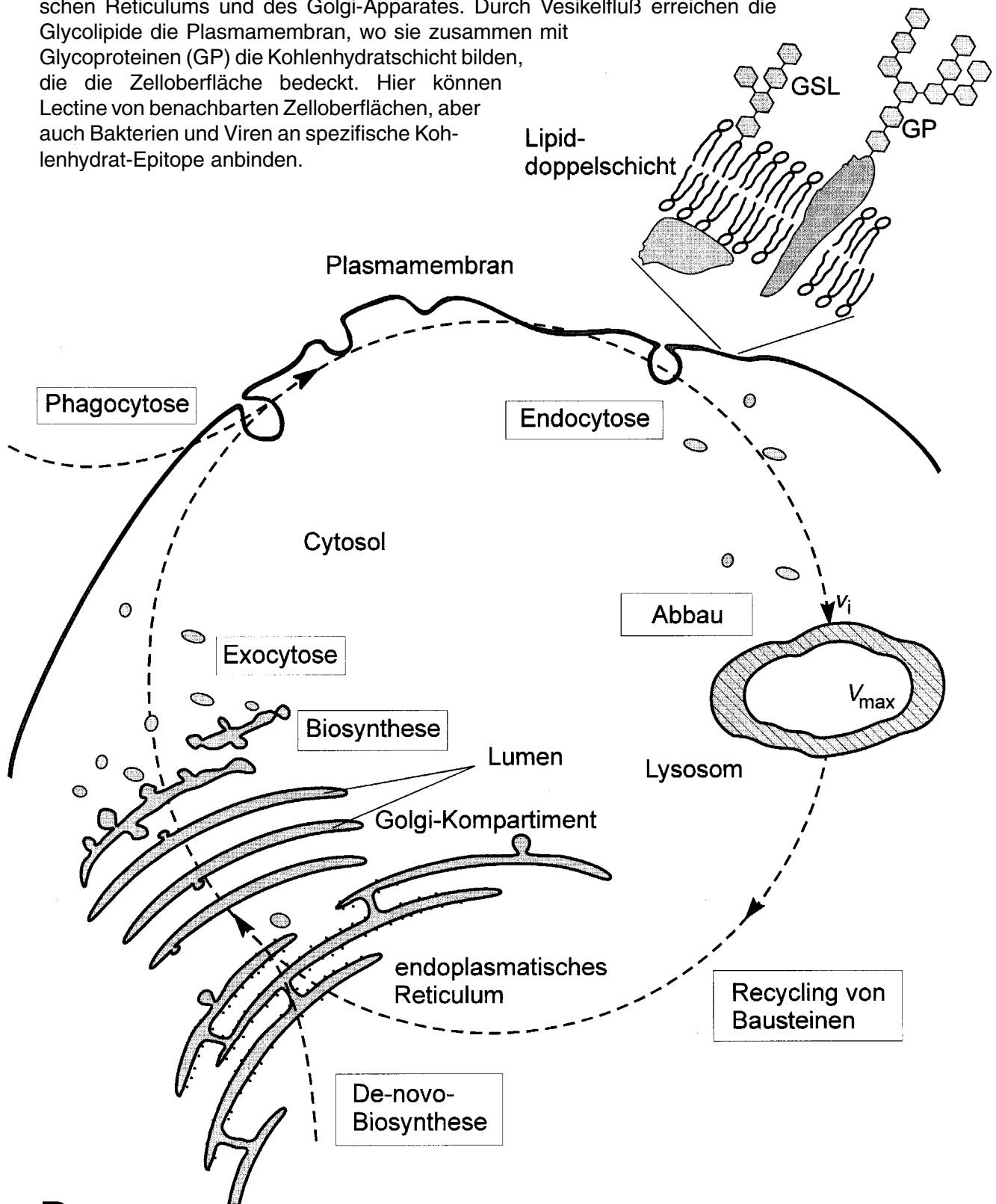


**D**argestellt ist der Stoffwechselfluß von Glycosphingolipiden (GSL) innerhalb einer eukaryontischen Zelle. Die Biosynthese dieser Verbindungen erfolgt an intrazellulären Membranen des endoplasmatischen Reticulums und des Golgi-Apparates. Durch Vesikelfluß erreichen die Glycolipide die Plasmamembran, wo sie zusammen mit Glycoproteinen (GP) die Kohlenhydratschicht bilden, die die Zelloberfläche bedeckt. Hier können Lectine von benachbarten Zelloberflächen, aber auch Bakterien und Viren an spezifische Kohlenhydrat-Epitope anbinden.



**D**urch Endocytose erreichen Bausteine der Plasmamembran die Lysosomen, innerhalb derer sie in ihre Bausteine zerlegt werden. Glycolipid-Einstrom ( $v_i$ ) und maximale Abbaukapazität ( $V_{max}$ ) innerhalb des Lysosoms sind wesentliche Parameter, die für den Verlauf menschlicher Erbkrankheiten mit Defekten im Sphingolipid-Abbau bestimmend sind. Neben der Neusynthese der Glycolipide können in einem Recycling-Prozeß die Bausteine wiederverwertet werden, die durch den lysosomalen Abbau entstehen und ins Cytosol freigesetzt werden.

# **Sphingolipide – ihre Stoffwechselwege und die Pathobiochemie neurodegenerativer Erkrankungen**

**Thomas Kolter\* und Konrad Sandhoff\***

*Professor Hans-Jürgen Quadbeck-Seeger zum 60. Geburtstag gewidmet*

Sphingolipide sind Bausteine von Plasmamembranen eukaryontischer Zellen. Sie verankern lipidgebundene Kohlenhydrate der Zelloberfläche und helfen beim Aufbau der Wasserpermeabilitätsbarriere der Haut. Intermediate des Sphingolipid-Stoffwechsels

sind an der Transduktion extrazellulärer Signale in das Innere von Zellen beteiligt. Wir geben hier eine Übersicht über den Stoffwechsel dieser Verbindungen in Wirbeltieren, über die intrazelluläre Topologie der einzelnen Stoffwechselwege sowie über Erb-

krankheiten, die bei Defekten dieser Wege auftreten und häufig zur Degeneration des Nervensystems führen.

**Stichwörter:** Enzyminhibitoren • Erbkrankheiten • Glycolipide • Glycosidasen • Sphingolipide

## **1. Einleitung**

Unser heutiges Wissen über eine Klasse von Naturstoffen, die als Glycosphingolipide (GSL) bezeichnet werden, geht zurück auf die zweite Hälfte des vergangenen Jahrhunderts. Dem deutschen Arzt Tudichum gelang es, durch fraktionierende Kristallisation alkoholischer Hirnextrakte Verbindungen zu isolieren, die neben Zucker und Fettsäure eine organische Base enthielten, die er als Sphingosin bezeichnete<sup>[1]</sup> und deren Struktur 1947 durch Carter aufgeklärt werden konnte.<sup>[2]</sup> Die Isolierung und Bezeichnung weiterer Hirnlipide wie Ceramid, Sphingomyelin und Cerebrosid gehen ebenfalls auf Tudichum zurück.<sup>[3]</sup> Ende der dreißiger Jahre dieses Jahrhunderts entdeckte der Kölner Biochemiker Klenk eine neue Untergruppe saurer Sphingolipide im Hirngewebe von Patienten, die an amaurotischer Idiotie, einer seltenen Erbkrankheit, litten. Er bezeichnete diese neuen Verbindungen als Ganglioside und ihre saure Komponente als Neuraminsäure.<sup>[4]</sup> Die Struktur von *N*-Acetylneuraminsäure, auch als Sialinsäure<sup>[5]</sup> oder Lactaminsäure bekannt, wurde 1962 durch Kuhn und Mitarbeiter aufgeklärt.<sup>[6]</sup> Die erste Strukturauflösung eines Gangliosids, des GM1 (Abbildung 1), gelang 1963 Kuhn und Wiegandt.<sup>[7]</sup> Doch nicht nur die Strukturaufklärung, sondern auch die Untersuchung des Stoffwechsels von GSL wurde mit Autopsiematerial von Patienten durch-

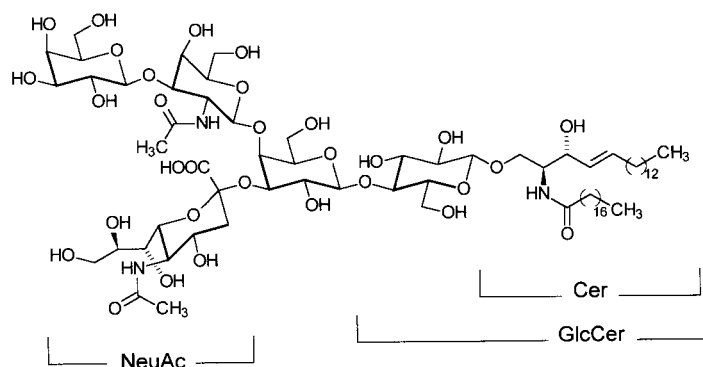


Abbildung 1. Struktur des Gangliosids GM1, eines häufigen sialinsäurehaltigen Glycosphingolipids im adulten menschlichen Hirn, das auch als Rezeptor für das Choleratoxin im Darm fungiert. Heterogenitäten im Lipidteil sind nicht gekennzeichnet. NeuAc = *N*-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure); Cer = Ceramid (*N*-Acylsphingosin); GlcCer = Glucosylceramid.

geführt, die an seltenen Stoffwechseldefekten litten. Bei diesen Speicherkrankheiten akkumulieren Sphingolipide aufgrund von Mutationen, die einen Ausfall der für den lysosomalen Abbau erforderlichen Proteine bewirken. Die Untersuchung dieser Erbkrankheiten in unserem Labor führte zur Aufklärung der Tay-Sachs'schen Erkrankung, der Sandhoff'schen Erkrankung und weiterer Sphingolipidosen (Abschnitt 6) sowie zu einem neuen Modell der Topologie von Endocytose und lysosomaler Verdauung (Abschnitt 5.4). Auch die Funktion von Aktivatorproteinen, die für den Sphingolipid-Katabolismus erforderlich sind, konnte anhand von Erbkrankheiten erforscht werden. So führte die Analyse der AB-Variante der GM2-Gangliosidose zur Entdeckung des

[\*] Dr. T. Kolter, Prof. K. Sandhoff  
Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität  
Gerhard-Domagk-Straße 1, D-53121 Bonn  
Fax: (+ 49) 228-73-77-78.  
E-mail: Kolter@snchemie1.chemie.uni-bonn.de  
Sandhoff@uni-bonn.de

GM2-Aktivatorproteins (Abschnitt 6.2.4). Die Spezifität der Sphingolipid-Aktivatorproteine A bis D (SAP-A–D, auch Saposine genannt) in vivo konnte erst mit Hilfe der beiden einzigen bekannten Patienten mit SAP-Vorläufer-Defizienz (Abschnitt 6.11) nachgewiesen werden.

## 2. Struktur und Funktion von Sphingolipiden

Die Oberflächen eukaryontischer Zellen sind von einer Kohlenhydratschicht bedeckt. Diese sogenannte Glycocalix besteht aus Glycoproteinen, Glycolipiden und Glycosaminoglycanen. Als Membrananker lipidgebundener Kohlenhydrate fungiert in eukaryontischen Zellen weitgehend das Ceramid, das in den meisten Sphingolipiden vorkommt.<sup>[8–10]</sup> Ceramid selbst besteht aus dem langkettigen Aminoalkohol D-erythro-Sphingosin, dessen Aminogruppe mit einer Fettsäure acyliert ist. Neben Ceramid gibt es noch weitere kohlenhydratfreie Sphingolipide wie das Membranlipid Sphingomyelin oder die Zwischenprodukte des Sphingolipid-Stoffwechsels wie Sphingosin, Sphinganolin oder Sphingosin-1-phosphat.

In der Natur existiert eine Vielzahl von GSL, die sich in Art, Zahl und Verknüpfung der einzelnen Zuckerbausteine unterscheiden. Die GSL-Ausstattung eines Organismus ist artspezifisch. Dabei können die Lipide in wenigen Serien (Abbildungen 2 und 3) klassifiziert werden, die für entwicklungsgeschichtlich verwandte Arten charakteristisch sind.<sup>[10]</sup> GSL bilden auf der Zelloberfläche zelltypspezifische Muster (Abbildung 4), die sich mit dem Differenzierungszustand und bei viraler oder onkogener Transformation ändern.<sup>[11]</sup> Die Heterogenitäten innerhalb dieser Stoffklasse sind jedoch nicht auf den Kohlenhydratteil beschränkt; auch der Lipidanker kann in Alkylkettenlänge, Sättigungs- und Hydroxylierungsgrad variieren.

GSL der Zelloberfläche sind an zelltypspezifischen Adhäsionsprozessen beteiligt.<sup>[12]</sup> Es ist bekannt, daß sie als Bin-

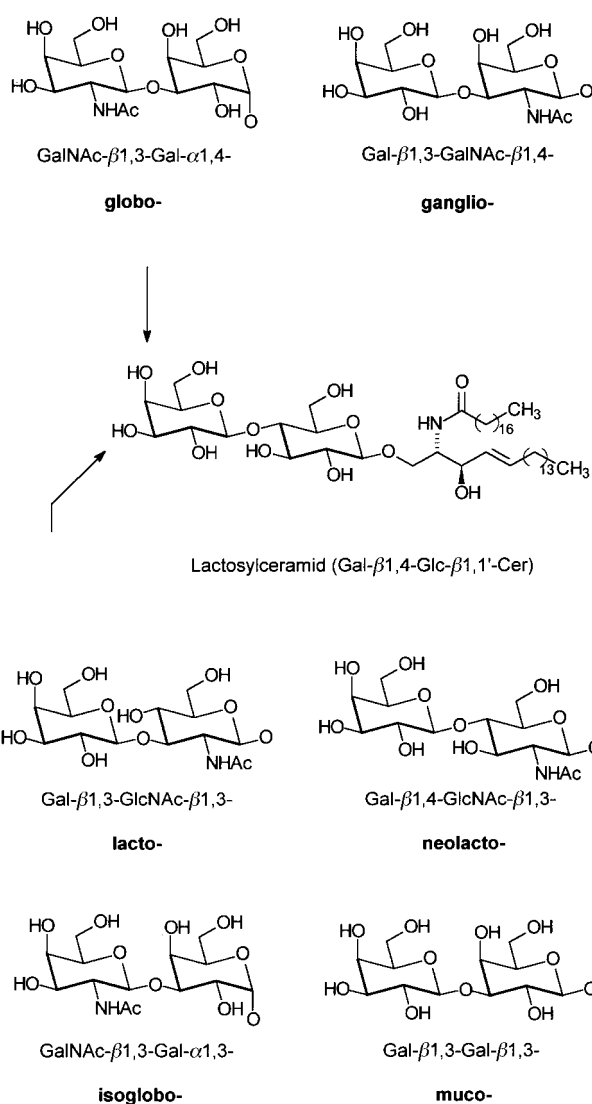


Abbildung 2. Strukturen und Trivialnamen der Glycosphingolipid-Serien des Säugers, die sich vom Lactosylceramid ableiten.

Thomas Kolter, geboren 1963, studierte Chemie an der Universität Bonn. Er promovierte 1993 bei A. Giannis mit einer Arbeit über die Synthese von Peptidmimetika. Seither arbeitet er zusammen mit Konrad Sandhoff auf dem Gebiet der Lipidbiochemie. Sein besonderes Interesse gilt bioorganischen Aspekten des Glycolipid-Stoffwechsels.

Konrad Sandhoff, geboren 1939, studierte Chemie an der Universität München. Er promovierte 1965 unter der Leitung von H. Jatzkewitz und F. Lynen und arbeitete am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München, an der Johns-Hopkins-Universität, Baltimore, und am Weizmann-Institut, Rehovot. 1979 wurde er zum Professor für Biochemie an das Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn berufen. Zu den Ehrungen, die er erhielt, gehört die Bezeichnung „Sandhoffsche Erkrankung“ für eine menschliche Erbkrankheit, die Verleihung der Richard-Kuhn-Medaille der Gesellschaft Deutscher Chemiker 1992 und des K.-J.-Zülch-Preises der Max-Planck-Gesellschaft 1998. Seit 1991 ist er Sprecher des Sonderforschungsbereichs 284 (Glykokonjugate und Kontaktstrukturen der Zelloberfläche) und gehört seit 1994 dem Kuratorium der Angewandten Chemie an. Seine Forschungsinteressen sind die Analyse lysosomaler Speicherkrankheiten und alle Aspekte des Stoffwechsels von Glycolipiden.



T. Kolter



K. Sandhoff

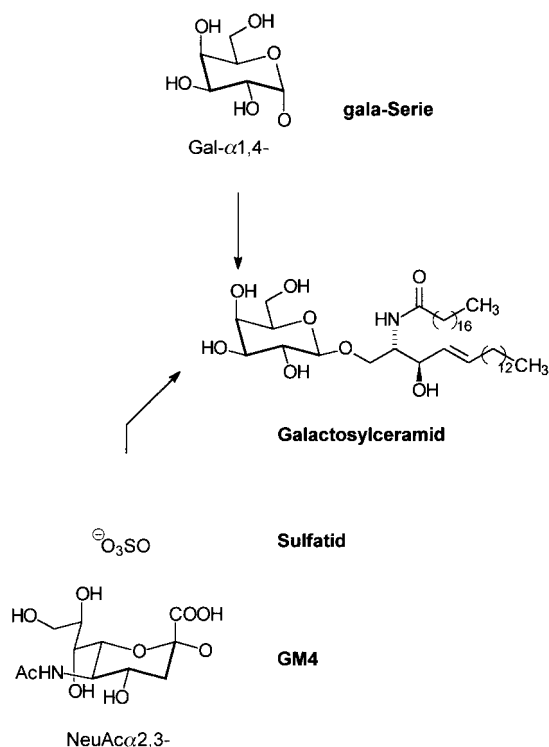


Abbildung 3. Strukturen und Trivialnamen der Glycosphingolipid-Serien des Säugers, die sich vom Galactosylceramid ableiten.

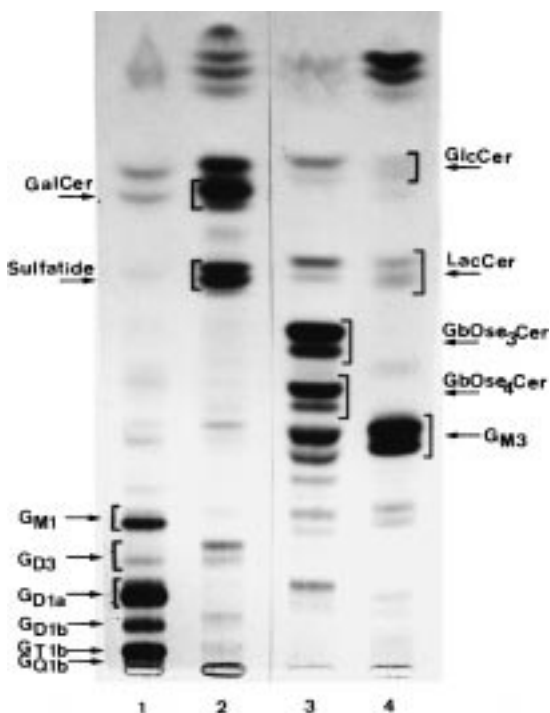


Abbildung 4. Biosynthetische Markierung zellulärer Glycolipide mit [ $^{14}\text{C}$ ]Galactose.<sup>[438]</sup> Die Zellen wurden in Kultur mit [ $^{14}\text{C}$ ]Galactose ( $2 \mu\text{Ci mL}^{-1}$ ) 48 h markiert, geerntet und extrahiert. Die Glycosphingolipide wurden dünnschichtchromatographisch getrennt und durch Fluorographie sichtbar gemacht. Bahn 1: Körnerzellen aus dem Kleinhirn der Maus; Bahn 2: Oligodendrocyten; Bahn 3: Fibroblasten; Bahn 4: Neuroblastomzellen (B 104). Die Mobilität von Standardlipiden ist angegeben; zu den verwendeten Abkürzungen siehe nachfolgende Abbildungen.

dungsstellen für Toxine, Viren<sup>[13]</sup> und Bakterien<sup>[14]</sup> fungieren können. Diese Pathogene profitieren von der engen räumlichen Nachbarschaft zwischen spezifischen Kohlenhydrat-Erkennungsstellen auf der Zelloberfläche und der Plasmamembran. Zelladhäsionsphänomene dieser Art beruhen auf einer Bindung des Kohlenhydratanteils membranständiger GSL durch Lectine außerhalb der Zelle. Auf diesem Prinzip basiert auch die Bildung von Myelinscheiden um die Axone von Nervenzellen. Hier sind Ganglioside auf der Oberfläche neuronaler Zellen Liganden für das Myelin-assoziierte Glycoprotein (MAG), das sich auf der Oberfläche myelinisierender Gliazellen befindet.<sup>[15]</sup> Auch Wechselwirkungen von GSL mit Rezeptoren und Enzymen innerhalb derselben Membran werden beschrieben und sind möglicherweise von physiologischer Relevanz.<sup>[16]</sup> So kann das Gangliosid GM1 den Rezeptor des Nervenwachstumsfaktors aktivieren<sup>[17]</sup> und das Gangliosid GM3 die Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors für den epidermalen Wachstumsfaktor inhibieren.<sup>[18]</sup>

Durch GSL können viele physiologische Vorgänge beeinflusst werden, z. B. die Embryogenese, die Differenzierung neuronaler Zellen und Leukocyten, die Zelladhäsion und die Signaltransduktion.<sup>[19]</sup> Auch lipophile Intermediate des GSL-Stoffwechsels wie Sphingosin, Ceramid und deren phosphorylierte Derivate sind als neuartige Signalmoleküle identifiziert worden.<sup>[20, 21]</sup> Schließlich bilden komplexe GSL eine Schicht auf den anticytosolischen Seiten von Zellmembranen, die diese vor Abbau und unkontrollierter Membranfusion schützt.<sup>[22, 23]</sup> Über die genaue Funktion einzelner Sphingolipide in vivo ist aber wenig bekannt. Zahlreiche Beobachtungen legen nahe, daß sie an biologischen Vorgängen beteiligt sind, aber in vielen Fällen fehlen eindeutige Beweise für ihre Funktion. Bei gentechnisch veränderten Mäusen, die infolge der Inaktivierung von GM2- und GD2-Synthase keine komplexen Ganglioside bilden können, werden nur geringfügige Störungen im Nervensystem,<sup>[24]</sup> aber schwere Funktionsstörungen im Testis registriert. Die Hemmung der Biosynthese der GSL, die sich vom Glucosylceramid ableiten, beeinträchtigt die Entwicklung von Fisch-<sup>[25]</sup> und Mausembryonen nicht.<sup>[26]</sup> Hingegen ist die Bildung von Glucosylceramid selbst für die Embryogenese essentiell: Gentechnisch veränderte Mäuse, denen die Glucosylceramid-Synthase fehlt, sterben bereits am 19. Tag ihrer Embryogenese.<sup>[27]</sup> Galactosylceramid, Sulfatid und Ganglioside sind für die Myelinfunktion essentiell (Abschnitt 3.1), Ceramide für die Funktion der Haut (Abschnitt 2.1). Die Konservierung der GSL-Struktur in der Evolution sowie das Fehlen von Erbkrankheiten, die auf Störungen ihrer Biosynthese beruhen, weisen darauf hin, daß auch sie wesentliche Funktionen für den lebenden Organismus erfüllen.

## 2.1. Sphingolipide der Haut

Sphingolipide sind für die Funktion der menschlichen Haut erforderlich, da sie zum Aufbau der Wasserpermeabilitätsbarriere beitragen.<sup>[28, 29]</sup> Diese Barriere ist in der Hornschicht der Epidermis lokalisiert und besteht aus einem dicht gepackten System terminal differenzierter Keratinocyten (Corneocyten), die in eine hochorganisierte, multilamellare Lipid-

matrix aus freien Fettsäuren, Cholesterin und Ceramiden eingebettet sind. Die daran beteiligten Ceramide unterscheiden sich in ihren Strukturen von den üblicherweise in GSL von Wirbeltieren vorkommenden Membranankern in charakteristischer Weise (Abbildungen 5 und 6). So haben sie z. B. ungewöhnlich lange Fettsäurereste sowie Sphingoidbasen, die an verschiedenen Positionen hydroxyliert sein können.<sup>[30]</sup>

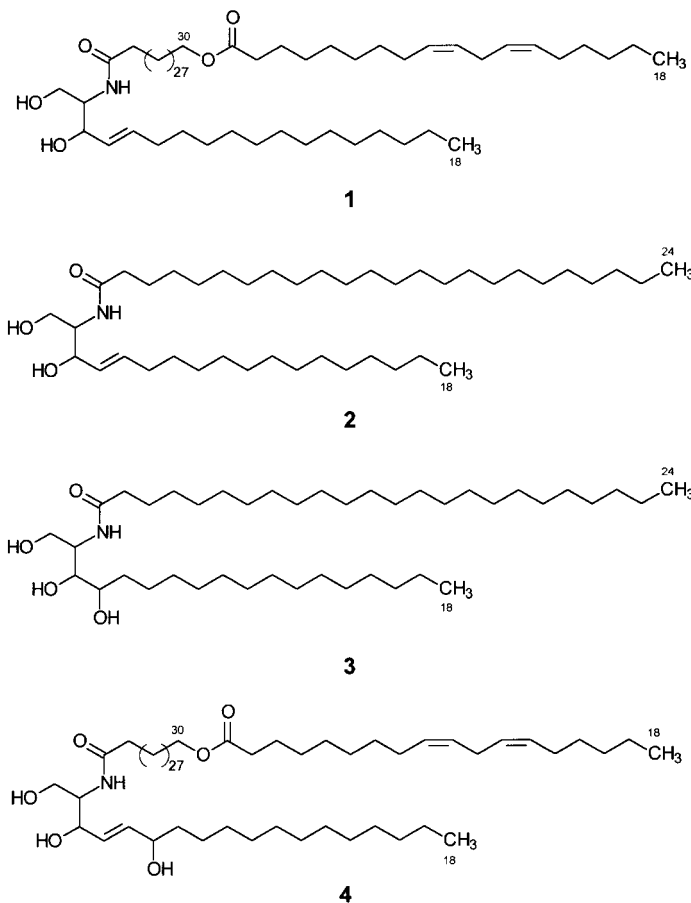


Abbildung 5. Sphingolipide der menschlichen Haut (I): Strukturen der Ceramide 1–4.<sup>[30]</sup>

Eine charakteristische Sphingoidbase der Keratinocyten ist das Phytosphingosin (*D*-ribo-4-Hydroxysphinganin), das sonst als Bestandteil der Sphingolipide von Hefen und anderen niederen Eukaryonten vorkommt. Beim Menschen macht es etwa 40 % der Sphingoidbasen epidermaler Ceramide aus.<sup>[31]</sup> Als Funktion der zusätzlichen freien Hydroxygruppe wird angenommen, daß durch eine größere Zahl an Wasserstoffbrückenbindungen die Rigidität der interzellulären Lipidaggregate erhöht und damit der transepidermale Wasserverlust vermindert wird.<sup>[32]</sup> Auch kovalente Bindungen zwischen den Ceramiden und Proteinen wie Involukrin tragen zur Stabilität der Haut bei.<sup>[33]</sup> Die Biosynthese der Sphingolipide in humanen Keratinocyten ist ungeklärt und wird gegenwärtig in unserem Arbeitskreis untersucht. Elias und Menon stellten 1991 die Hypothese auf, daß die Ceramide der interzellulären Lipidlamellen in der epidermalen Hornschicht durch extrazellulären Abbau komplexer GSL entstehen.<sup>[34]</sup> In vivo werden die Lipidlamellen über ellipsoide Organellen, so-

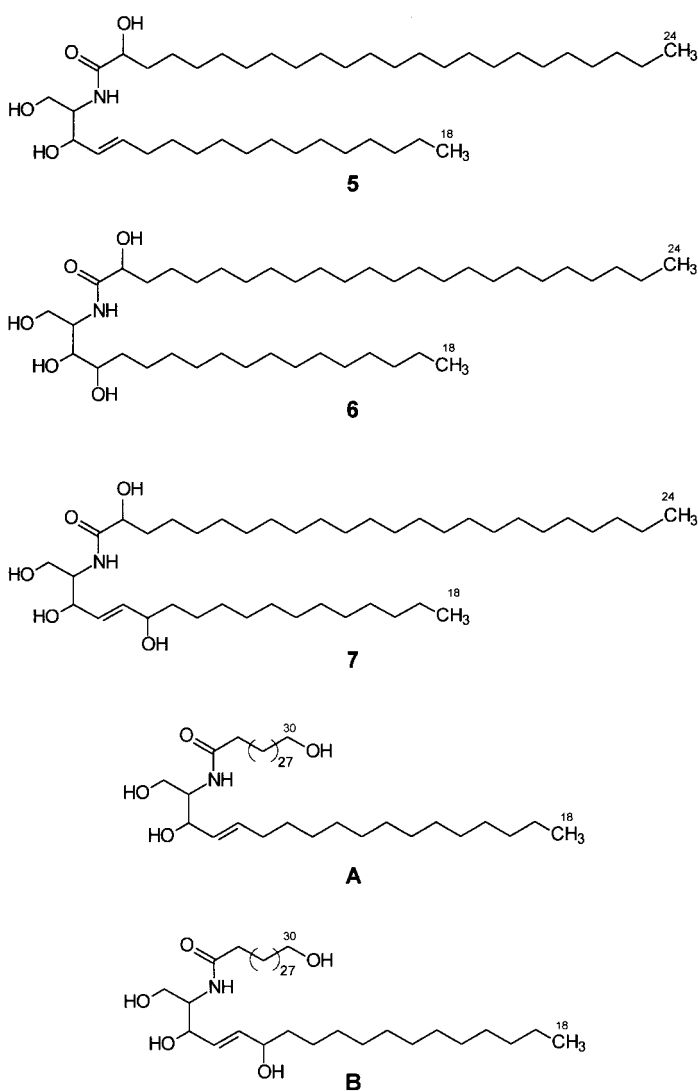


Abbildung 6. Sphingolipide der menschlichen Haut (II): Strukturen der Ceramide 5–7, A und B.<sup>[30]</sup>

nannte „Odland Bodies“, in den Extrazellulärraum der Hornschicht sezerniert. „Odland Bodies“ enthalten neben Lipidaggregaten eine Ausstattung an lysosomalen Proteinen, die für den Abbau der Lipidvorstufen verwendet werden könnten.<sup>[35]</sup>

Durch Untersuchungen an gentechnisch veränderten Mäusen, denen das SAP-Vorläuferprotein (Abschnitt 6.11) fehlt und die dementsprechend auch eine verminderte Abbaukapazität für Glucosylceramide aufweisen, konnten wir Einzelheiten dieses Prozesses aufklären. Demnach wird das Glucosylderivat des Ceramids **1** (Abbildung 5) durch Umesterung auf die sauren Aminosäureseitenketten von Proteinen übertragen und nachfolgend der Glucoserest abgespalten.<sup>[445]</sup> Es handelt sich hier um einen Schlüsselschritt für die Bildung extrazellulärer Lipidaggregate, der bei Landtieren für die Wasserpermeabilitätsbarriere der Haut essentiell ist. Die Bedeutung der Sphingolipide für die Hautfunktion wird wiederum durch eine Erbkrankheit belegt: Bei einem kompletten Ausfall der Glucocerebrosidase bei seltenen Fällen der Gaucher'schen Erkrankung sterben die Patienten innerhalb weniger Stunden nach der Geburt an transepidermalem Wasserverlust.<sup>[36]</sup> Wegen dieser Bedeutung für die Hautfunk-

tion sind Ceramide und Ceramid-Ersatzstoffe für die kosmetische Industrie interessant.<sup>[37]</sup> Hinzuweisen ist in diesem Zusammenhang aber auch auf die Funktion von Ceramid als Signalmolekül (Abschnitt 5.1), die den Einsatz von Ceramid selbst für die Hautpflege problematisch erscheinen läßt.

## 2.2. Glycosphingolipide und das Immunsystem

Glycolipide können vom Immunsystem erkannt werden. Historisch ist die Identifizierung des Forssman-Antigens als GSL besonders bedeutsam.<sup>[38]</sup> Einzelne Glycosphingolipide sind Blutgruppen-Antigene; die Bildung von Autoantikörpern gegen Ganglioside wurde als Ursache peripherer Neuropathien bekannt; so werden Anti-GM1- und Anti-GQ1b-Antikörper als Auslöser des Guillain-Barre-Syndroms angesehen. Aber auch bei anderen Autoimmunerkrankungen können Anti-Glycolipidantikörper nachgewiesen werden, beispielsweise gegen Sulfatid beim insulinabhängigen Diabetes (Typ 1).<sup>[39]</sup> Einige Glycolipide spielen eine Rolle als tumorassoziierte Antigene und bei der Immuntherapie einzelner Krebsformen.<sup>[40]</sup>  $\alpha$ -Konfigurierte Glycolipide wurden als äußerst potente Immunstimulatoren beschrieben.<sup>[41]</sup> Dagegen ist die Hemmung der Sphingolipid-Biosynthese durch den Naturstoff Myriocin (Abschnitt 4.1) mit einer starken Immunsuppression verbunden.<sup>[42]</sup> Sphingolipide sind außerdem an Signaltransduktionsprozessen innerhalb des Immunsystems beteiligt.<sup>[43]</sup>

## 3. Biosynthese und intrazelluläre Topologie

### 3.1. Sphingolipid-Biosynthese

Auf der Zelloberfläche werden GSL-Muster ausgeprägt, die für einen Zelltyp in einem bestimmten Entwicklungsstadium charakteristisch sind. Bei der Biosynthese dieser Verbindungen, ihrem Abbau und ihrem intrazellulären Transport handelt es sich demnach um koordinierte und aufeinander abgestimmte Prozesse.

Biologische Membranen bestehen aus Lipiddoppelschichten, wobei die cytosolische und die anticytosolische Schicht unterschiedlich zusammengesetzt sein können. Unter den Zellmembranen befinden sich GSL und Sphingomyelin am häufigsten auf der äußeren Hälfte der Plasmamembran (Abbildung 7). Da ihre Biosynthese und ihr Abbau in unterschiedlichen zellulären Organellen erfolgen, werden sie und ihre Vorstufen auch in intrazellulären Membranen nachgewiesen, die über Prozesse der Membranfusion mit der Plasmamembran in Verbindung stehen. Bei den Enzymen, die an der Sphingolipid-Biosynthese beteiligt sind, handelt es sich um membran-gebundene Proteine. Über ihre Struktur, katalytische Mechanismen, Biosynthese und Regulation ist wenig bekannt.

