

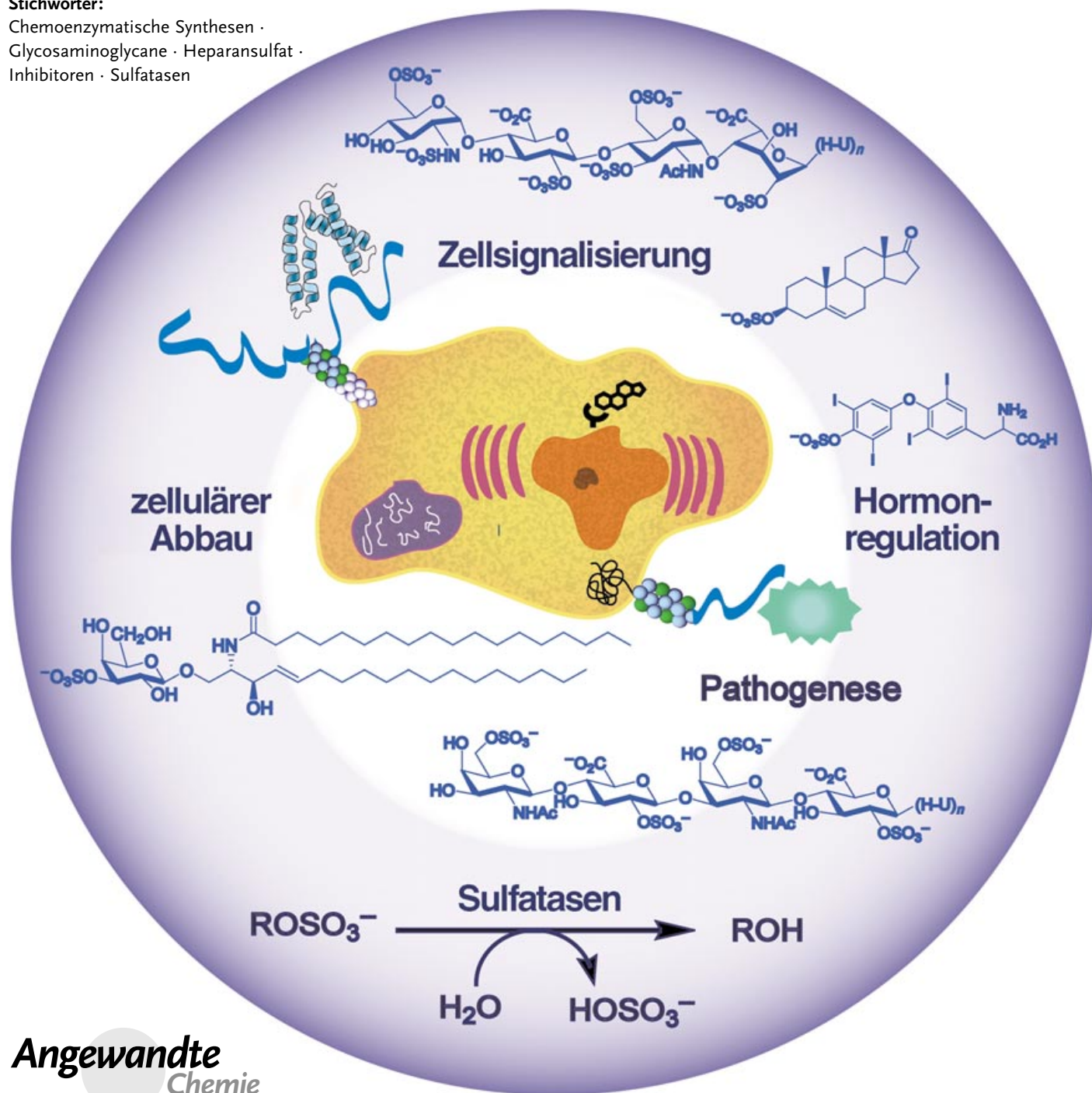
Enzymchemie

Sulfatasen: Struktur, Mechanismus, biologische Aktivität, Inhibition, Anwendung in Synthesen

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

Stichwörter:

Chemoenzymatische Synthesen ·
Glycosaminoglycane · Heparansulfat ·
Inhibitoren · Sulfatasen



Angewandte Chemie

Sulfatasen – d. h. Sulfatester spaltende Enzyme – spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulierung von Sulfatierungszuständen, die über die Funktion vieler physiologischer Moleküle entscheiden. Die Substrate der Sulfatasen reichen von kleinen cytosolischen Steroiden wie dem Östrogensulfat bis hin zu komplexen Kohlenhydraten auf Zelloberflächen, etwa den Glycosaminoglycanen. Die Umwandlung dieser Moleküle wurde mit wichtigen zellulären Funktionen in Verbindung gebracht, z. B. mit der Hormonregulation, dem zellulären Abbau und der Modulation von Signalisierungsprozessen. Sulfatasen hängen mit dem Ausbruch etlicher pathophysiologischer Erscheinungen zusammen, etwa mit hormonabhängigen Krebsformen. Bis heute sind zwar zahlreiche Sulfatasen identifiziert worden, die Aufklärung des weitreichenden Spektrums ihrer biologischen Aktivitäten befindet sich aber erst am Anfang. Dieser Aufsatz gibt einen Überblick über den derzeitigen Wissensstand zu den Strukturen, Mechanismen und der Inhibition von Sulfatasen.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	5859
2. Die Familie der Sulfatasen	5859
3. Strukturen	5862
4. Mechanismen	5864
5. Die posttranslationale FGly-Modifikation	5866
6. Substrate und biologische Funktionen eukaryotischer Sulfatasen	5868
7. Substrate und biologische Funktionen prokaryotischer Sulfatasen	5873
8. Inhibition von Sulfatasen	5876
9. Anwendungen in der Synthese	5879
10. Zusammenfassung und Ausblick	5881

1. Einleitung

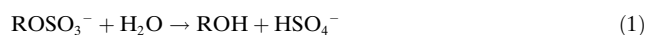
Während Sulfotransferasen in den letzten Jahren Gegenstand einer intensiven Forschung waren, existieren zu den Sulfatasen relativ wenige Studien. Sulfatasen wurden im 20. Jahrhundert sporadisch in Eukaryoten und Prokaryoten entdeckt, lange ist diese Klasse von Enzymen aber unterschätzt worden, da man davon ausging, dass sie abgesehen vom Abbau organischer Sulfate im Erdboden keine relevante biologische Funktion haben. Eine Menge an Informationen zu humanen Sulfatasen wurde in den 60er Jahren gesammelt, nachdem entdeckt worden war, dass Sulfatasemangel zu mehreren lysosomalen Erbkrankheiten führt. Seither hat sich herausgestellt, dass Sulfatasen wichtige Komponenten bei Prozessen wie der Hormonregulation (sowie der Hormonregulation bei hormonabhängigen Krebsarten), den Wechselwirkungen von Gameten und der Knochen- und Knorpelbildung sind.

Sehr neu ist der Befund, dass Sulfatasen an der Modifikation von Sulfateinheiten von Glycosaminoglycanen (GAGs)^[*] beteiligt sind, die die Signalgebung bei Stammzellen und mustergebende Phänomene in der extrazellulären Matrix (ECM) steuern. Darüber hinaus wurden neue Funktionen von Sulfatasen in Wirbellosen und Prokaryoten entdeckt, z. B. eine mögliche Rolle in der bakteriellen Pathogenese. Dieser Aufsatz gibt einen Überblick über die Strukturen, Mechanismen und Inhibition der Sulfatasen. Außerdem diskutieren wir die Substrate und die biologischen Funktionen von Sulfatasen; der Schwerpunkt liegt hierbei auf aktuellen Themen und potenziellen therapeutischen Targets. Schließlich diskutieren wir die Anwendung dieser Enzyme in der Synthese, wobei wir insbesondere die biologischen Wechselwirkungen von sulfatierten Kohlenhydraten und

Glycosaminoglycanen innerhalb der extrazellulären Matrix analysieren.

2. Die Familie der Sulfatasen

Sulfatasen (EC 3.1.5.6) katalysieren die hydrolytische Desulfonierung von Sulfateestern (CO-S) und Sulfamaten (CN-S) [Gl. (1) und (2)]. Sie bilden eine Enzymklasse, die bei



eukaryotischen und prokaryotischen Spezies sequenziell, strukturell und mechanistisch hoch konserviert ist. Charakteristisch sind unter anderem: 1) eine 20- bis 60-prozentige Sequenzhomologie über die gesamte Länge des Proteins, 2) eine hoch konservierte N-terminale Region mit dem Konsensusmotiv der Sulfatasen und 3) ein einzigartiger Aldehydest im aktiven Zentrum, α -Formylglycin (FGly), der posttranslational eingeführt wird.

[*] S. R. Hanson, Dr. M. D. Best, Prof. C.-H. Wong
Department of Chemistry and
The Skaggs Institute for Chemical Biology
The Scripps Research Institute
10550 North Torrey Pines Road, BCC 357
La Jolla, CA 92037 (USA)
Fax: (+1) 858-784-2409
E-mail: wong@scripps.edu

[†] Eine Liste häufig verwendeter Abkürzungen findet sich am Ende des Aufsatzes.

Der hohe Grad an Sequenzhomologie und struktureller Übereinstimmung führte zu dem Schluss, dass sich die Sulfatasen vor langer Zeit aus einem gemeinsamen Vorläufer-Gen entwickelt haben.^[1,2] Die Humanenzyme (15 sind bekannt, 13 Gene wurden kloniert, Tabelle 1) ebenso wie die Enzyme aus Wirbellosen, niederen Eukaryoten und Prokaryoten (viele sind bekannt, 13 Gene wurden kloniert, Tabelle 2) sind in der Regel zwischen 500 und 600 Aminosäuren lang; die kürzlich entdeckten humanen Sulf-Enzyme haben eine geringfügig längere Sequenz von etwa 800 Resten (Abbildung 1). In Eukaryoten werden Sulfatasen für den sekretorischen Transportweg vorbereitet, wobei sie umfangreich glycosyliert werden, bevor sie in die extrazelluläre Matrix (ECM) oder in subzelluläre Kompartimente wie das endoplasmatische Retikulum (ER), das Golgi-System und in die Lysosomen transportiert werden (Tabelle

Tabelle 1: Substrate und subzelluläre Lokalisierung humaner Sulfatasen.

Sulfatase ^[a]	Abkürzung	physiologisches Substrat	subzelluläre Lokalisierung ^[b]	Lit. ^[c]
Arylsulfatase A	ARSA	Sulfatid	Lysosom	[67]
Arylsulfatase B	ARSB	Dermatansulfat, Chondroitinsulfat	Lysosom	[2, 68]
Arylsulfatase C	ARSC	Steroidulfate	ER	[121]
Arylsulfatase D	ARSD	unbekannt	ER	[129]
Arylsulfatase E	ARSE	unbekannt	Golgi-Netzwerk	[129]
Arylsulfatase F	ARSF	unbekannt	ER	[130]
Arylsulfatase G	ARSG	unbekannt	ER	[133]
Galactosamin-6-Sulfatase	GalN6S	Chondroitinsulfat, Keratansulfat	Lysosom	[69]
Glucosamin-3-Sulfatase*	GlcN3S	Heparansulfat	Lysosom	[92, 93]
Glucosamin-6-Sulfatase	GlcN6S	Heparansulfat, Keratansulfat	Lysosom	[70]
Glucuronat-2-Sulfatase*	GlcA2S	Heparansulfat	Lysosom	[91]
Heparan-N-Sulfatase	GlcNS	Heparansulfat	Lysosom	[71]
Iduronat-2-Sulfatase	IdoA2S	Heparansulfat, Dermatansulfat	Lysosom	[72]
Endo-Sulfatase 1	Sulf1	Heparansulfat	ECM	[22]
Endo-Sulfatase 2	Sulf2	Heparansulfat	ECM	[22]

[a] Mit einem Stern markierte humane Sulfatasen wurden bislang nicht kloniert. Zusätzlich zu den humanen Genen wurden Orthologe aus vielen anderen Säugern (Maus, Ratte, Katze, Schwein, Wachtel, Ziege) kloniert. [b] ER=endoplasmatisches Retikulum, ECM=extrazelluläre Matrix. [c] Literatur über Genklonierung oder Entdeckung (*).

le 1). Die lysosomalen und extrazellulären Sulfatasen sind löslich, die im ER und im Golgi-Apparat sind hingegen membrangebunden. Sämtliche bekannten Sulfatasen aus

Tabelle 2: Aus Wirbellosen, niederen Eukaryoten und Prokaryoten klonierte Sulfatasen.

Organismus	Sulfatase	Substrat	subzelluläre Lokalisierung	physiologische Rolle	Lit.
Wirbellose und niedere Eukaryoten					
<i>Helicoverpa erythrogramma</i>	HeARS	unbekannt	extrazellulär	Entwicklung	[115]
<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	HpARS	unbekannt	extrazellulär	Entwicklung	[116]
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	SARS	unbekannt	extrazellulär	Entwicklung	[118]
<i>Helix pomatia</i>	HeSulf1	unbekannt	unbekannt	unbekannt	[155]
<i>Plutella xylostella</i>	PGSS	unbekannt	Darmlumen	Entgiftung	[152]
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	CARS	Glucosinolate	Periplasma	Schwefel-Bereitstellung	[160]
<i>Neurospora crassa</i>	NARS	Tyrosin-O-sulfat	extra- und intrazellulär	Schwefel-Bereitstellung	[158]
<i>Volvox catenula</i>	VARS	unbekannt	Periplasma	Schwefel-Bereitstellung	[161]
Prokaryoten					
<i>Flavobacterium</i>	FHS2S	Heparansulfat	Periplasma	HS-Abbau	[58]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KARS	unbekannt	Periplasma	Schwefel-Bereitstellung	[63]
<i>Prevotella sp.RS2</i>	PMdS	unbekannt	Periplasma	Mucin-Abbau	[60]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PARS	unbekannt	Cytoplasma	Schwefel-Bereitstellung	[173]
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	SChoS	Cholin-O-sulfat	Cytoplasma	Schwefel-Bereitstellung, Osmoprotektion	[181]



Chi-Huey Wong erlangte den B.S. und M.S. an der National Taiwan University und promovierte in Chemie am Massachusetts Institute of Technology. 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.



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 ist sie im Rahmen des Chemistry Graduate Program unter der Anleitung von Prof. Chi-Huey Wong am Scripps Research Institute beschäftigt.

	1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Position von FGly (1*)	Länge	Zugriffs- nummer
humane Sulfatasen															
ARSA	C	T	P	S	R	A	A	L	L	T	G	R	69	507	P15289
ARSB	C	T	P	S	R	S	Q	L	L	T	G	R	75	533	NP_000037
ARSC	C	T	P	S	R	A	A	F	M	T	G	R	83	583	P08842
ARSD	C	T	P	S	R	A	A	F	L	T	G	R	89	593	CAA58555
ARSE	C	T	P	S	R	A	A	F	L	T	G	R	86	589	I37187
ARSF	C	S	P	S	R	S	A	F	L	T	G	R	79	591	X97868
ARSG	C	S	P	S	R	A	S	L	L	T	G	R	82	525	[130]
GalN6S	C	S	P	S	R	A	A	L	L	T	G	R	79	522	P54793
GlcN6S	C	C	P	S	R	A	S	I	L	T	G	K	91	552	CAA78164
GlcNS	C	S	P	S	R	A	S	L	L	T	G	L	70	502	P51688
IdoA2S	C	A	P	S	R	V	S	F	L	T	G	R	84	550	P22304
Sulf1	C	C	P	S	R	S	S	M	L	T	G	K	87	871	AAM76860
Sulf2	C	C	P	S	R	S	S	I	L	T	G	K	88	870	AAM76861
Sulfatasen aus Wirbellosen und niederen Eukaryoten															
HeARS	C	T	P	S	R	S	A	I	M	T	G	R	106	559	AAC27821
HpARS	C	T	P	S	R	S	A	I	M	T	G	R	100	551	P14000
SARS	C	T	P	S	R	S	A	I	V	T	G	R	115	567	P50473
HpSulf1	C	T	P	T	R	S	Q	L	M	S	G	R	80	508	AAF30402
PGSS	C	S	P	A	R	T	A	V	L	T	G	K	70	532	CAC86342
CARS	C	C	P	S	R	T	N	L	C	A	A	S	73	646	KJKM
NARS	C	C	P	A	R	V	S	L	W	T	G	K	89	639	AAC02716
VARS	C	C	P	S	R	T	N	L	W	R	G	Q	72	649	Q10723
prokaryotische Sulfatasen															
FHS2S	C	T	P	S	R	S	A	I	F	S	G	K	82	464	[58]
KARS	S	A	P	A	R	S	M	L	L	T	G	N	72	577	T45548
PARS	C	S	P	T	R	S	M	L	L	T	G	T	51	533	P51691
PmS	S	T	P	A	R	A	C	L	L	T	G	L	79	517	AAF72520
SChoS	C	A	P	A	R	A	S	F	M	A	G	Q	54	512	AAC13371

Abbildung 1. Signatursequenzen von Sulfatasen. Die partielle Alignment aller klonierten Sulfatasen verdeutlicht eine Homologie der Sulfatase-Signatursequenzen (PS00523). Diese Konsensussequenz ist für die Steuerung der Oxidation des ersten Aminosäurerestes zum katalytisch aktiven FGly ausschlaggebend. Hoch konservierte Reste sind durch weiße Buchstaben auf schwarzem Hintergrund gekennzeichnet, andere signifikant konservierte Reste sind grau dargestellt. Angegeben sind die Zugriffsnummern für ExPASy oder (für dort nicht hinterlegte Proteinsequenzen) eine zugehörige Literaturstelle.

Wirbellosen, niederen Eukaryoten und Bakterien sind löslich und finden sich im Cytoplasma, im Periplasma und in extrazellulären Bereichen (Tabelle 2).^[3]

Sulfatasen katalysieren die Hydrolyse einer vielfältigen Reihe von Sulfateestern; hierzu zählen: hydrophobe Glucosinolat-, Steroid- und Thyroninsulfate, amphiphile sulfatierte Kohlenhydrate (gefunden bei Glycosaminoglycanen, Proteoglycanen und Glycolipiden) und wasserlösliche Mono- und Disaccharidsulfate. Oft wurden physiologische Substrate von Sulfatasen erst im Anschluss an ihre Entdeckung mithilfe kleiner Arylsubstrate identifiziert, daher tragen viele den generischen Arylsulfatasenamen (ARS).^[3–5] Man kennt beim Menschen acht Funktionsstörungen, die durch einen Mangel

einer einzelnen Sulfatase hervorgerufen werden (Tabelle 3).^[1,6,7] Darüber hinaus gibt es eine seltene autosomale rezessive Störung, die multiple Sulfatase-Defizienz (MSD), die auf eine hochgradig reduzierte Aktivität aller Sulfatasen zurückgeht.^[8]

Zwei ausgeprägt homologe Aminosäuremotive, die Sulfatase-Signatursequenzen I und II, befinden sich innerhalb

Tabelle 3: Erbkrankheiten, die durch den Mangel einer einzelnen Sulfatase hervorgerufen werden.^[a]

subzelluläre Lokalisierung	Sulfatase	genetische Störung ^[b]
Lysosom	ARSA	metachromatische Leukodystrophie (MLD)
	IdoAS	Hunter-Syndrom (MPS II)
	GlcNS	Sanfilippo A (MPS IIIA)
	GlcN6S	Sanfilippo B (MPS IIIB)
	GalN6S	Morquio A (MPS IVA)
ER, Golgi	ARSB	Maroteaux-Lamy (MPS VI)
	ARSC	X-linked Ichthyose (XLI)
	ARSE	Chondrodysplasia Punctata (CDPX)

[a] Außer den Krankheiten, die durch den Mangel einer einzelnen Sulfatase hervorgerufen werden, gibt es eine seltene genetische Störung, die multiple Sulfatase-Defizienz (MSD), bei der alle Sulfatasen eine erheblich verminderte Aktivität zeigen. [b] MPS = Mucopolysaccharidose.



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 fluoreszenten Sensoren für Biomoleküle. Seither beschäftigt er sich als Postdoc bei Prof. Chi-Huey Wong am Scripps Research Institute mit der Entwicklung niedermolekularer Verbindungen, die Störungen in biologischen Systemen hervorrufen.

des ersten Drittels der N-terminalen Sequenzen bei allen bekannten hydrolytischen Sulfatasen.^[9] Die Signatursequenz I, bestehend aus den zwölf Aminosäuren C/S-X-P-S/X-R-X-X-X-L/X-T/X-G/X-R/X, ist essenziell für die posttranslationale Modifikation des anfänglichen Cysteins/Serins zum katalytisch aktiven Rest FGly.^[10,11] Der hohe Konservierungsgrad dieser Reste, belegt durch partielle Alignierung der in Abbildung 1 gezeigten Sequenzen, unterstreicht ihre spezialisierte Funktion. Mehrere dieser Reste sind bemerkenswert hoch konserviert oder konservativ substituiert. Das Kernmotiv C/S-X-P-X-R ist über die gesamte Enzymklasse vollständig konserviert. Der Argininrest in diesem Motiv hat mehrere Funktionen: 1) als Steuerelement bei der FGly-Modifizierung,^[10] 2) als integrale Komponente des aktiven Zentrums, das den FGly-Rest stabilisiert,^[12] und 3) als essenzielles Strukturelement.^[11] Der konservierte Prolinrest spielt ebenfalls eine Schlüsselrolle bei der Steuerung der FGly-Modifizierung,^[10] und man nimmt an, dass er Teil einer α -Helix ist, die FGly präzise im aktiven Zentrum ausrichtet.^[11] Interessanterweise wurden zwei Enzyme aus anderen Enzymklassen entdeckt, eine Phosphatmonoesterhydrolase (U44852) und eine alkalische Phosphatase (AF047381), die ebenfalls die Kernsequenz C/S-X-P-X-R enthalten. In Anbetracht dieser potenziellen evolutionären Verbindung^[13] dürften die alkalischen Phosphatasen diejenigen Enzyme außerhalb der Sulfataseklasse sein, die am ehesten einen FGly-Rest beherbergen könnten. Die zweite Sulfatase-Signatursequenz enthält die dodekamere Konsensussequenz G-Y/V-X-S/T-X-X-X-G-K-X-X-H. Die konservierten Lysin- und Histidinreste in diesem Motiv gehören zum aktiven Zentrum und haben eine große Bedeutung für die Sulfateterkatalyse.^[14]

3. Strukturen

Die Strukturen von vier Sulfatasen sind bislang röntgenkristallographisch gelöst worden: HARSA (2.1 Å),^[15] HARSB (2.5 Å),^[16] und HARSC (2.6 Å)^[17] aus dem Menschen sowie PARS (1.3 Å) aus dem Gram-negativen Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*.^[12] Diese Sulfatasen haben auffallend ähnliche Strukturen und erscheinen als nahezu sphärische globuläre Mo-

nomere mit einer gemischten α/β -Topologie, die wiederum in zwei Domänen unterteilt sind (Abbildung 2). Auffallend ist, dass ARSC zusätzlich eine einzigartige Transmembrandomäne enthält, aus der die lösliche Domäne „herauskeimt“, was dem Enzym eine pilzförmige Morphologie verleiht. Die größere, N-terminale Domäne besteht aus α -Helices, die ein großes gemischtes β -Faltblatt umgeben, das in HARSA, HARSB und PARS zehnsträngig und in HARSC elfsträngig ist. Die kleinere, C-terminale Domäne enthält ein viersträngiges antiparalleles β -Faltblatt, das dicht an eine lange, zum Lösungsmittel orientierte C-terminale α -Helix gepackt ist. In einer für die α/β -Enzymfamilie^[18] typischen Weise ist die Kavität des aktiven Zentrums an das C-terminale Ende des großen β -Faltblatts angeschmiegt, und der FGly-Rest befindet sich am unteren Ende eines nahegelegenen Spaltes mit

