

Struktur-Funktions-Analyse des Proteinkomplexes
Mistellektin-I aus *Viscum album*

Zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Ruth Krauspenhaar
aus Frankfurt am Main

Hamburg 2001

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ML-I	Mistellektin-I
RIP	ribosomeninaktivierendes Protein
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
HIV	humanes immundeficiency virus
Gal	Galactose
NAG	N-acetyl-Glucosamin
FUC	Fucose
GOL	Glycerol
Ca ²⁺	Calcium 2+
Mn ²⁺	Mangan 2+
Cl ⁻	Chlorid
SO ₄ ²⁻	Sulfat
r.m.s.	root mean square
B-Faktor	Temperaturfaktor
3D	dreidimensional

EcolL	<i>Erythrina corallodendron</i> Lektin
PAP	Pokeweed antiviral Protein
MOM	α-Momorcardin
TRI	Trichosanthin
ABA	Abrin-a A-Kette
RTA	Ricin A-Kette
MLA	Mistellektin-I A-Kette
GS4	<i>Griffonia simplicifolia</i> Lektin

Einheiten

Da	Dalton
Å	Angström
µl	mikro Liter
ml	milli Liter
mM	milli Molar

Symbole für Aminosäuren

G	Gly	Glycin	R	Arg	Arginin
A	Ala	Alanin	S	Ser	Serin
V	Val	Valin	T	Thr	Threonin
F	Phe	Phenylalanin	Y	Tyr	Tyrosin
P	Pro	Prolin	H	His	Histidin
M	Met	Methionin	C	Cys	Cystein
I	Ile	Isoleucin	N	Asn	Asparagin
L	Leu	Leucin	Q	Gln	Glutamin
D	Asp	Asparaginsäure	W	Trp	Tryptophan
E	Glu	Glutaminsäure	K	Lys	Lysin

Inhaltsverzeichnis

1.	Problemstellung	1
2.	Zusammenfassung	2
3.	Einleitung	3
3.1.	Die Familie der ribosomeninaktivierenden Proteine (RIP)	3
3.2.	Lektine	4
3.3.	Mistellektin I (ML-I) aus <i>Viscum album</i>	7
4.	Material und Methoden	9
4.1.	Reinigung von Mistellektin I	9
4.2.	Kristallisation von Mistellektin I	10
4.3.	Kristallisation von ML-I im Komplex mit Lactose als auch Galactose	11
4.4.	Grundlagen der Röntgenstrukturanalyse	12
4.5.	Datensammlung, Auswertung und Reduktion	14
4.6.	Lösung des Phasenproblems	15
4.7.	Verfeinerung von Proteinstrukturen	16
5.	Ergebnisse	18
5.1.	Die Struktur des nativen Mistellektin-I	18
5.1.1.	Datensammlung und Reduktion	18
5.1.2.	Strukturlösung, Verfeinerung und Güte des Modells	19
5.1.3.	Temperaturfaktoren	22
5.1.4.	Primärsequenzen von Mistellektin-I und dessen Isoformen	25
5.1.5.	Die global räumliche Struktur von Mistellektin-I	27
5.1.6.	Die Architektur des aktiven Zentrums	31
5.1.7.	Isoformen von Mistellektin-I	33
5.1.8.	Die Wechselwirkungen an der Grenzfläche zwischen A- und B-Kette von Mistellektin-I	33
5.1.9.	Die Glykosylierungsstellen von Mistellektin-I	35
5.2.1.	Die Struktur von Mistellektin-I im Komplex mit Lactose	38
5.2.1.1.	Datensammlung und Reduktion	38

5.2.1.2.	Verfeinerung und Güte des Modells	38
5.2.1.3.	Temperaturfaktoren	41
5.2.2.	Die Struktur von Mistellektin-I im Komplex mit Galactose	44
5.2.2.1.	Datensammlung und Reduktion	44
5.2.2.2.	Verfeinerung und Güte des Modells	44
5.2.2.3.	Temperaturfaktoren	47
5.2.3.	Die Architektur der Zuckerbindungsstelle I im Komplex mit Lactose bzw. Galactose	50
5.2.4.	Die Architektur der Zuckerbindungsstelle II im Komplex mit Lactose bzw. Galactose	54
5.2.5.	Die Architektur der potentiellen dritten Galactosebindungsstelle in Subdomäne 1 β	60
5.2.6.	Vergleich der Galactosebindungsstelle I zwischen nativer und Lactose - bzw. Galactose- komplexierter ML-I Struktur	62
5.2.7.	Vergleich der Zuckerbindungsstellen	62
5.2.8.	Der hydrophobe Kern von Subdomäne I und II der B-Kette	64
5.3.	Datensammlung und Reduktion von nativem Mistellektin-I aus <i>Viscum album</i> gewachsen auf <i>Pyrus pashia</i>	66
6.	Diskussion	65
6.1.1.	Die Faltung von Mistellektin I im Vergleich zu Ricin	67
6.1.2.	Vergleich der Lage der Glykosylierungsstellen in Mistellektin-I und Ricin	70
6.2.1.	Die Faltung von Mistellektin-I im Vergleich zu Abrin-a	70
6.2.2.	Vergleich der Lage der Glykosylierungsstellen in Mistellektin-I und Abrin-a	73
6.3.1.	Vergleich der Wechselwirkungen an der Grenzfläche zwischen A- und B-Kette von ML-I und Ricin	74
6.3.2.	Vergleich der Wechselwirkungen an der Grenzfläche zwischen A- und B-Kette von ML-I und Abrin-a	75
6.4.	Vergleich des aktiven Zentrums zwischen ML-I, Ricin und Abrin-a	78
	Die Architektur der Zuckerbindungsstelle I in Ricin	86
6.5.2.	Die Architektur der Zuckerbindungsstelle II in Ricin	88

6.6.	Vergleich der Galactosebindungsstelle I von ML-I, Ricin, Abrin-a mit der Galactosebindungsstelle von <i>Erythrina corallodendron</i> Lektin, Erdnußlektin und der dritten potentiellen Galactosebindungsstelle von ML-I	91
6.7.	Ausblick	97
7.	Literaturverzeichnis	98
8.	Danksagung	103

1. Problemstellung

An Zelloberflächen finden sich exponierte Oligosaccharidketten als Teil von Glykolipiden und Glykoproteinen. Gegenstand zahlreicher Untersuchungen war und ist die Aufklärung der Struktur und Funktion dieser Zuckermoleküle. Kohlehydratketten sind in ihrer Anordnung und Verzweigung außerordentlich vielfältig. Der glykosidischen Modifikation von Proteinen und Lipiden wird eine wichtige Funktion bei der Speicherung als auch der Vermittlung von biologischer Information zugeordnet. Aufgrund der Vielfalt und auch durch ihre exponierte Position auf Zelloberflächen übernehmen diese Strukturen besondere Aufgaben bei der Zellerkennung. Lektine sind Proteine, die spezifisch Kohlehydrate und deren Konformation erkennen und damit Proteine oder auch Zelltypen unterscheiden können. Diese Lektine sind in ihrer Funktion so spezifisch, daß sie sogar Konformere der eher hochflexiblen Oligosaccharide unterscheiden können.

Kohlehydrat-Lektin-Wechselwirkungen kontrollieren viele biologische Prozesse, wie z.B. das Wachstum und die Differenzierung von Zellen, die Agglutination von Zellen als auch die Zell-Zell-Adhäsion. Bei bestimmten Krankheiten übernehmen Lektin vermittelte Interaktionen z.B. eine Schlüsselfunktion bei der Infektion von Zellen. Aus diesem Grund ist die Entwicklung von Therapeutika, welche auf spezifischen Kohlehydrat-Lektin-Wechselwirkungen basieren und durch ihre spezifische Erkennung gezielt in einen Infektionsprozeß eingreifen können, von entscheidender Bedeutung und heute Gegenstand intensiver Forschung. Hierbei tragen dreidimensionale Strukturanalysen von Lektin-Kohlehydrat-Komplexen erheblich zum Verständnis dieser spezifischen Wechselwirkungen auf molekularer Ebene bei.

2. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die dreidimensionale Struktur des nativen Mistellektin-I (ML-I) aus *Viscum album* und des Mistellektin-I im Komplex mit Galactose und Lactose mit den Methoden der Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt. Mistellektin-I gehört zur Familie der ribosomeninaktivierenden Proteine (RIP), welche eukaryontische Ribosomen durch Abspaltung eines Adenin aus der GAGA-Schleife der 28S rRNA irreversibel schädigen. ML-I besteht aus einer toxischen A-Kette mit N-Glykosidaseaktivität und einer B-Kette, welche spezifisch endständige Galactose erkennt. Anhand von Diffraktionsdaten der nativen ML-I Kristalle wurde ein Modell bis zu einer Auflösung von 2.3 Å erstellt. Ebenfalls bis 2.3 Å Auflösung wurden die Strukturen des ML-I im Komplex mit Galactose und Lactose verfeinert. Durch vergleichende Analyse verschiedener Röntgenstrukturen von RIPs des Typ I und II konnten strukturelle Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede in einem Motiv positiv geladener Aminosäuren an der Oberfläche der A-Kette in der Nähe des aktiven Zentrums bestimmt werden. Diese scheinen an der Interaktion mit der 28S rRNA beteiligt zu sein. Darüber hinaus sind die Wechselwirkungen an der Grenzfläche zwischen den beiden Ketten des Mistellektin-I im Vergleich zu homologen RIPs vom Typ II unterschiedlich gestaltet, was sicherlich das toxische Potential beeinflusst.

Die mit Galactose bzw. mit Lactose komplexierten ML-I Strukturen liefern Informationen über die Zucker-Lektin-Wechselwirkung. Die wesentlichen Wechselwirkungen zwischen Galactose und ML-I werden über die Erkennung der 4' und 3'Hydroxylgruppe des Zuckers sowie ergänzende Stabilisierung durch ein „stacking“ des Zuckerringes mit einer aromatischen Seitenkette des ML-I vermittelt. Weiterhin konnte eine bis dahin nur selten festgestellte Wechselwirkung zwischen der 2'Hydroxylgruppe der Galactose und ML-I erkannt und analysiert werden. Die wesentlich höhere Spezifität von Mistellektin-I zu Galactose im Vergleich zu N-acetyl-Galactosamin kann anhand der vorliegenden Strukturdaten auf molekularer Ebene eindeutig erklärt werden.

3. Einleitung

3.1 Die Familie der ribosomeninaktivierenden Proteine (RIP)

Als ribosomeninaktivierende Proteine (RIP) bezeichnet man RNA N-Glykosidasen, welche Ribosomen irreversibel schädigen, indem sie spezifisch die Deadenylierung des ersten Adenin A₄₃₂₄ der hochkonservierten GAGA-Tetraschleife der 28S rRNA katalysieren [1]. In der Folge können Elongationsfaktoren EF-1 und EF-2 nicht mehr binden und die Proteinbiosynthese der Zielzelle wird inhibiert [2, 3]. Die RIPs werden in zwei Hauptklassen eingeteilt, die Holo-RIPs und die Chimero-RIPs. Die Holo-RIPs, auch als Typ I bezeichnet, bestehen aus einer Kette und verfügen über ein Molekulargewicht von ~30kDa. Die Chimero RIPs, auch Typ II genannt, haben ein Molekulargewicht von ~60 kDa und bestehen aus einer A-Kette mit N-Glykosidase Aktivität und einer B-Kette mit Lektin Funktion, die durch eine Disulphidbrücke miteinander verbunden sind. Eine Untergruppe der Typ I RIPs bilden die nach protolytischer Spaltung der 30 kDa Polypeptidkette vorliegenden zweikettigen Typ I ribosomeninaktivierenden Proteine, die durch nicht-kovalente Interaktionen stabilisiert werden. Darüber hinaus wurde in Gerste (*Hordeum vulgare*) [4] ein RIP vom Typ III identifiziert. Dieses verfügt über ein Molekulargewicht von 60 kDa mit einer Domäne mit N-Glykosidaseaktivität sowie einer Domäne mit bisher unbekannter Funktion. RIP Proteine variieren in ihrem toxischen Potential. So haben RIPs vom Typ II durch ihre sehr effiziente Aufnahme in das Innere der Zielzelle durch Wechselwirkung mit Glykolipiden und Glykoproteinen eine höhere Toxizität als RIPs vom Typ I. Je nach Toxin steht eine verschiedene Zahl und Art von Rezeptoren zur Internalisierung in die Zielzelle zur Verfügung. Dies ist ein Grund für die unterschiedliche toxische Wirkung der RIP Proteine vom Typ II [2]. Die Analyse der Primärstruktur liefert eine hohe Homologie der aminoterminalen und zentralen Sequenzabschnitte jedoch hohe Varianz im carboxyterminalen Bereich, was die Präferenz von Typ I RIPs gegenüber Ribosomen von Bakterien und Viren erklärt. Typ II RIPs hingegen ziehen mammalien Ribosomen vor [5].

RIPs sind aufgrund ihrer Spezifität, den Zelltod in humanen und tierischen Zellen auszulösen, schon lange Gegenstand der pharmazeutischen Forschung. So haben sich ribosomeninaktivierende Proteine vom Typ II als toxischer für Tumorzellen als gegenüber normalen Zellen erwiesen und sind deshalb bei der Entwicklung von Medikamenten zur Tumorbekämpfung von Interesse [7]. Außerdem ist ein weiterer Ansatz der Anwendungen von

RIPs in der Therapie die Kopplung mit geeigneten Transportmolekülen, wie es in Form von Antikörpern mit RIPs als sogenannte Immunotoxine [2] geschehen ist, die in der Therapie von HIV eingesetzt werden.

3.2. Lektine

Die Klasse der pflanzlichen Lektine zeichnet sich dadurch aus, daß sie mindestens eine katalytische Domäne besitzt, die reversibel an spezifische Mono- oder Oligosaccharide bindet [6]. Auf der Basis der Struktur der Lektinuntereinheiten werden vier Haupttypen Merolektine, Hololektine, Chimerolektine und Superlektine unterschieden. Merolektine sind kleine Proteine (z.B. Chitin-bindendes Hevein aus *Hevea brasiliensis* [8]), die nur über eine Zuckerbindungsstelle verfügen. Hololektine, zu denen die meisten aller pflanzlichen Lektine gehören, weisen zwei oder mehrere Zuckerbindungsstellen auf. Diese sind dadurch gekennzeichnet, daß die Untereinheiten identisch oder sehr homolog zueinander sind und sich in ihrer Zuckerspezifität gleichen oder an strukturell sehr ähnliche Zucker binden. Die Gruppe der Chimerolektine umfaßt Fusionsproteine, die von einer zuckerbindenden Untereinheit und einer katalytischen Untereinheit (oder einer anderen biologischen Aktivität) aufgebaut werden, die unabhängig vom Lektin agiert. Die Gruppe der ribosomeinaktivierenden Proteine vom Typ II [2] gehört zur Klasse der Chimerolektine. Eine Untergruppe bilden die Superlektine, die über zwei Zuckerbindungsstellen verfügen, die sich in ihrer Spezifität unterscheiden, wobei bisher nur das Lektin aus der Tulpenzwiebel, *Tulipa*, [9] dieser Gruppe eindeutig zugeordnet werden konnte.

Zum Schutz von wertvollen Speichergewebe und Samen, welche hauptsächlich Ziel von äußeren Angriffen der an ihren Standort gebundenen Pflanzen sind, kommen in diesen Geweben vermehrt Lektine vor [6]. Diese Aufgabe der Abwehr von Fremdorganismen wird durch die Tatsache bestätigt, daß pflanzliche Lektine eine hohe Affinität für Oligosaccharidstrukturen haben, die in der Pflanze selbst nicht vorkommen. Pflanzliche Lektine sind weiterhin durch eine hohe Stabilität über einen großen pH-Bereich, Hitzestabilität und Proteaseresistenz von Tieren und Insekten gekennzeichnet [6].

Die bisher durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärten 3D-Strukturen von pflanzlichen Lektinen sind ausschließlich aus β -Faltblättern aufgebaut [10]. Aus der Familie der Leguminosen sind

zahlreiche Lektinstrukturen analysiert worden [11, 12, 13]. Diese als Dimer oder Tetramer vorkommenden zuckerbindenden Proteine sind durch ein β -Sandwich Motiv gekennzeichnet. Ihre Lektinaktivität ist von der Gegenwart von Ca^{2+} - oder Mn^{2+} -Ionen abhängig. Ein weiteres Strukturmotiv in pflanzlichen Lektinen ist die Anordnung dreier viersträngiger β -Faltblätter in Form eines β -Prismas, wie es in der Faltung des Schneeglöckchen Lektins aus *Galanthus nivalis* [14] gefunden wurde. Darüber hinaus stellt ein funktionelles Dimer, welches aus zweisträngigen β -Faltblättern in Form eines Kleeblatts entlang einer pseudodreizähligen Achse mit hydrophoben Resten im Proteininneren aufgebaut ist, eine charakteristische Faltungsklasse in pflanzlichen Lektinen dar. Vertreter dieses Strukturelementes sind die B-Kette des Ricin aus *Ricinus communis* [15], Abrin-a aus *Abrus precatorius* [16], Mistellektin-I aus *Viscum album* und Amaranthin aus *Amaranthus caudatus* [17]. Schließlich bildet Jacalin aus der Lektinfamilie der *Moraceae* [18] ein weiteres Strukturmotiv in pflanzlichen Lektinen. Jacalin besteht aus einem Tetramer, welches in drei Subdomänen untergliedert ist und sich zueinander längs einer quasi dreifach Symmetrie anordnet. Auch in diesem Fall stabilisieren hydrophobe Interaktionen zwischen benachbarten β -Faltblättern die charakteristische Faltung.

Neben diesen aus ausschließlich β -Faltblättern aufgebauten typischen Lektinfaltungen sind die Klasse der chitin-bindenden Proteine wie Hevein aus *Hevea brasiliensis* [8] mit einem Molekulargewicht von 4.7 kDa und das chitin-bindende Mistellektin aus *Viscum album* [19, 20] wesentlich kleiner und verfügen über einen relativ geringen Anteil von Sekundärstrukturelementen. Diese Gruppe der Lektine bildet Dimere, welche Produkt einer Genduplikation aus einer disulphidreichen Domäne sind.

Der Sequenzvergleich von Lektinen pflanzlicher und tierischer Herkunft bestätigt die Vermutung, daß die Fähigkeit der spezifischen Zucker -Erkennung und -Bindung sich unabhängig voneinander entwickelt hat [21]. Auf der Basis der dreidimensionalen Struktur werden Lektine heute in zwei Hauptgruppen eingeteilt. Die Gruppe I der zuckerbindenden Proteine zeichnet sich durch tief liegende Zuckerbindungstaschen aus. Im Gegensatz dazu verfügt die Gruppe II der Lektine über relativ flache Zuckerbindungsstellen an der Proteinoberfläche [22, 23]. Charakteristisch für alle Lektine ist ihre relativ geringe Affinität für Monosaccharide mit Dissoziationskonstanten im Konzentrationsbereich von 0.1 – 1.0 milli molar und erhöhte Affinität gegenüber Oligosacchariden [22, 23]. Die spezifische Zuckerbindung zwischen Lektin und Zuckerliganden geht auf grundlegende gemeinsame Schlüsselwechselwirkungen zurück. Die Prinzipien für die spezifische Erkennung terminaler Galactose wurden erstmals an Hand der

Struktur *Erythrina corallodendron lectin* EcolL [24] durch Shaanan *et al.* 1991 aufgeklärt und über weitere Kristallstrukturanalysen an Galactose-spezifischen Lektinen aus Erdnuß Lektin [13] (Banerjee *et al.*, 1996), aus *Griffonia simplicifolia* [25] (Delbaere *et al.*, 1993) und aus Sojabohne [12] (Dessen *et al.*, 1995) bestätigt. Galactose spezifische Lektine, wie das Mistellektin-I, stellen in ihrer Zuckerbindungsstelle ein Arrangement von Aminosäuren bereit, welche als Wasserstoffbrückendonoren ideal mit der 4'Hydroxylgruppe in axial und der 3'Hydroxylgruppe in äquatorial Konformation der Galactose interagieren können. Die primäre Interaktion bei der Bindung von Galactose vollzieht sich über die Wechselwirkung mit der 4'OH Gruppe des Zuckers, welche den Liganden in der Zuckerbindungstasche positioniert. Sekundär interagiert die 3'OH Gruppe der Galactose mit dem Lektin [26].

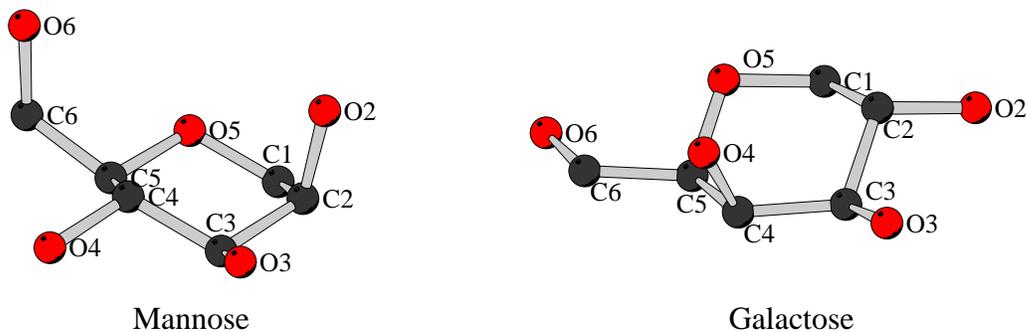


Abbildung 1: Die epimeren Zucker Galactose und Mannose.

In manchen Fällen wird die Selektivität für einen Typ von Zucker durch sterische Hinderung ergänzt [26]. Darüber hinaus ist es für Galactose-spezifische Lektine typisch [23], daß die apolare Ebene aus C3, C4, C5 und C6 Ringatomen der Galactose mit der planaren Ebene einer aromatischen Seitenkette in Wechselwirkung tritt und den Zucker-Lektin Komplex stabilisiert. Dies wird als „stacking“ bezeichnet. Die Selektion der Gal-spezifischen Lektine zwischen Galactose und seinem Epimer Mannose wird zum einen durch die Erkennung 4'OH-Gruppe in axialer Konformation in Galactose und in äquatorialer Konformation in Mannose vermittelt (Abbildung 1).

Da die Affinität der Lektine zu Monosacchariden relativ gering ist, erhöhen viele zuckerbindenden Proteine ihre Affinität zum Liganden, indem sie mehrere gleiche oder ähnliche Zuckerbindungsstellen im Tandem als „Cluster“ arrangieren. Durch diese Art der Multivalenz ermöglichen die Zuckerbindungsstellen mit ihrem räumlichen Abstand zueinander die Interaktion mit exponierten Zuckerstrukturen auf Zelloberflächen, die einen ähnlichen Abstand wie die Zuckerbindungsstellen aufweisen.

3.3. Mistellektin-I aus *Viscum album*

Die in Europa am weitesten verbreitete weißbeerige Mistel (*Viscum album*) ist ein immergrüner Schmarotzer, der in Abhängigkeit von seinem Wirtsbaum lebt. Dazu gehören nahezu alle Laubbäume und die Nadelbäume Kiefer und Tanne. Die Mistel zeichnet sich im Gegensatz zu anderen Pflanzen durch einige Besonderheiten aus. Sie ist eine Pflanze ohne Bodenhaftung, ihre Fruchtreife liegt im Winter und die Entwicklung des Mistelbusches geht sehr langsam vonstatten [27]. Mistelextrakte werden in Form von Tees in der Behandlung von Bluthochdruck angewendet [27]. Subkutane, nichttoxische Injektionen von Mistelextrakten werden in der Nachbehandlung von Krebspatienten eingesetzt. Der Hauptwirkstoff dieser wässrigen Pflanzenauszüge ist Mistellektin-I [28].

Mistellektin-I aus *Viscum album* gehört zur Familie der ribosomeninaktivierenden Proteine vom Typ II. Dem ML-I homolog ist das hochtoxische Ricin aus *Ricinus communis* und Abrin aus *Abrus precatorius* [28]. ML-I besteht aus zwei Untereinheiten, einer 29 kDa umfassenden A-Kette mit N-Glykosidaseaktivität und einer 34 kDa großen D-Galactose-spezifischen B-Kette, die durch eine Disulphidbrücke miteinander verbunden sind [28]. Die Konzentration von ML-I in der

Pflanze variiert in Abhängigkeit vom Wirtsbaum und der Jahreszeit [29]. ML-I ist ein Glykoprotein, an vier Positionen innerhalb der Polypeptidkette sind Oligosaccharidstrukturen über Asparagin angehängt [30]. Die Mistel enthält neben ML-I noch zwei weitere Lektine, das 60 kDa D-Galactose und N-acetyl-D-galactosamin spezifische Mistellektin-II und das 50 kDa N-acetyl-D-Galactosamin spezifische Mistellektin-III [31]. Darüber hinaus kommt in *Viscum album* noch ein je nach Isoform zwischen 6.2-6.3 kDa umfassendes chitin-bindendes Mistellektin vor [20].

Zur Entfaltung des toxischen Potentials muß ML-I in die Zielzelle aufgenommen werden. Hierbei fungieren eine Reihe von Glykoproteinen und Glykolipiden mit terminalen Galactoseresten als Rezeptoren für die Internalisierung in die Zelle. Die Gegenwart von Ca^{2+} Ionen begünstigt diesen Prozeß [32]. Wie an Zellkulturexperimenten gezeigt werden konnte, unterscheiden sich im Falle von ML-I die Art und Zahl der Rezeptoren je nach Zelllinie [32].

Zur Therapie bzw. zur Stimulation des Immunsystems werden Mistelextrakte mit standardisiertem Lektiningehalt im Konzentrationsbereich von 1 ng/kg Körpergewicht eingesetzt [33]. Nachweislich steigt die Zahl der T-Helferzellen und natürlichen Killerzellen im peripheren Blut an [33, 34]. Außerdem führt die Gabe von ML-I zu einer verstärkten Ausschüttung von Interleukin 1, Interleukin 6 und Tumornekrosefaktor α [35] und bewirkt die Konzentrationserhöhung von β -Endorphinen im Blut, welches zu einer verbesserten Lebensqualität von Tumorpatienten beiträgt [34]. Bisher sind die Mechanismen der immunmodulatorischen Wirkung von ML-I weitgehend unverstanden. Es bestehen jedoch Hinweise, die belegen, daß die Lektinkomponente für die Reaktionen der Immunzellen verantwortlich ist [36].

4. Material und Methoden

4.1. Reinigung von Mistellektin-I

Zur Isolierung von Mistellektin-I aus *Viscum album* wurde überwiegend Pflanzenmaterial eingesetzt, welches auf der Spezies Apfelbäumen *Mallus silvestris* gewachsen war. Darüber hinaus wurde Pflanzenmaterial von Bäumen der Spezies *Pyrus pashia* aus dem Himalayagebiet (Indien) für die Reinigung von ML-I verwendet. Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Prof. T.P. Singh am All India Institute of Medical Sciences in New Delhi, Indien durchgeführt. Die Aufreinigung wurde nach der von Franz *et al.* [31] publizierten Prozedur durchgeführt, wobei kleine Änderungen zur Optimierung vorgenommen wurden. Im folgenden wird daher nur die prinzipielle Vorgehensweise erläutert.

Durch Übergießen mit flüssigem Stickstoff wurden Blätter und kleine bzw. mittelgroße Äste zuerst schockgefroren. Tiefgefrorenes Material wurde dann durch Mixen im Wharingblender zerkleinert. Das pulverisierte Pflanzenmaterial wurde anschließend in 0.5 M NaCl-Lösung aufgenommen und über Nacht bei 4°C gerührt. Zur Abtrennung des groben Pflanzenmaterials wurde die Suspension durch ein Baumwolltuch gepreßt. Die zurückbleibenden feinen Pflanzenteile wurden durch Zentrifugation (Beckmann J2-21 M/E Zentrifuge, Rotor JA10) bei 10000 rpm und 4°C abgetrennt. Anschließend wurde der Pflanzenextrakt durch einen Papierfilter (Schleicher & Schuell) von feinsten Partikeln befreit. Der fertige Extrakt wurde mit einer Flußrate von 1.5 ml pro Minute mit einer Pumpe (Firma Biorad, Econo Pump Modell EP1) auf eine Affinitätschromatographiesäule (Länge 75 cm, Durchmesser 2.5 cm) mit einer Matrix aus Sepharose 4B, aufgenommen in 0.5 M NaCl und 10mM TRIS/HCl pH 7.5, aufgepumpt. Das Säulenmaterial Sepharose 4B wurde zuvor durch Behandlung mit 1 M HCl für 30 Minuten bei 60° C partiell hydrolysiert. Nachdem der gesamte Extrakt auf die Säule aufgepumpt war, wurde die Säule mit 0.5 M NaCl und 10 mM TRIS/HCl pH 7.5 so lange bei gleichbleibender Flußrate gewaschen, bis die Braunfärbung des Säulenbettes, hervorgerufen durch den Pflanzenextrakt, ausgewaschen war. Die Elution erfolgte mit 0.2 M Lactose in 0.5 M NaCl und 10 mM TRIS/HCl, pH 7.5 bei einer Fließgeschwindigkeit von 1.5 bis 2 ml pro Minute, wobei die Fraktion mit ML-I nach etwa vier Stunden von der Säule gewaschen wurde. Die Detektion erfolgte durch eine der Säule nachgeschaltete Photometereinheit des Biorad Säulen Systems (Econo UV Monitor Model EM-1, Biorad). Danach wurde die Proteinfraction durch Dialyse gegen destilliertes Wasser von Lactose befreit und durch Zentrifugation bei 3000 rpm und 4°C in Konzentratortiltereinheiten (Ultrafree 4 Filter mit Biomax 10 Membran, Firma Millepore) aufkonzentriert und auf 0.2 M

Glycin/HCl pH 2.5 umgepuffert. Zur Prüfung der Reinheit der Proteinfraction wurde ein Polyacrylamidgel angefertigt.

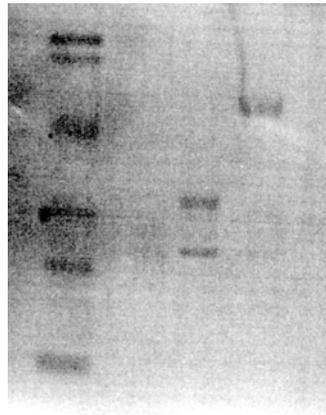


Abbildung 2:
Polyacrylamidgel

4.2. Kristallisation von Mistellektin-I

Mistellektin-I wurde nach der Methode des hängenden Tropfens [37] kristallisiert. Röntgenbeugungsfähige Kristalle wurden unter folgenden Bedingungen erhalten. ML-I wurde in 0.2 M Glycin/HCl pH 2.5 mit einer Konzentration von 10 mg/ml eingesetzt. Das Reservoir enthielt 30 bis 40 %iges gesättigtes Ammoniumsulfat, 4 % Dioxan in 0.1 M Glycin/HCl, pH 2.5. 5µl der Proteinlösung wurden mit 5µl der Reservoirlösung auf einem silikonisierten Deckglas gemischt und gegen das vorgegebene Reservoir in der Linbroplatte® equilibriert, wobei die Konzentration von Ammoniumsulfat zwischen 30 %, 32 %, 35 %, 40 % variiert wurde. Hexagonale Kristalle wuchsen nach 5-14 Tagen bei Raumtemperatur. Die größten Kristalle hatten eine Ausdehnung von 0.5 mm in der Länge und 0.35 mm in der Breite. Im Mittel betrug die Kristallgröße 0.1 bis 0.3 mm in der Länge. Für die Diffraktiondatensammlung wurden die Kristalle zur Vermeidung der Strahlenschädigung schockgefroren. Hierzu wurden die ML-I Kristalle mittels einer Schlaufe kurz in eine Cryolösung, zusammengesetzt aus 30 bis 35 % Glycerol, 32 % Ammoniumsulfat in 0.03 M Glycin/HCl, pH 2.5, überführt und folgend im Stickstoffstrom schockgefroren.

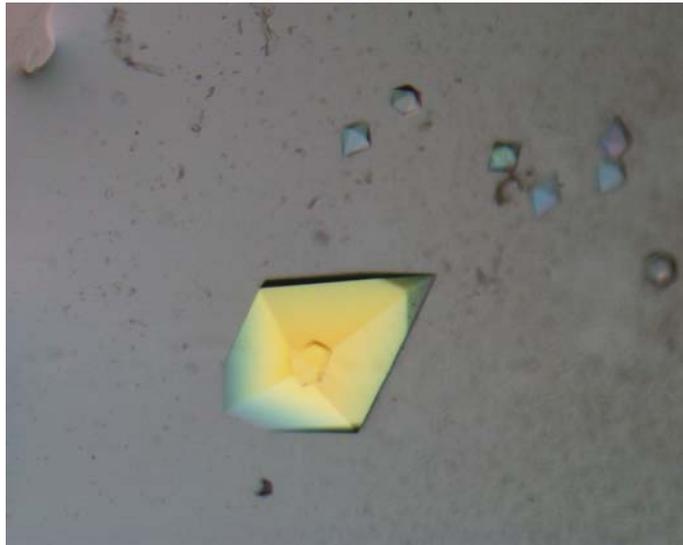


Abbildung 3:
Nativer Mistellektin-I Kristall.

4.3. Kristallisation von ML-I im Komplex mit Lactose als auch Galactose

Die Bedingungen für die Kristallisation von ML-I im Komplex mit Lactose bzw. mit Galactose unterscheiden sich durch die Zugabe des entsprechenden Zuckers. Das Reservoir setzte sich aus 30 bis 40 % Ammoniumsulfat, 4 % Dioxan in 0.1 M Lactose bzw. Galactose und 0.1 M Glycin/HCl, pH 2.5 zusammen. Das molekulare Verhältnis von ML-I zu Zuckerliganden betrug 1:315. Die Cryolösung entspricht der vorhergehend verwendeten bei den nativen Mistellektin-I Kristallen, jedoch wurde zusätzlich 0.2 M Lactose bzw. Galactose zugesetzt.

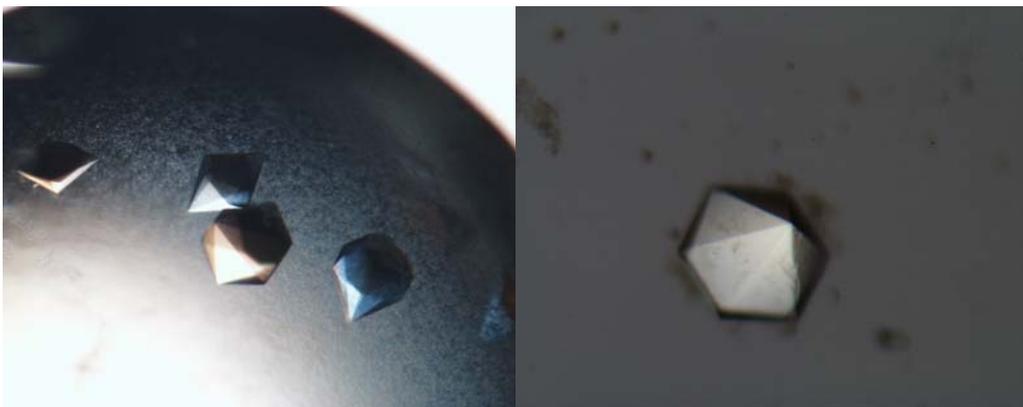


Abbildung 4:
Kristalle von ML-I im Komplex mit
Galactose.

Abbildung 5:
Kristall von ML-I im Komplex mit
Lactose.

4.4. Grundlagen der Röntgenstrukturanalyse

Röntgenbeugung stellt eine leistungsfähige Methode zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von Molekülen dar. Die ständig wachsende Zahl von Röntgenstrukturen von biologischen Makromolekülen hat entscheidenden Beitrag zum Verständnis der strukturellen Molekularbiologie beigetragen, da die Struktur die Grundlage der Funktion ist.

Ein Kristall ist dadurch charakterisiert, daß seine periodische Anordnung von Molekülen in allen drei Raumrichtungen wiederholt. Zur Beschreibung des Aufbaus eines Kristalls genügt die Kenntnis des kleinsten sich wiederholenden Motivs sowie die Länge und Richtung der drei Vektoren, welche die Aneinanderreihung im Raum beschreiben. Das Motiv kann ein oder mehrere Moleküle beinhalten, die sich durch Symmetrieoperationen ineinander überführen lassen. Die drei Vektoren a , b , c , die die Translation des Motivs in den drei Raumrichtungen beschreiben, werden Basisvektoren genannt. Die Einheitszelle ist durch die Zellkonstanten a , b , c und die dazwischen aufgespannten Winkel α , β , γ gekennzeichnet. Die Moleküle in der Einheitszelle lassen sich durch Symmetrieoperationen ineinander überführen, wobei die Einheitszelle in sogenannte asymmetrische Einheiten zerlegt wird. Alle unterscheidbaren Symmetriemöglichkeiten lassen sich in die Kristallsysteme einteilen. Gittertyp und beinhaltete Symmetrieoperation ermöglichen dann die Zuordnung zu einer der 65 Raumgruppen der Proteinkristallographie. In einem nach Konvention rechtshändigen xyz – Koordinatensystem verläuft die a -Achse der Elementarzelle entlang der x -Achse, die b -Achse in Richtung der y -Achse und die c -Achse entlang der z -Achse.