Die De-novo-Biosynthese von GSL<sup>[44]</sup> (Abbildung 8) findet in den gleichen intrazellulären Kompartimenten statt wie die Biosynthese der Glycoproteine. Sie ist an den intrazellulären vesikulären Transport der wachsenden Lipidmoleküle gekoppelt, der über die Zisternen des Golgi-Apparates zur Plasmamembran führt. Sie beginnt mit der Bildung von Ceramid an

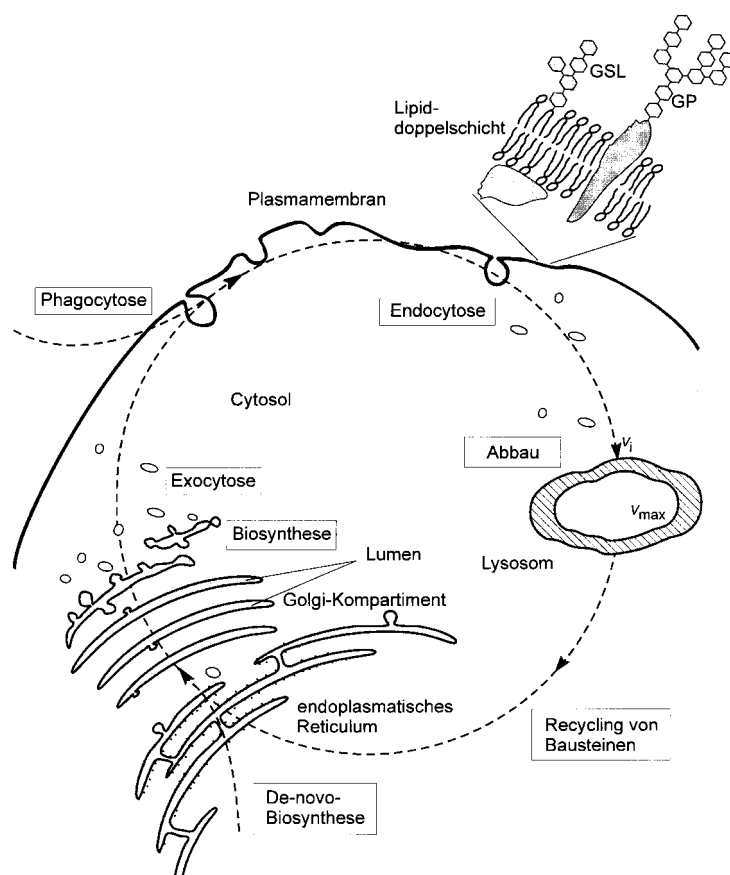


Abbildung 7. Intrazellulärer Stoffwechsel der Sphingolipide. GSL = Glycosphingolipid; GP = Glycoprotein;  $v_i$  = Einstromgeschwindigkeit des Substrats in das Lysosom (Näheres siehe Text).

den Membranen des endoplasmatischen Retikulums (ER). Die Kondensation der Aminosäure L-Serin mit einer Coenzym-A-aktivierten Fettsäure zu 3-Ketosphingamin wird von der Serin-Palmitoyltransferase (SPT) katalysiert.<sup>[45–47]</sup> Die SPT ist ein Pyridoxalphosphat (PLP)-abhängiges Enzym und mechanistisch mit der Aminolävulinat-Synthase verwandt; diese katalysiert die Einstiegsreaktion in die Häm-Biosynthese (siehe Lit. [100]). Die SPT hat eine geringere Aktivität als die folgenden Enzyme der Ceramid-Biosynthese und katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dieses Stoffwechselweges. Sie bevorzugt Fettsäure-Coenzym-A-Ester mit einer Kettenlänge von 16 C-Atomen, so daß langkettige Basen mit einer  $C_{18}$ -Kette entstehen. Die SPT ist das einzige Enzym der Ceramid-Biosynthese, für das Sequenzdaten aus Hefe<sup>[48, 49]</sup> und Mensch<sup>[50]</sup> vorliegen. In der nachfolgenden NADPH-abhängigen Reaktion wird 3-Ketosphingamin durch die 3-Ketosphingamin-Reduktase zu D-erythro-Sphingamin reduziert.<sup>[46]</sup> Anschließend acyliert die Sphingamin-N-Acyltransferase Sphingamin zu Dihydroceramid.<sup>[51, 52]</sup> Dieses Enzym<sup>[53]</sup> läßt eine Selektivität für Coenzym-A-aktivierte Stearinsäure erkennen und ist in der Lage, Sphingosin zu acylieren, das im „salvage pathway“ beim Sphingolipid-Abbau anfällt.<sup>[54]</sup>

Es wird auch berichtet, daß das Enzym nach Stimulierung durch den Plättchen-aktivierenden Faktor Sphingosin acetyliert.<sup>[55]</sup> Dihydroceramid wird von der Dihydroceramid-De-

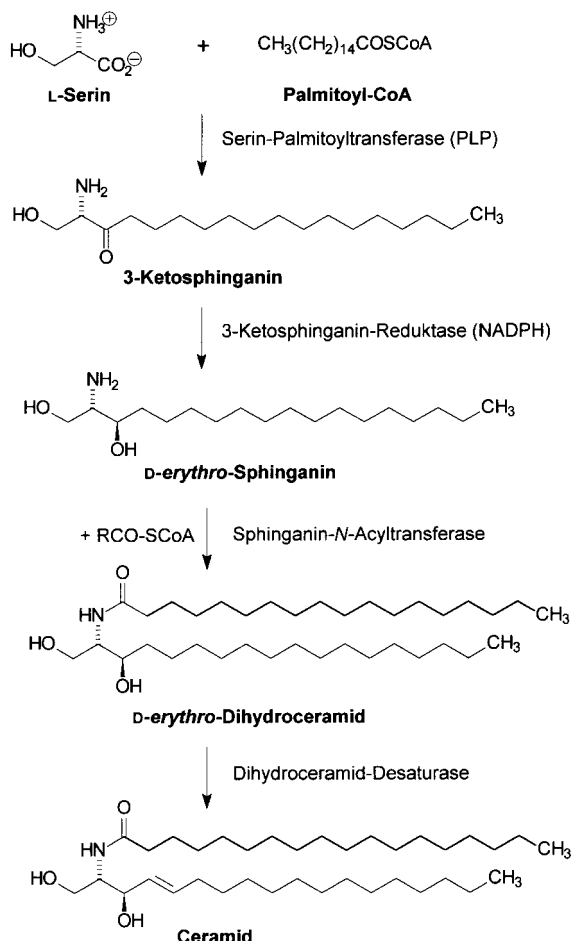


Abbildung 8. Ceramid-Biosynthese. Die Bildung von Ceramid findet auf der cytosolischen Membranseite des endoplasmatischen Reticulums statt.<sup>[44]</sup>

saturase zu Ceramid dehydriert.<sup>[56–58]</sup> Die Reihenfolge von Acylierung und Einführung der Doppelbindung war lange Zeit umstritten, es gilt heute jedoch als sicher, daß Dihydroceramid und nicht Sphingamin desaturiert wird. Sphingosin, die Stammverbindung der Sphingolipide, ist also kein Intermediat der Sphingolipid-Biosynthese, sondern wird während des Sphingolipid-Abbaus gebildet. Die Biosynthese von Phytosphingosin-haltigen Ceramiden ist ungeklärt; es konnte jedoch das Gen charakterisiert werden, das in Hefe für die Biosynthese dieser Strukturen verantwortlich ist.<sup>[59]</sup>

Ceramid ist die gemeinsame Vorstufe von GSL und Sphingomyelin. Bei GSL von Wirbeltieren ist ein Glucose- oder Galactoserest  $\beta$ -glycosidisch mit der 1-Position von Ceramid verbunden. Die Glycosyltransferasen, die den Aufbau dieser Verbindungen katalysieren, übertragen einzelne Nucleotid-aktivierte Zucker auf Ceramid. Die Galactosylierung von Ceramid,<sup>[60]</sup> die zur Bildung von Glycolipiden der gala-Serie führt, findet vorwiegend in den Oligodendrocyten des Gehirns sowie in den Nieren statt. Galactosylceramid (GalCer) und Sulfatid (GalCer-3-sulfat) treten in hohen Konzentrationen in den multilamellaren Schichten von Myelin auf, das die Axone von Nervenzellen umgibt.<sup>[61]</sup> Knockout-Mäuse, bei denen das Gen der Ceramid-Galactosyltransferase inaktiviert wurde und die demzufolge kein Galactosylceramid und kein Sulfatid bilden können, sind dennoch in der Lage,

Myelin mit weitgehend normaler Struktur aufzubauen. Anstelle des fehlenden GalCer bauen sie ein im Fettsäureanteil hydroxyliertes Glucosylceramid (GlcCer) in ihr Myelin ein. Die Stabilität und die Funktion dieser Myelinschichten sind allerdings stark eingeschränkt.<sup>[62, 63]</sup> Die Reaktion der 3'-OH-Gruppe im Galactoserest von GalCer mit als PAPS (3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat) aktiviertem Sulfat liefert Sulfatid.<sup>[64]</sup>

Die Biosynthese der meisten GSL von Wirbeltieren erfordert nicht die Galactosylierung, sondern die Glucosylierung von Ceramid. Die GlcCer-Synthase konnte kürzlich aus Rattenleber isoliert<sup>[65]</sup> und die komplementäre DNA (cDNA) des humanen Proteins kloniert<sup>[66]</sup> werden. Sie überträgt einen Glucoserest von UDP-Glucose auf Ceramid. Die Fettsäuren, die in GlcCer und GalCer gefunden werden, unterscheiden sich in Länge und Hydroxylierungsgrad, was auf die unterschiedlichen Zelltypen zurückgeführt werden kann, in denen diese Strukturen gebildet werden.<sup>[9]</sup> Obwohl die GlcCer- und die GalCer-Synthase ähnliche Reaktionen katalysieren, besteht keine Sequenzhomologie zwischen den cDNAs, die diese Enzyme codieren.<sup>[67]</sup> Knockout-Mäuse, denen die GlcCer-Synthase und damit die Mehrzahl der komplexen GSL fehlt, sind nicht lebensfähig und sterben bereits während der Embryogenese.<sup>[27]</sup> Dieser Befund weist auf lebenswichtige Funktionen der Glycolipide bei der Morphogenese und Embryogenese hin. Lactosylceramid, die gemeinsame Vorstufe von fünf GSL-Serien in Wirbeltieren, wird durch die Wirkung der Galactosyltransferase I gebildet, die einen Galactoserest von UDP-Galactose auf Glucosylceramid überträgt. Dieses Enzym konnte kürzlich aus Rattenhirn gereinigt und kloniert werden.<sup>[68]</sup>

Ceramid ist auch eine Vorstufe von Sphingomyelin, einem strukturellen Bestandteil der Plasmamembran. Es ist ein 1-Ceramid-phosphocholin und kommt vorwiegend in der Plasmamembran vor und dort hauptsächlich in der nach außen gewandten Schicht. Der Sphingomyelin-Gehalt von Plasmamembranen hängt vom Zelltyp ab und kann 25 % erreichen. Sphingomyelin unterscheidet sich von den Glycolipiden wie Phosphatidylcholin durch eine höhere Schmelztemperatur. Der Grund dafür liegt zum einen im hohen Anteil gesättigter Fettsäureseitenketten, zum anderen im Auftreten intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der 3-OH-Gruppe und dem Amid-N-Atom. Die Biosynthese von Sphingomyelin geschieht durch Übertragung der Phosphorylcholin-Kopfgruppe von Phosphatidylcholin auf Ceramid. Dabei entsteht Diacylglycerin, ein Aktivator der Proteinkinase C und der Bildung sekretorischer Vesikel am Golgi-Apparat.<sup>[69]</sup> Die Bildungsweise des Sphingomyelins legt eine enge Kopplung von Sphingolipid- und Glycerolipid-Stoffwechsel nahe. Tatsächlich wird in vielen biologischen Membranen eine inverse Korrelation der Anteile an Sphingomyelin und Phosphatidylcholin beobachtet.

### 3.2. Topologie

Zur Topologie der Sphingolipid-Biosynthese existieren teilweise widersprüchliche experimentelle Befunde. Die vermutlich wesentlichen Transportwege werden hier wiederge-

geben. Demnach werden die ersten vier Schritte der Sphingolipid-Biosynthese, die zur Bildung von Ceramid führen, von membrangebundenen Enzymen auf der cytosolischen Seite des endoplasmatischen Reticulums (ER) katalysiert.<sup>[70, 71]</sup> Da die Bildung von Glucosylceramid auf der cytosolischen Seite des Golgi-Apparates oder eines Prä-Golgi-Kompartiments verläuft,<sup>[72, 73]</sup> muß Ceramid und zum Teil auch Dihydroceramid vom ER zum Golgi-Apparat transportiert werden. Dies kann entweder durch Vesikelfluß oder durch einen proteinvermittelten Transport geschehen. Zumindest in CHO-Zellen (CHO = chinese hamster ovary) scheint auch ein direkter Transportweg zu existieren, bei dem Glucosylceramid von der cytosolischen Seite des Golgi-Apparates aus die Plasmamembran erreichen kann.<sup>[74]</sup> Der nächste Zuckerrest wird auf der luminalen Seite des Golgi-Apparates eingeführt unter Bildung von Lactosylceramid.<sup>[75]</sup> Dies impliziert eine Membrantranslokation von Glucosylceramid, die durch ein Protein, eine noch nicht charakterisierte „Flipase“,<sup>[76]</sup> vermittelt sein könnte. Höhere Ganglioside werden dann auf der luminalen Seite des Golgi-Apparates synthetisiert.<sup>[77]</sup> Infolgedessen sind die Glycanketten der membrangebundenen GSL anticytosolisch orientiert. Diese Orientierung ist der Situation auf der Plasmamembran topologisch äquivalent, bei der die Kohlenhydratreste komplexer Glycolipide in den Extrazellulärraum ragen.

Ein Großteil des Sphingomyelins wird auf der luminalen Seite des Golgi-Kompartiments gebildet,<sup>[78]</sup> aber auch andere Synthesorte kommen in Frage.<sup>[79]</sup> Diese erfordern einen zusätzlichen Membrantranslokationsschritt auf der Stufe von Ceramid. Die Bildung von Galactosylceramid mit hydroxylierten Fettsäuren in der Seitenkette scheint auf der luminalen Seite der ER-Membran abzulaufen, während nichthydroxylierte GalCer-Spezies auf der cytosolischen Seite des cis-Golgi gebildet werden.<sup>[80]</sup> Die Biosynthesen von Sulfatid<sup>[81]</sup> und Digalactosylceramid<sup>[80]</sup> finden im Lumen des Golgi-Apparates statt.

### 3.3. Die Biosynthese komplexer Ganglioside

Ganglioside sind saure Glycolipide der ganglio- oder der lacto-Serie,<sup>[9]</sup> die eine oder mehrere Sialinsäuren enthalten. Besonders häufig sind Ganglioside der ganglio-Serie auf der Oberfläche von Nervenzellen.<sup>[82]</sup> Ihre Biosynthese wird hier kurz zusammengefaßt. In Gangliosiden, aber auch in Glycoproteinen sind Sialinsäuren nur in  $\alpha$ -glycosidischer Verknüpfung vorhanden. Dagegen können die meisten anderen Zucker in Glykokonjugaten sowohl in der  $\alpha$ - als auch in der  $\beta$ -Konfiguration vorliegen. Diesen Befund haben wir in einer Hypothese mit der Spezifität von Sialyltransferasen korreliert, die als Glycosyldonor nur Nucleosidmonophosphat-

aktivierte Zucker wie CMP-NeuAc und keine Nucleosiddiphosphat-aktivierten Zucker verwenden.<sup>[83]</sup>

Mit Ausnahme von GM4 leiten sich Ganglioside strukturell und biosynthetisch vom Lactosylceramid ab. Durch membrangebundene Glycosyltransferasen werden im Golgi-Apparat schrittweise weitere Zuckerreste einschließlich der Sialinsäure auf die Glycankette übertragen. Lactosylceramid und seine sialylierten Derivate GM3, GD3 und GT3 sind Vorstufen komplexer Ganglioside der 0-, a-, b- und c-Serien (Abbildung 9). Ganglioside der c-Serie werden in mensch-

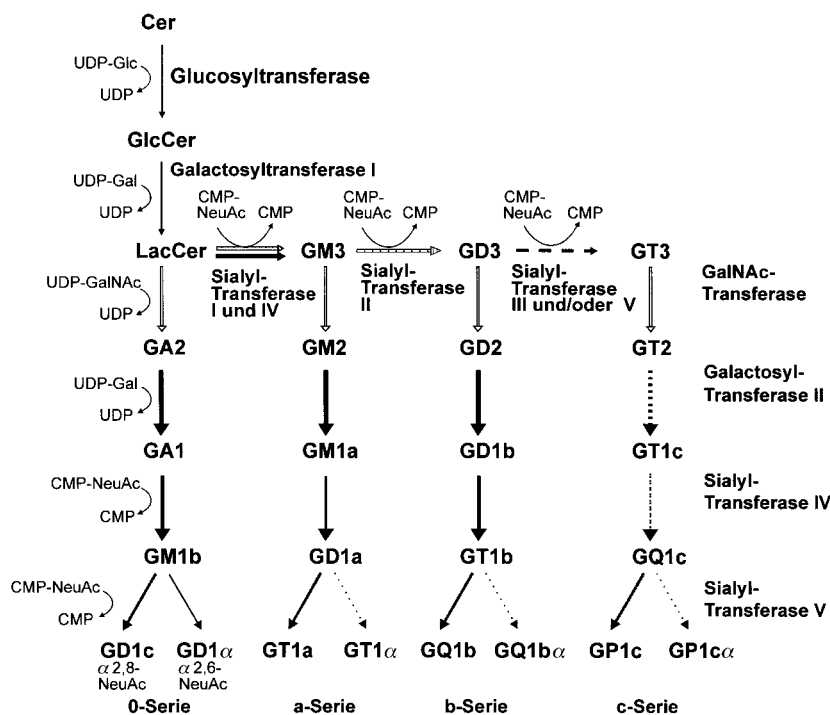


Abbildung 9. Biosyntheschema komplexer Ganglioside<sup>[44]</sup> unter Berücksichtigung von Lit. [439]. Die Reaktionsschritte werden von membranständigen Glycosyltransferasen im Lumen des Golgi-Apparates katalysiert.

lichen Geweben nur in Spuren nachgewiesen. Die schrittweise Glycosylierung dieser Vorstufen wird überraschenderweise durch wenige recht unspezifische Glycosyltransferasen katalysiert. Wir konnten in enzymkinetischen Versuchen nachweisen, daß diese Enzyme die entsprechenden Zucker auf verschiedene Glycosylacceptoren übertragen, die sich durch die Zahl der an die innere Galactose gebundenen Sialinsäuren unterscheiden.<sup>[84–86]</sup> Aus Experimenten in vitro geht hervor, daß die Sialyltransferasen I und II eine sehr viel höhere Spezifität für ihre Glycolipidsubstrate aufweisen als die Sialyltransferasen IV und V sowie die Gal-II- und GalNAc-Transferase. Da die cDNAs für die GD3- und die GT3-Synthase identisch sind, wurde angenommen, daß sowohl GD3 als auch GT3 beim Menschen vom selben Enzym biosynthetisiert werden können.<sup>[87]</sup>

Die Verteilung von Glycosyltransferasen innerhalb der Zisternen des Golgi-Apparates wurde mit Inhibitoren des vesikulären Membranflusses untersucht. Monensin, ein kationischer Ionophor, verhindert den vesikulären Membranfluß zwischen proximalen und distalen Golgi-Zisternen und führt zu einer verstärkten biosynthetischen Galactosemarkierung



von GlcCer, LacCer, GM3, GD3 und GM2, während die Markierung komplexerer Ganglioside herabgesetzt ist. Die Zugabe von Brefeldin A, das eine Fusion von ER vorwiegend mit Teilen des cis- und des medialen Golgi bewirkt, führt zu einer reduzierten Markierung der Ganglioside GM1a, GD1a, GD1b, GT1b und GQ1b sowie in abgeschwächter Form auch von Sphingomyelin.<sup>[88]</sup> Obwohl Glycosyltransferase-Aktivitäten oft in mehreren Golgi-Subkompartimenten nachgewiesen wurden,<sup>[89]</sup> sprechen die vorliegenden Daten dafür, daß die Vorläufermoleküle GM3 und GD3 in frühen Golgi-Kompartimenten gebildet werden und die komplexen Ganglioside überwiegend im trans-Golgi-Netzwerk.<sup>[90]</sup> Neben der De-novo-Biosynthese können GSL auch in Salvage-Prozessen entstehen, bei denen Monosaccharide und insbesondere Sphingosin aus dem GSL-Abbau wiederverwendet werden.<sup>[91, 92]</sup>

### 3.4. Regulation

Die Aufrechterhaltung stabiler GSL-Muster auf individuellen Zelloberflächen erfordert eine genaue Kontrolle von GSL-Biosynthese, -Abbau und intrazellulärem Transport. Da nicht nur der regulierte Sphingomyelin-Abbau, sondern auch eine vermehrte Biosynthese von Ceramid für zelluläre Antworten verantwortlich gemacht wird,<sup>[93, 94]</sup> kommt der Regulation dieses Stoffwechselweges eine besondere Bedeutung zu. Allerdings gibt es bisher nur wenige Anhaltspunkte für die Regulationsmechanismen beim GSL-Stoffwechsel und -Transport. Die SPT scheint der erste Kontrollpunkt bei der Sphingolipid-Bildung zu sein. Die Enzymaktivität korreliert mit den relativen Anteilen von Sphingolipiden, die in verschiedenen Geweben ermittelt werden.<sup>[95]</sup> Da Sphingosin die SPT-Aktivität in kultivierten Nervenzellen verringert, scheint eine Autoregulation des Enzyms vorzuliegen.<sup>[121]</sup> Auch das Entfernen von Hautlipiden führt zu einem Ansteigen der SPT-Aktivität.<sup>[96]</sup>

Im Verlauf von Ontogenese und Zelltransformation wird eine Korrelation zwischen GSL-Expression und der Aktivität der Glycosyltransferasen, die zu deren Synthese führen, registriert. Dementsprechend scheint die Kontrolle von Glycosyltransferasen, etwa auf Transkriptionsebene, ein wesentlicher Regulationspunkt zu sein (Übersicht: Lit. [44]). Da die meisten Glycosyltransferasen während der letzten Jahre kloniert wurden,<sup>[97, 98]</sup> ist zu erwarten, daß die Information zum Verständnis der Kontrolle auf Transkriptionsebene im Laufe der nächsten Jahre verfügbar sein wird. Neben der Regulation auf genomischer Ebene gibt es auch einige Hinweise auf epigenetische Regulationsmechanismen. Die Feedback-Kontrolle verschiedener Glycosyltransferasen durch ihr entsprechendes Reaktionsprodukt oder durch ein Endprodukt der entsprechenden GSL-Serie wurde zumindest in vitro nachgewiesen;<sup>[44]</sup> ebenso kann ihr Phosphorylierungsstatus sowie der pH-Wert der Umgebung<sup>[99]</sup> die Aktivität der Glycosyltransferasen beeinflussen.

### 4. Inhibitoren der Sphingolipid-Biosynthese

Niedermolekulare Inhibitoren der Sphingolipid-Biosynthese<sup>[100]</sup> (Abbildung 10) wurden aus natürlichen Quellen isoliert

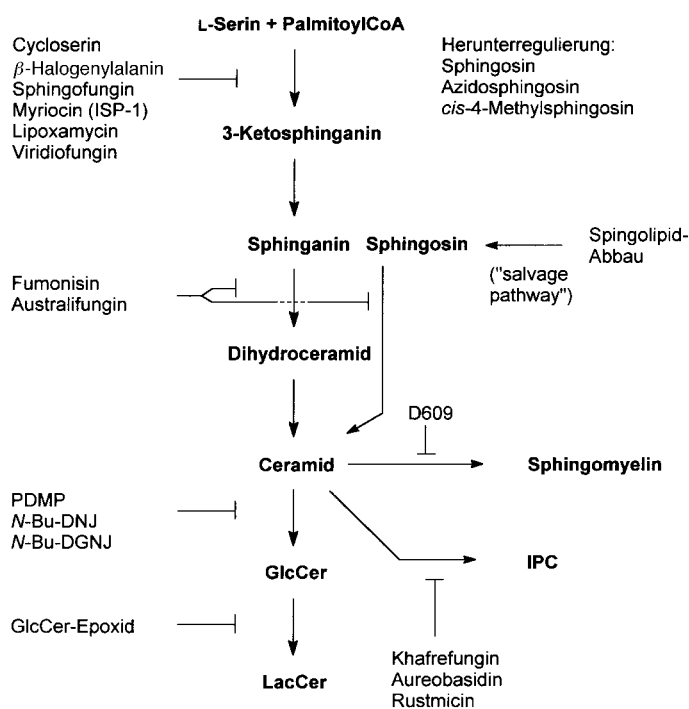


Abbildung 10. Flußschema und Inhibitoren der Sphingolipid-Biosynthese (modifiziert nach Lit. [100]). IPC = Inositolphosphorylceramid; N-Bu-DNJ = N-Butyldeoxynojirimycin; N-Bu-DGNJ = N-Butyldeoxygalactonojirimycin; PDMP = 1-Phenyl-2-decanoylamino-3-morpholinopropan-1-ol.

oder chemisch synthetisiert. Die meisten von ihnen wirken auf einer frühen Stufe der Biosynthese und haben eine lipidähnliche Struktur. Diese Inhibitoren haben eine größere Membranpermeabilität als solche auf Kohlenhydratbasis. Zusammen mit Inhibitoren des Sphingolipid-Abbaus (Abschnitt 5.2) sind sie wertvolle Werkzeuge zur Untersuchung der Stoffwechselwege. Aus mehreren Gründen besteht Interesse und Bedarf an niedermolekularen Inhibitoren, die einen bestimmten Schritt der Sphingolipid-Biosynthese spezifisch hemmen.<sup>[100]</sup> Ein mögliches Anwendungsgebiet ist die Analyse der GSL-Funktion durch Ausschaltexperimente.<sup>[101]</sup> Die Unterbrechung der Sphingolipid-Biosynthese auf einer bestimmten Stufe kann dabei entweder durch Inhibitoren oder durch die Herstellung mutanter Zellen oder Tiere erreicht werden, denen ein bestimmtes Biosynthese-Enzym fehlt.<sup>[102]</sup> Dieser Ansatz hat einen zweifachen Effekt: Zum einen verarmt die Zelle oder der Organismus an Metaboliten stromabwärts des gehemmten bzw. mutierten Enzyms. Zum anderen können Stoffwechselprodukte stromaufwärts des blockierten Schrittes akkumulieren, wodurch Untersuchungen zu deren biologischer Funktion ermöglicht werden. Verbindungen wie Myriocin oder 1-Phenyl-2-decanoylamino-3-morpholinylpropan-1-ol (PDMP) haben auch als Werkzeuge zur Untersuchung des Zellzyklus Bedeutung erlangt.<sup>[103]</sup>

Membrangängige Inhibitoren der Sphingolipid-Biosynthese sind als Wirkstoffe ebenfalls interessant.<sup>[100]</sup> So ist Myriocin, ein Inhibitor der Serin-Palmitoyltransferase, eines der potentesten Immunsuppressiva.<sup>[42]</sup> Da die Kohlenhydratstrukturen der Glycolipide Bindungsstellen für Bakterien, Viren und Toxine bilden (Abschnitt 2), besteht prinzipiell die Möglich-

keit, durch Hemmung ihrer Synthese präventiv gegen Krankheiten vorzugehen, die durch diese Pathogene verursacht werden. Eine Alternative dazu bietet die Hemmung der Biosynthese von Sialinsäure, einem häufigen Bestandteil der Erkennungsstellen. Auch die Metastasierung von Krebs könnte dadurch günstig beeinflusst werden.<sup>[104]</sup> Neben der Sphingolipid-Biosynthese des Wirtes kann auch die der Parasiten gehemmt werden, sofern diese Sphingolipide zum Überleben oder zur Vermehrung benötigen. Dieser Ansatz wurde als neuartiges Prinzip zur Behandlung von Pilzinfektionen<sup>[100, 105]</sup> und Malaria vorgeschlagen.<sup>[106, 107]</sup>

Von besonderer Bedeutung ist die Hemmung der Biosynthese auch für die Behandlung von Sphingolipidosen (Abschnitt 6.14.3), wie von Radin postuliert<sup>[108]</sup> und durch Platt et al.<sup>[431]</sup> experimentell nachgewiesen werden konnte (Abschnitt 6.14.3). Mit geeigneten Inhibitoren könnte auch die Funktion der lateralen Aggregation von Sphingolipiden in Zellmembranen analysiert werden. Diese führt zur Bildung von Mikrodomänen,<sup>[109]</sup> die unter anderem für den intrazellulären Transport GPI-verankerter Proteine verantwortlich gemacht werden (GPI = Glycosylphosphatidylinosit).<sup>[110]</sup>

#### 4.1. Inhibitoren der Serin-Palmitoyltransferase

Die SPT wird durch Suizidinhibitoren PLP-abhängiger Enzyme gehemmt (Abbildung 11), die gegen die Serinbindungsstelle gerichtet sind. Dazu gehören L-Cycloserin<sup>[111, 112]</sup> sowie  $\beta$ -Chlor- und  $\beta$ -Fluoralanin.<sup>[113]</sup> Die besonders hohen SPT-Aktivitäten in humanen Keratinocyten werden durch L-Cycloserin und  $\beta$ -Chloralanin mit  $IC_{50}$ -Werten von  $3.0 \mu M$  bzw.  $25 \mu M$  gehemmt.<sup>[114]</sup>

Die Sphingofungine sind den Sphingolipiden strukturell ähnlich und wurden als Substanzen mit fungizider, aber ohne antibakterielle Aktivität aus einer Kultur von *Aspergillus fumigatus* isoliert. Sphingofungin B verringert den Einbau von [ $^3H$ ]Inosit in die Sphingolipide der Hefe ( $IC_{50} = 8 nM$ ).<sup>[115]</sup> Dies führt zu Wachstumshemmung und Zelltod. Die Wirkung von Sphingofungin kann durch Phytosphingosin, nicht aber durch Sphingosin aufgehoben werden. Dies ist zu erwarten, da Sphingolipide der Hefe Phytosphingosin statt Sphingosin als häufigste langkettige Base enthalten. Sphingofungine hemmen die SPT kompetitiv bezogen auf Serin.<sup>[115]</sup> Die Sphingofungine E und F wurden aus *Paecilomyces variotii* isoliert.<sup>[116]</sup>

Ein weiteres strukturelles Analogon des Sphingoid-Rückgrats ist das Myriocin. Es hemmt die Biosynthese von Ceramid und die der beiden häufigsten GSL in Hefe, Inositolphosphorylceramid (IPC) und Mannosyl-IPC (MIPC).<sup>[117]</sup> Gleichzeitig verringert es die Transportgeschwindigkeit GPI-verankerter Proteine zum Golgi-Apparat und die Remodellierungsreaktion des GPI-Ankers zu ceramidhaltigen Strukturen. Der SPT-Inhibitor Myriocin ist ein äußerst potentes Immunsuppressivum, von dem sich herausstellte, daß es mit den Antibiotika ISP-1 und Thermozytocidin identisch ist. Im Unterschied zu den häufig angewandten Immunsuppressiva Cyclosporin und FK-506 greift ISP-1 nicht in die Bildung von Interleukin-2 ein, sondern unterdrückt das IL-2-abhängige Wachstum einer cytotoxischen T-Lymphocy-

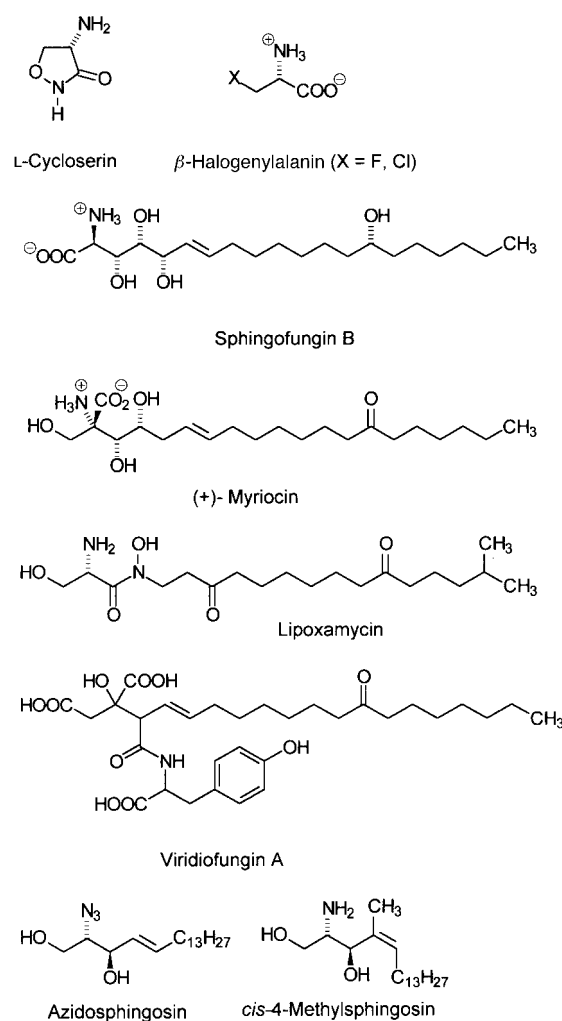


Abbildung 11. Inhibitoren der Serin-Palmitoyltransferase (SPT).

ten-Zelllinie der Maus, CTLL-2. Die SPT dieser Zellen wird in vitro auf nichtkompetitive Weise mit einer apparenten Hemmkonstante von  $0.28 nM$  gehemmt.<sup>[42]</sup> Die Hemmung der SPT wird von einer Unterdrückung des T-Zell-Wachstums begleitet, die durch Gabe von  $C_2$ -Ceramid, Sphingarin oder Sphingosin-1-phosphat, nicht aber von Sphingomyelin, GlcCer, GalCer oder GM3 wieder aufgehoben werden kann. Es wird angenommen, daß Myriocin in den CTLL-2-Zellen den programmierten Zelltod (Apoptose) auslöst.<sup>[118]</sup> Ein Sekundärmetabolit aus Actinomyceten, Lipoxamycin, wird ebenfalls als potenter Inhibitor der SPT beschrieben ( $IC_{50} = 21 nM$ ).<sup>[119]</sup> Bemerkenswert sind seine hohe Toxizität gegenüber Mäusen und seine fungiziden Eigenschaften, die durch Gabe von Sphingarin und Phytosphingosin aufgehoben werden können. Weiterhin erwies sich der antifungizide Wirkstoff Viridifungin, zuvor als ein Hemmstoff der Squallensynthese in vitro bekannt, als Inhibitor der SPT.<sup>[120]</sup>

Andere Wirkstoffe setzen die SPT-Aktivität in kultivierten Zellen herab, ohne aber das Enzym direkt zu hemmen. Dazu gehören D-erythro-Sphingosin und das metabolisch stabile D-erythro-Azidosphingosin, das entweder mit der natürlichen trans- oder der unnatürlichen cis-Doppelbindung die SPT-Aktivität in primär kultivierten Nervenzellen verringert.<sup>[121]</sup> Auch das synthetische 4-Methylderivat von cis-Sphingosin

senkt die Aktivität der SPT ( $IC_{50}=10\mu M$ ), bewirkt eine Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration und verhält sich als potentes Mitogen in Swiss-3T3-Fibroblasten. Außerdem induziert die Verbindung drastische morphologische Veränderungen der Zellen und leitet den Zelltod ein. Sowohl die *cis*-konfigurierte Doppelbindung als auch die 4-Methylgruppe sind für die Wirkung erforderlich, da die entsprechenden *trans*- und 5-Methylsterivate unwirksam sind. Alle Daten weisen darauf hin, daß die eigentlich wirksame Substanz ein Metabolit von *cis*-4-Methylsphingosin ist, nämlich dessen 1-Phosphat. Sphingosin-1-phosphat wird schnell durch eine Lyase abgebaut (Abschnitt 5.2); das *cis*-4-Methylsphingosin ist offensichtlich ein Prodrug für ein metabolisch stabiles Analogon von Sphingosin-1-phosphat.<sup>[122]</sup>

## 4.2. Inhibitoren der Sphingarin-N-Acyltransferase

*Fusarium moniliforme* ist ein Pilz, der häufig Mais- und Getreidepflanzen befällt. Der Verzehr von derart kontaminierten landwirtschaftlichen Produkten führt bei Tieren zu verschiedenen, oft neurologischen Erkrankungen und wurde beim Menschen mit dem Auftreten von Speiseröhrenkrebs in Verbindung gebracht.<sup>[123–125]</sup> Als aktive Verbindungen wurden die Fumonisin, Mycotoxine aus *F. moniliforme*, isoliert (Abbildung 12). Fumonisin B1 (FB1) und B2 (dem die 10-Hydroxygruppe von FB1 fehlt) wurden als Inhibitoren der Sphingarin-N-Acyltransferase mit  $IC_{50}$ -Werten um  $0.1\mu M$  identifiziert.<sup>[126, 127]</sup> Es sind strukturelle Analoga der Sphingoidbasen, wobei den Fumonisin die 1-Hydroxygruppe fehlt. Dies trägt zur metabolischen Stabilität dieser Mycotoxine bei, da langkettige Basen nach Phosphorylierung der 1-Position gespalten werden können. Die Tricarballdsäurereste und die 5-OH-Gruppe sind wichtig, aber nicht entscheidend für die Inhibierung. Fumonisin B3, dem die 5-OH-Gruppe fehlt, ist zwar noch aktiv, aber nur in Konzentrationen oberhalb von  $1\mu M$ . Ein vergleichbarer Wert gilt für Fumonisin B1H, das durch Abspaltung der Tricarballdsäurereste unter milden basischen Bedingungen hergestellt wird. Verschiedene Fumonisin-Analoga wurden synthetisiert und erwiesen sich als Substrate und Inhibitoren der Acyltransferase ( $IC_{50}$  ca.  $10\mu M$ ). Auch das *N*-Palmitoylderivat eines derartigen Aminopentols hemmt die Acyltransferase ( $IC_{50}=9\mu M$ ) und ist cytotoxisch. Im Unterschied zu anderen 1-Desoxysphingarin-Derivaten wird Fumonisin B1 in vitro durch die Acyltransferase nicht acyliert.<sup>[128]</sup> Die Hemmung der Ceramidbildung durch Fumonisin wird von einer Akkumulation der biosynthetischen Vorstufe Sphingarin begleitet. Sphingarin könnte für einige der von den Fumonisin hervorgerufenen Effekte verantwortlich sein, da es schon in geringen Konzentrationen toxisch und mitogen wirken kann. Das Verhältnis von Sphingarin zu Sphingosin im Serum von Tieren gilt als ein empfindlicher diagnostischer Indikator für die Aufnahme Fumonisin-kontaminierter Nahrung.

