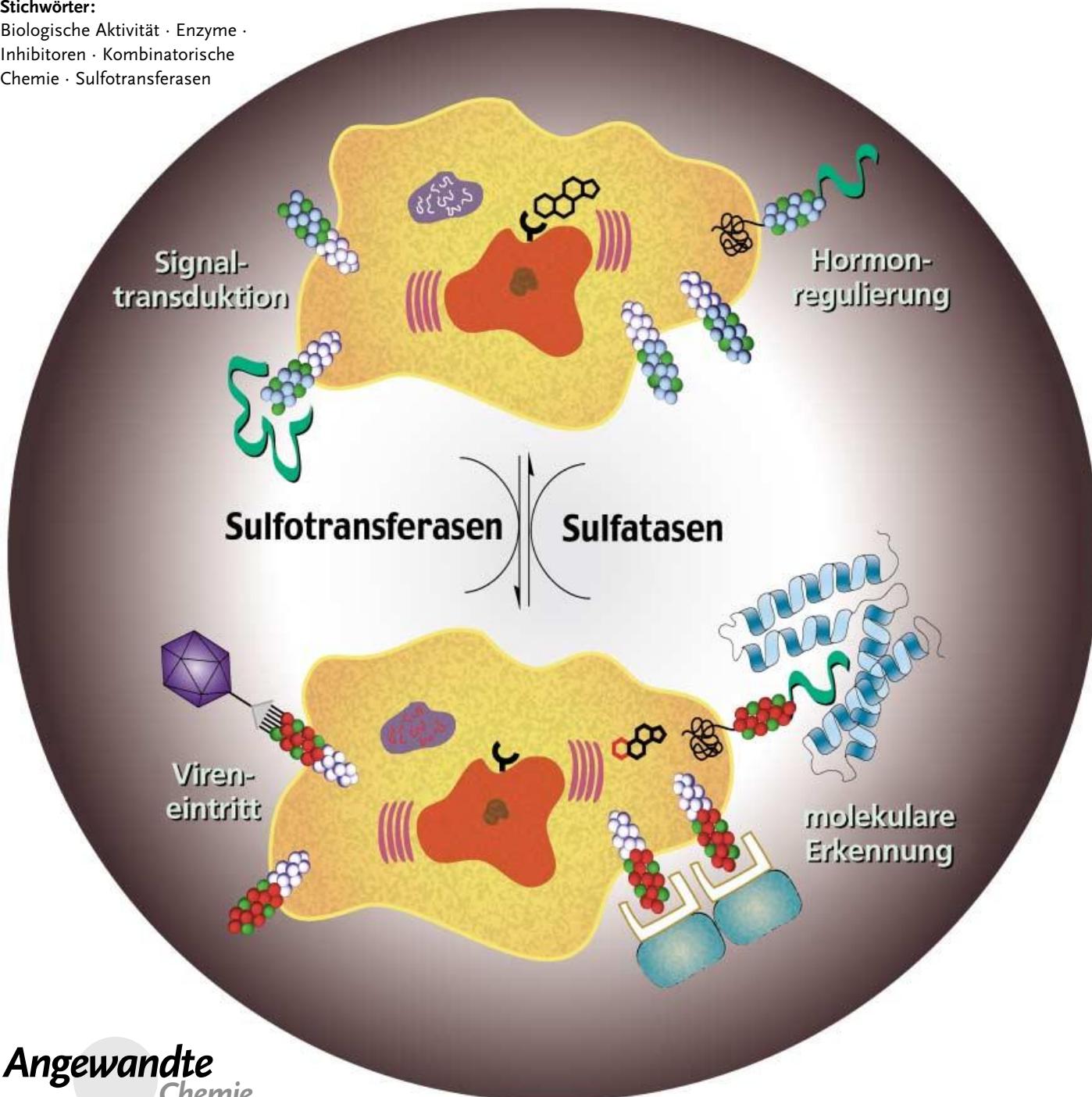


Sulfotransferasen: Struktur, Mechanismus, biologische Aktivität, Inhibierung, Anwendung in Synthesen

Eli Chapman, Michael D. Best, Sarah R. Hanson und Chi-Huey Wong*

Stichwörter:

Biologische Aktivität · Enzyme · Inhibitoren · Kombinatorische Chemie · Sulfotransferasen



Sein langem ist bekannt, dass die Sulfonierung von Biomolekülen in einer Vielzahl von Organismen stattfindet, von Prokaryoten bis hin zu vielzelligen Spezies, und ständig werden neue biologische Funktionen entdeckt, die mit dieser Umsetzung verknüpft sind. Frühe Studien zu Sulfotransferasen (STs), den Enzymen, die Sulfonierungen katalysieren, konzentrierten sich primär auf zytosolische STs, die an Entgiftungsreaktionen, der Hormonregulation und am Wirkstoffmetabolismus beteiligt sind. Obwohl man von ihrer Existenz gewusst hat, wurden membranassoziierte STs bis vor kurzem kaum untersucht. Sie sind an der Sulfonierung komplexer Kohlenhydrate und Proteine beteiligt und spielen eine zentrale Rolle bei einer Reihe von molekularen Erkennungsmechanismen und biochemischen Signalwegen. Des Weiteren hängen STs mit vielen pathophysiologischen Prozessen zusammen. Dies führte zu einem verstärkten Interesse an den komplexen Funktionen von STs und an der Möglichkeit zur Targetierung in therapeutischen Eingriffen. In diesem Aufsatz werden die Fortschritte bei der Aufklärung der Strukturen und Mechanismen von Sulfotransferasen sowie ihre biologische Aktivität, Inhibierung und Anwendung in der Synthese diskutiert.

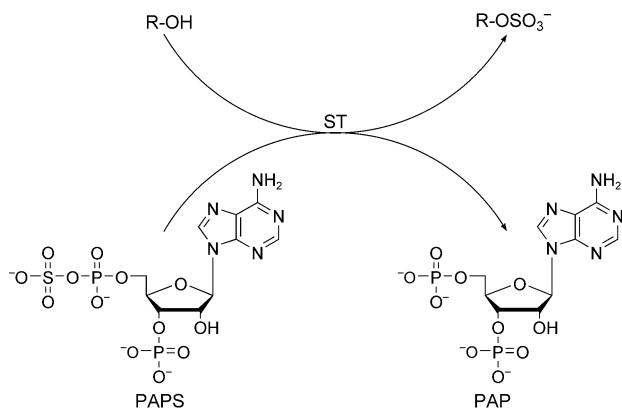
1. Einleitung

Schon 1876 wusste man von der Existenz sulfathaltiger Biomoleküle.^[1] Der Mechanismus der Sulfonierung wurde jedoch erst 80 Jahre später, nach der Isolierung des aktiven Sulfatdonors 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) erforscht.^[2] Sulfotransferasen (STs) katalysieren den Transfer einer Sulfurylgruppe (SO_3^-) von einem Donormolekül, gewöhnlich PAPS, auf Amin- und Hydroxysubstrate als Nucleophile (Schema 1). Ursprünglich wurde dieser Prozess als Sulfatierung bezeichnet, treffender ist jedoch Sulfonierung oder Sulfurylierung. Es gibt zwei Klassen von STs: zytosolische und membranassoziierte. Zytosolische STs sulfonieren kleine endogene und exogene Verbindungen wie Hormone, Bioamine, Wirkstoffe und verschiedene xenobiotische Verbindungen. Membranassoziierte STs, von denen viele jüngst

mit wichtigen biologischen Prozessen in Verbindung gebracht wurden, sulfonieren größere Biomoleküle wie Kohlenhydrate und Proteine.

Von zytosolischen STs war ursprünglich angenommen worden, dass sie in erster Linie an Entgiftungsprozessen beteiligt sind. Heute weiß man, dass dies nicht ihre einzige Funktion ist: Zum Beispiel sind sie, über die Bildung von Sulfatkonjugaten, an der Aktivierung und Desaktivierung von Hormonen und Carcinogenen beteiligt.^[3] Es wurde beobachtet, dass bestimmte Sulfatester von Hormonen in höheren Konzentrationen vorliegen als die nichtsulfatierten Spezies.^[4] Des Weiteren sind die Enzyme, die die Bildung von PAPS katalysieren (ATP-Sulfurylase und Adenosin-5'-phosphosulfat-Kinase (APS-Kinase)), in allen Organismen hoch konserviert, und eine Deletion dieser Aktivitäten ist letal.^[5]

Membranassoziierte Proteine wurden erst in jüngster Zeit mit mehreren wichtigen biologischen Prozessen in Verbindung gebracht, etwa mit dem Viruseintritt in Zellen, der Leukozytenadhäsion und der Antikoagulation. Allgemeiner betrachtet scheinen enzymatische Transformationen von Zelloberflächenproteoglycanen durch STs zentrale molekulare Erkennungs- und Signaltransduktionseignisse auszulösen. Daraus ließe sich ableiten, dass STs extrazelluläre Signalübertragungen steuern und damit den Kinasen analog



Schema 1. Allgemeine ST-katalysierte Reaktion mit PAPS als Cosubstrat.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	3611
2. Nomenklatur	3612
3. Substratspezifität	3613
4. Struktur	3613
5. Mechanismen	3616
6. Biologische Aktivität von Sulfotransferasen und ihren Produkten	3619
7. Sulfotransferase-Inhibierung	3623
8. Anwendungen in der Synthese	3627
9. Zusammenfassung und Ausblick	3628

[*] Dr. E. Chapman,⁺ Dr. M. D. Best,⁺ S. R. Hanson, Prof. C.-H. Wong
Department of Chemistry and
The Skaggs Institute for Chemical Biology
The Scripps Research Institute
10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)
Fax: (+1) 858-784-2409
E-mail: Wong@scripps.edu

[+] Beide Autoren trugen gleichermaßen zu diesem Aufsatz bei.

sind, die Signalkaskaden innerhalb der Zelle kontrollieren. Falls dies wirklich zutrifft, dann werden vermutlich noch viele weitere Funktionen von STs entdeckt werden, und ihre Bedeutung als therapeutische Targets wird weiter zunehmen.

Wegen der biologischen und medizinischen Relevanz der STs besteht ein starkes Interesse an den genauen Funktionen dieser Enzyme. Es stehen bereits viele Informationen über die Struktur, die Substratspezifität und die kinetischen Mechanismen der zytosolischen STs zur Verfügung. Zu den Strukturen von Übergangszuständen und zum Design wirksamer und spezifischer Inhibitoren ist hingegen wenig bekannt. Die membranassoziierten Enzyme sind weniger gut verstanden, zumal ihre wichtigen Rollen in biologischen Prozessen erst kürzlich aufgedeckt wurden. Mehrere ausgezeichnete Übersichtsartikel zu STs wurden bereits veröffentlicht.^[6–14] Im vorliegenden Aufsatz diskutieren wir den aktuellen Kenntnisstand zu den Strukturen, den chemischen und kinetischen Mechanismen, zur biologischen Aktivität, zur Inhibition und zu Anwendungen in der Synthese. Daneben gehen wir auf Substratspezifität und Nomenklatur ein.

2. Nomenklatur

Gegenwärtig sind zehn oder elf humane zytosolische STs charakterisiert. Die Nomenklatur dieser Enzyme hat eine lange und verwirrende Historie. Eine breite Substratüberlappung führte zu einem gewissen Durcheinander in frühen Nomenklaturschemata. Erst eine strengere biochemische, biophysikalische und genetische Charakterisierung konnte

Klarheit verschaffen, wenngleich auch in der heutigen Literatur noch viele unterschiedliche Namen für ein und dasselbe Enzym gefunden werden können. Im vorliegenden Aufsatz verwenden wir die Bezeichnung SULT für zytosolische STs sowie eine numerische Angabe zu deren Spezifizierung (Tabelle 1).^[15] Beispielsweise erhalten die drei bekann-

Tabelle 1: Nomenklatur humaner zytosolischer Sulfotransferasen.

Name	Synonyme	Substrat	Aminosäuresequenz-identität ^[a]
SULT1A1	ST1A3, STP-1, P-PST, TS-PST-1, HAST-1, HAST-2, H-PST	Phenole	100
SULT1A2	ST1A2, STP-2, TS-PST-2, HAST-4, HAST-4v	Phenole (niedrige Affinität)	95
SULT1A3	ST1A5, STM, TL-PST, M-PST, AST-3, HAST-3	Catecholamine	93
SULT1B1	HAST-1, 1B2, Hydroxylamin-ST	Thyroidhormone	54
SULT1C1	ST1C2	Arylhydroxylamine	37
SULT1C2	ST1C3	Arylhydroxylamine	41
SULT1E1	EST	Östrogene	51
SULT2A1	DHEA-ST, DST, HSST-1, HAST, STa	Hydroxysteroid	37
SULT1A1	Cholesterin-ST, HSST-2, HST	Hydroxysteroid	41
SULT1A1	Pregnenolon-ST, HSST-3, HST	Hydroxysteroid	39

[a] Relativ zu SULT1A1.



Chi-Huey Wong erlangte den B.S. und M.S. an der National Taiwan University und promovierte am Massachusetts Institute of Technology in Chemie. Nach einem Postdoc-Aufenthalt an der Harvard University wechselte er 1983 an die Texas A&M University und wurde 1989 Professor für Chemie am Scripps Research Institute (Ernest W. Hahn Chair). Seine Forschungsinteressen gelten bioorganischen und organischen Methoden in der Synthese sowie der Biokatalyse mit Schwerpunkt auf Studien zur Kohlenhydratvermittelten biologischen Erkennung.



Michael Best erhielt 1997 seinen B.S. in Chemie am Boston College mit einer Arbeit zur Synthese von Fullerenderivaten bei Prof. Lawrence T. Scott. 2002 promovierte er an der University of Texas in Austin bei Prof. Eric V. Anslyn über das Design und die Synthese von fluoreszenter Sensoren für Biomoleküle. Seitdem beschäftigt er sich als Postdoc bei Prof. Chi-Huey Wong am Scripps Research Institute mit der Entwicklung kleiner organischer Moleküle, die Störungen in biologischen Systemen hervorrufen.



Eli Chapman erhielt 1996 seinen B.S. an der University of California, Berkeley, mit Arbeiten zur nichtnatürlichen Aminosäuremutation bei Prof. Peter G. Schultz. Den M.A. erlangte 1998 er an der Columbia University bei Prof. James L. Leighton mit Arbeiten zur Rhodiumkatalysierten Silylformylierung. Er promovierte am Scripps Research Institute bei Prof. Chi-Huey Wong über Sulfotransferasen. Derzeit beschäftigt er sich als Postdoc bei Prof. Arthur Horwich an der Yale University School of Medicine mit der Untersuchung von molekularen Chaperonen.



Sarah R. Hanson erhielt ihren B.S. 1999 in Chemie an der University of California, Berkeley, mit einer Arbeit zur Synthese und Beurteilung antiproliferativer Purinderivate bei Prof. Peter G. Schultz. Nach einem Aufenthalt als NSF Undergraduate Fellow bei Prof. Maria C. Linder startete sie ihre berufliche Laufbahn bei der Firma Diversa, wo sie mit der Entwicklung neuer Enzymkatalysatoren betraut war. Seit 2002 beschäftigt sie sich im Rahmen eines Chemistry Graduate Program am Scripps Research Institute bei Prof. Chi-Huey Wong mit der Untersuchung von Sulfatasen.

ten Phenol-STs die Bezeichnungen SULT1A1, SULT1A2 und SULT1A3, die Östrogen-ST wird als SULT1E bezeichnet. Die SULT1-STs haben höhere Affinitäten für phenolische Gruppen, die SULT2-STs zeigen eine höhere Spezifität für Hydroxysterioide. Für membranassoziierte STs existiert bislang kein konsistentes allgemeingültiges Nomenklaturschema. STs aus dieser Klasse werden wir daher bezüglich ihrer Substratspezifität benennen, wobei wir den in der Literatur am häufigsten anzutreffenden Namen verwenden. Beispielsweise wird der Name TPST zur Beschreibung der Tyrosylprotein-Sulfotransferase verwendet. Bei Bedarf werden wir die Nomenklatur erklären.

3. Substratspezifität

Membranassoziierte STs haben eine relativ hohe Spezifität für ihre Substratmoleküle, wohingegen zytosolische STs zu einem gewissen Grad promiskuitiv sind. Viele zytosolische STs erkennen eine ganze Reihe von Molekülen als Substrate, wodurch ihre biologische Funktion oft verschleiert wird. In frühen Untersuchungen von STs wurden nichthomogene Enzyme eingesetzt, was für weitere Verwirrung sorgte. Wie aus Tabelle 2^[16–27] ersichtlich ist, haben die mit der Hormonregulierung verbundenen Enzyme (z.B. SULT1E1) generell eine höhere Spezifität für ein gegebenes Substrat als solche, die an Entgiftungsprozessen beteiligt sind. Im nächsten Abschnitt wird eine strukturbasierte Erklärung für die Unterschiede in der Spezifität gegeben.

Viele der Studien zur Substratspezifität von STs wurden mit der β -Aryl-Sulfotransferase IV aus Ratten durchgeführt (Übersichten hierzu siehe Lit. [6,28]). Speziell eine Studie mit SULT1A1 und SULT1A2 belegte eine Korrelation der Spezifität mit der Kettenlänge von Alkylphenolen sowie der Stellung von Substituenten. Moleküle mit kurzen Kohlenstoffketten (1–4 C-Atome) erwiesen sich als die besten Substrate, und Substitution in 2-Position resultierte in der höchsten katalytischen Wirkung. Substrate mit langen Kohlenstoffketten führten zur Inhibition.^[29] Ähnliche Studien zu SULT2A1 mit *para*-Alkyl-substituierten Benzylalkoholen zeigten eine maximale katalytische Effizienz für *n*-Pentylbenzylalkohol. Für primäre *n*-Alkohole wurde auf ähnliche Weise eine optimale Kettenlänge von 9–11 Kohlenstoffatomen ermittelt.^[30]

Die Spezifität der PAPS-Bindungsstelle wurde mithilfe von Affinitätsmarkierungstechniken und unterschiedlichen Substraten in mehreren Studien untersucht.^[31–34] Eine dieser Studien, mit SULT1A1, zeigte, dass das Enzym stark an Ribose und Adenin sowie auch andere Nucleotide bindet. Auch konnte gezeigt werden, dass SULT1A1 die Sulfonierung von cyclischem Adenosin-2',3'-phosphat-5'-phosphat (cyclischem 2',3'-PAP), Adenosinmonophosphat (AMP) und Adenosin-2',5'-diphosphat (2',5'-PAP) katalysiert. Unter den untersuchten Cofaktoren hatte PAP den niedrigsten K_m -Wert ($K_m = 0.4 \mu\text{M}$), gefolgt von cyclischem 2',3'-PAP ($K_m = 2.3 \mu\text{M}$) und 2',5'-PAP ($K_m = 67 \mu\text{M}$). Der höchste K_m -Wert wurde für AMP ermittelt ($K_m = 4300 \mu\text{M}$).^[35]

Tabelle 2: Substratspezifität humaner zytosolischer STs.