Treffen monochromatische Röntgenstrahlen aus einer konventionellen Drehanode mit $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung oder aus einer Synchrotronstrahlungsquelle auf einen Proteinkristall, so treten diese mit den Hüllelektronen der Moleküle in Wechselwirkung und es kommt zu Beugungserscheinungen. Die Diffraktion von Röntgenstrahlen läßt sich als Beugung an Gitterebenscharen vorstellen. Beugungsmaxima entstehen, wenn die Bragg'sche Gleichung [Gl. (1)] erfüllt ist.

$$\text{Gl. (1)} \quad 2 d \sin \theta = n \lambda$$

λ = Wellenlänge des verwendeten
Röntgenlichtes

θ = Glanzwinkel der Reflexion

d = Netzebenenabstand

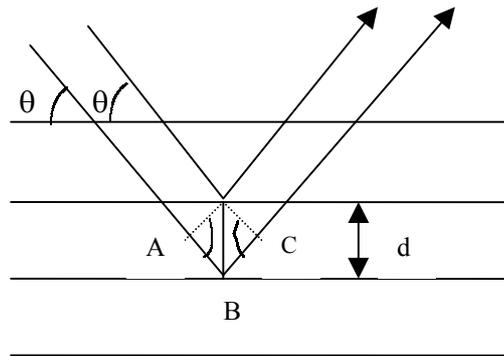


Abbildung 6:

Schemazeichnung: Beugung eines Röntgenstrahls an einer Netzebenenschar. Die Weglängen unterscheiden sich um die Strecke $AB + BC$, die vom Winkel θ abhängt. Konstruktive Interferenz erfolgt, wenn $AB + BC$ ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge ist.

Eine Ebenenschar ist durch parallele Ebenen gekennzeichnet, die den Abstand d zueinander besitzen. Jede Ebenenschar gehört zu einem Reflex des Diffraktionsbildes. Mit Hilfe der Millerschen Indices hkl werden die Netzebenenscharen beschrieben. Diese stellen die Reziproken der Gitterkonstanten dar und teilen die Achsen in ganzzahlige Vielfache, wobei h entlang der a -Achse, k entlang der b -Achse und l entlang der c -Achse verläuft. Das reziproke Gitter wird zur Bestimmung der Gitterkonstanten aus den Abständen der Netzebenen herangezogen.

Eine am Kristall gebeugte Röntgenwelle wird durch Amplitude und Phase bestimmt. Die in der kristallographischen Messung gemessene Intensität des Reflexes $I_{(hkl)}$ entspricht dem Quadrat der Strukturamplitude. Die Elektronendichte $p(hkl)$ läßt sich an einem Ort xyz wie folgt aus den komplexen Struktur Faktoren durch eine Fouriertransformation berechnen:

$$p(xyz) = 1/V \sum_h \sum_k \sum_l F(hkl) \exp [-2\pi i(hx + ky + lz)]$$

Da $F = |F| \exp [i\alpha]$ entspricht, läßt sich die Elektronendichte auch wie folgt ausdrücken:

$$p(xyz) = 1/V \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)| \exp [-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha(hkl)]$$

Die Phaseninformation ist der Messung leider nicht zugänglich. Zur Lösung des Phasenproblems stehen die Methode des molekularen Ersatzes, die Schweratommethode und die Methode der multiplen anomalen Diffraction zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit

wurde die Methode des molekularen Ersatzes verwendet, auf die im Kapitel 4.6. noch näher eingegangen wird. Aus der Fouriersynthese über alle gemessenen Reflexe resultiert die Elektronendichteverteilung, deren Interpretation das Strukturmodell liefert.

4.5. Datensammlung, Auswertung und Reduktion

Alle Beugungsdaten wurden nach der Rotationsmethode [38] aufgenommen. Zur Reduktion der Strahlenschädigung wurde der Kristall während der Messung im laminaren Stickstoffstrom auf 100 K gekühlt. Der Primärstrahl wird durch den sogenannten „Beamstop“ ausgeblendet. Alle Gitterebenscharen, die während einer Aufnahme die Bragg Bedingung erfüllen, werden als Reflexe mittels Detektor aufgezeichnet. Partielle aufgenommene Reflexe werden durch Addition über mehrere Aufnahmen zu einem Gesamreflex ergänzt. Zur Auswertung der aufeinanderfolgenden Beugungsbilder wurde das Programm DENZO [39] eingesetzt. Die geometrischen Zusammenhänge werden in der Programmeingabe über die Parameter wie Wellenlänge, Abstand zum Detektor, Strahldivergenz und Polarisation beschrieben und berücksichtigt. Anhand des ersten Beugungsbildes legt das Programm die Orientierung des Kristalls im Strahl fest, außerdem werden die Zellkonstanten und der Bravaisgittertyp bestimmt. Die programmimplementierte Optimierung verlangt vorab eine möglichst große Übereinstimmung von gemessenen und den Parametern entsprechend vorhergesagten Reflexen. Nach Verfeinerung werden die Reflexintensitäten mit vorgenommener Lorentz –und Polarisationskorrektur in einer Datei gespeichert. Die Rohdaten wurden anschließend mit Hilfe des Programms SCALEPACK [39] auf ein gemeinsames Intensitätsniveau skaliert. Die Güte der skalierten Daten wird durch den R_{symm} – Wert angegeben. Hierbei wird davon ausgegangen, daß symmetrieäquivalente Reflexe die gleichen Intensitäten aufweisen. Durch Meßfehler, Absorption und geringfügige Abweichungen beim Anpassen der Integrationsmasken weichen symmetrieäquivalente Reflexe in der Praxis jedoch voneinander ab. Der R_{symm} –Wert wird wie folgt angegeben:

$$R_{\text{symm}}(I) = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_i |I_i(\text{hkl}) - \overline{[I(\text{hkl})]}|}{\sum_{\text{hkl}} \sum_i I_i(\text{hkl})}$$

Dieser beschreibt die Standardabweichung gebildet aus der Summe über alle symmetrieäquivalenten Reflexe und die Anzahl i der Intensitätsmessungen, wobei $[I(\text{hkl})]$ den

Mittelwert über N äquivalente Messungen darstellt. Die weitere Reduktion zu Strukturfaktoramplituden wurde mit dem Programm TRUNCATE [40] aus dem CCP4-Paket durchgeführt.

4.6. Lösung des Phasenproblems

Ist eine Röntgenstruktur eines homologen Proteins bereits bekannt, so läßt sich das Phasenproblem mit Hilfe des molekularen Ersatzes lösen. Grundlage der Methode des molekularen Ersatzes ist es, daß die Phasen von Strukturfaktoramplituden des homologen Modells als Startphasen für die zu lösende Struktur herangezogen werden. Zunächst wird das Ausgangsmodell in der ermittelten Einheitszelle positioniert. Um die beste Orientierung für das Modell zu finden, wird die Pattersonfunktion zu Hilfe genommen, in welcher aus den gemessenen Strukturfaktoramplituden ein Vektorraum berechnet wird, der interatomare Abstände repräsentiert. Dieser Vektorraum wird Pattersonraum genannt und enthält keine Information über die Phase.

$$P(u,v,w) = 1/V \sum |F_{hkl}|^2 \cos [2\pi(hu + kv + lw)]$$

Da sich bei richtiger Orientierung des Suchmodells in der gefundenen Einheitszelle der zu lösenden Struktur ein ähnlicher Pattersonraum ergibt wie für die zu lösende Struktur, werden nun Rotations- und Translationsfunktionen gesucht, die beide Pattersonräume zur Deckung bringen. Die Pattersonfunktion sollte möglichst nur Vektoren enthalten, die intramolekulare Abstände darstellen, da diese die Information über die dreidimensionale Struktur enthalten. Nach Positionierung in der Einheitszelle werden die Strukturfaktoramplituden der ermittelten Lösung mit den gemessenen Strukturfaktoramplituden verglichen. Die Eindeutigkeit der gefundenen Rotation- und Translationsfunktion wird durch den Gütefaktor R-Wert angegeben. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Berechnung das Programm AmoRe [41] verwendet.

4.7. Verfeinerung der Proteinstrukturen

Ziel des Verfeinerungsprozesses ist es, die Parameter des Modells wie Atomkoordinaten, Besetzungs- und Temperaturfaktoren so zu verändern, daß die Differenz zwischen gemessenen und berechneten Strukturfaktoramplituden minimiert wird. Dies wird im kristallographischen R-Faktor wie folgt ausgedrückt:

$$R = \frac{\sum_{hkl} ||F_{gem}| - |F_{ber}||}{\sum_{hkl} |F_{gem}|}$$

Zur Verfeinerung wurde die Methode des *simulated annealing* im Programmpaket CNS [42] verwendet. Grundlage dieser Methode bildet das dynamische Verhalten der Atome bei verschiedenen Temperaturen. Die potentielle Energie des Gesamtmodells beinhaltet Energieterme für Bindungslängen, Bindungswinkel, kovalente- und nichtkovalente Wechselwirkungen und empirische Terme. Ziel ist es, die potentielle Energie des Systems zu minimieren, was über das Zuführen von hoher Temperatur zum System mit anschließendem schrittweisem Abkühlen erreicht wird. Durch diesen Prozess wird gleichzeitig der R-Faktor reduziert. Als alternative Methode wurde in der fortgeschrittenen Verfeinerung die potentielle Energie des Modells bei konstanter Temperatur mit einem Skalierungsfaktor minimiert. Im verwendeten Programm können positionelle und thermische Parameter sowie Besetzungsfaktoren zusammen oder unabhängig voneinander verfeinert werden. Gleichzeitig wird die Stereochemie zu Idealwerten optimiert.

Im Verlauf der Verfeinerung wird zum einen nach jedem Zyklus die Stereochemie geprüft, der R-Wert berechnet und beobachtet, ob dieser konvergiert. Weitere Aussagen über eine konvergierende Verfeinerung liefert der sogenannte „freie“ R-Wert (R_{free}). Hierzu wird zu Beginn der Verfeinerung vom Datensatz ein Anteil von ca. 3-5% der Daten nach dem Zufallsprinzip als sogenannter Testdatensatz ausgegliedert, die übrigen Daten bilden den Arbeitsdatensatz. Nur der Arbeitsdatensatz wird in der Verfeinerung berücksichtigt. Der „freie“ R-Wert liefert eine Aussage darüber, ob die berechneten Strukturfaktoramplituden des jeweiligen Modells mit den gemessenen Strukturfaktoramplituden übereinstimmen, und ist unbeeinflusst vom Verfeinerungsprozess. Eine Verminderung von R-Wert und „freiem“ R-Wert ist ein verlässliches Kriterium für eine konvergierende Verfeinerung. Daneben liefert der Vergleich von Bindungslängen und Bindungswinkeln aus Kleinstrukturen mit denjenigen im Modell zuverlässige Information über die Güte der Atomkoordinaten.

Die Minimierung der Verfeinerungsprogramme reicht nur bis zu einem bestimmten Konvergenzradius. Um große Veränderungen am Strukturmodell vorzunehmen, wird die Verfeinerung durch die Berechnung von Elektronendichten aus Fourier-Synthesen unterstützt. Hierbei wird das aktuelle Strukturmodell mit Hilfe eines 3D-Graphikgerätes (Firma Silicon Graphics) und dem Programm TURBO FRODO [43] gemäß der Elektronendichte verändert und umgebaut. Außerdem werden auf der Basis der Elektronendichte Wassermoleküle, Liganden und Zuckermoleküle dem Modell hinzugefügt.

5. Ergebnisse

5.1. Struktur von nativem Mistellektin-I

5.1.1. Datensammlung und Reduktion

Von Kristallen des nativen Mistellektin-I aus *Viscum album* wurde am Meßplatz BW7B (HASYLAB, Hamburg) mit einem MAR Image Plate Detektor ein Beugungsdatensatz gesammelt. Die Wellenlänge betrug 0.84 Å, Die Daten waren im Auflösungsbereich von 30Å bis 2.1 Å bis zu 99% vollständig. Zur Auswertung der Daten wurde das Programmpaket DENZO [39] und SCALEPACK [39] verwendet.

Raumgruppe	P6 ₁ 22/P6 ₅ 22
Zellkonstanten a=b	107.01 Å
Zellkonstante c	312.11 Å
Auflösung	30-2.1 Å
Vollständigkeit	99.6%
Wellenlänge	0.84 Å
Röntgenquelle	BW7B/HASYLAB
Anzahl aller gemessenen Reflexe	717.379
Anzahl der unique Reflexe	62.763
R _{symm}	5.0 %
R _{symm} (letzte Schale)	41.3 %
V _m	4.1 Å ³ /Dalton

Tabelle 1 :

Zusammenfassung der Datensammlung des nativen ML-I Kristalls aus *Viscum album*.

Die Einheitszelle mit den Zellkonstanten $a = b = 107.01$, $c = 312.11$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$ wurde bestimmt. Die Daten wurden zunächst der Raumgruppe P6₁22 zugeordnet, der molekulare Ersatz zeigte jedoch eindeutig, dass es sich um die enantiomere Raumgruppe P6₅22 handelt. Ausgehend von einem Molekül in der asymmetrischen Einheit beträgt der Packungsparameter 4.1 Å³/Da. Dies entspricht einem ungewöhnlich hohen Lösungsmittelanteil von ca. 70 %.

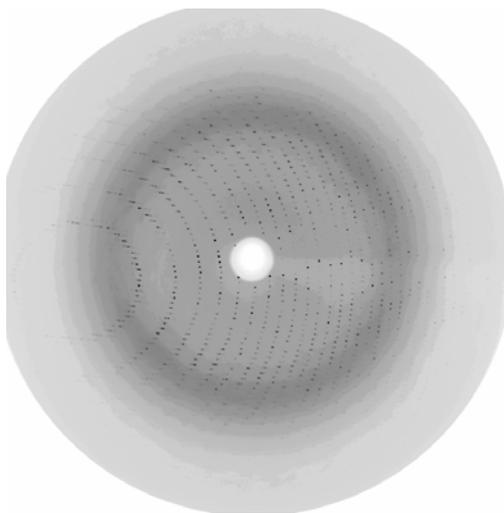


Abbildung 7:
Diffraktionsbild von nativen ML-I.

5.1.2. Strukturlösung, Verfeinerung und Güte des Modells

Zur Lösung des Phasenproblems wurde die Methode des molekularen Ersatzes verwendet. Ausgehend vom Suchmodell des homologen Ricin (2aai; pdbcode) ohne Wassermoleküle wurde das Ausgangsmodell von ML-I erstellt. Im ausgewählten Auflösungsbereich zwischen 8 bis 3.5 Å wurde eine klare Lösung für die Rotation und damit die Orientierung des Moleküls gefunden. Die anschließende Translation des orientierten Moleküls lieferte als Ergebnis einen R-Faktor von 39.8 %.

Zur Verfeinerung des Modells wurde das Programm CNS [42] verwendet. In den ersten Zyklen der Verfeinerung sank der R-Faktor auf 32.6%, wobei der Auflösungsbereich schrittweise von 3.4 Å zu 2.1 Å erhöht wurde. Aufgrund der mangelnden Güte der hochauflösenden Daten wurden für die weitere Verfeinerung jedoch nur Daten bis zu einer Auflösung von 2.3 Å verwendet. Gemäß der durch 2Fo-Fc und Fo-Fc Fouriersynthesen berechneten Elektronendichten wurde das Modell interaktiv mit Hilfe der Computergraphik unter Verwendung des Programms TURBO FRODO [43] optimiert. Auf der Basis der Elektronendichteverteilung wurden die Zucker der Glykosylierungsstellen in das Modell integriert, der R-Faktor sank auf 28.3%. Im weiteren Verlauf wurden nach jedem Verfeinerungszyklus Wassermoleküle in das Modell eingebracht, deren Positionen mittels Fo-Fc Elektronendichten in anschließenden Zyklen nochmals überprüft wurden. Mit zunehmender Verbesserung des R-Faktors und der Elektronendichte wurden Aminosäureseitenketten korrigiert und außerdem individuelle B-Faktoren verfeinert.

Auflösung (Å)	10.0 – 2.3
R-Faktor/R _{free}	21.5 % (23.7%)
Anzahl der Proteinatome	3932
Anzahl der Zuckeratome	94
Anzahl der Wasseratome	332
Anzahl anderer Atome	119
mittlerer Fehler der Atomkoordinaten (Å) nach Luzatti	0.28
CNS stereochemische Parameter	
r.m.s. Abweichung von idealen Bindungslängen (Å)	0.006
r.m.s. Abweichung von idealen Bindungswinkeln (°)	1.37
r.m.s. Abweichung von idealen dihydralen Winkeln (°)	24.9
r.m.s. Abweichung von idealen ungewöhnlichen Winkeln (°)	0.75

Tabelle 2:
Datenstatistik des verfeinerten Modells von nativem Mistellektin-I.

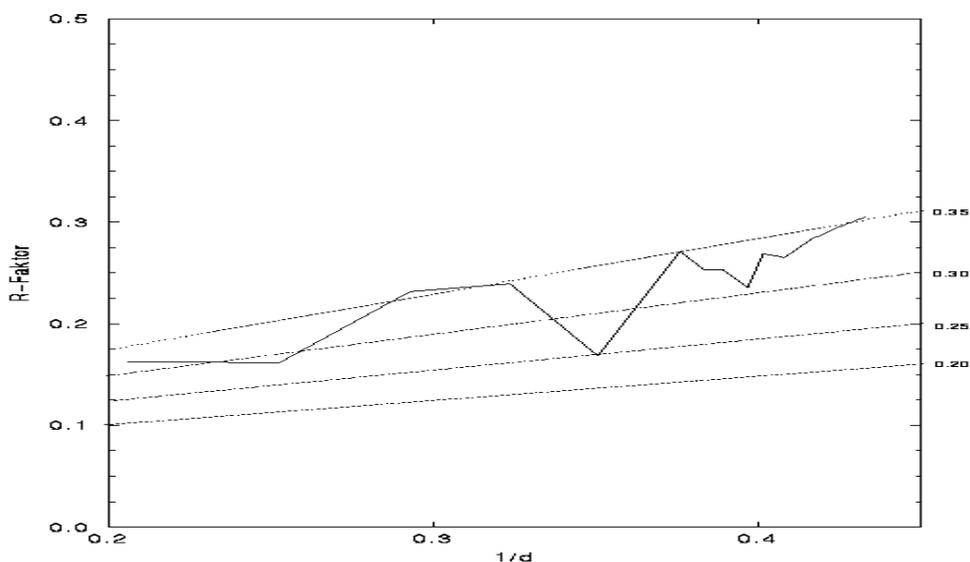


Abbildung 8:
Luzatti-Plot für das verfeinerte Mistellektin-I Modell.

Weiterhin wurden einige Ionen und Glycerolmoleküle lokalisiert, welche dem Kristallisationspuffer bzw. der Cryolösung entstammen. Nach einer anschließenden Überprüfung der eingefügten Wassermoleküle fiel der R-Faktor auf 21.5% ($R_{\text{free}} = 23.5\%$).

Als nicht vollständig besetzte Atomlagen der A-Kette wurden die Seitenketten von Arg 106A, Tyr 115A und Arg 120A, die Schleife mit den Resten 223A bis 226A und die C-terminalen Reste 248A und 249A verfeinert. In der B-Kette ist die Schleife 237B bis 244B flexibel und damit unklar in der Elektronendichte, so daß hier auch die Besetzungszahlen herabgesetzt wurden. Einige Zuckermoleküle der Glykosylierungsstellen und ein Cl⁻ Ion wurden mit halber Besetzungszahl verfeinert. Alle übrigen Atome wurden mit vollständiger Besetzung in den Verfeinerungsprozess eingebracht. Bis auf die fünf ungeordneten Aminosäuren am C-Terminus der A-Kette, konnten die übrigen 512 Aminosäuren in die klare Elektronendichte eingepaßt werden. Das fertige ML-I Modell enthält 3932 Atome und 332 Wassermoleküle, außerdem 7 Zuckermoleküle, 1 Cl⁻, 3 SO₄²⁻, 16 Glycerolmoleküle und 1 Dioxanmolekül. Die Güte der Stereochemie wird im Ramachandran Diagramm (Abbildung 9) gezeigt, 88.6% der dihydralen Winkel liegen in bevorzugten und 11.4 % in erlaubten Regionen und sind in Form von schwarzen Rechtecken dargestellt. Glycin Reste sind als schwarze Dreiecke im Diagramm eingezeichnet. Zur Abschätzung des Fehlers der Atomkoordinaten wurde die Methode nach Luzatti [44] (Abbildung 8) herangezogen. Der Fehler beträgt danach 0.28 Å. Die r.m.s. Abweichungen für die Bindungslängen liegen bei 0.005 Å und bei 1.37 Å für die Bindungswinkel.

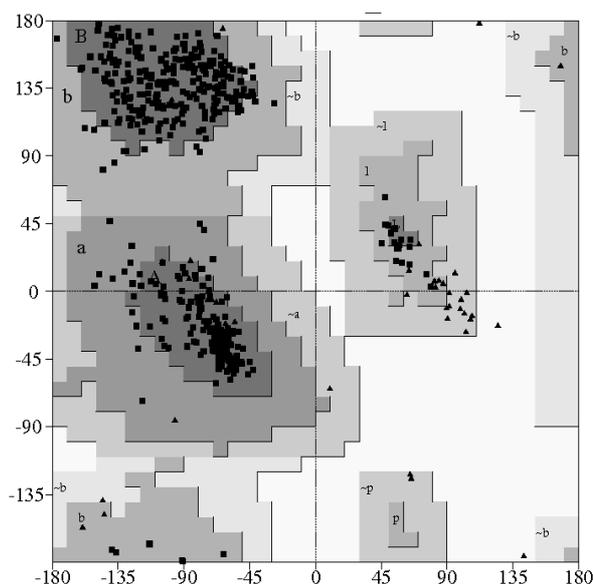


Abbildung 9:
Ramachandran-Plot des verfeinerten Mistellektin-I Modells.

		Mittlerer B-Wert	Maximaler B-Wert	Minimaler B-Wert
A-Kette	alle Atome	43.9	76.8	29.2
	Hauptkettenatome	43.4	75.6	28.2
	Seitenkettenatome	44.5	77.9	17.7
B-Kette	alle Atome	35.4	78.8	21.7
	Hauptkettenatome	34.9	77.3	21.8
	Seitenkettenatome	35.9	76.5	21.4
Wasser	alle Atome	52.3	78.3	25.5
Zucker	alle Atome	60.2	80.3	31.4
Glycerol, Dioxan	alle Atome	75.2	96.2	37.2
Ionen	alle Atome	75.9	90.4	53.6
Alle Atome		41.9	96.2	17.7

Tabelle 3:

Temperaturfaktoren B [\AA^2] der verfeinerten Struktur von ML-I, aufgliedert für die A- und B-Kette, die Wasser- und Zuckeratome und die Liganden.

5.1.3. Temperaturfaktoren

In Tabelle 3 sind die Temperaturfaktoren der ML-I Struktur jeweils für A- und B-Kette, die Wasser- und Zuckeratome und Liganden aus dem Lösungspuffer angegeben. Es ist auffällig, daß die B-Faktoren relativ hoch sind. Auch die Abschätzung der Temperaturfaktoren nach Wilson [45] ergab einen durchschnittlichen Wert von 40 \AA^2 . Das Programm TRUNCATE [40] legt bei Reduktion zu Strukturfaktoramplituden diese Skalierung bei den gemessenen Daten an. Der durchschnittliche B-Faktor liegt bei 43.9 \AA^2 für alle Atome der A-Kette und bei 35.4 \AA^2 für alle Atome der B-Kette. Bezogen auf die B-Faktoren des Proteins liegen die gemittelten Temperaturfaktoren der dem Lösungsmittel exponierten Zucker der Glykosylierungsstellen, der Wasseratome und der Liganden aus dem Kristallisations- und Cryopuffer in Relation und in diesem Fall vernünftigen Bereich. Der Lösungsmittelanteil von 70% im ML-I Kristall ermöglicht offensichtlich die hohe thermische Beweglichkeit der Atome, eine Besonderheit von Mistellektin-I. Die Temperaturfaktoren für die Hauptkettenatome (schwarz) und Seitenkettenatome (rot) sind in Abbildung 10 für jede Aminosäure der A- und in Abbildung 11 für die B-Kette von ML-I aufgetragen. Die B-Faktoren der B-Kette sind etwas niedriger als diejenigen für die A-Kette. Besonders hohe thermische Beweglichkeit ist am C-Terminus der A-Kette und am N-Terminus der B-Kette zu finden, was auf die Verknüpfung der beiden Ketten an der Proteinoberfläche zurückzuführen

ist. In der A-Kette zeigen dem Solvent ausgesetzte Schleifen gegenüber α -Helices und β -Faltblättern größere Beweglichkeit. Die B-Kette verfügt mit ausschließlich β -Faltblättern als Sekundärstrukturelement über einheitlich verteilte B-Faktoren der Hauptkettenatome.

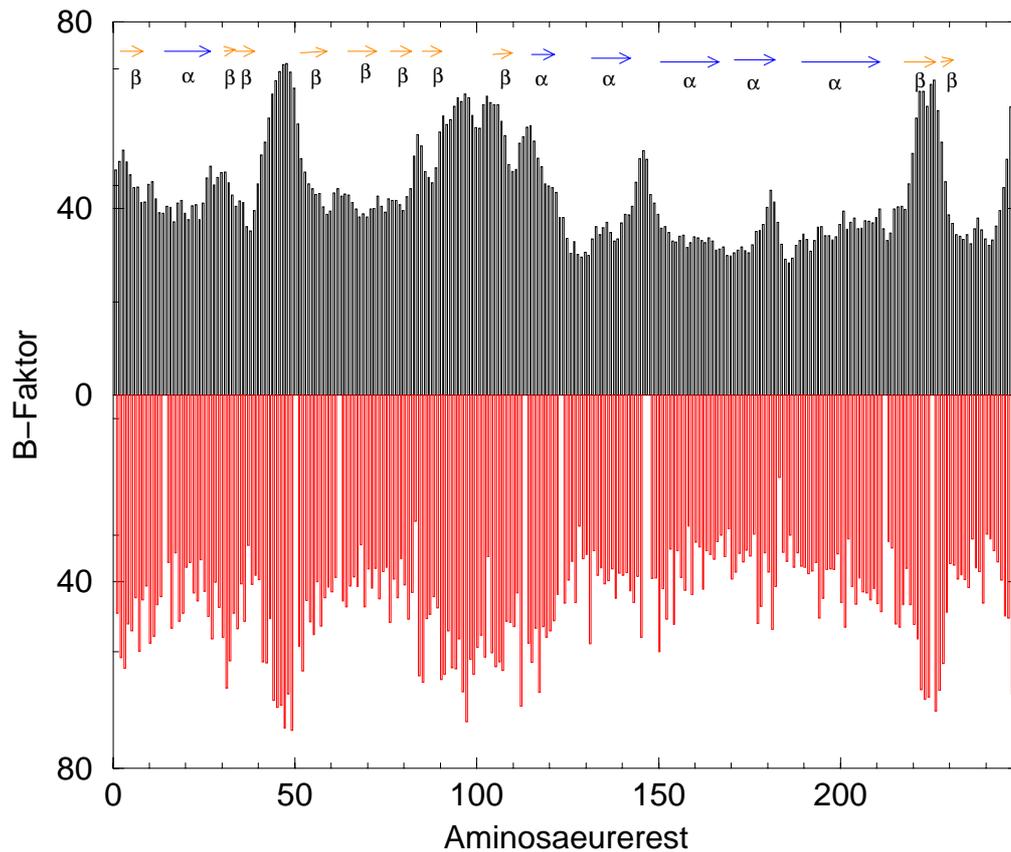


Abbildung 10:
Die Graphik zeigt die Temperaturfaktoren in \AA^2 jeder Aminosäure der A-Kette von nativem ML-I aufgegliedert in Hauptkettenatome (schwarz) und Seitenkettenatome (rot). Sequenzabschnitte, die als α -Helix oder als β -Faltblatt vorliegen, sind als blaue bzw. gelbe Pfeile dargestellt.

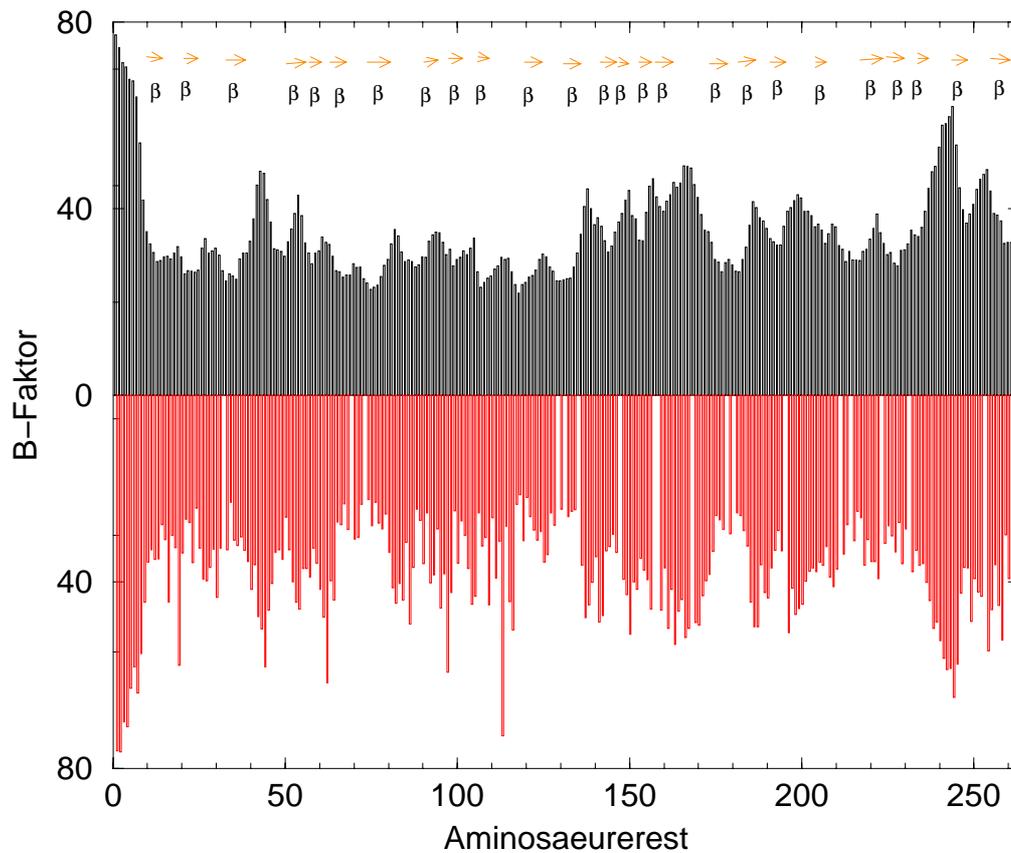


Abbildung 11:

Die Graphik zeigt die Temperaturfaktoren in \AA^2 jeder Aminosäure der B-Kette von nativem ML-I aufgegliedert in Hauptkettenatome (schwarz) und Seitenkettenatome (rot). Sequenzabschnitte, die als β -Faltblatt vorliegen, sind als gelbe Pfeile dargestellt.

Die Erntezeit des Pflanzenmaterials, welches zur Herstellung der nativen Mistellektinkristalle genutzt wurde, lag im März. Die Erntezeit für die Isolierung des Proteins, welches mit Lactose bzw. Galactose komplexiert und kristallisiert wurde, lag im Oktober. Dies erklärt, warum die Primärsequenzen der Zucker-komplexierten Isoformen homologer zu einander sind als die Isoform der nativen ML-I Struktur. Eine ausführliche Zusammenstellung der Sequenzunterschiede der einzelnen Isoformen und ihrer Lage innerhalb der Struktur wird in Kapitel 5.1.7. beschrieben. Nach Überlagerung der nativen und komplexierten Strukturen mit dem Programm LSQKAB [51] ergab sich eine r.m.s Abweichung von 0.15 Å zwischen der nativen und der mit Lactose-komplexierten Struktur bzw. 0.18 Å zu der mit Galactose-komplexierten Struktur. Im folgenden wird zunächst die Struktur des nativen ML-I gleicher Auflösung im Detail vorgestellt.

5.1.5. Die global räumliche Struktur von Mistellektin-I

Die A-Kette von Mistellektin-I ist kompakt und globulär aufgebaut. Anlehnend an die Nomenklatur von Ricin [15] wird die A-Kette in die drei Domänen I, II und III eingeteilt. Domäne I umfaßt die Aminosäuren 1 bis 109, welche aus einem sechssträngigen parallelen β -Faltblatt (adefgh), unterbrochen von einer α -Helix A und einem kleinen antiparallelen β -Faltblatt (bc), besteht. Die Sekundärstrukturelemente haben die Abfolge aAbcdefgh. Der erste Strang a des Faltblatts umfaßt die Reste 2 bis 8 und bildet Wasserstoffbrücken zu Strang d mit den Aminosäuren 56 bis 60. An die Helix A schließt sich das kleine unten angegliederte Faltblatt bc an. Die übrigen Abschnitte des Faltblatts e-h wechselwirken parallel angeordnet mit dem jeweiligen Nachbarstrang. Eine über die Reste 89 bis 104 ausgedehnte Schleifenstruktur verbindet die Stränge d-g mit dem Strang h. Am Anfang von Strang f ragt der aktive Rest 76A in die Höhlung des katalytischen Zentrums. An das rückwertige β -Faltblatt der Domäne I schmiegt sich Domäne II der A-Kette an, welche ausschließlich aus α -Helixes besteht. Aus der kleinen Helix B, welche sich über die Aminosäuren 114 bis 120 erstreckt, entstammt der aktive Rest Tyr 115. Die folgenden drei Helixes CDE der Domäne II (131-141, 148-171 und 170-181) sind in Form eines Dreiecks zueinander angeordnet. Am Ende der Helix D liegen die aktiven Reste Glu 165 und Arg 168, welche sich in der Vertiefung des aktiven Zentrums befinden. Domäne III besteht aus den C-terminalen Aminosäuren 199 bis 249, welche die Helix G (200 bis 208) und ein antiparalleles β -Faltblatt

ij (218 bis 222 und 226 bis 230) als Sekundärstrukturelemente enthalten. Helix G der Domäne III ist gegen die vorherige Helix F der Domäne II leicht verkippt, und das Falblatt der

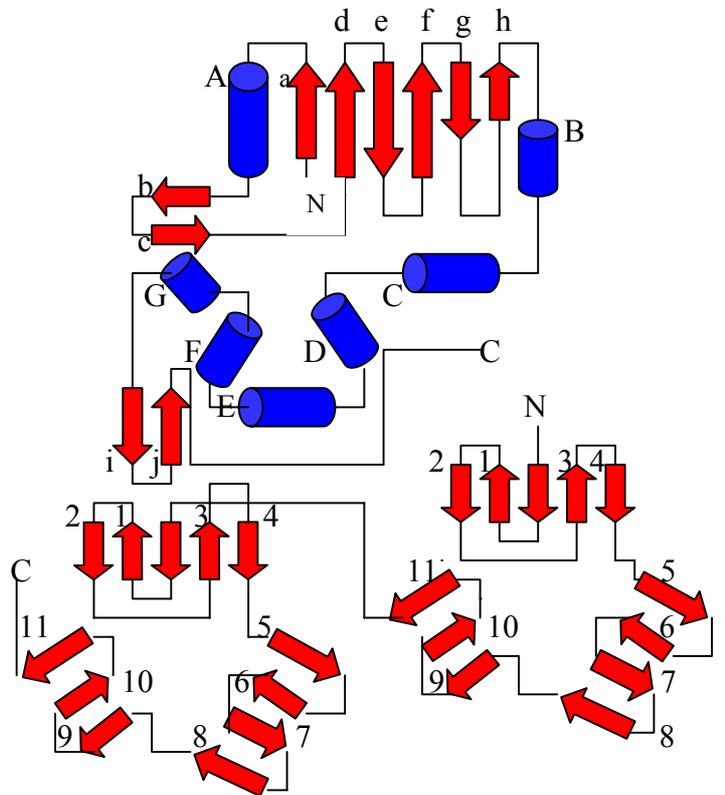


Abbildung 13:

Topology Diagramm von Mistellektin-I. In der oberen Bildhälfte befindet sich die A-Kette und in der unteren Bildhälfte die B-Kette. Die α -Helices sind als blaue Zylinder dargestellt und die β -Faltblätter als rote Pfeile.

