

3 Ergebnisse zur Hexosaminidase B

3.1 Kristallisation von HexB

Zunächst wurden Reihenversuche mit Hilfe kommerziell erhältlicher Zusammenstellungen von Kristallisationslösungen unternommen, um anfängliche Kristallisationsbedingungen für HexB zu finden. Nach ca. zwei Monaten erschienen hierbei in Ansatz 40 aus dem „Hampton Screen I“ (Hampton Research) Mikrokristalle in bereits vorher aufgetretenem Präzipitat. Zur Optimierung des Kristallwachstums wurde systematisch um die Bedingungen dieses Ansatzes (100mM Natriumcitrat-Puffer, 20% (v/v) Isopropanol, 20% (w/v) PEG 4000) nach besseren Bedingungen gesucht, dabei wurden verschiedene Puffer, Alkohole und PEGs in variierenden Mischungen verwendet. Dennoch konnten aus der ursprünglich verwendeten HexB-Probe nur sehr dünne, stark verwachsene und nicht für Röntgenexperimente brauchbare Kristallplättchen erhalten werden (s. Abbildung 10, (a)). Da die Optimierung der Kristallisationsbedingungen alleine nicht zu hinreichender Kristallqualität führte, wurden Proteinproben aus verschiedenen Expressionen kristallisiert, die z.T. verschieden gereinigt wurden, z.B. durch den Einsatz eines zusätzlichen, hochauflösenden Anionenaustausch-Chromatographie-Schrittes. Dabei kristallisierte eine der vier erhaltenen Proben deutlich besser als die drei anderen. Unter den für die erste Probe optimierten Bedingungen wurden direkt dreidimensional entwickelte Stäbchen mit hexagonalem Querschnitt erhalten (s. Abbildung 10, (b)).

Von dieser Probe standen während der gesamten Arbeit an diesem Projekt lediglich 4,2mg Protein zur Verfügung, so dass bei allen weiteren Schritten stets auf einen minimalen Probenverbrauch geachtet wurde. Der Austausch von Isopropanol gegen ähnliche Konzentrationen MPD (s. Abbildung 10, (c)) und Ethylenglykol (s. Abbildung 10, (d)) führte zu einer besseren Kristallmorphologie und erleichterte das Montieren der Kristalle. Die an den Enden verwachsenen, unter Zusatz von Ethylenglykol erhaltenen Kristalle konnten in einzelne Kristalle zerlegt werden und wurden zur Schweratomderivatisierung eingesetzt. Um nicht-verwachsene Einkristalle verbesserter Qualität zu erhalten, wurde ein strichartiges Animpfen eines Ansatzes mit einem Katzenschnurrhaar durchgeführt. Hierbei wurden jedoch nur kleinere und erneut verwachsene Kristalle erhalten (s. Abbildung 10, (e)). Weder die Kristallisation in Gegenwart von Octyl- β -D-glucopyranosid in Konzentrationen unterhalb der kritischen Micellenkonzentration noch in Gegenwart des Inhibitors δ -Lacton führten zum Wachstum von Einkristallen. Zur Absenkung der sekundären Nukleationsrate wurde die Kristallisation schließlich im hängenden Tropfen im Agarosegel durchgeführt. Hierbei bildeten sich Einkristalle von ca. 0,15 x 0,15 x 0,5mm Größe (s. Abbildung 10, (f)), die zur Aufnahme der hochaufgelösten Datensätze verwendet wurden. Kurioserweise entstanden unter den optimierten Bedingungen nur dann Kristalle, wenn das Gesamtvolumen des Kristallisationstropfens 4 μ l überstieg.

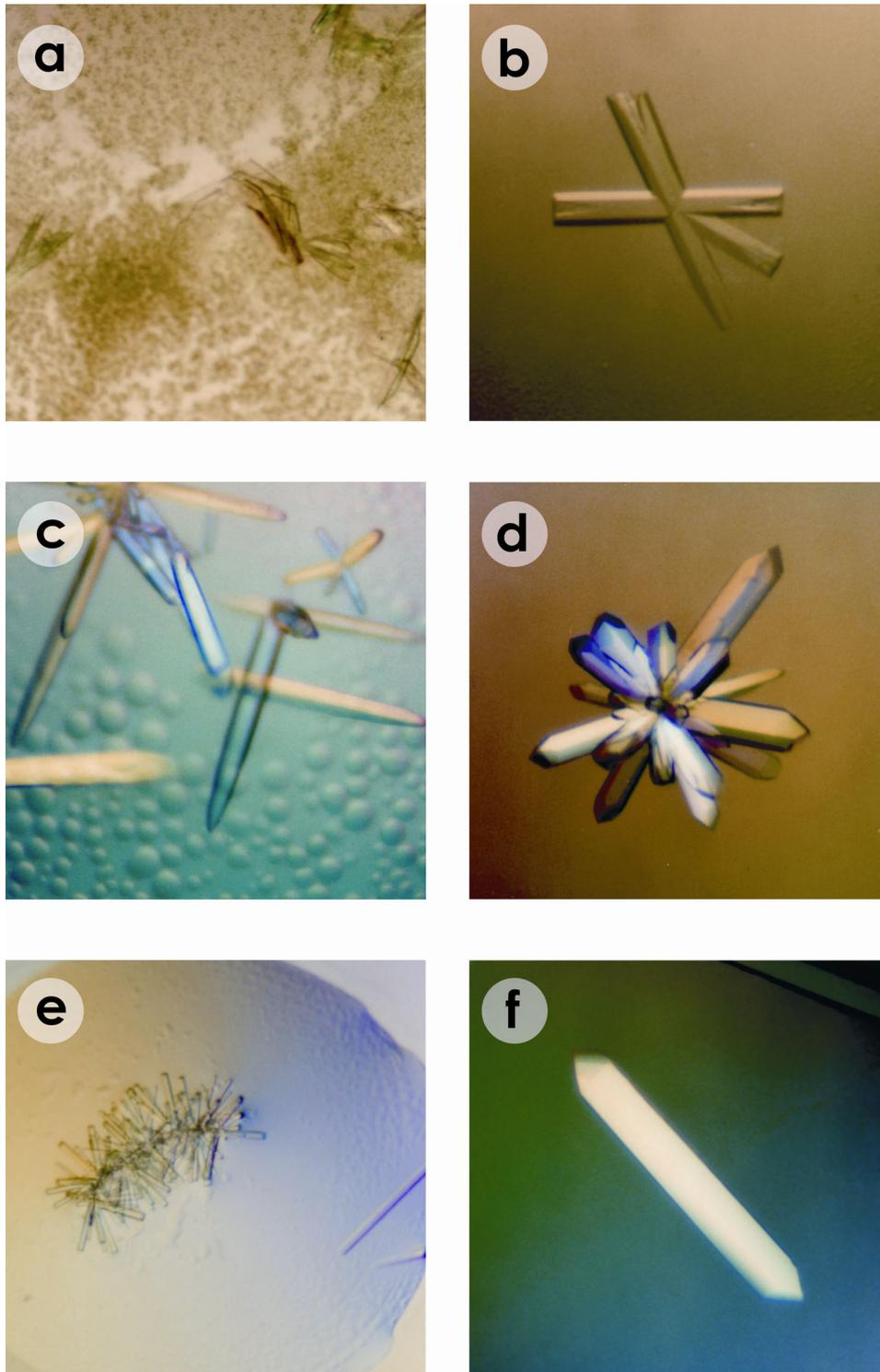


Abbildung 10: Ergebnisse der Kristallisation von HexB. (a) Optimierte Kristalle aus der ersten HexB-Probe. (b) Kristalle aus der dritten HexB-Probe, gewachsen unter den gleichen Bedingungen wie in (a). (c) Kristalle unter Bedingungen ähnlich denen in (b), Isopropanol ist hier durch MPD ersetzt. (d) Kristalle unter Bedingungen ähnlich denen in (b), Isopropanol ist hier durch Ethylenglykol ersetzt. (e) Kristalle unter Bedingungen ähnlich denen in (d), gewachsen als Ergebnis eines strichartigen Animpfens. (f) Kristalle unter Bedingungen ähnlich denen in (d), gewachsen in Gegenwart von 0,075% Agarose.

In Tabelle 1 wird ein Überblick über den optimalen Bereich der Zusammensetzung möglicher Kristallisationslösungen gegeben. Als geeignete Tieftemperaturpuffer erwiesen sich Lösungen, in denen die Konzentration an PEG8000 um 10% gegenüber der Kristallisationslösung erhöht war und die 30% (v/v) Ethylenglykol enthielten. HexB kristallisiert in Raumgruppe $P3_121$ mit ungefähren Zellkonstanten von $a=164\text{\AA}$, $c=245\text{\AA}$. Detaillierte Angaben und Statistiken zu den verwendeten Datensätzen werden in den folgenden Kapiteln angeführt.

Tabelle 1: Bedingungen zur optimalen Kristallisation von HexB. Angaben zur verwendeten Proteinlösung finden sich im Text. Die Kristallisation erfolgt bei 18°C .

Additive	0,1-0,25% (w/v) Octyl- β -D-glucopyranosid 0,5mM δ -Lacton 0,025-0,075% Agarose
Alkohol	MPD: 12,5-17,5% (v/v) Ethylenglykol: 12-20% (v/v)
Puffer	100mM Natriumcitrat-Puffer, pH 5,6
PEG	18-22% (w/v) PEG8000
Tropfenaufbau	von 2 μ l Reservoir + 2 μ l Protein bis 5 μ l Reservoir + 4 μ l Protein + 1 μ l Additivstammlösung

Die Raumgruppenbestimmung erfolgte mit Hilfe der zur Indizierung, Integration und Skalierung verwendeten Programme. Die Autoindizierung mit „DENZO“ ergab als wahrscheinlichstes Bravais-Gitter primitiv hexagonal. Die Daten ließen sich nur in der Raumgruppe $P3$, nicht aber in $P6$ skalieren. Daraufhin wurde die Skalierung in den Raumgruppen $P312$ und $P321$ versucht, von denen nur die letzte erfolgreich war. Das Vorhandensein einer Schraubenachse wurde aufgrund der geringen Intensitäten der erwarteten systematisch abwesenden Reflexe angedeutet. Als mögliche Raumgruppen verblieb somit das enantiomorphe Raumgruppenpaar $P3_{1/2}21$. Die endgültige Festlegung auf die Raumgruppe $P3_121$ war erst nach erfolgter Phasenbestimmung möglich.

3.2 Schweratomderivatisierung von HexB-Kristallen

Zur Schweratomderivatisierung wurden die Kristalle für eine oder 24Std. in einem Tieftemperaturpuffer mit 1mM K_2PtCl_4 , HgCl_2 oder Di- μ -Iodobis(ethylendiamin)-diplatin(II)-nitrat (PIP), für wenige Minuten in Tieftemperaturpuffer mit 1M NaBr oder unter Begasung mit Xenon inkubiert. Die entsprechenden Kristalle und Datensätze werden mit Pt, Hg, PIP, Br und Xe bezeichnet. Zum Überprüfen des Erfolgs der Schweratomderivatisierung und des Vorhandenseins eines anomalen Signals wurde in vielfach redundanten Datensätzen die Veränderung

der χ^2 -Werte beim Übergang von einer anomalen zu einer nicht-anomalen Prozessierung analysiert (Tabelle 2). Kristalle, die für kurze Zeit mit 1M NaBr inkubiert wurden, zeigten nur noch sehr schwache Diffraktion bis zu einer Auflösung von ca. 7Å, daher wurde von diesen Kristallen kein Datensatz aufgenommen. Es zeigte sich eindeutig, dass die Datensätze der Pt- und Hg-derivatisierten Kristalle ein starkes anomales Signal aufwiesen, während die Derivatisierung mit PIP und Xe nicht erfolgreich war (Tabelle 2).

Tabelle 2: Datensammlungsstatistik für Schweratomdatensätze von HexB. Brom-derivatisierte Kristalle besaßen keine für einen Datensatz hinreichende Qualität. Für alle Datensätze ist auch die auflösungsabhängige Analyse des anomalen Signals anhand der Änderung des χ^2 -Wertes beim Übergang von anomaler zu nicht-anomaler Datenprozessierung gezeigt.

	Br	Hg	PIP	Pt	Xe
Wellenlänge (Å)	0,83432	0,83432	0,83432	0,83432	0,83432
f' (theoretisch) ¹	-1,28	-7,53	-3,89	-3,89	-0,17
f'' (theoretisch) ¹	3,14	11,88	10,79	10,79	2,60
Zellkonstanten (Å)		a=164,0 c=245,1	a=164,4 c=244,7	a=163,5 c=244,7	a=163,6 c=244,9
Auflösung	> 7	30,0-3,0	30,0-3,0	15,0-3,0	25,0- 2,9
Mosaizität (°)		1,0	0,57	0,30	0,84
Gemessene Reflexe		710539	751780	465785	320171
Unabhg. Reflexe		77263	76509	75615	83835
I/σ(I) ²		14,5 (3,3)	18,3 (6,8)	13,9 (4,0)	9,8 (2,0)
R _{sym} ^{2,3}		14,2 (58,2)	13,9 (44,1)	12,6 (45,5)	11,5 (51,5)
Vollständigkeit (%) ¹		100 (99,9)	99,0 (99,3)	100 (100,0)	99,2 (99,3)
Δ(χ ²) nach		3,6 (30-8,6)	< 0.1 (6,2)	2,5 (15-8,2)	< 0,1 (6,4)
Auflösungsschalen		1,7 (6,8)		0,8 (6,7)	
(Bereiche in Å)		1,3 (6,0)		0,5 (5,9)	
		1,1 (5,4)		0,5 (5,4)	
		0,7 (5,0)		0,4 (5,0)	
		0,5 (4,7)		0,4 (4,7)	
		0,4 (4,5)		0,4 (4,5)	
		0,2 (4,3)		0,3 (4,3)	
		0,2 (4,1)		0,2 (4,1)	
		0,1 (4,0)		0,2 (4,0)	

¹ Theoretische Werte für das jeweilige Element bei der verwendeten Wellenlänge

² Werte in Klammern beziehen sich auf die Schale der höchsten Auflösung: Hg,PIP,Pt (3,11Å-3,00Å); Xe (3,00Å-2,90Å)

³ $R_{sym} = \sum |I_{obs} - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$

3.3 Strukturbestimmung von HexB mit der MIRAS-Methode

Zur Bestimmung von Schweratomlagen und zur Phasierung wurde der MIRAS-Ansatz gewählt. Als Schweratomderivat-Datensätze wurden dabei die Datensätze Pt und Hg (Tabelle 2) verwendet. Native Datensätze wurden von Kristallen, die in Gegenwart von MPD oder Ethylenglykol mit oder ohne Zugabe des δ -Lacton-Inhibitors gewachsen waren, gemessen. Dabei wurde ein deutlicher Unterschied in der maximalen Auflösung zwischen der Aufnahme an einem Drehanoden-Generator (Zusatz -g) und der Datensammlung mit Synchrotronstrahlung (Zusatz -s) festgestellt. Die Diffraktion war stets anisotrop mit geringerer Auflösung entlang der längsten Achse. Tabelle 3 gibt die Statistiken für alle nativen Datensätze an.

Die in Gegenwart von MPD gewachsenen Kristalle (mpd) sind trotz deutlicher Unterschiede in der Morphologie (vgl. Abbildung 10 (c) und (d)) vollständig isomorph und zeigen ein vergleichbares Streuvermögen wie die in Gegenwart von Ethylenglykol gewachsenen Kristalle (nativ, inhib). Die beste Statistik hinsichtlich Vollständigkeit, R-Werten und Signal-Rausch-Verhältnis wurde für einen mit Inhibitor inkubierten Kristall (inhib-s) erhalten. Dieser wurde als „nativer“ Datensatz für die Strukturbestimmung mit der MIRAS-Methode sowie zum Modellbau und zur initialen Verfeinerung genutzt.

Tabelle 3: Datensammlungsstatistik für native HexB-Datensätze. Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale. Die Datensammlung am Drehanodengenerator ist durch den Zusatz -g, die am Synchrotron durch den Zusatz -s gekennzeichnet.

	nativ-g	inhib-g	nativ-s	inhib-s	mpd-s
Wellenlänge (Å)	1,54179	1,54179	0,9393	0,9393	0,9393
Raumgruppe	P3 ₁ 21				
Zellkonstanten (Å)	a=164,2 c=244,7	a=163,0 c=244,9	a=163,2 c=245,5	a=163,9 c=244,7	a=163,3 c=244,7
Auflösung (Å)	30,0 -3,10	30,0-3,30	30,0-2,40	30,0-2,25	30,0-2,25
Höchste Schale	3,21-3,10	3,42-3,30	2,49-2,40	2,33-2,25	2,33-2,25
Mosaizität (°)	0,48	0,42	0,40	0,47	0,31
Gemessene Reflexe	529622	426524	649468	1930354	818841
Unabhg. Reflexe	69413	56816	141910	180325	177619
$I/\sigma(I)$	17,9 (4,9)	13,1 (4,3)	13,9 (3,7)	25,4 (5,5)	16,1 (3,8)
R_{sym}^1	12,5 (47,4)	16,4 (58,7)	8,6 (63,1)	6,5 (35,6)	7,9 (44,7)
Vollständigkeit (%)	99,6 (99,5)	99,8 (99,9)	96,7 (97,4)	99,9 (100)	99,8 (100)

$$^1 R_{\text{sym}} = \frac{\sum |I_{\text{obs}} - \langle I \rangle|}{\sum \langle I \rangle}$$

Die Bestimmung von Schweratomlagen und die anschließende Phasenbestimmung wurden automatisiert mit dem Programm „SOLVE“ (Terwilliger und Berendzen, 1999) durchgeführt. Dabei wurde die Auflösung auf 20,0-4,0Å beschränkt, die Zahl der Monomere pro asymme-

trischer Einheit (A.E.) und die Art der vorhandenen nicht-kristallographischen Symmetrie waren noch nicht bekannt. Es wurde angenommen, dass HexB unter den Kristallisationsbedingungen als Dimer vorliegt. Die Berechnung des Matthews-Koeffizienten zeigte jedoch, dass eine Anzahl von Untereinheiten von vier (Matthews-Koeffizient: $4,3\text{\AA}^3/\text{Da}$; Lösungsmittelgehalt 71%) bis zehn ($1,7\text{\AA}^3/\text{Da}$; 28,3%) möglich gewesen wäre. Die Anwesenheit von sechs Monomeren pro asymmetrischer Einheit führt zu dem „typischsten“ Matthews-Koeffizienten von $2,9\text{\AA}^3/\text{Da}$ entsprechend einem Lösungsmittelgehalt von 57% für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 55kDa.

Tabelle 4: Statistik der MIRAS-Phasenbestimmung von HexB.

	Hg	Pt
Auflösung		20,0 - 4,0
R_{iso}^1	17,0	14,1
R_{ano}^2	5,2	4,8
Zahl der Lagen	15	12
Signalhöhe (min-max in σ)	13,3 - 27,6	12,9 - 33,8
Z-Wert		59,6
Mittlerer B-Wert	47,3	60,0
Mittlere Besetzung	0,10	0,11
Phasierungskraft ³	0,88/1,06	0,86/1,15
FOM ⁴ nach		0,61 (12,27)
Auflösungsschalen		0,68 (8,48)
(Mittlere Auflösung der		0,67 (6,84)
Schalen in Å)		0,64 (5,89)
		0,57 (5,25)
		0,50 (4,78)
		0,45 (4,42)
		0,40 (4,12)
FOM ⁴ (gesamt)		0,54

$$^1 R_{\text{iso}} = \frac{\sum |F_{\text{ph}}^2 - F_{\text{p}}^2|}{\sum |F_{\text{ph}}^2 + F_{\text{p}}^2|}$$

$$^2 R_{\text{ano}} = \frac{\sum |F_{+}^2 - F_{-}^2|}{\sum |F_{+}^2 + F_{-}^2|}$$

$$^3 \text{Phasierungskraft} = \text{Rmsd. } (F_{\text{h}}/E_{\text{iso}}) \text{ wobei } E_{\text{iso}} \text{ gegeben ist als } F_{\text{PH}}(\text{obs}) - F_{\text{PH}}(\text{calc})$$

$$^4 \text{FOM, figure of merit. FOM} = \langle \cos(\Delta\alpha_{\text{h}}) \rangle, \text{ wobei } \Delta\alpha_{\text{h}} \text{ der Fehler des Phasenwinkels für den Reflex h ist}$$

Im Anschluss an die Phasenbestimmung wurde eine vorläufige Elektronendichte-Modifikation mit dem Programm „RESOLVE“ durchgeführt. Der Vergleich der Elektronendichtekarten vor und nach der Dichtemodifikation zeigte, dass die in der nicht-dichtemodifizierten Karte bereits

erkennbaren Protein-Sekundärstrukturelemente und Grenzen zwischen Lösungsmittel und Protein durch die Dichtemodifikation verstärkt wurden. Die erhaltene Elektronendichte war von hinreichender Qualität, um ein anfängliches Modell für ein Monomer, z.T. durch das automatische Einpassen von Sekundärstrukturelementen mit dem Programm „FFFEAR“, zu erzeugen (Abbildung 11). Dieses Modell wurde erfolgreich für eine Suche nach den Positionen der anderen Untereinheiten in der Elektronendichtekarte verwendet. Die anhand der Positionen von sechs Untereinheiten bestimmten NCS-Operatoren wurden verwendet, um eine Dichtemodifikation mit NCS-Mittlung und Phasenerweiterung auf die volle Auflösung des inhib-s-Datensatzes von 2,25Å durchzuführen (Abbildung 11). Die hohe anfängliche Korrelation der einzelnen NCS-Domänen und die hohen FOM-Werte bei Auflösungen kleiner 4Å lassen auf die korrekte Positionierung der Untereinheiten schließen. Die vollständige Statistik der Dichtemodifikation ist in Tabelle 5 gegeben.

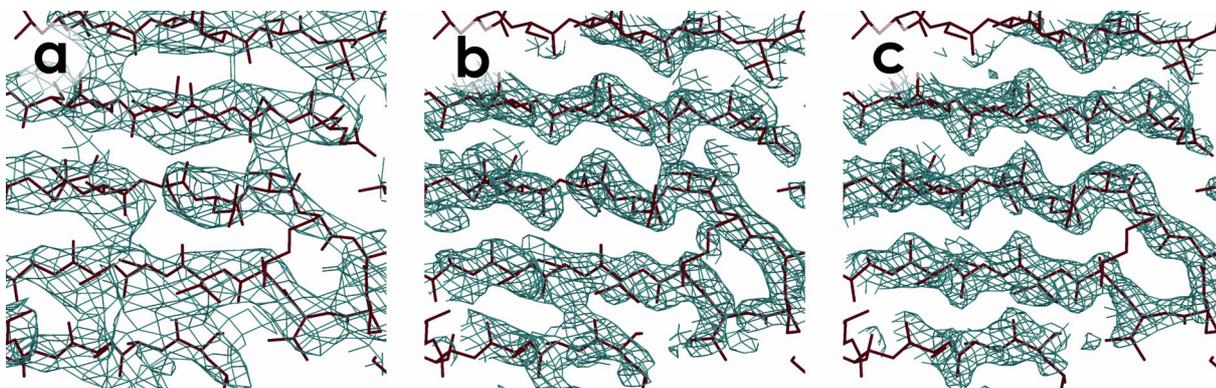


Abbildung 11: Einfluß der NCS-Mittlung auf die experimentelle Elektronendichte von HexB. (a) Von „SOLVE“ erzeugte rein experimentelle Elektronendichte bei 4Å Auflösung (b) Elektronendichte nach sechsfacher NCS-Mittlung und Phasenausdehnung auf 2,25Å mit „DM“. (c) 2Fo-Fc-Elektronendichte des verfeinerten Modells. Alle Elektronendichten sind bei 1σ konturiert.