SULT	repräsentatives Substrat	$K_m [\mu\text{M}]$	$K_{m,\text{PAPS}} [\mu\text{M}]$
1A1	pNP	1.1	0.98
	2-Naphthol	200	
	Dopamin	130	
	Tyramin	6483	
	Minoxidol	2800	
	3,3'-T ₂	0.14	
	T ₃	29.1	
1A2	pNP	69 (HAST-4) 4.1 (HAST-4v)	5.52 (HAST-4) 0.203 (HAST-4v)
	Dopamin	ND	
1A3	pNP	1024	1.1
	Tyramin	35	
	Dopamin	3.7	
1B1	pNP	5	1.2
	T ₄	23	
	T ₃	ND	
	rT ₃	141	
1C1	pNP	84.07 ^[a]	8.8 ^[b]
	Dopamin	ND	
	N-OH-2AAF	28.6	
1C2	pNP	75.3 ^[a]	
	Dopamin	ND	
	N-OH-2AAF	47.5	
1E1	Östradiol	0.025	0.3
	DHEA	4.569	
	Androstendiol	3.224	
	pNP	76.6	
2A1	Östradiol	2.0	1.6
	DHEA	0.993	
	Androstendiol	0.191	
2B1a	DHEA	2.27	0.09
	Pregnenolon	0.20	
	17 α -Hydroxypregneno-lon	0.89	
2B1b	DHEA	4.37	0.07
	Pregnenolon	0.60	
	17 α -Hydroxy-pregnenolon	0.97	

[a] Angegebene Werte sind Aktivitäten ($\text{pmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$). [b] Für rSULT1C1.

4. Struktur

Derzeit sind neun Strukturen von STs von fünf unterschiedlichen Enzymen aufgeklärt. Vier der fünf sind zytosolische STs mit einem hohen Homologiegrad; eine Struktur (NST-1) befindet sich auf der ST-Domäne der humanen Heparansulfat-*N*-Desacetylase/*N*-Sulfotransferase (HSNDST), einer membrangebundenen ST (Abbildung 1). Die Strukturen sind hoch konserviert und ähneln stark denen der Nucleotid-Kinasen.^[36] Sie sind annähernd sphärisch und

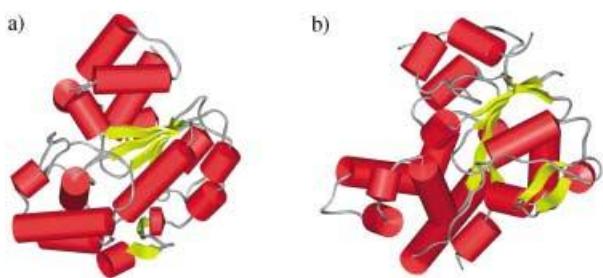


Abbildung 1. Strukturen im Kristall von a) Östrogen-ST (SULT1E1) und b) Heparansulfat-N-Desacetylase/N-Sulfotransferase (HSNDST).

enthalten ein einzelnes α/β -Faltmotiv mit einem zentralen vier- oder fünfsträngigen parallelen β -Faltblatt, umgeben von α -Helices. Eine Ausnahme bildet die Retinol-Dehydratase, ein Mitglied der ST-Überfamilie. Diese hat zwei Domänen, eine mit einem fünfsträngigen parallelen β -Faltblatt und acht α -Helices und eine mit einem dreisträngigen antiparallelen β -Faltblatt und sechs α -Helices.^[37] Das konservierte aktive Zentrum und die PAPS-Bindungsstelle sind jedoch vorhanden. Die PAPS-Bindungsregion sämtlicher STs ist auf dem Aminosäureneiveau konserviert (Abbildung 2), ebenso wie

	Region I									Region IV									Region I / IV			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Startaminosäure	Zugriffs-	schlüssel	
humane zytosolische STs																						
SULT1A1 (AST)	T	Y	P	K	S	G	T	T	W	R	K	G	M	A	G	D	W	K	45 / 257	G01843		
SULT2B1 (HSST)	T	Y	P	K	S	G	T	T	W	R	K	G	V	C	G	D	W	K	67 / 274	AAH34694		
SULT1E1 (EST)	T	Y	P	K	S	G	T	T	W	R	K	G	I	T	G	D	W	K	44 / 256	P49888		
SULT2A1 (DHEA)	T	Y	P	K	S	G	T	N	W	R	K	G	V	S	G	D	W	K	43 / 249	Q06520		
humane membrangebundene STs																						
GlcNAc 6-O-ST-5	S	S	W	R	S	G	S	S	F										69 / NA	NP_078809		
KS Gal 6-O-ST-1	A	T	T	R	S	G	S	S	F										74 / NA	AAH22567		
B-Gal 3-O-ST-5	K	T	H	K	S	G	S	S	S										73 / NA	AAH12976		
TPST-2	G	V	P	R	S	G	T	T	L										75 / NA	AAH17509		
█ konserviert unter allen gezeigten STs █ konserviert unter allen STs eines Subtyps █ stark konserviert innerhalb eines Subtyps																						

Abbildung 2. Sequenzhomologien zytosolischer und membranassoziiert STs.

die Struktur dieser Region. Die größte Varianz unter diesen STs findet sich in der Substratbindungsregion. Eine Vielzahl mechanistischer Einzelheiten stammt aus Studien an Strukturen mit gebundenem Substrat und/oder Cosubstrat sowie aus der Untersuchung eines Vanadatkplexes als potenziellem Übergangszustandsmimetikum. Strukturvergleiche ergaben, dass SULT1A3 mit mSULT1E1 mit einer mittleren quadratischen Abweichung (RMSD) der C_{α} -Atome von 0.81 Å überlagert.^[38] Ähnliche Vergleiche zwischen der PAPS-Bindungsregion von NST-1 und mSULT1E1 ergaben eine RMSD von 1.16 Å.^[39] Einige der wichtigsten strukturellen Aspekte werden im Folgenden zusammengefasst, ansonsten sei auf eine Reihe sehr guter Übersichten verwiesen.^[40,41]

4.1. PAPS-Bindungsregion

Die PAPS-Bindungsregion ist auf Aminosäureneiveau hoch konserviert. Drei Strukturmotive sind für die PAPS-

Bindung maßgebend: die 5'-Phosphatsulfatbindungsseile (PSB-Schleife), die 3'-Phosphatbindungsseile (PB-Schleife) und das β -Strang-Schleifen- α -Helix-Motiv (SLH3-Motiv).^[42] Nur eine der gelösten Strukturen, SULT1A3, weicht von diesen Bindungsmotiven ab, und zwar hinsichtlich einer starken Abweichung in der 3'-PB-Schleife. Daraus wurde geschlossen, dass die Bindung des 3'-Phosphats eine geringere Bedeutung hat als die des 5'-Phosphats.^[38] In einer anderen Publikation, die eine im selben Jahr durchgeföhrte Strukturlösung des gleichen Enzyms beschreibt, wird über besagte Abweichung jedoch nicht berichtet.^[43]

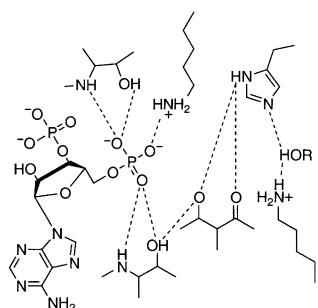
Für SULT1E1 wurden drei Strukturen gelöst: eine mit gebundenem PAP und Östradiol,^[36] ein als Übergangszustandsanalogen betrachteter Vanadatkplex^[44] und eine mit gebundenem PAPS.^[45] In mSULT1E1 mit gebundenem PAP und Östradiol, der ersten gelösten ST-Struktur, wird die PSB-Schleife aus den Aminosäureresten 45–51 gebildet. Das N ζ -Atom in Lys48 und das O γ -Atom von Thr51 und Thr52 bilden Wasserstoffbrücken zum 5'-Phosphat. Die PB-Schleife besteht aus den Resten 257–259, wobei die Amidstickstoffatome von Lys257 und Gly259 sowie die Seitenkette von Arg257 Wasserstoffbrücken zum 3'-Phosphat bilden. Mit Gly259 beginnt ein GxxGxxK-Motiv, das für die Bindung von

PAPS und Östradiol benötigt wird. Mutagenese von zwei der konservierten Aminosäuren erhöhte den K_m -Wert für PAPS auf das zehnfache, Mutagenese aller drei Aminosäuren ergab ein inaktives Enzym.^[46] Arg130 und das O γ -Atom von Ser138 haben ebenfalls einen Wasserstoffbrücke entsprechenden Abstand zueinander. Schließlich sind Trp153 und Phe229 so angeordnet, dass sie einen parallelen Stapel mit dem Adeninrest von PAP bilden. Im Vanadatkplex koordinieren Lys48, His108 und Lys106 das Vanadatzentrum. Aus der PAPS bindenden Struktur folgte, dass Lys48 anfänglich mit Ser138 wechselwirkt und sich nach Einleitung der Reaktion so verschiebt, dass es mit der Abgangsgruppe Sulfat wechselwirken kann (Schema 2). Mutagenesestudien an konservierten Resten des aktiven Zentrums ergaben, dass His108 für die katalytische Aktivität notwendig ist und dass Lys48 und Lys106 nur durch Mutagenese mit Argininresten ersetzt werden können, ohne dass die Aktivität vollständig verloren geht.^[44] Mutagenese von Ser138 zeigte, dass die Wechselwirkung zwischen diesem Rest und Lys48 ein wichtiger Schutz vor der Autohydrolyse von PAPS ist.^[45]

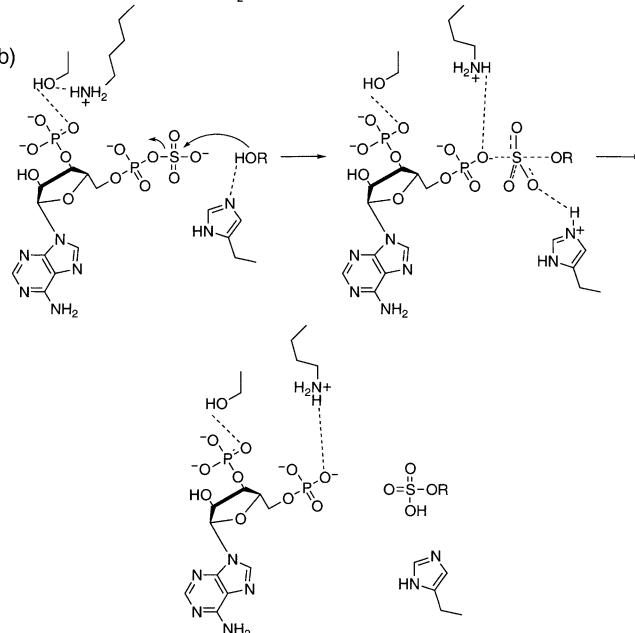
4.2. Substratbindungsregionen

Erwartungsgemäß findet sich die höchste Strukturvarianz in den Substratbindungsregionen. Es wurde gezeigt, dass die Substratbindungsregion der SULT1A-Familie eine Reihe von hydrophoben Resten enthält. In SULT1A1 und SULT1A3, die zu 93 % identisch sind, sich in der Substratbindung aber deutlich unterscheiden, wurden zwei variierende Regionen analysiert (Region I (84–89) und Region II (143–148)), die für die beobachtete Spezifität maßgebend sind. Ein chimäres

a)



b)



Schema 2. Katalytisches Zentrum einer Sulfotransferase. a) Wechselwirkung mit dem 5'-Phosphatrest von PAPS und mit konservierten katalytischen Resten von mSULT1E1. b) ST-katalysierter Mechanismus der Sulfonierung, wie er aus Strukturstudien abgeleitet wurde.

SULT1A1, bei dem die Region I durch Region II ausgetauscht war, zeigte die für SULT1A3 charakteristische Spezifität und umgekehrt.^[47] Durch die Mutationen Asp86A/E89I/E146A in SULT1A3 sinkt die katalytische Effizienz mit Dopamin als Substrat, steigt aber mit *p*-Nitrophenol (PNP) auf das Effizienzniveau von SULT1A1. Es wurde vorgeschlagen, dass diese negativ geladenen Aminosäuren mit der Aminogruppe von Dopamin (oder anderen Monoaminosubstraten) wechselwirken und dadurch die Ladung stabilisieren und das Substrat korrekt ausrichten. Entsprechende Mutationen in SULT1A1 blieben weitgehend ohne Wirkung, lediglich die katalytische Effizienz mit Dopamin als Substrat wurde leicht erhöht.^[48]

Eine ähnliche, vorwiegend hydrophobe Bindungstasche liegt in der Steroid-ST vor. In einer Mutagenesestudie mit SULT1E1 wurde gefunden, dass das Enzym nach der Mutation Y81L Dehydroepiandrosteron (DHEA) bindet. Im Wildtyp-Enzym schließt Tyr81 die 3 β -Hydroxygruppe von DHEA durch sterische Hinderung mit dem C19-Methylrest aus der Bindungstasche aus.^[24] Strukturstudien mit SULT2A3 ergaben, dass Trp77 und Phe133 eine „Tor-artige“ Struktur bilden (ähnlich dem Tyr81-Tor in SULT1E1), deren Funktion

bislang jedoch unbekannt ist. Weiterhin wurde gefunden, dass die SULT2A3-Bindungstasche hoch flexibel ist und das Substrat relativ zur Orientierung von Östradiol in der SULT1E1-Struktur um 30° gedreht ist. Als Erklärung für die Substrat-Inhibierung wurde ein alternativer Substratbindungsmodus vorgeschlagen, wonach DHEA um 2.87 Å in Richtung PAP verschoben ist.^[49,50] Deletionsstudien an N-terminalen und C-terminalen Regionen von SULT2B1a und SULT2B1b haben gezeigt, dass die 23 Aminosäuren des Aminoterminus von SULT2B1b essenziell für die Sulfonierung von Cholesterin sind (d.h., die Funktion geht durch Deletion verloren), während Deletion von 53 Aminosäuren vom C-Terminus keinen Einfluss auf die Aktivität hat. Analogen wurde bei SULT2B1a nicht beobachtet: Weder Deletion vom N-Terminus noch vom C-Terminus beeinflusste die Sulfonierung von Pregnanolon.^[51] Aus der Struktur der Retinol-Dehydratase geht hervor, dass gebundenes Retinol von mehreren aromatischen Resten umgeben ist. Diese Reste sind vermutlich an der Deprotonierung im Dehydratisierungsschritt beteiligt. Die konservierten Reste des katalytischen und des PAPS-Bindungszentrums ähneln denen anderer STs (Abbildung 3).^[37]

In der membranassoziierten NST-1, die Heparansulfat (HS) sulfoniert, liegt die Substratbindungsstelle als großer hydrophiler Spalt vor.^[39] Modelluntersuchungen der Heparansulfat- α -glucosaminyl-3-O-ST-1 zeigen ebenfalls einen großen offenen Spalt mit einer Anzahl basischer Reste.^[42] Laut Domänenaustrauschstudien mit 3-O-ST-1 und 3-O-ST-3 wird die Spezifität durch die ST-Domäne vermittelt und nicht durch den divergenten N-Terminus. 3-O-ST-1 generiert Bindungsstellen für Antithrombin, 3-O-ST-3 solche für das gD-

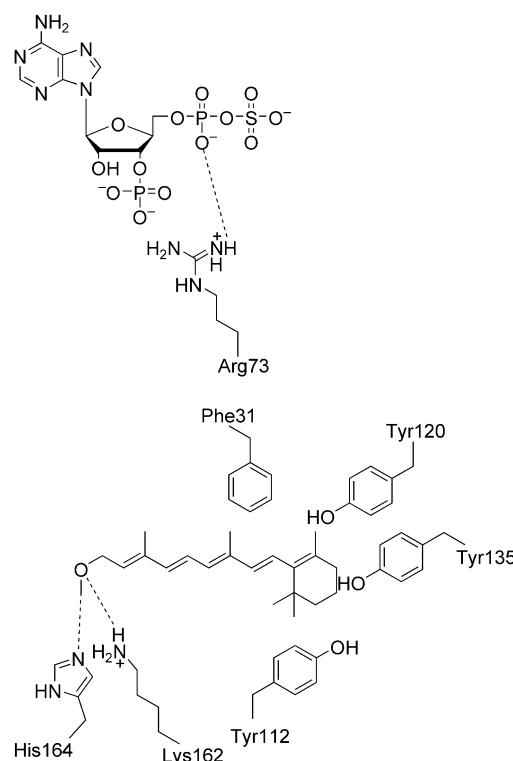


Abbildung 3. Bindungstasche der Retinol-Dehydratase, abgeleitet aus Kristallstrukturanalysen.

Hüllprotein des Herpes-Simplex-Virus-1 (HSV-1). Nach Fusion der N-terminalen Region der 3-O-ST-1 mit der ST-Domäne der 3-O-ST-3 generiert das Protein gD-Bindungsstellen. Im umgekehrten Fall, der Fusion der N-terminalen Region der 3-O-ST-3 mit der ST-Domäne der 3-O-ST-1, generiert das Protein Bindungstellen für Antithrombin.^[52]

4.3. Dimerisierungsmotiv

Die meisten STs liegen in ihren katalytisch aktiven Formen als Homodimere vor. Mehrere der gelösten Strukturen kristallisierten als Dimere, jedoch wurde es als unwahrscheinlich eingeschätzt, dass dies die katalytisch aktiven Spezies wären, da die Substratbindungsstellen durch die Dimerisierung blockiert sind. Mit mSULT1E1 (einem Monomer) und hSULT1E1 (einem Dimer) wurden Strukturvergleiche und Mutagenesestudien durchgeführt, mit dem Ziel, ein gemeinsames Strukturmotiv zu finden. Es wurde beobachtet, dass die Mutationen V269E und V260E die Homodimere SULT1E1 bzw. SULT2A1 in Monomere überführen. Des Weiteren zeigte sich, dass die Mutationen P269T und E270V in mSULT1E1 die Bildung einer homodimeren Struktur verursachen. Daraus wurde geschlossen, dass das gemeinsame Motiv KxxxTVxxxE für die Dimerisierung der STs ausschlaggebend ist.^[24]

4.4. Mechanistische Schlüsse

Aus den gelösten Strukturen konnte eine Vielzahl mechanistischer Schlüsse abgeleitet werden. Offenkundig verlaufen die Sulfonierungsreaktionen über einen geradlinigen Angriff des Nucleophils an der Sulfatgruppe von PAPS. Wahrscheinlich unterstützt der konservierte Histidinrest des aktiven Zentrums die Reaktion durch Deprotonierung des angreifenden Substrats; möglich ist aber auch, dass dieser Histidinrest als Nucleophil wirkt und einen instabilen Protein-Sulfat-Komplex bildet.^[36] Die Strukturuntersuchungen lassen keine Rückschlüsse darauf zu, ob die Reaktion nach einem assoziativen (S_N2) oder einem dissoziativen Mechanismus (S_N1) abläuft (Schema 3). Beide Möglichkeiten werden durch

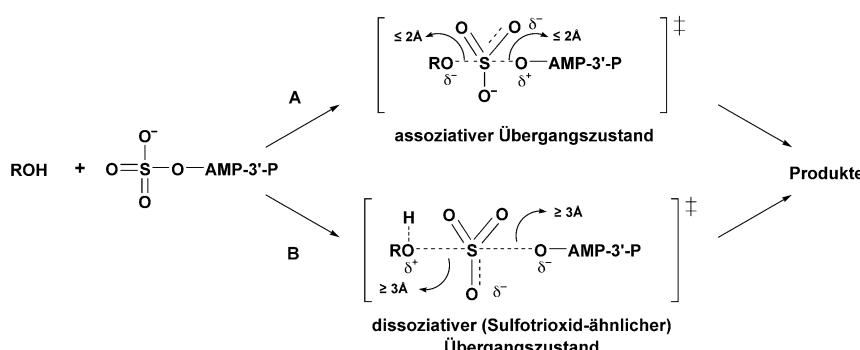
die Ergebnisse einer theoretischen Studie zu NST-1 gestützt. Beim assoziativen Mechanismus sollte die größte Ladungsänderung an der Sulfurylgruppe auftreten, wobei die Ladung durch Lys614, Lys676 und Lys833 stabilisiert werden könnte. Beim dissoziativen Mechanismus würde die größte Ladungsänderung das verbrückende Sauerstoffatom der 5'-Phosphatgruppe betreffen, wobei nun Thr617 und Thr618 stabilisierend wirken.^[53] Im nächsten Abschnitt werden wir das Thema vertiefen.

