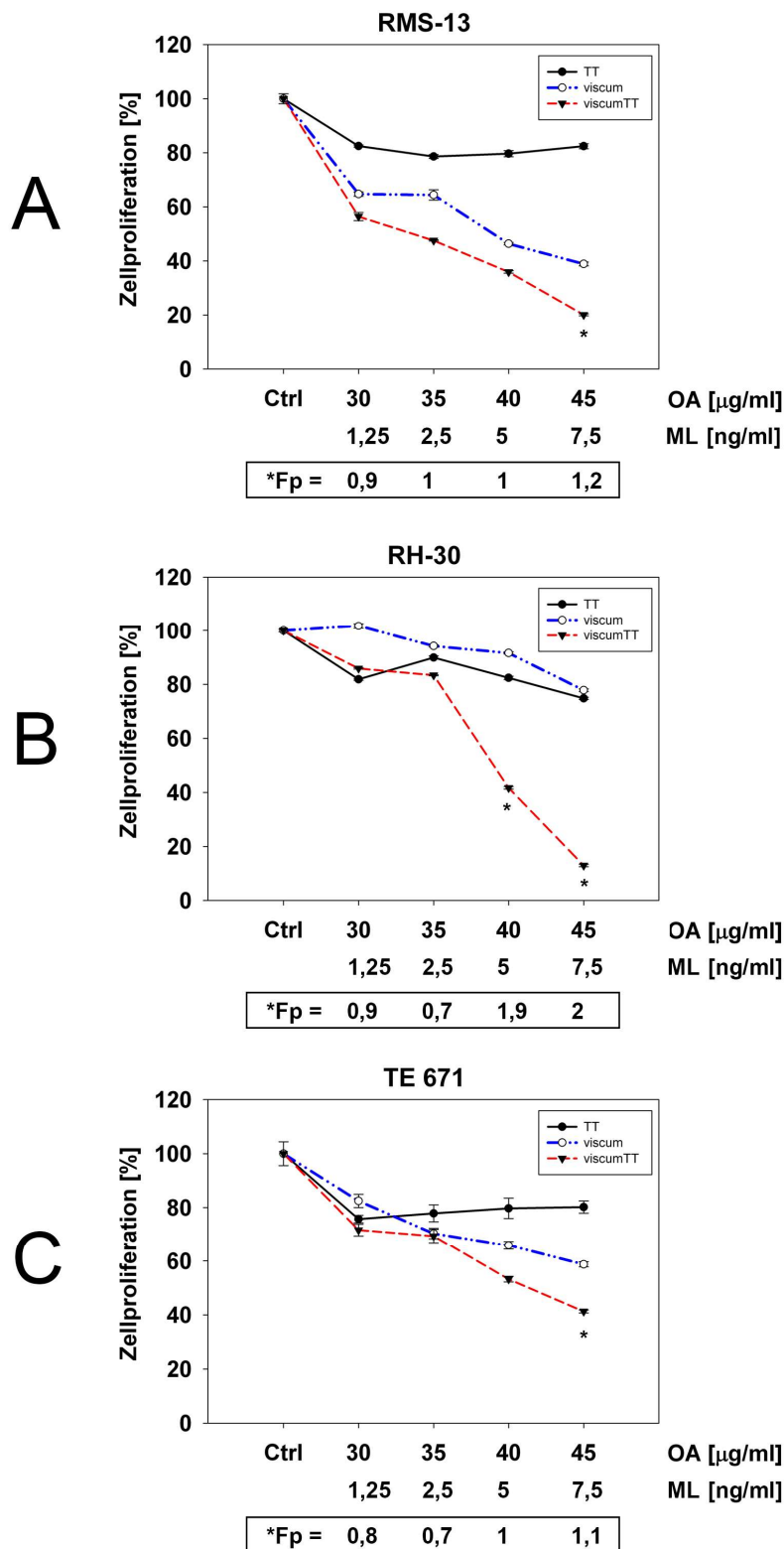


Abbildung 3. Untersuchung der Zellproliferation nach Inkubation mit Mistelextrakten. Die Zelllinien A) RMS-13, B) RH-30 und C) TE 671 wurden für 24 Stunden mit viscum, TT und viscumTT in ansteigenden Konzentrationen inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Zellzahlen mit dem CASY® Cell Counter. Mistellektine (ML) und Oleanolsäure (OA) dienen als Markersubstanzen für viscum und TT. Die Ergebnisse beziehen sich auf die unbehandelte Kontrollgruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Der synergistische Effekt wurde über das *fractional product* (Fp) nach Webb berechnet. Werte *Fp >1 zeigen einen Synergismus an. Ctrl = Kontrolle.

4.2 Apoptoseinduktion nach Behandlung mit Mistelextrakten

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass TT, viscum und viscumTT die Zellproliferation dosisabhängig hemmten. Als nächstes sollte überprüft werden, ob die Mistelextrakte Apoptose im RMS induzieren können. Hierfür wurden die Zellen wie bereits beschrieben mit den Mistelextrakten inkubiert und anschließend mit Annexin und PI gefärbt. Nach definierten Zeitpunkten wurde die Anzahl apoptotischer Zellen im Durchflusszytometer gemessen.

In Abbildung 4 sind die Veränderungen der Fluoreszenzintensitäten nach Inkubation mit Mistelextrakten im *Dot Plot* dargestellt. Abgebildet sind repräsentative Ergebnisse, die beispielhaft für die Zelllinie RMS-13 sind. Die Ergebnisse veranschaulichten, dass mit steigenden viscum- und viscumTT-Konzentrationen der Anteil Annexin- und PI-positiver Zellen zunahm. Dies wurde durch Erhöhung der Fluoreszenzintensitäten im FL-4-Kanal und im FL-2-Kanal erkennbar. Nach Behandlung mit TT konnten keine Veränderungen der Fluoreszenz detektiert werden.

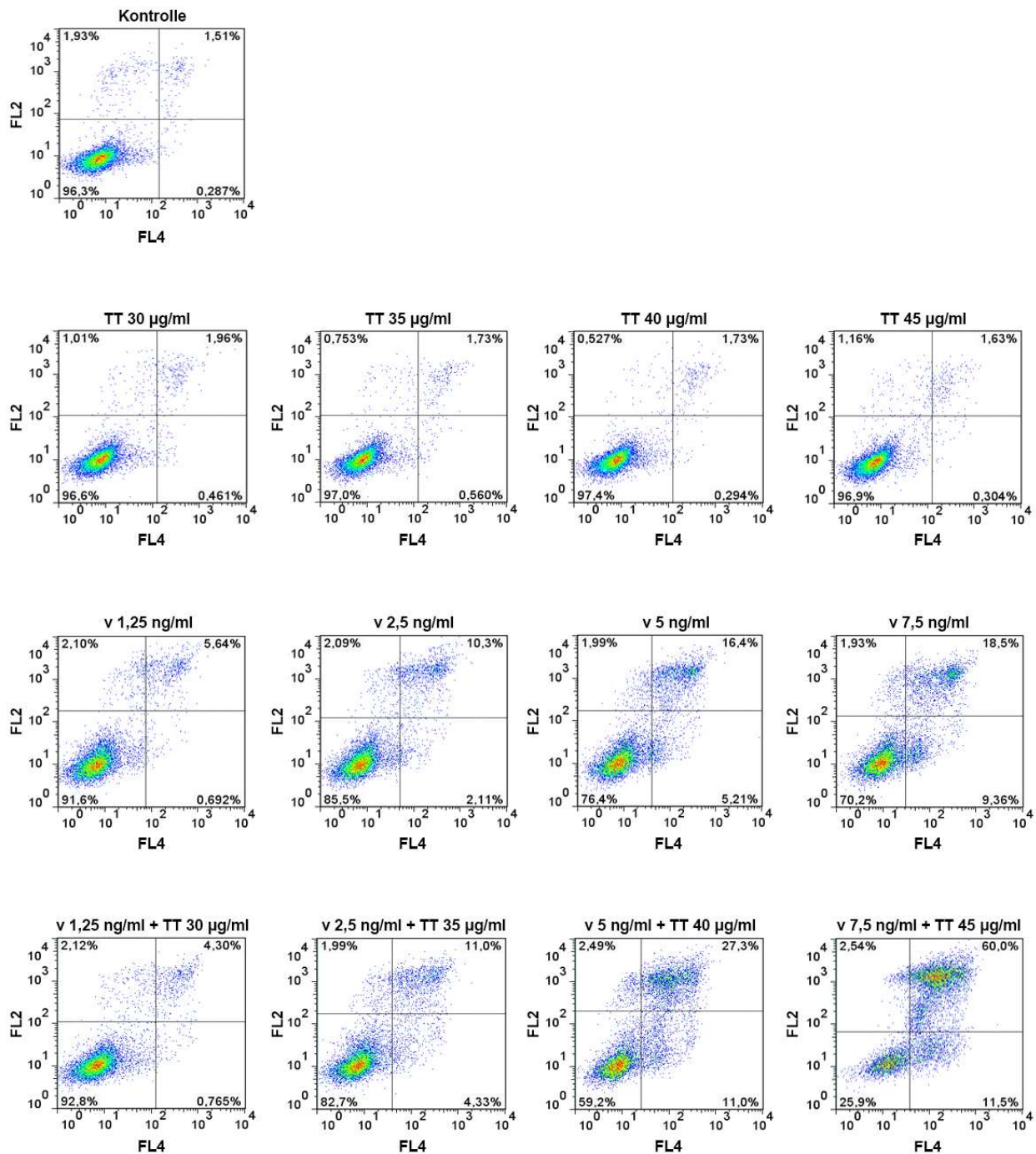


Abbildung 4. Repräsentative Ergebnisse der Annexin/PI-Färbung im *Dot Plot*. RMS-13 Zellen wurden mit viscum, TT und viscumTT in ansteigenden Konzentrationen inkubiert und anschließend mit Annexin V APC (Annexin) und Propidiumiodid (PI) gefärbt. Die Analyse der Zellen erfolgte im Durchflusszytometer. Die Ergebnisse wurden mit der Software *FlowJo* ausgewertet. Annexin wurde im FL-4-Kanal und PI im FL-2-Kanal gemessen. Lebende Zellen bilden sich im linken unteren, apoptotische Zellen im rechten oberen und unteren Quadranten ab. Nekrotische Zellen zeichnen sich links oben ab. v = viscum.

Die Daten der Annexin/PI-Färbung belegten, dass die Zelllinie RH-30 weder auf die Behandlung mit viscum und TT sensibel reagierte. Nach Inkubation mit viscumTT konnte konzentrationsabhängig eine moderate Apoptoseinduktion beobachtet werden. Die Anzahl apoptotischer Zellen stieg auf maximal 30 %. ViscumTT zeigte zudem eine synergistische Wirkung in den RH-30 Zellen (Abbildung 5).

Die Zelllinie TE 671 reagierte weder auf die getesteten Einzelextrakte, viscum und TT, noch auf viscumTT sensibel (Abbildung 5).

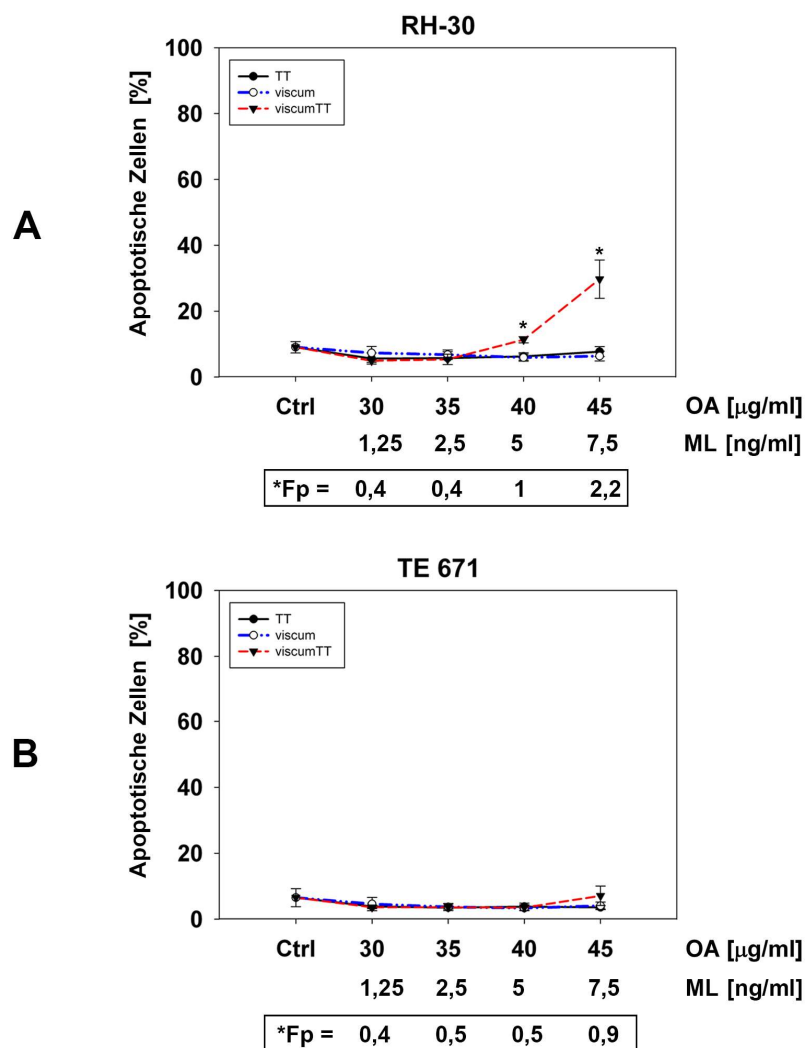


Abbildung 5. Messung der Apoptoseinduktion durch Mistelextrakte in den Zelllinien TE 671 und RH-30. A) RH-30 und B) TE 671 Zellen wurden mit TT, viscum und viscumTT in ansteigenden Konzentrationen inkubiert und nach 24 Stunden mit Annexin V APC (Annexin) und Propidiumiodid (PI) gefärbt. Die Messung der apoptotischen Zellen erfolgte im Durchflusszytometer. Mistellektine (ML) und Oleanolsäure (OA) dienen als Markersubstanzen für viscum und TT. Die Ergebnisse beziehen sich auf die unbehandelte Kontrollgruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Der synergistische Effekt wurde über das *fractional product* (Fp) nach Webb berechnet. Werte *Fp >1 zeigen einen Synergismus an. Ctrl = Kontrolle.

Die Zelllinie RMS-13 erwies sich resistent gegenüber der Behandlung mit TT. Im Gegensatz dazu reagierten die Zellen sensibel auf die Behandlung mit viscum und viscumTT, die zytotoxischen Effekte waren zeit- und konzentrationsabhängig. Nach Inkubation mit viscum waren nach 24 Stunden maximal 27 % der Zellen apoptotisch, nach 48 Stunden stieg die Zahl auf 69 % an. Nach 24-stündiger Inkubation mit viscumTT waren maximal 76 % der Zellen apoptotisch, bei Verdoppelung der Inkubationszeit stieg der Anteil auf 97 % an. Sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden konnten synergistische Effekte durch viscumTT auf die Apoptoseinduktion beobachtet werden (Abbildung 6).

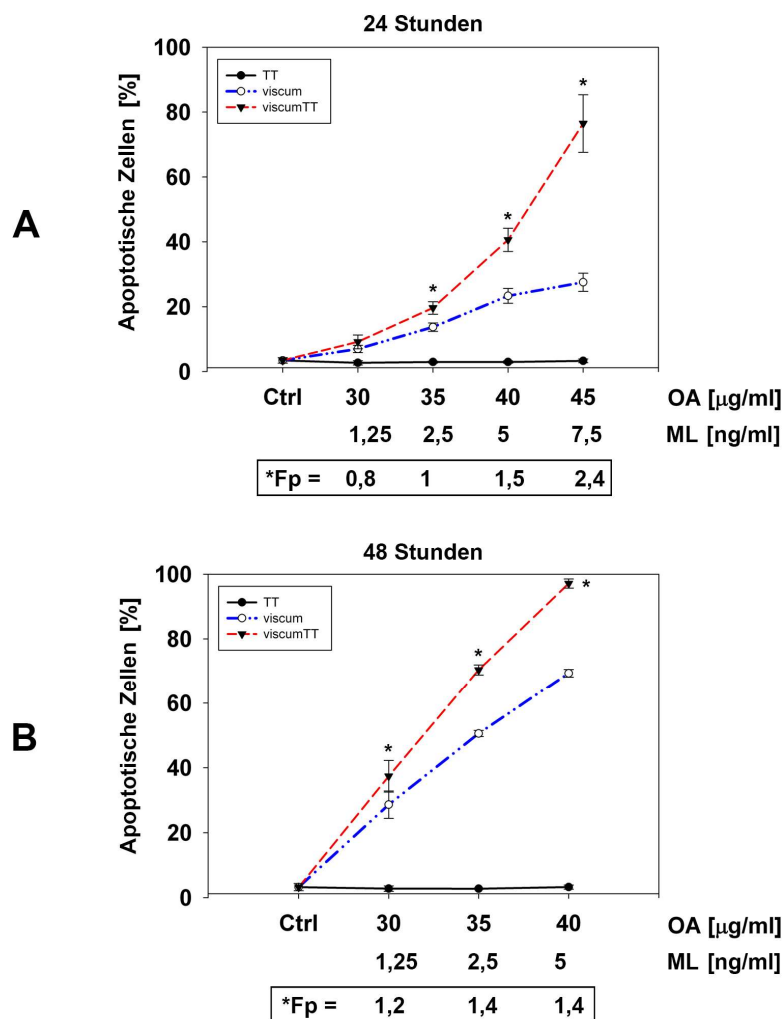


Abbildung 6. Untersuchung der Apoptoseinduktion nach Inkubation mit Mistelextrakten in den RMS-13 Zellen. Die Zelllinie RMS-13 wurde mit TT, viscum und viscumTT in ansteigenden Konzentrationen für A) 24 Stunden und B) 48 Stunden inkubiert und anschließend mit Annexin V APC (Annexin) und Propidiumiodid (PI) gefärbt. Die Analyse der Zellen erfolgte im Durchflusszytometer. Mistellektine (ML) und Oleanolsäure (OA) dienen als Markersubstanzen für viscum und TT. Die Ergebnisse für die Konzentrationen ML 7,5 ng/ml und OA 45 $\mu\text{g/ml}$ nach 48 Stunden sind nicht abgebildet, da hier 100 % der Zellen tot waren. Die Ergebnisse beziehen sich auf die unbehandelte Kontrollgruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Der synergistische Effekt wurde über das *fractional product* (Fp) nach Webb berechnet. Werte *Fp >1 zeigen einen Synergismus an. Ctrl = Kontrolle.

Anhand der Annexin/PI-Färbung wurde ersichtlich, dass weder die Zelllinie TE 671 noch die RH-30 Zellen sensibel auf die gewählten Wirkstoffe und ihre Konzentrationen reagierten. Im Gegensatz dazu konnte eine relevante Apoptoseinduktion für die RMS-13 Zellen beobachtet werden, demnach wurden alle weiteren Experimente ausschließlich mit der Zelllinie RMS-13 durchgeführt.

4.3 Messung der LDH-Freisetzung nach Inkubation mit Mistelextrakten

Im Verlauf der Nekrose kommt es durch Schädigung der Zellmembran zur unkontrollierten Freisetzung intrazellulärer Bestandteile. Als Folge können nekrotische Zellen im menschlichen Körper eine Entzündungsreaktion auslösen. Zum Ausschluss von Nekrose als Ursache der zytotoxischen Wirkung von Mistelextrakten wurde der LDH-Assay durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die RMS-13 Zellen mit Mistelextrakten inkubiert und anschließend die LDH-Konzentration im Zellkulturmedium gemessen.

Nach zwei Stunden konnte kein signifikanter Anstieg der LDH Konzentration (>10 %) detektiert werden (Abbildung 7).

