



FACT SHEET

Viscumin

1. Allgemeines

Das Protein Viscumin (auch Mistellektin 1 oder ML-I) kommt in allen Pflanzenteilen der halbschmarotzenden und immergrünen weissbeerigen Mistel (*Viscum album*) vor (Abb. 1) [1]–[4]. Die zur Familie der Lorantaceae (Mistelgewächse) gehörende Pflanze kann einen Durchmesser von bis zu 1 m erreichen und kommt auf Laub- und Nadelbäumen in Mittel- und Südeuropa, sowie in Teilen Afrikas, Asiens und Japans vor [2], [3], [5]. Viscumin gehört zu den Typ 2 Ribosomen-inaktivierenden Proteinen (RIP-II), welche in Zellen die Proteinsynthese verhindern und somit zum Zelltod führen [6]. Zwei zusätzliche Lektine sowie Viscotoxine (Polypeptide) sind weitere cytotoxische Bestandteile der weissbeerigen Mistel.



Abb. 1: Weissbeerige Mistel (*Viscum album*): Weisse Scheinbeeren mit Blüten (l.), kugeligem Mistelbüschel (m.), Bewuchs auf Wirtspflanze (r.) (Bilderverzeichnis: [1], [2]).

2. Chemische Struktur und Eigenschaften

Das Mistellektin 1 (Viscumin) ist der grösste Lektinbestandteil der weissbeerigen Mistel. Für RIP-II Toxine typisch, besteht das Protein aus zwei glykolisierten Polypeptidketten, einer A- und B-Kette, die mit einer Disulfidbrücke verbunden sind (Abb. 2) [7]–[9]. Die grössere B-Kette ist ein Lektin und bindet spezifisch an galaktosehaltige Zellstrukturen, womit sie der A-Kette zur Aufnahme in die eukaryotische Zelle verhilft. Die kleinere Untereinheit gelangt so in das Cytosol, wo sie mithilfe ihrer Glykosidase-Funktion Adenin katalytisch von der 28S ribosomalen RNA abspaltet. Die Proteinsynthese wird irreversibel gestoppt, was unweigerlich zum Zelltod führt [7]–[9]. Der Lektin Gehalt der Pflanze weist Werte von 0.05 – 0.2 % auf, wobei Laubholzmisteln generell einen grösseren Lektin Gehalt haben als Nadelholzmisteln [1].

Die in *Viscum album* enthaltenen Lektine können in drei Hauptgruppen, bestehend aus zahlreichen Isoformen, eingeteilt werden [1], [4]:

- Viscumin, ML-I (63 kDa):
 - Die A-Kette weist 254 Aminosäuren auf und hat ein molekulares Gewicht von 29 kDa
 - Die B-Kette besitzt ein molekulares Gewicht von 34 kDa und enthält 264 Aminosäuren mit 7 Cysteinresten und drei am N angeknüpften Kohlenhydratresten;
 - Das Protein bindet vorzugsweise an D-Galaktosereste
- ML-II (60 kDa):
 - Die A-Kette hat ein molekulares Gewicht von 32 kDa, die B-Kette 27 kDa
 - Protein bindet an D-Galaktose- oder N-Acetyl-D-galaktosaminreste
- ML-III (50 kDa):
 - Die A-Kette weist 254 Aminosäuren auf und hat ein molekulares Gewicht von 30 kDa
 - Die B-Kette besitzt ein molekulares Gewicht von 25 kDa und enthält 262 Aminosäurereste mit 10 Cysteinresten und 2 Kohlenhydratketten
 - Das Protein bindet an N-Acetyl-D-galaktosaminreste

Zu den toxischen Inhaltstoffen von *Viscum album* gehören auch chitinbindende Mistellektine (cbML I, II, III) und Viscotoxine, wobei chitinbindende Mistellektine kaum toxisch sind aber die Aktivität der anderen Mistellektine beeinflussen [1]. Viscotoxine sind cytotoxische Polypeptide aus 46 Aminosäuren mit einem molekularen Gewicht von ca. 5 kDa (Abb. 2) [1], [3], [10].