5. Mechanismen

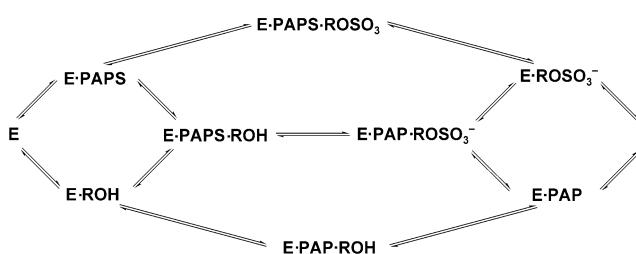
Die kinetischen Mechanismen ST-katalysierter Reaktionen haben eine lange und verwirrende Historie, erst mithilfe rekombinanter DNA-Technologie und Strukturstudien ergab sich ein klareres Bild. Bei vielen älteren Studien ergaben sich Probleme durch Verunreinigungen der untersuchten Enzyme, durch Enzyme in mehreren Isoformen und durch oxidative Unterschiede. Von einigen frühen Ausnahmen abgesehen, verlaufen sämtliche untersuchten Reaktionen mit Sulfotransferasen aus höheren Organismen nach sequenziellen Mechanismen, und zwar mit geordnetem („ordered“) oder ungeordnetem („random“) Ablauf. Für alle untersuchten bakteriellen STs, die andere Cosubstrate als PAPS verwenden, wurden Ping-Pong-Mechanismen gefunden. Der enzymatische Mechanismus für STs wird als „Bi-Bi“ bezeichnet, da die Reaktion mit zwei Substraten verläuft und zu zwei Produkten führt.

5.1. Sequenzielle Mechanismen

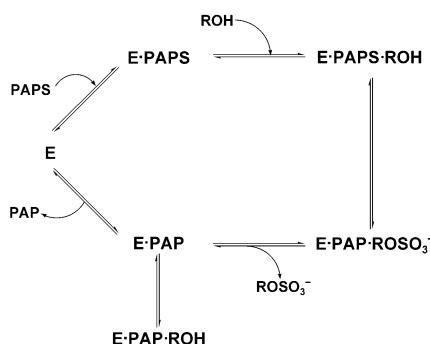
In neueren Studien (wie auch in den meisten älteren) konnte gezeigt werden, dass STs, die PAPS als Cosubstrat verwenden, sequenzielle kinetische Mechanismen durchlaufen, bei denen vor der Produktfreisetzung ein ternärer Enzymkomplex gebildet wird. Sequenzielle Mechanismen können entweder ungeordnet verlaufen, d.h. ohne eine zwingend vorgegebene Reihenfolge der Substrataddition (Schema 4), oder geordnet, d.h., ein bestimmtes Substrat kann nur binden, wenn ein anderes bereits gebunden ist (Schema 5). Die Reihenfolge der Substratbindung kann mit unterschiedlichen Methoden untersucht werden. Aufschluss geben unter anderem die direkte Messung von Bindungseignissen und Daten zur Produktinhibierung. Eventuelle Probleme ergeben sich durch die Bildung eines oder mehrerer Dead-End-Komplexe oder durch Verunreinigungen bei der Enzymisolierung. Sehr häufig wurden Produktinhibierungsstudien zur Bestimmung der Reihenfolge der Substrataddition herangezogen. Für einen geordneten Bi-Bi-Mechanismus kommen drei mögliche nichtkompetitive und ein kompetitives Inhibierungsmuster infrage (Abbildung 4). Für den in Schema 5 dargestellten Fall sollte PAP PAPS kompetitiv inhibieren. Bei einem ungeordneten kinetischen Mechanismus sind alle Inhibierungs-



Schema 3. Zwei mögliche Übergangszustände der ST-katalysierten Sulfonierung. Weg A durchläuft einen assoziativen Übergangszustand, wobei hauptsächlich die Nucleophilie des Substrats eine Rolle spielt. Weg B durchläuft einen dissoziativen Übergangszustand, wobei die Abspaltung der Abgangsgruppe entscheidend ist.



Schema 4. Ungeordneter kinetischer Bi-Bi-Mechanismus unter Beteiligung zweier Dead-End-Inhibitorkomplexe E-PAPS-ROSO₃ und E-PAP-ROH.



Schema 5. Geordneter kinetischer Bi-Bi-Mechanismus unter Beteiligung des Dead-End-Komplexes E-PAP-ROH.

muster vom kompetitiven Typ, solange keine Dead-End-Komplexe entstehen. Diese inhibieren nichtkompetitiv und können daher die Interpretation der Ergebnisse erschweren.^[54]

Erste Untersuchungen von SULT1E1 aus bovinen Adrenaldrüsen ließen auf einen sequenziellen Mechanismus schließen, es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob dieser geordnet oder ungeordnet verläuft.^[55] In einer weiteren Untersuchung von SULT1E1 aus bovinen Adrenaldrüsen wurde ein wellenförmiges kinetisches Muster beobachtet.^[56] Beide Studien wurden an Enzymsubstanz vorgenommen, die möglicherweise nicht homogen war, daher müssen die Daten mit Vorsicht interpretiert werden. Bindungsstudien mit rekombinanter hSULT1E1 und Untersuchungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit ergaben, dass es sich um einen ungeordneten Bi-Bi-Mechanismus mit schneller Äquilibrierung und unter Beteiligung der beiden Dead-End-

Komplexe E-PAPS-E₂S und E-PAP-E₂ handelt. Weiter zeigte sich, dass die Stöchiometrie der E₂-Bindung 2:1 beträgt. Es wurde geschlossen, dass eine Bindungsstelle katalytisch ist und es sich bei der zweiten um eine allosterische Bindungsstelle handelt, die den Stoffumsatz reguliert. Die Autoren weisen darauf hin, dass bei den Fluoreszenz-Bindungsexperimenten eventuell auch nichtproduktive Komplexe erfasst wurden, was die Interpretation der Daten erschwert.^[57]

In ähnlichen kinetischen und Bindungsstudien mit Phenol sulfonierenden Sulfotransferasen aus der Ratte und dem Meerschweinchen wurden sequenzielle Mechanismen ermittelt, die Reihenfolge der Bindung konnte aber nicht aufgeklärt werden. Frühe Studien an teilweise gereinigter gpPST und rPST belegten einen ungeordneten Bi-Bi-Mechanismus mit schneller Äquilibrierung.^[58,59] Möglicherweise widersprüchliche Ergebnisse wurden in Studien mit PST aus Rattenhirn erhalten, die auf einen geordneten sequenziellen Mechanismus mit einem E-PAP-ROH-Dead-End-Komplex hinweisen.^[60] Die Ergebnisse der bislang umfassendsten Studie (Bindungs- und Inhibierungsdaten, Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten), ausgeführt mit augenscheinlich homogener AST-IV (rSULT1C1) aus Rattenleber, sind mit diesem Mechanismus in Einklang.^[26] Später wurde nachgewiesen, dass zwei oxidative Formen der gleichen Sulfotransferase mit unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften existieren. Auch fand man, dass ein E-PAP-Komplex entweder dissoziieren oder unter Bildung eines Dead-End-Komplexes das Produkt PNP binden kann. Daraus lässt sich ableiten, dass ein geordneter Mechanismus vorliegen muss, da der Befund mit einem ungeordneten Mechanismus mit schneller Äquilibrierung nicht in Einklang zu bringen ist.^[54,61] Dieses Beispiel zeigt potenzielle Fehlschlüsse in anderen mechanistischen Untersuchungen auf und sollte Anlass zur Überprüfung früherer Ergebnisse sein.

Andere PAPS verwendende STs folgten sowohl geordneten als auch ungeordneten Mechanismen, die in allen Fällen jedoch sequenzieller Natur waren.^[62–65]

5.2. Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismen

Es wurde nachgewiesen, dass Aryl-Sulfotransferasen aus *Eubacterium A-44*, *Enterobacter amnigenus* und *Aspergillus oryzae* Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismen durchlaufen. Diese Enzyme verwenden kein PAPS, sondern aktivierte ArylSpe-

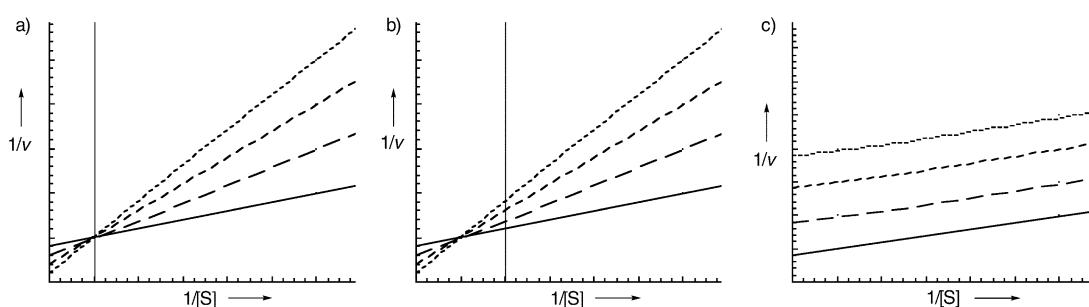
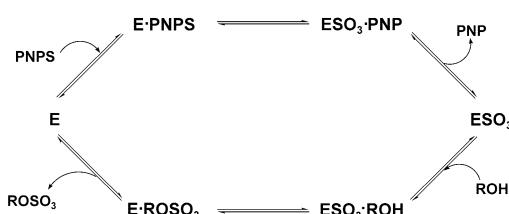


Abbildung 4. Produktinhibierungsmuster. Die Auftragungen wurden durch Variieren der Konzentration eines der Substrate bei konstanter gehaltener Konzentration des anderen Substrats bei vier unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen erhalten. a) Erwartetes kinetisches Muster bei kompetitiver Inhibition, b) beobachtetes kinetisches Muster bei nichtkompetitiver Inhibition, c) kinetisches Muster bei unkompetitiver Inhibition.

ties wie *p*-Nitrophenolsulfat (PNPS) als Quelle für aktivierte Schwefel. Ping-Pong-Mechanismen folgen dem in Schema 6 gezeigten allgemeinen Weg. Bei einem Ping-Pong-



Schema 6. Allgemeiner Mechanismus einer Ping-Pong-Bi-Bi-Reaktion.

Mechanismus führt die doppelt reziproke Auftragung von $1/v$ gegen $1/[Substrat]$ bei unterschiedlichen Konzentrationen des zweiten Substrats zu einer charakteristischen Serie paralleler Linien (Abbildung 5).^[54] Dieses Muster bei doppeltreziproker

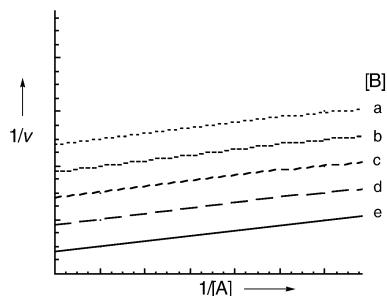
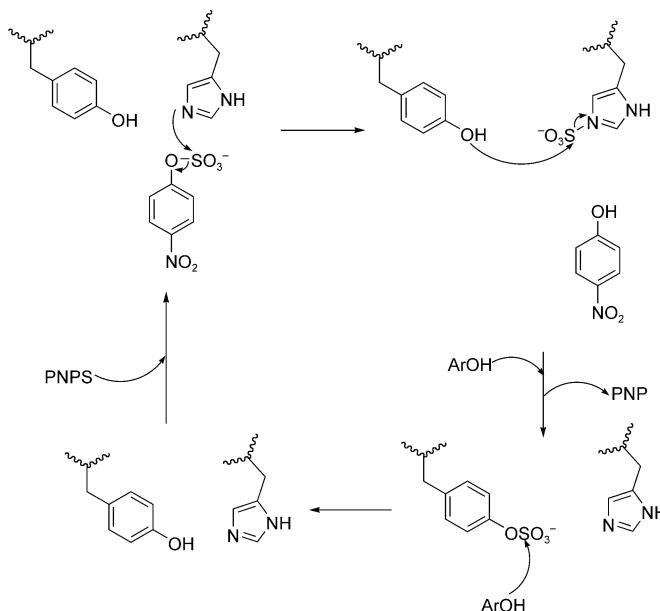
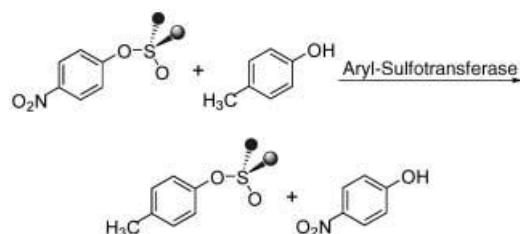


Abbildung 5. Kinetisches Muster bei doppeltreziproker Auftragung bei Vorliegen eines Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus. Gemessen wird die Geschwindigkeit bei jeweils fester Konzentration von Substrat A und unterschiedlichen Konzentrationen von Substrat B.

Auftragung zusammen mit dem Befund, dass freies Sulfat nicht in das Produkt eingebaut wurde, führte zu dem Schluss, dass die Aryl-Sulfotransferase aus *Aspergillus oryzae* einen Ping-Pong-Mechanismus mit Bildung einer Enzym-Sulfat-Zwischenstufe durchläuft.^[66] Bei einem ähnlichen, aus *Eubacterium A-44* stammenden Enzym konnte später gezeigt werden, dass in Gegenwart von ^{35}S -PNPS und ohne Acceptor-Molekül 2 mol ^{35}S pro mol Enzym in einen Tyrosinrest des aktiven Zentrums eingebaut werden. Weiter wurde beobachtet, dass das Histidin modifizierende Reagens Diethylpyrocarbamid die Enzymaktivität vollständig unterdrückt, das Enzym durch Addition des Donor-Substrats aber geschützt wird. Dies führte zu dem in Schema 7 gezeigten Mechanismus, wonach das Sulfat zuerst an einen Histidinrest im aktiven Zentrum und anschließend an einen Tyrosinrest übertragen wird.^[67] Weitere Markierungsexperimente mit dem Enzym führten zu den gleichen Ergebnissen und zeigten außerdem, dass ein chirales Sulfat unter Retention der Konfiguration übertragen wurde (Schema 8). Aus dieser Studie wurde auch geschlossen, dass das Histidin möglicherweise nicht als Nucleophil fungiert, sondern als allgemeine Base.^[68] Untersuchungen der Aryl-Sulfotransferase aus *Enterobacter amoenigenus* ergaben die gleichen doppeltreziproken



Schema 7. Vorgeschlagener Mechanismus der durch Aryl-Sulfotransferase aus *Eubacterium A-44* katalysierten Sulfonierung.



Schema 8. Verwendung eines chiralen Sulfats zur Untersuchung des Mechanismus der durch Aryl-Sulfotransferase aus *Eubacterium A-44* katalysierten Sulfonierung (schwarz ^{18}O , grau ^{17}O).

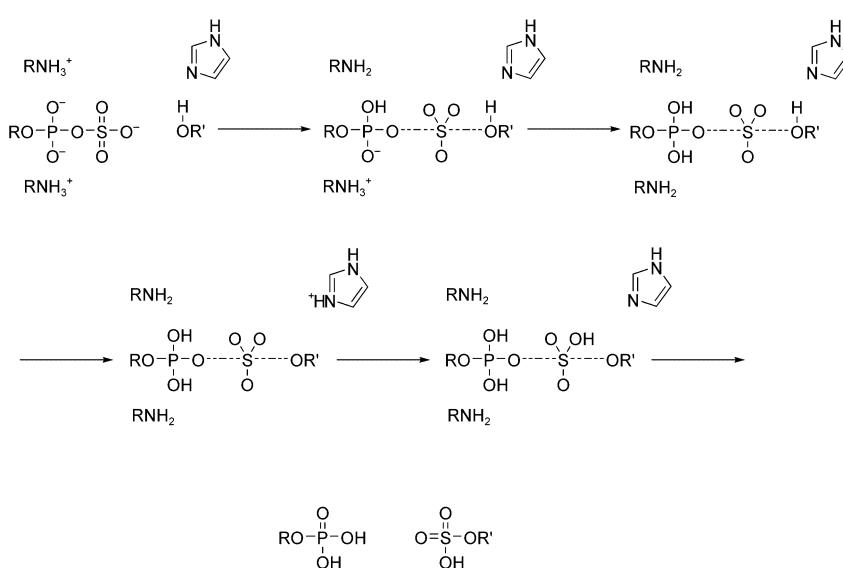
Muster sowie den Befund, dass PNP ein nichtkompetitiver Inhibitor des Sulfatdonors PNPS und ein kompetitiver Inhibitor des Acceptors 1-Naphthol ist.^[69]

5.3. Struktur des Übergangszustands

Wie bereits erwähnt wurde, verläuft die Reaktion über einen geradlinigen Angriff des Nucleophils am Schwefelatom. Hierbei gibt es zwei mögliche Übergangszustände (Schema 3): einen assoziativen, in dem das Nucleophil die entscheidende Rolle spielt, und einen dissoziativen, in dem die O-S-Bindung unter Bildung einer Sulfotrioxid-artigen Zwischenstufe weitgehend gelöst ist. Im assoziativen Fall sollten die Abstände zwischen dem abgehenden Sauerstoffatom von PAP und dem Schwefelatom sowie zwischen dem angreifenden Nucleophil und dem Schwefelatom kurz sein ($< 2 \text{ \AA}$). Im dissoziativen Fall sollten die beiden Abstände länger sein ($\geq 3 \text{ \AA}$) (Schema 3). Strukturdaten können, wie oben beschrieben, einen der beiden Mechanismen stützen. Laut einer theoretischen Untersuchung an SULT1E1 verläuft die Reaktion in mehreren Stufen: Zuerst wird die Ladung an

PAPS neutralisiert, dann die O-S-Bindung verlängert und schließlich das Nucleophil durch Deprotonierung aktiviert (Schema 9).^[70]

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe sind mit der Hypothese eines dissoziativen Mechanismus in Einklang. Mit einer Serie von fluorierten und sulfatierten *p*-Nitrophephenolen wurden Lineare-Freie-Enthalpie-Beziehungen für die Hin- und Rückreaktion ermittelt. Aus der Auftragung der effektiven Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung als Funktion der pK_a -Werte wurden der Brønsted-Nucleophiliekoeffizient (β_{nuc}) und der Brønsted-Abgangsgruppenkoeffizient (β_{lg}) zu +0.33 bzw. -0.45 bestimmt. Aus diesen Werten lassen sich die Leffler-Parameter α ($= \beta_{\text{nuc}}/\beta_{\text{EQ}}$; β_{EQ} = Differenz der effektiven Ladungen der Reaktanten und Produkte) berechnen, die die im Übergangszustand angehäufte Ladung



Schema 9. Chemischer Mechanismus der Sulfonierung, basierend auf theoretischen Modellstudien mit SULT1E1.

wiedergeben. Berechnet wurden Werte von 0.19 für die Hinreaktion und 0.61 für die Rückreaktion;^[71] diese stimmen mit Literaturwerten für unkatalysierte Reaktionen mit Pyridinanaloga weitgehend überein.^[72] Die Ergebnisse dieser Studien, zusammen mit den Ergebnissen theoretischer Untersuchungen und Untersuchungen der unkatalysierten Reaktion, führten zu dem Schluss, dass die Reaktion wohl eher dissoziativ als nucleophil kontrolliert verläuft (Abbildung 6).