Alternaria-Toxin (Abbildung 12) ist ein Phytotoxin mit struktureller Ähnlichkeit zum Sphingoid-Rückgrat. Es hemmt die Sphingolipid-Biosynthese auf der Stufe der Dihydroceramidbildung ( $IC_{50}=1\mu M$ ), ist aber wegen seiner verglichen mit der des Fumonisin geringeren Wirksamkeit und seiner

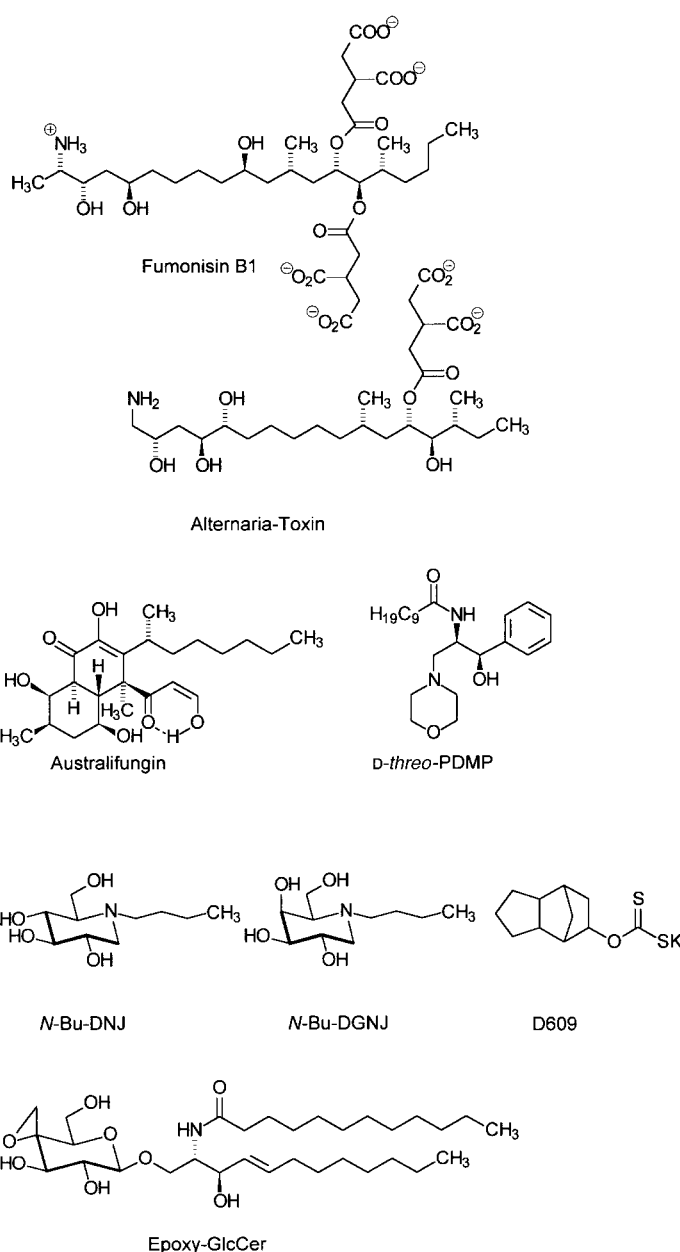


Abbildung 12. Weitere Inhibitoren der GSL-Biosynthese. Die absolute Konfiguration der Tricarballdsäurereste in Fumonisin B1 und Alternaria-Toxin ist nicht dargestellt.

erhöhten Cytotoxizität von begrenztem Nutzen für Experimente in Säugerzellkulturen.<sup>[129]</sup> Auch der Pilzmetabolit Australifungin wurde als In-vitro-Inhibitor der Sphingarin-N-Acyltransferase beschrieben. Sein  $IC_{50}$ -Wert ist noch geringer oder genauso groß wie der von Fumonisin B1, je nachdem, welcher Zelltyp als Enzymquelle verwendet wird.<sup>[130]</sup> Australifungin ist ein potentes Fungizid und hat keine Ähnlichkeit mit Sphingoidbasen.

## 4.3. Inhibitoren von Glycosyltransferasen

Nach der Bildung des Membranankers folgt die Einführung von Kohlenhydratstrukturen in die GSL. Anders als bei den meisten anderen Glycosyltransferase-katalysierten Reaktio-

nen<sup>[131]</sup> gehören die frühen Glycosylierungsschritte am Ceramid zu den wenigen Fällen, für die Hemmstoffe verfügbar sind. Eine Hemmung der Ceramid-Biosynthese selbst ist zur Analyse von GSL-Funktionen ungeeignet, da sie mehrere Konsequenzen hat: einmal eine Verarmung der Plasmamembran an GSL, zum anderen eine Verminderung der Sphingomyelin-Biosynthese sowie eine Erhöhung der Konzentration der stromaufwärts des gehemmten Schritts liegenden Metabolite. Zur Funktionsanalyse geeignet sind potente und spezifische Inhibitoren der GlcCer-Biosynthese; zwei Verbindungsklassen wurden bislang als solche beschrieben.<sup>[132]</sup> *D-threo*-PDMP (*D-threo*-(1*R*,2*R*)-1-Phenyl-2-decanoylamino-3-morpholinylpropan-1-ol, Abbildung 12) ist das am gründlichsten untersuchte Beispiel einer Reihe von Inhibitoren der GlcCer-Synthase mit ceramidanaloger Struktur. *D-threo*-PDMP hemmt die Bildung von Glucosylceramid in Konzentrationen von 2.5 bis 10  $\mu\text{M}$  und wurde bereits für Funktionsstudien verwendet.<sup>[133]</sup>

Bezogen auf Ceramid erweist sich *D-threo*-PDMP als ein gemischter Hemmtyp und ist nichtkompetitiv für den Glycosyldonor. Der apparente  $K_i$ -Wert beträgt 0.7  $\mu\text{M}$ . Bei Konzentrationen oberhalb von 25  $\mu\text{M}$  werden auch die Biosynthese von Sphingomyelin und der Transport sekretorischer Proteine gehemmt.<sup>[134]</sup> Stereoisomere und Analoga von PDMP wurden synthetisiert und untersucht, darunter *D-threo*-1-Morpholinyl-1-desoxyceramid (73 % Hemmung der GlcCer-Synthase in Madin-Darby-canine-kidney(MDCK)-Zellen bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  verglichen mit 20 % Inhibierung durch *D-threo*-PDMP).<sup>[135]</sup> Konzentrationen von mehr als 100  $\mu\text{M}$  *D-threo*-PDMP oder 10  $\mu\text{M}$  seines Palmitoylderivats PPMP sind für HL-60-Zellen toxisch. *D-threo*-PDMP bewirkt vielfältige zelluläre Effekte, unter anderem eine Hemmung des Zellwachstums, die möglicherweise auf einer Ceramidakkumulation und/oder einer Hemmung der Sphingomyelin-Biosynthese beruht. Das Anhalten des Zellzyklus in der G1/S- und G2/M-Phase durch PDMP scheint ebenfalls auf die intrazelluläre Ceramidakkumulation zurückzugehen.<sup>[136]</sup> Verschiedene andere Effekte von PDMP, seiner Stereoisomere und Analoga wurden zusammengefaßt.<sup>[133]</sup> Es wird durch Cytochrom P450 metabolisiert.<sup>[137]</sup> Ein weiterer Effekt, der nicht auf die Modulation des Sphingolipid-Stoffwechsels zurückzuführen ist, betrifft den Brefeldin-A-induzierten Membrantransport vom Golgi-Apparat zum ER, der von PDMP blockiert wird.<sup>[138]</sup>

Ein synthetisches Derivat des natürlich vorkommenden Glycosidase-Inhibitors Desoxynojirimycin, *N*-Butyl-desoxynojirimycin (*N*-Bu-DNJ, Abbildung 12), hemmt die GlcCer-Bildung mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 20  $\mu\text{M}$ . *N*-Bu-DNJ ist als Inhibitor der HIV-Replikation in vitro bekannt und wirkt offenbar als Inhibitor der Prozessierung viraler Glycoproteine. *N*-Butyl-desoxygalactonojirimycin (*N*-Bu-DGNJ) ist eine verwandte Verbindung mit verbesserter Selektivität ( $\text{IC}_{50}$  = 40  $\mu\text{M}$ ).<sup>[139]</sup> Glycosidasen wie  $\beta$ -Gluco- und  $\beta$ -Galactocerebrosidase sowie  $\alpha$ -Glucosidase I und II werden durch die Verbindung entweder gar nicht oder nur schwach gehemmt. Untersuchungen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen ergaben, daß eine Alkylkette mit drei C-Atomen für die Hemmung der GlcCer-Synthase erforderlich ist, aber Alkylketten mit vier oder sechs C-Atomen optimal wirken. Längerkettige

Verbindungen hemmen in vitro zwar noch besser, haben aber cytotoxische Eigenschaften in vivo. Die entsprechenden Derivate von Mannose, Fucose und *N*-Acetylglucosamin sind inaktiv. Ein großer Vorteil dieser Verbindungen ist ihre geringe Toxizität und hohe metabolische Stabilität. Eine Anwendung von *N*-Butyl-desoxynojirimycin zur Behandlung von Sphingolipid-Speicherkrankheiten zeichnet sich ab und wird im Zusammenhang mit neueren Therapieansätzen in Abschnitt 6.14.3 diskutiert.

#### 4.4. Inhibierung der LacCer-Synthase

Ein synthetisches GlcCer-Derivat mit einer zusätzlichen Epoxidfunktion in der 4-Position des Glucoserestes bewirkt eine irreversible und konzentrationsabhängige Abnahme der LacCer-Synthase-Aktivität in kultivierten Zellen.<sup>[140]</sup> In primär kultivierten Nervenzellen von Hühnerembryonen ist die biosynthetische Markierung von GSL stromabwärts von GlcCer verringert, während die Markierung in GlcCer akkumuliert. Das Derivat mit *gluco*-Konfiguration ist aktiv, hingegen zeigt die Verbindung mit *galacto*-Konfiguration keinen Effekt. Die Hemmung der LacCer-Bildung durch die Epoxyverbindung ist in vitro weniger ausgeprägt: Eine Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  ist erforderlich, um 30 % Hemmung der Enzymaktivität zu erreichen. Es kann deswegen nicht ausgeschlossen werden, daß die in vivo registrierten Effekte auf die Hemmung eines GlcCer-Translokators oder eines Transkriptionsfaktors zurückzuführen sind.

#### 4.5. Inhibitoren der Inositphosphorylceramid-Synthase

Während in Wirbeltieren ein großer Teil der Sphingolipide in Form von GSL vorliegt, überwiegen in Pilzen Verbindungen, in denen ein Inositrest über einen Phosphorsäurediester an Ceramid gebunden ist. Wird deren Biosynthese gehemmt, so verarmen die Organismen an Verbindungen, die offensichtlich essentielle Funktionen für das Überleben erfüllen.<sup>[100, 145]</sup> Möglicherweise sind Sphingolipide in Pilzen die einzige Speicherform für sehr lange Fettsäuren, die für das Überleben dieser Organismen erforderlich sind.<sup>[141]</sup> Durch die Hemmung der IPC-Synthase akkumulieren Ceramide, die zumindest in Hefe zum Anhalten des Zellzyklus in der G1-Phase führen können.<sup>[142]</sup> So hemmt z.B. der Pilzhaltstoff Khafrefungin (Abbildung 13) die Biosynthese von IPC in *Saccharomyces cerevisiae* und in pathogenen Pilzen bereits in picomolaren und nanomolaren Konzentrationen und bewirkt eine Ceramid-Akkumulation.<sup>[143]</sup> In vitro wird die IPC-Synthase mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 0.6 nM inhibiert und der Einbau von Inosit in die Sphingolipide mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 150 nM. Im Unterschied zu den anderen Inhibitoren, die die entsprechenden Enzyme in Pilz und Säuger im gleichen Umfang hemmen, wird die Sphingolipid-Biosynthese in Säugern durch Khafrefungin nicht beeinträchtigt.

Auch der antifungische Wirkstoff Aureobasidin A hemmt die Biosynthese von IPC; sein  $\text{IC}_{50}$ -Wert beträgt 0.2 nM.<sup>[105]</sup> In mikromolaren Konzentrationen hemmt Aureobasidin auch

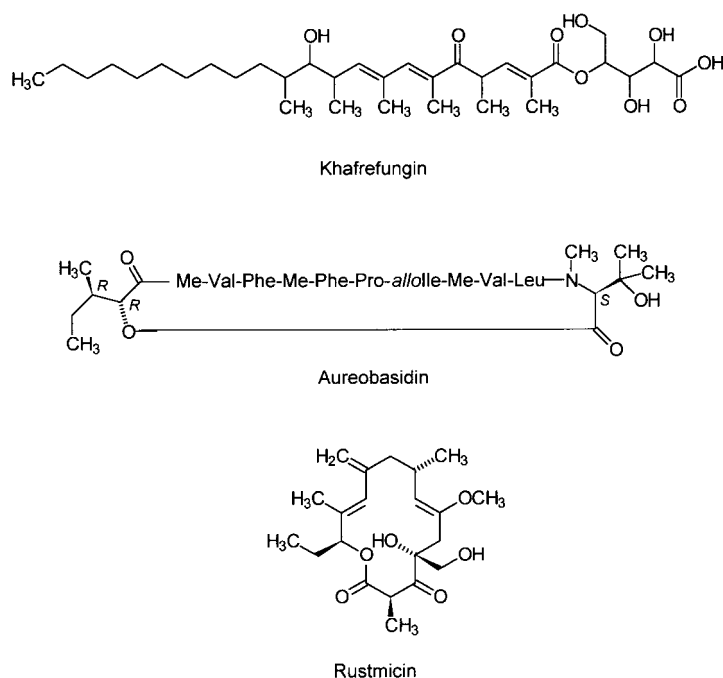


Abbildung 13. Inhibitoren der Inositolphosphorylceramid-Bildung.

die Transferase, die Phosphorylinosit auf Mannosyl-Inositolphosphorylceramid überträgt.<sup>[144]</sup> Ein weiterer, kürzlich beschriebener Inhibitor der IPC-Synthase ist das Makrolid Rustmicin,<sup>[145]</sup> das seit längerem als potentes Fungizid auch unter dem Namen Galbonolide A bekannt ist. Es hemmt das Enzym mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 70  $\mu$ M. Die Eignung der Verbindung zur Behandlung systemischer Pilzinfektionen wird durch ihre metabolische und chemische Instabilität sowie durch Resistenzphänomene begrenzt.<sup>[145]</sup>

#### 4.6. Verschiedenes

Auch D,L- $\alpha$ -Fluorpalmitinsäure hemmt die Biosynthese von Sphingolipiden.<sup>[146]</sup> Kürzlich konnte in einer Studie nachgewiesen werden,<sup>[147]</sup> daß Azidothymidin (AZT), das als Chemotherapeutikum bei der Behandlung von HIV-Infektionen verwendet wird, die Glycosylierung von Glycolipiden und Glycoproteinen in klinisch relevanten Konzentrationen von 1–5  $\mu$ M inhibiert. Der primäre zelluläre Metabolit von AZT, das Monophosphat, hemmt möglicherweise die Aufnahme von Nucleotidzuckern in den Golgi-Apparat und verringert auf diesem Weg den Anteil komplexer saurer GSL. Toxische Nebenwirkungen von AZT, insbesondere bei der Reifung von Blutzellen, scheinen eine Folge der veränderten Glycosylierungsmuster zu sein und nicht auf einer Hemmung der DNA-Replikation zu beruhen.

Antisense-Oligodesoxynucleotide zur GM2- und GD3-Synthase führen zur Abnahme komplexer GSL stromabwärts von GM3 innerhalb des Biosyntheseweges. Die Behandlung der menschlichen Leukämie-Zelllinie HL-60 mit Antisense-DNA bewirkt deren Differenzierung in Monocyten und die Akkumulation von GM3.<sup>[148]</sup> Da geeignete niedermolekulare Inhibitoren für Glycosyltransferasen heute nicht verfügbar

sind, stellt dieser Zugang ein vielversprechendes Werkzeug zur Aufklärung der GSL-Funktion dar.

Die Sphingomyelin-Synthase wird in vitro durch das Xanthogenat D609 (Abbildung 12) gehemmt.<sup>[149]</sup> Die Verbindung ist seit längerem als Inhibitor einer Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase-C-Aktivität bekannt.<sup>[150]</sup> Konzentrationen im Bereich von 40 bis 400  $\mu$ M hemmen auch die Sphingomyelinbildung in transformierten Fibroblasten.<sup>[149]</sup>

## 5. Sphingolipid-Katabolismus

### 5.1. Nichtlysosomal Abbau: Sphingolipide und Signaltransduktion

Der konstitutive Sphingolipid-Abbau erfolgt in den Lysosomen der Zelle. Daneben existiert ausgehend vom Sphingomyelin ein streng regulierter Abbauweg, in dessen Verlauf Signalmoleküle freigesetzt werden (Abbildung 14).<sup>[8]</sup> Sphingomyelin kann durch Sphingomyelinasen (die saure Sphingomyelinase (Abschnitt 6.6) und eine neutrale Sphingomyelinase wurden kloniert)<sup>[153]</sup> gespalten werden.<sup>[151, 152]</sup> Bei dieser Abbaureaktion wird Ceramid gebildet, das durch Ceramidasen unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation in Sphingosin und eine langkettige Fettsäure zerlegt werden kann (Abschnitt 6.10).<sup>[154]</sup> Es besteht auch die Möglichkeit der Phosphorylierung zu Ceramid-1-phosphat.<sup>[155]</sup> Sphingosin seinerseits kann durch eine cytosolische Sphingosinkinase an der 1-OH-Funktion phosphoryliert werden,<sup>[156, 157]</sup> wobei Sphingosin-1-phosphat entsteht. Dieses wird – wie auch die 1-Phosphate von D-erythro-Sphingarin und D-ribo-Phytosphingosin – von der Sphingosin-1-phosphat-Lyase, die auf der cytosolischen Seite der ER-Membran lokalisiert ist, in einer Pyridoxalphosphat-abhängigen Reaktion gespalten.<sup>[158]</sup> Der Mechanismus der Spaltung entspricht formal einer Retroaldoladdition. Das Gen der Lyase wurde unter anderem aus Hefe<sup>[159]</sup> und Maus<sup>[160]</sup> charakterisiert. Neben dem Abbau von Sphingoid-1-phosphaten ist auch die Phosphatase-Reaktion zurück zum Sphingosin untersucht worden.<sup>[161, 162]</sup> Eine Phosphatidsäure-Phosphohydrolase katalysiert die Hydrolyse von Sphingosin-1-phosphat, Ceramid-1-phosphat und Lyso-phosphatidsäure.<sup>[163]</sup>

Einige Befunde sprechen dafür, daß die Rolle von Ceramid derjenigen des strukturell ähnlichen, aber funktionell komplementären Diacylglycerins (DAG) entspricht. DAG wird zusammen mit Inosit-1,4,5-trisphosphat auf ein extrazelluläres Signal hin durch eine Phospholipase C aus Phosphatidyl-inosit-4,5-bisphosphat als Signalmolekül freigesetzt.<sup>[164]</sup> Die Beobachtung, daß auch die Hydrolyse von Sphingomyelin durch extrazelluläre Agentien in verschiedenen Zelltypen wie Lymphocyten, Myelocyten oder Fibroblasten induziert werden kann, hat zur Entdeckung des sogenannten Sphingomyelin-Zyklus (Abbildung 15) geführt.<sup>[165, 166]</sup> Den ersten Hinweis lieferte die Vitamin-D<sub>3</sub>-induzierte Spaltung von Sphingomyelin in HL-60-Zellen.<sup>[167]</sup> Auch der Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ ,  $\gamma$ -Interferon oder Interleukin-1, die auf Rezeptoren innerhalb der Plasmamembran wirken, führen zur Freisetzung von Ceramid. Die zellulären und molekularen Effekte dieser extrazellulären Agentien wie Hemmung des Zellwachstums,

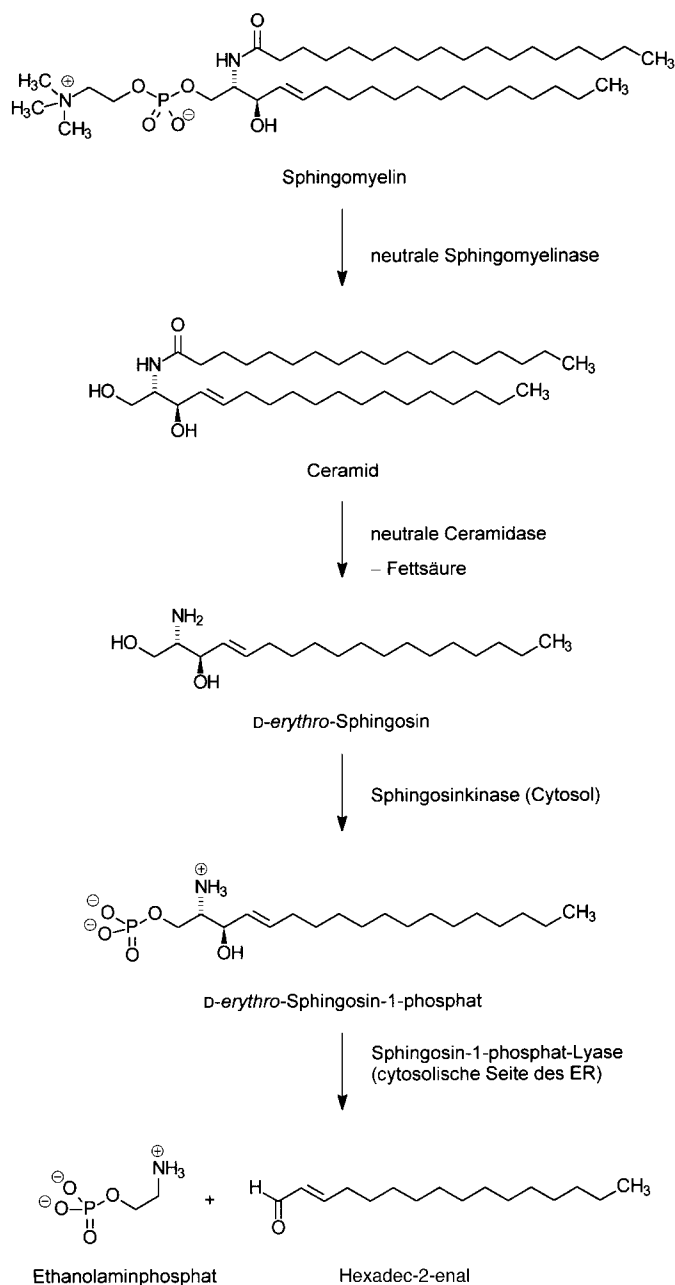


Abbildung 14. Nichtlysosomaler Sphingolipid-Abbau.

Einleitung von Differenzierung, Modulation von Proteinphosphorylierung und Regulation der Gentranskription können durch Gabe eines exogenen membrangängigen Ceramidderivats imitiert werden. Die Wirkungen dieses C<sub>2</sub>-Ceramids (*N*-Acetylsphingosin) werden mit der entsprechenden gesättigten Verbindung, C<sub>2</sub>-Dihydroceramid, nicht registriert.<sup>[168]</sup> Daraus läßt sich auf eine spezifische Wechselwirkung zwischen Ceramid und einem Bindungsprotein schließen. Die Identität der Ceramid-Rezeptoren und weiterer Proteine stromabwärts innerhalb des Signalfusses ist nicht zweifelsfrei bekannt. Eine ceramidabhängige Kinase,<sup>[169]</sup> eine Phosphatase<sup>[170]</sup> und ein Proteinkinase-C-Subtyp<sup>[171]</sup> werden gegenwärtig untersucht. Die Proteinkinase c-Raf wurde durch Photoaffinitätsmarkierung als Ceramidbindungsprotein innerhalb dieser Signalkette identifiziert (siehe Abschnitt 5.1.1).

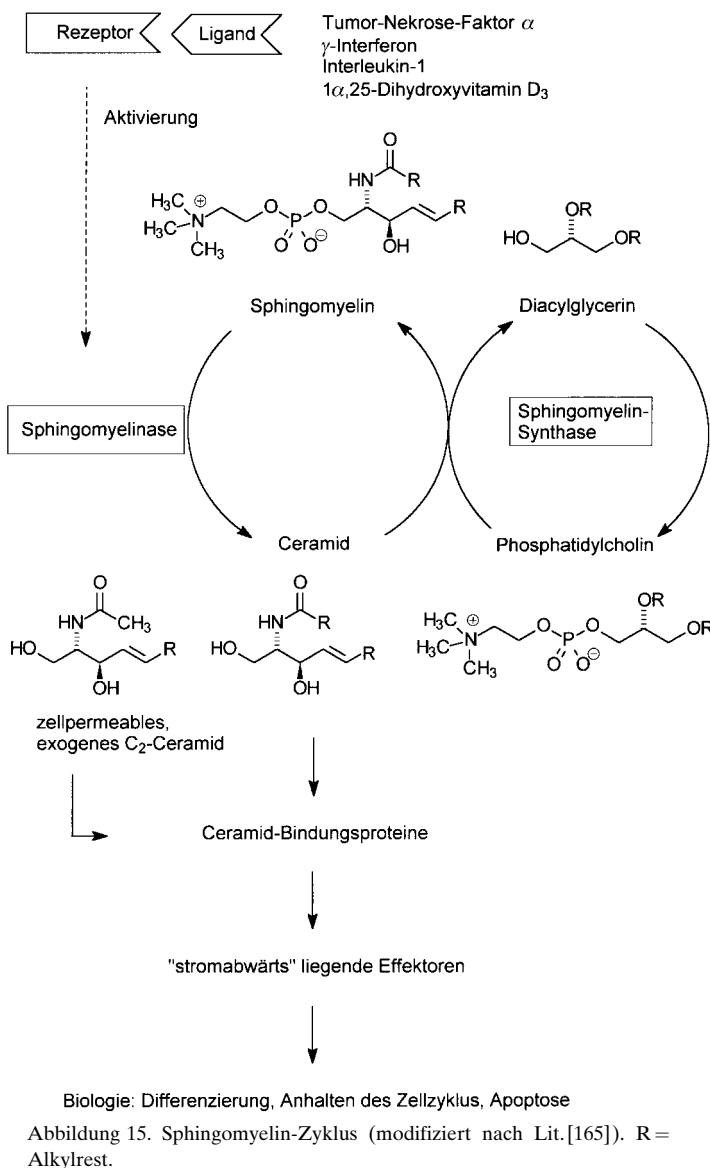


Abbildung 15. Sphingomyelin-Zyklus (modifiziert nach Lit.[165]). R = Alkylrest.

Im allgemeinen vermittelt Ceramid antimitogene Effekte wie Zelldifferenzierung, Anhalten des Zellzyklus und Zellalterung. Der spektakulärste der verschiedenen Effekte, die Ceramid auslösen kann, ist der programmierte Zelltod (Apoptose).<sup>[172]</sup> Der programmierte Zelltod ist im Gegensatz zur Nekrose ein wohldefinierter Prozeß, dessen biochemische Prinzipien heute erst zum Teil aufgeklärt sind.<sup>[173–175]</sup> Er ist durch rezeptorvermittelte Mechanismen kontrolliert, die ihrerseits intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren und damit den Phosphorylierungsstatus von Zielproteinen und letztlich die Genexpression beeinflussen. Ceramid ist kein sekundärer Botenstoff im engen Sinn, dessen Wirkung innerhalb kurzer Zeit terminiert wird. Stattdessen vermittelt es langanhaltende Antworten auf Streß.<sup>[20]</sup> Auch in Hefe scheinen Sphingolipide als Streßsignale zu fungieren.<sup>[176]</sup> Das Auslösen von Apoptose durch Ceramid kann durch Überexpression des Apoptose-Hemmers Bcl-2 verhindert werden.<sup>[177]</sup> Auch die Freisetzung von Ceramid selbst kann durch Bcl-2 unterdrückt werden.<sup>[178]</sup> Bemerkenswerterweise scheint für das Auslösen von Apoptose durch Ceramid in blutbildenden Zellen die Gegenwart



Calciumkanal-Antagonist SR33557 (Abbildung 17) wird als Inhibitor der sauren Sphingomyelinase-Aktivität beschrieben (72% Hemmung bei 30  $\mu\text{M}$  in einer Leukämiezelllinie der Maus, P388/ADR).<sup>[203]</sup> Mehrere Derivate von Sphingomyelin

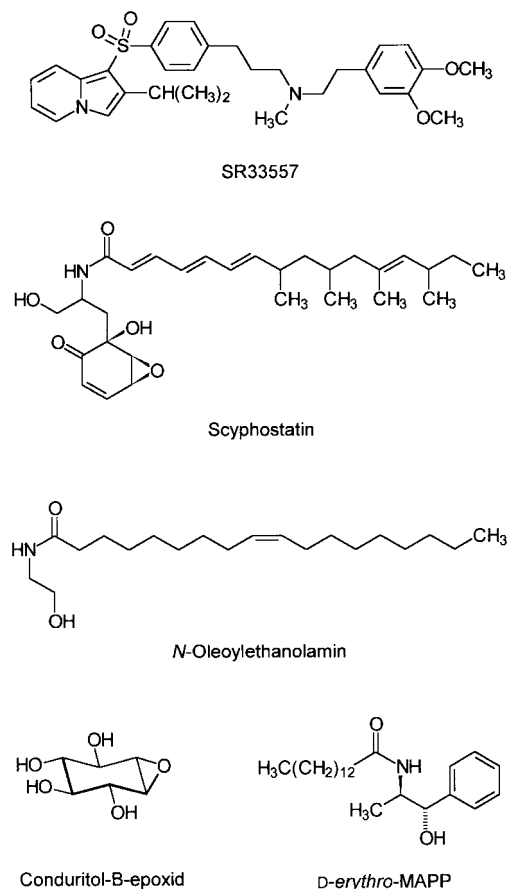


Abbildung 17. Inhibitoren des Sphingolipid-Abbaus.

(3-Desoxy-, 3-*O*-Methyl-, ( $IC_{50}=50\mu M$ ), 3-*O*-Ethyl-, 3-*O*-Tetrahydropyranyl- und *N*-Demethylsphingomyelin) sind synthetisiert und untersucht worden. Sie inhibieren die neutrale und die saure Sphingomyelinase nur wenig.<sup>[204]</sup> Als Affinitätsligand zur Reinigung von Sphingomyelinasen wurde ein Phosphonatanalogon von Sphingomyelin synthetisiert.<sup>[205]</sup> Das Gangliosid GM3 hemmt die neutrale Sphingomyelinase mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $45\mu M$ .<sup>[206]</sup> Auch Glutathion ist ein Inhibitor der neutralen Sphingomyelinase (95 % Hemmung bei einer Konzentration von 5 mM).<sup>[207]</sup> Als Inhibitor von neutraler ( $IC_{50}=1\mu M$ ) und von saurer Sphingomyelinase ( $IC_{50}=49\mu M$ ) wurde kürzlich Scyphostatin, ein Inhaltsstoff aus *Dasyscyphus mollissimus*, beschrieben.<sup>[208]</sup> Damit steht eine interessante Leitstruktur für die Optimierung zur Verfügung.

### 5.2.2. Ceramidase-Inhibitoren

Da durch die verschiedenen Ceramidase-Aktivitäten die Signalmoleküle Ceramid und Sphingosin/Sphingosin-1-phosphat im Gleichgewicht stehen, sind Ceramidase-Inhibitoren als Werkzeuge zur Untersuchung von Signaltransduktionsmechanismen von Interesse. *N*-Oleoyl ethanolamin wird als

Ceramidase-Inhibitor beschrieben,<sup>[209]</sup> und (1*S*,2*R*)-D-*erythro*-2-Myristoylamino-1-phenylpropan-1-ol (MAPP) ist ein potenter Inhibitor der alkalischen Ceramidase mit einem IC<sub>50</sub>-Wert im unteren mikromolaren Bereich.<sup>[210]</sup>

### 5.2.3. Inhibitoren der Sphingosinkinase

Sphingolipide mit *threo*-Konfiguration sind in der Lage, die Sphingosinkinase zu hemmen.<sup>[211]</sup> Da diese Verbindungen über Acylierung des Aminstickstoffatoms sowie Phosphorylierung in 1-Stellung metabolisiert werden können, sind sie nur von begrenztem Nutzen. Anders verhält es sich mit *N,N*-Dimethylsphingosin, einem Hemmstoff der Sphingosinkinase in Blutplättchen ( $IC_{50} = 5 \mu M$ ).<sup>[212]</sup> Die Verbindung kann in aktivierten Blutplättchen phosphoryliert werden;<sup>[213]</sup> das daraus resultierende 1-Phosphat ist ein funktioneller Agonist des Sphingosin-1-phosphat-Rezeptors.<sup>[214]</sup>

Neben Inhibitoren des Sphingolipid-Abbaus haben wir auch einen Stimulator entdeckt: 1-Methylsulfanyldihydroceramid reduziert in einer Konzentration von  $10\mu\text{M}$  scheinbar die De-novo-Synthese von Ceramid in primär kultivierten Nervenzellen um 90 %. Enzyme der Ceramid-Biosynthese werden durch diese Verbindung überraschenderweise nicht beeinflusst; hingegen stimuliert sie die Sphingosinkinase um den Faktor 2.5. Der Mechanismus der scheinbaren Biosynthese-Hemmung ist demzufolge ein beschleunigter Abbau von biosynthetischen Intermediaten wie Sphinganin und Sphingosin. Zugleich unterbricht die Verbindung das axonale Wachstum von kultivierten Hippocampus-Neuronen in vergleichbarer Weise wie direkte Inhibitoren der Sphingolipid-Biosynthese.<sup>[215]</sup> Ein weiterer Aktivator der Sphingosinkinase ist  $1\alpha,25\text{-Dihydroxy-Vitamin D}_3$ .<sup>[216]</sup>

#### 5.2.4. Inhibitoren der Sphingosin-1-phosphat-Lyase

Um die physiologische Funktion von Sphingosin-1-phosphat als sekundärem Botenstoff untersuchen zu können, werden metabolisch stabile Analoga oder Inhibitoren der Sphingosin-1-phosphat-Lyase benötigt. Als Prodrug eines metabolisch stabilen Sphingosin-1-phosphat-Analogons steht seit kurzem das *cis*-4-Methylsphingosin zur Verfügung (Abschnitt 4.1). Von Stoffel und Grol<sup>[217]</sup> wurde ein Desoxysphinganine-1-phosphonat beschrieben, das als kompetitiver Inhibitor dieses Enzyms wirkt ( $K_i = 5 \mu\text{M}$ ,  $K_M = 16 \mu\text{M}$ ). Diese äußerst toxische Verbindung wird zwar von der Lyase gespalten, aber um einen Faktor 10 langsamer als das natürliche Phosphat. Eine homologe, in der Kopfgruppe um ein Kohlenstoffatom verlängerte Verbindung wurde synthetisiert<sup>[218]</sup> und radiomarkiert.<sup>[219]</sup> Entsprechende Phosphorsäureamide<sup>[220]</sup> und das ungesättigte Phosphonat wurden ebenfalls hergestellt.<sup>[221]</sup> Diese Substanzen sind potentielle Liganden der Rezeptoren für Sphingosin-1-phosphat. Möglicherweise haben sie eine erhöhte metabolische Stabilität gegenüber der Spaltung durch Phosphatasen. Auch ein radiomarkiertes 2-Vinyldihydrosphingosin-1-phosphat, ein potentieller irreversibler Inhibitor der Lyase, wurde synthetisiert.<sup>[222]</sup>



### 5.3. Lysosomaler Sphingolipid-Abbau

Der konstitutive Abbau von GSL erfolgt in den sauren Kompartimenten der Zelle, den späten Endosomen und insbesondere in den Lysosomen.<sup>[223, 224]</sup> Dabei ist die Zusammensetzung der Sphingolipide, die von der Zelloberfläche in die Lysosomen gelangen, unterschiedlich und hängt vom Zelltyp ab. Die Plasmamembran von Nervenzellen ist reich an Gangliosiden, während Oligodendrocyten und Schwann'sche Zellen, die die Myelinhülle um die Axone von Nervenzellen bilden, besonders reich an Galactosylceramid und Sulfatid sind. In den verschiedenen Zelltypen visceraler Organe werden eher GSL der globo-Reihe angetroffen, etwa Globosid und Globotriaosylceramid. Hautzellen schließlich enthalten vorwiegend Ceramide und Glucosylceramide mit ungewöhnlich langen Fettsäureresten. Von GSL werden die einzelnen Zuckerreste sequentiell vom nichtreduzierenden Ende her abgespalten. Über niedrig glycosylierte Sphingolipide entsteht schließlich Ceramid, das zu Sphingosin und einer langkettigen Fettsäure abgebaut wird. Die freigesetzten Bausteine, Monosaccharide, Fettsäuren und Sphingoid-Basen, sind in der Lage, das Lysosom zu verlassen. Fällt aufgrund eines erblichen Defekts die Funktion eines der am Abbau beteiligten Proteine aus, kommt es zur Akkumulation nicht mehr abbaubarer Lipidsubstrate im Lysosom. Im Unterschied zu den wasserlöslichen Oligosacchariden der Glycoproteine handelt es sich dabei um schwerlösliche Amphiphile, die nicht abtransportiert werden können, sondern innerhalb der Lysosomen schwerlösliche Aggregate bilden.