Tabelle 5: Statistik der Dichtemodifikation unter NCS-Mittlung für HexB.

	Erster Zyklus	Letzter Zyklus
FOM bei 8,0 Å Auflösung (%)	70,1	87,9
FOM bei 6,0 Å Auflösung (%)	63,7	88,1
FOM bei 4,0 Å Auflösung (%)	39,7	90,3
FOM bei 3,0 Å Auflösung (%)	0,0	70,3
FOM bei 2,3 Å Auflösung (%)	0,0	31,2
mittlere NCS-Korrelation (%)	52,1	91,6
Gewählte effektive Auflösung (Å)	4,9	2,25

3.4 Modellbau und Verfeinerung

Die aus der Dichtemodifikation erhaltene Elektronendichte wurde zum Bau eines vollständigen Modells eingesetzt, das unter Verwendung der von DM optimierten NCS-Operatoren verwendet wurde, um die NCS-verwandten Moleküle zu erzeugen. Die Verfeinerung mit dem Programmpaket CNS1.0 (Brunger et al., 1998) erfolgte zunächst in mehreren Zyklen mit simuliertem Tempern, gefolgt von B-Wert- und Koordinaten-Verfeinerung unter Verwendung einer nicht-strikten NCS der Rückgrat-Atome als Randbedingung.

Zwischen den einzelnen Zyklen wurde das Modell manuell überarbeitet, schließlich wurden Wassermoleküle automatisch gesucht und überprüft. Der Inhibitor δ -Lacton, von dem ein Molekül pro Monomer gebunden ist, wurde modelliert. Unter Verwendung der NCS-Randbedingung ließ sich das Modell bis zu Werten von $R=22,1\%$, $R_{\text{frei}}=25,9\%$ verfeinern. Im Folgenden wurde die NCS-Randbedingung fallengelassen und das Modell durch weitere Zyklen aus Koordinaten- und B-Wert-Verfeinerung und manueller Überprüfung optimiert. Wassermoleküle wurden manuell kontrolliert. Zudem wurden Teile der N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharide und gebundene Ethylenglykol-Moleküle aus dem Kristallisationspuffer in das Modell aufgenommen. An einigen für die weitere Diskussion wenig bedeutsamen Stellen könnten an Stelle von Paaren nah benachbarter Wassermoleküle auch weitere Ethylenglykol-Moleküle gebunden haben. Für 28 Aminosäuren wurden alternative Seitenkettenkonformationen gebaut und verfeinert. Das endgültige Modell besitzt R-Werte von $R=19,6\%$, $R_{\text{frei}}=23,6\%$ und beinhaltet 2925 Protein-Reste, 2326 Wassermoleküle, 6 δ -Lacton-, 18 N-Acetylglucosamin- und 18 Ethylenglykol-Moleküle (Tabelle 6).

Jedes Monomer besteht aus drei Fragmenten aus den Resten 54-107, 122-311 und 315-552/553. Die N-terminalen Reste vom nativen N-Terminus zwischen Rest 48 und 50 bis zu Rest 54 und die Reste bis zum C-Terminus bei Rest 556 sind ungeordnet und in der Elektronendichte nicht sichtbar. Obwohl HexB bei der Expression in Insektenzellen mit dem Baculovirus-Expressionssystem nicht proteolytisch prozessiert wird, entsprechen die in der Dichte nicht lokalisierbaren Bereiche den Abschnitten von HexB, die bei der nativen Prozessierung entfernt werden (Schuette et al., 2001). Ein SDS-Gel der verwendeten Protein-Präparation wies nach längerer Lagerungsdauer allerdings auch ein Bandenmuster auf, das nur durch eine der natürlichen Form ähnlichen Prozessierung erklärt wird (C. Schütte, pers. Mitteilung). Der Versuch, Massenspektren für einen wiederaufgelösten Kristall zu erhalten, scheiterte wohl an der geringen Proteinmenge und dem hohen Anteil an Polyethylenglykol. Vermutlich ist durch minimale Protease-Verunreinigungen in der Proteinpräparation eine „Pseudo-native Prozessierung“ entstanden. Eine N-Glykosylierung ist an den Resten Asn84, Asn190 und Asn327 sichtbar. Im Gegensatz zum aus Placenta gereinigten Protein ist keine Glykosylierung von Asn142 sichtbar, in Übereinstimmung mit einer massenspektrometrischen Charakterisierung des Proteins (Schuette et al., 2001). Drei intramolekulare Disulfidbrücken zwischen den Cystein-Resten Cys91/Cys137, Cys309/Cys360 und Cys534/Cys551 sind in der Elektronendichte sichtbar und in unterschiedlichem Maße von Strahlenschäden bei der Synchrotron Datensammlung betroffen. Dies äußert sich in partiell geöffneten Disulfidbrücken, für die alternative, geöffnete Konformationen modelliert wurden. Die für die verwendeten Expositionszeiten erhal-

tenen Elektronendichten der betroffenen Disulfidbrücken entsprechen Ergebnissen, die bei der bewussten Strahlenschädigung von Lysozym-Kristallen erhalten wurden (Weik et al., 2000). Im Ramachandran-Diagramm liegen von allen Resten 89,6% in den bevorzugten, 10,1% in den erlaubten, 0,2% in den zusätzlich erlaubten und 0,0% in den verbotenen Bereichen. Wichtige Kennziffern zur Verfeinerung sind in Tabelle 6 gezeigt. Die Qualität des Modells wurde mit den Programmen „WHATCHECK“ (Hooft et al., 1996) und „PROCHECK“ (Laskowski et al., 1993) überprüft.

Tabelle 6: Statistik der Modellverfeinerung von HexB.

	inhib-s
Auflösung (Å)	30-2,25
R/R _{frei} (%)	19,6/23,6
Rmsd. Bindungen (Å)	0,010
Rmsd. Winkel (°)	1,5
DPI (Å) ¹	0,30
Monomere/A.E.	6
Anzahl der Proteinreste / Atome	2925/23623
Anzahl der Wassermoleküle	2326
Heterogruppen	6 δ-Lacton 18 N-Acetylglucosamin 18 Ethylenglykol
Lösungsmittelgehalt (%)	53
⟨B _{Protein} ⟩ (Å ²)	40±11
⟨B _{Lösungsmittel} ⟩ (Å ²)	50±11

¹ DPI, Diffraktionsdaten-Präzisions-Indikator = $\sqrt{(N_{\text{atome}}/N_{\text{obs}})(C-1/3)d_{\text{min}} R_{\text{frei}}}$, wobei N_{atome} , N_{obs} = Zahl der Atome, unabhängige Reflexe; C=fractionelle Vollständigkeit, d_{min} = höchste Auflösung

Neben dem Datensatz inhib-s wurde ein Datensatz mpd-s für einen Kristall gesammelt, der in Gegenwart von MPD gewachsen war und sich in seiner Morphologie deutlich von den in Gegenwart von Ethylenglykol gewachsenen Kristallen unterschied (vgl. Abbildung 10 (c),(d)). Dieser Kristall und ein weiterer mit Ethylenglykol gewachsener Kristall, dessen Messung zu dem Datensatz nativ-s führte, wurden ohne Inkubation mit dem δ-Lacton-Inhibitor gezüchtet und eingefroren (vgl. Tabelle 3). Dennoch zeigten sich bei der Verfeinerung des für den Datensatz inhib-s erhaltenen Modells gegen die isomorphen Datensätze mpd-s und nativ-s keinerlei signifikante Strukturunterschiede. In beiden Strukturen war trotz fehlender Inkubation mit dem Inhibitor während der Kristallisation eine wohldefinierte Elektronendichte für den Inhibitor vorhanden, die der Elektronendichte im mit Inhibitor inkubierten Kristall entsprach. Demnach

muss der noch gebundene Inhibitor direkt aus der Proteinreinigung stammen, wo dieser Inhibitor zur Elution von der Affinitätschromatographiesäule diente. Kinetische Tests ließen vorher annehmen, dass der Inhibitor während des Umpufferns des Proteins für die Kristallisation vollständig entfernt worden sei (Schuette et al., 2001). Die Bindekonstanten des δ -Lacton-Inhibitors sind wegen des konkurrierenden Hydrolysegleichgewichts des Lactons zur freien Säure nicht trivial bestimmbar, so dass Literaturwerte z.T. stark voneinander abweichen. Die Inhibitionskonstante für die verwandte N-Acetyl- β -D-glucosaminidase wurde als $K_i=0,036\mu\text{M}$ bestimmt (Legler et al., 1991). Aufgrund der fehlenden signifikanten Unterschiede zwischen den Datensätzen wird die folgende Beschreibung und Diskussion der Struktur von HexB auf das für den Datensatz inhib-s verfeinerte Modell beschränkt.

3.5 Faltung von HexB

HexB besteht aus zwei Domänen, einer kleineren N-terminalen und einer größeren C-terminalen oder auch zentralen Domäne. Letztere wird von einem $(\beta,\alpha)_8$ -Fass dominiert, einer Supersekundärstruktur, die erstmals in der Triosephosphat-Isomerase (TIM) beobachtet wurde (Banner et al., 1975) und daher auch als TIM-Fass bezeichnet wird. Ein solches TIM-Fass ist nicht nur durch die Beteiligung von acht Strängen und Helices gekennzeichnet, sondern folgt immer demselben schematischen Bauplan, der in Abbildung 12 gezeigt ist: Auf der N-terminalen Seite beginnt das Fass mit einem β -Strang, der über eine Schleifenregion variabler Länge mit einer α -Helix verbunden ist. Diese Abfolge wiederholt sich achtmal bis zum Ende des Fasses auf der C-terminalen Seite einer α -Helix. Die Faltblätter sind zu einem inneren Fass aufgerollt, das von den außen liegenden Helices flankiert wird (Abbildung 13, Abbildung 14). Das Fass besitzt eine Polarität, alle Helices und Stränge sind nahezu parallel ausgerichtet und beide Enden liegen auf derselben Seite des Fasses.

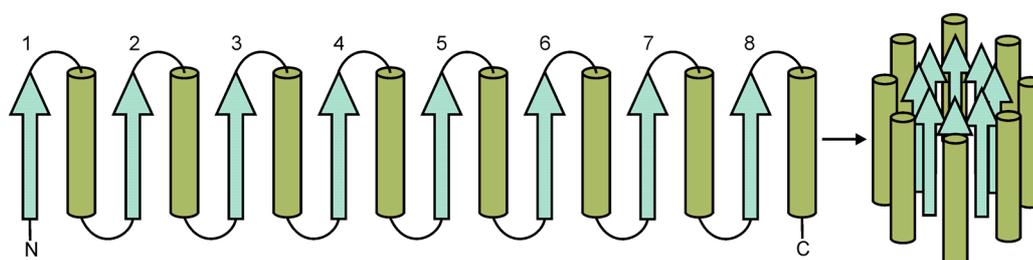


Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines TIM-Fasses.

Die N-terminale Domäne umfasst die Reste vom N-Terminus (54) bis zu Rest 199, die zentrale die Reste von 200 bis zum C-Terminus (552/553). Zur weiteren Diskussion werden die Helices und Stränge vom N-Terminus zum C-Terminus fortlaufend mit Gross- bzw. Kleinbuchstaben benannt. Die N-terminale Domäne besteht dann aus einem kleinen zweisträngigen (Stränge b,g) und einem zentralen sechssträngigen Faltblatt (c, d, f, h, a), das von einer kurzen (A) und zwei langen Helices (B, C) flankiert wird. Die Helices B, C bilden den Großteil

der Kontaktfläche zwischen der N- und C-terminalen Domäne, während die Helix A auf der dem Faltblatt abgewandten Seite solvensexponiert ist (Abbildung 13, Abbildung 14).

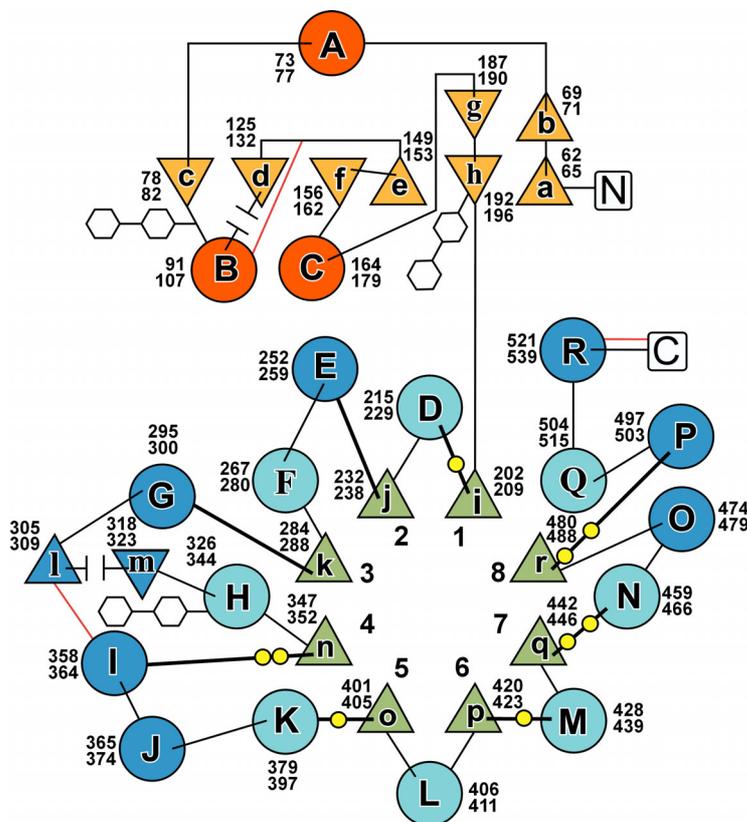


Abbildung 13: Topogramm von HexB. α -Helices sind als Kreise, β -Stränge als Dreiecke gezeigt, Nummern geben die Position der Sekundärstrukturelemente in der Sequenz an. Das TIM-Fass ist grün (Stränge) bzw. hellblau (Helices), die Erweiterungen des Fasses sind dunkelblau und die N-terminale Domäne ist orange (Stränge) bzw. rot (Helices) gefärbt. Glykosylierungsstellen werden durch Sechsecke, Disulfidbrücken durch rote Linien und proteolytische Prozessierungsstellen des reifen Enzyms durch unterbrochene Linien markiert. Schleifenregionen auf der C-terminalen Seite des zentralen $(\beta, \alpha)_8$ -Fasses sind fett eingezeichnet, die Positionen von Aminosäureresten mit Beteiligung an der Substratbindung oder Katalyse sind durch gelbe Kreise symbolisiert.

Das zentrale $(\beta, \alpha)_8$ -Fass trägt Erweiterungen bei den Strängen 2(j), 3(k), 4(n) und 8(r) sowie eine C-terminale helikale Verlängerung. Nach Strang 2 und vor und nach Strang 8 bestehen diese Erweiterungen nur aus einzelnen Helices (E, O, P), während nach Strang 3(k) eine Helix (G) und ein zweisträngiges β -Faltblatt (l,m) eingefügt sind. Die Erweiterung am C-Terminus von Strang 4(n) besteht aus zwei benachbarten Helices (I, J). Alle Reste mit Kontakt zum gebundenen Inhibitor (s. Abschnitt 3.7) befinden sich in Schleifenregionen auf der C-terminalen Seite des zentralen $(\beta, \alpha)_8$ -Fasses.

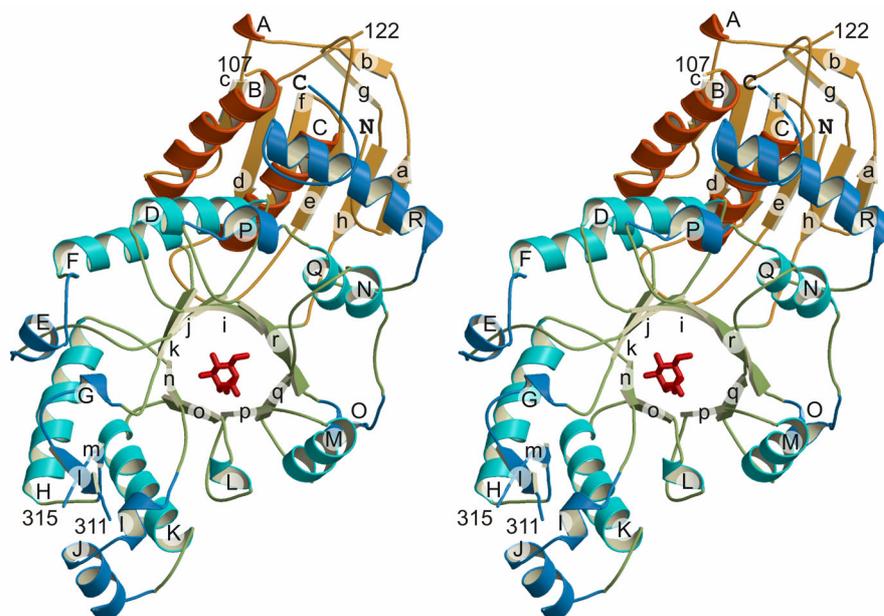


Abbildung 14: Bänderdarstellung der Faltung von HexB (stereo). Die in dieser Arbeit verwendeten Bezeichnungen von Strängen und Helices sind angegeben. N- und C-Terminus sowie die proteolytischen Prozessierungsstellen des reifen menschlichen Enzyms (107-122, 311-315) sind durch die Nummern der entsprechenden Aminosäuren gekennzeichnet. Der gebundene Inhibitor ist als rotes Stabmodell gezeigt. Die Färbung der Sekundärstrukturelemente entspricht Abbildung 13.

3.6 Strukturverwandte von HexB

Das generelle Faltungsmuster ist zwischen dem humanen HexB und den bakteriellen Mitgliedern der Familie 20 der Glykosylhydrolasen konserviert. Von zwei dieser bakteriellen Homologen sind die Strukturen bekannt: von einer Chitobiase aus *Serratia marcescens* (SmChb) (Tews et al., 1996) und von einer N-Acetylhexosaminidase aus *Streptomyces plicatus* (SpHex) (Mark et al., 2001). Obwohl die Sequenzidentität zwischen HexB und SmChb bzw. SpHex nur 22% bzw. 27% beträgt, sind die Positionen der Sekundärstrukturelemente der zentralen $(\beta, \alpha)_8$ -Fass-Domäne und sogar der in der Aminosäuresequenz kaum konservierten N-terminalen Domäne nahezu identisch. Während SmChb zwei weitere Domänen enthält, die das Protein gegenüber HexB N- und C-terminal erweitern, besteht SpHex nur aus den mit HexB gemeinsamen Domänen. Strukturbasierte Überlagerungen identifizieren 344 bzw. 349 zwischen HexB und SmChb/SpHex konservierte Reste, das sind 71%/72% aller Reste in HexB, mit einer Rmsd der Atompositionen von 1,4Å/1,5Å. Alle bekannten bakteriellen Homologen sind jedoch im Gegensatz zu HexB monomere Enzyme und besitzen eine andere Substratspezifität als HexB. Obwohl alle katalytisch bedeutsamen Reste zwischen HexB und den bakteriellen Verwandten konserviert sind, unterscheiden sich die Schleifenregionen auf der C-terminalen Seite des $(\beta, \alpha)_8$ -Fasses sowohl in ihrer Länge als auch in ihrer Konformation dramatisch (Abbildung 15).

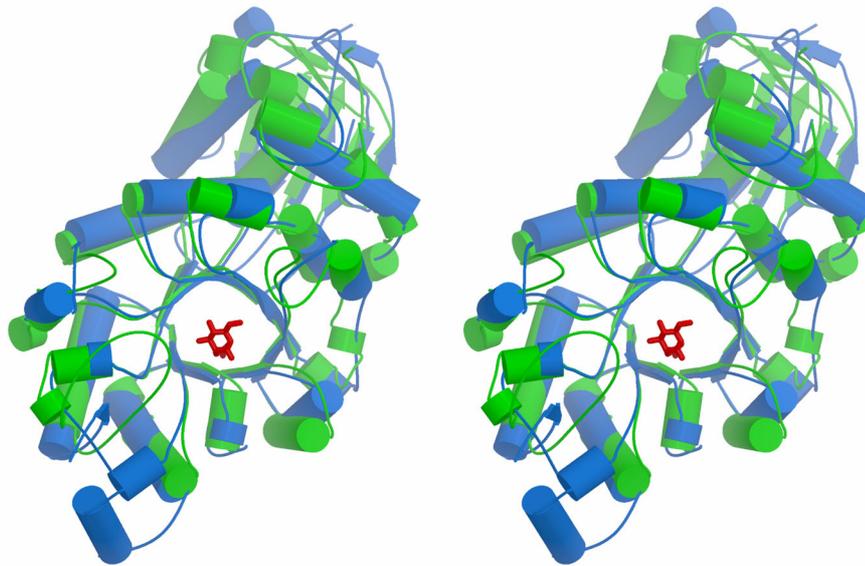


Abbildung 15: Überlagerung von HexB mit SpHex (stereo). HexB (blau) und SpHex (pdb:1hp5, grün) sind in schematisierter Darstellung gezeigt. Die Perspektive ist identisch mit Abbildung 14.

Deswegen sind diese Reste auch in einem Homologie-Modell der HexB, das nur die C-terminale $(\beta, \alpha)_8$ -Fass-Domäne, nicht aber die N-terminale Domäne umfasst, nicht korrekt modelliert. Die Rmsd für alle Atome/ $C\alpha$ -Atome zwischen dem Homologiemodell und HexB ist daher mit 3,6Å/3,0Å sehr hoch.

3.7 Der katalytische Mechanismus von HexB

Eine Überlagerung der Reste des aktiven Zentrums aus HexB, SpHex und SmChb (Abbildung 16) zeigt, dass in der Struktur von HexB alle für Katalyse und Substratbindung in der Glykosylhydrolase-Familie 20 verantwortlichen Reste konserviert sind und damit auch der katalytische Mechanismus selbst. Für die Glykosylhydrolasen der Familie 20 wird ein konfigurationserhaltender doppelter Verdrängungsmechanismus postuliert, bei dem ein Teil des Substrats selbst den nukleophilen Angriff auf das anomere C1-Atom durchführt. Anhand der Röntgenstrukturen der bakteriellen Homologen und von biochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es der Sauerstoff der Acetamido-Gruppe des nicht-reduzierenden (-1)-Zuckers ist, der diesen Angriff durchführt (Mark et al., 2001; Prag et al., 2000; Tews et al., 1996). Die hier verwendete Benennung der Monosaccharid-Einheiten des Substrats nummeriert die Einheiten auf der Seite des nicht-reduzierenden Oligosaccharid-Endes vom Ende bis zur Spaltstelle mit dem Betrag nach fallenden negativen Indices, die auf der Seite des reduzierenden Endes von der Spaltstelle zum Ende hin mit steigenden positiven Indices.