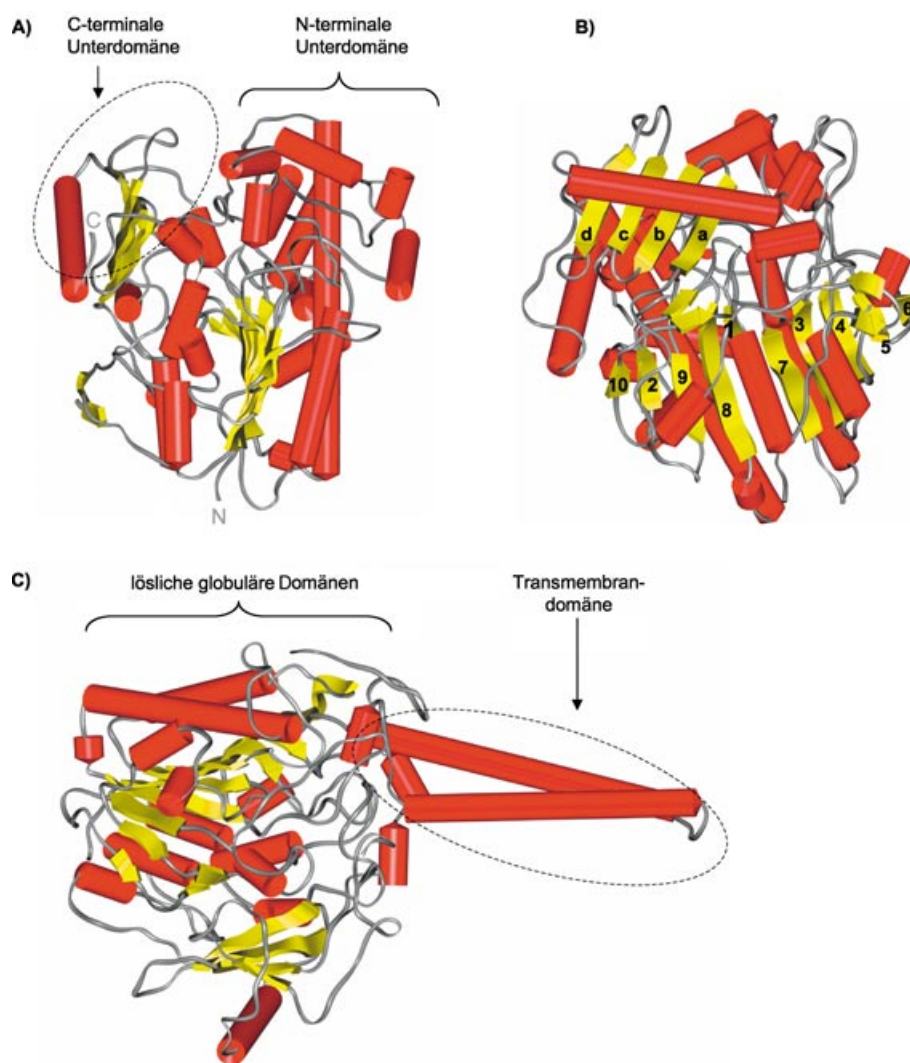


Abbildung 2. Strukturen von Sulfatasen im Kristall (rote Zylinder: α -Helices, gelbe Pfeile: β -Faltblätter). a) Struktur von PARS; charakteristisch sind zwei Subdomänen mit gemischten α/β -Topologien. b) Gleiche Struktur von PARS, um 90° gedreht; sichtbar sind die Stränge des großen β -Faltblatts innerhalb der N-terminalen Domäne (mit 1–10 nummeriert) und des kleinen β -Faltblatts innerhalb der C-terminalen Domäne (mit a–d bezeichnet). c) Struktur von HARSC; deutlich zu erkennen ist die hohe Strukturhomologie zwischen HARSC und PARS bezüglich der globulären Domänen. Das im ER befindliche Protein enthält zusätzlich eine Transmembrandomäne, bestehend aus zwei stark hydrophoben, 40 Å langen Helices.

geladenen Aminosäuren. Strukturell ähnelt die katalytische N-terminale Sulfatasedomäne stark den alkalischen Phosphatasen (APs), die Sequenzen unterscheiden sich aber drastisch.^[19] Eine Überlagerung der Strukturen von ARSA und AP ergibt 169 überlappende α -Atome, einschließlich der großen β -Faltblätter und mehrerer Reste des aktiven Zentrums; die mittlere quadratische Abweichung (rmsd) beträgt 1.9 Å. Ähnliche Ergebnisse erhält man bei der Überlagerung von HARSB und PARS.^[15]

Kristallographische Untersuchungen und Mutagenesestudien lieferten wertvolle Informationen über das aktive Zentrum der Sulfatasen (Abbildung 3). Bei jeder der bislang aufgelösten Strukturen sind die Reste im katalytischen Zentrum und dessen Geometrie bemerkenswert hoch konserviert (rmsd < 0.45 Å), was auf einen ebenfalls konservierten Mechanismus der Sulfatesterhydrolyse schließen lässt. Das

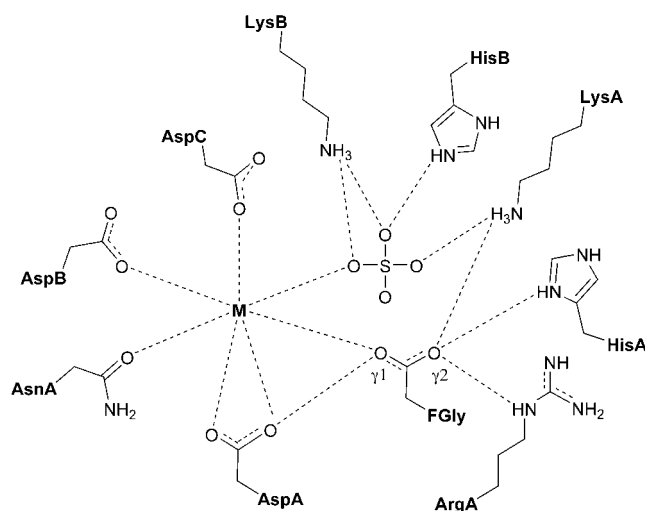


Abbildung 3. Aktives Zentrum der Sulfatasen. Aus den Kristallstrukturen geht hervor, dass die Reste im aktiven Zentrum hoch konserviert sind. Wichtige Wasserstoffbrücken sind durch gepunktete Linien markiert. Aus Gründen der Übersicht wurde auf einige Details verzichtet; nicht dargestellt sind lokalisierte Ladungen, einige Doppelbindungen und mehrere Wechselwirkungen, einschließlich einer Salzbrücke zwischen LysA und dem nichtkoordinierenden O-Atom von AspC, einer Wasserstoffbrücke zwischen Sulfat und dem Stickstoffatom in der Hauptkette von FGly und mehrerer Sulfat-FGly-Wechselwirkungen. Tabelle 4 enthält die Positionen und vermuteten Funktionen der Reste in jeder der gelösten Strukturen.

aktive Zentrum besteht aus zehn eng miteinander verknüpften polaren Resten und einem zweiwertigen Metall-Ion; die Positionen und vermutlichen Funktionen dieser Komponenten sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Im Falle von HARSA lieferte ein Mutationsexperiment zusätzliche Hinweise auf die Funktion der Reste.^[14] AspA, AspB, AspC und AsnA, das in ARSC konservativ durch ein Glutamin ersetzt ist, bilden eine metallkoordinierende Region. In HARSB, HARSC und PARS koordinieren die metallbindenden Reste zusammen mit FGly und einem Sauerstoffatom des Sulfats (oder in dessen Abwesenheit von Wasser) heptavalent ein Ca^{2+} -Ion, in HARSA wird ein Mg^{2+} -Ion oktaedrisch koordiniert. Allerdings wäre im letzteren Fall nicht auszuschließen, dass die bei der Aufreinigung des Enzyms in hohen Konzentrationen vorhandenen Magnesiumionen das native Kation ersetzt haben.^[15] Dieser Effekt wurde durch eine andere Arbeitsgruppe bei einer verfeinerten Analyse der ARSA-Struktur beobachtet.^[20] Die Mutation eines der metallbindenden Reste in HARSA führt in jedem Fall zu einer drastisch verringerten Bindungs- und Katalyseaktivität. Dies unterstreicht die zentrale Rolle, die das Metall bei der Spaltung der Sulfatester spielt; vermutet wird, dass das Metall an das Substrat bindet und es für den nucleophilen Angriff aktiviert.^[14]

Die katalytische Tasche ist mit mehreren positiv geladenen Resten ausgekleidet, darunter LysA und LysB, die an der Bindung des anionischen Sulfats beteiligt sind. Zusammen mit dem zweiwertigen Metall-Ion und HisB neutralisieren diese Reste wahrscheinlich das Sulfat-Ion und verringern dessen Elektronendichte, wodurch ein elektrophiles Schwefelzentrum entsteht. Außerdem positionieren sie das tetraedrische Sulfat für den linearen nucleophilen Angriff durch FGly.^[21] Darüber hinaus sind HisB und LysB an der Protonierung des exocyclischen Sauerstoffatoms der bei der Umesterung freigesetzten Alkoholat-Abgangsgruppe beteiligt. Der katalytische FGly-Rest befindet sich in Form eines FGly-Hydrats (FGH) am unteren Ende der Tasche. Die geminalen Diolgruppen erfüllen zwei unterschiedliche Funktionen: FGH-O γ 1, das mit dem Metallzentrum und AspA wechselwirkt, ist für den nucleophilen Angriff auf das Schwefelatom des Substrats ideal positioniert; FGH-O γ 2, das durch HisA, ArgA und LysA verankert ist und in Richtung des Zentrums der Tasche zeigt, ist an der Eliminierung der Enzym-Sulfatester-Zwischenstufe beteiligt. Die Funktionen der geminalen Hydroxygruppen werden vermutlich durch Protonen vermit-

Tabelle 4: Positionen und vermutete Funktionen der Aminosäuren und Metall-Kationen des aktiven Zentrums.

Rest ^[a]	PARS	HARSA	HARSB	HARSC	vermutete Funktion
FGly	51	69	91	75	katalytisches Nucleophil als FGH
M	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Ca^{2+}	Substratbindung und -aktivierung, Stabilisierung von FGH
AsnA	Asn 318	Asn 282	Asn 301	Gln 343	Metall-Koordination, Aktivierung von FGH
AspA	Asp 317	Asp 281	Asp 300	Asp 342	Metall-Koordination
AspB	Asp 14	Asp 30	Asp 54	Asp 36	Metall-Koordination
AspC	Asp 13	Asp 29	Asp 63	Asp 35	Metall-Koordination
ArgA	Arg 55	Arg 73	Arg 95	Arg 79	Stabilisierung von FGH
HisA	His 115	His 125	His 147	His 136	Stabilisierung von FGH, Eliminierung von FGS
HisB	His 211	His 229	His 242	His 290	Substratbindung und -aktivierung, Alkohol-Protonierung
LysA	Lys 113	Lys 123	Lys 145	Lys 134	Substratbindung und -aktivierung, Stabilisierung von FGH
LysB	Lys 375	Lys 302	Lys 318	Lys 368	Substratbindung und -aktivierung, Alkohol-Protonierung

[a] Generische Reste sind in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

telt, die sich zwischen AspA und FGly-Oy1 sowie zwischen HisA und FGly-Oy2 verschieben (siehe Abschnitt 4).

Bislang wurden keine Kristallstrukturen von Sulfatasen im Komplex mit ihren natürlichen Substraten aufgeklärt. Daher ist weitgehend unbekannt, welche Reste an der Substratspezifität beteiligt sind. Naheliegender wäre, dass die spezifische Erkennung der natürlichen Substrate außerhalb des engen Spalts mit den konservierten Resten des aktiven Zentrums stattfindet. Die Struktur im Cokristall von Cys69Ala-HARSA (einer Mutante, in der der katalytische FGly-Rest durch Alanin ersetzt ist) und *p*-Nitrocatecholsulfat (pNCS, ein allgemeines Substrat für Sulfatasen) lässt eine fest gebundene Sulfatgruppe erkennen (koordiniert durch das Metallzentrum, LysA, LysB und HisA; Abbildung 3) sowie einen hochgradig ungeordneten Phenylring außerhalb der Sulfatbindungstasche.^[21] Tatsächlich könnte die Tatsache, dass viele Sulfatasen kleine Arylsubstrate tolerieren, auch bedeuten, dass Bindungsstellen auf den Oberflächen der Enzyme zwischen großen Substraten unterscheiden und diese korrekt ausrichten, ohne den Zugang zum aktiven Zentrum zu blockieren.

Typischerweise birgt die C-terminale Region der Sulfatasen die höchste strukturelle Diversität und ist daher mit einiger Wahrscheinlichkeit für die Substratspezifität entscheidend. Interessanterweise enthalten die Sulfatasen der HSulf-Familie und HGLcN6S, die die Hydrolyse von Glucosamin-6S(GlcNAc_{6S})-Resten katalysieren, C-terminale Verlängerungen, die eine hohe Homologie zu Bereichen der GlcNAc-Transferase aus *Arabidopsis thaliana* aufweisen. Daraus lässt sich folgern, dass diese Region eine Rolle bei der Erkennung des GlcNAc-Substrats spielen könnte.^[22] Bei den membrangebundenen Sulfatasen könnte die C-terminale Region noch einen weiteren Zweck erfüllen. Laut Kristallstruktur von ARSC ist die kleine Subdomäne an mehreren wichtigen Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Schleifen und der Lipiddoppelschicht beteiligt. Die Polypeptidsegmente der Domäne könnten als „Schwingtüren“ fungieren und auf diese Weise Substrate erkennen und zum aktiven Zentrum führen, das in der Nähe der Membranoberfläche vergraben ist. Der Zugang zum aktiven Zentrum von ARSC enthält eine Vielzahl unpolarer Reste, die hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Steroidrückgrat bilden können, wenn das Sulfat im Sulfatbindungspalt entsprechend ausgerichtet ist.^[17]

4. Mechanismen

4.1. Sulfatesterhydrolyse

Das charakteristischste Merkmal der Sulfatasefamilie ist der FGly-Rest (2-Amino-3-oxypropansäure, α -Formylglycin) im aktiven Zentrum. FGly ist in den aktiven Zentren bei allen bislang charakterisierten prokaryotischen und eukaryotischen Sulfatasen vorhanden und für die katalytische Aktivität essenziell.^[23] Seine Bedeutung wurde ursprünglich durch von Figura und Mitarbeiter in Studien zur multiplen Sulfatasedefizienz (MSD) erkannt.^[7] Aus den Ergebnissen wurde der richtige Schluss gezogen, dass ein gemeinsames Struktur-

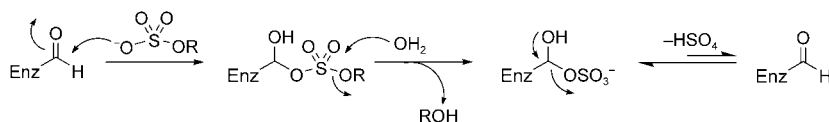
merkmal im aktiven Zentrum der Sulfatasen, das durch eine posttranslationale Modifikation erzeugt wird, bei MSD-Patienten defizient ist, was zur Inaktivierung der Sulfatasen führt.^[24] In einer bahnbrechenden Studie wurde die neuartige Aldehyd-Modifikation an der Position ausfindig gemacht, an der gemäß der cDNA in den Enzymen HARSA und HARSB ein Cysteinrest vorlag.^[25] Später wurde herausgefunden, dass es sich bei dem zu modifizierenden Rest entweder um ein Cystein in Eukaryoten^[25,26] und Prokaryoten^[27] oder um ein Serin^[28] in Prokaryoten handelt. Prokaryotische Sulfatasen sind daher in Cys- und Ser-Enzyme unterteilt.^[29–32]

Es überrascht nicht, dass der Mechanismus der Sulfatesterhydrolyse lange verborgen blieb, schließlich wusste man nicht, dass die Erzeugung des essenziellen Aldehyds im aktiven Zentrum eine posttranslationale Modifikation erfordert. Erst die Entdeckung dieser Modifikation, zusammen mit den Kristallstrukturen der Sulfatasen, ermöglichte die Aufklärung des Mechanismus.^[12,15–17] Obwohl sofort klar war, dass der FGly-Rest für die Katalyse entscheidend ist,^[25,33] war seine genaue Wirkungsweise lange Zeit Gegenstand der Diskussion.^[23] Die strukturelle Ähnlichkeit zu den alkalischen Phosphatasen lieferte erste Hinweise auf den Mechanismus der Sulfatasen, und nach der Aufklärung der ersten Sulfatasestruktur 1995 (HARSB) wurde ein Additions-Hydrolyse(AH)-Mechanismus postuliert.^[16] Wie in Schema 1a dargestellt ist, beginnt der Mechanismus mit einem nucleophilen Angriff eines Sauerstoffatoms der Sulfatgruppe an der elektrophilen Aldehydgruppe von FGly unter Bildung eines Sulfatdiesters. Das Alkohol-Konjugat wird anschließend durch ein Nucleophil, z. B. ein aktiviertes Wassermolekül, freigesetzt (ähnlich wie bei der alkalischen Phosphatase). Es wurde vorgeschlagen, dass das in der HARSB-Struktur im Kristall gefundene FGly-Sulfat-Addukt (FGS) eine stationäre Struktur des katalytischen Zyklus ist, obwohl von einem Gleichgewicht mit dem Aldehyd ausgegangen wurde.

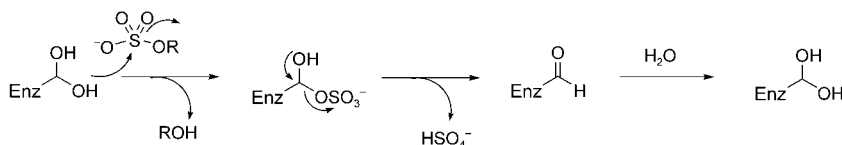
Die stationäre Struktur von HARSA wurde anders interpretiert: Hier wurde ein zweifach fehlgeordnetes Elektromomentmuster am FGly-Rest gefunden, was zu der Annahme führte, dass FGly im katalytischen Zustand als Aldehydhydrat vorliegt.^[15] Auf der Grundlage dieser Daten wurde ein Umesterungs-Eliminierungs(TE)-Mechanismus vorgestellt, demzufolge im ersten Schritt eine der geminalen Hydroxygruppen des FGly-Hydrats (FGH) als Nucleophil fungiert. Wie in Schema 1b dargestellt ist, bildet sich durch einen S_N2-Angriff auf das Sulfat-Schwefelatom unter Freisetzung von Alkohol ein kurzlebige FGS. Die zweite geminale Hydroxygruppe regeneriert den Aldehyd anschließend unter Eliminierung des Sulfats. Der katalytische Zyklus wird durch die Hydratisierung des Aldehyds unter Wiederherstellung des FGH abgeschlossen. Die Umgebung des essenziellen FGly-Restes ist in beiden Strukturen relativ schlecht aufgelöst, weshalb ein allgemeines Modell für die Sulfatesterhydrolyse noch immer Gegenstand der Debatte ist.

Der TE-Mechanismus wird durch Studien mit HARSA- und HARSB-Mutanten mit einem Serinrest anstelle von FGly gestützt. Serin-Mutanten, die [³⁵S]-*p*-Nitrocatecholsulfat ausgesetzt wurden, setzten *p*-Nitrocatechol frei, der markierte Schwefel blieb jedoch gebunden. Dagegen enthielten die Wildtyp-Enzyme nach Ende der Umsetzung keinen

a) Additions-Hydrolyse-Mechanismus



b) Umesterungs-Eliminierungs-Mechanismus



Schema 1. Vorgeschlagene Mechanismen der Sulfatesterhydrolyse durch den Aldehyd des aktiven Zentrums, FGly. a) Additions-Hydrolyse (AH)-Mechanismus, der unter der Annahme abgeleitet wurde, dass ein Sulfat-Halbacetal (FGS) ein stationärer Zustand der Kristallstruktur von HARSB ist. b) Umesterungs-Eliminierungs (TE)-Mechanismus, abgeleitet aus dem Befund, dass in der Kristallstruktur von HARSA eine hydratisierte Aldehydgruppe (FGH) vorliegt. Weitere Details finden sich im Text und in Schema 2.

markierten Schwefel.^[34] Dieser Befund beweist, dass der erste Schritt des enzymatischen TE-Mechanismus, nämlich die Umesterung des Substrats durch Serin unter Bildung einer Sulfoenzym-Zwischenstufe, ablaufen konnte, der zweite Schritt jedoch nicht. Die Serin-Mutanten waren nicht in der Lage, das Sulfat zu eliminieren, was die Bedeutung der zweiten FGH-Hydroxygruppe bei der Sulfatesterkatalyse unterstreicht. Außerdem lieferte das Experiment entscheidende Beweise gegen den AH-Mechanismus, da ein nucleophiler Angriff eines Sulfat-Sauerstoffatoms am Serin höchst unwahrscheinlich ist. Ein weiterer Beleg für den TE-Mechanismus ergab sich aus der Überlagerung von Wildtyp-HARSA mit einer Cokristallstruktur einer FGly-Alanin-HARSA-Mutante mit *p*-Nitrocatecholsulfat: Der Vergleich zeigte, dass die Sulfatgruppe für einen linearen nucleophilen Angriff durch die O_γ1-Hydroxygruppe (die 2.85 Å vom Schwefelzentrum entfernt ist) optimal positioniert ist.^[21]

Ein weiteres wichtiges Unterscheidungskriterium für die beiden Mechanismen ist die Konfiguration des chiralen Sulfats, das vom Substrat nach der Katalyse freigesetzt wird. Der TE-Mechanismus würde über eine pentagonale Zwischenstufe im S_N2-Übergangszustand zu einer Inversion der Konfiguration am Schwefelatom führen. Der AH-Mechanismus, der ohne chemische Modifikationen am Schwefelzentrum abläuft, würde dagegen in einer Sulfatgruppe mit beibehaltener Konfiguration resultieren. In einer Studie mit einem chiralen Sulfat als Substrat einer Arylsulfatase aus *Aspergillus* wurde Inversion der Konfiguration beobachtet, was ein weiterer Beleg für den TE-Mechanismus ist.^[35] Eine Reproduzierung des Experiments mit anderen, besser charakterisierten Sulfatasen steht allerdings noch aus.

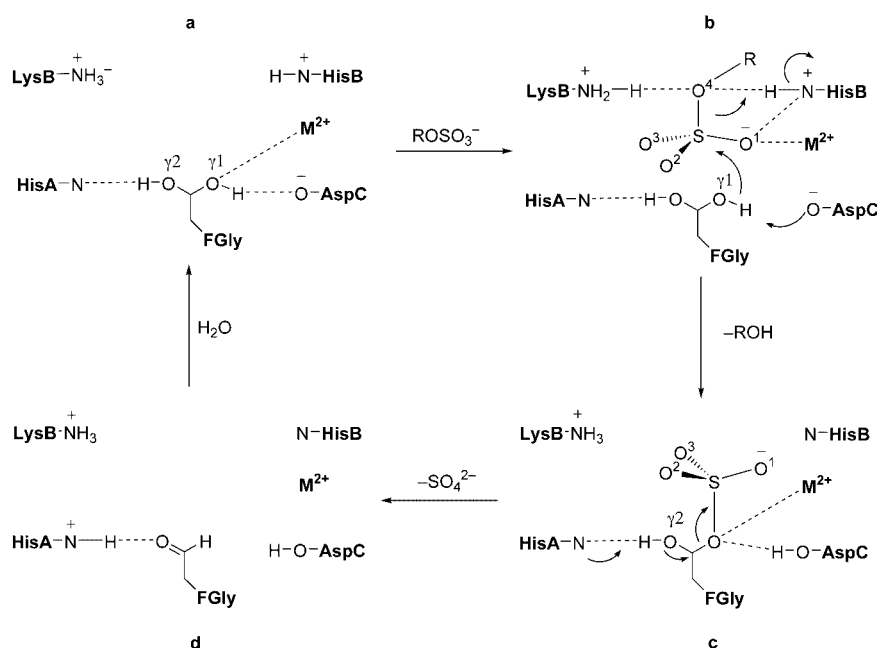
Ein besonders deutlicher Beleg für den TE-Mechanismus wurde aus der röntgenkristallographischen Aufklärung der PARS-Struktur mit 1.3 Å Auflösung abgeleitet.^[12] Die Struktur ließ erkennen, dass sich das FGly-Hydrat eindeutig in der Nähe eines koordinierten anorganischen Sulfats befindet, von

diesem jedoch unabhängig ist. Die Sulfatgruppe ist vermutlich wegen der bei der Herstellung der PARS-Kristalle verwendeten hohen exogenen Sulfatkonzentrationen präsent. Es ist wenig überraschend, dass hohe Sulfatkonzentrationen hydrolytische Sulfatasen inhibieren.^[3,5] Erneut zeigte sich, dass das Sulfat für einen nucleophilen Angriff optimal orientiert war, wobei eine Seite des Tetraeders einen Abstand von 2.96 Å zu FGH-O_γ1 einnimmt, ähnlich wie im Cokristall pNCS-Cys69Ala-HARSA.^[21] Derzeit geht man davon aus, dass die Sulfathydrolyse über den in Schema 2 dargestellten TE-Mechanismus verläuft.

