

Röntgenstrukturanalyse des fibrinogenverwandten Lektins

Tachylectin 5A

aus dem angeborenen Immunsystem des

Japanischen Pfeilschwanzkrebses

*Tachypleus tridentatus*



Norman Kairies

Max-Planck-Institut für Biochemie

Abteilung Strukturforschung

Max-Planck-Institut für Biochemie  
Abteilung Strukturforschung

Röntgenstrukturanalyse des fibrinogenverwandten Lektins  
Tachylectin 5A  
aus dem angeborenen Immunsystem des Japanischen  
Pfeilschwanzkrebses *Tachypleus tridentatus*

Norman Kairies

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Dr.h.c. R. Huber  
2. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

Die Dissertation wurde am 10. April 2002 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 04. Juni 2002 angenommen.

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von August 1998 bis Dezember 2001 in der Abteilung für Strukturforschung am Max Planck Institut für Biochemie in Martinsried unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Robert Huber durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Robert Huber möchte ich für die große Freiheit während der Anfertigung dieser Doktorarbeit danken. Außerdem haben sein ständiges Interesse und wertvolle Diskussionen diese Arbeit begleitet.

Herrn Prof. Dr. Wolfram Bode möchte ich für viele wertvolle Ratschläge und Diskussionen danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Hans-Georg Beisel zum einen für seine Einführung in die Kristallographie und zum anderen für die Möglichkeit die Kooperation mit Prof. Dr. Shun-ichiro Kawabata (Kyushu Universität, Fukuoka, Japan) weiterzuführen. In diesem Zusammenhang gilt mein Dank Prof. Dr. Shun-ichiro Kawabata und dessen Mitarbeitern für die zur Verfügung gestellten Proteine und die ausgezeichnete Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt auch Dr. Andreas Bergner und Dr. Peter Hof für die gemeinsame *Modellingzeit*, die zwar nicht zu den erhofften Ergebnissen führte, jedoch sehr lehrreich war in bezug auf das Programmieren und das Schreiben von *Skripten*.

Den Herren Michael Engel, Dr. Michael Groll, Dr. Michael Blaesse, Rainer Friedrich, Martin Augustin und Dr. Tobias Ulrich möchte ich für die gemeinsame Zeit und die vielen unterhaltsamen Momente in unserem Arbeitszimmer danken.

Ich danke allen Mitstreitern des Xray-Accounts für das kollegiale Miteinander.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Pablo Fuentes-Prior und Stefan Riedel für die Zusammenarbeit und die geselligen Stunden außerhalb des Institutes.

**Abkürzungsverzeichnis**

<b>CD 14</b>	Cluster of <b>D</b> ifferentiation 14
<b>EDTA</b>	<b>E</b> thylendiamintetraessigsäure
<b>FN</b>	<b>F</b> ungus
<b>GalNAc</b>	<i>N</i> - <b>A</b> cetyl <b>g</b> alactosamin
<b>GBP</b>	<b>G</b> alactose- <b>b</b> inding <b>p</b> rotein
<b>GlcNAc</b>	<i>N</i> - <b>A</b> cetyl <b>g</b> lucosamin
<b>GNB</b>	<b>G</b> ram- <b>n</b> egative <b>b</b> acteria
<b>GPB</b>	<b>G</b> ram- <b>p</b> ositive <b>b</b> acteria
<b>HLA</b>	<b>H</b> emolytic <b>a</b> ctivity
<b>KDO</b>	2- <b>k</b> eto-3- <b>d</b> eoxyoctonic acid
<b>LAF</b>	<b>L</b> imulus 18-kDa <b>a</b> gglutination- <b>a</b> ggregation <b>f</b> actor
<b>LCRP</b>	<i>Limulus</i> <b>C</b> -reaktive <b>p</b> rotein
<b>LEBP-PI</b>	<i>Limulus</i> <b>e</b> ndotoxin- <b>b</b> inding <b>p</b> rotein- <b>p</b> rotease <b>i</b> nhibitor
<b>LICI</b>	<i>Limulus</i> <b>i</b> ntracellular <b>c</b> oagulation <b>i</b> nhibitor
<b>LPS</b>	<b>L</b> ipopolysaccharid
<b>LTA</b>	<b>L</b> ipoteichoic <b>a</b> cid
<b>LTI</b>	<i>Limulus</i> <b>t</b> rypsin <b>i</b> nhibitor
<b>MAD</b>	<b>M</b> ultiple wavelength <b>a</b> nomalous <b>d</b> ispersion
<b>MASP</b>	<b>M</b> BL- <b>a</b> ssociated <b>s</b> erin <b>p</b> rotease
<b>MBL</b>	<b>M</b> annose- <b>b</b> inding- <b>l</b> ectin
<b>MIR</b>	<b>M</b> ultiple <b>I</b> somorphous <b>r</b> eplacement
<b>NCS</b>	<b>N</b> oncrystallographic <b>s</b> ymmetry
<b>NGF</b>	<b>N</b> erve <b>G</b> rowth <b>F</b> actor

---

<b>PAP</b>	<b>Protein A binding protein</b>
<b>PC</b>	<b>Phosphorylcholine</b>
<b>PDB</b>	<b>Protein Data Bank</b>
<b>PE</b>	<b>Phosphorylethanolamin</b>
<b>PEG</b>	<b>Polyethylenglykol</b>
<b>r.m.s.d.</b>	<b>Root mean square deviation</b>
<b>SA</b>	<b>Sialic acid</b>
<b>TCRP</b>	<i>Tachypleus</i> <b>C-reaktive protein</b>
<b>TRIS</b>	<b>Tris(hydroxymethyl)aminoethan</b>
<b>TTA</b>	<i>Tachypleus tridentatus</i> <b>agglutinin</b>

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>6</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>8</b>
2.1 Der Japanische Pfeilschwanzkrebs <i>Tachypleus tridentatus</i>	8
2.2 Immunabwehr des Japanischen Pfeilschwanzkrebses	11
2.2.1 Immunsysteme im allgemeinen	11
2.2.2 Gerinnungskaskade des Japanischen Pfeilschwanzkrebses	12
2.2.3 Lektine des Japanischen Pfeilschwanzkrebses	24
2.2.3.1 Tachylectin 1	24
2.2.3.2 Tachylectin 2	25
2.2.3.3 Tachylectin 3 und 4	27
2.2.3.4 Tachylectin 5A und 5B	27
2.3 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen	31
2.3.1 Überblick	31
2.3.2 Proteinkristalle und Symmetrie	32
2.3.3 Röntgenstrahlungsquellen	33
2.3.4 Beugung von Röntgenstrahlungen an Kristallen	34
2.3.5 Berechnung der Elektronendichte	38
2.3.6 Lösung des Phasenproblems	39
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>42</b>
3.1 Material	42
3.2 Röntgenstrukturanalytische Methoden	42
3.2.1 Kristallisation	42

Inhaltsverzeichnis	V
3.2.2 Datensammlung	43
3.2.3 Datenauswertung	43
3.2.4 Modellbau und Strukturverfeinerung	44
3.2.5 Analyse und graphische Darstellung der Atommodelle	45
<b>4 Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>46</b>
4.1 Kristallisation	46
4.2 Datensammlung	47
4.3 Multipler isomorpher Ersatz	48
4.4 Modellbau und Verfeinerung	50
4.5 Strukturbeschreibung	53
4.5.1 Gesamtstruktur	53
4.5.2 Kalziumbindestelle	55
4.5.3 Zuckerbindestelle	58
4.6 Vergleich zu Fibrinogen	61
4.6.1 Übersicht Fibrinogen	61
4.6.2 Strukturvergleich Fibrinogen/Tachylectin 5A	66
4.7 Vergleich zu anderen Lektinen	76
4.8 Implikation für die Stimulierung von <i>Big Defensin</i>	82
4.9 Schlußfolgerung	83
<b>5 Literaturverzeichnis</b>	<b>85</b>

## 1 Zusammenfassung

Invertebraten fehlt der adaptive Teil des Immunsystems. Deshalb mußten diese Lebewesen besonders effektive Verteidigungsmechanismen gegenüber einer Vielzahl pathogener Stoffe entwickeln. Diese Form der Verteidigungsmechanismen, das angeborene Immunsystem, ist in allen mehrzelligen Lebewesen einschließlich Menschen vorhanden.

Das angeborene Immunsystem des Japanischen Pfeilschwanzkrebses *Tachypleus tridentatus* schließt eine Gerinnungskaskade ein, die sowohl an der Verteidigung gegen pathogene Stoffe als auch an der Wundheilung beteiligt ist. Untersuchungen über das menschliche Blutgerinnungssystem hatten eine evolutionäre Beziehung zwischen beiden Systemen vorhergesagt. Diese Vorhersage konnte jedoch nicht durch den strukturellen Vergleich zwischen Coagulogen, dem Gerinnungsmolekül des Pfeilschwanzkrebses und Fibrinogen, dem entsprechenden Gerinnungsmolekül der Säugetiere bestätigt werden. Interessanterweise konnte durch Proteinsequenzvergleiche auf eine mögliche Analogie zwischen Fibrinogen und Lektinen hingewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wird die Kristallstrukturanalyse des Tachylectin 5A präsentiert, einem Lektin des angeborenen Immunsystems des Japanischen Pfeilschwanzkrebses. Tachylectin 5A ist, im Unterschied zu den bisher charakterisierten Lektinen des Pfeilschwanzkrebses, nicht in Zellen gespeichert, sondern Bestandteil der Hämolymphe. Es unterscheidet sich außerdem von *klassischen* Lektinen in seiner Bindungsspezifität für Acetylgruppen.

Trotz der unterschiedlichen Funktion entspricht die Faltung des Tachylectins der Faltung der  $\gamma$ C-Kette des Fibrinogens. In beiden Molekülen liegen außerdem die funktionellen Bereiche, wie Kalziumbindungen und Zucker-/Peptid-Bindetaschen, an äquivalenten Positionen.

Der Vergleich mit L-Ficolin, einem zu Tachylectin 5A homologen Protein des angeborenen Immunsystems des Menschen, macht ein evolutionär frühes Szenario vorstellbar in dem Tachylectin 5A als ein Vorläufermolekül sowohl für L-Ficolin als auch Fibrinogen auftrat. In diesem Zusammenhang liefert Tachylectin 5A eine strukturelle Basis für die evolutionäre Verknüpfung zwischen dem angeborenen Immunsystem und der Blutgerinnung der Säugetiere.



Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

**Norman Kairies**, Hans-Georg Beisel, Pablo Fuentes-Prior, Ryoko Tsuda, Tatsushi Muta, Sadaaki Iwanaga, Wolfram Bode, Robert Huber, Shun-ichiro Kawabata (2001) **The 2.0 Å crystal structure of tachylectin 5A provides evidence for the common origin of the innate immunity and the blood coagulation systems.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 13519-13524.

weitere Arbeiten an denen während der Promotionszeit mitgewirkt wurde:

Gunter Schmidtke, Hermann-Georg Holzhuetter, Matthew Bogyo, **Norman Kairies**, Michael Groll, Rita de Giuli, Sabine Emch, Marcus Groettrup (1999) **How an Inhibitor of the HIV-I Protease Modulates Proteasome Activity.** *J. Biol. Chem.*, **274**, 35734-35740.

Michael Groll, Kyung Bo Kim, **Norman Kairies**, Robert Huber, Craig M. Crews (2000) **Crystal Structure of Epoxomicin: 20S Proteasome Reveals a Molecular Basis for Selectivity of  $\alpha'$ ,  $\beta'$ -Epoxyketone Proteasome Inhibitors.** *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 1237-1238.

Stefan J. Riedl, Pablo Fuentes-Prior, Martin Renatus, **Norman Kairies**, Stefan Krapp, Robert Huber, Guy S. Salvesen, Wolfram Bode (2001) **Structural Basis for the Activation of Human Procaspase-7.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 14790-14795.

Stefan Gerhardt, Ann-Kathrin Schott, Markus Fischer, **Norman Kairies**, Mark Chushman, Boris Illarionov, Wolfgang Eisenreich, Adalbert Bacher, Robert Huber, Stefan Steinbacher (2002) **Studies on the Reaction Mechanism of Riboflavin Synthase. X-ray Crystal Structure of a Complex with 6-Carboxyethyl-7-oxo-8-ribityllumazine**, in Bearbeitung.

## 2 Einleitung

### 2.1 Der Japanische Pfeilschwanzkrebs *Tachypleus tridentatus*

Pfeilschwanzkrebse (siehe Abbildung 1), auch Hufeisenkrebse oder Schwertschwänze genannt, gehören neben Lebewesen wie z.B. den Quastenflossern oder den Knochenhechten zu den sogenannten *lebenden Fossilien* (Stormer, 1952).



**Abbildung 1:** Japanischer Pfeilschwanzkrebs (*Tachypleus tridentatus*)

Seit dem Devon (vor etwa 360 Millionen Jahren) haben Pfeilschwanzkrebse sich kaum verändert. Dies läßt sich durch den Vergleich fossiler Funde mit lebenden Tieren belegen (siehe Abbildung 2).

Die Bezeichnung *lebende Fossilien* benutzte erstmals Charles Darwin. Obwohl diese Lebewesen nicht in das Konzept seiner Evolutionstheorie paßten – denn nach seiner Theorie müßten sich alle Lebewesen immer wieder von neuem ihrer ständig in Veränderung begriffenen Umwelt anpassen – versuchte er deren perfekte Lebensform durch die extremen Lebensräume zu erklären, in denen sie sich einem Überlebenskampf nahezu entziehen konnten. Der Evolutionsbiologe Edward O. Wilson hingegen sieht in diesen Lebensformen das eigentliche evolutionäre Erfolgsmodell (Grolle und Petermann, 1995).



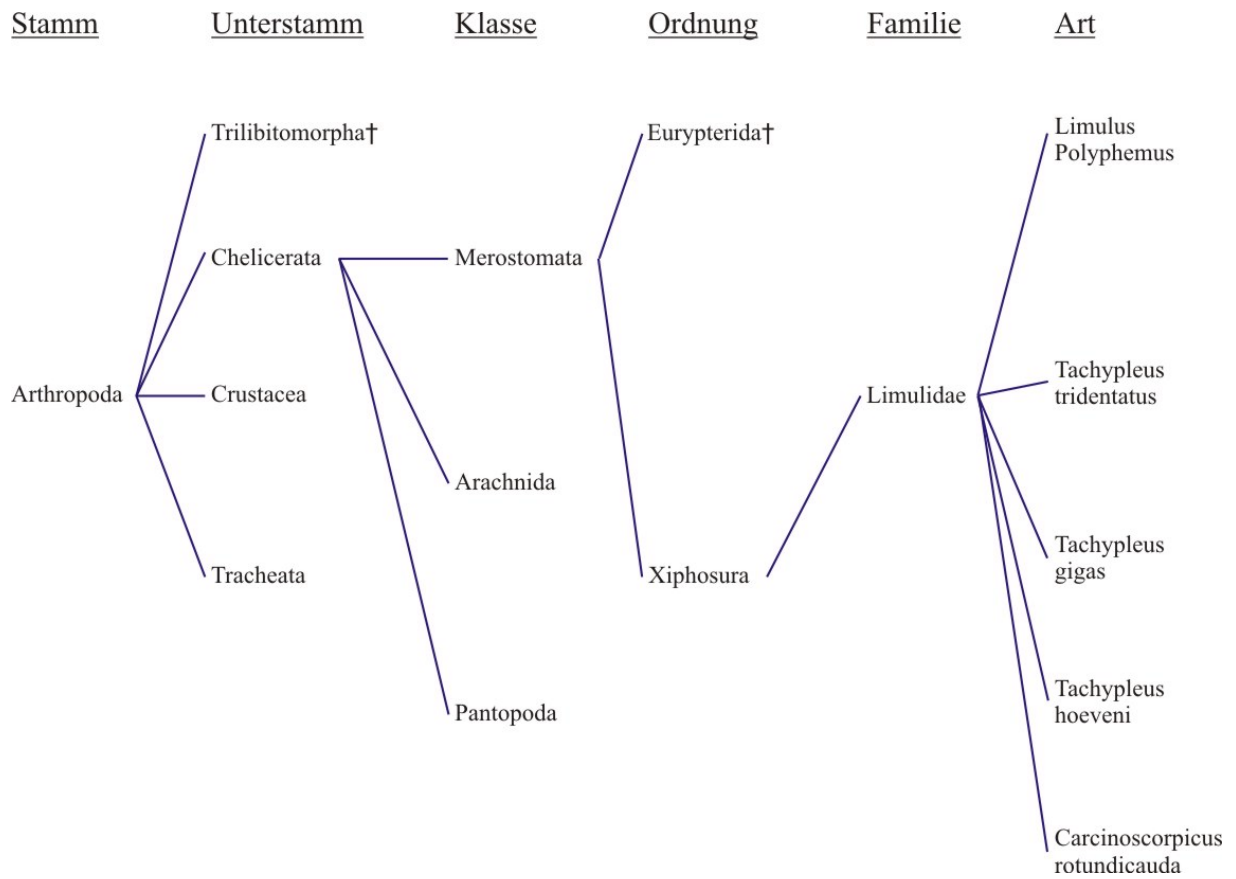
**Abbildung 2:** Versteinering eines Pfeilschwanzkrebse. Alter: 150 Millionen Jahre. Fundort: Mörsheim, Oberbayern.

Gegenwärtig existieren noch fünf Arten der Pfeilschwanzkrebse (*Limulidea*): *Limulus polyphemus* (Amerikanischer Pfeilschwanzkrebs), beheimatet an der Ostküste Nord- und Südamerikas, *Carcinoscorpius rotundicuada*, *Tachypleus gigas*, *Tachypleus hoeveni* und *Tachypleus tridentatus* (Japanischer Pfeilschwanzkrebs) beheimatet im indopazifischen Raum.

Pfeilschwanzkrebse sind nicht mit den Krebsen (*Crustacea*), sondern mit den Spinnentieren (*Arachnida*) und mit den Asselspinnen (*Pantopoda*) näher verwandt. Sie werden mit diesen zum Unterstamm der Chelicerenträger (*Chelicerata*) zusammengefaßt. Innerhalb der Klasse der Schwertschwänze (*Merostomata*) bilden sie neben den Riesenkrebsen und Seeskorpionen (*Eurypterida*) die Ordnung der Pfeilschwänze (*Xiphosura*) (siehe Abbildung 3).

Eine weitere Besonderheit der Pfeilschwanzkrebse – neben deren *fossilen* Alter – betrifft deren Immunsystem. Teil dieses Immunsystems ist eine Gerinnungskaskade, die in vielerlei Hinsicht Parallelen zum Blutgerinnungssystem des Menschen besitzt (Muta und Iwanaga, 1996b; Krem und Di Cera, 2002).

Untersuchungen über die Evolution des menschlichen Blutgerinnungssystems zeigen, daß evolutionär frühe Formen von Verteidigungssystemen, die neben der Immobilisierung und Zerstörung von Krankheitserregern auch die Wundheilung regulieren, als Vorläufer in der evolutionären Entwicklung in Frage kommen (Patthy, 1990). Der Pfeilschwanzkrebs ist ein geeigneter Modellorganismus um diese Zusammenhänge zu untersuchen.



**Abbildung 3:** Klassifikation der Pfeilschwanzkrebse (Renner, 1984). † bezeichnet ausgestorbene Arten.

## 2.2 Immunabwehr des Japanischen Pfeilschwanzkrebses

### 2.2.1 Immunsysteme im allgemeinen

Lebewesen stehen permanent in Kontakt mit pathogenen Stoffen aus der Umwelt. Viren, Bakterien oder Pilze können z.B. über die Atemluft oder die Nahrung in den Organismus gelangen. Im Falle einer Verletzung ist das innere Körpermilieu den pathogenen Stoffen unmittelbar ausgesetzt. Dieser Gefahr Rechnung tragend, entwickelten sich im Laufe der Evolution zwei miteinander kooperierende Systeme von Abwehrmechanismen (Janeway Jr., 1989; Janeway Jr. und Medzhitov, 1998). Der phylogenetisch ältere Teil, das angeborene Immunsystem, ist in allen multizellulären Organismen vorhanden (Hoffmann *et al.*, 1999; Medzhitov und Janeway Jr., 2000a; Medzhitov und Janeway Jr., 2000b). Der phylogenetisch jüngere Teil, das erworbene Immunsystem, ist ausschließlich in Vertebraten zu finden. Vereinfacht dargestellt muß das Immunsystem – im Falle der Verteidigung gegen pathogene Stoffe – den Krankheitskeim erkennen und effektiv zerstören. Im Zusammenhang damit müssen körpereigene von körperfremden Stoffen sicher unterschieden werden, um Autoimmunreaktionen zu vermeiden (Selbsttoleranz) (Delves und Roitt, 2000a; Delves und Roitt, 2000b).

Das erworbene Immunsystem wird hauptsächlich durch die B- und T-Lymphozyten vermittelt, die rekombinante Rezeptoren – Immunoglobuline und T-Zell-Rezeptoren – exprimieren, die nahezu jeden Krankheitskeim erkennen, mit denen der Wirtsorganismus konfrontiert wird. Durch klonale Expansion werden Lymphozytenklone erzeugt, die dem Antigen entsprechende Antikörper oder T-Zell-Rezeptoren tragen. Klonale Eliminierung, der gezielte Abbau aktivierter T-Zellen garantiert Selbsttoleranz.

Das angeborene Immunsystem basiert auf keimbahnkodierten, löslichen oder membrangebundenen Proteinen. Diese Proteine sind bereits im Wirtsorganismus vorhanden oder werden durch den Kontakt mit pathogenen Substanzen ausgeschüttet. Als Marker zur *Selbst-Fremd* Unterscheidung werden die zellspezifischen Oberflächenkohlenhydrate der pathogenen Organismen genutzt. Der auf Macrophagen sitzende Rezeptor CD14 zum Beispiel erkennt speziell Lipopolysaccharide (Wright *et al.*, 1990). Als weiteres Beispiel seien das C-

reaktive Protein, oder das Mannose-bindende Protein (Jack *et al.*, 2001) aus humanem Blutplasma genannt. Das angeborene Immunsystem der Invertebraten vermag darüber hinaus auch Polysaccharidderivate wie zum Beispiel Proteoglycane oder  $\beta$ -(1,3)-Glucane zu detektieren, wie die Phenoloxidase vermittelte Melanisierung in Insekten zeigt. In Tabelle 1 sind zusammenfassend ganz allgemein die Unterschiede zwischen erworbenem und angeborenem Immunsystem aufgezeigt.

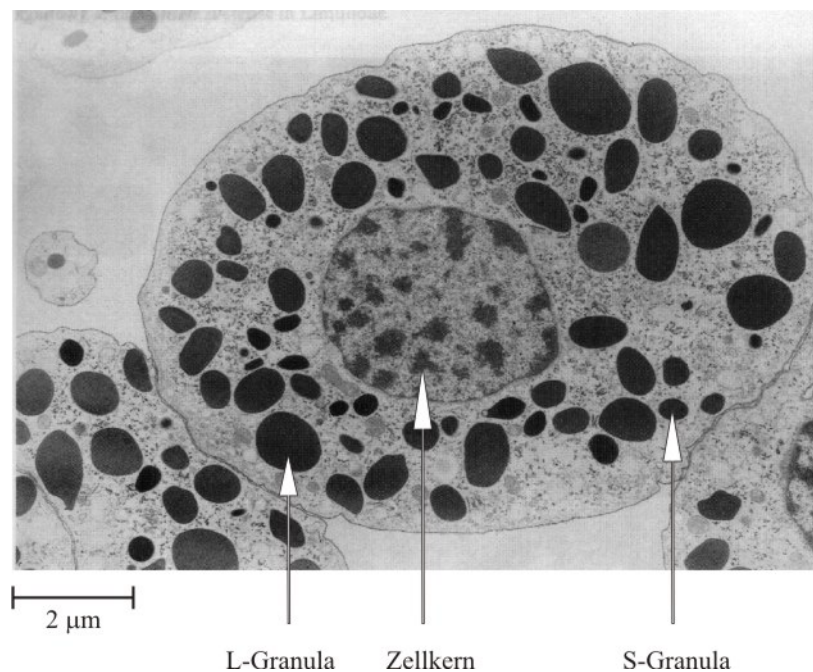
<b>Eigenschaft</b>	<b>angeborenes Immunsystem</b>	<b>erworbenes Immunsystem</b>
<b>Rezeptoren</b>	im Genom verankert, Umlagerung nicht notwendig	in Gensegmenten codiert Umlagerung notwendig
<b>Verteilung</b>	Nichtklonal	Klonal
<b>Erkennung</b>	konservierte molekulare Muster (z.B. LPS, LTA, Glycane)	detaillierte molekulare Strukturen; (Proteine, Peptide, Kohlenhydrate)
<b>Selbst-Fremd Unterscheidung</b>	Perfekt: durch evolutionären Druck optimiert	Fehlerhaft: aus unterschiedlichen somatischen Zellen ausgewählt
<b>Ansprech-Zeit</b>	Unmittelbare Aktivierung von Effektoren	Verzögerte Aktivierung von Effektoren

**Tabelle 1:** Vergleich zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem (Janeway Jr., 2001).

## 2.2.2 Gerinnungskaskade des Japanischen Pfeilschwanzkrebses

Im Vergleich zu Vertebraten besitzt der Japanische Pfeilschwanzkrebs keinen geschlossenen Blutkreislauf, sondern ein offenes Hämolympsystem. Dieses Hämolympsystem sorgt sowohl für den Sauerstofftransport durch Hämocyanin (van Holde *et al.*, 2001), als auch für die Hostverteidigung durch das angeborene Immunsystem.

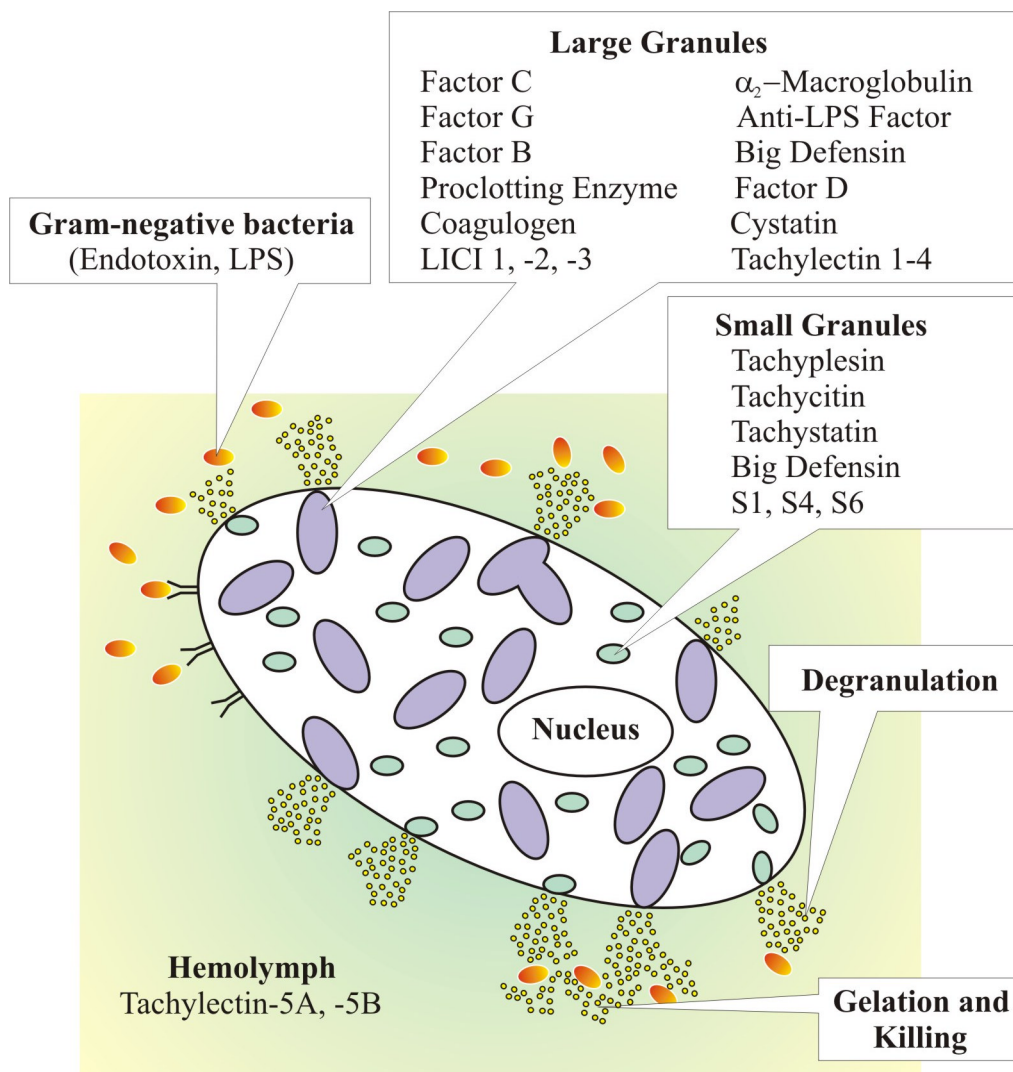
Neben löslichen Verbindungen lassen sich zwei Zelltypen (Hämozyten), die durch Kontakt mit pathogenen Stoffen *degranulieren*, in der Hämolympflüssigkeit unterscheiden. Entsprechend ihrer Morphologie werden diese Zellen als *granulare* und *nicht granulare Hämozyten* bezeichnet, wobei 99% aller Hämozyten zu den granularen Hämozyten zählen (Toh *et al.*, 1991; Muta und Iwanaga, 1996b). In diesen granularen Hämozyten befinden sich neben dem Zellkern zwei Typen sekretorischer Granula, die aufgrund ihrer Größe als L-Granula (*Large*, Durchmesser ca. 1.5  $\mu\text{m}$ ) und S-Granula (*Small*, Durchmesser ca. 0.6  $\mu\text{m}$ ) bezeichnet werden (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines granularen Hämozyten (auch als Granulocyt oder Amöbozyt bezeichnet) aus dem Japanischen Pfeilschwanzkrebs *Tachypleus tridentatus*. Aufnahme aus Toh *et al.*, 1991.

In den L-Granula befinden sich mehr als 20 Proteine des Immunsystems mit molekularen Massen zwischen 8 und 123 kDa, wie beispielsweise die Gerinnungsfaktoren, das Gerinnungsprotein Coagulogen, Proteaseinhibitoren, Lektine und antimikrobielle Proteine. In den S-Granula sind mindestens 6 Proteine mit molekularen Massen unter 30 kDa gespeichert. Zu ihnen gehören *Tachypleusine*, *Tachystatine* und *Big Defensin*, Proteine denen antimikrobielle Wirkung gegenüber Pilzen, Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien gemein ist. Im Gegensatz zu dem Blutplasma des Menschen enthält das Hämolympplasma

des Pfeilschwanzkrebses nur eine geringe Menge an löslichen Proteinen. Hauptsächlich, neben Hämocyanin, sind diese das C-reaktive Protein und das  $\alpha_2$ -Macroglobulin. Hinzu kommen die Tachylectine 5A und 5B, die für die hämagglutinierende Aktivität des Hämolympplasmas verantwortlich sind. In Tabelle 2 sind alle bisher charakterisierten Proteine aus der Hämolymphe zusammengefaßt. Abbildung 5 verdeutlicht die unterschiedlichen Speicherorte innerhalb der granularen Hämozyten.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung eines granularen Hämozyten und der Speicherorte der bisher charakterisierten Abwehr-Proteine, siehe auch Tabelle 2 (Muta und Iwanaga, 1996a; Iwanaga und Kawabata, 1998).



