

Holger Stalz: Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des *Geodia cydonium* Agglutinins als Prototyp eines Galectins mit Typ II-CRD. 2001

Das Galectin des marinen Schwammes *Geodia cydonium* ist ein β -Galactoside bindendes Lectin mit einer Kohlenhydratbindungsdomäne vom Typ II und ähnelt in seinen strukturellen und funktionellen Eigenschaften dem Galectin-3 aus Wirbeltieren. Das extrazellulär lokalisierte Protein weist in der reduzierenden SDS-Gelelektrophorese drei distinkte Banden mit apparenten Massen der Monomere zwischen 13 und 16 kDa auf, deren Sequenzen sich durch Aminosäureaustausche unterscheiden. Die vollständige Primärstruktur der Monomere konnte durch PSD-MALDI-MS- und ESI-MS/MS-Sequenzierung ermittelt und die Aufspaltung in das distinkte Muster aufgeklärt werden. Entgegen früher publizierten Ergebnissen konnten die Monomeren als Allelvarianten eines Gens (LECT-1-Gen) identifiziert und die Existenz eines zweiten bindungsaktiven Galectins ausgeschlossen werden. Die Isolierung genomischer DNA aus Schwammmaterial ermöglichte die Expression der rekombinanten 13 und 15 kDa-Monomerspecies, wobei letztere sich als bindungsaktiv gegenüber potentiellen Bindungspartnern (Laminin) und Oligosacchariden zeigte und vergleichbare Affinitäten wie das native GCG-Protein aufwies.

Zur Aufklärung der kohlenhydratvermittelten domänenspezifischen Bindung des Galectin-3 an Elastasefragmente des Laminins wurde die N- Glykosylierung des C-terminalen E3-Fragments der α -Kette mit der des Gesamt-EHS-Laminins verglichen. Es konnten keine prinzipiellen Unterschiede festgestellt werden, jedoch enthält das E3-Fragment einen signifikant höheren Anteil an tetraantennaren N-Glykanen.

The galectin of the marine sponge *Geodia cydonium* is a member of the β -galactoside binding lectins with a type-II carbohydrate recognition domain. In its structural and functional properties it resembles the mammalian galectin-3. During SDS gel electrophoresis the extracellular fraction of the protein reveals a distinct pattern of the three monomeric bands with apparent masses of 13 to 16 kDa. On sequencing the complete proteins by PSD-MALDI-MS and ESI-MS/MS we found that these differences are due to specific exchanges in charged amino acid residues. Since there is only one gene (LECT-1), we have thus demonstrated these bands to be allelic gene products.

The isolation of genomic DNA from crude sponge material was initially hampered by the affinity of the siliceous sponge skeleton. These difficulties have been overcome and the gene cloned and expressed in *E. coli* yielding the species which appeared at the 13 and 15 kDa, respectively. The 15 kDa monomer bound oligosaccharides and extracellular glycoproteins typically involved in galectin interaction, revealing similar behaviour as the native GCG.

Carbohydrate mediated domain specific binding of galectin-3 to proteolytic fragments of EHS laminin was investigated by comparing the N-glycans located on the C-terminal E3 fragment of the α chain with those of the whole molecule. No principal differences were found, but the E3 fragment contains a significantly higher fraction of tetraantennary structures.