Die exakte Konservierung der Bindestelle des (-1)-Zuckers und der für den gemeinsamen katalytischen Mechanismus entscheidenden Reste erlaubt die explizite Formulierung des Reaktionsmechanismus für HexB: Im ersten Schritt (Abbildung 18, Reaktion 1a, 1b, R= Kohlenhydratrest) wird das Acetamido-Sauerstoffatom des Substrats durch die Kontakte mit Asp354, Tyr450 und Trp424 positioniert (Abbildung 17 (a),(b)) und greift nukleophil das anomere C1-Atom desselben Zuckerrestes unter Bildung eines positiv geladenen Oxazolinium-Intermediats an. Dabei wird der deprotonierte (+1)-Zucker freigesetzt und durch einen Protonentransfer von Glu355 protoniert (Abbildung 18, Zustand (b)). Die Bindung des terminalen nicht-reduzierenden Zuckers in die (-1)-Zuckerbindestelle erfolgt in einer verzerrten Boot-Konformation (Abbildung 18, Zustand (a)), die zu einer 4C_1 -Sesselkonformation im cyclischen Intermediat entspannt wird (Abbildung 18, Zustand (c)). In einem zweiten Schritt (Abbildung 18, Reaktion 2a, 2b, R=H) aktiviert der allgemeine Säure-Base-Katalysator Glu355 ein ankommendes Wassermolekül, das als Nukleophil das anomere C-Atom des (-1)-Zuckerrestes angreift und den Oxazoliniumring somit unter Erhaltung der ursprünglichen Konfiguration am C1-Atom hydrolysiert. Die besondere Bedeutung von Glu355 für den Reaktionsmechanismus wurde zuvor bereits anhand verschiedener biochemischer Untersuchungen vermutet (Pennybacker et al., 1997). Glu355 ist Teil einer katalytischen Triade, die es zusammen mit His294 und Asp240 bildet (Abbildung 17(a)).

Der Komplex aus SmChb und Chitobiose ist ein Enzym-Substrat-Komplex, wohingegen das NAG-Thiazolin im Komplex mit SpHex ein Analoges des Oxazolinium-Zwischenzustandes ist. Der δ -Lacton-Inhibitor, der in dieser Arbeit mit HexB kokristallisiert wurde, ist dagegen ein echtes Analogon des Übergangszustandes der Katalyse, in dem das anomere C1-Atom des (-1)-Zuckerrestes gerade die von C2, C5 und O5 des Zuckerringes aufgespannte Ebene durchschreitet (Abbildung 18, Zustand (b)). Die Struktur des HexB- δ -Lacton-Komplexes macht deutlich, dass die Bewegung des anomeren C1-Atoms während des Reaktionsablaufes keinerlei Veränderungen der Struktur des aktiven Zentrums benötigt oder induziert, dass also das aktive Zentrum für eine effektive Katalyse optimal zur Stabilisierung des Übergangszustands konfiguriert ist.

Aufgrund der Kristallstrukturen von SmChb und SpHex wurden zwei verschiedene Positionen für das hereintretende, am Mechanismus beteiligte Wassermolekül postuliert. Beide Positionen sind auch in allen sechs Monomeren in der HexB-Kristallstruktur mit Wassermolekülen besetzt. Ein Wassermolekül, hier I genannt, das in der Struktur von SmChb identifiziert wurde, wird dort von Glu739 (Glu491 in HexB) und Asp671 (Asp452 in HexB) koordiniert. Die zweite postulierte Wasserposition (II) ist hypothetisch, sie ist in der SpHex-Struktur solvensexponiert und von einem Sauerstoffatom eines gebundenen Glycerinmoleküls besetzt. Ein Wassermolekül an dieser Position würde, wie vom Mechanismus her zu erwarten, eine Wasserstoffbrücke mit Glu314 in SpHex, entsprechend Glu355 in HexB, eingehen.

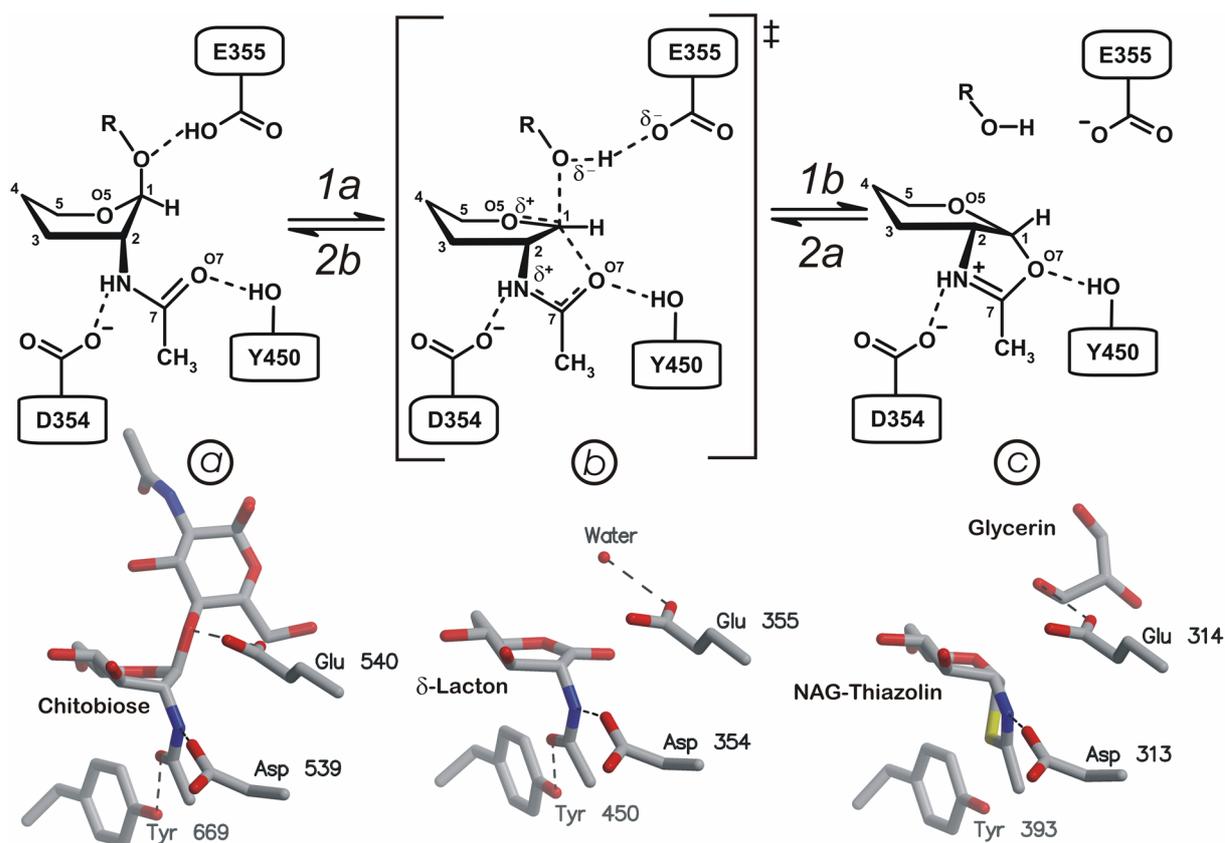


Abbildung 18: Katalytischer Mechanismus von HexB. Obere Zeile: Schematische Darstellung des doppelten Verdrängungsmechanismus. Im ersten Schritt (1a,1b, R=Kohlenhydrat) findet ein nukleophiler Angriff des Substrat-Acetamido-Sauerstoffs auf das C1-Atom unter Beteiligung des allgemeinen Säure-Base-Katalysators Glu355 statt, der den Rest R unter Bildung eines cyclischen Oxazoliniumderivats freisetzt. Im zweiten Schritt (2a,2b, R=H) wird der Oxazolinium-Ring durch ein von Glu355 aktiviertes Wassermolekül unter Beibehaltung der Konfiguration am anomeren C-Atom hydrolysiert. Untere Zeile: Experimentell bestimmte Strukturen der Reaktionsschritte. (a) SmChb mit gebundenem Substrat Chitobiose (pdb: 1qbb), (b) HexB in Komplex mit δ -Lacton (diese Arbeit) (c) SpHex in Komplex mit NAG-Thiazolin (pdb: 1hp5), hier ist die Position des katalytisch aktiven Wassermoleküls durch ein Glycerinmolekül besetzt.

Wassermolekül I (s. Abbildung 19) besitzt in den sechs Monomeren der asymmetrischen Einheit einen durchschnittlichen B-Wert von 33\AA^2 und ist in seiner Position durch kurze Wasserstoffbrücken zu $O^{\delta 2}$ von Asp452 und $O^{\epsilon 1}$ von Glu491 fixiert. Darüberhinaus bildet dieses Wassermolekül auch noch eine Wasserstoffbrücke mit einer Länge von $2,7\text{\AA}$ mit O^{η} des Restes Tyr456 der anderen Untereinheit eines Dimer (s. Abbildung 19), näheres hierzu findet sich in Abschnitt 3.9. Die feste Bindung und der geringe B-Wert des Wassermoleküls I lassen den Schluss zu, dass es nicht in der Lage ist, seine Position in ca. 7\AA Abstand von C1 des (-1)-Zuckers des Substrats zu verlassen, um an der Katalyse teilzunehmen. Es besitzt daher keine katalytische, sondern eine strukturelle Rolle.

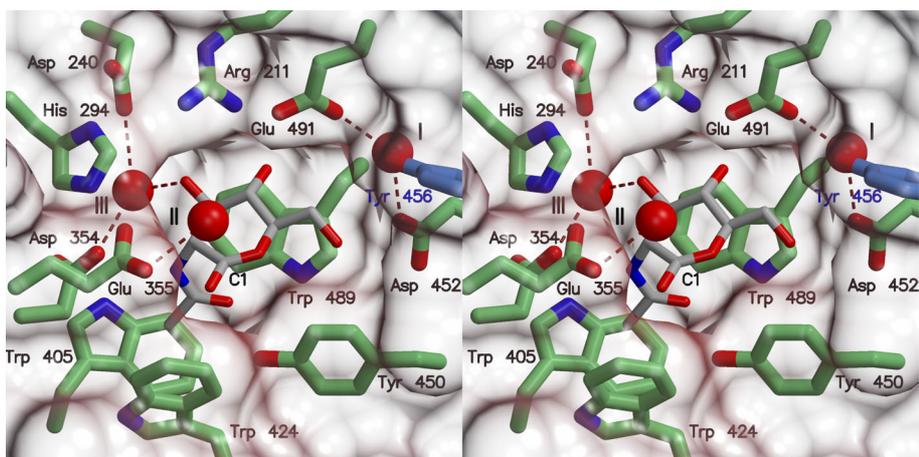


Abbildung 19: Wassermoleküle in der Umgebung des an HexB gebundenen Inhibitors (stereo). Der Inhibitor ist als Stabmodell gezeigt, die Position des C1-Atoms ist markiert, die Aminosäurereste des aktiven Zentrums liegen unterhalb der dem Lösungsmittel Wasser zugänglichen Oberfläche, die semi-transparent dargestellt ist. Der Rest Tyr456 (blau) ist Teil der anderen Untereinheit des Dimers. Die Wassermoleküle I, II, III (s. Text) sind als rote Kugeln dargestellt.

In dieser Aufgabe wäre es vergleichbar mit einem Wassermolekül III, das ebenfalls in allen sechs HexB-Monomeren identifizierbar ist. Es wird von den Resten Asp240 und Asp354 und dem O3 des δ -Lacton-Inhibitors koordiniert und ist damit direkt an der Bildung der Substratbindestelle beteiligt (Abbildung 19, Abbildung 17(b) als WAT 87 der Kette A). Beide Wassermoleküle, I und III, sind verdeckt, sobald und solange das Substrat bzw. der terminale nicht-reduzierende Zucker des Substrats oder das Oxazolium-Zwischenprodukt der Reaktion in der Substratbindetasche gebunden sind.

Das Wassermolekül II (Abbildung 19) hingegen wird nur vom Rest Glu355 koordiniert und besitzt einen deutlich höheren durchschnittlichen B-Wert von 55\AA^2 als Wassermolekül I, der auf eine höhere Beweglichkeit oder eine nur teilweise Besetzung dieser Position zurückgeführt werden kann. Wassermolekül II ist in einer geeigneten Position zum C1-Atom des Substrates auf der gegenüberliegenden Seite der Abgangsgruppe, um einen nukleophilen „in line“-Angriff auf dieses durchzuführen. Der Abstand zwischen dem C1-Atom im gebundenen Übergangszustandsanalogen Inhibitor und dem Wassermolekül II beträgt $3,2\text{\AA}$. Im Gegensatz zu Wassermolekül I ist die Bindestelle von Wassermolekül II nach dem Austritt des (+1)-Zuckers und weiterer mit ihm verknüpfter Teile des Substrates frei für das Lösungsmittel zugänglich (Abbildung 19). Daher ist das Wassermolekül II eindeutig als dasjenige Wassermolekül identifizierbar, das im zweiten Schritt des Mechanismus (Abbildung 18, Schritt 2b) den nukleophilen Angriff auf das anomere C1-Atom des Zuckers durchführt.

3.8 Oligomerstruktur von HexB im Kristall

HexB ist nur als Dimer, nicht aber als Monomer stabil und aktiv, dies gilt ebenso für die Isoenzyme HexA und S. Der Zusammenbau der α - und β -Untereinheit erfolgt früh im Reifungsprozess der Hexosaminidasen, nämlich bereits direkt nach der Synthese im endoplasmatischen Retikulum. Bemerkenswerter Weise ist der Zusammenbau zweier β -Ketten zum Homodimer HexB schneller und bevorzugt gegenüber der Assoziation zweier α -Ketten zu HexS oder der von α - und β -Kette zu HexA (Proia et al., 1984; Sonderfeld-Fresko und Proia, 1988). Mutationen, die Störungen in der Dimerbildung hervorrufen, sind auch als Ursachen von GM2-Gangliosidosen bekannt (Banerjee et al., 1994; d'Azzo et al., 1984). Aus den vorliegenden Studien zu bakteriellen Homologen, allesamt Monomere, sind keine Rückschlüsse auf die Quartärstruktur, also den Aufbau des HexB-Dimers aus den Monomeren, möglich. Aufgrund der besonderen Bedeutung der Dimerisierung für die Aktivität und Stabilität von HexB ist aber gerade die Kenntnis der Dimerstruktur eine essentielle Voraussetzung für ein vollständiges Verständnis der mit den Hexosaminidasen assoziierten Erbkrankheiten und deren Pathogenese. HexB kristallisiert unter den vorliegenden Bedingungen in der Raumgruppe $P3_121$ mit sechs Monomeren in der asymmetrischen Einheit und daraus folgend 36 Monomeren in der Einheitszelle. Jedes Monomer der β -Kette im Kristall bildet Kontakte zu wenigstens zwei, meist aber drei oder vier weiteren Monomeren. Damit lässt die reine Kristallstruktur verschiedene denkbare Oligomerformen zu, die die Einheitszelle des Kristalls aufbauen könnten. Erst unter Betrachtung verschiedener Anforderungen und Erwartungen an eine physiologisch relevante Oligomerstruktur ist es möglich, Kristallpackungskontakte von in Lösung existierenden Kontaktstellen mehrerer Untereinheiten eines Oligomers zu unterscheiden.

3.8.1 Analyse der Kristallpackung

Neben verschiedenen Kontaktstellen, die von nur fünf oder weniger interagierenden Resten gebildet werden, finden sich drei generell auftretende Typen von Kontaktstellen, die im Folgenden als Kontaktstelle I, II und III bezeichnet werden. Kontaktstelle I verbindet unter anderem die Monomere A und B, II die Monomere A und C und III die Monomere B und C, jedes einzelne Monomer bildet alle drei Arten von Kontakten aus (Abbildung 20). Ein wesentliches Kriterium für die Stabilität und Bedeutung einer solchen Kontaktstelle ist die Zahl der gebildeten interatomaren Kontakte und damit die Anzahl der beteiligten Aminosäuren. Diese ist für die Kontaktstelle A mit 24 beteiligten Resten je Monomer deutlich höher als für die Kontaktstellen II (13) und III (11). Die Zahl der nicht-gebundenen Kontakte (van-der-Waals-Kontakte), die im Bereich der Kontaktstellen vorliegen, unterscheiden sich deutlich: Während für Kontaktstelle I 24 beteiligte Reste pro Monomer 59 van-der-Waals-Interaktionen eingehen, sind es bei II nur 8 (13 beteiligte Reste) und bei III 7 (11 beteiligte Reste) (Tabelle 7). Der dramatische Unterschied zwischen I und II bzw. III geht auf die Arten der hauptsächlich am Kontakt beteiligten Aminosäuren zurück. An der Kontaktstelle I sind 8 große hydrophobe Reste je Seite beteiligt, an II und III jeweils nur 3. Diese Reste bilden oftmals mit mehreren Atomen enge Kontakte aus, so zum Beispiel Tyrosin-Reste, die an hydrophoben Stapel-

wechselwirkungen beteiligt sind. Die unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung der Kontaktflächen spiegelt sich auch in der Zahl und Häufigkeit von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Untereinheiten wieder. In der Kontaktstelle I werden zehn intermolekulare Wasserstoffbrücken (0,42 pro Rest) gebildet, ebenso viele wie in II (0,77 pro Rest), in III liegen lediglich drei Wasserstoffbrücken vor (0,27 pro Rest). Die durch die Kontakte verborgene Fläche pro Monomer ist für I (1368\AA^2) fast doppelt so groß wie für II (751\AA^2) und dreimal so groß wie für III (473\AA^2) (Tabelle 7). Die Zahl der in wässrigem Milieu besonders stabilisierend wirkenden hydrophoben Kontakte ist damit für die Kontaktfläche I eindeutig am höchsten. Die Kontaktstelle II wird von Wasserstoffbrückenbindungen dominiert.

Tabelle 7: Eigenschaften der intermolekularen Kontaktstellen in HexB-Kristallen.

Eigenschaften	I (AB)	II (AC)	III (BC)
Beteiligte Reste	211,212,260 452-456 491,492,494 496,497 500,501,533 543-550	78 89,92,96,99 247,249 262,265,267 269,270,273	71-75 123 183,184 186,187 552
Anzahl beteiligter Reste ¹	24	13	11
Nicht-gebundene Kontakte ²	59	8	7
Anzahl beteiligter hydrophober Reste ^{2,3}	8	3	3
Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen	10	10	3
Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen pro 100 \AA^2 verborgene Oberfläche	0,73	1,33	0,63
Identisch konservierte Reste ⁴	63%	23%	18%
Konservativ ausgetauschte Reste ⁴	25%	38%	36%
Mittlerer B-Wert der beteiligten Reste (\AA^2)	33±4	40±6	49±10
Verborgene Oberfläche (\AA^2) ²	1368	751	473

¹ An den Kontakten beteiligte Reste enthalten Atome, deren Abstand zu einem Atom des Partnermonomers weniger als 3.66 \AA beträgt.

² Werte sind angegeben pro Seite bzw. Monomer

³ Als hydrophobe Reste werden hier betrachtet: Ile, Leu, Val, Met, Tyr, Phe, Trp

⁴ Konservierung zwischen allen Hexosaminidase α - und β -Ketten aus Maus und Mensch

Diese sind zwar geeignet, eine Ausrichtung von Komplexen zu stabilisieren, tragen aber wenig zur freien Stabilisierungsenergie einer Dimerkontaktfläche bei, da sie im Monomer energetisch nahezu gleichwertig durch Wasserstoffbrückenbindungen zu umgebenden Wassermolekülen ersetzt werden können.

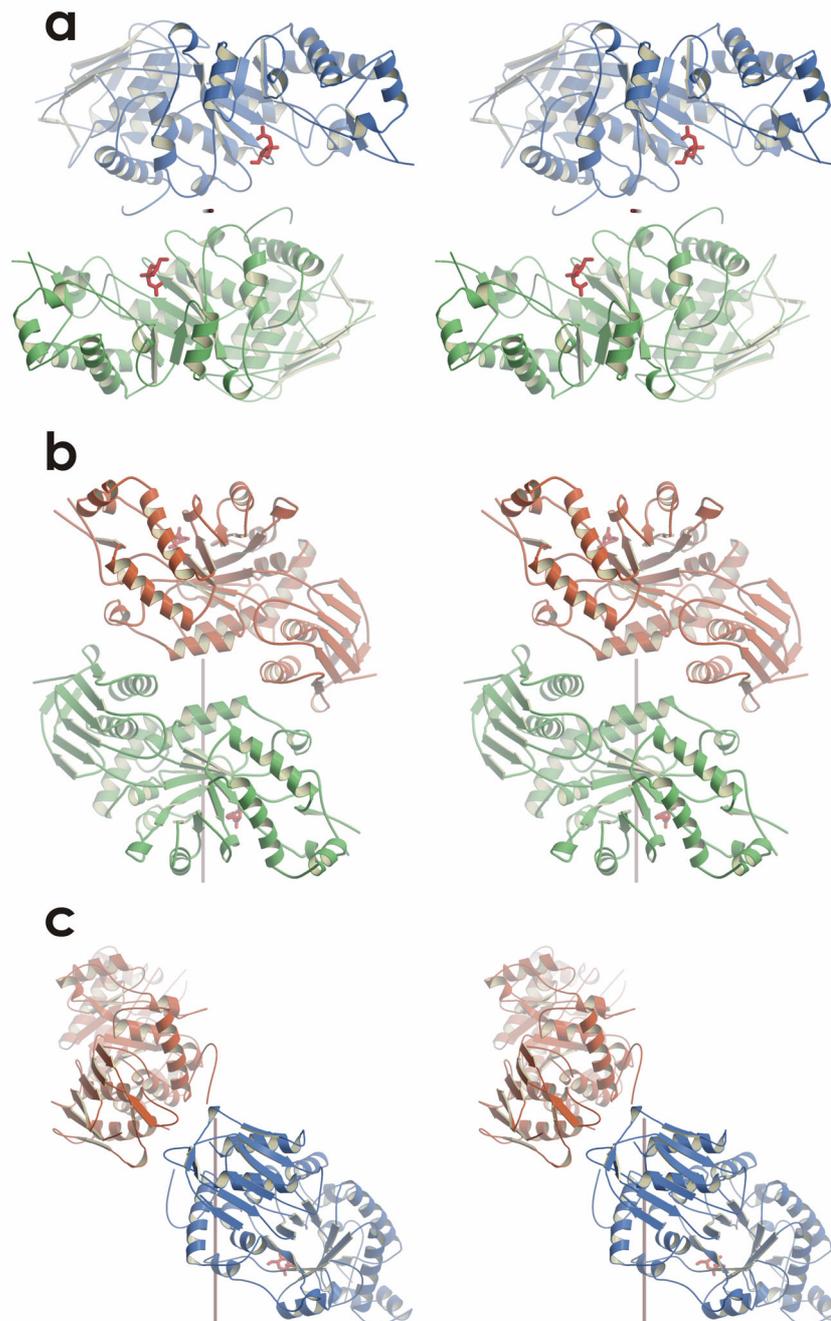


Abbildung 20: Übersicht über die Kontakte im HexB-Kristall (stereo). (a) Kontakt I verbindet die Monomere A (grün) und B (blau), hier sind vorwiegend Schleifenregionen auf der C-terminalen Seite des $(\beta, \alpha)_8$ -Fasses beteiligt. (b) Kontakt II, gebildet von A (grün) und C (rot), beteiligt sind äußere Bereiche zwischen den N-terminalen Domänen und Erweiterungen des $(\beta, \alpha)_8$ -Fasses. (c) Kontakt III zwischen B (blau) und C (rot), mit wesentlicher Beteiligung der N-terminalen Domäne. Zur Orientierung ist in allen Abbildungen die zweizählige Achse zwischen den Monomeren A und B (gezeigt in (a)) eingezeichnet.