Domäne III liegt langgestreckt gegenüber der B-Kette. Die Domäne III der A-Kette vermittelt die Hauptinteraktion zwischen den beiden Ketten, die über das C-terminale Cys 247A und das N-terminale Cys 5B durch eine Disulfidbrücke verbunden sind. Die hochflexiblen fünf C-terminalen Aminosäuren sind in der Elektronendichte nicht sichtbar. Es ist bemerkenswert, daß die Faltung der A-Kette im Vergleich zur B-Kette nicht über Disulfidbrücken stabilisiert ist. Die B-Kette von Mistellektin-I hat im Gegensatz zur A-Kette eine langgestreckte Form, und die ersten acht N-terminalen Aminosäuren liegen entfernt vom Grundkörper der B-Kette und umgreifen die A-Kette seitlich. Ähnlich dem Ricin [52] ist die B-Kette von ML-I offensichtlich ein Produkt einer Genduplikation. MLB wird daher in die Domänen I und II eingeteilt, welche eine Sequenzhomologie von 28 % zueinander aufweisen, und die sich ihrerseits in die Subdomänen α , β und γ , sowie die „Linker“-Domäne λ untergliedern lassen. Die B-Kette besteht ausschließlich aus β -Faltblättern, die sich längs einer dreizähligen Achse

anordnen. Die N-terminalen Aminosäuren 1 bis 16 umfassen die „Linker“-Region $\lambda 1$, welcher sich die Faltblätter 1 bis 4 der Subdomäne $\alpha 1$ anschließen.

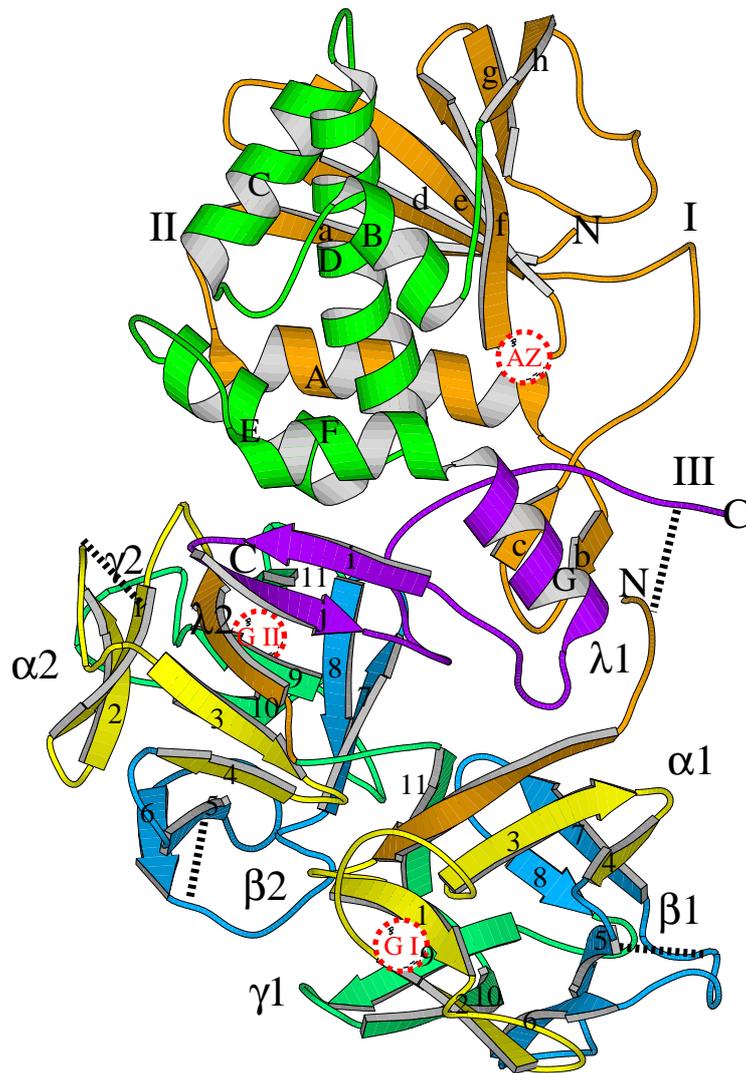


Abbildung 14:

Faltung von Mistellektin-I: A-Kette (rechte Bildhälfte): Domäne I wurde in orange, Domäne II wurde in grün und Domäne III wurde in violett gefärbt. AZ gibt die Lage des aktiven Zentrums an. B-Kette (linke Bildhälfte): Domäne I bzw. II wurde entsprechend ihrer Subdomänen α in gelb, β in blau, γ in türkis und λ in orange dargestellt. GI und GII bezeichnen die Lage der Galactosebindungsstelle I und II. Die schwarz gestrichelten Linien zeigen die Disulphidbrücken zwischen der A- und B-Kette bzw. innerhalb der B-Kette.

Faltblatt 1 mit den Resten 20 bis 24 enthält das im Zentrum gelegene Asp 23 der Galactosebindungsstelle I. Über eine ausgedehnte Schleife der Reste 25 bis 31, welche im proximalen Teil der Schleife den Boden der Bindungstasche aufbaut, wird die Verbindung zu Faltblatt 2 bestehend aus den Aminosäuren 32 bis 38 hergestellt. Faltblatt 2 verfügt über die zuckerbindende Aminosäure Gln 36 und die sich anschließende Schleife von 39 bis 49 enthält den Galactose bindenden Rest Lys 41 der Bindungstasche. Hierauf folgt das Faltblatt 3 mit den Resten 50 bis 53 und Faltblatt 4 aufgebaut aus 56 bis 60, wobei Faltblatt 3 auch mit der „Linker“-Domäne $\lambda 1$ interagiert. Das nachfolgende vierteilige Faltblatt der Subdomäne $\beta 1$ bildet ein ähnliches Arrangement wie Subdomäne $\alpha 1$. Strang 5 mit den Resten 63 bis 68 und Strang 6 mit den Resten 75 bis 79 schließen sich als nächstes antiparalleles β -Faltblatts an, wobei eine Disulphidbrücke zwischen Cys 64 und Cys 81 die Struktur begrenzt und stabilisiert. Strang 7 (92 bis 94) und Strang 8 (97 bis 101) werden durch die ausgedehnte Schleife der Reste 80 bis 91 verbunden. Subdomäne $\gamma 1$, bestehend aus den drei Faltblattsträngen 9-11 mit Resten 106 bis 110, 119 bis 122 und 131 bis 135, bildet den Schlußteil der Domäne I. Die Verbindungsdomäne $\lambda 1$ ergänzt der $\gamma 1$ zu einem viersträngigen β -Faltblatt-Aufbau, ähnlich zu den übrigen Subdomänen. Den Beginn der Domäne II bildet entsprechend die „Linker“-Subdomäne $\lambda 2$ mit den Aminosäuren 141 bis 147, worauf sich das antiparallele Faltblatt 1 und Faltblatt 2 mit den Resten 151 bis 156 und 159 bis 163 anschließt. Der Beginn von Faltblatt 1 und das Ende von Faltblatt 2 wird über die Disulphidbrücke zwischen Cys 152 und Cys 165 stabilisiert. Es folgt eine ausgedehnte Schleife der Aminosäuren 164 bis 172, welche die beiden antiparallelen Faltblattstränge der Subdomäne 2α verknüpft. Der Schleife folgt Strang 3 und 4 des antiparallelen Faltblatts mit den Aminosäuren 173 bis 177 und 180 bis 183, wobei Faltblatt 3 von $\alpha 2$ neben der Wechselwirkung mit Strang 4 auch mit dem Linker $\lambda 2$ interagiert. Eine Schleife, gebildet von den Resten 184 bis 190, verbindet die Subdomänen α und β . Das darauffolgende Faltblatt 5, von 191 bis 194, wird von einer ausgedehnten Schleife von 195 bis 203 vom Faltblatt 6 getrennt. Auch hier festigt die Disulphidbrücke zwischen Cys 191 und Cys 208 diesen Bereich der Struktur. Über die Verbindungsschleife der Reste 209 bis 215 schließt sich Faltblatt 7 und 8, aufgebaut durch die Aminosäuren 216 bis 220 und 223 bis 227 an. Subdomäne 2γ beginnt mit Faltblatt 9 und umfaßt die Reste 231 bis 235, gefolgt von der Schleife 236 bis 246. Dieser Aminosäureabschnitt bildet den „Boden“ und Tyr 249 das „Dach“ der Galactosebindungsstelle II. Faltblatt 10 besteht aus den Resten 246 bis 249. Das daran anknüpfende Faltblatt 11, mit den Aminosäuren 260 bis 262, stellt den Schluß der Domäne II dar. Beide Stränge des letzten antiparallelen Faltblatts werden durch die lange

Schleife der Reste 250 bis 260 verbunden. Ähnlich zur Domäne I ergänzt die „Linker“-Domäne die Subdomäne 2γ zu einem Sekundärstrukturelement aus vier Faltblättern (Abbildung 13 bzw. 14).

5.1.6. Die Architektur des aktiven Zentrums

Das aktive Zentrum befindet sich in einer Mulde der ansonsten annähernd globulär gestalteten Oberfläche von MLA und wird zum einen von den in RIP Proteinen absolut konservierten Aminosäuren Tyr 76, Tyr 115, Glu 165 und Arg 168 gebildet [53, 54]. Zum anderen bauen die invarianten Aminosäuren Asn 74, Arg 125, Gln 161, Glu 196 und Trp 199 das aktive Zentrum auf. Die aromatischen Seitenketten Tyr 76 aus dem Faltblatt f und Tyr 115, am Beginn der Helix B, sind parallel zueinander orientiert und ragen aus dem aktiven Zentrum (Abbildung 15). Sie ermöglichen eine „stacking interaction“ mit dem Purinring des Adenin 4324 der konservierten GAGA-Schleife der 28S rRNA [55]. Die Elektronendichte der Seitenkette von Tyr 115 ist nur teilweise sichtbar, vor allem das CB bleibt undefiniert, was für die Flexibilität der Seitenkette spricht. Darüber hinaus befindet sich das benachbarte Pro 116 in cis Konformation (Abbildung 15). Den oberen Rand des aktiven Zentrums säumt die Glykosylierungsstelle I der A-Kette, wobei Asn 112 mit NAG Z3 N-glykosidisch verknüpft ist. Das erste Zuckermolekül N-acetyl-Glukosamin der Glykostruktur ist deutlich in der Elektronendichte zu erkennen, die weiteren Zuckereinheiten sind ungeordnet und daher nicht in der Elektronendichte zu erkennen. Der Kohlenhydratanteil von Glykoproteinen hat im allgemeinen keine Funktion bei der katalytischen Aktivität [46], wie für ML-I durch Vergleich der cytotoxischen Aktivität von pflanzlichem und rekombinant hergestelltem festgestellt wurde [56]. Verborgен in der Tiefe der Bindungstasche liegen die katalytisch aktiven Reste Glu 165 und Arg 168, welche der Helix D zuzuordnen sind. Über eine Wasserstoffbrücke ist OH von Tyr 115 und OE2 von Glu 165 verbunden, welches außerdem zu NH1 von Arg 168 verbrückt ist. Darüber hinaus ist die Seitenkette von Arg 168 über NH2 zu O von Asn 74 stabilisiert. Parallel zur Seitenkette von Arg 168 liegt am Boden des aktiven Zentrums die Seitenkette des invarianten Trp 199, welche genau am Beginn der Helix G liegt. Helix G und F liegen verkippt zueinander, und wie Untersuchungen an Deletionsmutanten von Ricin zeigten [57], haben die verkippten Helices eine strukturelle Funktion beim Aufbau des aktiven Zentrums. Die aktiven Aminosäuren Glu 165 und Arg 168 werden dadurch im

aktiven Zentrum entsprechend positioniert. Zwischen den aromatischen Seitenketten von Tyr 76 und Tyr 115 liegen mittig vier Wassermoleküle. Wasser 90 ist über N des Val 77 an das Proteinrückgrat koordiniert, ein weiteres Wasser 226 bindet an Wassermolekül 90. Zentral im aktiven Zentrum liegen unverbrückt die Wassermoleküle 231 und 331. Entsprechend dem für Ricin vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus der Depurinierung des Adenin A4324 der 28S rRNA [55] wird ein aktiviertes Wassermolekül als Nucleophil für die Initiation der Reaktion postuliert. Somit wird eines dieser zentralen Wasser im aktiven Zentrum nach Bindung der Adeninbase die Aufgabe des nucleophilen Agens übernehmen.

Aminosäurerest			Aminosäurerest		Abstand in Å
Tyr 76A	N	→	Asn 74A	O	3.2
Val 77A	N	→	Ow 90	OH2	3.0
Glu 165A	OE1	→	Tyr 115A	OH	3.1
Glu 165A	OE1	→	Arg 168A	NH1	3.1
Arg 168A	NH2	→	Asn 74A	O	2.7
Glu 196A	OE2	→	Tyr 115A	OH	3.2
Ow 90	OH2	→	Ow 226	OH2	3.1

Tabelle 4:

Zusammenstellung der Wasserstoffbrücken im aktiven Zentrum von Mistellektin-I.

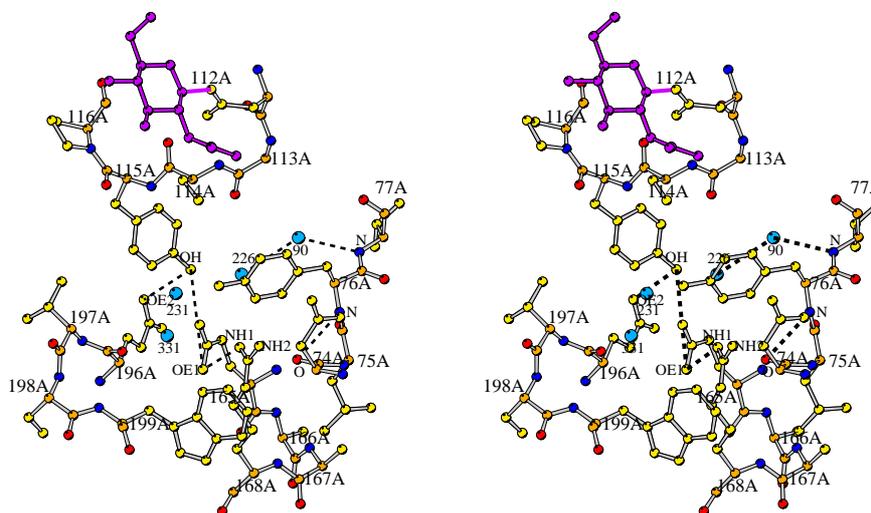


Abbildung 15:

Stereoabbildung des aktiven Zentrums von ML-I. Die katalytisch aktiven Aminosäuren Glu 165 und Arg 168 liegen in der Tiefe des aktiven Zentrums und die aromatischen Reste 76 und 115 weisen in Richtung der zentralen Vertiefung der Tasche. Wasserstoffbrücken sind als schwarz gestrichelte Linien eingezeichnet. Atome, die am Wasserstoffbrückennetzwerk beteiligt sind, wurden markiert.

5.1.7. Isoformen von Mistellektin-I

Die Positionen der Aminosäureaustausche für die untersuchten Isoformen der nativen ML-I Struktur und der mit Lactose- und Galactose- komplexierten ML-I Struktur sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Die Austausche sind durchgehend konservativ und befinden sich bis auf die Aminosäuren in Position 233A und 143A an der Proteinoberfläche. Die höher konservierte B-Kette zeigt im Vergleich zur A-Kette eine geringere Variabilität. Domäne II der A-Kette ist die am höchsten konservierte Domäne bei Vergleich verschiedener RIPs [46], auffälligerweise gilt das auch für die Isoformen von ML-I.

Aminosäure	ML-I nativ	ML-I + Lac	ML-I+Gal	ML-I seq.	Lokalisation
9A	Thr	Val	Val	Thr	Oberfläche, Schleife
27A	Tyr	Phe	Phe	Tyr	Oberfläche, Ende Helix
36A	Asn	Asn	Gln	Glu	Oberfläche, β -Schleife
51A	Ser	Ser	Gln	Gln	Oberfläche, Schleife
64A	Asn	Asp	Asp	Asp	Oberfläche, β -Faltblatt
73A	Ile	Thr	Thr	Thr	Oberfläche, β -Schleife
81A	Gln	Gln	Arg	Gln	Oberfläche, β -Faltblatt
84A	Gln	Gln	Asp	Asp	Oberfläche, β -Schleife
102A	Thr	Ala	Ala	Thr	Oberfläche, Schleife
117A	Gly	Asp	Asp	Asp	Oberfläche, Helix
118A	Asp	Leu	Leu	Leu	Oberfläche, Helix
223A	Pro	Pro	Ser	Pro	Oberfläche, β -Schleife
233A	Ile	Ile	Val	Val	verborgen, Helix
11B	Thr	Ile	Ile	Thr	Oberfläche, β -Faltblatt
86B	Glu	Arg	Arg	Arg	Oberfläche, Schleife
143B	Ile	Thr	Val	Val	verborgen, β -Faltblatt
156B	Ala	Asn	Ala	Asn	Oberfläche, β -Faltblatt
161B	Phe	Trp	Trp	Trp	Oberfläche, β -Faltblatt
243B	Lys	Ala	Ala	Lys	Oberfläche, Schleife
244B	Gly	Ser	Ala	Arg	Oberfläche, Schleife

Tabelle 5:

Zusammenfassung der Aminosäureaustausche und ihrer Lage in den untersuchten Isoformen der nativen-, lactose-komplexierten- und galactose-komplexierten- ML-I Strukturen im Vergleich zur sequenzierten Primärsequenz von ML-I [29, 50]. In Position 243B und 244B ist die Elektronendichte für die Seitenketten teilweise undeutlich, so daß in diesem Abschnitt nur eine eingeschränkte Aussage über die Sequenz getroffen werden kann.

5.1.8. Die Wechselwirkungen an der Grenzfläche zwischen A- und B-Kette

Neben der zur Proteinoberfläche hin exponierten Disulphidbrücke zwischen dem C-Terminus der A-Kette und dem N-Terminus der B-Kette wird das Heterodimer über zahlreiche polare und hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert, welche im Detail in Tabelle 6 zusammengestellt sind. Die Grenzfläche erstreckt sich über einen Bereich von 40 Å. Die

ersten acht N-terminalen Aminosäuren der B-Kette ragen aus dem Grundkörper der B-Kette gestreckt heraus und schmiegen sich rückwertig an die A-Kette an (Abbildung 16). So können die Aminosäuren 1B bis 3B polare Wechselwirkungen zu den Resten 33A und 35A bilden, welche der Disulphidbrücke direkt benachbart sind. Weitere polare Interaktionen an der Grenzfläche zur B-Kette werden über Aminosäuren der Domäne III der A-Kette ermöglicht. Auffällig ist, daß die Wechselwirkungen sich als Cluster über die gesamte Kontaktfläche erstrecken. Die Abbildung 17 zeigt diese Wechselwirkungen in vergrößerter Ansicht. So befinden sich die polaren Wechselwirkungen in Nachbarschaft zur Disulphidbrücke und erstrecken sich über eine Hälfte der Grenzflächenregion gefolgt von hydrophoben Interaktionen auf der anderen Seite. Mit Ausnahme der Wechselwirkung

A-Kette				B-Kette		Abstand in Å
Polare						
Phe	33 A	N	→	Asp	1 B OD1	3.0
Phe	33 A	O	→	Val	3 B N	2.7
Asn	35 A	N	→	Asp	2 B OD1	3.5
Gln	207A	O	→	Cys	5 B N	3.0
Asn	232A	ND2	→	Ala	134B O	3.1
Arg	234A	NH1	→	Trp	132B O	3.1
Arg	234A	NH2	→	Gly	178B O	3.1
Arg	234A	O	→	Arg	141B NH1	3.0
Ile	237A	O	→	Asn	221B ND2	2.7
Leu	240A	O	→	Asn	221B ND2	3.0
Disulphidbrücke						
Cys	247A	SG	→	Cys	5 B SG	2.0
Hydrophobe						
Trp	174A		→	Tyr	146B	
Trp	174A		→	Leu	260B	
Val	213A		→	Ala	134B	
Val	213A		→	Pro	10 B	
Tyr	191A		→	Pro	263B	

Tabelle 6:

Zusammenstellung der polaren und hydrophoben Wechselwirkungen sowie der Disulphidbrücke an der Grenzfläche zwischen A- und B-Kette von Mistellektin-I. Die Abstände für hydrophobe Wechselwirkungen betragen bis 3.9 Å zwischen den C-Atomen der Seitenketten und bis 5 Å zwischen aromatischen Ringen.

zwischen Val 213A und Pro 263B liegen die hydrophoben Interaktionen in der Grenzflächenregion distal zur Disulphidbrücke. Beim Vergleich der Sequenzen (Abbildung 12 a und b) von nativem ML-I zu dem mit Lactose- und Galactose komplexierten ML-I zeigt sich, daß alle Aminosäuren, die an Wechselwirkungen an der Grenzfläche zwischen beiden Ketten beteiligt sind, mit Ausnahme von 263B Phe zu Pro, invariant sind.

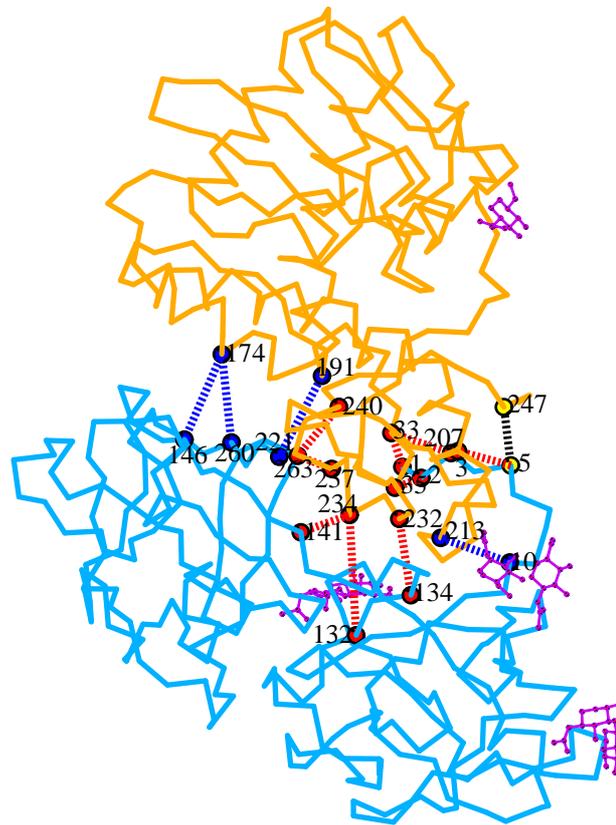


Abbildung 16:

α -Kette von ML-I. Die A-Kette ist orange und die B-Kette blau eingefärbt. α -Positionen der Aminosäuren, welche in der Grenzflächenregion in Wechselwirkung treten, sind nummeriert und farbig markiert, wobei hydrophobe Interaktionen blau, polare rot und die Disulphidbrücke schwarz dargestellt sind. Die Zucker der Glykosylierungsstellen sind rosa als „ball-and-stick“ abgebildet.

5.1.9. Die Glykosylierungsstellen des Mistellektin-I

Die Glykosylierung als solche unterstützt die Löslichkeit von Proteinen [46]. Für ML-I beträgt der Gesamtkohlehydratanteil 10 % (w/w) [46]. Der A-Kette ist in Position Asn 112A eine Oligosaccharidstruktur I ($\text{Man}_3\text{Xyl}_1\text{Fuc}_1\text{GlcNac}_2$) vom Xyklomannosetyp N-glykosidisch angehängt [30], welche als Glykosylierungsstelle I bezeichnet wird. Die Glykosylierungsstelle I begrenzt das aktive Zentrum zu einer Seite. Das 1 \rightarrow 4 verknüpfte β -D- N-acetyl-Glucosamin

der Oligosaccharidstruktur I ist deutlich in der Elektronendichte zu erkennen. Die distal angehängten Zucker sind hingegen hochflexibel und daher in der Elektronendichte nicht definiert. Die B-Kette ist an drei Positionen der Domäne I N-glykosyliert. An die relativ zentral positionierte Glykosylierungsstelle II Asn 61B ist ebenfalls die Oligosaccharidstruktur I geknüpft, wobei hier das über 1→4 verbundene β -D-N-acetyl-Glucosamin mit 1→3 verknüpfter α -L-Fucose in der Elektronendichte sichtbar ist.

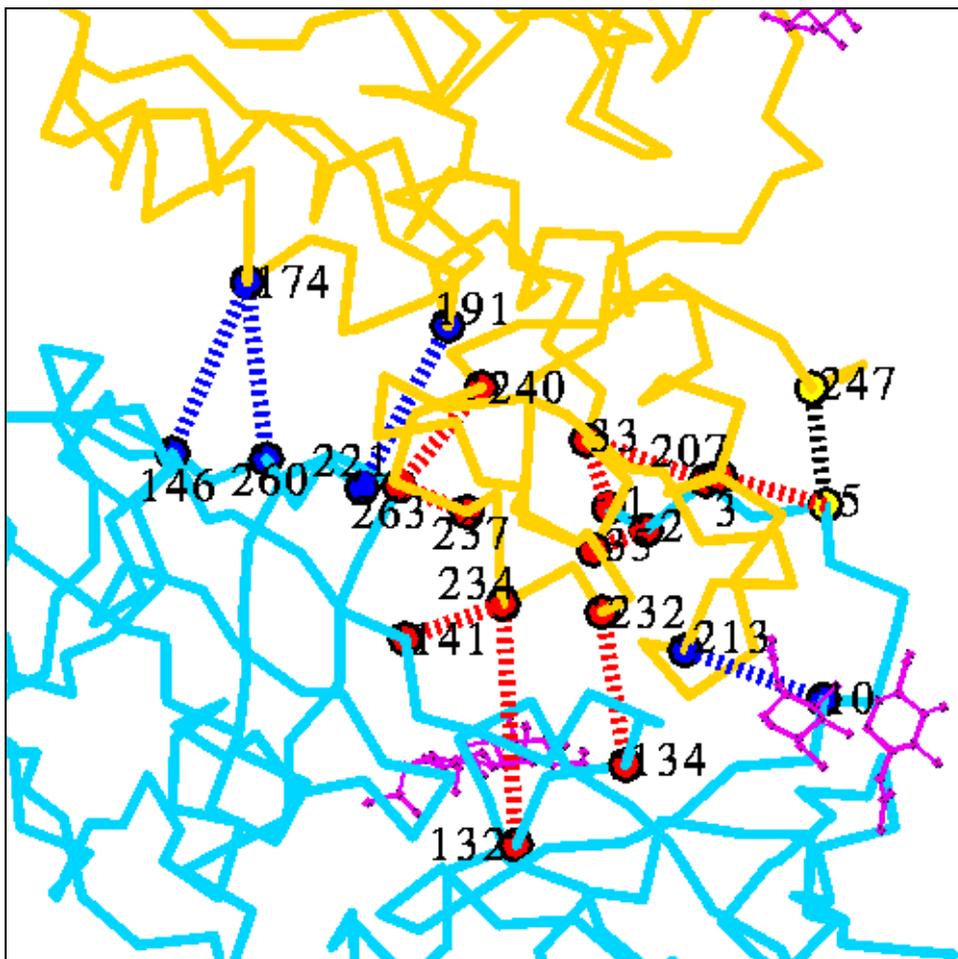


Abbildung 17:

Zoomansicht der Grenzflächenregion von ML-I aus Abbildung 16. $C\alpha$ -Kette von ML-I. Die A-Kette ist orange und die B-Kette blau eingefärbt. Die $C\alpha$ -Positionen der Aminosäuren, welche in der Grenzflächenregion in Wechselwirkung treten, sind nummeriert und farbig markiert, wobei hydrophobe Interaktionen blau, polare rot und die Disulphidbrücke schwarz dargestellt sind. Die Zucker der Glykosylierungsstellen sind in rosa gefärbt.

Die Glykosylierungsstelle III trägt an Position Asn 96B eine Oligosaccharidstruktur II vom Typ ($\text{Man}_6\text{GlcNac}_2$), sichtbar sind hier die β -D-1→4 glykosidisch verbrückten N-acetyl-Glucosaminreste. Die Glykosylierungsstelle IV in Position Asn 136B ist je nach Erntezeitpunkt mit der Oligosaccharidstruktur II oder III vom Typ ($\text{Man}_5\text{GlcNac}_2$) verbunden.

In der Elektronendichte sind ähnlich wie in Glykosylierungsstelle III die zwei proximalen β -D-1 \rightarrow 4 glykosidisch verbrückten N-acetyl-Glucosaminreste sichtbar. Bei genauerer Betrachtung aller Glykosylierungsstellen fällt auf, daß drei von vier der Glykosylierungsstellen längs einer Achse übereinander gestapelt sind. Die Glykosylierungsstelle I der A-Kette ist 47 Å von Glykosylierungsstelle II der B-Kette entfernt und diese wiederum 16 Å von Glykosylierungsstelle IV der B-Kette getrennt liegend. Die Glykosylierungsstelle I hat einen Abstand von 34 Å zu Glykosylierungsstelle IV. Ausgenommen von dieser Anordnung liegt die Glykosylierungsstelle III rückwertig an der B-Kette.

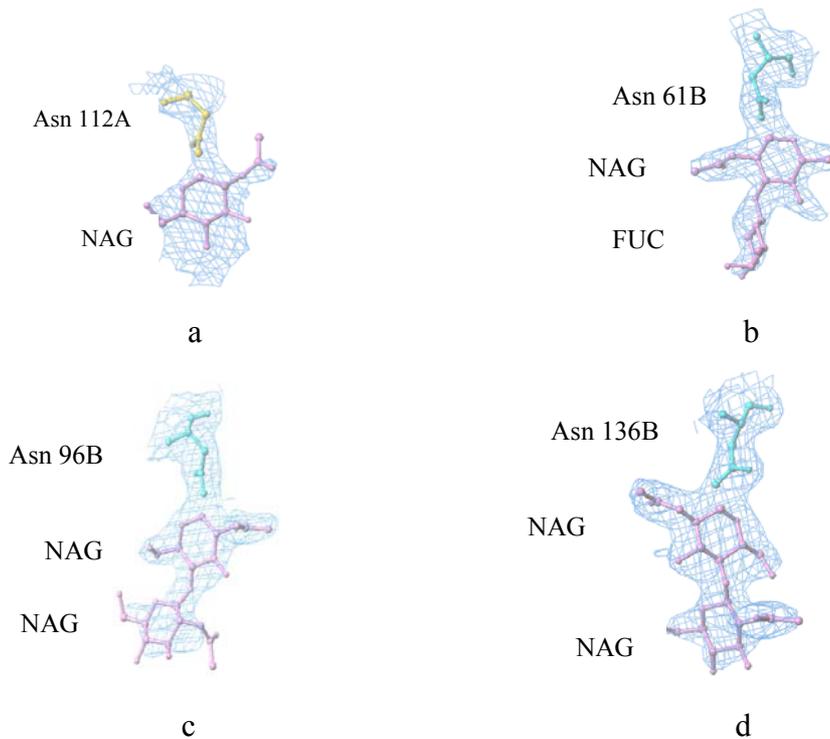


Abbildung 18a:

Glykosylierungsstelle I der A-Kette von ML-I: Asn 112A ist gelb, NAG rosa und die Elektronendichte blau dargestellt. 18b: Glykosylierungsstelle II der B-Kette: Asn 61B ist türkis, N-Acetyl-Glucosamin und Fucose sind rosa und die Elektronendichte blau gefärbt. 18c: Glykosylierungsstelle III der B-Kette: Asn 96B ist türkis, die beiden N-acetyl-Glucosamin sind rosa und die Elektronendichte blau dargestellt. 18d: Glykosylierungsstelle IV der B-Kette: Asn 136B ist türkis, die beiden N-acetyl-Glucosamin sind rosa und die Elektronendichte blau gefärbt.

5.2.1. Die Struktur von Mistellektin-I im Komplex mit Lactose

5.2.1.1. Datensammlung und Reduktion

Von einem mit Lactose kokristallisierten Mistellektin-I Kristall wurde am Meßplatz X11 (HASYLAB, Hamburg) mit einer MAR CCD-Kamera ein Beugungsdatensatz gesammelt. Die verwendete Wellenlänge betrug 0.91 Å. Der Kristall lieferte Beugungsdaten im Auflösungsbereich von 30 bis 2.3 Å, dieser Datensatz ist bis zu 99.6 % vollständig. Zur Datenauswertung wurde das Programmpaket DENZO [39] und SCALEPACK [39] herangezogen. Die Zellkonstanten wurden zu $a = b = 106.28 \text{ Å}$, $c = 312.33 \text{ Å}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$ bestimmt. Das Kristallgitter konnte ebenso wie der native ML-I Datensatz der Raumgruppe $P6_522$ zugeordnet werden. Ausgehend von einem Molekül in der asymmetrischen Einheit beträgt der Packungsparameter $4.1 \text{ Å}^3/\text{Da}$, welches einem Solventanteil von 70 % entspricht.

Raumgruppe	$P6_522$
Zellkonstanten a=b	106.28 Å
Zellkonstante c	312.33 Å
Auflösung	30-2.3 Å
Vollständigkeit	99.6%
Wellenlänge	0.91 Å
Röntgenquelle	X11/HASYLAB
Anzahl aller gemessenen Reflexe	701.222
Anzahl der unique Reflexe	47.510
R_{symm}	4.9 %
R_{symm} (letzte Schale)	36.8 %
V_m	$4.1 \text{ Å}^3/\text{Dalton}$

Tabelle 7:
Zusammenfassung der Datensammlung des ML-I Kristalls aus *Viscum album* im Komplex mit Lactose.

5.2.1.2. Verfeinerung und Güte des Modell von Mistellektin-I in Komplex mit Lactose

Als Ausgangsmodell für die Verfeinerung der mit Lactose komplexierten ML-I Struktur diente das native ML-I Modell. Zur Verfeinerung wurde das Programm CNS [42] verwendet. Der anfängliche R-Wert von 35.9 % sank in den ersten Zyklen der Verfeinerung unter der Verwendung der Daten bis 3.0 Å auf 31.1 %. In den sich anschließenden Zyklen wurden

schrittweise die hochauflösenden Daten bis 2.9 Å und später bis 2.7 Å in den Verfeinerungsprozess mit aufgenommen. Zwischen den Verfeinerungszyklen wurden 2Fo-Fc und Fo-Fc Elektronendichten berechnet. Auf der Basis der Elektronendichteverteilung wurde das Modell mit Hilfe der 3D-Graphik unter Verwendung des Programms TURBO FRODO [43] optimiert, außerdem wurden die Zucker der Glykosylierungsstellen, der Ligand Lactose und Ionen in das Modell eingebracht, wobei der R-Wert auf 26.4 % fiel. Im nächsten Schritt wurden alle Daten bis 2.3 Å in die Verfeinerung mit einbezogen, darüber hinaus wurden

Auflösung (Å)	10.0 – 2.3
R-Faktor/R _{free}	20.6 % (23.2 %)
Anzahl der Proteinatome	3921
Anzahl der Zuckeratome	140
Anzahl der Wasseratome	328
Anzahl anderer Atome	120
mittlerer Fehler der Atomkoordinaten (Å) nach Luzatti	0.27
CNS stereochemische Parameter	
r.m.s. Abweichung von idealen Bindungslängen (Å)	0.010
r.m.s. Abweichung von idealen Bindungswinkeln (°)	1.56
r.m.s. Abweichung von idealen dihydralen Winkeln (°)	25.08
r.m.s. Abweichung von idealen ungewöhnlichen Winkeln (°)	0.97

Tabelle 8:
Datenstatistik des verfeinerten Modells von Mistellektin-I im Komplex mit Lactose.

Wassermoleküle sowie Glycerolmoleküle gemäß der Elektronendichte in das Modell eingebracht. Im weiteren Prozeß der Verfeinerung wurden die Wassermoleküle und die Aminosäureseitenketten mittels Fo-Fc Elektronendichten überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Außerdem wurden individuelle B-Faktoren verfeinert. Die abschließenden Schritte der Verfeinerung wurden im Auflösungsbereich von 10-2.3 Å durchgeführt, der R-Wert sank zum Abschluß der Verfeinerung auf 20.6 %, der R_{free} auf 23.2 %. Aufgrund von schwacher Elektronendichte in flexiblen Molekülbereichen wurde die Seitenkette von Tyr 115A, der β -turn der Schleife von 224A bis 226A und in den C-terminalen Resten 248A und 249A als nicht vollständig besetzte Atomlagen verfeinert. Ferner wurden der N-terminale Rest 6B, zwei Zucker der Glykosylierungsstellen und ein gebundenes Ion mit reduzierter Besetzung verfeinert. Das abschließende ML-I Modell mit dem Liganden Lactose umfaßt 512 Aminosäuren, es enthält 3921 Atome in der A- und B-Kette, 328 Wassermoleküle, 9

Zuckermoleküle, 3 Cl⁻ und 3 SO₄²⁻ Ionen, 1 Dioxan und 15 Glycerolmoleküle. Die fünf C-terminalen Reste der A-Kette sind ungeordnet und fehlen im vorgestellten Modell. Die Güte der Stereochemie wird im Ramachandran Diagramm (Abbildung 20) gezeigt.

