

## 1 Einleitung

Unter der Vielzahl von Krankheiten, die die Gesundheit des Menschen bedrohen, nehmen Erbkrankheiten eine besondere Rolle ein, da sie als einzige von Generation zu Generation weitergegeben werden und von Geburt an die zukünftige Entwicklung der Betroffenen bestimmen. Sie entstehen im Gegensatz zu anderen genetisch bedingten Krankheiten nicht durch die Veränderung des Erbguts von Körperzellen sondern nur durch solche in Keimzellen. Die Auswirkungen und Arten der Beeinflussung des Erbgutes können sich dabei stark unterscheiden. So beruht das Down-Syndrom auf der Verdreifachung des ganzen Chromosoms 21 oder eines Teils davon, während die Sichelzellerkrankheit, bei der aggregierender roter Blutfarbstoff (Hämoglobin) zu einer hämolytischen Anämie führt, durch eine einzelne Punktmutation verursacht wird. Neben Störungen von Regulationsprozessen, wie den erblichen Krebsformen, oder der Rezeptionsfähigkeit bei Rot-Grün-Blinden, bilden die erblichen Stoffwechselstörungen eine zahlen- und bedeutungsmäßig große Untergruppe der Erbkrankheiten.

### 1.1 Erbliche Stoffwechselstörungen

Erstmals wurde eine angeborene Stoffwechselstörung des Menschen, die Alkaptonurie, im Jahre 1904 von Archibald E. Garrod als solche erkannt. Seitdem wurden mehr als 500 weitere angeborene Stoffwechselstörungen beschrieben, die zusammen ungefähr ein bis zwei Prozent aller Neugeborenen weltweit betreffen (Baric et al., 2001). Obwohl also das kumulative Auftreten angeborener Stoffwechselstörungen hoch ist, sind die individuellen Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten einzelner Krankheiten eher gering und bewegen sich in einem Bereich von 0,2% für die familiäre Hypercholesterinämie bis zu 0,00034% für die Ahornsirupkrankheit. Die Auftretenswahrscheinlichkeit der einzelnen Störungen schwankt dabei stark zwischen einzelnen ethnischen Gruppen (Martins, 1999).

Die erblichen Stoffwechselerkrankungen werden typischerweise durch den Verlust der katalytischen Aktivität eines oder mehrerer spezifischer Enzyme verursacht. Dadurch kommt es zu Mangelzuständen an Synthesewegsstufen lebenswichtiger Substanzen, zum Fehlen einzelner Stoffwechselprodukte oder zu einer Anreicherung von Zwischen- oder Abbauprodukten, die entweder selbst toxisch wirken oder durch alternative Wege des Stoffwechsels in toxische Produkte umgewandelt werden. Als Grund für einen Mangel an katalytischer Aktivität kommt hierbei nicht nur eine Mutation in Frage, die direkt das entsprechende Enzym betrifft; vielmehr können auch Defekte von Aktivatorproteinen, der Synthese von Cofaktoren, des Proteintransports, von Trägersystemen oder Mechanismen zur spezifischen Markierung und Modifizierung von Proteinen die eigentliche Ursache darstellen (Waber, 1990). Für einzelne Stoffwechselstörungen sind dabei nur selten jeweils einzelne, bestimmte genetische Veränderungen verantwortlich. Weitaus häufiger existieren eine ganze Reihe von verschiedenartigen Mutationen wie Deletionen, Insertionen, Leserasterverschiebungen und Punktmutationen, die im Einzelfall die Ursache für den Verlust der Aktivität ein und desselben Enzyms darstellen. Ein besonders auffälliger Fall ist die Phenylketonurie, für die mehr als 400 verschiedene verursachende Mutationen im Phenylalanin-Hydroxylase-Gen bekannt sind

(Baric et al., 2001). Die Diagnose einzelner erblicher Stoffwechselstörungen wird durch ihr seltenes Auftreten sowie das oft erst späte Eintreten von Symptomen erschwert. Auch eine molekularbiologische Diagnostik ist in den Fällen, in denen zahlreiche verschiedene Mutationen für einen Defekt verantwortlich sein können, nicht trivial. Die erfolgreichsten Reihentestverfahren beruhen momentan auf massenspektrometrischen Analysen von krankheitstypischen Anreicherungs- oder Mangelprodukten im Serum Neugeborener (Clayton, 2001).