Zur Charakterisierung von Dimer-Kontaktflächen haben Jones und Thornton (1996) einen weiteren Indikator eingeführt, nämlich die Zahl der Wasserstoffbrückenbindungen pro 100\AA^2 verborgener Oberfläche pro Monomer im Komplex. Dieser Parameter beschreibt das Verhält-

nis zwischen hydrophilen und hydrophoben Kontakten in der Grenzfläche. In einer statistischen Auswertung von 32 echten Homodimer-Strukturen ermittelten sie für diesen Parameter den Wert $0,7 \pm 0,4$ Bindungen pro 100 \AA^2 . Dieser Wert stimmt gut mit den Werten für Kontaktfläche I (0,7) und III (0,6), nicht aber mit dem für II (1,3) überein (Tabelle 7). Die Bewertung der Art und des Ausmaßes der Interaktionen in den einzelnen Kontaktflächen führt damit eindeutig zu dem Schluss, dass Kontaktfläche I die physikalisch stärkste Interaktion zweier Monomere vermittelt.

Es erscheint zunächst ungewöhnlich, dass es insbesondere Schleifenregionen sind, die zu der Bildung einer besonders festen Kontaktfläche I beitragen, da Schleifenregionen in Proteinen allgemein eine höhere Flexibilität und geringere Ordnung besitzen als typische Sekundärstrukturelemente, die z.B. zur Bildung der Kontaktfläche II beitragen. Der kristallographische Temperaturfaktor, auch B-Wert genannt, ist ein Maß für die statische Unordnung unter Tieftemperaturbedingungen und damit auch für die Flexibilität unter physiologischen Temperaturbedingungen. Der mittlere B-Wert für alle Aminosäurereste in der HexB Kristallstruktur beträgt $40 \pm 11 \text{ \AA}^2$. Für alle an der Kontaktfläche I beteiligten Reste beträgt der mittlere Temperaturfaktor dagegen nur $33 \pm 4 \text{ \AA}^2$, während er für II ($40 \pm 11 \text{ \AA}^2$) und III ($49 \pm 10 \text{ \AA}^2$) dem durchschnittlichen Wert für alle Reste entspricht bzw. diesen noch übersteigt (Tabelle 7). Die Schleifenregionen, die die Kontaktfläche I bilden, besitzen somit eine hohe Ordnung in der Kristallstruktur, die sie als Dimer-Kontaktflächen qualifiziert (Abbildung 21). An der Basis dieser Schleifen, nahe den C-Termini der β -Stränge des TIM-Fasses liegen zudem die Reste des aktiven Zentrums, deren Position und Konformation nur sehr wenig flexibel sein darf, um die katalytische Aktivität zu erhalten (Abbildung 13).

Neben der reinen Strukturbetrachtung müssen bei der Zuweisung der Dimerstruktur selbstverständlich auch bisherige biochemische Erkenntnisse berücksichtigt werden. Die Isoenzyme HexA, B und S sind sich in Ihren physikalischen Eigenschaften und in ihrer katalytischen Aktivität ähnlich, wenn auch nicht identisch und werden aus insgesamt zwei α - oder β -Ketten zusammengesetzt. Die beiden Ketten sind in ihrer Aminosäuresequenz zu 60% identisch und besitzen aller Wahrscheinlichkeit nach eine identische Faltung. Somit lässt sich vermuten, dass die Assoziation von zwei Ketten zu den verschiedenen Isoenzymen immer auf die prinzipiell gleiche Weise und unter Verwendung konservierter Kontaktflächen erfolgt. Diese Vermutung wird durch Experimente belegt, in denen chimäre Fusionsproteine, die aus Teilen der α - und β -Ketten aufgebaut sind, erfolgreich exprimiert wurden und katalytische Aktivität besaßen (Tse et al., 1996). Damit kann die Konservierung der Aminosäuren in den einzelnen Kontaktflächen ebenfalls als Kriterium für die physiologische Bedeutung einer Kontaktfläche dienen. In den Aminosäuresequenzen der α - und β -Ketten aus Mensch und Maus unterscheidet sich der Grad der Konservierung für die einzelnen Kontaktflächen deutlich: Während 63% der Reste in I zwischen den Sequenzen identisch sind, sind dies in II nur 23% und in III 18%. Auch der gesamte Anteil an konserviert ausgetauschten und identischen Resten ist in I mit insgesamt 88% (identisch 63%, konservativ ausgetauscht 25%) signifikant höher als in II (gesamt 61%, 23%/38%) oder III (gesamt 54%, 18%/36%) (Tabelle 7, Abbildung 42).

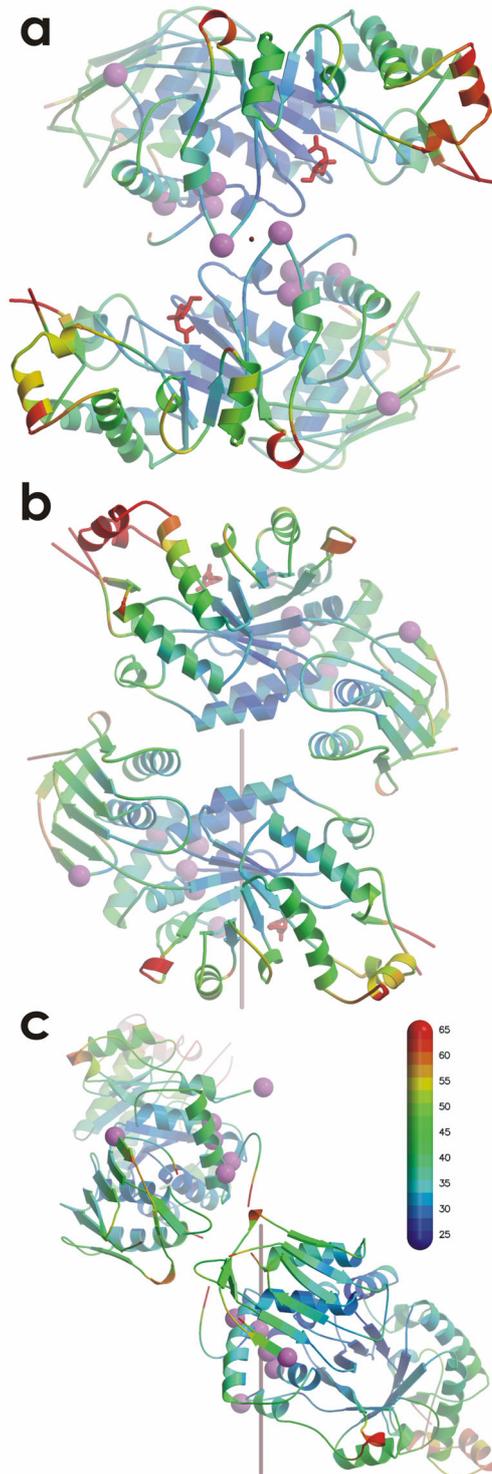


Abbildung 21: Hypothetische HexB-Dimere. B-Wert-Verteilung und Lage von krankheitsassoziierten Mutationen in hypothetischen HexB-Dimeren, gebildet durch die Kontaktflächen I (a), II (b) und III (c). Die Bändermodelle sind nach B-Wert gefärbt, eine Farbskala in [Å²] ist gezeigt, die Lage der C α -Atome der mit pathogenen Mutationen assoziierten Reste ist durch rosa Kugeln angezeigt. Die Perspektiven entsprechen jeweils Abbildung 20.

Die Spezifität des aktiven Zentrums einer Untereinheit im Dimer wird durch die zweite Untereinheit reguliert, wie beispielsweise an den verschiedenen Aktivitäten der α -Untereinheiten in HexA und HexS gegenüber dem Glykolipid SM2 gezeigt wurde (Hepbildikler et al., 2002). Angesichts der erwarteten ähnlichen Faltung der beiden Ketten und des starren Aufbaus des TIM-Fasses als Grundgerüst des aktiven Zentrums ist eine solche Beeinflussung vorwiegend dadurch zu erklären, dass Teile einer Untereinheit nahe an die Substratbindestelle der anderen Untereinheit heranreichen. Dies ist nur für die Kontaktfläche I der Fall, hier wird Tyr456 einer Untereinheit so nahe am aktiven Zentrum der anderen Untereinheit positioniert, dass es gemeinsam mit Resten der (-1)-Zuckerbindestelle ein Wassermolekül koordiniert (Abbildung 19). Damit qualifizieren sowohl die physikalische Stärke der Interaktion als auch die Übereinstimmung mit den Ergebnissen biochemischer Untersuchungen nur die Kontaktfläche I als physiologisch relevante Dimerisierungsregion.

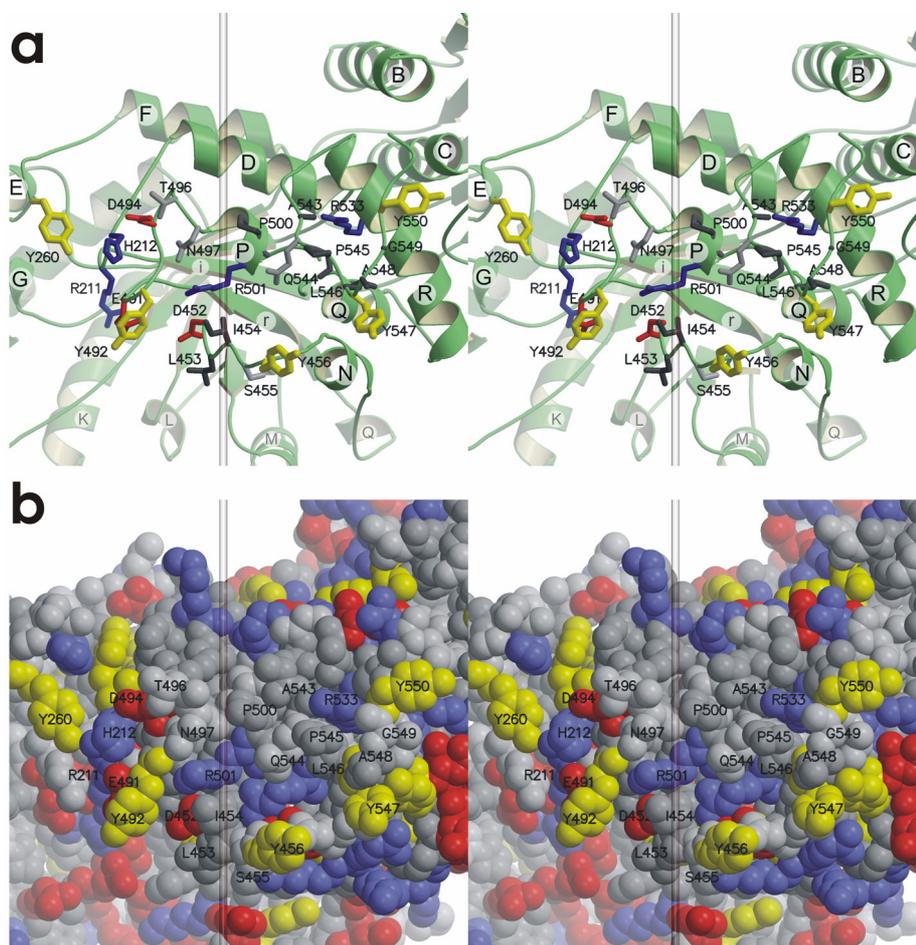


Abbildung 22: Dimer-Kontaktfläche von HexB in Aufsicht (stereo). Die Kontaktfläche des gezeigten Monomers A ist identisch zu der in Abbildung 20(a) und Abbildung 21(a) gezeigten. (a) Bändermodell. (b) Kalottenmodell. In (a) und (b) sind an der Kontaktfläche beteiligte Aminosäuren beschriftet, nicht-polare Seitenketten sind dunkelgrau, polare nicht-ionische hellgrau, kationische blau und anionische rot gefärbt. Tyrosinreste sind gelb gefärbt und bilden eine bogenförmige Umrandung der Kontaktfläche. Die zweizählige, das Dimer beschreibende Symmetrieachse ist eingezeichnet. Der in (a) und (b) gezeigte Ausschnitt ist identisch.

3.9 Dimere Struktur von HexB

Die Dimerkontaktfläche (Kontaktfläche I) wird zu einem großen Teil von Schleifenregionen auf der C-terminalen Seite des $(\beta, \alpha)_8$ -Fasses gebildet. Die gleichen Regionen bilden auch das aktive Zentrum; an einigen Stellen sind Aminosäuren der (-1)-Substratbindestelle sogar direkt an der Dimerisierung beteiligt. Diese beteiligten Schleifenregionen liegen zwischen Strang i und Helix D, zwischen den Helices E und F, zwischen Strang q und Helix N sowie zwischen Strang r und Helix P (Abbildung 22). Einen weiteren Beitrag zur Dimerkontaktfläche liefern die Helix P und die C-terminale Schleifenregionen von Rest 543 bis Rest 550. Diese Schleifenregion wird in ihrer Lage und Konformation entscheidend durch eine Disulfidbrücke zwischen Cys534 und Cys551 stabilisiert, die C-terminal von Cys551 gelegenen Reste sind dagegen weitgehend ungeordnet (Abbildung 28).

3.9.1 Dimerkontaktfläche

Die Dimerkontaktfläche ist in erster Näherung rechteckig geformt, mit Seitenlängen von 45Å und 25Å. Besonders auffällig ist ein halbmondförmiger Bogen aus fünf Tyrosinresten, der die Kontaktfläche umrundet und abschließt (Abbildung 22, gelb). Jedes dieser fünf Tyrosine bildet, neben anderen Interaktionen, hydrophobe Kontakte zu einem der fünf äquivalenten Tyrosine in der anderen Untereinheit des Dimers aus. Andere nicht-polare Seitenketten, wie Leu453, Pro545 und Leu546 (Abbildung 22, dunkelgrau) interagieren mit den fünf Tyrosinen der anderen Untereinheit und tragen damit zu dem Ring hydrophober Kontakte bei, der die Kontaktfläche gegen das Lösungsmittel abgrenzt. Neben den hydrophoben Kontakten treten auch Wasserstoffbrücken zwischen zwei Monomeren auf. Betrachtet man eine Hälfte der Kontaktfläche (Ausschluß von „Spiegel-Interaktion“, keine doppelte Zählung gleichartiger Interaktionen), aus der die zweite Hälfte durch Anwendung einer zweizähligen Drehachse erzeugt werden kann, so treten drei Wasserstoffbrücken zwischen Seitenketten, eine zwischen einer Seitenkette und einem Hauptkettenatom und eine zwischen Hauptkettenatomen auf. Der Carbonyl-Sauerstoff von Arg211, das direkt an der Substratbindung beteiligt ist, bildet eine Wasserstoffbrücke zum Hauptketten-Stickstoff von Gly549 der anderen Untereinheit und ist damit an der einzigen Hauptketten-Hauptketten-Wasserstoffbrücke beteiligt. Das benachbarte His212 bildet mit seinem N^εH eine Wasserstoffbrücke zum Carbonyl-Sauerstoff von Tyr547 des zweiten Monomers und damit die einzige Seitenketten-Hauptketten-Wasserstoffbrücke (Abbildung 23). Die Seitenketten-Seitenketten-Wasserstoffbrücken werden zwischen Asn497/Gln544 sowie Asp494/Arg533 gebildet (Abbildung 23). Neben den direkten Kontakten zwischen Aminosäuren der beiden Untereinheiten treten noch eine Reihe indirekter, über Wassermoleküle, die Wasserstoffbrücken zu beiden Untereinheiten bilden, vermittelte Kontakte auf.

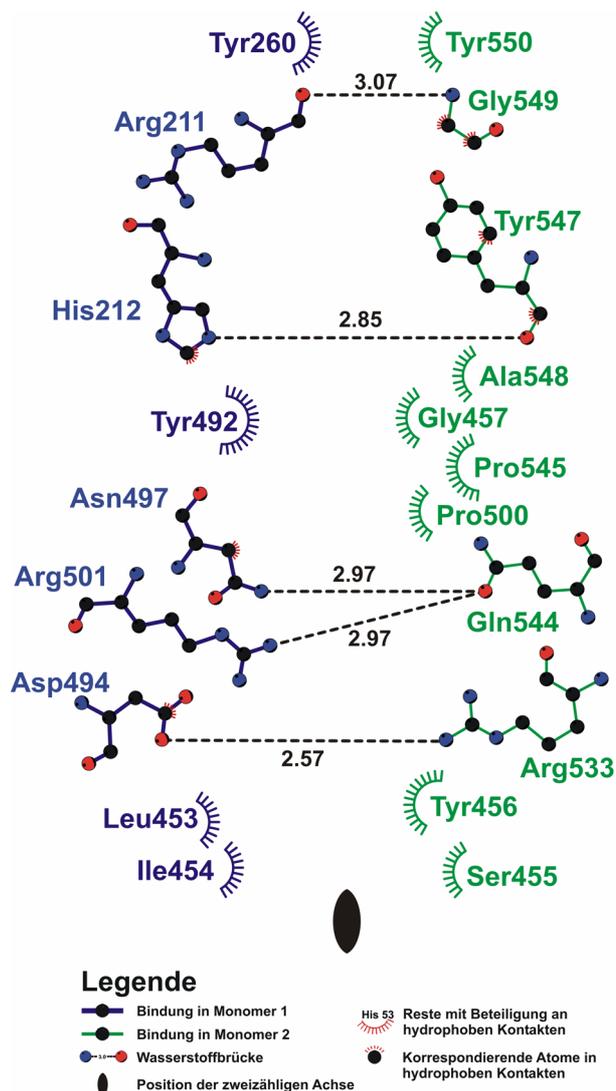


Abbildung 23: Interaktionen in der Dimer-Kontaktfläche von HexB (schematisch). Nur eine Hälfte der Kontaktfläche ist gezeigt, die zweite Hälfte der Kontaktfläche wird durch die eingezeichnete zweizählige Rotationsachse (schwarze Ellipse) erzeugt.

3.9.2 Aktives Zentrum und Substratbindestelle im HexB-Dimer

Im HexB-Dimer befindet sich jeweils Tyr456 einer Untereinheit in großer Nähe ($< 4\text{\AA}$) zum nächsten Atom (C6) des gebundenen Inhibitors im aktiven Zentrum der anderen Untereinheit. Neben Tyr456 sind Tyr547 und die umgebenden Reste nahe der Substratbindestelle der anderen Untereinheit platziert. Diese Reste bilden gemeinsam eine „Rückwand“ der Substratbindestelle in einer Region, in der bei den bakteriellen Homologen die (+1)-Substratbindestelle lokalisiert ist (Abbildung 24). Diese ist in den Strukturen von SmChb und SpHex sehr ähnlich gestaltet; der (+1)-Ring des Substrats bildet hydrophobe Stapelwechselwirkungen mit einem

konservierten Tryptophan, Trp685 (SmChb) bzw. Trp408 (SpHex) (Abbildung 24). Die Wände der (+1)-Substratbindestelle werden von Val493/Val276 (SmChb/SpHex) auf der dem konservierten Tryptophan entgegengesetzten Seite des (+1)-Zuckerrings und Tyr683/Leu406 auf der anderen Seite gebildet. In der dimeren Struktur von HexB existieren keine den bakteriellen Homologen ähnlichen Aminosäuren in diesen den (+1)-Ring bindenden Positionen. Vielmehr ist die Substratbindetasche nur um den (-1)-Ring herum geschlossen, aber in der wahrscheinlichsten Umgebung des (+1)-Rings und aller folgenden Gruppen der möglichen Substrate weit geöffnet. Ein grundsätzlich anderer Bindungsmodus des (-1)-Ringes ist jedoch aufgrund der speziellen Anforderungen des katalytischen Mechanismus und der Konservierung aller Reste der (-1)-Bindungsstelle nahezu ausgeschlossen, da nur die Bindung des Substrats in der verzerrten Boot-Konformation anstelle der in Lösung begünstigten 4C_1 -Sesselkonformation den Ablauf des formulierten Mechanismus unter Substratbeteiligung erlaubt. Die offene Bindungstasche steht in gutem Einklang mit der beobachteten breiten Substratspezifität von HexB. Es bleibt jedoch unklar, ob die großen, physiologisch bedeutsamen Substrate wie Ganglioside und verwandte Glykolipide mit weiteren Zucker- und Fettsäureanteilen mit HexB interagieren. Ein Nachweis für die Existenz von sekundären Bindungsstellen für Substratbestandteile neben dem (-1)-Zuckerring konnte bisher nicht erbracht werden.

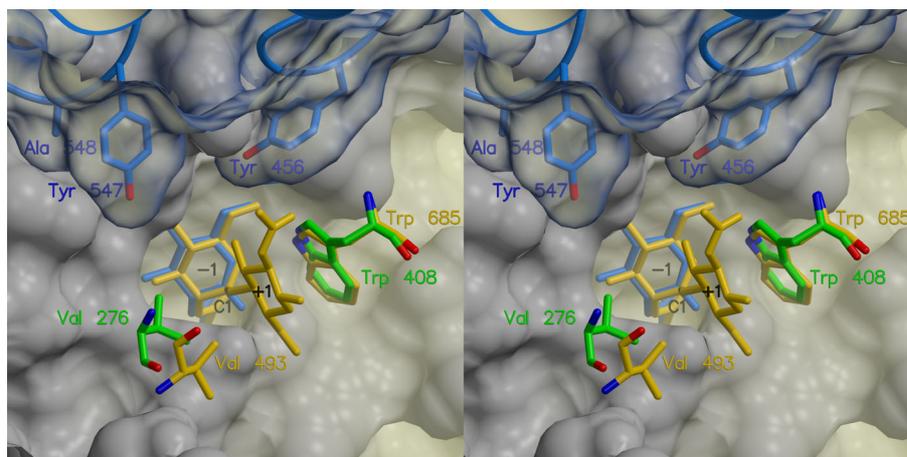


Abbildung 24: Substratbindestelle im HexB-Dimer (stereo). Die dem Lösungsmittel zugängliche Oberfläche des ersten Monomers ist in grau gezeigt, die des zweiten in transparentem Blau. Der an die erste Untereinheit gebundene Inhibitor ist in blau gezeigt, wie auch die benachbarten Aminosäuren des zweiten Monomers. Ausgewählte Reste in SmChb, die an der Bindung des (+1)-Zuckers der kokristallisierten Chitobiose beteiligt sind (gold, pdb: 1qbb) und die korrespondierenden Reste in SpHex (grün, pdb: 1hp5) sind mit der HexB-Struktur auf der gleichen Basis wie in Abbildung 16 überlagert.

3.10 Krankheitsassoziierte Mutationen in HexB

Zu den genetischen Defekten, die die Sandhoff-Krankheit hervorrufen können, gehören partielle Gendelektionen, kleinere Insertionen und verschiedene Punktmutationen im *HEXB* Gen. Führt eine Mutation dazu, dass das entsprechende Gen nicht mehr in mRNA transkribiert

werden kann oder dazu, dass die entstehende mRNA hochgradig instabil ist, so ruft sie eine „early-onset“-Variante der Sandhoff-Krankheit hervor. Dabei treten erste Symptome bereits in der frühen Kindheit auf und die Patienten versterben nach einem raschen Fortschreiten der Neurodegeneration noch im Kindesalter. Einzelne Punktmutationen, die die Produktion von mRNA und auch von Protein mit einer gewissen Restaktivität erlauben, führen zu einer als „late-onset“ Variante bezeichneten Form der Sandhoff-Krankheit. Diese Verlaufsform ist durch einen Einsatz der ersten Symptome erst im Jugendalter und ein langsames Fortschreiten gekennzeichnet. Patienten, die an dieser Variante leiden, erreichen das Erwachsenenalter, teilweise verläuft die Krankheit hier sogar nicht tödlich. Mittlerweile sind wenigstens zehn solcher Punktmutationen im *HEXB* Gen in Zusammenhang mit dem Auftreten der Sandhoff-Krankheit beschrieben (Tabelle 8). Im Gegensatz zu den assoziierten klinischen Phänotypen sind die Folgen der Mutationen auf Stabilität, Faltung und Aktivität von HexB zum Teil kaum untersucht, vor allem wegen der großen Schwierigkeiten bei der rekombinanten Expression mutierter Proteine oder bei deren Reinigung aus Patientenproben.