6. Biologische Aktivität von Sulfotransferasen und ihren Produkten

Sulfotransferasen und ihre Produkte sind an einer Reihe komplexer biologischer Prozesse beteiligt, z.B. an der Hormonregulierung, Entgiftung, molekularen Erkennung, Zellsignalisierung und am Viruseintritt in Zellen. Vor diesem Hintergrund hat sich eine breite Forschung zu den Funktionsweisen der STs und ihrer Produkte entwickelt. In Anbetracht der umfangreichen Literatur, die zu diesem

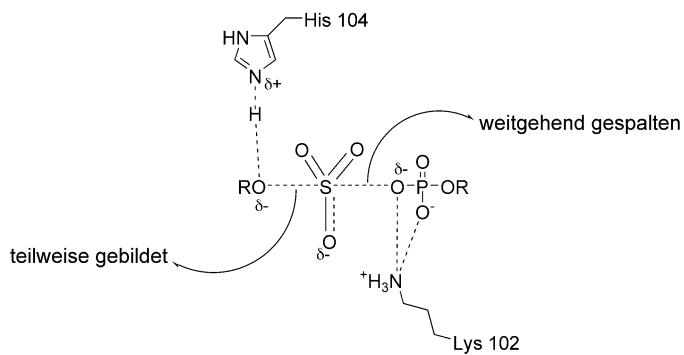


Abbildung 6. Vorgeschlagener Übergangszustand der katalytischen Sulfonierung; dargestellt sind zwei der hoch konservierten Aminosäurereste im aktiven Zentrum.

Thema publiziert wurde, können wir nur eine Auswahl an STs behandeln, die eine besondere Rolle in entscheidenden biologischen Prozessen spielen. Ansonsten verweisen wir auf frühere Übersichten.^[12,73,74]

6.1. Östrogen-Sulfotransferase

Östrogen-ST (SULT1E1) ist ein zytosolisches Enzym, das die Sulfonierung des Hormons Östrogen zum Östrogensulfat (**1**, Abbildung 7) katalysiert. SULT1E1 ist somit an der Regulation des Gleichgewichtes zwischen diesen Verbindungen im Zytosol beteiligt. In Untersuchungen waren erhöhte Östrogen-Sulfotransferase-^[75] und Östrogensulfat-Spiegel^[76] mit dem Auftreten von Brusttumoren korreliert, was das Enzym zu einem vielversprechenden therapeutischen Target macht. In anderen Unter-

suchungen hingegen war die Immunreakтивität dieses Enzyms invers mit der Tumogröße korreliert;^[77] außerdem wurde

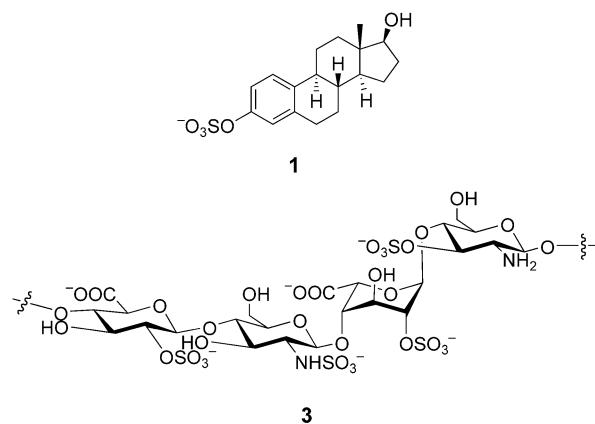


Abbildung 7. Das regulatorische Biomolekül Östrogensulfat (**1**) und das HSV-1 bindende Epitop von HS (**3**); beide werden durch enzymatische Sulfonierung gebildet.

gefunden, dass es in MCF-7-Brustkrebszellen nicht vor kommt,^[78] und seine erneute Bereitstellung führte zu einer Abnahme des östrogenabhängigen Tumorwachstums.^[79]

6.2. Heparan-Sulfotransferasen

Heparan-STs bilden eine Klasse membranassozierter STs (Tabelle 3) mit zentralen biologischen Eigenschaften.^[80,81] Diese Enzyme katalysieren Sulfonierungen von Heparansulfatglycosaminoglycanen (HSGAGs) und bilden dabei komplexe HS-Sulfoformen mit hoher Strukturdiversität. Resultat ist eine differenzierte biologische Aktivität, hauptsächlich erzeugt durch punktuelle Veränderungen chemischer Funktionalität. Der Saccharidteil von HS besteht im Allgemeinen aus alternierenden Untereinheiten aus Glucosamin- und Uronsäurederivaten. Die Oligosaccharidketten sind durch unterschiedliche Muster sulfonierter Hydroxy- und Aminogruppen, acetylierter Aminogruppen sowie durch Epimerisierungen derivatisiert. Zusammen erzeugen das Saccharidgerüst und das Sulfonierungsmuster eine hohe Diversität, aus der sich wiederum eine hohe Spezifität in den Wechselwir-

kungen mit anderen Proteinen sowie mit Wachstumsfaktoren, Chemokinen und Viren ergibt. HS-Protein-Wechselwirkungen wurden kürzlich in einer Übersicht beschrieben.^[82]

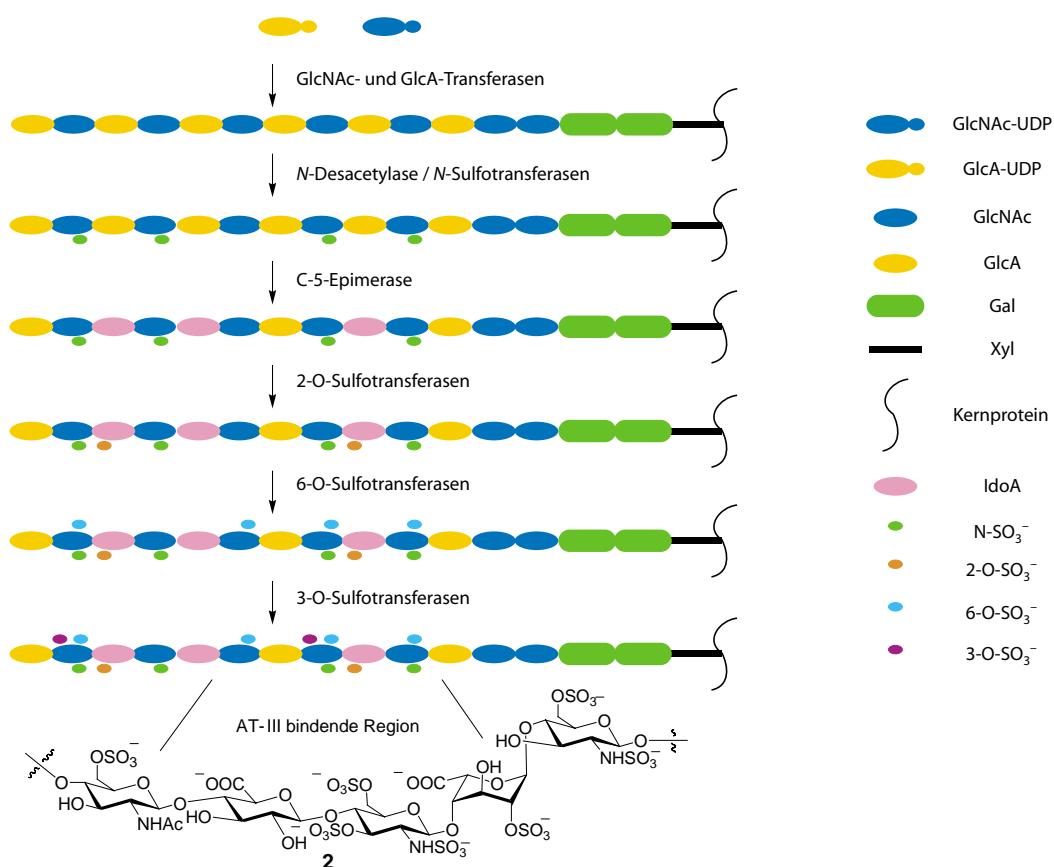
In der Biosynthese von HS wird die Diversität erst in den letzten Stufen eingeführt, im Anschluss an einen nach einem relativ allgemeinen Schema verlaufenden Aufbau der Oligosaccharidstruktur. Schema 10 zeigt den Verlauf der Biosynthese des AT-III bindenden Pentasaccharids 2.^[83] Die Kupplung der D-Glucuronsäure- und N-Acetyl-D-glucosamin-Einheiten wird durch Glucuronosyl-Transferasen (GlcAT1) bzw. α -N-Acetylglucosaminyl-Transferasen (α GlcNAcTIA und B) katalysiert. Anschließend wird das gebildete Polymer mehrfach modifiziert: durch N-Desacetylase-N-Sulfotransferasen (NDSTs), durch 5'-Uronosyl-Epimerase (EPI), die bestimmte D-Glucuronsäure- in L-Iduronsäurereste überführt, und schließlich durch eine Serie von Heparan-STs, die spezifische Hydroxygruppen sulfonieren. Dass Heparan-STs an den letzten Schritten der HS-Differenzierung beteiligt sind, in denen die spezifische Funktion des Produkts festgelegt wird, macht sie zu vielversprechenden therapeutischen Target.

Heparansulfat wurde mit dem Viruseintritt von HSV-1 in Zellen in Verbindung gebracht.^[84] Beim Viruseintritt fun-

Tabelle 3: Membranassoziierte Sulfotransferasen.

Name	Kürzel	Substrat	biologischer Prozess
Heparansulfat-D-glucosaminyl-3-O-ST-3a und b	HS-3-O-ST-3a und b	Heparansulfat	HSV-1-Eintritt in die Zelle
Heparansulfat-D-glucosaminyl-3-O-ST-1	HS-3-O-ST-1	Heparansulfat	AT-III-Bindung, Antikoagulation
Heparansulfat-iduronsäure-2-O-ST	HS-2-O-ST	Heparansulfat	FGF-Bindung, Angiogenese
Heparansulfat-D-glucosaminyl-6-O-ST	HS-6-O-ST	Heparansulfat	FGF-Aktivierung, Angiogenese
Tyrosylprotein-ST	TPST	CCR-5 PSGL-1	HIV-1-Eintritt in die Zelle P-Selectin-Bindung, Leukozytenadhäsion
N-Acetylglucosamin-6-O-ST	GlcNAc-6-O-ST	Sialyl-Lewis ^X	L-Selectin-Bindung, Leukozytenadhäsion
Chondroitinsulfat-N-galactosamin-4-O-ST-1, 2 und 3	CS-4-O-ST-1, 2 und 3	Chondroitinsulfat	Knorpelbildung, neuronale Funktionen, Lymphozytenbindung, T-Zell-Antwort
Chondroitinsulfat-N-galactosamin-6-O-ST	CS-6-O-ST	Chondroitinsulfat, Keratansulfat	Knorpelbildung, neuronale Funktionen, Lymphozytenbindung, T-Zell-Antwort
HNK-1-Glucuronsäure-3-O-ST	HNK-1-ST	HNK-1-Sulfat	Exprimierung im Nervengewebe
N-Acetylgalactosamin-4-O-ST	GalNAc-4-O-ST	Saccharidrezeptoreinheiten für Lutropin, Thyrotropin und Proopiomelanocortin	Steuerung der zirkulatorischen Halbwertszeit
Dermatansulfat-N-galactosamin-4-O-ST	DS-4-O-ST	Dermatansulfat	Bestandteil von Glycolipiden und Glycoproteinen
Keratansulfatgalactose-6-O-ST	KS-6-O-ST	Keratansulfat	Kornealtransparenz

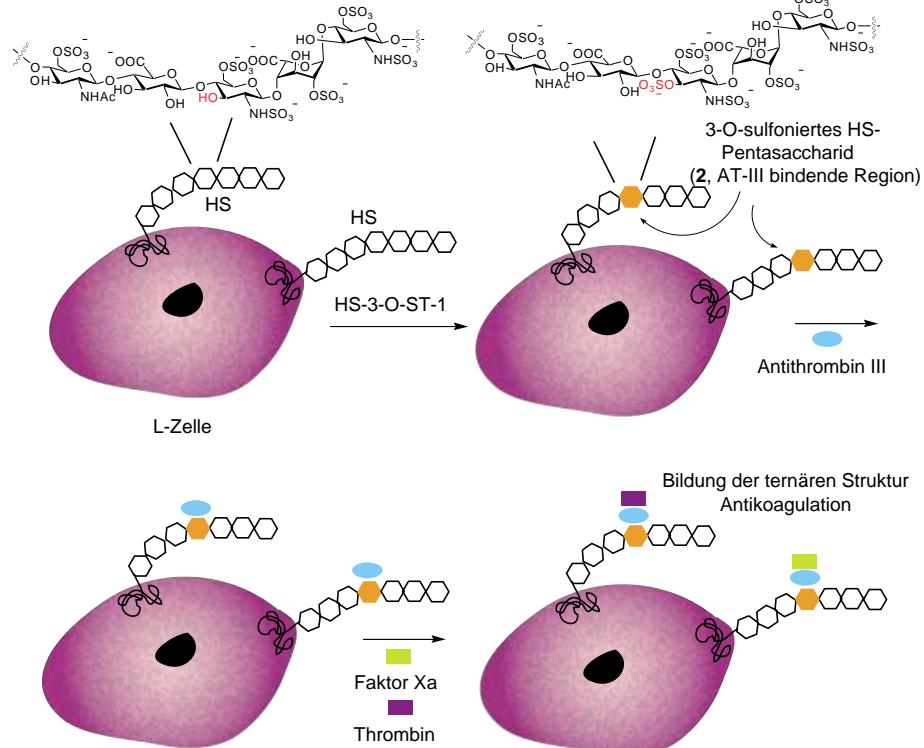
Sulfotransferasen



Schema 10. Biosynthese von Heparansulfat.

gieren bestimmte Tetrasaccharidregionen (**3**, Abbildung 7) als Bindungsstellen für das gD-Hüllprotein von HSV-1.^[85] Die Heparan-ST-Isoform 3-O-ST-3 katalysiert die entscheidende Sulfonierung der 3-Hydroxygruppe des D-Glucosaminrestes an der HS-Einheit, die zur Erkennung von gD notwendig ist. Es wurde außerdem gezeigt, dass Heparin und HS mit HIV-1 wechselwirken und so den Viruseintritt in die Zelle verhindern.^[86,87] HS-Moleküle binden hierbei an die V3-Schleife des viralen Glycoproteins gp120 und blockieren die Kupplung des Virus an den CD4-Rezeptor der Zelle.^[88–90] Wie gezeigt wurde, binden diese Verbindungen auch an das virale Tat-Protein, das für die HIV-1-Replikation benötigt wird.^[91,92]

Die Wechselwirkung von HS mit Antithrombin III (AT-III) wurde intensiv untersucht (Schema 11). Die Bindung von AT-III in der Pentasaccharidregion **2** von HS verstärkt die Inaktivierung der Blutkoagulationsfaktoren Thrombin und Xa, was die antikoagulativen Eigenschaften begründet.^[93–96] Rosenberg et al. fanden heraus, dass



Schema 11. Heparan-Sulfonierung, die zum HS-Derivat mit hoher Affinität für Antithrombin III und zu antikoagulativer Wirkung führt.

das HS-Derivat mit der hohen Affinität für AT-III das Produkt der Sulfonierung einer D-Glucosaminuntereinheit durch das Enzym HS-3-O-ST-1 ist.^[97] Die gleiche Arbeitsgruppe verwendete Gel-Mobility-Shift-Assays (GMSAs) zur Bestimmung der entscheidenden funktionellen Gruppen bei HS-Rezeptor-Wechselwirkungen.^[98] Sulfonierungen in den 3-O- und 6-O-Positionen erwiesen sich als besonders wichtig für die Bindung von AT-III durch das Oligosaccharid. In einer weiteren Studie wurde HS-6-O-ST-1 als das entscheidende Enzym bei der Synthese von antikoagulativem HS identifiziert.^[99]

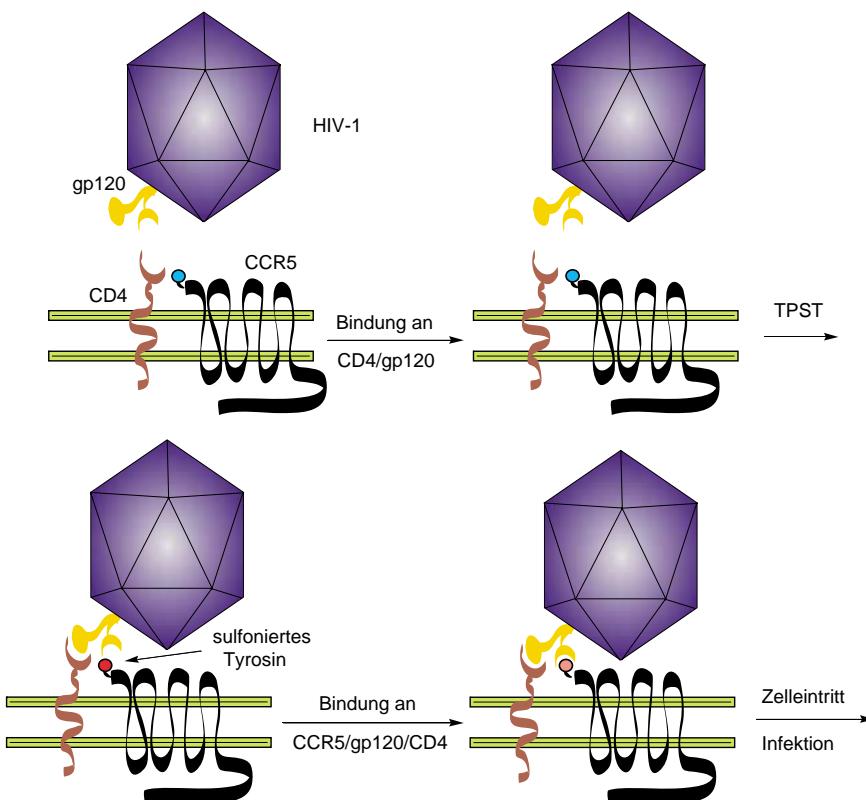
Die Produkte der Enzyme HS-Iduronsäure-2-O-ST und HS-Glucosaminyl-6-O-ST binden an Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGFs).^[100–103] Diese Wechselwirkung verursacht die Dimerisierung von FGF mit anschließender Autophosphorylierung der FGF-Tyrosinkinasedomäne und löst damit eine Signaltransduktion in der Angiogenese aus.

Heparansulfate wechselwirken auch mit anderen Zytokinen und Chemokinen^[104–108] sowie mit lipid- und membranbindenden Proteinen und Adhäsionsmolekülen.^[109–112] Insgesamt kennt man fünf Isoformen der HS-3-O-ST, drei Isoformen der HS-6-O-ST und vier Isoformen der NDST.^[113–116] Die Funktionen viele dieser Isoformen müssen noch aufgeklärt werden.