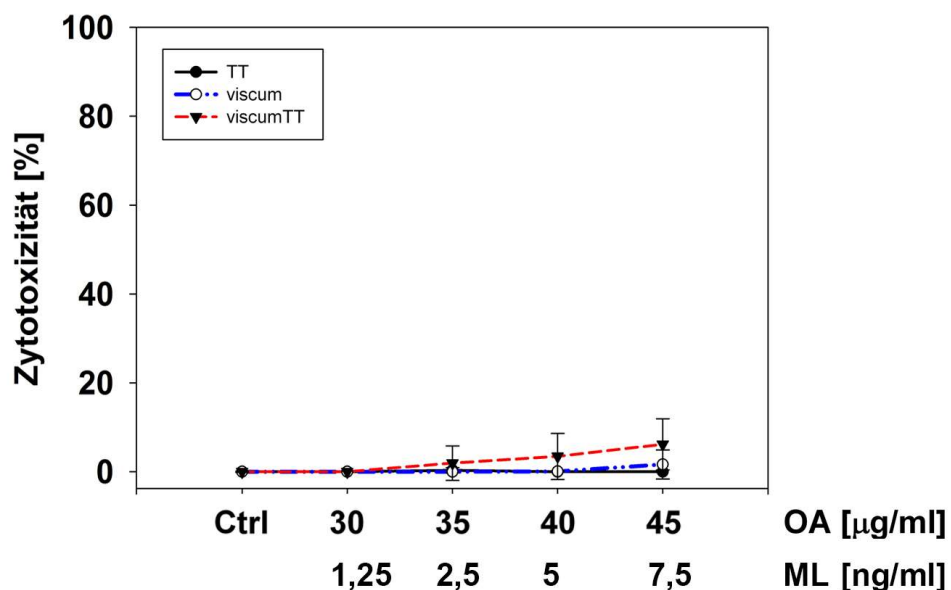


Abbildung 7. Messung der Nekroseinduktion durch Mistelextrakte mittels LDH-Assay. RMS-13 Zellen wurden für zwei Stunden mit ansteigenden Konzentrationen von viscum, TT und viscumTT inkubiert. Im Anschluss wurde die LDH-Freisetzung in das Zellkulturmedium mittels LDH-Assay bestimmt. Mistellektine (ML) und Oleanolsäure (OA) dienten als Markersubstanzen für viscum und TT. Die Ergebnisse beziehen sich auf die unbehandelte Kontrollgruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Ctrl = Kontrolle.

4.4 Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials nach Behandlung mit Mistelextrakten

Zur genaueren Charakterisierung des Apoptosemechanismus durch Mistelextrakte erfolgte die Messung des MMP mittels JC-1-Färbung. Hierfür wurden die RMS-13 Zellen wie bereits beschrieben mit Mistelextrakten inkubiert und anschließend mit JC-1 gefärbt. Als Positivkontrolle diente CCCP, ein Protonophor, welches das MMP depolarisiert.

Abbildung 8 stellt anhand repräsentativer Ergebnisse die Veränderungen der Fluoreszenzintensitäten nach Inkubation mit Mistelextrakten dar. Die Behandlung mit *viscum* und *viscumTT* bewirkte eine Depolarisation der Mitochondrienmembran. Als Folge nahm die Zahl der roten Aggregate ab, wohingegen die der grünen Monomere anstieg. Im *Dot Plot* wurde dies durch die Erniedrigung der Fluoreszenzintensität im FL-2-Kanal und Erhöhung im FL-1-Kanal deutlich.

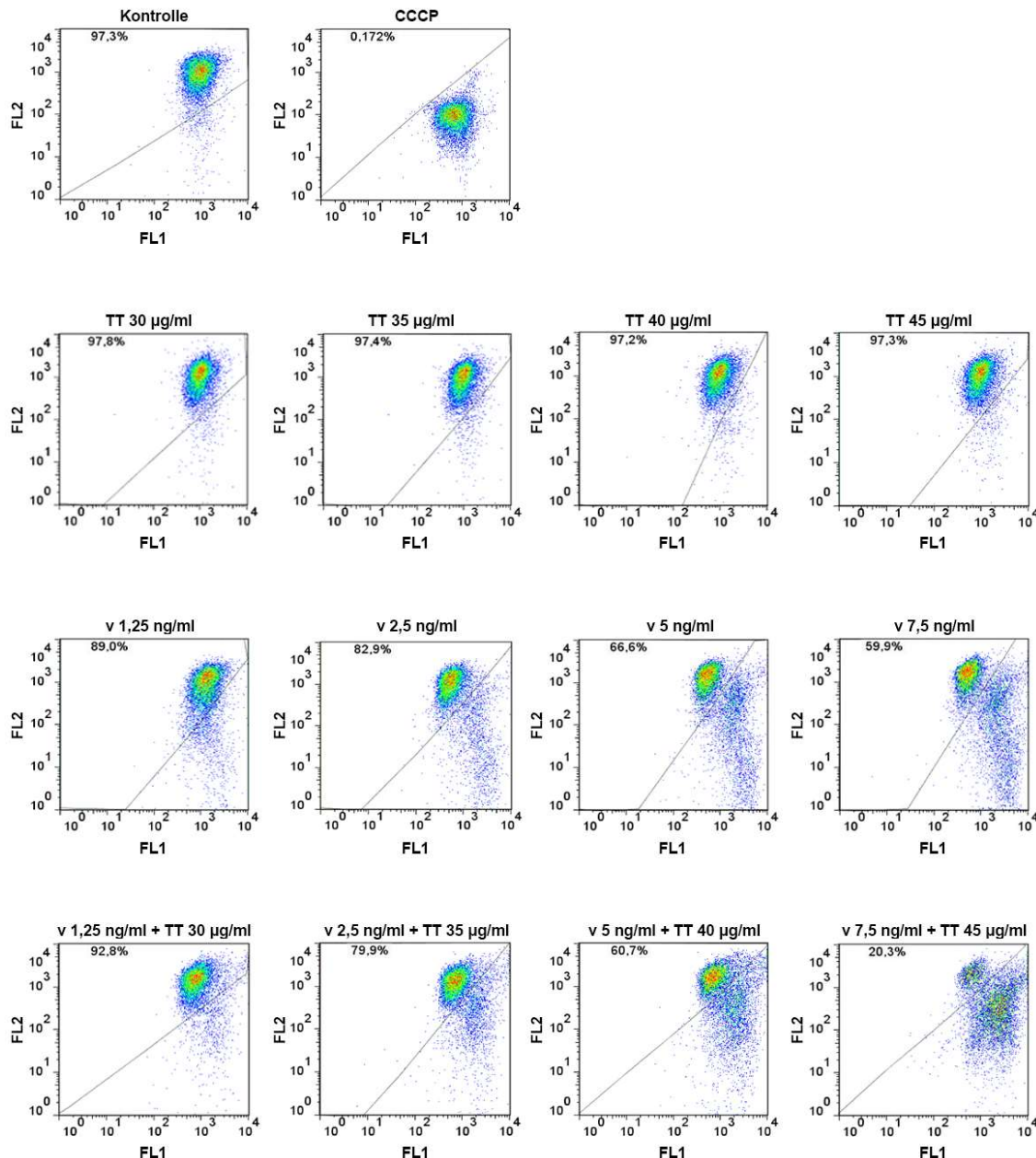


Abbildung 8. Repräsentative Ergebnisse der JC-1-Färbung im *Dot Plot*. RMS-13 Zellen wurden mit viscum, TT und viscumTT in ansteigenden Konzentrationen inkubiert und anschließend mit 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethyl-benzimidazolcarbocyaniniodid (JC-1) gefärbt. Der Entkoppler Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP) diente als Positivkontrolle. Die Analyse der Zellen erfolgte im Durchflusszytometer und die Auswertung mit der Software *FlowJo*. Über die Fluoreszenzkanäle wurde die grüne Fluoreszenz (FL-1-Kanal) der JC-1 Monomere und die rote Fluoreszenz (FL-2-Kanal) der JC-1 Aggregate erfasst. Durch die Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials kam es zu einer Zunahme der grünen Fluoreszenz im FL-1-Kanal. v = viscum.

Nach TT-Inkubation traten keine Veränderungen des MMP auf. Wohingegen der Anteil von Zellen mit verringertem MMP nach Inkubation mit viscum konzentrationsabhängig anstieg, der maximale Anteil betrug 40 %. Nach Behandlung mit viscumTT konnten die stärksten Effekte beobachtet werden. Im Vergleich zur Kontrolle war das MMP bei 73 %

der Zellen erniedrigt. Im hohen Konzentrationsbereich zeigte sich zudem ein Synergismus durch viscumTT (Abbildung 9).

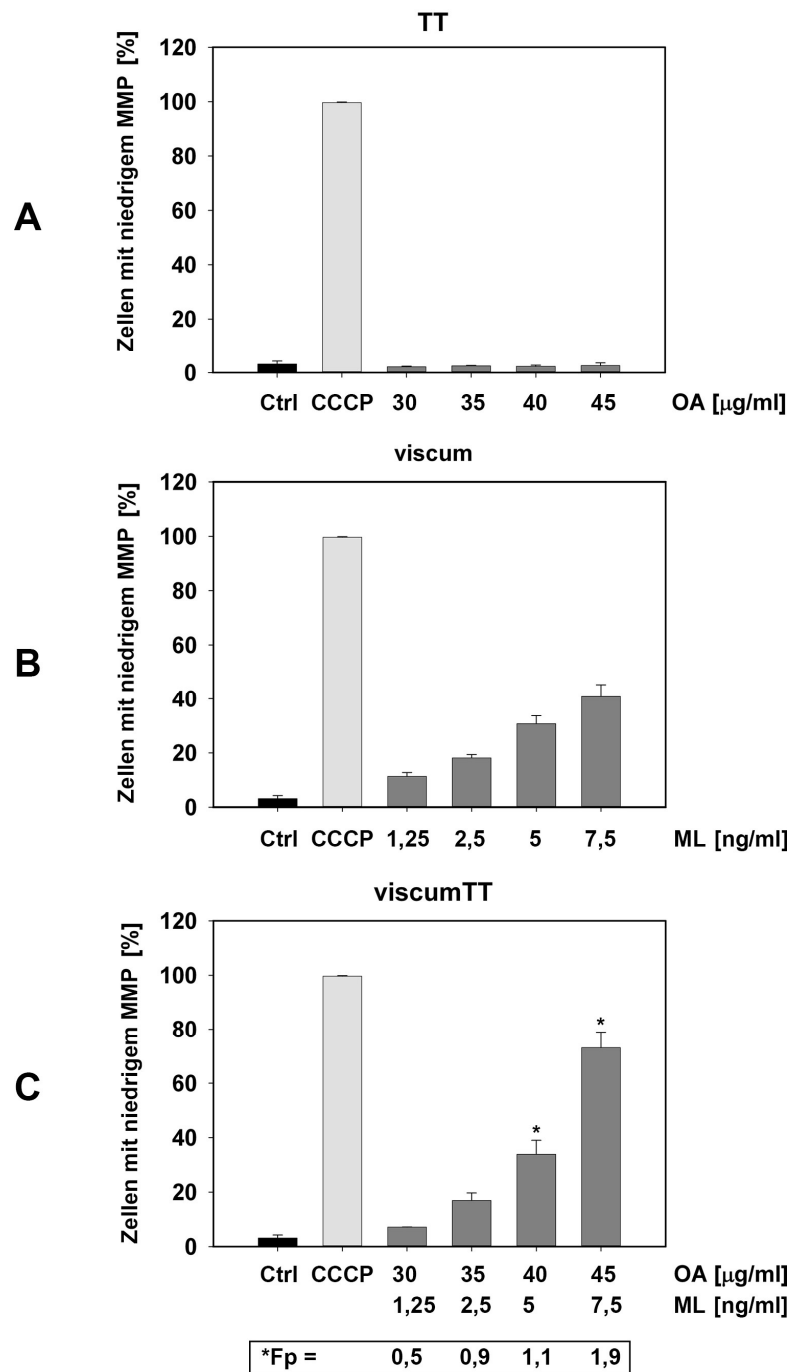


Abbildung 9. Messung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) nach Inkubation mit Mistelextrakten. RMS-13 Zellen wurden mit A) TT, B) viscum und C) viscumTT in ansteigenden Konzentrationen für 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss erfolgte Färbung mit 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethylbenzimidazolcarbocyaniniodid (JC-1) und die Analyse des MMP im Durchflusszytometer. Als Positivkontrolle wurde Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP) verwendet. Mistellektine (ML) und Oleanolsäure (OA) dienen als Markersubstanzen für viscum und TT. Die Ergebnisse beziehen sich auf die unbehandelte Kontrollgruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Der synergistische Effekt wurde über das *fractional product* (Fp) nach Webb berechnet. Werte *Fp > 1 zeigen einen Synergismus an. Ctrl = Kontrolle.

4.5 Die Rolle der Caspasen bei der Apoptoseinduktion durch Mistelextrakte

4.5.1 Aktivierung der Caspasen-3, -8 und -9

Zur näheren Charakterisierung des zugrundeliegenden Apoptosemechanismus der Mistelextrakte erfolgte die Färbung der aktiven CASP3, CASP8 und CASP9 mittels Immunfluoreszenz im Durchflusszytometer.

Anhand repräsentativer Ergebnisse der aktiven CASP3-Messung lassen sich die Veränderungen im Aktivitätsmuster im *Dot Plot* veranschaulichen. Nach Behandlung mit *viscum* und *viscumTT* stieg die Anzahl apoptotischer Zellen an und die Zahl CASP3-positiver Zellen nahm zu. Dies wurde durch eine Rechtsverschiebung im FL-1-Kanal erkennbar. Nach Inkubation mit TT konnte keine Aktivierung der CASP3 gemessen werden (Abbildung 10).

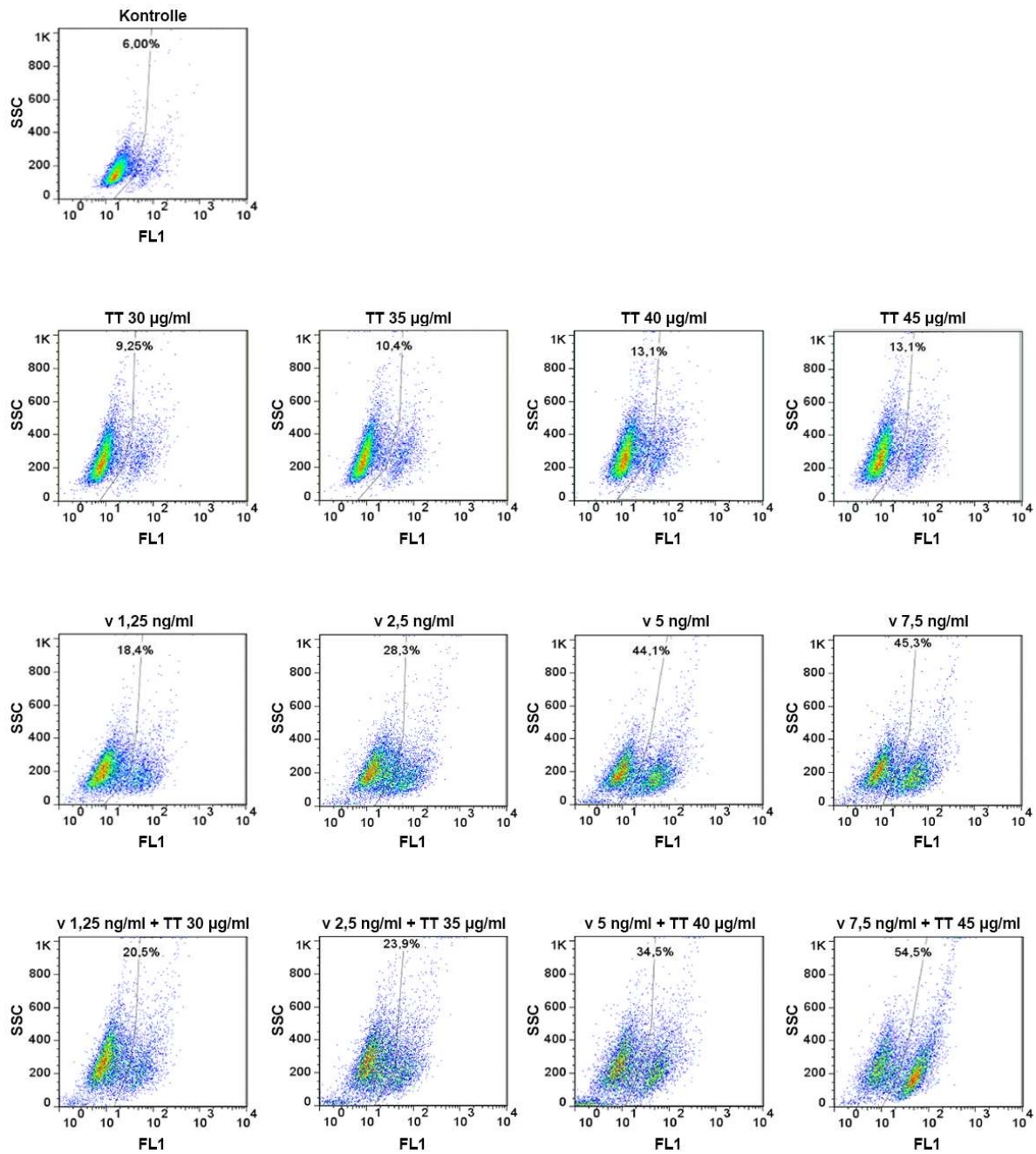


Abbildung 10. Repräsentative Daten der Messung der aktiven Caspase-3 (CASP3) im *Dot Plot*. RMS-13 Zellen wurden mit TT, viscum und viscumTT in ansteigenden Konzentrationen für 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss folgte die Färbung der aktiven CASP3 und die Analyse im Durchflusszytometer. Der Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) wurde im FL-1-Kanal gemessen. v = viscum.

Die Messung der aktiven Caspasen ergab, dass die Behandlung mit TT die Aktivität der CASP3, CASP8 und CASP9 nicht beeinflusste (Abbildung 11).

Nach Inkubation mit viscum konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg CASP3-positiver Zellen auf maximal 43 % beobachtet werden. Zudem konnte eine konzentrationsabhängige Aktivierung der CASP8 (46 %) und CASP9 (36 %) erfasst werden (Abbildung 11).

Die Behandlung mit viscumTT hatte ebenfalls eine konzentrationsabhängige Aktivierung der CASP3, CASP8 und CASP9 zur Folge. Der maximale Anteil CASP3-, CASP8- und CASP9-positiver Zellen betrug ca. 50 %. In den höchsten Mistelkonzentrationen überstieg die Wirkung von viscumTT die der Einzelextrakte und es konnte ein synergistischer Effekt auf die Aktivierung der CASP3, CASP8 und CASP9 nachgewiesen werden (Abbildung 11).