Tabelle 8: Punktmutationen in der β -Kette der Hexosaminidase bei Sandhoff-Patienten.

Mutation	Biochemischer Phänotyp	Klinischer Phänotyp	Literatur
S62L	unbekannt	infantil akut (zweites Allel del50kb)	(Zhang et al., 1995)
C309Y	unbekannt	chronisch (vermutlich durch zweites Allel P417L)	(Gomez-Lira et al., 1995)
P417L	70% der normalen Aktivität	subakut oder schwach chronisch	(Fujimaru et al., 1998; Gomez-Lira et al., 1995; McInnes et al., 1992)
Y456S	HexB abwesend, β -Ketten liegen nur in HexA vor, HexA Restaktivität 30 %	subakut (zweites Allel I207V)	(Banerjee et al., 1991; Cashman et al., 1986)
P504S	ca. 20% Restaktivität gegen MUG, vorwiegend als Proenzym	chronisch (zweites Allel del16kb)	(Hou et al., 1998)
R505Q	thermolabil	chronisch (zweites Allel null)	(Bolhuis et al., 1993)
C534Y	unbekannt	infantil akut	(Kuroki et al., 1995)
A543T	thermolabil	asymptomatisch	(Narkis et al., 1997)
K121R	unverändert	Polymorphismus	(McInnes et al., 1992)
I207V	unverändert	Polymorphismus	(Zhang et al., 1995)

Alle Aminosäuren, deren Mutation zu einem Ausbruch der Sandhoff-Krankheit führen, sind in der Kristallstruktur von HexB wohlgeordnet, ihr durchschnittlicher B-Wert liegt unter dem für alle Aminosäuren. Die funktionale Bedeutung der mutierten Reste wurde bereits anhand eines Homologie-Modells von HexB besprochen (Tews et al., 1996), jedoch ohne Kenntnis wichtiger Details: Das verwendete Modell umfasste nur den Hauptteil der zentralen TIM-Fass-Domäne, die Schleifenregionen auf der C-terminalen Seite des Fasses waren zu einem großen Teil fehlmodelliert, die N-terminale Domäne und die C-terminale Schleifenregion waren wegen mangelnder Sequenzkonservierung nicht im Modell enthalten. Auf der Basis dieses Modells war es nicht möglich, die Struktur des Dimers zu ermitteln und die Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten zu verstehen. Allein die Tatsache, dass HexB ebenso wie HexA nur als Dimer aktiv ist und monomere Formen keinerlei physiologische Bedeutung besitzen, zeigt die Beschränktheit einer Diskussion der Krankheits-assoziierten Mutationen auf dieser Basis auf. Tatsächlich sind viele der betreffenden Mutationen in der Nähe der Dimer-Kontaktfläche lokalisiert (Abbildung 21). Wie in den folgenden Absätzen dargelegt wird, sind die Mutationen in einem direkten Zusammenhang mit einer gestörten Dimerisierung von HexB zu sehen, wie zum Teil auch durch biochemische Studien belegt werden kann.

Unter den Resten, deren Mutation zu einem Ausbruch der Sandhoff-Krankheit führt, sind lediglich die Reste Pro504 und Arg505 hochkonserviert sowohl in eukaryotischen als auch in prokaryotischen Enzymen aus der Familie 20 der Glykosylhydrolasen. Dagegen sind Pro417, Tyr456, Cys309, Cys534 und Ala543 zwar sehr wohl konserviert in den α - und β -Ketten der Säugerenzyme, nicht aber in den monomeren bakteriellen Homologen. Da die generelle Faltung, das aktive Zentrum und der enzymatische Mechanismus der pro- und eukaryotischen Homologen nahezu identisch sind, ist dies ebenfalls als Hinweis auf die Bedeutung dieser Reste bei der Assoziation der α - und β -Ketten der dimeren Säugerenzyme zu werten.

3.10.1 Mutation Ser62Leu: Infantile akute Sandhoff-Krankheit

Der Nukleotid-Austausch C185T im *HEXB* Gen wurde in einem Allel eines Patienten mit einer „early-onset“-Variante der Sandhoff-Krankheit gefunden (Zhang et al., 1995). Dieser Austausch führt zu der Mutation Ser62Leu in der β -Kette der Hexosaminidase. Es existieren keine Berichte über die Expression oder eine womöglich vorhandene Restaktivität des mutierten Enzyms. Ser62 befindet sich in einem scharfen β -Knick am N-Terminus des N-terminalen β -Stranges a (Abbildung 25). Serin gehört zu den typischerweise in solchen Knicken auftretenden Resten, was durch einen Chou-Fasman-Parameter von 143 für die Knick-Konformation ausgedrückt wird. Leucin hingegen kommt sehr selten in solchen Knicks vor und wirkt destabilisierend, ausgedrückt in dem niedrigen Chou-Fasman-Knick-Parameter von 59 (Prevelige und Fasman, 1989). Ser62 ist von den hydrophoben Aminosäuren Pro60, Leu61, Val93 und Ile195 umgeben. Eine Mutation des hydrophilen Serins zu einem hydrophoben Leucin erlaubt damit möglicherweise starke hydrophobe Interaktionen zwischen den Aminosäureseitenketten, die die Faltung in der Knick-Region beeinträchtigen könnten. Somit ist anzunehmen, dass die Mutation Ser62Leu einen negativen Einfluss auf die Faltung und Stabilität von HexB hat, da der Knick um Ser62 essentiell ist, um die Faltung der N-terminalen Domäne aufrecht zu erhalten.

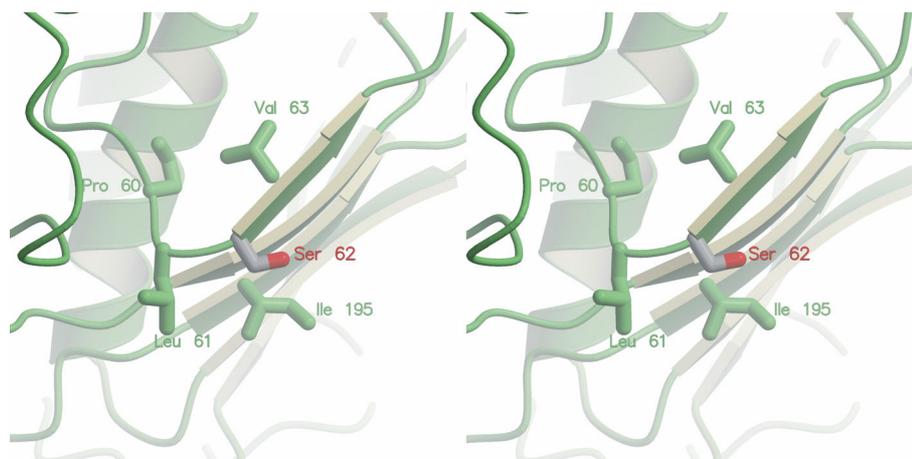


Abbildung 25: Mutation Ser62Leu (stereo). Monomer A ist als grünes Bändermodell gezeigt. Der betroffene, nicht-mutierte Rest ist nach Atomtyp gefärbt als Stabmodell gezeigt und rot beschriftet. Ausgewählte Reste in der Umgebung dieses Restes sind in der Farbe ihres Monomers als Stabmodell gezeigt und beschriftet.

3.10.2 Mutation Pro417Leu: Chronische Sandhoff-Krankheit

Der Nukleotidaustausch C1214T in Exon 11 des HEXB Gens führt zu der Produktion eines instabilen und fehlgespleißten mRNA-Transkripts und dadurch zu einer insgesamt erniedrigten Expression von HexB. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der Einfluß des Basenaustauschs noch weiter reicht: Das resultierende Protein mit der Mutation Pro417Leu, konnte rekombinant in COS-Zellen exprimiert werden und besitzt nur 70% der spezifischen Aktivität des nicht-mutierte Proteins (Wakamatsu et al., 1992). Die Mutation Pro417Leu ähnelt in ihrem Charakter der zuvor besprochenen Mutation Ser62Leu, da ein Knick-stabilisierender Prolin-Rest durch ein Leucin ersetzt wird, das die Ausbildung eines Knicks behindert. Die Pro417Leu Mutation wurde in Patienten auch zusammen mit der Mutation Cys309Tyr beobachtet, die die Ausbildung einer Disulfidbrücke verhindert (Gomez-Lira et al., 1995). Darüberhinaus tritt die Pro417Leu-Mutation auch gemeinsam mit einem bekannten Polymorphismus, dem Austausch Lys121Arg, auf (McInnes et al., 1992). Es ist anzunehmen, dass die Kombinationen der betroffenen Mutationen einen stärkeren Effekt auf die Aktivität von HexB besitzen als die einzelne Mutation Pro417Leu.

3.10.3 Mutation Tyr456Ser: Chronische Sandhoff-Krankheit

Bei einem Patienten, der an einer der Sandhoff-Krankheit verwandten Erkrankung namens Motor-Neuron-Erkrankung litt, wurden zwei Mutationen in der β -Kette der Hexosaminidase festgestellt. Eine dieser Mutationen, Ile207Val war vom Vater ererbt, die andere, Tyr456Ser, von der Mutter (Banerjee et al., 1991). Für die Mutation Ile207Val ist gezeigt worden, dass diese ein häufiger auftretender Polymorphismus ist, der in keinem Zusammenhang mit einer verminderten Aktivität von HexB oder dem Auftreten der Sandhoff-Krankheit steht (Zhang et

al., 1995). Tyr456 liegt in einem Schleifenbereich auf der C-terminalen Seite des Strangs q (Strang 7 des $(\beta,\alpha)_8$ -Fasses). Die Reste Tyr450, Asp452 und Leu451 in demselben Schleifenbereich tragen zur Bildung des aktiven Zentrums bei und interagieren direkt mit dem gebundenen δ -Lacton-Inhibitor. Wie später gezeigt wird, ist auch Leu451 indirekt durch eine pathogene Mutation betroffen, nämlich durch die Mutation Arg505Gln. Ein potentieller Effekt der Mutation von Tyr456 wäre damit eine Konformationsänderung dieses Schleifenbereichs und dadurch eine Störung der Struktur des aktiven Zentrums. Allerdings liegt Tyr456 ungefähr 20Å vom aktiven Zentrum entfernt in dem äußersten Bereich der Schleifenregion. Angesichts der strengen Konservierung der Struktur des aktiven Zentrums und der starren Struktur des $(\beta,\alpha)_8$ -Fasses, das dem aktiven Zentrum deutlich näher ist als Tyr456, ist diese Möglichkeit jedoch wenig wahrscheinlich.

Wie bereits erwähnt, spielt Tyr456 auch eine bedeutende Rolle bei der Dimerisierung zweier Monomere zum aktiven HexB-Dimer. In diesem bildet Tyr456 hydrophobe Kontakte mit Ile454 und Tyr492 der anderen Untereinheit aus (Abbildung 23). Tyr456 ist Teil des halbmondförmigen Ringes von Tyrosinen, der die Dimerfläche umgibt und nach aussen hin abschließt (Abbildung 22). Die Kontakte von Tyr456 im Dimer bewirken eine Fixierung und Ausrichtung von Schleifenbereichen der anderen Untereinheit auf der C-terminalen Seite der Stränge q und r (Stränge 7 und 8 des $(\beta,\alpha)_8$ -Fasses). Diese Schleifenbereiche wiederum tragen mit einigen Aminosäureresten, z.B. Asp 452 und Glu491, direkt zum aktiven Zentrum der eigenen Untereinheit bei. Die Bedeutung von Tyr456 wird auch durch biochemische Untersuchungen bestätigt. So fehlte in kultivierten Fibroblasten eines Patienten, der die Tyr456Ser Mutation trägt, aktives HexB. Dennoch besaß der Patient aktive β -Ketten als Untereinheiten von HexA. Damit ist Tyr456 entweder essentiell für die Homodimerisierung der β -Ketten oder aber für die gegenseitige Aktivierung einer Untereinheit durch die andere (Banerjee et al., 1991). Für die letztere Möglichkeit spricht, dass sich Tyr456 in einer Fingerform weit ins aktive Zentrum der anderen Untereinheit hineinstreckt. Dabei nähert sich die Hydroxylgruppe des Tyrosines dem nächsten Atom (C6) des gebundenen Inhibitors bis auf eine Entfernung von nur 4Å (Abbildung 26). Das Tyr456 Oⁿ-Atom koordiniert dabei ein strukturelles Wassermolekül, das auch mit Asp452 und Glu491 der anderen Untereinheit Wasserstoffbrückenbindungen eingeht (s. Abschnitt 3.7). Über die zusätzliche Fixierung des Wassermoleküls und die Wechselwirkung mit Ile454 und Tyr492 kann Tyr456 somit den Verlauf der Hauptkette und die Konformation der Seitenketten in den betreffenden Schleifenbereichen und damit indirekt auch die Struktur des aktiven Zentrums der anderen Untereinheit beeinflussen. Aufgrund der Nähe zum in der anderen Untereinheit gebundenen Substrat ist Tyr456 darüberhinaus auch ein möglicher Bindungspartner für Teile jenseits des (-1)-Zuckers in den größeren natürlichen Substraten (Abbildung 24).

Eine Mutation von Tyr456 zu Serin bewirkt die Abwesenheit eines Koordinationspartners für das strukturelle Wassermolekül, das zwischen den Seitenketten von Asp452 und Glu491 gebunden ist. Der Wechsel vom großen hydrophoben Aromatenring des Tyr456 zum kleinen hydrophilen Serin bedeutet darüber hinaus das Fehlen der angesprochenen hydrophoben Kontakte z.B. zu Tyr492, die die Dimerkontaktfläche stabilisieren. Insgesamt betrifft die Muta-

tion daher sowohl die Stabilität des Dimers und die aktivierenden Wechselwirkungen zwischen den beiden Untereinheiten eines Dimers als auch möglicherweise die Konformation des aktiven Zentrums in der mutierten Untereinheit selber.

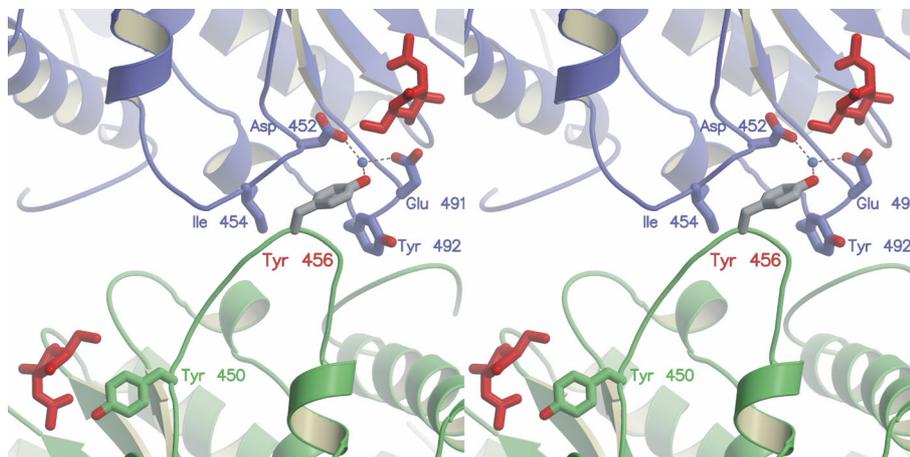


Abbildung 26: Mutation Tyr456Ser (stereo). Das Monomer A ist als grünes, das Monomer B als blaues Bändermodell gezeigt. Der betroffene, nicht-mutierte Rest ist nach Atomtyp gefärbt als Stabmodell gezeigt und rot beschriftet. Ausgewählte Reste in seiner Umgebung sind in der Farbe ihres Monomers als Stabmodell gezeigt und beschriftet. Der gebundene δ -Lacton-Inhibitor ist als rotes Stabmodell dargestellt.

3.10.4 Mutation Pro504Ser und Arg505Gln: Chronische Sandhoff-Krankheit

Die Mutation Arg505Gln in der Hexosaminidase β -Kette ruft eine „late-onset“-Variante der Sandhoff-Krankheit hervor. In diesem Fall gelang es, das mutierte Protein rekombinant in COS-Zellen zu exprimieren (Bolhuis et al., 1993). Das mutierte Enzym war deutlich hitzelabiler als die Wildtyp-Form und wurde durch eine einstündige Inkubation bei 55°C fast vollständig inaktiviert. Dies ist auch von großer Bedeutung für die Diagnostik, da normalerweise die unterschiedliche Thermostabilität als zweite Methode neben der unterschiedlichen Aktivität gegenüber MUG und MUGS zur Unterscheidung von HexA und HexB verwendet wird. Arg505 befindet sich am N-Terminus der Helix Q und damit nicht auf einer der direkt von den Strängen des $(\beta, \alpha)_8$ -Fasses ausgehenden Schleifenregionen. Zwischen den Atomen $N^{\eta 1}$ und $N^{\eta 2}$ von Arg505 und dem Hauptketten-Sauerstoff von Leu451 werden kurze Wasserstoffbrücken gebildet (Abbildung 27). Leu451 wiederum ist in einer Schleifenregion C-terminal von Strang q (Strang 7 des $(\beta, \alpha)_8$ -Fasses) gelegen. Die direkten Nachbarn von Leu451, nämlich Tyr450 und Asp452, sind wesentlich an der Bildung der Substratbindestelle und der Ausrichtung des Substrats beteiligt (s. Abschnitt 3.7). Die Wasserstoffbrücken zwischen Leu451 und Arg505 haben daher vermutlich eine Bedeutung bei der Stabilisierung der stark gekrümmten Schleifenkonformation in der Umgebung des Leu451 und damit auch für die Bildung der Substratbindestelle. Das Atom $N^{\eta 1}$ von Arg505 bildet außerdem eine kurze Wasserstoffbrücke zum Rückgratsauerstoff von Arg501, der in der Helix P liegt. Arg501 ist seinerseits an der Di-

merisierung zweier Monomere beteiligt, indem er mit seinem Nⁿ² eine Wasserstoffbrücke zu O^{ε1} von Gln544 der anderen Untereinheit bildet (Abbildung 27). Damit nimmt Arg505 als zweite mit einer pathogenen Mutation assoziierte Aminosäure neben Tyr456 eine Brückenfunktion zwischen der Dimerkontaktfläche und der Struktur des aktiven Zentrums ein.

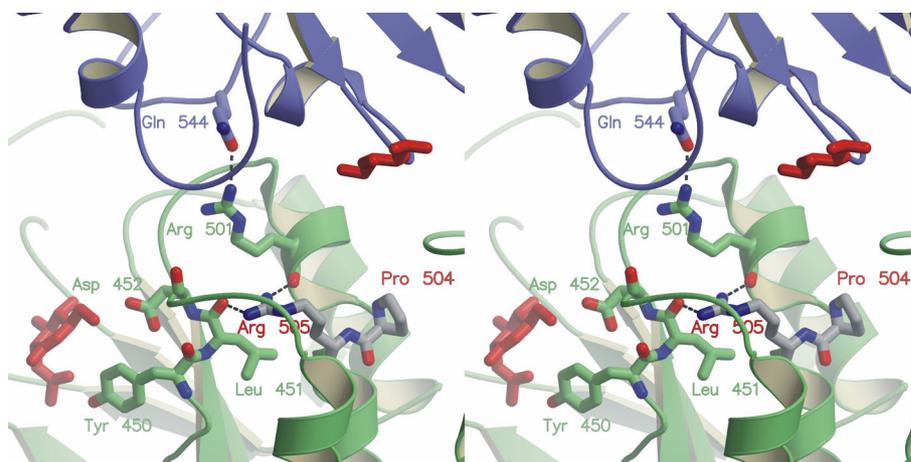


Abbildung 27: Mutationen Pro504Ser und Arg505Gln (stereo). Das Monomer A ist als grünes, das Monomer B als blaues Bändermodell gezeigt. Die betroffenen, nicht-mutierten Reste sind nach Atomtyp gefärbt als Stabmodell gezeigt und rot beschriftet. Ausgewählte Reste in ihrer Umgebung sind in der Farbe ihres Monomers als Stabmodell gezeigt und beschriftet. Der gebundene δ -Lacton-Inhibitor ist als rotes Stabmodell dargestellt.

Eine Mutation des dem Arg505 benachbarten Pro504 zu Serin führt zu der Expression einer hitzelabilen Form von HexA mit einer verminderten spezifischen Aktivität gegen größere natürliche Substrate, nicht aber gegenüber kleinen Modells substraten. Daraus lässt sich schließen, dass die Mutation dieses Restes nicht die katalytische Umsatzrate, sondern die Substratbindung beeinflusst. Pro504 liegt am Beginn einer Schleifenstruktur, die eine β -Windung beschreibt und nimmt eine cis-Peptid-Konformation ein. Es ist unwahrscheinlich, dass ein Serin-Rest diese Konformation annimmt, so dass die Mutation von Pro504 zu Serin in einer Verzerrung der Schleifenkonformation in diesem Bereich führen würde. Davon wären sowohl die räumlich benachbarte C-terminale Schleifenregion (s. Abschnitt 3.10.5), die einen großen Anteil an der Bildung der Dimerkontaktfläche hat, als auch die bereits für Arg505 besprochenen Regionen mit Einfluss auf das aktive Zentrum und die Dimerisierung betroffen.

3.10.5 Mutation Cys534Tyr: Infantile akute Sandhoff-Krankheit

Ein Patient, der an einer infantilen „early-onset“-Variante der Sandhoff-Krankheit litt, war homozygoter Träger einer Mutation im *HEXB* Gen, die zu dem Aminosäureaustausch Cys534Tyr in der Hexosaminidase β -Kette führt (In der Originalarbeit ist dieser Austausch wegen unterschiedlicher Nummerierungsschemata für HexB als Cys522Tyr beschrieben) (Kuroki

et al., 1995). Das betroffene Cys534 bildet im Wildtyp-Protein eine Disulfidbrücke zu Cys551, die sowohl in der Elektronendichte von HexB als auch massenspektrometrisch nachgewiesen wurde (Schuette et al., 2001). Die Hauptfunktion dieser Disulfidbrücke ist die Fixierung der C-terminalen Schleifenregion in ihrer Konformation und Lage zum Restprotein. In einem hypothetischen isolierten Monomer hätten die Reste 547-552 keine Kontakte zum Restprotein ausser der Disulfidbrücke zwischen Cys534 und Cys551. Im aktiven Dimer dagegen nehmen die Reste 543 bis 550 an Kontakten zwischen den Untereinheiten teil. In der Kristallstruktur sind die Reste des Bereichs bis einschließlich Cys551 wohl geordnet, während sofort nach dem Cysteinrest die Unordnung deutlich zunimmt, wodurch lediglich die Reste bis zu 552/553 (je nach Kette) modellierbar sind. Die Mutation des Cys534 zu einem großen Tyrosin-Rest verändert zwangsläufig die Lage des Restes 534 und damit die gesamte Schleifenkonformation. Da eine kovalente Fixierung der Schleife nicht mehr möglich wäre, würde der betreffende Bereich vermutlich destabilisiert, eventuell sogar ungeordnet. Der Beitrag der C-terminalen Schleifenregion zur Dimerkontakfläche würde dadurch deutlich vermindert werden.