---

## Angeborene Stoffwechselerkrankungen

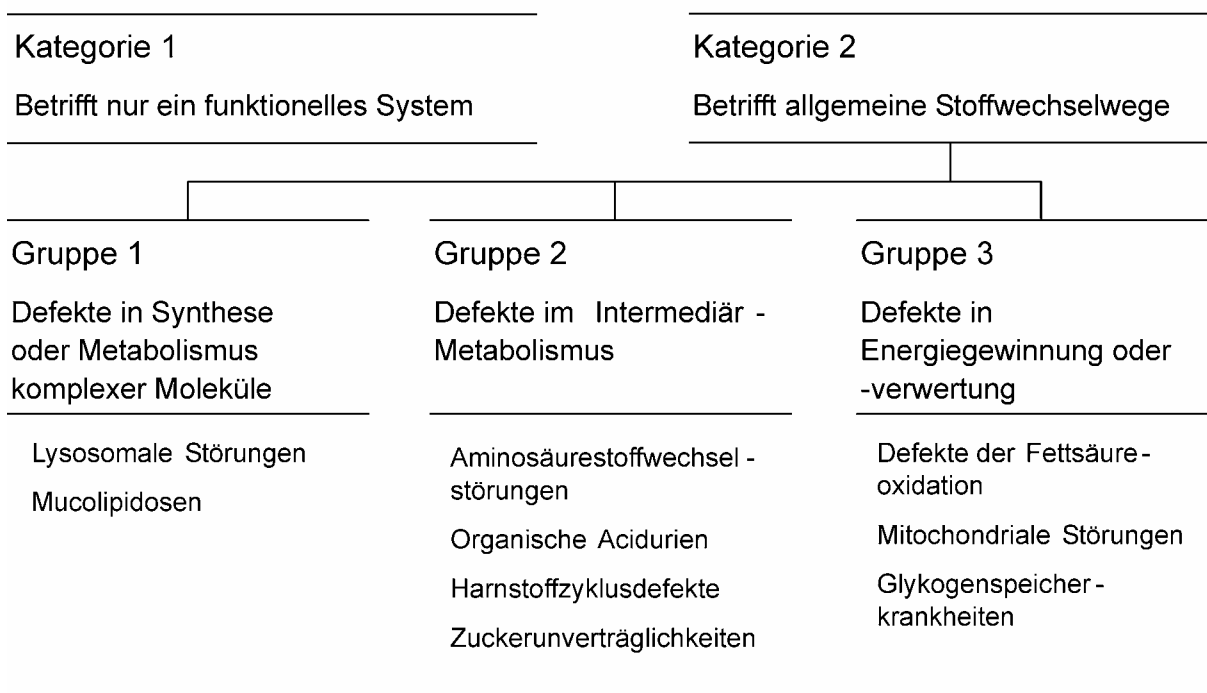


Abbildung 1: Klassifizierung von erblichen Stoffwechselstörungen. Darstellung nach Saudubray und Charpentier (1995).

Eine systematische Klassifizierung erblicher Stoffwechselstörungen wurde von Saudubray und Charpentier (1995) vorgeschlagen. Sie teilen die Defekte danach ein, ob sie nur einzelne funktionelle Systeme (Kategorie 1) oder für viele Organe bedeutsame, allgemeine Stoffwechselwege (Kategorie 2) betreffen. Eine weitere Untergliederung der zweiten Kategorie erfolgt danach, ob der defekte Stoffwechselschritt der Synthese oder dem Katabolismus komplexer Moleküle (Gruppe 1), dem Intermediärmetabolismus (Gruppe 2) oder der Energiegewinnung oder -verwertung (Gruppe 3) dient (Abbildung 1).

## 1.2 Glykosphingolipide

Sphingolipide sind wesentliche Bestandteile der Zellmembranen höherer Lebewesen. Sie leiten sich vom Aminoalkohol Sphingosin und seinen N-Acylfettsäurederivaten, den Ceramiden, ab. Ceramide selbst kommen nur in geringsten Anteilen in Zellmembranen vor, bilden aber die Grundsubstanz der häufigeren Sphingophospholipide und Sphingoglykolipide. Die häufigsten Sphingophospholipide, die Sphingomyeline, werden durch Veresterung von Phosphocholin oder Phosphoethanolamin mit Ceramiden gebildet, während die Glykosphingolipide an gleicher Stelle einen Saccharidanteil als sogenannte Kopfgruppe tragen.

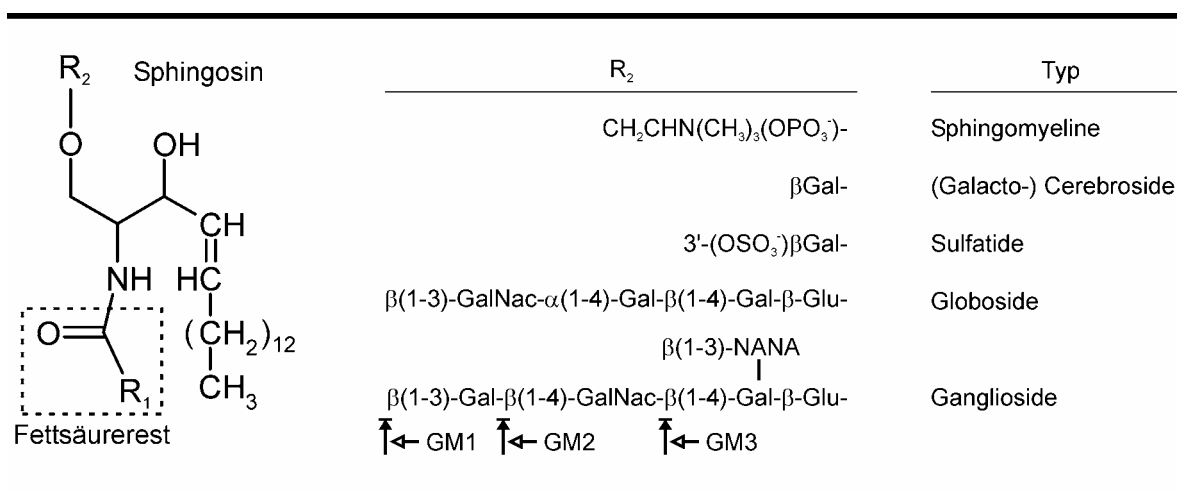


Abbildung 2: Chemische Strukturen wichtiger Sphingolipide. Links ist die Grundstruktur der aus Sphingosin und Fettsäurerest bestehenden Ceramide gezeigt. Rechts werden die zur Klassifizierung führenden Substituenten genannt.