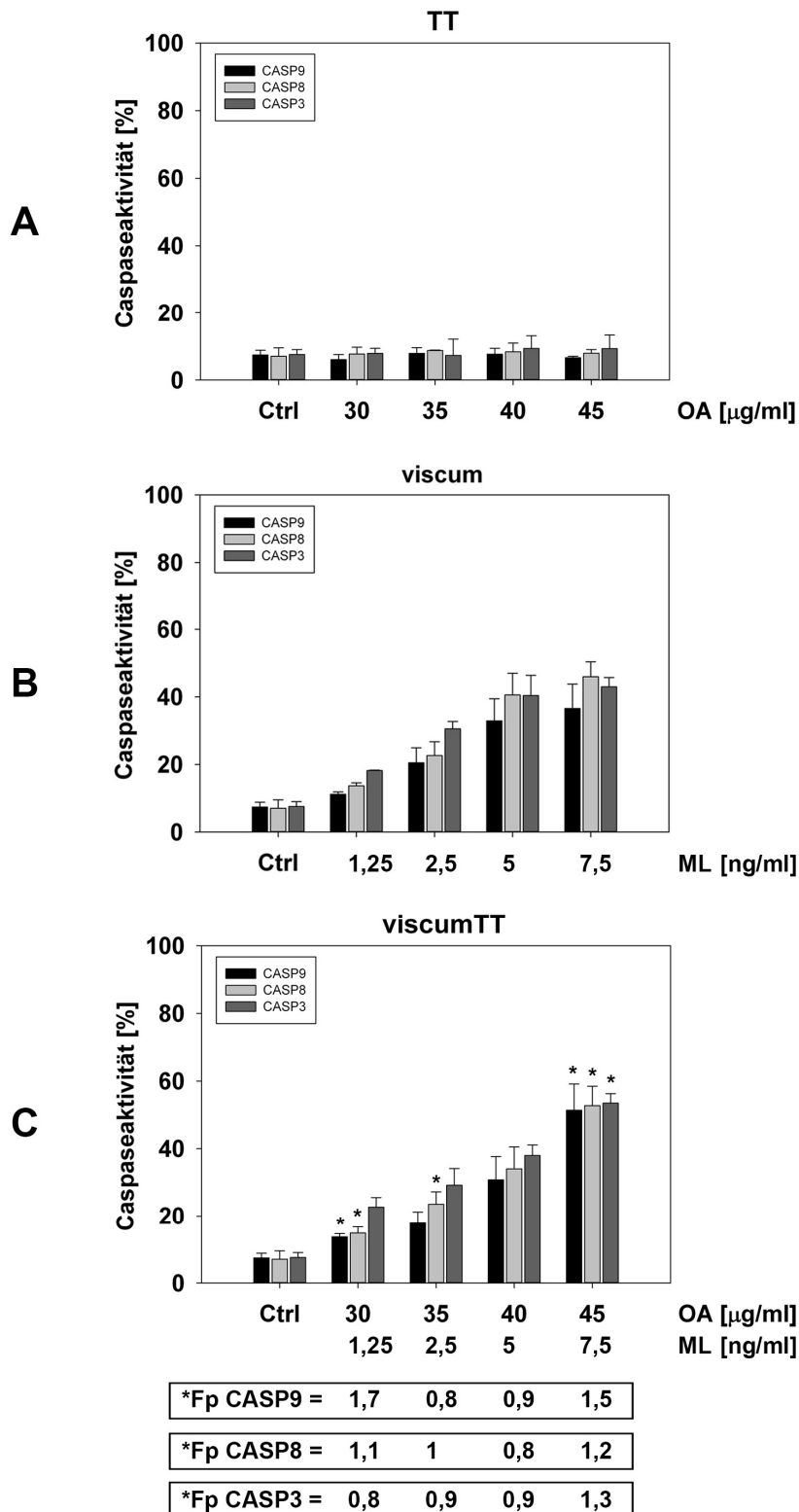


Abbildung 11. Messung der aktiven Caspase-3 (CASP3), Caspase-8 (CASP8) und Caspase-9 (CASP9). RMS-13 Zellen wurden mit A) TT, B) viscum und C) viscumTT in ansteigenden Konzentrationen für 24 Stunden inkubiert. Es erfolgte die Färbung der CASP3, CASP8 und CASP9 und anschließend die Analyse im Durchflusszytometer. Mistellektine (ML) und Oleanolsäure (OA) dienten als Markersubstanzen für viscum und TT. Die Ergebnisse beziehen sich auf die unbehandelte Kontrollgruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Der synergistische Effekt wurde über das *fractional product* (Fp) nach Webb berechnet. Werte *Fp >1 zeigen einen Synergismus an. Ctrl = Kontrolle.

4.5.2 Hemmung der Apoptoseinduktion durch Caspaseinhibitoren

Um die Abhängigkeit der Apoptoseinduktion von den Caspasen näher zu analysieren, wurden in den folgenden Experimenten die Wirkungen verschiedener Caspaseinhibitoren getestet.

Die viscum-induzierte Apoptose konnte durch alle eingesetzten Caspaseinhibitoren effektiv gehemmt werden. Der CASP9-Inhibitor reduzierte die Apoptoserate signifikant um bis zu 59 %. Der CASP8-Inhibitor hemmte die Apoptose um maximal 57 %. Der Breitspektrum-inhibitor reduzierte die Apoptose um maximal 74 %, wobei der inhibitorische Effekt mit steigender viscum-Konzentration abnahm. Die effektivste Apoptoseinhibierung konnte durch die Hemmung der CASP10 erzielt werden, hier waren maximal 75 % weniger Zellen apoptotisch (Abbildung 12).

Die viscumTT-induzierte Apoptose konnte ebenfalls durch Caspaseinhibitoren gehemmt werden, allerdings waren diese Effekte schwächer ausgeprägt als in den viscum-Experimenten. Zudem war auffällig, dass die hemmenden Effekte der Caspaseinhibitoren mit steigender Konzentration von viscumTT nachließen. Eine Ausnahme bildete hier der CASP8-Inhibitor, der die Apoptose um maximal 29 % verringerte. Der CASP9-Inhibitor zeigte zunächst einen moderaten inhibitorischen Effekt, dieser ließ nach Konzentrationssteigerung nicht nur nach, sondern verstärkte die Apoptoseinduktion durch viscumTT. Der Breitspektrum- und der CASP10-Inhibitor zeigten die stärksten inhibitorischen Effekte, sie reduzierten die Apoptoserate um maximal 46 % bzw. 50 % (Abbildung 12).

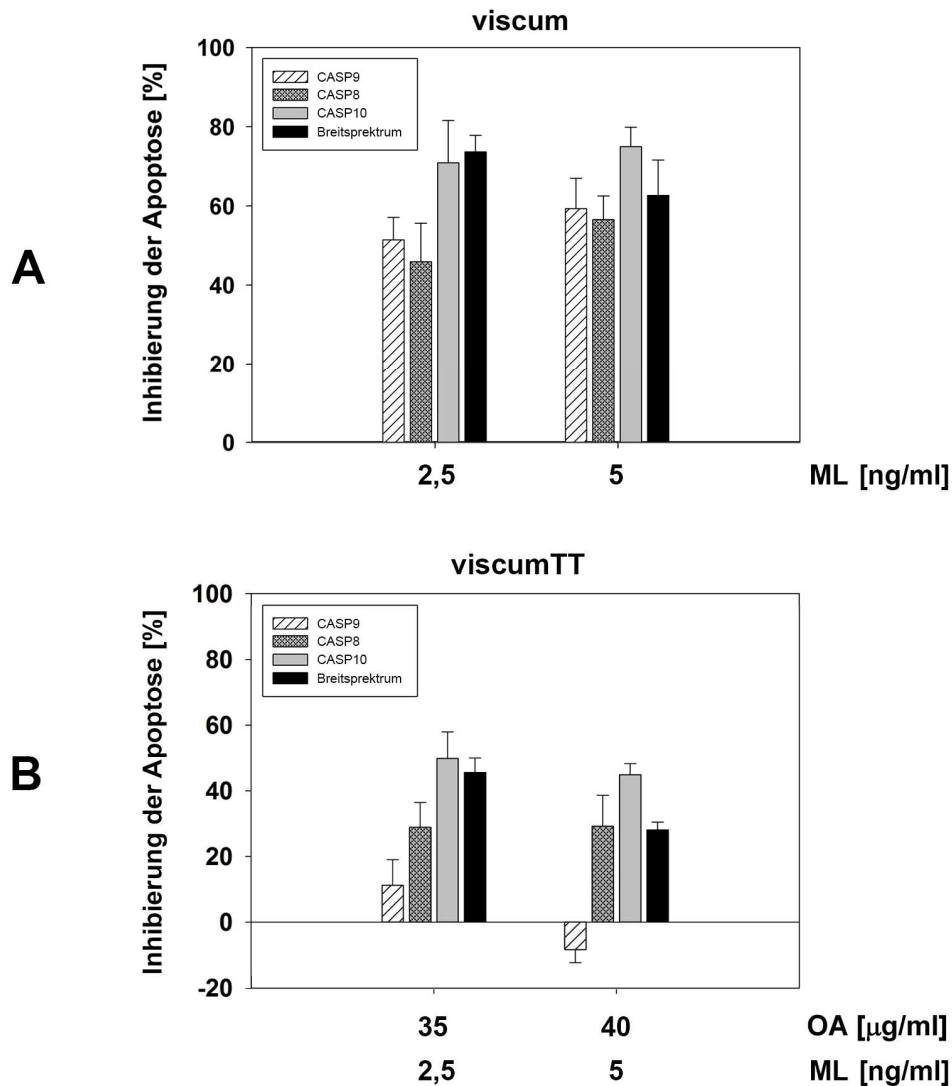


Abbildung 12. Untersuchung des Einflusses von Caspaseinhibitoren auf die viscum- und viscumTT-induzierte Apoptose. RMS-13 Zellen wurden im Dreifachansatz ausgesät und eine Stunde vor Inkubation mit A) viscum und B) viscumTT wurden dem Versuchsansatz die Caspaseinhibitoren hinzugegeben. Es wurden Inhibitoren der Caspase-8 (Z-IETD-FMK), Caspase-9 (Z-LEHD-FMK), Caspase-10 (Z-AEVD-FMK) und ein Breitspektrum-inhibitor (Z-VAD-FMK) eingesetzt. Ein Kontrollansatz enthielt nur die Mistelextrakte, ein weiterer zusätzlich 5 µM DMSO. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Ansätze mit Annexin V APC (Annexin) und Propidiumiodid (PI) gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Mistellektine (ML) und Oleanolsäure (OA) dienten als Markersubstanzen für viscum und TT. Die Ergebnisse beziehen sich auf den DMSO-Kontrollansatz. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

4.6 Einfluss von Mistelextrakten auf das Expressionsprofil Apoptose-assoziiierter Proteine

Proteinchemischen Methoden wurden neben durchflusszytometrischen Analysen zur Charakterisierung des Apoptosemechanismus angewandt. Nach Behandlung der RMS-13 Zellen mit den Mistelextrakten wurden die intrazellulären Proteine gewonnen und anschließend die intrazelluläre Proteinexpression im Western-Blot bzw. *Apoptosis Array* bestimmt.

4.6.1 *Apoptosis Array*

Der *Apoptosis Array* bot die Möglichkeit 35 Apoptose-assoziierte Proteine zeitgleich zu detektieren. Der *Apoptosis Array* diente der Orientierung und wurde daher im Gegensatz zu den anderen Experimenten nur ein einziges Mal durchgeführt. In Abbildung 13 sind ausgewählte Proteine des *Apoptosis Arrays* dargestellt.

Durch die Analyse des *Apoptosis Arrays* wurde erkennbar, dass nach Inkubation mit viscum und viscumTT Proteine mit antiapoptotischer Wirkung im Vergleich zu der Kontrolle verringert exprimiert wurden. In diesem Experiment wurden reduzierte Expressionslevel für Claspin (CLSPN), BIRC5, XIAP, BCL2, und BCL2L1 beobachtet. Mit viscum behandelte Zellen exprimierten verstärkt BAX und aktive CASP3, im Gegenzug wurde die Procaspase-3 vermindert exprimiert. Die Behandlung mit viscumTT führte zur verstärkten Expression der aktiven CASP3, die Expressionslevel von BAD, BAX und TP53 waren im Vergleich zur Kontrolle vermindert (Abbildung 13).

Nach der Behandlung mit TT war ein gegenteiliger Effekt zu erkennen, hier wurden die antiapoptotischen Proteine vermehrt exprimiert. Eine Ausnahme bildete BCL2L1, das auch nach Inkubation mit TT vermindert exprimiert wurde. Proapoptotisch wirksame Proteine wie BAD, BAX und die aktive CASP3 wurden ebenfalls verstärkt exprimiert (Abbildung 13).

Die Ergebnisse des *Apoptosis Arrays* deuten darauf hin, dass sich das Verhältnis zwischen anti- und proapoptotisch wirksamen Proteinen nach Behandlung mit viscum und viscumTT zu Gunsten der Apoptose verschob.

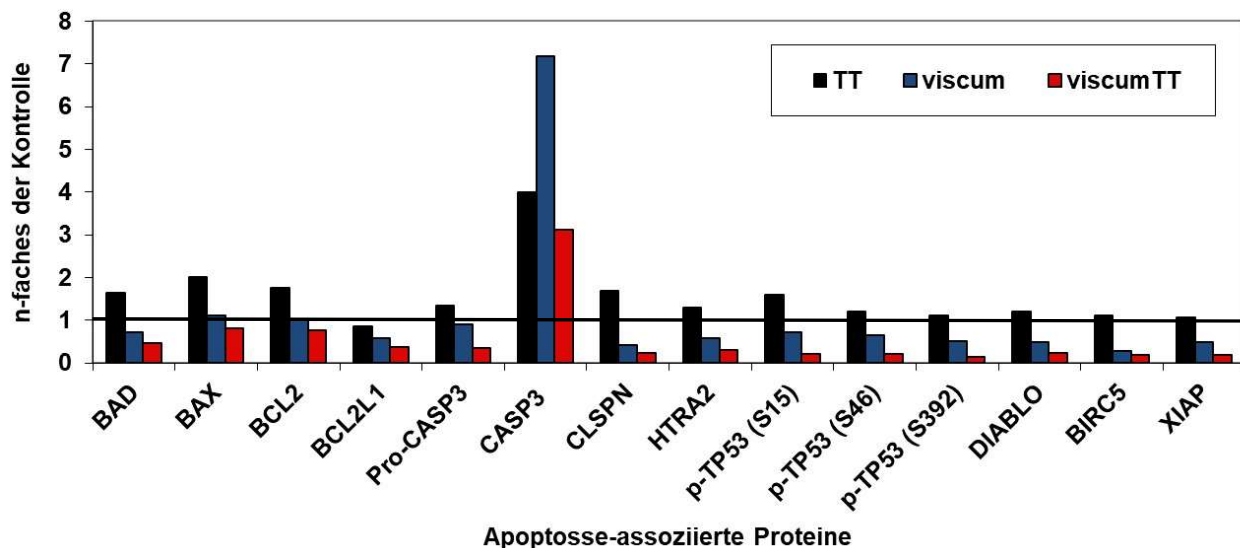


Abbildung 13. Analyse des *Apoptosis Arrays*. Die RMS-13 Zellen wurden für 24 Stunden mit viscum 5 ng/ml, TT 40 µg/ml und viscumTT 5 ng/ml + 40 µg/ml inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und der proteinreiche Überstand durch Zentrifugation gewonnen. 225 µg Protein wurden je Extrakt auf den *Array* aufgetragen und die Proteinbanden mittels Immunfluoreszenz detektiert. Der *Array* wurde nur ein einziges Mal durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Vielfaches (n-faches) der unbehandelten Kontrolle dargestellt. Pro-CASP3 = Procaspase-3.

4.6.2 Western-Blot und Immunodetektion Apoptose-assoziiierter Proteine

Im Anschluss an den *Apoptosis Array* wurden zur Verifizierung der Ergebnisse Western-Blot Analysen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Proteinlevel Apoptose-assoziiierter Proteine aus mindestens drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Anhand der Veränderungen der Proteinexpression konnten Rückschlüsse auf die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der Apoptose gezogen werden. Dabei war insbesondere das Verhältnis der Expressionslevel pro- und antiapoptotischer Proteine entscheidend für die Apoptoseinduktion. Im Folgenden sind die repräsentativen Ergebnisse einzelner Versuche dargestellt.

Die PARP1 ist ein Substrat der aktiven CASP3 und wird im Zuge der Apoptose in das Spaltprodukt cPARP1 fragmentiert. Die spezifische Proteolyse der PARP1 diente neben der Messung der aktiven CASP als Beweis für die Aktivierung der Caspase-Kaskade durch Mistelextrakte. Nach Inkubation mit viscum und viscumTT konnte cPARP1 konzentrationsabhängig verstärkt und PARP1 gleichzeitig vermindert nachgewiesen werden. TT hingegen hatte keinen Einfluss auf das Proteinlevel der PARP1 bzw. der cPARP1 (Abbildung 14).

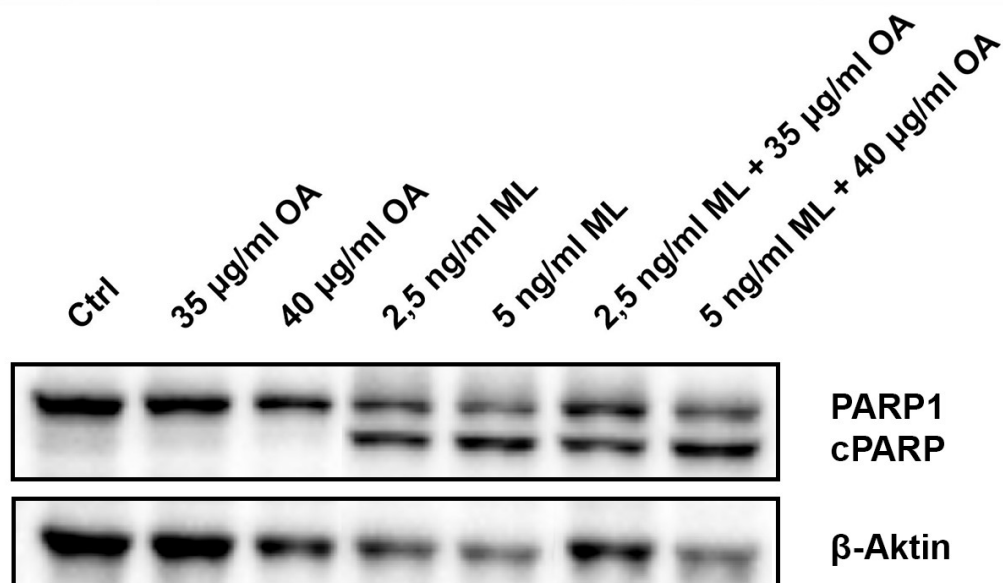


Abbildung 14. Expression und Spaltung von PARP1 nach Behandlung mit Mistellextrakten. Mistellektine (ML) und Oleanolsäure (OA) dienen als Markersubstanzen für viscum und TT. RMS-13 Zellen wurden für 24 Stunden mit den Mistellextrakten in den Konzentrationen viscum 2,5 und 5 ng/ml sowie TT 30 und 35 µg/ml inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die intrazellulären Proteine gewonnen. Es folgte die Bestimmung der Proteinexpression von PARP1 und dem Spaltprodukt cPARP1 im Western-Blot und mittels Immunodetektion. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Ctrl = Kontrolle.

4.6.2.1 Expression apoptosehemmender Proteine

Um das Ergebnis des *Apoptosis Arrays* zu bestätigen, wurden die Expressionslevel der IAP-Familienmitglieder XIAP und BIRC5 sowie die der Bcl-2-Familie BCL2, BCL2L1 und MCL1 untersucht. Darüber hinaus wurde die Expression von CLSPN analysiert.

Nach Behandlung mit allen drei Extrakten wurde CLSPN vermindert exprimiert. Besonders deutlich zeigte sich dies bei viscum und stärker noch bei viscumTT (Abbildung 15).

Nach Inkubation mit viscum und viscumTT konnte eine deutliche Abnahme der Expression der IAP-Familienmitglieder XIAP und BIRC5 beobachtet werden. TT hatte keinen Einfluss auf die Expression von BIRC5, jedoch wurde XIAP im Vergleich zur Kontrolle vermindert exprimiert (Abbildung 15).

Außerdem konnten mit dem *Apoptosis Array* verminderte Expressionslevel apoptosehemmender Proteine der Bcl2-Familie erfasst werden. In der Western-Blot Analyse konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Es konnten verminderte Expressionsprofile der Proteine BCL2 und BCL2L1 nach Behandlung mit viscum und

viscumTT detektiert werden. Dieser Effekt nahm mit steigenden Toxinkonzentrationen zu. Die BCL2L1-Expressionslevel sanken im Vergleich zur Kontrolle mit steigender TT-Konzentration. Im Gegensatz dazu wurde BCL2 nach Anwendung von TT vermehrt exprimiert, das Ergebnis präsentierte sich vorweg auch im *Apoptosis Array* (Abbildung 15).

Das Bcl-2-Familienmitglied MCL1 hat zwei Splicevarianten, MCL1 L und MCL1 S. In den Experimenten dieser Arbeit war zu beobachten, dass nach Inkubation mit viscum und viscumTT das Expressionslevel von MCL1 L sank, wohingegen das von MCL1 S konstant blieb. TT beeinflusste weder die Expression von MCL1 L noch MCL1 S (Abbildung 15).

