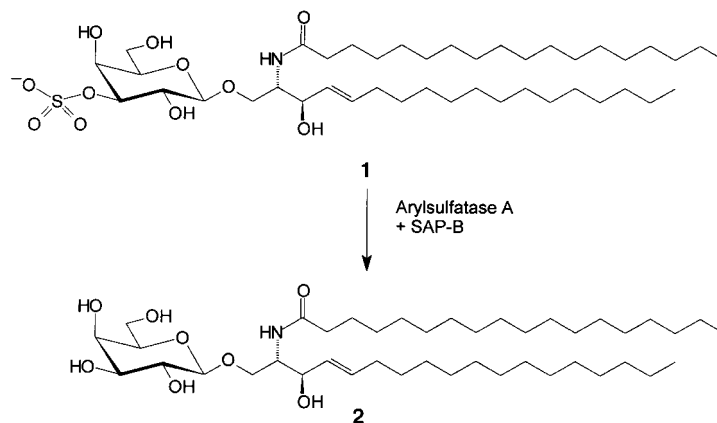


Wie werden Schwefelsäureester in der Natur gespalten? Eine neuartige posttranslationale Proteinmodifikation bei Sulfatasen

Gunther Uhlhorn-Dierks, Thomas Kolter und Konrad Sandhoff*

Alkyl- und Arylsulfate sind chemisch relativ stabile Verbindungen, deren Spaltung, beispielsweise durch alkalische Hydrolyse, drastische Reaktionsbedingungen erfordert. Sie finden Verwendung als anionische Detergentien und sind Bestandteile von Waschmitteln. Schwefelsäureester von Alkoholen kommen darüber hinaus natürlich vor, so im Heparin, in den Mucopolysacchariden Chondroitinsulfat und Keratansulfat, in sulfatierten Steroiden und als Tyrosinsulfat in den Peptidhormonen Gastrin und Cholecystokinin. Auch bei der Metabolisierung körperfremder Stoffe ist die Konjugation mit einer Sulfatgruppe von Bedeutung. Die Untersuchung einer Erbkrankheit hat im Arbeitskreis von Kurt von Figura zum Verständnis des Mechanismus geführt, nach dem in der Natur Schwefelsäureester gespalten werden. Dabei wurde eine neuartige posttranslationale Modifikation nachgewiesen, die für diese enzymatisch katalysierte Reaktion erforderlich ist.^[1]

Organische Sulfate werden enzymatisch durch Sulfatasen abgebaut, von denen beim Menschen neun charakterisiert werden konnten.^[2, 3] Sie sind – mit Ausnahme der Steroidsulfatase – in den Lysosomen der Zelle lokalisiert. Verschiedene Erbkrankheiten sind bekannt, die auf dem Defekt jeweils einer Sulfatase beruhen und die zu einer gewebsspezifischen Akkumulation der nicht abbaubaren Schwefelsäureester führen: Man unterscheidet zwischen der metachromatischen Leukodystrophie (MLD), der Mucopolysaccharidose und der Ichthyose. Bei Patienten, die an MLD leiden, ist die Arylsulfatase A (ASA) defekt.^[4, 5] Der Name „Arylsulfatase“ wurde von ihrer Fähigkeit abgeleitet, künstliche Arylsulfate zu spalten. Die Arylsulfatase A spaltet in Gegenwart eines Cofaktors, eines Sphingolipid-Aktivatorproteins (SAP-B), Sulfatide (Schema 1).^[6] MLD führt daher zur Akkumulation von Sulfatiden, Schwefelsäureestern der Galactocerebroside, in verschiedenen Organen, meist zum Schwinden der weißen Gehirnschicht und zum Tod der Patienten in der Kindheit. Der Name „metachromatische Leukodystrophie“ beruht auf der metachromatischen Anfärbung der gespeicherten Substanzen in histologischen Schnitten, d. h., beim Anfärben mit



Schema 1. Hydrolyse des Sulfatids **1** zum Galactosylceramid **2**. Die Reaktion wird von der Arylsulfatase A katalysiert. Als Cofaktor wird ein Sphingolipid-Aktivatorprotein, SAP-B, benötigt. Die Defizienz der Arylsulfatase A führt beim Menschen zur metachromatischen Leukodystrophie.