Dieser besteht in den Cerebroside als einfachsten Sphingoglykolipiden nur aus einem Monosaccharid, umfasst jedoch in den Globosiden und den Sialinsäure-haltigen Gangliosiden auch komplexere Oligosaccharide (Abbildung 2). Die Glykosphingolipide sind vor allem im äußeren Blatt der Plasmamembran eukaryotischer Zellen lokalisiert. Sie dienen als Bindungsstellen für Bakterien, Viren und Toxine und sind an Zell-Zell-Wechselwirkungen beteiligt (Holmgren et al., 1975; Karlsson, 1989; Markwell et al., 1981). Die Glykosphingolipid-Verteilung in der Zellmembran ist zelltypspezifisch und ändert sich während der Zelldifferenzierung und bei der Transformation zu Krebszellen (Hakomori und Kannagi, 1983; Zeller und Marchase, 1992). Mäuseembryonen mit defekter Glykosphingolipid-Biosynthese sind nicht lebensfähig und sterben am Tag 7,5 der Embryogenese während Maus-B16-Melanoma-Zellen mit gleichem Defekt in Kultur lebensfähig sind. Dies lässt auf eine besondere Bedeutung der Glykosphingolipide für mehrzellige Organismen und deren Entwicklung schließen (Bierfreund et al., 1999; Ichikawa et al., 1994; Yamashita et al., 1999).

Als Bestandteile der ständig erneuerten Zellmembran werden Glykosphingolipide konstitutiv synthetisiert und abgebaut. Für den Abbau gelangen sie über Endocytose und vesikulären

Transport über Endosomen schließlich in die Lysosomen, wo sie im Lumen auf der Außenseite von intralysosomalen Vesikeln präsentiert werden. Luminale wasserlösliche Exohydrolasen bauen dann die Kopfgruppen der Glykosphingolipide sequentiell ab, so dass die Grundbausteine nach einer Aktivierung erneut verwertet werden können (Fürst und Sandhoff, 1992). Für den Abbau von Glykosphingolipiden, deren terminale Zucker vor dem Zugriff der Exohydrolasen geschützt sind, weil sie nicht weit genug in die wässrige Phase hineinreichen, werden sogenannte Aktivator-Proteine benötigt (Abbildung 3). Mittlerweile sind fünf solche Proteine bekannt: Die Sphingolipid-Aktivatorproteine A, B, C und D, kurz SapA, -B, -C und -D entstehen durch Proteolyse aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein, dem Prosaposin, und weisen einige gemeinsame strukturelle Merkmale auf. Sie unterscheiden sich grundlegend vom Gangliosid M2-Aktivator Protein (GM2AP), das eine  $\beta$ -Fasstruktur besitzt (Wright et al., 2000).

### **1.3 Glykosphingolipid-Speicherkrankheiten**

Da der Abbau der Glykosphingolipide streng sequentiell erfolgt, führt der Ausfall bereits eines Enzyms zu einer Blockierung der gesamten Abbaukaskade. Alle Substanzen werden nur bis zu dem blockierten Schritt abgebaut und das Substrat des defekten Enzyms reichert sich intralysosomal an, weswegen die entsprechenden Defekte als Glykosphingolipid-Speicherkrankheiten bezeichnet werden. Die Akkumulation der Zwischenprodukte führt bei diesen Krankheiten zu einer Schädigung der betroffenen Zellen und schließlich zum Zelltod. Beim Menschen sind zahlreiche Glykosphingolipid-Speicherkrankheiten bekannt, die bis auf einen alle Schritte des Glykosphingolipid-Abbaus betreffen (Abbildung 3).

Die einzelnen Krankheiten unterscheiden sich deutlich in ihren Symptomen, führen aber in den meisten Fällen noch im Kindesalter zum Tod der Betroffenen. In weniger schweren Fällen ist oftmals eine gewisse Restaktivität des jeweiligen Enzyms vorhanden, betroffene Patienten erreichen in diesen Fällen sogar das Erwachsenenalter. Das klinische Bild wird vor allem von starker Neurodegeneration bestimmt, daneben finden sich bei den einzelnen Krankheiten zahlreiche weitere Symptome. Die Dominanz der cerebralen Symptome beruht darauf, dass Glykosphingolipide im zentralen Nervensystem besonders stark vertreten sind. So lässt sich auch die Bezeichnung Ganglioside für sialylierte Glykosphingolipide auf deren häufiges Vorkommen in Ganglien, den verdickten, kapselumschlossenen Nervenknotten der Hirnnerven und des Rückenmarks, zurückführen.