6.3. Tyrosylprotein-Sulfotransferasen

Tyrosylprotein-Sulfotransferasen (TPSTs) katalysieren die Sulfonierung von Tyrosinresten innerhalb spezifischer Peptidsequenzen. Diese Enzyme wurden mit einer Reihe von zentralen physiologischen Prozessen in Verbindung gebracht. Unter anderem wurde nachgewiesen, dass eines dieser Enzyme an der Erkennung von Targetzellen durch HIV-1 beteiligt ist,^[117] wobei TPST die Sulfonierung der N-terminalen Tyrosinreste des Chemokinrezeptors CCR5 katalysiert (Schema 12). Diese Transformation ermöglicht die Bindung des sulfonierte CCR5 an gp120/CD4-Komplexe und bewirkt so den Viruseintritt in die Zelle. Vor kurzem wurde gefunden, dass Antikörper mit sulfonierte Tyrosinresten durch Bindung an die CCR5-Region von HIV-1-gp-120 einer Infektion entgegenwirken.^[118]

Die Sulfonierung von Tyrosinresten durch TPST beeinflusst die Leukozytenadhäsion bei Entzündungsreaktionen (Schema 13).^[119] Der N-Terminus des Primärliganden von P-Selectin, P-Selectin-Glycoprotein-1 (PSGL-1, 4), wird durch



Schema 12. Viruseintritt von HIV-1 in die Zelle, eingeleitet durch die Sulfonierung von CCR5 durch die Tyrosylprotein-Sulfotransferase.

TPST sulfoniert.^[120,121] Dies führt zu einer Erhöhung der Bindungsaaffinität von Rezeptor und Ligand um etwa fünf Größenordnungen.^[122] Demgemäß wurde TPST als therapeutisches Target bei chronischen Entzündungen wie rheumatoider Arthritis, Hautentzündungen, Abstoßung kardialer Transplantate und bronchialem Asthma identifiziert.

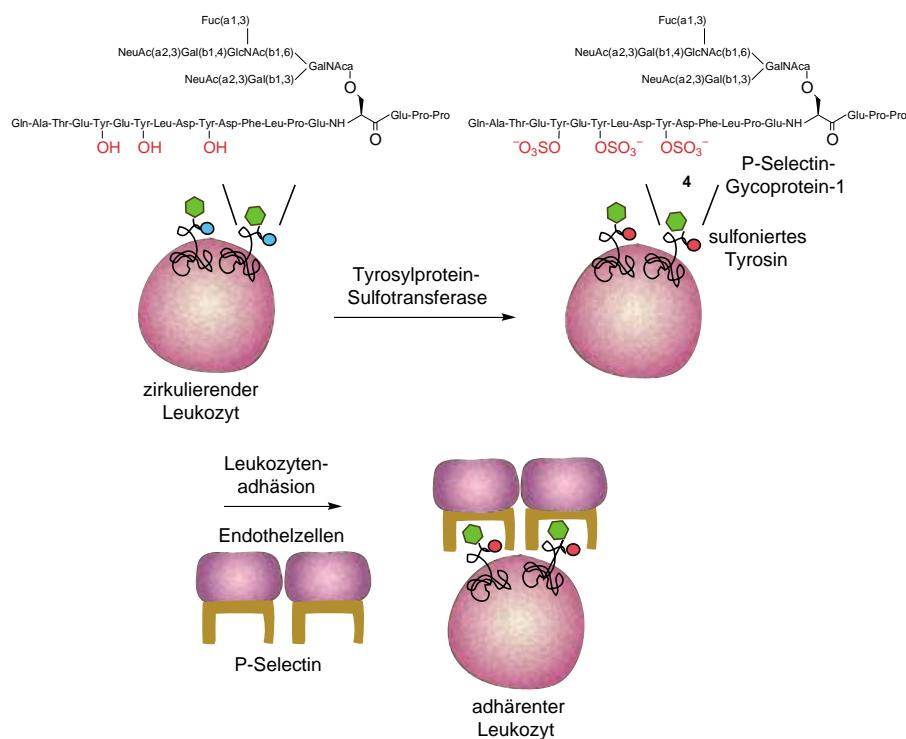
6.4. N-Acetylglucosamin-6-O-Sulfotransferasen

Die Sulfonierung von N-Acetylglucosaminresten an der 6-Hydroxygruppe ist eine weitere wichtige Funktion der STs. Beispielsweise werden N-Acetylglucosamin-Untereinheiten von Kohlenhydraten, die sich auf Endothelzellen befinden und das Sialyl-Lewis^X-Motiv (5) enthalten, durch GlcNAc-6-O-ST sulfoniert (Schema 14).^[123–128] Diese Sulfonierung führt zu einer starken Wechselwirkung zwischen den resultierenden Kohlenhydraten und L-Selectin-Zelladhäsionsmolekülen, was die anti-inflammatorische Reaktion bewirkt. Dementsprechend wurden auch diese Enzyme als Targets zur Behandlung chronischer Entzündung identifiziert. Wie bereits erwähnt wurde, katalysieren Heparan-STs auch die Sulfonierung von Glucosamineinheiten.

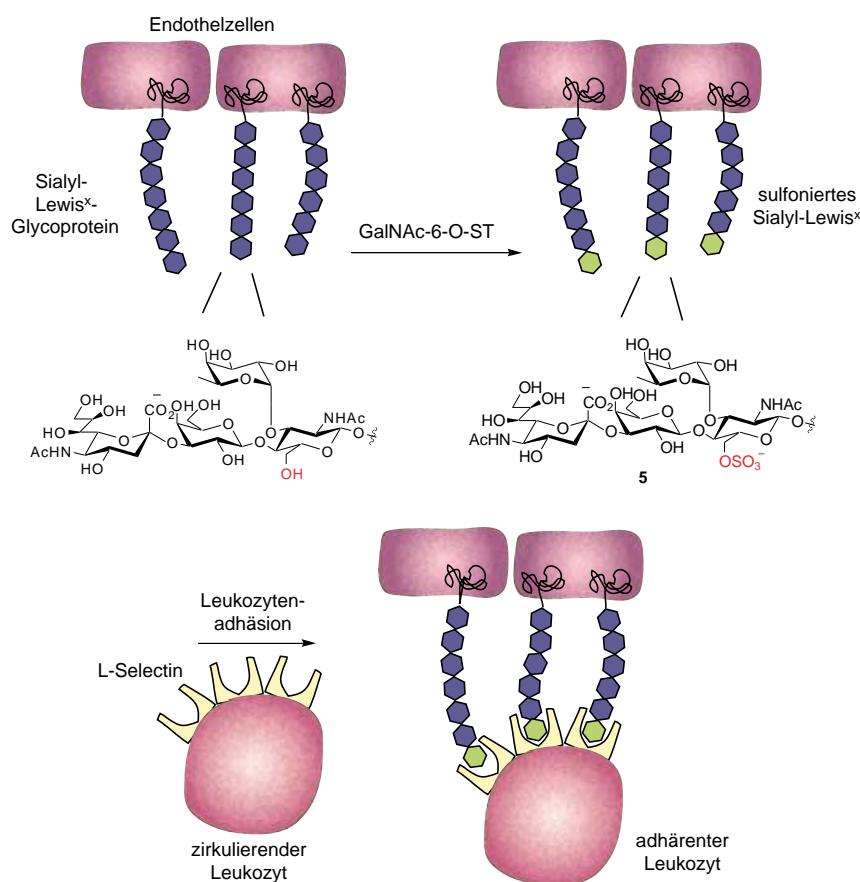
6.5. Andere Kohlenhydrat-Sulfotransferasen

Eine weitere Familie von Kohlenhydrat-Sulfotransferasen ist an der Sulfonierung von Galactosaminderivaten in Poly-

Sulfotransferasen



Schema 13. Regulierung der Leukozytenadhäsion durch Sulfonierung der Tyrosinreste von PSGL-1.



Schema 14. Die Sulfonierung von Sialyl-Lewis^X bewirkt eine nachfolgende Leukozytenadhäsion.

saccharidketten beteiligt. Die Sulfonierung von Chondroitin, das an der Knorpelbildung,^[129] neuronalen Funktionen,^[130,131] der Lymphozyten-Endothelzellen-Bindung^[132] und der Verstärkung der T-Zell-Antwort beteiligt ist,^[133] wird durch Chondroitin-4-O-STs^[134] und Chondroitin-6-O-ST katalysiert.^[135] Chondroitin-STs wurden auch mit der Sulfonierung von Keratansulfat in Verbindung gebracht.^[136,137] HNK-1-ST sulfoniert das HNK-1 bindende Kohlenhydrat, das auf Glycolipiden und Glycoproteinen des Nervengewebes exprimiert wird.^[138,139] N-Acetylgalactosamin-4-O-STs (GalNAc-4-O-STs) sulfonieren Saccharidrezeptoreinheiten auf den Hypophysenhormonen Lutropin, Thyrotropin und Proopiomelanocortin, die die zirkulatorische Halbwertszeit steuern.^[140–142] Weiterhin sulfoniert Dermatan-4-O-ST Dermatansulfat (Chondroitinsulfat B), einen weiteren Oligosaccharidbestandteil von Glycolipiden und Glycoproteinen.^[143] Das Produkt der Keratan-6-O-ST wurde mit der Kornealtransparenz in Verbindung gebracht.^[144] Eine weitere Klasse von Substanzen, die zur Ausübung einer wichtigen biologischen Funktion sulfoniert werden, sind Zelloberflächenglycolipide. Beispielsweise wirken die aus einem Lipidgrundgerüst mit angehängtem sulfonierte Zuckerrest bestehenden Sulfatide als T-Zell-Antigene auf an der Zellmembran verankerten CD1-Proteinen.^[191,192] Diese Glycolipide inaktivieren natürliche Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) und erzeugen so eine Immunantwort.

7. Sulfotransferase-Inhibierung

Die Beteiligung von Sulfotransferasen an der Entwicklung diverser Krankheitszustände hat zu einer Suche nach möglichen therapeutischen Inhibitoren für diese Enzyme geführt. In diesem Abschnitt diskutieren wir erfolgreiche Strategien zur Inhibierung von Sulfotransferasen.

Wirksame Inhibitoren sind aus der Strukturklasse der PAPS-Analoga hervorgegangen.^[145,146] Eine Studie zur Inhibition der M- und P-Formen humaner cerebraler Phenol-Sulfotransferasen (SULT1A1 und SULT1A3) zeigte, dass PAP am wirksamsten die Umsetzung von Dopamin und Phenolsubstraten inhibiert (mit einer Inhibitionskonstante von $K_i = 100 \text{ nM}$). Derivatisierungen an PAP führten zu weitaus höheren Werten. Beispielsweise wurde für 2'-5'-PAP, das sich lediglich durch einen 2'-Phosphatrest anstelle eines 3'-Phosphatrestes von der Originalstruktur unterscheidet, eine ca. 100fache Zunahme beobachtet. Die Sulfatgruppe von PAPS beeinflusst die Bindung hingegen nicht, da PAPS und PAP ähnliche Affinitäten für die Enzyme haben. Zur Untersuchung der enzymatischen Reaktionen wurde ^{35}S -PAPS eingesetzt, wobei das radioaktiv markierte Produkt mit einem Szintillationsspektrophotometer nach chromatographischer Trennung detektiert wurde.

Mehrere kleine aromatische Verbindungen wurden als Inhibitoren von Arylsubstrat-STs beschrieben. Zu den am besten untersuchten Verbindungen gehören 2,6-Dichlor-4-nitrophenol (DCNP) und Pentachlorphenol (PCP).^[147] In einer ersten Studie wurde ermittelt, dass DCNP die Sulfonierung von Harmol, einem phenolischen Wirkstoff, durch Rattenleber-PST inhibiert ($IC_{50} = 100 \text{ nM}$). In diesem Experiment wurde die Desulfonierung von *p*-Nitrophenylsulfat durch Absorbanzmessungen bei 400 nm detektiert. Ausgehend von dieser Struktur wurden durch Derivatisierungsstudien verbesserte Inhibitoren entwickelt. Beispielsweise wurden hydroxylierte polychlorierte Biphenylene als Inhibitoren für hSULT1E1 mit IC_{50} -Werten zwischen 0.10 und 0.19 nM entdeckt.^[148]

Ein weiteres Beispiel aus dieser Gruppe ist *N*-Hydroxy-2-acetylaminofluoren, das die hepatische Aryl-Sulfotransferase IV aus Ratten (rSULT1C1 oder AST-IV) irreversibel inaktiviert.^[149] Auch mehrere Arylcabsonsäuren wurden als Inhibitoren dieses Enzyms untersucht.^[150] Dabei war 1-Naphthoësäure ($K_i = 16 \mu\text{M}$) wirksamer als 2-Naphthoësäure ($K_i = 41 \mu\text{M}$). Weiterhin war 1-Naphthoësäure 12.5-mal wirksamer als 1-Naphthylessigsäure und 17.5-mal wirksamer als Benzoësäure. Die K_i -Werte von Salicylsäure und Naproxen wurden zu ca. 100 μM bestimmt.

In einer weiteren Studie mit diesem Enzym wurde für 1-Naphthaldehyd ein K_i -Wert von 29 μM erhalten.^[151] In diesem Fall wurden die Geschwindigkeiten der Enzymreaktion durch HPLC-Analyse bestimmt. Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiole inhibierten rSULT1C1 mit K_i -Werten von 3 bis 4 μM , wohingegen das entsprechende Hydroxybenzo[a]pyren als Substrat wirkt.^[152] Die Autoren schrieben diese Beobachtung einem unterschiedlichen Bindungsmodus der Dihydrodiole zu, der sie als Substrat ausschließt.

Zwei Studien beschäftigten sich mit der Inhibition unterschiedlicher STs durch diätetische Nahrungsergänzungsstoffe wie Catechin, Octylgallat, Tartrazin, Vanillin,^[153] Epicatechingallat und Epigallocatechingallat.^[154] Weiter wurde die Inhibition von STs durch verbreitete Wirkstoffe^[155] und Amine^[156] beschrieben. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass Pyridoxylphosphat bovine PST durch kovalente Bindung an das Enzym inhibiert.^[157] Für die Inhibition von hSULT1A1 durch Quercetin wurde ein IC_{50} -Wert von 100 nM

bestimmt, bei anderen STs wie hSULT1A3 und hSULT2A1 ist der IC_{50} -Wert drei- bis viermal höher.^[158]

Eine andere Strategie zur Entwicklung von Inhibitoren und zur Aufklärung der Enzym-Substrat-Wechselwirkungen beruht auf der Derivatisierung des Substrats durch chemische Synthese. Unter einer Vielzahl von Östra-1,3,5(10)-trien-17 β -olen wurde das 4-Nitroderivat als der wirksamste Inhibitor von endometranem SULT1E1 aus dem Schwein identifiziert ($K_i = 2.4 \mu\text{M}$).^[159]

Bertozzi et al. synthetisierten mehrere Disaccharidanaloga des Substrates der GlcNAc-6-Sulfotransferase, um zu untersuchen, welche funktionellen Gruppen für die Wechselwirkung mit dem Enzym entscheidend sind.^[160] Hierzu wurden die funktionellen Gruppen des Substrats systematisch entfernt und die Aktivitäten der resultierenden Derivate bestimmt. Die Ergebnisse eines Screenings mit zwei humanen STs, CHST2 und HEC-GlcNAc6ST, sind in Abbildung 8 zusammengefasst.

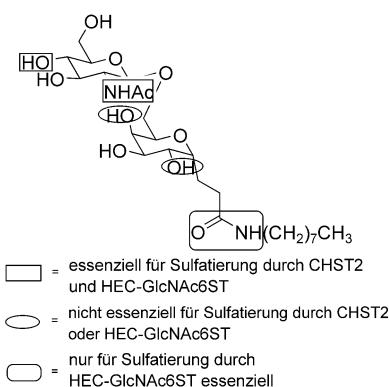


Abbildung 8. Analyse der funktionellen Gruppen von Disaccharid-Analoga des GlcNAc-6-ST-Substrats.

Synthetische bisubstratische Analoga wurden mit dem Ziel untersucht, die PAPS- und die Substratbindungsdomänen simultan zu inhibieren. So wurden beispielsweise Adenin- und PAPS-Derivate mit kovalent gebundenen Östrogengruppen getestet (Abbildung 9).^[161] Als wirksamster Inhibitor von adrenalem SULT1E1 aus dem Schwein wurde das Derivat **6** identifiziert ($K_i = 250 \text{ nM}$), in dem eine Östrogengruppe über einen Diphosphat-Linker an die Adenosin-5'-hydroxygruppe eines PAPS-Analogons gebunden ist.

Bertozzi et al. untersuchten eine kinasegerichtete Bibliothek aus 139 Verbindungen auf Inhibition der GlcNAc-6-ST NodH aus *Rhizobium meliloti*.^[162] Dieser Ansatz wurde aufgrund der Ähnlichkeiten der Substrate von Sulfotransferasen und Kinasen gewählt. Durch kombinatorische Synthese^[163] (Schema 15) wurden in der 2- und 6-Position des Purinrings primäre und sekundäre Amine eingeführt, die N9-Position wurde durch Mitsunobu-Reaktion mit einer Reihe von Alkoholen funktionalisiert. Die Synthesen wurden in der Festphase durchgeführt, wobei die Positionen C2, C6 oder N9 am Harzkügelchen immobilisiert wurden.

Die wirksamsten Inhibitoren in dieser Studie enthielten ein Puringerüst mit benzylischen Substituenten an N6. Die potenteste Struktur, **7**, erreichte einen IC_{50} -Wert von 20 μM .

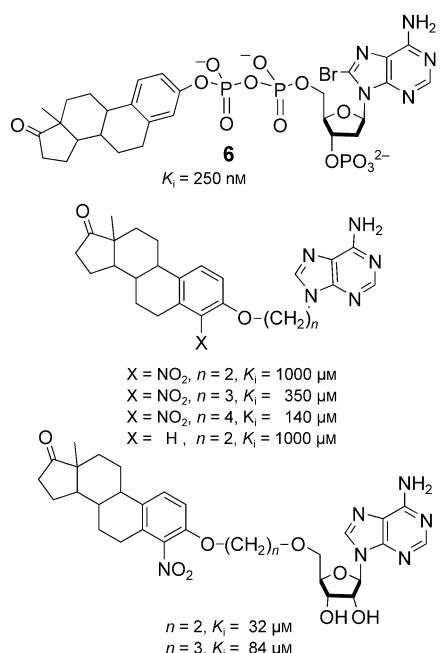
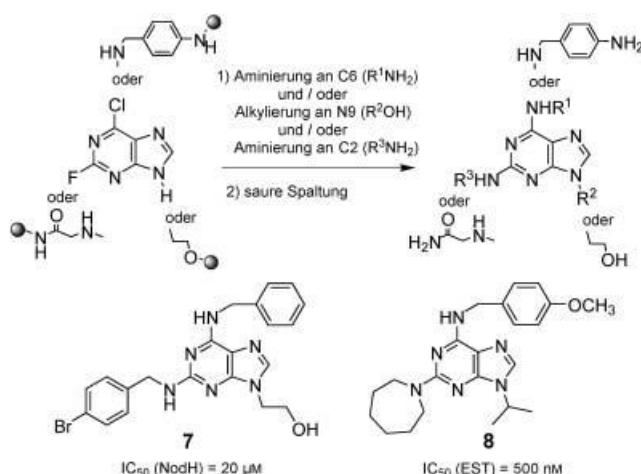


Abbildung 9. Östrogen-derivatisierte PAPS- und Adenin-Analoga als bisubstratische Inhibitoren von EST.



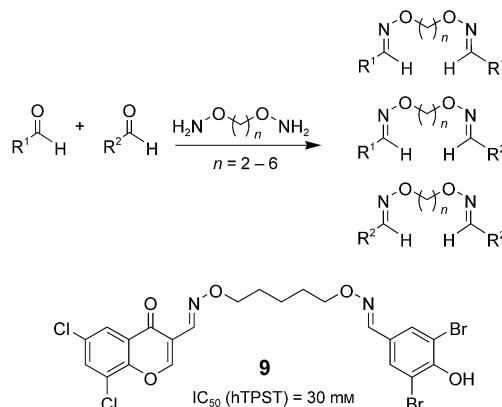
Schema 15. Oben: Synthese einer kinasegerichteten Purinbibliothek; unten: resultierende NodH- und SULT1E1-Inhibitoren.