Bislang wurde nicht direkt untersucht, ob der Übergangszustand der Sulfatesterhydrolyse in erster Linie assoziativ (S_N2-artig) oder dissoziativ (S_N1-artig) ist. Mehrere Studien haben ergeben, dass die Natur der Alkoholat-Abgangsgruppe von Bedeutung ist. In Studien mit bak-

teriellen Sulfatasen wurden Lineare-Freie-Energie-Beziehungen aufgestellt, die belegen, dass bessere phenolische Abgangsgruppen mit einer effektiveren Bindung und Katalyse einhergehen (siehe die Übersicht von Dodgson et al.).^[3] Diese Ergebnisse wurden durch neuere Untersuchungen zur Inhibition von ARSC mit Aryl- und Alkylsulfamaten bestätigt.^[36] Die irreversible Inhibition durch diese Verbindungen erfolgt nach dem geschwindigkeitsbestimmenden hydrolytischen Schritt; der genaue Ablauf bei der Bildung des Dead-End-Addukts ist allerdings nicht bekannt. Die Befunde zeigen, dass durch elektronenziehende Gruppen (EWGs) an der α-Position der Alkylgruppen oder an der phenolischen Kette eine viel bessere Inhibition resultiert. Auch dies belegt, dass eine besser stabilisierte Abgangsgruppe für die einleitende Hydrolyse und die folgende Inhibition wichtig ist. Dieses Verhalten spiegelt die bei den alkalischen Phosphatasen beobachteten Mechanismen wider, von denen mittlerweile bekannt ist, dass sie weitgehend dissoziativer Natur sind.^[37]

Auch die unkatalysierte Hydrolyse von Sulfateestern verläuft neueren Studien zufolge dissoziativ.^[38] Bei einem dissoziativen Übergangszustand der Sulfatesterhydrolyse würden das angreifende Nucleophil und der Schwefel eine relativ schwache Bindung bilden, und eine ausgeprägte Bindungsdissoziation zwischen der Sulfonyl- und der Abgangsgruppe würde zu einer Anhäufung negativer Ladung am Phenolat-Sauerstoffatom führen. Elektronenziehende Gruppen sollten die Delokalisierung dieser Ladung unterstützen und den dissoziativen Übergangszustand stabilisieren. Die bislang vorliegenden Ergebnisse scheinen das Modell eines dissoziativen Übergangszustands bei der Sulfatesterhydrolyse zu stützen. Dies impliziert, dass der Mechanismus hauptsächlich vom S_N1-Typ ist und vermutlich vom nucleophilen FGly-Hydrat unterstützt wird. Diese Interpretation sollte jedoch mit Vorsicht behandelt werden, da relativ wenige Studien durchgeführt wurden.



Schema 2. Der TE-Mechanismus unter Beteiligung von FGly und Resten des aktiven Zentrums, basierend auf der Kristallstruktur von PARS und Mutagenesestudien mit HARS. a) Der FGly-Rest bildet im stationären Zustand ein durch Wasserstoffbrücken stabilisiertes FGly-Hydrat (FGH). a→b: Positiv geladene Reste und das Metallzentrum binden, orientieren und aktivieren das Substrat für den nucleophilen linearen Angriff durch das geminale Hydroxy-O γ 1 des FGH, das 2.96 Å vom Schwefelzentrum entfernt ist. Die Umesterung wird durch einen Protonentransfer zwischen O γ 1 und AspC unterstützt. b→c: Eine S $_N$ 2-Substitution (durch Pfeile in (b) verdeutlicht) verläuft über eine fünffach koordinierte Zwischenstufe unter Inversion der Konfiguration am Schwefelzentrum und Freisetzung des Konjugat-Alkoholats, das ein Proton von HisB aufnimmt und aus der Tasche herausdiffundiert (LysB, O γ 2 und H $_2$ O können je nach pH-Wert ebenfalls als Protonenquellen fungieren). Die Eliminierung des Sulfat-Halbacetals (FGS) wird durch den elektronenziehenden Charakter der sulfatkoordinierenden Reste erleichtert. c→d: Die Abstrahierung des O γ 2-Protons durch HisA leitet die Eliminierung des Sulfats ein und regeneriert den Aldehyd, der anschließend zur Vollendung des katalytischen Zyklus rehydratisiert wird (d→a). Siehe Tabelle 4 für die Nummerierung der Reste und Abbildung 2 für eine schematische Darstellung der Reste des aktiven Zentrums.

4.2. Weitere Sulfatasemechanismen

Bei Prokaryoten wurden mindestens zwei weitere Mechanismen der Sulfatesterspaltung gefunden. Es wurden mehrere bakterielle Alkylsulfatasen (AlkSs) identifiziert, die die C-O(S)-Bindung von Sulfatestern spalten; damit unterscheiden sie sich von den die (C)O-S-Bindung spaltenden hydrolytischen Enzymen.^[39,40] Interessanterweise bewirken einige dieser Alkylsulfatasen eine Inversion der Konfiguration am stereogenen Kohlenstoffatom, was für einen nucleophilen Angriff an dieser Position spricht (siehe hierzu die Übersicht von Dodgson et al.^[3]). Diese Stereoinversion wurde kürzlich genutzt, um eine Methode zur Deracemisierung sekundärer Alkylsulfate zu entwickeln.^[41–43] Auch die oxidative Spaltung von Alkylsulfatgruppen zu Aldehyden und anorganischen Sulfaten wurde beschrieben.^[44–46]

Gene für C-O spaltende^[47,48] und oxidative Sulfatasen wurden kloniert.^[46] Diese zeigen erwartungsgemäß keine signifikante Sequenzhomologie zu den hydrolytischen S-O-spaltenden Sulfatasen und enthalten auch nicht die für die Bildung der FGly-Modifikation charakteristischen Konsen-

sussequenzen. Mehrere andere S-O-spaltende Alkylsulfatasen sind bekannt,^[49,50] Informationen über ihre Sequenzen sind jedoch bislang nicht verfügbar. Auch ist nicht geklärt, ob sie in einem FGly-vermittelten hydrolytischen Prozess reagieren oder ob andere Mechanismen der Sulfatesterspaltung ablaufen. Ein weiterer sulfatspaltender Mechanismus könnte bei den Arylsulfatasen aus *A. Carrageenovora* und *Campylobacter jejuni* wirksam sein.^[51,52] Diese Enzyme enthalten nicht die für die Erzeugung von FGly erforderliche Sulfatase-Konsensussequenz und weisen nur eine geringe Sequenzähnlichkeit zu den hydrolytischen Arylsulfatasen auf. Eine Aufklärung der mechanistischen Details dieser Enzyme steht noch aus.

5. Die posttranslationale FGly-Modifikation

5.1. Die Cys-FGly-Modifikation in humaner ARSA

Die katalytische Wirkung der Sulfatasen beruht auf dem FGly-Rest. Dieser wird normalerweise durch die Oxidation einer Cysteinovorstufe erzeugt, die in der codierten Peptidsequenz aller humaner Sulfatasen vorkommt. Bei multipler Sulfatasedefizienz (MSD) fehlt diese essenzielle Modifikation, was zu kategorisch inaktiven Sulfatasen und ersten klinischen Manifestationen führt.^[25] Es wurde postuliert, dass der MSD-Faktor (MSDF) auf einen Defekt in der posttranslationalen Modifikationsmaschinerie oder im FGly erzeugenden Enzym (FGE) zurückzuführen ist.^[7] Mit der Identifizierung des FGE als der ursächlichen Komponente bei MSD gelang kürzlich ein entscheidender Durchbruch.^[31,32]

Als Komponenten des sekretorischen Stoffwechselweges werden die Sulfatasen während der Proteinsynthese zum ER geleitet. Dort wird der entscheidende katalytische Rest, FGly, aus einem Cystein gebildet.^[53,54] Die mit dem zu modifizierenden Cystein beginnende autonome lineare Sequenz C-T-P-S-R-A-A-L-L-T-G-R enthält die gesamte Information, die für die Einleitung der Modifikation notwendig ist.^[10,53] Durch Mutation und Verkürzung dieser Targeting-Sequenz wurde herausgefunden, dass das Kernmotiv C(X/T)P(X/S)R die Minimalsequenz für eine moderat stattfindende Oxidation ist. Mutationen von P und R innerhalb dieses Motivs setzen die Effizienz drastisch herab, während Mutationen von T oder S (aber nicht beider Reste) toleriert werden. Von den sieben auxiliären Resten erwies sich die LTGR-Sequenz als der wichtigste, und man geht davon aus, dass sie eine Rolle bei der Molekülerkennung spielt. Abgesehen vom Cysteinrest hat somit keine Einzelmutteration eine komplett inaktivierende Wirkung.^[10,11]

In mehreren Experimenten wurde belegt, dass die Oxidation nach der Translokation zum ER und vor der Faltung

des Proteins als eine späte Co- oder Posttranslation erfolgt.^[10,11,53–55] Die Modifikation von ribosomenverknüpften naszierenden Polypeptidketten (RNCs) trat in vitro nach Translokation zu den Mikrosomen auf oder nachdem sie löslichen Extrakten aus dem ER ausgesetzt wurden. Dies belegt, dass Translokation und Exposition gegen luminalen Komponenten des ER zur Einleitung der Transformation erforderlich sind. In translokationsgehemmten RNCs mit gentechnisch erzeugten *N*-Glycosylierungsstellen wurde der FGly-Rest erst nach der Glycosylierung und der chemisch induzierten Freisetzung vom Ribosom sowie nach der Abspaltung des Signalpeptids erzeugt. Dies weist darauf hin, dass der Oxidationsschritt in einer späten cotranslationalen Phase erfolgt. Schließlich belegt der Befund, dass FGly auch in verkürzten und heterologen Protein-Konstrukten exprimiert wird, dass andere Peptidteile oder die Proteinfaltung die Umsetzung nur unwesentlich beeinflussen. Dass die Modifikation in einem weitgehend ungefalteten Stadium abläuft, wird auch dadurch belegt, dass kleine exogene Peptide, die aus der Targeting-Sequenz bestehen, die FGly-Expression in RNCs effektiv inhibieren.^[55] Auch die In-vitro-Oxidation dieser kleinen Peptide (ARSA65–80) wurde kürzlich nachgewiesen, was ein zusätzlicher Beleg für die unabhängige Wechselwirkung der linearen dirigierenden Sequenz mit dem FGE ist.^[31]

Das lange gesuchte FGE wurde kürzlich von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander entdeckt.^[31,32] Das FGE-Gen, *sumf1* (Sulfatase-modifizierender Faktor 1), codiert für ein im ER lokalisiertes Protein mit 374 Aminosäuren, das zu einer Klasse von Proteinen mit zuvor unbekannter Funktion gehört. Eine erste biochemische Charakterisierung weist darauf hin, dass SUMF1 als mischfunktionelle Oxygenase agiert, die sowohl essenziell als auch limitierend für die

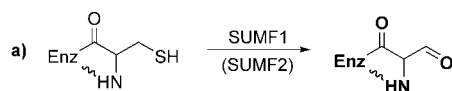
Expression aktiver Sulfatasen ist (Schema 3 a).^[31] Hoch konservierte SUMF1-Homologe wurden in vielen eukaryotischen und prokaryotischen Spezies gefunden, was in Anbetracht der Bedeutung der FGly-Modifikation nicht überrascht.^[31,32] Die katalytische und funktionale Konservierung innerhalb der FGE-Homologen wurde durch die Erzeugung aktiver humaner Sulfatasen, die mit SUMF1-cDNAs aus der Maus und aus *Drosophila* coexprimiert wurden, belegt.^[32] Anhand der Sequenzhomologie wurden auch Paraloge von SUMF1 identifiziert (als SUMF2 bezeichnet). Diese zeigen ebenfalls FGE-Aktivität, sind allerdings deutlich weniger effizient als SUMF1, und man geht davon aus, dass sie die schwache Sulfataseaktivität bei MSD bewirken.^[32]

5.2. Die FGly-Modifikation in Prokaryoten

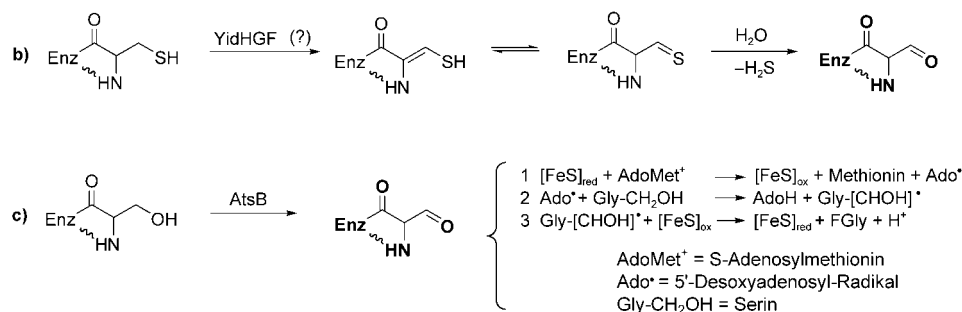
Mehrere Sulfatase-Gene wurden aus Prokaryoten kloniert und charakterisiert (Tabelle 2). Die Sequenzen haben einen hohen Grad an Übereinstimmung mit den Sequenzen eukaryotischer Sulfatasen, besonders innerhalb der FGly-Signatursequenz. Anders als bei den eukaryotischen Enzymen, die ausschließlich Cystein als ihre FGly-Vorstufe codieren, können prokaryotische Sulfatasen FGly-Reste sowohl aus Serin- wie auch aus Cysteinresten ableiten. Die Modifikation der Enzyme vom Ser-Typ und vom Cys-Typ verläuft auf unterschiedlichen Routen, und mehrere Studien haben sich der Identifizierung und Charakterisierung des zugrundeliegenden FGE gewidmet.

Das bakterielle Cys-FGE (C-FGE) ist vermutlich ein Homolog der konservierten SUMF1-Proteinfamilie, die vor kurzem in Eukaryoten entdeckt wurde (Schema 3 a).^[31,32] In einigen Bakterien wurden mutmaßliche SUMF1-Gene durch

Eukaryoten und Prokaryoten



Prokaryoten



Schema 3. Mechanismen der FGly-Bildung durch eukaryotische und prokaryotische FGly erzeugende Enzyme. Die SUMF-Gene wurden vorläufig als mischfunktionelle Oxygenasen charakterisiert; sie sind bei der Bildung der FGly-Reste aus Cysteinvorstufen in Eukaryoten essenziell (Pfad a). In Prokaryoten werden FGly-Reste durch C-FGE und S-FGE aus Cystein- bzw. Serinvorstufen erzeugt. Das C-FGE könnte vom gleichen Typ wie das eukaryotische FGE sein, es wurden jedoch auch andere Pfade vorgeschlagen (Pfad b; Einzelheiten siehe Text). Das S-FGE (Pfad c) wurde als das Eisen-Schwefel-Protein AtsB identifiziert; es katalysiert die Transformation über einen postulierten Redoxprozess, bestehend aus den Schritten 1–3.

Sequenzanalysen entdeckt, die Klonierung und Charakterisierung eines bakteriellen C-FGE ist bislang jedoch nicht gelungen. Ein Großteil der zum bakteriellen Cys-Modifikationssystem verfügbaren Informationen wurde durch die rekombinante Expression von Sulfatasen im Bakterium *E. coli* gewonnen, das keine endogene Arylsulfatase produziert.^[56] Bislang wurde aus *E. coli* keine aktive Sulfatase isoliert, jedoch wurden sowohl Cys- als auch Ser-Gene und deren mutmaßliche Aktivitäten beschrieben.^[29,57] Klar ist soweit, dass die Bakterien ein aktives C-FGE enthalten, das FGly-Reste ausschließlich aus Cystein-Vorstufen erzeugt. Die rekombinante Expression von Cys-PARS und FHS2S (Heparan-2-Sulfatase aus *Flavobacterium heparinum*) in *E. coli* führt zu aktiven Enzymen,^[27,58] wohingegen die Ser-Sulfatasen inaktiv sind.^[59,60] Ebenso entstehen durch Mutationen von PARS und FHS2S zu Ser-Enzymen inaktive Proteine.^[27,61]

Die Effizienz des C-FGE unterscheidet sich in Eukaryoten und Prokaryoten drastisch. Die Modifikation von PARS läuft in nativen und in *E.-coli*-Wirten bis zur Vollständigkeit ab.^[27] Im Unterschied dazu ist das humane FGE ein limitierender Faktor,^[62] eine effiziente Modifikation erfordert die Coüberexpression von SUMF1, und selbst dann ist die Oxidation nicht vollständig.^[31,32] Dies weist darauf hin, dass sich die C-FGEs von Bakterien und Eukaryoten grundlegend unterscheiden.

Es ist sogar möglich, dass Bakterien ein weiteres FGE enthalten, das sich von SUMF1 deutlich unterscheidet. In bioinformatischen Studien wurde ein Gencluster, *yidHGF*, in der Nähe einer vermutlichen Cys-Sulfatase, *yidJ*, in *E. coli* lokalisiert. Aufgrund der Sequenzhomologie und einem ähnlichen Mechanismus wurde postuliert, dass der Cluster die oxidative Desulfurierung der Sulfanylgruppe von Cystein zu einem Aldehyd katalysiert – analog zu der oxidativen Desaminierung von Aspartat zu Oxalacetat (Schema 3b).^[29]

Einiges mehr ist über die Ser-FGEs (S-FGEs) in Bakterien bekannt. Frühe Untersuchungen der Expression von Arylsulfatasen aus *Klebsiella pneumoniae* (KARS) zeigten, dass die Produktion eines aktiven Enzyms in *E. coli* auf die Coexpression eines benachbarten Gens, *astB*, angewiesen ist; *astB* bildet ein bicistronisches Operon mit dem KARS-Gen.^[63] Ursprünglich war man davon ausgegangen, dass AstB ein Transkriptionsfaktor oder ein positiver Regulator von KARS ist.^[64] Später erkannte man eine ausgeprägte Homologie von AstB zu den Oxidoreduktasen sowie seine essenzielle Funktion bei der Expression von FGly, was darauf hindeutete, dass es sich um das S-FGE handeln könnte.^[27,59] Dass es sich bei AstB-Homologen um mögliche S-FGEs handeln könnte, wurde auch durch den Befund belegt, dass die Ser-Sulfatase PMdS (Mucinsulfatase aus *Prevotella sp.* RS2) bei Expression in *E. coli* inaktiv ist, bei heterologer Produktion in *Bacteriosides thetaiotaomicron* aber aktiv.^[60] *B. thetaiotaomicron* enthält das Gen *chuR*, das für ein Protein mit hoher Homologie zu AstB codiert; bei Knock-out-Stämmen (d.h. Stämmen, denen dieses Gen fehlt) ist die endogene Sulfataseaktivität inhibiert.^[65] Eine Sequenzanalyse der flankierenden Regionen des PMdS-Gens brachte zum Vorschein, dass dieses ein benachbartes Gen hat, das für ein AstB-Homolog codiert. Damit lässt sich spekulieren, dass die Coexpression dieses Gens in *E. coli* aktives PMdS produzie-

ren könnte. Tatsächlich wurden bei der Sequenzanalyse mehrerer vermuteter Ser-Sulfatasen ähnliche Operons identifiziert, was dafür spricht, dass das S-FGE generell bicistronisch mit der von ihm modifizierten Sulfatase vorkommt.^[29] In jedem Fall codiert das zweite Gen für ein Eisen-Schwefel-Protein, das konservierte Cysteincluster enthält; diese wurden kürzlich mit Oxidoreduktase-Aktivitäten in Verbindung gebracht, und sie sind in der Lage, einen Serinrest zu einem Aldehyd zu oxidieren (Schema 3c).^[29,30]

Die Funktion von AstB bei der Modulation der Serin-Transformation zu FGly wurde letztlich durch Studien aufgeklärt, bei denen KARS unabhängig und mit AstB zusammenwirkend in *E. coli* exprimiert wurde.^[59] FGly wurde nur in Gegenwart von AstB gebildet. Dabei lag die Modifizierungsausbeute bei 60 %, was der Ausbeute mit nativ exprimierter KARS entspricht.^[28] Neuere Untersuchungen ergaben, dass AstB ein cytoplasmatisches Enzym ist, das Serin-abhängig direkte Wechselwirkungen mit der für das FGly-Targeting entscheidenden Signatursequenz der Sulfatase eingeht. Daher wurde postuliert, dass AstB die Transformation über seine Oxidoreduktase-Aktivität katalysiert (Schema 3c).^[30] Die Transformation wird durch ein Signalpeptid erleichtert, das die Translokation des Proteins in das Periplasma begünstigt. Das Entfernen dieser Sequenz vermindert drastisch die Effizienz von periplasmatischem KARS. Eine mutante Ser-PARS führte die FGly-Transformation nur dann aus, wenn das Enzym rekombinant mit der KARS-Signalsequenz versehen wurde.^[28] Alle bekannten und mehrere vermutete Ser-Sulfatasen enthalten N-terminale Signalpeptide, die das Enzym in das Periplasma dirigieren; demgegenüber sind die meisten Cys-Sulfatasen im Cytoplasma lokalisiert.^[29]

Dass in Bakterien die posttranslationale Transformation von Cystein und Serin zu FGly über separate Mechanismen verläuft, ist überraschend, da die Sequenzen in der Umgebung der FGly-Vorstufen weitgehend identisch sind.^[29] Einer frühen Theorie zufolge unterscheiden die Enzyme nicht auf der Grundlage von Bindungsprozessen zwischen den nahezu identischen Targeting-Sequenzen, sondern greifen auf spezifische katalytische Domänen zurück, die Cystein und Serin zu FGly oxidieren.^[59] Tatsächlich wurde bei der Aufreinigung des Säuger-FGE (Cys-Typ) eine Bindungsmatrix genutzt, die die Ser-Targetingsequenz enthält.^[31] Auch die subzelluläre Verteilung hat offenbar einen Einfluss darauf, welches FGE in Bakterien aktiv ist. Die periplasmatische Targetingsequenz vermittelt das Zusammenwirken von Ser-Sulfatase und S-FGE, möglicherweise sind aber noch weitere translokationale Komponenten beteiligt.^[30]

6. Substrate und biologische Funktionen eukaryotischer Sulfatasen

Viele eukaryotische Sulfatasen wurden ursprünglich anhand ihrer enzymatischen Aktivität gegen kleine aromatische Sulfate wie *para*-Nitrophenolsulfat (pNPS), *para*-Nitrocatecholsulfat (pNCS) und 4-Methylumbelliferonsulfat (4MUS) identifiziert. Diese Aktivität führte zu einer langwährenden Fehlinterpretation der physiologischen Funktion von Sulfatasen, dient aber heute zur Einteilung von Sulfata-

sen in ARS- und Nicht-ARS-Typen.^[4,5] Beide Enzymtypen sind aktiv gegen Arylsubstrate, der ARS-Typ zeigt jedoch weit höhere Hydrolysegeschwindigkeiten. Zu den natürlichen Substraten humaner Sulfatasen gehören Steroidsulfate und eine Vielzahl sulfonierter Kohlenhydrate, darunter Monosaccharide, Oligosaccharide, Proteoglycane und Glycolipide (Tabelle 1). Wie aus Tabelle 5 hervorgeht, haben die Enzyme trotz ihrer unspezifischen Aktivität gegen Arylsubstrate eine hohe Spezifität für ihre biologischen Substrate.

Humane Sulfatasen wurden an mehreren subzellulären Stellen lokalisiert. Sie üben Schlüsselfunktionen bei wichtigen

biologischen Prozessen aus, z. B. bei der Hormonsynthese im ER, beim Abbau von Glycosaminoglycanen und Glycolipiden im Lysosom und bei der Modulation der Stammzellsignalisierung in der ECM. Mehrere andere humane Sulfatasen wurden identifiziert, ihre biologischen Funktionen sind jedoch unbekannt. Eventuell sind diese Enzyme an der Desulfonierung anderer wichtiger Biomoleküle wie Sialyl-Lewis^x-6S (sLe^x-6S) und Tyrosin-*O*-sulfat beteiligt. Sulfatasen von Wirbellosen und niederen Eukaryoten sind weitgehend unerforscht. Mehrere Gene wurden kloniert (Tabelle 2), und in einigen Fällen konnte eine Aktivität zugeordnet

werden; Beispiele umfassen eine Funktion bei der Entwicklung von Seeigelembryos, die Inaktivierung endogener Pflanzentoxine und eine Beteiligung am Schwefelmetabolismus in Algen und Pilzen.

6.1. Lysosomale Sulfatasen

Lysosomale Sulfatasen waren die ersten Sulfatasen, die mit physiologischen Funktionen in Verbindung gebracht wurden. Unter den humanen Sulfatasen sind sie am besten charakterisiert. Es sind ubiquitäre Enzyme, die im sekretorischen Stoffwechsel synthetisiert und über den Mannose-6-phosphat-Rezeptor-Pfad in das Lysosom gelenkt werden.^[66] Wie für Proteine mit dieser subzellulären Lokalisierung charakteristisch, liegt ihr pH-Optimum im sauren Bereich (Tabelle 5). Außerdem weisen sie eine hervorragende Substratspezifität auf und haben eine geringe funktionale Redundanz. Die katalytische Desulfonierung ist für den Katabolismus mehrere sulfathaltiger Metaboliten mit essenziell. Man kennt sechs physiologische Störungen beim Menschen, die aus der Akkumulation toxischer Mengen von nichtabbaubaren sulfatierten Verbindungen infolge defizienter lysosomaler Sulfatasen resultieren (Tabelle 3).^[24] Wegen ihrer Rolle bei bestimmten Krankheiten wurden viele Humangenom, die für lysosomale Proteine codieren,^[2,67–72] kloniert und charakterisiert.^[1,7,8]

Wie in Tabelle 5 gezeigt ist, hydrolysiert ARSA eine Reihe sulfatierter Substrate;^[73,74] die wichtigsten physiologischen Substrate sind Sulfatide, insbesondere Sphin-

Tabelle 5: Katalytische Eigenschaften humaner Sulfatasen.