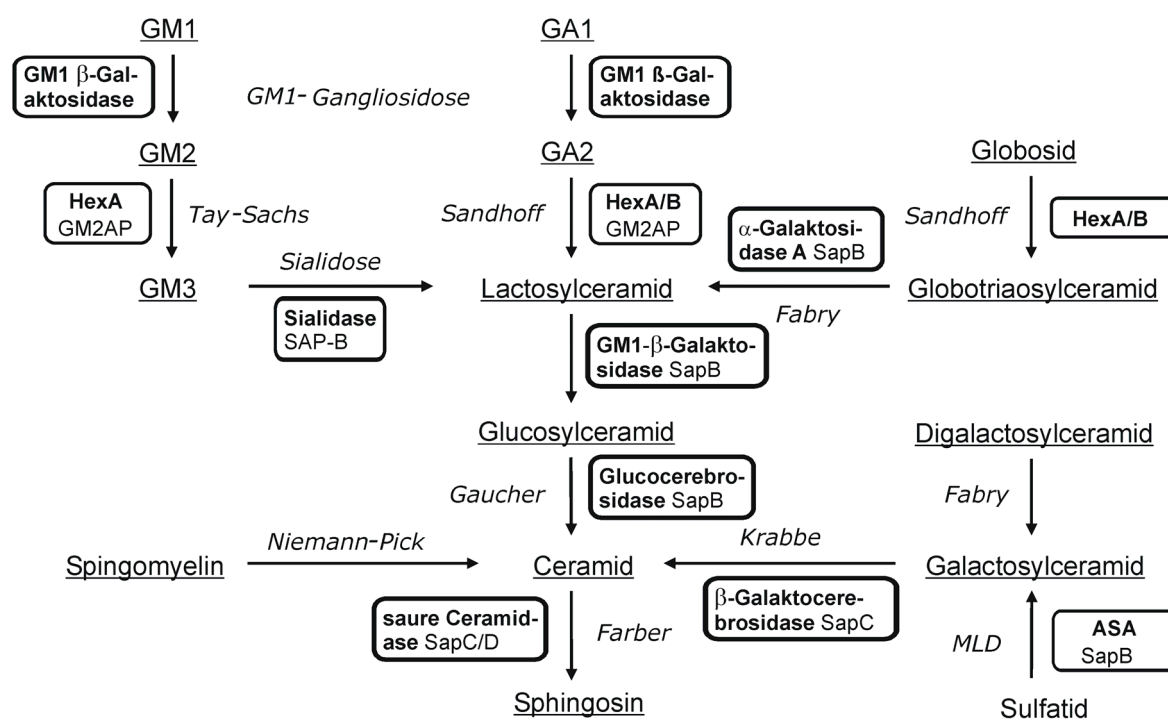


Abbildung 3: Defekte des Sphingolipid-Abbaus. Die einzelnen Metabolite sind unterstrichen, die Namen der mit dem jeweiligen Abbauschritt verbundenen Erbkrankheiten kursiv, die der beteiligten Proteine umrandet dargestellt. Verwendete Abkürzungen: MLD: Metachromatische Leukodystrophie, ASA: Arylsulfatase A, Hex: Hexosaminidase, GM2AP: GM2-Aktivatorprotein, Sap: Sphingolipid-Aktivatorprotein.

## 1.4 β-Hexosaminidase und GM2-Gangliosidosen

Einer der ersten Schritte des Glykosphingolipid-Abbaus, die Abspaltung eines terminalen  $\beta$ -(1,4)-verknüpften N-Acetyl-Galactosamin-Restes (GalNAc), wird von dem lysosomalen Enzym  $\beta$ -Hexosaminidase (Hex) (EC 3.2.1.52) katalysiert. Dieses dimere Enzym ist aus zwei Untereinheiten,  $\alpha$  und  $\beta$ , aufgebaut. Die beiden Untereinheiten, die von den Genen *HEXA* und *HEXB* kodiert werden, sind in ihrer Aminosäuresequenz zu ca. 60% identisch (Proia, 1988). Durch verschiedene Kombinationen beider Untereinheiten entstehen drei Isoformen der Hexosaminidase: das heterodimere HexA ( $\alpha\beta$ ) sowie die homodimeren HexB ( $\beta\beta$ ) und HexS ( $\alpha\alpha$ ) (Gravel et al., 2001). Alle drei Isoformen besitzen unterschiedliche Substratspezifitäten und erfüllen daher eine jeweils eigene Aufgabe im Stoffwechsel.

### 1.4.1 GM2-Gangliosidosen: Tay-Sachs- und Sandhoff-Krankheit

Die Tay-Sachs-Krankheit wurde erstmals 1881 von dem britischen Augenarzt Warren Tay beschrieben und ist damit die am längsten bekannte Glykosphingolipid-Speicherkrankheit. Er beschrieb sie als „infantile amaurotische Idiotie“, die durch Blindheit, verlangsamtes Wachstum, motorische Störungen und einen vergrößerten Kopf gekennzeichnet sei und im Alter von

drei bis fünf Jahren zum Tode führe (Tay, 1881). Der amerikanische Neurologe Bernard Sachs bemerkte das aufgeblähte Zytoplasma in den Neuronen der betroffenen Patienten und auch die starke Verbreitung der Krankheit unter der jüdischen Bevölkerung und prägte daher die Bezeichnung „familiäre amaurotische Idiotie“ (Sachs, 1887). Erst viel später wurde das Speicheranmaterial, das zum Anwachsen der Zellen führt, als Gangliosid GM2 identifiziert (Svennerholm, 1962) und strukturell charakterisiert (Makita und Yamakawa, 1963), so dass die Basis für ein molekulares Verständnis der Tay-Sachs-Krankheit gegeben war. Der betroffene Schritt ist der Abbau des Gangliosids GM2 zu GM3, der nur von der Hexosaminidase-Isoform HexA unter der Beteiligung des Aktivatorproteins GM2AP katalysiert wird. Der Defekt beruht dabei auf Mutationen im Gen *HEXA*, die in einem Fehlen aktiver  $\alpha$ -Untereinheiten resultieren. Bei Tay-Sachs-Patienten sind daher die  $\beta$ -Hexosaminidase-Isoformen HexA und HexS vollständig inaktiv, HexB als  $\beta_2$ -Homodimer ist dagegen intakt und aktiv (eine aktuelle Übersicht über die GM2-Gangliosidosen gibt Gravel et al. (2001).

Durch Defekte der kodierenden Gene für die  $\beta$ -Untereinheit der Hexosaminidasen und des Aktivatorproteins GM2AP entstehen die nahe verwandten Speicherkrankheiten Sandhoff-Krankheit bzw. GM2-Aktivatorprotein-Defizienz, die durch eine der Tay-Sachs-Krankheit sehr ähnliche Pathologie gekennzeichnet sind; allerdings wird hier nicht nur das Hirn, sondern auch die inneren Organe geschädigt. Alle drei Krankheiten werden zusammen als GM2-Gangliosidosen bezeichnet. Im Falle der Sandhoff-Krankheit führt das Fehlen der  $\beta$ -Untereinheit zu einem Defekt sowohl von HexA als auch von HexB, also von beiden am Glykosphingolipid-Abbau beteiligten Isoformen; daher wird diese Krankheit auch als 0-Variante der GM2-Gangliosidosen bezeichnet.