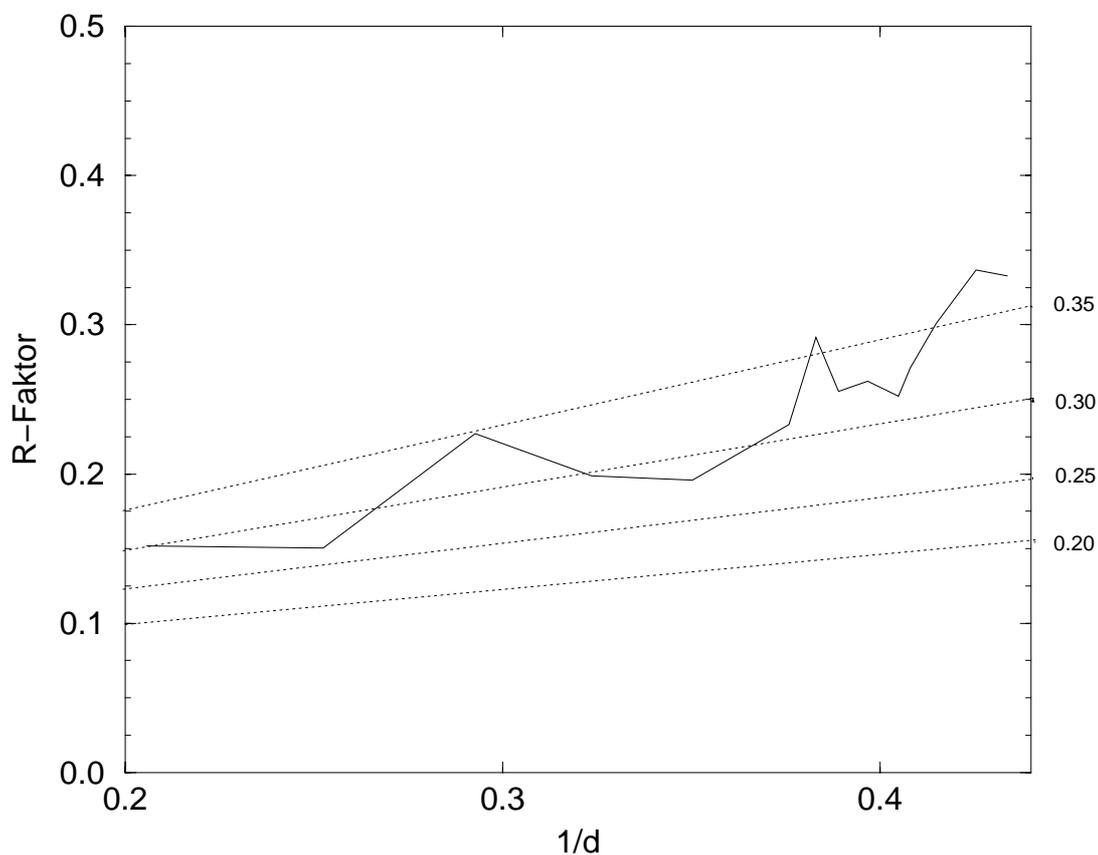


Abbildung 19:
Luzzati-Plot für das verfeinerte Mistellektin-I Modell im Komplex mit Lactose.

88.7 % der dihydralen Winkel liegen in bevorzugten und 11.3 % in erlaubten Regionen und sind in Form von schwarzen Rechtecken dargestellt. Glycin Reste sind als schwarze Dreiecke im Diagramm eingezeichnet. Der Koordinatenfehler wurde nach Luzatti [44] abgeschätzt und beträgt 0.27 Å. Die r.m.s. Abweichung für die Bindungslängen liegt bei 0.010 Å bzw. bei 1.56 Å für die Bindungswinkel.

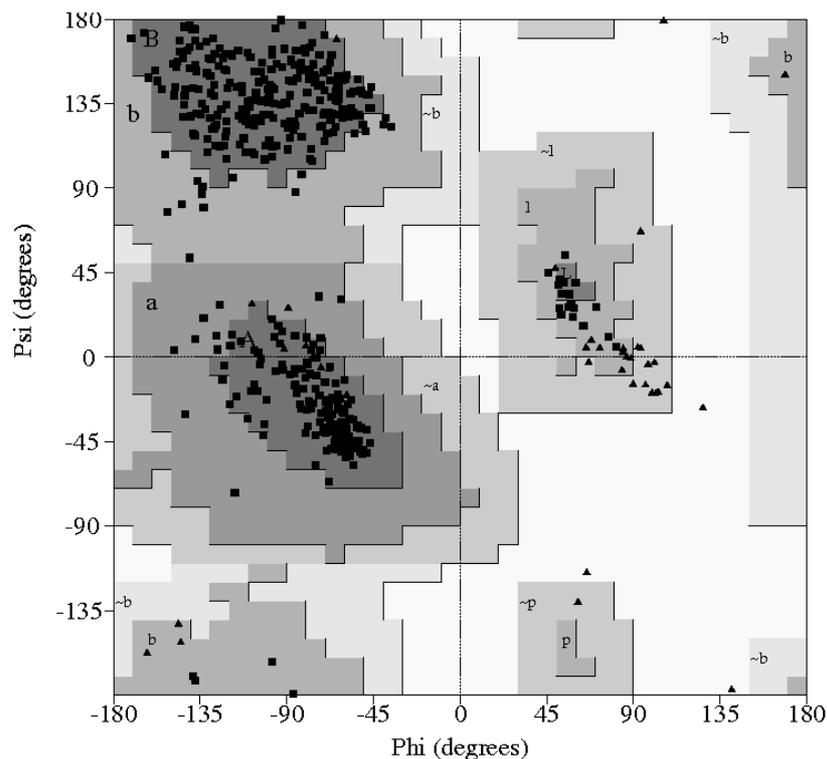


Abbildung 20: Ramachandran-Plot des verfeinerten Mistellektin-I Modells im Komplex mit Lactose.

5.2.1.3. Temperaturfaktoren

Die Aufstellung der Temperaturfaktoren für die A- und B-Kette sowie für die Wassermoleküle, Zucker, Glycerolmoleküle und Ionen wurde mit Hilfe der Programme ACT [40], BAVERAGE [40] und CNS [42] erstellt und ist in Tabelle 9 zusammengestellt. Der durchschnittliche B-Faktor beträgt 38.5 \AA^2 , das entspricht annähernd der Abschätzung des Temperaturfaktors nach Wilson [45] von 35.5 \AA^2 . Der durchschnittliche Temperaturfaktor der Proteinatome liegt relativ hoch, wobei sich die Temperaturfaktoren der Wassermoleküle, Zucker, Liganden und Ionen in Relation zum Protein bewegen. Wie im Fall der nativen ML-I Struktur ermöglicht der hohe Solventanteil im Kristall eine hohe thermische Beweglichkeit. In Abbildung 21 und 22 sind die Temperaturfaktoren für die Hauptkettenatome (schwarz) und für die Seitenkettenatome (rot) für jede einzelne Aminosäure der A- und B-Kette aufgetragen. In der A-Kette zeigen dem Solvent ausgesetzte Schleifen gegenüber α -Helices und β -Faltblättern eine größere Beweglichkeit. Die B-Kette verfügt mit ausschließlich β -Faltblättern als Sekundärstrukturelement über einheitlich verteilte B-Faktoren der Hauptkettenatome.

		mittlerer B-Wert	maximaler B-Wert	minimaler B-Wert
A-Kette	alle Atome	40.6	68.2	24.9
	Hauptkettenatome	40.1	70.5	25.3
	Seitenkettenatome	41.2	77.7	24.3
B-Kette	alle Atome	32.0	61.2	20.7
	Hauptkettenatome	31.4	62.6	20.6
	Seitenkettenatome	32.7	67.1	19.7
Wasser	alle Atome	49.8	80.5	16.4
Zucker	alle Atome	59.4	78.0	31.1
Glycerol, Dioxan	alle Atome	73.3	95.7	38.5
Ionen	alle Atome	79.0	99.9	55.7
Alle Atome		39.0	99.9	16.4

Tabelle 9:
Temperaturfaktoren B [\AA^2] der verfeinerten Struktur von ML-I im Komplex mit Lactose, aufgegliedert für die A- und B-Kette, die Wasser- und Zuckeratome und die Liganden.

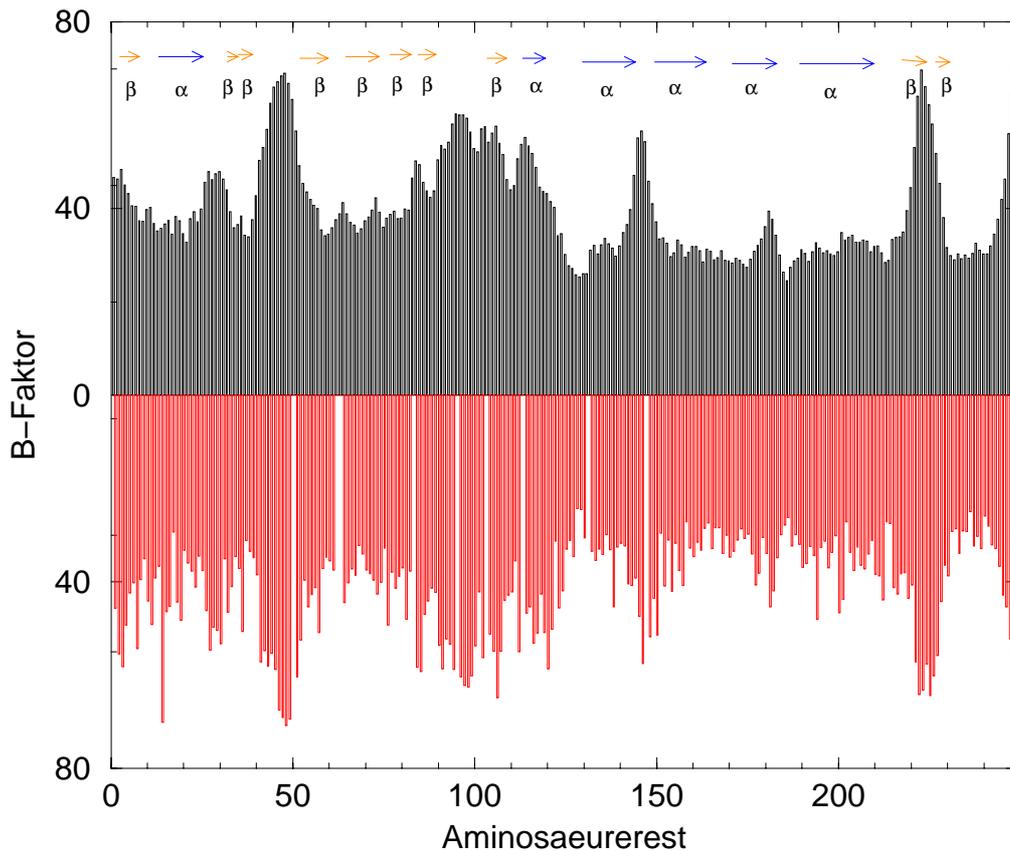


Abbildung 21:
Die Graphik zeigt die Temperaturfaktoren in \AA^2 jeder Aminosäure der A-Kette von ML-I im Komplex mit Lactose aufgegliedert in Hauptkettenatome (schwarz) und Seitenkettenatome (rot). Sequenzabschnitte, die als α -Helix oder als β -Faltblatt vorliegen, sind als blaue bzw. gelbe Pfeile dargestellt.

Es ist auffällig, daß die B-Faktoren der B-Kette insgesamt niedriger sind als die der A-Kette. Die zuckerbindenden Aminosäuren der B-Kette weisen die niedrigsten B-Faktoren auf. Bereiche hoher thermischer Beweglichkeit befinden sich in oberflächenexponierten Regionen wie am C-Terminus der A-Kette und am N-Terminus der B-Kette.

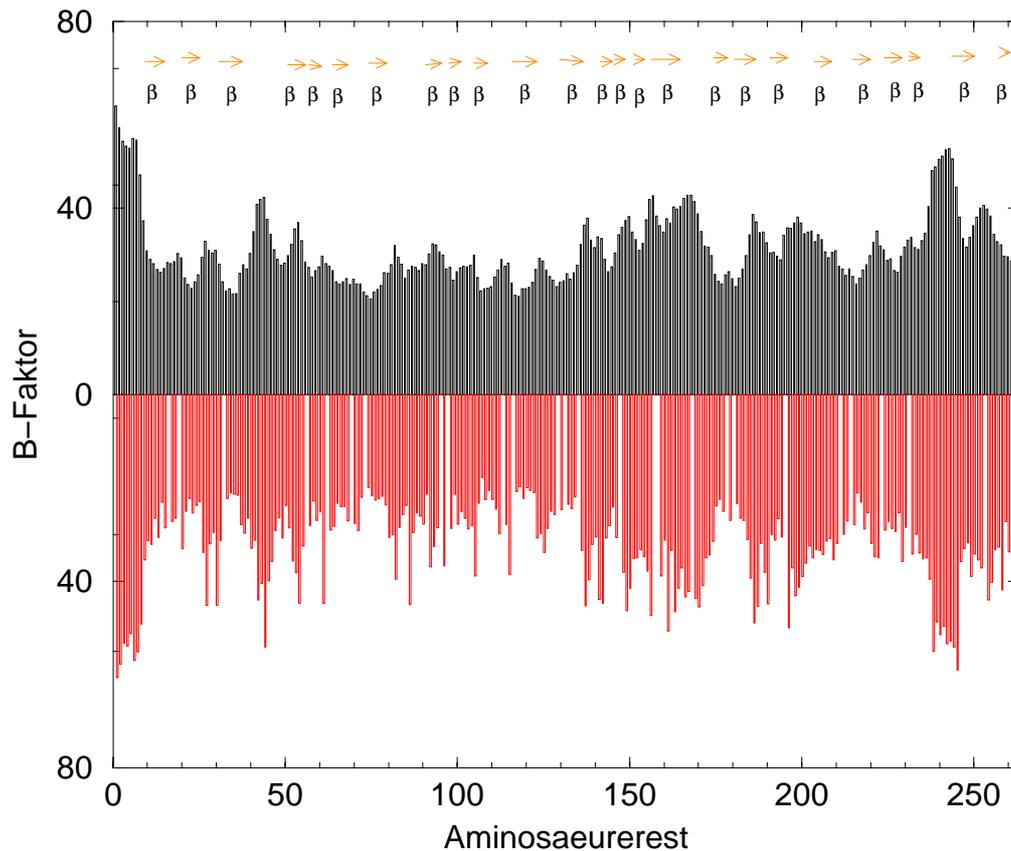


Abbildung 22:

Die Graphik zeigt die Temperaturfaktoren in \AA^2 jeder Aminosäure der B-Kette von ML-I im Komplex mit Lactose aufgegliedert in Hauptkettenatome (schwarz) und Seitenkettenatome (rot). Sequenzabschnitte, die als β -Faltblatt vorliegen, sind als gelbe Pfeile dargestellt.

5.2.2. Struktur von Mistellektin-I im Komplex mit Galactose

5.2.2.1. Datensammlung und Datenreduktion

Von Kristallen des Mistellektin-I im Komplex mit Galactose wurde am Meßplatz X11 (HASYLAB, Hamburg) ein Beugungsdatensatz gesammelt. Der Meßplatz ist mit einer MAR CCD-Kamera als Detektor ausgestattet. Für die Messung wurde eine Wellenlänge von 0.91 Å verwendet. Die Daten sind im Auflösungsbereich von 30 bis 2.3 Å zu 96.3 % vollständig. Die Datenauswertung erfolgte mit dem Programmpaket DENZO [39] und SCALEPACK [39]. Es wurde die Einheitszelle mit den Zellkonstanten $a = b = 106.83 \text{ Å}$ und $c = 310.95 \text{ Å}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$ bestimmt. Der Datensatz des mit Galactose komplexierten ML-I konnte, wie der native Datensatz, der Raumgruppe P6₅22 zugeordnet werden. Ausgehend von einem Molekül in der asymmetrischen Einheit beträgt der Packungsparameter $4.0 \text{ Å}^3/\text{Dalton}$, das entspricht einem Solventanteil von 70 %.

Raumgruppe	P6 ₅ 22
Zellkonstanten a=b	106.83 Å
Zellkonstante c	310.95 Å
Auflösung	30-2.3 Å
Vollständigkeit	96.3 %
Wellenlänge	0.91 Å
Röntgenquelle	X11/HASYLAB
Anzahl aller gemessenen Reflexe	525.723
Anzahl der unique Reflexe	47.779
R _{symm}	4.8 %
R _{symm} (letzte Schale)	42.3 %
V _m	4.0 Å ³ /Dalton

Tabelle 10:
Zusammenfassung der Datensammlung des ML-I Kristalls aus *Viscum album* im Komplex mit Galactose.

5.2.2.2. Verfeinerung und Güte des Modells

Als Ausgangsmodell für die Verfeinerung der mit Galactose komplexierten ML-I Struktur diente das mit Lactose komplexierte ML-I Modell. Die Verfeinerung wurde mit Hilfe des Programms CNS [42] durchgeführt. Für alle Daten im Bereich von 26 – 3.2 Å fiel der anfängliche R-Faktor von 38.6 % in den ersten Zyklen der Verfeinerung auf 28.0 %.

Schrittweise wurden die hochauflösenden Daten bis 2.5 \AA in den Verfeinerungsprozeß mit aufgenommen. Nach jedem Rechenzyklus wurde das Modell mittels $2F_o - F_c$ und $F_o - F_c$ berechneten Elektronendichten unter Zuhilfenahme der Programms TURBO FRODO [43] interaktiv geprüft und optimiert. Gemäß der Elektronendichteverteilung wurde nun der Ligand Galactose in die Zuckerbindungsstellen, die Zucker der Glykosylierungsstellen und 45 Wassermoleküle in das Modell integriert. Der R-Faktor reduzierte sich danach auf 26.6 %. Die Verfeinerung wurde auf den Datenbereich zwischen 26 bis 2.3 \AA ausgedehnt, ferner wurden die in der Elektronendichte identifizierten Ionen, weitere Zucker der Glykosylierungsstellen und Wassermoleküle in das Modell eingefügt. Folgend reduzierte sich der R-Faktor zu 24.7 %.

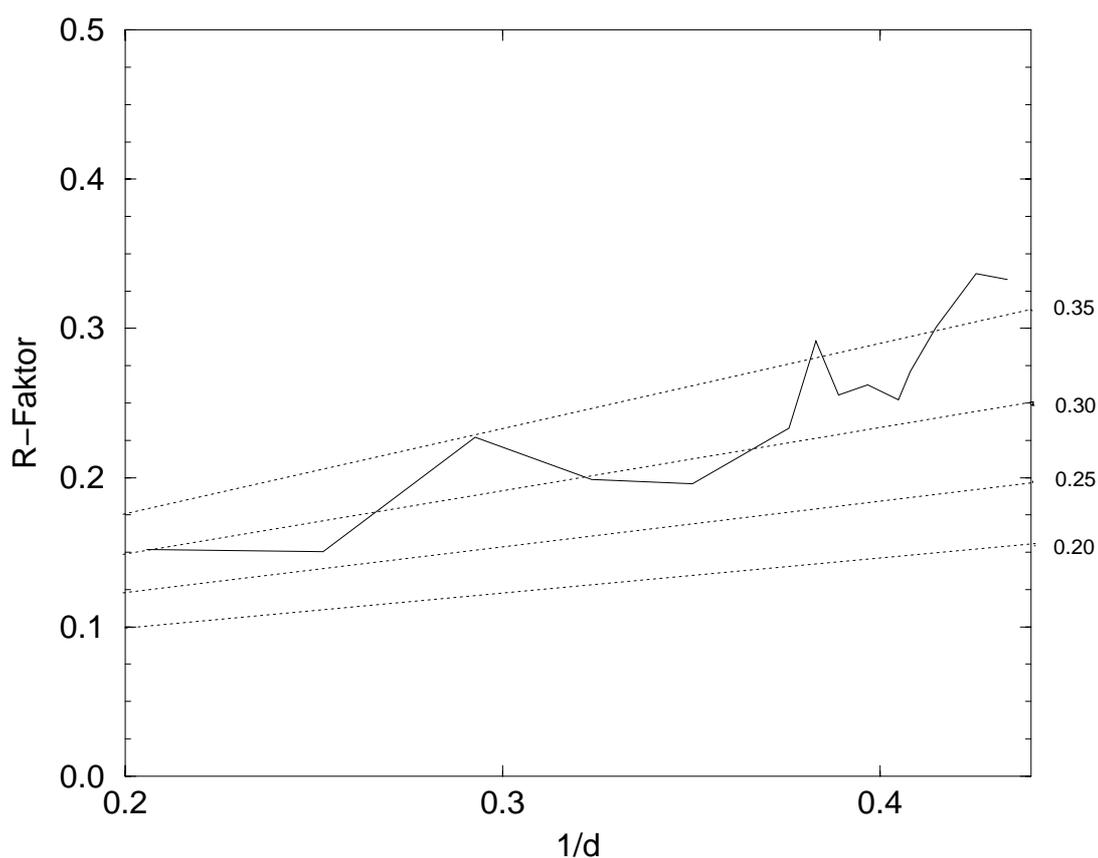


Abbildung 23: Luzatti-Plot für das verfeinerte ML-I Modell komplexiert mit Galactose.

Die in der Elektronendichte abweichenden Aminosäuren wurden durch die in der vorliegenden Isoform ersetzt, Wassermoleküle wurden aus dem Modell entfernt, sowie individuelle B-Faktoren verfeinert. Nach abschließenden Verfeinerungszyklen in Kombination mit Prüfung des Modells mittels 3D Graphik fiel der R-Faktor im Auflösungsbereich von 10 bis 2.3 Å auf 20.9 % (R_{free} 24.6 %). Ungeordnete Elektronendichte in Bereichen hoher Flexibilität des Modells zeigte sich für die Seitenkette von Arg 177A, die C-terminalen Aminosäuren 248A und 249A, in der N-terminalen Aminosäure 6B sowie für die Zucker NAG 6 und FUC 7 der Glykosylierungsstellen und den Ionen Cl^- 26 und SO_4^{2-} 28, so daß diese Atomlagen in der Besetzungszahl reduziert wurden. Alle übrigen Atome des ML-I Modells komplexiert mit Galactose wurden als vollständig besetzte Atomlagen verfeinert. Das fertige Modell enthält 512 Aminosäuren, die fünf C-terminalen Reste der A-Kette konnten aufgrund der mangelnden Elektronendichte, bedingt durch die hohe Flexibilität in diesem Molekülbereich, nicht in das Modell eingepaßt werden. Das fertige Modell im Komplex mit Galactose hat 3918 Atome in der A- und B-Kette, 361 Wassermoleküle, 9 Zuckermoleküle, 2 Cl^- und 2 SO_4^{2-} Ionen sowie 15 Glycerolmoleküle. Insgesamt umfaßt das Modell 4505 Atome. Die Güte des Modells im Hinblick auf die Stereochemie wird im

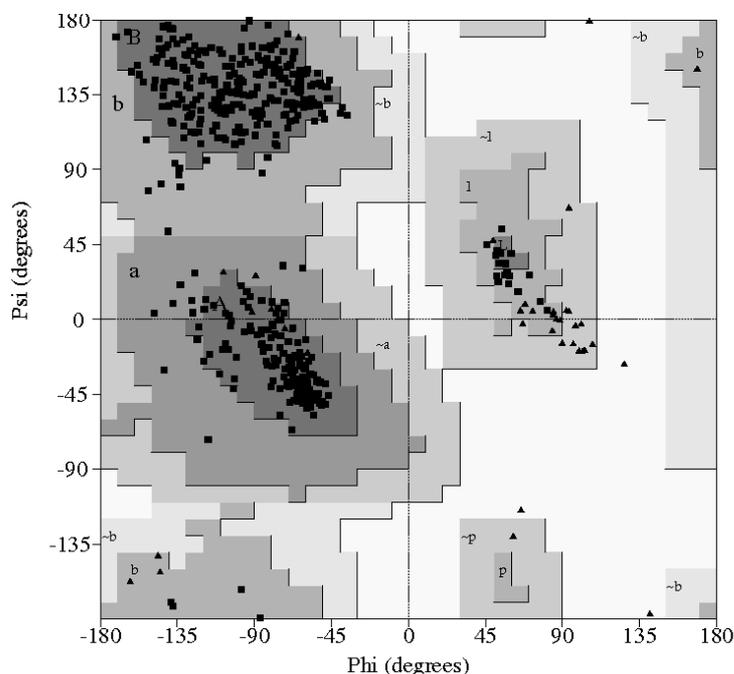


Abbildung 24:
Ramachandran-Plot des verfeinerten ML-I Modells im Komplex mit Galactose.

Ramachandran Diagramm (Abbildung 24) gezeigt. 88.0 % der dihydralen Winkel liegen in bevorzugten und 12.0 % in erlaubten Regionen und sind in Form von schwarzen Rechtecken

dargestellt. Glycin Reste sind als schwarze Dreiecke im Diagramm eingezeichnet. Der Koordinatenfehler wurde mit Hilfe der Methode nach Luzatti [44] abgeschätzt und beträgt 0.29 Å. Die r.m.s. Abweichung für die Bindungslängen liegt bei 0.009 Å und bei 1.57 Å für die Bindungswinkel.

Auflösung (Å)	10.0 – 2.3
R-Faktor/R _{free}	20.9 % (24.6 %)
Anzahl der Proteinatome	3918
Anzahl der Zuckeratome	118
Anzahl der Wasseratome	361
Anzahl anderer Atome	108
mittlerer Fehler der Atomkoordinaten (Å) nach Luzatti	0.29
CNS stereochemische Parameter	
r.m.s. Abweichung von idealen Bindungslängen (Å)	0.009
r.m.s. Abweichung von idealen Bindungswinkeln (°)	1.57
r.m.s. Abweichung von idealen dihydralen Winkeln (°)	25.1
r.m.s. Abweichung von idealen ungewöhnlichen Winkeln (°)	0.87

Tabelle 11:

Datenstatistik des verfeinerten Modells von Mistellektin-I im Komplex mit Galactose.

5.2.2.3. Temperaturfaktoren

Eine Aufstellung über die mittleren, maximalen und minimalen Temperaturfaktoren jeweils für die A- und B-Kette, die Wasser- und Zuckeratome sowie die Liganden aus dem Kristallisations- bzw. Cryo- Puffer wurde mit Hilfe der Programme ACT [40], BAVERAGE [40] und CNS [42] angefertigt und in Tabelle 12 zusammengefaßt. Der durchschnittliche B-Faktor für die A-Kette liegt bei 41.9 Å², der für die B-Kette bei 34.2 Å². Diese für verfeinerte Proteinstrukturen vergleichsweise hohen Temperaturfaktoren werden auch durch die Abschätzung nach Wilson mit 40.7 Å² bestätigt [45]. Bezogen auf die B-Faktoren der A- und B-Kette liegen die thermischen Parameter der Wasser und Zucker und Liganden in Relation zum Proteinanteil. Die hohe thermische Beweglichkeit der Atome ist wie bei der nativen Struktur von ML-I auf den hohen Gehalt an Lösungsmittel von 70 % im Kristall zurückzuführen. In Abbildung 25 und 26 sind die Temperaturfaktoren für Hauptkettenatome (schwarz) und Seitenkettenatome (rot) für jede Aminosäure der A- und B-Kette von ML-I aufgetragen. Die B-Faktoren der B-Kette sind insgesamt niedriger als die der A-Kette. Hohe

		mittlerer B-Wert	maximaler B-Wert	minimaler B-Wert
A-Kette	alle Atome	41.9	75.5	27.6
	Hauptkettenatome	41.5	75.9	28.8
	Seitenkettenatome	42.4	76.0	25.8
B-Kette	alle Atome	34.2	70.4	23.8
	Hauptkette	33.7	70.9	22.9
	Seitenketten	34.9	71.0	22.4
Wasser	alle Atome	54.2	91.5	22.8
Zucker	alle Atome	59.3	87.3	32.0
Glycerol, Dioxan	alle Atome	72.1	98.5	40.8
Ionen	alle Atome	76.4	91.7	68.7
Alle Atome		40.7	98.5	22.4

Tabelle 12:
Temperaturfaktoren B [\AA^2] der verfeinerten Struktur von ML-I im Komplex mit Galactose, aufgegliedert für die A- und B-Kette, die Wasser- und Zuckeratome und die Liganden.

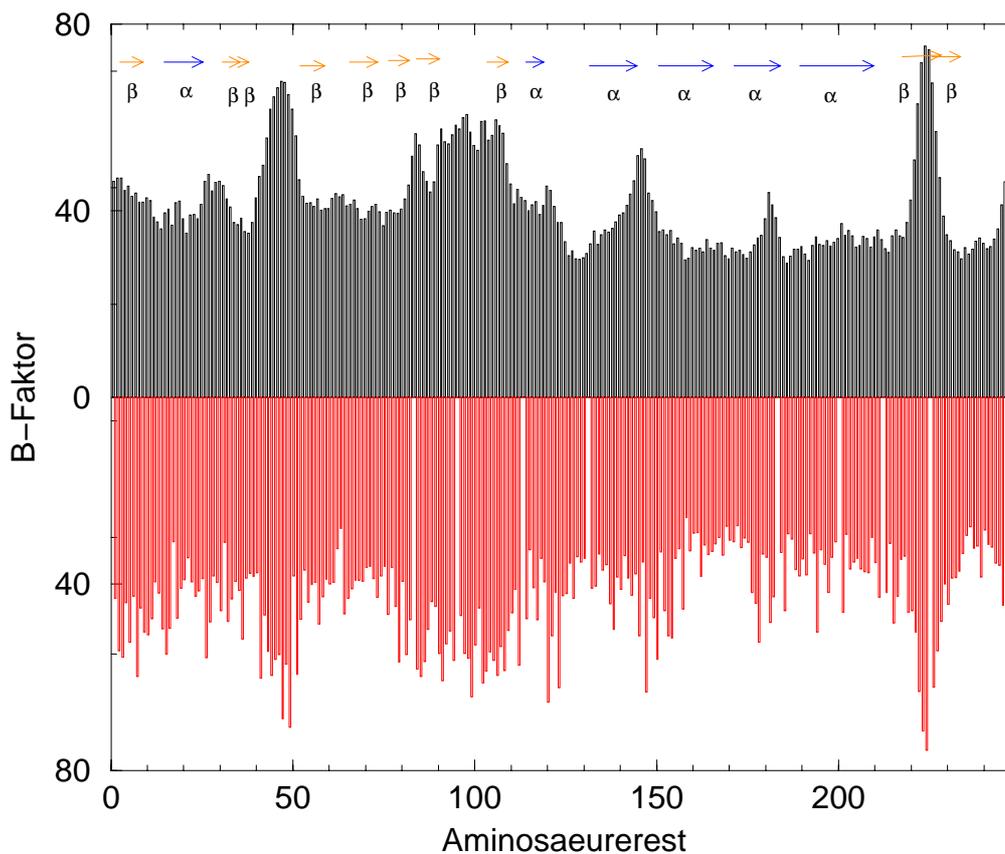


Abbildung 25:
Die Graphik zeigt die Temperaturfaktoren in \AA^2 jeder Aminosäure der A-Kette von ML-I im Komplex mit Galactose aufgegliedert in Hauptkettenatome (schwarz) und Seitenkettenatome (rot). Sequenzabschnitte, die als α -Helix oder als β -Faltblatt vorliegen, sind als blaue bzw. gelbe Pfeile dargestellt.

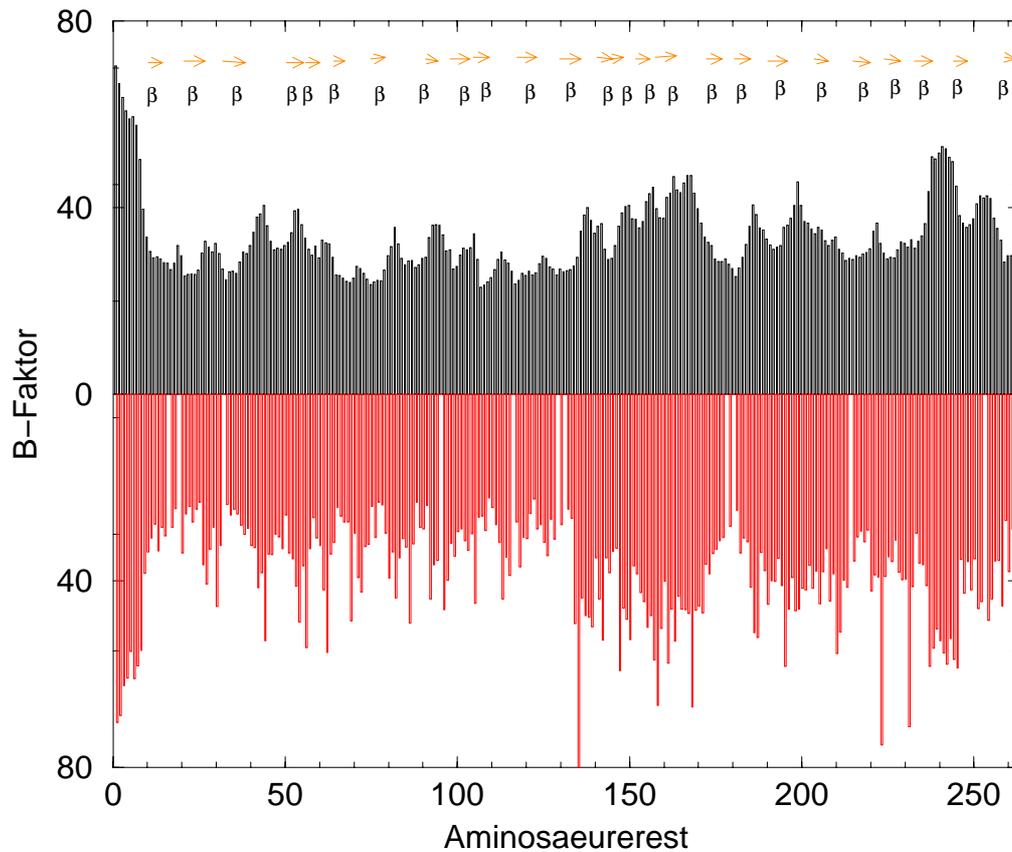


Abbildung 26:

Die Graphik zeigt die Temperaturfaktoren in \AA^2 jeder Aminosäure der B-Kette von ML-I im Komplex mit Galactose aufgegliedert in Hauptkettenatome (schwarz) und Seitenkettenatome (rot). Sequenzabschnitte, die als β -Faltblatt vorliegen, sind als gelbe Pfeile dargestellt.

thermische Beweglichkeit findet sich im oberflächenexponierten C-Terminus der A-Kette und am N-Terminus der B-Kette. In der A-Kette zeigen dem Solvent ausgesetzte Schleifen gegenüber α -Helices und β -Faltblättern größere Beweglichkeit. Die B-Kette verfügt mit ausschließlich β -Faltblättern als Sekundärstrukturelement über einheitlich verteilte B-Faktoren der Hauptkettenatome, wobei die zuckerbindenden Aminosäuren die niedrigsten thermischen Parameter aufweisen.

5.2.3. Die Architektur der Zuckerbindungsstelle I im Komplex mit Lactose bzw. Galactose

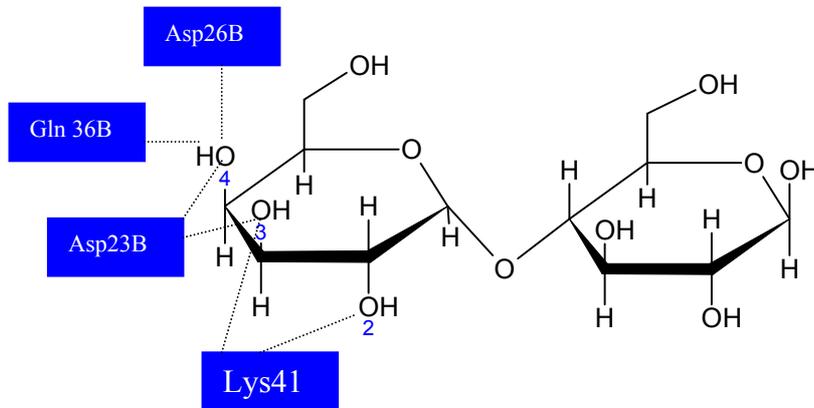


Abbildung 27a:
Schemazeichnung der Wechselwirkungen zwischen zuckerbindenden Aminosäuren der Zuckerbindungsstelle I und Lactose. Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien angedeutet.

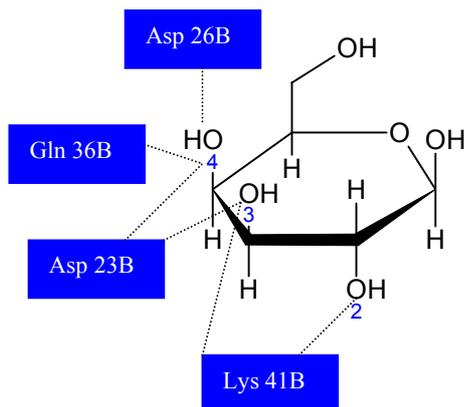


Abbildung 27b:
Schemazeichnung der Wechselwirkungen zwischen zuckerbindenden Aminosäuren der Zuckerbindungsstelle I und Galactose. Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien angedeutet.

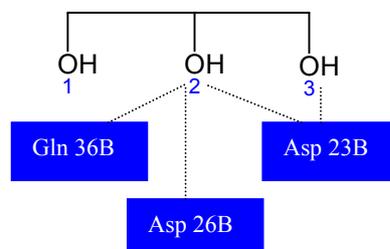


Abbildung 27c:
Schemazeichnung der Wechselwirkungen zwischen zuckerbindenden Aminosäuren der Zuckerbindungsstelle I und Glycerol. Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien angedeutet.

