

Abstract

The dynamic nature of eukaryotic cell membranes requires constant degradation of complex membrane lipids to basic building blocks and the re-synthesis of new membrane constituents. The breakdown of complex lipids is carried out by the sequential action of soluble hydrolases in lysosomes, the acidic, catabolic compartments of the cell. Many of these enzymes require the presence of small non-enzymatic activator proteins for efficient processing of membrane-bound lipid substrates. The catabolism of glycosphingolipids, an important class of outer layer membrane lipids, is of special interest because the disruption of the sequential degradation pathway by genetic alterations is the cause of multiple inborn errors of metabolism, which are all characterised by an accumulation of catabolic intermediates resulting in fatal neurodegeneration. This work focuses on the structural characterisation of proteins from human glycosphingolipid degradation, the enzyme β -hexosaminidase and the sphingolipid activator proteins SapC and SapD.

β -Hexosaminidase is a lysosomal glycosidase with a broad substrate specificity. However, it is indispensable only for glycosphingolipid degradation, as demonstrated by its association with the fatal sphingolipid storage diseases Tay-Sachs and Sandhoff disease. The dimeric enzyme exists in three isoforms, HexA ($\alpha\beta$), HexB ($\beta\beta$) and HexS ($\alpha\alpha$), generated by combinations of two closely related monomers, α and β . In this work the X-ray crystal structure of HexB has been determined by the MIRAS method to 2.3Å resolution. On the basis of prior work on related bacterial enzymes and the crystal structure in complex with a transition-state analogue inhibitor determined here, the configuration-retaining double displacement mechanism of HexB is explained in detail.

The analysis of protein-protein interactions in the crystal reveals the dimeric structure of HexB at lysosomal pH and identifies Tyrosine 456 as pointing inwards the active site of the companion subunit, potentially mediating an intersubunit crosstalk affecting substrate specificity. The locations of mutations associated with Sandhoff disease indicate that unexpectedly many of these are destabilizing the dimerisation contact rather than affecting the active site directly. Near neutral pH HexB is a tetramer in solution as demonstrated by small-angle X-ray scattering. In contrast to the dimerisation interface the tetramerisation site is not conserved between the α - and β - subunits, thus tetramerisation provides the first explanation for the observed preference of β -chains for homooligomerisation over heterodimerisation with α -chains.

Diffraction-quality crystals have been obtained for the sphingolipid activator proteins SapC and SapD. The crystal structure of SapD has been determined by molecular replacement to 2.1Å resolution upon a change to a higher symmetry space group provoked by the iodination of SapD crystals. SapD crystallises in a closed, non-liganded conformation significantly different from those observed for the related SapB. In the crystal SapD binds sulfate from the crystallisation solution. The distribution of positively charged residues in SapD and the observed binding sites of sulfate, a structural analogue of phosphate, suggest a novel mode of binding of SapD to their primary interaction partners, anionic phospholipid-containing membranes, different from those described for related proteins, e.g. granulysin.

The results obtained provide a new understanding of certain genetic sphingolipid storage diseases and raise new questions regarding the mechanisms of catalysis at the interface of aqueous phase and lipid membranes.

Zusammenfassung

Die Dynamik der eukaryotischen Zellmembranen verlangt einen ständigen Abbau komplexer Membranlipide in ihre Grundbausteine und den Wiederaufbau neuer Membranbestandteile. Der Abbau komplexer Lipide erfolgt sequentiell durch lösliche Hydrolasen in Lysosomen, den sauren katabolischen Zellkompartimenten. Viele dieser Enzyme benötigen für die effiziente Umsetzung ihrer membranständigen Substrate kleine, enzymatisch nicht aktive Aktivatorproteine. Von besonderem Interesse ist der Abbauweg der Glykosphingolipide, da Unterbrechungen dieses Stoffwechselweges durch genetische Veränderungen zu angeborenen Stoffwechselstörungen führen, die durch eine Anhäufung von Abbauzwischenprodukten zu tödlicher Neurodegeneration führen. Das Thema der vorliegenden Arbeit ist die strukturelle Charakterisierung von Proteinen des menschlichen Glykosphingolipidabbaus, nämlich des Enzyms β -Hexosaminidase und der Sphingolipidaktivatorproteine SapC und SapD.

β -Hexosaminidase ist eine lysosomale Hydrolase mit breiter Substratspezifität. Sie ist jedoch nur für den Glykosphingolipidabbau essentiell, wie ihre Assoziation mit den Sphingolipid-Speicherkrankheiten Tay-Sachs- und Sandhoff-Krankheit zeigt. Das dimere Enzym kommt in drei Isoformen, HexA ($\alpha\beta$), HexB ($\beta\beta$) und HexS ($\alpha\alpha$), vor, die durch die Kombination zweier nahe verwandter Untereinheiten, α und β , entstehen. In dieser Arbeit wurde die Röntgenkristallstruktur von HexB mit der MIRAS-Methode bei 2,3Å Auflösung bestimmt. Auf der Grundlage früherer Studien und der hier bestimmten Struktur im Komplex mit einem Übergangszustands-analogen Inhibitor, wird der konfigurationserhaltende doppelte Verdrängungsmechanismus von HexB im Detail erklärt.

Die Analyse der Protein-Protein-Wechselwirkungen im Kristall offenbart die dimere Struktur von HexB bei lysosomalem pH. Im Dimer ist vermutlich Tyrosin 456 an der wechselseitigen Beeinflussung der Substratspezifität der Untereinheiten beteiligt. Aus der Lage der mit der Sandhoff-Krankheit assoziierten Mutationen läßt sich unerwarteter Weise darauf schließen, dass diese eher die notwendige Dimerisierung als direkt das katalytische Zentrum beeinträchtigen. Kleinwinkel-Röntgenstreuungsexperimente zeigen, dass HexB bei annähernd neutralem pH als Tetramer vorliegt. Im Gegensatz zur Dimerkontaktfläche ist die Tetramerisierungsfläche nicht zwischen den α - und β -Untereinheiten konserviert. Die auftretende Tetramerisierung bietet daher die erste Erklärung für die gegenüber der Heterodimerisierung mit der α -Untereinheit bevorzugte Homooligomerisierung der β -Untereinheit.

Von den Sphingolipidaktivatorproteinen SapC und SapD wurden für Röntgenexperimente taugliche Kristalle erhalten. Die Kristallstruktur von SapD konnte nach einer durch Iodierung der Kristalle ausgelösten Raumgruppenänderung durch Molekularen Ersatz gelöst werden. SapD kristallisiert in einer ligandenfreien Konformation, die sich deutlich von der Kristallstruktur des verwandten SapB unterscheidet. Im Kristall bindet SapD Sulfat aus der Kristallisationslösung. Die Verteilung positiv geladener Reste und in SapD und die beobachteten Bindungsstellen des Phosphat-analogen Sulfat zeigen an, dass SapD in einer anderen Art mit seinen primären Bindungspartnern, anionischen Phospholipidmembranen, interagiert als verwandte Proteine, z.B. Granulysin.

Die gewonnenen Erkenntnisse erlauben ein neues Verständnis bestimmter erblicher Sphingolipid-Speicherkrankheiten und werfen neue Fragen zum Mechanismus der Katalyse an der Grenzfläche zwischen wässrigem Milieu und Lipidmembranen auf.