Bei allen drei GM2-Gangliosidosen besteht eine große Bandbreite an klinischen Phänotypen, die von frühkindlichen, schnell fortschreitenden neurodegenerativen Formen, die vor dem Alter von vier Jahren zum Tode führen, bis zu subakuten, spät-einsetzenden oder chronischen Formen mit deutlich milderem Verlauf reicht. Chronische Verlaufsformen äußern sich dabei durch Symptome wie Psychosen und progressive Dystonie. Heterozygote Träger der entsprechenden Defekte bleiben prinzipiell asymptomatisch, die GM2-Gangliosidosen werden demnach autosomal rezessiv vererbt. In der allgemeinen Bevölkerung wird die Frequenz heterozygoter Mutationen auf 0,006 im *HEXA* Gen und auf 0,0036 im *HEXB* Gen geschätzt. Die Zahl der Träger liegt aber in einigen Bevölkerungsgruppen, vor allem solchen jüdischer Abstammung, deutlich höher. Zur Zeit gibt es keine spezifische Therapie gegen GM2-Gangliosidosen. In Tiermodellen und Zellkulturen werden verschiedene Ansätze wie die Enzyersatz- oder Gentherapie erprobt, weitere Möglichkeiten liegen in der Transplantation von neuronalen Vorläufer-Stammzellen.

### 1.4.2 Biosynthese und Prozessierung der $\beta$ -Hexosaminidase

Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten der Hexosaminidase, kodiert von den Genen *HEXA* und *HEXB*, werden als Vorläuferproteine synthetisiert. Sie durchlaufen den sekretorischen und lysosomalen Transportweg und werden dabei posttranslational modifiziert. Während des Imports in

das endoplasmatische Retikulum (ER) werden die N-terminalen hydrophoben Signalsequenzen entfernt, und die Oligosaccharyltransferase überträgt vorsynthetisierte Oligosaccharide von einem Dolichol-verknüpften Träger auf die N-Glykosylierungsstellen der Proteine. Der  $\alpha$ -Kette-Vorläufer trägt drei Glykosylierungsstellen (Weitz und Proia, 1992), der Vorläufer der  $\beta$ -Kette besitzt vier Glykosylierungsstellen (Schuette et al., 2001). Im ER findet auch die Dimerisierung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten zu den drei Isoformen HexA ( $\alpha\beta$ ), HexB ( $\beta\beta$ ) und HexS ( $\alpha\alpha$ ) statt. Diese Dimerisierung ist essentiell für die katalytische Aktivität der Hexosaminidasen. Die Dimerisierung zweier  $\beta$ -Ketten zu HexB verläuft dabei deutlich schneller als die von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit oder die zweier  $\alpha$ -Untereinheiten, für die mehrere Stunden benötigt werden (Proia et al., 1984; Sonderfeld-Fresko und Proia, 1988). Einzelne, nicht-dimere Untereinheiten werden im ER zurückgehalten. Im Golgi-System werden die dimeren Proproteine dann für den Transport in die Lysosomen mit Mannose-6-Phosphat markiert. In den Lysosomen findet eine erneute Prozessierung der Glykanstrukturen der Glykoproteine statt, darüber hinaus werden sie auch proteolytisch prozessiert. Dabei werden die Reste 75-89 aus der  $\alpha$ -Kette und die Reste 108-121 sowie 312-315/316 aus der  $\beta$ -Kette ausgeschnitten (Abbildung 4).