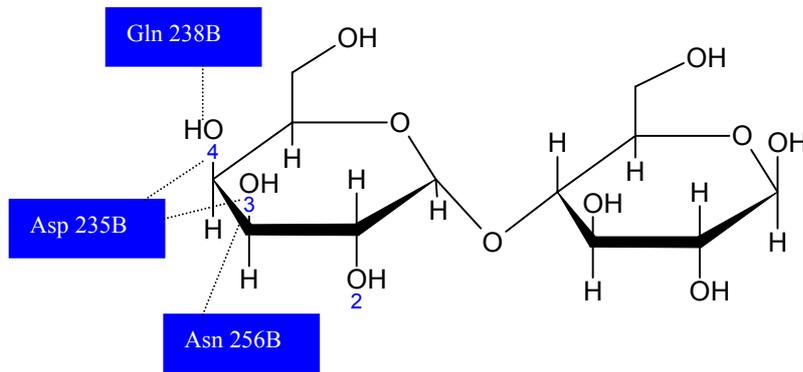


Abbildung 28a:
Schemazeichnung der Wechselwirkungen zwischen zuckerbindenden Aminosäuren der Zuckerbindungsstelle II und Lactose. Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien angedeutet.

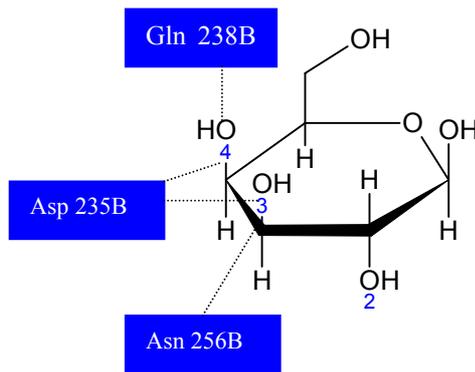


Abbildung 28b:
Schemazeichnung der Wechselwirkungen zwischen zuckerbindenden Aminosäuren der Zuckerbindungsstelle II und Galactose. Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien angedeutet.

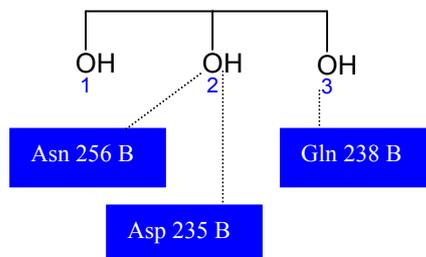


Abbildung 28c:
Schemazeichnung der Wechselwirkungen zwischen zuckerbindenden Aminosäuren der Zuckerbindungsstelle II und Glycerol. Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien angedeutet.

Mistellektin-I gehört zur Klasse II der Lektine, welche durch strukturell ausgeprägte Zuckerbindungsstellen charakterisiert werden [22]. ML-I erkennt und bindet spezifisch β -D-Galactose [58]. Die Zuckerbindungsstellen in ML-I verfügen über geeignete Wasserstoffbrückendonoren zur epimeren-spezifischen Wechselwirkung mit den axial-äquatorial konformierten 4-hydroxyl- und 3-hydroxyl-Gruppen der Galactose (Abbildung 27 und 28). Die Zuckerbindungsstelle I in Subdomäne α 1 von MLB wird von dem zentral angeordneten Asp 23B, seitlich von Gln 36B und Lys 41B und am „Boden“ vom Tripeptid Asp23B – Val 24B – Arg 25B gebildet (Abbildung 29). Dieser Bereich bildet über Wechselwirkungen zu benachbarten Hauptkettenatomen eine stark gekrümmte Schleife. Trp 38B stellt eine hydrophobe Plattform oberhalb des gebundenen Zuckerrings in Form einer „stacking interaction“ dar. Der Winkel, der sich über die planare Seitenkette von Trp 38B und die Ebene zwischen C1 und C4 der Galactose ergibt, beträgt 19.4° . In der mit Lactose

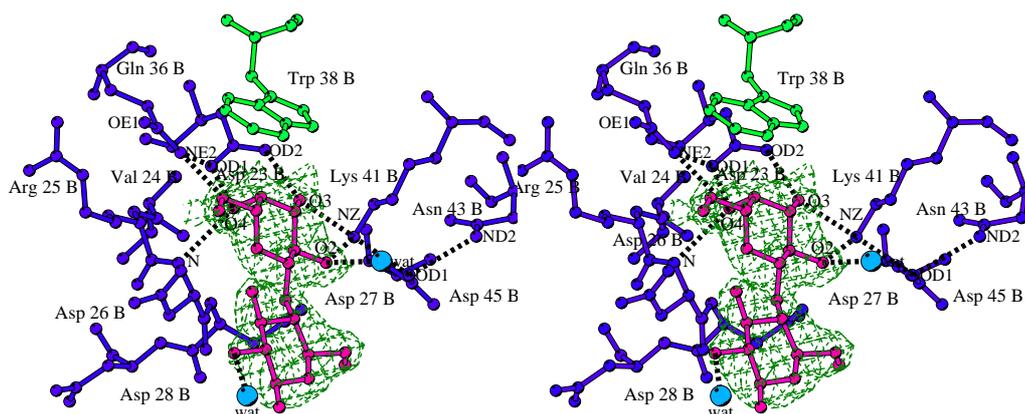


Abbildung 29:

Stereoabbildung der Zuckerbindungsstelle I von ML-I im Komplex mit Lactose. Die Lactose ist in rot der Elektronendichte überlagert. Die aromatische Aminosäure Trp 38B ist in grün, Wassermoleküle in hellblau und die übrigen Aminosäuren der Zuckerbindungsstelle in blau dargestellt. Wasserstoffbrücken sind als schwarz gestrichelte Linien angedeutet.

Rest	Atom			Rest	Atom			Abstand in Å
Asp 23	B	OD1	→	Gal	O4			2.6
Asp 23	B	OD2	→	Gal	O3			2.6
Asp 26	B	N	→	Gal	O4			3.0
Gln 36	B	NE2	→	Gal	O4			3.1
Lys 41	B	NZ	→	Gal	O3			2.9
Lys 41	B	NZ	→	Gal	O2			2.7
Wat 135	I	OW	→	Gal	O2			3.1
Wat 176	I	OW	→	Glu	O2			3.2
Asp 23	B	OD1	→	Gln 36	B	NE2		2.9
Lys 41	B	NZ	→	Asp 45	B	OD1		2.7
Asn 43	B	ND2	→	Asp 45	B	OD1		3.0
Asp 23	B	O	→	Arg 25	B	N		3.2
Val 24	B	O	→	Asp 26	B	N		3.4
Arg 25	B	O	→	Asp 27	B	N		3.0

Tabelle 13:

Zusammenstellung der Wasserstoffbrücken zwischen den zuckerbindenden Aminosäuren und Lactose sowie der Wechselwirkungen, welche die Architektur der Zuckerbindungsstelle stabilisieren.

ML-I Struktur beträgt dieser Winkel 33.4° . Das zentral angeordnete Asp 23B geht mit seiner planaren Seitenkette Wasserstoffbrücken mit der 4'OH und 3'OH-Gruppe der Galactose bzw. mit dem Galactosylanteil der Lactose ein. Asp 23B vermittelt die ideale Geometrie für einen optimalen Abstand zwischen den Hydroxylgruppen des Zuckers von etwa 2.8 \AA [59]. Die Seitenkette von Asp 23B bildet die stärksten (kürzesten) Wasserstoffbrücken zum Zucker aus und formiert mit den übrigen zuckerbindenden Resten eine polare Umgebung, welche der Zuckerbindung dienlich ist [60]. MLB bindet durch NE2 von Gln 36B und N von Asp 26B an die 4'OH Gruppe von Galactose bzw. den Galactoserest von Lactose. Weiterhin bildet NZ von Lys 41B Wasserstoffbrücken zur 3' und 2' Hydroxylgruppe der Pyranose und stabilisiert zusätzlich die Zucker-Lektin Interaktion. Eine Integration der 2'OH-Gruppe des Zuckerrings in die Wechselwirkungen mit dem Lektin wurde nicht beobachtet. Eine H-Brücke zwischen Asp 45B OD1 und Lys 41 NZ orientiert dieses in seiner Ausrichtung zur Galactose. Die Seitenkette von Asp 45B wird durch die Interaktion mit Asn 43B ND2 entsprechend positioniert. Außerdem wird die Position der Seitenkette von Gln 36B durch eine Wasserstoffbrücke zwischen Asp 23B OD1 und Gln 36B NE2 stabilisiert. In der mit Galactose komplexierten ML-I Struktur bindet ein Wassermolekül an 1-Hydroxyl-Gruppe des Zuckers sowie an NE1 von Trp 38B. Im Gegensatz dazu koordiniert ein Wassermolekül an die 2' OH-Gruppe des Glycosylanteils der Lactose und eines an die 2'OH-Gruppe der Galactosylgruppe der Lactose.

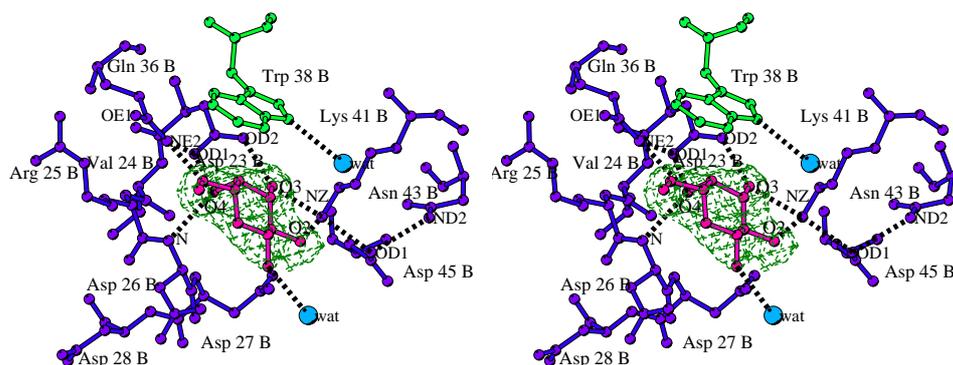


Abbildung 30:

Stereoabbildung der Zuckerbindungsstelle I im Komplex mit Galactose. Die Galactose ist in rot der Elektronendichte überlagert. Die aromatische Aminosäure Trp 38B ist in grün, Wassermoleküle in hellblau und die übrigen Aminosäuren der Zuckerbindungsstelle sind in blau dargestellt. Wasserstoffbrücken sind als schwarz gestrichelte Linien angedeutet.

Rest	Atom		Rest	Atom	Abstand in Å
Asp 23 B	OD1	→	Gal	O4	2.6
Asp 23 B	OD2	→	Gal	O3	2.6
Asp 26 B	N	→	Gal	O4	2.9
Gln 36 B	NE2	→	Gal	O4	3.1
Lys 41 B	NZ	→	Gal	O3	3.0
Lys 41 B	NZ	→	Gal	O2	3.0
Wat 273 I	OW	→	Gal	O1	3.1
Asp 23 B	OD1	→	Gln 36 B	NE2	3.0
Lys 41 B	NZ	→	Asp 45 B	OD1	2.7
Asn 43 B	ND2	→	Asp 45 B	OD1	2.9
wat 272 I	OW	→	Trp 38 B	NE1	3.1
Asp 23 B	O	→	Arg 25 B	N	3.2
Val 24 B	O	→	Asp 26 B	N	3.1
Arg 25 B	O	→	Asp 27 B	N	3.0

Tabelle 14:

Zusammenstellung der Wasserstoffbrücken zwischen den zuckerbindenden Aminosäuren der Zuckerbindungsstelle I und Galactose sowie der Wechselwirkungen, die die Architektur der Zuckerbindungsstelle stabilisieren.

5.2.4. Die Architektur der Zuckerbindungsstelle II im Komplex mit Lactose bzw. Galactose

Die Zuckerbindungsstelle II in Subdomäne 2 γ von ML-I verfügt über eine ähnliche Architektur wie Subdomäne 1 α . Die Hauptwechselwirkungen zur epimerspezifischen Bindung von Galactose bzw. Lactose gleichen sich, obwohl sich die zuckerbindenden Aminosäuren

unterscheiden. Im Zentrum der Bindungstasche befindet sich Asp 235B, welches über eine Wasserstoffbrücke des OD2 zu NE2 von Gln 257B ausgerichtet wird. Den „Boden“ der Zuckerbindungsstelle II bildet das Tripeptid Asp-Val-Ala, 235B-236B-237B, welches durch Wechselwirkungen zwischen Hauptkettenatomen von Nachbaraminosäuren eine starr gekrümmt Schleife ausbildet (Abbildung 31 und 32). Entsprechend zu Zuckerbindungsstelle I interagiert das zentrale Asp 235B über OD1 mit der 4‘Hydroxylgruppe der Galactose bzw. dem Galactosylanteil der Lactose und über OD2 mit der 3‘Hydroxylgruppe. Die 4-Hydroxyl-Gruppe der Galactose bzw. des Galactoserestes der Lactose bindet an Gln 238B N, während die 3-Hydroxyl-Gruppe mit ND2 von Asn 256B eine H-Brücke bildet. Ein Wassermolekül ist zusätzlich an das OD1 des Asn 256B gebunden. Am oberen Rand formt die Seitenkette von Tyr 249B das hydrophobe Interface zum aromatischen „stacking“ mit dem gebundenen Zuckerring. Auch für diese Bindung ist der Galactosering im Vergleich zur Ebene der aromatischen Seitenkette verkippt und schließt in der mit Galactose komplexierten ML-I Struktur einen Winkel von 29.2° ein. Der Galactoserest der Lactose bildet zur Ebene von Tyr 249B den nahezu identischen Winkel von 29.6° . Zusätzlich ist ein Wassermolekül an die 6‘OH-Gruppe der Galactose gebunden.

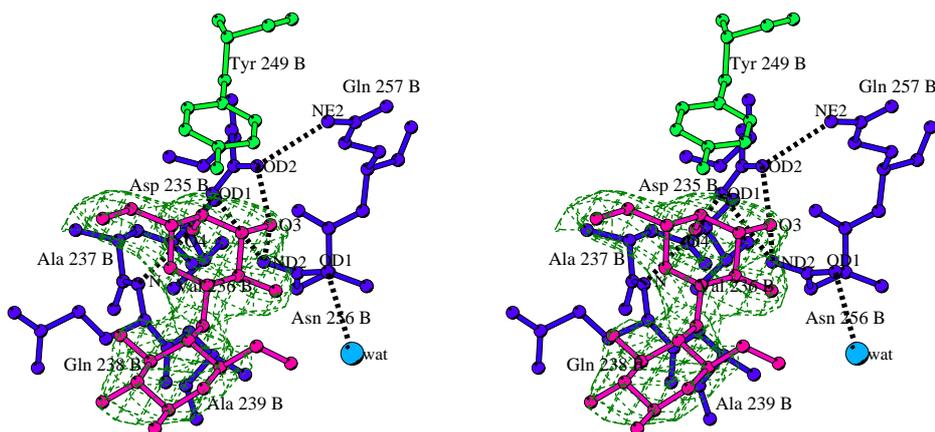


Abbildung 31:

Stereoabbildung der Zuckerbindungsstelle II im Komplex mit Lactose. Die Lactose ist in rot der Elektronendichte überlagert. Die aromatische Aminosäure Trp 249B ist in grün, das Wassermolekül in hellblau und die übrigen Aminosäuren der Zuckerbindungsstelle in blau dargestellt. Die Wasserstoffbrücken sind als schwarz gestrichelte Linien angedeutet.

Im Gegensatz zu der Galactosebindungsstelle I werden in der Bindungsstelle II keine Wechselwirkungen zwischen dem Lektin und der 2‘OH-Gruppe des Zuckers ausgebildet.

Insgesamt werden weniger Interaktionen zwischen dem Zucker und MLB beobachtet. Ähnlich zur Galactose-Bindungsstelle I koordiniert ein Wassermolekül an die 1-Hydroxyl-Gruppe der Galactose in Zuckerbindungsstelle I, während an die Lactose kein Wassermolekül bindet.

Rest	Atom		Rest	Atom	Abstand in Å
Asp 235 B	OD1	→	Gal	O4	2.7
Asp 235 B	OD2	→	Gal	O3	2.7
Gln 238 B	N	→	Gal	O4	2.9
Asn 256 B	ND2	→	Gal	O3	3.1
Asp 235 B	OD1	→	Asn 256 B	ND2	3.0
Asp 235 B	OD2	→	Gln 257 B	NE2	3.0
Val 236 B	O	→	Asn 256 B	ND2	2.9
wat 227 I	OW	→	Asn 256 B	OD1	3.1
Asp 235 B	O	→	Ala 237 B	N	2.9
Val 236 B	O	→	Gln 238 B	N	3.3
Ala 237 B	O	→	Ala 239 B	N	2.9

Tabelle 15:

Zusammenstellung der Wasserstoffbrücken zwischen den zuckerbindenden Aminosäuren der Zuckerbindungsstelle II und Lactose sowie der Wechselwirkungen, welche die Architektur der Zuckerbindungsstelle stabilisieren.

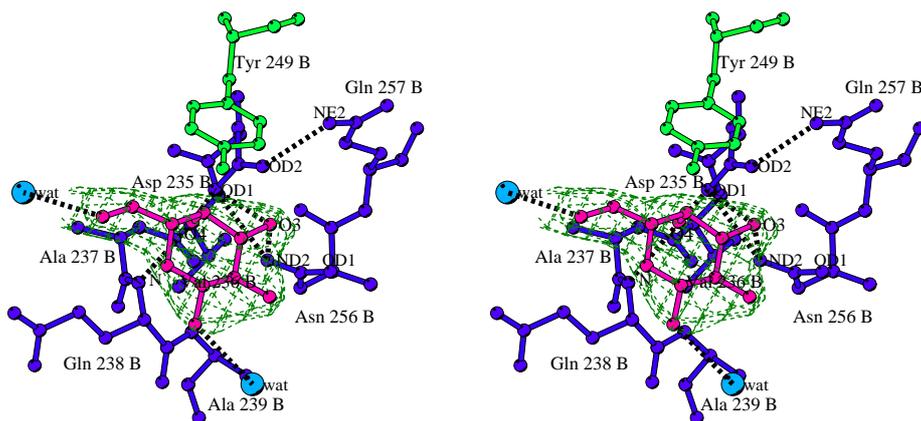


Abbildung 32:

Stereoabbildung der Zuckerbindungsstelle II im Komplex mit Galactose. Die Galactose ist in rot der Elektronendichte überlagert. Die aromatische Aminosäure Trp 249B ist in grün, Wassermoleküle in hellblau und die übrigen Aminosäuren der Zuckerbindungsstelle in blau dargestellt. Die Wasserstoffbrücken sind als schwarz gestrichelte Linien angedeutet.

Rest	Atom		Rest	Atom	Abstand in Å
Asp 235 B	OD1	→	Gal	O4	2.6
Asp 235 B	OD2	→	Gal	O3	2.7
Gln 238 B	N	→	Gal	O4	3.0
Asn 256 B	ND2	→	Gal	O3	3.1
wat 157 I	OW	→	Gal	O6	3.4
wat 354 I	OW	→	Gal	O1	3.0
Asp 235 B	OD1	→	Asn 256 B	ND2	3.1
Asp 235 B	OD2	→	Gln 257 B	NE2	2.9
Val 236 B	O	→	Asn 256 B	ND2	2.9
Asp 235 B	O	→	Ala 237 B	N	3.1
Val 236 B	O	→	Gln 238 B	N	3.4
Ala 237 B	O	→	Ala 239 B	N	2.9

Tabelle 16:

Zusammenstellung der Wasserstoffbrücken zwischen den zuckerbindenden Aminosäuren der Zuckerbindungsstelle II und Galactose sowie der Wechselwirkungen, welche die Architektur der Zuckerbindungsstelle stabilisieren.

In den beiden vorgeformten Galactosebindungsstellen befindet sich in der nativen ML-I Struktur jeweils ein Glycerolmolekül, welches dem Cryoprotectant entstammt. In Bindungsstelle I bindet O3 des Glycerols an Lys 41B NZ ähnlich wie O3 und O2 der Galactose. O2 des Glycerols bildet eine Wasserstoffbrücke zu NE2 des Gln 36B und zu N des Asp 26B am Boden der Bindungstasche. An Lys 41B NZ koordiniert ein Wassermolekül, welches außerdem an OD1 und OD2 von Asp 27B sowie an ein weiteres Wassermolekül bindet. Das O1 des Glycerols liegt frei orientiert in Richtung zur Proteinoberfläche. Insgesamt beobachtet liegt das Glycerolmolekül der Länge nach gestreckt und leicht verkippt zur Seitenkette von Trp 38B (Abb. 33). In der Galactosebindungsstelle II werden nur über das O2 des Glycerols direkte Wechselwirkungen zum Lektin geformt. So bindet das O2 des Glycerols an ND2 von Asn 256B und N von Gln 238B. Indirekte Wechselwirkungen zum ML-I bildet O1 über Verbrückung zu einem Wassermolekül, welches seinerseits an OG des Ser 200B bindet. Dieses Glycerolmolekül liegt gestreckt in der Bindungstasche und ist verkippt in Bezug auf die aromatische Seitenkette von Tyr 249B. Im Gegensatz zu Bindungsstelle I geht das Glycerol O3 in der Bindungsstelle II keine Wechselwirkung mit dem Lektin ein.

Rest	Atom		Rest	Atom	Abstand in Å
Asp 23 B	OD1	→	Glycerol	O2	2.6
Asp 23 B	OD2	→	Glycerol	O3	3.1
Asp 26 B	N	→	Glycerol	O2	2.6
Gln 36 B	NE2	→	Glycerol	O2	2.8
Lys 41 B	NZ	→	Glycerol	O3	2.8
OW 170 I	O	→	Glycerol	O3	3.0
Asp 23 B	OD1	→	OW 170 I	O	3.2
Asp 23 B	OD2	→	OW 170 I	O	2.7
Lys 41 B	NZ	→	OW 170 I	O	2.8
OW 170 I	O	→	OW 221 I	O	3.2
Lys 41 B	NZ	→	Asp 45 B	OD1	2.7
Asn 43 B	ND2	→	Asp 45 B	OD1	2.9
Asp 23 B	O	→	Arg 25 B	N	3.1
Val 24 B	O	→	Asp 26 B	N	3.4
Arg 25 B	O	→	Asp 27 B	N	3.0

Tabelle 17:

Zusammenstellung der Wasserstoffbrücken zwischen den zuckerbindenden Aminosäuren der Zuckerbindungsstelle I und Glycerol sowie der Wechselwirkungen, welche die Architektur der Zuckerbindungsstelle stabilisieren.

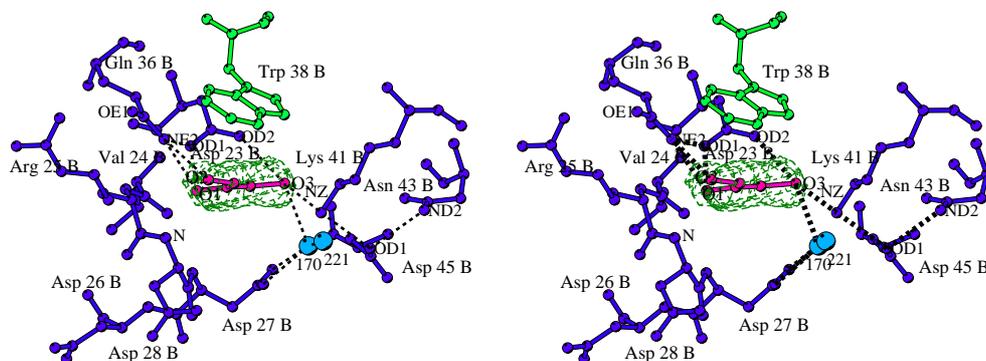


Abbildung 33:

Stereoabbildung der Zuckerbindungsstelle I von nativem ML-I. Das Glycerol ist der Elektronendichte in rot überlagert. Die aromatische Aminosäure Trp 38B ist in grün, Wassermoleküle in hellblau und die übrigen Aminosäuren der Zuckerbindungsstelle sind in blau dargestellt. Wasserstoffbrücken sind als schwarz gestrichelte Linien angedeutet.

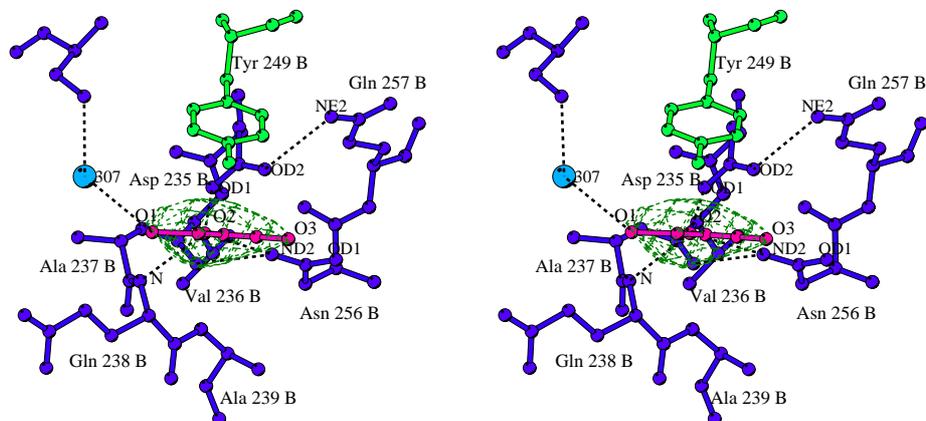


Abbildung 34:

Stereoabbildung der Zuckerbindungsstelle II von nativem ML-I. Das Glycerol ist in rot der Elektronendichte überlagert. Die aromatische Aminosäure Trp 249B ist in grün, das Wassermolekül in hellblau und die übrigen Aminosäuren der Zuckerbindungsstelle sind in blau dargestellt. Wasserstoffbrücken sind als schwarz gestrichelte Linien angedeutet.

Rest	Atom		Rest	Atom	Abstand in Å
Asp 235 B	OD1	→	Glycerol	O2	2.7
Gln 238 B	N	→	Glycerol	O3	3.0
Asn 256 B	ND2	→	Glycerol	O2	3.2
OW 307 I	O	→	Glycerol	O1	3.1
OW 307 I	O	→	Ser 200 B	OG	2.9
Asp 235 B	OD1	→	Asn 256 B	ND2	3.1
Asp 235 B	OD2	→	Gln 257 B	NE2	3.0
Val 236 B	O	→	Asn 256 B	ND2	3.2
Asp 235 B	O	→	Ala 237 B	N	3.0
Val 236 B	O	→	Gln 238 B	N	3.4
Ala 237 B	O	→	Ala 239 B	N	2.9

Tabelle 18:

Zusammenstellung der Wasserstoffbrücken zwischen den zuckerbindenden Aminosäuren der Zuckerbindungsstelle II und Glycerol sowie der Wechselwirkungen, die für die Architektur der Zuckerbindungsstelle wichtig sind.

5.2.5. Die Architektur der potentiellen dritten Galactosebindungsstelle in Subdomäne 1 β

Bis auf die Subdomänen $\alpha 1$ und $\gamma 2$ haben die übrigen Subdomänen ihre Fähigkeit, Galactose zu binden, verloren. Für Ricin wurde eine dritte Galactosebindungsstelle in Subdomäne $\beta 1$ vorhergesagt [61]. Die Untersuchung dieser potentiellen Galactosebindungsstelle im nativen und im komplexierten ML-I liefert, daß dort ein Glycerolmolekül gebunden hat. Der Sequenzvergleich (Abbildung 35) der galactosebindenden Aminosäuren in Subdomäne $\alpha 1$ und $\gamma 2$ mit den dazu äquivalenten Resten in Subdomäne $\beta 1$ zeigt eine ähnliche Architektur dieser Bindungstasche wie die Galactosebindungsstelle I und II. Den oberen Rand der Bindungstasche säumt Phe 79B entsprechend dem Trp 38B der Bindungsstelle I und entsprechend Tyr 249B in Bindungsstelle II. Im Zentrum befindet sich Thr 66B, welches die Position von Asp 23B bzw. Asp 235B einnimmt. Seitlich ragt die Seitenkette von Met 77B äquivalent zu Gln 36B in die Bindungstasche, wobei das O3 des Glycerol an das gegenüberliegende N von Val 85B bindet. Da Met 77B kein Wasserstoffbrückendonator für das polare Glycerol ist, sind O2 und O1 des Glycerols zur Proteinoberfläche orientiert. In den mit Galactose bzw. Lactose komplexierten ML-I Strukturen ist Glycerol O3 über ein Wassermolekül mit dem gegenüberliegenden O des Thr 67B verbrückt. Dieses Wassermolekül bindet zusätzlich ein weiteres Wassermolekül. Ähnlich dem Glycerolmolekül, welches im nativen ML-I in die Galactosebindungsstelle I und II bindet, hat dieses auch die Neigung, die vorgeformte dritte Galactosebindungsstelle zu besetzen. Die Fähigkeit, Galactose zu binden, hat diese Bindungstasche durch Mutation zu unpolaren Aminosäuren, insbesondere an den Positionen 66B (Asp zu Thr) und 77B (Gln zu Met), offensichtlich verloren.

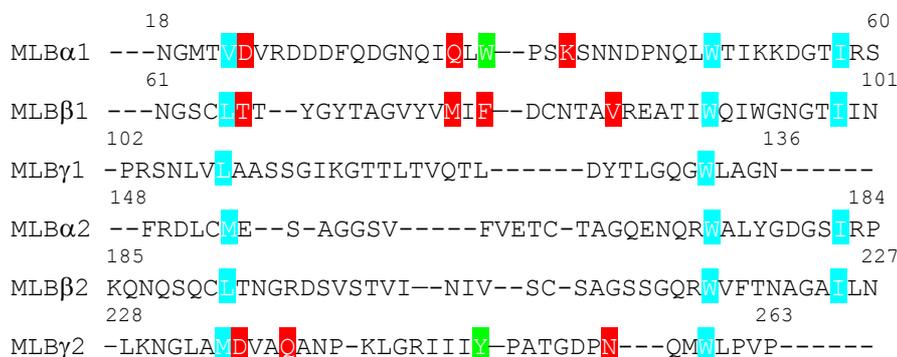


Abbildung 35:

Sequenzvergleich der Subdomänen von MLB. In rot unterlegt sind die Aminosäuren, welche an der Zuckerbindung in Subdomäne $\alpha 1$ und $\gamma 2$ beteiligt sind. Die aromatischen Aminosäuren der Zuckerbindungsstellen sind grün umrandet. Aminosäuren, welche zur potentiellen dritten Zuckerbindungsstelle in Subdomäne $\beta 1$ gehören, sind entsprechend in rot unterlegt. Aminosäuren, die als hydrophober Kern die Kleeblattfaltung stabilisieren sind in türkis unterlegt.

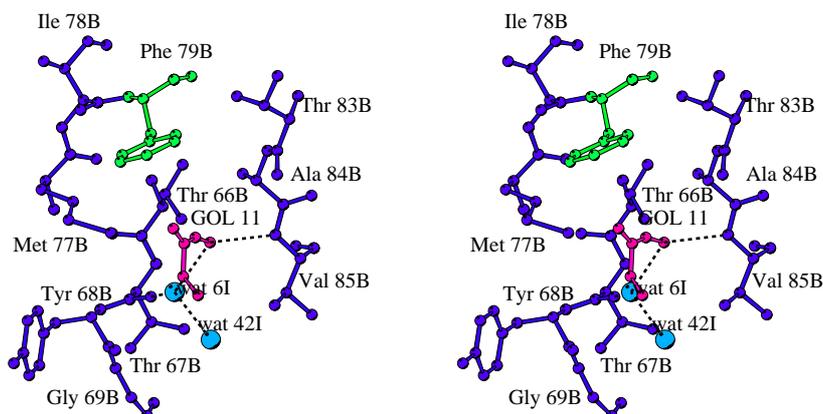


Abbildung 36:

Stereoabbildung der potentiellen dritten Zuckerbindungsstelle in ML-I in Subdomäne $\beta 1$. Das Glycerolmolekül (GOL) ist in rot, die aromatische Aminosäure Tyr 79B in grün, die übrigen Reste in blau und die Wassermoleküle in hellblau dargestellt. Die Wasserstoffbrücken sind als schwarz gestrichelte Linien angedeutet.

Rest	Atom		Rest	Atom	Abstand in Å
Val 85 B	N	→	Glycerol	O3	2.8
OW 289 I	O	→	Glycerol	O2	3.4

Tabelle 19a:

Zusammenstellung der Wasserstoffbrücken zwischen den Aminosäuren der Zuckerbindungsstelle III und Glycerol in der nativen ML-I Struktur.

Rest	Atom		Rest	Atom	Abstand in Å
Val 85 B	N	→	Glycerol	O3	2.9
OW 39 I	O	→	Glycerol	O3	2.7
OW 39 I	O	→	Thr 67 B	O	2.7
OW 39 I	O	→	OW 52 I	O	2.9

Tabelle 19b:

Zusammenstellung der Wasserstoffbrücken zwischen den Aminosäuren der Zuckerbindungsstelle III und Glycerol in der mit Galactose komplexierten ML-I Struktur.

Rest	Atom		Rest	Atom	Abstand in Å
Val 85 B	N	→	Glycerol	O3	2.8
OW 6 I	O	→	Glycerol	O3	2.8
OW 6 I	O	→	Thr 67 B	O	2.9
OW 6 I	O	→	OW 42 I	O	2.9

Tabelle 19c:

Zusammenstellung der Wasserstoffbrücken zwischen den Aminosäuren der Zuckerbindungsstelle III und Glycerol in der mit Lactose komplexierten ML-I Struktur.

5.2.6. Vergleich der Galactosebindungsstelle I zwischen nativer und Galactose –bzw. Lactose-komplexierter ML-I Struktur

Glycerol geht wie Galactose und Lactose Wechselwirkungen mit den zuckerbindenden Aminosäuren Asp 26B, Gln 36B und Lys 41B der Galactosebindungsstelle I ein. Glycerol verfügt ähnlich wie die gebundenen Zucker über Hydroxylgruppen, welche in der vorgeformten Zuckerbindungstasche homolog zu den Hydroxylgruppen des Galactoseliganden Wasserstoffbrücken eingehen. Sowohl O2 und O3 des Glycerol als auch Wasser 170 der nativen Struktur Galactosebindungsstelle I sind in den Positionen zu finden, die im Zucker-Lektin Komplex von den 4'OH-, 3'OH- und 2'OH-Gruppe der Galactose bzw. der Lactose eingenommen werden. In den nativen Strukturen von EcorL [62], Mannose bindenden Protein [63] und Erdnußlectin [64] zeigte sich ebenfalls, daß die Wassermoleküle exakt die Positionen in der Bindungstasche besetzen, die von den 3' und 4'Hydroxylgruppe des Zuckerliganden eingenommen werden. Im Gegensatz zu Bindungsstelle I bindet in der Bindungsstelle II das O2 des Glycerol nur an die zuckerbindenden Aminosäuren Gln 238B und Asn 256B. Dieses O2 von Glycerol nimmt damit dieselbe Position wie das O4 der Galactose ein. Wie bereits von Drickamer [26] beschrieben, wird deutlich, daß die Epimerspezifität liefernde Wechselwirkung über eine Erkennung des 4'OH in axialer Position vorrangig vor der Bindung an die 3'OH-Gruppe der Galactose ist. Die 3'OH-Gruppe unterstützt die Bindung der Schlüsselwechselwirkung der 4'OH-Gruppe des Zuckerliganden zum Lektin. Eine Interaktion zwischen O3 des Glycerol zu ML-I wird nicht ausgebildet, was diese Hilfsfunktion unterstreicht. Die hier beschriebene native ML-I Struktur ist ein Beispiel dafür, daß ein Glycerol in der Galactosebindungsstelle einer geordneten Wasserstruktur vorgezogen wird.