Enzym	Substrat ^[a]	Geschwindigkeit ^[b]	K_m ^[c]	pH-Optimum	Lit.
ARSA	4MUS	40 000	12 500	5.7	[73, 74]
	pNCS	160 000	400	5.5	
	Ascorbinsäure-2S	85 000	2800	4.8	
	Cerebrosid-3S	6600	105	4.5	
	Seminolipid-3S	5000	180	4.5	
	Psychosin-3S	3000	200	4.5	
	Tyrosin-S	6700	3500	5.5	
ARSB	4MUS	48 500	1180	5.6	[74, 89, 94]
	GalN_{4S}-(CS/DS)*	2000	60	5.6	
	Tyrosin-S	871	< 300 000	5.5	
ARSC	4MUS	7000	800	7.0	[122]
	pNPS	4000	400	7.0	
	Östron-S	2900	0.8	7.0	
	Pregnenolon-S	1600	0.6	7.0	
	Cholesterin-S	1400	2	7.0	
	DHEA-S	1000	1.7	7.0	
	Testosteron-S	1	40	7.0	
	Vitamin-D3-S	< 1	N/A	7.0	
ARSD	4MUS	n.d.		7.0	[129]
ARSE	4MUS	663		7.0	[129, 130]
ARSF	4MUS	1356		7.0	[129]
ARSG	4MUS	n.d.		7.0	[133]
GalN6S	4MUS	120	4400	4.7	[88, 89]
	GalNAc_{6S}-(CS)*	1990	15	4.0	
	Gal_{6S}-(KS)*	100	50	4.0	
GlcN5	4MUS	114	4800	5.4	[95]
	GalN₅-(HS)*	930	10.3	5.6	
	GalN ₅ -IdoA _{2S}	60	4.1	3.8	
	GalN ₅	0.04	0.7	5.6	
GlcN6S	4MUS	10	5800	5.2	[70, 95]
	GlcNAc_{6S}-(HS)*	218	0.25	4.1	
	GlcNAc_{6S}-(KS)*	4.5	1	3.9	
	GlcNAc _{6S}	1.6	7.1	5.7	
IdoA2S	4MUS	300	12 400	5.6	[89, 96]
	IdoA_{2S}-(HS)*	3400	3	4.5	
Sulf-1	4MUS	1000–2000		7.5	[22]
	GlcN_{6S} (endo)	0.088		7.5	
Sulf-2	4MUS	1000–2000		7.5	[22]
	GlcN_{6S} (endo)	0.097		7.5	

[a] Physiologische Substrate sind fett gedruckt. Sterne markieren Aktivität am nichtreduzierenden Ende des Glycosaminoglycans (in Klammern). [b] Geschwindigkeit in nmol Substrat pro min pro mg Enzym. n.d. = keine detektierbare Aktivität. [c] Werte in μ M.

golipide mit Galactose-3S(Gal-3S)-Kopfgruppen.^[75,76] Ascorbinsäure-2S ist vermutlich ebenfalls ein natürliches Substrat.^[77] ARSA wurde mit der Erbkrankheit Metochromatische Leukodystrophie (MLD) in Verbindung gebracht, die durch einen hochgradigen Abbau von Myelin im Nervensystem gekennzeichnet ist.^[7] Dies ist die Folge eines fehlerhaften Katabolismus von Sulfatidcerebrosid-3S (**1**, Abbildung 4),

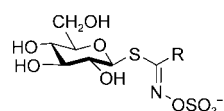
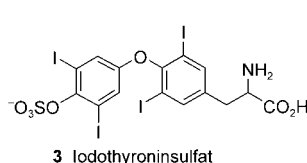
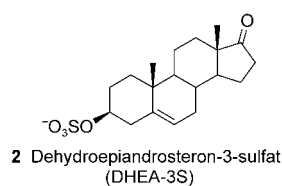
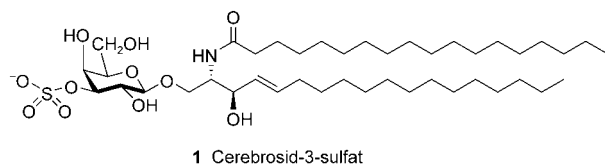


Abbildung 4. Repräsentative Substrate für Sulfatasen. Cerebrosid-3S (**1**) ist ein physiologisches Substrat für ARSA, DHEA-3S (**2**) ein natürliches Substrat für ARSC. Iodothyroninsulfat (**3**) ist ein mögliches Substrat für eine der ER-Sulfatasen, Glucosinolate (**4**) sind Substrate für PGSS.

einer der Hauptstrukturkomponenten der Myelinscheide. Die Spaltung des Cerebrosid-3S-esters *in vivo* benötigt das lösungsvermittelnde Agens Sphingolipid-Aktivatorprotein B (sapB), das vor der Hydrolyse durch ARSA einen 1:1-Komplex mit dem Substrat bildet.^[78] Neuere Befunde weisen darauf hin, dass ARSA auch in nichtlysosomalen Umgebungen eine Rolle spielt. Es wurde auf Spermienoberflächen gefunden und adhärert vermutlich an sulfatierte Ovarien-Glycoproteine, sodass es bestimmte Schritte im Befruchtungsprozess steuert.^[79–82]

Die humanen lysosomalen Sulfatasen ARSB, GalN6S, GalN3S, GlcN6S, GlcA2S, GlcNS und IdoA2S wurden intensiv untersucht. Sie spielen eine Rolle bei Mucopolysaccharidosen (MPSs), einer Gruppe lysosomaler Speicherkrankheiten, die durch einen gestörten GAG-Katabolismus verursacht werden (Tabelle 3).^[1] Glycosaminoglycane bestehen aus langen Ketten von Disaccharid-Wiederholungseinheiten, die aus Uronsäure(U)- und Hexosamin-Zuckern (H) aufgebaut sind. Diese Ketten sind hochgradig polydispers wegen ihrer variablen Länge, glycosidischen Verknüpfungen, Epimerisierung, N-Acetylierung und des Grads an O- und N-Sulfatierung (Abbildung 5).^[83,84] In Tabelle 1 sind Substrate für die

GAG	Disaccharideinheit	H	U	Modifikationen
Heparin und Heparansulfat	$H_{2N\text{Y},5X,3X}-(\alpha 1,4)-U_{2X}-(\alpha/\beta 1,4)$	GlcN	GlcA IdoA	N-Sulfonierung N-Desacetylierung O-Sulfonierung C5-Epimerisierung
Chondroitin- und Dermatsulfat	$H_{2N\text{AC},4X,5X}-(\beta 1,4)-U_{2X}-(\alpha/\beta 1,3)$	GalN	GlcA IdoA	O-Sulfonierung C5-Epimerisierung
Keratansulfat	$H_{2N\text{AC},6X}-(\beta 1,3)-\text{Gal}_{6X}-(\beta 1,4)$	GlcN	Gal	O-Sulfonierung

repräsentative Monosaccharideinheiten			
D-Glucosamin (GlcN)	D-Galactosamin (GalN)	D-Glucuronsäure (GlcA)	L-Iduronsäure (IdoA)

Abbildung 5. GAG-Disaccharideinheiten mit ihren Modifikationsstellen. Glycosaminoglycane sind polydisperse Makromoleküle aus unverzweigten Uronsäure(U)- und Hexosamin(H)-Disaccharideinheiten. Die GAG-Sulfatester werden in drei Hauptklassen eingeteilt, die sich in erster Linie durch die Identität und Verknüpfung der Zuckerreste unterscheiden; Beispiele sind Heparansulfat (HS) und Heparinsulfat (HSCAG, das im Allgemeinen mehr Sulfatreste als HS enthält), Keratansulfat (KS) sowie Chondroitin- und Dermatsulfat (CS und DS). Die Disaccharideinheiten können mehrfach modifiziert werden, etwa durch C5-Epimerisierung der GlcA-Reste zu IdoA, N-Acetylierungen sowie O- und N-Sulfonierungen. Tiefgestellte Symbole bezeichnen sulfatierte oder unsubstituierte Positionen (X) sowie sulfatierte, acetylierte oder unsubstituierte Positionen (Y).

unterschiedlichen lysosomalen Sulfatasen aufgeführt, von denen die meisten nach ihrer Restespezifität innerhalb der GAG-Kette benannt sind. Ausnahmen bilden ARSB, Heparan-N-Sulfatase und Galactosamin-6-Sulfatase. Von der ursprünglich als generische Arylsulfatase angesehenen ARSB^[85] ist heute bekannt, dass sie Sulfatester spezifisch an der 4-Position von N-Acetylgalactosamin(GalNAc)-Resten in Dermatsulfat (DS) und Chondroitinsulfat (CS) spaltet.^[86,87] Die Heparan-N-Sulfatase (GlcNS) katalysiert die Hydrolyse N-verknüpfter Sulfamate an Glucosaminresten in Heparin und Heparansulfat (HS).^[62] GalN6S, die ihren Namen der Eigenschaft verdankt, GalNAc_{6S}-Reste von DS und CS zu hydrolysieren, katalysiert auch die Hydrolyse von Galactose-6S(Gal_{6S})-Resten in Keratansulfat (KS).^[88,89]

Am Abbaustoffwechsel im Lysosom sind Sulfatasen und Glycosidasen beteiligt, die die GAG-Strukturen sequenziell von den nichtreduzierenden Enden her abbauen.^[90] In Abbildung 6 sind einige Glycosaminoglycane und ihre Angriffspunkte für die Sulfatesterspaltung (Pfeile) durch lysosomale Sulfatasen abgebildet. Die lysosomalen Sulfatasen bauen die Glycosaminoglycane exoenzymatisch ab, was bedeutet, dass die spezifischen Reste am nichtreduzierenden Terminus durch eine Glycosidase exponiert werden müssen. Die Glycosidasen wiederum können den nächsten Abbauschritt erst vollziehen, wenn der nichtreduzierende Rest desulfoniert wurde. Tabelle 5 enthält kinetische Parameter für bekannte Substrat-Sulfatase-Kombinationen.^[91–96]

Sulfs, aber um mehr als eine Größenordnung schneller sind als Nicht-Sulfs (Tabelle 5). Die hohe Sequenzübereinstimmung mit lysosomaler GlcN6S und die Schlüsselsignalmodulation durch GlcN_{6S}-Reste von HS ließen den Schluss zu, dass die Sulfs gegen diese Substrate aktiv sind. Tatsächlich wurde eine solche Aktivität beobachtet. Die Sulfs sind endoaktiv bei neutralem pH-Wert (Tabelle 5). In biochemischen Untersuchungen an Menschen- und Wachtelenzymen wurde eine funktionale Selektivität für eine Untergruppe von 6-O-Sulfatresten in HS entdeckt (für das dreifach sulfatierte Motiv IdoA_{2S}-GlcN_{6S} und die zweifach sulfatierte GlcA-GlcN_{6S}-Disaccharideinheit).^[97,99] Die IdoA_{2S}-GlcN_{6S}-Sequenz spielt eine Rolle bei der Bindung von FGF und der Dimerisierung des FGF-abhängigen Rezeptors,^[109,110] weshalb man erwarten würde, dass eine Desulfonierung durch ein Sulf-Enzym diese Prozesse negativ reguliert. Eine genauere Aufklärung dieser Zusammenhänge steht jedoch noch aus.

Wachstumsfaktoren wie FGF und Morphogene wie Wnt wurden mit pathophysiologischen Prozessen wie der Entstehung und dem Wachstum von Tumoren in Verbindung gebracht.^[111] Die Beteiligung dieser Faktoren an normalen und pathogenen Prozessen wird durch die HSPGs reguliert, die an die Moleküle binden und ihre Aktivität modulieren.^[112] Da die Sulfs eine entscheidende Rolle bei der Regulierung dieser Bindungsereignisse spielen, könnten sie an der Deregulierung bei Krankheitszuständen wie Krebs beteiligt sein. Dies macht sie zu Kandidaten für künftige therapeutische Interventionen.

Es wurde gefunden, dass Sulfatasen bei der Entwicklung von Seeigelembryos eine Rolle spielen, eine direkte Beteiligung an der Zellsignalisierung wurde bislang aber nicht nachgewiesen. Drei sehr ähnliche ARS-Gene, die aus den Seeigelspezies *Hemicentrotus pulcherrimus*, *Strongylocentrotus purpuratus* und *Heliocidaris erythrogramma* kloniert wurden (Tabelle 2), sind während der Embryose in einer vom Entwicklungsstadium der Zelle abhängigen Weise auf den Zelloberflächen lokalisiert.^[113–115] Ihre Expression fällt mit wichtigen Zelldifferenzierungsereignissen zusammen.^[116,117] Es wird vermutet, dass sulfonierte Proteoglycane die Substrate dieser extrazellulären Arylsulfatasen sind.^[118] Der Seeigel dient seit langer Zeit als Modellsystem zur Untersuchung der embryonalen Musterbildung,^[119] und es könnte sich lohnen, eine mögliche Rolle der Seeigel-Arylsulfatasen in der HS-basierten Signalgebung zu untersuchen.

6.3. Steroid-Sulfatase

Der Steroidhormonspiegel wird teilweise durch die mikrosomale Sulfatase ARSC, allgemein bekannt als Steroid-sulfatase (STS), moduliert.^[120] ARSC ist ein ubiquitär exprimiertes membrangebundenes Protein, das primär im rauen ER lokalisiert ist.^[121] Es hat ein pH-Optimum im Neutralen und prozessiert effizient mehrere Aryl- und Steroidsulfs (Tabelle 5).^[122] Die stark unterschiedlichen Strukturen der durch ARSC hydrolysierten Substrate warfen die Frage auf, ob mehrere ARSC-Isoformen oder sogar unterschiedliche Enzyme an der Prozessierung beteiligt sind. Mehrere Studien deuten aber überzeugend darauf hin, dass nur ein einziges

ARSC-Protein existiert, das eine Bandbreite von Steroidsulfaten hydrolysieren kann.^[6] ARSC setzt systemische Steroidvorstufen aus inaktiven 3-O-Sulfatkonjugaten wie Östron- und Dehydroepiandrosteronsulfat (**2**, Abbildung 4) frei, die dann in hormongesteuerte Signalgebungsprozesse eingreifen.^[123] Eine Hochregulierung der ARSC-Aktivität wurde mit hormonabhängigem Brustkrebs in Verbindung gebracht,^[124–126] bei der Erbkrankheit X-linked Ichthyose (XLI) wurde hingegen Enzymdefizienz beobachtet.^[6] Die Beteiligung an Brustkrebs macht ARSC zu einem interessanten Target für niedermolekulare Therapeutika (siehe Abschnitt 8).^[127,128]

6.4. Sulfatasen des ER und des Golgi-Systems

Mehrere neue humane Sulfatasen wurden kürzlich beschrieben, darunter die ARSD-, ARSE- und ARSF-Gene. Diese wurden in einem Positionsklonierungsexperiment isoliert, das zum Ziel hatte, die für die kongenitale Krankheit Chondrodysplasia Punctata (CDPX) ursächlichen Gene zu kartieren.^[129,130] Die Gene befinden sich zusammen mit ARSC als Cluster auf dem distalen kurzen Arm des X-Chromosoms (Xp22.3) und sind genomisch ähnlich organisiert, was auf ein evolutionäres Duplikationsereignis hinweist.^[131,132] Eine weitere Sulfatase, ARSG, wurde kürzlich bei bioinformatischen Suchen identifiziert und ebenfalls kloniert.^[133] Diese vier neu entdeckten Gene codieren für membrangebundene Sulfatasen des ER und des Golgi-Systems mit einem pH-Optimum im Neutralen. Sie wurden anhand ihrer zu bekannten Arylsulfatasen ähnlichen Strukturen in die ARS-Familie eingeordnet, wenngleich nur ARSE und ARSF gegen aromatische Substrate aktiv sind.^[130,133–135] Die natürlichen Substrate dieser Sulfatasen sind bislang unbekannt.

CDPX wird durch eine ARSE-Defizienz verursacht (Tabelle 3).^[134,136] Interessanterweise wird ARSE durch Warfarin inhibiert, den Auslöser von Warfarin-Embryopathie, deren klinisches Erscheinungsbild dem von CDPX auffallend ähnelt.^[129,130] Beide Erkrankungen äußern sich in Knochen- und Knorpeldysplasien, was dafür spricht, dass ARSE eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung dieser Gewebe spielt.^[6,137] Aufgrund der subzellulären Lokalisierung von ARSE und der Tatsache, dass Glycosaminoglycane eine entscheidende Funktion in der Knochen- und Knorpelentwicklung haben, kann spekuliert werden, dass ARSE zusammen mit anderen anabolischen Enzymen des Golgi-Netzwerks an der Bildung von Glycosaminoglycanen und Zelloberflächen-HSPGs beteiligt ist.^[138–140]

Ein potenzielles Substrat der ER-Sulfatasen ist Iodthyroninsulfat (**3**, Abbildung 4). Neueren Studien zufolge könnte die biologische Aktivität des Thyroidhormons durch Sulfonierung moduliert werden.^[141] Es wurde ein reversibler Sulfonierungsweg vorgeschlagen, nach dem Sulfatase inaktive sulfonierte Konjugate in aktive Thyroide umwandelt.^[142,143] Der Steroidhormonregulator ARSC kann Iodthyroninsulfat hydrolysieren, aktuelle Arbeiten zeigen aber auch, dass die Hydrolyse in erster Linie durch eine oder eventuell mehrere Sulfatasen aus humanen Lebermikrosomen, die sich bioche-

misch von ARSC unterscheiden, erfolgt.^[142,144] ARSD hat ein ähnliches Genexpressionsmuster wie ARSC und kommt daher ebenfalls als aktive Sulfatase für Iodthyroninsulfat infrage.

6.5. Sulfatasen von Wirbellosen und niederen Eukaryoten

Nur wenige Sulfatasen von Wirbellosen sind charakterisiert worden. Identifiziert wurden Sulfatasen in einigen Gastropoden und Echinodermen (unter anderem Arylsulfatasen im Seeigel), es gilt aber als sehr wahrscheinlich, dass es noch viele weitere Sulfatasen gibt und dass diese analoge Funktionen wie in Wirbeltieren haben.^[3,145–151] Beobachtungen deuten darüber hinaus auf besondere Funktionen von Sulfatasen in Wirbellosen hin. So wurde z.B. aus *Plutella xylostella* (der Kohlmotte) eine einzigartige Sulfatase isoliert. Kohlmotten können sich von Kreuzblütlern ernähren, indem sie einen pflanzeigenen Abwehrmechanismus umgehen, der auf der Freisetzung von toxischen Isothiocyanaten, Nitrilen und Thiocyanaten aus einer Glucosinolatsulfat(GS)-Vorstufe beruht (siehe 4, Abbildung 4).^[152] Die Resistenz geht auf die Wirkung einer Glucosinolat-Sulfatase (GSS) zurück, die mehrere Glucosinolatsulfate zu harmlosen Nebenprodukten desulfoniert. Das GSS-Gen wurde bisher in anderen Schädlingen noch nicht formal identifiziert, jedoch kennt man eine GSS- und ARS-Aktivität in *Helix pomatia*, der gemeinen Weinbergschnecke.^[153,154] Ein Gen und ein Teil-Gen (*HpSulf1* und *HpSulf2*, die keine bekannte Verbindung zu den an der Signalgebung beteiligten Sulf-Enzymen haben) wurden kürzlich aus *Helix pomatia* kloniert, doch keines der beiden scheint für das GSS-Enzym zu codieren.^[155] Als ein bei Schädlingen möglicherweise verbreitetes Enzym wäre die GSS-Sulfatase ein potenzielles Target für Pestizide.

In mehreren niederen eukaryotischen Organismen wurde Sulfataseaktivität nachgewiesen,^[156,157] außerdem wurden drei Arylsulfatasen aus Pilzen^[158] und Algen kloniert und teilweise charakterisiert (Tabelle 2).^[159–161] Die Enzyme werden bei einer Schwefelunterversorgung hochreguliert, und man geht davon aus, dass sie eine Rolle bei der Bereitstellung von Schwefel spielen. Beispielsweise ist bekannt, dass NARS und die Cholinsulfatase (ChoS) aus dem Fadenpilz *Neurospora crassa* unter schwefelarmen Bedingungen Tyrosin-O-sulfat und Cholin-O-sulfat hydrolysieren.^[162,163] Unabhängig von der Verfügbarkeit von Schwefel ist NARS während der Keimung 30mal aktiver, was auf eine Funktion bei der Organismusentwicklung hindeutet.^[164]

7. Substrate und biologische Funktionen prokaryotischer Sulfatasen

In vielen Bakterienarten wurden hohe ARS-, Alkylsulfatase- und Glycosulfatase-Aktivitäten nachgewiesen,^[3,50] jedoch wurden nur einige wenige bakterielle Sulfatasen kloniert und charakterisiert (Tabelle 2). Die Aufgabe dieser Enzyme besteht typischerweise darin, Sulfatgruppen von exogenen Substraten abzuspalten und als Schwefel- und Kohlenstoffquellen bereitzustellen.^[3] Neuere Untersuchun-

gen haben weitere Funktionen bei der Osmoprotektion und in pathogenen Prozessen aufgedeckt.

7.1. Sulfatverwertung in Bakterien

Eine ARS-Aktivität wurde in mehreren Enterobakterien nachgewiesen (*Klebsiella*,^[63,165] *Salmonella*,^[166,167] *Proteus*,^[146,168] *Pseudomonas*,^[169] *Serratia*^[170]) sowie in aquatischen Bakterien (*Alteromonas*),^[52] in pathogenen Bakterien (*Mycobacteria*,^[171,172] *Pseudomonas*^[173,174]), in extremophilen Bakterien (*Plectonema*)^[175] und in Bodenbakterien (*Comamonas*^[176] und *Pseudomonas*^[176]). Die meisten der bakteriellen ARS-Enzyme werden bei einer Schwefel-Unterversorgung hochreguliert, was auf eine Funktion bei der Bereitstellung von Schwefel hinweist.^[3,50] Ihre bevorzugten Substrate sind nicht bekannt, vermutet werden sulfatierte Kohlenhydrate. Am gründlichsten charakterisiert wurden ARS-Enzyme aus *Pseudomonas aeruginosa*^[173] und *Klebsiella pneumoniae*^[63] (früher als *Klebsiella aerogenes* und *Aerobacter aerogenes* klassifiziert). Frühe Studien dieser Enzyme konzentrierten sich auf die genetische Induktion unter schwefelarmen Bedingungen, und in neueren Arbeiten wurde die Beteiligung von KARS am Sulfattransport untersucht.^[50,177] Die Untersuchungen von PARS und KARS lieferten wertvolle mechanistische und Strukturinformationen über die gesamte Klasse der Sulfatasen.^[12,27,59]

Eine besondere Funktion als osmoprotektorisches Enzym wurde bei der Cholin-O-Sulfatase (ChoS) ausgemacht, einer gemeinhin als Sulfat-Scavenger angesehenen Alkylsulfatase, die in erster Linie am Abbau von Cholinsulfat zu Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefelquellen beteiligt ist.^[178–181] Das *bet*-Operon in dem Rhizobakterium *Sinhorhizobium meliloti* codiert für mehrere Enzyme, die die Synthese von Glycinbetain steuern, einem verbreiteten bakteriellen Osmoprotektanten.^[182] In einem Klonierungsschema für dieses Operon wurde überraschenderweise ein ChoS-Homologes isoliert, was darauf hindeutet, dass das ChoS-Enzym zwei Funktionen ausüben könnte, nämlich bei der Assimilierung von Nährstoffen bei Bedarf und bei der Synthese von Osmolyten zum Schutz des Wirtsorganismus.^[181]

7.2. Glycosaminoglycan abbauende Sulfatasen

Schon lange ist bekannt, dass Bakterien alleine durch Aufnahme von Glycosaminoglycanen überleben können.^[3] Früh wurde auch erkannt, dass die bakteriellen Abbau-Stoffwechselwege zur Aufklärung der komplexen Natur von Glycosaminoglycanen genutzt werden können, sodass man einen erheblichen Aufwand in die Charakterisierung mehrerer Enzyme aus *Proteus vulgaris*, *Bacteriosides theitomicron* und *Flavobacterium heparinum* investiert hat (Tabelle 6). Ein großer Teil der Forschungen zu GAG-abbauenden Enzymen hat sich auf bakterielle Lyasen konzentriert,^[183–185] aber auch Sulfatasen wurden charakterisiert.^[3,50] Generell wird der Abbau durch mehrere spezielle Lyasen eingeleitet, die die Glycosaminoglycane an der Hexosamin-Uronat(H-U)-Verknüpfung über einen Eliminierungsmechanismus spalten. Es

Tabelle 6: Am Abbau von Glycosaminoglycanen beteiligte bakterielle Sulfatasen.