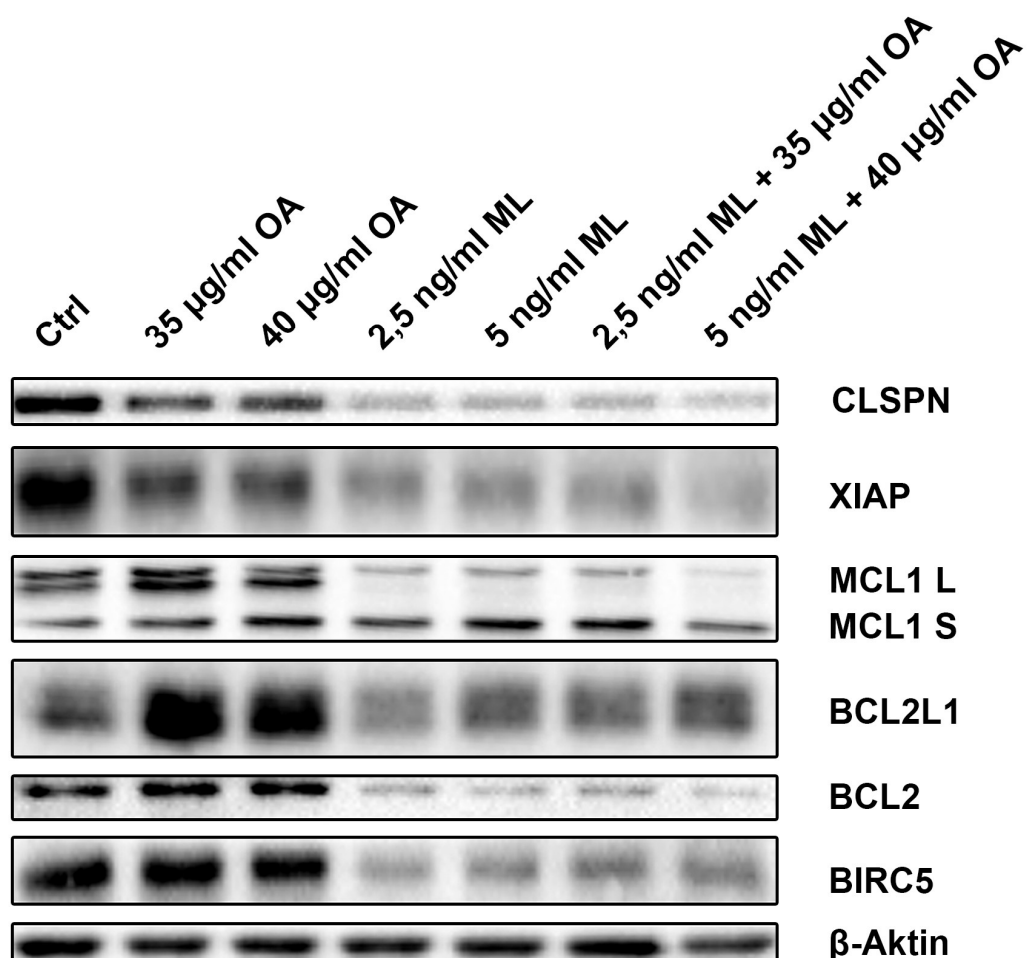


Abbildung 15. Expression antiapoptotischer Proteine nach Behandlung mit Mistellextrakten. Mistellektine (ML) und Oleanolsäure (OA) dienen als Markersubstanzen für viscum und TT. RMS-13 Zellen wurden für 24 Stunden mit den Mistellextrakten in den Konzentrationen viscum 2,5 und 5 ng/ml sowie TT 30 und 35 µg/ml inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die intrazellulären Proteine gewonnen. Es folgte die Bestimmung der Expression der Proteine CLSPN, XIAP, MCL1, BCL2L1, BCL2 und BIRC5 im Western-Blot und mittels Immunodetektion. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Ctrl = Kontrolle.

4.6.2.2 Expression apoptosefördernder Proteine

Die vorherigen Ergebnisse ergaben, dass viscum und viscumTT ihre zytotoxische Wirkung u.a. über die verminderte Expression von antiapoptotischen Proteinen entfalten. Dies ließ die Frage aufkommen, in welchem Maße die Mistelextrakte die Expressionslevel der proapoptotischen Proteine beeinflussten. Im Hinblick darauf wurden die Expressionslevel der Proteine PMAIP1 und TP53 bestimmt.

Die Untersuchungen der Proteinlevel des Tumorsuppressors TP53 konnten das Ergebnis des *Apoptosis Arrays* nicht bestätigen. Im Array zeigte sich vorab, dass TT zur verstärkten, und viscum und viscumTT zur verminderten Expression von TP53 führten. Die Experimente ergaben jedoch, dass die Mistelextrakte die Expression von TP53 nicht beeinflussten (Abbildung 16).

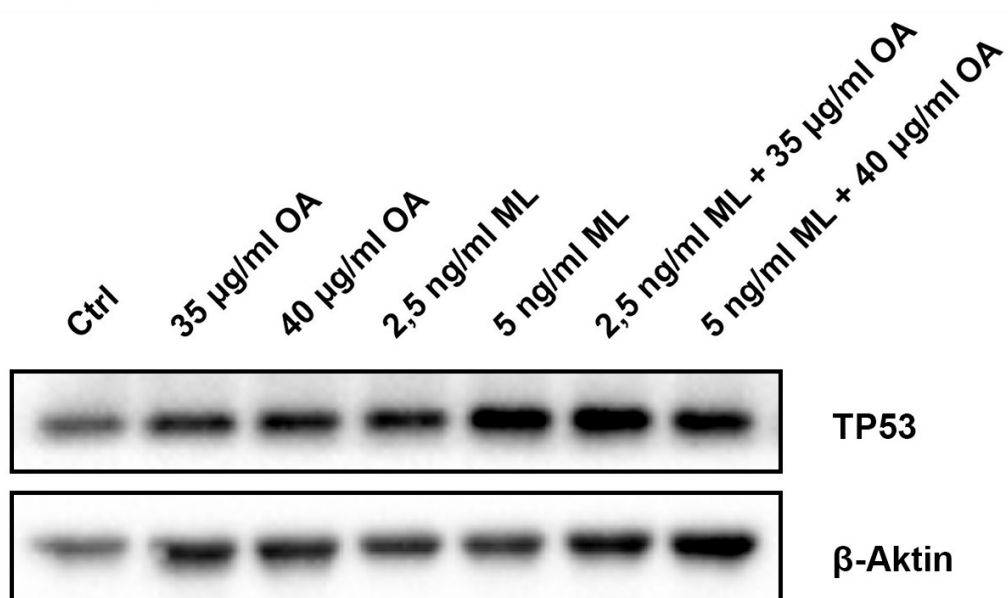


Abbildung 16. Expression von TP53 nach Behandlung mit Mistelextrakten. Mistellektine (ML) und Oleanolsäure (OA) dienen als Markersubstanzen für viscum und TT. RMS-13 Zellen wurden für 24 Stunden mit den Mistelextrakten in den Konzentrationen viscum 2,5 und 5 ng/ml sowie TT 30 und 35 µg/ml inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die intrazellulären Proteine gewonnen. Es folgte die Bestimmung der Proteinexpression von TP53 im Western-Blot und mittels Immunodetektion. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Ctrl = Kontrolle.

PMAIP1, ein Bcl-2-Familiemitglied mit proapoptotischer Wirkung, zeigte Western-Blot ein verändertes Bandenmuster. Laut dem Herstellerprotokoll sollte PMAIP1 eine Bande bei 15 kDa im Western-Blot aufweisen, diese konnte in den Versuchen nicht detektiert werden. Es konnten jedoch Proteinbanden bei 60, 40 und 35 kDa nachgewiesen werden. Nach Inkubation mit viscum und viscumTT nahm die Anzahl der zusätzlichen Banden mit steigenden Konzentrationen ab (Abbildung 17).

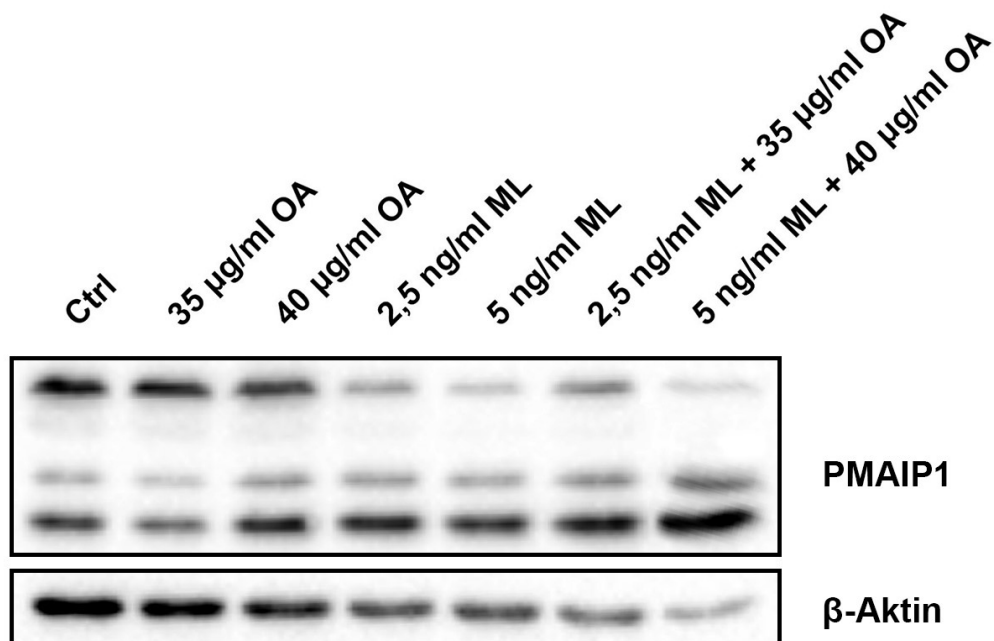


Abbildung 17. Expression von PMAIP1 nach Behandlung mit Mistelextrakten. Mistellektine (ML) und Oleanolsäure (OA) dienen als Markersubstanzen für viscum und TT. RMS-13 Zellen wurden für 24 Stunden mit den Mistelextrakten in den Konzentrationen viscum 2,5 und 5 ng/ml sowie TT 30 und 35 µg/ml inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die intrazellulären Proteine gewonnen. Es folgte die Bestimmung der Proteinexpression PMAIP1 im Western-Blot und mittels Immunodetektion. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Ctrl = Kontrolle.

5 Diskussion

Das ARMS ist ein aggressiver Tumor, der oft metastasiert und eine schlechte Prognose hat. Die Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten ist zur Prognoseverbesserung dieses Tumors dringend erforderlich. Im Rahmen dieser Dissertation wurde erstmalig die Wirksamkeit eines triterpensäurehaltigen *Viscum album* Gesamtextraktes, viscumTT, im Rhabdomyosarkommodell untersucht. Ziel dieser Untersuchungen war es, die Grundlage für neue Therapieansätze des ARMS zu schaffen. Es konnte gezeigt werden, dass viscumTT *in vitro* effektiv die Zellproliferation hemmte und Apoptose induzierte, wobei die Wirkung denen der Einzelextrakte viscum und TT überlegen war. Im folgenden Abschnitt wird ein Modell der Apoptoseinduktion präsentiert und die Ergebnisse anhand des aktuellen wissenschaftlichen Standes kritisch diskutiert.

5.1 ViscumTT hemmt synergistisch die Zellproliferation und induziert Apoptose im Rhabdomyosarkom *in vitro*

Die Wirkung der verwendeten Mistelextrakte war sowohl konzentrations- und zeitabhängig als auch zelltypspezifisch. TT zeigte ausschließlich proliferationshemmende Effekte, während viscum und viscumTT sowohl die Zellproliferation inhibierten als auch Apoptose induzierten. Die Apoptoseinduktion war dabei von der Aktivierung der Caspase-Kaskade abhängig, beweisend hierfür waren die Messung der aktiven CASP3 sowie der Nachweis der Spaltung ihres Substrates PARP1 im Western-Blot. Der Ausschluss eines ungewollten frühen zytotoxischen Effekts, welcher der Nekrose zugeschrieben wird, konnte mit dem LDH-Assay erbracht werden.

Entsprechende Beobachtungen konnten nach Behandlung mit OA und ihren Derivaten bei verschiedenen Zelllinien gemacht werden. So konnten sowohl eine proliferationsinhibierende wie auch Apoptose-induzierende Wirkung durch OA und ihre Derivate beim malignen Melanom [141], Gallenblasenkarzinom [146] und Pankreaskarzinom [148] festgestellt werden. Einige Zelllinien reagierten jedoch resistent auf die Behandlung mit OA. In einer Versuchsreihe mit Ewing-Sarkom Zellen konnte bei der Zelllinie TC-71 eine schwache Apoptoseinduktion durch OA beobachten werden, wohingegen die Zelllinie MHH-ES-1 resistent reagierte [136].

Die Wirkung von OA scheint zelltypspezifisch zu sein, wobei eine Erklärung für die verschiedenen Sensibilitäten der Zelllinien zurzeit noch nicht existiert. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die unterschiedliche Zusammensetzung der Plasmamembranen sein. Darüber hinaus ist bekannt, dass Triterpensäuren in Plasmamembranen eindringen und diese verändern können [164-166].

Viscum zeigte ebenfalls konzentrations- und zelltypspezifische Unterschiede in der Apoptoseinduktion. Ähnliche Effekte nach Behandlung mit viscum wurden beim Ewing-Sarkom [136], multiplen Myelom [64] und beim Plattenepithelkarzinom der Zunge [65] beobachtet. Es ist bekannt, dass die zytotoxischen Effekte von viscum in den Zelllinien variieren [138]. Die Wirkung von ML, dem Hauptbestandteil des viscum-Extraktes, wird über ihre A- und B-Ketten vermittelt. Durch die Bindung der B-Kette an spezifische Kohlenhydrate auf der Zelloberfläche erfolgt die Aufnahme von ML in die Zelle (Kapitel 1.3.1.1). Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Sensibilität der Zelllinien gegenüber viscum könnte die variierende Expression der spezifischen Kohlenhydratbindungsstellen der Zellmembran bieten [113, 167].

Die stärksten zytotoxischen Effekte konnten nach Einsatz von viscumTT beobachtet werden, wobei die Wirkung des Kombinationspräparates die der Einzelextrakte überstieg. Im hohen Konzentrationsbereich zeigte sich zudem ein Synergismus von viscumTT. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen überein, die beim Ewing-Sarkom [136], Osteosarkom [168], bei der AML [139] und ALL [138] nach Behandlung mit viscumTT gemacht werden konnten. Auch hier konnte die Überlegenheit des Mistelgesamtextraktes gegenüber den Einzelextrakten sowie teilweise ein Synergismus beobachtet werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit der Theorie, dass Gesamtpflanzenextrakte häufig effektiver sind als ihre Einzelkomponenten [169-171].

5.2 Charakterisierung des Apoptosemechanismus

Die Apoptose kann sowohl durch den rezeptorvermittelten als auch den mitochondrialen Signalweg ausgelöst werden. Zur Charakterisierung der Apoptosesignaltransduktion wurden die Messungen des MMP, der aktiven Caspasen und der Apoptosehemmung durch Caspaseinhibitoren durchgeführt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten sowohl auf eine Aktivierung des extrinsischen als auch des intrinsischen Apoptosesignalweges durch Behandlung mit viscum und viscumTT hin. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl

die Einzelextrakte OA und ML wie auch das Kombinationspräparat viscumTT verschiedene Apoptosesignalwege aktivieren. Die Art der Signaltransduktion durch ML und OA scheint dabei, vom Zelltyp abhängig zu sein.

Die Aktivierung des mitochondrialen Signalweges durch ML konnte bei akuten Leukämien [63, 67, 86], beim hepatozellulären Karzinom [172] und beim kolorektalen Adenokarzinom [173] erfasst werden. In diesem Zusammenhang konnten u.a. die Depolarisierung des MMP [86, 172] und die Aktivierung der Caspase-Kaskade beobachtet werden [86, 173, 174]. Bantel *et al.* beschrieben darüber hinaus eine Todesrezeptoren-unabhängige Aktivierung des intrinsischen Signalweges sowie der CASP9 und CASP8 [86]. In Ergänzung konnte nach Behandlung mit viscum auch die Aktivierung des rezeptorvermittelten Signalweges beim Kolonkarzinom [173] und bei der AML [139] festgestellt werden.

Die Apoptoseinduktion über den extrinsischen Weg durch OA und ihre Derivate wurde für die myeloischen Leukämie [175-177], das Osteosarkom [178], Ovarialkarzinom [179], Mammakarzinom [180], Kolonkarzinom [181] und Lungenkarzinom [182] beschrieben. Die Triterpensäuren OA und BA können Apoptose auch über den intrinsischen Signalweg induzieren, dies konnte u.a. beim hepatozellulären Karzinom [147], Gallenblasenkarzinom [146], Pankreaskarzinom [148], Neuroblastom [183] und beim Rhabdomyosarkom [184] beobachtet werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass OA und BA direkt mit der Mitochondrienmembran interagieren können [176, 185, 186].

ViscumTT konnte die Apoptose sowohl über den intrinsischen als auch den extrinsischen Apoptoseweg beim Ewing-Sarkom [136], der ALL [138] und AML [139] induzieren. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden sowohl die Depolarisation des MMP als auch die Aktivierung der CASP8 und CASP9 beobachtet, wobei die Wirkung von viscumTT synergistisch war. Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit den vorliegenden Untersuchungsergebnissen, die ebenfalls einen Synergismus von viscumTT zeigten. Zudem konnte eine gesteigerte Expression der Todesrezeptoren DR4 und DR5 nach Behandlung mit viscumTT bei der AML beobachtet werden [139].

Mit Hilfe von Caspaseinhibitoren konnte der Einfluss der Caspase-Kaskade auf die Apoptoseinduktion genauer untersucht werden. Zunächst fiel auf, dass der Apoptose-hemmende Effekt der Inhibitoren bei viscum stärker ausgeprägt war als bei viscumTT. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die Zugabe von solubilisierten

Triterpensäuren zu wässrigen Mistelextrakten unbekannte Mechanismen aktiviert, welche die Apoptoseinduktion Caspase-unabhängig verstärken. Diese Annahme wird durch Untersuchungen gestützt, die nach Inkubation mit OA eine Caspase-unabhängige Komponente der Apoptoseinduktion feststellten [142, 176].

Durch Blockierung des rezeptorvermittelten Signalweges durch CASP8- und CASP10-Inhibitoren konnte die Apoptoseinduktion effektiv reduziert werden. Der CASP10-spezifische Inhibitor zeigte die stärksten inhibitorischen Effekte und war effektiver als der Breitspektrum-inhibitor. Dieses Experiment zeigt, dass die Apoptoseinduktion durch viscum und viscumTT stark von der CASP10 abhängig ist. Die CASP10 ist ein Homologon der CASP8 und wird nach Ligandenbindung an die Todesrezeptoren durch die Todesdomänen rekrutiert [187, 188]. Darüber hinaus wurde auch die Todesrezeptor-unabhängige Aktivierung der CASP10 durch Chemotherapeutika beschrieben. Interessanterweise war die Aktivierung der CASP10 dabei abhängig von der Todesdomäne FADD [189-191].

Der CASP9-Inhibitor konnte die viscumTT-induzierte Apoptose nicht signifikant reduzieren, sondern verstärkte diese. Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen überein, die nach Behandlung mit dem Diterpenoid Oridonin in Kombination mit einem CASP9-Inhibitor ebenfalls eine verstärkte Apoptoseinduktion aufzeigten [192]. Es wird vermutet, dass durch Hemmung der CASP9 der autophagische Fluss unterbrochen und so der Caspase-unabhängige Zelltod gefördert wird [192, 193]. Zudem legen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit den Schluss nahe, dass die CASP9 im Rahmen der viscumTT-induzierten Apoptose nicht als Initiator- sondern als Effektorcaspase agiert. Das bedeutet, dass sie durch die CASP8 und/oder die CASP10 direkt aktiviert wird und deren Wirkung in einer Rückkopplungsschleife verstärkt, ähnlich der TNF- α -vermittelten Signaltransduktion. Bei der TNF- α -induzierten Apoptose wird die CASP9 direkt durch die CASP8 aktiviert [194, 195]. Für diese Annahme spricht, dass nach gemeinsamer Behandlung eines synthetischen OA-Derivates mit einem CASP8-Inhibitor die CASP9-Aktivität vermindert war [182]. In den Untersuchungen von Strüh *et al.* konnte ebenfalls eine effektive Blockierung der DNS-Fragmentierung durch den CASP8-Inhibitor beobachtet werden, wohingegen der CASP9-spezifische Inhibitor nur einen schwachen Effekt zeigte [142].

Darüber hinaus sind der extrinsische und der intrinsische Apoptosesignalweg über die Spaltung von BID miteinander verknüpft. Das Spaltprodukt tBID aktiviert durch

Permeabilisierung der mitochondrialen Membran den intrinsischen Apoptosesignalweg. Sowohl die aktivierte CASP8 als auch die aktivierte CASP10 können BID in seine trunkeerte Form tBID spalten [196]. Die CASP8 und CASP10 können über BID-Spaltung den mitochondrialen Signalweg rekrutieren und über Aktivierung der CASP9 eine Signalamplifikation hervorrufen. Durch Aktivierung der CASP9 kommt es zur Spaltung der CASP3 und CASP7 und infolgedessen zur Aktivierung der CASP6 und CASP2. Am Ende dieser Kaskade werden in einer Rückkoppelungsschleife die CASP8 und CASP10 verstärkt aktiviert [197].