Die Leitverbindungen zeigten nur eine geringe Inhibition der humanen hochendothelialen GlcNAc-6-O-Sulfotransferase und der Keratansulfat-Sulfotransferase, was auf eine gewisse Selektivität hinweist, wohingegen Kreuzreaktivität mit CDK2 bei IC_{50} -Werten zwischen 15 und 40 μM festgestellt wurde. Ebenfalls durchgeführt wurde ein Hochdurchsatz-Screening mit ^{35}S -PAPS, einschließlich einer Produktanalyse durch Phosphor-Imaging der entstehenden Dünnschichtchromatogramme (TLCs).

In einer Folgestudie wurden 275 Verbindungen aus dieser Purinbibliothek auf die Inhibition von mSULT1E1 getestet.^[164] Die wirksamste Verbindung, **8**, hat ähnliche Strukturmerkmale wie **7**, bei einem IC_{50} -Wert von 500 nm. Bei 200 μM zeigte sich keine Aktivität mit der bakteriellen GlcNAc-6-

Sulfotransferase NodH, der humanen GlcNAc-6-Sulfotransferase HEC-GlcNAc6ST und CHST2. Zur Analyse wurde zusätzlich zu einem TLC-Assay ein massenspektrometrisches Hochdurchsatz-Screening angewendet.

In einer weiteren Studie verwendeten Bertozzi et al. einen targetgelenkten Ligandenbau („target-guided ligand assembly“)^[165] zur Entwicklung von Inhibitoren der humanen Tyrosylprotein-Sulfotransferase-2 (hTPST-2).^[166] Monomere, die bei 1 mM oder höher aktiv waren, wurden zum Aufbau einer Bibliothek von 171 Dimeren eingesetzt und auf ihre Inhibitorkraft untersucht. Durch Oximbildung zwischen den aldehydfunktionalisierten Monomeren und *O,O'*-Diaminoalkandiol-Linkern unterschiedlicher Länge wurden die Bausteine dimerisiert (Schema 16). Jede Kavität enthielt

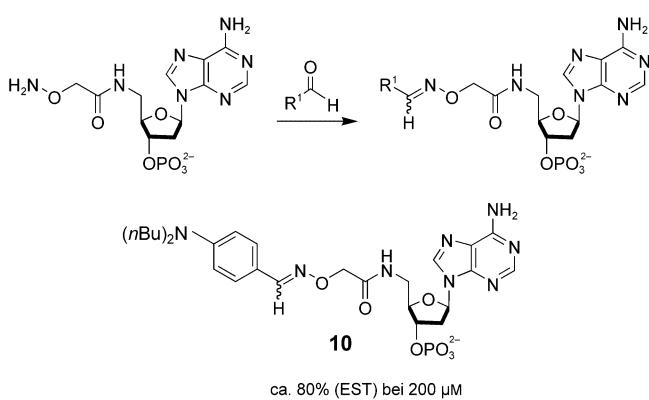


Schema 16. Aufbau einer targetgelenkten Dimerbibliothek zur Identifizierung von hTPST-2-Inhibitoren.

zwei Aldehyde und sechs Linker unterschiedlicher Länge, wodurch insgesamt fünfzehn Verbindungen erhalten wurden. Der wirksamste Inhibitor, **9**, hatte einen IC_{50} -Wert von 30 μM und war weitaus wirksamer als die beiden strukturbildenden Monomere. Trotz der beobachteten Kreuzreaktivität war die Bindung reversibel (NodST: $IC_{50} = 15 \mu\text{M}$, hEST: $IC_{50} = 250 \mu\text{M}$).

Eine weitere Bibliothek mit 447 Komponenten basierte auf einem 2'-Desoxy-PAP-Analogon, das mit unterschiedlichen hydrophoben Gruppen verknüpft war.^[167] Das Syntheseschema beruht auf einem PAP-Analogon mit *O*-verknüpfter Hydroxylamingruppe, das mit einer Reihe von Aldehyden kondensiert wird (Schema 17). Die resultierende Bibliothek wurde gegen hSULT1E1 getestet, wobei mit Verbindungen wie **10** eine Inhibition von etwa 80% bei 200 μM gefunden wurde. Ein anderer für dieses Enzym entwickelter Inhibitor, **11**, enthält als Strukturmerkmale kovalent verknüpfte PAPS- und Sulfatacceptor-Mimetika (Abbildung 10).^[168] Der K_i -Wert gegen PAPS betrug 2.9 nm, allerdings wurde eine nichtkompetitive Inhibition der Steroidbindungsstelle beobachtet, was darauf schließen lässt, dass es kein echter bisubstratischer Inhibitor ist.

Unsere Arbeitsgruppe hat in Zusammenarbeit mit Schultz et al. in einem Screening-Verfahren etwa 35000 Purin- und Pyrimidinanaloga auf Aktivität gegen β -AST-IV getestet.^[169] Zur Synthese dieser Bibliothek wurden Dichlor-



Schema 17. Bibliothek aus PAP-Analoga zur Identifizierung von SULT1E1-Inhibitoren.

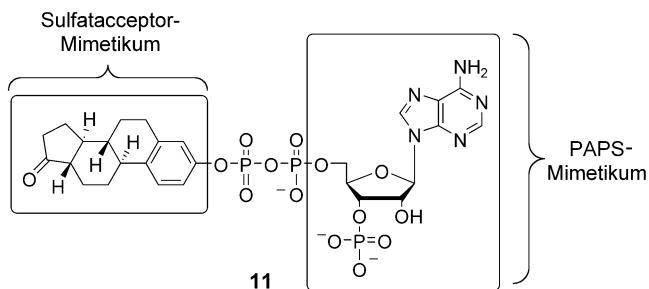
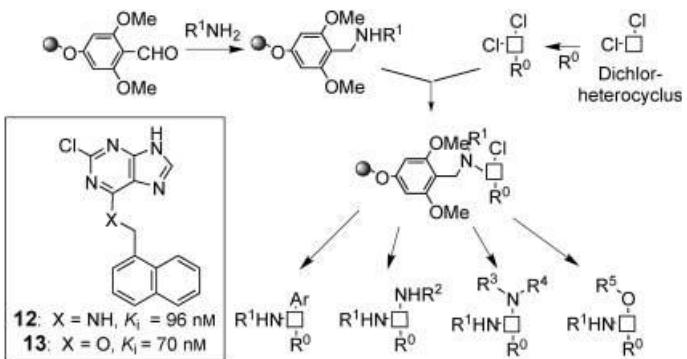


Abbildung 10. Inhibitor mit kovalent verknüpften PAP- und Östrogen-Analoga.

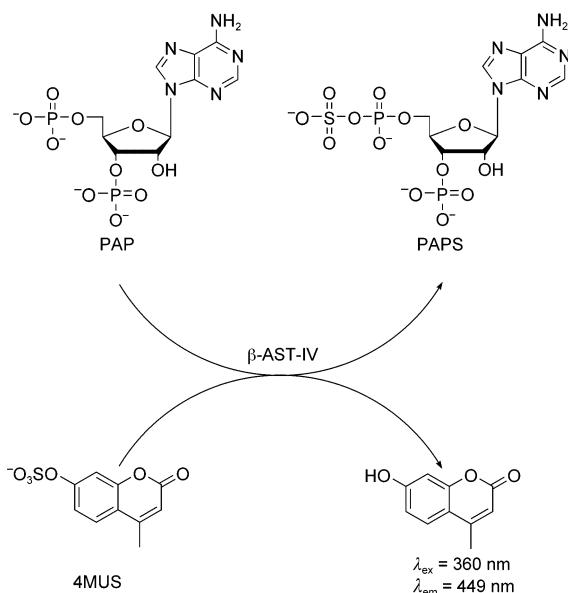
heterocyclen zunächst monofunktionalisiert und anschließend mit einem am Harzkügelchen verankerten Aminoterminus gekuppelt, wodurch die zweite funktionelle Gruppe eingeführt wurde (Schema 18).^[170] Die dritte funktionelle



Schema 18. Heterocyclusbibliothek mit den daraus resultierenden rSULT1C1(β-AST-IV)-Inhibitoren.

Gruppe wurde an der festen Phase eingeführt und das Endprodukt anschließend abgespalten. Die drei Substituenten wurden durch unterschiedliche Kombinationen von reduktiven Aminierungen, Mitsunobu-Reaktionen und palladiumkatalysierten Kreuzkupplungen eingeführt. Diese Methode kann für unterschiedliche Heterocyclen angewendet werden, unter anderem für Purine, Pyrimidine, Chinazoline, Pyrazine, Phthalazine, Pyridazine und Chinoxaline.

Zum Screening der Bibliothek wurde ein Fluoreszenzassay entwickelt, der die Desulfonierung von 4-Methylumbelliferonsulfat (4MUS) verfolgt (Schema 19).^[171] Es wurden elf Hits identifiziert, allesamt arylsubstituierte Purinderivate;



Schema 19. Reverser enzymatischer Assay zum Hochdurchsatz-Screening von ST-Inhibitoren.

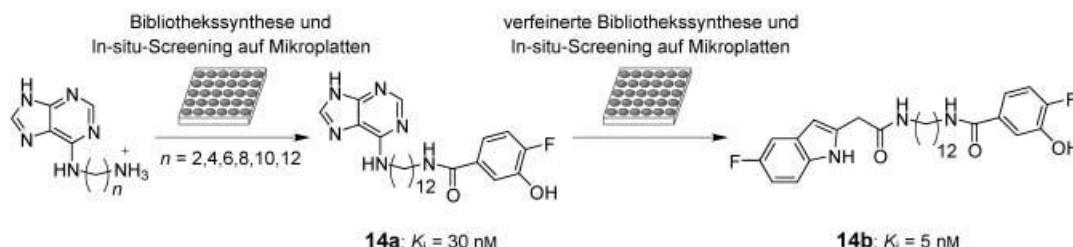
zehn der elf Hits enthielten Naphthalylgruppen an der N6-Position. Der stärkste Inhibitor, **12**, erzielte einen K_i -Wert von 96 nM. Die Wechselwirkung erwies sich als hinreichend spezifisch: SULT1A1 wird durch **12** geringfügig inhibiert, während Nod-Faktor-ST, Proteinkinase G, Hexokinase, Pyruvatkinase, Lactat-Dehydrogenase und Fucosyl-Transferase V nicht inhibiert werden (Tabelle 4).

Tabelle 4: Spezifität der Verbindung **12**.

Enzym	IC ₅₀
Sult-1A1	770 nM
Nod-Faktor-ST	keine Inhibition ^[a]
Proteinkinase G	keine Inhibition ^[a]
Hexokinase	keine Inhibition ^[b]
Pyruvatkinase	keine Inhibition ^[b]
Lactatdehydrogenase	keine Inhibition ^[b]
Fucosyltransferase V	keine Inhibition ^[b]

[a] 10 µM **12**. [b] 100 µM **12**.

In einer Folgestudie wurde der Inhibitor **13** identifiziert, bei dem eine Anbindung an die Puringruppe über das Sauerstoffatom zu einem K_i von 70 nM führt. Diese Struktur wurde durch schnelle diversitätsorientierte kombinatorische Synthese durch Amidbildung von uns weiterentwickelt.^[172] Die Bibliothek – bestehend aus Purinen, die über geradzahlige Kohlenstoffketten (2, ..., 12 C-Atome) mit einer Vielzahl von Säuren verknüpft waren (Schema 20) – wurde in Mikroplatten synthetisiert und *in situ* auf ihre Aktivität gegen β-AST-IV getestet. Die wirksamste Inhibition wurde mit 4-



Schema 20. Optimierung niedermolekularer rSULT1C1-Inhibitoren durch schnelle diversitätsorientierte Bibliothekssynthese und Hochdurchsatz-Screening.

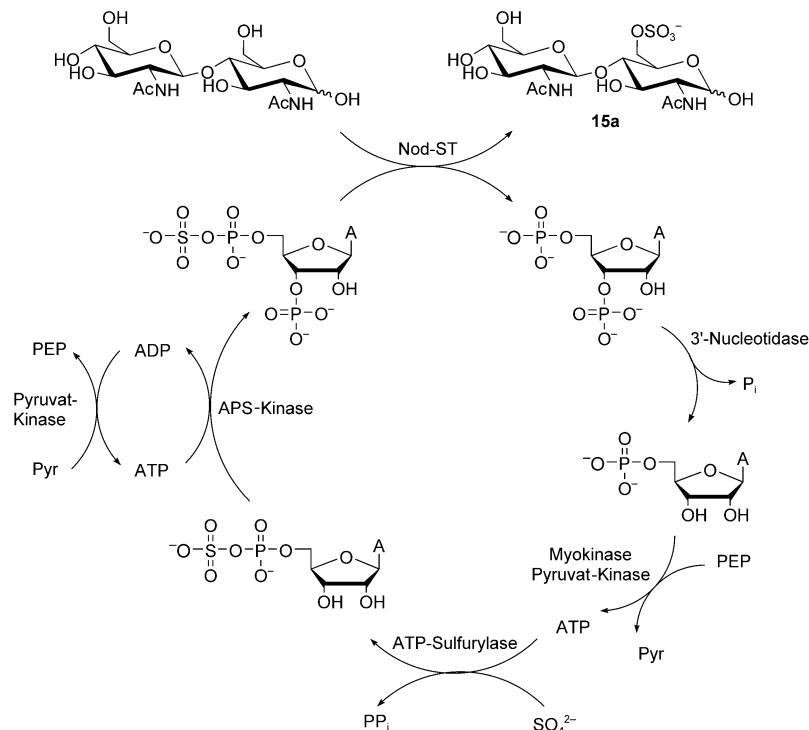
Fluor-3-hydroxybenzoësäure und dem längsten Linker erzielt (**14a**, $K_i = 30 \text{ nm}$). Die hohe Aktivität von **14a** könnte eine Folge der hohen Flexibilität sein, die es dem Molekül ermöglicht, seine Wechselwirkung mit den Resten des aktiven Zentrums zu maximieren. Durch Aufbau einer Folgebibliothek (Ersetzen der Puringruppe) wurde **14a** zum Inhibitor **14b** weiterentwickelt, dessen K_i -Wert von 5 nm mehr als fünf Größenordnungen niedriger ist als der K_m -Wert (1 mm) des Substrats, dessen Bindungsstelle er inhibiert.

8. Anwendungen in der Synthese

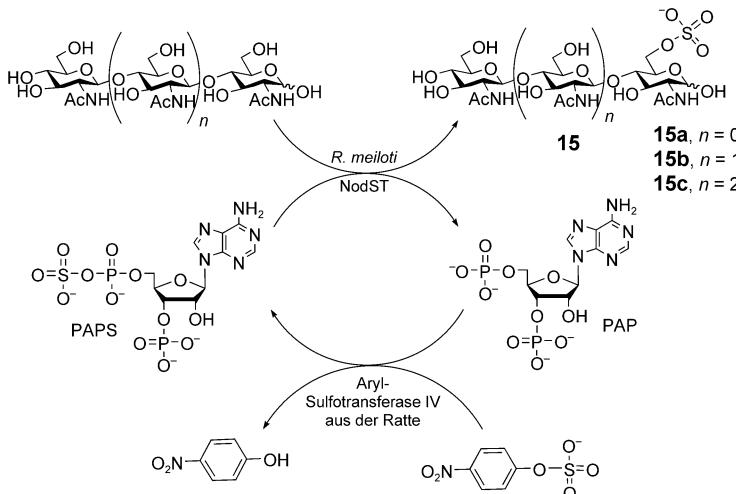
Die Synthese einer Reihe sulfatierter Biomoleküle wurde beschrieben. Beispielsweise wurde PAPS in mehreren Synthesen chemisch oder enzymatisch hergestellt.^[173–178] Ebenfalls berichtet wurde über chemische Synthesen von sulfatierten Sialyl-Lewis^X(sLe^X)-Strukturen,^[179] über chemoenzymatische Synthesen von 6'-Sulfo-sLe^X^[180] und Chondroitinsulfat E^[181] sowie über Synthesen von Sulfoglycopeptiden mit chemischen und enzymatischen Reaktionsschritten.^[122,182] Beispiele für Synthesen, in denen STs eingesetzt werden, sind jedoch selten. In den oben genannten Synthesen sulfatierter Biomoleküle wurde die Sulfatgruppe chemisch eingeführt.

Eines der Probleme beim Einsatz von STs in der Synthese ist die Produktinhibierung. PAP ist ein starker (nm bis μM) Inhibitor der STs. Ein Lösungsansatz ist die Anwendung einer Regenerierungsmethode. Lin et al. wendeten den in Schema 21 gezeigten Kreislauf zur Synthese von 6-Sulfochitobiose (**15a**) an.^[183] Durch den Regenerierungsansatz kann die Reaktion bei niedrigen PAPS-Konzentrationen und mit geringem Kostenaufwand durchgeführt werden. PAP wird enzymatisch entfernt, was die Inhibition minimiert. Der größte Nachteil dieser Methode ist ihre Komplexität, da sechs Enzyme und ihre Substrate benötigt werden. Dementsprechend entwickelten Burkart et al. einen einfacheren Ansatz, bei dem rSULT1C1 (β -AST-IV) in einem revers-physiologischen Prozess zur Synthese von PAPS aus *p*-Nitrophenolsulfat (PNPS) eingesetzt wird (Schema 22).^[184] Diese gekoppelte Reaktion wurde zur Synthese der in Schema 23 gezeigten sLe^X-Analoga herangezogen.

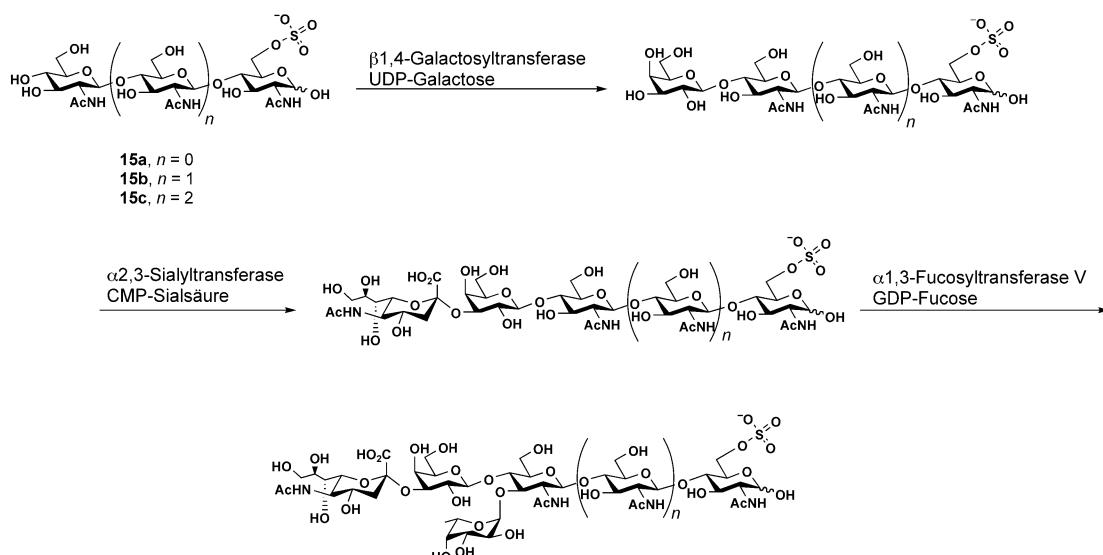
Rosenberg et al. berichteten kürzlich über interessante neue chemoenzymatische Synthesen von Antithrombin-III



Schema 21. Nod-ST-katalysierte Synthese von N,N'-Diacylchitobiose-6-sulfat mit multienzymatischer Regenerierung von PAPS.