### 5.4. Topologie der Endocytose

Damit die GSL der Zelloberfläche intrazellulär abgebaut werden können, müssen sie zu den Lysosomen transportiert werden. Bausteine und Fragmente der Plasmamembran können die Lysosomen durch Endocytose erreichen.<sup>[225]</sup> Dabei werden Bereiche der Plasmamembran als Stachelsaumgrübchen (coated pits) zu intrazellulären Vesikeln abgeschnürt, die mit frühen Endosomen verschmelzen können. Aus ehemaligen Bereichen der Plasmamembran werden so Bestandteile der endosomalen Membranen. Durch einen solchen Vesikelfluß erreichen die Bausteine der Plasmamembran demzufolge die Lysosomen als Bausteine der lysosomalen Membran (Abbildung 18A). Im Anschluß muß der Abbau der Lipide selektiv innerhalb der lysosomalen Membran erfolgen, ohne deren Integrität zu beeinträchtigen. Es gibt keine plausible Vorstellung davon, wie das geschehen soll, insbesondere da die lysosomale Membran auf ihrer Innenseite von einer Schicht von Kohlenhydraten geschützt ist, die überwiegend aus Lactosaminstrukturen besteht. Diese Glycocalix wird von Glycoproteinen gebildet, den sogenannten „limps“ (lysosomal integral membrane proteins) und „lamps“ (lysosomal associated membrane proteins), die Bestandteile der lysosomalen Membran sind.<sup>[226]</sup>

Wir haben ein alternatives Modell vorgeschlagen (Abbildung 18B), wonach Bausteine der Plasmamembran den intrazellulären Verdauungsapparat auch als Bestandteile intraendosomaler bzw. intralysosomaler Vesikel und Mem-

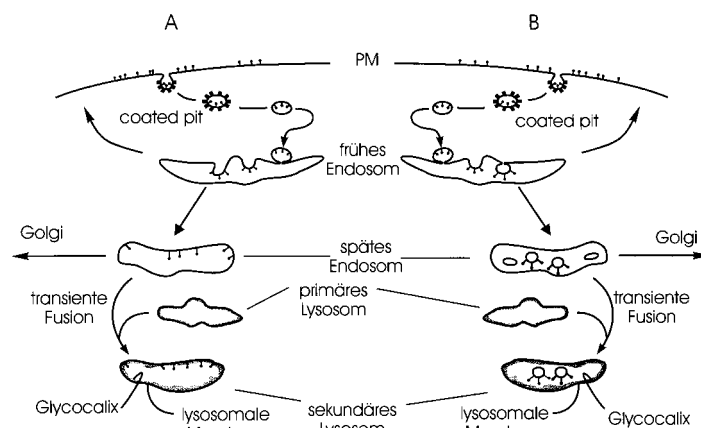


Abbildung 18. Modelle der Endocytose und der lysosomalen Verdauung von GSL der Plasmamembran.<sup>[228]</sup> a) Konventionelles Modell: Der Abbau von GSL der Plasmamembran erfolgt selektiv innerhalb der lysosomalen Membran. b) Unser alternatives Modell: Während der Endocytose werden GSL der Plasmamembran in Membranen intraendosomaler Vesikel (multivesikulierter Körperchen) integriert. Die Vesikel gelangen in das lysosomale Kompartiment, wenn späte Endosomen mit primären Lysosomen transient fusionieren, und werden dort abgebaut. PM = Plasmamembran; .... GSL.

branen erreichen können.<sup>[227]</sup> Diese könnten durch Einstülpfen und Abschnüren bestimmter Bereiche der endosomalen Membranen gebildet werden, die besonders reich an ehemaligen Bausteinen der Plasmamembran sind. Über bekannte Fusionsprozesse zwischen den späten Endosomen und den frühen Lysosomen könnten die so gebildeten intraendosomalen Vesikel in das Lumen, also in den Innenraum der Lysosomen, gelangen und so den Verdauungsproteinen ausgesetzt werden. Es gibt eine Reihe von Befunden, die dieses Modell stützen.<sup>[228, 229]</sup>

### 5.5. Mechanismen der lysosomalen Verdauung

Der lysosomale Abbau der einzelnen GSL erfolgt durch Exohydrolasen, die vom nichtreduzierenden Ende her die Zuckerreste der Glykokonjugate abspalten. Der GSL-Abbau beginnt daher an einer Phasengrenzfläche, vermutlich an der Oberfläche intralysosomaler Vesikel. Diese Vesikel werden sich von der Perimetermembran durch ihre Krümmung und ihre Lipidzusammensetzung unterscheiden und demzufolge auch durch den Lateraldruck, der auf ihrer Oberfläche herrscht. Diese Faktoren können den enzymatischen Abbau solcher Strukturen ganz erheblich beeinflussen.<sup>[230, 231]</sup> Bei den Hydrolasen, die den Glycolipid-Abbau katalysieren, handelt es sich um im Lysosol gelöste Enzyme. Ihre Substrate dagegen sind Lipide, die in membrangebundener Form vorliegen. Wie die Analyse von Erbkrankheiten des Sphingolipid-Abbaus im Labor von Jatzkewitz und in unserem Labor erkennen ließ, kann dies bei GSL mit kurzen Oligosaccharidketten dazu führen, daß die abzubauenen Lipide den Hydrolasen sterisch nicht mehr zugänglich sind. Dann reicht ein Zweikomponentensystem aus Lipid und Hydrolase für den GSL-Abbau in vivo nicht mehr aus, sondern es wird zusätzlich ein Aktivatorprotein benötigt. So wird der enzymatische Abbau des Gangliosids GM2 erst durch ein lysosomales Gangliosid-

Bindungsprotein, den GM2-Aktivator, ermöglicht.<sup>[246]</sup> Dieser wirkt wie ein schwaches Detergens und kann das membranständige Gangliosid GM2 oder Ganglioside ähnlicher Struktur in stöchiometrischen, wasserlöslichen Komplexen binden. Auf Membran- bzw. Vesikelloberflächen wirkt er offensichtlich als sogenannte „Liftase“, die membranständige Ganglioside erkennt, bindet und aus der Membranebene heraushebt, so daß diese den wasserlöslichen, abbauenden Enzymen, wie der Hexosaminidase A beim Menschen, als Substrate zugeführt werden können (Abbildung 19). Dabei kann

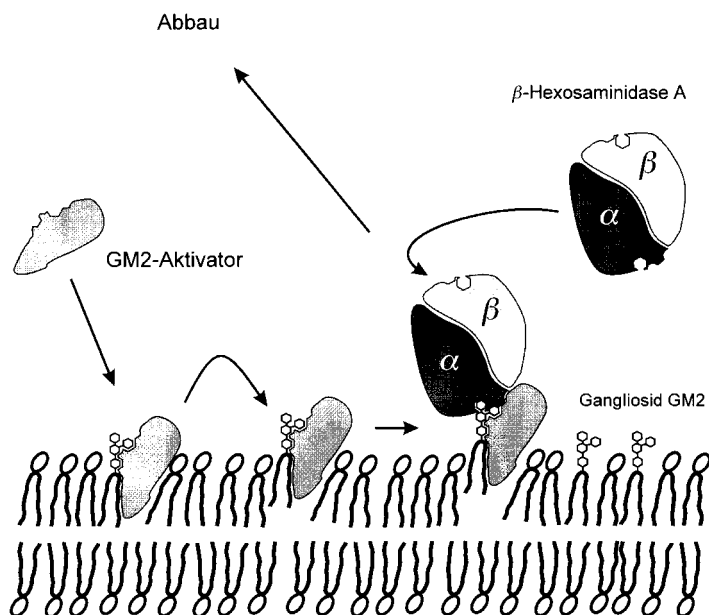


Abbildung 19. Modell für die GM2-Aktivator-stimulierte Hydrolyse des Gangliosids GM2 durch die menschliche Hexosaminidase A (modifiziert nach Lit. [227]). In Abwesenheit des GM2-Aktivators oder geeigneter Detergentien greift die wasserlösliche Hexosaminidase A membrangebundenes GM2 nicht an, aber sie spaltet Gangliosid-GM2-Analoga, die einen kurzkettigen oder gar keinen Fettsäurerest (Lysogangliosid GM2) enthalten. Diese sind weniger fest an die Lipiddoppelschicht gebunden und wasserlöslicher als GM2. Membrangebundenes GM2, z.B. das von intralysosomalen Vesikeln, wird aber nur in Gegenwart des GM2-Aktivators hydrolysiert. Der GM2-Aktivator bindet ein Molekül GM2 und hebt es aus der Membran heraus. Der Aktivator-Gangliosid-Komplex kann dann von der wasserlöslichen Hexosaminidase A erkannt und das Lipidsubstrat gespalten werden.

der Aktivator nur in solche Lipiddoppelschichten inserieren, deren Lateraldruck unter  $25 \text{ mN m}^{-1}$  liegt.<sup>[446]</sup> Weitere Faktoren, die neben dem Lateraldruck den Glycolipid-Abbau beeinflussen können, sind die Krümmung und Zusammensetzung der Lipiddoppelschicht, wobei negativ geladenen lysosomalen Lipiden wie dem Bis(monoacylglycerol)phosphat eine besondere Bedeutung zukommt.<sup>[230]</sup> Durch den Ausfall des GM2-Aktivatorproteins bei einer seltenen Erbkrankheit, der AB-Variante der GM2-Gangliosidose, kommt es zu einer für die Patienten tödlichen Akkumulation des Gangliosids in den Nervenzellen.

Außer dem GM2-Aktivator sind vier weitere Sphingolipid-Aktivatorproteine, SAP-A bis -D, bekannt, die auch als Saposine bezeichnet werden. Bereits 1964 wurde ein Protein identifiziert,<sup>[232]</sup> das für die hydrolytische Spaltung von Sulfatid (Galactosylceramid-3-sulfat) durch die lysosomale

Arylsulfatase A benötigt wird. Bei diesem Sulfatid-Aktivator (SAP-B) handelt es sich um ein kleines lysosomales Glycoprotein, das aus 80 Aminosäuren mit einer N-glycosidisch gebundenen Zuckereinheit besteht und durch drei Disulfidbrücken stabilisiert wird.<sup>[233]</sup> Ähnlich dem GM2-Aktivator bindet es GSL und fungiert in vitro als GSL-Transferprotein. Sulfatide und ähnliche GSL können auf der Oberfläche von Donorliposomen erkannt werden, in 1:1-Komplexen gebunden, aus der Membran extrahiert und in die Membranen von Acceptorliposomen übertragen werden.<sup>[234, 235]</sup> In den Lysosomen wirkt es offensichtlich wie der GM2-Aktivator als Liftase; der Sulfatid-Aktivator kann ganz unterschiedliche GSL von vesikulären Membranen binden, aus der Membranebene „liften“ und wasserlöslichen Enzymen als Substrate anbieten. Entsprechend führt der erbliche Defekt des Sulfatid-Aktivators zu einer Speicherkrankheit ähnlich der metachromatischen Leukodystrophie, bei der neben Sulfatiden auch andere GSL wie Globotriaosylceramid akkumulieren (Abschnitt 6.11). Die proteinchemische und molekularbiologische Analyse des Sulfatid-Aktivators (SAP-B) und des Gaucher-Faktors (SAP-C) ergab, daß beide Proteine zusammen mit den beiden Aktivatorproteinen SAP-A und SAP-D<sup>[236]</sup> durch proteolytisches Prozessieren aus einer gemeinsamen Proteinvorstufe entstehen, dem SAP-Vorläufer.<sup>[236–238]</sup> Alle vier Aktivatorproteine sind zueinander homolog; sie haben ähnliche Eigenschaften, aber unterschiedliche, teilweise noch unaufgeklärte Funktionen.

Membranaktive Sphingolipid-Aktivatorproteine ermöglichen also die Wechselwirkung zwischen membranständigem GSL-Substrat und der jeweiligen Exohydrolase. Dabei muß ihre Funktion nicht auf die eines GSL-Bindungsproteins beschränkt bleiben; so wurde auch eine direkte Aktivierung der Glucosylceramid- $\beta$ -Glucosidase durch SAP-C nachgewiesen<sup>[239]</sup> sowie eine spezifische Wechselwirkung des GM2-Aktivators mit der Hexosaminidase A.<sup>[260]</sup> Die Beteiligung der Aktivatorproteine am GSL-Abbau kann auch zum Schutz von Zellmembranen beitragen. Lysosomale Enzyme oder auch ihre oft schon aktiven Proenzyme treten infolge unvollständiger Sortiermechanismen – wenn auch verdünnt – im Extrazellulärraum auf. Lysosomale Hydrolasen, die keinen Aktivator benötigen, könnten dort GSL auf der Zelloberfläche langsam abbauen. Diese Möglichkeit wird normalerweise durch zwei Faktoren beeinträchtigt: durch einen neutralen pH-Wert auf der Zelloberfläche, bei dem die lysosomalen Hydrolasen nur eine geringe Aktivität aufweisen, und zusätzlich durch die notwendige Stimulierung über lysosomale Aktivatorproteine, die im Extrazellulärraum ebenfalls nur in geringen Konzentrationen auftreten.

## 6. Pathobiochemie

Der lysosomale Abbau von Sphingolipiden ist mit dem Auftreten verschiedener Erbkrankheiten verbunden.<sup>[240, 241]</sup> Allgemein erfolgt der Abbau zellulärer Bestandteile hauptsächlich in den sauren Kompartimenten der Zelle, den Lysosomen und auch den Endosomen. Hier werden Makromoleküle durch hydrolytische Enzyme in ihre Bausteine zerlegt. Daran sind etwa vierzig Hydrolasen beteiligt, dar-

unter Proteasen, Glycosidasen, Lipasen, Phospholipasen, Nucleasen, Phosphatasen und Sulfatasen. Die abzubauenen Verbindungen können die Lysosomen auf dem Weg der Endocytose oder der Autophagie erreichen. Die Abbauprodukte verlassen das Lysosom, um in anderen subzellulären Kompartimenten für die Energiegewinnung oder die Neusynthese zellulärer Bestandteile eingesetzt zu werden. Ihr Durchtritt durch die lysosomale Membran geschieht durch Diffusion oder mit Transportproteinen.

Die erbliche Störung von einem oder mehreren Abbauschritten führt zur Akkumulation nicht mehr abbaubarer Verbindungen und zu lysosomalen Speicherkrankheiten, die nach der Art der Speichersubstanzen klassifiziert werden.<sup>[242]</sup> Man unterscheidet dementsprechend Sphingolipidosen, Mucopolysaccharidosen, Mucolipidosen, Glycoprotein-Speicherkrankheiten und eine lysosomale Glycogen-Speicherkrankheit, die Pompe'sche Erkrankung. Das Konzept, daß angeborene Stoffwechselstörungen zu Erbkrankheiten führen können, geht auf Garrod zurück.<sup>[243]</sup> Am Beispiel der Pompe'schen Erkrankung führte dann Hers<sup>[244]</sup> den Begriff der lysosomalen Erkrankung ein, die durch den erblichen Defekt einer sauren Hydrolase mit lysosomaler Lokalisation und die Akkumulation ihres nicht mehr abbaubaren Enzymsubstrates charakterisiert ist. Heute müssen die Konzepte von Garrod und Hers dahingehend erweitert werden, daß nicht nur Enzymdefekte, sondern auch Defekte in Transport<sup>[245]</sup>- und Aktivatorproteinen<sup>[246]</sup> zu lysosomalen Speicherkrankheiten führen können. Auch ist – wie bei der Krabbe'schen Erkrankung – der Defekt einer lysosomalen Hydrolase nicht unbedingt von der lysosomalen Speicherung ihres Substrates begleitet. Hier ist die Konzentration einer sonst kaum auftretenden toxischen Substanz, des Galactosylsphingosins, in Oligodendrocyten erhöht (Abschnitt 6.9). Am Abbauweg der GSL (Abbildung 20) fällt auf, daß verglichen mit anderen Stoffwechselwegen eine Vielzahl von Erbkrankheiten bekannt ist. Dies muß auf den streng sequentiellen Abbauweg dieser Verbindungen zurückgeführt werden, bei dem die Nutzung alternativer Wege bei Auftreten eines Stoffwechselblocks nicht möglich ist. So sind Mäuse mit dem Enzymdefekt, der beim Menschen die Tay-Sachs'sche Erkrankung hervorruft, weitgehend gesund, da im Unterschied zum Menschen bei ihnen ein alternativer Stoffwechselweg existiert (Abschnitt 6.2.5).

Lysosomale Glycosidasen sind im allgemeinen spezifisch für einen abzuspal tenden terminalen Rest, der in verschiedenen Stoffklassen vorkommen kann, und weniger für ein bestimmtes Aglycon. Das kann dazu führen, daß bei einer bestimmten Sphingolipidose neben den Lipidsubstraten auch Glycoproteine oder Mucopolysaccharide gespeichert werden, wenn die defekte Hydrolase auch für einen ihrer Abbauewege benötigt wird. Für fast jeden der einzelnen Abbauschritte im Sphingolipid-Katabolismus ist beim Menschen ein solcher Defekt bekannt. Eine Ausnahme bildet der Lactosylceramid-Abbau, der von zwei Enzymen in Kombination mit zwei Aktivatorproteinen geleistet werden kann.<sup>[247]</sup> Dementsprechend ist kein einzelner enzymatischer Defekt bekannt, der zur isolierten Speicherung von Lactosylceramid führt, doch wird bei einem Ausfall mehrerer Aktivatorproteine neben anderen Lipiden auch Lactosylceramid gespeichert.

Die klinischen Konsequenzen einer Abbaustörung hängen in erster Linie davon ab, welche Zelltypen von der Speicherung vorwiegend betroffen sind. Bei den Gangliosid-Speicherkrankheiten handelt es sich um neuronale Erkrankungen, während bei Akkumulation von Ceramid und Glucosylceramid vorwiegend die visceralen Organe und die Haut und bei Speicherung von Galactosylceramid und Sulfatid die weiße Substanz des Gehirns betroffen sind. Sphingolipidosen werden mit Ausnahme der Fabry'schen Erkrankung autosomal rezessiv vererbt. Daneben gibt es eine weitere X-chromosomal vererbte lysosomale Speicherkrankheit, die allerdings nicht den Sphingolipid-Stoffwechsel betrifft: Bei der als Hunter'sche Erkrankung bekannten Mucopolysaccharidose II ist die  $\alpha$ -Iduronat-Sulfatase defekt. Neben Defekten in den Enzymen und Aktivatorproteinen kann auch eine fehlerhafte posttranslationale Modifikation zur Ausprägung einer lysosomalen Speicherkrankheit führen. Dies ist der Fall bei der Mucolipidose II („I-cell disease“) und der multiplen Sulfatasedefizienz. Die einzelnen Mutationen, die lysosomale Speicherkrankheiten verursachen, wurden in einer Übersicht zusammengefaßt.<sup>[248]</sup>

## 6.1. GM1-Gangliosidose

Der angeborene Defekt der GM1- $\beta$ -Galactosidase äußert sich beim Menschen durch zwei Erkrankungen: die GM1-Gangliosidose, die vor allem durch eine neuronale Gangliosid-GM1-Speicherung charakterisiert wird<sup>[249]</sup> und die Morquio-Typ-B-Erkrankung, bei der eine Oligosaccharid-Speicherung in den Viscera vorherrscht.<sup>[250]</sup> Die Ursachen dafür liegen in der Substratspezifität der mutierten  $\beta$ -Galactosidase. Der molekulare Defekt, der zur GM1-Gangliosidose führt, konnte 1967 als  $\beta$ -Galactosidase-Defizienz identifiziert werden.<sup>[251, 252]</sup> Die GM1- $\beta$ -Galactosidase ist ein monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kD und bildet mit der Sialidase und dem sogenannten „protective protein“ einen ternären Komplex. In dieser Form ist sie vor einem vorzeitigen proteolytischen Abbau geschützt.<sup>[253]</sup> Auch Mutationen im „protective protein“ können sekundär eine GM1-Speicherung bewirken. Die cDNA<sup>[254]</sup> und das Gen<sup>[255]</sup> der GM1- $\beta$ -Galactosidase wurden kloniert.

Bei der GM1-Gangliosidose können klinisch drei Krankheitsformen unterschieden werden. Bei Typ 1, der infantilen Form, treten neurologische Symptome innerhalb der ersten sechs Lebensmonate auf und führen vor dem zweiten Lebensjahr zum Tod. Charakteristisch sind ein kirschroter Fleck auf dem Augenhintergrund der Patienten, Dysmorphie der Gesichtszüge, Vergrößerung von Leber und Milz und eine Verformung des Skeletts. Die spätingfantile oder juvenile Form der Erkrankung, der sogenannte Typ 2, verläuft milder mit einer Lebenserwartung der Patienten von etwa zehn Jahren. Störungen im Knochenwachstum und cerebrale Symptome treten erst nach dem ersten Lebensjahr in Erscheinung. Patienten, die an der adulten Form der Krankheit (Typ 3) leiden, entwickeln milde, langsam fortschreitende neurologische Störungen, wobei das Skelett kaum betroffen ist. Auch Übergangsformen sind bekannt.

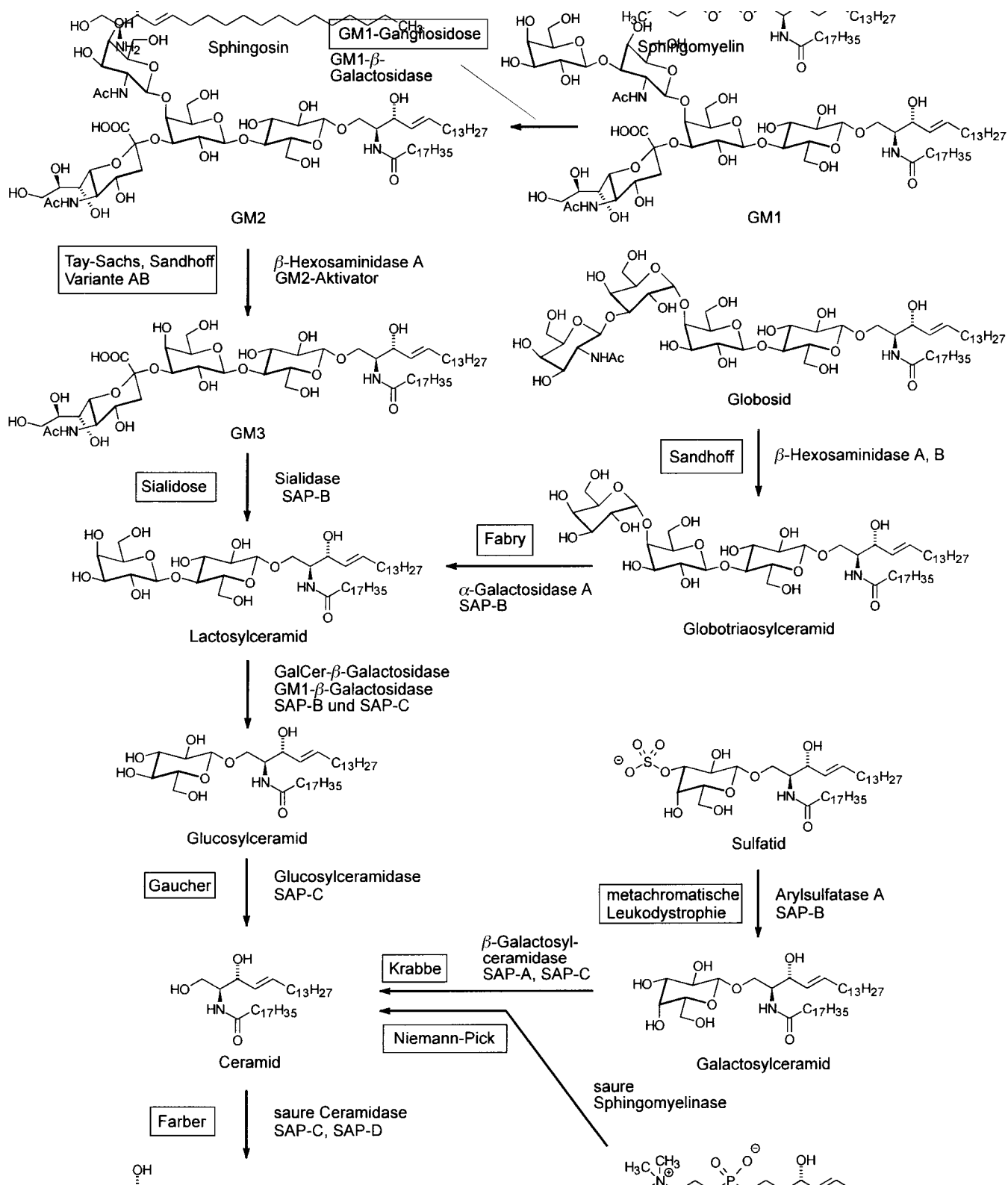


Abbildung 20. Lysosomaler Sphingolipid-Abbau.<sup>[223]</sup> Die Eponyme bekannter Stoffwechseldefekte und die für den Abbau in vivo benötigten Sphingolipid-Aktivatorproteine sind angegeben. Heterogenitäten im Lipidteil der Sphingolipide sind nicht gekennzeichnet. Variante AB = AB-Variante der GM2-Gangliosidose (Fehlen des GM2-Aktivatorproteins); SAP = Sphingolipid-Aktivatorprotein.

Bei einem Defekt der  $\beta$ -Galactosidase können neben dem Gangliosid GM1 noch weitere Enzymsubstrate gespeichert werden, darunter das Glycolipid GA1, Oligosaccharide von Glycoproteinen und Zwischenprodukte des Keratansulfat-Abbaus. Je nach Ort ihrer Biosynthese werden diese Substanzen in verschiedenen Organen abgelagert. Die GM1-Speicherung in Neuronen führt zum Zusammenbruch des Nervensystems. Die Schwere und Verlaufsform der Erkrankung korreliert mit der enzymatischen Restaktivität in den Zellen und Körperflüssigkeiten sowie mit dem Ausmaß der Substratspeicherung.<sup>[256]</sup> Die Mutationen, die in infantilen GM1-Gangliosidose-Patienten identifiziert werden konnten (Übersicht: Lit.[248]), sind heterogen, und keiner der bekannten Defekte tritt mit besonderer Häufigkeit auf. Kürzlich ist es gelungen, ein authentisches Mausmodell der GM1-Gangliosidose zu entwickeln.<sup>[257, 258]</sup>

### 6.1.1. Morquio-Typ-B-Erkrankung

Die Morquio-Typ-B-Erkrankung (Übersicht: Lit.[250]) entspricht klinisch einem milden Phänotyp der nichtalleli-schen Typ-A-Erkrankung, bei der die *N*-Acetyl-galactosamin-6-sulfatase defekt ist und infolgedessen Keratansulfat gespeichert wird. Wie die GM1-Gangliosidose ist die Morquio-B-Erkrankung auf einen Defekt der GM1- $\beta$ -Galactosidase zurückzuführen. Sie ist durch Skelettdeformationen ohne primäre Beteiligung des Zentralnervensystems gekennzeichnet. Oligosaccharide mit terminalen Galactoseresten akkumulieren in den visceralen Organen und im Urin.

## 6.2. Die GM2-Gangliosidosen

Die GM2-Gangliosidosen beruhen auf einem Defekt beim Abbau des Gangliosids GM2.<sup>[259, 263]</sup> Langjährige Untersuchungen haben ergeben, daß an der enzymatischen Abspaltung des terminalen *N*-Acetylgalactosaminrestes in vivo drei Polypeptidketten beteiligt sind, die von drei verschiedenen Genen codiert werden (Abbildung 19): die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten der  $\beta$ -Hexosaminidasen und das GM2-Aktivatorprotein. Die  $\beta$ -Hexosaminidasen sind dimere Proteine, die  $\beta$ -glycosidisch verknüpfte terminale *N*-Acetylglucosamin- und *N*-Acetyl-galactosaminreste von Glykokonjugaten abspalten. Bei GM2 wird dazu das GM2-Aktivatorprotein als Cofaktor benötigt. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten der  $\beta$ -Hexosaminidase bilden drei Isoenzyme, die sich durch ihre Untereinheitenstruktur und Substratspezifität unterscheiden. Die  $\beta$ -Hexosaminidase A hat die Untereinheitenstruktur  $\alpha\beta$  und baut negativ geladene und ungeladene Substrate ab. Sie verfügt – zunächst ganz unerwartet – über zwei aktive Zentren, eines auf der  $\alpha$ -Kette und eines auf der homologen  $\beta$ -Kette.<sup>[260]</sup>

Die  $\beta$ -Hexosaminidase B mit der Untereinheitenstruktur  $\beta_2$  spaltet vorwiegend *N*-Acetylglucosamin- und *N*-Acetyl-galactosamin-Reste von ungeladenen Substraten wie dem Glycolipid GA2, dem Globotetraosylceramid und von Oligosacchariden ab. Die  $\beta$ -Hexosaminidase S ist ein Homodimer aus  $\alpha$ -Ketten, das für den GM2-Abbau von untergeordneter Bedeutung ist und über dessen Funktion in vivo weit weniger Daten vorliegen als für die anderen Isoenzyme. Untersu-

chungen an gentechnisch veränderten Mäusen weisen darauf hin, daß die  $\beta$ -Hexosaminidase S am Abbau von Glycosaminoglycanen beteiligt ist.<sup>[261]</sup> Die GM2-Gangliosidosen haben wir danach klassifiziert, welche Isoenzyme noch in den Geweben des Patienten vorhanden sind.<sup>[262]</sup> Mutationen, die das Gen für die  $\alpha$ -Untereinheit der  $\beta$ -Hexosaminidasen betreffen, können zum Ausfall der  $\beta$ -Hexosaminidasen A und S führen. Dieser Defekt wird als B-Variante der GM2-Gangliosidosen bezeichnet und ihre infantile Verlaufsform auch als Tay-Sachs'sche Erkrankung. Mutationen im Gen für die  $\beta$ -Untereinheit können zum Ausfall der  $\beta$ -Hexosaminidasen A und B führen, wobei neben dem Gangliosid GM2 auch das Glycolipid GA2 und Globotetraosylceramid gespeichert werden. Die dazugehörige Erkrankung ist die 0-Variante der GM2-Gangliosidosen oder auch Sandhoff'sche Erkrankung. Defekte im Gen für den GM2-Aktivator führen zur AB-Variante der GM2-Gangliosidosen.

### 6.2.1. B-Variante der GM2-Gangliosidosen

Die infantile Form der B-Variante der GM2-Gangliosidosen ist besser als Tay-Sachs'sche Erkrankung bekannt. Die Symptome dieser Erkrankung wurden erstmals 1881 von dem britischen Augenarzt Tay beschrieben, der über einen Fall von infantiler amaurotischer Idiotie berichtete.<sup>[263]</sup> Tay entdeckte einen kirschroten Fleck in der Retina eines ein Jahr alten Patienten, der physisch und psychisch retardiert war. Vor der Jahrhundertwende prägte dann der amerikanische Neurologe Sachs den Begriff der familiären amaurotischen Idiotie und beschrieb die morphologischen Kennzeichen dieser Erkrankung. 1962 identifizierte Svennerholm die Hauptspeichersubstanz bei der Tay-Sachs'schen Erkrankung innerhalb des Nervensystems als Gangliosid GM2, dessen chemische Struktur in der Mitte der sechziger Jahre durch Makita und Yamakawa sowie Ledeen und Salsman (siehe Lit.[259]) aufgeklärt wurde. Der zugrunde liegende Stoffwechseldefekt, das Fehlen des Enzyms  $\beta$ -Hexosaminidase A, wurde 1969 identifiziert.<sup>[264, 265]</sup>

Die klassische Tay-Sachs'sche Erkrankung ist durch das Auftreten neurologischer Symptome im frühen Kindesalter charakterisiert. Die frühesten Symptome setzen im Alter von drei bis fünf Monaten ein. Es treten motorische Schwächen auf; plötzliche Geräusche rufen ungewöhnlich heftige Schreckreaktionen hervor. Im Alter von sechs bis zehn Monaten läßt die Aufmerksamkeit nach, motorische Fertigkeiten und Sehvermögen gehen verloren. Makrozephalie und neurologische Störungen schreiten fort, bis der Tod eintritt. Juvenile Verlaufsformen der B-Variante der GM2-Gangliosidosen sind durch motorische Störungen im Alter von zwei bis sechs Jahren und fortschreitende Demenz im ersten Lebensjahrzehnt charakterisiert. Eine chronische Verlaufsform fällt durch Abnormitäten in Gang und Körperhaltung der Patienten auf und kann im Alter von zwei bis fünf Jahren einsetzen. Mit fortschreitendem Alter treten neurologische Symptome in den Vordergrund, die Patienten können ein Alter von vierzig Jahren erreichen. Adulte Verlaufsformen der Erkrankung zeigen eine vielfältige Symptomatik, es können neurologische Störungen wie die spinale Muskelatrophie und

Psychosen auftreten. Das Sehvermögen und die Intelligenz sind aber nicht eingeschränkt.

Sowohl cDNA und Gen<sup>[266]</sup> der  $\alpha$ -Kette als auch cDNA<sup>[267]</sup> und Gen<sup>[268, 269]</sup> der homologen  $\beta$ -Kette wurden charakterisiert. Die reife Form der  $\alpha$ -Kette hat ein Molekulargewicht von 56 kDa,<sup>[270]</sup> die der  $\beta$ -Kette von 52 kDa.<sup>[271]</sup> Dabei wird die  $\beta$ -Kette in den Lysosomen mancher Zelltypen proteolytisch in zwei kleinere Fragmente,  $\beta_a$  und  $\beta_b$ , gespalten. Die Tay-Sachs'sche Erkrankung tritt besonders häufig in der Bevölkerungsgruppe der Ashkenasi-Juden auf (Heterozygotenfrequenz 1:27). Hier sind drei mutierte Allele innerhalb der  $\alpha$ -Kette für 93 % aller mutierten Allele verantwortlich. Insgesamt konnten über 50 Mutationen auf der  $\alpha$ -Kette identifiziert werden (Übersicht: Lit.[259]). Verlaufsform und Schwere der Erkrankung korrelieren mit der Restaktivität der Enzyme im Lysosom.<sup>[272]</sup>

### 6.2.2. B1-Variante der GM2-Gangliosidosen

Die B1-Variante der GM2-Gangliosidosen<sup>[273, 274]</sup> unterscheidet sich enzymologisch von der B-Variante durch eine veränderte Substratspezifität der mutierten  $\beta$ -Hexosaminidase A. Ungeladene synthetische Substrate werden gespalten, während gegenüber dem natürlichen Substrat und gegenüber negativ geladenen synthetischen Substraten keine Aktivität gemessen wird. Wir fanden heraus, daß die Funktion des aktiven Zentrums auf der  $\alpha$ -Kette gestört ist, ohne daß die Assoziation der Untereinheiten, das Prozessieren des Enzyms oder die Aktivität der  $\beta$ -Kette beeinträchtigt sind. Mutationen an drei Positionen auf der  $\alpha$ -Kette führen zur B1-Variante. Da auf Proteinebene bei drei Mutationen Arg178 durch eine der Aminosäuren Cys, His oder Leu substituiert ist, wurde angenommen, daß Arg178 eine Rolle als katalytische Aminosäure im aktiven Zentrum spielt. Diese Hypothese ist widerlegt worden,<sup>[275]</sup> die genaue Rolle von Arg178 bleibt aber noch unklar. Homozygote Patienten mit B1-Mutation zeigen einen juvenilen Krankheitsverlauf; bei zusammengesetzt Heterozygoten mit einem Nullallel wird die spätinfantile Form angetroffen.

### 6.2.3. 0-Variante der GM2-Gangliosidosen

Die 0-Variante der GM2-Gangliosidosen wird auch als Sandhoff'sche Erkrankung bezeichnet.<sup>[246]</sup> Die postmortalen Gewebe des ersten untersuchten Patienten haben wir unter der Diagnose der Tay-Sachs'schen Erkrankung erhalten. Die Isolierung und Analyse der Speichersubstanzen lieferten aber ein abweichendes Bild.<sup>[276]</sup> Anders als bei der B-Variante wurden neben negativ geladenen Glycolipiden, vorwiegend dem Gangliosid GM2, auch ungeladene Glycolipide gespeichert,<sup>[262]</sup> besonders Globosid in den visceralen Organen, Glycolipid GA2 im Nervengewebe und – wie sich später herausstellte – auch Oligosaccharide im Urin. Alle diese Speicherlipide hatten einen terminalen  $\beta$ -glycosidisch gebundenen *N*-Acetylgalactosaminrest, was auf den möglichen Stoffwechseldefekt hinwies. Bei Abbauprobeversuchen mit den radioaktiv markierten Speichersubstanzen konnten wir einen fast vollständigen Verlust der damals bekannten  $\beta$ -*N*-Acetylgalactosaminidase-Aktivitäten, also der Hexosaminidasen A

und B, in allen untersuchten Geweben nachweisen.<sup>[276]</sup> Dies war der erste beschriebene Enzymdefekt bei einer Gangliosidose. Spätere Untersuchungen ergaben, daß die beiden Hexosaminidasen A und B aufgrund von Mutationen auf dem Gen der gemeinsamen  $\beta$ -Kette defekt sind.

Das klinische und pathologische Bild der Sandhoff'schen Erkrankung entspricht weitgehend dem der Tay-Sachs'schen Erkrankung, es treten zusätzlich vergrößerte innere Organe und Knochendeformationen auf. Als katalytische Aminosäure im aktiven Zentrum der  $\beta$ -Hexosaminidase B haben wir Glu355 durch Photoaffinitätsmarkierung identifiziert.<sup>[277, 278]</sup>

### 6.2.4. AB-Variante der GM2-Gangliosidosen

Die AB-Variante der GM2-Gangliosidosen ist auf eine Defizienz des GM2-Aktivators zurückzuführen. In frühen Untersuchungen fiel uns auf, daß trotz des Vorhandenseins der  $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivitäten A und B eine massive Speicherung der Glycolipide GM2 und GA2 im Hirn auftrat.<sup>[224]</sup> Die aus Patientengewebe isolierten Enzyme waren sogar in der Lage, die aus dem gleichen Gewebe isolierten Speichersubstanzen enzymatisch in Gegenwart geeigneter Detergentien zu spalten. Diese anscheinend widersprüchlichen Befunde veranlaßten uns, nach einem endogenen, also natürlichen Detergens in postmortalen menschlichen Geweben zu suchen. Als Ergebnis dieser Suche konnten wir 1978 den molekularen Defekt bei der AB-Variante als die Defizienz eines Cofaktors, des GM2-Aktivatorproteins, identifizieren.<sup>[279]</sup> Die AB-Variante fungierte als Prototyp für die Analyse weiterer Aktivator-mangelkrankheiten. Kurz darauf gelang uns die Isolierung des Proteins.<sup>[280]</sup> Der reife GM2-Aktivator ist ein Glycoprotein und enthält einen Polypeptid-faden von 162 Aminosäuren. Dieser bildet vier Disulfidbrücken, deren Verknüpfungsweise kürzlich durch die Kombination proteinchemischer und massenspektrometrischer Techniken aufgeklärt werden konnte.<sup>[281]</sup> Die cDNA und große Bereiche des Gens sind bekannt.<sup>[282]</sup> Die Mutationen bei AB-Patienten wurden identifiziert.<sup>[283–285]</sup>

Der klinische Verlauf der Erkrankung entspricht weitgehend dem der Tay-Sachs'schen Erkrankung. Dabei ist das Einsetzen der Symptome gegenüber Patienten mit Tay-Sachs'scher Erkrankung leicht verzögert. Es werden bei der AB-Variante Gangliosid GM2 und Glycolipid GA2 gespeichert, nicht aber Globosid<sup>[262]</sup> oder GD1a-GalNAc, eine untergeordnete Speichersubstanz bei der 0- und der B-Variante.<sup>[286]</sup>

### 6.2.5. Tiermodelle der GM2-Gangliosidosen

Es sind verschiedene natürliche Tiermodelle der GM2-Gangliosidosen bekannt (Übersicht: Lit.[259]), und es ist in jüngster Vergangenheit gelungen, Mausmodelle für die einzelnen Formen der GM2-Gangliosidose zu entwickeln.<sup>[287]</sup> Das gezielte Ausschalten von Genen für die  $\alpha$ -Kette und die  $\beta$ -Kette der Hexosaminidasen sowie für das GM2-Aktivatorprotein in embryonalen Stammzellen führte zu Tiermodellen der B-Variante,<sup>[288, 289]</sup> der 0-Variante<sup>[290]</sup> und der AB-Variante.<sup>[291]</sup> Während sich die einzelnen Formen der GM2-Gangliosidose beim Menschen phänotypisch nur geringfügig unterscheiden, registriert man bei den Tiermodellen drastische

Unterschiede in Verlauf und Schwere der Erkrankung. Die Maus mit B-Variante ist phänotypisch unauffällig. Dagegen entwickelt die Maus mit 0-Variante schwere motorische Störungen, die Lebensdauer ist stark verkürzt. Die Ursache dafür ist die Spezifität der Sialidase, die sich bei Maus und Mensch unterscheidet.<sup>[290]</sup> Die Maus-Sialidase akzeptiert GM2 als Substrat und wandelt es langsam in GA2 um (Abbildung 21). Beim Menschen spielt dieser Stoffwechselweg keine wesentliche Rolle. GA2 kann durch die noch intakte  $\beta$ -Hexosaminidase B abgebaut werden, so daß bei der Tay-Sachs-Maus trotz eines kompletten Ausfalls der  $\beta$ -Hexosaminidase A der Stoffwechselblock partiell umgangen wird. Erst der Ausfall beider Isoenzyme, Hexosaminidase A und B, führt zu einer Symptomatik, die der Sandhoff'schen Erkrankung beim Menschen entspricht. Zwar kann die Maus-Sialidase weiterhin GM2 zu GA2 umsetzen, GA2 kann aber nicht weiter abgebaut werden, da das zuständige Enzym, die  $\beta$ -Hexosaminidase B, defekt ist.