Eine vollständige Aufklärung der Apoptosesignaltransduktion durch viscumTT ist anhand der Daten der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Aktivierung der Caspase-Kaskade ein entscheidender Faktor bei der Apoptoseinduktion durch viscumTT ist. Die Daten deuten auf eine initiale Aktivierung der CASP10 und CASP8 über einen bislang unbekanntem Mechanismus durch viscumTT mit konsekutiver Aktivierung der CASP9 hin. Die Abbildung 18 präsentiert eine schematische Darstellung der möglichen Signaltransduktion durch viscumTT.

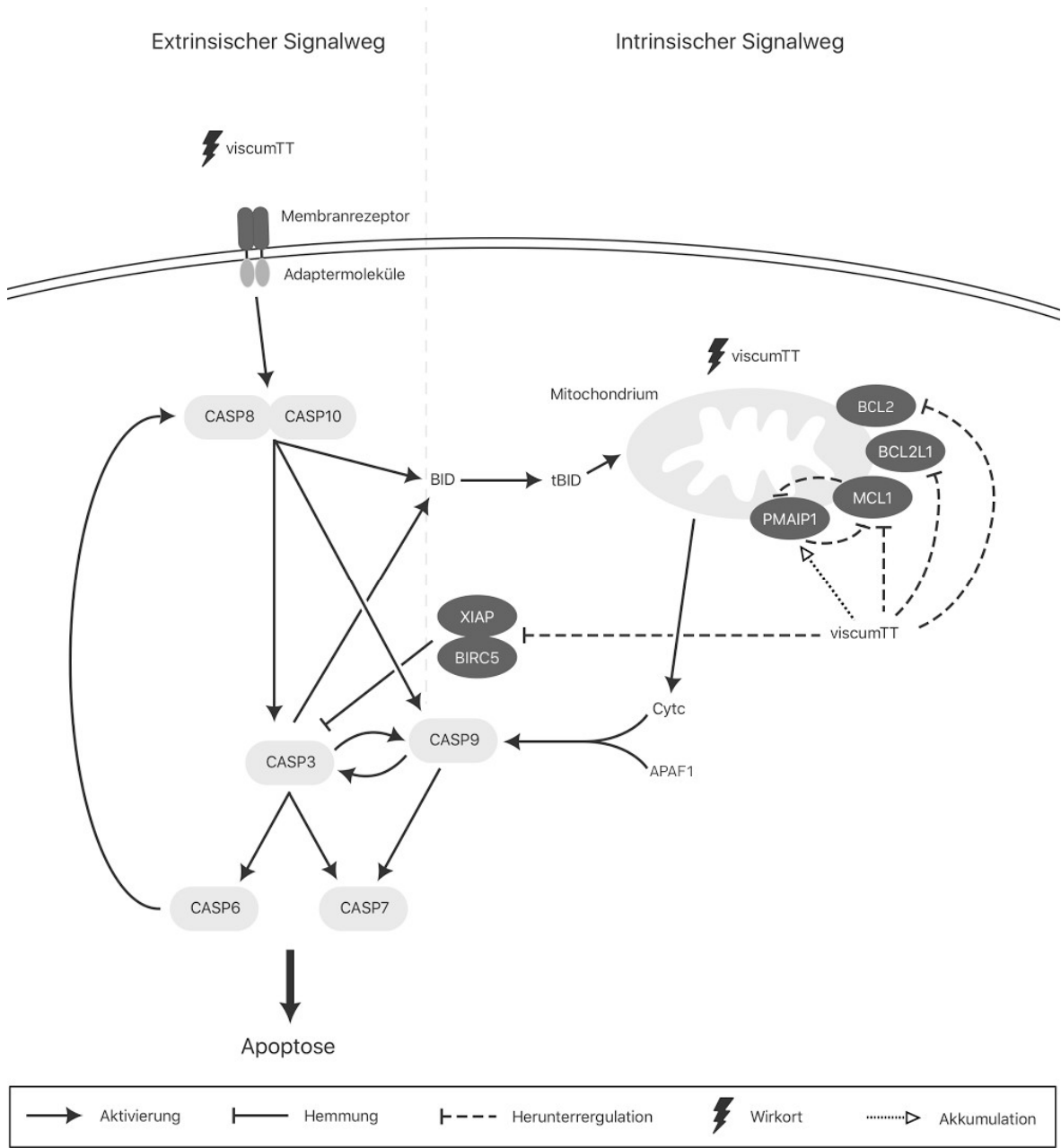


Abbildung 18. Modell der Apoptosesignaltransduktion durch viscumTT. Über einen unbekanntem Mechanismus werden durch viscumTT die Caspase-10 (CASP10) und die Caspase-8 (CASP8) aktiviert. Die CASP8 und CASP10 aktivieren im Verlauf direkt die Effektorcaspasen CASP3 und CASP9 und folglich die Caspase-Kaskade. Über die Spaltung von BID in seine trunkierte Form tBID kommt es zur Depolarisation der mitochondrialen Membran und zur Freisetzung von proapoptotischen Proteinen wie Cytochrom c (Cyt c) aus dem intermembranären Raum. Cyt c bildet gemeinsam mit APAF1 und der Procaspase-9 das Apoptosom, was die Aktivierung der CASP9 zur Folge hat. Die aktivierte CASP9 spaltet wiederum die Effektorcaspasen CASP3 und CASP7 und infolgedessen wird u.a. die CASP6 aktiviert. Am Ende dieser Kaskade werden in einer positiven Rückkoppelungsschleife die CASP8 und CASP10 verstärkt aktiviert. Die Aktivierung der Effektorcaspasen führt über die Spaltung ihrer Substrate letztlich zur Apoptose der Zelle. Darüber hinaus führt die Behandlung mit viscumTT zur verminderten Expression von XIAP und BIRC5, folglich entfällt ihre hemmende Wirkung auf die CASP3. Auch die apoptosehemmenden Proteine BCL2, BCL2L1 und MCL1 werden nach Inkubation mit viscum und viscumTT vermindert exprimiert. Der direkte Gegenspieler von MCL1, PMAIP1, wird nach Behandlung mit viscumTT verlangsamt abgebaut und akkumuliert im Zytosol. Insgesamt verschiebt sich das Verhältnis der Apoptose-assoziierten Proteine zu Gunsten der Apoptose.

5.3 Mistelextrakte beeinflussen die Expression Apoptose-assoziiierter Proteine

Analysen der Proteinexpression im Western-Blot dienen dem besseren Verständnis der Apoptosesignaltransduktion. Nach Inkubation mit viscum und viscumTT verschob sich durch die erniedrigte Expression ihrer Gegenspieler die Balance zu Gunsten der apoptosefördernden Proteine.

Nach Behandlung mit viscum und viscumTT wurden BCL2 und BCL2L1 vermindert exprimiert. Die Bcl-2-Proteinfamilie spielt eine wichtige Funktion bei der Kontrolle des intrinsischen Apoptosesignalweges und umfasst Subfamilien, die diesen sowohl fördern als auch verhindern können. Das Verhältnis zwischen den apoptosefördernden und -hemmenden Proteinen bestimmt, ob Apoptose induziert wird, da die Mitglieder dieser Proteinfamilie miteinander interagieren. Die Proteinexpression und -funktion der Bcl-2-Familie ist bei malignen Krebserkrankungen oft gestört, was letztlich zur Tumorbildung und Therapieresistenz beiträgt [198]. Diverse Mutationen führen im RMS zu erhöhten Expressionslevel von antiapoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern. Die Gli-Amplifikation hat eine vermehrte Expression von BCL2 zur Folge, bei positivem PAX3/FOXO1 Status ist BCL2L1 erhöht [198]. Beide Mutationen wurden für die Zelllinie RMS-13 beschrieben [159] und sind ein Faktor, der zur Apoptoseresistenz beiträgt. Außerdem ist beim RMS häufig die Aktivität des Transkriptionsfaktors *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) gestört. STAT3 ist ebenfalls an der Regulation der Expression der Bcl-2-Familie beteiligt [198]. Die erniedrigten Expressionslevel von BCL2 und BCL2L1 bekräftigen die These, dass viscum und viscumTT den intrinsischen Apoptosesignalweg aktivieren. Diese Annahme wird durch weitere Untersuchungen gestützt, die auch erniedrigte BCL2- und BCL2L1-Proteinlevel nach Behandlung mit viscum bei der ALL [138] und nach Einsatz von OA beim Ovarialkarzinom [199] und bei Leukämien [200] feststellen konnten. Zudem hemmen synthetische OA-Derivate die Aktivität von STAT3 [201]. CDDO-Me inhibierte den STAT3-Weg beim Osteosarkom und führte zur verminderten Expression von BCL2L1, BIRC5 und MCL1 [202].

MCL1, ein apoptosehemmendes Bcl-2-Protein, wird im RMS vermehrt exprimiert [203]. MCL1 hat zwei Splicevarianten, MCL1 L und MCL1 S. MCL1L inhibiert die Apoptose, indem es direkt BAX und BAK1 hemmt sowie indirekt durch Bindung von PMAIP1 und BID. Die kleinere Splicevariante MCL1 S besitzt eine proapoptotische Wirkung, da die Hemmung von MCL1 auf BAX oder BAK1 entfällt [204]. Nach Inkubation mit viscum und viscumTT wurde MCL1 L vermindert und MCL1 S vermehrt exprimiert. Dieses Ergebnis

deckt sich mit denen anderer Arbeitsgruppen, die bei Leukämiezellen erniedrigte Proteinlevel von MCL1 nach Behandlung mit ML ermitteln konnten [63, 205]. Zudem konnten OA beim Osteosarkom [202] und viscumTT beim Ewing-Sarkom [136] die MCL1-Level senken.

Ein direkter Gegenspieler von MCL1 ist PMAIP1, das zu den apoptosefördernden Bcl-2-Proteinen gehört und die Apoptose über den intrinsischen Signalweg induziert [206]. Dies erfolgt unabhängig von TP53, indem PMAIP1 direkt MCL1 hemmt und dessen Degradierung durch die Proteasomen fördert [207]. Im experimentellen Rahmen dieser Arbeit zeigte PMAIP1 ein verändertes Bandenmuster, es konnten zusätzliche Proteinbanden detektiert werden. Eine ähnliche Beobachtung konnten Dengler *et al.* beim Lymphom machen. Als Erklärung für das veränderte Bandenmuster im Western-Blot postulierten sie die These, dass PMAIP1 bei vermehrter Expression verstärkt polyubiquitiniert und degradiert wird. Diese Behauptung wurde dadurch gestützt, dass durch Hemmung des beschleunigten Abbaus PMAIP1 akkumulierte und nachfolgend Apoptose induziert werden konnte [208]. Diese Annahme lässt sich auch auf das Rhabdomyosarkommodell übertragen. RMS-13 Zellen exprimieren das Fusionsprotein PAX3/FOXO1, einen aktiven Transkriptionsfaktor. PMAIP1 wird aufgrund der gesteigerten Aktivität des Fusionsproteins PAX3/FOXO1 in den RMS-13 Zellen vermehrt exprimiert, wobei dies scheinbar unabhängig von TP53 geschieht [207]. Krebszellen können bei vermehrter Proteinexpression an erhöhte Proteinlevel von PMAIP1 adaptieren [207, 208], indem sie durch verstärkte Polyubiquitinierung und proteasomale Degradierung den Proteinumsatz beschleunigen [206, 208]. Nach Inkubation mit viscum und viscumTT nahm die Anzahl der PMAIP1-Banden ab, dies deutet auf eine Hemmung der Ubiquitinierung und somit auf einen verlangsamten Abbau des Proteins hin. PMAIP1 konnte im Zytosol akkumulieren und somit Apoptose vermehrt induzieren. In Zusammenschau der Ergebnisse zeigte sich, dass sich nach Behandlung mit viscum und viscumTT das Verhältnis von MCL1 zu PMAIP1 zu Gunsten der Apoptose verschob.

Die IAP-Familienmitglieder XIAP und BIRC5 wurden nach Inkubation mit viscum und viscumTT vermindert exprimiert. Die IAP-Familienmitglieder beeinflussen die Apoptose, indem sie Caspasen entweder direkt hemmen oder den Zusammenschluss proapoptotischer Komplexe wie dem Apoptosom inhibieren. BIRC5 stellt ein attraktives Therapieziel dar, da es in vielen pädiatrischen Tumoren vermehrt [209], in gesunden, adulten Geweben dagegen nur gering bzw. gar nicht exprimiert wird [55, 209]. Zudem ist

die verstärkte Expression von BIRC5 mit einer schlechten Prognose und häufigem Therapieversagen verbunden [55]. Caldas *et al.* fanden beim RMS erhöhte BIRC5-Proteinlevel und konnten durch dessen Inhibierung das Tumorstadium *in vivo* effektiv hemmen [210]. Die Behandlung mit OA konnte beim Lungenkarzinom [140], Ovarialzellkarzinom [199, 211], Leukämie [200] und Osteosarkom [202] die Expression von BIRC5 vermindern. Zudem konnten erniedrigte BIRC5-Level bei der AML [139], dem Osteosarkom [168] und Ewing-Sarkom [136] nach Behandlung mit viscum und viscumTT beobachtet werden. Verminderte XIAP-Level konnten nach Inkubation mit viscum, TT und viscumTT auch bei der ALL [139] und beim Ewing-Sarkom [136] beobachtet werden. Zudem wurden beim hepatozellulärem Karzinom durch OA und Ursolsäure die XIAP-Level reduziert [212].

Nach Behandlung mit viscum, TT und viscumTT wurden erniedrigte CLSPN-Proteinlevel detektiert. Viscum, TT und viscumTT konnten die Expression von CLSPN ebenfalls bei der AML, dem Osteosarkom [168] und Ewing-Sarkom vermindern [136, 139]. CLSPN ist ein Protein des Zellzyklus, das für die DNS-Replikation notwendig ist. Es agiert als Regulator der *checkpoint kinase 1* und löst den Zellzyklusarrest bei irreparablen DNS-Schäden aus [213, 214]. CLSPN kann das Überleben von Zellen mit DNS-Schäden fördern. Damit in diesen Zellen die Apoptose induziert werden kann, muss CLSPN degradiert werden [215].

Weder viscum, TT noch viscumTT beeinflussten die Expression von TP53. Das Tumorsuppressorprotein TP53 wird auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet. Bei DNS-Schäden der Zelle induziert TP53 den Zellzyklusarrest und kann je nach Ausmaß der Schäden sowohl das Überleben als auch den Zelltod fördern [38, 42]. Zudem spielt TP53 eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese und ist bei 50 % der Tumoren mutiert [38, 42]; so weisen auch etwa die Hälfte der RMS-Fälle eine TP53-Mutation auf [216]. Folglich werden Substanzen, die unabhängig von TP53 Apoptose induzieren, bevorzugt in der Tumorthherapie eingesetzt. Der TP53-Mutationsstatus der Zelllinie RMS-13 ist kontrovers, es wurde u.a. ein mutierter TP53-Status mit hohem Expressionslevel von dysfunktionalem TP53 beschrieben [217]. Dennoch scheint die Apoptoseinduktion durch viscum und viscumTT unabhängig von TP53 zu sein, da die Proteinexpression nicht beeinflusst wurde. Diese Annahme wird durch Untersuchungen gestützt, die nach Behandlung mit ML [172, 218], OA [182, 219] und BA [183, 184] ebenfalls eine TP53-unabhängige Apoptoseinduktion beobachteten. Darüber hinaus induzierte viscumTT

Apoptose in Zelllinien mit TP53-Wildtyp [138], mutiertem [136] oder null-mutiertem TP53-Status [168].

5.4 Methodische Fehler und Limitierungen

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden die ARMS-Zelllinien RH-30 und RMS-13 untersucht. In der Literatur werden kontroverse Angaben zu deren Zellursprung gemacht [220]. Manche Autoren behaupten, dass es sich dabei um die gleiche Zelllinie handelt [221], andere wiederum, dass es unterschiedliche Zelllinien sind [184, 222-224]. Gemäß der Produktinformation des ATCC [159] und des DSMZ [160] stimmen die Angaben zum Gewebeerprung überein. Beide Zelllinien wurden aus Knochenmetastasen eines 17-Jährigen kaukasischen Patienten etabliert und haben einen positiven PAX3/FOXO1 Fusionsgenstatus [159, 160]. Bei den RMS-13 Zellen konnte zudem eine Gli-Amplifikation nachgewiesen werden [159]. Widersprüchliche Angaben finden sich außerdem in Hinblick auf den TP53-Mutationsstatus. Die RH-30 Zellen sind Träger einer TP53-Mutation [225], für die RMS-13 ist sowohl eine TP53-Mutation [217] als auch ein TP53-Wildtyp [226] beschrieben. Autoren, die beide Zelllinien untersucht haben, konnten unterschiedliche Empfindlichkeiten der Zelllinien gegenüber den eingesetzten Substanzen feststellen [184, 227, 228]. Dies deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Die Zelllinie RH-30 reagierte resistenter gegenüber dem Einsatz der Mistelextrakte als die Zelllinie RMS-13. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche biologische Aktivität, trotz ähnlichem genetischem Profil, könnte die separate Kultivierung sein [220]. Die Frage, ob es sich bei den RMS-13 und den RH-30 um die gleiche Zelllinie handelt, kann anhand der aktuellen Studienlage nicht abschließend geklärt werden. Weitere Untersuchungen zur Authentifizierung der Zelllinien wie z.B. das *Short Tandem Repeat Profiling* wären notwendig, um diese Frage abschließend klären zu können [220]. Aufgrund der unterschiedlichen Empfindlichkeit gegenüber den eingesetzten Extrakten werden die RMS-13 und RH-30 in dieser Arbeit als getrennte Zelllinien betrachtet.

Eine weitere Limitation dieser Dissertation ist die mangelnde Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Zum einen wurde in den Versuchen mit den resistenten Zelllinien TE 671 und RH-30 weder versucht, die Inkubationszeit zu verlängern, noch den Konzentrationsbereich der Extrakte zu erhöhen. Da TT in anderen Experimenten zytotoxische Effekte zeigte [138, 139, 142], waren die eingesetzten Konzentrationen im

Rahmen dieser Arbeit eventuell zu niedrig gewählt. Für diese Annahme spricht, dass zur Apoptoseinduktion höhere Konzentrationen OA notwendig sind als zur Proliferationshemmung [201]. So konnten Wei *et al.* eine deutliche Zunahme der Apoptose beim Pankreaskarzinom nach Steigerung der OA-Konzentration *in vitro* beobachten. Nach Behandlung mit 30 µg/ml OA waren 16 %, bei 50 µg/ml 36 % und bei 60 µg/ml 73 % der Zellen apoptotisch [148]. Zum anderen wurden die Messungen des MMP, der aktiven Caspasen und Caspaseinhibitoren sowie die Western-Blot Analysen nur mit einer Zelllinie durchgeführt. Zur Verifizierung der Ergebnisse wären weitere Untersuchungen mit weiteren Zelllinien erforderlich.

Eine weitere Einschränkung ist, dass die Wirkung der Extrakte gegenwärtig den Markersubstanzen zugeschrieben wird. Das bedeutet, dass davon ausgegangen wird, dass sich die Wirkung von viscum über ML und VT sowie die von TT sich durch OA entfaltet. Im Widerspruch dazu steht die Tatsache, dass viscum eine Vielzahl biologisch aktiver Komponenten in unbekannt Konzentrationen enthält [100] und die Wirkung des Mistelgesamtextraktes die der Einzelsubstrate übersteigt [75, 98]. Es ist also anzunehmen, dass die Wirkung von viscum nicht alleine auf ML und VT zurückzuführen ist. Auch TT enthält neben der OA zu geringeren Anteilen BA und unbekannte Mengen an weiteren Triterpensäuren wie Ursolsäure. Sowohl für BA als auch für Ursolsäure sind zahlreiche biologische Aktivitäten beschrieben worden, wobei sich OA und BA in ihrer Wirkung ähneln [142]. Die Wirkung des TT-Extraktes kann somit nicht mit Sicherheit ausschließlich der OA zugeschrieben werden.