Organismus	GAG	Sulfatase ^[a]	Reste-Spezifität ^[b]	pH-Optimum	K _m [μM]	Stelle, Typ der Spaltung	Lit.
<i>Flavobacterium heparinum</i>	HS	HS2S	dU _{2S} -GlcN ₅	6.5	1060	nichtreduzierendes Ende, Exo	[58, 186]
			dU _{2S} -GlcNS _{6S}		87		
			dU _{2S} -GlcNAC _{6S}		515		
		HS3S	GlcNAC _{3S}	8.0	42	Monosaccharid	[186]
			GlcNS _{3S}	7.5			
		HS6S	GlcN _{5S}	7.5	1350	Monosaccharid	[187]
			GlcN _{5S}		16		
			GlcNAC _{6S}		54		
		HSNS	GlcN ₅	7.0	8.3	Monosaccharid	[189]
<i>Flavobacterium heparinum</i>	CS	CS2S	dU2S-GlcNAC _{6S}	> 10000	nichtreduzierendes Ende, Exo	[58, 192, 195]	
		CS4S*					
		CS6S*					
<i>Bacteriosides thetaiotaomicron</i>	CS	CS4S	dU-GlcNAC _{4S}	7.0			[191]
		CS6S	dU-GlcNAC _{6S}				
<i>Proteus vulgaris</i>	CS	CS4S	dU-GlcNAC _{4S}			reduzierendes Ende, Endo, Exo	[192]
		CS6S	dU-GlcNAC _{6S}			reduzierendes Ende, Exo	

[a] Mit einem Stern gekennzeichnete Enzyme wurden nachgewiesen, aber nicht isoliert. [b] Sulfatreste, für die das Enzym spezifisch ist, sind fett gedruckt.

resultieren Δ4,5-U-H(dU-H)-Disaccharid-Einheiten, wobei die stereochemische Information, die den Unterschied zwischen IdA und GlcA ausmacht, bei der Bildung der dU-Einheit verlorengeht.^[183] Anschließend desulfonieren die Sulfatasen diese Einheiten in einer vom Glycosaminoglycan abhängigen Reihenfolge (Abbildung 8).

Bei der HS-Prozessierung müssen die Disaccharid-Einheiten durch das HS2S-Enzym an der dU2S-Position desulfoniert werden, bevor sie durch eine Hydrolase zu Monosaccharid-Einheiten weiterverarbeitet werden können.^[186] Anschließend werden alle an den GlcN-Einheiten verbliebenen Sulfatgruppen sequenziell durch die Monosaccharid-Sulfatasen HS3S, HS6S und HSNS abgespalten.^[187–189] Beim Abbau von CS greifen CS6S und CS4S vor der Spaltung zu Monosaccharid-Einheiten am nichtreduzierenden Ende der GalNAc-Reste an.^[190,191] Außerdem wurde belegt, dass CS6S endoenzymatische Spaltungen an großen CS-Ketten ausführen kann.^[192] CS enthält ebenfalls Uronsäure-Reste mit 2-O-Sulfatgruppen (allerdings weniger als HS). Berichtet wurde über eine für Disaccharide, Trisaccharide und Tetrasaccharide mit dU2S-Resten spezifische Sulfatase, deren Aktivität vom Sulfatierungsmuster unabhängig ist.^[186,192–195] Man nimmt dementsprechend an, dass die dU2S-Reste von HS- und CS-Substraten durch die gleichen Sulfatasen prozessiert werden; tatsächlich zeigte das kürzlich aus *F. heparinum* klonierte FHS2S-Enzym Aktivität für beide Substrate.^[58,61] FHS2S spaltet bevorzugt die 2-O-Sulfatfunktion der HS-Disaccharid-Einheit dU_{2S}(β-1,4)H_{NS,6S}, ist jedoch auch bei schwächerer Sulfatierung und anderen glycosidischen Verknüpfungen aktiv, etwa gegen die α-1,3-Verknüpfung von CS. Dieses Verhalten zeigt, dass das Enzym primär für dU_{2S}-Reste an nichtreduzierenden Enden von GAG-Ketten spezifisch ist.

7.3. Mucin-Sulfatasen

Mucin-Sulfatasen (MdSs, mucin-desulfating sulfatases) sind bakterielle Enzyme, die Sulfatester am Mucin-Proteoglycan im Gastrointestinal(GI)-Trakt spalten. Ähnlich wie die Glycosaminoglycane enthalten Mucin-Oligosaccharide zahlreiche Sulfatgruppen, die die physikalischen Eigenschaften wesentlich mitbestimmen.^[196] Sulfatester wurden an den inneren und äußeren GlcNAc-, Gal- und GalNAc-Resten in 3-, 4- oder 6-Position von Mucinen gefunden.^[197] Mucine enthalten Blutgruppen-Antigene, darunter verschiedene Sialyl- und Sulfosialylgruppen, von denen bekannt ist, dass sie an bakteriellen Erkennungsprozessen und am Leukocyten-Trafficking beteiligt sind.^[198] Eine der wichtigsten Aufgaben von Mucinen ist die Bildung einer schützenden Barriere zwischen Endothelzellen und potenziell schädigenden Agentien, z. B. im GI-Lumen angesiedelten Bakterien.^[199] Die Hinweise häufen sich, dass die Mucine durch Sulfonierung stabilisiert werden, da die Desulfonierung durch Mucin-Sulfatasen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt beim bakteriellen Abbau der Mucine ist.^[200] Dies könnte der Grund dafür sein, dass die im GI-Trakt am häufigsten vorkommenden Mucine (Sulfomucine) erhöhte Sulfatesteranteile aufweisen.^[201]

Mucin-Sulfatasen wurden in Stämmen von Enterobakterien gefunden, die in der Lage sind, mit ³⁵S-markiertem Mucin als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen (Tabelle 7).^[202–204] Bislang wurden drei Enzyme aufgereinigt. Das erste, ein 30-kDa-Protein aus dem Extrazellulärraum einer *Helicobacter pylori*-Kultur, hat ein pH-Optimum bei 5.7 und katalysiert die Desulfonierung von GlcNAc_{6S} und Gal_{6S} in Mucinen sowie von Glc_{6S} in Glyceroglucolipiden.^[205] Ein weiteres 15-kDa-Enzym, gereinigt aus fäkalen Extrakten, hat ein pH-Optimum bei 4.5 und spaltete ungefähr 25 % des radioaktiv markierten Sulfats von einem humanen Dickdarm-Mucin ab.^[206] Das

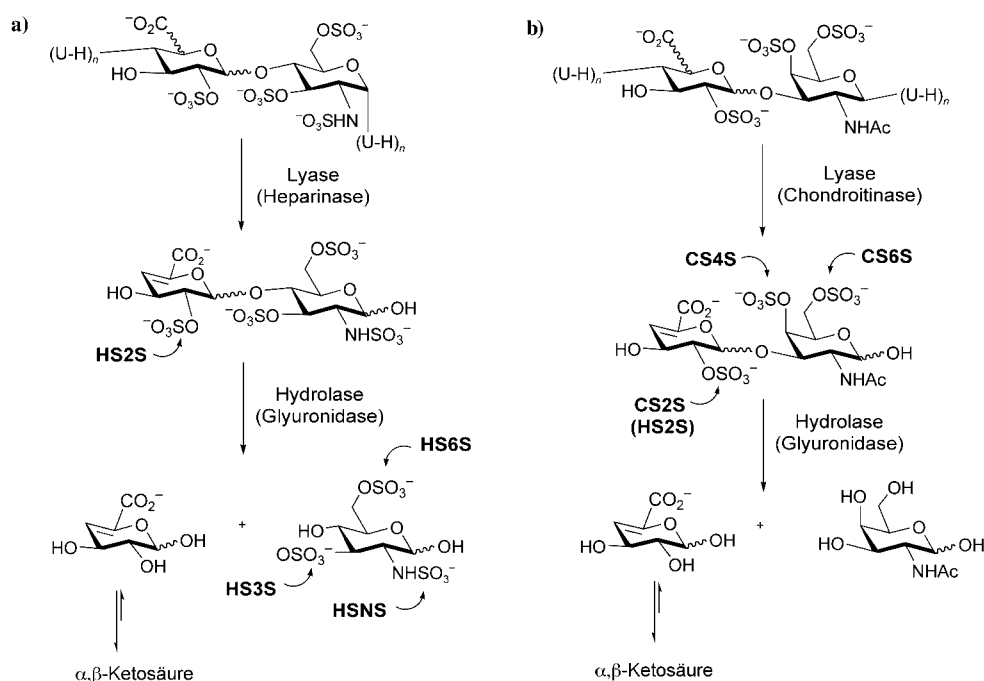


Abbildung 8. Die Rolle bakterieller Sulfatasen beim Abbau von HS (a) und CS (b). Die Angriffspunkte für die Sulfatesterhydrolyse sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Tabelle 7: Bakterielle Mucin-Sulfatasen.

Organismus	Wirt, Substrat ^[a]	Reste-Spezifität	pH-Optimum	subzelluläre Lokalisierung ^[b]	Infektion	Lit.
<i>Prevotella RS2</i>	S*-Ratte, gastrisches Mucin	Glc _{6S} , GlcNAc _{6S}	7.4	Periplasma		[60, 207–209]
<i>Bacteroides thetaiotamicron</i>	S*-Mensch, Dickdarm-Mucin	Gal _{6S} , Glc _{3S}	7.0	Cytoplasma extrazellulär		[202, 206]
<i>Bacterioides fragilis</i>	Mensch, Dickdarm-Mucin	Gal _{6S}	7.0			[208, 209]
unbekannt (humane Fäzes)	S*-Mensch, Dickdarm-Mucin	Glc _{6S}	4.5	extrazellulär	Ulcerative colitis	[206, 210, 211]
<i>Helicobacter pylori</i>	S*-Mensch, gastrisches Mucin	Glc _{6S} , GlcNAc _{6S} , Gal _{6S}	5.7	extrazellulär	Peptic ulcer, Magenkrebs	[205, 212]
<i>P. aeruginosa</i> , <i>Burkholderia cepacia</i>	S*-Mensch, Dickdarm-Mucin		7.0		nekrotisierende Pneumonie	[57]
<i>Streptococcus mitis</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. salivarius</i>	S*-Mensch, Dickdarm-Mucin			extrazellulär	Dentalplaque	[203]
<i>Ruminococcus torques</i> , <i>Bifidobacterium</i> VIII-210	Gal _{6S} -(b1,4)-glucitol	Gal _{6S}	5.0	extrazellulär		[204]
<i>E. coli</i>	S*-Mensch, Dickdarm-Mucin					[57]

[a] S* = radioaktives ³⁵S-Isotop zur Markierung von Mucin. [b] Die extrazelluläre Lokalisierung wurde aufgrund von enzymatischer Aktivität in Überständen der Kultur und/oder von Fäzes angenommen.

dritte, aus *Prevotella RS2* isolierte Enzym, ist ein periplasmatisches 58-kDa-Enzym mit einem pH-Optimum bei 7.0. Es spaltete 33 % des radioaktiv markierten Sulfats von einem humanen Dickdarm-Mucin.^[207] Dieses Enzym wurde kürzlich kloniert und als Exoenzym mit einer Spezifität für GlcNAc_{6S}-Reste charakterisiert.^[60,208]

Mit Rohzellextrakten von *Prevotelova* konnten 79 % des radioaktiv markierten Sulfats von einem Mucinsubstrat ab-

gespalten werden, was dafür spricht, dass noch eine weitere Mucin-Sulfatase in diesem Organismus vorkommen könnte.^[207] Möglicherweise enthält *Prevotella RS2* eine weitere, für Gal_{6S} spezifische Mucin-Sulfatase, da Lysate aus Zellen, die auf Dickdarm-Mucin gewachsen waren, sowohl Aktivität für Glc_{6S}- als auch für Gal_{6S}-Substrate zeigte.^[209] In teilweise gereinigten Extrakten aus *Bacterioides fragilis* wurden ebenfalls zwei separate Mucin-Sulfatasen gefunden,

die Gal₃S- und Gal₆S-Substrate desulfonieren.^[208,209] Andere sulfatierte Kohlenhydrate des GI-Traktes (z. B. Glycosaminoglycane und Sialylsubstrate) haben bestimmte Zuckerreste mit Mucinen gemeinsam. Die Mechanismen, mit denen Mucin-Sulfatasen zwischen diesen Substraten unterscheidet, müssen noch aufgeklärt werden.^[197,200]

7.4. Bakterielle Sulfatasen und Pathogenität

Die Hinweise häufen sich, dass Mucin-Sulfatasen an zahlreichen klinischen Erkrankungen beteiligt sind, z. B. an Darmentzündungen.^[200] Bei Patienten mit Colitis ulcerosa (UC) wurden erhöhte Mucinsulfatasespiegel in Fäkalextrakten festgestellt.^[210,211] In Einklang damit ist eine andere Studie, nach der bei UC-Patienten ein verstärkter Mucinabbau mit einer verstärkten MdS-Aktivität korreliert.^[210] Des Weiteren wurden in Magenbiopsien von mit *H. pylori* infizierten Patienten niedrigere Sulfomucinspiegel festgestellt.^[212] Man geht davon aus, dass der erhöhte Mucinabbau durch Mucin-Sulfatasen die Schwere eines Krankheitsbildes entscheidend beeinflusst.^[201] Weiterhin spielen Mucin-Sulfatasen vermutlich eine Rolle bei der Invasion der opportunistischen Pathogene *P. aeruginosa* und *Burkholderia cepacia* in Lungengewebe, besonders bei Patienten mit beeinträchtigter Mucin-Clearance, wie sie bei einer zystischen Fibrose (CF) typisch ist.^[57,213]

Es wird angenommen, dass diesen Sulfatasen zusätzlich zu ihrer Funktion bei der Aufbereitung von Schwefelquellen eine wichtige Aufgabe bei der Exposition von Adhäsionszentren zukommt. *P. aeruginosa* z. B. setzt wahrscheinlich Mucin-Sulfatasen zur Entfernung der Sulfatgruppen ein, die die essenziellen Bindungsmotive für Mucin, Gal(β-1,3)GlcNAc und Gal(β-1,4)GlcNAc, abschirmen.^[57,214,215] Sulfomucin inhibiert die Bindung von *H. pylori* an dessen normale Adhäsionselemente (Galactosphingolipid-3S), was darauf hinweist, dass die Desulfonierung von Mucinen eine entscheidende Rolle bei der Einleitung einer pathogenen Invasion spielen könnte.^[216] Diese Annahme wird durch den Befund gestützt, dass zwei gebräuchliche antiulcerative Wirkstoffe gegen Infektion mit *H. pylori*, Nitecapon und Sulcrasulfat, die Desulfonierungsaktivität von Mucin-Sulfatasen signifikant herabsetzen.^[205,212]

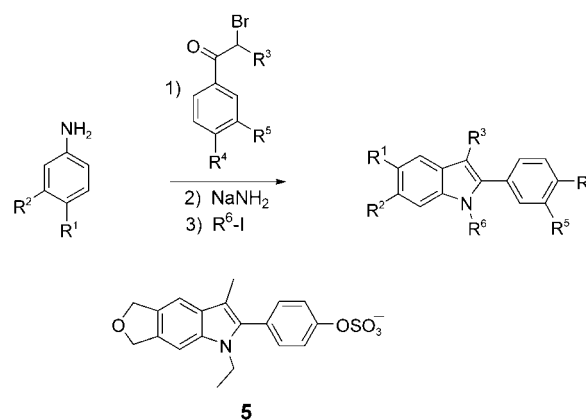
Eine Umlagerung der Sulfatstruktur wurde auch als Ursache für die Pathogenität bestimmter Stämme von *Mycobacterium* vorgeschlagen. In bioinformatischen Studien wurde gefunden, dass die in diesen Organismen ubiquitären Sulfatasesequenzen für Enzyme codieren könnten, die Glycosaminoglycane so modifizieren, dass die für eine Infektion essenziellen Bindungsstellen entstehen.^[217] Durch eine solche Adaption würden pathogene Bakterien einen Vorteil gewinnen, und bemerkenswerterweise ergibt eine Suche in der Datenbank Entrez,^[310] dass viele Pathogene mutmaßliche Sulfatasegene aufweisen, etwa *Yersinia pestis* (Drüsen- und Lungenpest),^[218] *Salmonella enterica* (Typhus),^[219] *Enterococcus faecalis* (vancomycinresistentes Pathogen),^[220] *Bacillus anthracis* (Milzbrand, potenzielle biologische Waffe)^[221] und *Streptococcus agalactiae* (Hauptverursacher von Blutvergiftungen, Pneumonie und Meningitis bei Neugeborenen).^[222]

Ein in *E. coli* K1, einem Verursacher von Meningitis, gefundenes mutmaßliches Sulfatase-Gen ist interessanterweise mit ausschlaggebend für die Fähigkeit der Bakterien, die Rückenmarksflüssigkeit zu kolonisieren.^[223] Hierin zeigt sich eine weitere faszinierende Verknüpfung zwischen bakteriellen Sulfatasen und Pathogenität. Je mehr solcher Querverbindungen aufgedeckt werden, desto wahrscheinlicher wird es, dass diese Enzyme als Targets für therapeutische Ansätze infrage kommen.

8. Inhibition von Sulfatasen

Ein Großteil der Studien zur Inhibition von Sulfatasen konzentrierte sich auf die Blockierung der Aktivität der Östronsulfatase (ARSC); ARSC setzt aus einem inaktiven Sulfatkonjugat wie Östronsulfat (E1S) oder Dehydroepiandrosteron (DHEAS) ein aktives Steroidhormon frei. Eine gesteigerte Freisetzung von E1 und DHEA wurde mit der Entwicklung von Brusttumoren in Verbindung gebracht. Eine Hochregulierung von ARSC konnte man bei unterschiedlichen Krebsarten beobachten. Daraus folgt, dass steroidale Sulfatase-Inhibitoren potenzielle Therapeutika für diese hormonabhängigen Krebsarten sind. Insbesondere die auf die Inhibition von ARSC abzielende Behandlung von Brustkrebs mit niedermolekularen Therapeutika ist in den vergangenen Jahren intensiv erforscht worden.^[36]

Seit erkannt wurde, dass 2-(Hydroxyphenyl)indole das Wachstum von Brusttumoren inhibieren,^[224,225] wurden Sulfatderivate des 2-Phenylindols auf ihr Potenzial als Inhibitoren für Steroid-Sulfatasen untersucht.^[226] Aus einer kombinatorischen Synthese (Schema 4) resultierte Verbindung **5** als der wirksamste Inhibitor mit einem IC₅₀-Wert von 120 μM. Die Inhibitoren wurden durch Bestimmung des hydrolysierten Anteils an 6,7-[³H]Östronsulfat im Flüssigszintillationszähler getestet. In einer neueren Untersuchung wurde ein Derivat mit einem Sulfamyloxysubstituenten gefunden, das ARSC mit einem IC₅₀-Wert von 200 nM inhibiert. Das Anti-östrogen Tamoxifen und verwandte Metaboliten^[227] sowie Daidzein-Sulfokonjugate^[228] und Danazol^[229,230] erwiesen sich ebenfalls als Inhibitoren von ARSC.



Schema 4. Kombinatorische Synthese von 2-(Hydroxyphenyl)indol-Inhibitoren.

Östron-3-phosphonate und Thiophosphonate wurden auf ihre Wirkung als Inhibitoren von Steroid-Sulfatasen getestet.^[231,232] Der beste Inhibitor war das Methylthiophosphonat **6** (E1-3-MTP, Abbildung 9) mit einem IC_{50} -Wert von unter

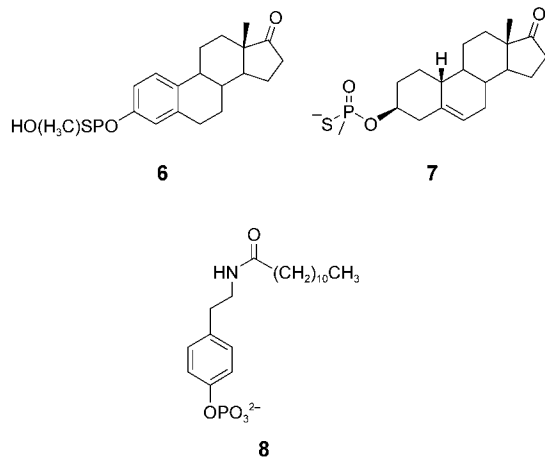


Abbildung 9. Steroide und nichtsteroides Phosphonat- und Phosphat-inhibitoren von ARSC.

100 nM. Durch selektiven Verdau des S_P -Stereoisomers mit Schlangengift-Phosphodiesterase wurde das reine R_P -Diastereomer erhalten. Dieses war weniger aktiv als das ursprüngliche Gemisch, was darauf hinweist, dass das S_P -Isomer das wirksamere Isomer ist. Allgemein wurde gefunden, dass Hydrophobie, Basizität, Größe und Ladung die Wirkung der Phosphonatinhibitoren beeinflussen.^[233] Für Dehydroepiandrosteronphosphat (**7**) wurde ein IC_{50} -Wert von 140 nM bei pH 6.0 ermittelt. Es hat eine höhere Aktivität als das entsprechende Sulfatanalogon, ist aber gegen enzymatische Hydrolyse inert.^[234] In einer Untersuchung nichtsteroider Phosphatester bestätigte sich, dass die Hydrophobie ein wichtiger Parameter für die Aktivität des Inhibitors ist. Für n -Lauroyltyraminphosphat (**8**) wurde ein K_i -Wert von 520 nM bei pH 7.0 ermittelt.^[235]

Als weitere Klasse potenzieller Inhibitoren von ARSC wurden in 17 α - und 17 β -Stellung alkylierte oder benzylierte Östradiole getestet.^[236] Man fand heraus, dass die Einführung von Alkyl- und substituierten Benzylgruppen an diesen Positionen die Aktivität erhöht. Der wirksamste Inhibitor, **9**, war mit einer 3'-Brombenzylgruppe substituiert und hatte einen IC_{50} -Wert von 24 nM (Abbildung 10). Wie anhand des IC_{50} -Wertes des Inhibitors **10** von 150 nM zu erkennen ist, erhöht die Einführung einer Sulfamatgruppe weiter die Aktivität.^[237,238] Auch der Einfluss langer Alkylketten auf die Aktivität von Östradiol wurde untersucht. Die Wirksamkeit steigt mit zunehmender Kettenlänge bis hin zum Octylsubstituenten (IC_{50} = 440 nM).^[239] In einer späteren Arbeit ergab sich für das 4'-Benzyloxybenzolderivat **11** ein IC_{50} -Wert von 22 nM. Weiterhin wurden benzylierte Analoga von Androstan und Pregnan synthetisiert und analysiert.^[240] In einer jüngeren Studie wurde über die Synthese von 17 α -substituierten Östradiolsulfamaten in einer kombinatorischen Split-Pool-Synthese an fester Phase berichtet.^[238] Wie in

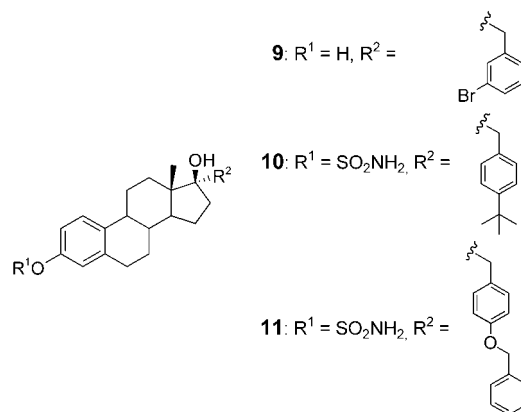
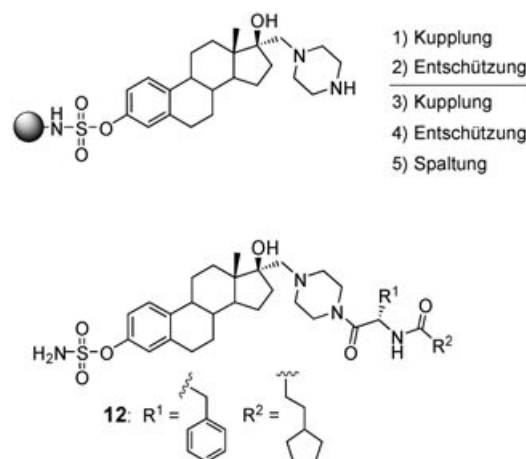


Abbildung 10. Benzylierte Östradiolinhibitoren.