<b>Protein</b>	<b>Masse (kDa)</b>	<b>Funktion/Spezifität</b>	<b>Lokalisation</b>
<b><i>Gerinnungsfaktoren</i></b>			
Factor C	123	Serinprotease	L-Granula
Factor B	64	Serinprotease	L-Granula
Factor G	110	Serinprotease	L-Granula
Proclotting Enzym	54	Serinprotease	L-Granula
Coagulogen	20	Gelbildung	L-Granula
<b><i>Protease Inhibitoren</i></b>			
LICI-1	48	Serpin/Faktor C*	L-Granula
LICI-2	42	Serpin/Klotting Enzym	L-Granula
LICI-3	53	Serpin/Faktor G*	L-Granula
Trypsin Inhibitor	6.8	Kunitz-Typ	unbekannt
LTI	16	unbekannt	unbekannt
LEBP-PI	12	unbekannt	L-Granula
<i>Limulus</i> Cystatin	12.6	Cystatin-Familie 2	L-Granula
$\alpha_2$ -Macroglobulin	180	Komplement	Plasma & L-Granula
Chymotrypsin Inhibitor	10	unbekannt	Plasma
<b><i>Antimikrobielle Substanzen</i></b>			
Anti-LPS factor	12	GNB	L-Granula
Tachyplepsins	2.3	GNB, GPB, FN	S-Granula
Polyphemusins	2.3	GNB, GPB, FN	S-Granula
Big Defensin	8.6	GNB, GPB, FN	L & S-Granula
Tachycitin	8.3	GNB, GPB, FN	S-Granula
Tachystatin	6.5	GNB, GPB, FN	S-Granula
Factor D	42	GNB	L-Granula

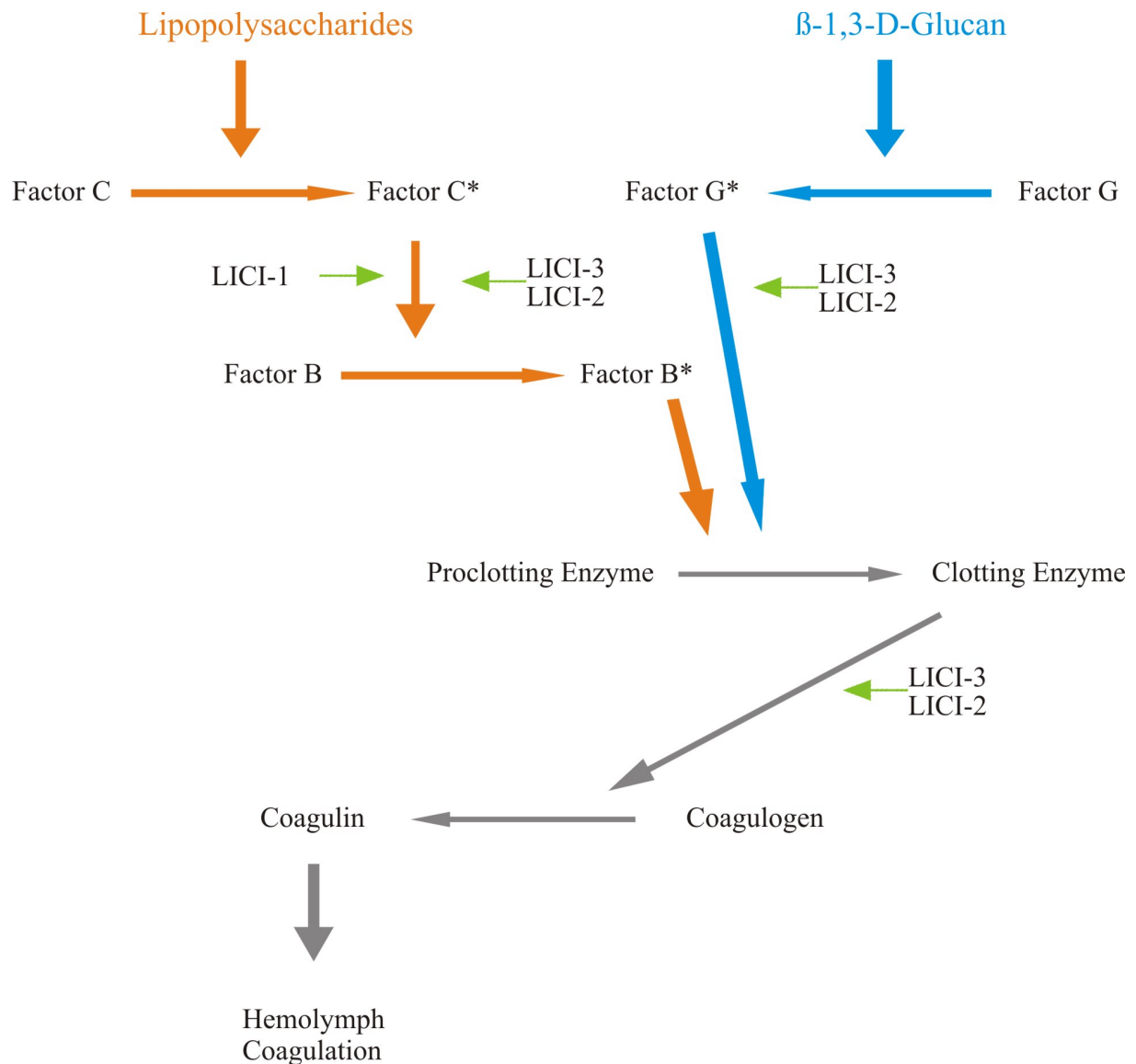
<b>Protein</b>	<b>Masse (kDa)</b>	<b>Funktion/Spezifität</b>	<b>Lokalisation</b>
<b><i>Lektine</i></b>			
Tachylectin-1	27	LPS (KDO), LTA	L-Granula
Tachylectin-2	27	GlcNAc, LTA	L-Granula
Tachylectin-3	15	LPS (O-Antigen)	L-Granula
Tachylectin-4	470	LPS (O-Antigen), LTA	L-Granula
Tachylectin-5A/B	380-440	N-Acetyl Gruppen	Plasma
Limunectin	54	PC	L-Granula
18K-LAF	18	Hämozytenaggregation	L-Granula
Limulin	300	HLA/PC, PE, SA, KDE	Plasma
LCRP	300	PC, PE	Plasma
tCRP-1	300	PE	Plasma
tCRP-2	330	HLA/PE, SA	Plasma
tCRP-3	340	HLA/SA, KDO	Plasma
Polyphemmin	NB	LTA, GlcNAc	Plasma
TTA	NB	SA, GlcNAc, GaINAc	Plasma
Liphemin	400-500	SA	Hämolymphe
Carcinoscorpin	420	SA, KDO	Hämolymphe
GBP	40	Gal	Hämolymphe
PAP	40	Protein A	Hämolymphe
<b><i>Andere</i></b>			
Transglutaminase	86	Crosslinking	Cytosol
8.6 kDa Protein	8.6	TGase Substrat	L-Granula
Pro-reiches Protein	80	TGase Substrat	L-Granula
<i>Limulus kexin</i>	70	unbekannt	unbekannt

Protein	Masse (kDa)	Funktion/Spezifität	Lokalisation
<i>Andere</i>			
Hemocyanin	3600	O <sub>2</sub> transporter (PO Aktivität)	Plasma
Toll-like receptor (tToll)	110	unbekannt	Hemocyte
L1	11	unbekannt	L-Granula
L4	11	unbekannt	L-Granula

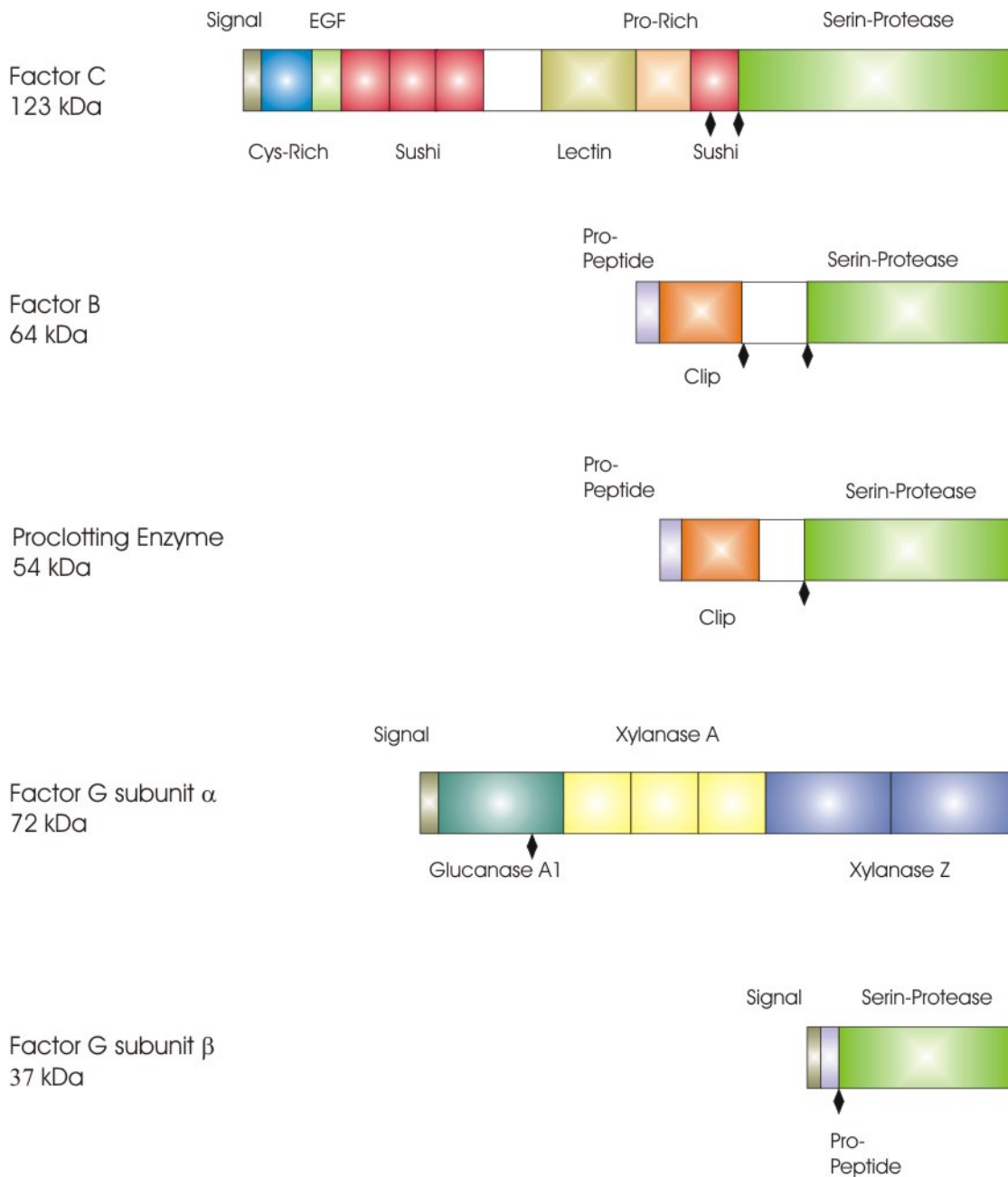
**Tabelle 2:** Übersicht aller bisher charakterisierten Abwehr-Proteine (Iwanaga, 2002; Iwanaga *et al.*, 1997). **LICI**, *Limulus* intracellular coagulation inhibitor; **LTI**, *Limulus* trypsin inhibitor; **LEBP-PI**, *Limulus* endotoxin-binding protein-protease inhibitor; **GNB**, Gram-negative bacteria; **GPB**, Gram-positive bacteria; **FN**, fungus; **LPS**, lipopolysaccharide; **LAF**, limulus 18-kDa agglutination-aggregation factor; **KDO**, 2-keto-3-deoxyoctonic acid; **PC**, phosphorylcholine; **PE**, phosphorylethanolamin; **SA** sialic acid; **TTA**, *Tachypleus tridentatus* agglutinin; **LCRP**, *Limulus* C-reaktive protein; **TCRP**, *Tachypleus* C-reaktive protein; **HLA**, hemolytic activity; **LTA**, lipoteichoic acid; **GBP**, galactose-binding protein; **PAP**, protein A binding protein.

Eine zentrale Stellung des Immunsystems des Pfeilschwanzkrebses nimmt die Hämolymphegerinnung ein. Sie sorgt neben der Immobilisierung pathogener Eindringlinge im Falle einer Verletzung auch für die Wundheilung. Das Koagulationssystem besteht aus hauptsächlich fünf Proteinen, die eine Gerinnungskaskade bilden. Zu ihnen zählen die Serinproteasezymogene C, B und G, das *Proclotting Enzyme* und das Gerinnungsmolekül *Coagulogen*. Diese als *Clotting Factors* bezeichneten Moleküle werden durch Exozytose in Folge von Stimulans durch Pathogene aus den L-Granula in die Hämolymphe ausgeschüttet. Die Faktoren C und G – Serinproteasezymogene mit Lektinaktivität – stehen jeweils am Anfang der Gerinnungskaskade und fungieren als Biosensoren für Kohlenhydratmuster, die pathogene Organismen auf ihrer Zelloberfläche tragen. Faktor C erkennt Lipopolysaccharide (LPS), den hauptsächlichsten Zellwandbestandteil Gram-negativer Bakterien und Faktor G (1,3)- $\beta$ -Glucane, typisch für Zelloberflächen von Pilzen. Durch Bindung an die Zelloberflächenzucker erfolgt sowohl für Faktor C als auch für Faktor G eine autokatalytische Umwandlung in die aktive Form C\* und G\*. Die aktivierte Form des Faktors C aktiviert ihrerseits das Serinproteasezymogen B zu B\*. Sowohl B\* als auch G\* aktivieren die Protease *Proclotting Enzyme*. Durch die aktivierte Form des *Proclotting Enzyme*, dem *Clotting Enzyme*

wird Coagulogen an zwei Stellen proteolytisch gespalten. Hierdurch kommt es zur Bildung des Fragments C (Thr-19 bis Arg-46) und des Coagulins, das durch Selbstpolymerisation das Coagulingel bildet (siehe Abbildung 6 und Abbildung 7).

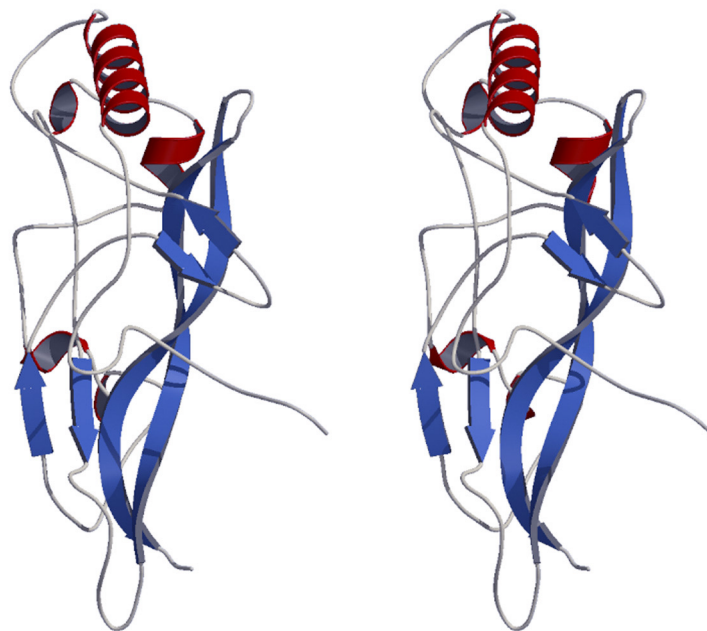


**Abbildung 6:** Gerinnungskaskade des Japanischen Pfeilschwanzkrebses. Die Gerinnungskaskade besteht aus vier Serinproteasezymogenen und dem Gerinnungsmolekül Coagulogen. Die Kaskade wird durch LPS (Endotoxin) oder 1,3-β-D-Glucan ausgelöst. Es folgt die schrittweise Aktivierung der Proteasezymogene, was schließlich zur proteolytischen Spaltung des Coagulogen und dessen Selbstaggregation führt. Mindestens drei Serpine (LICI-1, LICI-2 und LICI-3) sind an der Regulierung der Proteaseaktivierung beteiligt.

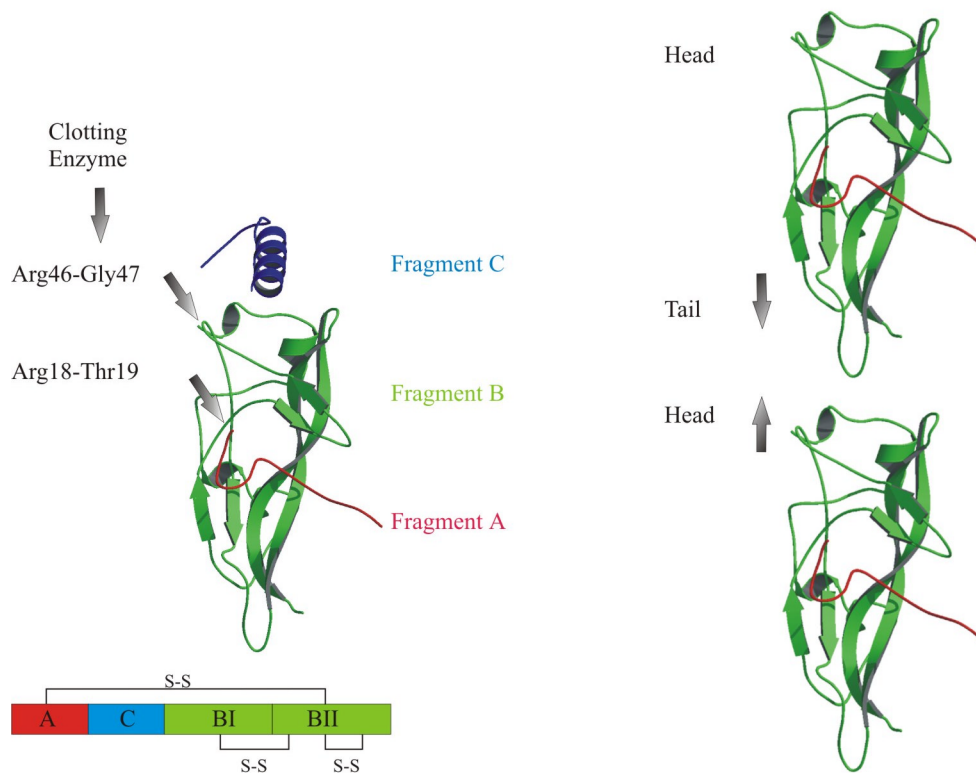


**Abbildung 7:** Aufbau der vier Gerinnungsfaktoren. Durch schwarze Rauten sind die proteolytischen Spaltstellen zur Aktivierung angegeben. Alle vier Zymogene besitzen N-terminal Serinproteasedomänen. Faktor C bindet durch die Lektindomäne an LPS (Muta *et al.*, 1991). Faktor B (Muta *et al.*, 1993) und *Proclotting Enzyme* (Muta *et al.*, 1990) besitzen N-terminal eine Clip-Domäne (Jiang und Kanost, 2000), identisch zu der des antimikrobiischen Proteins *Big Defensin* (Saito *et al.*, 1995a; Kawabata *et al.*, 1997). Für das *Proclotting Enzyme* wird angenommen, daß durch die proteolytische Aktivierung und Abspaltung der Clip-Domäne diese antimikrobisch aktiv wird. Faktor G ist ein heterodimeres Protein, bestehend aus den Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$ , die nicht-kovalent aneinander gebunden sind (Seki *et al.*, 1994; Muta *et al.*, 1995). Die Serinproteasedomäne der  $\beta$ -Untereinheit ist hoch homolog zu der des Faktor B (40,5% Identität) und des *Proclotting Enzyme* (37,7% Identität). Die Aktivierung des Faktor G wird durch Binden von (1-3)- $\beta$ -D-Glucan an die Xylanase A Domäne der Untereinheit  $\alpha$  eingeleitet. Hierdurch wird die Untereinheit  $\beta$  für die autokatalytische Aktivierung durch ein zweites Faktor G Molekül zugänglich (Muta und Iwanaga, 1996a).

Coagulin (siehe Abbildung 8) besteht aus der N-terminalen A-Kette (Ala-1 bis Arg-18) und der C-terminalen B-Kette (Gly-47 bis Phe-175). Beide Ketten sind durch zwei Dischwefelbrücken miteinander verbunden. Durch die Kristallstrukturanalyse des Coagulogen (siehe Abbildung 8) konnte eine Hypothese für den Selbstaggregationsmechanismus des Coagulin aufgestellt werden: Das Abspalten des helikalen Fragments C legt eine hydrophobe Tasche auf der Oberseite (*Head*) des Moleküls frei. Diese hydrophobe Tasche wird von einem anderen Coagulinmonomer benutzt um mit der hydrophoben Unterseite durch hydrophob/hydrophob-Wechselwirkungen das Coagulingel zu bilden (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 8:** Stereoansicht der Coagulogenstruktur (Bergner *et al.*, 1996). PDB-Id.: 1AOC.



**Abbildung 9:** Darstellung des *Head-to-Tail-Mechanismus* der Coagulingelbildung. Auf der linken Seite ist die proteolytische Abspaltung des Fragments C durch das *Clotting Enzyme* dargestellt. Unten links sind drei der insgesamt acht Disulfidbrücken dargestellt, die an der Verknüpfung der einzelnen Fragmente beteiligt sind. Rechts ist die *Head-to-Tail* Wechselwirkung dargestellt (Bergner *et al.*, 1996; Kawasaki *et al.*, 2000).

Dieser *Head-to-Tail-Mechanismus* konnte inzwischen durch Quervernetzungsexperimente bestätigt werden (Kawasaki *et al.*, 2000).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, daß Coagulin eine Tendenz zeigt in Längsrichtung in Fasern von etwa 100 Å Durchmesser zu polymerisieren (Bergner *et al.*, 1996). Mit einer Periodizität von etwa 45 Å bilden sich entlang der Fasern Kreuzungs- und Verzweigungspunkte aus. Die Fasern vernetzen sich untereinander durch die Immobilisierung der pathogenen Substanzen.

Obwohl eine Transglutaminase aus den Hämozyten isoliert werden konnte (Tokunaga *et al.*, 1993) wird Coagulin nicht in der selben Weise quervernetzt, wie es im Falle der Fibringerinnsel oder bei Gerinnungsproteinen (Vitellogenin) der Insekten geschieht (Barwig, 1995). Man geht davon aus, daß die Transglutaminase die Coagulinmonomere zwar nicht quervernetzt, jedoch Coagulin mit Oberflächenkomponenten der Granula verbindet.

Nach der Immobilisierung der Mikroorganismen erfolgt schließlich die Zerstörung der pathogenen Stoffe durch antimikrobiotische Proteine, wie z.B. *Tachyplesin* (Iwanaga *et al.*, 1994) *anti-LPS Faktor* (Hoess *et al.*, 1993) oder *Big Defensin* (Kawabata *et al.*, 1997).

Die Regulation der LPS bzw. (1,3)- $\beta$ -D-Glucan vermittelten Hämolympfgerinnung geschieht durch *Serpine* (*Serinprotease Inhibitor*) (Kanost, 1999) und  $\alpha_2$ -Macroglobulin (Swarnakar *et al.*, 2000).

Bisher konnte man drei Serpine aus den Hämocyten charakterisieren, die als *Limulus Intracellular Coagulation Inhibitors*, LICI-1, LICI-2 und LICI-3 bezeichnet werden (Iwanaga *et al.*, 1998). Alle LICI-Inhibitoren bilden stabile Komplexe mit den entsprechenden Zielproteasen. LICI-1 inhibiert ausschließlich Faktor C\*, LICI-2 und LICI-3 inhibieren sowohl Faktor C\* als auch Faktor G\* und das *Clotting Enzyme*. Alle Inhibitoren befinden sich in den L-Granula und werden mit den Koagulationsfaktoren ausgeschüttet. Durch die Inhibitoren wird sichergestellt, daß sich keine unnötigen Gerinnsel bilden können. Die Ausbreitung aktiver Klottingfaktoren wird dadurch *gesteuert*. Zum anderen sind die LICI-Inhibitoren ebenfalls in der Lage freigesetzte mikrobielle Proteasen zu neutralisieren (siehe Abbildung 6).

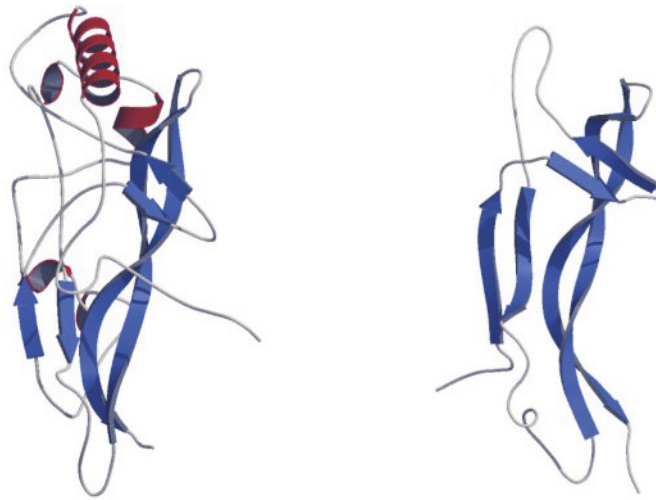
Das Gerinnungssystem des Pfeilschwanzkrebses weist eine Reihe interessanter Parallelen zum Blutgerinnungssystem von Säugetieren, aber auch anderen Tieren, wie Reptilien, Vögeln, Amphibien, Insekten und Krebsen auf (Iwanaga *et al.*, 1993). Diesen Arten ist gemein, daß ein selbstaggregationsfähiges Protein durch eine Serinprotease gespalten wird, und daß die dadurch ausgelöste Polymerisation ein Gerinnsel bildet.

Im Falle von Säugetieren ist das aggregationsfähige Protein Fibrinogen, ein dimeres Molekül mit einer molekularen Masse von 340 kDa, das aus den drei Proteinketten A $\alpha$ , B $\beta$  und  $\gamma$  in einer (A $\alpha$ B $\beta$  $\gamma$ )<sub>2</sub>-Stöchiometrie aufgebaut ist. Stark vereinfacht dargestellt werden durch die Serinprotease Thrombin im Laufe der Blutgerinnung die Fibrinopeptide A und B abgespalten und es kommt so zur Bildung des Blutgerinnsels.

Durch die Strukturanalyse des Coagulogens konnte die Ähnlichkeit der beiden Gerinnungssysteme hinsichtlich ihrer Gerinnungsmoleküle aufgedeckt werden.



Überraschenderweise besitzt Coagulogen eine NGF-artige (*Nerve Growth Factor*) Faltung (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Gegenüberstellung der Proteinstrukturen des Coagulogens und des Nerve Growth Factor, PDB Id: 1BET (McDonald *et al.*, 1991).

Obwohl dies zweifelsfrei gegen eine strukturelle Verwandtschaft zwischen Coagulogen und Fibrinogen spricht, hatte die Struktur des Coagulogens doch eine strukturelle Verwandtschaft zu der *Morphogenetic Cascade* in *Drosophila* aufgedeckt, die zu dem Zeitpunkt der Strukturaufklärung nicht bekannt war. (Bergner *et al.*, 1996; Bergner *et al.*, 1997).

Sind diese Ergebnisse eine Absage an die These einer evolutionären Beziehung zwischen dem *Horseshoe Crab* Gerinnungssystem und dem menschlichen Blutgerinnungssystem?

Interessanterweise liefert jedoch die Forschung an der Struktur des Fibrinogens einen Hinweis auf mögliche evolutionäre Verbindungen. Wie Doolittle *et al.* bereits 1997 zeigen konnte, kommen Lektine als potentielle evolutionäre Vorläufer des Fibrinogens in Frage:

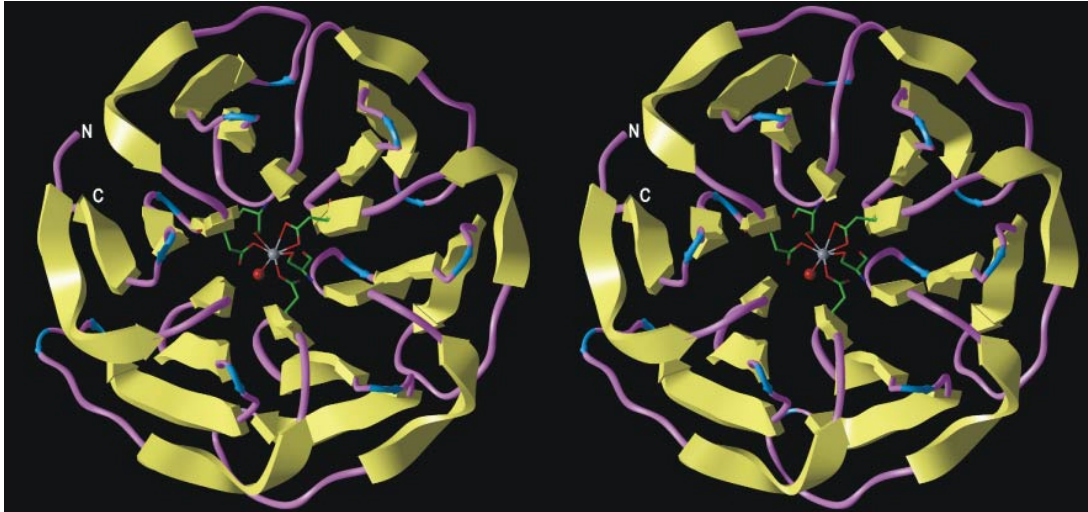
"...Given the nature of most fibrinogen related domains, the best candidates for spawning such a prototypic fibrinogen are lectins; it is not impossible that the first fibrinogen polymerized by way of intermolecular binding to its own carbohydrate. If a lectin was the common ancestor, then a transition from carbohydrate to peptide binding must have occurred..." (Doolittle *et al.*, 1997).

## 2.2.3 Lektine des Japanischen Pfeilschwanzkrebses

Das angeborene Immunsystem des Japanischen Pfeilschwanzkrebses nutzt nicht nur die Klottingfaktoren C und G um pathogene Stoffe zu detektieren, sondern auch eine Kombination verschiedener Lektine, die sich hinsichtlich ihrem Vermögen Zelloberflächenzucker zu binden unterscheiden/ergänzen. Fünf Lektine, als Tachylectin (TL) 1 bis 5 bezeichnet und verschiedene Agglutinine konnten bisher in den Hämozyten und dem Hämolymp plasma nachgewiesen werden (Kawabata *et al.*, 2001; Kawabata und Iwanaga, 1999).

### 2.2.3.1 Tachylectin-1

Tachylectin-1 ist in den L-Granula der Hämozyten gespeichert und bindet an Gram-negative Bakterien über 2-keto-3-deoxyoctanat (KDO), einer Zuckereinheit des Kernbereichs von LPS. Es agglutiniert darüber hinaus auch Gram-positive Bakterien über deren, an der Zelloberfläche präsentierten Lipoteichonsäuren (LTA) (Saito *et al.*, 1995b). TL-1 ist aus einer einzigen Polypeptidkette aufgebaut, die 221 Aminosäuren umfaßt. Das Molekül enthält drei Disulfidbrücken und ein freies Cystein. Durch die Kristallstrukturanalyse von TL-1 konnte gezeigt werden, daß die Faltung der Polypeptidkette einen sechszähligen  $\beta$ -Propeller bildet. Im Vergleich zu bekannten  $\beta$ -Propellern (Fülöp *et al.*, 1999) zeigt TL-1 jedoch eine sehr regelmäßige sechsfache Pseudosymmetrie (siehe Abbildung 11).

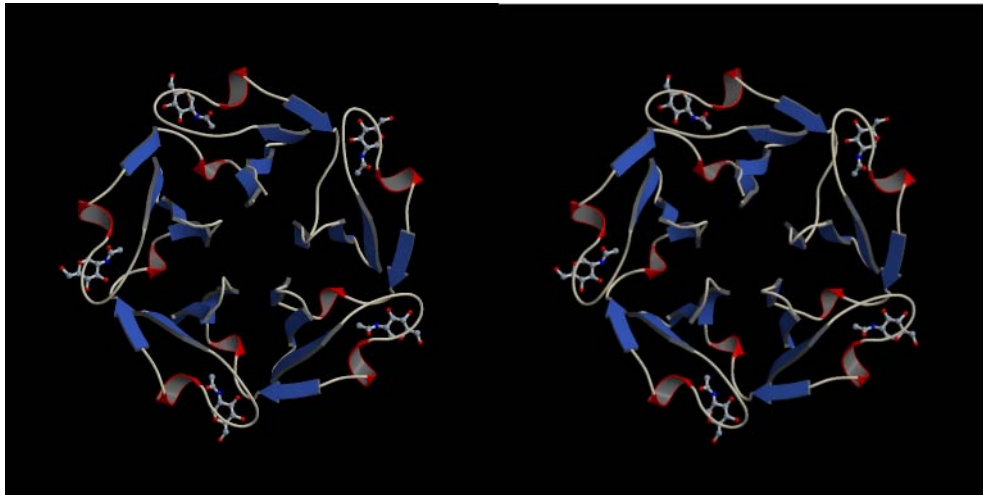


**Abbildung 11:** Schematische Darstellung der Tachyletin 1 Struktur. Blickrichtung entlang der sechsfachen Pseudorotationsachse. Im zentralen Kanal ist das Zinkion grau dargestellt, das durch drei Aspartate und zwei Serine koordiniert wird. Rot dargestellt ist das Wassermolekül, das ebenfalls an der Koordinierung des Zinkions beteiligt ist.

Im Inneren des zentralen Kanals sitzt ein Zinkion, das oktaedrisch durch zwei Serinreste, drei Aspartatreste und ein Wassermolekül koordiniert wird. Die Lage der Zuckerbindestelle konnte nicht aufgeklärt werden. Ein Vergleich mit bekannten  $\beta$ -Propellern legt jedoch die Vermutung nahe, daß sich die Zuckerbindestelle innerhalb des zentralen Kanals befindet (Baker *et al.*, 1997).

### 2.2.3.2 Tachylectin 2

Tachylectin-2 (TL-2) läßt sich aus den L-Granula der Hämozyten isolieren. TL-2 bindet spezifisch an *N*-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) und *N*-Acetyl-D-galactosamin (GalNAc). Es ist frei von Metallionen und die spezifische Aktivität wird durch Komplexbildner (z.B. EDTA) nicht gemindert. TL-2 ist aus einer einzigen Polypeptidkette aufgebaut, die 236 Aminosäuren umfaßt, und liegt als Monomer in Lösung vor (Okino *et al.*, 1995). Die Kristallstrukturanalyse zeigt, daß TL-2 ähnlich wie TL-1 eine  $\beta$ -Propeller Faltung einnimmt (Beisel *et al.*, 1999). Hinsichtlich bekannter  $\beta$ -Propeller schloß TL-2 eine Lücke, da es zu diesem Zeitpunkt das erste Beispiel eines fünfblättrigen  $\beta$ -Propellers darstellte (siehe Abbildung 12).



**Abbildung 12:** Darstellung der Tachylectin 2 Struktur mit allen fünf äquivalenten Bindungsstellen für *N*-Acetyl- $\alpha$ -D-glucosamin. Blickrichtung entlang der fünffachen Pseudorotationsachse.

TL-2 besitzt fünf äquivalente Bindestellen für GlcNAc, die entsprechend der fünffachen Pseudosymmetrie an der Oberfläche des Moleküls angeordnet sind. GlcNAc ist innerhalb der Bindetasche so orientiert, daß die Acetamidgruppe in die Tasche hineinragt und die C6 OH-Gruppe des Zuckers solvensexponiert ist.

Für die Bindung des Zuckers ist eine freie OH-Gruppe an dem C4 Atom notwendig. Diese freie OH-Gruppe spielt eine wichtige Rolle in der *Selbst-Fremd* Unterscheidung. Das Exoskelett des Pfeilschwanzkrebses wird von Chitin aufgebaut, welches somit ubiquitär in dem Organismus verteilt ist. Chitin ist ein Strukturpolysaccharid und besteht aus polymeren GlcNAc, das  $\beta$ -1,4 verknüpft ist. Durch die Spezifität der Zuckerbindetasche wird somit eine Autoimmunreaktion unterdrückt. Auf der anderen Seite wird durch die geometrische Anordnung der Bindetaschen – bedingt durch die pentagonale Anordnung sind benachbarte Bindetaschen 20 und 40 Å voneinander entfernt – eine Bindung zu unterschiedlichen endständigen GlcNAc-Gruppen des Chitins vermieden.

### 2.2.3.3 Tachylectin 3 und Tachylectin 4

Tachylectin-3 besitzt eine hämagglutinierende Wirkung gegenüber humanen Typ A Erythrozyten. Diese Aktivität entspricht der des Tachylectin 2, wird jedoch nicht durch D-GlcNAc oder D-GalNAc inhibiert. Interessanterweise wird diese Aktivität jedoch durch synthetische Blutgruppen A Antigene und noch stärker durch Typ S LPS unterschiedlicher Gram-negativer Bakterien inhibiert. Tachylectin 3 besteht aus 123 Aminosäuren und liegt in Lösung als Dimer vor (Saito *et al.*, 1997).