5.5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mistelextrakte, im speziellen viscum und viscumTT, zytotoxische Effekte im Rhabdomyosarkommodell ausüben. Darüber hinaus gelang es, zum besseren Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen beizutragen. Mehrere Fragen konnten abschließend nicht geklärt werden und einige neue Fragen wurden aufgeworfen, so dass es weitere Experimente benötigt, diese zu beantworten.

Die Versuche sollten zunächst zur besseren Vergleichbarkeit mit einer zweiten Ziellinie vervollständigt werden (siehe Limitationen). Daran sollten sich Experimente anschließen, die untersuchen, warum die TE 671 und RH-30 resistenter auf die Behandlung mit Mistelextrakten reagieren. Zu diesem Zweck sollte überprüft werden, ob Apoptose durch Steigerung der Wirkstoffkonzentration und/oder Verlängerung der Inkubationszeit induziert werden kann.

Darüber hinaus sollten die Versuche ausgebaut werden, um ein besseres Verständnis bezüglich der Wechselbeziehungen zwischen dem intrinsischen und extrinsischen Signalweg zu erlangen. Denkbar wäre hier z.B. die Bestimmung weiterer Proteine im Western-Blot wie Cytochrom c, BAX und BAK1. Außerdem könnten der *Knock-down* mittels siRNS oder der Einsatz spezieller Inhibitoren zur weiteren Charakterisierung des Apoptosemechanismus beitragen. Des Weiteren könnte die Aktivität der Todesrezeptoren wie Fas- und TRAIL-Rezeptoren auf der Zelloberfläche gemessen werden.

Bei Verwendung des Kombinationspräparates viscumTT konnten in den Versuchen synergistische Effekte beobachtet werden. Der Frage, auf welcher Ebene sich viscum und TT gegenseitig beeinflussen, sollte in zukünftigen Experimenten nachgegangen werden. Beispielsweise könnte die Messung der aktiven CASP und Bestimmung der Proteinexpression nach Ausschalten spezieller CASP dazu beitragen, diesen Effekt besser zu verstehen. Weiterhin scheint die Apoptoseinduktion durch viscumTT eine Caspase-unabhängige Komponente zu besitzen. Zur Aufklärung des zugrundeliegenden Mechanismus könnte der Nachweis der Beteiligung des Endoplasmatischen Retikulums oder der Lysosomen beitragen.

Ziel dieser Dissertation war es, neue Therapieoptionen zur Behandlung des Rhabdomyosarkoms zu entwickeln. Daher wäre ein möglicher Interessenschwerpunkt,

die Wirkung von viscum, TT und viscumTT in Kombination mit Chemotherapeutika zu erforschen. Sowohl ML [86, 87, 89] als auch OA [229] zeigten in vorangegangenen Versuchen das Potential, die Wirkung von Chemotherapeutika zu steigern. Weissenstein *et al.* konnten zeigen, dass wässrige Mistelextrakte die Effekte von Chemotherapeutika nicht negativ beeinflussen, und dass im höheren Konzentrationsbereich eine Wirkungssteigerung stattfindet [83]. Auch beim Osteosarkom konnte nach gemeinsamer Behandlung von viscum, TT und viscumTT mit Doxorubicin, Ifosfamid und Etoposid sowohl additive als auch synergistische Effekte beobachtet werden [168].

Als nächster Entwicklungsschritt in der Etablierung neuer Medikamente sollten sich an dieser Stelle *in vivo* Versuche anschließen, um die therapeutische Wirksamkeit der Mistelextrakte im Organismus zu überprüfen. In vorangegangenen Versuchen zeigte viscumTT bereits antitumorale Wirkungen im Mausmodell beim Ewing-Sarkom [136], akuten Leukämien [138, 139] und beim malignem Melanom [150]. Darüber hinaus verstärkte viscumTT die Wirkung des Chemotherapeutikums Cytarabin *in vivo* [139].

6 Schlussfolgerung

ARMS zeichnen sich durch ein aggressives Wachstumsverhalten und eine schlechte Prognose aus. Ihr genetisches Profil ist durch Mutationen gekennzeichnet, welche für die Blockierung der Differenzierung, die unkontrollierte Proliferation und Apoptoseresistenz verantwortlich sind. In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass *viscum* und insbesondere *viscumTT* diese Resistenzmechanismen überwinden können, indem sie effektiv die Zellproliferation inhibieren und Apoptose induzieren. Die zytotoxischen Effekte werden sowohl über den extrinsischen wie auch den intrinsischen Apoptosesignalweg vermittelt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass *viscum* und *viscumTT* die Proteinexpression der antiapoptotischen Proteine XIAP, BIRC5, BCL2, BCL2L1 und MCL1 vermindern und somit das Verhältnis zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen zu Gunsten der Apoptose verschoben. Die Wirkung der Mistelextrakte scheint unabhängig vom Tumorsuppressor TP53 zu sein. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass *viscum* und *viscumTT* zwar ähnliche Signalwege beeinflussen, die Wirkung von *viscumTT* derjenigen der Einzelsubstanzen jedoch synergistisch überlegen ist. Die Zugabe solubilisierter Triterpensäuren zu wässrigen Mistelextrakten potenziert deren Wirkung über einen bislang unbekanntem Mechanismus. Abschließend bleibt hervorzuheben, dass der triterpensäurehaltige Mistelgesamtextrakt *viscumTT* eine effektive Substanzkombination zur Behandlung des Rhabdomyosarkoms *in vitro* darstellt.

7 Literaturverzeichnis

1. Kaatsch P, Grabow D, Spix C, ed. German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2016 (1980-2015). Mainz, Germany: Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, 2016.
2. Robert Koch-Institut, ed. Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Gemeinsam getragen von RKI und Destatis. Berlin, Germany: Robert Koch-Institut, 2015.
3. Hayes-Jordan A, Andrassy R. Rhabdomyosarcoma in children. *Curr Opin Pediatr* 2009;21:373-8.
4. Horneber MA, Bueschel G, Huber R, Linde K, Rostock M. Mistletoe therapy in oncology. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;(2):CD003297.
5. Heusser P, Kienle GS. Anthroposophic medicine, integrative oncology, and mistletoe therapie of cancer. In: Abrams DI, Weil AT, eds. *Integrative Oncology*. 2nd ed. Oxford, England: Oxford University Press, 2014:560-88.
6. Längler A, Spix C, Edelhäuser F, Kameda G, Kaatsch P, Seifert G. Use of homeopathy in pediatric oncology in Germany. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011;2011:867151.
7. Nazaruk J, Orlikowski P. Phytochemical profile and therapeutic potential of *Viscum album L.* *Nat Prod Res* 2016;30(4):373-85.
8. Sultan I, Qaddoumi I, Yaser S, Rodriguez-Galindo C, Ferrari A. Comparing adult and pediatric rhabdomyosarcoma in the surveillance, epidemiology and end results program, 1973 to 2005: an analysis of 2,600 patients. *J Clin Oncol* 2009;27(20):3391-7.
9. Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F, eds. *WHO classification of tumours of soft tissue and bone*, 4th ed. Lyon, France: IARC Press, 2013.
10. Parham DM, Barr FG. Classification of rhabdomyosarcoma and its molecular basis. *Adv Anat Pathol* 2013;20(6):387-97.
11. Hawkins DS, Gupta AA, Rudzinski ER. What's New in the biology and treatment of pediatric rhabdomyosarcoma? *Curr Opin Pediatr* 2014;26(1):50-6.

12. Sorensen PH, Lynch JC, Qualman SJ, Tirabosco R, Lim JF, Maurer HM, Bridge JA, Crist WM, Triche TJ, Barr FG. PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol* 2002;20(11):2672-9.
13. Rubin BP, Nishijo K, Chen HI, Yi X, Schuetze DP, Pal R, Prajapati SI, Abraham J, Arenkiel BR, Chen QR, Davis S, McCleish AT, Capecchi MR, Michalek JE, Zarzabal LA, Khan J, Yu Z, Parham DM, Barr FG, Meltzer PS, Chen Y, Keller C. Evidence for an unanticipated relationship between undifferentiated pleomorphic sarcoma and embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell* 2011;19(2):177-91.
14. Hatley ME, Tang W, Garcia MR, Finkelstein D, Millay DP, Liu N, Graff J, Galindo RL, Olson EN. A mouse model of rhabdomyosarcoma originating from the adipocyte lineage. *Cancer Cell* 2012;22(4):536-46.
15. Abraham J, Nuñez-Álvarez Y, Hettmer S, Carrió E, Chen HI, Nishijo K, Huang ET, Prajapati SI, Walker RL, Davis S, Rebeles J, Wiebush H, McCleish AT, Hampton ST, Bjornson CR, Brack AS, Wagers AJ, Rando TA, Capecchi MR, Marini FC, Ehler BR, Zarzabal LA, Goros MW, Michalek JE, Meltzer PS, Langenau DM, LeGallo RD, Mansoor A, Chen Y, Suelves M, Rubin BP, Keller C. Lineage of origin in rhabdomyosarcoma informs pharmacological response. *Genes Dev* 2014;28(14):1578-91.
16. Parham DM, Alaggio R, Coffin CM. Myogenic tumors in children and adolescents. *Pediatr Dev Pathol* 2012;15:211-38.
17. Dagher R, Helman L. Rhabdomyosarcoma: an overview. *Oncologist* 1999;4(1):34-44.
18. Huh WW, Skapek SX. Childhood rhabdomyosarcoma: new insight on biology and treatment. *Curr Oncol Rep* 2010;12(6):402-10.
19. Dasgupta R, Rodeberg DA. Update on rhabdomyosarcoma. *Semin Pediatr Surg* 2012;21(1):68-78.
20. El Demellawy D, McGowan-Jordan J, de Nanassy J, Chernetsova E, Nasr A. Update on molecular findings in rhabdomyosarcoma. *Pathology* 2017;49(3):238-246.
21. Kashi VP, Hatley ME, Galindo RL. Probing for a deeper understanding of rhabdomyosarcoma: insights from complementary model systems. *Nat Rev Cancer* 2015;15(7):426-39.

22. Weiss AR, Lyden ER, Anderson JR, Hawkins DS, Spunt SL, Walterhouse DO, Wolden SL, Parham DM, Rodeberg DA, Kao SC, Womer RB. Histologic and clinical characteristics can guide staging evaluations for children and adolescents with rhabdomyosarcoma: a report from the Children's Oncology Group Soft Tissue Sarcoma Committee. *J Clin Oncol* 2013;31(26):3226-32.
23. Malempati S, Hawkins DS. Rhabdomyosarcoma: review of the Children's Oncology Group (COG) Soft-Tissue Sarcoma Committee experience and rationale for current COG studies. *Pediatr Blood Cancer* 2012;59(1):5-10.
24. Monti E, Fanzani A. Uncovering metabolism in rhabdomyosarcoma. *Cell Cycle* 2016;15(2):184-95.
25. Paulino AC, Okcu MF. Rhabdomyosarcoma. *Curr Probl Cancer* 2008;32(1):7–34.
26. Xia SJ, Pressey JG, Barr FG. Molecular pathogenesis of rhabdomyosarcoma. *Cancer Biol Ther* 2002;1(2):97-104.
27. Arnold MA, Barr FG. Molecular diagnostics in the management of rhabdomyosarcoma. *Expert Rev Mol Diagn* 2017;17(2):189-194.
28. Marshall AD, Grosveld GC. Alveolar rhabdomyosarcoma – The molecular drivers of PAX3/7-FOXO1-induced tumorigenesis. *Skelet Muscle* 2012;2:25.
29. Skapek SX, Anderson J, Barr FG, Bridge JA, Gastier-Foster JM, Parham DM, Rudzinski ER, Triche T, Hawkins DS. PAX-FOXO1 fusion status drives unfavorable outcome for children with rhabdomyosarcoma: a children's oncology group report. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60(9):1411-7.
30. Williamson D, Missiaglia E, de Reyniès A, Pierron G, Thuille B, Palenzuela G, Thway K, Orbach D, Laé M, Fréneaux P, Pritchard-Jones K, Oberlin O, Shipley J, Delattre O. Fusion gene-negative alveolar rhabdomyosarcoma is clinically and molecularly indistinguishable from embryonal rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol* 2010;28(13):2151-8.
31. Hettmer S, Li Z, Billin AN, Barr FG, Cornelison DD, Ehrlich AR, Guttridge DC, Hayes-Jordan A, Helman LJ, Houghton PJ, Khan J, Langenau DM, Linardic CM, Pal R, Partridge TA, Pavlath GK, Rota R, Schäfer BW, Shipley J, Stillman B, Wexler LH, Wagers AJ, Keller C. Rhabdomyosarcoma: current challenges and their implications for developing therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014;4(11):a025650.
32. Sokolowski E, Turina CB, Kikuchi K, Langenau DM, Keller C. Proof-of-concept rare cancers in drug development: the case for rhabdomyosarcoma. *Oncogene* 2014;33(15):1877-89.

33. Dasgupta R, Fuchs J, Rodeberg D. Rhabdomyosarcoma. *Semin Pediatr Surg* 2016;25(5):276-283.
34. Davicioni E, Anderson MJ, Finckenstein FG, Lynch JC, Qualman SJ, Shimada H, Schofield DE, Buckley JD, Meyer WH, Sorensen PH, Triche TJ. Molecular classification of rhabdomyosarcoma--genotypic and phenotypic determinants of diagnosis: a report from the Children's Oncology Group. *Am J Pathol* 2009;174(2):550-64.
35. Hawkins DS, Spunt SL, Skapek SX. Children's Oncology Group's 2013 Blueprint for Research: Soft Tissue Sarcomas. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60(6):1001-8.
36. Cooperative Weichteilsarkom Studiengruppe (CWS) of the Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH). CWS-Guidance for risk adapted treatment of soft tissue sarcoma and soft tissue tumours in children, adolescents, and young adults. Version 1.6.1. from 24.05.2014. Stuttgart, Germany: 2014.
37. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26(4):239-57.
38. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35(4):495-516.
39. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif* 2012;45(6):487-98.
40. Sun Y, Peng ZL. Programmed cell death and cancer. *Postgrad Med J* 2009;85(1001):134-40.
41. Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 1997;53(3):451-65.
42. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 2011;30:87.
43. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000;407(6805):784-8.
44. Pradelli LA, Bénétteau M, Ricci JE. Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cell Mol Life Sci* 2010;67(10):1589-97.
45. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med* 2009;361(16):1570-83.
46. Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5(6):a008672.

47. Fulda S. Targeting apoptosis for anticancer therapy. *Semin Cancer Biol* 2015;31:84-8.
48. Rupinder SK, Gurpreet AK, Manjeet S. Cell suicide and caspases. *Vascul Pharmacol* 2007;46(6):383-93.
49. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006;25(34):4798-811.
50. Chaitanya GV, Steven AJ, Babu PP. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal* 2010;8:31.
51. Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 1993;53(17):3976-85.
52. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM. Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 1995;81(5):801-9.
53. Fulda S. Targeting extrinsic apoptosis in cancer: Challenges and opportunities. *Semin Cell Dev Biol* 2015;39:20-5.
54. Indran IR, Tufo G, Pervaiz S, Brenner C. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2011;1807(6):735-45.
55. Koff JL, Ramachandiran S, Bernal-Mizrachi L. A Time to Kill: Targeting Apoptosis in Cancer. *Int J Mol Sci* 2015;16(2):2942-55.
56. Cosentino K, Garcia-Saez AJ. Mitochondrial alterations in apoptosis. *Chem Phys Lipids* 2014;181:62-75.
57. Fulda S, Galluzzi L, Kroemer G. Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9(6):447-64.
58. Vega-Naredo I, Cunha-Oliveira T, Serafim TL, Sardao VA, Oliveira PJ. Analysis of pro-apoptotic protein trafficking to and from mitochondria. *Methods Mol Biol* 2015;1241:163-80.
59. Fulda S, Vucic D. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2012;11(2):109-24.
60. Vucic D, Dixit VM, Wertz IE. Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12(7):439-52.

61. Yang YL, Li XM. The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Res* 2000;10(3):169-77.
62. Becker H. European mistletoe: Taxonomy, host trees, parts used, physiology. In: Büssing A, ed. *Mistletoe: The Genus Viscum. Medicinal and aromatic plants-Industrial profiles*. Amsterdam, Netherlands: Harwood Academic Publishers, 2000:31-41.
63. Park YK, Do YR, Jang BC. Apoptosis of K562 leukemia cells by Abnobaviscum F®, a European mistletoe extract. *Oncol Rep* 2012;28(6):2227-32.
64. Kovacs E. Investigation of the proliferation, apoptosis/necrosis, and cell cycle phases in several human multiple myeloma cell lines. Comparison of *Viscum album* QuFrF extract with vincristine in an in vitro model. *Sci. World J* 2010;10:311-20.
65. Klingbeil MF, Xavier FC, Sardinha LR, Severino P, Mathor MB, Rodrigues RV, Pinto DS Jr. Cytotoxic effects of mistletoe (*Viscum album* L.) in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Oncol Rep* 2013;30(5):2316-22.
66. Eggenschwiler J, von Balthazar L, Stritt B, Pruntsch D, Ramos M, Urech K, Rist L, Simões-Wüst AP, Viviani A. Mistletoe lectin is not the only cytotoxic component in fermented preparations of *Viscum album* from white fir (*Abies pectinata*). *BMC Complement Altern Med* 2007;7:14.
67. Seifert G, Jesse P, Laengler A, Reindl T, Lüth M, Lobitz S, Henze G, Prokop A, Lode HN. Molecular mechanisms of mistletoe plant extract-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia in vivo and in vitro. *Cancer Lett* 2008;264(2):218-28.
68. Beuth J, Ko HL, Schneider H, Tawadros S, Kasper HU, Zimst H, Schierholz JM. Intratumoral application of standardized mistletoe extracts down regulates tumor weight via decreased cell proliferation, increased apoptosis and necrosis in a murine model. *Anticancer Res* 2006;26(6B):4451-6.
69. Duong Van Huyen JP, Delignat S, Bayry J, Kazatchkine MD, Bruneval P, Nicoletti A, Kaveri SV. Interleukin-12 is associated with the in vivo anti-tumor effect of mistletoe extracts in B16 mouse melanoma. *Cancer Lett* 2006;243(1):32-7.
70. Rostock M, Huber R, Greiner T, Fritz P, Scheer R, Schueler J, Fiebig HH. Anticancer activity of a lectin-rich mistletoe extract injected intratumorally into human pancreatic cancer xenografts. *Anticancer Res* 2005;25(3B):1969-75.
71. Ramm H. Mistletoe through cultural and medical history: The all-healing plant proves to be a cancer-specific remedy. In: Zänker KS, Kaveri SV, eds. *Mistletoe: From mythology to evidence-based medicine*. Vol 4. Basel, Switzerland: Karger, 2015:1-10.

72. Urech K, Schaller G, Jäggy C. Viscotoxins, mistletoe lectins and their isoforms in mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador. *Arzneimittelforschung* 2006;56(6A):428-34.
73. Hoffmann F. Versorgung mit Krebstherapeutika im Jahr 2010. In: BARMER GEK, ed. BARMER GEK Arzneimittelreport 2011 - Auswertungsergebnisse der Barmer GEK Arzneimitteldaten aus den Jahren 2009 bis 2010. Schriftenreihe zur Gesundheitsanalyse, Band 8. St. Augustin, Germany: Asgard-Verlag, 2011:130-44.
74. Kienle GS, Kiene H. Complementary cancer therapy: a systematic review of prospective clinical trials on anthroposophic mistletoe extracts. *Eur J Med Res* 2007;12(3):103-19.
75. Braedel-Ruoff S. Immunomodulatory effects of *Viscum album* extracts on natural killer cells: review of clinical trials. *Forsch Komplementmed* 2010;17(2):63-73.
76. Steele ML, Axtner J, Happe A, Kröz M, Matthes H, Schad F. Use and safety of intratumoral application of European mistletoe (*Viscum album* L) preparations in Oncology. *Integr Cancer Ther* 2015;14(2):140-8.
77. Büssing A. Mistel (*Viscum album*) - anthroposophischer und phytotherapeutischer Ansatz. In: Münstedt KH, ed. Komplementäre und alternative Krebstherapien. 3rd ed. Landsberg am Lech, Germany: Ecomed Medizin, 2012:467-83.
78. Schad F, Axtner J, Buchwald D, Happe A, Popp S, Kröz M, Matthes H. Intratumoral Mistletoe (*Viscum album* L) Therapy in Patients With Unresectable Pancreas Carcinoma: A Retrospective Analysis. *Integr Cancer Ther* 2014;13(4):332-40.
79. Kienle GS, Kiene H. Review article: Influence of *Viscum album* L (European mistletoe) extracts on quality of life in cancer patients: a systematic review of controlled clinical studies. *Integr Cancer Ther* 2010;9(2):142-57.
80. Melzer J, Iten F, Hostanska K, Saller R. Efficacy and safety of mistletoe preparations (*Viscum album*) for patients with cancer diseases. A systematic review. *Forsch Komplementmed* 2009;16(4):217-26.
81. Tröger W, Galun D, Reif M, Schumann A, Stanković N, Milićević M. *Viscum album* [L.] extract therapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer: a randomised clinical trial on overall survival. *Eur J Cancer* 2013;49(18):3788-97.
82. Kunz C, Heiligtag HR, Hintze A, Urech K. Topische Behandlung des Basalzellkarzinoms mit *Viscum album*, lipophiler Extrakt 10 %, Unguentum - Eine Fallserie-Studie. In: Scheer R, Alban S, Becker H, Blaschek W, Kemper FH, Kreis W, Matthes H, Schilcher H, Stange R, eds. Die Misteltherapie in der Tumorthherapie - Aktueller Stand der Forschung und klinische Anwendung. 3rd ed. Essen, Germany: KVC Verlag, 2013:315-22.

