

## 5 Resümee und Ausblick

Der Auf- und Abbau von intrazellulären und die Zelle umgebenden Membranen ist ein wichtiger Bestandteil der zellulären Dynamik. Um die ständige, energieaufwändige Neusynthese von Membranlipiden zu vermeiden, zerlegen höhere Organismen abzubauen Membranen in den Lysosomen in ihre Grundbausteine und führen diese einer Wiederverwertung zu. Der Abbau der vor allem im äußeren Blatt der eukaryotischen Zellmembran vorkommenden Sphingolipide läuft intralysosomal in einem streng sequentiellen Prozess ab. Der genetische Ausfall eines der Schritte der Reaktionsabfolge bedingt damit zwangsläufig eine Unterbrechung des gesamten Abbauweges. Die daraus resultierenden Anhäufungen und Ablagerungen der abzubauen Substanzen schädigen einzelne Zellen und ganze Zellverbände und führen zu dramatischen Störungen des Organismus, den erblichen und meist tödlichen Sphingolipid-Speicherkrankheiten.

Der Sphingolipid-Stoffwechsel unterscheidet sich von vielen anderen grundlegenden Stoffwechselwegen dadurch, dass die umzusetzenden Substrate im Gegensatz zu den Abbauenzymen nicht wasserlöslich sind. Die meisten Schritte des Sphingolipid-Abbaus verlaufen daher an einer Wasser-Lipid-Grenzschicht oder benötigen zusätzliche Aktivatorproteine, die die Substrate in einer wasserlöslichen Form dem Abbau zugänglich machen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Kristallstruktur eines der Abbauenzyme des Sphingolipid-Stoffwechsels, der Hexosaminidase B (HexB) mit der MIRAS-Methode bestimmt. Auf der Basis von früheren Untersuchungen an verwandten bakteriellen Enzymen und der hier bestimmten Struktur des Komplexes der HexB mit einem Übergangszustand-analogen Inhibitor konnte der Katalysemechanismus der humanen HexB in allen Details aufgeklärt werden. Dabei bestätigte sich, dass HexB einen Reaktionsmechanismus verwendet, der von den üblichen Glykosylhydrolase-Mechanismen abweicht. Durch eine Ausrichtung des Substrats bei der Enzymbindung wird dieses in eine Konformation gebracht, in der eine Gruppe des Substrats selbst als Nukleophil die eigene Spaltung betreibt. Der resultierende Substrat-vermittelte doppelte Verdrängungsmechanismus von HexB läuft unter der Erhaltung der ursprünglichen Konfiguration am anomeren C1-Atom des Zuckers ab.

Neben dem katalytischen Mechanismus konnte erstmals die dimere Struktur der HexB beschrieben werden. Nur aus der Anordnung der Untereinheiten des Dimers zueinander lassen sich viele erbliche Mutationen in HexB verstehen, die zur tödlichen Sandhoff-Krankheit, einer Sphingolipid-Speicherkrankheit, führen. Auch die unterschiedlichen Substratspezifitäten gleicher Untereinheiten in verschiedenen Isoformen der dimeren Hexosaminidase lassen sich nur mit einer Kenntnis der dimeren Struktur analysieren. Der wesentliche Unterschied zwischen den Isoformen HexB und HexA bzw. HexS liegt in der Abhängigkeit nur der beiden letztgenannten vom GM2-Aktivator Protein (GM2AP), das Komplexe zwar mit HexA, nicht aber mit HexB bildet. Eine der frühen Anwendungen der hier bestimmten Struktur ist die Homologie-Modellierung der HexA und die Vorhersage möglicher an der GM2AP-HexA-Bindung beteiligter Reste. Erste Ergebnisse von an den entsprechenden Positionen mutiertem GM2AP bestätigen die Vorhersagen vollauf.

Röntgen-Kleinwinkelstreuungsmessungen (engl.: small angle X-ray scattering, SAXS) zeigen bei höherem als dem intralysosomalen pH-Wert das Vorliegen einer tetrameren Struktur von HexB an, die vermutlich der tetrameren Anordnung der Monomere im Kristall ähnelt. Die am Aufbau des Tetramers beteiligten Reste sind zwischen HexB und HexA nicht konserviert. Daher muss angenommen werden, dass HexA nicht in der Lage ist, derartige Tetramere auszubilden. Darin könnte der Grund für die früher beobachtete Präferenz der  $\beta$ -Ketten der Hexosaminidase zur Homodimerisierung während des Aufenthalts des Proteins im endoplasmatischen Retikulum gegenüber der Heterodimerisierung mit der  $\alpha$ -Kette liegen.