Die GM2-Aktivator-defiziente Maus prägt einen intermediären Phänotyp aus, der durch motorische Störungen und eine normale Lebensdauer charakterisiert ist. Die Kreuzung von Mäusen der B- und 0-Variante führte zu Tieren, bei denen im Unterschied zu den bekannten menschlichen Erkrankungen alle drei Isoenzyme, Hexosaminidase A, B und S, defekt sind. Diese Tiere weisen neben der neuronalen Glycolipid-

speicherung den Phänotyp einer Mucopolysaccharidose auf und scheiden große Mengen von Glycosaminoglycanen im Urin aus. Demnach sind Hexosaminidasen für den Glycosaminoglycanabbau verantwortlich. Bei menschlichen Patienten mit B- oder 0-Variante ist die Gegenwart des jeweils noch intakten Isoenzyms ausreichend, um eine Speicherung von Glycosaminoglycanen zu verhindern. Erst der Ausfall aller drei Isoenzyme führt zu einer Akkumulation nicht mehr abbaubarer Glycosaminoglycane.<sup>[261]</sup> Die Mäuse der B-Variante haben als Modell für die Therapie mit niedermolekularen Enzyminhibitoren Bedeutung gewonnen (Abschnitt 6.14.3).

### 6.3. Galactosialidose

Bei der Galactosialidose handelt es sich um die sekundäre Defizienz zweier Enzymaktivitäten,<sup>[292]</sup> der  $\beta$ -Galactosidase- und der Sialidase- oder *N*-Acetylneuraminidase-Aktivität. Der primäre Defekt ist auf Mutationen innerhalb des Gens für das sogenannte „protective protein“ zurückzuführen,<sup>[293]</sup> das mit den beiden anderen Proteinen zu einem stabilen Komplex von über 600 kD assoziiert.<sup>[294]</sup> Die Stöchiometrie des Komplexes ist noch unklar; allerdings ist die Gegenwart des  $\beta$ -Galactosidase-Proteins für die Stabilität des Komplexes

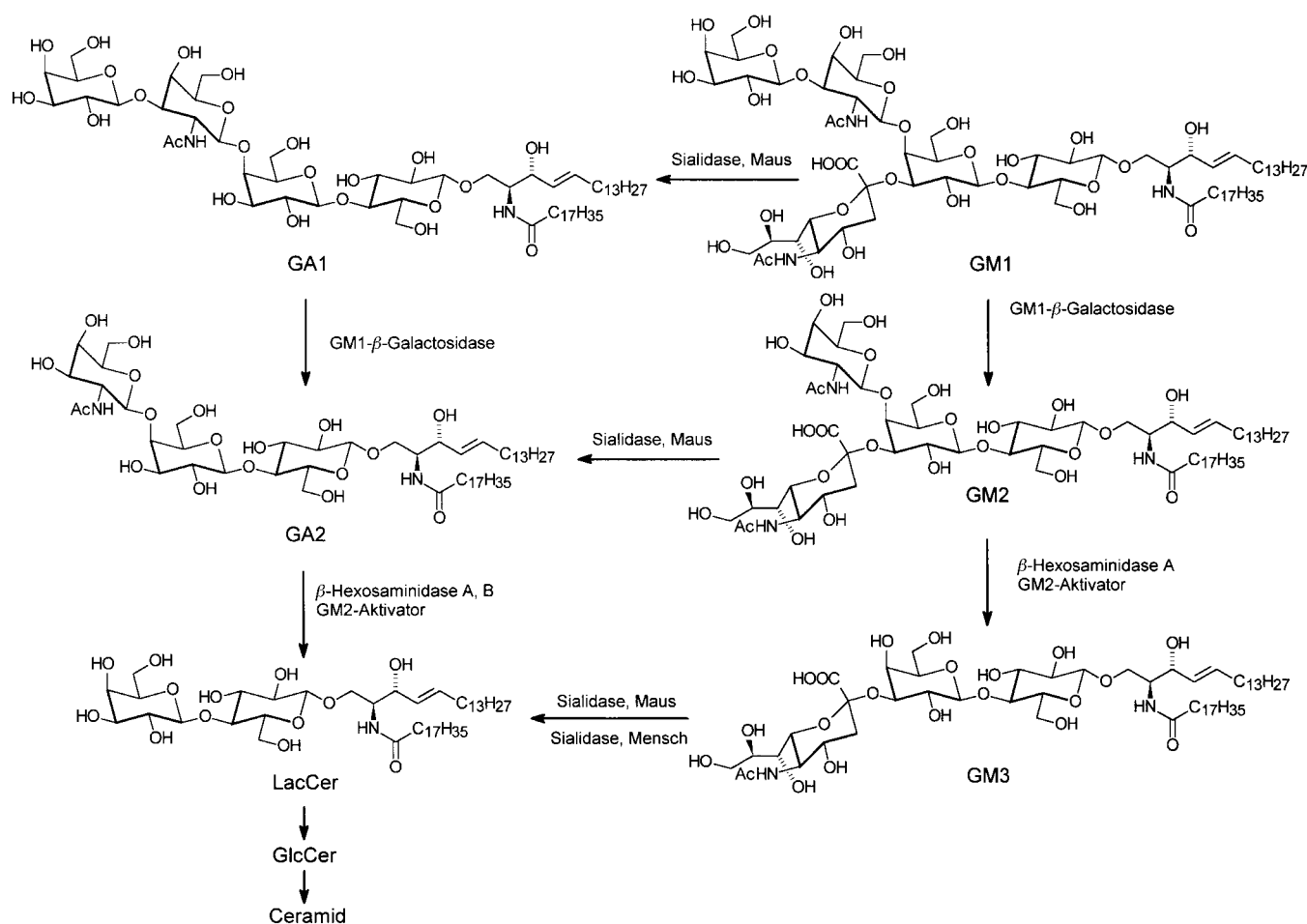


Abbildung 21. Abbauwege für das Gangliosid GM1 in Mensch und Maus.<sup>[257, 290]</sup>

nicht essentiell. Fehlt das „protective protein“, so werden sialinsäure- und galactosehaltige Substrate gespeichert, darunter Oligosaccharide und Ganglioside wie GM3 und GM1.<sup>[292]</sup> Sialyloligosaccharide akkumulieren in den Lysosomen und werden schließlich im Urin ausgeschieden.

Das „protective protein“ vereinigt verschiedene enzymatische Aktivitäten: Neben seiner Eigenschaft als Schutzprotein ist es eine Serinesterase, eine Carboxypeptidase (saurer pH-Optimum) und eine Deamidase (neutrales pH-Optimum). Es hat sich herausgestellt, daß es mit einem Protein identisch ist, das nach Thrombinstimulation von Blutplättchen freigesetzt wird und verschiedene Peptidhormone wie Oxytocin, Endothelin und Substanz P mit amidischem C-Terminus hydrolysiert und damit inaktiviert. Außerdem ist es mit der lysosomalen Protease Cathepsin A identisch. Die Protease- und die Schutz-Funktionen sind voneinander unabhängig, da ein Genprodukt mit inaktiviertem katalytischen Zentrum noch die Abbaukapazität von Sialidose-Fibroblasten restauriert. Das „protective protein“ wird als 54-kD-Vorstufe synthetisiert, die proteolytisch zu zwei durch Disulfidbrücken verbundenen Ketten von 32 und 20 kD prozessiert wird. In allen bisher untersuchten Patienten ist auch die Deamidase- und Carboxypeptidase-Aktivität des „protective protein“ defekt. Die Kristallstruktur des 108-kD-Dimers der Protective-protein-Vorstufe konnte aufgeklärt werden.<sup>[295]</sup>

Nachdem der molekulare Defekt der GM1-Gangliosidose als  $\beta$ -Galactosidase-Defizienz identifiziert worden war,<sup>[251, 252]</sup> wurde bei verschiedenen atypischen Patienten eine reduzierte  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität registriert, die sich nicht auf eine defekte  $\beta$ -Galactosidase zurückführen ließ. Bei einem dieser Patienten wiesen Wenger et al. eine kombinierte Defizienz an  $\beta$ -Galactosidase- und Neuraminidase-Aktivität nach,<sup>[296]</sup> die später auch bei anderen Patienten mit atypischer GM1-Gangliosidose und Sialidose festgestellt wurde. In Zellen, die diesen kombinierten Enzymdefekt aufwiesen, konnte in Zellfusionsexperimenten mit Neuraminidase-defizienten Zellen eine partielle Restaurierung der Sialidaseaktivität erzielt werden.<sup>[297]</sup> Die Natur eines postulierten „corrective factor“ wurde schließlich von d'Azzo et al. aufgeklärt.<sup>[293]</sup> Eine Galactosialidose wurde weltweit bei etwa siebzig Patienten diagnostiziert (Übersicht: Lit. [292]). Die Symptome bei allen Patienten sind vergrößerte Gesichtszüge, ein kirschroter Fleck auf dem Augenhintergrund, Veränderungen der Wirbelsäule, Schaumzellen im Rückenmark und vakuolisierte Lymphocyten. Man unterscheidet phänotypisch drei Formen der Erkrankung. Die frühinfantile Form führt zu neurologischen Störungen und zum Tod der Patienten im Alter von etwa acht Monaten aufgrund von Herz- oder Nierenversagen. Charakteristisch für die spätinfantile Form sind Wachstumsstörungen, die Vergrößerung von Leber und Milz und die Schädigung des Herzens; das Nervensystem wird aber nicht beeinträchtigt. Die Mehrzahl der Patienten leidet an der juvenilen/adulten Form, die sich unter anderem durch mentale Retardierung und neurologische Schäden äußert. Ein Mausmodell mit defektem „protective protein“ entspricht biochemisch weitgehend der schweren menschlichen Verlaufsform, hat demgegenüber allerdings eine ungewöhnlich hohe  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität.<sup>[298]</sup>

## 6.4. Sialidose

Defekte der lysosomalen Sialidase führen vor allem zu einer Akkumulation und Ausscheidung sialylierter Oligosaccharide und Glycokonjugate. Da Ganglioside bei den Speichersubstanzen nur eine untergeordnete Rolle spielen, handelt es sich nicht um eine Sphingolipidose im engeren Sinn. Sialidasen, die Ganglioside als Substrate akzeptieren, sind auf der Zelloberfläche lokalisiert.<sup>[299–302]</sup> Die infantile Form der Erkrankung (Sialidose Typ II) wird auch als Mucopolidose I bezeichnet und ist durch Skelett-Verformung, Vergrößerung innerer Organe und mentale Retardierung gekennzeichnet. Eine juvenile Verlaufsform (Sialidose Typ I) ist auch als Mucopolidose IV bekannt. Die menschliche cDNA der Sialidase ist kloniert worden.<sup>[303]</sup>

## 6.5. Fabry'sche Erkrankung

Der Fabry'schen Erkrankung liegt ein Ausfall der  $\alpha$ -Galactosidase A zugrunde. Die ersten Patienten wurden 1898 unabhängig voneinander von den Dermatologen Anderson und Fabry untersucht.<sup>[304]</sup> Die Identität des Speichermaterials konnte in den sechziger Jahren durch Sweeley und Klionsky und die Natur des enzymatischen Defektes durch Brady und Kint aufgeklärt werden. Im Unterschied zu den anderen Sphingolipidosen wird die Fabry'sche Erkrankung X-chromosomal vererbt. Sie führt zur Speicherung von Enzymsubstraten mit  $\alpha$ -glycosidisch gebundener terminaler Galactose. Das Enzym ist ein Homodimer aus Untereinheiten von jeweils 50 kD und wurde aus Leber und Milz isoliert.<sup>[305, 306]</sup> Die cDNA<sup>[307]</sup> und das Gen<sup>[308]</sup> der  $\alpha$ -Galactosidase A wurden kloniert.

Die Fabry'sche Erkrankung ist durch schmerzhafte Läsionen der Haut charakterisiert und manifestiert sich klinisch in Lipideinlagerungen innerhalb der Haut, Schmerzen in den Extremitäten und Nierenversagen. Die Symptome können im Kindes- oder Jugendalter einsetzen, am häufigsten ist jedoch eine adulte Verlaufsform. Heterozygote weibliche Überträger sind ohne Symptome, oder die Krankheit verläuft milder. Es werden vor allem Globotriaosylceramid, aber auch Digalactosylceramid und Lipide mit Blutgruppe-B-Spezifität gespeichert. Meßbare Restaktivitäten der  $\alpha$ -Galactosidase A könnten auf die Gegenwart der  $\alpha$ -Galactosidase B ( $\alpha$ -N-Acetylgalactosaminidase) zurückzuführen sein, die eine geringfügige Überlappung in der Substratspezifität mit dem Fabry-Enzym aufweist. Dieses Enzym ist bei der Schindler'schen Erkrankung defekt, von der bislang nur drei Patienten bekannt sind. Die Natur der Speichersubstanzen sowie die Pathogenese der Schindler'schen Erkrankung sind unklar.<sup>[309]</sup>

Die bei Fabry-Patienten betroffenen Lipide werden kaum in Nervenzellen synthetisiert, dementsprechend handelt es sich um eine systemische Erkrankung, bei der Schädigungen des Nervensystems sekundär sind. Die Speicherung erfolgt in Epithelzellen der Blutgefäße sowie in Zellen der glatten Muskulatur und des Herzmuskels. Die Pathogenese kommt durch die Blockade kleiner Blutgefäße durch Lipidablagerungen zustande und äußert sich in Angiokeratomen der Haut sowie Nierenversagen und kardiovaskulären Erkrankungen.



Lipidablagerungen im Hirn von Patienten sind auf Speicherung in den Blutgefäßen zurückzuführen. Wohl aber kann das autonome Nervensystem betroffen sein. Die molekularen Ursachen, die zur Ausprägung der Fabry'schen Erkrankung führen, sind vielfältig. Es wurden Genumlagerungen, Punktmutationen und Splicestellenmutationen festgestellt (Übersicht: Lit.[248]). Der Enzymdefekt kann durch die Bestimmung der Enzymaktivität in verschiedenen Quellen nachgewiesen werden; dabei wird bei weiblichen Überträgern die Interpretation der Ergebnisse durch die statistische Inaktivierung eines X-Chromosoms<sup>[310]</sup> erschwert. Ein Mausmodell der Erkrankung wurde beschrieben.<sup>[311]</sup>

## 6.6. Niemann-Pick'sche Erkrankung

Im Jahr 1914 berichtete der deutsche Arzt Niemann über einen Patienten im Kindesalter, der an Hepatosplenomegalie, Lymphadenopathie und Beeinträchtigung des Zentralnervensystems litt und vor Erreichen des zweiten Lebensjahrs starb.<sup>[312]</sup> Bei histologischen Studien bemerkte dann Pick das Auftreten von Schaumzellen, die in ähnlicher, aber nicht identischer Form bereits im Zusammenhang mit der Gaucher'schen Erkrankung beschrieben worden waren. Die Speichersubstanz wurde von Ernst Klenk als Sphingomyelin identifiziert, und in den betroffenen Zellen konnte Brady 1965 eine verminderte Sphingomyelinase-Aktivität nachweisen. Die Niemann-Pick'sche Erkrankung wurde 1961 durch Crocker in drei verschiedene Typen, A–C, klassifiziert, später kamen weitere Typen hinzu. Die Typen A und B der Niemann-Pick'schen Erkrankung werden durch den Defekt der sauren Sphingomyelinase verursacht (Übersicht: Lit.[312]) und sind durch eine lysosomale Sphingomyelin-Speicherung charakterisiert. Beim Typ C der Erkrankung handelt es sich nicht um einen Defekt der sauren Sphingomyelinase.<sup>[313]</sup> Der neuronopathische Typ A tritt im Kindesalter auf und ist durch fortschreitende psychomotorische Retardierung und eine massive Vergrößerung innerer Organe gekennzeichnet. Der Tod der Patienten tritt etwa im Alter von drei Jahren ein. Patienten, die am nichtneuronopathischen Typ B der Erkrankung leiden, haben ebenfalls vergrößerte Organe; es wird jedoch so gut wie keine Beteiligung des Zentralnervensystems registriert. Die Patienten können das Erwachsenenalter erreichen.

Intermediäre Formen zeichnen sich dadurch aus, daß sich ein anfänglich dem milden Typ B entsprechendes Krankheitsbild mit zunehmendem Alter unter Beteiligung des Zentralnervensystems verschlimmert.<sup>[314]</sup> Bei Patienten der Formen A und B werden enorme Vergrößerungen von Leber und Milz sowie charakteristische Speicherzellen im Knochenmark diagnostiziert. Die saure Sphingomyelinase, die bei den Typen A und B der Niemann-Pick'schen Erkrankung defekt ist, haben wir zur Homogenität gereinigt und charakterisiert, um die molekularen Krankheitsursachen aufzuklären. Es ist ein monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 70 kD.<sup>[315]</sup> Die cDNA<sup>[316]</sup> und das Gen<sup>[317]</sup> des Enzyms (Abbildung 22) sind kloniert worden.

Es handelt sich bei der Niemann-Pick'schen Erkrankung (Übersicht: Lit.[312]) um ein panethnisches Leiden, das aber

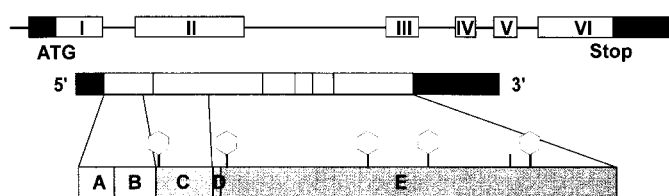


Abbildung 22. Genomstruktur (oben), cDNA (Mitte) und Proteindomänen (unten) der sauren Sphingomyelinase.<sup>[448]</sup> I–VI: Exons; A: Präsequenz; B: Prosequenz; C: Aktivator-domäne; D: prolinreiche Region; E: katalytische Domäne. Sechsecke: genutzte N-Glycosylierungsstellen; ATG: Translationsstart; Stop: Translationsstop.

in der Volksgruppe der Ashkenasi-Juden besonders häufig (Heterozygotenfrequenz 1:60) auftritt. Die unterschiedlichen Krankheitsbilder der Typen A und B können grundsätzlich auf die unterschiedliche enzymatische Restaktivität der sauren Sphingomyelinase zurückgeführt werden.<sup>[318]</sup> Patienten mit Typ B haben verglichen mit Typ-A-Patienten eine erhöhte Restaktivität, die im Nervensystem noch einen ausreichenden Umsatz des Sphingomyelins aufrecht erhalten kann.<sup>[319]</sup>

Die saure Sphingomyelinase spaltet Sphingomyelin in Ceramid und Phosphorylcholin. In der jüngsten Vergangenheit hat diese Reaktion besonderes Interesse erlangt, da Ceramid als sekundärer Botenstoff bei der intrazellulären Signaltransduktion diskutiert wird. Die Rolle der sauren Sphingomyelinase bei der signalabhängigen, induzierten Bildung von Ceramid im sogenannten Sphingomyelin-Zyklus ist zur Zeit noch umstritten.<sup>[20]</sup> Im Unterschied zu Normallymphoblasten reagieren Lymphoblasten von Patienten mit Niemann-Pick'scher Erkrankung sowie von Sphingomyelinase-Knockout-Mäusen jedoch nicht mit Ceramidbildung und Apoptose auf Bestrahlung.<sup>[320]</sup> Allerdings scheint die saure Sphingomyelinase für die Fas-induzierte Apoptose<sup>[180]</sup> erforderlich zu sein. Werden Zellen, die das magnesiumabhängige neutrale Enzym überexprimieren, mit Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  stimuliert, so erhöht sich die intrazelluläre Ceramidkonzentration nur geringfügig.<sup>[153]</sup> Die Behandlung von Ratten mit tricyclischen Antidepressiva führt zu einer Speicherung von Sphingomyelin in visceralen Organen und einem Krankheitsbild, das dem Typ B der Niemann-Pick'schen Erkrankung ähnelt.<sup>[321]</sup> Das Antidepressivum Desipramin bewirkt in kultivierten Fibroblasten einen proteolytischen Abbau der reifen lysosomalen Sphingomyelinase, nicht aber einer ihrer Vorstufen. Offenbar ist eine Thiolprotease für diesen induzierten Abbau verantwortlich.<sup>[322]</sup> Auch für die Niemann-Pick'sche Erkrankung ist ein Mausmodell entwickelt worden, dessen Phänotyp weitgehend dem der menschlichen Typ-A-Erkrankung entspricht.<sup>[323–324]</sup>

## 6.7. Metachromatische Leukodystrophie und multiple Sulfatasedefizienz

Die metachromatische Leukodystrophie (MLD) wird durch die Defizienz der Arylsulfatase A (ASA) verursacht (Übersicht: Lit.[325]) und führt zur Akkumulation von Sulfatiden in verschiedenen Organen. Der Name MLD beruht auf der metachromatischen Färbung der gespeicherten Substanzen in histologischen Schnitten. Sulfatid wurde 1933 von Blix aus

menschlichem Hirngewebe isoliert und die Struktur 1962 durch Yamakawa aufgeklärt. Die Speicherung von Sulfatiden bei MLD-Patienten wurde von Jatzkewitz (Übersicht: Lit. [326]), die Sulfatasedefizienz unabhängig voneinander durch Austin und Jatzkewitz nachgewiesen.<sup>[3]</sup> Arylsulfatasen sind Enzyme, die künstliche Arylsulfate spalten können. Bei MLD-Patienten ist eine der verschiedenen Arylsulfatasen, die Arylsulfatase A, defekt,<sup>[327]</sup> die in Gegenwart eines Cofaktors Sulfatide spaltet.<sup>[322]</sup> Dieser Cofaktor, ein später als SAP-B bezeichnetes Aktivatorprotein, wurde aus Gewebe von MLD-Patienten isoliert.<sup>[328]</sup> Es werden eine spätinfantile, eine juvenile und eine adulte Verlaufsform unterschieden.<sup>[329]</sup> Die adulte Verlaufsform ist seltener als die beiden anderen Formen. Die klinischen Symptome treten am Ende des zweiten oder im dritten Lebensjahrzehnts auf. Leitsymptome sind geistige Retardierung, die Demenz zur Folge hat, oder Verhaltensabnormalitäten, die zur Entwicklung einer Psychose führen.<sup>[330]</sup>

Verglichen mit der Krabbe'schen Erkrankung, bei der ebenfalls die myelinbildenden Zellen des Zentralnervensystems betroffen sind, ist bei der MLD der Anteil an Patienten mit juvenilen und adulten Verlaufsformen deutlich erhöht. Die Verringerung der Zahl an Oligodendrocyten, die die Nervenzellen mit der Myelinschicht versorgen, ist weniger schwerwiegend als bei der Krabbe'schen Erkrankung. Die Funktion peripherer Organe ist nicht beeinträchtigt, während das Nervensystem durch eine fortschreitende Demyelinisierung geschädigt wird. In den Geweben von MLD-Patienten wurden erhöhte Konzentrationen von Lysosulfatid (desacyliertes Sulfatid) nachgewiesen. Möglicherweise ist diese cytotoxische Verbindung ein wesentlicher Faktor in der Pathogenese der Erkrankung.<sup>[331]</sup> Makroskopisch wird ein reduziertes Volumen der weißen Substanz registriert; mikroskopisch wird ein Verlust des Myelins festgestellt, eine Reduktion der Oligodendrocyten und das Auftreten metachromatischer Granula.

Die Arylsulfatase A aggregiert bei niedrigeren pH-Werten. Das ASA-Gen wurde kloniert.<sup>[332, 333]</sup> die Inzidenz der Erkrankung wird in der weißen Bevölkerung auf 1:40000 geschätzt, die Frequenz der Leukodystrophie-Allele liegt bei 0,5%.<sup>[329]</sup> Es wurden mehr als dreißig verschiedene Mutationen im ASA-Gen charakterisiert, die zu MLD führen (Übersicht: Lit. [248]). Die molekulare Ursache für atypische Formen der MLD liegt in einer Defizienz des Sulfatid-Aktivators.<sup>[334]</sup> Die MLD kann durch Aktivitätsmessung der Arylsulfatase A gegenüber dem künstlichen Substrat 4-Nitrocatecholsulfat in Leukocyten oder kultivierten Fibroblasten diagnostiziert werden.<sup>[335]</sup> Früher wurde der Nachweis von Sulfatid im Urin oder die metachromatische Färbung von Schwann'schen Zellen in Nervenbiopsien verwendet. Mäuse mit künstlich erzeugter Arylsulfatase-A-Defizienz<sup>[336]</sup> lassen nur ein geringes Ausmaß an neurologischen und neuropathologischen Veränderungen erkennen, obwohl sie biochemisch dem schweren spätinfantilen Phänotyp beim Menschen entsprechen. Die Ursachen dafür sind noch unklar.

### 6.7.1. Multiple Sulfatasedefizienz (Austin'sche Erkrankung)

Zahlreiche natürlich vorkommende Verbindungen aus verschiedenen Stoffklassen enthalten Hydroxygruppen, die als Schwefelsäureester modifiziert sind. Diese Ester werden

durch Sulfatasen gespalten, von denen beim Menschen neun charakterisiert werden konnten. Sie sind – mit Ausnahme der Steroidsulfatase – im Lysosom lokalisiert (Übersicht: Lit. [337, 338]). Bei der multiplen Sulfatase-Defizienz sind die Aktivitäten von allen bekannten Sulfatasen stark erniedrigt. Der Phänotyp der Patienten ist klinisch und pathologisch durch die Kombination von Symptomen einer MLD und einer Mucopolysaccharidose charakterisiert (Übersicht: Lit. [325]). Im Urin werden Dermatansulfat und Heparansulfat ausgeschieden, neben den MLD-Symptomen treten Skelettdeformationen, Hepatosplenomegalie und kraniofaciale Abnormalitäten auf. Der primäre Defekt der multiplen Sulfatasedefizienz ist nicht bekannt, doch da die Expression von Sulfatase-cDNAs in Fibroblasten von MSD-Patienten zu Enzymproteinen mit reduzierter katalytischer Aktivität führt, haben von Figura und Mitarbeiter auf eine defekte co- oder posttranslationale Modifikation als Ursache der MSD geschlossen.<sup>[339]</sup> Sie konnten in MSD-Zellen eine Proteinmodifikation in den Arylsulfatasen A und B nachweisen. Es handelt sich dabei um die Umwandlung eines Cystein- in einen Formylglycin-Rest.<sup>[340]</sup> Diese neu entdeckte Modifikation ist offenbar für die verminderte katalytische Aktivität der Sulfatasen verantwortlich. Eine Darstellung des Sachverhalts ist in dieser Zeitschrift erschienen.<sup>[341]</sup>

## 6.8. Gaucher'sche Erkrankung

Die Gaucher'sche Erkrankung ist die häufigste unter den Sphingolipidosen und durch die Defizienz der  $\beta$ -Glucocerebrosidase und die Akkumulation von Glucosylceramid charakterisiert (Übersicht: Lit. [342]). Die Erkrankung wurde erstmals 1882 von Gaucher beschrieben, die Identifizierung des Speichermaterials gelang Aghion 1934. Die Identität des defekten Enzyms konnte 1965 durch Brady<sup>[343]</sup> und durch Patrick<sup>[344]</sup> geklärt werden. Die Glucocerebrosidase hat als Glycoprotein ein Molekulargewicht von 59 bis 67 kDa und besteht aus 497 Aminosäuren. Die komplementäre DNA des Enzyms wurde Mitte der achtziger Jahre kloniert.<sup>[345, 346]</sup> Informationen über das aktive Zentrum der Glucocerebrosidase wurden durch kompetitive, kovalente Inhibitoren des Enzyms gewonnen. Durch Conduritol-B-epoxid (Abbildung 17)<sup>[347]</sup> wird der Aminosäurerest Asp443 markiert.<sup>[348]</sup> Eine Beteiligung dieser Aminosäureseitenkette bei der Glycosidhydrolyse konnte jedoch durch ortsgerichtete Mutagenese ausgeschlossen werden.<sup>[349]</sup> Dagegen handelt es sich bei Glu340, das durch 2-Desoxy-2-fluorglucopyranose markiert wird, offensichtlich um den nucleophilen Rest bei der katalytischen Glycosidhydrolyse.<sup>[350]</sup>

Die Gaucher'sche Erkrankung wird in drei Typen, I–III, klassifiziert. Die weitaus häufigste, nichtneuronopathische Form I ist klinisch heterogen und hat eine Inzidenz von 1 in 50000 bis 200000 Geburten. Sie weist unter Ashkenasi-Juden eine erhöhte Häufigkeit auf; die Überträgerfrequenz liegt bei bis zu 1 in 10.<sup>[351]</sup> Betroffen ist in erster Linie das reticuloendotheliale System. In der selteneren, akuten neuronopathischen Form II der Erkrankung ist auch das Nervensystem betroffen. Eine intermediäre, juvenile Form III wird auch als subakute neuronopathische Form bezeichnet, bei der die

neurologischen Symptome später einsetzen und sich langsamer entwickeln als bei der Form II. Die Gaucher'sche Erkrankung ist panethnisch; Typ I ist besonders häufig unter Ashkenasi-Juden, und Typ III tritt bevorzugt in der schwedischen Provinz Norrbotten auf.

Obwohl die Defizienz der Glucocerebrosidase in allen Körperzellen existiert, wird der Phänotyp mit Ausnahme der sehr seltenen neuronopathischen Form nur in Makrophagen ausgeprägt, die aufgrund der Phagocytose etwa von Erythrocyten besonders große Mengen von Sphingolipiden abzubauen haben. Die Lipidspeicherung führt zu einer charakteristischen Morphologie der Makrophagen, die als Gaucher-Zellen bezeichnet werden. Das Auftreten der Speicherzellen in Leber, Lymphknoten und Milz bewirkt eine Vergrößerung dieser Organe. Durch Infiltration des Knochenmarks mit Gaucher-Zellen kommt es zu schmerzhaften Knochenschädigungen und zur Verdrängung der blutbildenden Zellen. Die Glucosylceramid-Speicherung wird von einer erhöhten Chitotriosidase-Aktivität im Plasma begleitet, die für diagnostische Zwecke herangezogen werden kann.<sup>[352]</sup>

Vier Mutationen sind für 80 % der gefundenen Defekte verantwortlich (Übersicht: Lit.[353, 248]). Zwei Fälle von Gaucher'scher Erkrankung sind bekannt, die nicht auf das Fehlen der Glucocerebrosidase, sondern auf ein Fehlen des Sphingolipid-Aktivatorproteins SAP-C zurückzuführen sind.<sup>[354–356]</sup> Die Schwere der Erkrankung korreliert mit der verbleibenden Glucocerebrosidase-Aktivität, die in kultivierten Hautfibroblasten von Gaucher-Patienten registriert wurde.<sup>[357]</sup> Besonders hohe Glucocerebrosidase-Aktivitäten werden in Fibroblasten und in der Placenta gemessen, aber auch in den für pränatale Diagnosen wichtigen Chorionvilli und kultivierten Amnionzellen. Die adulte Form der Gaucher'schen Erkrankung (Typ I) ist zur Zeit die einzige Sphingolipid-Speicherkrankheit, bei der eine kausale Therapie durchgeführt werden kann.<sup>[358–360]</sup> Dabei wird Glucocerebrosidase verwendet, die aus menschlicher Placenta oder gentechnisch gewonnen wurde und mit einer Targeting-Information für den Mannoserezeptor auf Makrophagen versehen wurde. Die Behandlung bewirkt eine Normalisierung der Blutparameter und die Gewichtsreduktion von Leber und Milz. Bei Patienten der schweren infantilen Form kann eine Knochenmarktransplantation durchgeführt werden. Tiermodelle der infantilen Gaucher'schen Erkrankung, Typ II<sup>[361]</sup> sowie II und III,<sup>[362]</sup> wurden beschrieben. Künstliche Modellsysteme der Gaucher'schen Erkrankung wurden mit Conuritil-B-epoxid generiert.<sup>[363, 364]</sup>

## 6.9. Krabbe'sche Erkrankung

Die Krabbe'sche Erkrankung ist auf das Fehlen der lysosomalen Galactocerebrosidase zurückzuführen (Übersicht: Lit.[365]). Zusammen mit der metachromatischen Leukodystrophie gehört sie zu den klassischen Myelin-Erkrankungen, da in beiden Fällen der Abbau von Glycolipiden, Galactosylceramid bzw. Sulfatid gestört ist, die für die Myelinhülle von Nervenzellen charakteristisch sind. Der Enzymdefekt, der die Globoidzell-Leukodystrophie auslöst, wurde 1970 aufgeklärt.<sup>[366]</sup>

Das Krankheitsbild ist durch neurologische Symptome geprägt, die in der Regel innerhalb der ersten sechs Lebensmonate einsetzen; die Patienten sterben vor Vollendung des zweiten Lebensjahres. Auch adulte Krankheitsformen sind bekannt. Die weiße Substanz des Zentralnervensystems und der peripheren Nerven ist der ausschließliche Ort, an dem die Erkrankung klinisch und pathologisch erkennbar ist. Im Endstadium enthält die weiße Substanz nahezu kein Myelin mehr. Oligodendroglia sind durch Astrocyten und abnormale Globoidzellen ersetzt. Im Unterschied zu allen anderen Speicherkrankheiten akkumuliert das Substrat des defekten Enzyms nicht in den besonders betroffenen Zellen. Die Spiegel an Galactosylceramid sind sogar unverändert oder niedriger als normal, nur der relative Anteil von Galactosylceramid an den Myelinlipiden ist erhöht. Die Ursache dafür liegt in einer schnellen Zerstörung der myelinbildenden Oligodendrocyten. Daher bleibt die Myelinisierung unvollständig, die zudem von einer raschen Entmyelinisierung begleitet wird, so daß es nicht zu einer Anhäufung des Galactosylceramids kommen kann. Der sogenannten Psychosin-Hypothese zufolge sind erhöhte Konzentrationen des nicht mehr abbaubaren Galactosylsphingosins (Psychosin), einem lytischen Metaboliten des Sphingolipid-Stoffwechsels, für den raschen Untergang der Oligodendrocyten und die Pathologie der Erkrankung verantwortlich.<sup>[367, 368]</sup>

Die Galactocerebrosidase ist ein membrangebundenes Protein und hat ein Molekulargewicht von ca. 50 kD.<sup>[369]</sup> Die cDNA<sup>[370, 371]</sup> und das Gen<sup>[372]</sup> der Galactocerebrosidase konnten kürzlich kloniert werden. Ein authentisches Tiermodell der Erkrankung ist die Twitcher-Maus.<sup>[373]</sup> Die Galactosylceramidase-cDNA der Maus wurde kloniert und die Twitcher-Mutation als vorzeitiges Stop-Codon in der Mitte der codierenden Sequenz identifiziert.<sup>[374]</sup>

## 6.10. Farber'sche Erkrankung

Die Farber'sche Erkrankung wird durch eine Defizienz der sauren Ceramidase und der dadurch bedingten Akkumulation von Ceramid in verschiedenen Geweben verursacht (Übersicht: Lit.[375]). Es handelt sich um eine seltene, autosomal rezessiv vererbte Erkrankung; von etwa 43 Patienten wurde berichtet. Durch Zellkultur-Studien konnte nachgewiesen werden, daß die Sphingolipid-Aktivatorproteine SAP-D<sup>[376]</sup> und auch SAP-C<sup>[447]</sup> für den lysosomalen Ceramid-Abbau essentiell sind. Die Erkrankung wurde zuerst 1947 beschrieben. S. Faber berichtete auf einer Tagung der Mayo-Stiftung vom Fall eines 14 Monate alten Mädchens mit Symptomen, die an die Niemann-Pick'sche Erkrankung erinnern, doch bestanden histologische Abweichungen.<sup>[375]</sup> Wegen des augenscheinlichsten Symptoms, des Auftretens subkutaner lipidhaltiger Knoten, wurde die Erkrankung als Lipogranulomatose bezeichnet. Die Patienten entwickeln im Kindesalter eine schmerzhafteste Schwellung der Gelenke und später subkutane Knoten. Charakteristisch ist auch das Auftreten einer fortschreitenden Heiserkeit als Folge einer Kehlkopfveränderung sowie Schluckbeschwerden. Je nach Lokalisation der Lipogranulome können Organe wie Lunge, Herz und Niere in ihrer Funktion beeinträchtigt werden.