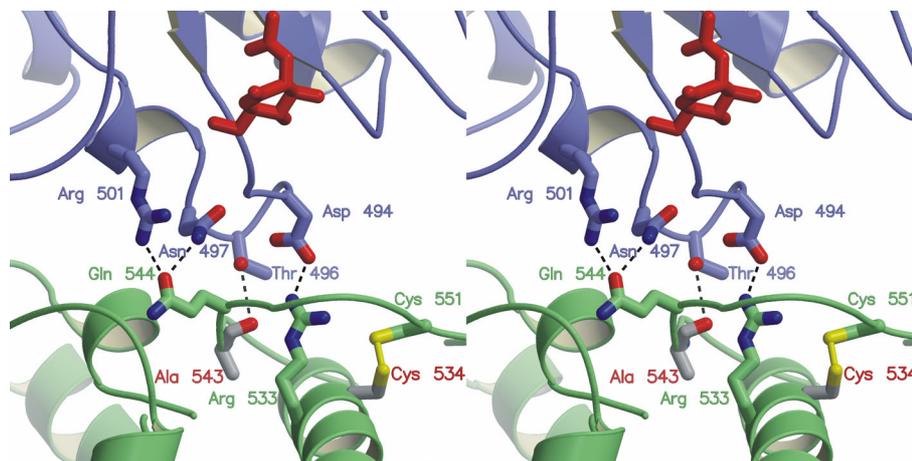


Abbildung 28: Mutationen Cys534Tyr und Ala543Thr (stereo). Das Monomer A ist als grünes, das Monomer B als blaues Bändermodell gezeigt. Die betroffenen, nicht-mutierten Reste sind nach Atomtyp gefärbt als Stabmodell gezeigt und rot beschriftet. Ausgewählte Reste in ihrer Umgebung sind in der Farbe ihres Monomers als Stabmodell gezeigt und beschriftet. Der gebundene δ -Lacton-Inhibitor ist als rotes Stabmodell dargestellt.

Eine direkte Einwirkung der Mutation Cys534Tyr auf das aktive Zentrum derselben Untereinheit ist nicht offensichtlich. Dagegen könnte die veränderte Wechselwirkung im Dimer sehr wohl die Substratbindestelle des anderen Monomers beeinträchtigen. Die an der Wechselwirkung beteiligten Reste 494 bis 501 der anderen Untereinheit liegen auf dem gleichen Schleifenbereich wie Reste des aktiven Zentrums. Eine Konformationsänderung oder erhöhte Flexibilität dieses Bereichs würde Trp489, das eine hydrophobe Stapelwechselwirkung mit dem gebundenen Inhibitor eingeht, und Glu491 betreffen. Damit besitzt auch die Mutation Cys534Tyr hauptsächlich Einfluss auf Interaktionen im Dimer und verhindert eine gegenseitige Stabilisierung der Monomere.

3.10.6 Mutation Ala543Thr: Hitzelabile HexB

Wie bereits erwähnt, unterscheiden sich HexB und HexA in ihrer Thermostabilität: Nach einer dreistündigen Inkubation bei 55°C ist HexA vollständig inaktiviert, während HexB nicht beeinträchtigt wird. Diese Hitzestabilität dient in verschiedenen klinischen Tests zur Unterscheidung beider Isoformen. Bei der Evaluation einer Reihe solcher Tests wurde eine Mutation gefunden, die sowohl in Patienten mit Sandhoff-Krankheit als auch bei nicht-betroffenen Kontrollpersonen detektiert wurde. Die Häufigkeit dieser Mutation schwankt deutlich zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen (Navon und Adam, 1990). Die Mutation beruht auf dem Basenaustausch G1627A im *HEXB* Gen, der zum Aminosäureaustausch Ala543Thr in der β -Kette der Hexosaminidasen führt (Narkis et al., 1997). Ala543 liegt am N-Terminus des C-terminalen Schleifenbereichs, der an der Dimer-Kontaktfläche beteiligt ist. Ala543 selbst bildet eine Wasserstoffbrücke mit seinem Rückgratsauerstoff zu dem Atom O γ von Thr496 des anderen Monomers. Zusätzlich bilden die beiden im Raum bzw. in der Sequenz Ala543 benachbarten Reste, nämlich Arg533 und Gln544, Wasserstoffbrücken zu Seitenketten der anderen Untereinheit, Asp494 im Falle von Arg533 und Asn497, Arg501 für Gln544. Der Austausch von Ala543 zu Threonin lässt sich nicht bei gleicher Packung der dann größeren Seitenkette erreichen und führt zu Verzerrungen in der Geometrie des C-terminalen Schleifenbereichs und insbesondere der Position von Ala543 und benachbarten Resten. Die Konsequenz aus diesen Störungen der Dimerkontaktfläche wäre eine Schwächung der Interaktionen zwischen beiden Untereinheiten, die die beobachtete verminderte Thermolabilität erklärt.

3.11 Röntgen-Kleinwinkelstreuung: Oligomerstruktur von HexB in Lösung

Um die Ergebnisse der Analyse der Kristallpackung experimentell zu überprüfen und die oligomere Struktur von HexB in Lösung zu bestimmen, wurden Experimente mit der Methode der Röntgen-Kleinwinkelstreuung durchgeführt. Diese Methode bietet momentan die sicherste Aussage über Molekülgröße und Molekülform in Lösung. Sie ist in der Lage, die Form von Makromolekülen vorbedingungslos in einer Auflösung zu bestimmen, die in kristallographischen Dimensionen zwischen 8Å und 20Å, je nach Datengüte, beträgt.

3.11.1 Primäre Datenprozessierung

Zur Extrapolation auf unendliche Verdünnung und zur Beobachtung von potentiell vorhandenen Konzentrationsabhängigkeiten der Quartärstruktur wurden Messungen für eine Probenverdünnungsreihe mit Proteinkonzentrationen von 13,8mg/ml, 6,9mg/ml, 3,5mg/ml, 1,8mg/ml und 0,9mg/ml gemäß der Absorption bei 280nm durchgeführt. Dabei wurde ein Probenpuffer verwendet, der dem Kristallisationspuffer ohne Präzipitant ähnelt und annähernd physiologische Natriumchlorid-Konzentrationen enthält, nämlich 20mM Natriumcitrat-Puffer mit 100mM NaCl bei pH 5,6.

Für jede Probe wurden 10 Messungen von je 1Min. durchgeführt. Die automatische Evaluation dieser Daten mit dem Programm „SAPOKO“ erkannte signifikante Strahlenschädigungen der Probe nach mehr als vier- bis sechsminütiger Exposition bei 15°C. Für die weitere Auswertung

wurden nur nicht beeinträchtigte Messungen verwendet. Für die Messungen bei den niedrigsten beiden Probenkonzentrationen wurde nur ein sehr schwaches Signal/Rauschverhältnis erhalten, so dass diese Messungen, obwohl sie keine prinzipiellen Abweichungen von den anderen Messungen offenbarten, bei der weiteren Auswertung nicht verwendet wurden. Zur Bestimmung von Konzentrationseffekten wurden die Streukurven für die Messungen bei Proteinkonzentrationen von 13,7mg/ml bis 3,5mg/ml überlagert, dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kurven (Abbildung 29). Zum weiteren Vergleich der Ergebnisse bei verschiedenen Proteinkonzentrationen wurden für diese Streukurven die Intensität bei dem Streuwinkel $\theta=0$ und der Gyrationradius nach Guinier bestimmt (Abbildung 30). Die für die verschiedenen Konzentrationen erhaltenen Werte sind im Rahmen der mit abnehmender Konzentration sinkenden Genauigkeit identisch (Tabelle 9). Die Messung wurde mit einer Standardlösung Rinderserumalbumin auf 10 I_0 -Einheiten \approx 1kDa Molekulargewicht kalibriert, das beobachtete Molekulargewicht unter der Annahme einer monodispersen Lösung homogener Partikel lag damit bei 222kDa bis 239kDa. Aufgrund der weitgehenden Übereinstimmung der Streukurven bei verschiedenen Proteinkonzentrationen wurde zur weiteren Bearbeitung eine gewichtet gemittelte Streukurve für die Messungen bei Proteinkonzentration zwischen 13,7mg/ml und 3,5mg/ml erstellt. Alle weiteren Analysen beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, auf diese Daten.

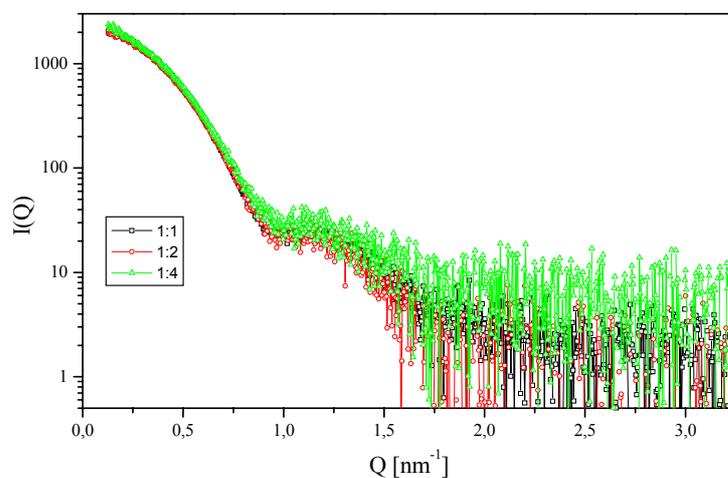


Abbildung 29: Konzentrationsunabhängigkeit der experimentellen Streukurven. Vergleich der experimentellen Streukurven für eine serielle Verdünnung (1:2, 1:4) einer Stammlösung mit einer Proteinkonzentration von 13,7mg/ml (1:1). Alle Kurven sind um den Hintergrund und um den Verdünnungsfaktor korrigiert.

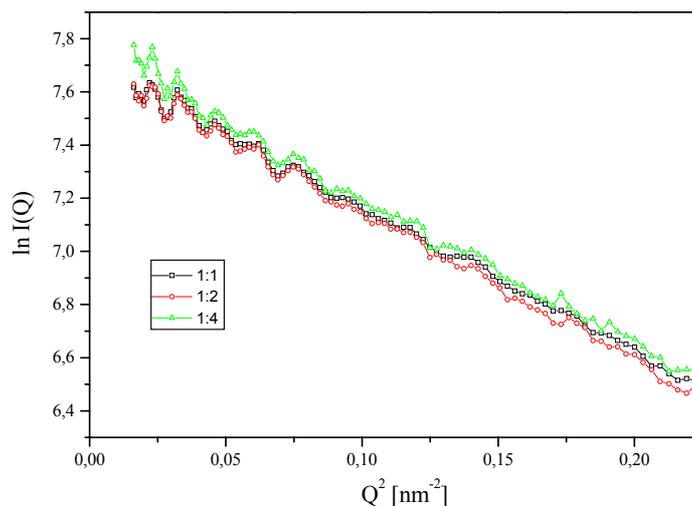


Abbildung 30: Guinier-Analyse der experimentellen Streukurven. Aufgetragen sind die Kurven für eine serielle Verdünnung (1:2, 1:4) einer Stammlösung mit einer Proteinkonzentration von 13,7mg/ml (1:1). Alle Kurven sind um den Hintergrund und den Verdünnungsfaktor korrigiert. Es wurden jeweils die ersten 100 Datenpunkte der Streukurve verwendet.

Tabelle 9: Gyrationradius von HexB nach Guinier-Analyse. Gyrationradius und I_0 für die serielle Verdünnung einer HexB-Stammlösung mit einer Konzentration von 13,7mg/ml.

Verdünnung	Gyrationradius R_g [nm]	I_0
1:1	4,052±0,003	2237±2
1:2	4,103±0,005	2224±3
1:4	4,151±0,006	2393±5

Zur optimalen Bestimmung des Regularisierungsparameters α wurde das Programm „GNOM“ eingesetzt. Dabei werden korrekte Lösungen anhand verschiedener erfahrungsbasierter Kriterien identifiziert. Zu diesen Kriterien, die zur Bewertung einer Paar-Verteilungsfunktion verwendet werden, gehören Schwingungen („Oscillations“), systematische Abweichungen, Diskrepanz, Positivität und die Gültigkeit im zentralen Teil der Paarverteilungsfunktion.

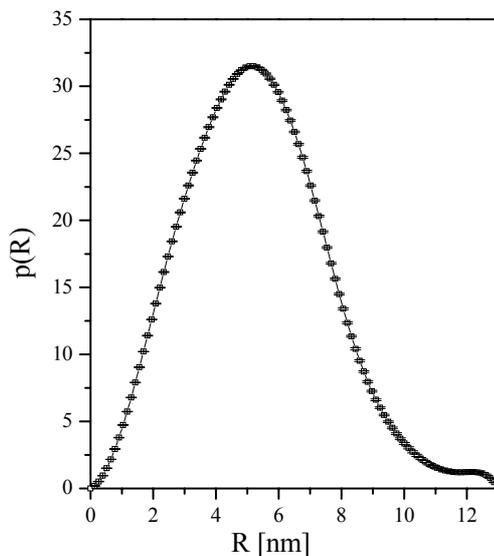


Abbildung 31: Paar-Verteilungsfunktion für die prozessierten und gemittelten Daten.

Die unter Verwendung des gesamten Auflösungsbereiches erhaltene Paar-Verteilungsfunktion unter der Annahme eines minimalen bzw. maximalen Radius $R_{\min}=0$ nm bzw. $R_{\max}=13$ nm und der Randbedingung $p(R)=0$ bei $R=R_{\min}$ oder $R=R_{\max}$ ist in Abbildung 31 gezeigt. Die verfeinerten Kriterien beschreiben die Verteilungsfunktion als monomodales System („Oscillations“=0,9) und genügen vollauf allen Ansprüchen an eine sinnvolle Lösung mit „Discrepancy“=0,5, „Stability“=1, „Systematic Deviation“=1, „Positivity“=1, „Validity in Central Region“=1, Gesamtkriterium 0,92. Aus der erhaltenen Paarverteilungsfunktion lassen sich ebenfalls Gyrationradius und I_0 bestimmen, diese liegen bei $R_g=4,060 \pm 0,005$ nm und $I_0=2245 \pm 2$ und befinden sich damit in guter Einstimmung mit den nach Guinier bestimmten Werten für die gemittelten Daten von $R_g=4,107 \pm 0,003$ nm und $I_0=2259 \pm 2$. Die beobachtete Streukurve entspricht damit einer monomodalen Verteilung von Partikeln mit einem Gyrationradius von $R_g \approx 4,1$ nm und angesichts der Eichung von 10 I_0 -Einheiten=1 kDa einem Molekulargewicht von $M_r=225$ kDa. Das somit eindeutig bestimmte Molekulargewicht des streuenden Partikels lässt sich nur mit dem nicht erwarteten Vorliegen von HexB als Tetramer erklären.

3.11.2 Anpassung berechneter Streukurven

Der Vergleich von berechneten Streukurven für mögliche Oligomere in der Kristallstruktur mit der experimentell erhaltenen Streukurve erfolgt mit dem Programm CRY SOL. Hierbei wird zur Berechnung der Streukurven aus den atomaren Koordinaten auch eine als 0,3 nm dick angenommene Hydrathülle mit einbezogen, deren Dichte von der des umgebenden Lösungsmittels abweichen kann. Die Anpassung der berechneten an die gemessene Streukurve erfolgt unter Verwendung von zwei Parametern, dem Dichtekontrast der Hydrathülle und dem Ausschlussvolumen des Partikels. Für die Anpassung an die experimentellen Daten wurden berechnete

Streukurven eines ABCD-Tetramers (Kontaktflächen I, II, III), das aufgrund des berechneten Molekulargewichts der streuenden Partikel die wahrscheinlichste Lösung darstellt, sowie der möglichen Dimere AB (Kontaktfläche I) und AC (Kontaktfläche II) verwendet. Die berechneten Streukurven für die beiden Dimere lassen sich nicht mit der experimentellen Streukurve in Einklang bringen, dies wird in den χ^2 -Werten von 11,4 (Dimer AB) und 16,6 (Dimer AC) deutlich. Die Anpassung gelingt weder im Bereich kleiner noch mittlerer oder großer Streuwinkel und die Abweichungen von der experimentellen Kurve sind extrem (Abbildung 32). Im Gegensatz dazu ist die Anpassung der Streukurve des Tetramers ABCD im Bereich niedriger Streuwinkel optimal und zeigt lediglich um $Q=0,8\text{nm}^{-1}$ eine deutliche Abweichung von der experimentellen Streukurve, auch der χ^2 -Wert von 2,56 zeigt eine deutliche, wenn auch nicht perfekte Übereinstimmung an.

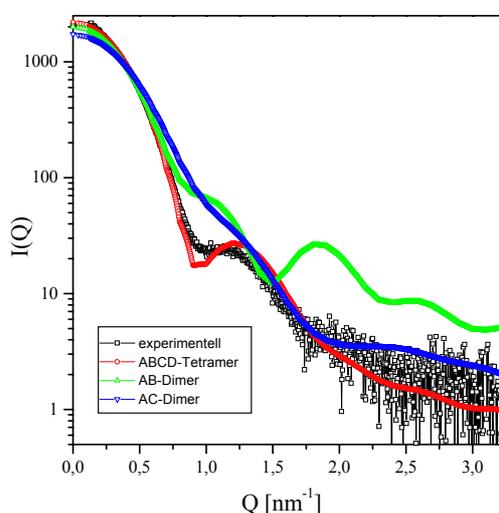


Abbildung 32: Anpassung berechneter an die experimentelle Streukurve. Die für verschiedene Oligomere aus der Kristallstruktur (ABCD-Tetramer rot, AB-Dimer grün, AC-Dimer blau) berechneten Streukurven wurden mit dem Programm „CRYSOL“ an die experimentelle Streukurve (schwarz) angepasst.

Aufgrund der deutlich besseren Übereinstimmung zwischen der für das ABCD-Tetramer berechneten und der experimentellen Streukurve kann, ebenso wie aus dem Molekulargewicht der Partikel, eindeutig geschlossen werden, dass ein Tetramer die in Lösung dominierende Spezies ist. Um die beobachteten Unterschiede zwischen berechneter und experimenteller Streukurve interpretieren zu können, wird die mit „GNOM“ berechnete Paar-Verteilungsfunktion für beide Streukurven verglichen. In Lösung (experimentelle Streukurve) kommen dabei mehr hohe interatomare Distanzen zwischen 8nm und 13nm vor (rechter Teil der Kurve) als im Kristall (ABCD-Tetramer) (Abbildung 33). Dies ließe sich auf den wasserentziehenden Einfluss des Fällungsmittels während der Kristallisation zurückführen, der intermolekulare Wechselwirkungen verstärkt und generell zu einer kompakteren Struktur im Kristall als in Lösung führt. Darüber hinaus muss bedacht werden, dass in der Kristallstruktur einige besonders flexible Teile der Struktur, darunter der Schleifenbereich zwischen den Resten 107-122 und drei

Zuckerstrukturen mit insgesamt bis zu 26 Monosaccharid-Bausteinen pro Monomer nicht modelliert wurden. Am Beispiel der Kristall- und Lösungsstruktur des β 2-Glykoproteins I wurde zuvor bereits gezeigt, dass die korrekte Modellierung von in diesem Fall vier Oligosaccharid-Einheiten auf 326 Aminosäuren einen großen Einfluss auf die Qualität der Anpassung der berechneten an die experimentelle Streukurve hat (Hammel et al., 2002). Die kompaktere Erscheinung der Kristallstruktur ist damit möglicherweise lediglich auf das Fehlen von nicht-modellierbaren flexiblen Bereichen zurückzuführen.

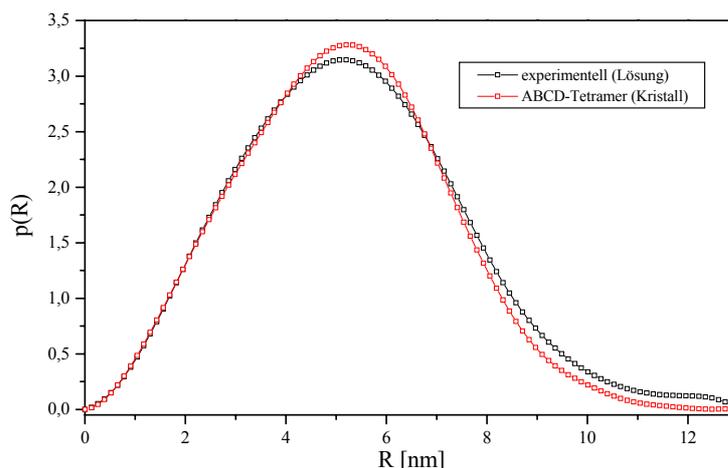


Abbildung 33: Paar-Verteilungsfunktion für experimentelle und berechnete Streukurven. Mit dem Program „GNOM“ berechnete Paar-Verteilungsfunktion für die experimentelle Streukurve (schwarz) und für die berechnete Streukurve des im Kristall beobachteten Tetramers (rot).

3.11.3 Anpassung des kristallographischen Modells an die Streudaten

Zur Optimierung der Übereinstimmung zwischen einem kristallographisch bestimmten, hochaufgelösten Strukturmodell und einer experimentell in Lösung bestimmten Streukurve können im wesentlichen zwei Verfahren verwendet werden. Dies sind einerseits die Starre-Körper-Anpassung von Bestandteilen des Strukturmodells an die gemessene Streukurve und andererseits Methoden, die unter Verwendung von Platzhalter-Modellen versuchen, Modellteile nachzubilden, die in der Kristallstruktur nicht lokalisiert werden konnten. Wie bereits erwähnt, sind in dem kristallographischen Modell der HexB bis zu 8% der enthaltenen Atome, nämlich die gebundenen N-Glykane und fehlgeordnete Schleifenregionen, nicht enthalten. Dies allein kann deutliche Abweichungen zwischen der für das Modell berechneten und der gemessenen Streukurve begründen. Daher wurde versucht, mit dem Programm „CHADD“ über ein simuliertes Tempern von Platzhaltermodellen einzelner fehlender Regionen die Übereinstimmung zwischen Modell und Messung zu optimieren. Leider können mit den zur Zeit verfügbaren Methoden nur einzelne und nicht mehrere fehlende Regionen gleichzeitig zum Modell hinzugefügt werden. Der Versuch, den vermutlich größten fehlenden Abschnitt, ein N-Glykan, bei Asn190 anzufügen, führte eher zu einer Verschlechterung der Übereinstimmung zwischen

Modell und Messung. Es wurde daher auf das sequentielle Anfügen weiterer Teilbereiche an das kristallographische Modell verzichtet.

Im Gegensatz dazu war der Einsatz einer Starre-Körper-Anpassung erfolgreich. Unter der Annahme einer 222-Symmetrie für das HexB Tetramer, die im kristallographisch beobachteten Tetramer in guter Näherung gegeben ist, wurde die Lage des einzelnen Monomers im Tetramer mit Hilfe der Programme „DIMMSYM“ und der graphischen Benutzeroberfläche „MAS-SHA“ optimiert. Als optimale Position wurde hierbei eine Verschiebung des Massenschwerpunktes einer Untereinheit von (20,4 4,3 21,0) nach (21,9 4,9 22,2) und eine Rotation des Monomers um die Euler-Winkel (α , β , γ) von (39,4°, 23,7°, 316,5°) erhalten, dabei verbesserte sich die Übereinstimmung zwischen Modell und experimenteller Streukurve, bewertet anhand des χ^2 -Wertes von 2,56 auf 1,45 (Abbildung 34).