Kresylviolett verschiebt sich das Absorptionsmaximum, so daß die Einschlüsse braun erscheinen.^[4]

Bei einer sehr seltenen Erbkrankheit, der multiplen Sulfatasedefizienz (MSD) oder Austinschen Erkrankung, weisen alle Sulfatasen eine stark erniedrigte Aktivität auf. Das klinische Erscheinungsbild umfaßt mehrere Symptome einzelner Sulfatase-Defekte. Die genetische Ursache der MSD ist bis heute unbekannt. Durch Komplementationstudien wurde allerdings festgestellt, daß die Gene, die die einzelnen Sulfatasen codieren, nicht betroffen sind; es handelt sich also nicht um einen zufälligen gemeinsamen Ausfall mehrerer Enzyme.^[7, 8] Wenn man die komplementäre DNA (cDNA) für eine intakte Sulfatase in kultivierten Zellen von MSD-Patienten exprimiert, ist die Aktivität des Enzyms stark erniedrigt.^[9] Diese experimentellen Befunde lieferten schon früh Hinweise auf einen sekundären Defekt, z. B. eine fehlerhafte co- oder posttranslationale Modifikation, die für die katalytische Aktivität der Sulfatasen erforderlich ist.

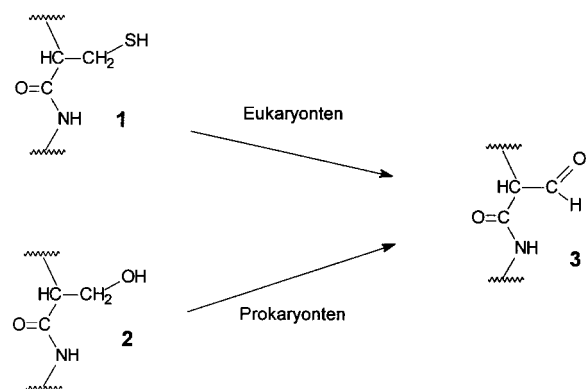
Die enzymatisch aktive Arylsulfatase A wurde daraufhin gereinigt und proteinchemisch sowie massenspektrometrisch auf eine posttranslationale Modifikation hin untersucht.^[1] Nach Spaltung mit der Protease Trypsin und enzymatischer Abspaltung N-glycosidisch gebundener Oligosaccharideinheiten konnte ein Peptid isoliert werden, dessen Masse nicht mit der aus der DNA-Sequenz errechneten übereinstimmte.

[*] Prof. Dr. K. Sandhoff, G. Uhlhorn-Dierks, Dr. T. Kolter
Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität
Gerhard-Domagk-Straße 1, D-53121 Bonn
Fax: (+49) 228-73-7778
E-mail: sandhoff@uni-bonn.de

Die Masse dieses Peptids, das die Aminosäuren 59–73 der ASA umfaßt, lag nach reduktiver Carboxymethylierung erstaunlicherweise um 74 Da unter der errechneten. Viele posttranslationale Modifikationen – abgesehen vom proteolytischen Prozessieren oder vom Verkürzen (Trimming) der Glycanketten – sind dagegen mit einer Massenzunahme verbunden. Durch Sequenzierung, metabolische Markierung mit [³⁵S]Methionin und durch Matrix-Assistierte-Laser-Desorption/Ionisation (MALDI)-Massenspektrometrie konnte nachgewiesen werden, daß das Peptid (ASA 59–73) an der Position 69 keinen Cysteinrest, wie gemäß der DNA-Sequenz erwartet, sondern einen Formylglycinrest (2-Amino-3-oxopropionsäurerest) aufweist (Schema 2). Nach Reduktion mit NaBH₄ nimmt die Masse des Peptids um zwei Masseneinheiten zu, und bei der Sequenzierung findet man an der Position 69 einen Serinrest.