Fehlfunktionen im Bereich des Nervensystems sind bei den meisten protrahierten Formen geringfügig. Die Krankheit führt innerhalb der ersten Jahre zum Tod, aber ein längerer Verlauf ist möglich. Die Speichersubstanz wurde 1969 als Ceramid<sup>[377]</sup> und der zugrundeliegende Defekt als Defizienz der sauren Ceramidase identifiziert.<sup>[378, 379]</sup> Das Enzym haben wir aus menschlichem Urin isoliert.<sup>[380]</sup> Es handelt sich um ein Heterodimer aus einer  $\alpha$ -Untereinheit von 13 kDa und einer glycosylierten  $\beta$ -Untereinheit von 40 kDa (Abbildung 23). Die komplementäre DNA wurde kloniert;<sup>[381]</sup> sie codiert für beide Untereinheiten.

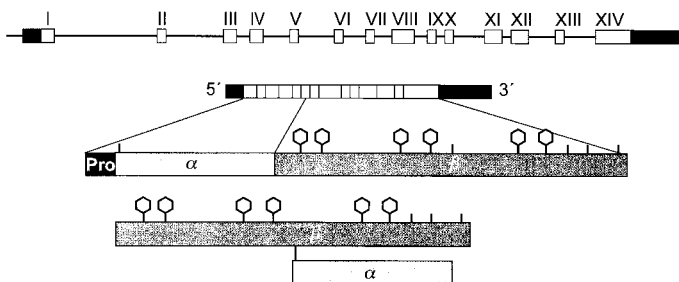


Abbildung 23. Gen, cDNA und Prozessierung der sauren Ceramidase.<sup>[449]</sup> I–XIV: Exons; Sechsecke: genutzte N-Glycosylierungsstellen.

Nach dem klinischen Bild werden verschiedene Subklassen der Farber'schen Erkrankung unterschieden. Alle Patienten weisen eine Lipidspeicherung in den Nieren auf, während Art und Umfang der Speicherung in den übrigen Geweben und Organen variieren können. Bei sechs der sieben Klassen liegt die Ursache der Erkrankung in einem Defekt der lysosomalen sauren Ceramidase. Der siebente Subtyp geht auf eine Mutation im Startcodon der Sphingolipid-Aktivatorprotein-Vorstufe zurück.<sup>[401]</sup> Dadurch fallen die von der sauren Ceramidase als Cofaktoren benötigten SAP-C und SAP-D zusammen mit zwei weiteren Aktivatoren aus. Biochemisch ist für die Farber'sche Erkrankung die Speicherung von Ceramid in Gewebe<sup>[377]</sup> und die erhöhte Sekretion von Ceramid im Urin der Patienten<sup>[382]</sup> charakteristisch. In subkutanen Knoten kann der Ceramidanteil bis zu 20 % der Gesamtlipide betragen, auch der Ceramidgehalt in der Niere ist erhöht. Die Hydrolyse des Ceramids wird noch von zwei anderen, nicht-lysosomalen Ceramidasen katalysiert, von denen eine ihr Aktivitätsoptimum im neutralen<sup>[383]</sup> und die andere im alkalischen Milieu hat.<sup>[379]</sup> Die drei Ceramidasen sind in verschiedenen Geweben verteilt und weisen eine unterschiedliche intrazelluläre Topologie sowie Substratspezifität auf.<sup>[375, 384]</sup> Daher sind die neutrale und die alkalische Ceramidase nicht in der Lage, die bei der Farber'schen Erkrankung defekte saure, lysosomale Ceramidase zu ersetzen.<sup>[378]</sup>

Der Verlauf der Farber'schen Erkrankung korreliert mit der Höhe des lysosomalen Ceramid-Abbaus, wie Untersuchungen in kultivierten Fibroblasten von Farber-Patienten ergaben.<sup>[385]</sup> Dabei ist die Restaktivität des Enzyms bei Farber-Patienten höher als die anderer defekter Enzyme bei den entsprechenden anderen Sphingolipidosen; offenbar müssen größere Mengen von Ceramid aus dem Sphingolipid-Abbau umgesetzt werden, so daß schon eine geringfügige Beeinträchtigung der Enzymaktivität zur Substratspeicherung führt.

Als ersten molekularen Defekt im Gen eines Farber-Patienten haben wir eine homoallelische Punktmutation identifiziert, die einen Thr222Lys-Austausch in der  $\beta$ -Untereinheit der sauren Ceramidase bewirkt.<sup>[381]</sup> Zur Diagnose wird die Aktivität der sauren Ceramidase unter Verwendung der synthetischen Substrate N-[1-<sup>14</sup>C]-Oleoylsphingosin und N-[1-<sup>14</sup>C]-Lauroylsphingosin in Gegenwart von Detergentien<sup>[386]</sup> bestimmt oder die Ceramidspeicherung nach biosynthetischer Markierung in kultivierten Fibroblasten analysiert.<sup>[387]</sup> Daneben werden morphologische Studien an Biopsie- und Autopsiematerial durchgeführt.

## 6.11. Defizienz von Sphingolipid-Aktivatorproteinen

Der Abbau von Sphingolipiden mit kurzen Oligosaccharidketten erfordert die Gegenwart kleiner nichtenzymatischer Proteine, der sogenannten Sphingolipid-Aktivatorproteine (Abschnitt 5.5). Fünf dieser kleinen, hitzestabilen Proteine sind bisher bekannt, der GM2-Aktivator und die vier Sphingolipid-Aktivatorproteine SAP-A bis -D, die durch proteolytisches Prozessieren aus einer gemeinsamen Vorstufe hervorgehen (Abbildung 24). Das GM2-Aktivatorprotein

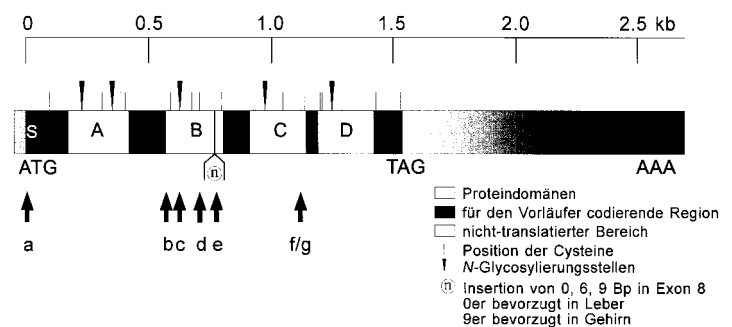


Abbildung 24. Struktur der SAP-Vorläufer-cDNA. Die cDNA des SAP-Vorläufers codiert für eine Sequenz von 524 Aminosäuren (bzw. 527 Aminosäuren)<sup>[388]</sup> einschließlich eines Signalpeptids (S) von 16 Aminosäuren für den Eintritt in das ER.<sup>[227]</sup> Die vier Domänen des Vorläufers, SAP-A bis -D, entsprechen den reifen, in menschlichem Gewebe gefundenen Proteinen: A = SAP-A oder Saposin A; B = SAP-B, auch SAP-1, Sulfatid-Aktivatorprotein oder Saposin B; C = SAP-C, auch SAP-2, Saposin C oder Glucosylceramidase-Aktivatorprotein; D = SAP-D, Saposin D oder Komponente C. ATG = Translationsstart; TAG = Translationsstop; AAA = Polyadenylierungsregion. Die Positionen der bekannten Mutationen (homoallelisch) sind durch Pfeile gekennzeichnet. a: A1T (Met1Leu);<sup>[401]</sup> b: g-t-Transversion der 3'-Acceptor-Spleiß-Stelle am Übergang von Intron e zu Exon 6;<sup>[440]</sup> c: C650T (Thr217Ile);<sup>[441, 442]</sup> d: G722C (Cys241-Ser);<sup>[388]</sup> e: 33-BP-Insertion nach G777 (elf zusätzliche Aminosäuren nach Met259);<sup>[443, 444]</sup> f: G1154T (Cys385Phe);<sup>[355]</sup> g: T1155G (Cys385Gly).<sup>[356]</sup>

wurde bereits im Zusammenhang mit den Mechanismen der lysosomalen Verdauung und der AB-Variante der GM2-Gangliosidose behandelt. Die Zahl der Patienten, bei der ein Sphingolipid-Aktivatorprotein-Defekt identifiziert werden konnte, ist klein, und das klinische Bild einer solchen Aktivatordefizienz bleibt unvollständig. Bei den Aktivatoren, die aus dem SAP-Vorläufer hervorgehen, kennt man bislang einen Fall von SAP-Vorläufer-Defizienz sowie isolierte Defekte von SAP-B oder SAP-C. Die Struktur des SAP-Vorläufer-Gens ist bekannt.<sup>[388, 389]</sup>

Nach dem bereits erwähnten SAP-B (Abschnitt 5.5) wurden die Aktivatoren SAP-C,<sup>[239]</sup> SAP-D<sup>[236]</sup> und schließlich SAP-A isoliert.<sup>[390]</sup> SAP-C stimuliert die Aktivität der Glucosylceramidase gegenüber natürlichen und synthetischen Substraten. Anders als bei SAP-B bindet das Glycoprotein SAP-C an das Enzym und stimuliert es direkt.<sup>[391–393]</sup> Es hat ein Molekulargewicht von 20 kDa<sup>[239]</sup> und stimuliert in vitro den Abbau von Galactosylceramid durch die Galactosylceramid- $\beta$ -Galactosidase<sup>[394]</sup> und von Sphingomyelin durch die saure Sphingomyelinase.<sup>[394–396]</sup>

Einblicke in die physiologische Funktion der SAPs konnten erst nach Untersuchungen an Patienten gewonnen werden, denen ein bestimmtes SAP fehlt. So zeigen SAP-B-defiziente Patienten<sup>[334, 397]</sup> eine drastische Speicherung von Sulfatid und das Krankheitsbild einer metachromatischen Leukodystrophie. Zudem scheiden diese Patienten erhöhte Mengen an Globotriaosylceramid und Digalactosylceramid im Urin aus.<sup>[398]</sup> Das Fehlen von SAP-C äußert sich in einer massiven Speicherung von Glucosylceramid; das klinische Bild der Patienten entspricht einer juvenilen Variante der Gaucher'schen Erkrankung.<sup>[354, 399]</sup> Bis heute ist keine Krankheit bekannt, die durch den alleinigen Ausfall oder Defekt von SAP-A bzw. SAP-D verursacht wird.

Als besonders bemerkenswert erwies sich der Fall eines im Alter von 16 Wochen verstorbenen Patienten sowie der seines fötalen Bruders, die morphologisch Gaucher-ähnliche Speicherzellen im Knochenmark und eine massive lysosomale Speicherung von Glucosylceramid, Lactosylceramid und Ceramid in der Leber aufwiesen.<sup>[400]</sup> Die Aufklärung des molekularen Defekts gelang uns 1991 mit der Entdeckung einer homoallelischen Mutation des Startcodons des SAP-Vorläufers von ATG zu TTG.<sup>[401]</sup> Diese bedingt einen vollständigen Ausfall des Vorläuferproteins sowie aller vier SAPs A–D. Die Analyse dieses Falles lieferte entscheidende Stützen für unsere Hypothese zur Funktion der Aktivatorproteine und zur Topologie der Endocytose und lysosomalen Verdauung. Wie erwartet speicherten die Gewebe von Patient und Fötus erhöhte Mengen an allen Glycolipiden mit kurzen Oligosaccharidketten (Abschnitt 5.5): neutrale Glycolipide wie Mono-, Di-, Tri- und Tetrahexosylceramide in Leber, Niere und kultivierten Hautfibroblasten.<sup>[402, 403]</sup> Sulfatid wurde in der Niere und freies Ceramid in Leber und Niere gespeichert. Die Menge der Ganglioside GM3 und GM2 war in der Leber, nicht aber im Hirn erhöht. Die Menge der Phospholipide blieb, soweit untersucht, normal. Auch der Sphingomyelinstoffwechsel war bei diesen Patienten nicht betroffen.<sup>[402]</sup> Morphologisch fiel die Anhäufung der von uns postulierten multivesikulären Körperchen auf (siehe Abbildung 18).<sup>[402]</sup> Diese ließen sich auch in kultivierten Fibroblasten des Patienten nachweisen und als pathologisch veränderte Lysosomen unter dem Elektronenmikroskop identifizieren.<sup>[229]</sup> Zufüttern des fehlenden Vorläuferproteins konnte sowohl die Speicherung der Glycolipide als auch das Auftreten der intralysosomalen Speichervesikel aufheben.<sup>[229]</sup> Gentechnisch veränderte Mäuse, die homozygot für das inaktivierte Gen des SAP-Vorläuferproteins sind, entsprechen in ihrem Phänotyp den beim Menschen beobachteten Symptomen.<sup>[404]</sup>

## 6.12. Pathogenese der Sphingolipidosen

Die Sphingolipidosen gehören zu den Erbkrankheiten, über deren biochemische Grundlagen und primäre Ursachen sehr viele Erkenntnisse vorliegen. Die Natur der Speichersubstanzen und die zugrundeliegenden Defekte auf Protein- und Nucleinsäureebene sind zu großen Teilen bekannt. Anders verhält es sich mit ihrer Pathogenese, bei der eine Korrelation von Genotyp und Phänotyp nicht ohne weiteres möglich ist. Einerseits können, wie bei vielen anderen Krankheiten, Defekte in ganz verschiedenen Strukturgenen klinisch sehr ähnliche Krankheitsbilder entwickeln. So haben Defekte in den  $\alpha$ -Ketten der Hexosaminidasen A und S, Defekte in den  $\beta$ -Ketten der Hexosaminidasen A und B und Defekte im GM2-Aktivator Krankheitsbilder zur Folge, die früher unter dem Begriff der amaurotischen Idiotie zusammengefaßt wurden.<sup>[263]</sup> Andererseits können verschiedene Mutationen in ein- und demselben Strukturgen zu unterschiedlichen Krankheitsverläufen führen, die manchmal sogar mit verschiedenen Eponymen benannt sind. So sind schwere Verlaufsformen des  $\alpha$ -Iduronidase-Defekts als Hurler'sche und mildere Verlaufsformen als Scheie'sche Erkrankung bekannt.<sup>[337]</sup> Eine  $\beta$ -Galactosidase-Defizienz kann eine GM1-Gangliosidose mit neurologischen Schäden verursachen oder zur Morquio-Typ-B-Erkrankung führen, bei der keine neurologische Beteiligung, sondern vorwiegend eine Skelettdeformation registriert wird.

Sogar Patienten mit identischen Mutationen im gleichen Strukturgen, z.B. in dem der Arylsulfatase A,<sup>[405]</sup> können unterschiedliche klinische Verlaufsformen aufweisen; wahrscheinlich sind diese durch einen jeweils verschiedenen genetischen Hintergrund bedingt. Die Kenntnis der primären Defekte auf DNA-Ebene ist zwar eine notwendige, aber bei weitem keine hinreichende Bedingung zum Verständnis der Pathogenese dieser Erkrankungen. Dies gilt insbesondere für die adulten Verlaufsformen der Sphingolipidosen.<sup>[318]</sup> Trotz ihrer enormen Heterogenität und der nur mittelbaren Verbindung zwischen Genotyp und Phänotyp einer Krankheitsform ist es aber möglich, Genotyp und Phänotyp der Erkrankung zu korrelieren und einige wesentliche Faktoren anzugeben, die die Pathogenese beeinflussen. Ein wesentlicher Faktor ist sicherlich die zelltypische Expression einzelner Sphingolipide. Sie bedingt, daß bei einer Abbaustörung die Speicherung primär in den Zellen und Geweben stattfindet, in denen die Lipidsubstrate des mutierten Enzymschritts vorwiegend synthetisiert (z.B. komplexe Ganglioside in Neuronen) oder von denen sie durch Phagocytose aufgenommen werden (z.B. Glucosylceramidspeicherung in Makrophagen bei der Gaucher'schen Erkrankung).

Ein weiterer Faktor ist die Art des Speichermaterials. Es wird angenommen, daß Sphingolipide im allgemeinen nicht toxisch sind und ihre Akkumulation von den Zellen innerhalb weiter Grenzen toleriert wird. Erst durch mechanische Schädigung wird die Zellfunktion gestört. Eine Abbaustörung kann jedoch auch zur Anhäufung morphogenetisch aktiver Verbindungen führen<sup>[406]</sup> oder die Ansammlung toxischer Lysoglycolipide bedingen.<sup>[365]</sup> Ein herausragender Faktor ist die Restaktivität des mutierten abbauenden Systems im Lysosom. An zahlreichen Beispielen konnte belegt werden,

daß das unterschiedliche Ausmaß einer Abbaustörung verschiedene klinische Verlaufsformen einer Krankheit bewirkt. Dabei korreliert die gemessene Restaktivität des betroffenen Enzyms mit der Verlaufsform der Krankheit. Bei Neurolipidosen ist ein Auftreten der ersten Symptome zu erwarten, wenn die Funktion der am stärksten betroffenen Nervenzellen durch die Speicherung beeinträchtigt wird. So wird im Tiermodell der AB-Variante der GM2-Gangliosidose nur eine definierte Population von Nervenzellen registriert, in denen GM2 akkumuliert.<sup>[291]</sup> Die Theorie der Restaktivität erklärt auch, daß minimale Veränderungen der Restenzymaktivität große Änderungen im Substratumsatz bewirken können.

### 6.12.1. Theorie der Restenzymaktivität

Die Höhe der enzymatischen Restaktivität ist ein wesentlicher pathogenetischer Faktor. Durch verschiedene Mutationen und pathobiochemische Mechanismen kann die Aktivität des abbauenden Systems auf unterschiedliche Restspiegel innerhalb des lysosomalen Kompartiments abgesenkt werden. Die Höhe dieser Restspiegel sollte einen direkten Einfluß auf die Pathogenese klinischer Verlaufsformen haben. Das jeweils mutierte Protein und die dadurch bedingten maximalen Aktivitäten ( $V_{\max}$ ) des abbauenden Systems bilden ein entscheidendes Bindeglied zwischen Genotyp und Phänotyp der jeweiligen Krankheitsform.

Ausgehend von der Michaelis-Menten-Gleichung haben wir die Substratkonzentration  $[S]_{\text{eq}}$  innerhalb des Lysosoms unter den Bedingungen des Fließgleichgewichts als Funktion der Restenzymaktivität berechnet.<sup>[407]</sup> Die Substratkonzentration  $[S]_{\text{eq}}$  hängt im Fließgleichgewicht näherungsweise von nur zwei Faktoren ab [Gl. (1)]: von der Einstromgeschwindigkeit  $v_i$  der Substrate in das Lysosom und von den enzymkinetischen Parametern  $K_M$  und  $V_{\max}$  des abbauenden Enzyms.

$$[S]_{\text{eq}} = K_M / (V_{\max} / v_i - 1) \quad (1)$$

In normalen Zellen liegt die Substratkonzentration in der Regel weit unterhalb des Wertes der Michaelis-Menten-Konstante  $K_M$  des abbauenden Enzyms. Die  $K_M$ -Werte lysosomaler Enzyme liegen im millimolaren Bereich. Ein Absinken der Enzymaktivität auf 20 % bis 50 % des Normalwertes beeinflusst die Umsatzgeschwindigkeit  $v$  noch nicht, da die verringerte Enzymaktivität durch eine erhöhte Substratkonzentration und damit eine größere Substratsättigung des Enzyms kompensiert wird (Abbildung 25). Das Verhältnis

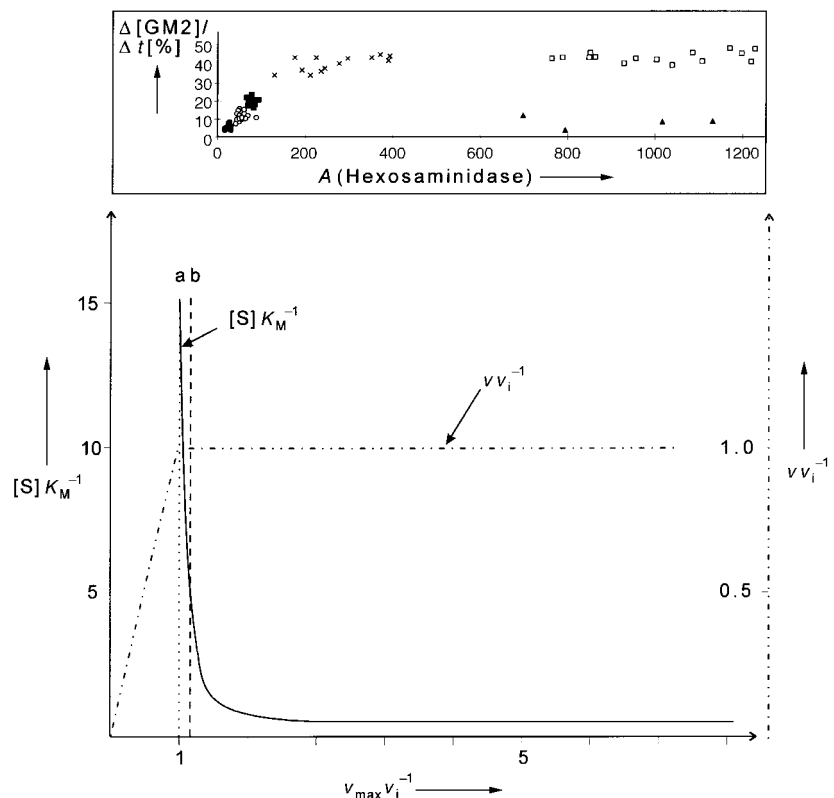


Abbildung 25. <sup>[223]</sup> Restaktivität eines mutierten Enzyms und Umsatz seines Substrats in den Lysosomen.<sup>[407]</sup> Die Substratkonzentration  $[S]$  ist als Vielfaches der Michaeliskonstante  $K_M$ , die Umsatzgeschwindigkeit  $v$  und die maximal erreichbare Enzymaktivität  $V_{\max}$  sind als Vielfache der Einstromgeschwindigkeit  $v_i$  dargestellt. — Substratgleichgewichtskonzentration  $[S] K_M^{-1}$ ; ●—● Umsatzgeschwindigkeit des Substrats  $v v_i^{-1}$ ; ●●● Kritischer Schwellenwert der Enzymaktivität (a); ——— Kritischer Schwellenwert (b) der Enzymaktivität unter Berücksichtigung begrenzter Substratlöslichkeit. Oben: Restaktivität  $A$  der Hexosaminidasen gegenüber GM2 in vitro (angegeben ist gespaltenes GM2 in  $\text{pmol h}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{AU}^{-1}$ ; AU = Aktivatoreinheit wie in Lit. [280] definiert) und Umsatz  $\Delta[\text{GM2}]/\Delta t$  des Gangliosids GM2 in Fibroblastenkulturen von Probanden und Patienten mit GM2-Gangliosidose.<sup>[272]</sup> Hautfibroblasten von normalen Probanden und Patienten mit verschiedenen Formen der GM2-Gangliosidose und deren Überträger wurden drei Tage mit radioaktiv markiertem GM2 in Kultur beladen. Dann wurden die Zellen geerntet, in Wasser homogenisiert und folgende drei Parameter bestimmt: a) Gesamteinbau des Substrats GM2. b) Prozentualer Anteil des abgebauten GM2. c) Aktivität der Hexosaminidase A gegenüber GM2 in Gegenwart des GM2-Aktivators. ●  $\alpha$ -Ketten-Defekt (Variante B der GM2-Gangliosidose oder Tay-Sachs'sche Erkrankung), ● infantile Form; ○  $\alpha$ -Ketten-Defekt, juvenile Form; ■  $\alpha$ -Ketten-Defekt, adulte Form; ▲ Aktivator-Defekt (Variante AB der GM2-Gangliosidose). Gesunde Probanden: × Überträger der GM2-Gangliosidose; □ normale Kontrollen.

$v/v_i$  bleibt konstant; diese Situation wird bei heterozygoten Überträgern einer derartigen Erbkrankheit angetroffen. Dieser Kompensationsmechanismus funktioniert so lange, bis die maximale Abbauaktivität des mutierten Enzyms unter den Wert des Substrat-Einstroms in das Lysosom sinkt. Bei diesem Schwellenwert ( $V_{\max}^{\text{mut}}/v_i = 1$ ) liegen alle Enzymmoleküle als Enzym-Substrat-Komplex vor; ein Absinken der Restenzymaktivität auf diesen theoretischen Schwellenwert führt aber noch nicht zu einer irreversiblen Substrat-Akkumulation. Dies erklärt, warum Probanden mit Pseudodefizienzen, beispielsweise mit einem Verlust von bis zu 90 % der Aktivität der  $\beta$ -Hexosaminidase A oder der Arylsulfatase A, nicht erkranken. Erst das Absinken der Enzymaktivität unter den kritischen Schwellenwert verursacht die Speicherung des entsprechenden Lipid-Substrates, da nur noch ein Teil des anfallenden Substrates abgebaut werden kann.

Dieses Modell wurde durch Substratfluß- und Enzymaktivitätsmessungen an Hautzellen in Kultur von verschiedenen Patienten mit GM2-Gangliosidose und metachromatischer Leukodystrophie<sup>[272]</sup> sowie anderen Sphingolipidosen überprüft.<sup>[256, 318, 319, 357, 385]</sup> Danach sinkt der Substratfluß wie erwartet erst unterhalb eines Schwellenwertes linear mit abfallender Enzymaktivität ab. Patienten der klinisch heterogenen adulten Verlaufsform haben einen deutlich höheren Umsatz der Speichersubstanz als Patienten der klinisch anders ausgeprägten juvenilen Form. Letztere wiederum zeigen einen höheren Umsatz als die Patienten der klinisch wiederum anders ausgeprägten infantilen Verlaufsform der Krankheit. Geringere Unterschiede in der restlichen Enzymaktivität entsprechen dabei deutlichen Differenzen im jeweiligen Stoffwechselfluß des Substrats.

### 6.13. Molekulare Diagnostik: metabolische, enzymatische und genetische Verfahren

Die Diagnose der Sphingolipidosen beruhte anfänglich auf klinischen und pathologischen Befunden. Später wurde auf der Basis des biochemisch identifizierten Speichermaterials die Erkrankung diagnostiziert. Der Schwerpunkt heutiger Diagnostik liegt in der Bestimmung der enzymatischen Aktivität einzelner hydrolytischer Enzyme.<sup>[408, 409]</sup> Als Enzymquellen werden klinisch leicht zugängliche Präparationen von Serum, Leukocyten, kultivierten Hautfibroblasten oder Biopsiematerial verwendet. Für pränatale Diagnosen werden Enzymaktivitäten in Amnionzellen oder Chorionvilli bestimmt. Zur Diagnose von Erkrankungen, die auf der Defizienz enzymatisch nicht aktiver Sphingolipid-Aktivatorproteine beruhen, sind metabolische Verfahren unerlässlich. Die Diagnose aufgrund einer DNA-Analyse ist möglich, sofern die Mutationen innerhalb der Familie des Patienten bekannt sind.

Zur Messung der enzymatischen Aktivität ist Serum eine besonders leicht zugängliche Enzymquelle, aus der die Aktivitäten einiger, aber nicht aller Hydrolasen bestimmt werden können. Nachteilig ist, daß die Aktivitätsspiegel lysosomaler Enzyme im Serum im allgemeinen niedriger sind als in zellulären Quellen und daß die Stabilität, vor allem von mutierten Proteinen, herabgesetzt sein kann. Blutplasma kommt als Enzymquelle normalerweise nicht in Frage, da lysosomale Hydrolasen durch Antikoagulantien gehemmt werden können. Leukocyten sind eine verlässliche und leicht zu präparierende Enzymquelle. Für manche Fragestellungen ist es vorteilhaft, Lymphocyten zu verwenden, die aufgrund ihrer zellulären Homogenität eine geringere Streuung der Meßwerte aufweisen. Kultivierte Hautfibroblasten sind eine weitere geeignete Enzymquelle. Da lysosomale Hydrolasen in der Regel nur eine geringe Substratspezifität erkennen lassen, kann ihre Aktivität nicht nur mit den oft nur schwer handhabbaren natürlichen Substraten, sondern auch mit synthetischen Substraten (Abbildung 26) bestimmt werden, die günstige fluorogene oder chromogene Eigenschaften aufweisen.<sup>[408]</sup>

Eine weitere diagnostische Absicherung bildet die Demonstration der Substratspeicherung in kultivierten Patientenzel-

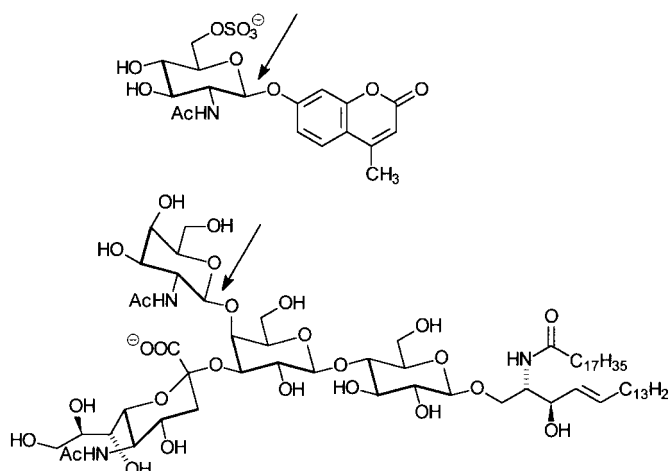


Abbildung 26. Struktur von GM2 und dem synthetischen Substrat 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-N-acetylgalactosamin-6-sulfat. Der Pfeil bezeichnet jeweils die Bindung, die von der  $\beta$ -Hexosaminidase A – bei GM2 in Gegenwart von GM2-Aktivatorprotein oder Detergens – gespalten wird.

lennach der Beladung mit radioaktiv markiertem Substrat oder katabolen Substratvorstufen. Zur Diagnose der Farber'schen Erkrankung beispielsweise kann der Abbau von Ceramid<sup>[410, 411]</sup> oder von Ceramidvorstufen wie Sulfatid<sup>[410, 412, 413]</sup> und Sphingomyelin<sup>[414]</sup> untersucht werden. Solche Lipidbeladungsstudien können hohe Abbaugeschwindigkeiten des endogenen Ceramids trotz bestehender Farber'scher Erkrankung nachweisen. Dies wird den z.T. hohen Restaktivitäten der mutierten sauren Ceramidase und dem nicht-lysosomalen Abbau der entsprechenden Lipide zugeschrieben.<sup>[414]</sup>

Der Vergleich biosynthetisch markierter Sphingolipide aus Patientenzellen mit denen aus Normalzellen ermöglicht ebenfalls den Nachweis einer Sphingolipid-Speicherung. Mit in 3-Position radioaktiv markiertem Serin lassen sich die zellulären Sphingolipide biosynthetisch markieren. Sphingolipide, deren Abbau gestört ist, behalten nach längeren „Chase“-Perioden eine stärkere Markierung als solche, deren Umsatz nicht beeinträchtigt ist. Voraussetzung ist, daß ein Zelltyp untersucht wird, in dem das nicht abbaubare Lipid auch in nennenswertem Umfang gebildet wird. Ein Vorteil der Methode besteht darin, daß sich die Enzyme und Lipide in ihrer natürlichen, topologisch korrekten subzellulären Umgebung befinden. Wird eine Lipidspeicherung mit diesem Zellsystem detektiert, so korreliert deren Intensität direkt mit dem Ausmaß des Defektes im entsprechenden Enzymsystem. Dazu gehört auch die Detektion des Ausfalls eines Cofaktors, dessen Mangel mit herkömmlichen Diagnoseverfahren oft übersehen wird. Bei Patienten, deren Enzyme eine hohe Restaktivität aufweisen, ist die biosynthetische Markierung einer direkten Bestimmung der Enzymaktivität jedoch unterlegen.

### 6.14. Therapie

Mit Ausnahme der adulten Form der Gaucher'schen Erkrankung ist eine kausale Therapie von Sphingolipidosen gegenwärtig nicht möglich. Das Ziel verschiedener Thera-

pieansätze ist es, die bei einer Sphingolipidose defekte Abbaukapazität innerhalb des Lysosoms wiederherzustellen. Dies kann auf direktem Wege durch Enzyersatztherapie geschehen oder aber indirekt durch Gentherapie oder Organtransplantation. Ziel der Enzyersatztherapie bei Sphingolipidosen ist es, durch exogen zugeführtes Protein die fehlende enzymatische Aktivität innerhalb der Lysosomen der Zielzellen zu restaurieren und damit bestehende Substratspeicherungen aufzuheben oder eine weitere Substrat-Akkumulation zu verhindern.

Das Konzept, Sphingolipidosen durch die exogene Gabe des defekten lysosomalen Enzyms zu behandeln, geht auf de Duve zurück.<sup>[415]</sup> Die Haupthindernisse, die dem im Wege stehen, sind zum einen die zentralnervöse Lokalisation der Zielzellen, in denen bei der Mehrzahl der Sphingolipidosen die Substratspeicherung aufgehoben werden muß. Zum anderen standen lange Zeit keine Techniken zur Verfügung, um die benötigten Proteine in ausreichender Menge und Reinheit gewinnen zu können. Das letztere Problem kann durch die Verfügbarkeit der cDNA-Sequenzen von lysosomalen Proteinen für die rekombinante DNA-Technologie überwunden werden. Weitere Probleme sind die Stabilität und Immunogenität der verwendeten Präparate, ihre Halbwertszeit im menschlichen Körper, die Aufnahme durch die entsprechenden Zielorgane und nicht zuletzt die Kosten einer solchen Therapie. Da von einer ausreichenden Überwindung der Blut-Hirn-Schranke<sup>[416]</sup> durch systemisch verabreichtes Protein gegenwärtig nicht ausgegangen werden kann, bleibt die Enzyersatztherapie zunächst auf Erkrankungen ohne primäre Beeinträchtigung des Zentralnervensystems beschränkt.