5.2.7. Vergleich der Zuckerbindungsstellen

Die Zuckerbindungsstellen I und II von ML-I weisen die für Galactose-spezifische Lektine beschriebenen charakteristischen Merkmale auf. Die Grundlage bilden zum einen die aromatische Seitenkette zur hydrophoben Interaktion mit der planaren Ebene des Zuckers und zum anderen die Aminosäureseitenketten und Hauptkettenatome, die als Wasserstoffbrückendonoren mit der 4'-und 3' Hydroxylgruppe der Galactose wechselwirken können. Die Zuckerbindung vermittelnden Aminosäuren in den Zuckerbindungsstellen I und

II unterscheiden sich, die räumlichen Strukturen ähneln sich jedoch stark. ML-I ist auch ein Beispiel dafür, daß sich die Zuckerbindungsstellen innerhalb einer Kette unterscheiden können. Die in der Struktur von ML-I im Komplex mit den Liganden Lactose bzw. Galactose ausgebildeten Wechselwirkungen sind in beiden Zuckerbindungsstellen nahezu identisch. Unterschiedlich sind jedoch z. B. die Verkippungswinkel, die zwischen der planaren Ebene der aromatischen Seitenkette und der Zuckerringebene in Zuckerbindungsstelle I ausgebildet werden. Der Galactosylanteil der Lactose ist mit einem Winkel von 33° stärker zur aromatischen Seitenkette Trp 38B geneigt als die Galactose mit nur 19° . Im Gegensatz dazu ist der eingeschlossene Winkel in Zuckerbindungsstelle II mit jeweils 29° im Lactose- und Galactose - ML-I Komplex identisch. Weitere Studien zur Zuckerbindung bei gal-spezifischen Lektinen ergaben einen Verkippungswinkel zwischen der planaren Ebene der aromatischen Seitenkette und dem Galactosering von durchschnittlich 32° [65]. Hiermit liegen die für die ML-I Komplexe den ML gefundenen Winkel im Bereich der für Galactose-spezifische Lektine typischen Verkippungswinkel. Die I_{50} -Werte betragen für D-Galactose 0.9 mM und für Lactose 0.5 mM [66]. Die Affinität von ML-I gegenüber D-N-acetyl-Galactosamin ist 120-fach geringer als gegenüber D-Galactose [66]. Dieser Effekt läßt sich, wie in Abbildung 37 gezeigt, über die Architektur der Zuckerbindungsstelle I erklären.

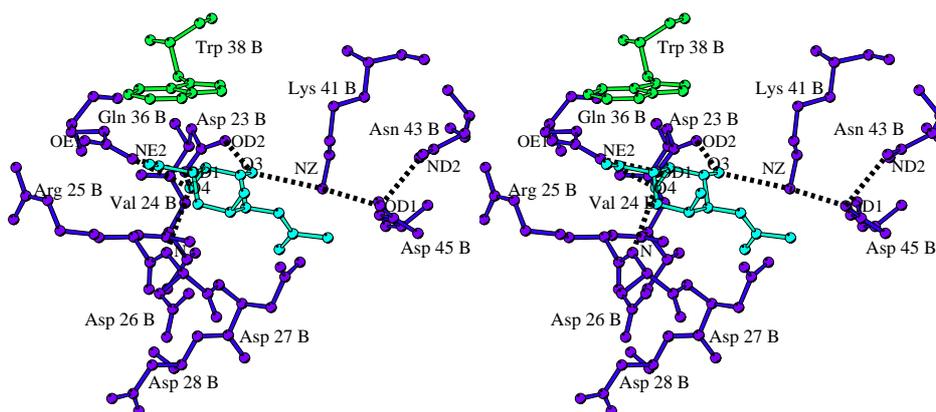


Abbildung 37:

Stereoabbildung der Zuckerbindungsstelle I von ML-I. In die Zuckerbindungsstelle I ist der Ligand N-Acetyl-Galactosamin analog zu Galactose modelliert. Die aromatische Aminosäure Trp 38B ist in grün, N-Acetyl-Galactosamin ist in hellblau und die übrigen Reste sind in blau dargestellt. N-acetyl-Galactosamin wurde anhand der komplexierten Struktur von *Erythrina corallodendron* lectin (1AX0.pdb, pdbcode) modelliert.

Die optimale Bindung von N-acetyl-Galactosamin wird sterisch durch die Seitenkette des Asp 27B der Tripeptidschleife behindert. Diese Interaktion mit dem O2 wird selten beobachtet [26] und gilt auch nicht für die Zuckerbindungsstelle II in ML-I. Folglich ermöglicht die Architektur der Zuckerbindungsstelle I in ML-I ausschließlich die Erkennung und Bindung von Galactose.

5.2.8. Die hydrophoben Kerne der Subdomäne I und II der B-Kette

Der Vergleich der etwa 40 Aminosäuren umfassenden Einheiten (Abbildung 35) der Subdomänen zeigt deutlich, daß hydrophobe Reste an bestimmten Positionen der Sequenz hochkonserviert sind. Diese hydrophoben Seitenketten ragen in das Innere der Domänen I und II und bilden zusammen einen hydrophoben Kern (Abbildung 38a und 38b). Die Untereinheiten der Domäne I und II ordnen sich längs einer pseudodreizähligen Achse.

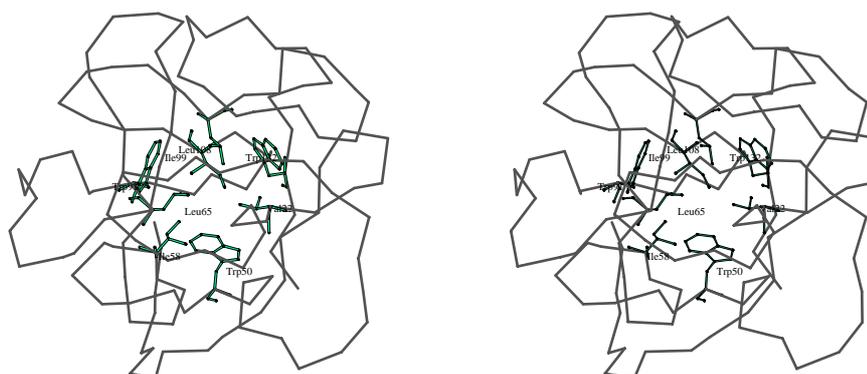


Abbildung 38a:
Stereoabbildung der α -Kette der Domäne I der B-Kette. Konservierte hydrophobe Reste sind in türkis dargestellt.

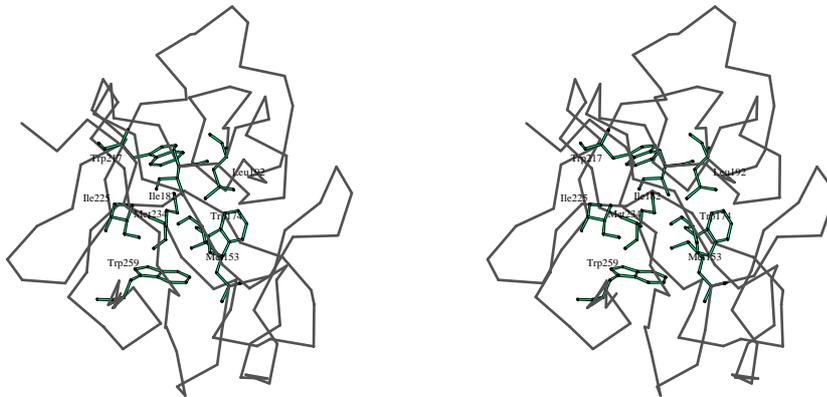


Abbildung 38b:
Stereobildung α -Kette der Domäne II der B-Kette. Konservierte hydrophobe Reste sind in türkis dargestellt.

Das für die Kleeblattfaltung von Lektinen charakteristische $(QXW)_3$ Peptid [67] am Ende jeder Subdomäne trägt über die Wechselwirkung zwischen dem konservierten Trp und dem Ile am Ende jeder Subdomäne (Tabelle 20, Abbildung 35) zur Stabilisierung längs der dreizähligen Achse bei.

Subdomäne	Trp	Ile
$\alpha 1$	50B	58B
$\beta 1$	91B	99B
$\gamma 1$	132B	
$\alpha 2$	174B	182B
$\beta 2$	217B	225B
$\gamma 2$	259B	

Tabelle 20:
Zusammenstellung der hydrophoben Aminosäuren am Ende jeder Subdomäne.

5.3. Datensammlung von nativem ML-I aus *Viscum album* gewachsen auf *Pyrus pashia*

Mittels Drehkristallverfahren [38] wurde am Meßplatz BW7B (HASYLAB, Hamburg) von nativem ML-I ein Beugungsdatensatz gesammelt. Als Detektor diente eine MAR Image Plate und es wurde eine Wellenlänge von 0.8453 Å verwendet. Zur Vorbeugung der Strahlenschädigung wurde der Kristall während der gesamten Meßzeit im Stickstoffstrom auf 100 K gekühlt. Der Datensatz war im Auflösungsbereich von 30 bis 2.8 Å bis zu 94.6 % vollständig. Beim Einfrieren des Kristall hatte sich ein Eisring gebildet, der die mangelnde Vollständigkeit dieses Datensatzes bedingt. Zur Auswertung der Daten wurde das Programmpaket DENZO [39] und SCALEPACK [39] verwendet. Die Einheitszellkonstanten wurden zu $a = b = 109.48$, $c = 309.98$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$ bestimmt. Die Daten wurden der Raumgruppe P6₅22 zugeordnet und ausgehend von einem Molekül in der asymmetrischen Einheit beträgt der Packungsparameter 4.3 Å³/Da, daraus ergibt sich ein Lösungsmittelanteil von 71 %.

Raumgruppe	P6 ₅ 22
Zellkonstanten a=b	109.48 Å
Zellkonstante c	309.98 Å
Auflösung	30-2.8 Å
Vollständigkeit	94.6 %
Wellenlänge	0.8453 Å
Röntgenquelle	BW7B/EMBL-Hamburg
Anzahl aller gemessenen Reflexe	1.137.879
Anzahl der unique Reflexe	28.141
R _{symm}	5.7 %
R _{symm} (letzte Schale)	43.3 %
V _m	4.3 Å ³ /Dalton

Tabelle 21: Zusammenfassung der Datensammlung an Kristallen des nativen ML-I.

6. Diskussion

6.1.1. Die Faltung von Mistellektin I im Vergleich zu Ricin

In Abbildung 39 zeigt die C α -Kette des Ricin überlagert auf die des ML-I. Die Hauptkettenkonformation der beiden RIP Proteine ist nahezu identisch, beide Ketten weisen eine mittlere r.m.s. Abweichung für die C α -Atome von 2.2 Å auf. Die Homologie zwischen den A-Ketten von ML-I und Ricin beträgt 35.8 %, während die B-Ketten mit einer Homologie von 60.9 % wesentlich stärker konserviert sind. In Abbildung 40 sind die Abweichungen für jedes C α -Atom der A- und B-Kette von ML-I im Vergleich zu Ricin in Å angegeben. Aminosäureabschnitte, in denen die C α -Positionen von ML-I zu denen von Ricin um mehr als 4 Å voneinander abweichen, sind in Tabelle 22 zusammengestellt. In ML-I zeigt die Aminosäureschleife 45A bis 48A nach Faltblatt c eine unterschiedliche Faltung zum äquivalenten Abschnitt 50A bis 53A in Ricin. Die A-Kette von Ricin ist um 13 Aminosäuren länger als die von ML-I, so daß Insertionen in einigen Fällen zu Änderungen in der Hauptkettenkonformation führen. Die Schleife gebildet von den Resten 92A bis 97A in ML-I, in der Nähe des aktiven Zentrums, weist zwei Insertionen gegenüber dem entsprechenden Abschnitt 95A bis 105A in Ricin auf und hat in Folge dessen eine unterschiedliche Faltung.

Mistellektin I	Ricin	Lokalisation (bezogen auf ML-I)	
45A-48A	50A-53A	Schleife nach β -Faltblatt c in Domäne I	
92A-97A	95A-105A	Schleife nach β -Faltblatt g in Domäne I; säumt direkt das aktive Zentrum	Insertion in Ricin
144A-152A	153A-163A	Schleife zwischen Helix C und D in Domäne II	Insertion in Ricin
221A-226A	233A-238A	β -Schleife zwischen β -Faltblatt i und j in Domäne III	
248A-249A	260A-267A	C-Terminus, hoch flexibel in ML-I	
1B-6B	1B-5B	N-Terminus	Insertion in Mistellektin-I
103B-105B	102B-104B	Schleife in Domäne I	
168B-170B	167B-169B	Schleife in Domäne II	

Tabelle 22:

Zusammenfassung der Sequenzabschnitte mit abweichender Hauptkettenkonformation in ML-I im Vergleich zu Ricin.

Zwischen Helix C und D der Domäne II zeigt der Abschnitt der Reste 144A bis 152A in ML-I aufgrund von einer Insertion in Ricin eine andere Hauptkettenfaltung als in Ricin. In Domäne III weichen die $C\alpha$ -Positionen für die β -Schleife 221A bis 226A in ML-I zu dem entsprechenden Bereich in Ricin ab. Über die Konformation der Aminosäuren 223A und 224A ist aufgrund mangelhafter Elektronendichte nur eine eingeschränkte Aussage möglich.

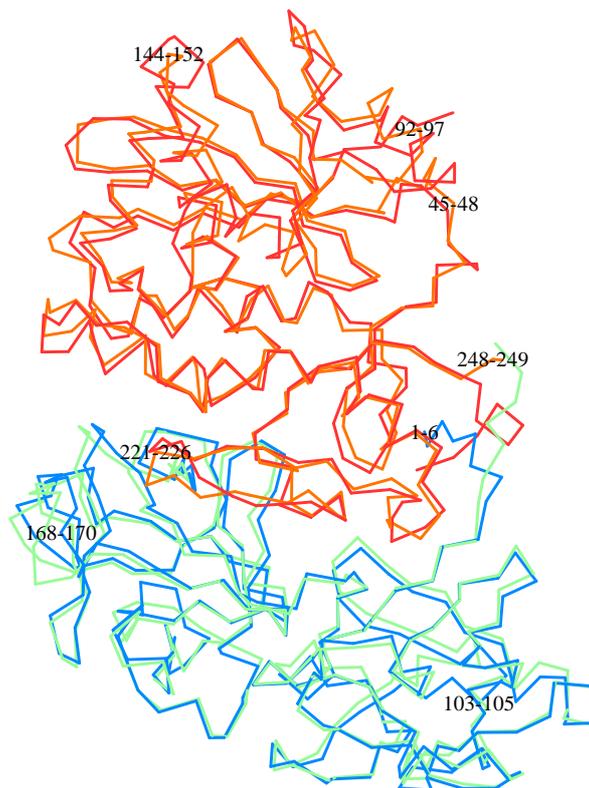


Abbildung 39:

$C\alpha$ -Kette von Ricin (A-Kette rot, B-Kette hellgrün) auf die $C\alpha$ -Kette von ML-I (A-Kette gelborange, B-Kette blau) gedreht. Aminosäureabschnitte mit abweichender Hauptkettenkonformation bezogen auf ML-I Nummerierung sind eingezeichnet. Die Lage der Glykosylierungsstellen I, II, III ist als schwarze Kreise dargestellt.

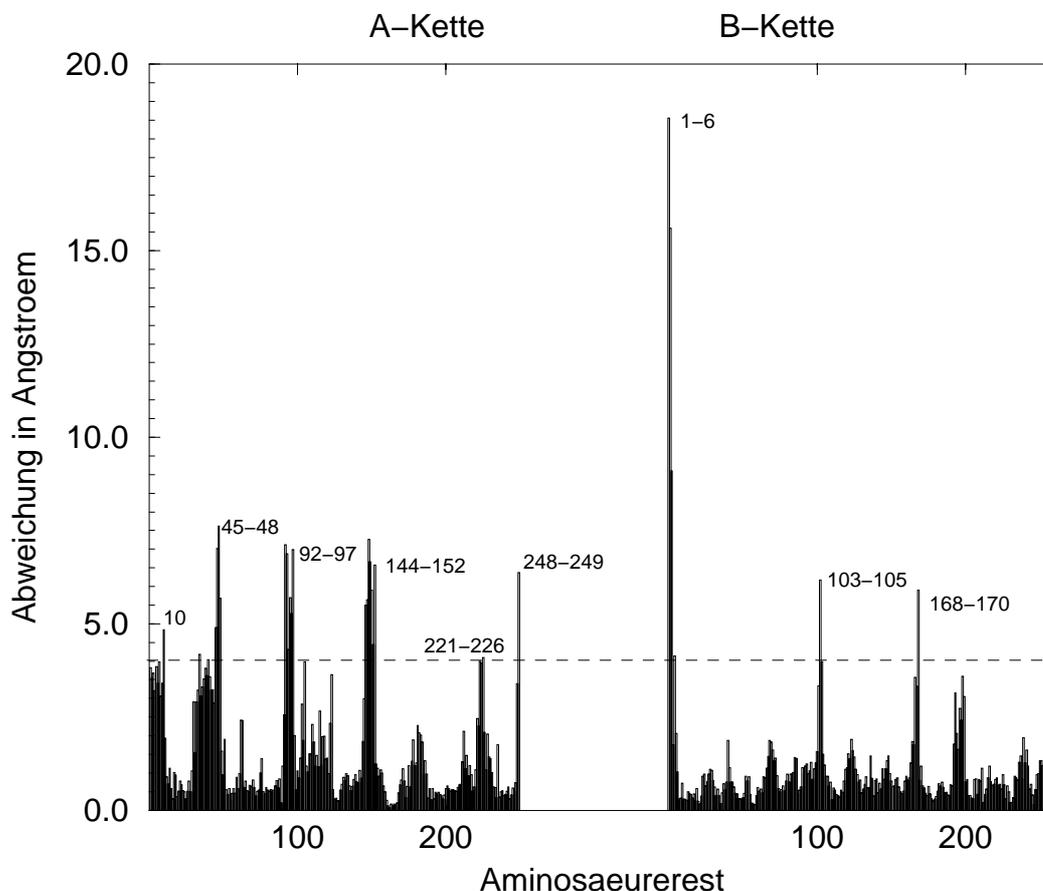


Abbildung 40:

Abweichungen in [\AA] aufgetragen für jedes der $C\alpha$ -Atome von ML-I im Vergleich zu Ricin. Aminosäureabschnitte von mehr als 4 \AA unterschiedlicher Hauptkettenkonformation (gestrichelte Linie) sind markiert.

Die $C\alpha$ -Positionen der C-terminalen Aminosäuren 248A und 249A in ML-I direkt nach der verbindenden Disulphidbrücke sind deutlich unterschiedlich von denjenigen in Ricin. Die Lage der Disulphidbrücke zwischen beiden Ketten ist jedoch stark konserviert. Die C-terminale Primärsequenz von Ricin enthält eine ungewöhnliche Folge von drei aufeinander folgenden Prolinresten, ML-I hingegen weist nur ein Prolin in diesem Bereich auf. Wie aufgrund der größeren Homologie der B-Ketten von ML-I und Ricin zu erwarten ist, zeigen die Hauptkettenkonformationen bis auf den N-Terminus weniger Unterschiede als in der A-Kette. Die N-terminalen Reste 1B-6B von ML-I nehmen eine deutlich andere Konformation im Vergleich zu Ricin ein und zeigen die größte Abweichung der Hauptketten voneinander. Demzufolge sind die Wechselwirkungen der N-terminalen Aminosäuren, welche an der

Grenzfläche zwischen A- und B-Kette beteiligt sind, auch erheblich unterschiedlich (Kapitel 5.1.8.). Im weiteren weisen in der B-Kette die oberflächenexponierten Schleifen mit den Resten 103A bis 105A und 168A bis 170A unterschiedliche Hauptkettenfaltung im Vergleich zu Ricin auf. Die Lage der Disulphidbrücken in der B-Kette ist in ML-I im Vergleich zu Ricin konserviert, RTB verfügt jedoch über eine zusätzliche SS-Brücke zwischen Cys 20B und 40B.

6.1.2. Vergleich der Lage der Glykosylierungsstellen in Mistellektin-I und Ricin

Die Positionen der Glykosylierungsstellen von Mistellektin-I im Vergleich zu Ricin unterscheiden sich hauptsächlich in der A-Kette. Infolgedessen weist Ricin auch nicht die für ML-I gefundene Anordnung von übereinander gestapelten Glykosylierungsstellen an einem Pol des Moleküls auf (Abbildung 39). Die Ricin A-Kette ist in Position Asn 10A und Asn 236A N-glykosyliert [68, 69]. Die Glykosylierungsstellen von RTB, Asn 95B und Asn 135B [60], sind im Vergleich zu ML-I konserviert. Die Glykosylierungsstelle in Position Asn 61B in ML-I fehlt allerdings in Ricin. Untersuchungen an Zellkulturen zum Vergleich der cytotoxischen Aktivität von pflanzlichem ML-I und rekombinanten ML-I zeigten keine Unterschiede. Dies unterstreicht, daß die Glykosylierung wie allgemein bekannt keinerlei Einfluß auf das toxische Potential hat [70]. Jedoch kann die Mannose Glykosylierung von Ricin durch eine Bindung an Mannose Rezeptoren auf Zelloberflächen dessen Internalisierung bewirken [71]. Dieser Aufnahmemechanismus wird auch für ML-I diskutiert [72]. Darüber hinaus beeinflusst die Glykosylierung die Zuckerspezifität von MLB gegenüber Monosacchariden. Rekombinant hergestelltes MLB weist eine reduzierte Affinität gegenüber Monosacchariden auf [72], wie auch im Falle von RTB gezeigt [73]. Möglicherweise bedingt die einzelne B-Kette eine Konformationsänderung, da keine Änderung der Affinität für das intakte rekombinante ML-I Heterodimer gefunden wurde [72].

6.2.1. Die Faltung von Mistellektin I im Vergleich zu Abrin-a

Mit Hilfe der Programms LSQKAB [51] wurde die C α -Kette von Abrin-a und auf die von ML-I überlagert, wobei die beiden Ketten eine mittlere r.m.s. Abweichung von 1.9Å aufweisen (Abbildung 42). Die Homologie zwischen den A-Ketten von ML-I und Abrin-a

Mistellektin I	Abrin-a	Lokalisation (bezogen auf ML-I)	
1+10			
45A-48A	44A-48A	Schleife nach β -Faltblatt c in Domäne I	
61A-63A	58A-61A	β -Schleife zwischen β -Faltblatt d und e in Domäne I	Insertion in Abrin-a
144A-147A	143A-146A	Schleife zwischen Helix C und D in Domäne II	Insertion in ML-I
221A-226A	220A-225A	β -Schleife zwischen β -Faltblatt i und j in Domäne III	
233A-237A	231A-237A	Schleife nach β -Faltblatt j in Domäne III	Insertion in Abrin-a
248A-249A	248A-251A	C-Terminus	
1B-4B	1B-8B	N-Terminus	

Tabelle 23:
Zusammenfassung der Sequenzabschnitte mit abweichender Hauptkettenkonformation in ML-I im Vergleich zu Abrin-a.

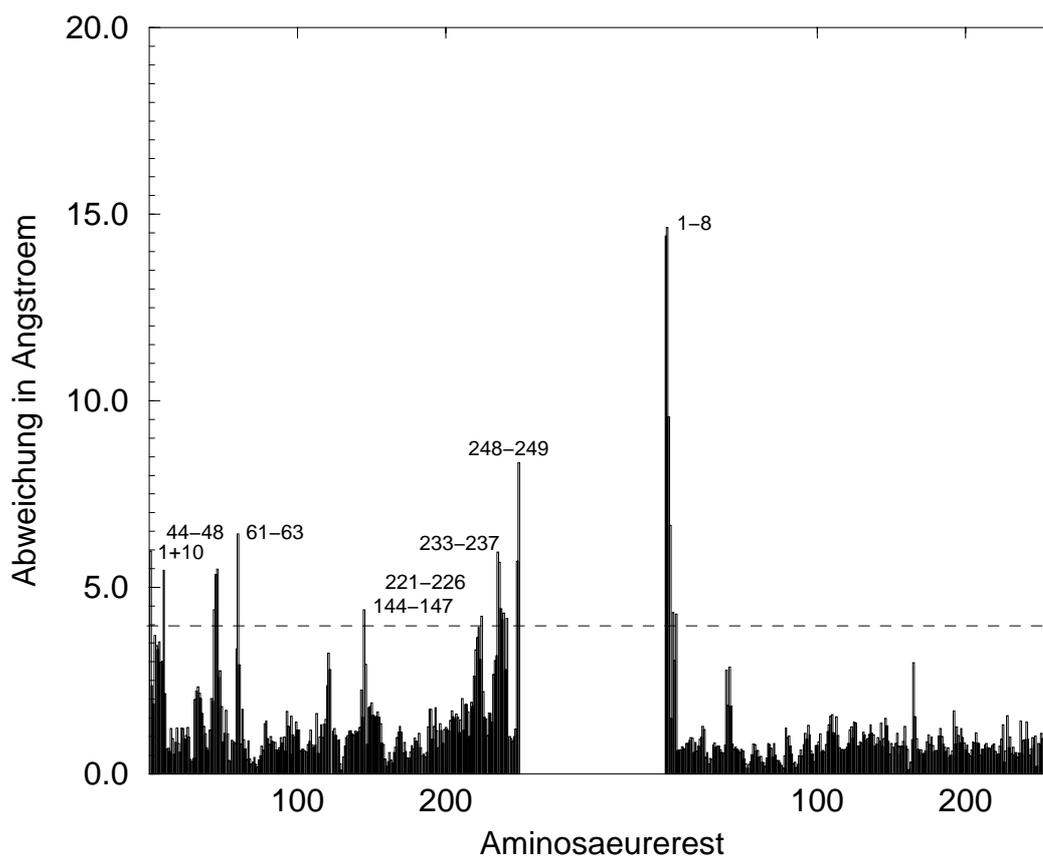


Abbildung 41:
Abweichungen in Å aufgetragen für jedes $\text{C}\alpha$ -Atome von ML-I im Vergleich zu Abrin-a. Aminosäureabschnitte mit unterschiedlicher Hauptkettenkonformation von mehr als 4 Å (gestrichelte Linie) sind markiert.

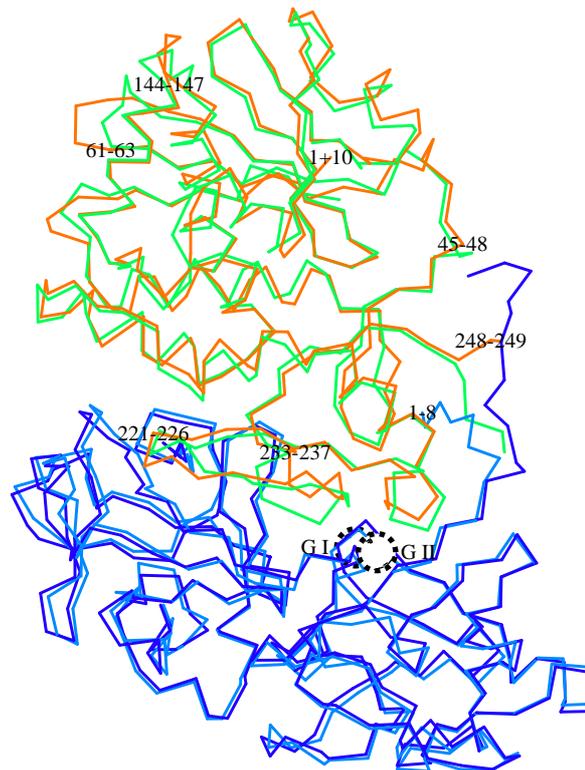


Abbildung 42:

C α -Kette von Abrin-a (A-Kette grün, B-Kette dunkelblau) auf die C α -Kette von ML-I (A-Kette orange, B-Kette blau) gedreht. Aminosäureabschnitte mit abweichender Hauptkettenkonformation bezogen auf ML-I Nummerierung sind eingezeichnet. Die Lage der Glykosylierungsstellen I und II sind als schwarze Kreise dargestellt.

beträgt 41.3 %, die der B-Ketten 52.3 %. In Abbildung 41 sind die Abweichungen in Å für jedes C α -Atom für die A- und B- Ketten von ML-I im Vergleich zu Abrin-a angegeben. Abweichungen der C α -Positionen von mehr als 4 Å zwischen beiden RIP Proteinen sind in Tabelle 22 aufgeführt. Die Hauptkettenkonformation von ML-I und Abrin-a ist weitgehend identisch. Abweichende Hauptkettenfaltung zeigen die Reste 45A bis 48A in ML-I äquivalent zu 44A bis 48A in Abrin-a. Ferner ist der Aminosäureabschnitt 61A bis 63A in ML-I aufgrund einer Insertion im entsprechenden Abschnitt 58A bis 61A in Abrin-a unterschiedlich konformiert. Auch Sequenzabschnitt 144A bis 147A zwischen Helix C und D in Domäne II in ML-I verfügt über eine Insertion in ML-I gegenüber den Aminosäuren 143A bis 146A in

Abrin-a und hat eine unterschiedliche Konformation. In Domäne III zeigt die Schleife gebildet von den Aminosäuren 221A bis 226A in ML-I und den Resten 220A bis 225A eine andere Faltung. In Folge einer Insertion in Abschnitt 231A bis 237A in Abrin-a zeigt der entsprechende Abschnitt 233A bis 237A nach Faltblatt j in Domäne III eine abweichende Konformation. Ähnlich wie in Ricin nehmen die C-terminalen C α -Positionen 248A und 249A in ML-I eine deutlich andere Faltung als der C-Terminus der Abrin-a A-Kette. Am meisten unterscheiden sich jedoch die Hauptkettenkonformationen der N-terminalen Aminosäuren 1B bis 8B in ML-I und Abrin-a, folglich sind auch die Wechselwirkungen an der Grenzfläche zwischen A- und B-Kette der beiden RIPs unterschiedlich (Kapitel 6.3.2.). Ansonsten sind sich die Hauptkettenfaltung der B-Kette zwischen ML-I und Abrin-a sehr ähnlich.

6.2.2. Vergleich der Lage der Glykosylierungsstellen in Mistellektin-I und Abrin-a

Die A-Kette von Abrin-a ist im Vergleich zu Mistellektin-I unglykosyliert. Die Glykosylierungsstellen der B-Kette, Asn 100B und Asn 140B, entsprechen den Glykosylierungsstellen III und IV in ML-I. Abrin-a ist mit nur zwei Glykosylierungsstellen erheblich weniger Zuckerstrukturen modifiziert als ML-I.

Der Vergleich der Hauptkettenkonformation der drei RIP Proteine ML-I, Ricin und Abrin-a liefert, daß die Mehrheit der Abweichungen des C α -Rückrats identisch lokalisiert sind und in der Mehrzahl Schleifen an der Oberfläche betreffen, die eine unterschiedliche Faltung tolerieren. Die Glykosylierungsstellen III und IV von ML-I sind in Ricin und Abrin-a konserviert. Unterschiede in der Gestaltung der Proteinoberfläche bedingt durch die Glykosylierung haben Einfluß auf den Internalisierungsprozeß in die Zelle und damit auf die toxische Aktivität.

6.3.1. Vergleich der Wechselwirkungen an der Grenzfläche zwischen A- und B-Kette von ML-I und Ricin

Die Wechselwirkungen zwischen A- und B-Kette des Ricin sind in Tabelle 24 aufgelistet. Bis auf die Disulphidbrücke zwischen beiden Ketten sind die übrigen Interaktionen an der Grenzfläche nicht konserviert. Verteilt über die gesamte Kontaktregion werden in Ricin mehr Wechselwirkungen zur Stabilisierung des Heterodimers ausgebildet als in ML-I. Die Disulphidbrücke liegt exponiert an der Oberfläche im Randbereich der Grenzfläche und wird von polaren Wechselwirkungen flankiert. Der Grenzflächenabschnitt, welcher sich relativ entfernt von der Disulphidbrücke befindet, wird durch polare Interaktionen, alterniert von

A-Kette				B-Kette		Abstand in Å
Polare						
His	40 A	ND1	→	Asp	94 B OD1	2.8
Glu	41 A	O	→	Asn	220B ND2	3.5
Glu	41 A	OE1	→	Lys	219B NZ	3.1
Glu	41 A	OE2	→	Lys	219B NZ	2.6
Gln	182A	NE2	→	Asn	220B O	2.9
Gln	182A	NE2	→	Asn	220B OD1	3.2
Tyr	183A	OH	→	Phe	262B OXT	3.0
Asn	222A	ND2	→	Asp	6 B OD2	3.1
Arg	234A	NH1	→	Phe	262B O	3.3
Arg	235A	N	→	Phe	262B O	3.0
Arg	258A	O	→	Ala	1 B N	2.7
Ala	260A	N	→	Asp	2 B O	3.1
Ala	260A	O	→	Cys	4 B N	2.9
Disulphidbrücke						
Cys	259A	SG	→	Cys	4 B SG	2.0
Hydrophobe						
Tyr	183A		→	Phe	262B	
Phe	240A		→	Phe	262B	
Phe	240A		→	Phe	140B	
Pro	250A		→	Phe	218B	
Pro	250A		→	Pro	260B	
Ile	251A		→	Pro	260B	
Cys	259A		→	Lys	4 B	

Tabelle 24:

Zusammenfassung der polaren und hydrophoben Wechselwirkungen sowie der Disulphidbrücke an der Grenzfläche zwischen A- und B-Kette von Ricin. Die Abstände für hydrophobe Wechselwirkungen betragen bis 3.9 Å zwischen C-Atomen der Seitenketten und bis 5 Å zwischen dem Zentrum von aromatischen Ringen.

hydrophoben Wechselwirkungen, charakterisiert. Die Wechselwirkungen an der Grenzfläche in Ricin im Vergleich zu ML-I unterscheiden sich hauptsächlich darin, daß sich polare Wechselwirkungen stabilisierend über die gesamte Kontaktfläche erstrecken (Abbildung 43).

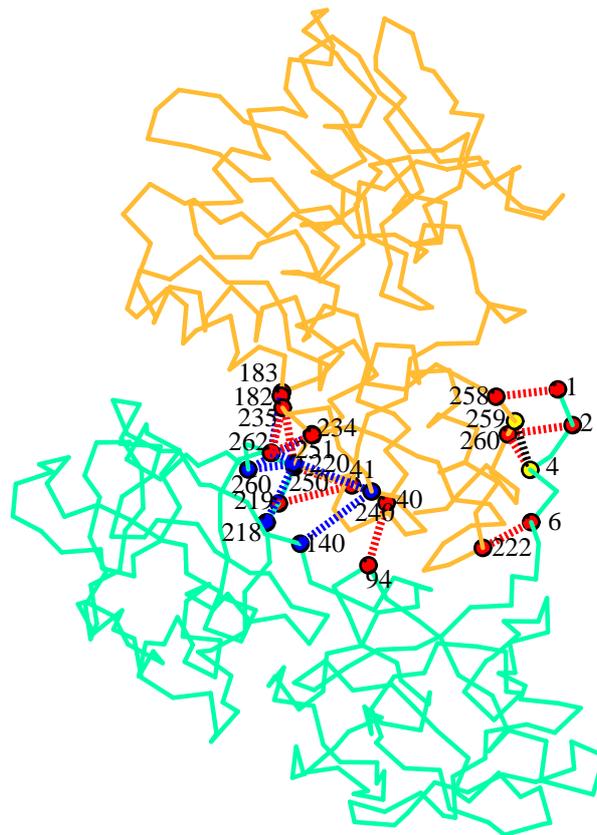


Abbildung 43:

α -Kette von Ricin. Die A-Kette ist in gelb und die B-Kette in türkis eingefärbt. α -Positionen der Aminosäuren, welche in der Grenzflächenregion in Wechselwirkung treten, sind nummeriert und farbig markiert, wobei hydrophobe Interaktionen blau, polare rot und die Disulphidbrücke schwarz dargestellt sind.

In ML-I hingegen (Kapitel 5.1.8.) bündeln sich hydrophobe und polare Wechselwirkungen abhängig von der Lokalisation in der Grenzflächenregion.

6.3.2. Vergleich der Wechselwirkungen an der Grenzfläche zwischen A- und B-Kette von ML-I und Abrin-a

In der Zusammenfassung der Grenzflächen-Wechselwirkungen des Abrin-a (Tabelle 25) fällt auf, daß die Interaktionen im Vergleich zu ML-I mit Ausnahme der Disulphidbrücke nicht

konserviert sind. Der N-Terminus der B-Kette von Abrin-a (Abbildung 44) verläuft seitlich an der A-Kette gestreckt und ist um vier Aminosäuren länger als in ML-I, so daß die Grenzflächenregion entsprechend vergrößert ist. Außerdem werden in Abrin-a in der Mitte der Grenzfläche, welche relativ fern zur exponierten Disulphidbrücke liegt, auch polare Wechselwirkungen von Resten der Domäne II der A-Kette und der Domäne II der B-Kette gebildet. Im Gegensatz dazu befinden sich in ML-I in diesem Abschnitt der Grenzfläche ausschließlich hydrophobe Interaktionen. In Abrin-a dominieren überwiegend polare Wechselwirkungen, welche über die gesamte Kontaktfläche verteilt sind. Hydrophobe und polare Interaktionen alternieren im mittleren Abschnitt der Grenzfläche. Im Vergleich zu ML-I werden in Abrin-a deutlich mehr polare Wechselwirkungen ausgebildet.