Schema 5 dargestellt ist, wurde zum Aufbau der Kernstruktur der Bibliothek eine Piperazingruppe an das Steroid gekuppelt. Anschließend wurde durch Zugabe einer Aminosäure und einer Carbonsäure acyliert. Die Verbindung mit den meisten hydrophoben Gruppen, **12**, erwies sich erneut als der beste Inhibitor.



Schema 5. In 17 α -Stellung substituierte Östradiolsulfamatinhibitoren.

Durch Einführung einer Sulfamatgruppe an Östron wurde der hoch wirksame, irreversible Inhibitor EMATE (**13**, Abbildung 11) erhalten, der ARSC mit einem IC_{50} -Wert von 80 nM irreversibel inhibiert.^[241,242] Das verbrückende Sauerstoffatom zur Sulfamatgruppe erwies sich als essenziell für die Aktivität, da die entsprechenden Thiophosphonat-, N -Sulfamat- und S -Sulfamat-Analoga allesamt wenig effektiv inhibierten.^[243] Auch die N -Alkylierung der Sulfonamidgruppe ergab schwächere, reversible Inhibitoren. Nachdem sich zeigte, dass EMATE ein Rezeptoragonist von Östrogen ist, verlagerten sich die Forschungen hin zu nichtsteroiden Inhibitoren.^[244] In Studien mit Cumarinsulfamaten wurde der wirksame nichtöstrogene irreversible ARSC-Inhibitor COUMATE (**14**, IC_{50} = 380 nM) entdeckt.^[245] Durch Modifikationen wurde das noch stärker hydrophobe tricyclische Cumarinsulfamat **15** erzeugt, das einen IC_{50} -Wert von 8 nM hat.^[246]

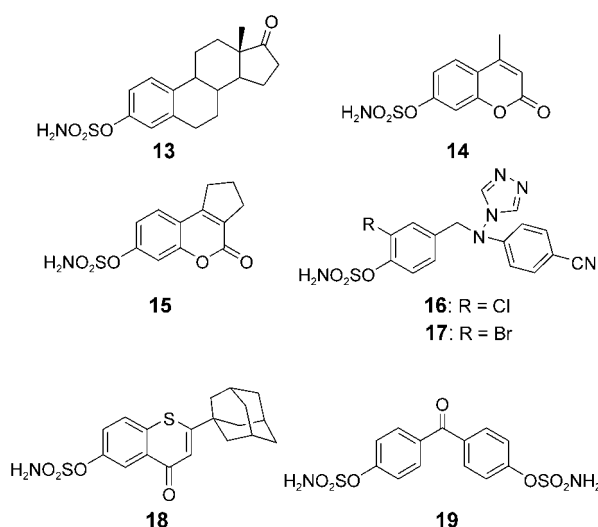
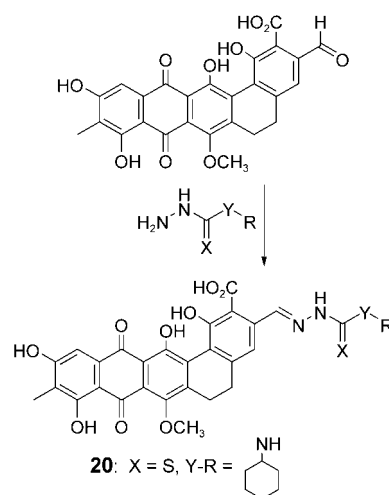


Abbildung 11. EMATE (**13**), COUMATE (**14**) und nichtsteroid Sulfataminhibitoren.

Weitere Studien konzentrierten sich auf Sulfamatderivate des Tetrahydronaphthalins, der Indanone und der Tetralone.^[247] Modifikationen an einem Aromatase-Inhibitor, darunter die Einführung von Sulfamatgruppen, führten zur Entwicklung dualer Östrogensulfatase/Aromatase-Inhibitoren.^[248] Die besten Inhibitoren waren **16** (IC_{50} (STS) = 2.3 nM, IC_{50} (Aromatase) = 20 nM) und **17** (IC_{50} (STS) = 0.82 nM, IC_{50} (Aromatase) = 39 nM, Abbildung 11).

Weitere nichtsteroid Östrogensulfataseinhibitoren sind Chromen-4-on-sulfamate. Wie die gute Inhibitorwirkung von 2-(1-Adamantyl)-4*H*-thiochromen-4-on-6-*O*-sulfamat (**18**, IC_{50} = 340 pM, Abbildung 11) belegt, sind Moleküle mit hochverzweigten aliphatischen Substituenten am aktivsten.^[249,250] Es wurden auch Benzophenonsulfamate hergestellt, unter anderem 4,4'-Benzophenon-*O,O'*-disulfamat (**19**, Abbildung 11) mit einem IC_{50} -Wert von 190 nM.^[251] Schließlich wurden Thiosemicarbazon-Derivate von Madurahydroxyaceton untersucht, einem Sekundärmetaboliten aus dem Bodenbakterium *Nonomuria rubra*.^[252] Die wirksamste Verbindung war das Cyclohexylthiosemicarbazon **20** (Schema 6), das einen K_i von 350 nM aufweist. Dieser Inhibitor wirkt in einer nichtkompetitiven Weise und hat eine geringe akute Toxizität.

Eine alternativer Ansatz zur Auffindung von ARSC-Inhibitoren beruht darauf, mithilfe von Modellierungsstudien und Struktur-Aktivitäts-Beziehungen genauere Informationen zur Wirkungsweise des aktiven Zentrums und zu den Übergangszuständen zu erhalten.^[253] Eine Untersuchung wies darauf hin, dass eine C(3)-Sulfonatgruppe für eine starke Bindung notwendig ist, eine polare C(17)-Gruppe hingegen verzichtbar wäre.^[254] Anhand einer Analyse von Phenolsulfamaten mit unterschiedlichen Substituenten konnte die Basizität der Phenoxid-Abgangsgruppe mit der Inhibitorwirkung korreliert werden.^[36,255,256] Die effektivste Inhibition wurde bei einem pK_a -Wert der phenolischen Abgangsgruppe von 8 beobachtet. In einer ähnlichen Untersuchung an einer Serie von 4-Sulfamat-substituierten Phenylalkylketonen



Schema 6. Thiosemicarbazoninhibitoren.

betrug der beste IC_{50} -Wert 3.4 μ M (Substitution durch Octylgruppen).^[257] Struktur-Aktivitäts-Beziehungen bei Phenylketonen^[258–260] und Biphenylsulfamaten^[261,262] bestätigen die Bedeutung der Hydrophobie für die Aktivität.

Ein Großteil der Arbeiten zur Inhibition von Sulfatasen konzentrierte sich auf ARSC, wegen dessen Beteiligung an hormonabhängigen Krebsarten. Mehrere wirksame Inhibitoren mit unterschiedlichen hydrophoben Grundgerüsten wurden entwickelt. Zwar hängt die Substratbindung auch von der Gerüststruktur ab, die entscheidende Funktion, die zur irreversiblen Inhibition des Enzyms führt, ist aber die Sulfamatgruppe. Für den Mechanismus der Affinitätsmarkierungen wurden mehrere Theorien aufgestellt, das genaue Dead-End-Produkt ist bislang jedoch unbekannt.^[36,246] Es wäre wichtig, die exakte Stelle der Affinitätsmarkierung zu ermitteln, da sich hieraus sichere Informationen zum Mechanismus der Sulfatesterhydrolyse ableiten ließen.

Die Inhibition anderer Sulfatasen als ARSC durch Sulfamataminhibitoren muss ebenfalls noch untersucht werden. Aufgrund des konservierten Mechanismus und der generellen Prozessierung kleiner Arylsubstrate lässt sich spekulieren, dass ein Phenylsulfamat-Pharmokophor ein allgemeiner Sulfataseinhibitor der Wahl sein könnte. Eine weitaus schwierigere Aufgabe betrifft das Design spezifischer Inhibitoren. Diese wären von großer Bedeutung, da therapeutische Targets auch bei Aufrechterhaltung essenzieller Sulfataseaktivität, z.B. des lysosomalen Katabolismus (siehe Tabelle 5), selektiv ausschaltbar wären. Die Entwicklung spezifischer Inhibitoren ist ein plausibles Forschungsziel. Beispielsweise inhibiert Warfarin die Sulfatase ARSE selektiv, ohne dabei andere Arylsulfatasen im ER zu beeinflussen.^[129,130] Cokristallstrukturen von Sulfatase-Substrat- und Sulfatase-Inhibitor-Komplexen könnten entscheidende Informationen über die Substratbindungsregionen innerhalb der Sulfatasestruktur liefern und neue Wege zur Optimierung der Inhibitorspezifität aufzeigen.

9. Anwendungen in der Synthese

9.1. Sulfatasen in der Sequenzierung von Glucosaminoglycanen

Sulfatierte Oligosaccharide finden wegen ihrer Beteiligung an zahlreichen biologischen Prozessen zunehmend an Interesse.^[139,263,264] Besonders Heparansulfat fungiert als Vermittler bei vielen biologischen Vorgängen, etwa bei der Embryogenese und der Zellsignalisierung,^[140,265] bei Entzündungsprozessen,^[266,267] Koagulation,^[268,269] Angiogenese,^[270] Krebsmetastasierung^[111] und bei mikrobieller und viraler Adhärenz und Invasion.^[271–273] Angesichts einer immer länger werdenden Liste zu untersuchender Wechselwirkungen ist die Entwicklung einer analytischen Methode zur Bestimmung der Struktur komplexer Oligosaccharide ein primäres Ziel geworden.^[274,275] Die Sequenzierung komplexer Oligosaccharide ist keinesfalls eine triviale Aufgabe, beispielsweise enthält Heparansulfat infolge variabler glycosidischer Verknüpfung, Epimerisierung und Sulfonierung 32 unterschiedliche Disaccharid-Einheiten (Abbildung 5). Diese strukturelle Diversität macht Heparansulfat zu einem der Biomoleküle mit der höchsten Informationsdichte. Zum Vergleich sind die DNA aus nur vier und Proteine aus zwanzig unterschiedlichen Einheiten aufgebaut. Darüber hinaus sind Heparansulfat- und Glycosaminoglycan-Sequenzen anders als DNA und Proteine nicht replizierbar, sodass es notwendig ist, Proben im Submilligramm-Bereich quantifizieren zu können. Schließlich bereitet der hochgradig anionische Charakter dieser Moleküle große Schwierigkeiten bei ihrer Aufreinigung. Es ist zunehmend klar geworden, dass spezifische Epitope der Heparansulfat-Sequenz gewebespezifisch erzeugt werden und selektiv mit bestimmten Proteinen wie Wachstumsfaktoren, Cytokinen, Rezeptorproteinen und Enzymen wechselwirken.^[139,276] Dementsprechend wurden viele Sequenzierungsstrategien für Heparansulfat entwickelt, um diese Wechselwirkungen zu charakterisieren.^[274,277]

Mehrere Methoden auf der Basis von Sulfatasen wurden zur Entschlüsselung der Heparansulfat-Sequenzen erarbeitet. Zwei neuere Techniken, die integrale Sequenzierung von Glycan (IGS)^[278] und PEN-MALDI-MS (property-encoded nomenclature matrix assisted laser desorption),^[279] haben sich bei der schnellen Bestimmung von Heparansulfatstrukturen mit kleinen Probenmengen bewährt. Die IGS-Methode umfasst eine Fluoreszenzmarkierung des reduzierenden Endes der HS-Kette mit anschließenden iterativen chemischen und enzymatischen Abbauschritten, die durch Gelelektrophorese analysiert werden (Abbildung 12). Nach der Markierung wird das Oligosaccharid durch salpetrige Säure an GlcN-(α -1,4)-H-Resten gespalten, wodurch mehrere Fragmente unterschiedlicher Größe entstehen. Diese werden mit einer Serie von Exoenzymen, die Monosaccharid-Einheiten (Glycosidasen) oder Sulfatgruppen (lysosomale Sulfatasen) abspalten, schrittweise vom nichtreduzierenden Ende abgebaut. Anhand des Elektrophoresemusters kann die ursprüngliche HS-Sequenz rekonstruiert werden. Ähnliche Methoden verwenden Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und Kapillarelektrophorese (CE) zur Analyse der Fragmente. Berichtet wurde auch über die Markierung von Heparansulfat aus In-vivo-Proben.^[280–282]

Einen etwas anderen Ansatz verfolgt die Methode PEN-MALDI-MS.^[279] Zu den bei dieser Prozedur verwendeten Enzymen zählen eukaryotische Exoglycosidasen und Sulfatasen sowie bakterielle Lyasen, Hydrolasen und Sulfatasen aus *F. heparinum*. Der Prozess beginnt mit einer massenspektrometrischen Analyse, aus der eine Liste aller möglichen HS-Sequenzen generiert wird. Anschließend werden durch iterative Anwendung chemischer und enzymatischer Reagentien nicht infrage kommende Sequenzen ausgeschlossen. Die Leistungsfähigkeit dieser Methoden wurde in mehreren Studien demonstriert, unter anderem bei der Aufklärung der Wechselwirkungen zwischen HS und FGF,^[278,283,284] Antithrombin III (AT-III)^[285–287] und dem Herpes-Simplex-Virus.^[288] Die Sequenzierungsmethoden lassen sich für Analysen anderer Glycosaminoglycane modifizieren. Mehrere ähnliche Techniken wurden zur Analyse von Chondroitinsulfat und Dermatansulfat entwickelt,^[289,290] und es ist anzunehmen, dass die weitere Charakterisierung von Mucin abbauenden Enzymen und Mucin-Sulfatasen bei der Sequenzierung biologisch relevanter Sulfomucinsequenzen hilfreich sein wird.

9.2. Sulfatasen in der Synthese

Aus den Ergebnissen der Sequenzierungsexperimente wurden mehrere entscheidende Bindungsmotive von Heparansulfaten abgeleitet. Auch gibt es eine Vielzahl ausführlich beschriebener sulfonierter Kohlenhydratstrukturen, z. B. sLe^x-6S, die biologisch interessant sind.^[291] Oft ist es wünschenswert, die biologische Aktivität solcher Moleküle durch kombinatorische Synthese und die Aufstellung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zu erforschen. Ein anderer, ebenfalls häufig verwendeter Ansatz ist die gezielte Synthese analoger Strukturen als potenzielle therapeutische Wirkstoffe. Die schwierigste Stufe bei solchen Studien ist in der Regel die Synthese der Oligosaccharid-Bibliotheken,^[292,293] und oft wird versucht, Enzyme einzusetzen.^[294,295] Sulfatasen können in mehrfacher Hinsicht Anwendung bei der chemischen Synthese sulfathaltiger Oligosaccharide finden.

Wie bei vielen Prozessen in der Kohlenhydratchemie verlangt auch die regioselektive Sulfonierung von Sacchariden oft komplizierte Schutzgruppenoperationen. Einige Methoden zur regioselektiven Sulfonierung wurden bereits beschrieben,^[291,296–299] kürzlich konnte aber gezeigt werden, dass die Verwendung von Sulfatasen eine effiziente Alternative bietet. Uzawa et al. synthetisierten *para*-Nitrophenol-Galactosederivate mit mehreren Sulfatgruppen, die anschließend mit kommerziell erhältlichen Sulfatasen aus Mollusken enzymatisch desulfoniert wurden.^[300,301] Durch Untersuchung diverser Enzyme wurden Bedingungen ermittelt, die den selektiven Aufbau unterschiedlicher Sulfatierungsmuster ermöglichen. Auf diese Weise wurde ein einfacher Zugang zu einer Bibliothek aus sulfatierten Monosacchariden erhalten. Diese konnten anschließend in Glycosyldonoren überführt werden, mit denen der Aufbau komplexerer sulfatierter Oligosaccharide gelang (Schema 7).^[302]

Mit der Entdeckung der Sulf-Enzyme ergaben sich weitere Möglichkeiten für die Verwendung von Sulfatasen in der

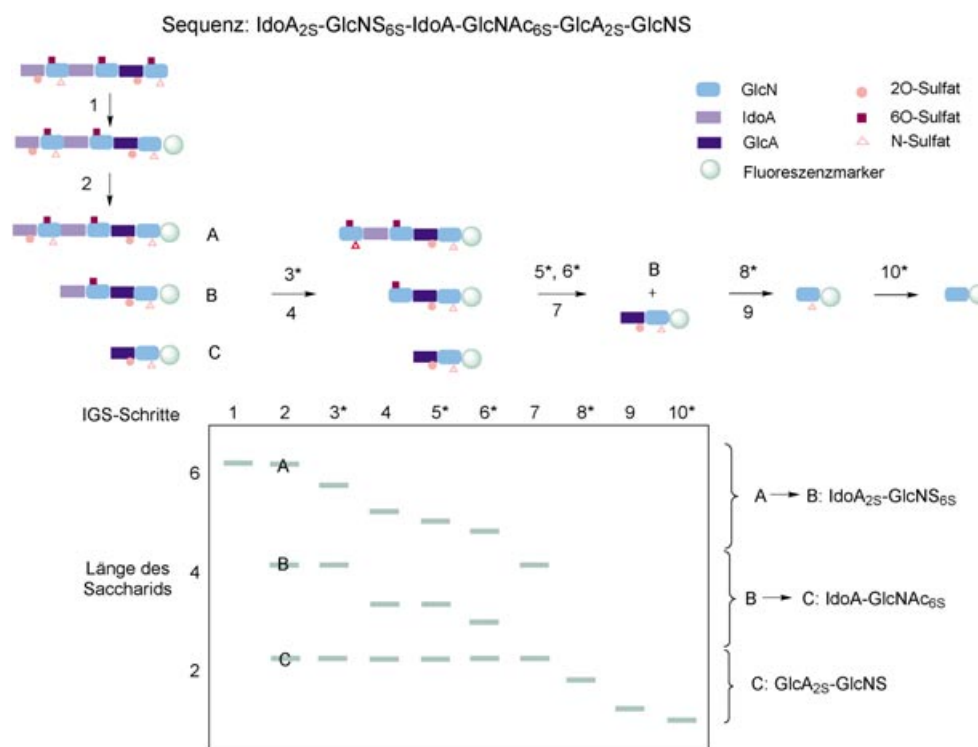
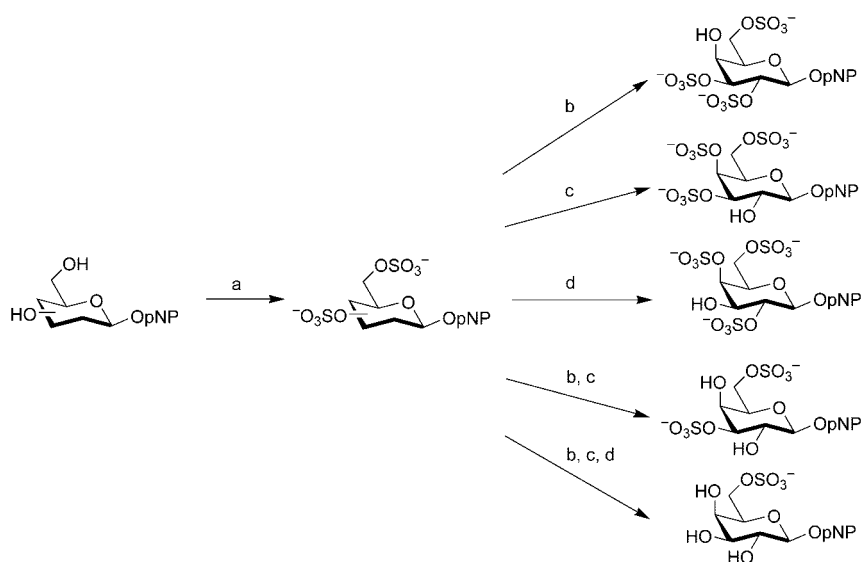


Abbildung 12. Die integrale Glycan-Sequenzierung (IGS)-Strategie zur Decodierung von Heparansulfat-Sequenzen. Isolierte HS-Saccharide können durch eine Kombination chemischer und enzymatischer Schritte mit nachfolgender elektrophoretischer Trennung der Produkte schnell sequenziert werden. Dieses schematische Beispiel zeigt die Entschlüsselung einer einfachen Hexasaccharidsequenz (oben). Das Saccharid wird an seinem reduzierenden Ende mit einem Fluoreszenzmarker versehen (Schritt 1). Durch partielle chemische Spaltung an GlcN-Resten mit salpetriger Säure entstehen die Fragmente A, B und C, die sich jeweils durch eine Disaccharideinheit unterscheiden (Schritt 2). In den Schritten 3–10 werden spezifische Sulfatgruppen oder Monosaccharidreste vom nichtreduzierenden Ende von A, B und C durch spezifische Exosulfatasen (mit einem Stern gekennzeichnet) und Exoglycosidasen entfernt. Eingesetzt wurden die lysosomalen Sulfatasen IdoA2S (Schritt 3), GlcN6S (Schritt 6), GlcA2S (Schritt 8) und GlcNS (Schritte 5 und 10) und die entsprechenden Glycosidasen. Die Trennung der enzymatischen Produkte auf einem Polyacrylamid-Gel hoher Dichte führt zu fluoreszenten Bandenmustern, die für die Saccharidsequenz charakteristisch sind.



Schema 7. Verwendung von Sulfatasen zum Aufbau unterschiedlicher Sulfatierungsmuster an Monosacchariddonoren. Nach erschöpfender Sulfonierung durch chemische und/oder enzymatische Synthese (a) lässt sich durch Einwirkung einer einzelnen Sulfatase oder durch Kombination mehrerer Sulfatasen das gewünschte Sulfatierungsmuster erzeugen. Angewendet wurden eine 4-O-Sulfatase aus der Ohrschnecke (b), eine 2-O-Sulfatase aus der Napfschnecke (c) und eine 3-O-Sulfatase aus der Schnecke (d).

Synthese. Die meisten der bis dahin bekannten GAG-spezifischen Sulfatasen sind streng exospezifisch, was für Anwendungen in der Sequenzierung und in der Synthese sulfatierter Monosacchariddonoren genutzt wurde. Demgegenüber sind die Sulf-Enzyme rein endospezifisch.^[22] Die Fähigkeit, Sulfat-ester innerhalb von Glycosaminoglycan-Ketten regiospezifisch zu spalten, kann zur Erzeugung von Diversität in Bibliotheken oder zur gezielten Synthese von Oligosaccharid-Epitopen genutzt werden.^[275] Beispielsweise wurde kürzlich ein Gel-Shift-Assay verwendet, um die Bindung von Proteinen an Heparansulfat-Targets zu quantifizieren, wobei Sulfatgruppen enzymatisch an ein unsubstituiertes Oligosaccharid-Rückgrat gekuppelt wurden.^[303] Eine komplementäre Sequenz könnte mit spezifischen Sulfatasen erzeugt werden, indem man mit einem bekannten Liganden und einem Heparansulfat-Target beginnt

und systematisch die Sulfatreste abspaltet. Speziell das Wechselspiel zwischen Wnt, HS und Sulf1 bietet sich für Untersuchungen durch einen Gel-Shift-Assay an. Durch Abspaltung von Sulfatestergruppen könnte sich hierdurch belegen lassen, dass Sulf1 die Bindungsaffinität von Heparansulfat für Wnt moduliert (Abbildung 7).^[97] Die Entdeckung und Entwicklung neuer spezifischer Sulfatasen würde die analytischen Möglichkeiten sicher stark erweitern; vorstellbar wäre ein Sortiment an Enzymen, einschließlich Sulfatasen und Sulfotransferasen, das sich zur dynamischen Modifizierung von sulfatierten HS-Oligosaccharid-Strukturen einsetzen lässt.