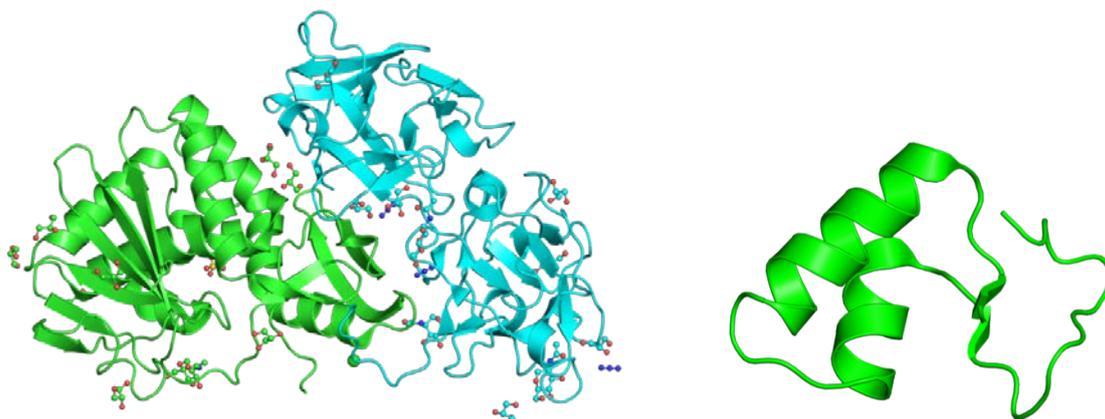


Abb. 2: Proteinstruktur von *Viscum album* Lektin 1 (Viscumin) (l.) und Viscotoxin A2 (r.)
(Bilderverzeichnis: [3], [4])

3. Anwendung

Das Mistelextrakt findet Anwendung in der Krebsbehandlung, wobei den Mistellektinen bei subtoxischen Konzentrationen *in vitro* sowie *in vivo* immunoaktivierende Effekte zugeschrieben werden [4], [5], [11]. Obwohl mehrere Studien signifikant höhere Lebenserwartungen bei Krebspatienten belegt haben [12]–[14], ist die Wirksamkeit von Mistelextrakten noch immer umstritten [15].

Auch das durch *E. coli* produzierte rekombinante rViscumin, welches spezifisch an sialylierte Gangliosiden der menschlichen Granulozyten bindet, wurde an Krebspatienten angewandt [16]. rViscumin stimulierte zwar die Immunabwehr der Patienten, doch traten bereits ab einer zweimal wöchentlich verabreichten Dosis von 4800 – 6400 ng/kg Lebervergiftungen auf. Infusionen mit geringeren Konzentrationen führten zu Müdigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Fieber und allergischen Reaktionen [16].

Die A-Kette von Viscumin wird zudem, gleich wie die A-Kette von Abrin und Ricin, zur Herstellung von Immunotoxinen gebraucht [4]. Das Immunotoxin, bestehend aus der enzymatisch aktiven Untereinheit von ML-1 (MLA) und dem monoklonalen anti-CD5 Antikörper, weist die gleiche Toxizität auf wie das natürliche ML-I und eine 80-fach grössere Aktivität als das korrespondierende Konjugat mit der Ricin A-Kette (RTA) [17]. CD5 ist dabei ein T-Zell inhibierendes Molekül, welches zur Regulation von Antitumor Immunreaktionen beiträgt [18]. Der Vergleich der strukturellen Eigenschaften von isoliertem MLA und RTA lässt vermuten, dass die MLA-Antikörper Konjugate potentiell für den therapeutischen Gebrauch geeignet wären [17].

4. Toxizität

Die Zusammensetzung der toxischen Bestandteile und somit die toxische Intensität der Mistel hängt von der Wirtspflanze ab [2], [3]. Die durch Mistellektine, Mistelpolysaccharide und möglicherweise auch durch Viscotoxine ausgelösten immunstimulierenden und hypotonischen Wirkungen führen dazu, dass lediglich der Verzehr von grossen Mengen des Mistelextraktes örtlich reizende und nekrotisierende Effekte hervorrufen können [1], [2]. Bei parenteraler Applikation des Mistelextraktes konnten Giftwirkungen wie Schüttelfrost, hohes Fieber, Kopfschmerzen, Kreislaufprobleme und Atemnot beobachtet werden [5].

Das Mistellektin 1 (Viscumin) macht den Hauptbestandteil der Toxizität des Mistelextrakt aus [8], doch sind toxische Wirkungen des isolierten Proteins der Literatur nicht zu entnehmen.