Tachylectin-4 besteht aus 232 Aminosäuren und ist ein oligomeres Protein mit einer Masse von 470 kDa (Inamori *et al.*, 1999). Verglichen zu TL-2 und TL-3 besitzt es die höchste hämagglutinierende Wirkung gegenüber humanen Typ A Erythrozyten. Obwohl L-Fucose und N-Acetylierte Neuraminsäure diese Aktivität bei einer Konzentration von 100 mM komplett inhibieren, ist die Inhibierungsstärke durch bakterielle Typ S LPS am stärksten, auch im Vergleich zu bakterieller Typ R LPS, der das O-Antigen fehlt.

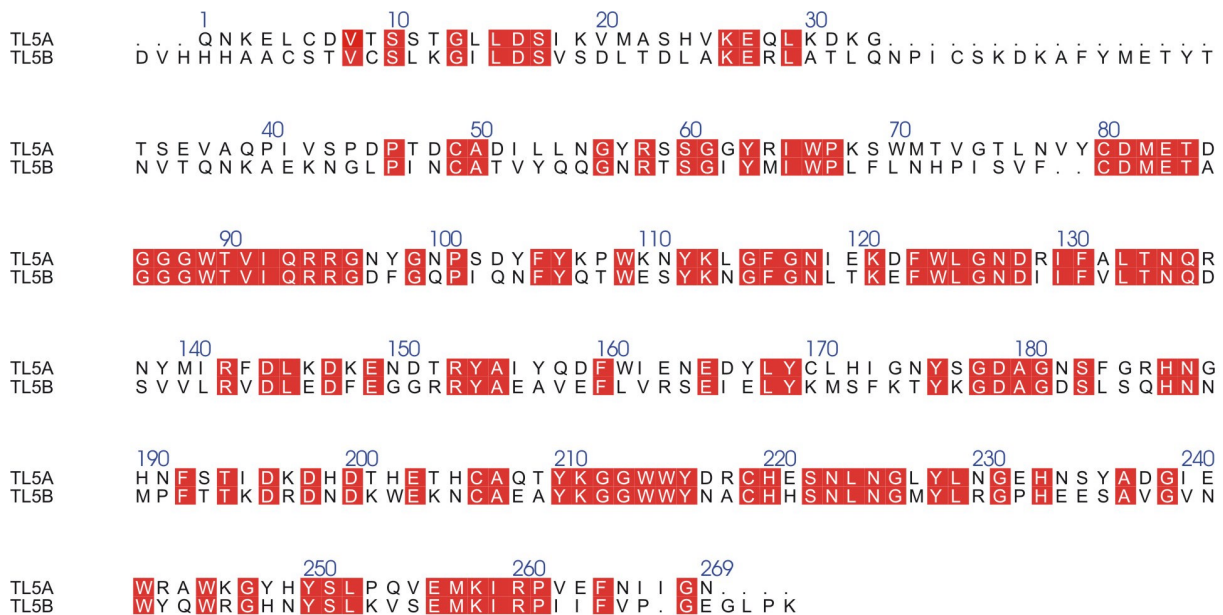
Am effektivsten inhibiert Type S LPS aus *Escherichia coli* die Agglutinierung von humanen Typ A Erythrozyten. Verglichen zu Typ S LPS aus *Salmonella minnesota* bedarf es einer einhundertsechzigfach geringeren Konzentration des *E. coli* Antigens, um dieselbe Agglutinierung hervorzurufen. *E. coli* LPS wird im Bereich des O-Antigen durch Colitose (3-Deoxy-L-fucose) aufgebaut, einem der L-Fucose strukturell verwandten Zucker. Dieser Zuckerbaustein kommt ausschließlich in LPS aus *E. coli* vor und macht deshalb L-Fucose zu dem wahrscheinlichsten Bindungspartner für TL-4.

### 2.2.3.4 Tachylectin 5A und Tachylectin 5B

Tachylectin 5A und 5B sind die einzigen der bisher aus dem Japanischen Pfeilschwanzkrebs charakterisierten Lektine, die nicht in den Granula, sondern in dem Hämolymp plasma gespeichert sind. Die hämagglutinierende Aktivität des Hämolymp plasma ist bereits lange bekannt (Muta und Kawabata, 1996b). Die Charakterisierung der verantwortlichen Lektine

war jedoch bisher nicht gelungen. Es konnte gezeigt werden das TL-5A und TL-5B maßgeblich für diese Aktivität verantwortlich sind (Gokudan *et al.*, 1999).

Sowohl TL-5A als auch TL-5B agglutinieren humane Typ A, B und O Erythrozyten. Hieraus läßt sich schließen, daß nicht alleine Blutgruppenantigene die Bindungsspezifität der Lektine bestimmen. Verglichen mit den Tachylectinen 1-4 agglutinieren TL-5A und TL-5B Bakterien am stärksten (siehe Tabelle 3). Die Inhibierung der agglutinierenden/hämagglutinierenden Eigenschaft geschieht durch eine große Anzahl unterschiedlicher Saccharide, wobei die Spezifität nicht eine bestimmte Zuckergruppe sondern eine Acetylgruppe erfordert. So konnte selbst für Acetylgruppen tragende Nichtsaccharide eine Inhibierung nachgewiesen werden (z.B. Acetylcholin, Acetylsalicylsäure) (Gokudan *et al.*, 1999) (siehe Tabelle 4). Die agglutinierende Aktivität wird durch den Metallionenkomplexbildner EDTA inhibiert. Die Inhibierung läßt sich aber durch einen Überschuß an CaCl<sub>2</sub> wieder aufheben. Beide Lektine agglutinieren sowohl Gram-negative als auch Gram-positive Bakterien.



**Abbildung 13:** Sequenzüberlagerung des Tachylectin 5A und 5B. Rot unterlegt sind identische Aminosäuren. Überlagerung modifiziert aus Gokudan *et al.*, 1999.

Die gesamte Sequenzidentität zwischen der 269 Aminosäuren umfassenden Sequenz des TL-5A und der 289 Aminosäuren umfassenden Sequenz des TL-5B beträgt 50.4% (siehe

Abbildung 13). Für beide Lektine konnte anhand eines Sequenzvergleichs eine Ähnlichkeit mit dem C-terminalen Bereich der  $\gamma$ - und der  $\beta$ -Kette des Fibrinogens vorhergesagt werden (Gokudan *et al.*, 1999).

	minimale Konzentration um Agglutinierung auszulösen ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	TL-5A	TL-5B
<b>Gram-negativ</b>		
<i>E. coli</i> B	0.08	0.11
<i>E. coli</i> K12	0.04	0.05
<b>Gram-positiv</b>		
<i>S. aureus</i> 209P	1.2	26.8
<i>S. saprophyticus</i> KD	1.6	15.1
<i>Enterococcus hirae</i>	0.3	26.8
<i>Micrococcus luteus</i>	2.4	26.8
<b>humane Erythrozyten</b>		
A	0.004	0.077
B	0.008	0.27
O	0.004	0.077

**Tabelle 3:** Agglutinierende Aktivität und hämagglutinierende Aktivität gegenüber Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien und humane Erythrozyten. Modifiziert aus Gokudan *et al.*, 1999.

Verbindung	minimale Konzentration zur Inhibierung der hämagglutinierenden Aktivität (mM)	
	TL5A	TL5B
<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamin	1.6	1.6
<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamin	3.1	3.1
<i>N</i> -Acetyllactosamin	1.6	1.6
<i>N</i> -Acetylalloctosamin	1.6	1.6
Natriumacetat	1.3	1.3
Acetamid	3.1	3.1
Acetylsalicylsäure	2.3	4.6
Acetylcholin	1.3	1.3

**Tabelle 4:** Inhibierung der hämagglutinierenden Aktivität der Tachylectine 5A und 5B. Modifiziert aus Gokudan *et al.*, 1999.



## 2.3 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

### 2.3.1 Überblick

Kristallographie ermöglicht die Bestimmung von Raumstrukturen bei atomarer Auflösung. Dabei wird während der Datensammlung das Verhalten der  $10^{13}$  bis  $10^{15}$  Moleküle im Kristall über Raum und Zeit gemittelt. Die Geschichte der Kristallographie beginnt mit einem von Max von der Laue angeregten Experiment der Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen. Damit gelang Friedrich und Knipping 1912 der Nachweis, daß sich Röntgenstrahlen wie elektromagnetische Wellen verhalten und daß das Wesen des kristallinen Zustands durch eine regelmäßige Anordnung der Atome in einer Gitterstruktur – mit Wiederholungsperioden in der Größenordnung der Wellenlänge der Röntgenstrahlung von  $10^{-9}$  m – beschrieben werden kann. In ihrer Versuchsanordnung hatten Friedrich und Knipping unwissentlich polychromatisches Licht (weißes) Röntgenlicht verwendet, dessen spektrale Verteilung durch die kontinuierliche Bremsstrahlung gegeben ist, der die charakteristische Strahlung, ein Linienspektrum, überlagert ist. Die Anordnung eines stationären Kristalls in einem polychromatischem Röntgenstrahl wird nach ihrem geistigen Vater Laue - Geometrie und in ihrer Anwendung Laue - Methode genannt.

Frühe Versuche röntgenkristallographischer Untersuchungen von Proteinen schlugen vor allem deshalb fehl, da man die Kristalle vor der Messung trocknete, was aus heutiger Sicht fatale Folgen für die Proteinkristalle hatte, da diese nicht selten einen Wassergehalt von mehr als 50% besitzen. Obwohl bereits 1840 über die erste Kristallisation von Proteinen berichtet wurde, dauerte es bis 1934 bevor die ersten Diffraktionsbilder von Proteinkristallen durch J. D. Bernal und D. Crowford veröffentlicht wurden. Es mußten allerdings noch weitere zwanzig Jahre vergehen, bevor durch den isomorphen Schweratomersatz eine Methode entwickelt war, die schließlich zur Strukturlösung von Hämoglobin (Perutz *et al.*, 1960) und Myoglobin (Kendrew *et al.*, 1960) führte.

Dank einer ständigen Verbesserung der Methoden und der Verfügbarkeit immer leistungsfähigerer Rechner nahm die Zahl der gelösten Proteinstrukturen enorm zu. Waren im

Mai 1998 rund 7000 Strukturen in der Proteindatenbank in Brookhaven hinterlegt, hat sich deren Zahl bis November 2001 auf 16000 vergrößert.

### 2.3.2 Proteinkristalle und Symmetrie

In Kristallen sind Atome bzw. Moleküle so zueinander angeordnet, daß deren Anordnung sich entlang allen drei Raumrichtungen durch Translationssymmetrie auf sich selbst abbilden läßt. Das sogenannte Kristallgitter bildet die dreidimensionale Anordnung der Elementarzellen. Eine Elementarzelle wird durch die Vektoren  $\vec{a}$ ,  $\vec{b}$ ,  $\vec{c}$  und die Winkel  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  definiert. Im allgemeinen sind die Beträge der Vektoren und der Winkel zueinander verschieden. Die Anordnung der Moleküle innerhalb der Elementarzelle kann asymmetrisch sein, ist jedoch in den meisten Fällen symmetrisch. Bezüglich der Rotationssymmetrie ist in Kristallen nur die 1-, 2-, 3-, 4- und 6-fache Rotation erlaubt. Diese Restriktion folgt aus der Kombination der Symmetrieeigenschaften des dreidimensionalen Kristallgitters und der Rotationsoperation. Andere mögliche Symmetrieelemente sind Spiegelebenen  $m$ , Inversionszentren und die Kombination aus Inversionszentrum und Rotationsachse (Inversionsdrehachse). Diese Symmetrieelemente bilden die Punktgruppensymmetrie. Sie treten nicht in beliebiger Kombination zueinander auf, sondern unterliegen der geometrischen Beschränkung durch die Elementarzelle. Die möglichen Kombinationen dieser Symmetrieelemente bilden 32 sogenannte Punktgruppen. Die Morphologie der Kristalle gehorcht dieser Punktgruppensymmetrie.

Definiert man innerhalb der 32 Punktgruppen ein zusätzliches Inversionszentrum, so gelangt man zu den 11 Lauegruppen, deren Symmetrie wichtig für die Beschreibung von kristallographischen Streubildern ist. Die Symbole der 11 Lauegruppen sind:  $\bar{1}$ ,  $2/m$ ,  $2/mmm$ ,  $\bar{3}$ ,  $\bar{3}m$ ,  $4/m$ ,  $4/mmm$ ,  $6/m$ ,  $6/mmm$ ,  $m3$  und  $m3m$ . Proteine sind chirale Moleküle. Aus diesem Grund können sie nur in einer der 11 enatiomorphen Punktgruppen (1, 2, 3, 4, 6, 23, 222, 32, 422, 622, 432) kristallisieren.

Die Kombination der Punktgruppensymmetrie mit dem Kristallgitter führt zu den sieben Kristallsystemen, triklin, monoklin, orthorhombisch, trigonal, tetragonal, hexagonal und kubisch, mit den 14 unterschiedlichen Bravais-Gittern, die entweder als primitiv,

flächenzentriert, vollständig flächenzentriert oder als innenzentriert bezeichnet werden. Darüber hinaus werden zusätzliche Symmetrieelemente durch die Translation erzeugt, wie die Schraubenachse und die Gleitspiegelebene. Von den 230 existierenden Raumgruppen gehören 65 zu den enantiomorphen Raumgruppen. Chirale Moleküle wie die Proteine können ausschließlich in diesen 65 Raumgruppen kristallisieren. Eine Besonderheit bezüglich der Symmetrie hängt mit der sogenannten asymmetrischen Einheit zusammen. Unter der asymmetrischen Einheit versteht man den kleinsten Satz an Molekülen (oder Atomen), der notwendig ist, um durch Anwendung der Raumgruppensymmetrien zu dem kompletten Inhalt der Elementarzelle – der Struktur – zu kommen. Die asymmetrische Einheit ist, abhängig von der Raumgruppe, immer ein  $n$ -Vielfaches der Elementarzelle und kann zahlreiche Moleküle enthalten. Diese Moleküle besitzen sehr oft eine eigene Symmetrie, die sogenannte nicht-kristallographische Symmetrie. Innerhalb der nicht-kristallographischen Symmetrie sind auch fünf- oder siebenfache Rotationsachsen erlaubt.

### 2.3.3 Röntgenstrahlungsquellen

Als Röntgenstrahlungsquellen dienen in der Proteinkristallographie hauptsächlich Drehanodengeneratoren und Elektronenbeschleuniger. In Drehanodengeneratoren wird im Hochvakuum ein Elektronenstrahl unter Hochspannung auf eine Anode gelenkt, deren Material aus hochreinem Metall (Cu oder Mo, seltener auch Fe oder Cr) besteht. Zwei Prozesse werden durch den *Beschuß* des Anodenmaterials mit Elektronen ausgelöst. Zum einen wird die kinetische Energie der Elektronen durch Abbremsen in der Anode als sogenannte *Bremsstrahlung* abgegeben. Diese Bremsstrahlung hat, da Elektronen bei unterschiedlicher Eintrittsgeschwindigkeit abgebremst werden, eine *spektrale* Energieverteilung. Man spricht aus diesem Grund auch von *weißer Röntgenstrahlung*. Der zweite, wichtigere Prozeß führt zu der Emittierung der *charakteristischen Strahlung*: Infolge der Wechselwirkung der Elektronen mit dem Anodenmaterial werden kurzzeitig Elektronenzustände angeregt, die unter Abgabe von Röntgenstrahlung wieder in den Grundzustand relaxieren. Im Falle von Kupfer als Anodenmaterial wird Röntgenstrahlung – entsprechend dem elektronischen Übergang – der Wellenlänge 1.54051 Å ( $\text{CuK}_{\alpha 1}$ ) und 1.54433 Å ( $\text{CuK}_{\alpha 2}$ ) emittiert. Durch Monochromatoren wird die gewünschte Wellenlänge herausgefiltert.

Da Proteinmoleküle relativ groß sind, streuen deren Kristalle die Röntgenstrahlung schlechter als Kleinmolekülkristalle. Der Grund liegt in der Eigenschaft, daß das Streuvermögen eines Kristalls von der Anzahl der ihn aufbauenden Moleküle abhängt: Bei großen Verbindungen ist die Anzahl an Molekülen in einem Kristall geringer, damit vermindert sich auch dessen Streuvermögen. Außerdem bestehen Proteine hauptsächlich aus den leichten Elementen C, N und O. Hinzu kommt, daß mit der Anzahl an Elektronen der Beugungseffekt der Röntgenstrahlung steigt und leichte Elemente somit einen geringeren Streubeitrag leisten. Diese Umstände führen in der Proteinkristallographie sehr oft dazu, daß die Intensität der durch einen Drehanodengenerator erzeugten Röntgenstrahlung für eine Vermessung der Proteinkristalle zu gering ist. In diesen Fällen läßt sich eine Strukturanalyse nur durch eine an Elektronenbeschleunigern erzeugten Röntgenstrahlung durchführen. Die Intensität dieser Röntgenstrahlung ist bis zu 10000-fach höher. Außerdem läßt sich hier die Röntgenstrahlungswellenlänge in einem spektralen Bereich von 0.5 bis 3.0 Å frei wählen, was besonders bei MAD- (*Multiple Wavelength Anomalous Dispersion*) und Laue-Experimenten von Bedeutung ist.

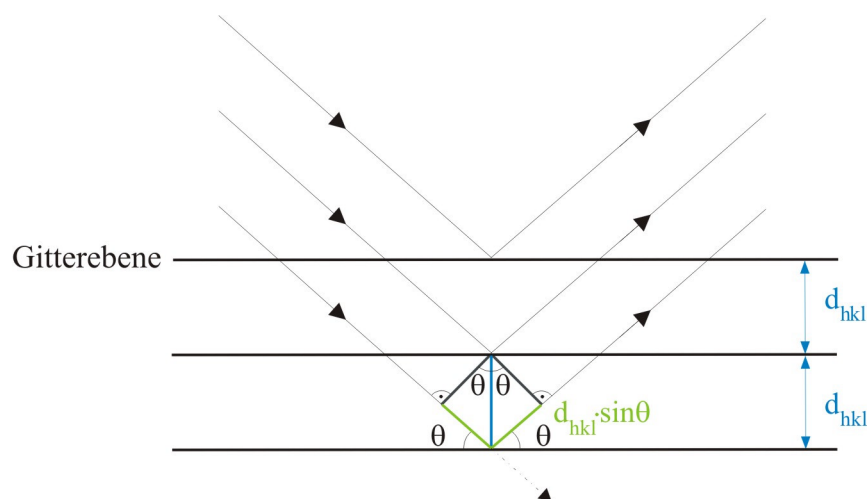
### 2.3.4 Beugung von Röntgenstrahlung an Kristallen

Ähnlich wie sichtbares Licht durch *kleine* Objekte, wird Röntgenstrahlung durch Elektronen gebeugt. Das elektrische Feld der Röntgenstrahlung regt die Elektronen zu Schwingungen an. Da die Atomkerne davon unbetroffen bleiben entsteht ein elektrischer Dipol. Dieser Dipol wiederum stellt einen Sender dar, der die eingestrahlte Röntgenstrahlung mit einem Phasenunterschied von 180° emittiert.

Diese elastische Streuung – auch Thomson-Streuung genannt – wird unter Vernachlässigung der Mehrfachstreuung durch die kinematische Streutheorie beschrieben. Aufgrund der Phasenverschiebung der gebeugten Einzelwellen – ausgehend von jedem Punkt endlicher Elektronendichte – summiert sich die Gesamtintensität der resultierenden Sekundärstrahlung aller Elektronen zur Intensität null (destruktive Interferenz), wenn nicht der Gangunterschied ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge ist (konstruktive Interferenz). Die Beugung der Röntgenstrahlung am Kristall läßt sich wie folgt beschreiben:

Durch die Anwendung der Translationssymmetrie auf die Elementarzelle ergibt sich das Kristallgitter. In Kristallgittern lassen sich Netzebenen definieren, die unterschiedliche Gitterpunkte beinhalten. Anhand der Schnittpunkte der Netzebenen mit den Achsen der Elementarzellen lassen sich jeder Netzebene entsprechende *Miller'sche Indices* zuordnen. Durch die Normalvektoren dieser Netzebenenscharen gelangt man zu dem reziproken Gitter. Das reziproke Gitter eines Kristalls stellt nicht den realen Kristall, sondern ein mathematisches Hilfsmittel dar, durch das die Interpretation der Streubilder erleichtert wird. Ein Streubild ist folglich eine Abbildung des reziproken Gitters: Jeder Reflex repräsentiert eine Netzebenenschar, die sich entsprechend der *Bragg'schen Gleichung* in der erforderlichen Reflexstellung befindet (siehe Abbildung 14). Große Abstände der beugenden Netzebenen führen im Streubild zu nahe beieinanderliegenden Reflexen, kleine Abstände führen zu weit entfernten Reflexen. Deshalb spricht man von einem *reziproken* Gitter.

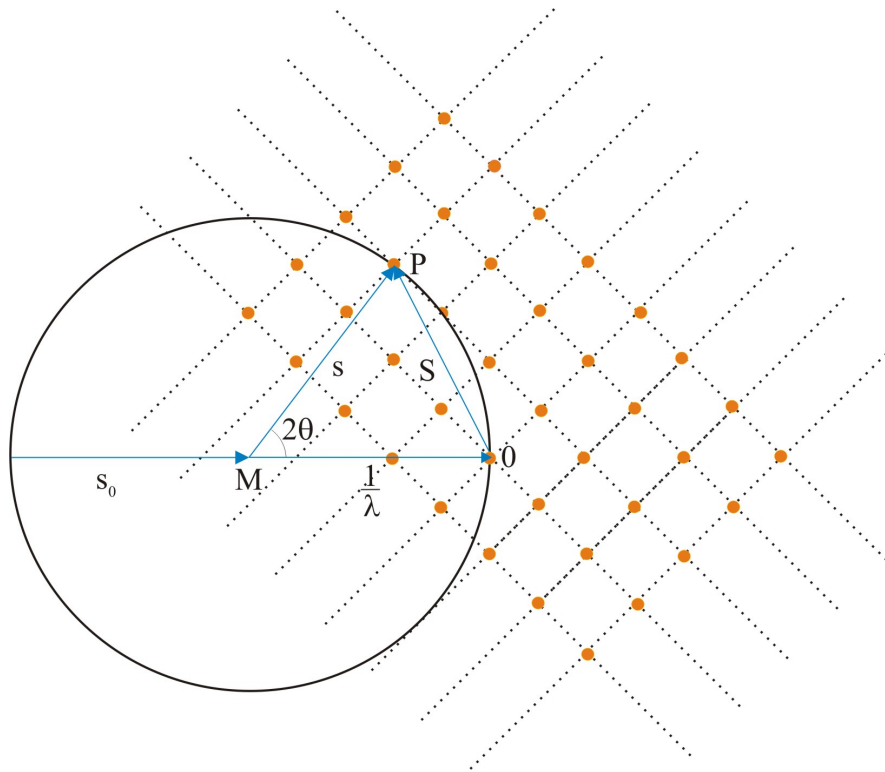
Wie bereits oben erwähnt stellt die Bragg'sche Gleichung die mathematische Gesetzmäßigkeit der Beugung von Röntgenstrahlung dar: Bei kohärenter Streuung an einer Netzebenenschar des Gitters tritt unter einem Winkel  $\theta$  zwischen einfallendem Strahl und Netzebenenschar konstruktive Interferenz auf, wenn der Gangunterschied zwischen den an verschiedenen Ebenen einer Schar gebeugten Wellen ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge ist (siehe Abbildung 14).



$$2d \sin \theta = n\lambda$$

**Abbildung 14:** Bragg'sche Gleichung. In der Abbildung sind drei Gitterebenen mit dem Abstand  $d_{hkl}$  zueinander gezeigt. Einfallender und reflektierter Strahl schließen mit den Gitterebenen jeweils den Winkel  $\theta$  ein. In der Bragg'sche-Gleichung steht  $d$  für den Gitterebenenabstand,  $\lambda$  für die Wellenlänge und  $n$  für eine ganze Zahl.

In der sogenannten *Ewald-Konstruktion* (Ewald, 1921) lässt sich die Bragg'sche Gleichung unter Verwendung des reziproken Gitters als Vektordiagramm darstellen (siehe Abbildung 15).



**Abbildung 15:** Schnitt durch die Ewald Kugel. Der Kristall befindet sich im Mittelpunkt M der Ewald-Kugel mit dem Radius  $1/\lambda$ . Der Ursprung des reziproken Gitters liegt in 0.  $s_0$  bezeichnet die Richtung des einfallenden Strahls,  $s$  bezeichnet die Richtung des ausfallenden Strahls und  $S$  einen Gittervektor. Für jeden Punkt P des reziproken Gitters, der auf der Kugeloberfläche liegt, ist die Reflexionsbedingung erfüllt.

Die Intensität der gebeugten Strahlung wird von dem Inhalt der Elementarzelle bestimmt. Da ein Kristall die Konvolution des Elementarzelleninhalts mit dem dreidimensionalen Gitter darstellt, ergibt sich das Diffraktionsmuster des Molekülkristalls aus dem Produkt der molekularen Transformation mit dem reziproken Gitter. Dieses Produkt beider Transformationen resultiert in einer Abbildung der molekularen Transformation an den reziproken Gitterpunkten. Folglich ist die Intensität an einem Gitterpunkt hoch, wenn die zugrundeliegende molekulare Translation an diesem Punkt ebenfalls eine hohe Intensität besitzt, und umgekehrt.

Da die Elektronenhülle eines Atoms ein endliches Volumen einnimmt, hängt die gestreute Gesamtwelle vom Einfallswinkel ab. Bei großen Streuwinkeln ist die Phasendifferenz zwischen den Wellen, die an unterschiedlichen Positionen innerhalb der Atomhülle gebeugt werden, ebenfalls hoch, so daß die resultierende Gesamtintensität mit zunehmendem Winkel – und damit höherer Auflösung – abnimmt. Die an einem Atom gestreute Gesamtwelle errechnet sich die Summe aller individuellen Beiträge innerhalb des Atomvolumens:

$$f(\vec{S}) = \int_V \rho(\vec{r}) \exp[2\pi i \vec{r} \cdot \vec{S}] dV$$

Unter der Annahme, kugelsymmetrischer Verteilung der Elektronendichte des Atoms, hängt der *atomare Formfaktor*  $f$  nur von der Länge des Streuvektors  $\vec{S}$  ab, nicht aber von dessen Orientierung. Die atomaren Formfaktoren innerhalb einer Elementarzelle mit  $n$  Atomen summieren sich unter Multiplikation mit ihrem jeweiligen Phasenwinkel zum *Strukturfaktor*  $F$ :

$$\vec{F}(\vec{S}) = \sum_{j=1}^n f_j \exp[2\pi i \vec{r}_j \cdot \vec{S}]$$

Der Vektor  $\vec{r}_j$  gibt die Position des Atoms  $j$  in Fraktionalkoordinaten an.

Analog zur Winkelabhängigkeit der gebeugten Strahlungsintensität im Falle nichtpunktförmiger Strahler bewirkt auch die thermische Schwingung von Atomen eine zunehmende destruktive Interferenz der gestreuten Wellen, besonders bei großen Streuwinkeln. Diese Besonderheit wird durch den *Temperaturfaktor*  $B$  berücksichtigt:

$$T(iso) = \exp\left[-B \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2}\right]$$

Der Temperaturfaktor ist mit der mittleren quadratischen Auslenkung verknüpft:

$$B = 8\pi^2 \bar{u}^2$$

Zusätzlich zu dieser dynamischen Unordnung gehen in den Temperaturfaktor noch andere Faktoren – wie statische Unordnung, falsche Datenskalierung und Absorption – ein.

Aufgrund der Fehlordnung (Mosaizität) der Kristalle sind die Beugungsreflexe nicht *ideal* scharf, da sich die Netzebenenscharen eines Kristalls über einem Winkelbereich in Reflexstellung befinden. Rotiert ein Kristall mit konstanter Winkelgeschwindigkeit  $\omega$  durch die Reflexposition, gilt für die Gesamtintensität des gebeugten Strahls  $I(\vec{h})$  die *Darwin'sche Formel* (Darwin, 1914):

$$I(\vec{h}) = \frac{I_0}{\omega} \lambda^3 \frac{e^4}{m^2 c^4} \frac{1 + \cos^2 2\theta}{2} \frac{L A V_x}{V^2} |F(\vec{h})|^2$$

Dabei ist  $\lambda$  die Wellenlänge der Röntgenstrahlung,  $e$  die Elementarladung,  $m$  die Elektronenmasse und  $c$  die Lichtgeschwindigkeit. Der Term  $(1 + \cos^2 2\theta)/2$  stellt den Polarisationsfaktor dar, der die partielle Polarisierung des gebeugten Strahls für den Bragg'schen-Winkel  $\theta$  angibt, wenn der Primärstrahl unpolarisiert ist. Der Lorenzfaktor  $L$  berücksichtigt die relative Zeit, die jeder Reflex in der Reflexposition verbringt.  $A$  ist der Absorptionsfaktor,  $V_x$  das Kristallvolumen und  $V$  das Volumen der Elementarzelle.  $|F(\vec{h})|$  ist die Strukturfaktoramplitude für den Reflex  $\vec{h}$ . Somit ist – bei kinematischer Streuung ohne Mehrfachstreuung – die Intensität  $I(\vec{h})$  des gebeugten Röntgenstrahls proportional zum Amplitudenquadrat der Strukturfaktors  $\bar{F}(\vec{h})$ .

### 2.3.5 Berechnung der Elektronendichte

Der Strukturfaktor  $\bar{F}(\vec{h})$  ist die *Fourier-Transformation* der Elektronendichte. Daher läßt sich die Elektronendichte  $\rho$  am Ort  $xyz$  durch inverse Fourier-Transformation berechnen:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l \bar{F}(hkl) \exp[-2\pi i(h_x k_y l_z)]$$

Es gilt  $F(hkl) = |F(hkl)| \exp i\alpha(hkl)$ , wobei  $\alpha(hkl)$  den Phasenwinkel des Reflexes  $hkl$  darstellt. Im Beugungsexperiment erhält man aus den integrierten Intensitäten lediglich



die Strukturamplituden  $|F(hkl)|$ , nicht aber den zugehörigen Phasenwinkel, ohne den die zugehörige Elektronendichte des Moleküls nicht berechnet werden kann.

### 2.3.6 Lösung des Phasenproblems

Ohne bereits vorhandene strukturelle Information ist die Methode des *multiplen isomorphen Schweratomersatzes* (MIR) die wichtigste Methode zur Phasenbestimmung in der Proteinkristallographie. Aufgrund des technischen Fortschritts an Synchrotron-Beamlines gewinnt auch die MAD-Methode (*Multiple anomale Dispersion*) zunehmend an Bedeutung. Ist die Struktur eines homologen Proteins bereits bekannt, kann diese mit Hilfe von *Patterson-Suchmethoden* (Molekularer-Ersatz) unter günstigen Umständen zur initialen Phasenbestimmung herangezogen werden. Diese Methode findet in steigendem Maße Anwendung, da eine immer größere Zahl von Proteinstrukturen zur Verfügung steht. Im Gegensatz dazu spielen direkte Methoden in der Proteinstrukturanalyse nur eine untergeordnete Rolle. In erster Linie begründet sich dieser Sachverhalt in der limitierten Auflösung der Röntgenbeugungsexperimente an Proteinen verbunden mit der großen Anzahl an Atomen in der Elementarzelle. In der Kleinmolekülkristallographie, in der die atomare Auflösung erreicht wird, sind direkte Methoden das Standardverfahren zur Phasenbestimmung. Im folgenden soll die MIR-Methode kurz beschrieben werden, da sie in der vorliegenden Arbeit verwandt wurde.

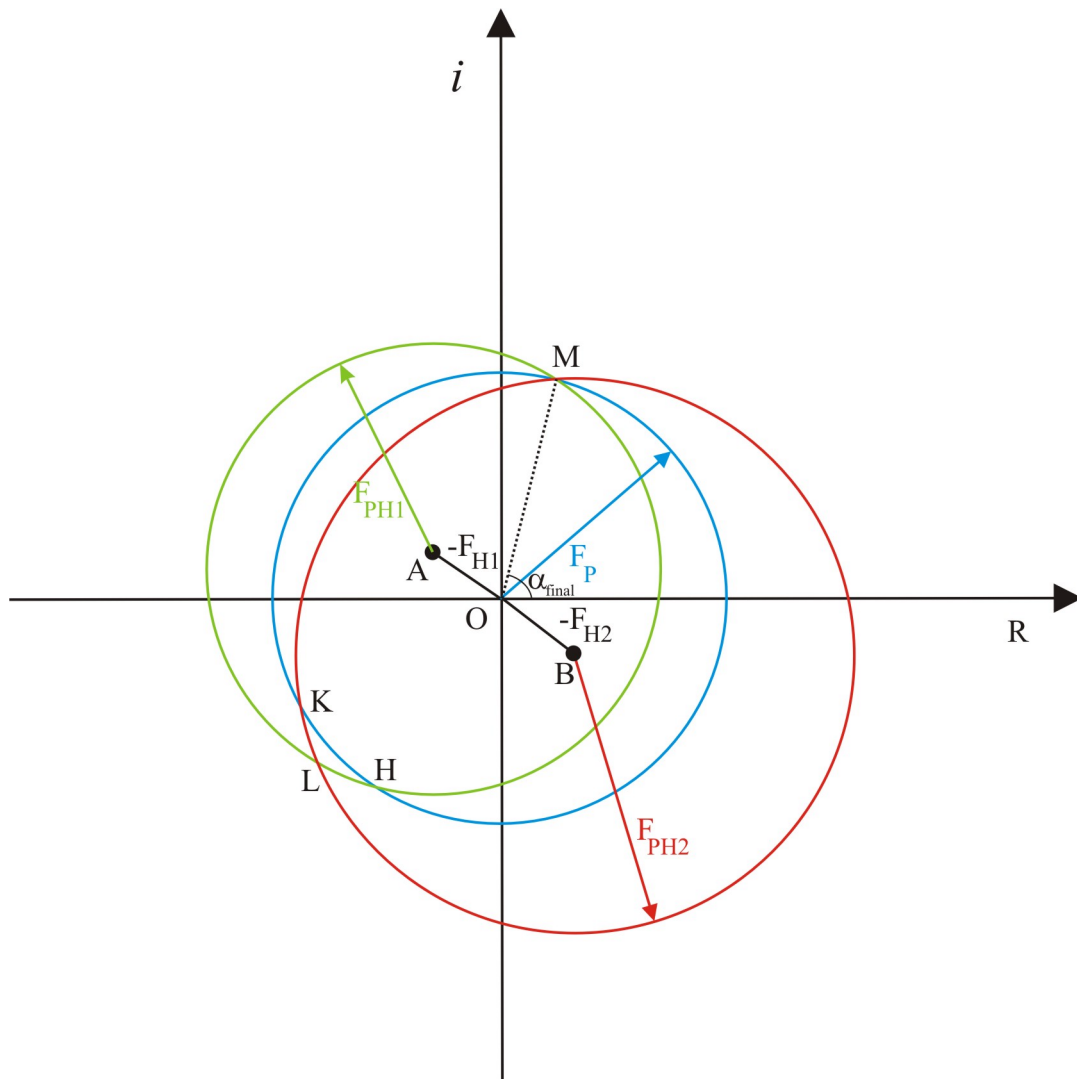
Bei der Methode des multiplen isomorphen Ersatzes wird ein Proteinkristall in eine Lösung eingelegt, die aus in Kristallpuffer gelösten, schweratomhaltigen Verbindungen besteht. Diese Verbindungen diffundieren durch Lösungsmittelkanäle in den Kristall und bilden günstigerweise Bindungen mit funktionellen Gruppen der Aminosäuren. Notwendige Voraussetzung ist, daß diese Reaktion kontrolliert verläuft und die kristalline Ordnung nicht beeinträchtigt wird. In diesen sogenannten Derivaten werden die Positionen der Schweratome durch die Differenz-Patterson-Funktionen aus Derivat und nativem Kristall bestimmt. Eine Patterson-Funktion ist eine Fourier-Summation aus den Quadraten der Strukturamplituden (den experimentell zugänglichen Intensitäten) ohne Phasenkomponente:

$$P(uvw) = \frac{2}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)|^2 \cos 2\pi(h_u k_v l_w)$$

Diese Patterson-Funktion beinhaltet die interatomaren Vektoren. Der Strukturfaktor des Schweratomderivats  $\bar{F}_{PH}$  ergibt sich aus der Summe der Strukturfaktoren des nativen Proteins und der Schweratome.

$$\bar{F}_{PH} = \bar{F}_P + \bar{F}_H$$

Nach Verfeinerung der Schweratomparameter lassen sich aus den so bestimmten Strukturfaktoren  $\bar{F}_H$  unter Verwendung der *Haker-Konstruktion* die Proteinphasen berechnen. Mit einem einzigen Derivat (SIR, *Single Isomorphus Replacement*) können die Phasen in der Regel nicht eindeutig bestimmt werden, es sei denn, man kann aufgrund zusätzlicher Informationen die Phasen verbessern. Neben Elektronendichtemanipulationen, die auf einem hohen Lösungsmittelgehalt der Proteinkristalle oder der Statistikanalyse beruhen, ist insbesondere bei Vorhandensein nicht-kristallographischer Symmetrie (NCS) das zyklische Mitteln der Elektronendichte (Phasenverbesserung) zu nennen – auch unter schrittweiser Erhöhung der Auflösung (Phasenexpansion). Ohne solche speziellen Methoden lassen sich die Proteinphasen erst mit Hilfe mindestens eines zusätzlichen Derivats eindeutig bestimmen. In der Praxis sind, aufgrund der Qualität der Derivatdatensätze, oft mehrere unabhängige Derivate notwendig (siehe Abbildung 16).