Über weitere Anwendungen von Sulfatasen wurde berichtet. Ein chemoenzymatischer Ansatz wurde aus der Wirkungsweise der Sulfatasen im Organismus abgeleitet. Ein von Bristol-Myers Squibb patentiertes Verfahren verwendet einen tumorspezifischen sulfatasekonjugierten Antikörper und ein sulfatiertes Prodrug zum gewebespezifischen Wirkstofftransport.^[304] Bei diesem Prozess wird das aktive Therapeutikum ausschließlich in der Umgebung der zu behandelnden Tumorzelle freigesetzt, wodurch die unspezifische Aktivität gemindert wird. Die Glucosinolat-Sulfatasen aus der Kohlmotte und der Schnecke *H. pomatia* wurden zur Analyse und Klassifizierung von Glucosinolaten (**4**, Abbildung 4) aus zahlreichen Pflanzen eingesetzt.^[152] Extrakte aus *H. pomatia* wurden in vielen weiteren analytischen Anwendungen genutzt, angefangen bei der Untersuchung organischer Bodenmaterie^[305] bis hin zur Identifizierung von Steroiden und psychotropen Substanzen in Urin- und Haarproben.^[306,307] Weitere Anwendungen prokaryotischer Sulfatasen finden sich in der biologischen Sanierung von Alkylsulfatabfällen^[48,308,309] und der Deracemisierung sekundärer Alkylsulfate.^[41–43]

10. Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieses Aufsatzes war es, die Teilbereiche der Sulfataseforschung zusammenfassend vorzustellen. Sulfatasen sind in mehrerlei Hinsicht interessant, und ihr Anwendungsbereich erweitert sich zusehends. Was die katalytische Wirkung betrifft, sind die Sulfatasen mit einem Schlüsselaldehyd im aktiven Zentrum ausgestattet, der ihnen die charakteristische Eigenschaft verleiht, Sulfatester zu hydrolysieren. Der posttranslationale Aufbau dieses Restes – der bei multipler Sulfatasedefizienz fehlt, was von großer klinischer Bedeutung ist – bedarf weiterer mechanistischer Untersuchungen. Bezüglich ihrer Strukturen lassen die Sulfatasen sehr ähnliche dreidimensionale Faltungsmuster und eine ähnliche Geometrie des katalytischen Spaltes erkennen, was ihre funktionale Konservierung von Prokaryoten hin zu Eukaryoten unterstreicht. Dieses mechanistisch konservierte Verhalten ist in Anbetracht der vielfältigen Substrate von Sulfatasen und ihrer unterschiedlichen pH-Optima beachtlich. Wenig bekannt ist bislang über den katalytischen Übergangszustand und die Grundlagen der Substratspezifität. Genauere Informationen hierzu würden ohne Zweifel die Entwicklung wirksamer spezifischer Inhibitoren für Sulfatasen erleichtern. Biologisch gesehen spielen Sulfatasen bei einer Vielzahl von

Prozessen eine wichtige Rolle, wobei es mit der Entdeckung neuer Sulfatasen und der Aufklärung neuer biologischer Funktionen immer offensichtlicher wird, dass in diesem Bereich noch sehr viel Forschungsarbeit investiert werden muss. Einer der interessantesten neuen Aspekte ist die Anwendung von Sulfatasen zum Aufbau spezifischer Sulfonierungsmuster an Heparansulfat-Ketten, die eine entscheidende Steuerungsfunktionen bei Signalisierungs- und molekularen Erkennungsprozessen ausüben. Studien zu Heparansulfaten gestalten sich als experimentell sehr anspruchsvoll, und die Verwendung von Sulfatasen in HS-Sequenzierungsversuchen hat sich als äußerst vielversprechend erwiesen. Sulfatasen könnten sich auch als nützliche Reagentien bei Synthesen im biologischen und therapeutischen Umfeld etablieren.

Man kennt eine Vielzahl von biologischen Wechselwirkungen, an denen Sulfatgruppen beteiligt sind. Beispiele umfassen: 1) die Beteiligung von Heparansulfat und anderen sulfatierten Glycosaminoglycanen an Signalgebungsprozessen sowie bakteriellen und viralen Infektionen, 2) die Rolle von Protein-Tyrosin-O-sulfat bei der Aktivität von Peptidhormonen und dem HIV-Eintritt in Zellen und 3) die Rolle von sLe^x-6S bei Entzündungen. Die physiologische Synthese dieser sulfonierten Biomoleküle durch Sulfotransferasen wurde in den letzten Jahren intensiv erforscht. Es wird interessant sein zu sehen, ob auch eukaryotische, prokaryotische oder virale Sulfatasen an der Modifizierung dieser Prozesse teilnehmen können.

Abkürzungen

AP	alkalische Phosphatase
ARS	Arylsulfatase
ECM	extrazelluläre Matrix
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
ER	endoplasmatisches Retikulum
FGE	FGly erzeugendes Enzym
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FGH	α -Formylglycin-Hydrat
FGly	α -Formylglycin
FGS	FGly-Sulfat-Addukt
GAG	Glycosaminoglycan
HS	Heparansulfat
HSPG	Heparansulfatproteoglycan
MSD	multiple Sulfatasedefizienz
MSDF	MSD-Faktor
pNCS	<i>p</i> -Nitrocatecholsulfat
SUMF	sulfatasemodifizierender Faktor

Unsere Arbeiten werden durch die National Institutes of Health unterstützt. S.R.H. dankt der ARCS Foundation für ein Stipendium.

Eingegangen am 1. September 2003

Online veröffentlicht am 18. Oktober 2004

Übersetzt von Dr. Thomas Fritzsche, Heidelberg

- [1] E. F. Neufeld, J. Muenzer in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Vol. III, 8. Aufl. (Hrsg.: C. R. Scriver), McGraw-Hill, New York, **1999**, S. 3421.
- [2] C. Peters, B. Schmidt, W. Rommerskirch, K. Rupp, M. Zuhlsdorf, M. Vingron, H. Meyer, R. Pohlmann, K. von Figura, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 3374.
- [3] K. S. Dodgson, G. F. White, J. W. Fitzgerald, *Sulfatases of Microbial Origin*, CRC, Boca Raton, **1982**.
- [4] A. B. Roy in *The Enzymes*, Vol. V (Hrsg.: P. D. Boyer), Academic Press, New York, **1971**, S. 1.
- [5] R. G. Nicholls, A. B. Roy in *The Enzymes*, Vol. V (Hrsg.: P. D. Boyer), Academic Press, New York, **1971**, S. 21.
- [6] A. Ballabio, L. J. Shapiro in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Vol. III, 8. Aufl. (Hrsg.: C. R. Scriver), McGraw-Hill, New York, **1999**, S. 4241.
- [7] K. von Figura, V. Gieselmann, J. Jaeken in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Vol. III, 8. Aufl. (Hrsg.: C. R. Scriver), McGraw-Hill, New York, **1999**, S. 3695.
- [8] J. J. Hopwood, A. Ballabio in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Vol. III, 8. Aufl. (Hrsg.: C. R. Scriver), McGraw-Hill, New York, **1999**, S. 3725.
- [9] Siehe die Webseite: <http://us.expasy.org/cgi-bin/prosite> (PDOC00117).
- [10] T. Dierks, M. R. Lecca, P. Schlotterhose, B. Schmidt, K. von Figura, *EMBO J.* **1999**, 18, 2084.
- [11] A. Knaust, B. Schmidt, T. Dierks, R. von Bülow, K. von Figura, *Biochemistry* **1998**, 37, 13941.
- [12] I. Boltes, H. Czapinska, A. Kahnert, R. von Bülow, T. Dierks, B. Schmidt, K. von Figura, M. A. Kertesz, I. Uson, *Structure* **2001**, 9, 483.
- [13] Gemäß der Webseite „Prosite“ (<http://us.expasy.org/prosite>) gibt es zwei Signatursequenzen (PS00523, PS00149).
- [14] A. Waldow, B. Schmidt, T. Dierks, R. von Bülow, K. von Figura, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 12284.
- [15] G. Lukatela, N. Krauss, K. Theis, T. Selmer, V. Gieselmann, K. von Figura, W. Saenger, *Biochemistry* **1998**, 37, 3654.
- [16] C. S. Bond, P. R. Clements, S. J. Ashby, C. A. Collyer, S. J. Harrop, J. J. Hopwood, J. M. Guss, *Structure* **1997**, 5, 277.
- [17] F. G. Hernandez-Guzman, T. Higashiyama, W. Pangborn, Y. Osawa, D. Ghosh, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 22989.
- [18] C. I. Branden, *Q. Rev. Biophys.* **1980**, 13, 317.
- [19] J. M. Sowadski, M. D. Handschumacher, H. M. K. Murthy, B. A. Foster, H. W. Wyckoff, *J. Mol. Biol.* **1985**, 186, 417.
- [20] M. Chruszcz, P. Laidler, M. Monkiewicz, E. Ortlund, L. Lebioda, K. Lewinski, *J. Inorg. Biochem.* **2003**, 96, 386.
- [21] R. von Bülow, B. Schmidt, T. Dierks, K. von Figura, I. Uson, *J. Mol. Biol.* **2001**, 305, 269.
- [22] M. Morimoto-Tomita, K. Uchimura, Z. Werb, S. Hemmerich, S. D. Rosen, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 49175.
- [23] G. Uhlhorn-Dierks, T. Kolter, K. Sandhoff, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2591; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2453.
- [24] K. von Figura, B. Schmidt, T. Selmer, T. Dierks, *Bioessays* **1998**, 20, 505.
- [25] B. Schmidt, T. Selmer, A. Ingendoh, K. von Figura, *Cell* **1995**, 82, 271.
- [26] T. Selmer, A. Hallmann, B. Schmidt, M. Sumper, K. von Figura, *Eur. J. Biochem.* **1996**, 238, 341.
- [27] T. Dierks, C. Miech, J. Hummerjohann, B. Schmidt, M. A. Kertesz, K. von Figura, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 25560.
- [28] C. Miech, T. Dierks, T. Selmer, K. von Figura, B. Schmidt, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 4835.
- [29] A. Schirmer, R. Kolter, *Chem. Biol.* **1998**, 5, R181.
- [30] C. Marquardt, Q. H. Fang, E. Will, J. H. Peng, K. von Figura, T. Dierks, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 2212.
- [31] T. Dierks, B. Schmidt, L. V. Borissenko, J. Peng, A. Preusser, M. Mariappan, K. von Figura, *Cell* **2003**, 113, 435.
- [32] M. P. Cosma, S. Pepe, I. Annunziata, R. F. Newbold, M. Grompe, G. Parenti, A. Ballabio, *Cell* **2003**, 113, 445.
- [33] D. A. Brooks, D. A. Robertson, C. Bindloss, T. Litjens, D. S. Anson, C. Peters, C. P. Morris, J. J. Hopwood, *Biochem. J.* **1995**, 307, 457.
- [34] R. Recksiek, T. Selmer, T. Dierks, B. Schmidt, K. von Figura, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 6096.
- [35] C. L. L. Chai, W. A. Loughlin, G. Lowe, *Biochem. J.* **1992**, 287, 805.
- [36] S. Ahmed, K. James, C. P. Owen, C. K. Patel, L. Sampson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 1279.
- [37] P. J. O'Brien, D. Herschlag, *Biochemistry* **2002**, 41, 3207.
- [38] B. T. Burlingham, L. M. Pratt, E. R. Davidson, V. J. Shiner, Jr., J. Fong, T. S. Widlanski, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 13036.
- [39] B. Bartholomew, K. S. Dodgson, G. W. J. Matcham, D. J. Shaw, G. F. White, *Biochem. J.* **1977**, 165, 575.
- [40] J. M. Cloves, K. S. Dodgson, D. E. Games, D. J. Shaw, G. F. White, *Biochem. J.* **1977**, 167, 843.
- [41] M. Pogorevc, U. T. Strauss, T. Riermeier, K. Faber, *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, 13, 1443.
- [42] M. Pogorevc, W. Kroutil, S. R. Wallner, K. Faber, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 4230; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 4052.
- [43] M. Pogorevc, K. Faber, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, 69, 2810.
- [44] I. Davies, G. F. White, W. J. Payne, *Biodegradation* **1990**, 1, 229.
- [45] T. P. Higgins, J. R. Snape, G. F. White, *J. Gen. Microbiol.* **1993**, 139, 2915.
- [46] A. Kahnert, M. A. Kertesz, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 31661.
- [47] Y. Tazuke, K. Matsuda, K. Adachi, Y. Tsukada, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1994**, 58, 889.
- [48] J. Davison, F. Brunel, A. Phanopoulos, D. Prozzi, P. Terpstra, *Gene* **1992**, 114, 19.
- [49] P. J. Matts, G. F. White, W. J. Payne, *Biochem. J.* **1994**, 304, 937.
- [50] M. A. Kertesz, *FEMS Microbiol. Rev.* **2000**, 24, 135.
- [51] R. J. Yao, P. Guerry, *J. Bacteriol.* **1996**, 178, 3335.
- [52] T. Barbeyron, P. Potin, C. Richard, O. Collin, B. Kloeareg, *Microbiology* **1995**, 141, 2897.
- [53] T. Dierks, B. Schmidt, K. von Figura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 11963.
- [54] T. Dierks, M. R. Lecca, B. Schmidt, K. von Figura, *FEBS Lett.* **1998**, 423, 61.
- [55] J. Fey, M. Balleininger, L. V. Borissenko, B. Schmidt, K. von Figura, T. Dierks, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 47021.
- [56] T. Yamada, Y. Murooka, T. Harada, *J. Bacteriol.* **1978**, 133, 536.
- [57] H.-J. Jansen, C. A. Hart, J. M. Rhodes, J. R. Saunders, J. W. Smalley, *J. Med. Microbiol.* **1999**, 48, 551.
- [58] J. R. Myette, Z. Shriver, C. Claycamp, M. W. McLean, G. Venkataraman, R. Sasisekharan, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 12157.
- [59] C. Szameit, C. Miech, M. Balleininger, B. Schmidt, K. von Figura, T. Dierks, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 15375.
- [60] D. P. Wright, C. G. Knight, S. G. Parker, D. L. Christie, A. M. Robertson, *J. Bacteriol.* **2000**, 182, 3002.
- [61] R. Raman, J. R. Myette, Z. Shriver, K. Pojasek, G. Venkataraman, R. Sasisekharan, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 12167.
- [62] D. S. Anson, J. Bielicki, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1999**, 31, 363.
- [63] Y. Murooka, K. Ishibashi, M. Yasumoto, M. Sasaki, H. Sugino, H. Azakami, M. Yamashita, *J. Bacteriol.* **1990**, 172, 2131.
- [64] Y. Murooka, H. Azakami, M. Yamashita, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1996**, 60, 935.
- [65] Q. Cheng, V. Hwa, A. A. Salyers, *J. Bacteriol.* **1992**, 174, 7185.
- [66] S. Kornfeld, I. Mellman, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1989**, 5, 483.
- [67] C. Stein, V. Gieselmann, J. Kreysing, B. Schmidt, R. Pohlmann, A. Waheed, H. Meyer, J. O'Brien, K. von Figura, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 1252.
- [68] D. S. Anson, J. A. Taylor, J. Bielicki, G. S. Harper, C. Peters, G. J. Gibson, J. J. Hopwood, *Biochem. J.* **1992**, 284, 789.

- [69] S. Tomatsu, S. Fukuda, M. Masue, K. Sukegawa, T. Fukao, A. Yamagishi, T. Hori, H. Iwata, T. Ogawa, Y. Nakashima, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 181, 677.
- [70] T. Litjens, J. Bielicki, D. S. Anson, K. Friderici, M. Z. Jones, J. J. Hopwood, *Biochem. J.* **1997**, 327, 89.
- [71] J. Bielicki, J. J. Hopwood, E. L. Melville, D. S. Anson, *Biochem. J.* **1998**, 329, 145.
- [72] J. Bielicki, J. J. Hopwood, P. J. Wilson, D. S. Anson, *Biochem. J.* **1993**, 289, 241.
- [73] A. A. Farooqui, P. Mandel, *Biomedicine* **1977**, 26, 232.
- [74] A. L. Fluharty, R. L. Stevens, E. B. Goldstein, H. Kihara, *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, 566, 321.
- [75] H. Jatzkewi, E. Mehl, *J. Neurochem.* **1969**, 16, 19.
- [76] E. Mehl, H. Jatzkewitz, *Biochim. Biophys. Acta* **1968**, 151, 619.
- [77] A. B. Roy, *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, 377, 356.
- [78] A. Vogel, G. Schwarzmans, K. Sandhoff, *Eur. J. Biochem.* **1991**, 200, 591.
- [79] B. M. Gadella, B. Colenbrander, L. M. G. Vangolde, M. Lopes-cardozo, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, 1128, 155.
- [80] J. Tantibhedhyangkul, W. Weerachatanukul, E. Carmona, H. Xu, A. Anupriwan, D. Michaud, N. Tanphaichitr, *Biol. Reprod.* **2002**, 67, 212.
- [81] E. Carmona, W. Weerachatanukul, T. Soboloff, A. L. Fluharty, D. White, L. Promdee, M. Ekker, T. Berger, M. Buhr, N. Tanphaichitr, *Dev. Biol.* **2002**, 247, 182.
- [82] E. Carmona, W. Weerachatanukul, H. Xu, A. Fluharty, A. Anupriwan, A. Shoushtarian, K. Chakrabandhu, N. Tanphaichitr, *Biol. Reprod.* **2002**, 66, 1820.
- [83] J. F. Robyt, *Essentials of Carbohydrate Chemistry*, Springer, New York, **1998**.
- [84] T. Islam, R. J. Linhardt in *Carbohydrate-based Drug Discovery, Vol. 1* (Hrsg.: C. H. Wong), Wiley-VCH, Weinheim, **2003**, S. 407.
- [85] K. S. Dodgson, B. Spencer, *Biochem. J.* **1957**, 65, 668.
- [86] R. Matalon, B. Arbogast, A. Dorfman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1974**, 61, 1450.
- [87] J. F. O'Brien, M. Cantz, J. Spranger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1974**, 60, 1170.
- [88] J. Bielicki, J. J. Hopwood, *Biochem. J.* **1991**, 279, 515.
- [89] J. Bielicki, M. Fuller, X. H. Guo, G. P. Morris, J. J. Hopwood, D. S. Anson, *Biochem. J.* **1995**, 311, 333.
- [90] B. Winchester in *Biology of the Lysosome, Vol. 27* (Hrsg.: J. B. Lloyd, R. W. Mason), Plenum, New York, **1996**, S. 191.
- [91] C. Freeman, J. J. Hopwood, *Biochem. J.* **1991**, 279, 399.
- [92] U. Lindahl, G. Backstrom, L. Thunberg, I. G. Leder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, 6551.
- [93] I. G. Leder, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, 94, 1183.
- [94] G. J. Gibson, G. T. Saccone, D. A. Brooks, P. R. Clements, J. J. Hopwood, *Biochem. J.* **1987**, 248, 755.
- [95] C. Freeman, J. J. Hopwood, *Biochem. J.* **1986**, 234, 83.
- [96] L. C. Ginsberg, D. T. Di Ferrante, N. Di Ferrante, *Carbohydr. Res.* **1978**, 64, 225.
- [97] G. K. Dhoot, M. K. Gustafsson, X. Ai, W. Sun, D. M. Standiford, C. P. Emerson, Jr., *Science* **2001**, 293, 1663.
- [98] J. L. Mullor, A. Ruiz i. Altaba, *BioEssays* **2002**, 24, 22.
- [99] X. Ai, A.-T. Do, O. Lozynska, M. Kusche-Gullberg, U. Lindahl, C. P. Emerson, Jr., *J. Cell Biol.* **2003**, 162, 341.
- [100] J. Lai, J. Chien, J. Staub, R. Avula, E. L. Greene, T. A. Matthews, D. I. Smith, S. H. Kaufmann, L. R. Roberts, V. Shridhar, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 23107.
- [101] G. H. Baeg, X. H. Lin, N. Khare, S. Baumgartner, N. Perrimon, *Development* **2001**, 128, 87.
- [102] Z. L. Wu, L. Zhang, T. Yabe, B. Kuberan, D. L. Beeler, A. Love, R. D. Rosenberg, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 17121.
- [103] D. A. Pye, R. R. Vives, J. E. Turnbull, P. Hyde, J. T. Gallagher, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 22936.
- [104] K. Kamimura, M. Fujise, F. Villa, S. Izumi, H. Habuchi, K. Kimata, H. Nakato, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 17014.
- [105] X. H. Lin, N. Perrimon, *Nature* **1999**, 400, 281.
- [106] M. Tsuda, K. Kamimura, H. Nakato, M. Archer, W. Staatz, B. Fox, M. Humphrey, S. Olson, T. Futch, V. Kaluza, E. Siegfried, L. Stam, S. B. Selleck, *Nature* **1999**, 400, 276.
- [107] J. D. Esko, S. B. Selleck, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, 71, 435.
- [108] T. Ohto, H. Uchida, H. Yamazaki, K. Keino-Masu, A. Matsui, M. Masu, *Genes Cells* **2002**, 7, 173.
- [109] D. A. Pye, R. R. Vives, P. Hyde, J. T. Gallagher, *Glycobiology* **2000**, 10, 1183.
- [110] J. Schlessinger, A. N. Plotnikov, O. A. Ibrahimi, A. V. Eliseenkova, B. K. Yeh, A. Yayon, R. J. Linhardt, M. Mohammadi, *Mol. Cell* **2000**, 6, 743.
- [111] R. Sasisekharan, Z. Shriver, G. Venkataraman, U. Narayanasami, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, 2, 521.
- [112] D. F. Liu, Z. Shriver, G. Venkataraman, Y. El Shabrawi, R. Sasisekharan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 568.
- [113] K. Yamada, K. Akasaka, H. Shimada, *Eur. J. Biochem.* **1989**, 186, 405.
- [114] Q. Yang, L. M. Angerer, R. C. Angerer, *Dev. Biol.* **1989**, 135, 53.
- [115] E. S. Haag, R. A. Raff, *Dev. Genes Evol.* **1998**, 208, 188.
- [116] H. Sasaki, K. Yamada, K. Akasaka, H. Kawasaki, K. Suzuki, A. Saito, M. Sato, H. Shimada, *Eur. J. Biochem.* **1988**, 177, 9.
- [117] S. Kinoshita, H. Saiga, *Exp. Cell Res.* **1979**, 123, 229.
- [118] A. C. Rapraeger, D. Epel, *Dev. Biol.* **1981**, 88, 269.
- [119] C. A. Etensohn, H. C. Sweet, *Curr. Top. Dev. Biol.* **2000**, 50, 1.
- [120] R. Hobkirk, *Trends Endocrinol. Metab.* **1993**, 4, 69.
- [121] C. Stein, A. Hille, J. Seidel, S. Rijnbout, A. Waheed, B. Schmidt, H. Geuze, K. von Figura, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 13865.
- [122] L. Dibbelt, E. Kuss, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1991**, 372, 173.
- [123] C. T. Noel, M. J. Reed, H. S. Jacobs, V. H. T. James, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1981**, 14, 1101.
- [124] S. Ahmed, C. P. Owen, K. James, L. Sampson, C. K. Patel, *Curr. Med. Chem.* **2002**, 9, 263.
- [125] Y. Miyoshi, A. Ando, S. Hasegawa, M. Ishitobi, T. Taguchi, Y. Tamaki, S. Noguchi, *Clin. Cancer Res.* **2003**, 9, 2288.
- [126] 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.
- [127] A. Billich, P. Nussbaumer, P. Lehr, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2000**, 73, 225.
- [128] D. Poirier, L. C. Ciobanu, R. Maltais, *Expert Opin. Ther. Pat.* **1999**, 9, 1083.
- [129] B. Franco, G. Meroni, G. Parenti, J. Leveilliers, L. Bernard, M. Gebbia, L. Cox, P. Maroteaux, L. Sheffield, G. A. Rappold, G. Andria, C. Petit, A. Ballabio, *Cell* **1995**, 81, 15.
- [130] A. A. Puca, M. Zollo, M. Repetto, G. Andolfi, A. Guffanti, G. Simon, A. Ballabio, B. Franco, *Genomics* **1997**, 42, 192.
- [131] G. Meroni, B. Franco, N. Archidiacono, S. Messali, G. Andolfi, M. Rocchi, A. Ballabio, *Hum. Mol. Genet.* **1996**, 5, 423.
- [132] G. Parenti, G. Meroni, A. Ballabio, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1997**, 7, 386.
- [133] P. Ferrante, S. Messali, G. Meroni, A. Ballabio, *Eur. J. Hum. Genet.* **2002**, 10, 813.
- [134] A. Daniele, G. Parenti, M. d'Addio, G. Andria, A. Ballabio, G. Meroni, *Am. J. Hum. Genet.* **1998**, 62, 562.
- [135] P. Urbitsch, M. J. Salzer, P. Hirschmann, P. H. Vogt, *DNA Cell Biol.* **2000**, 19, 765.
- [136] G. Parenti, P. Buttitta, G. Meroni, B. Franco, L. Bernard, M. G. Rizzolo, N. Brunetti-Pierri, A. Ballabio, G. Andria, *Am. J. Med. Genet.* **1997**, 73, 139.
- [137] J. G. Hall, R. M. Pauli, K. M. Wilson, *Am. J. Med.* **1980**, 68, 122.
- [138] E. Arikawa-Hirasawa, H. Watanabe, H. Takami, J. R. Hassell, Y. Yamada, *Nat. Genet.* **1999**, 23, 354.