83. Weissenstein U, Kunz M, Urech K, Baumgartner S. Interaction of standardized mistletoe (*Viscum album*) extracts with chemotherapeutic drugs regarding cytostatic and cytotoxic effects in vitro. *BMC Complement Altern Med* 2014;14:6.
84. Weissenstein U, Kunz M, Urech K, Regueiro U, Baumgartner S. Interaction of a standardized mistletoe (*Viscum album*) preparation with antitumor effects of Trastuzumab in vitro. *BMC Complement Altern Med* 2016;16:271.
85. Mansky PJ, Wallerstedt DB, Sannes TS, Stagl J, Johnson LL, Blackman MR, Grem JL, Swain SM, Monahan BP. NCCAM/NCI Phase 1 Study of Mistletoe Extract and Gemcitabine in Patients with Advanced Solid Tumors. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013;2013:964592.
86. Bantel H, Engels IH, Voelter W, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S. Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Res* 1999;59(9):2083-90.
87. Hong CE, Park AK, Lyu SY. Synergistic anticancer effects of lectin and doxorubicin in breast cancer cells. *Mol Cell Biochem* 2014;394(1-2):225-35.
88. Srdic-Rajic T, Tisma-Miletic N, Cavic M, Kanjer K, Savikin K, Galun D, Konic-Ristic A, Zoranovic T. Sensitization of K562 Leukemia Cells to Doxorubicin by the *Viscum album* Extract. *Phytother Res* 2016;30(3):485-95.
89. Siegle I, Fritz P, McClellan M, Gutzeit S, Mürdter TE. Combined cytotoxic action of *Viscum album* agglutinin-1 and anticancer agents against human A549 lung cancer cells. *Anticancer Res* 2001;21(4A):2687-91.
90. Franz H, Ziska P, Kindt A. Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album* L.). *Biochem J* 1981;195(2):481-4.
91. Winterfeld K, , Bijl LH. Viscotoxin, ein neuer Inhaltsstoff der Mistel (*Viscum album* L). *Eur J Org Chem* 1949;561(2):107-15.
92. Wagner H, Feil B, Bladt S. *Viscum album* - die Mistel. Analyse und Standardisierung von Arzneidrogen und Phytopräparaten durch Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und andere chromatographische Verfahren (III). *Deutsche Apotheker Zeitung* 1984;124(29):1429-32.
93. Fukunaga T, Kajikawa I, Nishiya K, Watanabe Y, Takeya K, Itokawa H. Studies on the Constituents of the European Mistletoe, *Viscum album* L. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1987;35:3292-7.

94. Becker H, Exner J, Schilling G. Notizen: Isolierung und Strukturaufklärung von 2'-Hydroxy-4', 6'dimethoxychalkon-4-glukosid aus *Viscum album* L. Isolation and identification of 2'-hydroxy-4', 6' -dimethoxy-chalkon-4-glucoside of *Viscum album* L. Zeitschrift für Naturforschung 1978;33:771-3.
95. Becker H, Exner J. Vergleichende Untersuchungen von Misteln verschiedener Wirtsbäume an Hand der Flavonoide and Phenolcarbonsäuren: Comparative Studies of Flavonoids and Phenylcarboxylic Acids of Mistletoes from Different Host Trees. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 1980;97(5):417-28.
96. Jordan E, Wagner H. Structure and properties of polysaccharides from *Viscum album* (L.). Oncology 1986;43 Suppl 1:8-15.
97. Klett CY, Anderer FA. Activation of natural killer cell cytotoxicity of human blood monocytes by a low molecular weight component from viscum album extract. Arzneimittelforschung 1989;39(12):1580-5.
98. Urech K, Baumgartner S. Chemical constituents of *Viscum album* L.: Implications for the pharmaceutical preparation of mistletoe. In: Zänker KS, Kaveri SV, eds. Mistletoe: From mythology to evidence-based medicine. Vol 4. Basel, Switzerland: Karger, 2015:11-23.
99. Jäger S, Winkler K, Pfüller U, Scheffler A. Solubility studies of oleanolic acid and betulinic acid in aqueous solutions and plant extracts of *Viscum album* L. Planta Med 2007;73(2):157-62.
100. Büssing A, Schietzel M. Apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts from different host trees, correlate with their content of toxic mistletoe lectins. Anticancer Res 1999;19(1A):23-8.
101. Schaller G, Urech K, Grazi G, Giannattasio M. Viscotoxin composition of the three European subspecies of *Viscum album*. Planta Med 1998;64(7):677-8.
102. Jung ML, Baudino S, Ribéreau-Gayon G, Beck JP. Characterization of cytotoxic proteins from mistletoe (*Viscum album* L.). Cancer Lett 1990;51(2):103-8.
103. Büssing A, Multani AS, Pathak S, Pfüller U, Schietzel M. Induction of apoptosis by the N-acetyl-galactosamine-specific toxic lectin from *Viscum album* L. is associated with a decrease of nuclear p53 and Bcl-2 proteins and induction of telomeric associations. Cancer Lett 1998;130(1-2):57-68.
104. Ziska P, Franz H. Studies on the interaction of the mistletoe lectin I with carbohydrates. Experientia 1981;37(3):219.
105. Franz H. Mistletoe lectins and their A and B chains. Oncology 1986;43 Suppl 1:23-34.

106. Büssing A, Suzart K, Bergmann J, Pfüller U, Schietzel M, Schweizer K. Induction of apoptosis in human lymphocytes treated with *Viscum album* L. is mediated by the mistletoe lectins. *Cancer Lett* 1996;99(1):59-72.
107. Olsnes S, Stirpe F, Sandvig K, Pihl A. Isolation and characterization of viscumin, a toxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe). *J Biol Chem* 1982;257(22):13263-70.
108. Lavastre V, Chiasson S, Cavalli H, Girard D. *Viscum album* agglutinin-I induces apoptosis and degradation of cytoskeletal proteins via caspases in human leukaemia eosinophil AML14.3D10 cells: differences with purified human eosinophils. *Br J Haematol* 2005;130(4):527-35.
109. Choi SH, Lyu SY, Park WB. Mistletoe lectin induces apoptosis and telomerase inhibition in human A253 cancer cells through dephosphorylation of Akt. *Arch Pharm Res* 2004;27(1):68-76.
110. Schumacher U, Stamouli A, Adam E, Peddie M, Pfüller U. Biochemical, histochemical and cell biological investigations on the actions of mistletoe lectins I, II and III with human breast cancer cell lines. *Glycoconj J* 1995;12(3):250-7.
111. Yang X, Jiang S, Liu Y, Zhang P, Xie S, Wang G. Recombinant VAA-I from *Viscum album* induces apoptotic cell death of hepatocellular carcinoma SMMC7721 cells. *Molecules* 2012;17(10):11435-46.
112. Elsasser-Beile U, Ruhnau T, Freudenberg N, Wetterauer U, Mengs U. Antitumoral effect of recombinant mistletoe lectin on chemically induced urinary bladder carcinogenesis in a rat model. *Cancer* 2001;91(5):998-1004.
113. Schaffrath B, Mengs U, Schwarz T, Hilgers RD, Beuth J, Möckel B, Lentzen H, Gerstmayer B. Anticancer activity of rViscumin (recombinant mistletoe lectin) in tumor colonization models with immunocompetent mice. *Anticancer Res* 2001;21(6A):3981-7.
114. Schumacher U, Feldhaus S, Mengs U. Recombinant mistletoe lectin (rML) is successful in treating human ovarian cancer cells transplanted into severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Cancer Lett* 2000;150(2):171-5.
115. Hegde P, Maddur MS, Friboulet A, Bayry J, Kaveri SV. *Viscum album* exerts anti-inflammatory effect by selectively inhibiting cytokine-induced expression of cyclooxygenase-2. *PLoS One* 2011;6(10):e26312.
116. Hajto T, Hostanska K, Gabius HJ. 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* 1989;49(17):4803-8.

117. Hajto T, Hostanska K, Frei K, Rordorf C, Gabius HJ. 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* 1990;50(11):3322-6.
118. Hostanska K, Hajto T, Spagnoli GC, Fischer J, Lentzen H, Herrmann R. A plant lectin derived from *Viscum album* induces cytokine gene expression and protein production in cultures of human peripheral blood mononuclear cells. *Nat Immun* 1995;14(5-6):295-304.
119. Ribéreau-Gayon G, Dumont S, Muller C, Jung ML, Poindron P, Anton R. Mistletoe lectins I, II and III induce the production of cytokines by cultured human monocytes. *Cancer Lett* 1996;109(1-2):33-8.
120. Elluru SR, Duong Van Huyen JP, Delignat S, Prost F, Heudes D, Kazatchkine MD, Friboulet A, Kaveri SV. Antiangiogenic properties of viscum album extracts are associated with endothelial cytotoxicity. *Anticancer Res* 2009;29(8):2945-50.
121. Guzmán-Rodríguez JJ, Ochoa-Zarzosa A, López-Gómez R, López-Meza JE. Plant antimicrobial peptides as potential anticancer agents. *Biomed Res Int* 2015;2015:735087.
122. Urech K, Schaller G, Ziska P. Comparative study on the cytotoxic effect of viscotoxin and mistletoe lectin on tumour cells in culture. *Phytother Res* 1995;9:49-55.
123. Samuelsson G. Mistletoe Toxins. *Syst Biol* 1973;22(4):566-569.
124. Büssing A, Stein GM, Wagner M, Wagner B, Schaller G, Pfüller U, Schietzel M. Accidental cell death and generation of reactive oxygen intermediates in human lymphocytes induced by thionins from *Viscum album* L. *Eur J Biochem* 1999;262:79-87.
125. Konopa J, Woynarowski JM, Lewandowska-Gumieniak M. Isolation of viscotoxins. Cytotoxic basic polypeptides from *Viscum album* L. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1980;361(10):1525-33.
126. Schaller G, Urech K, Giannattasio M. Cytotoxicity of Different Viscotoxins and Extracts from the European Subspecies of *Viscum album* L. *Phytother Res* 1996;10:473-7.
127. Tabiasco J, Pont F, Fournié JJ, Vercellone A. Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Biochem* 2002;269(10):2591-600.
128. Laszczyk MN. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta Med* 2009;75(15):1549-60.

129. Patlolla JM, Rao CV. Triterpenoids for cancer prevention and treatment: current status and future prospects. *Curr Pharm Biotechnol* 2012;13(1):147-55.
130. Jäger S, Trojan H, Kopp T, Laszczyk MN, Scheffler A. Pentacyclic triterpene distribution in various plants - rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules* 2009;14(6):2016-31.
131. Pollier J, Goossens A. Oleanolic acid. *Phytochemistry* 2012;77:10-5.
132. Shanmugam MK, Dai X, Kumar AP, Tan BK, Sethi G, Bishayee A. Oleanolic acid and its synthetic derivatives for the prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical evidence. *Cancer Lett* 2014;346(2):206-16.
133. Alabran JL, Cheuk A, Liby K, Sporn M, Khan J, Letterio J, Leskov KS. Human neuroblastoma cells rapidly enter cell cycle arrest and apoptosis following exposure to C-28 derivatives of the synthetic triterpenoid CDDO. *Cancer Biol Ther* 2008;7(5):709-17.
134. Gao X, Deeb D, Jiang H, Liu Y, Dulchavsky SA, Gautam SC. Synthetic triterpenoids inhibit growth and induce apoptosis in human glioblastoma and neuroblastoma cells through inhibition of prosurvival Akt, NF-kappaB and Notch1 signaling. *J Neurooncol* 2007;84(2):147-57.
135. Zhou R1 Zhang Z, Zhao L, Jia C, Xu S, Mai Q, Lu M, Huang M, Wang L, Wang X, Jin D, Bai X. Inhibition of mTOR signaling by oleanolic acid contributes to its anti-tumor activity in osteosarcoma cells. *J Orthop Res* 2011;29(6):846-52.
136. Twardziok M, Kleinsimon S, Rolff J, Jäger S, Eggert A, Seifert G, Delebinski CI. Multiple Active Compounds from *Viscum album* L. Synergistically Converge to Promote Apoptosis in Ewing Sarcoma. *PLoS One* 2016;11(9):e0159749.
137. Zhang P, Li H, Chen D, Ni J, Kang Y, Wang S. Oleanolic acid induces apoptosis in human leukemia cells through caspase activation and poly(ADP-ribose) polymerase cleavage. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2007;39(10):803-9.
138. Delebinski CI, Jaeger S, Kemnitz-Hassanin K, Henze G, Lode HN, Seifert GJ. A new development of triterpene acid-containing extracts from *Viscum album* L. displays synergistic induction of apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia. *Cell Prolif* 2012;45(2):176-87.
139. Delebinski CI, Twardziok M, Kleinsimon S, Hoff F, Mulsow K, Rolff J, Jäger S, Eggert A, Seifert G. A Natural Combination Extract of *Viscum album* L. Containing Both Triterpene Acids and Lectins Is Highly Effective against AML In Vivo. *PLoS One* 2015;10(8):e0133892.

140. Lúcio KA, Rocha Gda G, Monção-Ribeiro LC, Fernandes J, Takiya CM, Gattass CR. Oleanolic acid initiates apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines and reduces metastasis of a B16F10 melanoma model in vivo. *PLoS One* 2011;6(12):e28596.
141. Pratheeshkumar P, Kuttan G. Oleanolic acid induces apoptosis by modulating p53, Bax, Bcl-2 and caspase-3 gene expression and regulates the activation of transcription factors and cytokine profile in B16F. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2011;30(1):21-31.
142. Strüh CM, Jäger S, Schempp CM, Scheffler A, Martin SF. A novel triterpene extract from mistletoe induces rapid apoptosis in murine B16.F10 melanoma cells. *Phytother Res* 2012;26(10):1507-12.
143. Wu J, Yang C, Guo C, Li X, Yang N, Zhao L, Hang H, Liu S, Chu P, Sun Z, Sun B, Lin Y, Peng J, Han G, Wang S, Tang Z. SZC015, a synthetic oleanolic acid derivative, induces both apoptosis and autophagy in MCF-7 breast cancer cells. *Chem Biol Interact* 2016;244:94-104.
144. Rui LX, Shu SY, Jun WJ, Mo CZ, Wu SZ, Min LS, Yuan L, Yong PJ, Cheng SZ, Sheng WS, Yao TZ. The dual induction of apoptosis and autophagy by SZC014, a synthetic oleanolic acid derivative, in gastric cancer cells via NF- κ B pathway. *Tumour Biol* 2016;37(4):5133-44.
145. Hua Y, Zhang Z, Li J, Li Q, Hu S, Li J, Sun M, Cai Z. Oleanolic acid derivative Dex-OA has potent anti-tumor and anti-metastatic activity on osteosarcoma cells in vitro and in vivo. *Invest New Drugs* 2011;29(2):258-65.
146. Li HF, Wang XA, Xiang SS, Hu YP, Jiang L, Shu YJ, Li ML, Wu XS, Zhang F, Ye YY, Weng H, Bao RF, Cao Y, Lu W, Dong Q, Liu YB. Oleanolic acid induces mitochondrial-dependent apoptosis and G0/G1 phase arrest in gallbladder cancer cells. *Drug Des Devel Ther* 2015;9:3017-30.
147. Wang X, Bai H, Zhang X, Liu J, Cao P, Liao N, Zhang W, Wang Z, Hai C. Inhibitory effect of oleanolic acid on hepatocellular carcinoma via ERK-p53-mediated cell cycle arrest and mitochondrial-dependent apoptosis. *Carcinogenesis* 2013;34(6):1323-30.
148. Wei J, Liu M, Liu H, Wang H, Wang F, Zhang Y, Han L, Lin X. Oleanolic acid arrests cell cycle and induces apoptosis via ROS-mediated mitochondrial depolarization and lysosomal membrane permeabilization in human pancreatic cancer cells. *J Appl Toxicol* 2013;33(8):756-65.
149. Sohn KH, Lee HY, Chung HY, Young HS, Yi SY, Kim KW. Anti-angiogenic activity of triterpene acids. *Cancer Lett* 1995;94(2):213-8.

150. Strüh CM, Jäger S, Kersten A, Schempp CM, Scheffler A, Martin SF. Triterpenoids amplify anti-tumoral effects of mistletoe extracts on murine B16.f10 melanoma in vivo. *PLoS One* 2013;8(4):e62168.
151. Lin C, Wen X, Sun H. Oleanolic acid derivatives for pharmaceutical use: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 2016;26(6):643-55.
152. Liu J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacol* 1995;49(2):57-68.
153. Fulda S, Kroemer G. Targeting mitochondrial apoptosis by betulinic acid in human cancers. *Drug Discov Today* 2009;14(17-18):885-90.
154. Zuco V, Supino R, Righetti SC, Cleris L, Marchesi E, Gambacorti-Passerini C, Formelli F. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Lett* 2002;175(1):17-25.
155. Johnson IS, Armstrong JG, Gorman M, Burnett JP Jr. The Vinca Alkaloids: A New Class of Oncolytic Agents. *Cancer Res* 1963;23:1390-427.
156. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* 1971;93(9):2325-7.
157. Sinkule JA. Etoposide: A semisynthetic epipodophyllotoxin. Chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, adverse effects and use as an antineoplastic agent. *Pharmacotherapy* 1984;4(2):61-73.
158. Gloger O, Witthohn K, Müller BW. Lyoprotection of aviscumine with low molecular weight dextrans. *Int J Pharm* 2003;260(1):59-68.
159. American Type Culture Collection (ATCC). Product information: cell line RMS-13. (Accessed September 29, 2016, at https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2061?geo_country=de#generalinformation.)
160. Leibniz-Institut DSMZ- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. DSMZ cell culture data: cell line RH-30. (Accessed September 29, 2016, at <https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-489.html>.)
161. Stratton MR, Darling J, Pilkington GJ, Lantos PL, Reeves BR, Cooper CS. Characterization of the human cell line TE671. *Carcinogenesis* 1989;10(5):899-905.
162. Leibniz-Institut DSMZ- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. DSMZ cell culture data: cell line TE 671. (Accessed November 08, 2016, at <https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-263.html>.)