**Abbildung 16:** *Harker-Diagramm.* Um den Ursprung  $O$  ist ein Kreis mit dem Radius  $|F_P|$ , den Strukturfaktoramplituden des nativen Datensatzes, gezogen. Relativ dazu sind Kreise mit den entsprechenden Strukturfaktoramplituden der Schweratomderivate ( $|F_{PH1}|$ ,  $|F_{PH2}|$ ), um die Beiträge der Schweratomderivate ( $-\vec{F}_{H1}$ ,  $-\vec{F}_{H2}$ ) versetzt in  $A$  und  $B$ , gezogen. Durch den Schnittpunkt  $M$  aller drei Kreise ist der Phasenwinkel ( $\alpha_{\text{final}}$ ) eindeutig bestimmt.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt von den Firmen Merck, Sigma und Fluka bezogen.

Die Proteine Tachylectin 5A und Tachylectin 5B wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Shun-ichiro Kawabata, Fachbereich Biologie der Kyushu Universität Fukuoka, Japan zur Verfügung gestellt. Die Präparation und Charakterisierung beider Proteine ist in Gokundan *et al.*, 1999 publiziert.

Tachylectin 5A war in einer Lösung aus 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM CaCl<sub>2</sub> und 25 mM GlcNAc gelöst. Die anfängliche Konzentration des Proteins betrug 0.39 mg/ml. Tachylectin 5B war in einer Lösung aus 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM CaCl<sub>2</sub> und 250 mM GlcNAc gelöst. Die anfängliche Konzentration betrug 0.27 mg/ml. Für beide Proteine wurde vor den Kristallisationsversuchen die Konzentration auf 5-7 mg/ml erhöht.

### 3.2 Röntgenstrukturanalytische Methoden

#### 3.2.1 Kristallisation

Experimente zur Auffindung von Kristallisationsbedingungen für TL-5A und TL-5B wurden nach der Dampfdiffusionsmethode (McPherson, 1990) mit hängendem bzw. sitzendem Tropfen durchgeführt. Als Gefäße wurden sowohl gasdicht verschlossene CrysChem-Schalen (Hampton Research) als auch Kunststoffschalen mit Kunststoffbänken verwendet. Um initiale Kristallisationsbedingungen zu finden wurden die Crystal Screen Pakete I und II, Cryo und MembFac der Firma Hampton Research verwendet. Es kamen außerdem die Screening-Pakete Wizard I und Wizard II der Firma Emerald Biostructures zum Einsatz. Die ersten

Kristallisationsbedingungen wurden durch Variation verschiedener Parameter, wie z.B. Konzentration an Präzipitat oder pH-Wert optimiert (Jancarik und Kim, 1991; Cudney und Patel, 1994; Shieh *et al.*, 1995; McPherson, 1995).

### 3.2.2 Datensammlung

Alle röntgenographischen Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Kristalle wurden je nach Größe in Glaskapillaren (Mark-Röhrchen für röntgenographische Arbeiten der Firma W. Müller, Berlin) von 0,7 mm bzw. 0,5 mm verbracht. Hierzu wurden die Kristalle mit etwas Kristallisationslösung in die Glaskapillaren gesaugt. Schrittweise wurde der Kristall dann von der umgebenden Lösung befreit, bis nur noch ein kleiner Flüssigkeitstropfen zurück blieb, durch den der Kristall an der Kapillarenwand gehalten wurde. Die Röntgenröhrchen wurden auf beiden Seiten mit Dentalwachs (Glaswachs, Richter und Hoffmann, Harvard-Dental-GmbH, Berlin) verschlossen.

Alle Messungen wurden an den abteilungseigenen Meßanlagen durchgeführt. Als Röntngenerator wurde ein Drehanodengenerator (Rigaku, Tokyo, Japan, RU 2000 Rotaflex Drehanode, 45 kV, 120 mA) mit Graphit-monochromatisierter  $\text{CuK}_\alpha$ -Strahlung ( $\lambda=1.5418 \text{ \AA}$ , 300  $\mu\text{m}$  Kollimator) eingesetzt. Alle Datensätze wurden mit einem MAResearch Image Plate Detektor (MAResearch, Hamburg) aufgenommen. Die Belichtungszeit betrug 30 Minuten pro Bild bei einem Winkelbereich von  $1^\circ$  pro Bild.

### 3.2.3 Datenauswertung

Alle Streubilder wurden mit den Programmen IMSTILLS und REFIX (Kabsch, 1988; Powell, 1999) indiziert und mit MOSFLM (Leslie, 1991) integriert. Zur Skalierung wurden die Programme ROTAVATA/AGROVATA (Fox und Holmes, 1966; CCP4, 1994) und SCALA (Evans, 1993; CCP4, 1994) herangezogen. Die Berechnung der Strukturamplituden erfolgte mit TRUNCATE (Wilson, 1949; French und Wilson, 1978; CCP4, 1994).

Zur Lösung des Phasenproblems wurden durch *Soaking*-Experimente Schweratomderivate erzeugt. Die Interpretation dieser Datensätze und die Lokalisierung potentieller Schweratompositionen ergab sich aus der Berechnung der Patterson-Funktionen. Hierzu kam das Programm RSPS (CCP4, 1994) zum Einsatz. Fourier-Transformationen wurden mit FFT (Cooley und Tukey, 1965; Ten Eyck, 1985; CCP4, 1994) durchgeführt. Die Berechnung initialer Phasenwinkel und die Ableitung von Schweratomlagen durch *Kreuzphasierungsrechnungen* wurden mit dem Programm MLPHARE (CCP4, 1994) erreicht. Die finalen Phasenwinkel wurden mit dem Programm SHARP (de LaFortelle und Bricogne, 1997) berechnet; *solvent flattening* als weiterer Schritt der Phasenverbesserung wurde mit dem Programm SOLOMON durchgeführt (Abrahams und Leslie, 1996).

### 3.2.4 Modellbau und Strukturverfeinerung

Die atomaren Modelle wurden mit dem Programm O (Jones *et al.*, 1991) in die Elektronendichte eingepaßt und mit dem Programm CNS (Brünger *et al.*, 1998b) verfeinert. Der Vorgang Modellbau/Verfeinerung wurde solange wiederholt bis die vorhandene Elektronendichte vollständig interpretiert und der Modellcharakter der Proteinstruktur minimiert war. Dieses iterative Anpassen des Modells an die experimentellen Daten wurde anhand des *kristallographischen* und des *freien* R-Faktors verfolgt (Brünger *et al.*, 1998a).

Der kristallographische R-Faktor gibt ein Maß für den Unterschied zwischen den Strukturfaktoramplituden des gemessenen Kristalls und dem Modell wieder. Er sollte im Idealfall gegen Null gehen; der Richtwert für *gute Meßdaten* liegt bei einem Wert von unter 20%. Für die Berechnung des freien R-Faktors wurden 5% an unabhängigen Reflexen zufallsverteilt zu einem *Testset* vereint, das nicht in die Verfeinerungsrechnungen einfloß. Durch den freien R-Faktor läßt sich der Phasenfehler des Modells verfolgen (Brünger, 1997). Er liegt etwa um fünf Größen über dem Wert des kristallographischen R-Faktors.

Die Verfeinerungsrechnungen wurden unter Einschränkungen bezüglich der Geometrie und der B-Faktoren durchgeführt. Einschränkungen hinsichtlich der Geometrie sind notwendig, da der Anzahl verfeinerter Parameter im Falle von Proteinstrukturen keine hinreichend große Anzahl unabhängiger Messungen gegenübersteht. Es wurden deshalb unter Verwendung der

Parameter von Engh und Huber (1991) Zielwerte für festgelegte Bereiche der Molekülgeometrie vorgegeben und die erlaubte Abweichung für den Beitrag der gemessenen Strukturfaktoramplituden gewichtet und bestimmt. Die B-Faktoren wurden unter Einhaltung der vorgegebenen Einschränkung bezüglich der Standardabweichung für jedes Atom isotrop verfeinert.

### **3.2.5 Analyse und graphische Darstellung der Atommodelle**

Die geometrische Analyse der Strukturmodelle wurde mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) vorgenommen. Sekundärstrukturelemente wurden anhand der Programme DSSP (Kabsch und Sander, 1983) und STRIDE (Frishman und Argos, 1995) zugeordnet. Zur graphischen Darstellung der Molekülmodelle wurden die Programme RASTER3D (Merrit und Bacon, 1997), MOLSCRIPT (Kraulis, 1991b), POVRAY ([www.povray.com](http://www.povray.com)) und BOBSCRIPT (Esnouf, 1997; Esnouf, 1999) benutzt. Zur Bearbeitung von Bildern fanden die Programme COREL-DRAW (Adobe Systems Inc., USA) und PHOTOSHOP (Adobe Systems Inc., USA) Verwendung. Die Darstellung von Sequenzvergleichen geschah durch das Programm ALSRIPT (Barton, 1993).

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Kristallisation

Erste Kristallisationsbedingungen wurden durch *Screening*-Experimente gefunden. Tachylectin 5A kristallisierte sowohl aus den Lösungen 0.1 M NaAc, 8% (m/v) PEG 4000 als auch 0.1 M Hepes, 10% (m/v) PEG 8000, 8% Ethylenglykol.

Hierzu wurden jeweils 2.5 µl des Proteins (TL-5A-Lösung: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM CaCl<sub>2</sub> und 25 mM GlcNAc) mit 1.5 µl der Kristallisationslösung gemischt und ruhten in CrystChem-Platten nach der *sitting-drop* Methode gegen 500 µl Reservoir-Puffer bei einer Temperatur von etwa 15 °C. Kristalle wuchsen aus beiden Lösungen in einem Zeitraum von zwei bis drei Monaten. Beide Kristallisationsbedingungen ergaben meßbare Kristalle, allerdings nur bis zu einer Auflösung von 3 Ångström. Anhand eines pH-Feinscreenings wurde schließlich die Bedingung gefunden aus der innerhalb von 2 Monaten sehr gut streuende Kristalle wuchsen.

Optimierte Kristallisationsbedingung:

0.1 M Hepes, 10% (m/v) PEG 8000, 8% Ethylenglykol, pH=7.5.

Die Konzentration des Proteins betrug 7 mg/ml und wurde mittels Extinktionsmessung (UV/VIS) bei einer Wellenlänge von  $\lambda=280$  nm bestimmt. Die Kristalle hatten in der Projektion etwa eine Größe von 800x400 µm<sup>2</sup>.

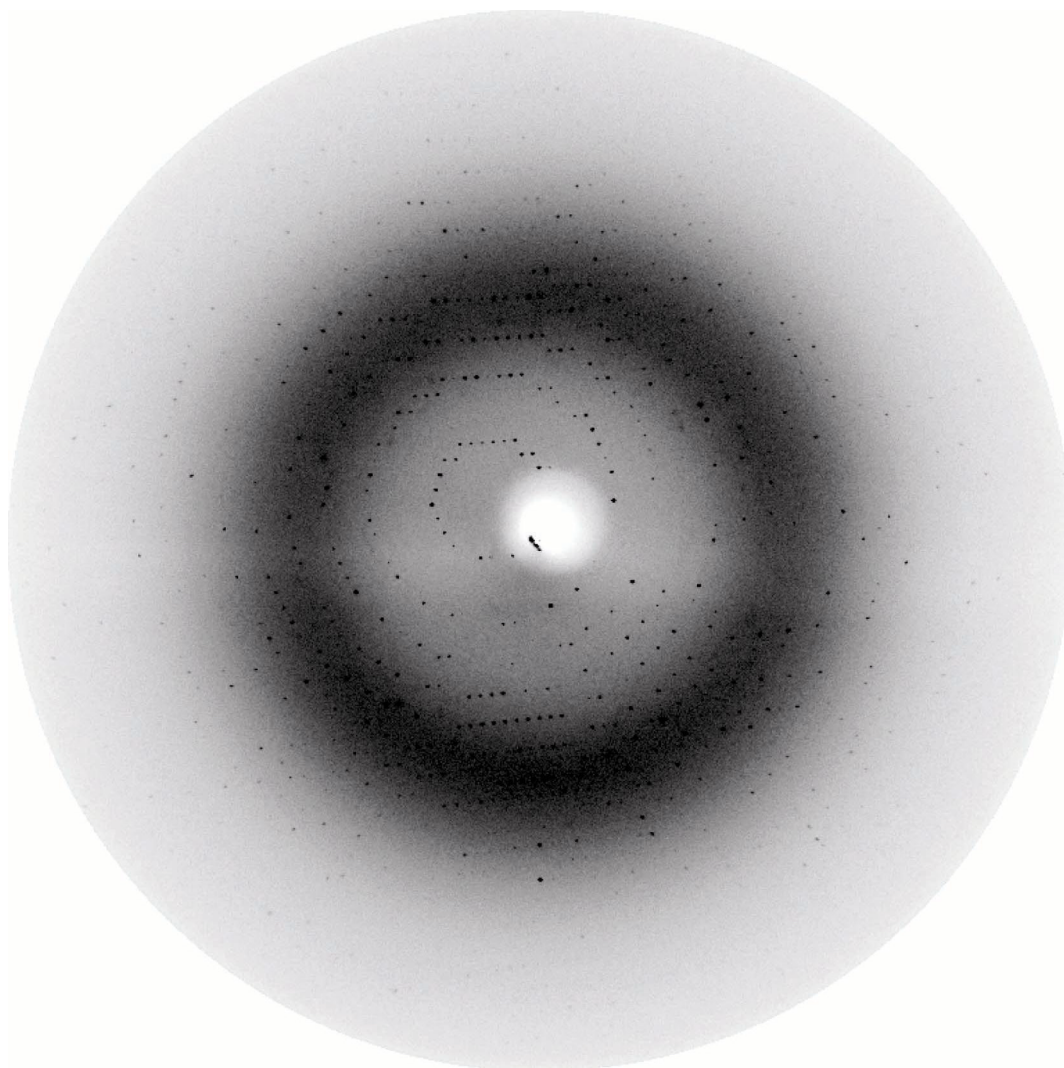
Für Tachylectin 5B ließen sich keine Kristallisationsbedingungen finden.



## 4.2 Datensammlung

Sämtliche Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Versuche durch geeignete *Cryobedingungen* die Strahlenschädigung des Kristalls während der Messung zu vermeiden schlugen fehl, da die Kristalle bei den getesteten Puffern nicht unter Erhaltung der Diffraktion eingefroren werden konnten.

Die Bestimmung der Raumgruppe erfolgte mit dem Autoindizierungsalgorithmus von Kabsch (Kabsch, 1988). Tachylectin 5A kristallisiert in der tetragonalen Raumgruppe I4. Die Kristalle enthielten ein Molekül pro asymmetrischer Einheit entsprechend einem Solvensgehalt von 45% (*Matthewskoeffizient*  $V_m=2.26$ , (Matthews, 1968)). Abbildung 17 zeigt ein Diffraktionsbild des Kristalls. In Tabelle 5 sind die Statistiken aller Datensätze zusammengefaßt.



**Abbildung 17:** Darstellung eines exemplarischen Diffraktionsbildes aus dem Datensatz TL5A/GlcNAc. Die Auflösung am Plattenrand entspricht 2.0 Å.

Datensatz	Tl5A/GlcNAc	NAT	UO <sub>2</sub> (AcO) <sub>2</sub>	Pb(AcO) <sub>2</sub> /Me <sub>3</sub> PbCl
Auflösung (Å)	2.0	2.2	3.1	2.4
Gemessene Reflexe	79953	62016	21151	56510
Unabhängige Reflexe	24726	18490	6013	17404
Vollständigkeit (%)	98.1	98.3	80.5	94.3
Vollständigkeit letzte Schale (%)	94.6	98.0	79.6	88.1
Auflösung letzte Schale (Å)	2.0-2.1	2.2-2.3	3.1-3.2	2.3-2.5
R <sub>sym</sub>	10.7	10.6	15.1	8.8
I/σ(I) letzte Schale	2.0	2.1	2.2	2.4
<b>Zellparameter (I4)</b>				
a=b (Å)	108.93	108.39	108.50	108.91
c (Å)	64.06	63.82	63.181	63.67
α=β=γ (°)	90	90	90	90

**Tabelle 5:** Übersicht zur Datensammlung.

$$R_{sym} = \frac{\sum |I(h)_i - \langle I(h) \rangle|}{\sum \langle I(h) \rangle}$$

### 4.3 Multipler isomorpher Ersatz

Zur Auffindung geeigneter Schweratomderivate wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen wurde versucht Kalzium durch ein schwereres Ion zu ersetzen. Hierzu wurden Salze der *Seltenen Erden* in den Kristall *gesoakt*. Der andere Ansatz verfolgte die Möglichkeit Verbindungen mit hoher Affinität zu Schwefel an freie Cysteine oder Methionine zu binden. Hierzu wurden hauptsächlich Quecksilber- und Bleiverbindungen eingesetzt. Des weiteren kamen chemische Verbindungen zum Einsatz die alleine durch ihre hohe Elektronenzahl vielversprechend sind, ohne daß *a priori* geeignete Bindestellen innerhalb des Proteins vorhergesagt werden konnten.

Salze der *Seltenen Erden* lieferten keine interpretierbaren Schweratomderivate.  $\text{UO}_2(\text{AcO})_2$  und  $\text{Pb}(\text{AcO})_2/\text{Me}_3\text{PbCl}$  ließen sich ohne Zerstörung des Kristalls *soaken* und führten zu gut interpretierbaren "Derivaten". Die Mischung aus zwei Bleiverbindungen war notwendig, da sich durch Vorversuche herausstellte, daß eine  $\text{Pb}(\text{AcO})_2$  Lösung den Kristall in relativ kurzer Zeit zerstört,  $\text{Me}_3\text{PbCl}$  aber nur ein äußerst schwaches Derivat generierte. Die Konzentrationen beider Bleiverbindungen wurde im Vergleich zu den Vorversuchen halbiert.  $\text{Pb}(\text{AcO})_2$  wurde erst kurz vor der Messung hinzugegeben und hatte eine *Soakingdauer* von wenigen Stunden. Details können Tabelle 6 entnommen werden.

Schwermetallverbindung	Konzentration (mM)	Soakingdauer (h)
$\text{UO}_2(\text{AcO})_2$	3	24
$\text{Pb}(\text{AcO})_2$	2.5	24
$\text{Me}_3\text{PbCl}$	2.5	4

**Tabelle 6:** *Soakingdauer* der einzelnen Schweratomderivate.

Die durch den  $\text{UO}_2(\text{AcO})_2$  Datensatz errechnete Phaseninformation lieferte keine ausreichend interpretierbare Elektronendichtekarte. Es war deshalb notwendig, nach zusätzlichen Schweratomderivaten zu suchen. Dieses Problem wurde durch die Phaseninformation aus dem Doppelderivat  $\text{Pb}(\text{AcO})_2/\text{Me}_3\text{PbCl}$  gelöst. Die Schweratomlagen aus beiden Datensätzen wurden durch Kreuzphasierung und Inspektion der Elektronendichtekarte verifiziert. Die statistischen Werte der Derivatsätze sind in Tabelle 7 angegeben.

Derivat	UO <sub>2</sub> (AcO) <sub>2</sub>	Pb(AcO) <sub>2</sub> /Me <sub>3</sub> PbCl
Auflösung (Å)	3.1	2.4
Zahl der Schweratome	1	1
R <sub>iso</sub>	15.7	19.4
R <sub>cullis</sub>	0.73	0.62
Phasing Power (ac/c)	1.01/1.59	2.67/1.51

**Tabelle 7:** Übersicht über die Phasierungsstatistiken.

$$R_{iso} = \frac{\sum |F_{PH} - F_P|}{\sum F_P},$$

$R_{cullis}$  = r.m.s. lack of closure/r.m.s. lack of closure für alle Reflexe,

Phasing Power =  $\langle |F_H| \rangle$  / r.m.s. lack of closure (alle Reflexe), ac/c acentric/centric.

#### 4.4 Modellbau und Verfeinerung

Durch die beiden Schweratomdatensätze war eine Phaseninformation bis zu einer Auflösung von 2.4 Å vorhanden. Mit dieser Phaseninformation wurde eine erste Elektronendichtekarte aus dem NAT-Datensatz errechnet. Nach dem *solvent flattening* (unter Berücksichtigung der Strukturfaktoren von 30 Å bis 2.4 Å) war die Qualität der Elektronendichteverteilung hoch genug um den Verlauf der Polypeptidkette und vieler Seitenketten zu erkennen. Außerdem konnten alle relevanten Sekundärstrukturmerkmale zugeordnet werden. Da die Zuckerbindestelle nicht sicher bestimmt werden konnte, wurde eine weitere Messung an einem Kristall durchgeführt, in den zusätzliches GlcNAc *gesoakt* wurde. Die *Soakingdauer* betrug drei Tage, die Konzentration an GlcNAc 10 mM (Datensatz T15A/GlcNAc, siehe Tabelle 5). Das Modell aus dem Datensatz NAT wurde zunächst durch eine *rigid body* Verfeinerung in die Zelle des höher aufgelösten T15A/GlcNAc-Datensatz eingepaßt. In der resultierenden Elektronendichtekarte war die Zuckerbindestelle sehr gut definiert und es konnte das GlcNAc-Modell eingebaut werden. Es folgten weitere Schritte zur Verfeinerung der Struktur, wobei anfänglich auferlegte *restrains* (Engh und Huber, 1991) schrittweise gelockert wurden. Die Verfeinerungsschritte bestanden aus iterativem Anpassen des Modells

an die aktuellen Differenzdichten  $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$  bzw.  $F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$  bis zur Konvergenz der R-Faktoren. Anschließend wurde Wasser in die  $F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$  Differenzelektronendichte gebaut und das so erweiterte Modell erneut bis zur Konvergenz verfeinert. Die Verfeinerungsstatistik ist in Tabelle 8 angegeben. Abbildung 18 zeigt einen *Ramachandran*-plot der finalen Tachylectin 5A Struktur.

<b>T15A/GlcNAc Komplex</b>	
Auflösungsbereich (Å)	15.0-2.0
$R_{\text{cryst}}$ (%)	18.3
$R_{\text{free}}$ (%)	19.8
Proteinatome	1839
Solvensatome	179
mittlerer B-Faktor (Å <sup>2</sup> )	27.95
r.m.s ΔB	0.86
r.m.s Bindungslänge (Å)	0.005
r.m.s. Bindungswinkel (°)	1.40

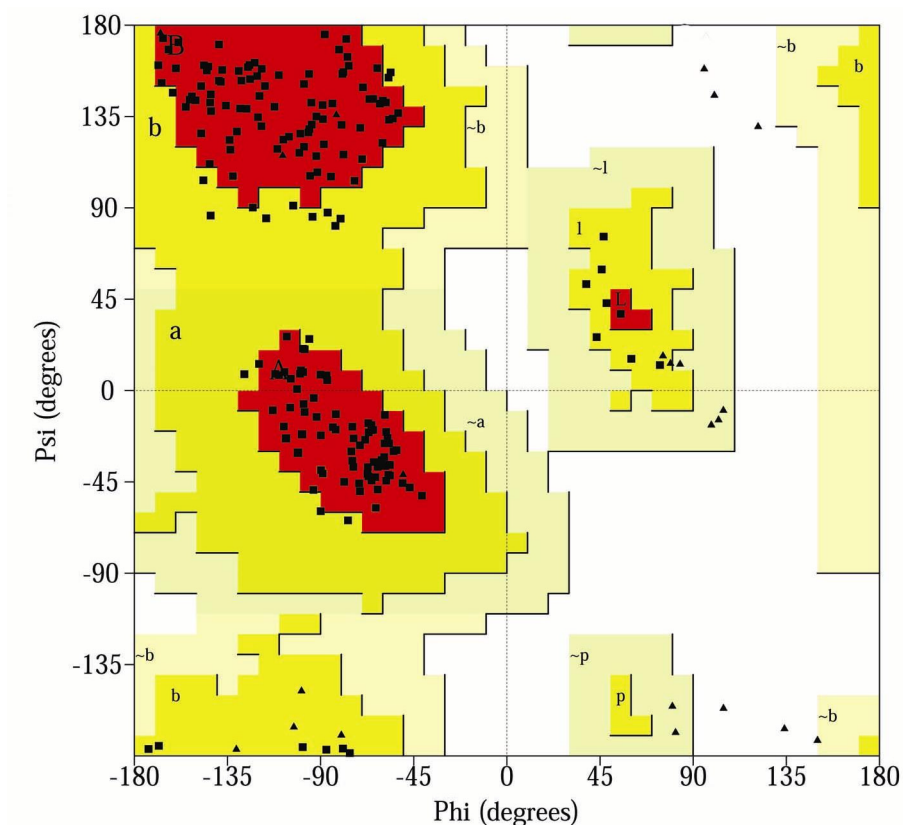
**Tabelle 8:** Verfeinerungsstatistik für Tachylectin 5A.

$$R_{\text{cryst}} = \frac{\sum_{hkl \in W} \left| |F_{\text{obs}}| - k|F_{\text{calc}}| \right|}{\sum_{hkl \in W} |F_{\text{obs}}|}, \text{ W: working set}$$

$$R_{\text{free}} = \frac{\sum_{hkl \in T} \left| |F_{\text{obs}}| - k|F_{\text{calc}}| \right|}{\sum_{hkl \in T} |F_{\text{obs}}|}, \text{ T: test set.}$$

Die Elektronendichte war mit Ausnahme der ersten 44 Aminosäuren für die gesamte Proteinsequenz des Moleküls sehr gut interpretierbar. Durch Sequenzierung konnte belegt werden, daß die nicht *sichtbaren* Aminosäuren physikalisch vorhanden waren. Es ist anzunehmen, daß durch die hohe Mobilität, auch im kristallinen Zustand, dieser Bereich des Moleküls keine Streubeiträge lieferte. Bestätigt wurde diese Vermutung durch den Nachweis, daß diese N-terminale Region nicht durch Disulfidbrücken an einer Dimerenbildung beteiligt ist. Gokundan *et al.* hatten für die Cysteine C6 und C170 vermutet, daß diese an einer

Dimerenbildung durch Disulfidbrücken beteiligt sind (siehe Sequenz Abbildung 13) (Gokudan *et al.*, 1999). Die Struktur des Tachylectin 5A zeigt jedoch eindeutig, daß an Position C170 eine *freies* Cystein vorliegt. Anschließende Bindungsexperimente bestätigten diese Ergebnisse und konnten auch für C6 zeigen, daß dieses Cystein reduziert vorliegt (Shun-ichiro Kawabata, persönliche Mitteilung).



**Abbildung 18:** Ramachandrandiagramm des finalen Tachylectin 5A Modells (Ramachandran und Sasisekharan, 1968). Glycine sind durch Dreiecke, alle anderen Aminosäuren sind durch Quadrate dargestellt.

## 4.5 Strukturbeschreibung

### 4.5.1 Gesamtstruktur

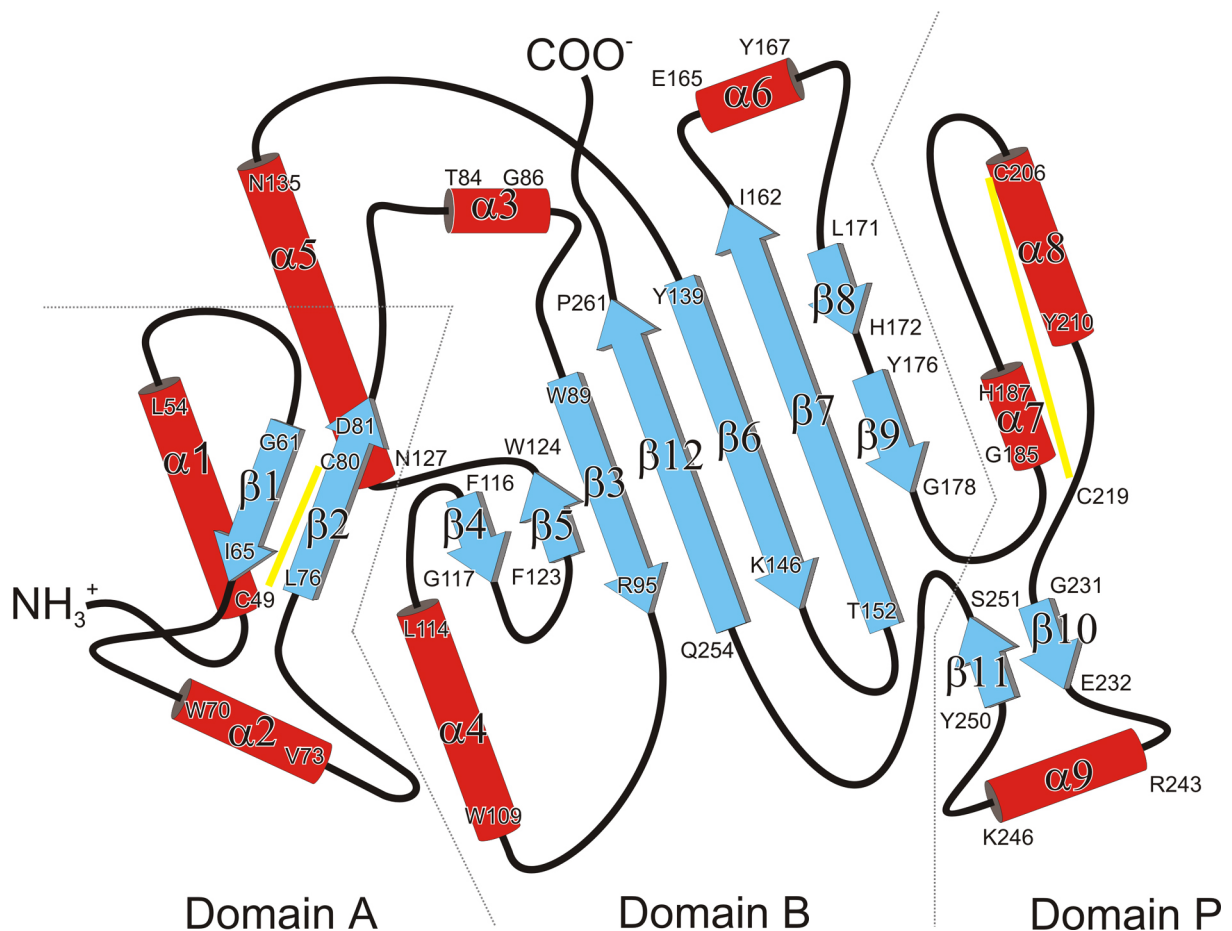
Tachylectin 5A ist ein ellipsoides Molekül mit den Dimensionen 34x36x53 Å<sup>3</sup>. Innerhalb des Moleküls lassen sich drei Domänen unterscheiden (vergleiche Abbildung 19 und Abbildung 20). Um den Vergleich zu Fibrinogen zu erleichtern wurden die Domänen als A-, B- und P-Domäne bezeichnet.

Dominiert wird die Struktur durch die zentrale Domäne B, die von der einen Seite durch die N-terminale Domäne A und von der anderen Seite durch die Domäne P überdeckt wird. Ein auffälliges Merkmal zwischen den Domänen zeigt bereits ein erster Blick. Sowohl in A als auch in B überwiegen Sekundärstrukturmerkmale,  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter. In P hingegen überwiegen *Loop*- und *Turn*-Bereiche. Jedoch ist in dieser Domäne durch die Zucker- und die Kalziumbindestelle die Funktion des Proteins verankert.