			Polare			
His	34 A	ND1	→	Asp	99 B	OD2 3.3
His	34 A	ND1	→	Asp	99 B	OD1 3.2
Asp	41 A	OD1	→	Lys	6 B	NZ 2.9
Asp	41 A	OD2	→	Lys	4 B	NZ 3.0
Thr	44 A	OG1	→	Lys	4 B	NZ 2.6
Arg	169A	NH1	→	Trp	263B	O 2.9
Arg	169A	NH2	→	Trp	263B	O 3.0
Arg	176A	NH1	→	Asp	154B	OD1 3.2
Glu	207A	OE1	→	Tyr	12 B	OH 3.3
Gln	210A	OE1	→	Trp	95 B	O 3.2
Ile	222A	N	→	Phe	267B	OXT 2.8
Ser	233A	OG	→	Gly	101B	N 3.2
Asn	248A	N	→	Lys	6 B	O 2.9
Asn	248A	O	→	Cys	8 B	N 2.7
			Disulphidbrücke			
Cys	247A	SG	→	Cys	8 B	SG 2.0
			Hydrophobe			
Tyr	170A		→	Phe	207B	
Thr	212A		→	Thr	138B	
Pro	214A		→	Pro	14 B	
Pro	214A		→	Tyr	12 B	
Val	227A		→	Phe	14 B	
His	234A		→	Phe	145B	

Tabelle 25:

Zusammenfassung der polaren und hydrophoben Wechselwirkungen sowie der Disulphidbrücke zwischen A- und B-Kette von Abrin-a. Die Abstände für hydrophobe Wechselwirkungen betragen bis 3.9 Å zwischen C-Atomen der Seitenketten und bis 5 Å zwischen dem Zentrum von aromatischen Ringen.

Unter diesem Gesichtspunkt fällt auf, daß die Wechselwirkungen an der Grenzfläche zwischen den verglichenen RIP Proteinen ML-I, Ricin und Abrin-a bis auf die Disulphidbrücke erheblich voneinander abweichen.

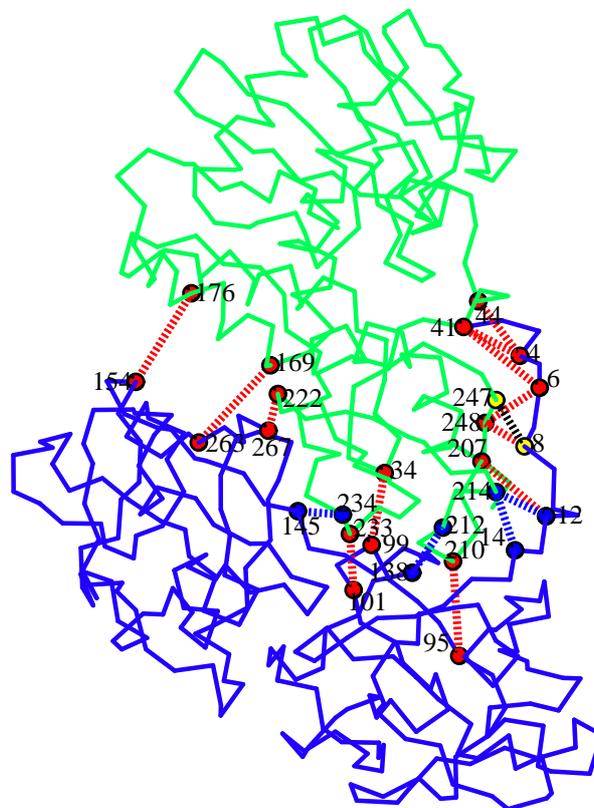


Abbildung 44:

α -Kette von Abrin-a. Die A-Kette ist in grün und die B-Kette in blau dargestellt. α -Positionen der Aminosäuren, welche in der Grenzflächenregion in Wechselwirkung treten, sind nummeriert und farbig dargestellt, wobei hydrophobe Interaktionen in blau, polare in rot und die Disulphidbrücke in schwarz abgebildet sind.

Die Assoziation von RIP Heterodimeren ist insbesondere für die toxische Aktivität von Bedeutung, da nur getrennte A und B-Ketten es vermögen Ribosomen, zu inaktivieren [74]. Im Falle von ML-I [75] und Ricin [76] wurde festgestellt, daß die beiden Untereinheiten noch vor der Translokation über die Membran dissoziieren. Da sich die toxische Aktivität von MLA und RTA grundsätzlich nicht unterscheidet, wird die höhere Toxizität von Ricin über

die unterschiedliche Grenzflächenassoziation erklärt [70]. In der Grenzflächenregion der Ricin B-Kette sind die im Heterodimer verborgenen hydrophoben Domänen für die Interaktion mit der Zellmembran der Zielzelle verantwortlich [77]. Diese Interaktion mit der Zellmembran vermag die ML-I B-Kette im Vergleich nicht [77]. Mutationsexperimente am Ricin unterstreichen den Einfluß der Wechselwirkung in der Grenzflächenregion des Heterodimers. Wie sich zeigte, besitzt die Mutante mit der Substitution Pro 250A zu Ala eine reduzierte RIP Aktivität [78]. Außerdem betrifft dieser Austausch die Wechselwirkung zwischen Pro 250A und Phe 218B in der Grenzflächenregion. Der Vergleich von C-terminalen Aminosäuresequenzen von RIP Typ II mit geringerem toxischen Potential wie Nigrin-b [79] und Ebulin [80] zeigt, daß sich die C-terminalen Aminosäuren von denen in ML-I, Ricin und Abrin-a unterscheiden und unterstreicht deren funktionellen Beitrag zur toxischen Aktivität.

6.4. Vergleich des aktiven Zentrums zwischen ML-I, Ricin und Abrin-a

Voraussetzung für die Entfaltung des toxischen Potentials von RIP Proteinen ist die Internalisierung in die Zielzelle. Zahl und Art der Rezeptoren für die Wechselwirkung mit den RIPs variieren, was die unterschiedliche toxische Aktivität auf Kulturzellen von Ricin, Abrin-a und ML-I zeigt [32].

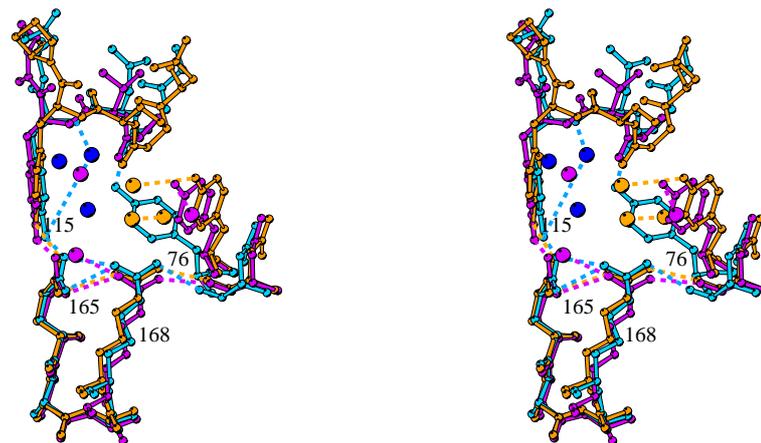


Abbildung 45:

Stereoabbildung der aktiven Aminosäuren von ML-I, Ricin und Abrin-a. Die Aminosäuren von ML-I sind in gelb, diejenigen von Ricin in blau und die von Abrin-a in rot dargestellt. Die jeweiligen Wassermoleküle wurden angelehnt an die Aminosäuren entsprechend gleich gefärbt, als gestrichelte Linien dargestellt.

Unter diesem Aspekt wurden die aktiven Zentren der drei RIP Proteine miteinander verglichen. In Abbildung 45 wurden die C α -Positionen der aktiven Aminosäuren Tyr 76A, Tyr 115A, Glu 165A und Arg 168A (ML-I Nummerierung) von Ricin und Abrin-a auf diejenigen von ML-I überlagert. Die für das „stacking“ mit der Zielbase verantwortlichen aromatischen Aminosäuren liegen zur Proteinoberfläche hin orientiert, während die katalytisch aktiven Aminosäuren Glu 165A und Arg 168A verborgen in der Bindungstasche liegen. Die Konformation der aktiven Reste ist mit Ausnahme der in Ricin abweichenden Seitenkettenkonformation von Tyr 80 (Tyr 76A in ML-I und Tyr 74A in Abrin-a) in den verglichenen RIPs nahezu identisch. Während Tyr 80A in Ricin mit der gegenüberliegenden Hauptkette verbrückt ist, bindet Tyr 76A in ML-I und Tyr 74A in Abrin-a jeweils ein Wassermolekül. Allen drei untersuchten RIP Proteine ist gemeinsam, daß Tyr 115A OH über das OE2 von Glu 165A und Glu 165A über das OE1 an Arg 168A NH1 bindet. Dieses Arginin bindet wiederum über NH2 an das O von Asn 74A (ML-I Nummerierung). Im Hinblick auf den Mechanismus der ribosomeninaktivierenden Reaktion, welcher wie postuliert [55] über den Angriff eines aktivierten Wassermoleküls abläuft, ist auffällig, daß sich die Lage der Wassermoleküle im aktiven Zentrum in den drei RIP-Proteinen unterscheidet. Der Vergleich der aktiven Zentren von verschiedenen RIP Strukturen zeigt, daß Tyr 76A eine hohe Flexibilität in seiner Konformation zeigte. Wie am Komplex von Ricin mit AMP von Weston *et al.* vorgeschlagen [81], hängt die Flexibilität von Tyr 80A in Ricin (äquivalent zu 76A in ML-I) mit der Freisetzung des Produktes Adenin der RIP Reaktion zusammen. Die Aufgabe der sich gegenüberliegenden Tyrosinreste des aktiven Zentrums liegt darin, das Substrat in der Weise zu binden, so daß sich der Purinring des Adenin parallel zu den aromatischen Ringen orientieren kann [55]. Somit wird eine gewisse Orientierung des Adeninrings sichergestellt, über die das N₃ eine Wasserstoffbrücke zu Arg 168A formen kann. In diesem Zusammenhang ist auch bemerkenswert, daß im aktiven Zentrum der ML-I Struktur die aromatische Seitenkette von Tyr 115A ungeordnet ist, soweit sich das benachbarte Pro 116A in seiner cis Konformation befindet. Im Gegensatz dazu ist die Seitenkette 115A geordnet und hat eine deutliche Elektronendichte, wenn sich das benachbarte Pro 116 in der trans Konformation befindet. Die Flexibilität der Seitenkette von Tyr 115A, durch eine cis und trans Konformation bedingt, gibt einen Hinweis darauf, daß möglicherweise Tyr 115A in ML.I und nicht Tyr 76A bei der Bindung des RNA Substrates bzw. bei dessen Freisetzung beteiligt ist.

Experimente gezielter Mutagenese zeigten, welche Rolle die einzelnen aktiven Reste für die toxische Aktivität spielen. Substitution der katalytisch aktiven Aminosäuren Glu 165A zu Gln

des Moleküls in diesem Bereich ist [84]. Vergleichbare Experimente mit Abrin-a zeigten, daß eine Reduktion der toxischen Aktivität um den Faktor 625 erreicht wird, wenn Arg 167A durch Leu ersetzt wurde. Eine Substitution von Glu 164A zu Ala bewirkt eine Reduktion um den Faktor 25 und die Doppelmutante erwies sich als 1250fach weniger aktiv [85]. Im Vergleich dazu ist die Doppelmutante E165Q R168Q von ML-I nur um den Faktor 273 weniger aktiv, woraus Langer *et al.* folgerte [82], daß die Aminosäure, Asp 91A, stellvertretend in einem alternativen RIP Mechanismus [86] beteiligt sein kann. In der ML-I Struktur liegt Asp 91A aber am Rand des aktiven Zentrums „oberhalb“ der Glykosylierungsstelle I. Die Seitenkette des Asp 91A OD2 liegt mit ca. 12 Å jedoch zu weit entfernt vom zentralen Wassermolekül 226 I, um eine katalytische Funktion wahrzunehmen.

Wie der Vergleich der Primärsequenzen (Abbildung 46) der sechs RIP Proteine [RIP Type II: ML-I (MLA), Ricin (RTA), Abrin-a (ABA) und RIP Type I: Pokeweed antiviral Protein (PAP), α -Momorcardin (MOM) und Trichosanthin (TRI)] zeigt, enthalten alle RIP Sequenzen ein Asp oder Glu in Position 91A (ML-I Nummerierung). Diese strukturelle Gemeinsamkeit impliziert, daß eine Seitenkette mit Carboxylgruppe an dieser Stelle essentiell für die RIP Funktion ist. Molekular dynamische Simulationsanalysen mit Substratanaloga am Ricin [87] ordnen dem Asp 91A eine Rolle bei der Substratbindung zu und nicht bei der Katalyse.

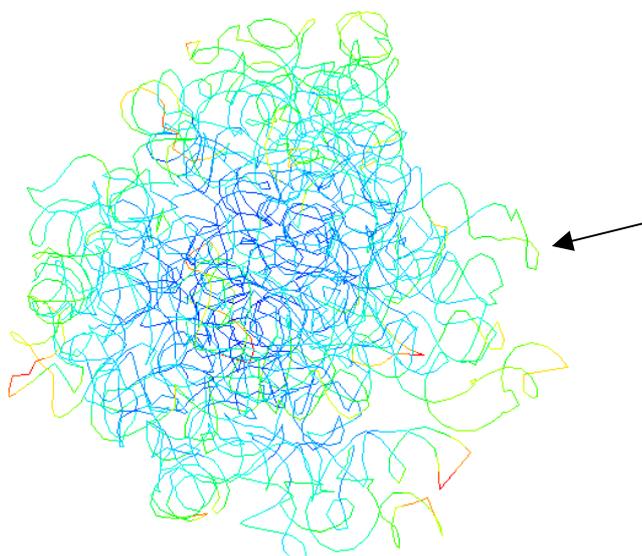


Abbildung 47a:
Zuckerphosphat-Rückgrat der 23S rRNA aus *Haloarcula Marismortui* (1FFK.pdb pdb entry code) [88]. Der Pfeil deutet auf die GAGA-Tetraschleife, Angriffspunkt der RIP Proteine.

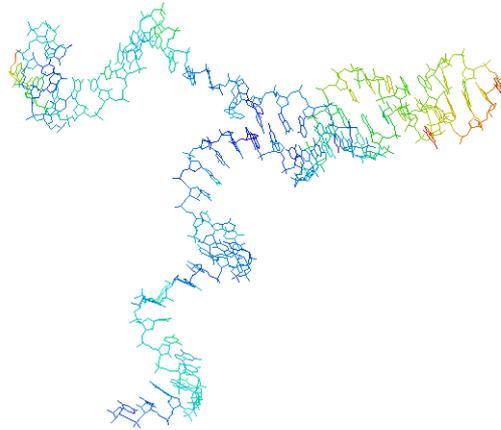


Abbildung 47b:
Zoomansicht der GAGA-Tetraschleife der 23S rRNA.

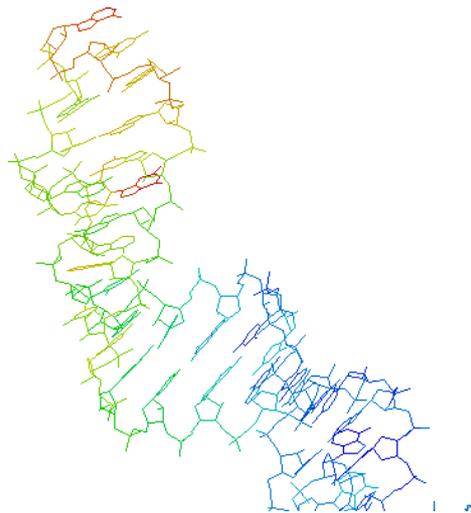


Abbildung 47c:
GAGA-Tetraschleife der 23 S rRNA. Die Zielbase Adenin ist an der Oberfläche exponiert in rot dargestellt.

Weitere Mutagenese Experimente am Ricin ergaben, daß die Substitution von Asn 209A zu Ser am unteren Rand des aktiven Zentrums eine Reduktion der RIP Aktivität zur Folge hat. Dieser Rest übernimmt offensichtlich eine Funktion bei der Substratbindung bzw. bei der Substraterkennung [83]. Amidgruppen werden häufig für die spezifische Erkennung von Nukleinsäuren herangezogen [89]. ML-I verfügt über ein Thr in dieser Position, was aber nicht der alleinige Grund für das geringere toxische Potential sein kann [90]. RIP Proteine interagieren hoch spezifisch mit der GAGA Tetraschleife der 28S rRNA (Abbildung 47a-c) [1], welche eine der konserviertesten Sequenzen in der Natur ist [83]. Da ein synthetisiertes

35 Basen langes Fragment mit dieser spezifischen GAGA Sequenz mit nur sehr geringen Raten von RIP Proteinen umgesetzt wird [91], erkennen RIP Proteine wahrscheinlich übergeordnete Strukturen des Ribosoms. Das Ribosom als Substrat ist wesentlich größer als das RIP Protein, folglich sind Aminosäuren der Proteinoberfläche räumlich weit entfernt vom aktiven Zentrum mit der Substratbindung bzw. dessen Positionierung miteingebunden. Deshalb wurde die Proteinoberfläche um das aktive Zentrum von ML-I, Ricin, Abrin-a und den Typ I RIPs Pokeweed antiviral Protein (PAP), Trichosanthin (TRI) und α -Momorcardin (MOM) auf strukturelle Gemeinsamkeiten hin untersucht. Für die Ricin A-Kette ist ein Arginin-reiches Bindungsmotiv um das aktive Zentrum hin beschrieben, welches aus sechs Argininresten besteht, fünf davon sind an der Bindung der rRNA beteiligt [87]. Bei Vergleich der äquivalenten Aminosäure-Positionen (Abbildung 46 und 48) des Arginin-reichen Motivs von Ricin mit ML-I, Abrin-a und den genannten RIP Proteinen vom Typ I fällt auf, daß die Arginine einerseits konserviert sind oder stellvertretend durch räumlich benachbarte Arginine ersetzt werden können. Für einige Proteine ist das Motiv von sechs geladenen Resten reduziert oder Arginin wird durch Lysin ersetzt. Neben dem katalytisch aktiven Arg 168A ist auch Arg 125A am Rand des aktiven Zentrum in allen genannten RIP Proteinen konserviert. Das Arg 120A, ebenfalls am Rand des aktiven Zentrums, ist auch in Ricin, Abrin-a, MOM und TRI in homologer Position, während in PAP ein Lysin diese Position einnimmt. Dasselbe Arrangement säumt einen weiteren Bereich am aktiven Zentrum. Alle bislang verglichenen RIP Primärsequenzen weisen in der dem Arg 52A entsprechenden Position einen Argininrest auf, während nur PAP Lysin 48A in äquivalenter Stelle trägt. Unterhalb des katalytischen Zentrums befinden sich in Ricin eng benachbart Arg 213A und Arg 258A, welche in ML-I fehlen, PAP hingegen besitzt die Lysine 208A und 251A in entsprechender Position. In räumlicher Nähe zu Arg 258A in Ricin befindet sich Arg 203A in Abrin-a, die Sequenzen MOM und TRI enthalten beide Lys 197A an dieser Stelle. Es fällt weiterhin auf, daß sich an der Oberfläche von ML-I in der Nähe des aktiven Zentrums eine weitere positiv geladene Aminosäure, Lys 90A, befindet. Dieses Lysin findet sich auch in Abrin-a und PAP.

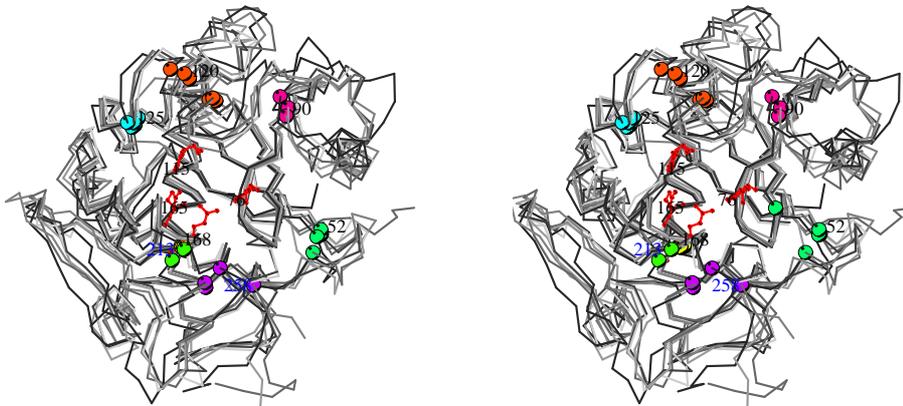


Abbildung 48:

Stereoabbildung der C α -Kette von RTA, ABA, PAP, MOM, TRI und MLA. Die aktiven Aminosäuren von MLA sind als rotes Kugel-Stab-Modell eingezeichnet. Äquivalente Reste des Arginin-reichen Motives sind als gleichfarbige Kugeln dargestellt. Die schwarze Nummerierung bezieht sich auf MLA, die blaue Nummerierung auf die nur im Ricin vorkommenden Reste.

Die Verteilung von geladenen Aminosäuren an der Proteinoberfläche der genannten RIP Type I Proteine und der A-Kette der RIP vom Typ II führt dazu, daß die Typ I RIP über eine positive Nettoladung verfügen.

Arginin-reiches Motiv:	MLA	RTA	ABA	PAP	MOM	TRI
Aminosäure	R 52 A K 90 A R 120A R 125A R 168A Q 201A V 248A	R 48 A R 125A R 134A R 180A R 213A R 258A	R 50 A K 88 A R 118A R 124A R 167A N 200A R 203A	K 48 A K 89 A K 128A R 134A R 178A K 208A K 251A	R 46 A R 113A R 122A R 163A N 200A K 197A	R 46 A R 113A R 122A R 163A A 194A K 197A
Asp/Glu	20	23	29	22	21	19
Arg	16	21	18	9	16	13
Lys	1	2	3	22	10	10
Homologie zu MLA	-	35.8 %	41.3 %	29.4 %	32.3 %	33.9 %
r.m.s. Abweichung zu MLA [Å]	-	2.3	1.8	5.3	2.8	3.0

Tabelle 26:

Zusammenstellung der äquivalenten Aminosäuren des Arginin reichen Motives in MLA, RTA, ABA, PAP, MOM und TRI. Die Gesamtzahl der positiv und negativ geladenen Reste sowie die Homologie zu MLA sind angegeben.

Im Gegensatz dazu ist die Oberfläche von ML-I und Abrin-a insgesamt negativ geladen, die von Ricin ist ungeladen. Der Vergleich der Primärsequenzen des aktiven Zentrums der sechs RIP Proteine zeigt, daß die Aminosäuren Asn 74A, Glu 196A und Trp 199A alle hoch konserviert sind. Asn74A und Glu 196A bilden Wasserstoffbrücken mit aktiven Aminosäuren (Tabelle 4) und tragen zur Konformation des aktiven Zentrums essentiell bei. Wie Mutagenese Experimente am Ricin mit Substitution von Trp 211A (Trp 199A in ML-I) zeigten [92], ist das in allen RIP Proteinen konservierte Trp in die Substratbindung involviert. Der obige Vergleich der aktiven Zentren der sechs ausgewählten RIP Proteine und ihrer Proteinoberfläche zeigt, daß die Faktoren, die das cytotoxische Potential der RIP beeinflussen können, offenbar sehr vielfältig sind.

6.5.1. Die Architektur der Zuckerbindungsstelle I in Ricin

Die Architektur der Zuckerbindungsstelle I in Ricin gleicht der des Mistellektin I. Den „Boden“ der Bindungsstelle bildet das Tripeptid Asp-Val-Arg (Aminosäuren 22B bis 24B), das durch Wechselwirkungen zwischen Hauptkettenatomen zu dem jeweils übernächsten Hauptkettenatom einen starre, gekrümmte Schleife ähnlich wie in ML-I bildet. In dieser Schleife ist die Aminosäure Asp 27B in ML-I zu Gly 26B in Ricin ausgetauscht. Wie in ML-I bewirkt das zentrale Asp 22B die epimerspezifische Wechselwirkung mit der 4'OH- und 3'OH-Gruppe des Galactosylanteils der Lactose (Abbildung 49). Die zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zwischen NE2 von Gln 35B und der 4'Hydroxylgruppe des Zuckers ist in ML-I und Ricin konserviert.

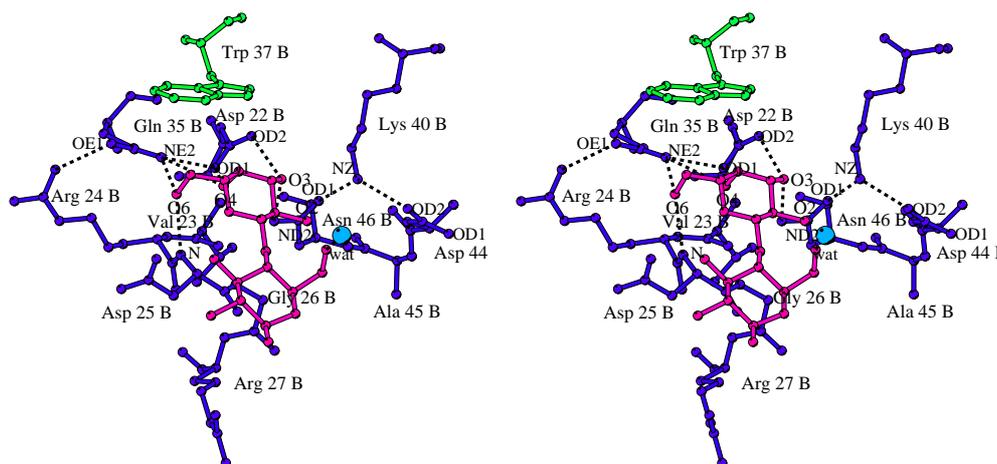


Abbildung 49:

Stereoabbildung der Zuckerbindungsstelle I von Ricin im Komplex mit Lactose. Die Lactose ist in rot, die aromatische Aminosäure Trp 37B ist in grün, Wassermoleküle sind in hellblau und die übrigen Aminosäuren der Zuckerbindungsstelle sind in blau dargestellt. Wasserstoffbrücken sind als schwarz gestrichelte Linien angedeutet.

Den oberen Rand säumt die Seitenkette von Trp 37B, welche als hydrophobe Plattform die „stacking interaction“ mit dem Pyranosering vermittelt. Die planaren Ebenen der beiden Ringstrukturen liegen in einem Winkel von 45° zueinander.

Rest	Atom		Rest	Atom	Abstand in Å
Asp 22	B OD1	→	Gal 264	O4	2.9
Asp 22	B OD2	→	Gal 264	O3	3.1
Asp 25	B N	→	Gal 264	O6	3.1
Gln 35	B NE2	→	Gal 264	O6	3.1
Asn 46	B ND2	→	Gal 264	O3	2.9
Asp 22	B OD1	→	Gln 35	B NE2	2.9
Lys 40	B NZ	→	Asn 46	B OD1	3.2
Asp 22	B O	→	Arg 24	B N	3.4
Val 23	B O	→	Asp 25	B N	3.6
Arg 24	B O	→	Gly 26	B N	2.7

Tabelle 27:

Zusammenstellung der Wasserstoffbrücken zwischen den zuckerbindenden Aminosäuren der Zuckerbindungsstelle I und Galactose sowie der Wechselwirkungen, die für die Konformation der Zuckerbindungsstelle wichtig sind.

Der Pyranosering ist in Ricin im Vergleich zu ML-I stärker zur Ebene der aromatischen Seitenkette verkippt. Somit findet die 3'-Hydroxylgruppe des Galactoseanteils der Lactose in ND2 des Asn 46B ihren Bindungspartner und nicht zu Lys 41B, wie für ML-I. Darüber hinaus

Rest	Atom		Rest	Atom	Abstand in Å
Asp 234	B OD1	→	Gal 267	O4	2.9
Asp 234	B OD2	→	Gal 267	O3	2.9
Ala 237	B N	→	Gal 267	O4	2.8
His 251	B NE2	→	Gal 267	O3	3.0
Asn 255	B ND2	→	Gal 267	O3	2.8
Val 235	B O	→	Asn 255	B ND2	3.2
Asp 234	B O	→	Arg 236	B N	3.5
Val 235	B O	→	Ala 237	B N	3.4
Arg 236	B O	→	Ser 238	B N	2.9

Tabelle 28:

Zusammenstellung der Wasserstoffbrücken zwischen den zuckerbindenden Aminosäuren der Zuckerbindungsstelle II und Lactose sowie der Wechselwirkungen, die für die Architektur der Zuckerbindungsstelle wichtig sind.

bildet die 6'-OH-Gruppe des Zuckers eine Wasserstoffbrücke zu N des Asp 25B sowie zu NE2 des Gln 35B. Diese Wechselwirkungen werden in der Struktur von ML-I nicht gebildet. Außerdem gibt es im Ricin-Lactose Komplex keinerlei Interaktionen zur 2'-Hydroxylgruppe

des Zuckers, da diese im Gegensatz zum ML-I-Lactose-Komplex mehr zur Proteinoberfläche orientiert ist.

6.5.2. Die Architektur der Zuckerbindungsstelle II in Ricin

Die Zuckerbindungsstelle II in Ricin ist ähnlich aufgebaut wie die in ML-I. Die Hauptinteraktion mit dem Galactosylanteil der Lactose wird über die 3' und 4' Hydroxylgruppe des zentral in der Bindungstasche angeordneten Asp 234B vermittelt (Abbildung 50). Die zusätzliche Wechselwirkung zwischen dem O4 des Galactoserestes der Lactose und N von Ala 237B entspricht der Bindung an Gln 238B in ML-I. Die Bindung zwischen O3 des Zuckers und ND2 von Asn 255 ist in Ricin und ML-I konserviert. Darüber hinaus wird eine weitere Bindung zwischen dem O3 des Galactoserestes und NE2 von His 251B in der Zuckerbindungsstelle II in Ricin ausgebildet. Die Ebene der aromatischen Seitenkette 248B bildet einen Winkel von 26° zur planaren Pyranoseebene. Somit sind im Vergleich zu ML-I der gebundene Zucker und die aromatische Plattform zur „stacking interaction“ nahezu identisch zueinander verkippt. Den „Boden“ der Zuckerbindungsstelle II in Ricin bildet das Tripeptid Asp-Val-Arg mit den Resten Asp 234B, Val 235B und Arg 236B, welches in ML-I aus dem Aminosäuremuster Asp-Val-Ala besteht.

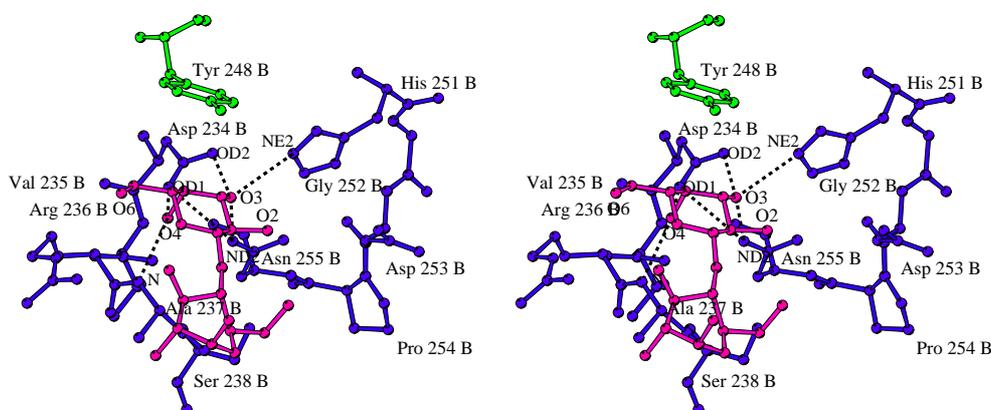


Abbildung 50:

Stereoabbildung der Zuckerbindungsstelle II von Ricin im Komplex mit Lactose. Die Lactose ist in rot, die aromatische Aminosäure Tyr 248B ist in grün, Wassermoleküle in hellblau und die übrigen Aminosäuren der Zuckerbindungsstelle sind in blau dargestellt. Wasserstoffbrücken sind als schwarz gestrichelte Linien angedeutet.

Entscheidend sind offensichtlich die Wechselwirkungen, die von den Hauptkettenatomen des Tripeptids zur jeweils übernächsten Aminosäure ausgebildet werden und die gekrümmte Schleife am Boden der Bindungstasche aufbauen. Wie in der Zuckerbindungsstelle II des ML-I wird auch in Ricin, bedingt durch die Orientierung von O2 zur Proteinoberfläche, keine Wasserstoffbrücke zwischen dem O2 der Pyranose und dem Lektin geknüpft. Mutationsanalysen von zuckerbindenden Aminosäuren im RTB, wie auch die Substitution von Tyr 248B (entspricht Tyr 249B in ML-I) zu His zeigte eine verminderte Affinität gegenüber Galactose [92]. Ebenso weist die RTB Mutante mit dem Austausch Asn 255B (entspricht Asn 256B in ML-I) zu Ala durch Verlust einer Wasserstoffbrücke zum Liganden eine reduzierte Lektinaktivität auf [94]. Diese Ergebnisse unterstreichen die Schlüsselfunktion des aromatischen Restes am Rand der Zuckerbindungsstelle II wie auch des Asparagin, welches die Tasche begrenzt. Untersuchungen über die Affinität von Ricin gegenüber D-Galactose und Lactose liegen im Bereich auch der für ML-I gefundenen I_{50} -Werte. Ricin verfügt gegenüber D-Galactose über einen I_{50} -Wert von 1.0 mM, gegenüber Lactose über einen Wert von 0.4 mM. Unterschiede in der Spezifität zeigen sich aber bei der Affinität gegenüber N-Acetylgalactosamin. Während Ricin über einen I_{50} -Wert von 1.7 mM bezüglich N-Acetylgalactosamin verfügt, beträgt dieser für ML-I 120 mM. Ricin bindet N-Acetylgalactosamin nur in der Galaktosebindungsstelle II [95, 96]. Auf der Basis der Struktur der Galaktosebindungsstelle I ist im Falle von ML-I ein voluminöser Substituent am C2 sterisch gehindert. Im Gegensatz dazu wird in der Zuckerbindungsstelle I im Ricin zwar keine Interaktion zwischen O2 der Galactose und dem Lektin geknüpft, dennoch scheint das Substrat ungünstig in der Tasche orientiert. Dadurch wird kein anderer Substituent als eine Hydroxylgruppe toleriert. Ein weiterer struktureller Unterschied zwischen den Zuckerbindungsstellen I und II von ML-I und Ricin zeigt sich in den verschiedenen Verkippungswinkeln der planaren Ebene der aromatischen Seitenkette und der Ebene des Galactoserings. In Zuckerbindungsstelle I beträgt dieser Verkippungswinkel im Falle von Ricin 45° gegenüber 33° für ML-I. Bemerkenswerterweise sind sich die Verkippungswinkel der Zuckerbindungsstelle II mit 29° für ML-I und 26° für Ricin fast identisch. Im Vergleich dazu beträgt dieser Winkel 24° im Peanut Lektin (1BZW.pdb, pdb entry code) und 12° im *Erythrina coll.* Lektin (1LTE.pdb, pdb entry code). Im Mittel wird ein Winkel von 32° bei Galactose-spezifischen Lektinen gefunden [23]. Die hydrophobe Wechselwirkung mit der aromatischen Seitenkette liefert Stabilität für den Zucker-Lektin-Komplex, aber keine Spezifität [26]. Im Falle von Ricin wurde mittels Spektroskopie [95] und über chemische Modifikationen [96] festgestellt, daß die Zuckerbindungsstelle II eine höhere Affinität

gegenüber der Zuckerbindungsstelle aufweist. Möglicherweise sind die Verkippungswinkel der Zuckerbindungsstelle II in ML-I als auch in Ricin energetisch bevorzugt, woraus im Vergleich zu Zuckerbindungsstelle I höhere Bindungskonstanten resultieren.

6.6. Vergleich der Galactosebindungsstelle I von ML-I, Ricin, Abrin-a mit der Galactosebindungsstelle von *Erythrina corallodendron* Lektin, Erdnuß Lektin und der dritten potentiellen Galactosebindungsstelle von ML-I

Im folgenden sind die Galactosebindungsstelle I von ML-I, Ricin, Abrin-a den Galactosebindungsstellen von *Erythrina corallodendron* Lektin [62] und Erdnuß Lektin [13] sowie der potentiellen dritten Galactosebindungsstelle des ML-I gegenübergestellt. Im anschließenden Vergleich werden die strukturellen Grundelemente von Galactose-spezifischen Lektinen aus verschiedenen Pflanzenarten miteinander verglichen. Zur besseren Übersicht ist die gebundene Galactose in den folgenden Abbildungen nicht dargestellt. Die Wechselwirkungen zwischen Galactose bzw. Lactose und den zuckerbindenden Aminosäuren der Galactosebindungsstelle I von ML-I sind im Detail in Kapitel 5.2.3. beschrieben. Da sich die Schlüsselemente der Galactosebindungsstelle I und II in ML-I und Ricin gleichen, wird im nachfolgenden Vergleich nur auf die Galactosebindungsstelle I eingegangen.

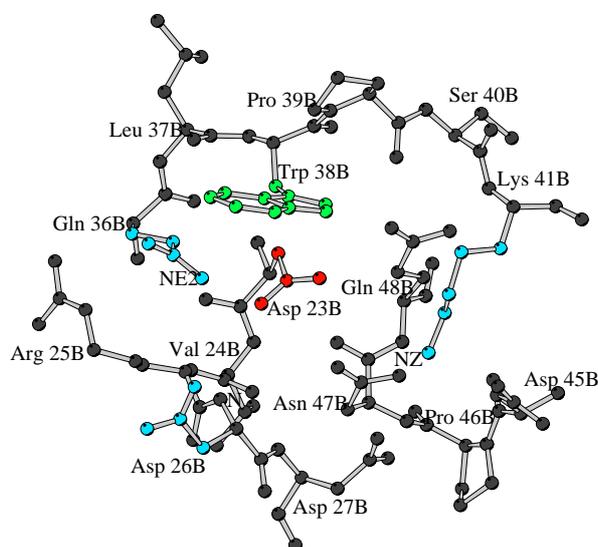


Abbildung 51:

Zuckerbindungsstelle I des Mistellektin-I. Die Seitenkette des zentralen Asp 23B ist in rot, die hydrophobe Plattform von Trp 38B in grün und die übrigen in die Zuckerbindung involvierten Aminosäuren Gln 36B, Lys 41B und Asp 26B sind in blau dargestellt.