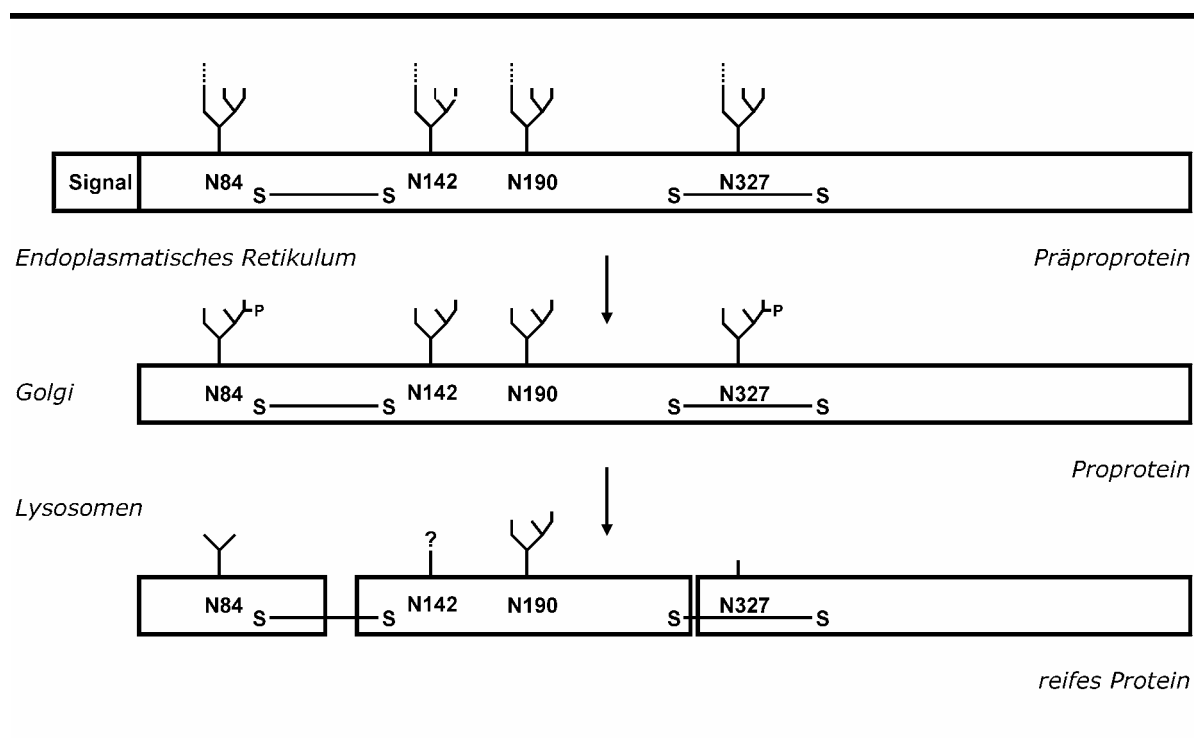


Abbildung 4: Prozessierung und posttranslationale Modifikationen von HexB. Nicht dargestellt ist die im endoplasmatischen Retikulum stattfindende Dimerisierung.

Die verbleibenden Fragmente sind in beiden Fällen über Disulfidbrücken miteinander verknüpft. Diese proteolytische Prozessierung ist weder nötig für die katalytische Aktivität noch verändert sie diese (Gravel et al., 2001).

### 1.4.3 Substratspezifität und katalytische Aktivität der $\beta$ -Hexosaminidase

Wie die meisten lysosomalen Enzyme besitzt die  $\beta$ -Hexosaminidase eine breite Substratspezifität; die einzigen Anforderungen an das Substrat sind seine sterische Zugänglichkeit, die Art des terminalen nicht-reduzierenden Zuckers (N-Acetylglucosamin oder N-Acetylgalactosamin) und die  $\beta$ -glykosidische Verknüpfung dieses Restes. Die Natur des Aglykon-Anteils der Substrate ist für die Aktivität unwichtig, solange der terminale Zucker zugänglich bleibt. Dennoch ist die  $\beta$ -Hexosaminidase im menschlichen Organismus lediglich für den Abbau der Glykosphingolipide unverzichtbar, wie die Pathologie der GM2-Gangliosidosen zeigt. Jede Untereinheit der dimeren  $\beta$ -Hexosaminidasen besitzt ein aktives Zentrum, jedoch unterscheiden sich die aktiven Zentren der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit in ihrer Substratspezifität. Die  $\beta$ -Untereinheit hydrolysiert vorwiegend neutrale Substrate wie das Modellsubstrat 4-Methylumbelliferyl-2-acetamido-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosid (MUG), die  $\alpha$ -Untereinheit darüber hinaus auch negativ geladene Substrate wie 4-Methylumbelliferyl-6-sulfo-2-acetamido-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranosid (MUGS) oder das natürlich vorkommende GlcNAc-6-Sulfat aus Keratansulfaten (Kytzia und Sandhoff, 1985). Während HexB auch das Gangliosid-Substrat GA2 ohne die Mitwirkung weiterer Coaktivatoren hydrolysiert, sind die Isoformen HexA und HexS für den Abbau des Gangliosids GM2 bzw. des sulfatierten Glykosphingolipids SM2 auf die Mitwirkung des GM2AP angewiesen. Das GM2AP bildet mit HexA und Gangliosid GM2 einen nachweisbaren ternären Komplex aus, doch ist kein Substrat der HexB bekannt, dessen Abbau durch GM2AP aktiviert würde (Meier et al., 1991; Yadao et al., 1997). Die natürlichen Substrate und die spezifische Aktivität von HexS sind nicht genau bekannt, da diese Isoform sowohl in verschiedenen Geweben als auch bei rekombinanter Expression instabil ist (Kytzia und Sandhoff, 1985). Die Hauptsubstrate scheinen allerdings weniger Membranlipide als vielmehr Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Glykosaminoglykane zu sein (Hepbildikler et al., 2002).

### 1.4.4 Struktur und Mechanismus der $\beta$ -Hexosaminidase

Die von der  $\beta$ -Hexosaminidase katalysierte Hydrolyse der glykosidischen Bindung läuft unter Erhaltung der Konfiguration des anomeren C1-Atoms des Substrates ab. In den meisten Glykosylhydrolasefamilien beruht eine solche Stereoselektivität auf einer spezifischen Anordnung zweier Aminosäuren in der Nähe des Substrates: Eine Aminosäure wirkt dabei als Protonen-Donor, der das glykosidische O-Atom protoniert, ein zweiter Aminosäurerest fungiert als anionischer Stabilisator für den positiv geladenen Übergangszustand (Gravel et al., 2001). Nur wenige Glykosylhydrolase-Familien verwenden andere Mechanismen, so z.B. die Familie 4, die ein Molekül Nicotinamidadenindinucleotid (NAD<sup>+</sup>) und zweiwertige Metallionen als Cofaktoren benötigt (Lodge et al., 2003). Auch einige Enzyme aus der Familie 20, zu der die Hexosaminidase aufgrund ihrer Sequenzhomologie gezählt wird, besitzen einen unüblichen substratvermittelten doppelten Verdrängungsmechanismus, bei dem ein Teil des Substrats als Nukleophil das anomere C1-Atom angreift (Mark et al., 2001; Prag et al., 2000). Auf der Basis der Röntgenstruktur einer bakteriellen Chitobiase aus dem Organismus *Serratia marcescens* (SmChb), die in ihrer Sequenz zu 22% identisch mit der  $\beta$ -Untereinheit ist, wurde ein Homolo-