Die N-terminale Domäne A (Asp-45 bis Trp-89) umfaßt zwei kurze Helices und ein kleines zweisträngiges  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2). Helix  $\alpha$ 1 ist relativ zu dem Faltblatt diagonal verdreht und durch eine Dischwefelbrücke (Cys-49 und Cys-80) an den Strang  $\beta$ 2 des  $\beta$ -Faltblattes gebunden. Die zweite Helix  $\alpha$ 2 führt den Verlauf der Polypeptidkette von Strang  $\beta$ 1 kommend in Richtung zu Strang  $\beta$ 2.

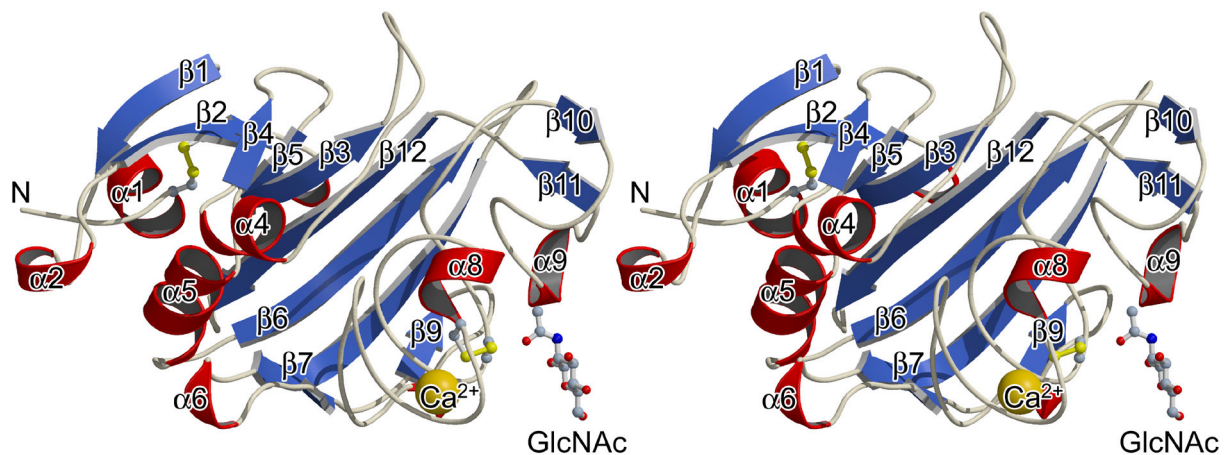
Die zentrale Domäne B (Thr-90 bis Ala-180 und Pro-253 bis Phe-264) besteht hauptsächlich aus einem leicht verdrehten antiparallelen siebensträngigen  $\beta$ -Faltblatt (Strang  $\beta$ 3 bis  $\beta$ 7,  $\beta$ 9 und  $\beta$ 12). Durch dieses Faltblatt ist Domäne A von Domäne P räumlich getrennt. Innerhalb des Faltblattes liegen sich zwei Stränge ( $\beta$ 3 und  $\beta$ 12) gegenüber, die als Verknüpfungspunkt der drei Domänen betrachtet werden können. Durch Strang  $\beta$ 3 führt die Polypeptidkette aus der Domäne A in die Domäne B und durch Strang  $\beta$ 12 gelangt die Polypeptidkette aus Domäne P wieder in Domäne B. Dadurch liegen N- und C-terminus auf der gleichen Seite des Moleküls. Benachbart zu Strang  $\beta$ 3 liegt eine durch Strang  $\beta$ 4 und  $\beta$ 5 gebildete  $\beta$ -Faltblatteinheit. Diese Einheit unterbricht die angrenzende  $\alpha$ -Helix in die Helices  $\alpha$ 4 und  $\alpha$ 5.

Die C-terminale Domäne P (Gly-181 bis Leu-252) liegt über dem  $\beta$ -Faltblatt der zentralen Domäne B. Oberhalb der Zuckerbindetasche liegt ein kleines antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt (Strang  $\beta_{10}$  und  $\beta_{11}$ ). Dieses Faltblatt wird durch einen *Loop* (von Strang  $\beta_{10}$  nach Strang  $\beta_{11}$ ) verbunden, der sich in Richtung der zentralen Domäne B neigt. Durch diesen Verlauf der Polypeptidkette wird eine Spalte innerhalb des Moleküls geschaffen, in der die Zuckerbindestelle liegt. Unterhalb davon, in einem Abstand von 11 Ångström, befindet sich die Kalziumbindestelle. Der Verlauf der Polypeptidkette verhält sich hier wie eine *Superhelix*. In der ersten halben Windung liegt das Kalzium, dann folgt eine kurze Helix ( $\alpha_8$ ). Kurz vor der Zuckerbindestasche nimmt der superhelikale Verlauf ab und die Polypeptidkette neigt sich, ähnlich dem oben beschriebenen Verlauf, in Richtung der zentralen Domäne B. Hierdurch trägt auch dieser Teil zu der Ausbildung der oben beschriebenen Spalte und der Zuckerbindestelle bei.



**Abbildung 19:** Schematische Darstellung der Topologie der gesamten Faltung des Tachylectin 5A. Durch gelbe Balken sind die Disulfidbrücken angegeben. Domäne A umfaßt D45 bis W89, Domäne B umfaßt T90 bis A180 und P253 bis F264 und Domäne P umfaßt G181 bis L252. Die Farben der Sekundärstrukturelemente entsprechen denen in Abbildung 20.





**Abbildung 20:** Stereodarstellung des Tachylectin 5A. Der gebundene Zucker ist als *ball-and-stick* Modell dargestellt. Das Kalziumion ist als goldene Kugel, die Disulfidbrücken sind in gelb ebenfalls als *ball-and-stick* Modell dargestellt.

#### 4.5.2 Kalziumbindestelle

Die Aktivität vieler Lektine hängt von zweiwertigen Metallkationen ab (Drickamer und Taylor, 1993; Rini, 1995; Weis und Drickamer, 1996; Rini und Lobsanov, 1999). In den meisten Fällen ist das Metallkation Kalzium, es sind jedoch auch Lektine bekannt deren Aktivität von Mangan (*Legume Lectin* (Loris *et al.*, 1998)) oder Magnesium (*Xylose Isomerase* (Lavine *et al.*, 1994), *Mannose 6-phosphate receptor* (Roberts *et al.*, 1998)) abhängt.

Für die Funktion des Kalziums sind zwei Rollen bekannt. In *C-type* Lektinen (Weis *et al.*, 1998) wie beispielsweise *Mannose-binding protein* (Weis *et al.*, 1992) ist Kalzium direkt an der Zuckerbindung beteiligt, in Lektinen wie beispielsweise *pea-lectin* (Rini *et al.*, 1993) fungiert Kalzium als *Strukturdeterminante* und ist nicht direkt an der Zuckerbindung beteiligt.

Obwohl in Tachylectin 5A das Kalzium in unmittelbarer Nähe zu der Zuckerbindetasche liegt, ist es nicht an der Koordinierung des Zuckers beteiligt. Es wird auch nicht durch eine Aminosäure bzw. Aminosäureseitenkette der Zuckerbindetasche gebunden. Durch das Kalzium wird jedoch der *Loop* unterhalb der Helix  $\alpha 8$  fixiert. Dies hat indirekt eine Auswirkung auf die Zuckerbindung, da hierdurch die Dischwefelbrücke zwischen Cys-209

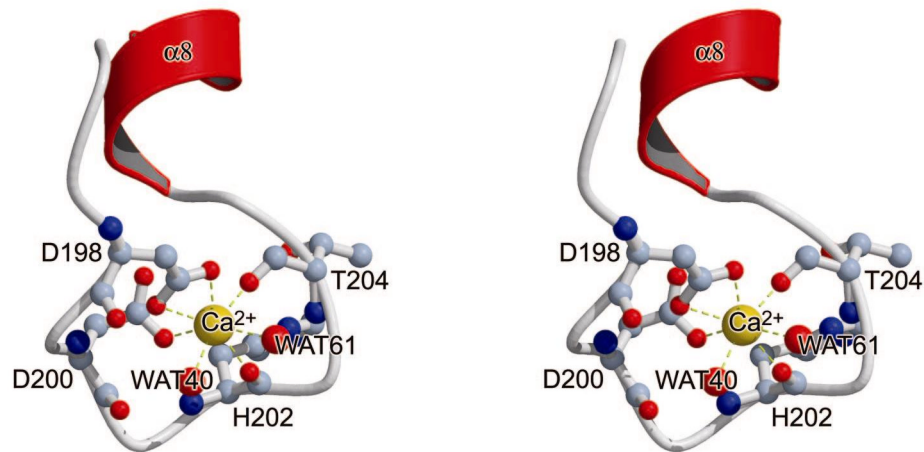
und Cys-219 in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt wird und Cys-219 an der Bindung des GlcNAc beteiligt ist.

Verglichen zu dem EF-Motiv (Helix-Loop-Helix) (Lewit-Bentley und Réty, 2000), einem Strukturmotiv, das sehr häufig bei Kalziumbindungen auftritt stellt die Kalziumbindung des Tachylectin 5A einen eigenen Strukturtyp dar. Es ist zwar C-terminal von der Kalziumbindung eine  $\alpha$ -Helix vorhanden, jedoch fehlt diese N-terminal. Zur Veranschaulichung zeigt Abbildung 21 die Struktur des klassischen EF-Motivs an zwei Beispielen.

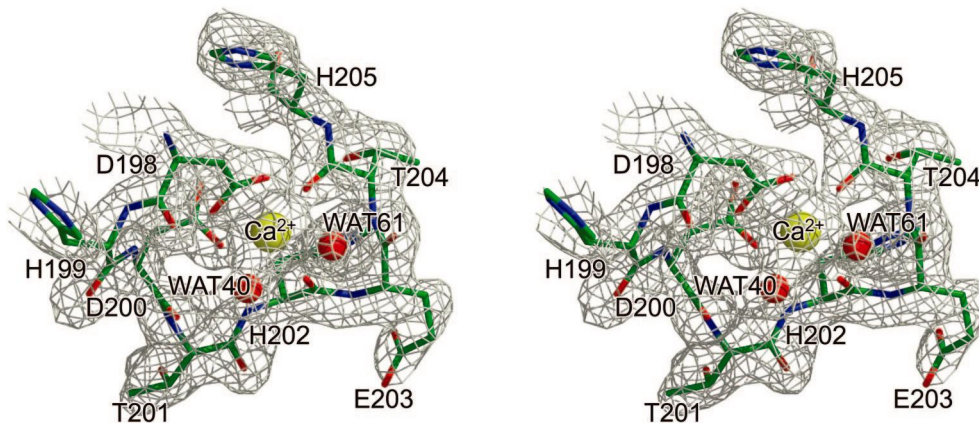


**Abbildung 21:** Beispielhafte Darstellung des EF-Hand Motivs. Auf der linken Seite sind die vier EF-Hände in der Calmodulin-Struktur (PDB-Id.: 1CLL) (Meador *et al.*, 1992), auf der rechten Seite sind die zwei EF-Hände der Parvalbumin-Struktur (PDB-Id.: 1B8R) (Cates *et al.*, 1999) zu sehen.

$\text{Ca}^{2+}$  wird in Tachylectin 5A durch sieben Sauerstoffatome in einer pentagonalen bipyramidalen Anordnung koordiniert. Die Carboxylatsauerstoffatome der Aminosäure Asp-198 bilden mit den Hauptkettensauerstoffatomen der Aminosäuren His-202, Thr-204 und dem Wassermolekül WAT-40 die pentagonale Grundfläche der Bipyramide auf deren Spitzen ein Seitenkettensauerstoffatom der Aminosäure Asp-200 und das Wassermolekül WAT-61 sitzen (Abbildung 22 und Abbildung 23). In der Tabelle zur Abbildung 23 sind die Bindungslängen angegeben. Die mittlere Bindungslänge entspricht mit einem Wert von 2.42 Ångström dem typischen Wert bekannter Kalziumbindungen (Glusker, 1991; McPhalen, 1991).



**Abbildung 22:** Stereodarstellung der Kalziumkoordination. An der Bindung des Kalziums sind nur Aminosäuren des *Loops* D198 bis T204 beteiligt. Bemerkenswert ist auch die Geometrie beider koordinierender Wasser. Sie entspricht der vicinalen Anordnung der 3- und 4-OH Gruppen von Zuckern, wie z.B. D-mannose, *N*-acetyl-D-glucosamin und L-fucose. Dies legt die Vermutung nahe, daß *in vivo* das Kalzium auch unmittelbar an der Bindung ausgedehnter Zelloberflächenzucker beteiligt sein könnte.



**Abbildung 23:**  $2F_o - F_c$ -Elektronendichte der Kalziumkoordination. Die Auflösung beträgt 2.0 Å, die Konturierung erfolgte bei einer Standardabweichung von  $1\sigma$ . Die Bindungslängen sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

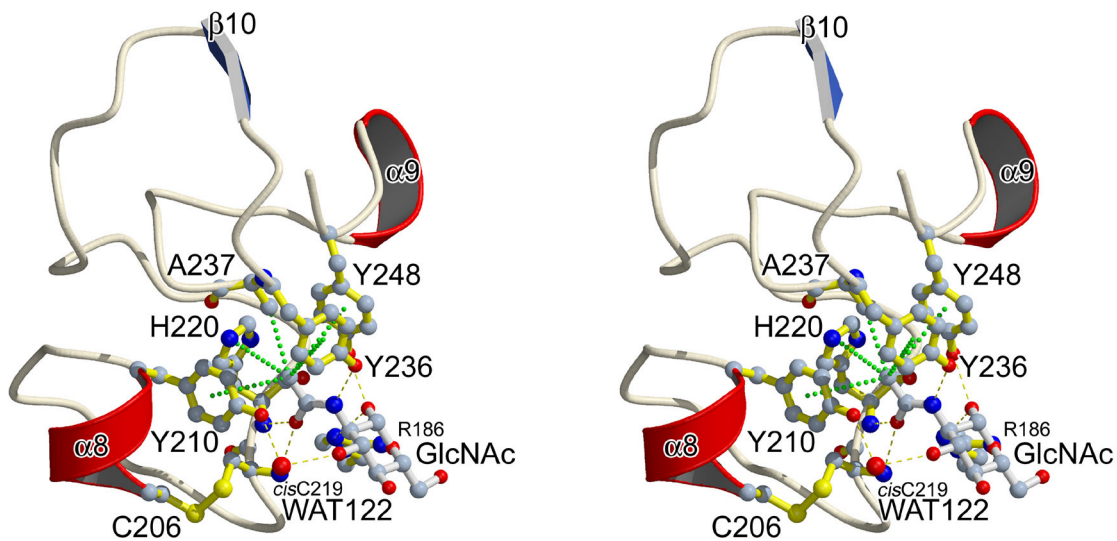
Koordinierende Aminosäuren	Bindungsabstand (Å)
Asp 198 OD1	2.57
Asp 198 OD2	2.30
Asp 200 OD1	2.37
His 202 O	2.48
Thr 204 O	2.31
WAT 40	2.30
WAT 61	2.60
mittlere Bindungslänge	2.42

### 4.5.3 Zuckerbindestelle

Tachylectin 5A besitzt die außergewöhnliche Eigenschaft nicht eine bestimmte Zuckereinheit sondern eine funktionelle Gruppe, die typischerweise Bestandteil von Oberflächenzuckern ist, zu binden. Eine ähnliche Spezifität für Acetylgruppen tragende Zucker konnte bisher nur für L-ficolin/P35 nachgewiesen werden (Matsushita *et al.*, 1996; Le *et al.*, 1998). Ficoline sind Proteine der angeborenen Immunität des Menschen, deren Rolle innerhalb der Komplementaktivierung Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Untersuchungen ist (Matsushita *et al.*, 2000; Gadjeva *et al.*, 2001).

Tachylectin 5A stellt hinsichtlich der Acetylgruppenspezifität das erste Lektin aus dieser Gruppe dar, das röntgenkristallographisch untersucht wurde.

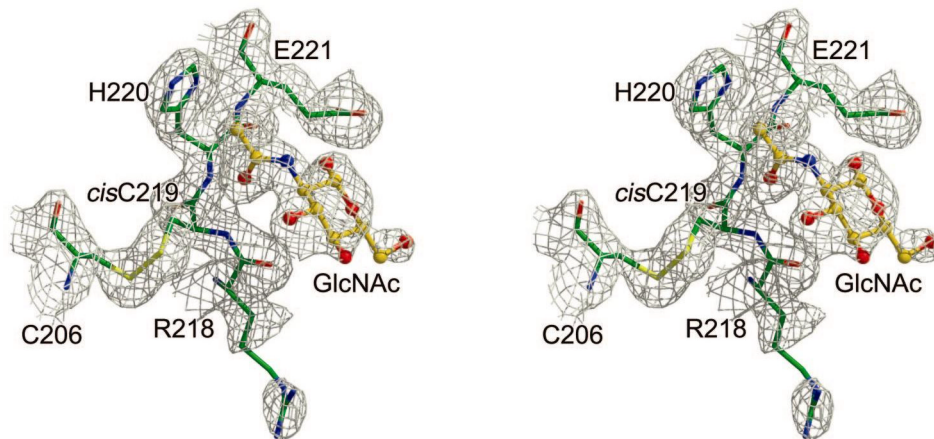
Die Acetylgruppenspezifität der Bindungstasche wird durch die Anordnung von vier Seitenkettenaromaten erreicht (siehe Abbildung 24): Die Seitenketten der Aminosäuren Tyr-210, Tyr-236, Tyr-248 und His-220 bilden einen Trichter, an dessen verjüngtem Ende die Seitenkette der Aminosäure Alanin-237 sitzt. Diese Anordnung verleiht der Bindetasche im Inneren einen hydrophoben Charakter. Am oberen Ende hingegen ist die Bindetasche polar. Dies entsteht durch die Hydroxylgruppen der Tyrosine (Tyr-210, Tyr-236 und Tyr-248) und den Hauptkettenstickstoffatomen der angrenzenden Polypeptidkette (Cys-219 bis His-220). Die Methylgruppe der Acetamidfunktion des Zuckers liegt im Inneren der hydrophoben Tasche, regelrecht in einer Linie mit der Methylgruppe des Ala-237. In dieser geometrischen Anordnung liegt das Methylkohlenstoffatom des Zuckers so über den Aromatenringen, daß die CH-Bindungen mit dem  $\pi$ -Elektronensystem in Wechselwirkung treten. Diese Form der bindenden CH/ $\pi$  Wechselwirkungen wurde bereits an verschiedenen Proteinen untersucht (Umezawa und Nishio, 1998a; Umezawa und Nishio, 1998b). Die Abstände zwischen den CH-Atomen und den  $sp^2$  Kohlenstoffatomen der aromatischen Systeme müssen in einem Bereich von 2.5 bis 3.1 Å liegen um CH/ $\pi$ -Wechselwirkungen eingehen zu können (Takahashi *et al.*, 2000). Dies trifft für die Abstände zwischen der CH-Bindung der Methylgruppe in GlcNAc und Tyr-248 (2.8 Å), Tyr-236 (3.0 Å) und Tyr-210 (3.1 Å) zu.



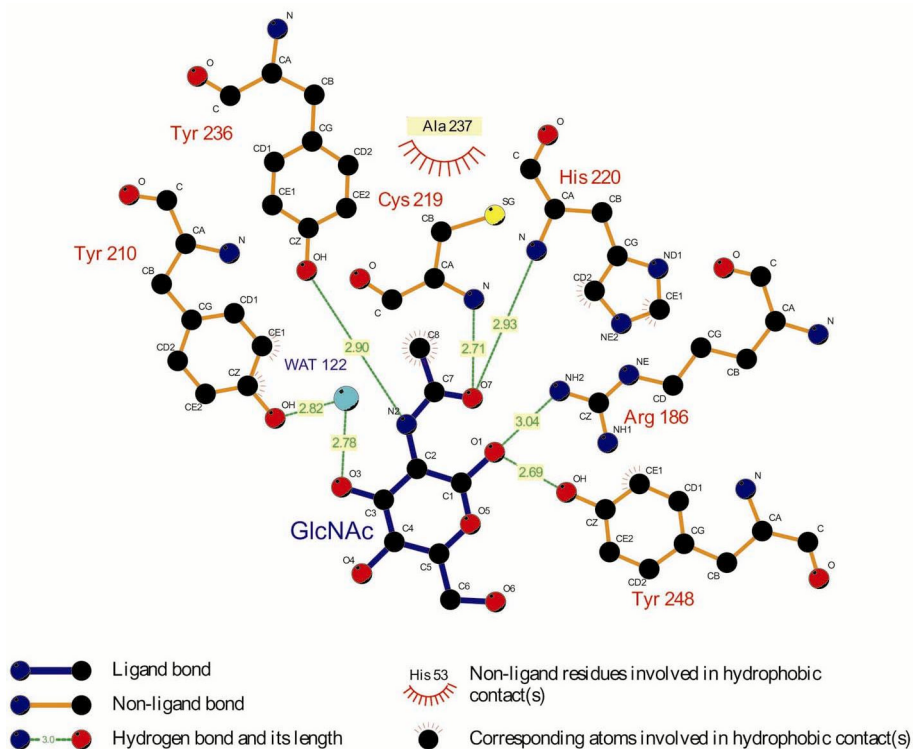
**Abbildung 24:** Stereodarstellung der Zuckerbindung. Durch grün gepunktete Linien sind die hydrophob/hydrophob-Wechselwirkungen im Inneren der Bindetasche mit der Methylgruppe des Zuckers wiedergegeben. Gelb gestrichelte Linien geben alle gerichteten Wechselwirkungen wieder. Helix  $\alpha 8$  entspricht der Helix, die C-terminal der Kalziumbindestelle folgt (siehe Abbildung 22). Die *cis*-Peptidbindung ist nur durch den wechselwirkenden Hauptkettenstickstoff angedeutet. In Abbildung 25 ist die *cis*-Peptidbindung detailliert dargestellt. Abbildung 26 enthält eine Übersicht über die Bindungslängen.

Eine weitere Besonderheit der Bindetasche liegt in einer *cis*-Peptidbindung zwischen Arg-218 und Cys-219 (siehe Abbildung 25). Durch diese *cis*-Peptidbindung macht der Verlauf der Polypeptidkette eine starke Biegung und ermöglicht eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Hauptkettenstickstoffatom (Cys-219) und dem Carbonylsauerstoffatom der Acetamidgruppe. Diese Wasserstoffbrückenbindung ist mit einer Länge von 2.7 Å die kürzeste und damit möglicherweise stärkste, die innerhalb der Bindetasche ausgebildet wird. Es wird auf diese Weise die energetisch ungünstige Ausbildung einer *cis*-Peptidbindung kompensiert (Pal und Chakrabarti, 1999; Weiss *et al.*, 1998a; Jabs *et al.*, 1999). Das Carbonylsauerstoffatom der Acetamidgruppe bildet zusätzlich eine schwache Wasserstoffbrückenbindung mit dem Hauptkettenstickstoffatom der Aminosäure His-220 (3.4 Å). Weitere polare Wechselwirkungen kommen hauptsächlich durch die Hydroxylgruppen der Tyrosine zustande. Die Hydroxylgruppe des Tyr-210 bildet eine durch ein Wassermolekül (WAT 122) vermittelte Wasserstoffbrückenbindung zu der C3 OH-Gruppe des Zuckers (2.8 Å), die des Tyr-236 bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem Stickstoffatom der Acetamidgruppe (2.9 Å) und die des Tyr-248 bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zu der

C5 OH-Gruppe des Zuckers (2.7 Å). Die C5 OH-Gruppe bildet zusätzlich eine schwache Wasserstoffbrücke mit dem Guanidiniumstickstoffatom der Aminosäure Arg-186 (3.0 Å). Abbildung 26 enthält eine Übersicht über die Bindungslängen.



**Abbildung 25:**  $2F_o-F_c$ -Elektronendichte des gebundenen Zuckers und eines Teils der Zuckerbindetasche im Bereich der *cis*-Peptidbindung. Die Auflösung beträgt 2.0 Å, die Konturierung erfolgte bei einer Standardabweichung von  $1\sigma$ . Links unterhalb des Zuckers ist die *cis*-Peptidbindung zwischen Arg-218 und Cys-219 zu sehen. Bemerkenswert ist auch die sehr gut definierte Elektronendichte um die Acetamidgruppe des Zuckers.

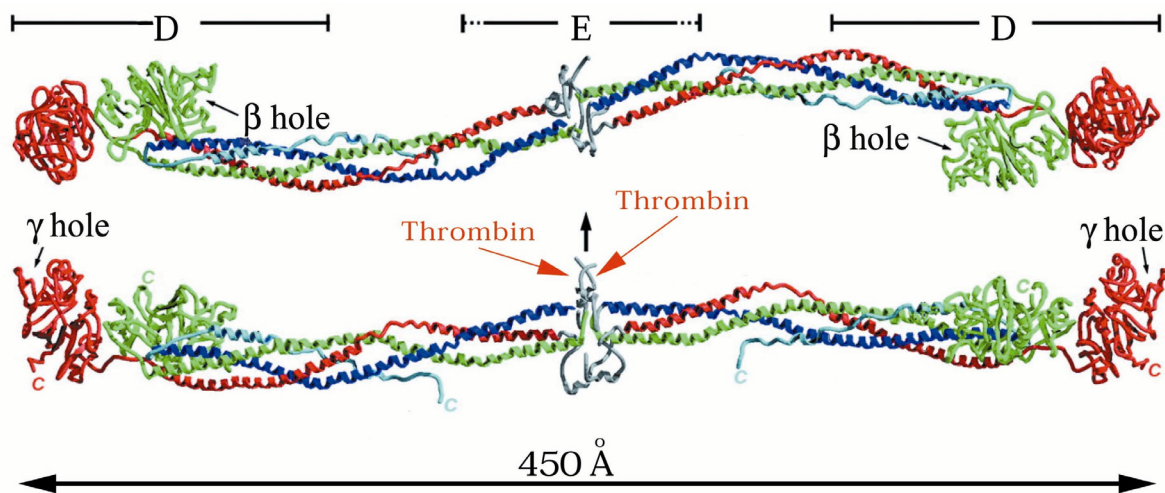


**Abbildung 26:** Übersicht über die Bindungslängen der Zuckerbindung.

## 4.6 Vergleich zu Fibrinogen

### 4.6.1 Übersicht Fibrinogen

Die proteolytische Umwandlung des Fibrinogens in unlösliches Fibrin ist der Schlüsselschritt innerhalb der Blutgerinnungskaskade der Säugetiere. Fibrinogen ist ein Glykoprotein mit einer molekularen Masse von 340 kDa. Es ist aus drei unterschiedlichen Polypeptiketten in einer  $(A\alpha B\beta\gamma)_2$ -Stöchiometrie aufgebaut (Doolittle, 1984; Doolittle *et al.*, 1996) (siehe Abbildung 27). Fibrinogen spielt eine zentrale Rolle bei der Bildung von Blutgerinnseln und Zelladhäsion (Doolittle, 1984; Herrick *et al.*, 1999; Ugarova und Yakubenko, 2001; Bennet, 2001).



**Abbildung 27:** Darstellung der gesamten Fibrinogenstruktur. Die untere Abbildung ist relativ zu der oberen um 90° gekippt. Rot sind die  $\gamma$ -, grün die  $B\beta$ - und blau die  $A\alpha$ -Ketten dargestellt. In der mittleren Domäne E sind grau die N-termini der  $A\alpha$ -Ketten zu sehen, aus denen durch die proteolytische Spaltung durch Thrombin die *A-knobs* entstehen. In den Domänen D liegen die globulären C-terminalen Domänen der  $B\beta$  und  $\gamma$ -Kette mit den entsprechenden Peptidbindetaschen. Die dargestellte Struktur beruht auf niedrig aufgelösten Daten ( $\sim 4.5\text{\AA}$ ) und wurde modifiziert aus Brown *et al.* übernommen (PDB-Id.: 1DEQ) (Brown *et al.*, 2000).

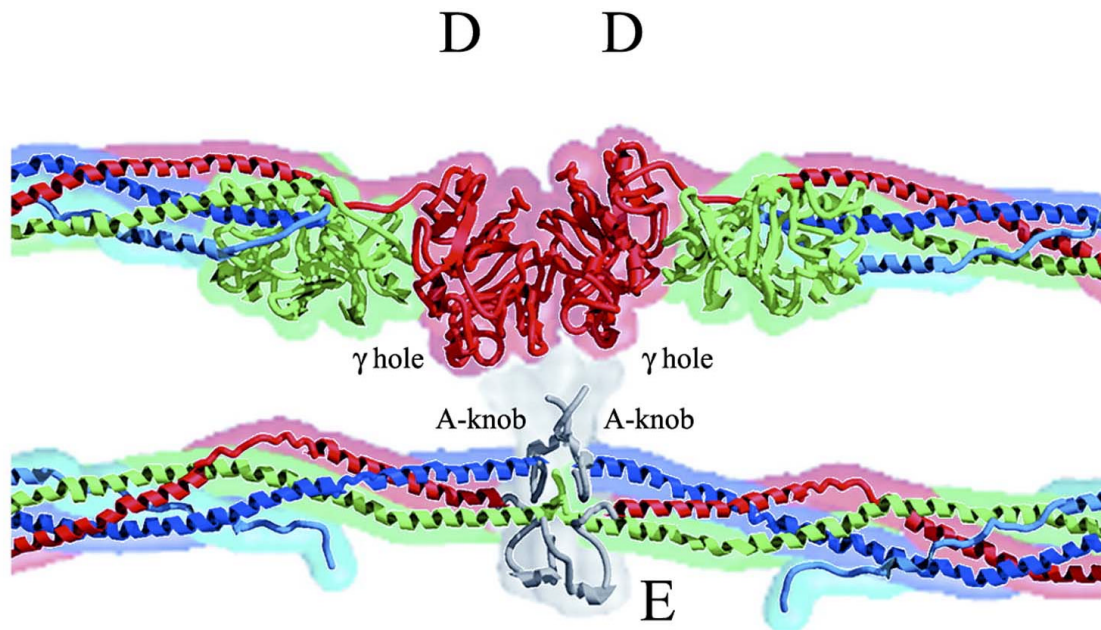
Innerhalb der Gesamtfaltung lassen sich drei Domänen unterscheiden. An den seitlichen Enden des langgestreckten Moleküls sitzen die beiden Domänen D, die über die zentrale Domäne E miteinander verbunden sind. Die Domäne D besitzt eine molekulare Masse von 67 kDa und ist hauptsächlich aus den C-termini der  $B\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten aufgebaut. Domäne E

besteht aus den N-termini aller drei Ketten und besitzt eine molekulare Masse von 33 kDa. Zwischen Domäne E und D liegt ein *coiled coil* Bereich, dessen Existenz durch elektronenmikroskopische Aufnahmen vorhergesagt wurde (Rao *et al.*, 1991).

Thrombin schneidet die N-termini der A $\alpha$ - und B $\beta$ - Ketten nach den Aminosäureresten  $\alpha$ -Arg16 und  $\beta$ -Arg14 (primär die A $\alpha$ -Kette, mit einer geringeren Rate die B $\beta$ -Kette). Dadurch werden die Fibrinopeptide A und B freigesetzt. Die neu entstandenen N-termini werden als *A-* und *B-knobs* bezeichnet (*A-knob*: Gly-Pro-Arg; *B-knob*: Gly-His-Arg). Bemerkenswert ist die hohe Selektivität des Thrombins: Aus den insgesamt 181 Arg/Lys-Xxx Peptidbindungen die in Fibrinogen vorhanden sind werden hoch selektiv nur zwei geschnitten (Blombäck *et al.*, 1967). Durch Röntgenstrukturanalyse konnten die Thrombin-Fibrinogenpeptid A Kontakte mit der unmittelbaren Umgebung des aktiven Zentrums von Thrombin aufgeklärt werden (Stubbs *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1992).

Im nächsten Schritt kommt es zur Bildung des Blutgerinnsels: Die *A-knobs* eines Fibrinmonomers binden spontan in die  $\gamma$ -holes (*polymerization pocket*) eines anderen Fibrinmonomers. Es bilden sich *Protofibrillen*, Fibrinoligomere, die zwei Fibrineinheiten dick und etwa 15 Fibrineinheiten lang sind (siehe Abbildung 28) (Bale *et al.*, 1982; Mosseson *et al.*, 1995). An den Kontaktstellen zweier D Domänen benachbarter Fibrineinheiten werden die  $\gamma$ -Ketten durch eine Transglutaminase (auch als Faktor XIIIa oder Fibrinolygase bezeichnet) kovalent quervernetzt (Greenberg *et al.*, 1991; Takahashi *et al.*, 1986). Abschließend kommt es zu der lateralen Aggregation der Protofibrillen. Über diesen Mechanismus ist wenig bekannt, es wird jedoch angenommen, daß hier die *B-knobs* und die  $\beta$ -holes eine maßgebliche Rolle spielen (Yang *et al.*, 2000b).





**Abbildung 28:** Modell der Prototypfibrillenbildung am Beispiel eines *DDE-Clusters*. Oben sind zwei Fibrinogenmoleküle gezeigt, die durch die Transglutaminase Faktor XIIIa via  $\gamma$  Gln-398 und  $\gamma'$  Lys-406 kovalent verknüpft sind. Unten ist ein Fibrinmolekül zu sehen, das durch die beiden *A-knobs* (Sequenz: GPR) in die Polymerisationstaschen ( *$\gamma$ -hole*) bindet (Brown *et al.*, 2000). Die Farben der Fibrinogen-/Fibrin-Ketten entsprechen denen in Abbildung 27.