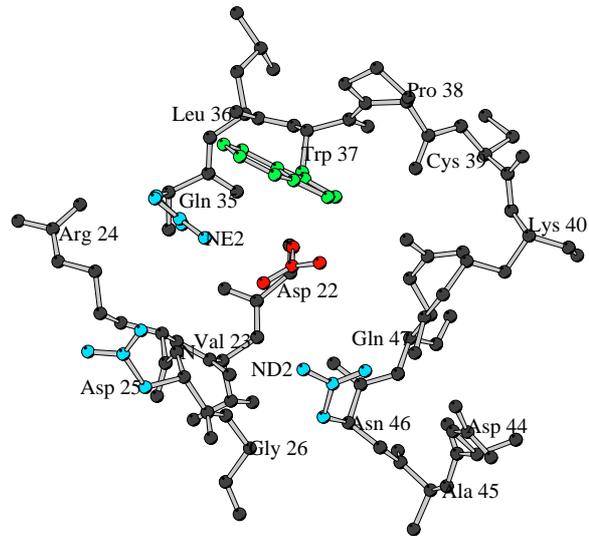


Abbildung 52:
Zuckerbindungsstelle I des Ricin. Die Seitenkette des zentralen Asp 22B ist in rot, die hydrophobe Plattform von Trp 37B in grün und die übrigen in die Zuckerbindung involvierten Aminosäuren Gln 35B, Asn 46B und Asp 25B sind in blau dargestellt.

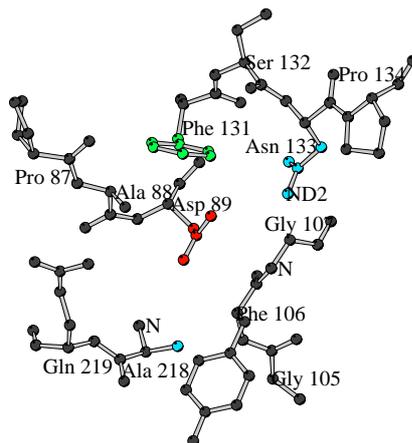


Abbildung 53:
Zuckerbindungsstelle des *Erythrina corallodendron* Lectin [62]. Die Seitenkette des zentralen Asp 89 ist in rot, die hydrophobe Plattform von Phe 131 in grün und die übrigen in die Zuckerbindung involvierten Aminosäuren Asn 133 und Ala 218 sind in blau dargestellt.

Ähnlich wie in ML-I und Ricin vollzieht sich die Bindung der Pyranose an das *Erythrina corallodendron* Lektin über die 4'OH Gruppe der Galactose zur Hauptkette am Boden der Tasche, in diesem Fall zum N des Ala 218 (Abbildung 53). Darüber hinaus bestehen Wechselwirkungen zwischen der 3'OH Gruppe der Galactose zum ND2 des Asn 133 und N des Gly 107. Am oberen Rand befindet sich die aromatische Aminosäure Phe 131, welche als hydrophobe Plattform parallel zum Pyranosering orientiert ist und so ein „stacking“ mit dem Zuckerring ermöglicht. Im Zentrum der Bindungstasche befindet sich Asp 89, welches starke Wasserstoffbrücken zu den 4' und 3' -OH Gruppen der Galactose formt und darüber hinaus die polare Umgebung für die Zuckerbindung schafft [60]. Mutationsanalysen der Zuckerbindungsstelle des *Erythrina corallodendron* Lektin mit Substitution von Asp 89 durch Ala bzw. Asn 133 durch Ala oder Asp und Phe 133 durch Ala oder Val zeigten, daß das Lektin dadurch seine Aktivität verliert [93]. Analog zu den bisher vorgestellten Galactose-spezifischen Lektinen ist auch die Zuckerbindungsstelle im Erdnuß Lektin [13] (Abbildung 54) aufgebaut. Im Zentrum der Zuckerbindungstasche befindet sich Asp 83.

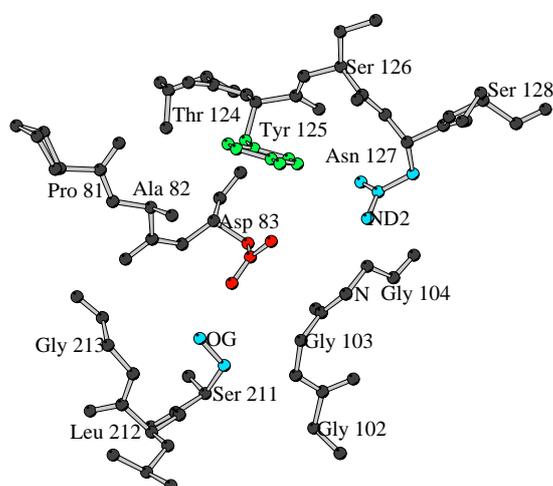


Abbildung 54:

Zuckerbindungsstelle des Erdnuß Lektin [13]. Die Seitenkette des zentralen Asp 83 ist in rot, die hydrophobe Plattform von Tyr 125 in grün und die übrigen in die Zuckerbindung involvierten Aminosäuren Asn 127 und Ser 211 sind in blau dargestellt.

Die zuckerbindenden Aminosäuren ragen von den äußeren Rändern in die Tasche. Ser 211 OG bindet an die 4'OH-Gruppe der Galactose und Asn 127 ND2 interagiert mit der 3'OH-Gruppe der Pyranose. In diesem Fall fungiert Tyr 125 am oberen Rand der

Zuckerbindungsstelle als hydrophober „stacking“ Partner für den Zuckerring. Im Gegensatz zu ML-I und Ricin konnte Abrin-a bisher nur in der Lactose bzw. Galactose freien Form kristallisiert werden [94]. Der Grund hierfür besteht darin, daß terminale Mannosereste der Glykosylierung des Abrin-a Moleküls in die Zuckerbindungsstelle des Nachbarmoleküls binden und somit die Moleküle im Kristallgitter verbrücken. Die Architektur der Galactosebindungsstelle 1 von Abrin-a ist ähnlich zu der von ML-I und Ricin aufgebaut (Abbildung 55). Im Zentrum der Bindungstasche von Abrin-a befindet sich Asp 27B, welches dem Asp 26B in ML-I bzw.

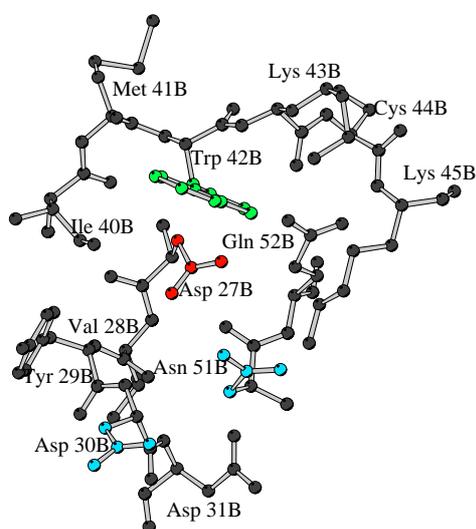


Abbildung 55:

Zuckerbindungsstelle I des Abrin-a. Die Seitenkette des zentralen Asp 27B ist in rot, die hydrophobe Plattform von Trp 42B in grün und die übrigen in die Zuckerbindung der Mannose der benachbarten Glykosylierungsstelle involvierten Aminosäuren Asp 30B und Asn 51B sind in blau dargestellt.

Asp 25B in Ricin äquivalent ist und mit der 4'OH Gruppe der Pyranose interagiert. Das Dach der Zuckerbindungsstelle bildet Trp 42B, welches dem Trp 38B in ML-I entspricht. Den einzigen Unterschied bildet Ile 40B in Abrin-a am Rand der Zuckerbindungsstelle. Sowohl in ML-I als auch in Ricin befindet sich in dieser Position ein Gln, welches über NE2 an die 4'OH-Gruppe der Galactose bindet. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Architektur der Zuckerbindungsstelle in Abrin-a der von ML-I und Ricin grundsätzlich gleicht.

In allen Lektinen aus Leguminosen sind die Aminosäuren Asp, Asn und eine aromatische Aminosäure strukturell konserviert und kommen in topologisch konservierten Positionen vor,

unabhängig davon, ob diese spezifisch für Galactose, Mannose oder Glucose sind [22]. Die vorher verglichenen Gal-spezifischen Lektine aus unterschiedlichen Familien verfügen über dieses Arrangement von Asp, Asn und einem Aromat in der hier beschriebenen Weise. Die Diskriminierung zwischen Galactose und Mannose vollzieht sich ausschließlich über die Wechselwirkung mit der 4' und 6' Hydroxylgruppe im Falle von Mannose und über die 4' und 3' Hydroxylgruppe bei Galactose [22].

Die Architektur der potentiellen dritten Galactosebindungsstelle in Subdomäne 1 β ähnelt stark den Zuckerbindungsstellen des ML-I und Ricin (Abbildung 56). Der Vergleich mit den galactosespezifischen Lektinen aus Erdnuß Lektin und *Erythrina collarodendron* Lektin unterstreicht die Hauptmerkmale einer typischen Galactosebindungsstelle. Mit dem Ziel im Rahmen eines zielgerichteten Mutagenese-Experimentes, die Zuckerbindungsfähigkeit der

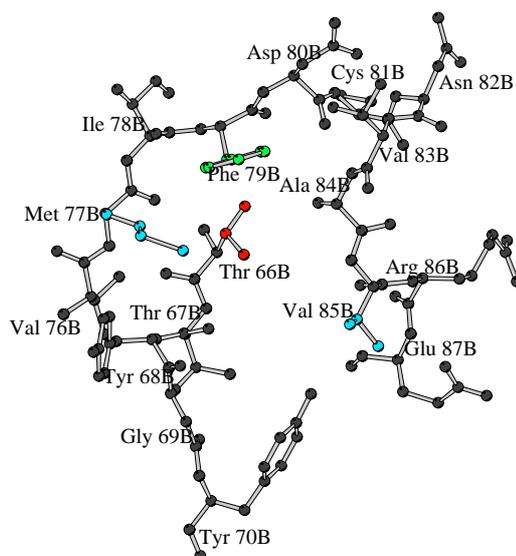


Abbildung 56:

Potentielle dritte Zuckerbindungsstelle I von ML-I. Die Seitenkette des zentralen Thr 66B ist in rot, die hydrophobe Plattform von Phe 79B in grün und die potentiell bindenden Aminosäuren Val 85B am rechten Rand und Met 77B am linken Rand der Tasche sind in blau dargestellt.

dritten potentiellen Galactosebindungsstelle wiederherzustellen, müßte das zentral angeordnete Thr 66B analog der angeführten Lektine durch ein Asp ausgetauscht werden. Damit würde die Interaktion zur 3'OH und 4'OH-Gruppe der Galactose sowie eine optimalere Ladungsverteilung in der Bindungstasche für eine effektive Zuckerbindung vermittelt [60]. Außerdem müßte Met 77B durch eine polare oder geladene Aminosäure wie z.B. Lys ausgetauscht werden. Die Wasserstruktur und das gebundene Glycerol nehmen in der dritten

potentiellen Galactosebindungsstelle analog den Galactosebindungsstellen I und II die Positionen der Hydroxylgruppen des potentiell gebundenen Zuckers ein, so daß eine Wiederherstellung der Zuckerbindungsfähigkeit auf der Basis der hier vorgestellten Kristallstruktur möglich ist. Weiterhin wird die Reorganisation von Wassermolekülen des Lösungsmittels die nötige Bindungsenthalpie für die Zucker-Lektin-Wechselwirkung liefern [95]. Dies wird durch die Strukturdaten unterstützt, da die Temperaturfaktoren der zuckerbindenden Aminosäuren und der Glycerol bindenden Aminosäuren in der dritten potentiellen Galactosebindungsstelle vergleichsweise zu den niedrigsten im gesamten Molekül gehören.

6.7. Ausblick

Die strukturellen Kenntnisse über die Zucker-Lektin-Wechselwirkungen vermitteln einen Überblick über die Interaktion zwischen ML-I und galactose-terminierten Glykolipid- und Glykoprotein-Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Dies trägt zum Verständnis der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung auf molekularer Ebene bei.

Der zielgerichtete Transfer von Wirkstoffmolekülen in Zielzellen stellt nach wie vor ein großes Problem dar. Hier bietet die Struktur der Mistellektin-I B-Kette ein vielversprechendes Target für die Entwicklung von spezifischen Transportmolekülen. Insbesondere die direkte Kopplung von Wirkstoffen an die B-Kette ist ein möglicher Ansatzpunkt. In diesem Zusammenhang ist die Optimierung der dritten Galactosebindungsstelle von großem Interesse. Mit Einführung einer zusätzlichen Zuckerbindungsstelle läßt sich die Affinität des MLB gegenüber der Galactose relativ leicht erhöhen. Weitergehende strukturelle Untersuchungen an isolierten ML-I B-Ketten können Hinweise auf das Lektin typische Oligomerisierungsverhalten liefern.

Strukturanalysen von ML-I Kristallen im Komplex mit Inhibitoren werden weitere Details, Aufschluß über das aktive Zentrum und die toxische Aktivität zeigen. Daraus können sich dann umfassende Erkenntnisse über die an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren ergeben. Darüber hinaus können Mutationsanalysen der als invarianten angesehenen Aminosäuren des aktiven Zentrums Rückschlüsse liefern, welche Aminosäuren tatsächlich für die Konformation und Aktivität essentiell sind. Dabei sollte auch das Arginin-reiche Motiv in Mutationsanalysen mit einbezogen werden, um diejenigen Aminosäuren zu identifizieren, welche für die Interaktion mit dem Ribosomen verantwortlich sind.

In der Nachbehandlung von Krebs wird eine auf ML-I normierte Mistelextrakttherapie eingesetzt. Trotz zahlreicher Untersuchungen ist der Wirkmechanismus des immunstimulierenden Effekts dieser Vielstoffgemische aus wässrigem Mistelextrakt relativ unverstanden. Nur eine detaillierte Röntgenstrukturanalyse der Einzelkomponenten insbesondere der Hauptbestandteile, ML-I, ML-II, ML-III, chitin-bindendes ML und der Viscotoxine, wird weiterführende Ansätze zum Verständnis der Wirkungsweise der Mistelextrakte in der adjuvanten Krebstherapie liefern können.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Endo, Y., Mitsui, K., Motizuki, M. and Tsurugi, K. (1987) The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28S ribosomal RNA caused by the toxins. *J. Biol. Chem.* **262**, 5908-5912.
- [2] Barbieri, L., Battelli, M. G. and Stirpe, F. (1993) Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochem. Biophys. Acta* **1154**, 237-282.
- [3] Sperti, S., Montanaro, L., Mattioli, A. and Testoni, G. (1975). Relationship between elongation factor I- and elongation factor II- dependent guanosine triphosphatase activities of ribosomes. Inhibition of both activities by ricin. *Biochem. J.* **148**, 447-451.
- [4] Reinbothe, S., Reinbothe, C., Lehmann, J., Becker, W, Apel, K. and Parthier, B. (1994) JIP60, a methyl jasmonate-induced ribosome-inactivating protein involved in plant stress reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7012-7016.
- [5] Peumans, W. J., Hao, Q., Van Damme, E. J. M. (2001). Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? *FASEB J.* **15**, 1493-1506.
- [6] Peumans, W. J., Van Damme, E. J. M. (1995) Lectins as Plant Defense Proteins. *Plant Physiol.* **109**, 347-352.
- [7] Lin, J. Y., Tsering, K. Y., Chen, C. C., Lin, L. T. and Tung, T. C. (1970) Abrin and ricin: new anti-tumor substances . *Nature* (London) **227**, 292-293.
- [8] Van Parijs, J., Broeckert, W. F., Goldstein, I. J. & Pneumans, W. J. (1991). Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta* **183**, 258-262.
- [9] Cammue, B. P. A., Peters, B. & Pneumans, W. J. (1986) A new lectin from tulip (*Tulipa*) bulbs. *Planta* **169**, 583-588.
- [10] Efimov, A. V. (1994) Common structural motifs in small proteins and domains. *FEBS Lett.* **355**, 213-219.
- [11] Loris, R., Van Overberge, D., Dao-Thi, M. H., Poortsmans, F., Maene, N., Wyns, L. (1994). Structural analysis of two crystal forms of lentil lectin at 1.8 Å resolution. *Proteins* **20**, 330-346.
- [12] Dessen, A., Gupta, D., Sabesan, S., Brewer, C. F. & Sacchettini, J. C. (1995) X-ray crystal structure of the soyabean agglutinin cross-linked with a biantennary analog of the blood group I carbohydrate antigen. *Biochemistry* **34**, 4933-4942.
- [13] Banerjee, R., Das, K., Ravishankar, R., Suguna, K., Surolia, A. & Vijayan, M. (1996) Conformation, protein-carbohydrate interactions and novel subunit association in the refined structure of peanut lectin-lactose complex. *J. Mol. Biol.* **259**, 281-296.
- [14] Hester, G., Kaku, H., Goldstein, U., Wright, C. S. (1995) Structure of mannose-specific Snowdrop (*Galanthus nivalis*) lectin is representative of a new plant lectin Family. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 472-479.
- [15] Montfort, W., Villafranca, J. E., Monzingo, A. F., Ernst, S. R., Katzin, B., Rutenber, E., Xoung, N. H., Hamlin, R. and Robertus, J. D. (1987) The Three-dimensional Structure of Ricin at 2.8 Å. *J. Biol. Chem.* **262**, 5398-5403.
- [16] Tahirov, T. H., Lu, T. H., Liaw, Y.-C., Chen, Y.-L., Lin, J.-Y. (1995) Crystal Structure of Abrin-a at 2.14 Å. *J. Mol. Biol.* **250**, 354-367.
- [17] Transue, T. R., Smith, A. K., Mo, K., Goldstein, U., Saper, M. A. (1997). Structure of benzyl T-antigen disaccharide bound to *Amaranthus caudatus* agglutinin. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 779-783.
- [18] Sankaranarayanan, R., Sekar, K., Banerjee, R., Sharma, V., Surolia, A., Vijayan, M. (1996) A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin with β -prism fold. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 596-603.

- [19] Peumans, W. J., Verhaert, P., Pfüller, U., Van Damme, E. J. M. (1996) Isolation and partial characterization of a small chitin-binding lectin from mistletoe (*Viscum album*) leaves. *FEBS Lett.* **396**, 261-265.
- [20] Stoeva, S., Franz, M., Wacker, R., Krauspenhaar, R., Guthöhrlein, E., Mikhailov, A., Betzel, C. and Voelter, W. (2001). Primary Structure, Isoforms and Molecular Modeling of a Chitin-Binding Mistletoe Lectin. *Arch. Biochem. Biophys.* **392**, 23-31.
- [21] Drickamer K. (1995). Increasing diversity of animal lectin structures. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 612-616.
- [22] Rini, J. M. (1995) Lectin Structure. *Annu. Rev. Biophys. Struct.* **24**, 551-577.
- [23] Weiss, W. I., Drickamer, K. (1996) Structural Basis of Lectin-Carbohydrate Recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 441-473.
- [24] Shaanan B., Lis, H. & Sharon, N. (1991) Structure of a legume lectin with an ordered N-linked carbohydrate in complex with lactose. *Science*, **254**, 862-866.
- [25] Debaere, L. T. J., Vandonselaar, M., Prasad, L., Quail, J. W., Wilson, K. S. & Dauter, Z. (1993) Structure of the lectin IV of *Griffonia simplicifolia* and its complex with the Lewis b human blood group determined at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **230**, 950-965.
- [26] Drickamer, K. (1997) Making a fitting choice: common aspects of sugar-binding sites in plant and animal lectins. *Structure* **5**, 465-468.
- [27] Schnober-Sen, M. (1999) Die Mistel - ein geheimnisvolles Gewächs mit heilender Wirkung S. 6-9, Urania Verlag Berlin.
- [28] Olsnes, Sjur, Stirpe, F., Sandvig, K. and Pihl, A. (1982). Isolation and Characterization of Viscumin, a Toxic Lectin from *Viscum album* L. (Mistletoe). *J. Biol. Chem.* **257**, 13263-13270.
- [29] Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J., Pusztai, A., Bardocz, S. (1998). Handbook of Plant Lectins: Properties and Biomedical Applications. Wiley-VCH Verlag, p.417-421.
- [30] Stoeva, S., Maier, T., Soler, M. H. and Voelter, W. (1999) Carbohydrate Chains and Their Binding Sites in Mistletoe Lectin I. *Polish. J. Chem.* **73**, 125-133.
- [31] Franz, H., Ziska, P. and Kindt, A. (1981) Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album* L.) *Biochem. J.* **195**, 481-484.
- [32] Stirpe, F., Sandvig, K., Olsnes, S., Pihl, A. (1982). Action of Viscumin, a Toxic Lectin from Mistletoe, on Cells in Culture. *J. Biol. Chem.* **257**, 13271-13277.
- [33] Hajto, T., Hostanska, K. and Gabius, H.-J. (1989). Modulatory Potency of the β -Galactoside-specific Lectin from Mistletoe Extract (Iscador) on the Host Defense System *in Vivo* in Rabbits and Patients. *Cancer Res.* **49**, 4803-4808.
- [34] Beuth, J., Ko, H. L., Gabius, H.-J., Burchrichter, H., Oette, K. and Pulverer, G. (1992). Behavior of lymphocyte subsets and expression of activation markers in response to immunotherapy with galactoside-specific lectin from mistletoe in breast cancer patients. *Clin. Investig.* **70**, 658-661.
- [35] Hajto, T., Hostanska, K., Frei, K., Rohrdorf, C. and Gabius, H.-J. (1990). Increased Secretion of Tumor Necrosis Factor α , Interleukin 1 and Interleukin 6 by Human Monomolecular Cells Exposed to β -Galactoside-specific Lectin from Clinically Applied Mistletoe Extracts. *Cancer Res.* **50**, 3322-3326.
- [36] Gabius, S., Kayser, K. and Gabius, H.-J. (1991). Analytische, immunologische und tierexperimentelle Voraussetzungen für die klinische Prüfung der auf Lektin Gehalt standardisierten Misteltherapie. *Dtsch. Zschr. Onkol.* **23**, 113-119.
- [37] Ducruix, A. and Giegé, R. (1992) Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. Oxford University Press, S. 73-98.
- [38] Arndt, U.W. and Wonacott, A.J. (Hrsg.) (1977). The Rotation Method in Crystallography, North Holland Publishing Co., Amsterdam.

- [39] Otwinowski, Z. & Minor, W. (1996) Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. *Methods in Enzymology* 276 C.W. Carter, Jr. & R.M. Sweet Eds., Academic Press
- [40] Collaborative Computational Project Nummer 4 (1994). The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Cryst.* **D50**, 760-763.
- [41] Navaza, J. (1994). AmoRe: An automated package for molecular replacement. *Acta Cryst.* **D50**, 157-163.
- [42] Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., Delano, W. L., Gros, P., Gross-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L.M., Simonson, T. and Warren G. L. (1998). Crystallography and NMR Systems (CNS): A new software system for macromolecular structure determination. *Acta Cryst.* **D54**, 905-921.
- [43] Roussel, A., Cambillau, C., "Turbo Frodo". In: Silicon Graphics Geometry Partners Directory. Mountain View, Ca: Silicon Graphics, 86, 1991.
- [44] Luzatti, P.V. (1952) Traitement Statistique des Erreurs dans la Determination des Structures Cristallines. *Acta Cryst.* **5**, 802.
- [45] Drenth, J. (1999). Principles of Protein X-ray Crystallography. Springer Verlag, New York, Sec. Ed. p. 120-122.
- [46] Soler, M. H., Stoeva, S., Schwamborn, C., Wilhelm, S., Stiefel, T. und Voelter, W. (1996) Complete amino acid sequence of the A chain of mistletoe lectin I. *FEBS Lett.* **399**, 153-157.
- [47] Luther, P. and Becher, H. (1987) Die Mistel: Botanik, Lektine, medizinische Anwendung, Springer-Verlag, Berlin.
- [48] Gabius, S., Kayser, K. and Gabius, H.-J. (1991) Mistelextrakte und ihre Anwendung - wissenschaftlich betrachtet. *Dtsch. Zschr. Onkol.* **5**, 113-119.
- [49] Franz, H., Ziska, P. and Kindt, A. (1985) in: Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry (Bøg-Hansen, T. C. and Breborowicz, J. Eds) Vol. IV, 473-480, Walter de Gruyter, Berlin.
- [50] Soler, M. H., Stoeva, S. und Voelter, W. (1998) Complete Amino Acid Sequence of the B Chain of Mistletoe lectin I. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **246**, 596-601.
- [51] Kabsch, W. (1976). *Acta Cryst.* A32, 922-923.
- [52] Villafranca, J. E. and Robertus, J.D. (1981) Ricin B Chain Is a Product of Gene Duplication. *J. Biol. Chem.* **256**, 554-556.
- [53] Funatsu, G., Islam, M. R., Minami, Y., Sung-Sil, K. & Kimura, M., (1991) Conserved amino acid residues in ribosome inactivating proteins from plants. *Biochimie* **73**, 1157-1161.
- [54] Katzin, B. J., Collins, E. J. & Robertus, J. D. (1991) Structure of ricin A-chain at 2.5 Å. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **10**, 251-259.
- [55] Monzingo, A. F. and Robertus, J. D. (1992) X-ray Analysis of Substrate Analogs in the Ricin A-chain Active Site. *J. Biol. Chem.* **227**, 1136-1145.
- [56] Eck, J., Langer, M., Möckel, B., Baur, A., Rothe, M., Zinke, H. and Lentzen, H. (1999) Cloning of the mistletoe lectin gene and characterization of the recombinant A-chain. *Eur. J. Biochem.* **264**, 775-784.
- [57] Munishkin, A. and Wool, I. (1995) Systematic Deletion Analysis of Ricin A-Chain Function. *J. Biol. Chem.* **270**, 30581-30587.
- [58] Wu, A. M., Chin, L.-K., Franz, H., Pfüller, U., Herp, A. (1992) Carbohydrate specificity of the receptor sites of mistletoe toxic lectin-I. *Biochim. Biophys. Acta* **1117**, 232-234.
- [59] Vyas, N.K. (1991). Atomic features of protrein-carbohydrate interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1**, 732-740.

- [60] Rutenber, E. and Robertus, J. D. (1991) Structure of Ricin B-Chain at 2.5 Å Resolution. *Proteins: Struct. Func. and Gen.* **10**: 260-269.
- [61] Steeves, R. M., Denton, M., E., Barnard, F. C., Henry, A. and Lambert, J. M. (1999). Identification of Three Oligosaccharide Binding Sites in Ricin. *Biochem.* **38**, 11677-11685.
- [62] Elgavish, S. Shaanan, B. (1998) Structures of the Erythrina corallodendron Lectin and its Complexes with Mono- and Disaccharides. *J. Mol. Biol.* **277**, 917-932.
- [63] Ng Kenneth K.-S., Drickamer, K. and Weis, W.I. (1996) Structural analysis of Monosaccharide Recognition by Rat Liver Mannose-binding Protein. *J. Biol. Chem.*, **271**, 663-674.
- [64] Ravishankar, R., Suguna, K., Surolia, A. and Vijayan, M. (1999) Structures of the complexes of peanut lectin with methyl-β-galactose and N-acetyllactosamine and a comparative study of carbohydrate binding in Gal/GalNAc-specific legume lectins. *Acta Cryst.* **D55**, 1375-1382.
- [65] Kolatkar, A., Weis, W. I. (1996) Structural Basis of Galactose Recognition by C-type Animal Lectins. *J. Biol. Chem.* **271**, 6679-6685.
- [66] Lee, R. T., Gabius, H. J. and Lee, Y. C. (1994). The sugar-combining area of the galactose-specific toxic lectin of mistletoe extends beyond the terminal sugar residue: comparison with a homologous toxic lectin, ricin. *Carbohydrate Research* **254**, 269-276
- [67] Hazes, B. (1996). The (QxW)₃ domain: a flexibel lectin scaffold. *Protein Sci* **5**, 1490-1501.
- [68] Katzin, B. J., Collins, E. J. & Robertus, J. D. (1991) Structure of ricin A-chain at 2.5 Å. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **10**, 251-259.
- [69] Kimura, Y., Kusuoka, H., Tada, M., Takagi, S. and Funatsu, G. (1990). Structural analysis of sugar chains from ricin A-chain variant. *Agric Biol. Chem.* **54**, 157-162.
- [70] Möckel, B., Eck, J., Langer, M., Zinke, H. & Lentzen, H. (1998). Induction of apoptosis in human blood cells by natural and recombinant mistletoe lectin. In *COST 98, Vol. 5. Effects of Antinutrients on the Nutritional Value of Legume Diets* (Bardocz, S., Pfüller, U. & Pusztai, A., eds), pp 94-101. European Commission, Luxembourg.
- [71] Frankel, A. E., Fu, T., Burbage, C., Tagge, E., Harris, B., Vesely, J. & Willingham, M. C., (1997) Lectin-deficient ricin toxin intoxicates cells bearing the D-mannose receptor. *Carbohydr Res.* **300**, 251-258.
- [72] Eck, J., Langer, M., Möckel, B., Witthohn, K., Zinke, H., Lentzen, H. (1999) Characterization of recombinant and plant-derived mistletoe lectin and their B-chains. *Eur. J. Biochem.* **265**, 788-797.
- [73] Richardson, P. T., Hussain, K., Woodland, H. R., Lord, J. M. & Roberts, L. M. (1991) The effects of N-glycosylation on the lectin activity of recombinant ricin B chain. *Carbohydrate Res.* **213**, 19-25.
- [74] Lappi, D. A., Kapmeyer, W., Beylau, J. M. and Kaplan, N. O. (1978). The disulfide bond connecting the chains of ricin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1096-1100.
- [75] Agapov, I. I., Tonevitsky, A. G., Moysenovich, M. M., Maluchenko, N. V., Weyhenmeyer, R., Kirpichnikov, M. P. (1999). Mistletoe lectin dissociates into catalytic and binding subunits before translocation across the membrane to the cytoplasm. *FEBS Lett.* **452**, 211-214.
- [76] Bilge, A., Warner, C. V. and Press, O. W. (1995). Translocation of Ricin A-chain into Proteoliposomes Reconstituted from Golgi and Endoplasmatic Reticulum. *J. Biol. Chem.* **270**, 23720-23725.
- [77] Agapov, I. I., Tonevitsky, A. G., Shamshiev, A. T., Pohl, E., Pohl, P., Palmer, R. A., Kirpichnikov, M. P. (1997). The role of structural domains in RIP II toxin model membrane binding. *FEBS Lett.* **402**, 91-93.

- [78] Simpson, J. C., Lord, J. M. and Robertus, L. M. (1995). Point mutations in hydrophobic C-terminal region of ricin A-chain indicate that Pro250 plays a key role in membrane translocation. *Eur J. Biochem.* **232**, 458-463.
- [79] Girbes, T., Citores, L., Ferreras, J. M., Rojo, M. A., Iglesias, R., Munoz, R., Arias, F. J., Calonge, M., Garcia, J. R. and Mendez, E. (1993) *Plant Mol. Biol.* **22**, 1181-1186.
- [80] Girbes, T., Citores, L., Iglesias, R., Ferreras, J. M., Munoz, R., Rojo, M. A., Arias, F. J., Garcia, J. R., Mendez, E. and Calgone, M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 18195-18199.
- [81] Weston, S. A., Tucker, A. D., Thatcher, D. R., Derbyshire, D. J. and Pauptit, R., A. (1994) X-ray Structure of Recombinant A-Chain at 1.8 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **244**, 410-422.
- [82] Langer, M., Möckel, B., Eck, J., Zinke, H. and Lentzen, H. (1999). Site-Specific Mutagenesis of Mistletoe Lectin. The Role of RIP Activity in Apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **264**, 944-948.
- [83] Ready, M. P., Kim, Y. and Robertus, J. D. (1991) Site-Directed Mutagenesis of Ricin A-Chain and Implications for the Mechanism of Action. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **10**, 270-278.
- [84] Frankel, A., Welsh, P., Richardson, J. and Robertus, J. D. (1990). Role of Arginine 180 and Glutamic Acid 177 of Ricin Toxin A Chain in Enzymatic Inactivation of Ribosomes. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 6257-6263.
- [85] Hung, C. H., Lee, M. C., Chen, J., K. and Lin, J. Y. (1994) *Eur J. Biochem.* **219**, 83-87.
- [86] Huang, Q., Liu, S., Tang, Y., Jin, S. and Wang, Y. (1995). Studies on crystal structures, active-center geometry and depurinating mechanism of two ribosome-inactivating proteins. *Biochem. J.* **309**, 285-298.
- [87] Olson, M. A. (1997). Ricin A-Chain Structural Determinant for Binding Substrate Analogues: A Molecular Dynamics Simulation Analysis. *Proteins: Struct., Func. Gen.* **27**, 80-95.
- [88] Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., Steitz, T. (2000). The Complete Atomic Structure of the large ribosomal Subunit at 2.4 Å Resolution. *Science* **289**, 905-930.
- [89] Aggarwal, A. K., Rodgers, D. W., Drottar, M., Ptashne, M., Harrison, S C. (1988) Recognition of a DNA operator by the repressor of phage 434: a view at high resolution. *Science* **242**, 899-907.
- [90] Agapov, I. I., Tonevitsky, A. G., Shamshiev, A. T., Pohl, E., Pohl, P., Palmer, R. A. and Kirpichnikov, M. P. (1997). The role of structural domains in RIP II toxin model membrane binding. *FEBS Lett.* **402**, 91-93.
- [91] Endo, Y, Chan, Y. L., Lin, A., Tsurugi, K. and Wool I.G. (1988) The cytotoxins α -sarcin and ricin retain their specificity when tested on a synthetic oligoribonucleotide (35-mer) that mimics a region of the 28S ribosomal ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* **263**, 7917-7920.
- [92] Bradley, J. L., McGuire, P. M. (1990) Site-directed mutagenesis of ricin A chain trp 211 to Phe. *Int. J. Peptide Protein Res.* **35**, 365-366.
- [93] Adar, R. and Sharon, N. (1996) Mutational studies of the amino acid residues in the combining site of Erythrina corallodendron lectin. *Eur. J. Biochem.* **239**, 668-674.
- [94] McPherson, A. (1982). *Preparation and Analysis of Protein Crystals*, S. 94-96, 115, John Wiley & Sons, New York, USA.
- [95] Chervenak, M. C. and Toonr, E. J. (1994). A Direct Measure of the Contribution of Solvent Reorganization to the Enthalpy of Ligand Binding. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 10533-10539.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Betzel für die Bereitstellung des Themas, die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Dr. W. Voelter und Frau PD Dr. S. Stoeva ermöglichten mir einen Aufenthalt in ihrer Arbeitsgruppe am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen und wiesen mich in die Proteinisolierung aus Mistelextrakten ein. Ihnen und ihren Mitarbeitern Frau Mirita Franz und Herrn Dr. Roland Wacker danke ich für die Bereitstellung der Proteinproben und ihre Kooperation.

Herrn Prof. Dr. A. Mikailov und Frau Dr. N. Konareva danke ich für die hilfreiche Anleitung bei der Züchtung und dem Umgang mit den Kristallen.

Herrn Dr. M. Perbandt gebührt mein Dank für die Anleitung am Beginn dieser Arbeit und Frau Dr. S. Eschenburg danke ich für Diskussionsbereitschaft sowie allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, die sich stets als hilfsbereit erwiesen.

An dieser Stelle möchte ich ganz besonders Herrn Prof. Dr. Singh und seinen Mitarbeitern für die Möglichkeit danken, in seiner Arbeitsgruppe am Institut für Biophysik am All India Institute for Medical Sciences Mistelextrakte herstellen zu können.

Lebenslauf

Name: Ruth Krauspenhaar

Geburtstag: 4.11.1972

Geburtsort: Frankfurt am Main

Ausbildung: August 1982 – Juni 1991

Goetheschule
Gymnasium Neu-Isenburg

Oktober 1991 – Oktober 1993

Staatliche Lehranstalt für
medizinisch-technische
Assistenten am
Universitätsklinikum
Frankfurt am Main

Oktober 1993 – Juli 1998

Studium der Biochemie
und Molekularbiologie
Universität Hamburg

Diplomarbeit „Kristallisation
und Modellbaustudien von
Mistellektin-I aus *Viscum
album*“

November 1998 – Januar 2002

wissenschaftliche Mitarbeiterin
Universitätsklinikum
Hamburg Eppendorf

Auslandstudium:

29.7. – 25.8. 1996

Englisch an der University
of California in
San Francisco, U.S.A.