163. Webb JL. Effect of more than one inhibitor. In: *Enzyme and metabolic inhibitors*. Vol 1. New York, NY: Academic Press, 1963:66–79, 488–512.
164. Prades J, Vögler O, Alemany R, Gomez-Florit M, Funari SS, Ruiz-Gutiérrez V, Barceló F. Plant pentacyclic triterpenic acids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochim Biophys Acta* 2011;1808(3):752-60.
165. Broniatowski M, Flasiński M, Zieba K, Miśkowiec P. Interactions of pentacyclic triterpene acids with cardiolipins and related phosphatidylglycerols in model systems. *Biochim Biophys Acta* 2014;1838(10):2530-8.
166. Han SK, Ko YI, Park SJ, Jin IJ, Kim YM. Oleanolic acid and ursolic acid stabilize liposomal membranes. *Lipids* 1997;32(7):769-73.
167. Janssen O, Scheffler A, Kabelitz D. In vitro effects of mistletoe extracts and mistletoe lectins. Cytotoxicity towards tumor cells due to the induction of programmed cell death (apoptosis). *Arzneimittelforschung* 1993;43(11):1221-7.
168. Kleinsimon S, Kauczor G, Jaeger S, Eggert A, Seifert G, Delebinski C. *Viscum*TT induces apoptosis and alters IAP expression in osteosarcoma in vitro and has synergistic action when combined with different chemotherapeutic drugs. *BMC Complement Altern Med* 2017;17(1):26.
169. Ji HF, Li XJ, Zhang HY. Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia? *EMBO Rep* 2009;10(3):194-200.
170. Gilbert B, Alves LF. Synergy in plant medicines. *Curr Med Chem* 2003;10(1):13-20.
171. Williamson EM. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine* 2001;8(5):401-9.
172. Lyu SY, Choi SH, Park WB. Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in hepatocarcinoma cells is associated with inhibition of telomerase via mitochondrial controlled pathway independent of p53. *Arch Pharm Res* 2002;25(1):93-101.
173. Khil LY, Kim W, Lyu S, Park WB, Yoon JW, Jun HS. Mechanisms involved in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis of cancer cells. *World J Gastroenterol* 2007;13(20):2811-8.
174. Kim MS, So HS, Lee KM, Park JS, Lee JH, Moon SK, Ryu DG, Chung SY, Jung BH, Kim YK, Moon G, Park R. Activation of caspase cascades in Korean mistletoe (*Viscum album* var. *coloratum*) lectin-II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. *Gen Pharmacol* 2000;34(5):349-55.

175. Samudio I, Kurinna S, Ruvolo P, Korchin B, Kantarjian H, Beran M, Dunner K Jr, Kondo S, Andreeff M, Konopleva M. Inhibition of mitochondrial metabolism by methyl-2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-diene-28-oate induces apoptotic or autophagic cell death in chronic myeloid leukemia cells. *Mol Cancer Ther* 2008;7(5):1130-9.
178. Konopleva M, Tsao T, Estrov Z, Lee RM, Wang RY, Jackson CE, McQueen T, Monaco G, Munsell M, Belmont J, Kantarjian H, Sporn MB, Andreeff M. The synthetic triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid induces caspase-dependent and -independent apoptosis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res* 2004;64(21):7927-35.
177. Ito Y, Pandey P, Place A, Sporn MB, Gribble GW, Honda T, Kharbanda S, Kufe D. The novel triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic acid induces apoptosis of human myeloid leukemia cells by a caspase-8-dependent mechanism. *Cell Growth Differ* 2000;11(5):261-7.
178. Ito Y, Pandey P, Sporn MB, Datta R, Kharbanda S, Kufe D. The novel triterpenoid CDDO induces apoptosis and differentiation of human osteosarcoma cells by a caspase-8 dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 2001;59(5):1094-9.
179. Petronelli A, Saulle E, Pasquini L, Petrucci E, Mariani G, Biffoni M, Ferretti G, Scambia G, Benedetti-Panici P, Greggi S, Cognetti F, Russo MA, Sporn M, Testa U. High sensitivity of ovarian cancer cells to the synthetic triterpenoid CDDO-Imidazolid. *Cancer Lett* 2009;282(2):214-28.
180. He X, Wang Y, Hu H, Zhang Z. In vitro and in vivo antimammary tumor activities and mechanisms of the apple total triterpenoids. *J Agric Food Chem* 2012;60(37):9430-6.
181. Yoo KH, Park JH, Cui EJ, Kim KI, Kim JY, Kim J, Hong SG, Baek NI, Chung IS. 3-O-acetyloleanolic acid induces apoptosis in human colon carcinoma HCT-116 cells. *Phytother Res* 2012;26(10):1541-6.
182. Zou W, Liu X, Yue P, Zhou Z, Sporn MB, Lotan R, Khuri FR, Sun SY. c-Jun NH2-Terminal Kinase-Mediated Up-regulation of Death Receptor 5 Contributes to Induction of Apoptosis by the Novel Synthetic Triterpenoid Methyl-2-Cyano-3,12-Dioxooleana-1, 9-Dien-28-Oate in Human Lung Cancer Cells. *Cancer Res* 2004;64(20):7570-8.
183. Fulda S, Friesen C, Los M, Scaffidi C, Mier W, Benedict M, Nuñez G, Krammer PH, Peter ME, Debatin KM. Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 1997;57(21):4956-64.

184. Eichenmüller M, Hemmerlein B, von Schweinitz D, Kappler R. Betulinic acid induces apoptosis and inhibits hedgehog signalling in rhabdomyosarcoma. *Br J Cancer* 2010;103(1):43-51.
185. Samudio I, Konopleva M, Pelicano H, Huang P, Frolova O, Bornmann W, Ying Y, Evans R, Contractor R, Andreeff M. A novel mechanism of action of methyl-2-cyano-3,12 dioxoolean-1,9 diene-28-oate: direct permeabilization of the inner mitochondrial membrane to inhibit electron transport and induce apoptosis. *Mol Pharmacol* 2006;69(4):1182-93.
186. Fulda S, Scaffidi C, Susin SA, Krammer PH, Kroemer G, Peter ME, Debatin KM. Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid. *J Biol Chem* 1998;273(51):33942-8.
187. Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, Gazdar A, Blenis J, Arnott D, Ashkenazi A. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem* 2001;276(49):46639-46.
188. Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(24):13884-8.
189. Lee HJ, Pyo JO, Oh Y, Kim HJ, Hong SH, Jeon YJ, Kim H, Cho DH, Woo HN, Song S, Nam JH, Kim HJ, Kim KS, Jung YK. AK2 activates a novel apoptotic pathway through formation of a complex with FADD and caspase-10. *Nat Cell Biol* 2007;9(11):1303-10.
190. Park SJ, Wu CH, Gordon JD, Zhong X, Emami A, Safa AR. Taxol induces caspase-10-dependent apoptosis. *J Biol Chem* 2004;279(49):51057-67.
191. Filomenko R, Prevotat L, Rebe C, Cortier M, Jeannin JF, Solary E, Bettaieb A. Caspase-10 involvement in cytotoxic drug-induced apoptosis of tumor cells. *Oncogene* 2006;25(58):7635-45.
192. Kang N, Cao SJ, Zhou Y, He H, Tashiro S, Onodera S, Qiu F, Ikejima T. Inhibition of caspase-9 by oridonin, a diterpenoid isolated from *Rabdosia rubescens*, augments apoptosis in human laryngeal cancer cells. *Int J Oncol* 2015;47(6):2045-56.
193. Jeong HS, Choi HY, Lee ER, Kim JH, Jeon K, Lee HJ, Cho SG. Involvement of caspase-9 in autophagy-mediated cell survival pathway. *Biochim Biophys Acta* 2011;1813(1):80-90.

194. Gyrd-Hansen M, Farkas T, Fehrenbacher N, Bastholm L, Høyer-Hansen M, Elling F, Wallach D, Flavell R, Kroemer G, Nylandsted J, Jäättelä M. Apoptosome-independent activation of the lysosomal cell death pathway by caspase-9. *Mol Cell Biol* 2006;26(21):7880-91.
195. McDonnell MA, Wang D, Khan SM, Vander Heiden MG, Kelekar A. Caspase-9 is activated in a cytochrome c-independent manner early during TNF α -induced apoptosis in murine cells. *Cell Death Differ* 2003;10(9):1005-15.
196. Fischer U, Stroh C, Schulze-Osthoff K. Unique and overlapping substrate specificities of caspase-8 and caspase-10. *Oncogene* 2006;25(1):152-9.
197. Cullen SP, Martin SJ. Caspase activation pathways: some recent progress. *Cell Death Differ* 2009;16(7):935-8.
198. Fulda S. Molecular targeted therapies for rhabdomyosarcoma: focus on hedgehog and apoptosis signaling. *Klin Padiatr* 2013;225(3):115-9.
199. Gao X, Liu Y, Deeb D, Liu P, Liu A, Arbab AS, Gautam SC. ROS mediate proapoptotic and antisurvival activity of oleanane triterpenoid CDDO-Me in ovarian cancer cells. *Anticancer Res* 2013;33(1):215-21.
200. Shishodia S, Sethi G, Konopleva M, Andreeff M, Aggarwal BB. A synthetic triterpenoid, CDDO-Me, inhibits I κ B α kinase and enhances apoptosis induced by TNF and chemotherapeutic agents through down-regulation of expression of nuclear factor kappaB-regulated gene products in human leukemic cells. *Clin Cancer Res* 2006;12(6):1828-38.
201. Liby KT, Yore MM, Sporn MB. Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7(5):357-69.
202. Ryu K, Susa M, Choy E, Yang C, Hornicek FJ, Mankin HJ, Duan Z. Oleanane triterpenoid CDDO-Me induces apoptosis in multidrug resistant osteosarcoma cells through inhibition of Stat3 pathway. *BMC Cancer* 2010;10:187.
203. Fulda S. Cell death pathways as therapeutic targets in rhabdomyosarcoma. *Sarcoma* 2012;2012:326210.
204. Thomas LW, Lam C, Edwards SW. Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett* 2010;584(14):2981-9.
205. Lavastre V, Pelletier M, Saller R, Hostanska K, Girard D. Mechanisms involved in spontaneous and Viscum album agglutinin-I-induced human neutrophil apoptosis: Viscum album agglutinin-I accelerates the loss of antiapoptotic Mcl-1 expression and the degradation of cytoskeletal paxillin and vimentin proteins via caspases. *J Immunol* 2002;168(3):1419-27.

206. Baou M, Kohlhaas SL, Butterworth M, Vogler M, Dinsdale D, Walewska R, Majid A, Eldering E, Dyer MJ, Cohen GM. Role of NOXA and its ubiquitination in proteasome inhibitor-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica* 2010;95(9):1510-8.
207. Marshall AD, van der Ent MA, Grosveld GC. PAX3-FOXO1 and FGFR4 in alveolar rhabdomyosarcoma. *Mol Carcinog* 2012;51(10):807-15.
208. Dengler MA, Weilbacher A, Gutekunst M, Staiger AM, Vöhringer MC, Horn H, Ott G, Aulitzky WE, van der Kuip H. Discrepant NOXA (PMAIP1) transcript and NOXA protein levels: a potential Achilles' heel in mantle cell lymphoma. *Cell Death Dis* 2014;5:e1013.
209. Fangusaro JR, Caldas H, Jiang Y, Altura RA. Survivin: an inhibitor of apoptosis in pediatric cancer. *Pediatr Blood Cancer* 2006;47(1):4-13.
210. Caldas H, Holloway MP, Hall BM, Qualman SJ, Altura RA. Survivin-directed RNA interference cocktail is a potent suppressor of tumour growth in vivo. *J Med Genet* 2006;43(2):119-28.
211. Duan Z, Ames RY, Ryan M, Hornicek FJ, Mankin H, Seiden MV. CDDO-Me, a synthetic triterpenoid, inhibits expression of IL-6 and Stat3 phosphorylation in multi-drug resistant ovarian cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009;63(4):681-9.
212. Shyu MH, Kao TC, Yen GC. Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in HuH7 human hepatocellular carcinoma cells through a mitochondrial-dependent pathway and downregulation of XIAP. *J Agric Food Chem* 2010;58(10):6110-8.
213. Kumagai A, Dunphy WG. Claspin, a novel protein required for the activation of Chk1 during a DNA replication checkpoint response in *Xenopus* egg extracts. *Mol Cell* 2000;6(4):839-49.
214. Chini CC, Chen J. Human claspin is required for replication checkpoint control. *J Biol Chem* 2003;278(32):30057-62.
215. Azenha D, Lopes MC, Martins TC. Claspin functions in cell homeostasis-A link to cancer? *DNA Repair (Amst)* 2017;59:27-33.
216. Merlino G, Helman LJ. Rhabdomyosarcoma--working out the pathways. *Oncogene* 1999;18(38):5340-8.
217. Ohnstad HO, Paulsen EB, Noordhuis P, Berg M, Lothe RA, Vassilev LT, Myklebost O. MDM2 antagonist Nutlin-3a potentiates antitumour activity of cytotoxic drugs in sarcoma cell lines. *BMC Cancer* 2011;11(1):211.

118. Hostanska K, Vuong V, Rocha S, Soengas MS, Glanzmann C, Saller R, Bodis S, Pruschy M. Recombinant mistletoe lectin induces p53-independent apoptosis in tumour cells and cooperates with ionising radiation. *Br J Cancer* 2003;88(11):1785-92.
219. Kim KB, Lotan R, Yue P, Sporn MB, Suh N, Gribble GW, Honda T, Wu GS, Hong WK, Sun SY. Identification of a novel synthetic triterpenoid, methyl-2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oate, that potently induces caspase-mediated apoptosis in human lung cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2002;1(3):177-84.
220. Hinson AR, Jones R, Crose LE, Belyea BC, Barr FG, Linardic CM. Human rhabdomyosarcoma cell lines for rhabdomyosarcoma research: utility and pitfalls. *Front Oncol* 2013;3:183.
221. Ridzewski R, Rettberg D, Dittmann K, Cuvelier N, Fulda S, Hahn H. Hedgehog Inhibitors in Rhabdomyosarcoma: A Comparison of Four Compounds and Responsiveness of Four Cell Lines. *Front Oncol* 2015;5:130.
222. Rodeberg DA, Erskine C, Celis E. In vitro induction of immune responses to shared tumor-associated antigens in rhabdomyosarcoma. *J Pediatr Surg* 2007;42(8):1396-402.
223. Guenther MK, Graab U, Fulda S. Synthetic lethal interaction between PI3K/Akt/mTOR and Ras/MEK/ERK pathway inhibition in rhabdomyosarcoma. *Cancer Lett* 2013;337(2):200-9.
224. Heinicke U, Fulda S. Chemosensitization of rhabdomyosarcoma cells by the histone deacetylase inhibitor SAHA. *Cancer Lett* 2014;351(1):50-8.
225. Barlow JW, Wiley JC, Mous M, Narendran A, Gee MF, Goldberg M, Sexsmith E, Malkin D. Differentiation of rhabdomyosarcoma cell lines using retinoic acid. *Pediatr Blood Cancer* 2006;47(6):773-84.
226. Muller CR, Paulsen EB, Noordhuis P, Pedeutour F, Saeter G, Myklebost O. Potential for treatment of liposarcomas with the MDM2 antagonist Nutlin-3A. *Int J Cancer* 2007;121(1):199-205.
227. Preuss E, Hugle M, Reimann R, Schlecht M, Fulda S. Pan-mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor AZD8055 primes rhabdomyosarcoma cells for ABT-737-induced apoptosis by down-regulating Mcl-1 protein. *J Biol Chem* 2013;288(49):35287-96.
228. Wachtel M, Rakic J, Okoniewski M, Bode P, Niggli F, Schäfer BW. FGFR4 signaling couples to Bim and not Bmf to discriminate subsets of alveolar rhabdomyosarcoma cells. *Int J Cancer* 2014;135(7):1543-52.

229. Wei J, Liu H, Liu M, Wu N, Zhao J, Xiao L, Han L, Chu E, Lin X. Oleanolic acid potentiates the antitumor activity of 5-fluorouracil in pancreatic cancer cells. *Oncol Rep* 2012;28(4):1339-45.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Relative Häufigkeiten der Diagnosehauptgruppen von 2009-2015 (modifiziert nach Kaatsch <i>et al.</i> , 2016)	13
Abbildung 2 Prinzip der Auswertung einer FACS-Analyse	39
Abbildung 3 Untersuchung der Zellproliferation nach Inkubation mit Mistelextrakten ..	47
Abbildung 4 Repräsentative Ergebnisse der Annexin/PI-Färbung im <i>Dot Plot</i>	49
Abbildung 5 Messung der Apoptoseinduktion durch Mistelextrakte in den Zelllinien TE 671 und RH-30	50
Abbildung 6 Untersuchung der Apoptoseinduktion nach Inkubation mit Mistelextrakten in den RMS-13 Zellen	51
Abbildung 7 Messung der Nekroseinduktion durch Mistelextrakte mittels LDH-Assay	52
Abbildung 8 Repräsentative Ergebnisse der JC-1-Färbung im <i>Dot Plot</i>	54
Abbildung 9 Messung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) nach Inkubation mit Mistelextrakten	55
Abbildung 10 Repräsentative Daten der Messung der aktiven Caspase-3 (CASP3) im <i>Dot Plot</i>	57
Abbildung 11 Messung der aktiven Caspase-3 (CASP3), Caspase-8 (CASP8) und Caspase-9 (CASP9)	59
Abbildung 12 Untersuchung des Einflusses von Caspaseinhibitoren auf die viscum- und viscumTT-induzierte Apoptose	61
Abbildung 13 Analyse des <i>Apoptosis Arrays</i>	63
Abbildung 14 Expression und Spaltung von PARP1 nach Behandlung mit Mistelextrakten	64
Abbildung 15 Expression antiapoptotischer Proteine nach Behandlung mit Mistelextrakten	65
Abbildung 16 Expression von TP53 nach Behandlung mit Mistelextrakten	66
Abbildung 17 Expression von PMAIP1 nach Behandlung mit Mistelextrakten	67
Abbildung 18 Modell der Apoptosesignaltransduktion durch viscumTT	73

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Risikostratifizierung und risikoadaptierte Therapie des Rhabdomyosarkoms modifiziert nach den Therapieempfehlungen der CWS	17
Tabelle 2 Primärantikörper der Western-Blot Analyse	32
Tabelle 3 Sekundärantikörper der Western-Blot Analyse	32
Tabelle 4 Zusammensetzung der Mistelextrakte	33
Tabelle 5 Kultivierung der Zelllinien	35
Tabelle 6 Wirkstoffkonzentrationen der Caspaseinhibitoren	41

10 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11 Publikationsliste

Publikation:

Rahel Mascha Stammer, Susann Kleinsimon, Jana Rolff, Sebastian Jäger, Angelika Eggert, Georg Seifert, Catharina I. Delebinski, Synergistic antitumour properties of *viscumTT* in alveolar rhabdomyosarcoma, Journal of Immunology Research, vol. 2017, Article ID 4874280, 13 pages, 2017. doi:10.1155/2017/4874280.

12 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Rahel Mascha Stammer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung der Apoptoseinduktion im Rhabdomyosarkommodell: Analyse eines triterpenhaltigen *Viscum album* Gesamtextraktes“, selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

13 Anteilerklärung

Rahel Mascha Stammer hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Rahel Mascha Stammer, Susann Kleinsimon, Jana Rolff, Sebastian Jäger, Angelika Eggert, Georg Seifert, Catharina I. Delebinski, Synergistic antitumour properties of *viscumTT* in alveolar rhabdomyosarcoma, Journal of Immunology Research, vol. 2017, Article ID 4874280, 13 pages, 2017. doi:10.1155/2017/4874280.

Beitrag im Einzelnen:

Durchführung der *in vitro* Experimente und der *ex vivo* Versuche von Patient Nr. 1, Auswertung und Interpretation der *in vitro* und aller *ex vivo* Daten, Teilhabe an der Auswertung der *in vivo* Daten, erstellen der gesamten Diagramme, des Schaubildes und der Western-Blot-Abbildung, Erstellung des Manuskripts, Einarbeitung der Anmerkungen der Koautoren, Einreichung des Manuskripts online und Überarbeitung im *peer review* System, Einarbeitung der Kommentare der Gutachter und Koautoren.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

14 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei allen recht herzlich bedanken, die mich in meinem Promotionsvorhaben unterstützt haben und mir geholfen haben dies zu verwirklichen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Georg Seifert für die Vergabe des spannenden Promotionsthemas und für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können. Auch für seine Ermunterung, eine experimentelle Arbeit zu wagen und sein Vertrauen in mich muss ich ihm herzlich danken.

Dr. rer. nat. Catharina Delebinski danke ich für die gute Betreuung meiner Arbeit. Ihre wertvollen Anregungen und Ratschläge waren eine große Unterstützung und richtungsweisend. Mein besonderer Dank gilt zudem Susann Kleinsimon, die mich geduldig in die experimentelle Forschung eingearbeitet hat und mir jederzeit bei Problemen zur Seite stand. Auch für die mühevollen Arbeit des Redigierens möchte ich mich bei den beiden herzlich bedanken.

Mein größter Dank gilt meiner wundervollen Familie, meinen Freunden und meinem Freund für ihre unermüdliche Unterstützung und ihre Liebe.