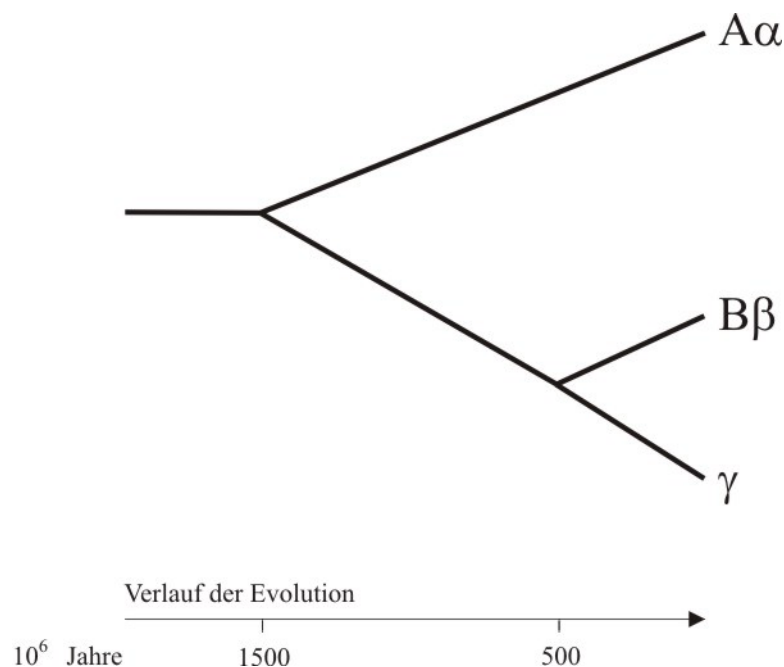
Röntgenkristallographisch konnten bisher die Strukturen für Fragment D, Doppel-D ( $D_2$ ) und E5 bestimmt werden (Everse *et al.*, 1998; Spraggon *et al.*, 1997; Madrazo *et al.*, 2001). Es konnte außerdem die Struktur des C-terminalen Bereichs der  $\gamma$ -Kette ( $\gamma$ C) gelöst werden, wodurch man erstmals einen Einblick in den Polymerisationsprozeß des Fibrins auf atomarer Ebene erhielt (Yee *et al.*, 1997; Côté *et al.*, 1997; Pratt *et al.*, 1997). Mittlerweile konnten auch erste Erfolge erzielt werden, die gesamte Struktur des Fibrinogens zu lösen. In zwei kürzlich publizierten Arbeiten werden niedrig aufgelöste Strukturen ( $\sim 4.5$  Å/ $\sim 5.5$  Å) des gesamten Fibrinogens vorgestellt (Brown *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000a).

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der  $A\alpha$ -,  $B\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten zeigt eine hohe Homologie zwischen den drei Ketten. Dies hat zu der Vermutung Anlaß gegeben, daß alle drei Polypeptide aus einer gemeinsamen evolutionären Vorstufe hervorgegangen sein müssen (siehe Tabelle 9) (Doolittle, 1983; Henschen *et al.*, 1983).

	A $\alpha$ -Kette	B $\beta$ -Kette
B $\beta$ -Kette	18%	
$\gamma$ -Kette	17%	32%

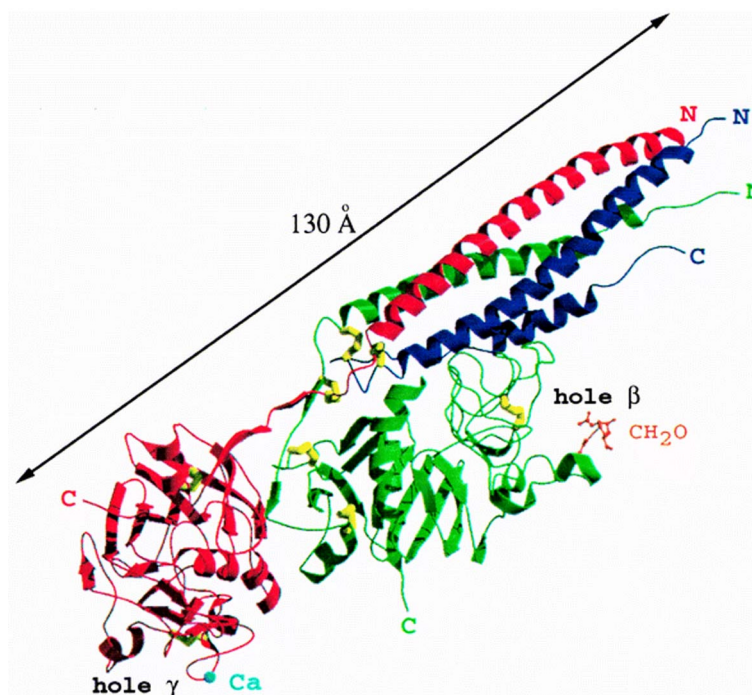
**Tabelle 9:** Homologie der  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  Ketten des menschlichen Fibrinogen (Doolittle, 1983)

Der Sequenzvergleich zeigt auch, daß die A $\alpha$ -Kette die geringste Homologie, relativ zu den anderen Beiden, besitzt. Anhand dieser Daten und dem Vergleich der Aminosäuresequenz des Fibrinogens unterschiedlicher Lebewesen mit der des Menschen hat man eine evolutionäres Szenario entwickelt, demzufolge vor etwa 1500 Millionen Jahren ein Urfibrinogen existierte, dessen drei Polypeptidketten zueinander identisch waren (Doolittle, 1983; Henschen *et al.*, 1983). Es kam dann durch Genduplikation zu der Abzweigung der A $\alpha$ -Kette und vor etwa 500 Millionen Jahren zu der Abzweigung der B $\beta$ -Kette (siehe Abbildung 29). Belegt wurde diese These auch durch die Entdeckung eines fibrinogenartigen Proteins in einem Echinoderm, der Seegurke *Parastichopus parvimensis* (Xu und Doolittle, 1990).



**Abbildung 29:** Modell der evolutionären Entwicklung der einzelnen Fibrinogenketten (Henschen *et al.*, 1983).

Die Strukturanalyse des Fragments D konnte die Ähnlichkeit zwischen den drei Ketten erstmals auf atomarer Ebene klären. Interessanterweise ist die Faltung der B $\beta$ -Kette zu der Faltung der  $\gamma$ -Kette identisch (Spraggon *et al.*, 1997). In beiden Ketten ist zudem durch die *polymerization pockets* in den C-terminalen Domänen die gleiche Funktionalität verankert. Die Faltung der A $\alpha$ -Kette ist dazu völlig verschieden: Es fehlt die zu den B $\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten entsprechende C-terminale Domäne. Statt dessen ist die A $\alpha$ -Kette so gefaltet, daß nicht nur der N-terminale sondern auch der C-terminale Bereich Teil der *coiled coil* Region ist. Sollte die These eines gemeinsamen evolutionären Vorläufers richtig sein, muß folglich die C-terminale Domäne der A $\alpha$ -Kette im Laufe der Evolution verschwunden sein.



**Abbildung 30:** Struktur des Fragment D des Fibrinogens (Spraggon *et al.*, 1997). Durch diese hochaufgelöste Struktur (2.9 Å) konnte erstmals die Homologie zwischen der B $\beta$ - und der  $\gamma$ -Kette gezeigt werden. Es war außerdem die Besonderheit der A $\alpha$ -Kette entdeckt worden, über keine globuläre C-terminale Domäne zu verfügen. Die Farben der Fibrinogen-/Fibrin-Ketten entsprechen denen in Abbildung 27. PDB-Id.: 1FZA.

Interessanterweise wurde jedoch 1994 durch Fu (Fu und Grieninger, 1994) ein Fibrinogen (Fib<sub>420</sub>, Masse 420 kDa) beschrieben, dessen A $\alpha$ -Kette (bezeichnet als  $\alpha_E = \alpha$  extended chain) eine Masse besitzt die um 50% größer ist als die des gewöhnlichen Fibrinogens. Diese Form des Fibrinogens stellt keine pathogene Veränderung dar, sondern ist mit einem natürlichen Anteil von 2% bezüglich der Gesamtmenge an Fibrinogen im humanen Blutplasma vorhanden. Durch diese Form des Fibrinogens konnte die *evolutionäre Entwicklungsthe*

bestätigt werden. Spraggon *et al.* konnten durch die Strukturanalyse zeigen, daß die C-terminale Domäne der  $\alpha_E$ -Kette exakt die selbe Faltung einnimmt wie  $\beta C$  und  $\gamma C$  (Spraggon *et al.*, 1998). Die Kalziumbindungsstelle und die Polymerisationstasche sind konserviert, obwohl die  $\alpha_E C$ -Polymerisationstasche keine *A-* oder *B-knobs* entsprechende Peptide binden kann (Grienninger, 2001). Durch diese Ergebnisse wurden auch die Vorhersagen Doolittles *et al.* bekräftigt, daß Lektine potentiell als evolutionäre Vorläufer für Fibrinogen in Frage kommen (Doolittle *et al.*, 1997). Die physiologische Funktion des Fib<sub>420</sub> ist noch nicht geklärt (Grienninger, 2001). Der Vergleich mit einem Sialinsäurederivat-bindenden Lektin aus der Nacktschnecke *Limax flavus* (Knibbs *et al.*, 1993) zeigt jedoch überraschende Parallelen hinsichtlich der Bindetaschen, was darauf hindeutet, daß Fib<sub>420</sub> eine lektinähnliche Aktivität besitzt. Dies könnte wiederum ein Hinweis dafür sein, daß Fib<sub>420</sub> als eine Art *Immunofibrinogen* eine Funktion in der Immunantwort während der Blutgerinnung/Wundheilung besitzt. Es wäre denkbar daß Fib<sub>420</sub> noch über funktionelle Eigenschaften verfügt, die von dem evolutionären Vorläuferprotein *abstammen*.

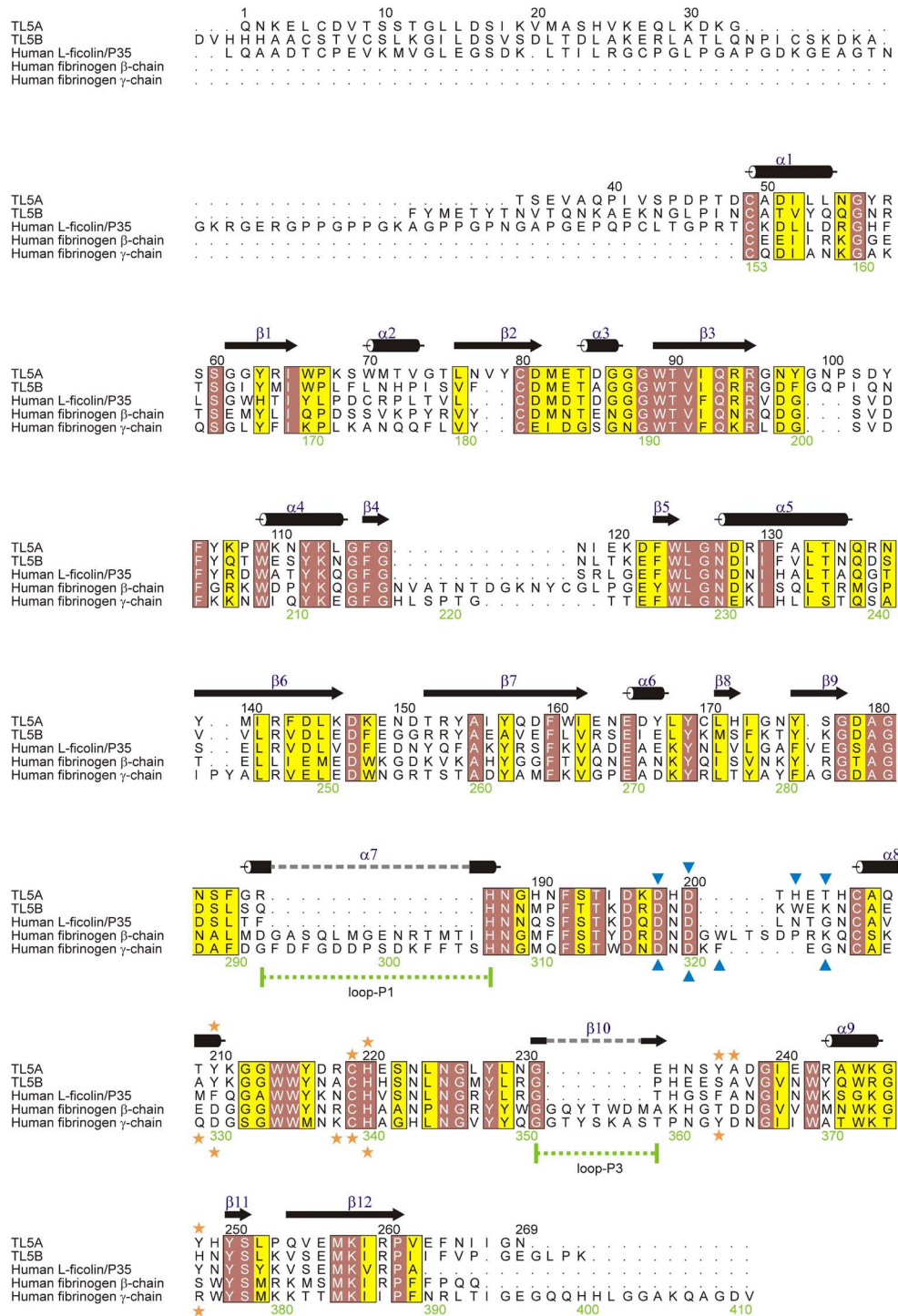
#### 4.6.2 Strukturvergleich Fibrinogen/Tachylectin 5A

Eine Sequenzhomologiesuche deckte die überzeugende Ähnlichkeit zwischen den Tachylectinen 5A/B und dem Fibrinogen bzw. fibrinogenverwandten Proteinen auf (Gokudan *et al.*, 1999) (siehe Tabelle 10 und Abbildung 31).

Besonders auffällig ist, daß die Homologie mit dem evolutionären Alter des Lebewesens steigt. Zwischen TL-5A und den  $\beta$ -/ $\gamma$ -Fibrinogenketten des Neunauges ist sie beispielsweise höher als die zu den  $\beta$ -/ $\gamma$ -Fibrinogenketten des Menschen. Ein weiteres wichtiges Resultat ist die hohe Sequenzidentität zwischen den Tachylectinen 5A/5B und den Ficolinen, Lektine des angeborenen Immunsystems in Vertebraten (Matsushita und Fujita, 2001).

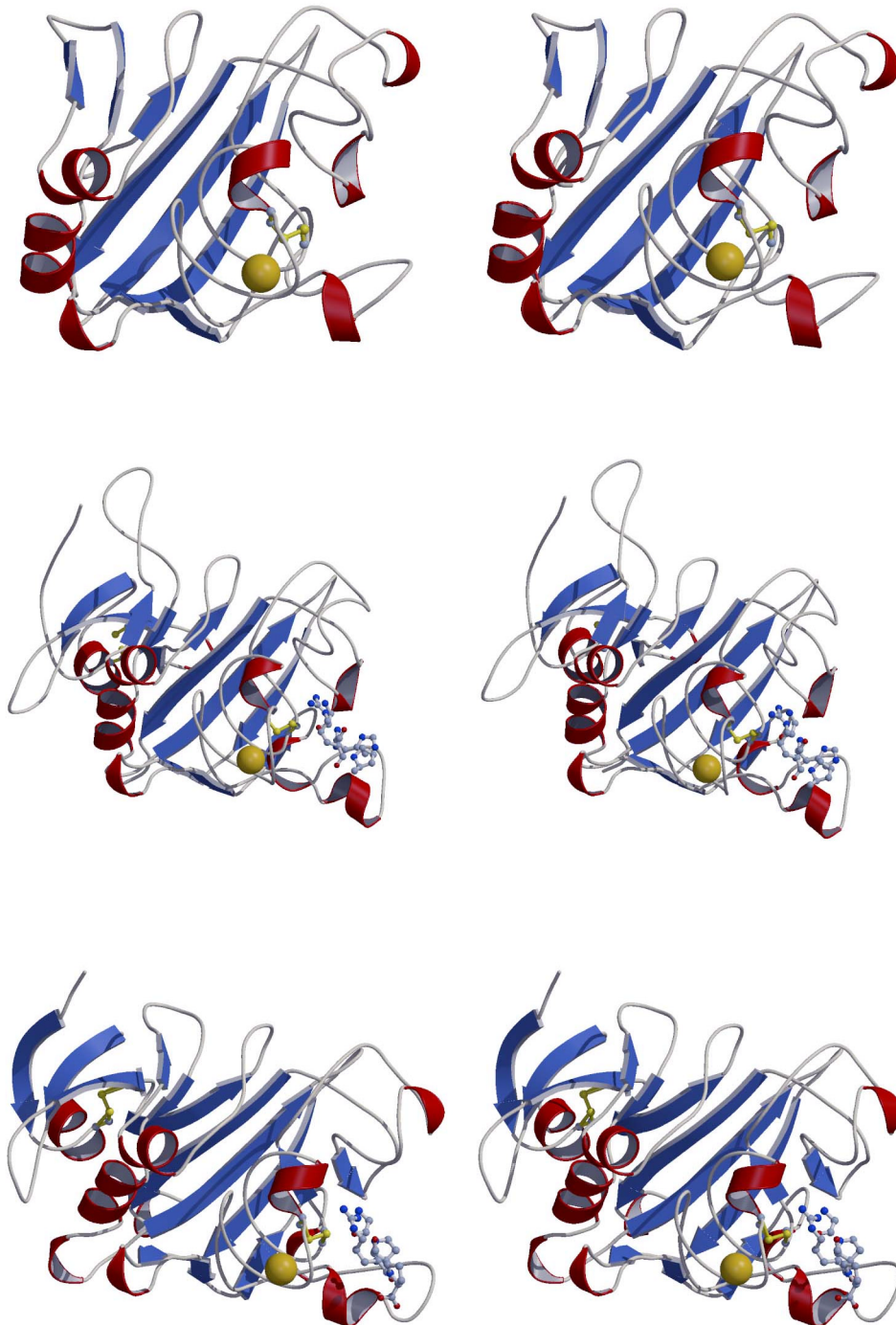
Protein	Identität (%)	
	TL-5A	TL-5B
<b>Fibrinogen <math>\alpha</math>-Kette</b>		
Mensch	17.2	13.7
<b>Fibrinogen <math>\beta</math>-Kette</b>		
Mensch	38.9	38.9
Ratte	37.3	38.9
Rind	36.9	39.3
Huhn	38.9	39.2
Neunauge	40.1	38.2
<b>Fibrinogen <math>\gamma</math>-Kette</b>		
Mensch	36.7	38.3
Ratte	34.6	34.0
Rind	35.4	37.1
Neunauge	38.3	39.3
<b>Ficolin</b>		
Human M	47.7	50.6
Human L	45.6	49.2
Hakata antigen	37.2	41.0
<b>Tachylectin 5A</b>		50.4
<b>Tachylectin 5B</b>	50.4	

**Tabelle 10:** Sequenzidentität zwischen Tachylectinen 5A/B und Fibrinogen/fibrinogenähnlichen Proteinen. Die prozentuale Identität bezieht sich auf einen normalisierten *alignment score* (Gokudan *et al.*, 1999).



**Abbildung 31:** Sequenzüberlagerung der Tachylectine 5A/B, des L-Ficolin/P35 und der Fibrinogen  $\beta$ C- und  $\gamma$ C-Kette. Rot sind identische Aminosäuren unterlegt, gelb ähnliche. Für TL-5A sind die Sekundärstrukturelemente in schwarz über der Sequenz dargestellt. Blaue Dreiecke kennzeichnen sowohl für TL-5A als auch für  $\gamma$ C Aminosäuren, die an der Kalziumbindung beteiligt sind. Durch orange Sterne sind Aminosäuren gekennzeichnet, die in TL-5A an der Zuckerbindung bzw. in  $\gamma$ C an der *Knob*-Bindung beteiligt sind.

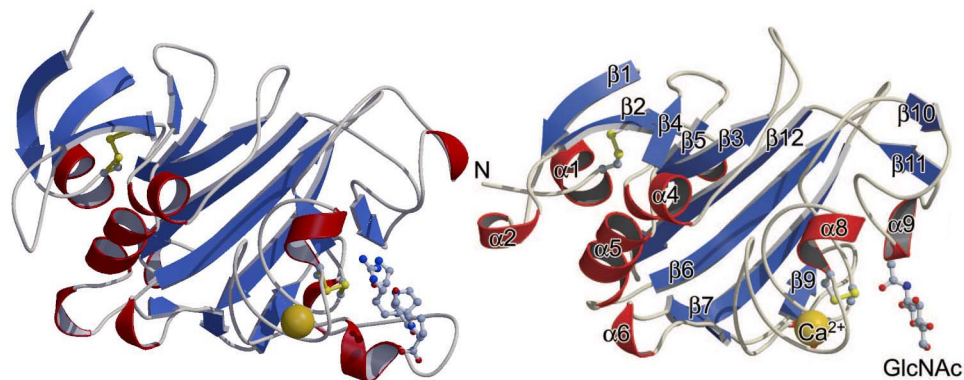
Der Strukturvergleich zwischen Tachylectin 5A und den C-terminalen Domänen der Fibrinogenketten ( $\alpha_{\text{Ext}}\text{C}$ ,  $\beta\text{C}$  und  $\gamma\text{C}$ ) beweist die evolutionäre Verwandtschaft zwischen diesen Proteinen. In Abbildung 32 ist zunächst die strukturelle Homologie zwischen den C-terminalen Domänen der Fibrinogenketten dargestellt.



**Abbildung 32:** Gegenüberstellung der einzelnen C-terminalen Domänen des Fibrinogens. Oben ist  $\alpha_{\text{EXT}}\text{C}$ , in der Mitte  $\beta\text{C}$  mit dem *B-knob* entsprechenden Modellpeptid GHR und unten  $\gamma\text{C}$  mit dem *A-knob* entsprechenden Modellpeptid GPR zu sehen. PDB-Id.: 1FZD, 1FZA und 2FIB.  $\beta\text{C}$ -Koordinaten wurden dem D-Fragment entnommen.

Die Faltung aller drei Proteine ist nahezu identisch. Es sind zudem in allen drei Domänen die Kalziumbindestellen und die Bindetaschen konserviert. Die einzigen Unterschiede bestehen in den Spezifitäten der Bindetaschen. Für  $\alpha C_{Ext}$  ist bisher sowohl Funktion als auch Spezifität der Bindetasche unklar. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, daß weder *A-knob* (Gly-Pro-Arg) noch *B-knob* (Gly-His-Arg) entsprechende Modellpeptide gebunden werden. Wie bereits erwähnt macht der Vergleich mit dem Sialinsäurederivat-bindenden Lektin eine lektinartige Spezifität wahrscheinlich (Knibbs *et al.*, 1993; Spraggon *et al.*, 1998). Diese Hypothese konnte bisher durch experimentelle Daten nicht bestätigt werden. Die Polymerisationstaschen der  $\beta C$  und  $\gamma C$  Domänen sind *Proteinbindetaschen*. Sie unterscheiden sich darin, daß sie hochselektiv entsprechende *Knobs* binden.

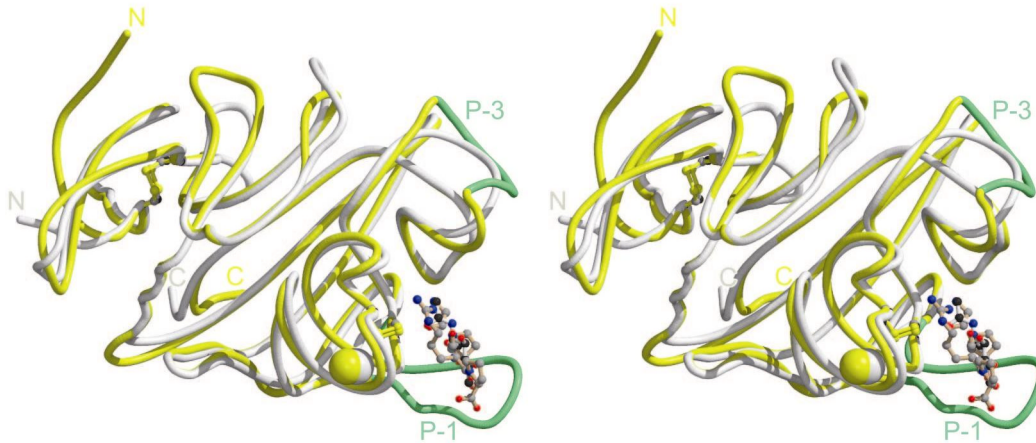
Im folgenden wird die Tachylectinstruktur mit der  $\gamma C$ -Struktur verglichen. Diese Wahl wurde deshalb getroffen weil in der  $\gamma C$  Domäne die *primary fibrin polymerization pocket* sitzt. Zum anderen ist  $\gamma C$  durch hochaufgelöste röntgenkristallographische Arbeiten am besten charakterisiert (Côté *et al.*, 1997; Pratt *et al.*, 1997; Yee *et al.*, 1997). In Abbildung 33 sind beide Strukturen gegenübergestellt.



**Abbildung 33:** Gegenüberstellung der  $\gamma C$ -Struktur (links) und der Tachylectin 5A-Struktur (rechts).

Die Faltung der Polypeptidkette ist in beiden Strukturen nahezu gleichartig. Hinzu kommt, daß sowohl die Kalziumbindestellen als auch die Zucker-/Peptid-Bindetaschen an äquivalenten Positionen liegen. Durch die Überlagerung beider Strukturen in Abbildung 34 wird die nahezu identische Faltung beider Proteine verdeutlicht. Die mittlere Abweichung (r.m.s.d.) beider Strukturen bezüglich der  $C_{\alpha}$ -Atome beträgt 1.09 Å.





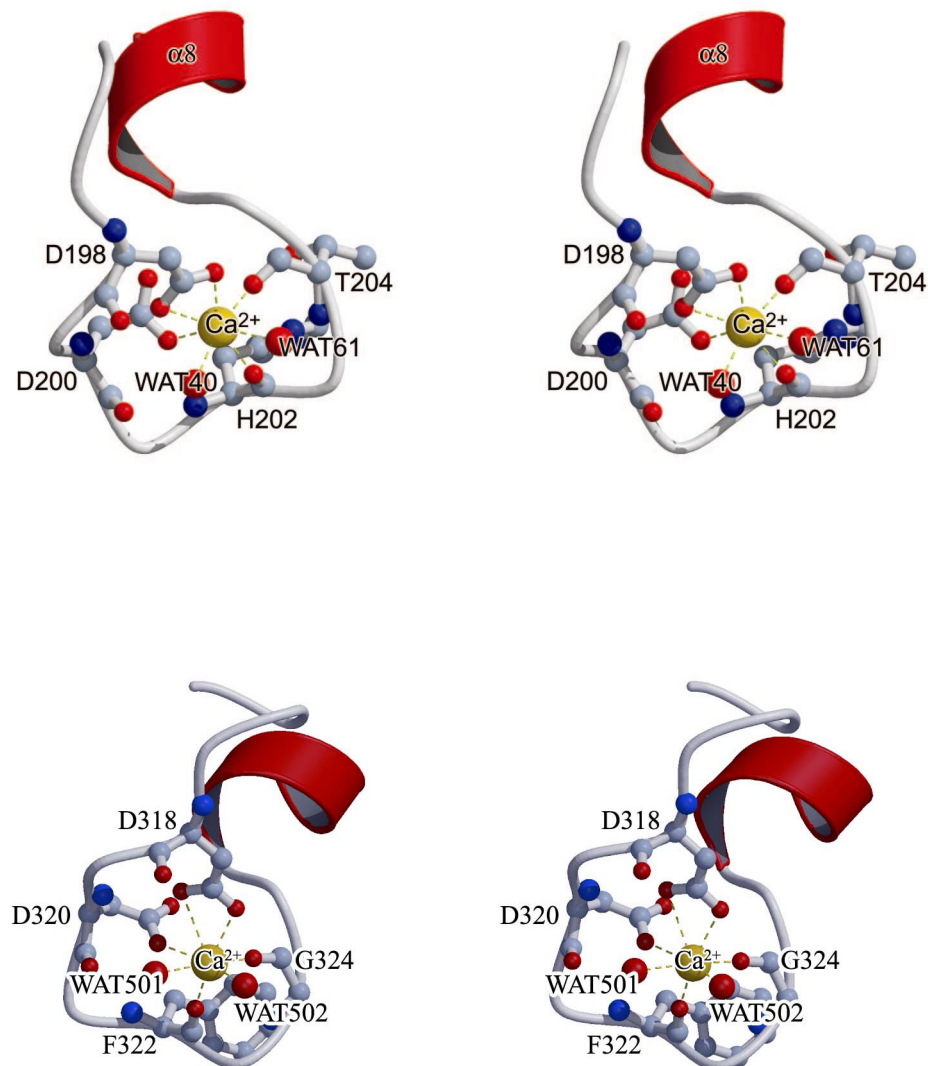
**Abbildung 34:** Überlagerung des  $C_{\alpha}$ -trace der  $\gamma C$  Struktur (gelb) und der TL-5A Struktur (grau). Grün gefärbt sind die *Loop*-Bereiche P-1 und P-3 der  $\gamma C$ -Struktur, die verglichen mit TL-5A innerhalb der Domäne P den größten Unterschied in der Gesamtfaltung darstellen (siehe Sequenzüberlagerung Abbildung 31).

Im Vergleich zu der Struktur des Tachylectins unterscheiden sich die drei Domänen in  $\gamma C$  dadurch, daß in den Domänen A und B  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter vorherrschen, Domäne P überwiegend aus *Loop*- und *Turn*-Bereichen besteht. Yee (Yee *et al.*, 1997) macht hierfür den hohen Anteil an Glycinen in dieser Domäne verantwortlich, der mit einem Anteil von 13% etwa dem des TL-5A entspricht (12%).

Fibrinpolymerisation und die Faktor XIIIa vermittelte kovalente Verknüpfung der  $\gamma$ -Ketten unterschiedlicher Fibrineinheiten sind kalziumabhängige Vorgänge (Herrick *et al.*, 1999). Die Kalziumbindestelle, die in der  $\gamma C$  Struktur gefunden wurde, ist strukturell homolog zu der des Tachylectins: Zum einen liegt sie 10 Ångström von der Polymerisationstasche entfernt. Zum andern sitzt sie in einem *Loop*-Bereich dessen Verlauf C-terminal in eine kurze  $\alpha$ -Helix mündet. Diese  $\alpha$ -Helix ist, entsprechend TL-5A, durch eine Dischwefelbrücke (Cys-326 und Cys-339) an ein Cystein (Cys-339) gebunden, das Teil der Polymerisationstasche ist. N-terminal zu der Kalziumbindestelle ist keine Helix vorhanden, d.h. auch hier liegt kein EF-Hand Bindungsmotiv vor.

Das Kalzium in  $\gamma C$  wird durch sieben Sauerstoffatome koordiniert. Die Seitenkettensauerstoffatome der Aminosäuren Asp-318 (OD1, OD2) und Asp-320 (OD1) bilden mit dem Wassermolekül (WAT-502) und dem Hauptkettencarbonylsauerstoffatom der Aminosäure Phe-322 eine pentagonale Grundfläche. Über dieser Grundfläche sitzt auf der

einen Seite WAT-501 und auf der anderen Seite der Carbonylsauerstoff der Aminosäure Gly-324. Hierdurch ist das Kalzium in einer pentagonal bipyramidalen Geometrie koordiniert (siehe Abbildung 35).



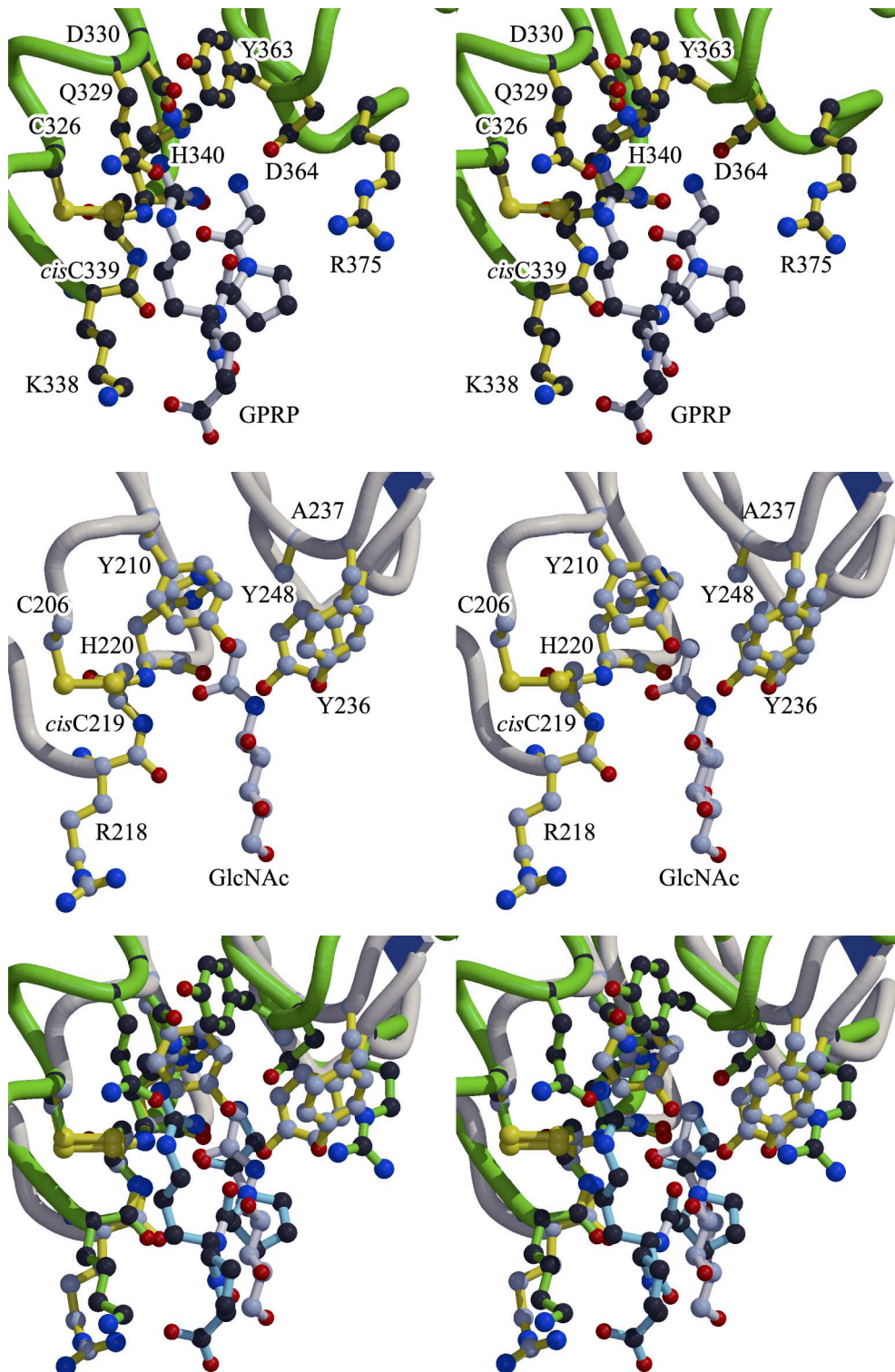
**Abbildung 35:** Gegenüberstellung der Kalziumbindungen. Oben ist die Kalziumbindung des TL-5A, unten die des  $\gamma$ C zu sehen.