Schema 22. Synthese sulfatierter Chitoooligosaccharide mit AST-IV-katalysierter Regenerierung von PAPS.



Scheme 23. Synthese von Sialyl-Le^X-6-sulfat-Analoga.

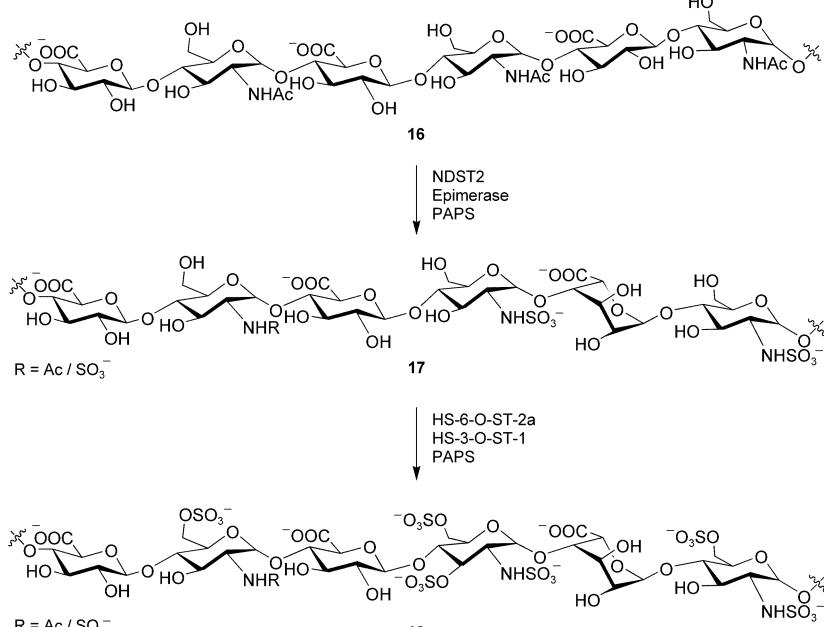
bindenden Heparansulfaten. Verbindungen dieses Typs wurden bereits durch konventionelle chemische Synthesen hergestellt,^[185,186] die aber eine Vielzahl von Stufen erforderten. In einem Beispiel wurden modifizierte HS-Ketten mit der Antithrombin-III-Bindungsdomäne chemoenzymatisch in einem zweistufigen Verfahren aus nichtsulfatierten *N*-Acetylheparosanpolysacchariden aus dem *E. coli*-Stamm K5 (**16**) synthetisiert (Schema 24).^[187] Ziel der Studie war die Verbesserung von HS-Therapeutika, von denen einige Nebenwirkungen bekannt sind. Im letzten Schritt, der Sulfonierung von **17**, wurde PAP³⁵S eingegebaut, um die Affinität für AT-III durch Gel-Mobilitäts-Assays abschätzen zu können. Das Produkt Mitrin (**18**) hat eine vier- bis fünfmal höhere spezifische Aktivität als kommerzielles HS.

In einer weiteren Veröffentlichung wurde die chemoenzymatische Synthese des Antithrombin-III bindenden HS-Pentasaccharids beschrieben (Schema 25).^[188] Als Ausgangsmaterial wurde ebenfalls das Heparosan **16** verwendet. In der Synthese wurde zunächst NDST2 zur selektiven *N*-Desacytylierung und *N*-Sulfonierung von Glucosaminresten unter Bildung von **19** eingesetzt. Anschließend wurde **19** mit Heparitinase I partiell zu einer Mischung von Oligosacchariden gespalten, aus der das Hexasaccharid **20** durch HPLC isoliert wurde. In den folgenden Schritten wurden C5-Epimerase und HS-2-O-ST-1 zur Epimerisierung und Sulfonierung zu **21** sowie HS-6-O-ST-1 und HS-6-O-ST-2a zur Bildung von **22** eingesetzt. Das bakterielle Enzym $\Delta^{4,5}$ -Glycuronidase wurde zur Entfernung des ungesättigten Uronsäurerestes unter Bildung von **23** verwendet. Anwendung von HS-3-O-ST-1 und PAP³⁵S führte schließlich zum Endprodukt **24**. Durch Gel-Mobilitäts-Assays konnte bestätigt werden, dass **24** wirksam an AT-III bindet.

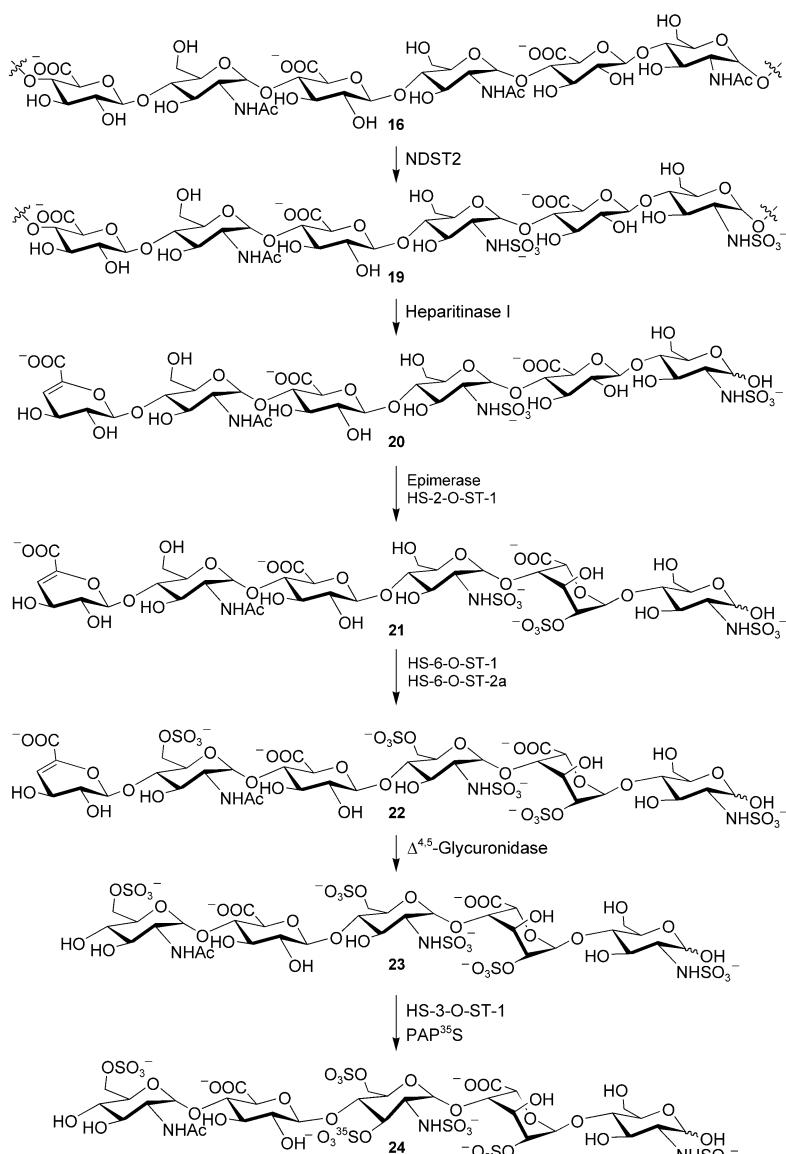
Wegen der wichtigen Funktionen sulfonierter Glycoaminoglycane in entscheidenden biologischen Prozessen sind praktikable Methoden zur Synthese dieser Verbindungen von großem Interesse. Die jüngsten Beispiele für die effiziente Anwendung chemoenzymatischer Methoden haben vielversprechende Ansätze aufgezeigt. Eine Kombination von chemoenzymatischer Synthese und PAPS-Regenerierung würde einen großen Fortschritt bezüglich Herstellung und Verfügbarkeit von Verbindungen dieses Typs bedeuten.

9. Zusammenfassung und Ausblick

Die Enzymklasse der Sulfotransferasen rückt wegen ihrer potenziellen biomedizinischen und regulatorischen Bedeutung zunehmend in den Blickpunkt des Interesses. Obwohl bereits eine Reihe



Scheme 24. Zweistufige chemoenzymatische Synthese von Mitrin (**18**).



Schema 25. Chemoenzymatische Synthese des AT-III bindenden HS-Pentasaccharids.

struktureller und mechanistischer Details aufgeklärt wurden, erfordert die Entwicklung wirksamer und spezifischer Inhibitoren von STs für den therapeutischen Einsatz weitergehende Studien.

Die meisten biochemischen und biophysikalischen Studien wurden mit zytosolischen STs durchgeführt, die durch rekombinante Techniken leichter zugänglich sind als die membranassoziierten STs. Aus den Ergebnissen dieser Studien ergibt sich ein vollständiges mechanistisches Bild, ein rationaler Ansatz zur Synthese von Inhibitoren mit hoher Wirkung gegen spezifische STs konnte bislang aber nicht präsentiert werden. Zur Lösung wurde vorgeschlagen, bisubstratische Übergangs- oder Grundzustandanaloga herzustellen und zu testen. Frühere Versuche waren vermutlich durch unzureichende Kenntnisse über die Struktur des Übergangszustands behindert. Die Länge des Linkers zwischen den beiden Bausteinen wird durch diese Struktur vorgegeben.

Studien mit dem Protein Tyrosinkinase (Csk) bestätigen, dass die Länge des Linkers zur Struktur des dissoziativen Übergangszustandes passen muss.^[189,190]

Eine weitere wichtige Frage betrifft die Existenz einer Sulfoenzym-Zwischenstufe. Anhand der verfügbaren strukturellen und mechanistischen Daten kann diese nicht ausgeschlossen werden. Das Histidin im aktiven Zentrum (mit geringer Wahrscheinlichkeit auch ein anderer Rest) könnte als Nucleophil wirken und eine instabile Sulfohistidin-Zwischenstufe bilden und sich so einer mechanistischen Untersuchung entziehen. Aus einer Strukturanalyse geht hervor, dass das konserverierte Histidin des aktiven Zentrums so positioniert ist, dass es als Nucleophil und nicht als Base agiert.^[36] Mutagenesestudien mit rSULT1C1 zeigten, wenn auch nicht schlüssig, dass H104A- und H104S-Mutanten inaktiv sind und dass die Aktivität auch durch Imidizol nicht wiederhergestellt werden kann.^[78] Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass das Histidin nicht als Base fungiert. Weiterhin wurde über einen Suizidinhibitor der rSULT1C1 berichtet, der Enzym-Inhibitor-Komplex wurde jedoch nicht ausführlich charakterisiert.^[149] Weitere Forschungen sind hier notwendig.

Eines der Hindernisse bei der Untersuchung membranassozierter STs ist die mangelnde Verfügbarkeit an rekombinantem Protein, sodass die Klonierung und Überexpression dieser Enzyme eine zentrale Aufgabe sein wird. Schließlich werden auch genauere Informationen über die aktiven Zentren und Substratbindungsstellen dazu beitragen, wirksame und spezifische Inhibitoren für diese wichtige Verbindungsklasse zu entwickeln.

Wir bedanken uns für die Unterstützung durch die National Institutes of Health. S.R.H. dankt der ARCS Foundation für ein Stipendium. Wir danken weiterhin Marian Bryan für ihre Hilfe bei der Erstellung der Graphiken.

Eingegangen am 1. September 2003 [A631]

Online veröffentlicht am 21. Juni 2004

Übersetzt von Dr. Thomas Fritzsche, Heidelberg

- [1] E. Baumann, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1876**, 54.
- [2] P. W. Robbins, F. Lipmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 2652–2653.
- [3] C. Clarke, P. Thorburn, D. McDonald, J. B. Adams, *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, 707, 28–37.
- [4] B. J. Buirchell, R. Hahnel, *J. Steroid Biochem.* **1975**, 6, 1489–1494.
- [5] A. Superti-Furga, *Am. J. Hum. Genet.* **1994**, 55, 1137–1145.
- [6] M. W. Duffel, A. D. Marshall, P. McPhie, V. Sharma, W. B. Jakoby, *Drug Metab. Rev.* **2001**, 33, 369–395.

- [7] K. Nagata, Y. Yamazoe, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2000**, 40, 159–176.
- [8] H. Glatt, *FASEB J.* **1997**, 11, 314–321.
- [9] M. Matsui, H. Homma, *Int. J. Biochem.* **1994**, 26, 1237–1247.
- [10] Y. Yamazoe, K. Nagata, S. Ozawa, R. Kato, *Chem.-Biol. Interact.* **1994**, 92, 107–117.
- [11] C. Niehrs, R. Beisswanger, W. B. Huttner, *Chem.-Biol. Interact.* **1994**, 92, 257–271.
- [12] C. A. Strott, *Endocr. Rev.* **2002**, 23, 703–732.
- [13] M. A. Runge-Morris, *FASEB J.* **1997**, 11, 109–117.
- [14] C. N. Falany, T. W. Wilborn, *Adv. Pharmacol.* **1994**, 27, 301–329.
- [15] C. Her, T. C. Wood, E. E. Eichler, H. W. Mohrenweiser, L. S. Ramagli, M. J. Siciliano, R. M. Weinshilboum, *Genomics* **1998**, 53, 284–295.
- [16] L. A. Brix, A. C. Barnett, R. G. Duggleby, B. Leggett, M. E. McManus, *Biochemistry* **1999**, 38, 10474–10479.
- [17] G. P. Chen, P. A. Rabjohn, J. L. York, C. Wooldridge, D. Q. Zhang, C. N. Falany, A. Radominska-Pandya, *Biochemistry* **2000**, 39, 16000–16007.
- [18] R. J. Anderson, P. E. Kudlacek, D. L. Clemens, *Chem.-Biol. Interact.* **1998**, 109, 53–67.
- [19] L. A. Brix, R. G. Duttleby, A. Gaedigk, M. E. McManus, *Biochem. J.* **1999**, 337, 337–343.
- [20] L. A. Brix, R. Nicoll, X. Y. Zhu, M. E. McManus, *Chem.-Biol. Interact.* **1998**, 109, 123–127.
- [21] J. Wang, J. L. Falany, C. N. Falany, *Mol. Pharmacol.* **1998**, 53, 274–282.
- [22] Y. Sakakibara, K. Yanagisawa, J. Katafuchi, D. P. Ringer, Y. Takami, T. Nakayama, M. Suiko, M. C. Liu, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 33929–33935.
- [23] N. Hempel, A. C. Barnett, R. M. Bolton-Grob, N. E. Liyou, M. E. McManus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, 276, 224–230.
- [24] E. V. Petrotchenko, M. E. Doerflein, Y. Kakuta, L. C. Pedersen, M. Negishi, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 30019–30022.
- [25] W. J. Geese, R. B. Raftogianis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, 288, 280–289.
- [26] M. W. Duffel, W. B. Jakoby, *J. Biol. Chem.* **1981**, 256, 1123–1127.
- [27] W. Honma, Y. Kamiyama, K. Yoshinari, H. Sasano, M. Shimada, K. Nagata, Y. Yamazoe, *Drug Metab. Dispos.* **2001**, 29, 274–281.
- [28] M. W. Duffel, *Chem.-Biol. Interact.* **1994**, 92, 3–14.
- [29] R. M. Harris, R. H. Waring, C. J. Kirk, P. J. Hughes, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 159–166.
- [30] G. P. Chen, E. Banoglu, M. W. Duffel, *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, 9, 67–74.
- [31] M. W. Duffel, G. P. Chen, V. Sharma, *Chem.-Biol. Interact.* **1998**, 109, 81–92.
- [32] Y. S. Yang, S. W. Tsai, E. S. Lin, *Chem.-Biol. Interact.* **1998**, 109, 129–135.
- [33] Y. Q. Zheng, A. Bergold, M. W. Duffel, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 30313–30319.
- [34] D. M. Otterness, S. P. Powers, L. J. Miller, R. M. Weinshilboum, *Mol. Pharmacol.* **1991**, 39, 34–41.
- [35] E. S. Lin, Y. S. Yang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, 271, 818–822.
- [36] Y. Kakuta, L. G. Pedersen, C. W. Carter, M. Negishi, L. C. Pedersen, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, 4, 904–908.
- [37] S. Pakhomova, M. Kobayashi, J. Buck, M. E. Newcomer, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, 8, 447–451.
- [38] R. Dajani, A. Cleasby, M. Neu, A. J. Wonacott, H. Jhoti, A. M. Hood, S. Modi, A. Hersey, J. Taskinen, R. M. Cooke, G. R. Manchee, M. W. H. Coughtrie, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 37862–37868.
- [39] Y. Kakuta, T. Sueyoshi, M. Negishi, L. C. Pedersen, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 10673–10676.
- [40] M. Negishi, L. G. Pedersen, E. Petrotchenko, S. Shevtsov, A. Gorokhov, Y. Kakuta, L. C. Pedersen, *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, 390, 149–157.
- [41] K. Yoshinari, E. V. Petrotchenko, L. C. Pedersen, M. Negishi, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2001**, 15, 67–75.
- [42] R. Raman, J. Myette, G. Venkataraman, V. Sasisekharan, R. Sasisekharan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 290, 1214–1219.
- [43] L. M. Bidwell, M. E. McManus, A. Gaedigk, Y. Kakuta, M. Negishi, L. Pedersen, J. L. Martin, *J. Mol. Biol.* **1999**, 293, 521–530.
- [44] Y. Kakuta, E. V. Petrotchenko, L. C. Pedersen, M. Negishi, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 27325–27330.
- [45] L. C. Pedersen, E. Petrotchenko, S. Shevtsov, M. Negishi, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 17928–17932.
- [46] W. J. Driscoll, K. Komatsu, C. A. Strott, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 12328–12332.
- [47] Y. Sakakibara, Y. Takami, T. Nakayama, M. Suiko, M. C. Liu, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 6242–6247.
- [48] M. C. Liu, M. Suiko, Y. Sakakibara, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 13460–13464.
- [49] P. H. Rehse, M. Zhou, S. X. Lin, *Biochem. J.* **2002**, 364, 165–171.
- [50] L. C. Pedersen, E. V. Petrotchenko, M. Negishi, *FEBS Lett.* **2000**, 475, 61–64.
- [51] H. Fuda, Y. C. Lee, C. Shimizu, N. B. Javitt, C. A. Strott, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 36161–36166.
- [52] T. Yabe, D. Shukla, P. G. Spear, R. D. Rosenberg, P. H. Seeberger, N. W. Shworak, *Biochem. J.* **2001**, 359, 235–241.
- [53] A. Gorokhov, L. Perera, T. A. Darden, M. Negishi, L. C. Pedersen, L. G. Pedersen, *Biophys. J.* **2000**, 79, 2909–2917.
- [54] W. W. Cleland, *Enzymes* **1967**, 2, 1–65.
- [55] J. B. Adams, A. Poulos, *Biochim. Biophys. Acta* **1967**, 146, 493–508.
- [56] J. B. Adams, R. K. Ellyard, J. Low, *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, 370, 160–188.
- [57] H. P. Zhang, O. Varmalova, F. M. Vargas, C. N. Falany, T. S. Leyh, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 10888–10892.
- [58] R. K. Banerjee, A. B. Roy, *Biochem. J.* **1966**, 100, P59–P60.
- [59] R. K. Banerjee, A. B. Roy, *Biochim. Biophys. Acta* **1968**, 151, 573–586.
- [60] E. J. M. Pennings, R. Vrielink, G. M. J. Vankempen, *Biochem. J.* **1978**, 173, 299–307.
- [61] A. D. Marshall, P. McPhie, W. B. Jakoby, *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, 382, 95–104.
- [62] L. Varin, R. K. Ibrahim, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 1858–1863.
- [63] E. Vakiani, J. G. Luz, J. Buck, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 35381–35387.
- [64] Z. Tong, M. O. James, *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, 376, 409–419.
- [65] P. Mattock, D. J. Barford, J. M. Basford, J. G. Jones, *Biochem. J.* **1970**, 116, 805–810.
- [66] G. R. J. Burns, E. Galanopoulou, C. H. Wynn, *Biochem. J.* **1977**, 167, 223–227.
- [67] K. Kobashi, D. H. Kim, T. Morikawa, *J. Protein Chem.* **1987**, 6, 237–244.
- [68] C. L. L. Chai, G. Lowe, *Bioorg. Chem.* **1992**, 20, 181–188.
- [69] A. R. Kwon, H. J. Yun, E. C. Choi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, 285, 526–529.
- [70] Y. Bartolotti, Y. Kakuta, L. Pedersen, M. Negishi, L. Pedersen, *J. Mol. Struct.* **1999**, 461–462, 105–111.
- [71] E. Chapman, M. C. Bryan, C. H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 910–915.
- [72] A. Williams, *Adv. Phys. Org. Chem.* **1992**, 27, 1–55.
- [73] K. G. Bowman, C. R. Bertozzi, *Chem. Biol.* **1999**, 6, R9–R22.