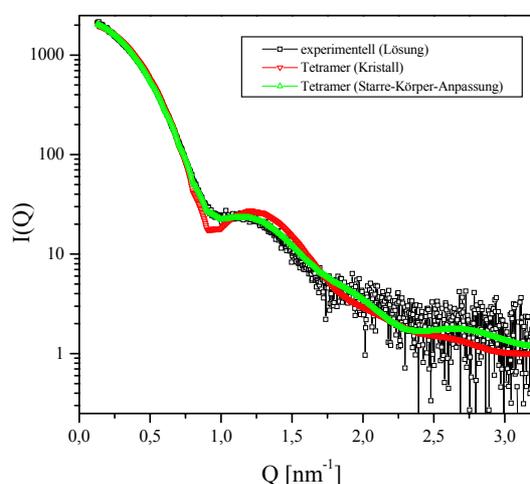


Abbildung 34: Starre-Körper-Anpassung an die experimentelle Streukurve. Anpassung der berechneten Streukurven für das kristallographisch beobachtete Tetramer mit (grün) und ohne (rot) eine Starre-Körper-Anpassung unter Annahme einer 222-Symmetrie an die experimentell bestimmte Streukurve (schwarz) mit „CRY SOL“.

Die erhaltene Starre-Körper-Bewegung lässt sich alternativ als eine 24°-Rotation um die in Abbildung 35 gezeigte Schraubenachse bei einer Translation entlang der Achse von nur 1,3Å beschreiben und ist damit eine nahezu reine Rotationsbewegung. Eine Starre-Körper-Modellierung des Tetramers auf der Basis starrer Dimere, also des AB-Dimers (Kontaktfläche I) oder des AC-Dimers, führte lediglich zu einer Verbesserung des χ^2 -Wertes von 2,56 auf 1,88 (AB-Dimer) bzw. 1,86 (AC-Dimer) und damit zu einer geringeren Übereinstimmung des erhaltenen Tetramers mit der experimentellen Streukurve als die Modellierung basierend auf einem Monomer unter der Annahme einer 222-Symmetrie.

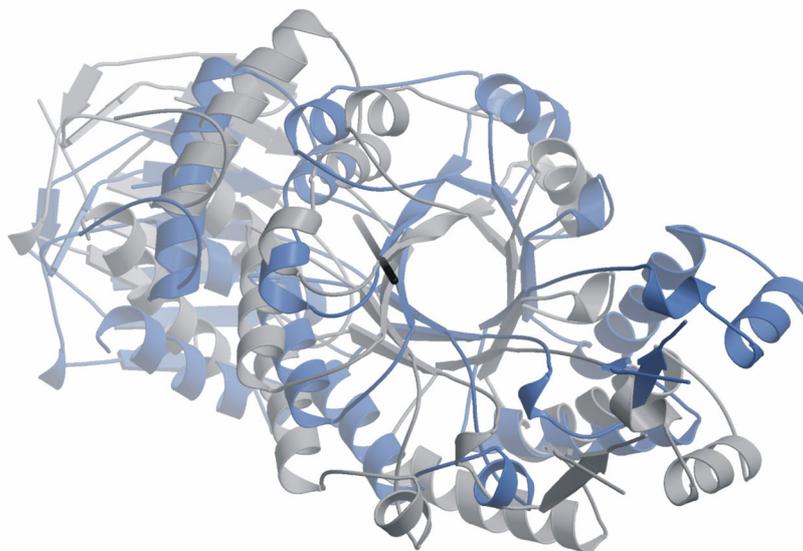


Abbildung 35: Ergebnis der Starre-Körper-Anpassung an die experimentelle Streukurve. Gezeigt ist das HexB-Monomer vor (hellgrau) und nach (blau) der Starre-Körper-Anpassung. Die beobachtete Rotation beträgt 24° um die gezeigte Achse bei einer Translation entlang der Achse von nur $1,3\text{\AA}$.

Dementsprechend ergibt sich bei der Überlagerung des 222-symmetrischen Tetramermodells mit dem ursprünglichen kristallographisch beobachteten Tetramer keine bevorzugte Änderung nur in einzelnen Kontaktflächen, die Änderungen betreffen gleichermaßen beide das Tetramer aufbauende „Dimerarten“, das AB- und das AC-Dimer (Abbildung 36).

3.11.4 *Ab initio* Formvorhersage

Zur *ab initio* Vorhersage der Form der streuenden Partikel in Lösung wurde das Programm „GASBOR“ verwendet, das eine Kette von Resteplatzhaltern durch simuliertes Tempern an die beobachtete Streukurve anpasst. Die gemessenen Daten sind von eher niedriger Auflösung für die Anwendung dieser Technik, die maximale gemessene Auflösung beträgt $Q=3,2\text{nm}^{-1}$. Daher wird als Randbedingung zur Formvorhersage angenommen, dass der streuende Partikel ein Tetramer mit 222-Symmetrie ist. Die Verwendung der Symmetrierandbedingung kann auch bei Vorliegen sehr guter Daten nötig sein, um eine einheitliche Lösung zu erzielen (Volkov und Svergun, 2003). Die Formvorhersage wurde mit drei verschiedenen Sätzen an Eingabeparametern durchgeführt, die sich an den Standardparametern des Programms orientierten, dabei wurde die Ordnung der Fibonacci-Reihe, die Zahl der Resteplatzhalter, der Suchradius, die Strafe für eine Randlage (peripheral penalty) und die Zahl der unabhängig zu bewegenden Atome variiert. Die verwendeten Eingabedateien sind als Anhang I angefügt. Für jeden verwendeten Parametersatz wurden wenigstens zehn unabhängige Optimierungen der Faltung der Platzhalter-Kette durch simuliertes Tempern durchgeführt. Die Ergebnisse der Minimierungen wurden visuell und anhand ihrer normalisierten strukturellen Diskrepanz (NSD-Wert) untereinander verglichen.

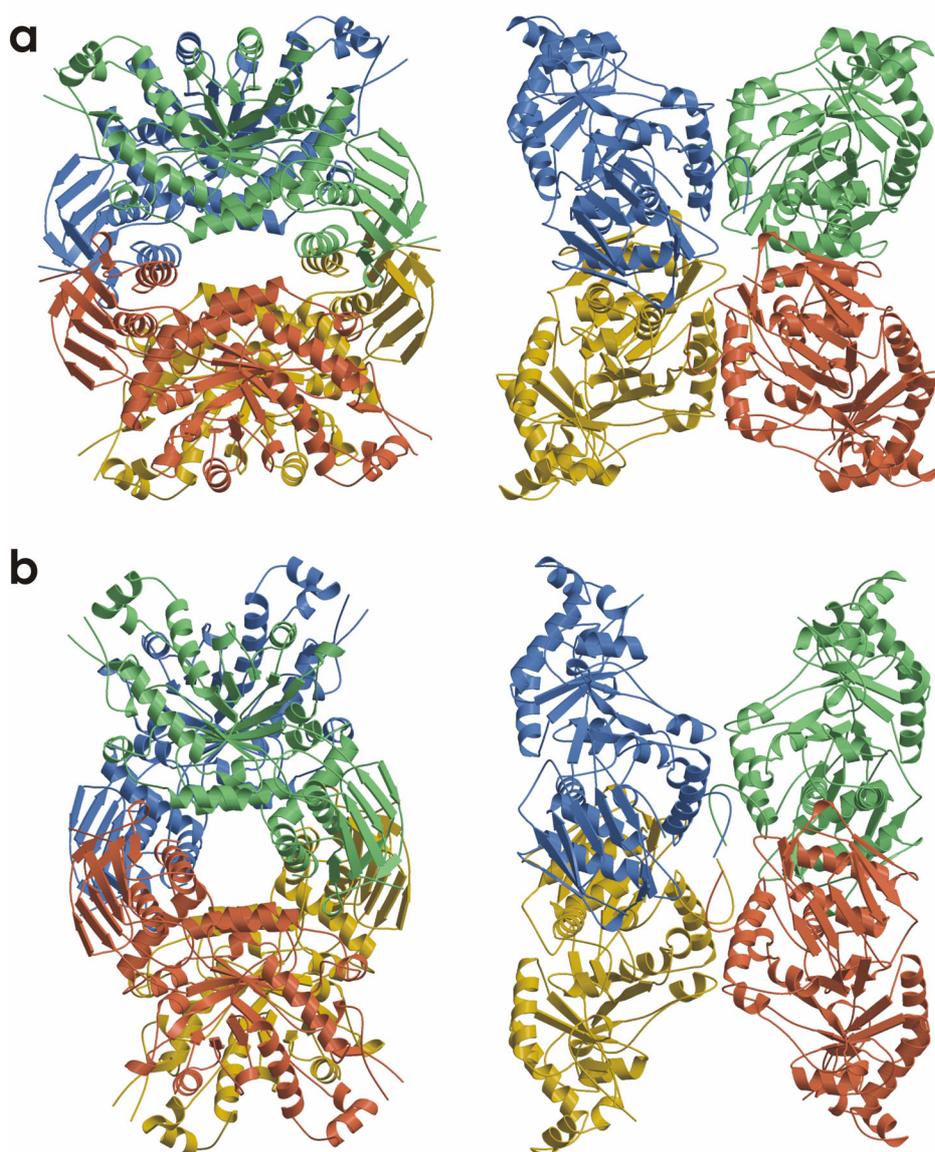


Abbildung 36: Tetramer nach der Starre-Körper-Anpassung an die experimentelle Streukurve. (a) ABCD-Tetramer aus der Kristallstruktur. (b) Tetramer, erhalten durch eine Starre-Körper-Anpassung an die Streukurve unter Annahmen einer 222-Symmetrie basierend auf Untereinheit A. In (a) und (b) sind die Untereinheiten A grün, B blau, C rot und D gelb gefärbt, die rechte und linke Abbildung sind gegeneinander um 90° um die vertikale Achse rotiert.

In allen Fällen wurden zwei Gruppen ähnlicher Lösungen erhalten, wobei die NSD-Werte innerhalb einer Gruppe kleiner als 1,3 und zwischen Mitgliedern verschiedener Gruppen größer 1,3 waren. Daneben wurde noch ein kleinerer Teil von intermediären Lösungen gefunden. Die entsprechenden Kreuzkorrelationstabellen sind in Anhang II gegeben. Von der Berechnung von Kreuzkorrelationen von mehr als 25 Lösungen wurde wegen des erhöhten Rechenbedarfs abgesehen. Der visuelle Vergleich der beiden Lösungsgruppen I und II zeigt

eindeutig die Unterschiedlichkeit der erhaltenen Lösungen auf (Abbildung 37). Während die Lösungen der Gruppe 1 eine X-ähnliche Form mit einer zentralen Verdickung und endständigen Fortsetzen aufweisen, die nahezu in einer Ebene liegen, weisen die der Gruppe II eher sich verjüngende Enden ohne heraustretende Fortsätze oder eine Kreuzform auf. Da eine Mittelung über sich eindeutig unterscheidende Lösungsklassen keine sinnvolle Lösung ergeben kann, wurden je elf Lösungen einer Klasse ausgewählt, um aus diesen ein gewichtet gemittelt Modell mit dem Programm „DAMAVER“ anzufertigen. Die mittleren NSD-Werte für die ausgewählten je elf Modelle lagen bei $1,177 \pm 0,054$ für Gruppe I und bei $1,217 \pm 0,033$ für Gruppe II. Die gemittelten Modelle zeigen die bereits beim visuellen Vergleich der einzelnen Gruppenmitglieder beschriebenen Formunterschiede deutlich auf (Abbildung 38).

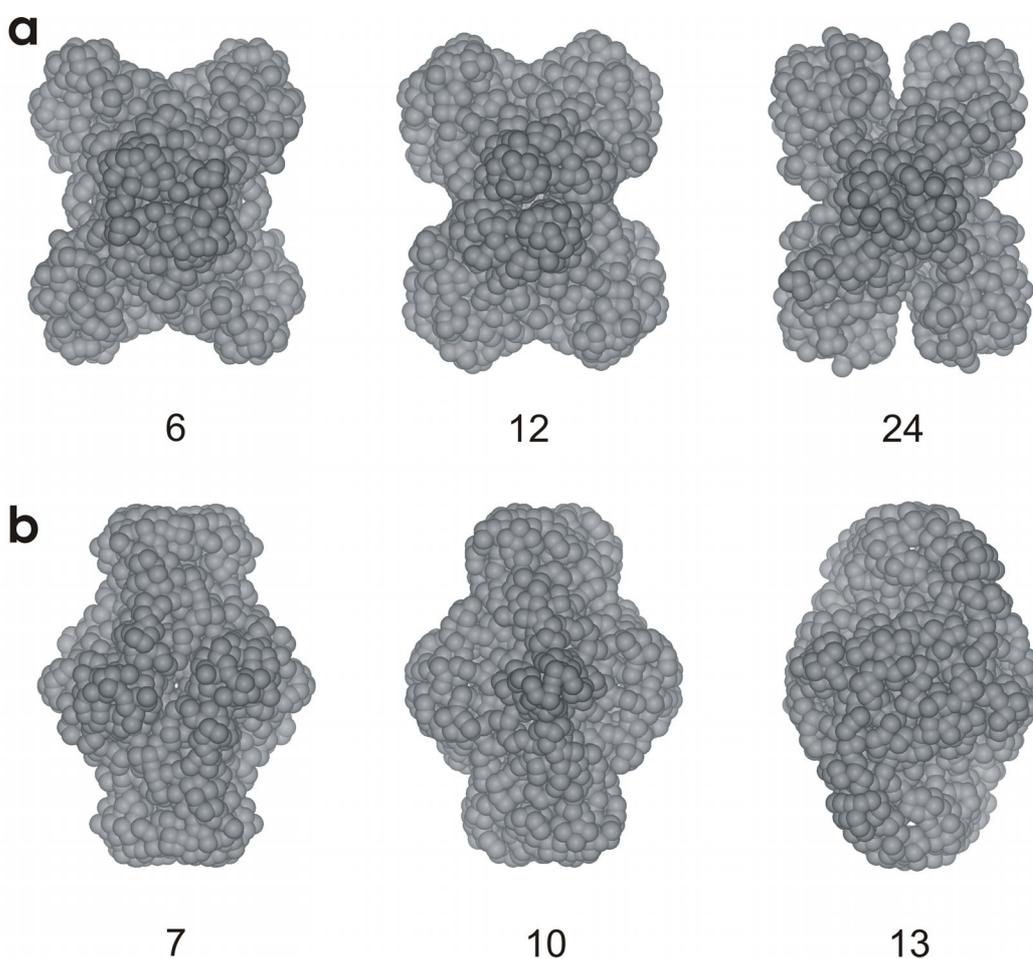


Abbildung 37: Vergleich zweier Gruppen von Lösungen bei der *ab initio* Strukturvorhersage. (a) Lösungsgruppe I (b) Lösungsgruppe II. In (a) und (b) sind die Restplatzhalter als Kalotten dargestellt, Wassermoleküle der Hydrathülle sind nicht gezeigt, alle Modelle werden in der gleichen Perspektive, basierend auf einer optimalen Überlagerung, gezeigt. Die ausgewählten Modelle repräsentieren die strukturelle Variabilität der jeweiligen Lösungsgruppe. Die Nummern geben den verwendeten „GASBOR“-Lauf an und ermöglichen die Zuordnung zu der Kreuzkorrelationstabelle im Anhang I.

Allein anhand der Daten der Kleinwinkelstreuung lässt sich keine weitere Aussage darüber treffen, welche der beiden Lösungen der tatsächlich vorliegenden Partikelform besser entspricht. Es ist jedoch möglich, die erhaltenen niedrig aufgelösten Platzhalterreste-Modelle mit dem kristallographisch beobachteten Tetramer zu vergleichen, um so zu bewerten, ob eine der beiden erhaltenen Lösungen dieser deutlich mehr ähnelt als die andere und daher mit höherer Plausibilität die wahre Lösung darstellt. Zu diesem Zweck werden die beiden erhaltenen Lösungen mit dem kristallographisch beobachteten ABCD-Tetramer mit Hilfe des Programms „SUPCOMB“ überlagert.

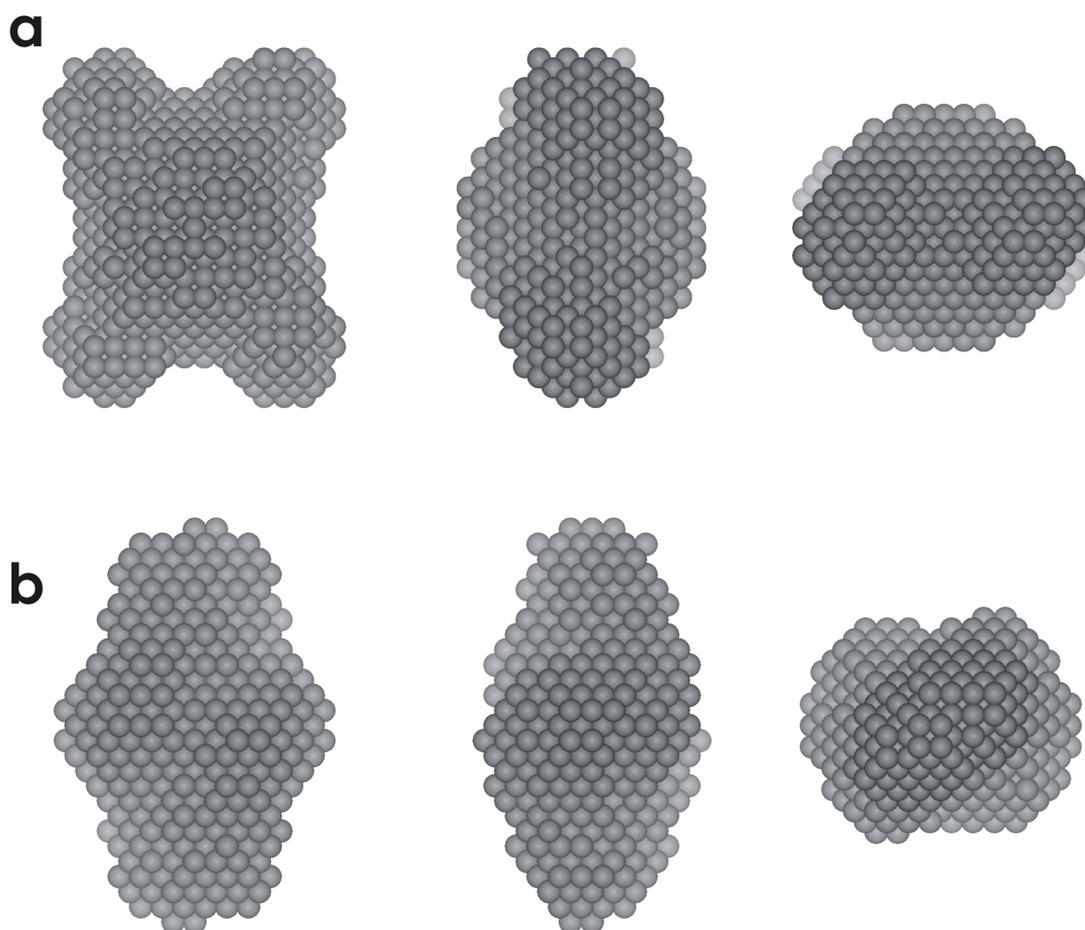


Abbildung 38: Gemittelte Modelle für die Lösungsgruppen I (a) und II (b). Die Modelle in der zweiten und dritten Spalte sind um jeweils 90° entlang einer vertikalen bzw. horizontalen Achse gegenüber der Ansicht in der ersten Spalte gedreht. Die Platzhalterreste der gemittelten Modelle sind in Kalottendarstellung gezeigt.

Die Überlagerung aller Atome oder nur der C_{α} -Atome ergibt NSD-Werte von 1,63 oder 0,98 für das Modell aus Gruppe I und 1,92 oder 1,15 für das Modell aus Gruppe II, damit ist Gruppe I dem kristallographisch bestimmten Modell eindeutig ähnlicher als Gruppe II. Die Überlagerung zwischen dem kristallographischen Tetramer und dem Modell aus Gruppe I zeigt deutlich

deren strukturelle Ähnlichkeit (Abbildung 39). Das kristallographische Modell entspricht in der Form Modell I gut, ragt aber an einigen Stellen über das gemittelte Modell hinaus. Dies ist zum einen in den Filterkriterien, die zum Erstellen des gemittelten Modells verwendet wurden, und zum anderen in der Divergenz der einzelnen Modelle begründet.

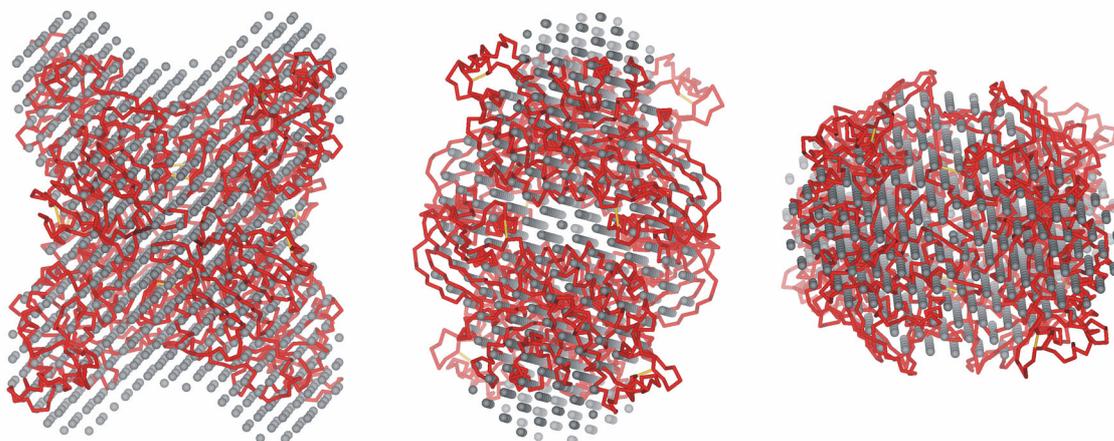


Abbildung 39: Übereinstimmung von *ab initio* Vorhersage und Röntgenstruktur. Überlagerung des kristallographisch beobachteten ABCD-Tetramers (rot) mit dem gemittelten Modell für die Lösungsgruppe I aus der *ab initio* Vorhersage. Die Reste-Platzhalter sind hier der besseren Übersichtlichkeit halber mit einem kleineren Radius als in den vorigen Abbildungen gezeigt. Die mittlere und die rechte Darstellung sind gegenüber der linken um 90° entlang einer vertikalen bzw. horizontalen Achse rotiert. Die Perspektiven entsprechen denen in Abbildung 38.

3.11.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Röntgen-Kleinwinkelstreuung

Es bleibt festzuhalten, dass die Bestimmung des Molekulargewichts des streuenden Partikels und die Anpassung der für verschiedene kristallographisch beobachtete Oligomere berechneten Streukurven an die experimentell bestimmte Streukurve eindeutig auf das Vorliegen eines Tetramers in Lösung schließen lassen. Die Übereinstimmung des kristallographisch beobachteten ABCD-Tetramers mit der Struktur in Lösung ist nicht perfekt, dies kann durch das Fehlen flexibler Teile des Partikels im kristallographischen Modell oder durch eine leichte strukturelle Umorientierung im Kristall gegenüber der Struktur in Lösung begründet werden. Ein Einfluss des Fehlens flexibler Teile war nicht nachweisbar, da schon der Versuch des Einbaus der größten Zuckerstruktur zu einer Verschlechterung der Übereinstimmung führte. Dies mag aber auch dadurch begründet sein, dass mit den verfügbaren Programmen nicht mehrere fehlende Teilregionen gleichzeitig modelliert werden können und keine Modellierung einer erhöhten Flexibilität von Teilregionen, beispielsweise in Form eines Temperaturfaktors, möglich ist. Eine Starre-Körper-Anpassung führte hingegen zu einer deutlichen Verbesserung der Übereinstimmung zwischen dem kristallographischen Modell und der experimentell beobachteten Streukurve. Die *ab initio* Vorhersage der Struktur des streuenden Partikels unter der Annahme eines Tetramers mit 222-Symmetrie lieferte statt einer

eindeutigen Lösung zwei Gruppen von unterschiedlichen Lösungen. Aufgrund der begrenzten zur Verfügung stehenden Probenmenge und der auftretenden Strahlenschäden war nur eine mittlere Qualität der Streukurve hinsichtlich des Signal-Rausch-Verhältnisses und der maximalen Auflösung erreichbar. In Anbetracht dessen ist das prinzipielle Gelingen einer *ab initio* Strukturvorhersage als Erfolg zu betrachten, zumal eine der beiden erhaltenen Lösungen eine deutliche Ähnlichkeit mit dem kristallographisch bestimmten Modell aufweist.