In der Sequenzüberlagerung (siehe Abbildung 31) ist zu sehen, daß beide Kalziumbindungsseiten in einem kurzen Bereich aus sieben hintereinanderliegenden Aminosäuren lokalisiert sind. Interessanterweise spiegelt sich das gemeinsame Bindungsmuster bereits in der Sequenz wieder. Alle an der Koordination beteiligten Aminosäuren liegen relativ zu der ersten (Asp-189 TL5A, Asp-318  $\gamma$ C) in Position N+2 auf

der Sequenz. Es sind außerdem die beiden Aspartate (Asp-198, Asp-200, T15A und Asp-318, Asp-320  $\gamma$ C), die jeweils durch ihre Seitenketten an der Koordination beteiligt sind, in beiden Sequenzen konserviert. Die nachfolgenden Aminosäuren sind nur durch ihre Carbonylsauerstoffatome an der Koordinierung beteiligt, was die Tatsache relativiert, daß diese beiden Aminosäuren nicht konserviert sind.

Obwohl die Polymerisationstasche naturgemäß eine völlig andere Spezifität besitzt als die Zuckerbindetasche des Tachylectins bestehen, doch bemerkenswerte Ähnlichkeiten zwischen beiden Bindungstaschen.

Die proteolytische Abspaltung des Fibrinopeptids A durch Thrombin bildet den zweifach positiv geladenen *A-knob* (GPR) (Pratt *et al.*, 1997). Dementsprechend muß die Polymerisationstasche ein stark negatives elektrostatisches Potential besitzen (Yee *et al.*, 1997). Wie aus Abbildung 36 ersichtlich wird, ist die Polymerisationstasche diesen Anforderungen entsprechend aufgebaut. Der positiv geladene N-terminus und das positiv geladene Arginin des *A-knob* Modellpeptids (GPRP) liegen tief in der Bindetasche. Der N-terminus bildet Salzbrücken zu dem Carbonylsauerstoffatom der Aminosäure His-340 und der Seitenkette der Aminosäure Asp-364. Die Guanidiniumgruppe des Arginin (*A-knob*) bildet Salzbrücken mit den Seitenketten der Aminosäure Asp-330 und Glu-329. Ein weiteres wichtiges Merkmal der Polymerisationstasche erklärt die pH-Abhängigkeit der Fibrinpolymerisation (Pratt *et al.*, 1997). Am Boden der Polymerisationstasche sitzt die Aminosäure His-340. Dieses Histidin bildet, abhängig vom pH-Wert, Wasserstoffbrücken, was im Extremfall dazu führt, daß bei einem pH-Wert unter 5.0 die Fibrinpolymerisation unterdrückt wird, da Wasserstoffbrücken zu Aminosäureseitenketten ausgebildet werden, die bei höherem pH-Wert an der *Knob*-Bindung beteiligt sind (Asp-364 und Asp-330) (Pratt *et al.*, 1997). Ein bemerkenswertes Charakteristikum der Polymerisationstasche ist eine *cis*-Peptidbindung zwischen den Aminosäuren Lys-338 und Cys-339. Durch diese *cis*-Peptidbindung können die Hauptkettenstickstoffatome der Aminosäuren Cys-339 und His-340 Wasserstoffbrückenbindungen zu dem Carbonylsauerstoffatom des Glycins (*A-knob*) ausbilden. Da die Bindung des *A-knobs* hauptsächlich auf richtungsabhängigen Wechselwirkungen (Wasserstoff- und Salzbrückenbindungen) beruht und apolare Wechselwirkungen nur eine untergeordnete Rolle spielen, stellt die *cis*-Peptidbindung eine notwendige Eigenschaft der Bindetasche dar um deren Spezifität auszubilden.



**Abbildung 36:** Gegenüberstellung der Protein-/Zuckerbindetasche. Die Darstellung oben zeigt die *Polymerisation Pocket* mit dem *A-knob* Modellpeptid GPRP (PDB-Id.: 3FIB). Die mittlere Abbildung zeigt die Zuckerbindetasche des TL-5A in der gleichen Orientierung wie die *Polymerisation Pocket*. Die Abbildung unten zeigt die Überlagerung beider Bindetaschen.

In Abbildung 36 ist die Zuckerbindungstasche des Tachylectins in der gleichen Orientierung wie die Polymerisationstasche des  $\gamma$ C dargestellt. Der Verlauf der Polypeptidkette um die Dischwefelbrücke zwischen Cys-206 und Cys-219 ist identisch mit dem des  $\gamma$ C (Cys-326 und Cys-339). Darüber hinaus ist sowohl die *cis*-Peptidbindung als auch das Histidin (His-220, TL5A und His-340,  $\gamma$ C) konserviert. In der Überlagerung beider Bindetaschen liegt die Acetamidgruppe des Zuckers an äquivalenter Position zu der des Glycins des *A-knobs*. Es ist deutlich zu erkennen, wie beide Carbonylsauerstoffatome in Richtung auf die *cis*-Peptidbindung zeigen und durch entsprechende Wasserstoffbrücken gebunden werden. Durch die Mutation von zwei Aminosäuren ist in diesem Bereich der Bindetasche die Spezifität von apolar (TL-5A) nach polar ( $\gamma$ C) sichergestellt. Asp-364 und Asp-330 in  $\gamma$ C sind in TL5A durch Ala-237 und Tyr-210 ersetzt. Asp-364 und Asp-330 sind durch die Salzbrücken maßgeblich an der *Knob*-Bindung beteiligt, Ala-237 und Tyr-210 maßgeblich an der Bildung der hydrophoben Bindetasche. Bemerkenswert ist Aminosäure Tyr-363 der Polymerisationstasche. Durch Photoaffinitätsmarkierung war die Polymerisationstasche in der Umgebung von Tyr-363 lokalisiert worden (Yamzumi und Doolittle, 1992; Shimizu *et al.*, 1992). Diese Aminosäure ist in beiden Bindetaschen konserviert (Tyr-236, TL-5A). In TL-5A ist sie unmittelbar an der Zuckerbindung beteiligt. In  $\gamma$ C zeigt die Seitenkette von der Polymerisationstasche weg und ist nicht an der *Knob*-Bindung beteiligt.

Betrachtet man die Überlagerung beider Strukturen in Abbildung 34, dann fallen besonders die längeren *Loops* ober- und unterhalb der Polymerisationstasche in  $\gamma$ C auf. *Loop* P-1 verlängert die Polypeptidkette in  $\gamma$ C um vierzehn, *Loop* P-3 um sieben Aminosäuren relativ zu TL-5A (siehe Abbildung 31). Bemerkenswerterweise hatte ein Sequenzvergleich zwischen Fibrinogen und Proteinen mit potentiell fibrinogenartiger Faltung (Yee *et al.*, 1997) bereits auf die unterschiedliche Länge dieser *Loops* aufmerksam gemacht. Man hat daraus geschlossen, daß die evolutionäre Entwicklung der Polymerisationstasche aus der Zuckerbindungstasche mit einer Verlängerung dieser *Loops* verknüpft ist. Obwohl aus der Komplexstruktur des  $\gamma$ C zu sehen ist, daß keine Aminosäuren des P-1 *Loops* an der *Knob*-Bindung beteiligt sind (siehe Abbildung 31) macht alleine die Nähe zur Polymerisationstasche eine Beteiligung des *Loops* während der Blutgerinnung *in vivo* wahrscheinlich; zumal durch das *Knob*modellpeptid nur ein Bruchstück des realen *Knobs* wiedergegeben wird. In Tachylectin 5A fehlt diese *Looperweiterung* vollständig. Dadurch wird die Bindetasche zugänglicher und ermöglicht so das Binden der relativ kleinen Acetylgruppe innerhalb von Oberflächenzuckern.

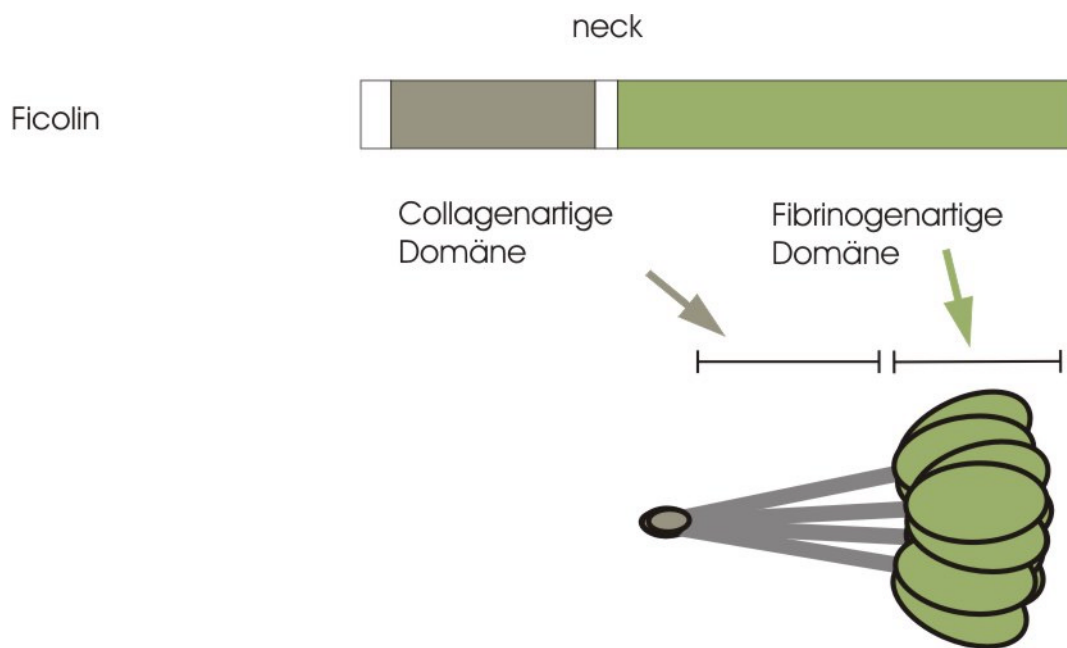
Der Vergleich zwischen beiden Strukturen zeigt eine bemerkenswerte Verwandtschaft, nicht nur in bezug auf eine gemeinsame Faltung, sondern auch in bezug auf konservierte Funktionen. TL-5A ist als ein Vorläufermolekül innerhalb der molekularen Entwicklungsgeschichte des Fibrinogens zu Betrachten. Der Strukturvergleich belegt auch den evolutionären Zusammenhang zwischen dem angeborenen Immunsystem und der Blutgerinnungskaskade des Menschen, da Tachylectin 5A entsprechende Lektine – die Ficoline – auch in dem angeborenen Immunsystem des Menschen charakterisiert werden konnten. Im folgenden wird dieser Aspekt ausgeführt.

#### 4.7 Vergleich zu anderen Lektinen

Zu den Proteinen die sowohl bezüglich der Bindungsspezifität als auch hinsichtlich der Faltung Ähnlichkeiten zu Tachylectin 5A besitzen sollten, zählen die Ficoline. Ficoline wurden erstmals aus Gebärmuttergewebe von Schweinen als Wachstumsfaktor  $\beta$ -1 bindende Proteine charakterisiert (Ichijo *et al.*, 1991; Ichijo *et al.*, 1993). Sie konnten sowohl in Vertebraten als auch Invertebraten, direkt als Protein bzw. indirekt durch die entsprechende cDNA, nachgewiesen werden. Im Menschen existieren mindestens drei Ficoline: Ficolin/P35, Hakata Antigen und Ficolin/P35 verwandtes Protein (Matsushita und Fujita, 2001). Ficolin/P35 (auch als L-Ficolin, Ficolin I, elastin-binding protein (EBP)-37 und Hucolin bezeichnet) und Hakata Antigen sind Bestandteile des menschlichen Blutplasmas.

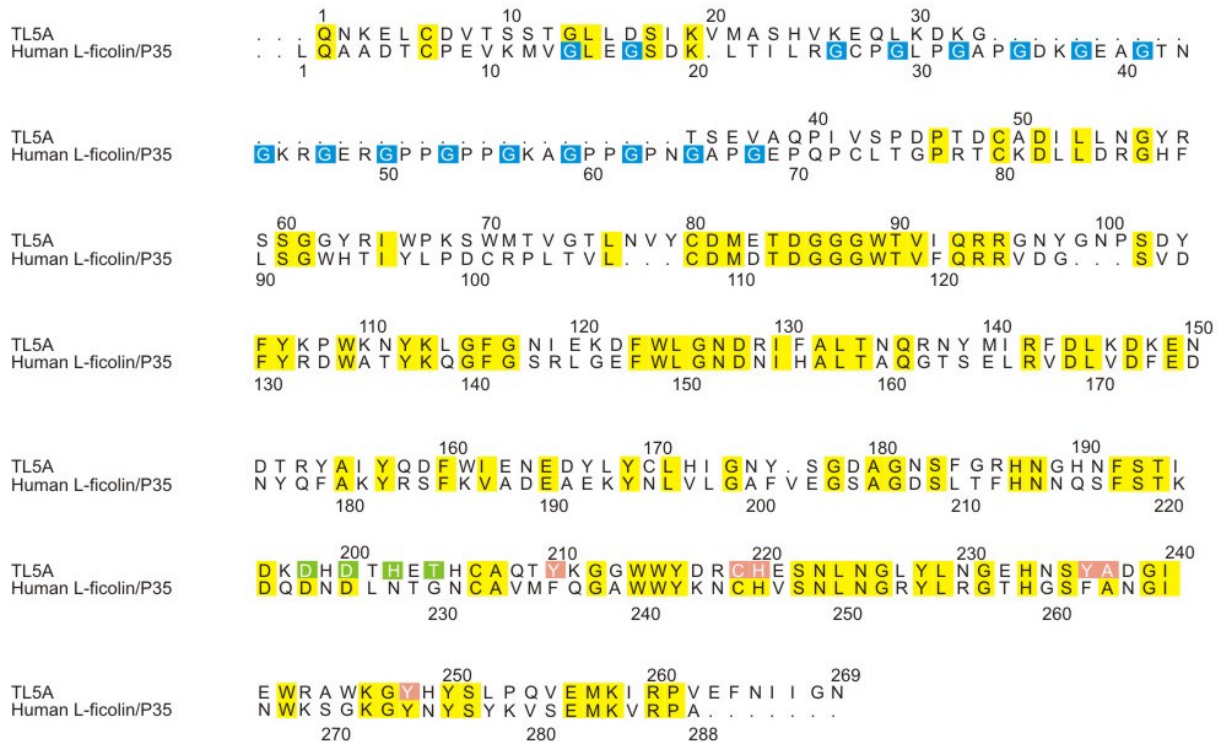
L-Ficolin/P35 ist eine oligomeres Protein, bestehend aus 35-kDa großen Untereinheiten (Matsushita *et al.*, 1996). Jede Untereinheit ist aus vier Domänen aufgebaut: Einem N-terminalen Protein, bestehend aus dreizehn Aminosäuren und einem Cystein folgt ein collagenartiger Bereich, in dem insgesamt 17 Gly-Xaa-Yaa Triplets vorhanden sind. Es folgt ein kurzer, sogenannter *Neck*-Bereich und C-terminal endet die Sequenz in einer fibrinogenartigen Domäne (siehe Abbildung 37 und 38).

Für die oligomere Struktur wird aufgrund von elektronenmikroskopischen Aufnahmen eine blumenstraußartige Anordnung von vier Trimeren angenommen. Innerhalb der Trimere sind jeweils zwei Monomere durch die N-terminalen Cysteine kovalent miteinander verbunden. (Abb. 37) (Ohashi und Erickson, 1998).



**Abbildung 37:** Darstellung der L-Ficolin Struktur (Matsushita und Fujita, 2001). Oben ist schematisch die Verteilung der Domänen in der Proteinsequenz zu sehen, unten die blumenstraubartige Anordnung des 12-mer, beruhend auf elektronenmikroskopischen Untersuchungen (Ohashi und Erickson, 1998).

L-Ficolin zählt zu der Gruppe der kalziumabhängigen Lektine mit einer Bindungsspezifität für GlcNAc (Matsushita *et al.*, 1996). Gokudan *et al.* konnten darüber hinaus nachweisen, daß für die Zuckerbindung eine Acetylgruppe, in der selben Weise wie für Tachylectin 5A, notwendig ist (Gokudan *et al.*, 1999). L-Ficolin zählt neben dem *Mannose-binding lectin* (MBL) zu den Lektinen des angeborenen Immunsystems des Menschen, die durch Agglutinierung pathogener Eindringlinge die Opsonisierung einleiten. In diesem Zusammenhang aktivieren diese Lektine neben dem *klassischen* und *alternativen Weg* durch den sogenannten *Lektin Weg* das Komplement des angeborenen Immunsystems (Matsushita *et al.*, 2000). Weitere Untersuchungen zeigen, daß sich die funktionellen Eigenschaften des L-Ficolins eindeutig den unterschiedlichen Domänen innerhalb des Moleküls zuordnen lassen. In der fibrinogenartigen C-terminale Domäne liegt die Zuckerbindestelle. Die Collagendomäne ist an der Bildung von MASP-Komplexen (*MBL-associated serine proteases*) beteiligt und dadurch für die Einleitung der Opsonisierung verantwortlich (Matsushita *et al.*, 2000).



**Abbildung 38:** Sequenzvergleich von Tachylectin 5A und humanem L-Ficolin/P35. Dieser Vergleich basiert auf dem Sequenzvergleich von Gokudan (Gokudan *et al.*, 1999). Konservierte Aminosäuren sind gelb unterlegt. Auf die Darstellung *ähnlicher* Aminosäuren wurde verzichtet (siehe Sequenzüberlagerung Abbildung 31). Blau unterlegt sind jeweils die Glycine der siebzehn Gly-Xaa-Yaa Triplets der collagenartigen Domäne des L-Ficolins. Grün unterlegte Aminosäuren markieren die Kalziumbindung, rot unterlegte Aminosäuren die Zuckerbindung des Tachylectins.

Da Ficoline bisher nicht röntgenkristallographisch charakterisiert wurden muß sich der Vergleich zu Tachylectin 5A auf die Proteinsequenz beschränken (siehe Abbildung 38). Die gesamte Sequenz des L-Ficolins ist zu 45,6% identisch mit der des Tachylectins (siehe Tabelle 10). Der größte Unterschied zwischen beiden Sequenzen ist die fehlende Collagensequenz in TL-5A. Bemerkenswert ist jedoch, daß Cys-6 des Tachylectins in L-Ficolin konserviert ist. Dieses Cystein wird für die kovalente Verknüpfung der Ficolinmonomere durch Dischwefelbrücken verantwortlich gemacht; liegt in TL-5A jedoch lediglich reduziert vor. Ein weiteres wichtiges Merkmal ist, daß alle Cysteine, die in TL-5A intermolekulare Dischwefelbrücken ausbilden, ebenfalls in L-Ficolin konserviert sind.



Betrachtet man den Sequenzbereich der Kalziumbindung des Tachylectins, dann zeigt sich, daß die Kalziumbindung in L-Ficolin äquivalent sein muß. Entsprechend dem Tachylectin liegt ein Dx Dx N x G Motiv vor. Beide Aspartate, die durch ihre Seitenketten sowohl in TL-5A als auch in  $\beta$ C und  $\gamma$ C an der Kalziumbindung beteiligt sind, sind in L-Ficolin konserviert. Die folgenden zwei Aminosäuren sind von denen des Tachylectins verschieden. Jedoch sind diese Aminosäuren nur durch ihre Hauptkettencarbonylsauerstoffatome an der Kalziumbindung beteiligt. Verglichen mit der Sequenz der Kalziumbindungsstelle des  $\gamma$ C (Dx Dx Fx G) zeigt sich sogar eine Übereinstimmung über beide Aspartate hinaus (siehe Abbildung 31).

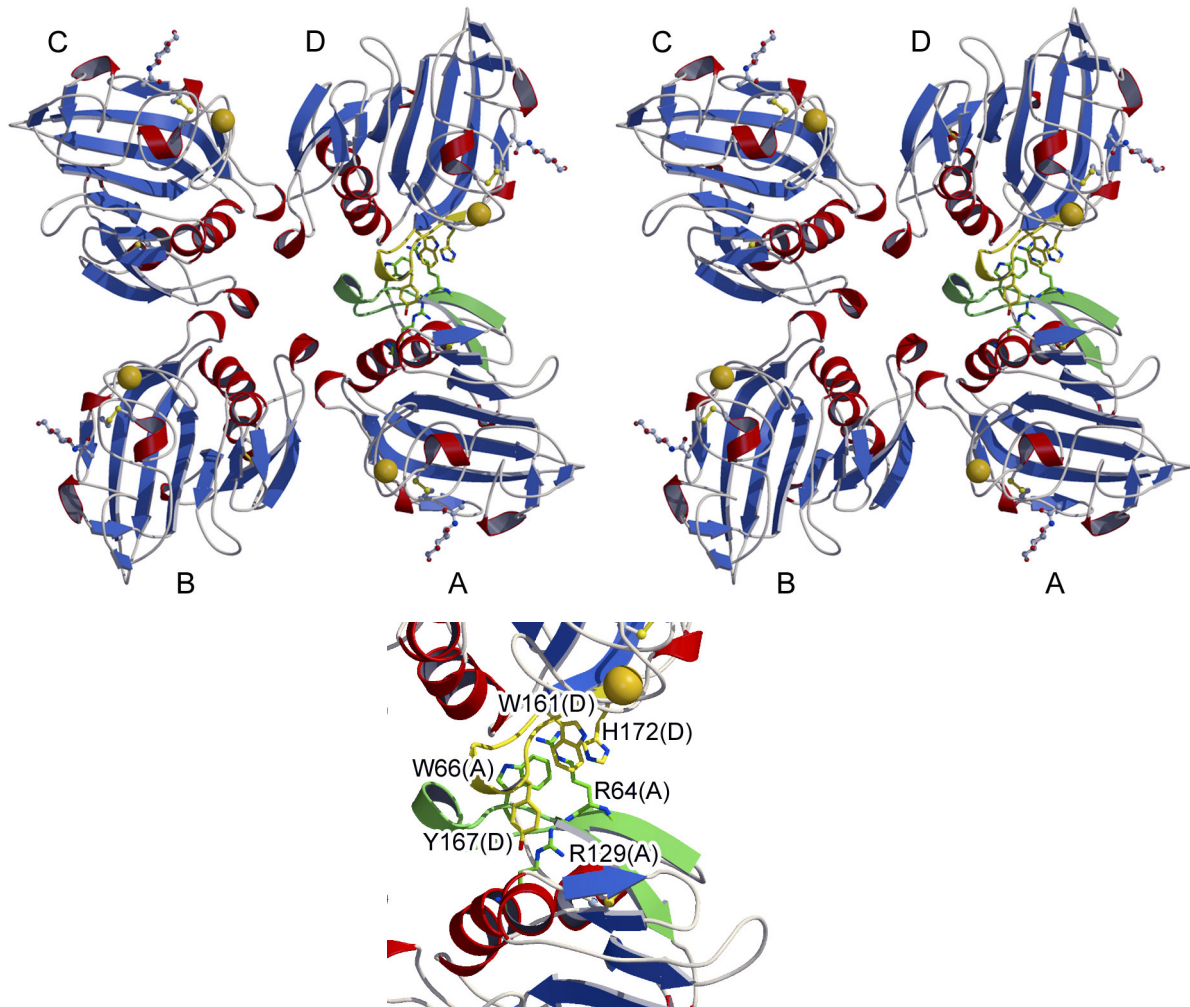
Eine bemerkenswerte Homologie zeigt sich auch in dem Bereich der Zuckerbindetasche des Tachylectins. Alle in Tachylectin 5A an der Zuckerbindung beteiligten Aminosäuren sind, bis auf die Tyrosine Tyr-210 und Tyr-236, in L-Ficolin konserviert. An Stelle dieser beiden Tyrosine sind in L-Ficolin Phenylalanine vorhanden. Diese Tatsache unterstützt die Vermutung, daß die Zuckerbindetasche des L-Ficolins homolog zu der des Tachylectins sein muß. Da eine Mutation der beiden Tyrosine zu Phenylalaninen vorliegt, ist davon auszugehen, daß hierdurch nur eine schwächere Bindung zu den acetylierten Zuckern bzw. zu der Acetylgruppe ausgebildet werden kann, da in Tachylectin die Hydroxylgruppen der Tyrosine an der Bindung der Acetamidgruppe beteiligt sind (siehe Abbildung 24). Diese Unzulänglichkeit wird durch das, häufig bei Lektinen anzutreffende, *Multivalenzprinzip* (Mammen *et al.*, 1998) aufgehoben: L-Ficolin bildet 12-mer Aggregate, deren einzelne Bindestellen additiv zwölf Zuckereinheiten binden können. Auf diese Weise können Oberflächenzucker hoher Dichte erkannt werden. Dieses Prinzip der Erkennung fremder Oberflächen wird beispielsweise auch durch das *Mannose-binding protein* genutzt (Turner, 1996): Drei Lektineinheiten sind hier durch eine N-terminale *coiled coil* Faltung so angeordnet, daß die Bindestellen etwa 53 Å voneinander versetzt sind (Weis und Drickamer, 1994). Daher können Oberflächenzucker nicht nur durch additive Bindung erkannt, sondern auch unterschieden werden. Ein weiteres Beispiel ist Tachylectin 2, das ebenfalls fünf gleichwertige Zuckerbindestellen für GlcNAc besitzt (Beisel *et al.*, 1999).

Die hohe Sequenzhomologie zwischen Tachylectin 5A und L-Ficolin belegt die Vermutung einer evolutionären Beziehung zwischen beiden Proteinen. In Verbindung mit der strukturellen Verwandtschaft zwischen  $\gamma$ C und TL-5A ist ein evolutionäres Szenario denkbar, in dem Tachylectin 5A sowohl für die Ficoline als auch für das Fibrinogen als evolutionäres

Vorläuferprotein auftrat. Durch Genmutationen respektive Insertion fand für Fibrinogen der Übergang von Zuckerbindung zu Proteinbindung statt und für L-Ficolin durch Insertion einer N-terminalen kollagenähnlichen Einheit eine den Erfordernissen angepaßte Anordnung der zwölf Lektineinheiten.

Ein weiteres wichtiges Merkmal das durch den Vergleich mit L-Ficolin auffällt deutet auf das *Multivalenzprinzip* hin. Besonders interessant ist dieses im Zusammenhang mit der in der Einleitung zitierten Vorhersage von Doolittle, daß als Vorläufermoleküle für Fibrinogen Lektinverbindungen in Frage kommen, deren Polymerisation durch Selbstaggregation zustande kommt. Für Tachylectin 5A wurde anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen eine trimere und tetramere Anordnung von Dimeren in Lösung vorhergesagt, obwohl diese Aufnahmen schwer zu interpretieren sind (Gokudan *et al.*, 1999).

Auf Grund dieser Ergebnisse und durch den Vergleich mit Fibrinogen wurden an Position 6 und 170 (siehe Abbildung 31) Disulfidbrücken vermutet, durch die Tachylectin Dimere bilden sollte. Die Strukturanalyse des Tachylectins zeigt eindeutig, daß an Position 170 ein freies Cystein vorliegt und keine Disulfidbrücken ausgebildet werden. Durch anschließende Bindungsexperimente konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Sowohl Cys-6 als auch Cys-170 bilden keine Disulfidbrücken zu anderen Tachylectinmolekülen aus (S. Kawabata, persönliche Mitteilung). Die Tendenz des Tachylectins *in vivo* höhere Oligomere zu bilden, muß daher durch Oberflächenwechselwirkungen zustande kommen. Interessanterweise läßt sich in der Kristallstruktur eine tetramere Anordnung finden. Obwohl diese Anordnung durch die kristallographische Symmetrie (Raumgruppe I4) erzwungen wird, scheint sie von Relevanz für die Anordnung *in vivo* zu sein (siehe Abbildung 39).



**Abbildung 39:** Tetramere Anordnung symmetrieverwandter Tachylectinmoleküle im Kristall. Im oberen Bild ist die tetramere Anordnung der Tachylectin 5A Moleküle zu sehen, die aufgrund der kristallographischen Symmetrie (I4) erzwingen wird. Die Blickrichtung verläuft entlang der vierfachen Rotationsachse. Im unteren Bild ist das *Stagging* zwischen zwei Monomeren vergrößert dargestellt.

Die vier Tachylectinmonomere liegen in einer Ebene auf den Ecken eines Quadrats. Die einzelnen Monomere sind so orientiert, daß die Zuckerbindetaschen jeweils nach außen zeigen und die Kalziumionen am oberen Ende des Moleküls liegen (siehe Abbildung 39). Durch diese Anordnung kommen die N- und C-termini unterhalb der quadratischen Fläche zum liegen. Die Kontaktflächen der Monomer-Monomer Wechselwirkungen sind  $580 \text{ \AA}^2$  groß. Neben anderen bindenden Interaktionen ist besonders auf zahlreiche Aromaten-Arginin-*Staggings* hinzuweisen, Wechselwirkungen, die sehr oft in Proteinstrukturen zu finden sind (Flocco und Mowbray, 1994). Exemplarisch ist in Abbildung 39 das *Stagging* der Monomeren A und D dargestellt. Arg-64(A) wird von der einen Seite durch Trp-161(D) und von der anderen Seite durch His-172(D) umgeben. Des weiteren bilden Tyr-167(D) mit Arg-129(A) und Trp-66(A) mit Trp-161(D) *staggings*.

In dieser Anordnung liegen benachbarte Zuckerbindetaschen etwa 73 Å voneinander entfernt und erlauben die simultane mehrfache Bindung von acetylgruppentragenden Zuckern. Diese Anordnung könnte deshalb von Bedeutung für die physiologische Wirkung des Tachylectin 5A *in vivo* sein.

#### 4.8 Implikation für die Stimulierung von *Big Defensin*

Tachylectin 5A ergänzt durch seine Spezifität für acetylgruppentragende Zucker die an der Hostverteidigung beteiligten Lektine des Japanischen Pfeilschwanzkrebses. Es bedarf zudem keiner zeitverzögerten Sezernierung aus den Granula während der Verteidigung gegen pathogene Eindringlinge. Interessanterweise ist für Tachylectin 5A zusätzlich zu der agglutinierenden/hämagglutinierenden Aktivität eine synergistische Steigerung der antimikrobiellen Aktivität von *Big Defensin* nachgewiesen worden (Gokundan *et al.*, 1999). Eine vergleichbare Eigenschaft der gegenseitigen Aktivitätssteigerung konnte auch für die beiden antimikrobiellen Proteine *Tachycitin* und *Big Defensin* nachgewiesen werden (Kawabata *et al.*, 1996).

Tachylectin 5A vergrößert die antimikrobielle Aktivität des *Big Defensin* gegenüber Gram-positiven Bakterien. Es vergrößert jedoch nicht die antimikrobielle Aktivität des *Big Defensin* gegenüber Gram-negativen Bakterien. Unabhängig davon ist jedoch die Agglutinierung Gram-negativer Bakterien durch Tachylectin 5A effektiver als die Agglutinierung Gram-positiver Bakterien. Die strukturelle Analyse des *Big Defensin* läßt eine Funktionshypothese für die Aktivierung durch Tachylectin 5A zu.

*Big Defensin* besitzt durch seine 79 C-terminalen Reste eine Ähnlichkeit zu Defensinen aus den Neutrophilen des Menschen. Im Gegensatz dazu konnte für den N-terminalen hydrophoben Bereich keine Homologie gefunden werden. *Big Defensin* inhibiert nicht nur das Wachstum Gram-negativer und -positiver Bakterien, sondern auch das von Pilzen, wie z.B. *Candida albicans*, vergleichbar zu *Tachypleisin*. Der N-terminale hydrophobe Sequenzbereich läßt sich durch Trypsin von dem kationischen C-terminalen *Defensin*-Bereich abspalten. Überraschenderweise unterscheiden sich beide Bereiche des Proteins in ihrer antimikrobiellen Funktion. In dem N-terminalen Bereich läßt sich die antimikrobielle Aktivität gegenüber

Gram-positiven Bakterien, in dem C-terminalen Bereich die antimikrobielle Aktivität gegenüber Gram-negativen Bakterien lokalisieren (Saito *et al.*, 1995a).

Tachylectin 5A bindet wahrscheinlich an den C-terminalen Bereich des *Big Defensin* und blockiert so die antimikrobielle Aktivität gegenüber Gram-negativen Bakterien. Es könnte darüber hinaus an einem effizienten Transport des *Big Defensin* zu der Zelloberfläche der eingedrungenen Bakterien beteiligt sein. Es ist aber auch denkbar, daß Tachylectin durch die Wechselwirkung der Zelloberflächenzucker der pathogenen Eindringlinge eine Markierung vornimmt, in dessen Folge *Big Defensin* solche Zellen als fremd erkennt und so eine Opsonisierung einleitet.

Für Tachylectine aus den Hämozyten, wie beispielsweise Tachylectin-1 oder Tachylectin-2 sind solche synergistischen Effekte auf die antimikrobielle Aktivität nicht bekannt. Tachylectin 5A fungiert in diesem Zusammenhang als *Selbst-Fremd* unterscheidendes Molekül des angeborenen Immunsystems des Japanischen Pfeilschwanzkrebses *Tachypleus tridentatus*. Es zeigen sich hier wiederum Parallelen zu L-Ficolin, das ebenfalls an der Einleitung der Opsonisierung beteiligt ist.