giemodell für einen Teil der Hexosaminidase-Struktur erstellt. Dieses Homologiemodell unterstützt die Vermutung eines konservierten Mechanismus innerhalb der Familie 20 der Glykosylhydrolasen und identifiziert Glu355 als allgemeinen Säure-Base-Katalysator (Tews et al., 1996). Gemäß dieses Homologiemodells besteht die  $\beta$ -Hexosaminidase aus zwei Domänen, einer kleineren N-terminalen, deren Struktur nicht vorhergesagt werden konnte und einer größeren C-terminalen, die ein  $(\beta\alpha)_8$ -Fass bildet. Verschiedene Mutagenese- und Markierungsstudien konnten eine herausgehobene Bedeutung von Glu355 für die katalytische Aktivität der Hexosaminidase bestätigen (Liessem et al., 1995; Pennybacker et al., 1997). Da SmChb und eine weitere strukturell charakterisierte bakterielle Glykosylhydrolase der Familie 20, die Hexosaminidase aus *Streptomyces plicatus* (SpHex), monomere Enzyme sind, lässt das beschriebene Homologiemodell keine Aussage über die Dimerstruktur der  $\beta$ -Hexosaminidase zu.

### 1.5 Sphingolipid-Aktivatorproteine

Die Sphingolipid-Aktivatorproteine (Sap-Proteine) bilden eine Familie kleiner, hitzestabiler Proteine, die *in vivo* für den lysosomalen Glykosphingolipid-Abbau essentiell sind. Die vier Proteine SapA, -B, -C und -D werden durch limitierte Proteolyse aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein, dem Prosaposin, erhalten (Reiner et al., 1989). Die Sap-Proteine sind durch eine Sequenzkonservierung von ca. 60% gekennzeichnet, wobei die Lage von sechs Cysteinresten und deren Verknüpfung zu drei Disulfidbrücken invariant ist (Vaccaro et al., 1995). Alle Sap-Proteine besitzen ein oder zwei N-Glykosylierungsstellen, doch nicht-glykosylierte Proteine sind *in vitro* vollständig aktiv und stabil (Fujibayashi und Wenger, 1986a; Fujibayashi und Wenger, 1986b; Hiraiwa et al., 1993; Morimoto et al., 1989; Qi et al., 1994; Sano und Radin, 1988). Aufgrund von Sekundärstrukturvorhersagen, spektroskopischen Messungen und der konservierten Lage von Disulfidbrücken ist anzunehmen, daß alle Sap-Proteine und eine Reihe Sap-ähnlicher amphipathischer Proteine wie NK-Lysin, Granulysin und das Oberflächen-assoziierte Protein B (surfactant associated protein B, SP-B) sowie pflanzliche Aspartat-Proteasen, einige porenbildende Peptide und eine Untereinheit der Acyloxyacyl-Hydrolase, konservierte  $\alpha$ -helikale Bündelstrukturen besitzen (Munford et al., 1995). Tatsächlich aber unterscheiden sich die bereits bestimmte NMR-Struktur des NK-Lysin (Liepinsh et al., 1997) und die Röntgenstruktur des Granulysin (Anderson et al., 2003) stark von der ebenfalls bekannten Röntgenstruktur des SapB (Ahn et al., 2003) durch eine Scharnier-Drehbewegung zweier  $\alpha$ -Helices, die in dramatischen Änderungen der Tertiärstruktur resultiert. Trotz der ähnlichen Sekundärstrukturanordnungen haben die Sap-ähnlichen Proteine jeweils eigene, spezifische Aufgaben *in vivo* (Munford et al., 1995). So spielt SP-B eine Rolle bei der schnellen Adsorption von Lipiden an Luft-Wasser-Grenzschichten, während NK-Lysin und Granulysin von T-Lymphocyten produzierte Proteine der Immunabwehr sind. Alle diese Proteine haben lediglich eine funktionelle Gemeinsamkeit, nämlich die Bindung oder Interaktion mit biologischen Lipid-Membranen. Für die Sap-ähnlichen Proteine werden verschiedene Interaktionsmöglichkeiten mit Membranen postuliert, dabei wird der Verteilung von geladenen und hydrophoben Bereichen an der Oberfläche dieser Proteine die entscheidende Rolle zugesprochen.

Ein wichtiger postulierter Mechanismus ist das Insertieren verschieden langer hydrophober, helikaler Bereiche der Proteine in biologische Membranen (Qi und Grabowski, 2001).

Die Sap-Proteine selbst sind *in vivo* unverzichtbar für den Glykosphingolipidabbau (Fürst und Sandhoff, 1992). Ein genetischer Defekt, der zum Fehlen des Prosaposins und damit aller Sap-Proteine führt, bedingt einen lethalen Phänotyp, der dem kombinierten Defekt lysosomaler Hydrolasen entspricht. Die physiologische Aufgabe der Sap-Proteine ist die Aktivierung von Substraten des lysosomalen Lipidstoffwechsels für den Abbau durch bestimmte Hydrolasen. SapA fungiert dabei als Coaktivator der sauren  $\beta$ -Glucosidase, SapB wird unter anderem von der Sialidase, der  $\alpha$ -Galaktosidase A und der Arylsulfatase A benötigt. SapC aktiviert die Substrate der Gluco- und der  $\beta$ -Galaktocerebrosidase sowie der sauren Ceramidase, die auch von SapD stimuliert wird. Dementsprechend führen erbliche Defekte der einzelnen Sap-Proteine zu den gleichen Krankheiten wie ein Verlust der von ihnen aktivierten Enzyme: Verluste von SapB oder -C führen zur Metachromatischen Leukodystrophie bzw. zur Gaucher-Krankheit.