Die erste Sphingolipidose, die erfolgreich durch Enzyersatztherapie behandelt werden konnte, ist die adulte Form der Gaucher'schen Erkrankung (Typ I).<sup>[358]</sup> Dies ist möglich, weil die Speicherung von Glucosylceramid hauptsächlich auf Kupffer-Zellen (Makrophagen der Leber) und andere Makrophagen beschränkt ist, die Mannose-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren und über die exogen gegebene, lysosomal gerichtete Protein aufgenommen werden kann.<sup>[417]</sup> Zu einer Beteiligung des Nervensystems kommt es nicht, da die Patienten noch über eine ausreichend hohe Restaktivität der defekten Glucosylceramidase verfügen. Anfängliche Schwierigkeiten bei der Behandlung der Gaucher'schen Erkrankung beruhten darauf, daß die infundierten Enzympräparate zwar von der Leber aufgenommen wurden, allerdings von Hepatocyten, die ein aus menschlicher Placenta gewonnenes Enzympräparat über den Asialoglycoprotein-Rezeptor internalisierten. Die Zielzellen des Enzyms, die Kupffer-Zellen, wurden durch das Enzym nicht erreicht. Wird dagegen ein enzymatisch modifiziertes Enzympräparat verabreicht, das durch partiellen Glycosidaseverdau terminale Mannosereste auf seiner Oberfläche exponiert, so wird es von Mannoserezeptoren auf den Makrophagen internalisiert und ist in der Lage, einige der Beschwerden von Gaucher-Patienten zu lindern. Dazu gehört die Rückbildung von Organvergrößerungen. Problematisch bleiben die Rückbildung von Skelettdeformationen, die nur sehr langsam erfolgt, und die neuronopathischen Formen II und III. Bei Typ III wird zwar eine Verschlechterung des neurologischen Zustands der Patienten verhindert, eine Verbesserung wird aber nicht erreicht.<sup>[358, 360]</sup>

Über Antikörperbildung wurde berichtet, eine Neutralisation des Enzyms fand aber offenbar nicht statt.<sup>[418]</sup>

#### 6.14.1. Knochenmarktransplantationen

Das wesentliche Hindernis bei der Enzyersatztherapie von neuronopathischen Sphingolipidosen, die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke, wäre durch Knochenmarktransplantation prinzipiell überwindbar. Makrophagen des Knochenmarks können die Blut-Hirn-Schranke in geringem Umfang passieren und als Mikroglia im Gehirn als Enzymquelle wirken.<sup>[419]</sup> Obwohl in Einzelfällen von erfolgreichen Versuchen berichtet wurde, bildet die Knochenmarktransplantation gegenwärtig aber noch kein erfolgreiches Therapiekonzept zur Behandlung der Sphingolipidosen. Knochenmark-Transplantationen an Tiermodellen von Sphingolipidosen<sup>[420, 421]</sup> haben zur Verbesserung neurologischer Symptome und zur Rückbildung neuraler Schäden geführt. Die Lebenserwartung der Twitcher-Maus als Tiermodell der Krabbe'schen Erkrankung wurde durch diese Behandlungsform erhöht, ohne eine Heilung der Tiere erzielen zu können.<sup>[420]</sup> Von einer klinischen Verbesserung von „Late-onset“-Lipidosepatienten (Krabbe'sche Erkrankung, MLD) wurde berichtet, während die Therapie bei infantilen Patienten kontraindiziert ist.<sup>[422]</sup>

#### 6.14.2. Gentherapie

Noch weit weniger fortgeschritten sind gentherapeutische Ansätze zur Behandlung der Sphingolipidosen. Deren Ziel ist die Einführung eines funktionstüchtigen Gens in den betroffenen Patienten. Über geeignete Vektoren wird das Gen in somatische Zellen eingeführt, die das Genprodukt zu einem gewissen Prozentsatz an deren Umgebung abgeben. Ein Hauptproblem ist dabei der effiziente Transfer therapeutischer DNA ins Zentralnervensystem. Postmitotische Zellen einschließlich der meisten Nervenzellen werden von retroviralen Vektoren nicht transfiziert,<sup>[423]</sup> so daß für viele Anwendungen auf andere Vektoren ausgewichen werden muß. Dennoch wird auch dieses System untersucht. Beispielsweise wurden auf Zellkulturebene Transduktionsexperimente mit retroviral vermittelter Galactosylceramidase-cDNA durchgeführt.<sup>[424]</sup> Unter den verschiedenen anderen Verfahren des Gentransfers<sup>[425]</sup> sind replikationsdefiziente Adenoviren hervorzuheben, von denen sich abzeichnet, daß sie als Vektoren zur Einführung rekombinanter Gene in Nervenzellen geeignet sind. Hinsichtlich Pathogenität und Vorhersagbarkeit der Expressionsspiegel scheinen sie Systemen, die auf dem *Herpes-simplex*-Virus basieren, überlegen zu sein. Im Mausmodell einer lysosomalen Speicherkrankheit, des Sly-Syndroms (Mucopolysaccharidose VII), konnte durch Adenovirus-vermittelten Gentransfer die viscerale Pathologie korrigiert werden. Nach Injektion des rekombinanten Virus in die lateralen Ventrikel der Mäuse wurde auch eine Erhöhung der  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität im Hirn der Versuchstiere festgestellt.<sup>[426, 450]</sup> Exemplarisch sei noch auf Zellversuche hingewiesen, in denen die GM2-Speicherung in Fibroblasten von Tay-Sachs-Patienten nach adenoviral vermitteltem Gentransfer aufgehoben werden konnte.<sup>[427]</sup>



### 6.14.3. Inhibitoren der Glycosphingolipid-Biosynthese

Erbkrankheiten lassen sich grundsätzlich auch auf der Ebene der Metaboliten behandeln. Einer dieser Ansätze wird als „substrate deprivation“ oder auch „substrate restriction“ bezeichnet.<sup>[428]</sup> Zu den Faktoren, die Schwere und Verlaufsform von Sphingolipidosen beeinflussen, gehört wesentlich das Verhältnis von verbleibender lysosomaler Enzymaktivität ( $V_{\max}$ ) und Substrateinstrom ( $v_i$ ) in das Lysosom. Solange die Biosynthese der Substrate weiterläuft, für deren Abbau das defekte System verantwortlich ist, schreitet die pathologische Anhäufung der Substrate im Lysosom fort. Nicht nur die lysosomale Abbaukapazität, sondern auch der Fluß von Substraten in das Lysosom (Abbildung 27) ist ein Parameter,

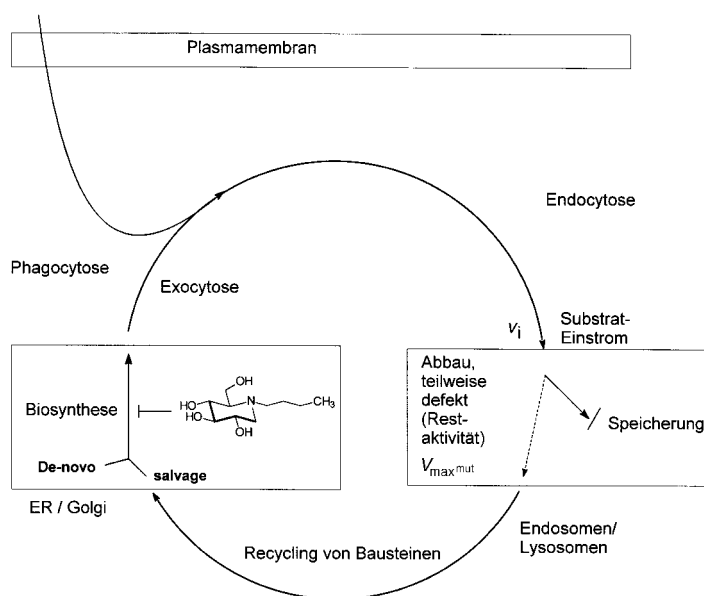


Abbildung 27. „Substrate deprivation“: Durch Hemmung der Sphingolipid-Biosynthese wird der Substrateinstrom in die Lysosomen reduziert. Andere Therapiekonzepte zielen darauf ab, die Abbaukapazität innerhalb des Lysosoms zu restaurieren.

dessen Änderung den Verlauf einer Sphingolipidose beeinflussen kann. Der Substrateinstrom in die Lysosomen sollte durch Hemmung der Sphingolipid-Biosynthese reduzierbar sein. Damit sollte es möglich sein, durch Inhibitoren der Biosynthese sowohl Schwere als auch Verlaufsform dieser Erkrankungen positiv zu beeinflussen. Dieser Ansatz setzt voraus, daß noch eine minimale Restaktivität des defekten Enzyms im Lysosom vorhanden ist. Dies ist bei juvenilen und adulten Verlaufsformen der Fall, während bei den infantilen Verlaufsformen keine oder nur eine sehr geringe Restaktivität gemessen wird.<sup>[272]</sup> Langfristig kann sogar davon ausgegangen werden, daß fehlende Restaktivität exogen, beispielsweise durch Knochenmarktransplantation, wiederhergestellt wird und gleichzeitig durch Hemmung des Substrateinstroms das Fortschreiten der Erkrankung verzögert wird.

Es sind verschiedene niedermolekulare Inhibitoren der GSL-Biosynthese bekannt.<sup>[100]</sup> Ein Wirkstoff ist im Zusammenhang mit der Therapie von Sphingolipidosen von besonderem Interesse.<sup>[429, 430]</sup> Es handelt sich dabei um das bereits als Glycosidase-Inhibitor bekannte *N*-Butyldeoxynojirimycin

(Abbildung 12), das im Tiermodell der Tay-Sachs'schen Erkrankung untersucht wurde.<sup>[431]</sup> Durch orale Gabe der Verbindung werden Serumkonzentrationen von  $50 \mu\text{M}$  erreicht, wie bereits bei menschlichen Patienten festgestellt werden konnte, die diese Verbindung im Rahmen einer antiviralen Therapie erhalten hatten. Diese Konzentration reicht aus, um nach einer zwölfwöchigen Behandlung bei Tay-Sachs-Mäusen die Speicherung von GM2 im Hirn um 50 % gegenüber unbehandelten Mäusen zu verringern. Im Unterschied zu unbehandelten Mäusen sind in den Nervenzellen der behandelten Mäuse nach 16 Wochen kaum noch cytoplasmatische Membranstrukturen vorhanden, die durch das abgelagerte Lipid gebildet werden. Wesentlich für die Wirksamkeit der Verbindung ist ihre geringe Toxizität und ihre gute Bioverfügbarkeit. Sie kann oral aufgenommen werden und passiert die Blut-Hirn-Schranke, so daß im Zentralnervensystem ausreichend hohe Konzentrationen erreicht werden, um die Bildung von GSL in gewünschtem Umfang zu hemmen (Abbildung 27).<sup>[431]</sup> Der Erfolg der Verbindung war nicht unbedingt vorhersagbar, da sie nicht nur als Hemmstoff der Biosynthese, sondern auch des Glucocerebroside-Abbaus fungiert.

Die Glucocerebrosidease wurde durch Affinitätschromatographie an *N*-Alkyldeoxynojirimycinsepharose gereinigt,<sup>[432]</sup> was die Eignung der Verbindung zur Behandlung der Gaucher'schen Erkrankung problematisch erscheinen läßt. Die Tay-Sachs-Knockout-Mäuse verfügen über eine so hohe Restenzymaktivität, daß sie nicht erkranken und insofern als Modellsystem zur Überprüfung des Konzepts geeignet sind. *N*-Butyldeoxynojirimycin hemmt die Glucosyltransferase, die Glucose von Uridindiphosphat-Glucose auf Ceramid überträgt (Abschnitt 4.3). Grundsätzlich kommt eine Behandlung mit Verbindungen dieses Typs bei solchen Sphingolipidose-Patienten in Frage, deren gespeicherte Sphingolipide sich biosynthetisch vom Glucosylceramid ableiten. Die erfolgreiche Anwendung dieser oder ähnlicher Wirkstoffe am menschlichen Patienten ist zur Zeit noch hypothetisch, doch bestehen aufgrund der oben angestellten Erwägungen realistische Erfolgsaussichten, Sphingolipidosen zu behandeln.

## 7. Ausblick

Wesentliche Erkenntnisse über Pathogenese und therapeutische Ansätze sind von den Tiermodellen zu erwarten, die für die menschlichen Formen der Sphingolipidosen entwickelt wurden.<sup>[433, 434]</sup> Beispielsweise wurde nach Hinweisen auf die Beteiligung des Immunsystems in der Pathogenese der Krabbe'schen Erkrankung durch Kreuzung von Twitcher-Mäusen (einem authentischen Tiermodell der Krabbe'schen Erkrankung) mit MHC-Klasse-II-defizienten Mäusen (MHC = major histocompatibility complex) Doppel-Knockout-Mäuse erhalten, die einen deutlich milderen Krankheitsverlauf entwickeln.<sup>[435]</sup> In  $\beta$ -Glucuronidase-defizienten Mäusen wurden Knochenmarktransplantationen mit retroviral modifizierten Zellen erprobt.<sup>[436, 437]</sup> Der Phänotyp des Galactosialidose-Mausmodells konnte durch transgene und normale Knochenmarkzellen korrigiert werden.<sup>[298]</sup> Diese Ansätze machen deutlich, daß es sich bei den erst seit kurzem verfügbaren

Tiermodellen um wertvolle Hilfsmittel zum Verständnis der Pathogenese der Sphingolipidosen handelt. Zur Weiterentwicklung neuartiger therapeutischer Konzepte sind sie sicherlich von außerordentlichem Wert. Es ist davon auszugehen, daß diese präklinischen Modelle die Erprobung von Konzepten zur kausalen Therapie dieser Erkrankungen wesentlich erleichtern werden und verbesserte Behandlungsmöglichkeiten daraus hervorgehen.

*Die Arbeiten im Labor der Autoren wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 284, SFB 400) und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert.*

Eingegangen am 24. August 1998 [A 297]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1532–1568

- [1] J. L. W. Tudichum, *The Chemical Constitution of the Brain*, Bailliere, Tindall & Cox, London, **1884**.
- [2] H. Carter, *Annu. Rev. Biochem.* **1965**, 34, 109–137.
- [3] T. Yamakawa, *Glycoconj. J.* **1996**, 13, 123–126.
- [4] E. Klenk, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1942**, 273, 76–86.
- [5] G. Blix, L. Svennerholm, I. Werner, *Acta Chem. Scand.* **1952**, 6, 358–362.
- [6] R. Kuhn, G. Baschang, *Chem. Ber.* **1962**, 95, 2384–2385.
- [7] R. Kuhn, H. Wiegandt, *Chem. Ber.* **1963**, 96, 866–880.
- [8] L. Riboni, P. Viani, R. Bassi, A. Prinetti, G. Tettamanti, *Prog. Lipid Res.* **1997**, 36, 153–195.
- [9] A. H. Merrill, Jr., C. C. Sweeley in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and membranes* (Hrsg.: D. E. Vance, J. E. Vance), Elsevier, **1996**, S. 309–339.
- [10] H. Wiegandt in *New Comprehensive Biochemistry, Vol. 10* (Hrsg.: A. Neuberger, L. L. M. van Deenen), Elsevier, Amsterdam, **1985**, S. 199–260.
- [11] S. Hakomori, *Annu. Rev. Biochem.* **1981**, 50, 733–764.
- [12] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, 3, 97–130.
- [13] M. A. K. Markwell, L. Svennerholm, J. C. Paulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, 78, 5406–5410.
- [14] K. A. Karlsson, *Annu. Rev. Biochem.* **1989**, 58, 309–350.
- [15] L. Yang, C. B. Zeller, N. L. Shaper, M. Kiso, A. Hasegawa, R. E. Shapiro, R. L. Schnaar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 814–818.
- [16] R. L. Schnaar, *Glycobiology* **1991**, 1, 477–485.
- [17] T. Mutoh, A. Toluda, T. Miyadai, M. Hamaguchi, N. Fujiki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 5087–5091.
- [18] G. Zhou, S. Hakomori, K. Kitamura, Y. Igarashi, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 1959–1965.
- [19] C. B. Zeller, R. B. Marchase, *Am. J. Physiol.* **1992**, 262, C1341–C1355.
- [20] Y. A. Hannun, *Science* **1996**, 274, 1855–1859.
- [21] S. Spiegel, D. Foster, R. Kolesnick, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1996**, 8, 159–167.
- [22] A. van Helvoort, G. van Meer, *FEBS Lett.* **1995**, 369, 18–21.
- [23] J. Kopitz in *Glycosciences* (Hrsg.: H. J. Gabius, S. Gabius), Chapman & Hall, Weinheim, **1997**, S. 163–189.
- [24] S. Fukumoto, M. Haraguchi, N. Takeda, K. Fujimura, M. Sakae, M. Kishikawa, H. Shiku, K. Furukawa, S. Aizawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 10662–10667.
- [25] B. A. Fenderson, G. K. Ostrander, Z. Hausken, N. S. Radin, S. Hakomori, *Exp. Cell Res.* **1992**, 198, 362–366.
- [26] J. V. Brigande, F. M. Platt, T. N. Seyfried, *J. Neurochem.* **1998**, 70, 871–882.
- [27] T. Yamashita, R. Wada, T. Sasaki, C. Deng, U. Bierfreund, K. Sandhoff, R. L. Proia, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [28] D. T. Downing, *J. Lipid Res.* **1992**, 33, 301–313.
- [29] P. W. Wertz, B. van den Bergh, *Chem. Phys. Lipids* **1998**, 91, 85–96.
- [30] K. J. Robson, M. E. Stewart, S. Michelsen, N. D. Lazo, D. Downing, *J. Lipid Res.* **1994**, 35, 2060–2068.
- [31] P. W. Wertz, D. C. Swartzendruber, K. C. Madison, D. T. Downing, *J. Invest. Dermatol.* **1987**, 89, 419–425.
- [32] L. Landmann, *Anat. Embryol.* **1988**, 178, 1–13.
- [33] L. N. Marekov, P. M. Steinert, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 17763–17770.
- [34] P. M. Elias, G. K. Menon, *Adv. Lipid Res.* **1991**, 24, 1–26.
- [35] S. Grayson, A. D. Johnson-Winegar, B. U. Wintroub, R. R. Isseroff, E. H. Epstein, P. M. Elias, *J. Invest. Dermatol.* **1985**, 85, 289–294.
- [36] K. Liu, C. Commens, R. Choong, R. Jaworski, *Arch. Dis. Childh.* **1988**, 63, 854–856.
- [37] H. Möller, W. Knörr, M. Weuthen, B. Guckenbiehl, R. Wachter, *Fett/Lipid* **1997**, 99, 120–129.
- [38] B. Siddiqui, S. Hakomori, *J. Biol. Chem.* **1971**, 246, 5766–5769.
- [39] R. Misasi, S. Dionisi, L. Farilla, B. Carabba, L. Lenti, U. Di Mario, F. Dotta, *Diabetes Metab. Rev.* **1997**, 13, 163–179.
- [40] P. O. Livingston, *Immunol. Rev.* **1995**, 145, 147–166.
- [41] T. Kawano, J. Cui, Y. Koezuka, I. Toura, Y. Kaneko, K. Motoki, H. Ueno, R. Nakagawa, H. Sato, E. Kondo, H. Koseki, M. Taniguchi, *Science* **1997**, 278, 1626–1629.
- [42] Y. Miyake, Y. Kozutsumi, S. Nakamura, T. Fujita, T. Kawasaki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, 211, 396–403.
- [43] L. R. Ballou, S. J. F. Laulederkind, E. F. Rosloniec, R. Raghov, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, 1301, 273–287.
- [44] G. van Echten-Deckert, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 5341–5344.
- [45] P. E. Braun, E. E. Snell, *J. Biol. Chem.* **1968**, 243, 3775–3783.
- [46] W. Stoffel, D. LeKim, G. Sticht, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1968**, 349, 664–670.
- [47] E. C. Mandon, G. van Echten-Deckert, R. Birk, R. R. Schmidt, K. Sandhoff, *Eur. J. Biochem.* **1991**, 198, 667–674.
- [48] C. Zhao, T. Beeler, T. Dunn, *J. Biol. Chem.* **1994**, 34, 21480–21488.
- [49] M. M. Nagiec, J. A. Baltisberger, G. B. Wells, R. L. Lester, R. C. Dickson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 7899–7902.
- [50] B. Weiss, W. Stoffel, *Eur. J. Biochem.* **1997**, 249, 239–247.
- [51] J. Rother, G. van Echten-Deckert, G. Schwarzmann, K. Sandhoff, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, 189, 14–20.
- [52] A. H. Merrill, Jr., E. Wang, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 3764–3769.
- [53] H. Shimeno, S. Soeda, M. Sakamoto, T. Kouchi, T. Kowakame, T. Kihara, *Lipids* **1998**, 33, 601–605.
- [54] P. Morell, N. S. Radin, *J. Biol. Chem.* **1970**, 245, 342–350.
- [55] T. Lee, M. Ou, K. Shinozaki, B. Malone, F. Snyder, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 209–217.
- [56] C. Michel, G. van Echten-Deckert, J. Rother, K. Sandhoff, E. Wang, A. H. Merrill, Jr., *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 22432–22437.
- [57] L. Geeraert, G. P. Mannaerts, P. P. van Veldhoven, *Biochem. J.* **1997**, 327, 125–132.
- [58] T. Mikami, M. Kashiwagi, K. Tsuchihashi, T. Akino, S. Gasa, *J. Biochem.* **1998**, 123, 906–911.
- [59] D. Haak, K. Gable, T. Beeler, T. Dunn, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 29704–29710.
- [60] S. Schulte, W. Stoffel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 10265–10269.
- [61] T. Coetzee, K. Suzuki, B. Popko, *Trends Neurosci.* **1998**, 21, 126–130.
- [62] T. Coetzee, N. Fujita, J. Dupree, R. Shi, A. Blight, K. Suzuki, B. Popko, *Cell* **1996**, 86, 209–219.
- [63] A. Bosio, E. Binczek, W. Stoffel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 13280–13285.
- [64] K. S. Sundaram, M. Lev, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 24041–24044.
- [65] P. Paul, Y. Kamisaka, D. L. Marks, R. E. Pagano, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 2287–2293.
- [66] S. Ichikawa, H. Sakiyama, G. Suzuki, K. Hidari, Y. Hirabayashi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 4638–4643.
- [67] S. Ichikawa, Y. Hirabayashi, *Trends Cell Biol.* **1998**, 8, 198–202.
- [68] T. Nomura, M. Takizawa, J. Aoki, H. Arai, K. Inoue, E. Wakisaka, N. Yoshizuka, G. Imokawa, N. Dohmae, K. Takio, M. Hattori, N. Matsuo, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 13570–13577.
- [69] B. G. Kearns, T. P. McGee, P. Mayinger, A. Gedvilaite, S. E. Phillips, S. Kagiwada, V. A. Bankaitis, *Nature* **1997**, 387, 101–105.
- [70] E. C. Mandon, I. Ehse, J. Rother, G. van Echten-Deckert, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 11144–11148.
- [71] C. Michel, G. van Echten-Deckert, *FEBS Lett.* **1997**, 416, 153–155.
- [72] H. Coste, M.-B. Martel, R. Got, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, 858, 6–12.
- [73] D. Jeckel, A. Karrenbauer, K. N. J. Burger, G. van Meer, F. Wieland, *J. Cell Biol.* **1992**, 117, 259–267.
- [74] D. E. Warnock, M. S. Lutz, W. A. Blackburn, W. W. Young, J. U. Baenziger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 2708–2712.

- [75] H. Lannert, C. Bünning, D. Jeckel, F. T. Wieland, *FEBS Lett.* **1994**, 342, 91–96.
- [76] A. K. Menon, *Trends Cell. Biol.* **1995**, 5, 355–360.
- [77] H. Lannert, K. Gorgas, I. Meißner, F. T. Wieland, D. Jeckel, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 2939–2946.
- [78] A. H. Futerman, B. Stieger, A. L. Hubbard, R. E. Pagano, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 8650–8657.
- [79] M. J. M. Obradors, D. Sillence, S. Howitt, D. Allan, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, 1359, 1–12.
- [80] K. N. J. Burger, P. van der Bijl, G. van Meer, *J. Cell Biol.* **1996**, 133, 15–28.
- [81] G. Tennekoon, M. Zaruba, J. Wolinsky, *J. Cell. Biol.* **1983**, 97, 1107–1112.
- [82] R. W. Ledeen, G. Wu, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **1992**, 4, 174–187.
- [83] T. Kolter, K. Sandhoff, *Glycobiology* **1997**, 7(7), vii–x.
- [84] G. Pohlentz, D. Klein, G. Schwarzmann, D. Schmitz, K. Sandhoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 7044–7048.
- [85] H. Iber, G. van Echten-Deckert, K. Sandhoff, *Eur. J. Biochem.* **1991**, 195, 115–120.
- [86] H. Iber, C. Zacharias, K. Sandhoff, *Glycobiology* **1992**, 2, 137–142.
- [87] J. Nakayama, M. N. Fukuda, Y. Hirabayashi, A. Kanamori, K. Sasaki, T. Nishii, M. Fukuda, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 3684–3691.
- [88] G. van Echten-Deckert, H. Iber, H. Stotz, A. Takatsuki, K. Sandhoff, *Eur. J. Cell Biol.* **1990**, 51, 135–139.
- [89] H. Iber, G. van Echten-Deckert, K. Sandhoff, *J. Neurochem.* **1992**, 58, 1533–1537.
- [90] H. Lannert, K. Gorgas, I. Meißner, F. T. Wieland, D. Jeckel, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 2939–2946.
- [91] B. K. Gillard, R. G. Clement, D. M. Marcus, *Glycobiology* **1998**, 8, 885–890.
- [92] G. Tettamanti, L. Riboni in *Progress in Brain Research, Vol. 101* (Hrsg.: L. Svennerholm, A. K. Asbury, R. A. Reisfeld, K. Sandhoff, K. Suzuki, G. Tettamanti, G. Toffano), Elsevier, Amsterdam, **1994**, S. 77–100.
- [93] R. Bose, M. Verheij, A. Haimovitz-Friedman, K. Scotto, Z. Fuks, R. Kolesnick, *Cell* **1995**, 82, 405–414.
- [94] K. Yokoyama, H. Nojiri, M. Suzuki, M. Setaka, A. Suzuki, S. Nojima, *FEBS Lett.* **1995**, 368, 477–480.
- [95] A. H. Merrill, Jr., D. W. Nixon, R. D. Williams, *J. Lipid Res.* **1985**, 26, 617–622.
- [96] W. M. Holleran, K. R. Feingold, M. Q. Man, W. N. Gao, J. M. Lee, P. M. Elias, *J. Lipid. Res.* **1991**, 32, 1151–1158.
- [97] K. Sasaki, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **1996**, 8, 195–215.
- [98] S. Tsuji, *J. Biochem.* **1996**, 120, 1–13.
- [99] H. Iber, G. van Echten-Deckert, R. A. Klein, K. Sandhoff, *Eur. J. Cell Biol.* **1990**, 52, 236–240.
- [100] T. Kolter, K. Sandhoff, *Chem. Soc. Rev.* **1996**, 25, 371–381.
- [101] N. S. Radin, J. Inokuchi, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **1991**, 3, 200–213.
- [102] A. H. Futerman, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **1994**, 6, 143–153.
- [103] D. T. Hung, T. F. Jamison, S. L. Schreiber, *Chem. Biol.* **1996**, 3, 623–639.
- [104] N. S. Radin, *Mol. Chem. Neuropath.* **1994**, 21, 111–127.
- [105] M. M. Nagiec, E. E. Nagiec, J. A. Baltisberger, G. B. Wells, R. L. Lester, R. C. Dickson, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 9809–9817.
- [106] S. A. Lauer, N. Ghorri, K. Haldar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 9181–9185.
- [107] K. Haldar, *Trends Cell Biol.* **1996**, 6, 398–405.
- [108] N. S. Radin, *Glycoconj. J.* **1996**, 13, 153–157.
- [109] K. Simons, E. Ikonen, *Nature* **1997**, 387, 569–572.
- [110] A. H. Futerman, *Trends Cell Biol.* **1995**, 5, 377–380.
- [111] K. S. Sundaram, M. Lev, *J. Neurochem.* **1984**, 42, 577–581.
- [112] K. S. Sundaram, M. Lev, *J. Lipid Res.* **1985**, 26, 473–477.
- [113] K. A. Medlock, A. H. Merrill, Jr., *Biochemistry* **1988**, 27, 7079–7084.
- [114] W. M. Holleran, M. L. Williams, W. N. Gao, P. M. Elias, *J. Lipid Res.* **1990**, 31, 1655–1661.
- [115] M. M. Zweerink, A. M. Edison, G. B. Wells, W. Pinto, R. L. Lester, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 25032–25038.
- [116] W. S. Horn, J. L. Smith, G. F. Bills, S. L. Raghoobar, G. L. Helms, M. B. Kutz, J. A. Marrinan, B. R. Frommer, R. A. Thornton, S. M. Mandala, *J. Antibiot.* **1992**, 45, 1692–1696.
- [117] A. Horvath, C. Sütterlin, U. Manning-Krieg, N. R. Movva, H. Riezmann, *EMBO J.* **1994**, 13, 3687–3695.
- [118] S. Nakamura, Y. Kozutsumi, Y. Sun, Y. Miyake, T. Fujita, T. Kawasaki, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 1255–1257.
- [119] S. M. Mandala, B. R. Frommer, R. A. Thornton, M. B. Kurtz, N. M. Young, M. A. Cabello, O. Genilloud, J. M. Liesch, J. L. Smith, W. S. Horn, *J. Antibiot.* **1994**, 47, 376–379.
- [120] S. M. Mandala, R. A. Thornton, B. R. Frommer, S. Dreikorn, M. B. Kurtz, *J. Antibiot.* **1997**, 50, 339–342.
- [121] G. van Echten, R. Birk, G. Brenner-Weiß, R. R. Schmidt, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 9333–9339.
- [122] G. van Echten-Deckert, A. Zschoche, T. Bär, R. R. Schmidt, A. Raths, T. Heinemann, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 15825–15833.
- [123] E. Wang, W. P. Norred, C. W. Bacon, R. T. Riley, A. H. Merrill, Jr., *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 14486–14490.
- [124] H. Abbas, T. Tanaka, S. D. Duke, J. K. Porter, E. M. Wray, L. Hodges, A. E. Sessions, E. Wang, A. H. Merrill, R. T. Riley, *Plant Physiol.* **1994**, 106, 1085–1093.
- [125] A. H. Merrill, Jr., E. Schmelz, E. Wang, J. J. Schroeder, D. L. Dillehay, R. T. Riley, *J. Nutr.* **1995**, 125, 1677S–1682S.
- [126] A. H. Merrill, D. C. Liotta, R. T. Riley, *Trends Cell Biol.* **1996**, 6, 218–223.
- [127] A. H. Merrill, Jr., E. Wang, D. G. Gilchrist, R. T. Wiley, *Adv. Lipid Res.* **1993**, 26, 215–234.
- [128] H. U. Humpf, E. M. Schmelz, F. I. Meredith, H. Vesper, T. R. Vales, E. Wang, D. S. Menaldino, D. C. Liotta, A. H. Merrill, Jr., *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 19060–19064.
- [129] A. H. Merrill, Jr., E. Wang, D. G. Gilchrist, R. T. Wiley, *Adv. Lipid Res.* **1993**, 26, 215–234.
- [130] O. D. Hensens, G. L. Helms, E. T. Turner Jones, G. H. Harris, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 1772–1776.
- [131] P. Sears, C. H. Wong, *Chem. Commun.* **1998**, 1161–1170.
- [132] F. M. Platt, T. D. Butters, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **1995**, 7, 495–511.
- [133] N. S. Radin, J. A. Shayman, J.-I. Inokuchi, *Adv. Lipid Res.* **1993**, 26, 183–213.
- [134] A. G. Rosenwald, C. E. Machamer, R. E. Pagano, *Biochemistry* **1992**, 31, 3581–3590.
- [135] K. G. Carson, B. Ganem, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 2659–2662.
- [136] C. S. Rani, A. Abe, Y. Chang, N. Rosenzweig, A. R. Saltiel, N. S. Radin, J. A. Shayman, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 2859–2867.
- [137] A. Shukla, N. S. Radin, *J. Lipid Res.* **1991**, 32, 713–722.
- [138] J. W. Kok, T. Babia, C. M. Filipeanu, A. Nelemans, G. Egea, D. Hoekstra, *J. Cell Biol.* **1998**, 142, 25–38.
- [139] F. M. Platt, G. R. Neises, G. B. Karlsson, R. A. Dwek, T. D. Butters, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 27108–27114.
- [140] C. Zacharias, G. van Echten-Deckert, M. Plewe, R. R. Schmidt, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 13313–13317.
- [141] C. S. Oh, D. A. Toke, S. Mandala, C. E. Martin, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 17376–17384.
- [142] J. T. Nickels, J. R. Broach, *Genes Dev.* **1996**, 10, 382–394.
- [143] S. M. Mandala, R. A. Thornton, M. Rosenbach, J. Milligan, M. Garcia-Calvo, H. G. Bull, M. B. Kurtz, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 32709–32714.
- [144] R. C. Dickson, E. E. Nagiec, G. B. Wells, M. M. Nagiec, R. L. Lester, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 29620–29625.
- [145] S. M. Mandala, R. A. Thornton, J. Milligan, M. Rosenbach, M. Garcia-Calvo, H. G. Bull, G. Harris, G. K. Abruzzo, A. M. Flattery, C. J. Gill, K. Bartizal, S. Dreikorn, M. B. Kurtz, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 14942–14949.
- [146] R. M. Soltysiak, F. Matsuura, D. Bloomer, C. C. Sweeley, *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, 792, 214–226.
- [147] J. Yan, D. D. Ilsley, C. Frohlick, R. Steet, E. T. Hall, R. D. Kuchta, P. Melancon, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 22836–22841.
- [148] G. Zeng, T. Agriga, X. Gu, R. K. Yu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 8670–8674.
- [149] C. Luberto, Y. A. Hannun, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 14550–14559.
- [150] K. Müller-Decker, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, 162, 198–205.
- [151] M. W. Spence, *Adv. Lipid Res.* **1993**, 26, 3–23.
- [152] R. Testi, *Trends Biochem. Sci.* **1996**, 21, 468–471.
- [153] S. Tomiuk, K. Hofmann, M. Nix, M. Zumbansen, W. Stoffel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 3638–3643.

- [154] D. F. Hassler, R. M. Bell, *Adv. Lipid Res.* **1993**, 26, 49–58.
- [155] S. M. Bajjalieh, T. F. J. Martin, E. J. Floor, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 14354–14360.
- [156] B. M. Buehrer, R. M. Bell, *Adv. Lipid Res.* **1993**, 26, 59–67.
- [157] A. Olivera, T. Kohama, Z. Tu, S. Milstien, S. Spiegel, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 12576–12583.
- [158] P. P. van Veldhoven, G. P. Mannaerts, *Adv. Lipid Res.* **1993**, 26, 69–98.
- [159] J. D. Saba, F. Nara, A. Bielawska, S. Garrett, Y. A. Hannun, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 26087–26090.
- [160] J. H. Zhou, J. D. Saba, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, 242, 502–507.
- [161] C. G. Mao, M. Wadleigh, G. M. Jenkins, Y. A. Hannun, L. M. Obeid, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 28690–28694.
- [162] S. M. Mandala, R. Thornton, Z. Tu, M. B. Kurtz, J. Nickels, J. Broach, R. Menzeleev, S. Spiegel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 150–155.
- [163] D. W. Waggoner, A. Gomez-Munoz, J. Dewald, D. N. Brindley, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 16506–16509.
- [164] N. Divecha, R. F. Irvine, *Cell* **1995**, 80, 269–278.
- [165] Y. A. Hannun, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 3125–3128.
- [166] R. Kolesnick, D. W. Golde, *Cell* **1994**, 77, 325–328.
- [167] T. Okazaki, R. M. Bell, Y. A. Hannun, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 19076–19080.
- [168] A. Bielawska, H. M. Crane, D. Liotta, L. M. Obeid, Y. A. Hannun, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 26226–26232.
- [169] S. Mathias, K. A. Dressler, R. N. Kolesnick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 10009–10013.
- [170] R. T. Dobrowsky, Y. A. Hannun, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 5048–5051.
- [171] M. T. Diaz-Meco, E. Berra, M. M. Municio, L. Sanz, J. Lozano, I. Dominguez, V. Diaz-Golpe, M. T. L. De Lera, J. Alcamí, C. V. Paya, F. Arenzana-Seisdedos, J.-L. Virelizier, J. Moscat, *Mol. Cell Biol.* **1993**, 13, 4770–4775.
- [172] Y. A. Hannun, L. M. Obeid, *Trends Biochem. Sci.* **1995**, 20, 73–77.
- [173] C. B. Thompson, *Science* **1995**, 267, 1456–1462.
- [174] A. H. Wyllie, *Eur. J. Cell Biol.* **1997**, 73, 189–197.
- [175] M. D. Jacobson, *Trends Cell Biol.* **1997**, 7, 467–469.
- [176] R. C. Dickson, E. E. Nagiec, M. Skrzypek, P. Tillman, G. B. Wells, R. L. Lester, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 30196–30200.
- [177] J. Zhang, N. Alter, J. C. Reed, C. Borner, L. M. Obeid, Y. A. Hannun, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 5325–5328.
- [178] S. Yoshimura, Y. Banno, S. Nakashima, K. Takenaka, H. Sakai, Y. Nishimura, N. Sakai, S. Shimizu, Y. Eguchi, Y. Tsujimoto, Y. Nozawa, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 6921–6927.
- [179] R. De Maria, L. Lenti, F. Malisan, F. Dagostino, B. Tomassini, A. Zeuner, M. R. Rippo, R. Testi, *Science* **1997**, 277, 1652–1655.
- [180] R. De Maria, M. R. Rippo, E. H. Schuchman, R. Testi, *J. Exp. Med.* **1998**, 187, 897–902.
- [181] J. D. Watts, M. Gu, A. J. Polverino, S. D. Patterson, R. Aebersold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 7292–7296.
- [182] N. Karasavvas, R. K. Erukulla, R. Bittman, R. Lockshin, Z. Zakeri, *Eur. J. Biochem.* **1996**, 236, 729–737.
- [183] N. D. Ridgway, D. L. Merriam, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, 1256, 57–70.
- [184] A. Abe, J. A. Shayman, N. S. Radin, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 14383–14389.
- [185] A. Abe, J. Shayman, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 8467–8474.
- [186] M. Ojika, G. Yoshino, Y. Sakagami, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 4235–4238.
- [187] S. Spiegel, *J. Lipid Mediators* **1993**, 8, 169–175.
- [188] O. Cuvillier, G. Pirianov, B. Kleuser, P. G. Vanek, O. A. Coso, J. S. Gutkind, S. Spiegel, *Nature* **1996**, 381, 800–803.
- [189] M. Lee, J. R. Van Brocklyn, S. Thangada, C. H. Liu, A. R. Hand, R. Menzeleev, S. Spiegel, T. Hla, *Science* **1998**, 279, 1552–1555.
- [190] G. C. M. Zondag, F. R. Postma, I. V. Etten, I. Verlaan, W. H. Moolenaar, *Biochem. J.* **1998**, 330, 605–609.
- [191] Y. A. Hannun, R. M. Bell, *Science* **1989**, 243, 500–507.
- [192] Y. Igarashi, *J. Biochem.* **1997**, 122, 1080–1087.
- [193] D. Meyer zu Heringdorf, C. J. van Koppen, K. H. Jakobs, *FEBS Lett.* **1997**, 410, 34–38.
- [194] A. Huwiler, J. Brunner, R. Hummel, M. Vervoordeldonk, S. Stabel, H. van den Bosch, J. Pfeilschifter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 6959–6963.
- [195] T. Weber, J. Brunner, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 3084–3095.
- [196] T. Wiedler, C. C. Geilen, T. Kolter, F. Sadeghlar, K. Sandhoff, R. Brossmer, P. Ihrig, D. Perry, C. E. Orfanos, Y. A. Hannun, *FEBS Lett.* **1997**, 411, 260–264.
- [197] Y. Nagai, M. Iwamori in *Biology of the Sialic Acids* (Hrsg.: A. Rosenberg), Plenum Press, New York, **1995**, S. 197–241.
- [198] Y. Nagai, *Behav. Brain Res.* **1995**, 66, 99–104.
- [199] S. Hakomori, Y. Igarashi, *J. Biochem.* **1995**, 118, 1091–1103.
- [200] G. Legler in *Carbohydrate Mimics* (Hrsg.: Y. Chapleur), WILEY-VCH, Weinheim, **1998**, S. 63–490.
- [201] H. Grassmé, E. Gulbins, B. Brenner, K. Ferlinz, K. Sandhoff, K. Harzer, F. Lang, T. Meyer, *Cell* **1997**, 91, 605–606.
- [202] L. E. Quintern, G. Weitz, H. Nehrkorn, J. M. Tager, A. Schram, K. Sandhoff, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, 922, 323–336.
- [203] J.-P. Jaffrezou, J.-M. Herbert, T. Levade, M.-N. Gau, P. Chatelain, G. Laurent, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 19858–19864.
- [204] M. D. Lister, Z. Ruan, R. Bittman, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, 1256, 25–30.
- [205] N. T. Tazabekova, A. S. Bushnev, Zh. A. Kakimzhanova, E. N. Zvonkova, R. P. Evstigneeva, *Sov. J. Bioorg. Chem.* **1988**, 343–348.
- [206] M. D. Lister, C. L. Crawford-Redick, C. R. Loomis, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, 1165, 314–320.
- [207] B. Liu, Y. A. Hannun, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 16281–16287.
- [208] M. Tanaka, F. Nara, K. Suzuki-Konagai, T. Hosoya, T. Ogita, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 7871–7872.
- [209] D. A. Wiesner, G. Dawson, *Glycoconj. J.* **1996**, 13, 327–333.
- [210] A. Bielawska, M. S. Greenberg, D. Perry, S. Jayadev, J. A. Shayman, C. McKay, Y. A. Hannun, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 12646–12654.
- [211] B. M. Buehrer, R. M. Bell, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 3154–3159.
- [212] Y. Yatomi, F. Ruan, T. Megdishi, T. Toyokuni, S. Hakomori, Y. Igarashi, *Biochemistry* **1996**, 35, 626–633.
- [213] Y. Yatomi, Y. Ozaki, K. Satoh, S. Kume, F. Ruan, Y. Igarashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, 231, 848–851.
- [214] Y. Yatomi, S. Yamamura, F. Ruan, S. Kume, Y. Ozaki, Y. Igarashi, *FEBS Lett.* **1997**, 417, 341–344.
- [215] G. van Echten-Deckert, A. Giannis, A. Schwarz, A. H. Futerman, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 1184–1191.
- [216] B. Kleuser, O. Cuvillier, S. Spiegel, *Cancer Res.* **1998**, 58, 1817–1824.
- [217] W. Stoffel, M. Grol, *Chem. Phys. Lipids* **1973**, 13, 372–388.
- [218] A. Schick, T. Kolter, A. Giannis, K. Sandhoff, *Tetrahedron* **1995**, 51, 11207–11218.
- [219] A. Schick, G. Schwarzmam, T. Kolter, K. Sandhoff, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1997**, 39, 441–451.
- [220] A. Schick, T. Kolter, A. Giannis, K. Sandhoff, *Tetrahedron* **1996**, 52, 2945–2956.
- [221] A. Tarnowski, T. Bär, R. R. Schmidt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 573–576.
- [222] A. Boumendjel, S. P. F. Miller, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1995**, 36, 377–383.
- [223] K. Sandhoff, T. Kolter, *Naturwissenschaften* **1995**, 82, 403–413.
- [224] K. Sandhoff, *Angew. Chem.* **1977**, 89, 283–295; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1977**, 16, 273–285.
- [225] G. W. Griffiths, B. Hoflack, K. Simons, I. S. Mellman, S. Kornfeld, *Cell* **1988**, 52, 329–341.
- [226] S. R. Carlsson, J. Roth, F. Pillar, M. Fukuda, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 18911–18919.
- [227] W. Fürst, K. Sandhoff, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, 1126, 1–16.
- [228] K. Sandhoff, T. Kolter, *Trends Cell Biol.* **1996**, 6, 98–103.
- [229] J. K. Burkhardt, S. Hüttler, A. Klein, W. Möbius, A. Habermann, G. Griffiths, K. Sandhoff, *Eur. J. Biochem.* **1997**, 73, 10–18.
- [230] T. Kolter, K. Sandhoff, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **1998**, 10, 455–468.
- [231] G. Wilkening, T. Linke, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 30271–30278.
- [232] E. Mehl, H. Jatzkewitz, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1964**, 339, 260–276.
- [233] W. Fürst, J. Schubert, W. Machleidt, E. H. Meyer, K. Sandhoff, *Eur. J. Biochem.* **1990**, 192, 709–714.
- [234] G. Fischer, H. Jatzkewitz, *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, 481, 561–572.
- [235] A. Vogel, G. Schwarzmam, K. Sandhoff, *Eur. J. Biochem.* **1991**, 200, 591–597.
- [236] W. Fürst, W. Machleidt, K. Sandhoff, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1988**, 369, 317–328.