#### 4.9 Schlußfolgerung

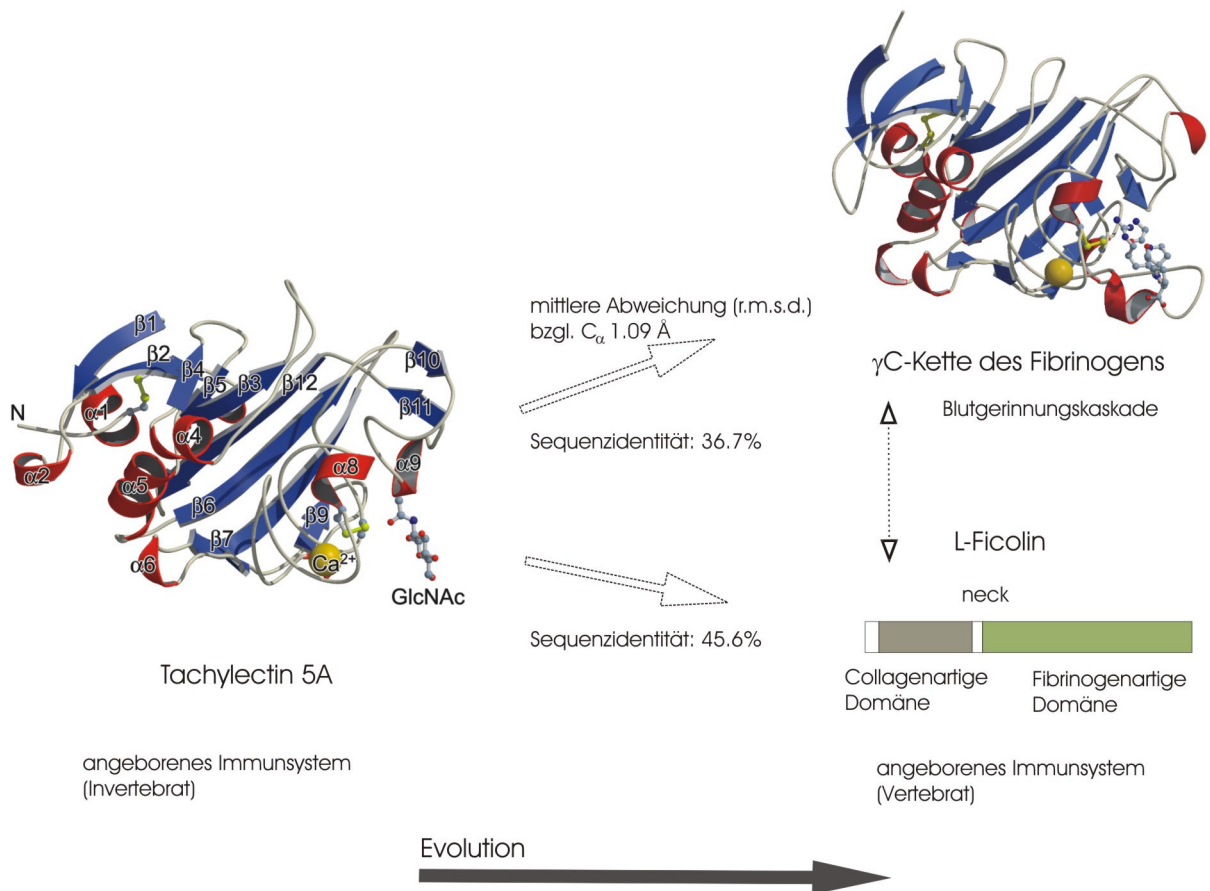
Es ist seit langem ein evolutionärer Zusammenhang zwischen dem Blutgerinnungssystem der Säugetiere und frühen Formen von Verteidigungssystemen, die neben der Immobilisierung und Zerstörung von Krankheitserregern auch die Wundheilung regulieren, vorhergesagt worden. Durch die Komplexstruktur des Tachylectin 5A aus dem angeborenen Immunsystem des Japanischen Pfeilschwanzkrebses wird diese Vermutung erstmals durch eine röntgenstrukturanalytische Untersuchung bestätigt.

Der Vergleich mit der C-terminalen globulären Domäne der  $\gamma$ -Kette des Fibrinogens zeigt eine hohe Ähnlichkeit zwischen beiden Strukturen. Die gesamten Strukturen lassen sich entlang ihre Polypeptidhauptkette ( $C_{\alpha}$ -Atome) mit einer mittleren Abweichung von 1.09 Å überlagern. In beiden Strukturen liegen die Kalziumbindungsstellen und die Protein-/Zucker-Bindungstaschen an äquivalenten Positionen. Das Kalziumbindungsmotiv ist in beiden Strukturen von der EF-Hand verschieden, jedoch analog zueinander.

In der Zucker-/Proteinbindetasche finden sich charakteristische Parallelen, wie etwa eine *cis*-Peptidbindung. Wichtige Unterschiede innerhalb der Bindetaschen machen den evolutionären Übergang von Zuckerbindung zu Peptidbindung deutlich. Dieser evolutionäre Übergang steht wahrscheinlich auch in einem Zusammenhang mit zwei charakteristischen *Loop*-Verlängerungen des  $\gamma$ C-Fragments.

Der Vergleich zwischen den Proteinsequenzen des TL-5A und des L-Ficolins, einem Protein aus dem angeborenen Immunsystem des Menschen, läßt ebenfalls eine hohe Analogie zwischen beiden Strukturen erwarten. Die Proteinsequenzüberlagerung zeigt eine Identität von 45,6%. Hinzu kommt, daß L-Ficolin eine Bindungsspezifität für Acetylgruppen entsprechend dem Tachylectin 5A besitzt.

Diese Ergebnisse legen die Schlußfolgerung nahe, daß Tachylectin 5A als ein Vorläufermolekül sowohl für Fibrinogen als auch für L-Ficolin fungierte (siehe Abbildung 40).



**Abbildung 40:** Übersicht der denkbaren evolutionären Zusammenhänge zwischen Tachylectin 5A und Fibrinogen/L-Ficolin (siehe Kapitel 4.6 und 4.7).

## 5 Literaturverzeichnis

Abrahams, J.P. und Leslie, A.G.W. (1996) Methods Used in the Structure Determination of Bovine Mitochondrial F<sub>1</sub> ATPase. *Acta Cryst.*, **D52**, 30-42.

Bale, M.D., Janmey P.A. und Ferry J.D. (1982) Kinetics of formation of fibrin oligomers. II. Size distributions of ligated oligomers. *Biopolymers*, **21**, 2265-2277.

Barwig, B. (1995) Isolation and characterization of plasma coagulogen (PC) of the cockroach *Leucophaea maderae* (Blattaria). *J. Comp. Physiol.*, **B155**, 135-143.

Baker, S.C., Saunders, N. F. W., Willis, A.C., Ferguson, S.J. Hajdu, J. und Fülöp, V. (1997) Cytochrome cd<sub>1</sub> structure: Unusual haem environment in a nitrile reductase and analysis of factors contributing to  $\beta$ -propeller folds. *J. Mol. Biol.*, **269**, 440-455.

Barton, G.J. (1993) ALSCRIPT: a tool to format multiple sequence alignments. *Prot. Eng.*, **6**, 37-40.

Beisel, H.-G., Kawabata, S., Iwanaga, S., Huber, R. und Bode, W. (1999) Tachylectin-2: crystal structure of a specific GlcNAc/GalNAc-binding lectin involved in the innate immunity host defense of the Japanese horseshoe crab *Tachypleus tridentatus*. *EMBO J.*, **18**, 2313-2322.

Bennett, J. S. (2001) Platelet-Fibrinogen Interactions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **936**, 340-354.

Bergner, A., Oganessyan, V., Muta, T., Iwanaga, S., Typke, D., Huber, R. und Bode, W. (1996) Crystal structure of coagulogen, the clotting protein from horseshoe crab: a structural homologue of nerve growth factor. *EMBO J.*, **15**, 6789-6797.

Bergner, A., Muta, T., Iwanaga, S., Beisel, H.-G., Delotto, R. und Bode, W. (1997) Horseshoe Crab Coagulogen Is an Invertebrate Protein with Nerve Growth Factor-Like Domain. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **378**, 283-287.

Blombäck, B., Blombäck, M., Hessel, B. und Iwanaga, S. (1967) Structure of N-terminal fragments of fibrinogen and specificity of thrombin. *Nature*, **215**, 1445-1448.

Brown, J.H., Volkmann, N., Jun, G., Henschen-Edman, A.H. und Cohen, C. (2000) The crystal structure of modified bovine fibrinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 85-90.

Brünger, A.T., Kuriyan, J. und Karplus, M. (1987) Crystallographic R factor refinement by molecular dynamics. *Science*, **235**, 458-460.

Brünger, A.T. (1997) Free R value: cross-validation in crystallography. *Methods Enzymol.*, **277**, 366-396.

Brünger, A.T., Adams, P.D. und Rice, L.M. (1998a) Recent developments for the efficient crystallographic refinement of macromolecular structures. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **8**, 606-611.

Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. und Warren, G.L. (1998b) Crystallography & NMR System: A new software suit for macromolecular structure determination. *Acta Cryst.*, **D54**, 905-921.

CCP4 - Collaborative Computational Project, Number 4. (1994) The CCP4 Suit: Programs for Protein Crystallography. *Acta Cryst.*, **D50**, 760-763.

Cates, M.S., Berry, M.B., Ho, E.L., Li, Q., Potter, J.D. und Phillips Jr., G.N. (1999) Metal ion affinity and specificity in EF-Hand Proteins: Coordination geometry and domain plasticity in parvalbumin. *Structure (London)*, **7**, 1269-1277.

Cooley, J.W. und Tukey, J.W. (1965) *Mathematics of Computation*, **19**, 297-301.

Côté, H.C.F., Pratt, K.P., Davie, E.W. und Chung, D.W. (1997) The Polymerization Pocket "a" within the Carboxyl-terminal Region of the  $\gamma$  Chain of Human Fibrinogen Is Adjacent to but Independent from the Calcium-binding site. *J. Biol. Chem.*, **272**, 23792-23798.



Cudney, B., Patel, S., Weisgraber, K., Newhouse, Y. und McPherson, A. (1994) Screening and Optimization Strategies for Macromolecular Crystal Growth. *Acta Cryst.*, **D50**, 414-423.

Darwin, C.G. (1914) The theory of x-ray reflection. *Phil. Mag.*, **27**, 315-333.

de La Fortelle, E. und Bricogne, G. (1997) Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods. *Methods Enzymol.*, **276**, 472-494.

Delves, P.J. und Roitt, I.M. (2000a) The immune system. *N. Engl. J. Med.*, **343**, 37-49.

Delves, P.J. und Roitt, I.M. (2000b) The immune system. *N. Engl. J. Med.*, **343**, 108-117.

Doolittle, R.F. (1983) The Structure and Evolution of Vertebrate Fibrinogen. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **408**, 13-27.

Doolittle, R.F. (1984) Fibrinogen and Fibrin. *Ann. Rev. Biochem.*, **53**, 195-229.

Doolittle, R.F., Everse, S.J. und Spraggon, G. (1996) Human fibrinogen: anticipating a 3-dimensional structure. *FASEB J.*, **10**, 1464-1470.

Doolittle, R.F., Spraggon, G. und Everse, S.J. (1997) Evolution of vertebrate fibrin formation and the process of its dissolution. *Ciba Foundation Symposium*, **212**, 4-17.

Drickamer, K. und Taylor, M.E. (1993) Biology of animal Lectins. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **9**, 237-264.

Engh, R. und Huber, R. (1991) Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Cryst.*, **A47**, 392-400.

Esnouf, R.M. (1997) An extensively modified version of MolScriipt that includes greatly enhanced coloring capabilities. *J. Mol. Graphics*, **15**, 132-134.

Esnouf, R.M. (1999) Further additions to *MolScript* version 1.4, including reading and contouring of electron-density maps. *Acta Cryst.*, **D55**, 938-940.

Evans, P.R. (1993) Data reduction. *Proc. of CCP4 collaborative computational project study weekend 1993 on data collection and processing*, 114-122.

Everse, S.J., Spraggon, G., Veerapandian, L., Riley, M. und Doolittle, R.F. (1998) Crystal Structure of Fragment Double-D from Human Fibrin with Two Different Bound Ligands. *Biochemistry*, **37**, 8637-8642.

Ewald, P.P. (1921) Das "reziproke Gitter" in der Strukturtheorie. *Z. Kristallogr.*, **56**, 129-156.

Flocco, M.M. und Mowbray, S.L. (1994) Planar Stacking Interactions of Arginine and Aromatic Side-Chains in Proteins. *J. Mol. Biol.*, **235**, 709-717.

Fox, G.C. und Holmes, K.C. (1966) An Alternative Method of Solving the Layer Scaling Equations of Hamilton, Rollett and Sparks. *Acta Cryst.*, **20**, 886-891.

French, S. und Wilson, K. (1978) On the Treatment of Negative Intensity Observations. *Acta Cryst.*, **A34**, 517-525.

Frishman, D. und Argos, P. (1995) Knowledge based secondary structure assignment. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, **23**, 566-579.

Fu, Y. und Grieninger, G. (1994) Fib<sub>420</sub>: A normal human variant of fibrinogen with two extended  $\alpha$  chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 2625-2628.

Fülöp, V. und Jones, D.T. (1999)  $\beta$  Propellers: structural rigidity and functional diversity. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9**, 715-721.

Gadjeva, M., Thiel, S. und Jesenius, J.C. (2001) The mannan-binding lectin pathway of the innate immune response. *Curr. Opin. Immunol.*, **13**, 74-78.

Glusker, J.P. (1991) Structural Aspects Of Metal Liganding To Functional Groups In Proteins. *Adv. Prot. Chem.*, **42**, 1-76.

Gokudan, S., Muta, T., Tsuda, R., Koori, K., Kawahara, T., Seki, N., Mizunoe, Y., Wai, S.N., Iwanaga, S. und Kawabata, S. (1999) Horseshoe crab acetyl group-recognizing lectins involved in innate immunity are structurally related to fibrinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 10086-10091.

Greenberg, C.S., Birckbichler, P.J., und Rice, R.H. (1991) Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J.*, **5**, 3071-3077.

Grieninger, G. (2001) Contribution of the  $\alpha_E C$  Domain to the Structure and Function of Fibrinogen-420. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **936**, 44-64.

Grolle, J. und Petermann, J. (1995) Wir werden einsam sein. *Der Spiegel*, **15**, 107-112.

Henschen, A., Lottspeich, F., Kehl, M., und Southan, C. Covalent structure of fibrinogen. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **408**, 28-43.

Herrick, S., Blanc-Brude, O., Gray, A. und Laurent, G. (1999) Fibrinogen. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **31**, 741-746.

Hoess, A., Watson, S., Siber, G.R. und Liddington, R. (1993) Crystal structure of an endotoxin-neutralizing protein from the horseshoe crab, *Limulus* anti-LPS factor, at 1.5 Å resolution. *EMBO J.*, **12**, 3351-3356.

Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway Jr., C.A. und Ezekowitz, R.A.B. (1999) Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. *Science*, **284**, 1313-1318.

van Holde, K. E., Miller, K. I. und Decker, H. Hemocyanins and invertebrate evolution. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 15563-15566.

Ichijo, H., Ronnstrand, L., Miyagawa, K., Ohashi, H., Heldin, C.H. und Miyazono, K. (1991) Purification of transforming growth factor  $\beta$ -1 binding Proteins from porcine uterus membranes. *J. Biol. Chem.*, **266**, 22459-22464.

Ichijo, H., Hellman, U., Wernsted, C., Gonez, L.J., Claesson-Welsh, L., Heldin, C.-H. und Miyazono, K. (1993) Molecular Cloning and Characterization of Ficolin, a Multimeric Protein with Fibrinogen- and Collagen-like Domains. *J. Biol. Chem.*, **268**, 14505-14513.

Inamori, K., Saito, T., Iwaki, D., Nagira, T., Iwanaga, S., Arisaka, F. und Kawabata, S. (1999a) A newly identified horseshoe crab lectin with specificity for blood group A antigen recognizes specific O-antigenes of bacterial lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.*, **274**, 3272-3278.

Iwanaga, S. (1993) Primitive Coagulation Systems and Their Message to Modern Biology. *Thromb. Haemostas.*, **70**, 48-55.

Iwanaga, S. (2002) The molecular basis of innate immunity in the horseshoe crab. *Curr. Opin. Immunol.*, **14**, 87-95.

Iwanaga, S., Muta, S., Shigenaga, T., Seki, N., Kawano, K., Katsu, T. und Kawabata, S. (1994) *Structure-function relationships of tachyplexins and their analogues*. John Wiley, New York.

Iwanaga, S., Kawabata, S. und Muta, T. (1997) New Types of Clotting Factors and Defense Molecules Found in Horseshoe Crab Hemolymph: Their Structures and Functions. *J. Biochem.*, **123**, 1-15.

Iwanaga, S. und Kawabata, S. (1998) Evolution and phylogeny of defense molecules associated with innate immunity in horseshoe crab. *Front. Biosci.*, **3**, D973-D984.

Jabs, A., Weiss, M.S. und Hilgenfeld, R. (1999) Non-proline *Cis* Peptide Bonds in Proteins. *J. Mol. Biol.*, **286**, 291-304.

- Jack, D.L., Klein, N.J. und Turner, M.W. (2001) Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. *Immunol. Rev.*, **180**, 86-99.
- Jancarik, J. und Kim, S.-H. (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.*, **24**, 409-411.
- Janeway Jr., C.A. und Medzhitov, R. (1998) Introduction: The role of innate immunity in the adaptive immune response. *Sem. Immunol.*, **10**, 349-350.
- Janeway Jr., C.A. (1989) Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **54**, 1-13.
- Janeway Jr., C.A. (2001) How the immune system works to protect the host from infection: A personal view. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 7461-7468.
- Jiang, H. und Kanost, M.R. (2000) The clip-domain family of serin proteinases in arthropods. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **30**, 95-105.
- Jones, T.A., Zou, J.-Y., Cowan, S.W. und Kjeldgaard, M. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst.*, **A 47**, 110-119.
- Kabsch, W. und Sander, C. (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen bonded and geometrical features. *Biopolymers*, **22**, 2577-2637.
- Kabsch, W. (1988) Automatic indexing of rotation diffraction patterns. *J. Appl. Cryst.*, **21**, 67-71.
- Kanost, M.R. (1999) Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Dev. Comp. Immunol.*, **23**, 291-301.

Kawabata, S., Muta, T. und Iwanaga, S. (1996) The Clotting Cascade and Defense Molecules Found in the Hemolymph of the Horseshoe Crab. In Söderhäll, K., Iwanaga, S. und Vasta, G.R. (eds.), *New Directions in invertebrate Immunology*, pp. 255-283.

Kawabata, S., Saito, T., Saeki, K., Toh, Y. und Iwanaga, S. (1997) cDNA Cloning, Tissue Distribution, and Subcellular Localization of Horseshoe Crab Big Defensin. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **378**, 289-292.

Kawabata, S., Beisel, H.-G., Huber, R., Bode, W., Gokudan, S., Muta, T., Tsuda, R., Koori, K., Kawahara, T., Seki, N., Mizunoe, Y., Wai, S.N. und Iwanaga, S. (2001) Role of Tachylectins in host defense of the japanese horseshoe crab tachypleus tridentatus. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **484**, 195-202.

Kawabata, S. und Iwanaga, S. (1999) Role of lectins in the innate immunity of horseshoe crab. *Dev. Comp. Immunol.*, **23**, 391-400.

Kawasaki, H., Nose, T., Muta, T., Iwanaga, S., Shimohigashi, Y. und Kawabata, S. (2000) Head-to-Tail Polymerization of Coagulin, a Clottable Protein of the Horseshoe Crab. *J. Biol. Chem.*, **275**, 35297-35301.

Kendrew, J.C., Dickerson, R.E., Strandberg, B.E., Hart, R.C. und Davies, D.R. (1960) Structure of myoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 2Å resolution. *Nature*, **185**, 422-427.

Knibbs, R.N., Osborne, S.E., Glick, G.D. und Goldstein, I.J. (1993) Binding Determinants of the Sialic Acid-specific Lectin from the Slug *Limax flavus*. *J. Biol. Chem.*, **268**, 18524-18531.

Knight, S.D. (2000) *RSPS* version 4.0: a semi-interactiv vector-search program for solving heavy-atom derivatives. *Acta Cryst.*, **D56**, 42-47.

Kraulis, P.J. (1991b) MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, **24**, 946-950.

Krem, M.M. und Di Cera, E. (2002) Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation. *TRENDS Biochem. Sci.*, **27**, 67-74.

Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. und Thornton, J.M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, **26**, 283-291.

Lavie, A., Allen, K.N., Petsko, G.A. und Ringe, D. (1994) X-Ray Crystallographic Structures of D-Xylose Isomerase Substrate Complexes Position the Substrate and Provide Evidence for Metal Movement during Catalysis. *Biochemistry*, **33**, 5469-5480.

Le, Y., Lee, S.H., Kon, O.L. und Lu, J. (1998) Human L-ficolin: plasma levels, sugar specificity, and assignment of its lectin activity to the fibrinogen-like (FBG) domain. *FEBS Lett.*, **425**, 367-370.

Leslie, A.G.W. (1991) Molecular data processing. In Moras, D., Podjarny, A.D. und Thierry, J.C. (eds.), *Crystallographic Computing 5*. Oxford University Press, Oxford, pp. 50-61.

Lewit-Bentley, A. und Réty, S. (2000) EF-hand calcium-binding proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 637-643.

Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J. und Wyns, L. (1998) Legume lectin structure. *Biochim. Biophys. Acta*, **1383**, 9-36.

Madrazo, J., Brown, J.H., Litvinovich, S., Dominguez, R., Yakovlev, S., Medved, L. und Cohen, C. (2001) Crystal structure of the central region of bovine fibrinogen (E<sub>5</sub> fragment) at 1.4-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 11967-11972.

Mammen, M., Choi, S.-K. und Whitesides, G.M. (1998) Polyvalente Wechselwirkung in biologischen Systemen: Auswirkungen auf das Design und die Verwendung multivalenter Liganden und Inhibitoren. *Angew. Chem.*, **110**, 2908-2953.

Martin, P.D., Robertson, W., Turk, D., Huber, R. und Bode, W. (1992) The structure of residues 7-16 of the A $\alpha$ -chain of human fibrinogen bound to bovine thrombin at 2.3 Å resolution. *J. Biol. Chem.*, **267**, 7911-7920.

Matthews, B.W. (1968) Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.*, **33**, 491-497.

Matsushita, M., Endo, Y., Taira, S., Sato, Y., Fujita, T., Ichikawa, N., Nakata, M. und Mizuochi, T. (1996) A Novel Human Serum Lectin with Collagen- and Fibrinogen-like Domains That Functions as an Opsonin. *J. Biol. Chem.*, **271**, 2448-2454.

Matsushita, M., Endo, Y. und Fujita, T. (2000) Complement-activating complex of ficolin and mannose-binding lectin associated serine protease. *J. Immunol.*, **164**, 2281-2284.

Matsushita, M. und Fujita, T. (2001) Ficolins and the lectin complement pathway. *Immunol. Rev.*, **180**, 78-85.

McDonald, N.Q., LaPatto, R., Murray-Rust, J., Gunning, J., Wlodawer, A. und Blundell, T.L. (1991) New Protein Fold revealed by a 2.3 Å resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature*, **354**, 411-417.

McPhalen, C.A., Strynadka, N.C. und James, M.N. (1991) Calcium binding sites in proteins: a structural perspective. *Adv. Protein Chem.*, **42**, 77-144.

McPherson, A. (1990) Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur. J. Biochem.*, **189**, 1-23.

McPherson, A. (1995) Increasing the size of microcrystals by fine sampling of pH limits. *J. Appl. Cryst.*, **28**, 362-365.

Meador, W.E., Means, A.R. und Quijoch, F.A. (1992) Target enzyme recognition by calmodulin: 2.4 Ångstrom structure of a Calmodulin-Peptide complex. *Science*, **257**, 1251-1255.



Medzhitov, R. und Janeway Jr., C. (2000a) Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol. Rev.*, **173**, 89-97.

Medzhitov, R. und Janeway Jr., C. (2000b) Innate immunity. *N. Engl. J. Med.*, **343**, 338-344.

Merrit, E.A. und Bacon, D.J. (1997) Raster3D: photorealistic molecular graphics. *Methods Enzymol.*, **277**, 505-524.

Mosesson, M.W., Siebenlist, K.R., Hainfeld, J.F. und Wall, J.S. (1995) The Covalent Structure of Factor XIIIa Crosslinked Fibrinogen Fibrils. *J. Struct. Biol.*, **115**, 88-101.

Muta, T., Hashimoto, R., Miyata, T., Nishimura, H., Toh, Y. und Iwanaga, S. (1990) Proclotting enzyme from horseshoe crab hemocytes. cDNA cloning, disulfide locations, and subcellular localization. *J. Biol. Chem.*, **265**, 22426-22433.

Muta, T., Miyata, T., Misumi, Y., Tokunaga, F., Nakamura, T., Toh, Y., Ikehara, Y. und Iwanaga, S. (1991) Limulus factor C. An endotoxin-sensitive serine protease zymogen with mosaic structure of complement-like, epidermal growth factor-like, and lectin-like domains. *J. Biol. Chem.*, **266**, 6554-6561.

Muta, T., Oda, T. und Iwanaga, S. (1993) Horseshoe crab coagulation factor B. A unique serine protease zymogen activated by cleavage of an Ile-Ile bond. *J. Biol. Chem.*, **268**, 21384-21388.

Muta, T., Seki, N., Takaki, Y., Hashimoto, R., Oda, T., Iwanaga, A., Tokunaga, F. und Iwanaga, S. (1995) Purified horseshoe crab factor G: reconstitution and characterization of the (1-3)- $\beta$ -D-glucan sensitive serine protease cascade. *J. Biol. Chem.*, **270**, 892-897.

Muta, T. und Iwanaga, S. (1996a) The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, **8**, 41-47.

- Muta, T. und Iwanaga, S. (1996b) Clotting and Immune Defense in Limulidae. In Rinkevich, B. und Mueller, W.E.G. (eds.), *Progress in Molecular and Subcellular Biology: Invertebrate Immunology*. Springer Verlag, Heidelberg, Vol. 15, pp. 154-189.
- Ohashi, T. und Erickson, H.P. (1998) Oligomeric Structure and Tissue Distribution of Ficolins from Mouse, Pig and Human. *Arch. Biochem. Biophys.*, **360**, 223-232.
- Okino, N., Kawabata, S., Saito, T., Hirata, M., Takagi, T. und Iwanaga, S. (1995) Purification, Characterization, and cDNA Cloning of a 27-kDa Lectin (L10) from Horseshoe Crab Hemocytes. *J. Biol. Chem.*, **270**, 31008-31015.
- Pal, D. und Chakrabarti, P. (1999) *Cis* Peptide Bonds in Proteins: Residues Involved, their Conformations, Interactions and Locations. *J. Mol. Biol.*, **294**, 271-288.
- Patthy, L. (1990) Evolution of blood coagulation and fibrinolysis. *Blood Coagul. Fibrin.*, **1**, 153-166.
- Perutz, M.F., Rossmann, M.G., Cullis, A.F., Muirhead, H., Will, G. und North, A.C.T. (1960) Structure of hemoglobin: a three dimensional fourier synthesis at 5.5 Å resolution, obtained by xray analysis. *Nature*, **185**, 416-422.
- Powell, H.R. (1999) The Rossmann Fourier autoindexing algorithm in *MOSFLM*. *Acta Cryst.*, **D 55**, 1690-1695.
- Pratt, K.P., Côté, H.C.F., Chung, D.W., Stenkamp, R.E. und Davie, E.W. (1997) The primary fibrin polymerization pocket: Three-dimensional structure of a 30-kDa C-terminal  $\gamma$  chain fragment complexed with the peptide Gly-Pro-Arg-Pro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 7176-7181.
- Ramachandran, G.N. und Sasisekharan, V. (1968) Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Protein Chem.*, **23**, 283-437.

Rao, S.P., Poojary, M.D., Elliott, B.W., Jr., Melanson, L.A., Oriel, B. und Cohen, C. (1991) Fibrinogen structure in projection at 18 Å resolution. Electron density by coordinated cryo-electron microscopy and X-ray crystallography. *J. Mol. Biol.*, **222**, 89-98.

Renner, M. (1984) *Kükenthals Leitfaden für das Zoologische Praktikum*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

Rini, J.M., Hardman, K.D., Einspahr, H., Suddath, F.L. und Carver, J.P. (1993) X-ray crystal structure of a pea lectin-trimannoside complex at 2.6 Å resolution. *J. Biol. Chem.*, **268** 10126-10132.

Rini, J.M. (1995) Lectin structure. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **24**, 551-577.

Rini, J.M. und Lobsanov, Y.D. (1999) New animal lectin structures. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9**, 578-584.

Roberts, D.L., Weix, D.J., Dahms, N.M. und Kim, J.-J.P. (1998) Molecular Basis of Lysosomal Enzyme Recognition: Three-Dimensional Structure of the Cation-Dependent Mannose 6-Phosphate Receptor. *Cell*, **93**, 639-648.

Saito, T., Kawabata, S., Shigenaga, T., Takayenoki, Y., Cho, J., Nakajima, H., Hirata, M. und Iwanaga, S. (1995a) A novel big defensin identified in horseshoe crab hemocytes: isolation, amino acid sequence and antimicrobial activity. *J. Biochem.*, **114**, 1131-1137.

Saito, T., Kawabata, S., Hirata, M. und Iwanaga, S. (1995b) A Novel Type of *limulus* Lectin-L6: Purification, primary structure and antibacterial activity. *J. Biol. Chem.*, **270**, 14493-14499.

Saito, T., Hatada, M., Iwanaga, S. und Kawabata, S. (1997) A Newly Identified Horseshoe Crab Lectin with Binding Specificity to O-antigen of Bacterial Lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.*, **272**, 30703-30708.

Seki, N., Muta, M., Oda, T., Iwaki, D., Kuma, K., Miyata, T. und Iwanaga, S. (1994) Horseshoe crab (1,3)- $\beta$ -D-glucan-sensitive coagulation factor G. A serin protease zymogen heterodimer with similarities to beta-glucan binding proteins. *J. Biol. Chem.*, **269**, 1370-1374.

Shieh, H.-S., Stallings, W.C., Stevens, A.M. und Stegeman, R.A. (1995) Using Sampling Techniques in Protein Crystallization. *Acta Cryst.*, **D51**, 305-310.

Shimizu, A., Nagel, G.M. und Doolittle, R.F. (1992) Photoaffinity labeling of the primary fibrin polymerization site: Isolation and characterization of a labeled cyanogen bromide fragment corresponding to  $\gamma$  chain residues 337-379. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 2888-2892.

Spraggon, G., Applegate, D., Everse, S.J., Zhang, J.-Z., Veerapandian, L., Redman, C., Doolittle, R.F. und Grieninger, G. (1998) Crystal structure of a recombinant  $\alpha_E$ C domain from human fibrinogen-420. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 9099-9104.

Spraggon, G., Everse, S.J. und Doolittle, R.F. (1997) Crystal structures of fragment D from human fibrinogen and its crosslinked counterpart from fibrin. *Nature*, **389**, 455-462.

Stormer, L. (1952) Phylogeny and taxonomy of fossil horseshoe crab. *J. Paleontol.*, **26**, 630-639.

Stubbs, M.T., Oschkinat, H., Mayer, I., Huber, R., Angliker, H., Stone, S.R. und Bode, W. (1992) The interaction of thrombin with fibrinogen. A structural basis for its specificity. *Eur. J. Biochem.*, **206**, 187-195.

Swarnakar, S., Asokan, R., Quigley, J.P. und Armstrong, P.B. (2000) Binding of  $\alpha_2$ -macroglobulin and limulin: regulation of the plasma haemolytic system of the American horseshoe crab, *Limulus*. *Biochem. J.*, **347**, 679-685.

Takahashi, N., Takahashi, Y. und Putnam, W.F. (1986) Primary structure of blood coagulation factor XIIIa (fibrinolygase, transglutaminase) from human placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8019-8023.

Takahashi, H., Tsuboyama, S., Umezawa, Y., Honda, K. und Nishio, M. (2000) CH/ $\pi$  Interactions as Demonstrated in the Crystal Structure of Host/Guest Compounds. A Database Study. *Tetrahedron*, **56**, 6185-6191.

Ten Eyck, L. (1985) Fast Fourier Transform calculation of electron density maps. *Methods. Enzymol.*, **115**, 324-337.

Tokunaga, F., Muta, T., Iwanaga, S., Ichinose, A., Davie, E.W., Kuma, K. und Miyata, T. (1993) Limulus hemocyte transglutaminase: cDNA cloning, amino acid sequence, and tissue localization. *J. Biol. Chem.*, **268**, 262-268.

Toh, Y., Mizutani, A., Tokunaga, F., Muta, T. und Iwanaga, S. (1991) Morphology of the granular hemocytes of the Japanese horseshoe crab *Tachypleus tridentatus* and immunocytochemical localization of clotting factors and antimicrobial substances. *Cell Tissue Res.*, **266**, 137-147.

Turner, M.W. (1996) Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol. Today*, **17**, 532-539.

Ugarova, T.P. und Yakubenko, V.P. (2001) Recognition of Fibrinogen by Leukocyte Integrins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **936**, 368-385.

Umezawa, Y. und Nishio, M. (1998a) CH/ $\pi$  Interactions in the Crystal Structure of Class I MHC Antigens and their Complexes with Peptides. *Bioorgan. Med. Chem.*, **6**, 2507-2515.

Umezawa, Y. und Nishio, M. (1998b) CH/ $\pi$  Interactions as Demonstrated in the Crystal Structure of Guanine-nucleotide Binding Proteins, Src Homology-2 Domains and Human Growth Hormone in Complex with their Specific Ligands. *Bioorgan. Med. Chem.*, **6**, 493-504.

Weis, W.I., Drickamer, K. und Hendrickson, W.A. (1992) Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. *Nature*, **360**, 127-134.

Weis, W.I. und Drickamer, K. (1994) Trimeric structure of a C-type mannose-binding protein. *Structure (London)*, **2**, 1227-1240.

Weis, W.I. und Drickamer, K. (1996) Structural Basis of Lectin-Carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 441-473.

Weis, W.I., Taylor, M.E. und Drickamer, K. (1998) The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol. Rev.*, **163**, 19-34.

Weiss, M.S., Jabs, A. und Hilgenfeld, R. (1998a) Peptide Bonds Revisited. *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 676.

Wilson, A. J. C. (1949) *Acta Cryst.*, **2**, 318-321.

Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J. und Mathison, J.C. (1990) CD14, a Receptor for Complexes of Lipopolysaccharide (LPS) and LPS Binding Protein. *Science*, **249**, 1431-1433.

Xu, X. und Doolittle, R.F. (1990) Presence of a vertebrate fibrinogen-like sequence in an echinoderm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2097-2101.

Yamazumi, K. und Doolittle, R.F. (1992) Photoaffinity labeling of the primary fibrin polymerization site: Localization of the label to  $\gamma$ -chain Tyr-363. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 2893-2896.

Yang, Z., Mochalkin, I., Veerapandian, L., Riley, M. und Doolittle, R.F. (2000a) Crystal structure of native chicken fibrinogen at 5.5-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 3907-3912.

Yang, Z., Mochalkin, I. und Doolittle, R.F. (2000b) A model of fibrin formation based on crystal structures of fibrinogen and fibrin fragments complexed with synthetic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 14156-14161.

Yee, V.C., Pratt, K.P., Côté, H.C.F., Le Trong, I., Chung, D.W., Davie, E.W., Stenkamp, R.E. und Teller, D.C. (1997) Crystal structure of a 30 kDa C-terminal fragment from the  $\gamma$  chain of human fibrinogen. *Structure (London)*, **5**, 125-138.