Für Viscumin und ML-II wurden folgende LD₅₀-Werte in Mäusen gefunden [5]:

- Viscumin: - LD₅₀ Maus (intravenös): **28.6 µg/kg**
- LD₅₀ Maus (intraperitoneal): **33 µg/kg**
- ML-II: - LD₅₀ Maus (intravenös): **46.7 µg/kg**

5. Analytik

5.1 Immunologischer Nachweis mittels Mikrochip

Rubina et al. (2005) identifizierten die Proteine mithilfe eines Sandwich-Immunoassays auf Mikrochip-Basis [19]. Die Nachweisgrenze lag bei 0.08 – 5.0 ng/ml [19]. Das Patent ist öffentlich einsehbar, die erwähnten Antikörper jedoch nicht kommerziell erhältlich [20].

5.2 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

ELISA wurde bereits mithilfe von mehreren verschiedenen Antikörpern zum Nachweis von natürlichem und rekombinantem Viscumin eingesetzt [21], [22]. Die monoklonalen anti-rViscumin Antikörper 2G8-F7 und 1C5-H8 sind öffentlich erhältlich.

5.3 Massenspektrometrie:

Die Galaktoseaffinität von RIP-II Toxinen ermöglicht dessen Aufreinigung mithilfe einer Kapillar-Gelelektrophorese [23]. Fredriksson et al. (2015) zeigten auf, dass der anschliessende qualitative und quantitative Nachweis der verschiedenen Lektine via LC-MS Massenspektrometrie

rometrie erreicht werden kann und führten dies an Ricin durch [23]. Da die Aminosäuresequenzen von Viscumin bekannt sind [24], bietet dies eine ebenfalls geeignete Nachweismethode für Viscumin.

Im Labor Spiez ist keines der Verfahren etabliert.

Literaturverzeichnis:

- [1] E. Teuscher und U. Lindequist, *Biogene Gifte: Biologie - Chemie ; Pharmakologie - Toxikologie ; mit 2500 Strukturformeln und 62 Tabellen*. Wiss. Verlag-Ges., 2010.
- [2] D. Frohne und H. J. Pfänder, *Giftpflanzen: ein Handbuch für Apotheker, Ärzte, Toxikologen und Biologen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1983.
- [3] L. Roth, M. Daunderer, und K. Kormann, *Giftpflanzen, Pflanzengifte: Vorkommen, Wirkung, Therapie*. Ecomed-Verlag-Ges., 1984.
- [4] E. J. M. V. Damme, W. J. Peumans, A. Pusztai, und S. Bardocz, *Handbook of Plant Lectins: Properties and Biomedical Applications*. John Wiley & Sons, 1998.
- [5] „Viscum“, *Hager-Archiv*. 17-Aug-2016.
- [6] K. Eiklid, S. Olsnes, und A. Pihl, „Entry of lethal doses of abrin, ricin and modeccin into the cytosol of HeLa cells“, *Experimental Cell Research*, Bd. 126, Nr. 2, S. 321–326, Apr. 1980.
- [7] S. Olsnes, „The history of ricin, abrin and related toxins“, *Toxicon*, Bd. 44, Nr. 4, S. 361–370, Sep. 2004.
- [8] S. Olsnes, F. Stirpe, K. Sandvig, und A. Pihl, „Isolation and characterization of viscum, a toxic lectin from *Viscum album* L. (mistletoe).“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 257, Nr. 22, S. 13263–13270, Nov. 1982.
- [9] Y. Endo, K. Mitsui, M. Motizuki, und K. Tsurugi, „The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins.“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 262, Nr. 12, S. 5908–5912, Apr. 1987.
- [10] J. KONOPA, J. M. WOYNAROWSKI, und M. LEWANDOWSKA-GUMIENIAK, „Isolation of Viscotoxins. Cytotoxic Basic Polypeptides from *Viscum album* L.“, *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, Bd. 361, Nr. 2, S. 1525–1534, 2009.
- [11] G. Ribéreau-Gayon, S. Dumont, C. Muller, M.-L. Jung, P. Poindron, und R. Anton, „Mistletoe lectins I, II and III induce the production of cytokines by cultured human monocytes“, *Cancer Letters*, Bd. 109, Nr. 1, S. 33–38, Dez. 1996.
- [12] N. E. Gardin, „Immunological response to mistletoe (*Viscum album* L.) in cancer patients: a four-case series“, *Phytother. Res.*, Bd. 23, Nr. 3, S. 407–411, März 2009.
- [13] G. S. Kienle und H. Kiene, „Complementary Cancer Therapy: A Systematic Review of Prospective Clinical Trials on Anthroposophic Mistletoe Extracts“, *European Journal of Medical Research*, Bd. 12, Nr. 3, S. 103, 2007.
- [14] J. Kleijnen und P. Knipschild, „Mistletoe treatment for cancer review of controlled trials in humans“, *Phytomedicine*, Bd. 1, Nr. 3, S. 255–260, Dez. 1994.
- [15] E. Ernst, K. Schmidt, und M. K. Steuer-Vogt, „Mistletoe for cancer?“, *Int. J. Cancer*, Bd. 107, Nr. 2, S. 262–267, Nov. 2003.