- [237] T. Nakano, K. Sandhoff, J. Stümper, H. Christomanou, K. Suzuki, *J. Biochem.* **1989**, 105, 152–154.
- [238] J. S. O'Brien, K. A. Kretz, N. Dewji, D. A. Wenger, F. Esch, A. L. Fluharty, *Science* **1988**, 241, 1098–1101.
- [239] M. W. Ho, J. S. O'Brien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, 68, 2810–2813.
- [240] T. Kolter, K. Sandhoff, *Brain Pathol.* **1998**, 8, 79–100.
- [241] T. Kolter, K. Sandhoff in *Molekulare Medizin, Band 6* (Hrsg.: D. Ganten, K. Ruckpaul), Springer, Berlin, im Druck.
- [242] K. Suzuki in *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects* (Hrsg.: G. J. Siegel, B. W. Agranoff, R. W. Albers, P. B. Molinoff), 5. Aufl., Raven Press, New York, **1994**, S. 93–812.
- [243] A. E. Garrod, *Inborn Errors of Metabolism*, Oxford University Press, London, **1923**.
- [244] H. G. Hers, *Gastroenterology* **1966**, 48, 625–633.
- [245] R. L. Pisoni, J. G. Thoene, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, 1071, 351–373.
- [246] K. Sandhoff, K. Harzer, W. Fürst in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Hrsg.: C. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle), 7. Aufl., Mc Graw Hill, New York, **1995**, S. 2427–2441.
- [247] A. Zschoche, W. Fürst, G. Schwarzmann, K. Sandhoff, *Eur. J. Biochem.* **1994**, 222, 83–90.
- [248] V. Gieselmann, *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, 1270, 103–136.
- [249] H. Jatzkewitz, K. Sandhoff, *Biochim. Biophys. Acta* **1963**, 70, 354–356.
- [250] Y. Suzuki, H. Sakuraba, A. Oshima in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Hrsg.: C. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle), 7. Aufl., Mc Graw Hill, New York, **1995**, S. 2785–2823.
- [251] R. Sacrez, J. G. Juif, J. M. Gigonet, J. E. Gruner, *Pediatric* **1967**, 22, 143–162.
- [252] S. Okada, J. S. O'Brien, *Science* **1968**, 160, 1002–1004.
- [253] A. Oshima, K. Yoshida, K. Itoh, R. Kase, H. Sakuraba, Y. Suzuki, *Hum. Genet.* **1994**, 93, 109–114.
- [254] A. Oshima, A. Tsuji, Y. Nagao, H. Sakubara, Y. Suzuki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, 157, 238–244.
- [255] H. Morreau, E. Bonten, X. Y. Zhou, A. D'Azzo, *DNA Cell. Biol.* **1991**, 10, 495–504.
- [256] K. Yoshida, A. Oshima, M. Shimmoto, Y. Fukuhara, H. Sakuraba, N. Yanagisawa, Y. Suzuki, *Am. J. Hum. Genet.* **1991**, 49, 435–442.
- [257] C. N. Hahn, M. del Pilar, M. Schröder, M. T. Vanier, Y. Hara, K. Suzuki, K. Suzuki, A. d'Azzo, *Hum. Mol. Genet.* **1997**, 6, 205–211.
- [258] J. Matsuda, O. Suzuki, A. Oshima, A. Ogura, M. Naiki, Y. Suzuki, *Brain Dev.* **1997**, 19, 19–20.
- [259] R. A. Gravel, J. T. R. Clarke, M. M. Kaback, D. Mahuran, K. Sandhoff, K. Suzuki in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Hrsg.: C. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle), 7. Aufl., Mc Graw Hill, New York, **1995**, S. 2839–2879.
- [260] H. J. Kytzia, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 7568–7572.
- [261] K. Sango, M. P. McDonald, J. N. Crawley, M. L. Mack, C. J. Tiffit, E. Skop, C. M. Starr, A. Hoffmann, K. Sandhoff, K. Suzuki, R. L. Proia, *Nat. Genet.* **1996**, 14, 348–352.
- [262] K. Sandhoff, K. Harzer, W. Wässle, H. Jatzkewitz, *J. Neurochem.* **1971**, 18, 2469–2489.
- [263] K. Sandhoff, E. Conzelmann, E. Neufeld, M. M. Kaback, K. Suzuki in *The Metabolic Bases of Inherited Disease* (Hrsg.: C. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle), 6. Aufl., Mc Graw Hill, New York, **1989**, S. 1807–1839.
- [264] S. Okada, J. S. O'Brien, *Science* **1969**, 165, 698–700.
- [265] K. Sandhoff, *FEBS Lett.* **1969**, 4, 351–354.
- [266] R. Myerowitz, R. Piekarz, E. F. Neufeld, T. B. Shows, K. Suzuki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 7830–7834.
- [267] B. O'Dowd, F. Quan, H. Willard, A. M. Lamhonwah, R. G. Korneluk, J. A. Lowden, R. A. Gravel, D. J. Mahuran, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 1184–1188.
- [268] R. L. Proia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 1883–1887.
- [269] K. Neote, B. Bapat, A. Dumbille-Ross, C. Troxel, S. M. Schuster, D. J. Mahuran, R. A. Gravel, *Genomics* **1988**, 3, 279–286.
- [270] A. Hasilik, E. F. Neufeld, *J. Biol. Chem.* **1980**, 255, 4937–4945.
- [271] R. L. Proia, E. F. Neufeld, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, 79, 6360–6364.
- [272] P. Leinekugel, S. Michel, E. Conzelmann, K. Sandhoff, *Hum. Genet.* **1992**, 88, 513–523.
- [273] H. J. Kytzia, U. Hinrichs, I. Maire, K. Suzuki, K. Sandhoff, *EMBO J.* **1983**, 2, 1201–1205.
- [274] K. Suzuki, M. T. Vanier, *Dev. Neurosci.* **1991**, 13, 288–294.
- [275] M. J. G. Fernandes, S. Yew, D. Leclerc, B. Henrissat, C. E. Vorgias, R. A. Gravel, P. Hechtman, F. Kaplan, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 814–820.
- [276] K. Sandhoff, U. Andreae, H. Jatzkewitz, *Pathol. Eur.* **1968**, 3, 278–285.
- [277] B. Liessem, G. J. Glombitza, F. Knoll, J. Lehmann, J. Kellermann, F. Lottspeich, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 23693–23699.
- [278] M. Pennybacker, C. S. Schuette, B. Liessem, S. Hepbildikler, J. A. Kopetka, M. R. Ellis, R. Myerowitz, K. Sandhoff, R. L. Proia, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 8002–8006.
- [279] E. Conzelmann, K. Sandhoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, 75, 3979–3983.
- [280] E. Conzelmann, K. Sandhoff, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1979**, 360, 1837–1849.
- [281] C. G. Schütte, T. Lemm, G. J. Glombitza, K. Sandhoff, *Protein Sci.* **1998**, 7, 1–7.
- [282] H. Klima, A. Tanaka, D. Schnabel, T. Nakano, M. Schröder, K. Suzuki, K. Sandhoff, *FEBS Lett.* **1991**, 289, 260–264.
- [283] M. Schröder, D. Schnabel, K. Suzuki, K. Sandhoff, *FEBS Lett.* **1991**, 290, 1–3.
- [284] M. Schröder, D. Schnabel, R. Hurwitz, E. Young, K. Suzuki, K. Sandhoff, *Hum. Genet.* **1993**, 92, 437–440.
- [285] U. Schepers, G. J. Glombitza, T. Lemm, A. Hoffmann, A. Chabàs, P. Ozand, K. Sandhoff, *Am. J. Hum. Genet.* **1996**, 59, 1048–1056.
- [286] E. M. Meier, G. Schwarzmann, W. Fürst, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 1879–1887.
- [287] T. Kolter, K. Sandhoff, *J. Inher. Metab. Dis.* **1998**, 21, 548–563.
- [288] S. Yamanaka, M. D. Johnson, A. Grinberg, H. Westphal, J. N. Crawley, M. Taniike, K. Suzuki, R. L. Proia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 9975–9979.
- [289] M. Taniike, S. Yamanaka, R. L. Proia, C. Langaman, T. Bonc-Turentine, K. Suzuki, *Acta Neuropathol.* **1995**, 89, 296–304.
- [290] K. Sango, S. Yamanaka, A. Hoffmann, Y. Okuda, A. Grinberg, H. Westphal, M. P. McDonald, J. N. Crawley, K. Sandhoff, K. Suzuki, R. L. Proia, *Nat. Genet.* **1995**, 11, 170–176.
- [291] Y. Liu, A. Hoffmann, A. Grinberg, H. Westphal, M. P. McDonald, K. M. Miller, J. N. Crawley, K. Sandhoff, K. Suzuki, R. L. Proia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 8138–8143.
- [292] A. d'Azzo, G. Andria, P. Strisciuglio, H. Galjaard in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Hrsg.: C. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle), 7. Aufl., Mc Graw Hill, New York, **1995**, S. 2825–2837.
- [293] A. d'Azzo, A. Hoogveen, A. A. J. Reuser, D. Robinson, H. Galjaard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, 79, 4535–4539.
- [294] R. M. D'Agrosa, M. Hubbes, S. Zhang, R. Shankaran, J. W. Callahan, *Biochem. J.* **1992**, 285, 833–838.
- [295] G. Rudenko, E. Bonten, A. d'Azzo, W. G. Hol, *Structure* **1995**, 3, 1249–1259.
- [296] D. A. Wenger, T. J. Tarby, C. Wharton, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, 82, 589–595.
- [297] A. T. Hoogveen, F. W. Verheijen, A. d'Azzo, H. Galjaard, *Nature* **1980**, 285, 500–502.
- [298] X. Y. Zhou, H. Morreau, R. Rottier, D. Davis, E. Bonten, N. Gillemans, D. Wenger, F. G. Grosveld, P. Doherty, K. Suzuki, G. C. Grosveld, A. d'Azzo, *Genes Dev.* **1995**, 9, 2623–2634.
- [299] T. Miyatake, T. Yamada, M. Suzuki, B. Pallmann, K. Sandhoff, T. Ariga, T. Atsumi, *FEBS Lett.* **1979**, 97, 257–259.
- [300] J. Kopitz, C. von Reitzenstein, K. Sinz, M. Cantz, *Glycobiology* **1996**, 6, 367–376.
- [301] J. Kopitz, K. Sinz, R. Brossmer, M. Cantz, *Eur. J. Biochem.* **1997**, 248, 527–534.
- [302] K. Hata, T. Wada, A. Hasegawa, M. Kiso, T. Miyagi, *J. Biochem.* **1998**, 123, 899–905.
- [303] A. V. Pshezhetsky, C. Richard, L. Michaud, S. Igouda, S. Wang, M. A. Elsliger, J. Qu, D. Leclerc, R. Gravel, L. Dallaire, M. Potier, *Nat. Genet.* **1997**, 15, 316–320.
- [304] R. J. Desnick, Y. A. Ioannou, C. M. Eng in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Hrsg.: C. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle), 7. Aufl., Mc Graw Hill, New York, **1995**, S. 2741–2784.
- [305] K. J. Dean, C. C. Sweeley, *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 9994–10000.

- [306] D. F. Bishop, R. J. Desnick, *J. Biol. Chem.* **1981**, 256, 1307–1316.
- [307] D. F. Bishop, D. H. Calhoun, H. S. Bernstein, P. Hantzopoulos, M. Quinn, R. J. Desnick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, 83, 4859–4863.
- [308] D. F. Bishop, R. Kornreich, R. J. Desnick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 3903–3907.
- [309] R. J. Desnick, A. M. Wang in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Hrsg.: C. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle), 7. Aufl., Mc Graw Hill, New York, **1995**, S. 2509–2528.
- [310] M. Lyon, *Nature* **1961**, 190, 372–373.
- [311] T. Ohshima, G. J. Murray, W. D. Swaim, G. Longenecker, J. M. Quirk, C. O. Cardarelli, Y. Sugimoto, I. Pastan, M. M. Gottesman, R. O. Brady, A. B. Kulkarni, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 2540–2544.
- [312] E. H. Schuchman, R. J. Desnick in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Hrsg.: C. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle), 7. Aufl., Mc Graw Hill, New York, **1995**, S. 2601–2624.
- [313] M. T. Vanier, K. Suzuki, *Brain Pathol.* **1998**, 8, 163–174.
- [314] M. Elleder, *Path. Res. Pract.* **1989**, 185, 293–328.
- [315] L. E. Quintern, G. Weitz, H. Nehrkorn, J. M. Tager, A. W. Schram, K. Sandhoff, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, 922, 323–336.
- [316] L. E. Quintern, E. H. Schuchmann, O. Levran, M. Suchi, K. Ferlinz, H. Reinke, K. Sandhoff, R. J. Desnick, *EMBO J.* **1989**, 8, 2469–2473.
- [317] E. H. Schuchman, O. Levran, L. V. Peireira, R. J. Desnick, *Genomics* **1992**, 12, 197–205.
- [318] E. Conzelmann, K. Sandhoff, *Dev. Neurosci.* **1991**, 13, 197–204.
- [319] D. Graber, R. Salvayre, T. Levade, *J. Neurochem.* **1994**, 63, 1060–1068.
- [320] P. Santana, L. A. Pena, A. Haimovitz-Friedman, S. Martin, D. Green, M. McLoughlin, C. Cordon-Cardo, E. H. Schuchman, Z. Fuks, R. Kolesnick, *Cell* **1996**, 86, 189–199.
- [321] R. Lüllmann-Rauch, *Acta Neuropathol.* **1974**, 29, 237–249.
- [322] R. Hurwitz, K. Ferlinz, K. Sandhoff, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1994**, 375, 447–450.
- [323] K. Horinouchi, S. Erlich, D. Perl, K. Ferlinz, C. L. Bisgaier, K. Sandhoff, R. J. Desnick, C. L. Stewart, E. H. Schuchmann, *Nature Genet.* **1995**, 10, 288–293.
- [324] B. Otterbach, W. Stoffel, *Cell* **1995**, 81, 1053–1061.
- [325] E. H. Kolodny, A. L. Fluharty in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Hrsg.: C. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle), 7. Aufl., Mc Graw Hill, New York, **1995**, S. 2693–2739.
- [326] H. Jatzkewitz, E. Mehl, K. Sandhoff, *Biochem. J.* **1970**, 117, 6–8.
- [327] J. H. Austin, A. S. Balasubramanian, T. N. Pattabiraman, S. Saraswathi, D. K. Basu, B. K. Bachhawat, *J. Neurochem.* **1963**, 10, 805–816.
- [328] H. Jatzkewitz, K. Stinshoff, *FEBS Lett.* **1973**, 32, 129–131.
- [329] A. Polten, A. L. Fluharty, C. B. Fluharty, J. Kappler, K. von Figura, V. Gieselmann, *N. Engl. J. Med.* **1991**, 324, 18–22.
- [330] J. Rapola, *Path. Res. Pract.* **1994**, 190, 759–766.
- [331] K. Toda, K. Kobayashi, I. Goto, K. Ohno, Y. Eto, K. Inui, S. Okada, *J. Neurochem.* **1990**, 55, 1585–1591.
- [332] C. Stein, V. Gieselmann, J. Kreysing, B. Schmidt, R. Pohlmann, A. Waheed, H. E. Meyer, J. S. O'Brien, K. von Figura, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 1252–1259.
- [333] V. Gieselmann, A. Polten, J. Kreysing, J. Kappler, A. Fluharty, K. von Figura, *Dev. Neurosci.* **1991**, 13, 222–227.
- [334] R. L. Stevens, A. L. Fluharty, H. Kihara, M. M. Kaback, L. J. Shapiro, B. K. Marsh, K. Sandhoff, G. Fischer, *Am. J. Hum. Genet.* **1981**, 33, 900–906.
- [335] E. Conzelmann, M. Lee-Vaupel, K. Sandhoff in *Lipid Storage Disorders* (Hrsg.: R. Salvayre, L. Douste-Blazy, S. Gatt), Plenum, New York, **1988**, S. 323–332.
- [336] B. Hess, P. Saftig, D. Hartmann, R. Coenen, R. Lüllmann-Rauch, H. H. Goebel, M. Evers, K. von Figura, R. D'Hooge, G. Nagels, P. De Deyn, C. Peters, V. Gieselmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 14821–14826.
- [337] E. F. Neufeld, J. Muenzer in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Hrsg.: C. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle), 7. Aufl., Mc Graw Hill, New York, **1995**, S. 2465–2494.
- [338] A. Ballabio, L. J. Shapiro in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Hrsg.: C. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle), 7. Aufl., Mc Graw Hill, New York, **1995**, S. 2999–3022.
- [339] W. Rommerskirch, K. von Figura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 2561–2565.
- [340] B. Schmidt, T. Selmer, A. Ingendoh, K. von Figura, *Cell* **1995**, 82, 271–278.
- [341] G. Uhlhorn-Dierks, T. Kolter, K. Sandhoff, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2591–2594; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, 37, 2453–2455.
- [342] E. Beutler, G. A. Grabowski in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Hrsg.: C. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle), 7. Aufl., Mc Graw Hill, New York, **1995**, S. 2641–2670.
- [343] R. O. Brady, J. N. Kanfer, A. D. Shapiro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1965**, 18, 211–125.
- [344] A. D. Patrick, *Biochem. J.* **1965**, 97, 17C–18C.
- [345] J. Sorge, C. West, B. Westwood, E. Beutler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 7289–7293.
- [346] S. Tsuji, P. V. Choudary, B. M. Martin, S. Winfield, J. A. Barranger, E. I. Ginns, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 50–53.
- [347] G. Legler, *Biochim. Biophys. Acta* **1968**, 151, 728–729.
- [348] T. Dinur, K. M. Osiecki, G. Legler, S. Gatt, R. J. Desnick, G. A. Grabowski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, 83, 1660–1664.
- [349] M. E. Grace, K. M. Newman, V. Cheinker, A. Berg-Fussman, G. A. Grabowski, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 2283–2291.
- [350] S. Miao, J. D. McCarter, M. E. Grace, G. A. Grabowski, R. Aebbersold, S. G. Withers, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 10975–10978.
- [351] E. Sidransky, E. I. Ginns, *Genetic Counseling*, Human Sciences Press, New York, **1994**, 3, 13–22.
- [352] C. E. Hollak, S. van Weeley, M. H. van Oers, J. M. Aerts, *J. Clin. Invest.* **1994**, 93, 1288–1292.
- [353] E. Beutler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 5384–5390.
- [354] H. Christomanou, A. Aignesberg, R. P. Linke, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1986**, 367, 879–890.
- [355] D. Schnabel, M. Schröder, K. Sandhoff, *FEBS Lett.* **1991**, 284, 57–59.
- [356] M. A. Rafi, G. De Gala, X. Zhang, D. A. Wenger, *Somatic Cell Mol. Genet.* **1993**, 19, 1–7.
- [357] I. Meivar-Levy, M. Horowitz, A. H. Futerman, *Biochem. J.* **1994**, 303, 377–382.
- [358] N. W. Barton, F. S. Furrish, G. J. Murray, M. Garfield, R. O. Brady, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 1913–1916.
- [359] N. W. Barton, R. O. Brady, J. M. Dambrosia, A. M. DiBisceglie, S. H. Doppelt, S. C. Hill, H. J. Mankin, G. J. Murray, R. I. Parker, C. E. Argoff, R. P. Grewal, K. T. Yu, *New. Engl. J. Med.* **1991**, 324, 1464–1470.
- [360] E. Beutler, *Science* **1992**, 256, 794–799.
- [361] V. L. J. Tybulewicz, M. L. Tremblay, M. E. LaMarca, R. Willemsen, B. K. Stubblefield, S. Winfield, B. Zablocka, E. Sidransky, B. M. Martin, S. P. Huang, K. A. Mintzer, H. Westphal, R. C. Mulligan, E. I. Ginns, *Nature* **1992**, 357, 407–410.
- [362] Y. Liu, K. Suzuki, J. D. Reed, A. Grinberg, H. Westphal, A. Hoffmann, T. Döring, K. Sandhoff, R. L. Proia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 2503–2508.
- [363] D. S. Newburg, S. Yatziv, R. H. McCluer, S. Raghavan, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, 877, 121–126.
- [364] E. M. Prenc, P. Chaturvedi, D. S. Newburg, *J. Neurosci. Res.* **1996**, 43, 365–371.
- [365] K. Suzuki, Y. Suzuki, K. Suzuki in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Hrsg.: C. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle), 7. Aufl., Mc Graw Hill, New York, **1995**, S. 2671–2692.
- [366] K. Suzuki, Y. Suzuki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1970**, 66, 302–309.
- [367] T. Miyatake, K. Suzuki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1972**, 48, 538–543.
- [368] L. Svennerholm, M. T. Vanier, J. E. Mansson, *J. Lipid Res.* **1980**, 21, 53–64.
- [369] Y. Q. Chen, D. A. Wenger, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, 1170, 53–61.
- [370] Y. Q. Chen, M. A. Rafi, G. De Gala, D. A. Wenger, *Hum. Mol. Genet.* **1993**, 2, 1841–1845.
- [371] N. Sakai, K. Inui, N. Fujii, H. Fukushima, J. Nishimoto, I. Yanagihara, Y. Isegawa, A. Iwamatsu, S. Okada, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, 198, 485–491.
- [372] P. Luzi, M. A. Rafi, D. A. Wenger, *Genomics* **1995**, 26, 407–409.
- [373] T. Kobayashi, T. Yamanaka, J. M. Jacobs, F. Teixeira, K. Suzuki, *Brain Res.* **1980**, 202, 479–483.
- [374] N. Sakai, K. Inui, N. Tatsumi, H. Fukushima, T. Nishigaki, M. Taniike, J. Nishimoto, H. Tsukamoto, I. Yanagihara, K. Ozono, S. Okada, *J. Neurochem.* **1996**, 66, 1118–1124.

- [375] H. W. Moser in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Hrsg.: C. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle), 7. Aufl., Mc Graw Hill, New York, **1995**, S. 2589–2599.
- [376] A. Klein, M. Henseler, C. Klein, K. Suzuki, K. Harzer, K. Sandhoff, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, 200, 1440–1448.
- [377] H. W. Moser, A. L. Prenskey, J. H. Wolfe, N. P. Rosman, *Am. J. Med.* **1969**, 47, 869–890.
- [378] M. Sugita, J. T. Dulaney, H. W. Moser, *Science* **1972**, 178, 1100–1102.
- [379] M. Sugita, M. Williams, Z. T. Dulaney, H. W. Moser, *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, 398, 125–131.
- [380] K. Bernardo, R. Hurwitz, T. Zenk, R. J. Desnick, K. Ferlinz, E. H. Schuchman, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 11098–11102.
- [381] J. Koch, S. Gärtner, C. M. Li, L. E. Quintern, K. Bernardo, O. Levran, D. Schnabel, R. J. Desnick, E. H. Schuchman, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 33110–33115.
- [382] M. Iwamori, H. W. Moser, *Clin. Chem.* **1975**, 21, 725–729.
- [383] W. Stoffel, I. Melzner, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1980**, 361, 755–771.
- [384] T. Momoi, Y. Ben-Yoseph, H. L. Nadler, *Biochem. J.* **1982**, 205, 419–425.
- [385] T. Levade, H. W. Moser, A. H. Fensom, K. Harzer, A. B. Moser, R. Salvayre, *J. Neurol. Sci.* **1994**, 134, 108–114.
- [386] Y. Ben-Yoseph, R. Gagne, M. R. Parvathy, D. A. Mitchell, T. Momoi, *Clin. Genet.* **1989**, 36, 38–42.
- [387] G. van Echten-Deckert, A. Klein, T. Linke, T. Heinemann, J. Weisgerber, K. Sandhoff, *J. Lipid Res.* **1997**, 38, 2569–2579.
- [388] H. Holtschmidt, K. Sandhoff, W. Fürst, H. Kwon, D. Schnabel, K. Suzuki, *FEBS Lett.* **1991**, 280, 267–270.
- [389] E. G. Rorman, V. Scheinker, G. A. Grabowski, *Genomics* **1992**, 13, 312–318.
- [390] S. Morimoto, B. M. Martin, Y. Yamamoto, K. A. Kretz, J. S. O'Brien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 3389–3393.
- [391] S. L. Berent, N. S. Radin, *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, 664, 572–582.
- [392] E. Prenc, S. Chakravorty, A. Basu, L. S. Clark, R. H. Glew, J. A. Chambers, *Arch. Biochem. Biophys.* **1985**, 236, 98–109.
- [393] D. Fabbro, G. A. Grabowski, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 15021–15027.
- [394] D. A. Wenger, M. Sattler, S. Roth, *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, 712, 639–649.
- [395] H. Christomanou, T. Kleinschmidt, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1985**, 366, 245–256.
- [396] M. Tayama, S. Soeda, Y. Kishimoto, B. M. Martin, J. W. Callahan, M. Hiraiwa, J. S. O'Brien, *Biochem. J.* **1993**, 290, 401–404.
- [397] W. Schlote, K. Harzer, B. C. Paton, B. Kustermann-Kuhn, B. Schmid, J. Seeger, U. Beudt, I. Schuster, U. Langenbeck, *Eur. J. Pediatr.* **1991**, 150, 584–591.
- [398] S. C. Li, H. Kihara, S. Serizawa, Y. T. Li, A. L. Fluharty, J. S. Mayes, L. J. Shapiro, *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 1867–1871.
- [399] H. Christomanou, A. Chabás, T. Pampols, A. Guardiola, *Klin. Wochenschr.* **1989**, 67, 999–1003.
- [400] K. Harzer, B. C. Paton, A. Poulos, *Eur. J. Pediatr.* **1989**, 149, 31–39.
- [401] D. Schnabel, M. Schröder, W. Fürst, A. Klein, R. Hurwitz, T. Zenk, J. Weber, K. Harzer, B. C. Paton, A. Poulos, K. Suzuki, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 3312–3315.
- [402] V. Bradova, F. Smid, B. Ulrich-Bott, W. Roggendorf, B. C. Paton, K. Harzer, *Hum. Genet.* **1993**, 92, 143–152.
- [403] B. C. Paton, B. Schmid, B. Kustermann-Kuhn, A. Poulos, K. Harzer, *Biochem. J.* **1992**, 285, 481–488.
- [404] N. Fujita, K. Suzuki, M. T. Vanier, B. Popko, N. Maeda, A. Klein, M. Henseler, K. Sandhoff, H. Nakayasu, K. Suzuki, *Hum. Mol. Genet.* **1996**, 5, 711–725.
- [405] J. M. Penzien, J. Kappler, N. Herschkowitz, B. Schuknecht, P. Leinekugel, P. Propping, T. Tonnessen, H. Lou, H. Moser, S. Ziers, E. Conzelmann, V. Gieselmann, *Am. J. Hum. Genet.* **1993**, 52, 557–564.
- [406] D. P. Purpura, K. Suzuki, *Brain Res.* **1976**, 116, 1–21.
- [407] E. Conzelmann, K. Sandhoff, *Dev. Neurosci.* **1983/84**, 6, 58–71.
- [408] K. Suzuki, *Methods Enzymol.* **1987**, 138, 727–762.
- [409] B. D. Lake, E. P. Young, B. G. Winchester, *Brain Pathol.* **1998**, 8, 133–149.
- [410] W. W. Chen, A. B. Moser, H. W. Moser, *Arch. Biochem. Biophys.* **1981**, 208, 444–455.
- [411] S. L. Sutrina, W. W. Chen, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 3039–3044.
- [412] T. Kudoh, D. A. Wenger, *J. Clin. Invest.* **1982**, 70, 89–97.
- [413] K. Inui, M. Furukawa, J. Nishimoto, S. Okada, H. Yabuuchi, *J. Inherited Metab. Dis.* **1987**, 10, 293–296.
- [414] T. Levade, M. C. Tempesta, R. Salvayre, *FEBS Lett.* **1993**, 329, 306–312.
- [415] C. de Duve, *Fed. Proc.* **1964**, 23, 1045–1049.
- [416] A. Aigner, S. Wolf, H. G. Gassen, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 24–42; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 24–41.
- [417] P. D. Stahl, J. S. Rodman, M. J. Miller, P. H. Schlesinger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, 75, 1399–1403.
- [418] S. M. Richards, T. A. Olsen, J. M. McPherson, *Blood* **1993**, 82, 1402–1409.
- [419] P. M. Hoogerbrugge, K. Suzuki, K. Suzuki, B. J. H. M. Poorthuis, T. Kobayashi, G. Wagenmaker, D. W. Van Bekkum, *Science* **1988**, 239, 1035–1038.
- [420] P. M. Hoogerbrugge, B. J. Poorthuis, A. E. Romme, J. J. Van de Kamp, G. Wagenmaker, D. W. Van Bekkum, *J. Clin. Invest.* **1988**, 81, 1790–1794.
- [421] E. H. Birkenmeier, J. E. Barker, C. A. Vogler, J. W. Kyle, W. S. Sly, B. Gwynn, B. Levy, C. Pegors, *Blood* **1991**, 78, 3081–3092.
- [422] W. Krivit, L. A. Lockman, P. A. Watkins, J. Hirsch, E. G. Shapiro, *J. Inherited Metab. Dis.* **1995**, 18, 398–412.
- [423] K. W. Culver, Z. Ram, S. Wallbridge, H. Ishii, E. H. Oldfield, R. M. Blaese, *Science* **1992**, 256, 1550–1552.
- [424] M. A. Gama Sosa, R. de Gasperi, S. Undevia, J. Yeretsian, S. C. Rouse II, T. Lyerla, E. H. Kolodny, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 218, 766–771.
- [425] R. C. Mulligan, *Science* **1993**, 260, 926–932.
- [426] T. Ohashi, K. Watabe, K. Uehara, W. S. Sly, C. Vogler, Y. Eto, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 1287–1292.
- [427] S. Akli, J. E. Guidotti, E. Vigne, M. Perricaudet, K. Sandhoff, A. Kahn, L. Poenaru, *Gene Ther.* **1996**, 3, 769–774.
- [428] A. L. Beaudet, C. R. Scriver, W. S. Sly, D. Valle in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Hrsg.: C. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle), 7. Aufl., Mc Graw Hill, New York, **1995**, S. 53–118.
- [429] T. Kolter, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 2044–2048; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1955–1959.
- [430] F. M. Platt, T. D. Butters, *Biochem. Pharmacol.* **1998**, 56, 421–430.
- [431] F. M. Platt, G. R. Neises, G. Reinkensmeier, M. J. Townsend, V. H. Perry, R. L. Proia, B. Winchester, R. A. Dwek, T. D. Butters, *Science* **1997**, 276, 428–431.
- [432] K. M. Osiecki-Newman, D. Fabbro, T. Dinur, S. Boas, S. Gatt, G. Legler, R. J. Desnick, G. A. Grabowski, *Enzyme* **1986**, 35, 147–153.
- [433] K. Suzuki, R. L. Proia, K. Suzuki, *Brain Pathol.* **1998**, 8, 195–215.
- [434] K. Suzuki, M. T. Vanier, *J. Biochem.* **1998**, 124, 8–19.
- [435] G. K. Matsushima, M. Taniike, L. H. Glimcher, M. J. Grusby, J. A. Frelinger, K. Suzuki, J. P. Ting, *Cell* **1994**, 78, 645–656.
- [436] J. H. Wolfe, M. S. Sands, J. E. Barker, B. Gwynn, L. B. Rowe, C. A. Vogler, E. H. Birkenmeier, *Nature* **1992**, 360, 749–753.
- [437] P. Moullier, D. Bohl, J. M. Heard, O. Danos, *Nat. Genet.* **1993**, 4, 154–159.
- [438] G. van Echten-Deckert, K. Sandhoff, *J. Neurochem.* **1989**, 52, 207–214.
- [439] K. Hidari, I. Kawashima, T. Tai, F. Inagaki, Y. Nagai, Y. Sanai, *Eur. J. Biochem.* **1994**, 221, 603–609.
- [440] M. Henseler, A. Klein, M. Reber, M. T. Vanier, P. Landrieu, K. Sandhoff, *Am. J. Hum. Genet.* **1996**, 58, 65–74.
- [441] M. A. Rafi, X. L. Zhang, G. De Gala, D. A. Wenger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, 166, 1017–1023.
- [442] K. A. Kretz, G. S. Carson, S. Morimoto, Y. Kishimoto, A. L. Fluharty, J. S. O'Brien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 2541–2544.
- [443] X. L. Zhang, M. A. Rafi, G. De Gala, D. A. Wenger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 1426–1430.
- [444] X. L. Zhang, M. A. Rafi, G. De Gala, D. A. Wenger, *Hum. Genet.* **1991**, 87, 211–221.
- [445] T. Doering, W. M. Holleran, A. Potratz, G. Vielhaber, P. M. Elias, K. Suzuki, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.* **1999**, im Druck.
- [446] A. Giehle, T. Lemm, K. Sandhoff, A. Blume, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [447] T. Linke, K. Sandhoff, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [448] K. Ferlinz, M. Weiler, O. Bartelsen, K. Sandhoff, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [449] J. Bär, G. Kopal, K. Sandhoff, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [450] C. G. Stein, A. Ghodsi, T. Derksen, B. L. Davidson, *J. Virol.* **1999**, 73, 3424–3429.