Im zweiten Hauptteil der Arbeit wurde die Struktur von Sphingolipid-Aktivator-Proteinen (Sap-Proteine) untersucht. Neben dem bereits strukturell charakterisierten GM2AP gehören die vier weiteren am Sphingolipid-Abbau beteiligten Proteine SapA, -B, -C und -D einer Familie an und entstehen durch proteolytische Prozessierung aus einem gemeinsamen Vorläufer. Die Proteine SapC und SapD wurden kristallisiert, die Struktur des SapD konnte nach einer Änderung der erhaltenen Raumgruppe durch die Iodierung eines Tyrosin-Restes durch molekularen Ersatz gelöst werden. SapD unterscheidet sich in seiner hier kristallisierten, lipidfreien Form stark von der lipidfreien Form des verwandten SapB, dessen Röntgenstruktur bereits bekannt ist. Der Strukturunterschied zwischen dem dimeren SapB und dem monomeren SapD lässt sich als eine öffnende Scharnier-Drehbewegung beschreiben, bei der sich jeweils durch Disulfidbrücken verknüpfte Helixpaare als annähernd starre Körper bewegen. Dagegen besteht eine ausgeprägte strukturelle Ähnlichkeit zwischen SapD und den beiden Proteinen Granulysin und NK-Lysin, die als Teil der Immunabwehr von T-Lymphozyten gebildet werden. Alle drei Proteine zeigen bei der Bindung an Membranen eine Präferenz für saure Phospholipide. Die im Granulysin vermutlich für die Phosphatbindung verantwortlichen Reste sind im NK-Lysin konserviert, nicht aber im SapD. An Hand einer Betrachtung der Ladungsverteilung in den drei Proteinen und der verschiedenen Bindungsstellen für das phosphatanaloge Sulfat wird hier für SapD ein anderer Modus der initialen Lipidanbindung postuliert als für Granulysin und NK-Lysin beschrieben. In dieser Arbeit werden darüber hinaus funktionelle und strukturelle Parallelen zwischen Apolipoprotein III (ApoLpIII), einem Lipidtransport-Protein der Insektenhämolymphe, und SapD aufgezeigt. Beide Proteine sind als 4-Helix-Bündel organisiert, binden Lipidvesikel und bilden mit diesen charakteristische, Scheibchenstapel-ähnliche Organisationsformen mit nahezu identischen Dimensionen, was auf einen gemeinsamen Mechanismus der Interaktion mit Lipidvesikeln schließen lässt.

Die Struktur des SapC, das unter den Kristallisationsbedingungen in einer offenen Konformation vorliegt, wie Circular dichroismus-Spektren anzeigen, konnte noch nicht bestimmt werden, da eine Derivatisierung der Kristalle mit Schweratomen nicht gelang, das Kristallwachstum schwer reproduzierbar war und die Qualität der Kristalle für die angestrebte Strukturbestimmung anhand des anomalen Signals der natürlich vorkommenden Schwefelatome nicht ausreichte. Mit der erfolgreichen Expression des SapC als Selenomethionin-markiertes Protein in *Pichia pastoris* ist jedoch ein wesentlicher Schritt zur Strukturaufklärung von SapC getan.

Mit den vorliegenden Ergebnissen ist eine Basis für die Analyse der komplexen intramolekularen Wechselwirkungen während des Sphingolipidabbaus gelegt. Mit den Strukturen des

GM2AP, des dimeren SapB und der hier bestimmten Struktur des SapD, die auch als Modell für die monomeren Proteine SapA und SapC dienen kann, ist erstmals eine umfassende Beschreibung aller Aktivatorproteine des Stoffwechselweges möglich. Dennoch bestehen noch große Defizite im Verständnis der Interaktion sowohl der Aktivatorproteine mit Lipiden als auch der löslichen Abbauenzyme mit den Aktivatorproteinen. Am Beispiel des GM2AP konnten erste Schritte hin zu einem Verständnis dieser Interaktionen aufgezeigt werden. Weitere Arbeiten zur Struktur und Dynamik der Aktivatorproteine in Gegenwart von Lipiden mit kristallographischen und spektroskopischen Methoden werden aber von Nöten sein, um ein geschlossenes Verständnis der Katalyse an der Phasengrenze zwischen Lipid und Wasser zu erhalten. Diese Erkenntnisse werden vermutlich gemeinsame Grundlagen in der Protein-Lipid-Interaktion an der Lungenoberfläche, in der Immunabwehr und an vielen Stellen des Lipid-Transports und Abbaus offenbaren, wie die weite Verbreitung Sap-ähnlicher Proteine nahelegt.

Neben der Bedeutung für den Sphingolipid-Metabolismus sind die Isoformen der Hexosaminidase wegen ihrer Bedeutung für den Abbau der Glykosaminoglykane, die einen wichtigen Teil der Knorpelmatrix bilden, auch als Ziele der Medikamententwicklung gegen Arthritis identifiziert worden (Liu et al., 2001). Die genaue Kenntnis des aktiven Zentrums und seiner nächsten Umgebung, die hier durch die Kristallstrukturanalyse von HexB gewonnen wurde, wird in Zukunft helfen, gezielt Inhibitoren gegen Hexosaminidase-Isoformen zu entwickeln, die sich zum therapeutischen Einsatz eignen. Die Bedeutung der hier gewonnenen strukturellen Erkenntnisse ist somit nicht auf ein Verständnis des Sphingolipid-Abbaus oder der Ursachen der Sandhoff-Krankheit beschränkt.