### 1.6 Aufgabenstellung

Der Katabolismus der Glykosphingolipide ist aufgrund seiner Verbindung zu Erbkrankheiten physiologisch und biochemisch gut charakterisiert. Dennoch fehlen für viele Enzyme dieses Stoffwechselweges detaillierte strukturelle Informationen. Aufgrund dessen sind die verwendeten Katalysemechanismen, insbesondere der Einfluss der Lipid-Wasser-Grenzschicht bisher nicht verstanden. Dies gilt auch für die Abspaltung terminaler  $\beta$ -(1-4)-glykosidisch verknüpfter GalNAc/GlcNAc-Reste durch die Isoformen der Hexosaminidase. Dieser Hydrolyseschritt ist für den Abbau der Globoside, Ganglioside und der nicht-sialylierten Gangliosidanaloga gleichermaßen essentiell. Das Enzym Hexosaminidase, das diese Reaktion katalysiert, ist ein dimeres, aus zwei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) aufgebautes Enzym, das aufgrund der verschiedenen Kombinationen der Untereinheiten in drei verschiedenen Isoformen vorkommt. Die Untereinheiten in den einzelnen Isoformen zeigen verschiedene Spezifität, und nur zwei der drei Isoformen wechselwirken mit einem Aktivatorprotein, dem GM2AP. Das bisher vorhandene Homologiemodell für eine Domäne der Isoform HexB basiert auf der Struktur eines monomeren bakteriellen Enzyms mit nur ca. 22% Sequenzidentität. Es lässt keinerlei Rückschlüsse auf die Quartärstruktur der humanen Hexosaminidase und damit auch nicht auf die Wechselwirkung mit GM2AP oder die gegenseitige Beeinflussung zweier Untereinheiten im Dimer zu. Die aus dem Homologiemodell gezogenen Rückschlüsse auf den Mechanismus sind immer noch Objekt intensiver biochemischer Studien, die versuchen, die Plausibilität dieser Schlüsse zu belegen. Der Mechanismus ist von besonderem Interesse, da vermutet wird, dass es sich nicht um einen kanonischen Glykosylhydrolase-Mechanismus handelt. Das primäre Ziel dieser Arbeit ist daher die Bestimmung der Röntgenkristallstruktur der humanen  $\beta$ -Hexosaminidase, genauer der Isoform HexB.

Mittlerweile sind die Röntgenstruktur des SapB und des Granulysins sowie die NMR-Struktur des Sap-ähnlichen NK-Lysins bekannt. Trotz einer Sequenzähnlichkeit zwischen diesen Proteinen, die vergleichbar hoch ist wie die Ähnlichkeit unter den Sap-Proteinen, besitzen die

Moleküle dramatisch verschiedene Tertiärstrukturen, die durch eine Scharnier-Drehbewegung eines Helixpaares hervorgerufen werden. Die Informationen, die aus den beiden Strukturen erhalten werden können, reichen nicht aus, um die Mechanismen zu verstehen, die die unterschiedliche Substratspezifität und die verschiedenartigen Wechselwirkungen der Sap-Proteine mit Membranen zu erklären. Daher ist ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die Proteine SapA, -C, und -D einer strukturellen Untersuchung zuzuführen. Insgesamt werden damit neue Erkenntnisse zu sieben der 13 Schritte des Sphingolipid-Abbaus und damit auch zu bis zu sieben angeborenen Metabolismusstörungen erwartet.

### **1.7 Gliederung dieser Arbeit**

Die Ergebnisse dieser Arbeit gliedern sich in zwei Hauptabschnitte. Im ersten Teil werden die Arbeiten zur Strukturaufklärung der HexB vorgestellt. Dabei werden zunächst die Reinigung, Kristallisation sowie die Strukturbestimmung und -verfeinerung dargestellt. Die Auswertung der erhaltenen Röntgenstruktur schließt die Analyse der Wechselwirkung eines kokristallisierten Inhibitors mit HexB und den Strukturvergleich mit verwandten bakteriellen Enzymen ein. Basierend auf dieser Verwandtschaft wird der enzymatische Mechanismus von HexB diskutiert. Unter Zuhilfenahme einer Analyse der Kristallpackung und biochemischer Eigenschaften der Hexosaminidase wird die Struktur des physiologisch relevanten Dimers postuliert und in die Diskussion derjenigen Mutationen einbezogen, die bei Patienten verschiedene Formen der Sandhoff-Krankheit hervorrufen. Es werden Röntgen-Kleinwinkelstreuemessungen verwendet, um den Oligomerisierungszustand der HexB unter den Kristallisationsbedingungen zu überprüfen und die Ergebnisse dieser Studien werden zur Erklärung biochemischer Charakteristika der Hexosaminidase-Isoformen herangezogen.

In einem zweiten Abschnitt werden Arbeiten an den Sap-Proteinen behandelt. Hierbei wird die Expression von SapC und SapD in *Pichia pastoris*, die Reinigung beider Proteine sowie ihre Kristallisation beschrieben. Die Qualität der dabei erhaltenen Kristalle wird anhand von kristallographischen Daten belegt. Für SapC werden Vorarbeiten zu einer späteren Strukturbestimmung auf der Basis der bereits durchgeführten Diffraktionsexperimente diskutiert. Die Bestimmung der Kristallstruktur des SapD wird vorgestellt, die erhaltene Struktur des SapD wird beschrieben und mit den Strukturen verwandter Proteine verglichen. Anhand der Struktur werden mögliche Mechanismen der Lipidbindung durch SapD von denen anderer Sap-ähnlicher Proteine abgegrenzt. Anhand struktureller und funktioneller Analogien wird SapD mit einer nicht-homologen Proteinfamilie, den Apolipophorinen, verglichen.