3.11.6 Kontaktflächen im Tetramer

Bisher wurde HexB in der Literatur nur als Dimer beschrieben, eine Übersicht geben Gravel et al. (2001). Die Ergebnisse der Kleinwinkelstreuung zeigen hingegen unter den gewählten Bedingungen die Existenz eines Tetramers an. Die Existenz dieses Tetramers ist vereinbar mit den Ergebnissen der Kristallstrukturanalyse, denn unter Einbeziehung aller in Abschnitt 3.8.1 besprochenen Kontaktflächen, Kontakt I (A-B und C-D), II (A-C und B-D) und III (B-C und A-D), wird auch im Kristall eine tetramere Struktur beobachtet. Nach der dort erfolgten Analyse ist die Existenz einer solchen tetrameren Form als physiologisch aktiver Zustand von HexB aber unwahrscheinlich. Der wesentliche Unterschied zwischen den für die Röntgen-Kleinwinkelstreuung gewählten und physiologischen Bedingungen, d.h. dem lysosomalen Milieu, ist der im Experiment erhöhte pH-Wert von 5,6. Damit liegt der Schluss nahe, dass der Oligomerisierungszustand von HexB pH-abhängig ist und HexB bei einem lysosomalen pH-Wert von ca. 4,7 (Ohkuma und Poole, 1978) als Dimer vorliegt, bei höheren pH-Werten um 5,6 aber als Tetramer.

Das Auftreten einer pH-abhängigen Änderung des Oligomerisierungszustandes wurde bemerkenswerterweise bereits für ein funktionell verwandtes Enzym beschrieben, nämlich für Arylsulfatase A (ASA), die im gleichen Stoffwechselweg ebenfalls am Sphingolipidabbau beteiligt ist (vgl. Abbildung 3). ASA dimerisiert zunächst im endoplasmatischen Retikulum und wird als Dimer über Mannose-6-Phosphat-Erkennung in Endosomen zum Transport in Lysosomen sortiert. In den Lysosomen oligomerisieren die Dimere aufgrund des veränderten pH-Wertes und bilden Oktamere (Lukatela et al., 1998). Die Störung der Oktamerisierung durch eine Punktmutation führt zur Instabilität der ASA in den Lysosomen und ist die molekulare Ursache einer Form der Metachromatischen Leukodystrophie (von Bulow et al., 2002). Die Oligomerisierung der ASA wird über den Protonierungszustand eines einzigen Glutamat-Restes, Glu424, kontrolliert. Ist dieser bei höherem pH-Wert deprotoniert, so verhindert seine negative Ladung eine Oktamerisierung. Bei einer Erniedrigung des pH-Wertes unter pH 5,8 geht ein zunehmender Anteil der Moleküle in den oktameren Zustand über, ausgelöst durch die Protonierung des Glutamat-Restes.

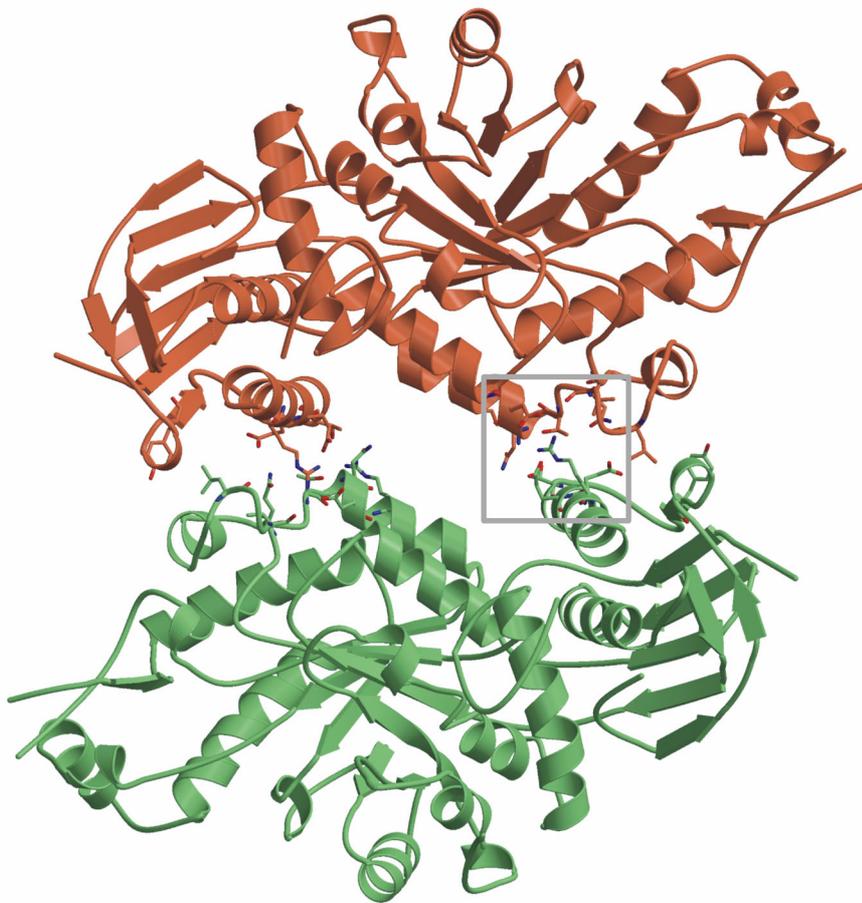


Abbildung 40: Kontaktfläche II im HexB-Kristall (am Beispiel des Kontaktes AC). Monomer A ist in grün, Monomer C in rot gezeigt. Reste, die an der Bildung der zweigeteilten Kontaktfläche beteiligt sind, sind in den Farben ihrer Untereinheit gezeigt. Der graue Kasten zeigt den in Abbildung 41 dargestellten Ausschnitt an.

Lediglich die Carboxylgruppen der sauren Aminosäuren Glutamat und Aspartat und, in seltenen Fällen, der Histidin-Rest können einen pK-Wert in dem pH-Bereich, der für eine Änderung des Oligomerisierungszustandes von HexB in Frage kommt, also zwischen pH 5,6 und pH 4,7, besitzen. Der mit Abstand wahrscheinlichste Mechanismus zur pH-abhängigen Steuerung der Oligomerisierung von HexB ist damit der Wechsel des Protonierungszustandes einer dieser beiden Aminosäuren, so wie für das Beispiel ASA beschrieben. Für die Bildung eines Tetramers aus dem postulierten Dimer wären die Kontaktflächen II (AC-Kontakt) und III (BC-Kontakt) verantwortlich. Von diesen beiden ist die Kontaktfläche II die deutlich intensivere, mit einer höheren Zahl beteiligter Reste (13 in II, 11 in III) und einer deutlich größeren in dem Kontakt verborgenen Oberfläche pro Seite (751\AA^2 in II, 473\AA^2 in III). Die Kontaktfläche II besitzt einen ausgesprochen hydrophilen Charakter und ist durch einen auffallend hohen Anteil an Wasserstoffbrücken zwischen den Untereinheiten charakterisiert (vgl. Tabelle 7, Seite 56). An dem ausgeprägten Netz aus Wasserstoffbrücken in Kontaktfläche II sind mehrere saure Aminosäuren beteiligt, deren pK_a -Wert in dem relevanten pH-Bereich von 4,2-5,6 lie-

gen. Daher ist die Kontaktfläche II der bestgeeignete Ort für die Implementierung eines pH-abhängigen „Oligomerisierungs-Schalters“.

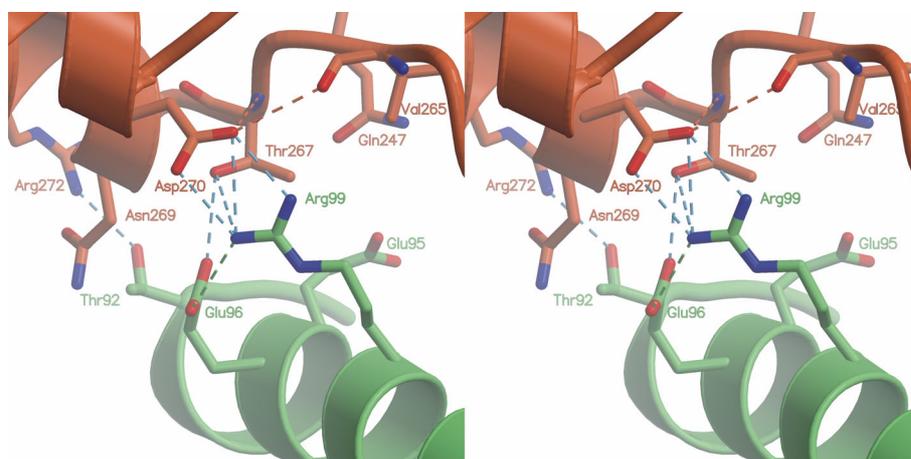


Abbildung 41: Detailansicht der Kontaktfläche II im HexB-Kristall. Die C-Atome der am Kontakt beteiligten Reste sind in der Farbe der jeweiligen Untereinheit (A: grün, C rot) gefärbt. Ausgewählte inter- und intramolekulare Wasserstoffbrücken sind in hellblau (intermolekular) und den Farben der Untereinheiten (intramolekular) gezeigt. Der gewählte Ausschnitt ist in Abbildung 40 angegeben, die Perspektive ist zur besseren Übersichtlichkeit leicht gegenüber Abbildung 40 verändert.

Die Kontaktfläche II ist keine zusammenhängende Fläche, sondern setzt sich aus zwei Teilen zusammen (Abbildung 40), die durch eine nicht-kristallographische zweizählige Symmetrie miteinander in Beziehung stehen. Jede der beiden Teilflächen wird von den Interaktionen von Asp270 (beispielsweise in Monomer C, kurz C) einer Untereinheit mit Arg99(A) der anderen Untereinheit und dem dort gebildeten Netz an Wasserstoffbrücken bestimmt (Abbildung 41). Neben der direkten Salzbrücke zwischen dem positiv geladenen Arg99(A) und Asp270(C) wird auch eine Wasserstoffbrücke zwischen beiden Resten gebildet. Der dem Arg99(A) benachbarte Rest Glu96(A) bildet sowohl eine intramolekulare Salzbrücke zu Arg99(A) als auch eine intermolekulare Wasserstoffbrücke zu Thr267(C)O^{γ1}. Dieser Rest wiederum bildet mit demselben Atom eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zu Asp270(C), das weitere intramolekulare Wasserstoffbrücken zu Val265O und Thr267N bildet. Der Großteil der auf Wasserstoffbrückenbindungen aufbauenden Kontakte hängt damit in kritischer Weise von den Salz- und Wasserstoffbrücken ab, die von den Resten Glu96(A) auf der einen und Asp270(C) auf der anderen Untereinheit gebildet werden und damit auch von dem Protonierungszustand beider Reste. Es kann daher spekuliert werden, dass entweder Glu96 und Asp270 gemeinsam oder einer der beiden Reste den pH-Wert-abhängigen Schalter bilden, der bei einer Absenkung des pH-Wertes die Interaktionen der Kontaktfläche II schwächt und damit zum Zerfall des Tetramers in zwei Dimere führt.

3.12 Ansätze zu weiteren Arbeiten zu HexB

Das wesentliche Problem weiterführender Arbeiten an HexB ist die mangelnde Verfügbarkeit des Proteins. Für alle Arbeiten standen nur ca. 4mg einer gut kristallisierenden Proteincharge und ungefähr genauso viel partiell aggregiertes oder nicht kristallisierendes Protein zur Verfügung. Von besonderem Interesse bei HexB wäre die Kokristallisation mit einem natürlichen Substrat, um zu überprüfen, ob auch weiter vom (-1)-Zucker entfernt liegende Teile des Substrats aus dem Kohlenhydrat- oder Lipidanteil mit der Hexosaminidase wechselwirken. Für ein genaueres Verständnis der pH-Abhängigkeit der Oligomerisierung wäre die Aufnahme weiterer SAXS-Daten bei verschiedenen pH-Werten und möglichst bei noch höheren Proteinkonzentrationen essentiell. Da das Protein durch die intensive Einwirkung der Röntgenstrahlung bei Kleinwinkel-Experimenten irreversibel geschädigt wird, wären hierfür jedoch wenigstens 1mg der gereinigten HexB pro Messung erforderlich.

Die hier anhand der Röntgenstruktur gewonnenen Erkenntnisse sind nicht auf die β -Kette der Hexosaminidase beschränkt, wie eine Anpassung der Aminosäuresequenzen der β - und der α -Kette der humanen Hexosaminidase zeigt, in die auch die entsprechenden Ketten des Mäuse-Proteins und die Sequenzen der strukturell charakterisierten bakteriellen Homologen aufgenommen wurden (Abbildung 42). Alle Reste des aktiven Zentrums und darüber hinaus auch die Reste der Dimerkontaktfläche sind zwischen α - und β -Kette konserviert. Die Sequenzidentität zwischen beiden Ketten der Säugerenzyme ist hoch und im Gegensatz zu den bakteriellen Homologen existieren keine größeren Insertionen oder Deletionen. Damit ist die Struktur von HexB ($\beta\beta$) eine geeignete Vorlage zur Modellierung der Struktur des Heterodimers HexA ($\alpha\beta$). Ein Homologiemodell ist bereits unter Zuhilfenahme des Programms „MODELLER“ (Sali und Blundell, 1993) erstellt und manuell optimiert. Im Gegensatz zu HexB benötigt HexA für eine volle Aktivität beim Umsetzen des Gangliosids GM2 ein Aktivatorprotein, das GM2AP, dessen Kristallstruktur bekannt ist (Wright et al., 2000).

Unter Verwendung des Homologiemodells für HexA und der Kristallstruktur des GM2AP wurden Andockberechnungen für einen Komplex aus HexA und GM2AP mit dem Programm „GRAMM“ durchgeführt (Katchalski-Katzir et al., 1992). Von den erhaltenen Lösungen wurden diejenigen verworfen, in denen die Substrataustrittsstelle des GM2AP eindeutig zu weit vom aktiven Zentrum einer der beiden Untereinheiten in HexA entfernt sind. Auf der Basis dieses vorläufigen Andockmodells wurden drei Aminosäurepositionen, Asp113, Met117 und Glu123, vorgeschlagen, deren Mutation zwar die Bindung des Substrats durch GM2AP nicht beeinflussen sollte, wohl aber die Aktivierung der HexA durch GM2AP.

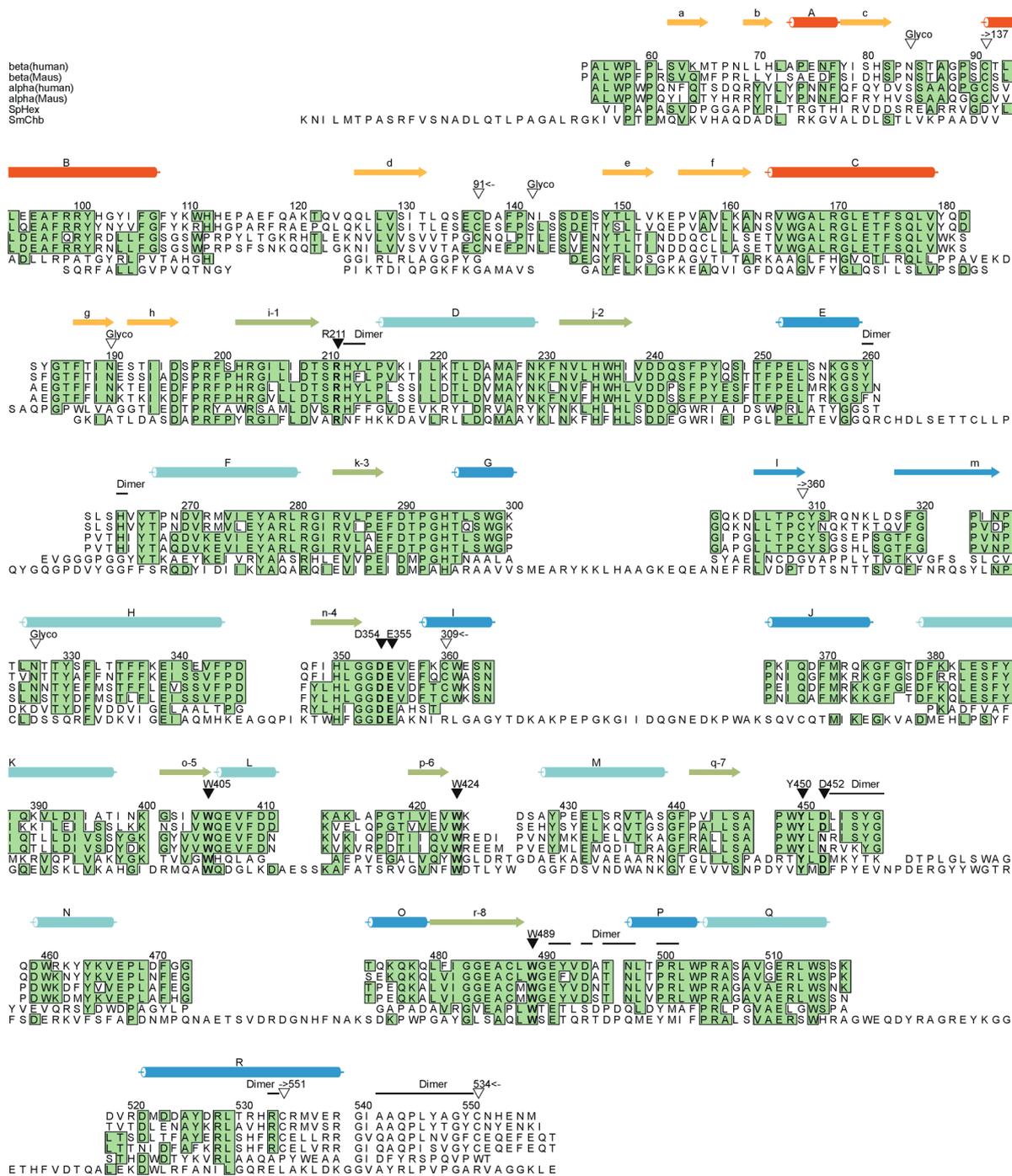


Abbildung 42: Sequenzanpassung von HexB und Homologen. Anpassung der Sequenz der β -Kette der humanen Hexosaminidase an die der menschlichen α -Kette, der α - und β -Kette der Maus und an die Sequenzen der strukturell charakterisierten bakteriellen Homologen, Chitobiase aus *Serratia marcescens* (SmChb, partielle Sequenz) und Hexosaminidase aus *Streptomyces plicatus* (SpHex). Die Sekundärstruktur von HexB (Buchstaben sowie Nummern der Stränge im TIM-Fass), Disulfidbrücken (offenes Dreieck, Nummer des verknüpften Cysteins), Glykosylierungsstellen (Glyco), Regionen in der Dimer-Kontaktfläche (Dimer) und Reste mit direkter Inhibitor-Interaktion (ausgefülltes Dreieck, fett, Restebzeichnung) sind angegeben. Identische Reste sind grün hinterlegt und umrandet.

Diese Mutanten werden durch M. Wendeler (AG Prof. Sandhoff, Universität Bonn) exprimiert, gereinigt und charakterisiert. Die CD-spektroskopische Untersuchung der Mutanten ergab vollkommen unveränderte Faltung im Falle der Mutation Met117Val sowie der Austausche von Asp113 bzw. Glu123 durch Lysin. Im Falle des Austauschs der beiden sauren Aminosäuren gegen Alanin und noch stärker beim Austausch gegen Tyrosin treten dagegen Beeinflussungen der Faltung und des Sekundärstrukturgehalts des GM2AP auf. Für die strukturell unveränderten Mutanten ist durch Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Messungen (Biacore) eine gegenüber dem Wildtyp-Protein unveränderte GM2-Bindung nachgewiesen. Alle drei Mutanten sind jedoch nicht mehr in der Lage, den Abbau von GM2 durch HexA zu aktivieren (M. Wendeler, persönliche Mitteilung). Tatsächlich sind diese Mutanten also in der Interaktion mit HexA defekt, wie aufgrund des vorläufigen Andock-Modells erwartet. Eine eigentliche Klärung der genauen Struktur des ternären Komplexes aus HexA, GM2AP und GM2 wird dennoch erst möglich sein, wenn die einzelnen Komponenten, rekombinant hergestellt oder aus natürlichem Material gereinigt, in hinreichenden Mengen zur Kristallisation zur Verfügung stehen.

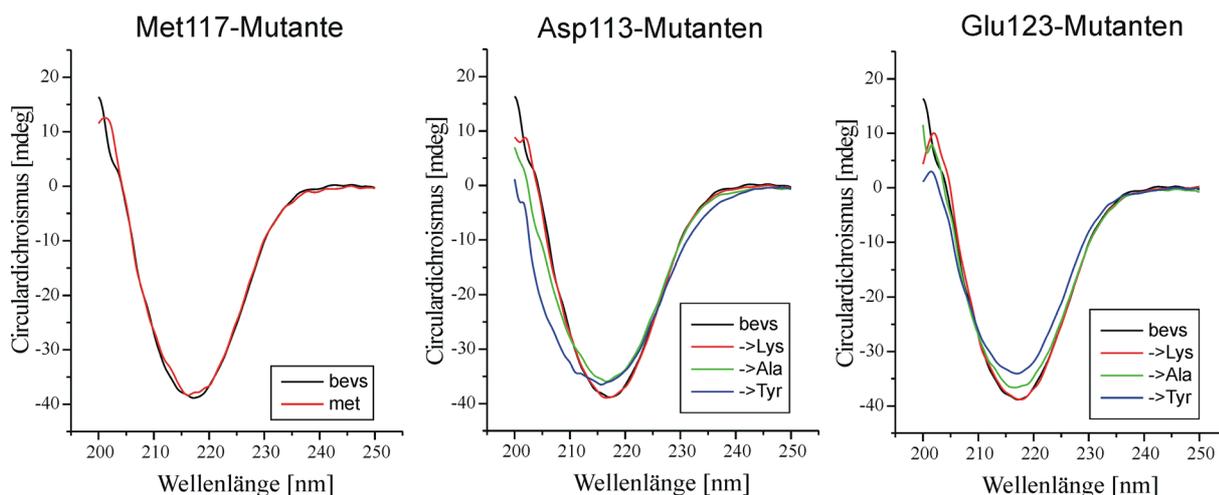


Abbildung 43: Vergleich der CD-Spektren von GM2AP-Mutanten und Wildtyp-Protein. Die ursprüngliche Aminosäure ist über den Graphen angegeben, die jeweiligen Mutationen sind in den Kästen erläutert, „bevs“ bezeichnet das in Insektenzellen exprimierte Wildtyp-Protein.