- [139] M. Bernfield, M. Gotte, P. W. Park, O. Reizes, M. L. Fitzgerald, J. Lincecum, M. Zako, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, 68, 729.
- [140] N. Perrimon, M. Bernfield, *Nature* **2000**, 404, 725.
- [141] M. W. H. Coughtrie, S. Sharp, K. Maxwell, N. P. Innes, *Chem.-Biol. Interact.* **1998**, 109, 3.
- [142] K. Richard, R. Hume, E. Kaptein, E. L. Stanley, T. J. Visser, M. W. H. Coughtrie, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2001**, 86, 2734.
- [143] C. A. Strott, *Endocr. Rev.* **2002**, 23, 703.
- [144] M. H. A. Kester, E. Kaptein, C. H. Van Dijk, T. J. Roest, D. Tibboel, M. W. H. Coughtrie, T. J. Visser, *Endocrinology* **2002**, 143, 814.
- [145] T. P. Dooley, R. Haldeman-Cahill, J. Joiner, T. W. Wilborn, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, 277, 236.
- [146] K. S. Dodgson, *Enzymologia* **1959**, 20, 301.
- [147] H. Hatanaka, F. Egami, I. Ishizuka, Y. Nagai, *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, 438, 176.
- [148] H. Hatanaka, Y. Ogawa, F. Egami, *Biochem. J.* **1976**, 159, 445.
- [149] M. G. L. Medeiros, T. Ferreira, E. L. Leite, L. Toma, C. P. Dietrich, H. B. Nader, *Comp. Biochem. Physiol. Part A* **1998**, 119, 539.
- [150] T. Moriya, M. Hoshi, *Arch. Biochem. Biophys.* **1980**, 201, 216.
- [151] F. W. Oliveira, S. F. Chavante, E. A. Santos, C. P. Dietrich, H. B. Nader, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1200, 241.
- [152] A. Ratzka, H. Vogel, D. J. Kliebenstein, T. Mitchell-Olds, J. Kroymann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 11 223.
- [153] A. B. Roy, *Methods Enzymol.* **1987**, 143, 361.
- [154] K. S. Dodgson, G. M. Powell, *Biochem. J.* **1959**, 73, 666.
- [155] U. Wittstock, M. Fischer, I. Svendsen, B. A. Halkier, *IUBMB Life* **2000**, 49, 71.
- [156] G. R. J. Burns, C. H. Wynn, *Biochem. J.* **1977**, 166, 415.
- [157] W. G. McGuire, G. A. Marzluf, *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, 161, 360.
- [158] J. V. Palletta, *Mol. Cell. Biol.* **1989**, 9, 3630.
- [159] E. L. de Hostos, R. K. Togasaki, A. Grossman, *J. Cell Biol.* **1988**, 106, 29.
- [160] E. L. de Hostos, J. Schilling, A. R. Grossman, *Mol. Gen. Genet.* **1989**, 218, 229.
- [161] A. Hallmann, M. Sumper, *Eur. J. Biochem.* **1994**, 221, 143.
- [162] G. A. Marzluf in *Advances in Genetics*, Vol. 31, Academic Press, San Diego, **1994**, S. 187.
- [163] G. A. Marzluf, *Annu. Rev. Microbiol.* **1997**, 51, 73.
- [164] W. A. Scott, R. Metzenbel, *J. Bacteriol.* **1970**, 104, 1254.
- [165] T. Adachi, Y. Murooka, T. Harada, *J. Bacteriol.* **1975**, 121, 29.
- [166] Y. Murooka, T. Harada, *J. Bacteriol.* **1981**, 145, 796.
- [167] M. J. Henderson, F. H. Milazzo, *J. Bacteriol.* **1979**, 139, 80.
- [168] J. W. Fitzgerald, F. H. Milazzo, *Int. J. Biochem.* **1975**, 6, 769.
- [169] M. A. Kertesz, T. Leisinger, A. M. Cook, *J. Bacteriol.* **1993**, 175, 1187.
- [170] Y. Murooka, M.-H. Yim, T. Harada, *Appl. Environ. Microbiol.* **1980**, 39, 812.
- [171] J. O. Falkinham III, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1990**, 40, 66.
- [172] H. Tomioka, H. Saito, K. Sato, D. J. Dawson, *J. Clin. Microbiol.* **1990**, 28, 2104.
- [173] S. Beil, H. Kehrl, P. James, W. Staudenmann, A. M. Cook, T. Leisinger, M. A. Kertesz, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 229, 385.
- [174] J. Hummerjohann, E. Kottel, M. Quadroni, J. Ragaller, T. Leisinger, M. A. Kertesz, *Microbiology* **1998**, 144, 1375.
- [175] S. Mueller, A. Schmidt, *Z. Naturforsch. C* **1986**, 41, 820.
- [176] J. W. Fitzgerald, M. E. Cline, *FEMS Microbiol. Lett.* **1977**, 2, 221.
- [177] M. A. Kertesz, *Res. Microbiol.* **2001**, 152, 279.
- [178] T. Harada, *Biochim. Biophys. Acta* **1964**, 81, 193.
- [179] J. J. Lucas, S. W. Burchiel, I. H. Segel, *Arch. Biochem. Biophys.* **1972**, 153, 664.
- [180] I. Takebe, *J. Biochem.* **1961**, 50, 245.
- [181] M. Osteras, E. Boncompagni, N. Vincent, M. C. Poggi, D. Le Rudulier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 11394.
- [182] L. T. Smith, J. A. Pocard, T. Bernard, D. Lerudulier, *J. Bacteriol.* **1988**, 170, 3142.
- [183] S. Ernst, R. Langer, C. L. Cooney, R. Sasisekharan, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1995**, 30, 387.
- [184] M. J. Hernaiz, R. J. Linhardt in *Proteoglycan Protocols*, Vol. 171 (Hrsg.: R. V. Iozzo), Humana Press, Totowa, **2001**, S. 363.
- [185] L. A. LeBrun, R. J. Linhardt in *Proteoglycan Protocols*, Vol. 171 (Hrsg.: R. V. Iozzo), Humana Press, Totowa, **2001**, S. 353.
- [186] M. W. McLean, J. S. Bruce, W. F. Long, F. B. Williamson, *Eur. J. Biochem.* **1984**, 145, 607.
- [187] J. S. Bruce, M. W. McLean, W. F. Long, F. B. Williamson, *Eur. J. Biochem.* **1985**, 148, 359.
- [188] J. S. Bruce, M. W. McLean, W. F. Long, F. B. Williamson, *Eur. J. Biochem.* **1987**, 165, 633.
- [189] J. S. Bruce, M. W. McLean, F. B. Williamson, W. F. Long, *Eur. J. Biochem.* **1985**, 152, 75.
- [190] V. Hwa, A. A. Salyers, *J. Bacteriol.* **1992**, 174, 342.
- [191] A. A. Salyers, M. O'Brien, *J. Bacteriol.* **1980**, 143, 772.
- [192] K. Sugahara, T. Kojima, *Eur. J. Biochem.* **1996**, 239, 865.
- [193] K. Sugahara, K. Shigeno, M. Masuda, N. Fujii, A. Kurosaka, K. Takeda, *Carbohydr. Res.* **1994**, 255, 145.
- [194] K. Sugahara, Y. Takemura, M. Sugiura, Y. Kohno, K. Yoshida, K. Takeda, K. H. Khoo, H. R. Morris, A. Dell, *Carbohydr. Res.* **1994**, 255, 165.
- [195] T. Yamagata, H. Saito, O. Habuchi, S. Suzuki, *J. Biol. Chem.* **1968**, 243, 1523.
- [196] G. J. Strous, J. Dekker, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1992**, 27, 57.
- [197] A. M. Robertson, S. I. Rosendale, D. P. Wright in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 125 (Hrsg.: A. P. Corfield), Humana Press, Totowa, **1999**, S. 417.
- [198] A. V. Nieuw Amerongen, J. G. Bolscher, E. Bloemena, E. C. Veerman, *Biol. Chem.* **1998**, 379, 1.
- [199] A. P. Corfield, D. Carroll, N. Myerscough, C. S. J. Probert, *Front. Biosci.* **2001**, 6, D1321.
- [200] A. M. Robertson, D. P. Wright, *Can. J. Gastroenterol.* **1997**, 11, 361.
- [201] A. M. Robertson, A. P. Corfield, *Mucin Degradation and Its Significance in Inflammatory Conditions of the Gastrointestinal Tract*, Kluwer, Norwell, **1999**.
- [202] H. H. Tsai, C. A. Hart, J. M. Rhodes, *Lett. Appl. Microbiol.* **1991**, 13, 97.
- [203] J. W. Smalley, D. Dwarakanath, J. M. Rhodes, C. A. Hart, *Caries Res.* **1994**, 28, 416.
- [204] A. P. Corfield, S. A. Wagner, J. R. Clamp, M. S. Kriaris, L. C. Hoskins, *Infect. Immun.* **1992**, 60, 3971.
- [205] V. L. N. Murty, J. Piotrowski, M. Morita, A. Slomiany, B. L. Slomiany, *Biochem. Int.* **1992**, 26, 1091.
- [206] H. H. Tsai, D. Sunderland, G. R. Gibson, C. A. Hart, J. M. Rhodes, *Clin. Sci.* **1992**, 82, 447.
- [207] A. M. Robertson, C. G. McKenzie, N. Sharfe, L. B. Stubbs, *Biochem. J.* **1993**, 293, 683.
- [208] K. Clinch, G. B. Evans, R. H. Furneaux, P. M. Rendle, P. L. Rhodes, A. M. Robertson, D. I. Rosendale, P. C. Tyler, D. P. Wright, *Carbohydr. Res.* **2002**, 337, 1095.
- [209] D. P. Wright, D. I. Rosendale, A. M. Robertson, *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, 190, 73.
- [210] H. H. Tsai, A. D. Dwarakanath, C. A. Hart, J. D. Milton, J. M. Rhodes, *Gut* **1995**, 36, 570.
- [211] A. P. Corfield, S. A. Wagner, L. J. D. Odonnell, P. Durdey, R. A. Mountford, J. R. Clamp, *Glycoconjugate J.* **1993**, 10, 72.
- [212] B. L. Slomiany, V. L. Murty, J. Piotrowski, M. Grabska, A. Slomiany, *Am. J. Gastroenterol.* **1992**, 87, 1132.
- [213] J. R. W. Govan, V. Deretic, *Microbiol. Rev.* **1996**, 60, 539.

- [214] R. Ramphal, C. Carnoy, S. Fiebre, J. C. Michalski, N. Houdret, G. Lamblin, G. Strecker, P. Roussel, *Infect. Immun.* **1991**, 59, 700.
- [215] A. Scharfman, E. VanBrussel, N. Houdret, G. Lamblin, P. Roussel, *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* **1996**, 154, S163.
- [216] J. Piotrowski, A. Slomiany, V. L. N. Murty, Z. Fekete, B. L. Slomiany, *Biochem. Int.* **1991**, 24, 749.
- [217] J. D. Mougous, R. E. Green, S. J. Williams, S. E. Brenner, C. R. Bertozzi, *Chem. Biol.* **2002**, 9, 767.
- [218] J. Parkhill, B. W. Wren, N. R. Thomson, R. W. Titball, M. T. Holden, M. B. Prentice, M. Sebahia, K. D. James, C. Churcher, K. L. Mungall, S. Baker, D. Basham, S. D. Bentley, K. Brooks, A. M. Cerdano-Tarraga, T. Chillingworth, A. Cronin, R. M. Davies, P. Davis, G. Dougan, T. Feltwell, N. Hamlin, S. Holroyd, K. Jagels, A. V. Karlyshev, S. Leather, S. Moule, P. C. Oyston, M. Quail, K. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, K. Stevens, S. Whitehead, B. G. Barrell, *Nature* **2001**, 413, 523.
- [219] J. Parkhill, G. Dougan, K. D. James, N. R. Thomson, D. Pickard, J. Wain, C. Churcher, K. L. Mungall, S. D. Bentley, M. T. Holden, M. Sebahia, S. Baker, D. Basham, K. Brooks, T. Chillingworth, P. Connerton, A. Cronin, P. Davis, R. M. Davies, L. Dowd, N. White, J. Farrar, T. Feltwell, N. Hamlin, A. Haque, T. T. Hien, S. Holroyd, K. Jagels, A. Krogh, T. S. Larsen, S. Leather, S. Moule, P. O'Gaora, C. Parry, M. Quail, K. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, K. Stevens, S. Whitehead, B. G. Barrell, *Nature* **2001**, 413, 848.
- [220] I. T. Paulsen, L. Banerjee, G. S. Myers, K. E. Nelson, R. Seshadri, T. D. Read, D. E. Fouts, J. A. Eisen, S. R. Gill, J. F. Heidelberg, H. Tettelin, R. J. Dodson, L. Umayam, L. Brinkac, M. Beanan, S. Daugherty, R. T. DeBoy, S. Durkin, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, J. Vamathevan, B. Tran, J. Upton, T. Hansen, J. Shetty, H. Khouri, T. Utterback, D. Radune, K. A. Ketchum, B. A. Dougherty, C. M. Fraser, *Science* **2003**, 299, 2071.
- [221] T. D. Read, S. L. Salzberg, M. Pop, M. Shumway, L. Umayam, L. Jiang, E. Holtzapple, J. D. Busch, K. L. Smith, J. M. Schupp, D. Solomon, P. Keim, C. M. Fraser, *Science* **2002**, 296, 2028.
- [222] H. Tettelin, V. Maignani, M. J. Cieslewicz, J. A. Eisen, S. Peterson, M. R. Wessels, I. T. Paulsen, K. E. Nelson, I. Margarit, T. D. Read, L. C. Madoff, A. M. Wolf, M. J. Beanan, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, R. T. DeBoy, A. S. Durkin, J. F. Kolonay, R. Madupu, M. R. Lewis, D. Radune, N. B. Fedorova, D. Scanlan, H. Khouri, S. Mulligan, H. A. Carty, R. T. Cline, S. E. Van Aken, J. Gill, M. Scarselli, M. Mora, E. T. Iacobini, C. Brettoni, G. Galli, M. Mariani, F. Vegni, D. Maione, D. Rinaldo, R. Rappuoli, J. L. Telford, D. L. Kasper, G. Grandi, C. M. Fraser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 12391.
- [223] J. A. Hoffman, J. L. Badger, Y. Zhang, S.-H. Huang, K. S. Kim, *Infect. Immun.* **2000**, 68, 5062.
- [224] E. Von Angerer, J. Prekajac, *J. Med. Chem.* **1983**, 26, 113.
- [225] E. Von Angerer, J. Prekajac, J. Strohmeier, *J. Med. Chem.* **1984**, 27, 1439.
- [226] H. Birnbock, E. Von Angerer, *Biochem. Pharmacol.* **1990**, 39, 1709.
- [227] S. J. Santner, R. J. Santen, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1993**, 45, 383.
- [228] C. K. Wong, W. M. Keung, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, 233, 579.
- [229] K. Carlstrom, A. K. Vonuexkull, N. Einhorn, B. Fredricsson, N. O. Lunell, P. Sundelin, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **1983**, 62, 519.
- [230] N. Terakawa, H. Ikegami, I. Shimizu, T. Aono, O. Tanizawa, K. Matsumoto, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1987**, 28, 571.
- [231] N. M. Howarth, G. Cooper, A. Purohit, L. Duncan, M. J. Reed, B. V. L. Potter, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, 3, 313.
- [232] L. Duncan, A. Purohit, N. M. Howarth, B. V. L. Potter, M. J. Reed, *Cancer Res.* **1993**, 53, 298.
- [233] N. M. Howarth, A. Purohit, J. J. Robinson, N. Vicker, M. J. Reed, B. V. L. Potter, *Biochemistry* **2002**, 41, 14801.
- [234] C. J. Anderson, L. J. H. Lucas, T. S. Widlanski, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 3889.
- [235] C. Anderson, J. Freeman, L. H. Lucas, M. Farley, H. Dalhoumi, T. S. Widlanski, *Biochemistry* **1997**, 36, 2586.
- [236] D. Poirier, R. P. Boivin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 1891.
- [237] L. C. Ciobanu, R. P. Boivin, V. Luu-The, F. Labrie, D. Poirier, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 2280.
- [238] L. C. Ciobanu, D. Poirier, *J. Comb. Chem.* **2003**, 5, 429.
- [239] R. P. Boivin, V. Luu-The, R. Lachance, F. Labrie, D. Poirier, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 4465.
- [240] L. C. Ciobanu, R. P. Boivin, V. Luu-The, D. Poirier, *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, 36, 659.
- [241] N. M. Howarth, A. Purohit, M. J. Reed, B. V. L. Potter, *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 219.
- [242] A. Purohit, G. J. Williams, N. M. Howarth, B. V. L. Potter, M. J. Reed, *Biochemistry* **1995**, 34, 11508.
- [243] L. W. L. Woo, A. Purohit, M. J. Reed, B. V. L. Potter, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 3075.
- [244] L. W. L. Woo, A. Purohit, M. J. Reed, B. V. L. Potter, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 1349.
- [245] A. Purohit, L. W. L. Woo, A. Singh, C. J. Winterborn, B. V. L. Potter, M. J. Reed, *Cancer Res.* **1996**, 56, 4950.
- [246] L. W. L. Woo, A. Purohit, B. Malini, M. J. Reed, B. V. L. Potter, *Chem. Biol.* **2000**, 7, 773.
- [247] L. W. L. Woo, N. M. Howarth, A. Purohit, H. A. M. Hejaz, M. J. Reed, B. V. L. Potter, *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 1068.
- [248] L. W. Woo, O. B. Sutcliffe, C. Bubert, A. Grasso, S. K. Chander, A. Purohit, M. J. Reed, B. V. Potter, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 3193.
- [249] P. Nussbaumer, P. Lehr, A. Billich, *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 4310.
- [250] P. Nussbaumer, P. Lehr, A. Billich, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 5091.
- [251] P. Nussbaumer, M. Bilban, A. Billich, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 2093.
- [252] P. Jutten, W. Schumann, A. Hartl, L. Heinisch, U. Grafe, W. Werner, H. Ulbricht, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 1339.
- [253] S. Ahmed, K. James, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 1645.
- [254] S. Ahmed, K. James, L. Sampson, C. Matri, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, 254, 811.
- [255] S. Ahmed, K. James, C. K. Patel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, 272, 583.
- [256] S. Ahmed, C. P. Owen, K. James, C. K. Patel, M. Patel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 899.
- [257] S. Ahmed, K. James, C. P. Owen, C. K. Patel, M. Patel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 841.
- [258] S. Ahmed, K. James, C. P. Owen, C. K. Patel, M. Patel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 2525.
- [259] S. Ahmed, K. James, C. P. Owen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 2391.
- [260] C. K. Patel, C. P. Owen, S. Ahmed, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 307, 778.
- [261] S. Ahmed, K. James, C. P. Owen, C. K. Patel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 1343.
- [262] S. Ahmed, K. James, C. P. Owen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 294, 180.
- [263] J. M. Trowbridge, R. L. Gallo, *Glycobiology* **2002**, 12, 117R.
- [264] Z. Shriver, D. F. Liu, R. Sasisekharan, *Trends Cardiovasc. Med.* **2002**, 12, 71.
- [265] E. M. Selva, N. Perrimon, *Adv. Cancer Res.* **2001**, 83, 67.
- [266] C. Yuen, K. Bezouska, J. O'Brien, M. Stoll, R. Lemoine, A. Lubineau, M. Kiso, A. Hasegawa, N. Bockovich, K. Nicolaou, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 1595.

- [267] P. J. Green, C. T. Yuen, R. A. Childs, W. Chai, M. Miyasaka, R. Lemoine, A. Lubineau, B. Smith, H. Ueno, K. C. Nicolaou, *Glycobiology* **1995**, 5, 29.
- [268] M. Petitou, J. P. Herault, A. Bernat, P. A. Driguez, P. Duchois, J. C. Lormeau, J. M. Herbert, *Nature* **1999**, 398, 417.
- [269] T. Toida, R. E. Hileman, A. E. Smith, P. I. Vlahova, R. J. Linhardt, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 32040.
- [270] R. V. Iozzo, J. D. San Antonio, *J. Clin. Invest.* **2001**, 108, 349.
- [271] M. Bomsel, A. Alfsen, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, 4, 57.
- [272] K. S. Rostand, J. D. Esko, *Infect. Immun.* **1997**, 65, 1.
- [273] T. Wadstrom, A. Ljungh, *J. Med. Microbiol.* **1999**, 48, 223.
- [274] R. Sasisekharan, Z. Shriver, S. Mallik, G. Venkataraman in *Carbohydrate-based Drug Discovery, Vol. 2* (Hrsg.: C.-H. Wong), Wiley-VCH, Weinheim, **2003**, S. 517.
- [275] J. Turnbull, A. Powell, S. Guimond, *Trends Cell Biol.* **2001**, 11, 75.
- [276] I. Capila, R. J. Linhardt, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 426; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 39.
- [277] D. L. Rabenstein, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, 19, 312.
- [278] J. E. Turnbull, J. J. Hopwood, J. T. Gallagher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 2698.
- [279] G. Venkataraman, Z. Shriver, R. Raman, R. Sasisekharan, *Science* **1999**, 286, 537.
- [280] R. R. Vives, D. A. Pye, M. Salmivirta, J. J. Hopwood, U. Lindahl, J. T. Gallagher, *Biochem. J.* **1999**, 339, 767.
- [281] S. E. Stringer, B. S. Kandola, D. A. Pye, J. T. Gallagher, *Glycobiology* **2003**, 13, 97.
- [282] C. L. R. Merry, M. Lyon, J. A. Deakin, J. J. Hopwood, J. T. Gallagher, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 18455.
- [283] P. Jemth, J. Kreuger, M. Kusche-Gullberg, L. Sturiale, G. Gimenez-Gallego, U. Lindahl, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 30567.
- [284] S. E. Guimond, J. E. Turnbull, *Curr. Biol.* **1999**, 9, 1343.
- [285] Z. Shriver, M. Sundaram, G. Venkataraman, J. Fareed, R. Linhardt, K. Biemann, R. Sasisekharan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 10365.
- [286] Z. Shriver, R. Raman, G. Venkataraman, K. Drummond, J. Turnbull, T. Toida, R. Linhardt, K. Biemann, R. Sasisekharan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 10359.
- [287] N. Keiser, G. Venkataraman, Z. Shriver, R. Sasisekharan, *Nat. Med.* **2001**, 7, 123.
- [288] J. Liu, Z. Shriver, R. M. Pope, S. C. Thorp, M. B. Duncan, R. J. Copeland, C. S. Raska, K. Yoshida, R. J. Eisenberg, G. Cohen, R. J. Linhardt, R. Sasisekharan, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 33456.
- [289] R. M. Lauder, T. N. Huckerby, I. A. Nieduszynski, *Glycobiology* **2000**, 10, 393.
- [290] H. O. Yang, N. S. Gunay, T. Toida, B. Kuberan, G. Yu, Y. S. Kim, R. J. Linhardt, *Glycobiology* **2000**, 10, 1033.
- [291] E. E. Simanek, G. J. McGarvey, J. A. Jablonowski, C. H. Wong, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 833.
- [292] P. Sears, C.-H. Wong, *Science* **2001**, 291, 2344.
- [293] P. H. Seeberger, *J. Carbohydr. Chem.* **2002**, 21, 613.
- [294] K. M. Koeller, C.-H. Wong, *Glycobiology* **2000**, 10, 1157.
- [295] K. M. Koeller, C.-H. Wong, *Nature* **2001**, 409, 232.
- [296] A. Lubineau, R. Lemoine, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 8795.
- [297] K. G. Bowman, B. N. Cook, C. L. de Graffenried, C. R. Bertozzi, *Biochemistry* **2001**, 40, 5382.
- [298] T. Yoshida, *Carbohydr. Res.* **1997**, 304, 249.
- [299] G. V. Reddy, R. K. Jain, R. D. Locke, K. L. Matta, *Carbohydr. Res.* **1996**, 280, 261.
- [300] H. Uzawa, T. Toba, Y. Nishida, K. Kobayashi, N. Minoura, K. Hiratani, *Chem. Commun.* **1998**, 2311.
- [301] H. Uzawa, Y. Nishida, K. Sasaki, N. Minoura, K. Kobayashi, *ChemBioChem* **2003**, 4, 640.
- [302] D. Page, R. Roy, *Glycoconjugate J.* **1997**, 14, 345.
- [303] Z. L. Wu, L. Zhang, D. L. Beeler, B. Kuberan, R. D. Rosenberg, *FASEB J.* **2002**, 16, 539.
- [304] Y. Sawada, T. Ueki, S. Yamamoto, K. Tomita, Y. Fukagawa, T. Oki, *Eur. Pat. Appl.* **1991**, 16.
- [305] J. K. Whalen, P. R. Warman, *Biol. Fertil. Soils* **1996**, 23, 64.
- [306] C. H. L. Shackleton, E. Roitman, A. Phillips, T. Chang, *Steroids* **1997**, 62, 665.
- [307] M. Yegles, F. Mersch, R. Wennig, *Forensic Sci. Int.* **1997**, 84, 211.
- [308] D. Schleheck, M. Lechner, R. Schonenberger, M. J.-F. Suter, A. M. Cook, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, 69, 938.
- [309] A. J. Ellis, S. G. Hales, N. G. A. Ur-Rehman, G. F. White, *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, 68, 31.
- [310] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>.