- [74] S. Hemmerich, *Drug Discovery Today* **2001**, 6, 27–35.
- [75] J. B. Adams, T. Pewnim, D. P. Chandra, L. Archibald, M. S. Foo, *Cancer Res.* **1979**, 39, 5124–5126.
- [76] J. R. Pasqualini, G. Chetrite, C. Blacker, M. C. Feinstein, L. Delalonde, M. Talbi, C. Maloche, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1996**, 81, 1460–1464.
- [77] T. Suzuki, T. Nakata, Y. Miki, C. Kaneko, T. Moriya, T. Ishida, S. Akinaga, H. Hirakawa, M. Kimura, H. Sasano, *Cancer Res.* **2003**, 63, 2762–2770.
- [78] J. L. Falany, C. N. Falany, *Cancer Res.* **1996**, 56, 1551–1555.
- [79] Y. Qian, C. Deng, W. C. Song, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, 286, 555–560.
- [80] U. Lindahl, M. Kusche-Gullberg, L. Kjellén, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 24979–24982.
- [81] N. Razi, U. Lindahl, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 11267–11275.
- [82] I. Capila, R. J. Linhardt, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 426–450; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 391–412.
- [83] J. D. Esko, S. B. Selleck, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, 71, 435–471.
- [84] D. Shukla, J. Liu, P. Blaiklock, N. W. Shworak, X. M. Bai, J. D. Esko, G. H. Cohen, R. J. Eisenberg, R. D. Rosenberg, P. G. Spear, *Cell* **1999**, 99, 13–2.
- [85] J. A. Liu, Z. Shriner, P. Blaiklock, K. Yoshida, R. Sasisekharan, R. D. Rosenberg, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 38155–38162.
- [86] C. C. Rider, *Glycoconjugate J.* **1997**, 14, 639–642.
- [87] D. S. Newburg, R. J. Linhardt, S. A. Ampofo, R. H. Yolken, *J. Nutr.* **1995**, 125, 419–424.
- [88] H. A. Harrop, D. R. Coombe, C. C. Rider, *AIDS* **1994**, 8, 183–192.
- [89] L. N. Callahan, M. Phelan, M. Mallinson, M. A. Norcross, *J. Virol.* **1991**, 65, 1543–1550.
- [90] D. Batinic, F. A. Robey, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 6664–6671.
- [91] M. Rusnati, D. Coltrini, P. Oreste, G. Zoppetti, A. Albini, D. Noonan, F. D. di Fagagna, M. Giacca, M. Presta, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 11313–11320.
- [92] H. C. Chang, F. Samaniego, B. C. Nair, L. Buonaguro, B. Ensoli, *AIDS* **1997**, 11, 1421–1431.
- [93] D. H. Atha, J. C. Lormeau, M. Petitou, R. D. Rosenberg, J. Choay, *Biochemistry* **1985**, 24, 6723–6729.
- [94] D. H. Atha, A. W. Stephens, R. D. Rosenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, 81.
- [95] D. H. Atha, J. C. Lormeau, M. Petitou, R. D. Rosenberg, J. Choay, *Biochemistry* **1987**, 26, 6454–6461.
- [96] R. D. Rosenberg, P. S. Damus, *J. Biol. Chem.* **1973**, 248, 6490–6505.
- [97] J. Liu, N. W. Shworak, L. M. S. Fritze, J. M. Edelberg, R. D. Rosenberg, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 27072–27082.
- [98] Z. L. L. Wu, L. J. Zhang, D. L. Beeler, B. Kuberan, R. D. Rosenberg, *FASEB J.* **2002**, 16, 539–545.
- [99] L. J. Zhang, D. L. Beeler, R. Lawrence, M. Lech, J. Liu, J. C. Davis, Z. Shriner, R. Sasisekharan, R. D. Rosenberg, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 42311–42321.
- [100] A. C. Rapraeger, *Chem. Biol.* **1995**, 2, 645–649.
- [101] D. A. Pye, R. R. Vives, J. E. Turnbull, P. Hyde, J. T. Gallagher, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 22936–22942.
- [102] S. Faham, R. E. Hileman, J. R. Fromm, R. J. Linhardt, D. C. Rees, *Science* **1996**, 271, 1116–1120.
- [103] Z. L. Wu, L. Zhang, T. Yabe, B. Kuberan, D. L. Beeler, A. Love, R. D. Rosenberg, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 17121–17129.
- [104] S. E. Marshall, M. Luscombe, D. S. Pepper, J. J. Holbrook, *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, 797, 34–39.
- [105] K. Ibel, G. A. Poland, J. P. Baldwin, D. S. Pepper, M. Luscombe, J. J. Holbrook, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, 870, 58–63.
- [106] E. Mbemba, J. C. Gluckman, L. Gattegno, *Glycobiology* **2000**, 10, 21–29.
- [107] G. S. V. Kuschert, F. Coulin, C. A. Power, A. E. I. Proudfoot, R. E. Hubbard, A. J. Hoogewerf, T. N. C. Wells, *Biochemistry* **1999**, 38, 12959–12968.
- [108] R. J. Lipscombe, A. M. Nakhoul, C. J. Sanderson, D. R. Coombe, *J. Leukocyte Biol.* **1998**, 63, 342–350.
- [109] R. Ishitsuka, K. Kojima, H. Utsumi, H. Ogawa, I. Matsumoto, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 9935–9941.
- [110] A. D. Cardin, N. Hirose, D. T. Blankenship, R. L. Jackson, J. A. K. Harmony, D. A. Sparrow, J. T. Sparrow, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, 134, 783–789.
- [111] K. H. Weisgraber, S. C. Rall, R. W. Mahley, R. W. Milne, Y. L. Marcel, J. T. Sparrow, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 2068–2076.
- [112] K. Fuxe, B. Tinner, W. Staines, G. David, L. F. Agnati, *Brain Res.* **1997**, 746, 25–33.
- [113] J. A. Liu, N. W. Shworak, P. Sinay, J. J. Schwartz, L. J. Zhang, L. M. S. Fritze, R. D. Rosenberg, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 5185–5192.
- [114] N. W. Shworak, J. A. Liu, L. M. Petros, L. J. Zhang, M. Kobayashi, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, R. D. Rosenberg, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 5170–5184.
- [115] J. Aikawa, K. Grobe, M. Tsujimoto, J. D. Esko, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 5876–5882.
- [116] H. Habuchi, M. Tanaka, O. Habuchi, K. Yoshida, H. Suzuki, K. Ban, K. Kimata, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 2859–2868.
- [117] M. Farzan, T. Mirzabekov, P. Kolchinsky, R. Wyatt, M. Cayabyab, N. P. Gerard, C. Gerard, J. Sodroski, H. Choe, *Cell* **1999**, 96, 667–676.
- [118] H. Choe, W. Li, P. L. Wright, N. Vasilieva, M. Venturi, C.-C. Huang, C. Grundner, T. Dorfman, M. B. Zwick, L. Wang, E. S. Rosenberg, P. D. Kwong, D. R. Burton, J. E. Robinson, J. G. Sodroski, M. Farzan, *Cell* **2003**, 114, 161–170.
- [119] G. S. Kansas, *Blood* **1996**, 88, 3259–3287.
- [120] D. Sako, K. M. Comess, K. M. Barone, R. T. Camphausen, D. A. Cumming, G. D. Shaw, *Cell* **1995**, 83, 323–331.
- [121] T. Pouyani, B. Seed, *Cell* **1995**, 83, 333–343.
- [122] K. M. Koeller, M. E. B. Smith, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 742–743.
- [123] Y. Imai, L. A. Lasky, S. D. Rosen, *Nature* **1993**, 361, 555–557.
- [124] D. D. Manning, C. R. Bertozzi, N. L. Pohl, S. D. Rosen, L. L. Kiessling, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 6254–6255.
- [125] K. Shailubhai, P. R. Streeter, C. E. Smith, G. S. Jacob, *Glycobiology* **1997**, 7, 305–314.
- [126] A. Bistrup, S. Bhakta, J. K. Lee, Y. Y. Belov, M. D. Gunn, F. R. Zuo, C. C. Huang, R. Kannagi, S. D. Rosen, S. Hemmerich, *J. Cell Biol.* **1999**, 145, 899–910.
- [127] K. Uchimura, H. Muramatsu, K. Kadomatsu, Q. W. Fan, N. Kurosawa, C. Mitsuoka, R. Kannagi, O. Habuchi, T. Muramatsu, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 22577–22583.
- [128] N. Hiraoka, B. Petryniak, J. Nakayama, S. Tsuboi, M. Suzuki, J. C. Yeh, D. Izawa, T. Tanaka, M. Miyasaka, J. B. Lowe, M. Fukuda, *Immunity* **1999**, 11, 79–89.
- [129] M. T. Bayliss, D. Osborne, S. Woodhouse, C. Davidson, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 15892–15900.
- [130] S. J. A. Davies, D. R. Goucher, C. Doller, J. Silver, *J. Neurosci.* **1999**, 19, 5810–5822.
- [131] J. Garwood, O. Schnadelbach, A. Clement, K. Schutte, A. Bach, A. Faissner, *J. Neurosci.* **1999**, 19, 3888–3899.
- [132] C. J. Derry, C. Faveeuw, K. R. Mordsley, A. Ager, *Eur. J. Immunol.* **1999**, 29, 419–430.
- [133] M. F. Naujokas, M. Morin, M. S. Anderson, M. Peterson, J. Miller, *Cell* **1993**, 74, 257–268.
- [134] H. G. Kang, M. R. Evers, G. Q. Xia, J. U. Baenziger, M. Schachner, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 34766–34772.
- [135] K. Uchimura, K. Kadomatsu, H. Nishimura, H. Muramatsu, E. Nakamura, N. Kurosawa, O. Habuchi, F. M. El-Fasakhany, Y. Yoshikai, T. Muramatsu, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 1443–1450.

- [136] G. Sugumaran, M. Katsman, R. R. Drake, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 22483–22487.
- [137] O. Habuchi, Y. Matsui, Y. Kotoya, Y. Aoyama, Y. Yasuda, M. Noda, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 21968–21974.
- [138] H. Bakker, I. Friedmann, S. Oka, T. Kawasaki, N. Nifantev, M. Schachner, N. Mantei, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 29942–29946.
- [139] E. Ong, J. C. Yeh, Y. L. Ding, O. Hindsgaul, M. Fukuda, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 5190–5195.
- [140] G. Q. Xia, M. R. Evers, H. G. Kang, M. Schachner, J. U. Baenziger, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 38402–38409.
- [141] T. Okuda, S. Mita, S. Yamauchi, N. Fukuta, H. Nakano, T. Sawada, O. Habuchi, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 40605–40613.
- [142] H. G. Kang, M. R. Evers, G. Q. Xia, U. Baenziger, M. Schachner, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 10861–10869.
- [143] M. R. Evers, G. Q. Xia, H. G. Kang, M. Schachner, J. U. Baenziger, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 36344–36353.
- [144] M. Fukuta, J. Inazawa, T. Torii, K. Tsuzuki, E. Shimada, O. Habuchi, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 32321–32328.
- [145] S. S. Rensdorffiano, J. A. Roth, *J. Neurochem.* **1987**, 48, 1411–1415.
- [146] J. P. Horwitz, R. S. Misra, J. Rozhin, J. P. Neenan, A. Huo, V. C. Godefroi, K. D. Philips, H. L. Chung, G. Butke, S. C. Brooks, *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, 525, 364–372.
- [147] G. J. Mulder, E. Scholtens, *Biochem. J.* **1977**, 165, 553–559.
- [148] M. H. A. Kester, S. Buldak, D. Tibboel, W. Meini, H. Glatt, C. N. Falany, M. W. H. Coughtrie, A. Bergman, S. H. Safe, G. Kuiper, A. G. Schuur, A. Brouwer, T. J. Visser, *Endocrinology* **2000**, 141, 1897–1900.
- [149] B. L. K. Mangold, J. Erickson, C. Lohr, D. J. McCann, J. B. Mangold, *Carcinogenesis* **1990**, 11, 1563–1567.
- [150] S. I. Rao, M. W. Duffel, *Drug Metab. Dispos.* **1991**, 19, 543–545.
- [151] M. W. Duffel, Y. Q. Zheng, *Drug Metab. Dispos.* **1993**, 21, 400–402.
- [152] S. I. Rao, M. W. Duffel, *Xenobiotica* **1992**, 22, 247–255.
- [153] K. J. Bamforth, A. L. Jones, R. C. Roberts, M. W. H. Coughtrie, *Biochem. Pharmacol.* **1993**, 46, 1713–1720.
- [154] M. W. H. Coughtrie, L. E. Johnston, *Drug Metab. Dispos.* **2001**, 29, 522–528.
- [155] K. J. Bamforth, K. Dalglish, M. W. H. Coughtrie, *Eur. J. Pharmacol. Environ. Toxicol. Pharmacol. Sec.* **1992**, 228, 15–21.
- [156] M. Matsui, M. Takahashi, Y. Miwa, Y. Motoyoshi, H. Homma, *Biochem. Pharmacol.* **1995**, 49, 739–741.
- [157] R. Bartzatt, J. D. Beckmann, *Biochem. Pharmacol.* **1994**, 47, 2087–2095.
- [158] T. Walle, E. A. Eaton, U. K. Walle, *Biochem. Pharmacol.* **1995**, 50, 731–734.
- [159] J. P. Horwitz, V. K. Iyer, H. B. Vardhan, J. Corombos, S. C. Brooks, *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 692–698.
- [160] B. N. Cook, S. Bhakta, T. Biegel, K. G. Bowman, J. I. Armstrong, S. Hemmerich, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 8612–8622.
- [161] V. K. Iyer, W. B. Butler, J. P. Horwitz, J. Rozhin, S. C. Brooks, J. Corombos, D. Kessel, *J. Med. Chem.* **1983**, 26, 162–166.
- [162] J. I. Armstrong, A. R. Portley, Y. T. Chang, D. M. Nierengarten, B. N. Cook, K. G. Bowman, A. Bishop, N. S. Gray, K. M. Shokat, P. G. Schultz, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 1359–1362; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 1303–1306.
- [163] N. S. Gray, L. Wodicka, A. Thunnissen, T. C. Norman, S. J. Kwon, F. H. Espinoza, D. O. Morgan, G. Barnes, S. LeClerc, L. Meijer, S. H. Kim, D. J. Lockhart, P. G. Schultz, *Science* **1998**, 281, 533–538.
- [164] D. E. Verdugo, M. T. Cancilla, X. Ge, N. S. Gray, Y. T. Chang, P. G. Schultz, M. Negishi, J. A. Leary, C. R. Bertozzi, *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 2683–2686.
- [165] D. J. Maly, I. C. Choong, J. A. Ellman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 2419–2424.
- [166] J. W. Kehoe, D. J. Maly, D. E. Verdugo, J. I. Armstrong, B. N. Cook, Y. B. Ouyang, K. L. Moore, J. A. Ellman, C. R. Bertozzi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 329–332.
- [167] J. I. Armstrong, X. Ge, D. E. Verdugo, K. A. Winans, J. A. Leary, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2001**, 3, 2657–2660.
- [168] J. I. Armstrong, D. E. Verdugo, C. R. Bertozzi, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 170–173.
- [169] E. Chapman, S. Ding, P. G. Schultz, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14524–14525.
- [170] S. Ding, N. S. Gray, X. Wu, Q. Ding, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 1594–1596.
- [171] M. D. Burkart, C. H. Wong, *Anal. Biochem.* **1999**, 274, 131–137.
- [172] M. D. Best, A. Brik, E. Chapman, L. V. Lee, W.-C. Cheng, C.-H. Wong, *ChemBioChem* **2004**, 5, 811–819.
- [173] J. P. Horwitz, J. P. Neenan, R. S. Misra, J. Rozhin, A. Huo, K. D. Philips, *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, 480, 376–381.
- [174] J. Baddiley, J. G. Buchanan, R. Letters, A. R. Sanderson, *J. Chem. Soc.* **1959**, 1731–1734.
- [175] J. I. Mukai, *Agric. Biol. Chem.* **1989**, 53, 883–884.
- [176] C. Satishchandran, G. D. Markham, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 15012–15021.
- [177] P. Hiram, P. Fernando, A. Karakawa, Y. Sakakibara, H. Ibuki, H. Nakajima, M. C. Liu, M. Suiko, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1993**, 57, 1974–1975.
- [178] R. D. Sekura, *Methods Enzymol.* **1981**, 77, 413–415.
- [179] K. C. Nicolaou, N. J. Bockovich, D. R. Carcanague, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 8843–8844.
- [180] P. R. Scudder, K. Shailubhai, K. L. Duffin, P. R. Streeter, G. S. Jacob, *Glycobiology* **1994**, 4, 929–932.
- [181] O. Habuchi, R. Moroi, S. Ohtake, *Anal. Biochem.* **2002**, 310, 129–136.
- [182] E. G. Cormier, M. Persuh, D. A. D. Thompson, S. W. Lin, T. P. Sakmar, W. C. Olson, T. Dragic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 5762–5767.
- [183] C. H. Lin, G. J. Shen, E. Garciajunceda, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 8031–8032.
- [184] M. D. Burkart, M. Izumi, E. Chapman, C. H. Lin, C. H. Wong, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 5565–5574.
- [185] M. Petitou, L. P. Herault, A. Bernat, P. A. Driguez, P. Duchaussoy, J. C. Lormeau, J. M. Herbert, *Nature* **1999**, 398, 417–422.
- [186] P. Sinay, J. C. Jacquinot, M. Petitou, P. Duchaussoy, I. Lederman, J. Choay, G. Torri, *Carbohydr. Res.* **1984**, 132, C5–C9.
- [187] B. Kuberan, D. L. Beeler, R. Lawrence, M. Lech, R. D. Rosenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 12424–12425.
- [188] B. Kuberan, M. Z. Lech, D. L. Beeler, Z. L. Wu, R. D. Rosenberg, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 1343–1346.
- [189] K. Kim, P. A. Cole, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 6851–6858.
- [190] K. Parang, J. H. Till, A. J. Ablooglu, R. A. Kohanski, S. R. Hubbard, P. A. Cole, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, 8, 37–41.
- [191] D. B. Moody, S. A. Porcelli, *Nature Rev.* **2003**, 3, 11–22.
- [192] G. De Libero, L. Mori, *News Physiol. Sci.* **2003**, 18, 71–76.