- [16] P. Schöffski, S. Riggert, P. Fumoleau, M. Campone, O. Bolte, S. Marreaud, D. Lacombe, B. Baron, M. Herold, H. Zwierzina, K. Wilhelm-Ogunbiyi, H. Lentzen, und C. Twelves, „Phase I trial of intravenous aviscumine (rViscumin) in patients with solid tumors: a study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer New Drug Development Group“, *Ann Oncol*, Bd. 15, Nr. 12, S. 1816–1824, Jan. 2004.
- [17] A. G. Tonevitsky, A. Y. Toptygin, U. Pfuller, T. L. Bushueva, G. V. Ershova, M. Gelbin, K. Pfuller, I. I. Agapov, und H. Franz, „Immunotoxin with mistletoe lectin I A-chain and ricin A-chain directed against CD5 antigen of human T-lymphocytes; Comparison of efficiency and specificity“, *International Journal of Immunopharmacology*, Bd. 13, Nr. 7, S. 1037–1041, Jan. 1991.
- [18] M. Tabbekh, M. Mokrani-Hammani, G. Bismuth, und F. Mami-Chouaib, „T-cell modulatory properties of CD5 and its role in antitumor immune responses“, *Oncoimmunology*, Bd. 2, Nr. 1, Jan. 2013.
- [19] A. Y. Rubina, V. I. Dyukova, E. I. Dementieva, A. A. Stomakhin, V. A. Nesmeyanov, E. V. Grishin, und A. S. Zasedatelev, „Quantitative immunoassay of biotoxins on hydrogel-based protein microchips“, *Analytical Biochemistry*, Bd. 340, Nr. 2, S. 317–329, Mai 2005.
- [20] E. Dementieva, V. Djukova, A. Zasedatelev, A. Rubina, A. Stomakhin, V. Nesmeyanov, E. Grishin, D. E. I, D. V. I, Z. A. S, R. A. J, S. A. A, N. V. A, und G. E. V, *Method for quantitative detection of biological toxins*. 2004.
- [21] J. Eck, M. Langer, B. Möckel, K. Witthohn, H. Zinke, und H. Lentzen, „Characterization of recombinant and plant-derived mistletoe lectin and their B-chains“, *European Journal of Biochemistry*, Bd. 265, Nr. 2, S. 788–797, Okt. 1999.
- [22] J. Müthing, M. Burg, B. Möckel, M. Langer, W. Metelmann-Strupat, A. Werner, U. Neumann, J. Peter-Katalinic, und J. Eck, „Preferential binding of the anticancer drug rViscumin (recombinant mistletoe lectin) to terminally α 2-6-sialylated neolacto-series gangliosides“, *Glycobiology*, Bd. 12, Nr. 8, S. 485–497, Jan. 2002.
- [23] S. A. Fredriksson, E. Artursson, T. Bergstrom, A. Ostin, C. Nilsson, und C. Astot, „Identification of RIP-II toxins by affinity enrichment, enzymatic digestion and LC-MS“, *Anal Chem*, Bd. 87, Nr. 2, S. 967–74, Jan. 2015.
- [24] „Beta-galactoside-specific lectin 1 precursor - *Viscum album* (European mistletoe)“, *UniProt*. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.uniprot.org/uniprot/P81446>. [Zugegriffen: 11-Aug-2016].

Bilderverzeichnis:

- [1] http://www.awl.ch/heilpflanzen/viscum_album/mistel.htm
- [2] <http://www.fotocommunity.de/photo/weissbeerige-mistel-b-walker/23707371>
- [3] <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/2rg9/>
- [4] <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/1jmn/analysis>