Die gleiche Modifikation wurde auch bei der humanen *N*-Acetylgalactosamin-4-sulfatase (Arylsulfatase B, ASB)^[1] und bei der Arylsulfatase der Grünalge *Volvox carteri*^[10] nachgewiesen: ein Hinweis auf die evolutionäre Konservierung dieser Proteinmodifikation bei Eukaryonten.

Welche Aminosäure enthalten aber die Sulfatasen von MSD-Patienten, die den Ausgangspunkt der Untersuchung bildeten? Bei den Arylsulfatasen A und B, die durch Überexpression aus MSD-Zellen erhalten wurden, lag statt Formylglycin hauptsächlich der nichtmodifizierte Cysteinrest vor. Bis zu 20 % der Sulfatasen waren allerdings modifiziert.^[1] Bei der multiplen Sulfatasedefizienz handelt es sich also um einen partiellen Defekt einer posttranslationalen Modifizierung, der daher zu einem unvollständigen Ausfall der enzymatisch aktiven Sulfatasen führt.



Schema 2. Posttranslationale Modifikation der Aminosäurereste von Cystein **1** (bei Eukaryonten) und von Serin **2** (bei den Prokaryonten *Klebsiella pneumoniae* und *Escherichia coli*) unter Bildung eines Formylglycinrests **3**.

Das Enzym, das die Umsetzung von proteingebundenem Cystein zu Formylglycin katalysiert, wurde noch nicht identifiziert. Da die cysteinhaltigen Vorstufen synthetisiert werden, handelt es sich nicht um eine Modifikation auf der Ebene einer speziellen, Formylglycin enthaltenden Aminoacyl-tRNA. Die Umsetzung des Cysteinrestes erfolgt nach der Synthese des Peptidstranges und dessen Translokation in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums, in dem auch die N-Glycosylierung stattfindet. Mit speziellen Peptidkonstruk-

ten wurde nachgewiesen, daß der Formylglycinrest erst nach der N-Glycosylierung gebildet wird.^[11]

Die Signale für eine posttranslationale Modifikation sind oft in der Aminosäuresequenz codiert. Bei der Arylsulfatase A konnte der für die Auslösung der Modifikation essentielle Bereich durch die Bildung chimärer Proteine aus ASA-Fragmenten und Fragmenten anderer Proteine lokalisiert werden. Eine Sequenz aus sechzehn Aminosäuren (vier vor und elf nach dem Cystein) reicht aus, um die Oxidation des Cysteinrestes zum Formylglycinrest einzuleiten.^[11] Die Aminosäuresequenz in diesem Bereich ist bei allen eukaryontischen Sulfatasen sehr stark konserviert (Abb. 1).

Arylsulfatasen niederer Eukaryonten	
<i>Volvox carteri</i>	P V C C P S R T N L W R G Q F
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	P V C C P S R T N L ? R G Q F
<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	A V C T P S R S A I M T G R L
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	S V C T P S R S A I V T G R Q
menschliche Arylsulfatasen	
Arylsulfatase A	S L C T P S R A A L L T G R L
Arylsulfatase B	P L C T P S R S Q L L T G R Y
Steroidsulfatase	P L C T P S R A A F M T G R Y
<i>N</i> -Acetylglucosamin-6-sulfatase	A L C C P S R A S I L T G K Y
Iduronatsulfatase	A V C A P S R V S F L T G R R
<i>N</i> -Acetylglucosamin-6-sulfatase	P L C S P S R A A L L T G R L
Arylsulfatase D	P L C T P S R A A F L T G R H
Arylsulfatase E	S L C T P S R A A F L T G R Y

Abb. 1. Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener Sulfatasen. Der Cysteinrest, der zu einem Formylglycinrest modifiziert wird, ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Die Spaltung eines Schwefelsäureesters durch einen Aldehyd ist bezüglich des Mechanismus nicht unmittelbar zu verstehen. Zwei Elementarreaktionen sind prinzipiell möglich: zum einen der nucleophile Angriff eines Sulfat-Sauerstoffatoms am Aldehyd, zum anderen eine nucleophile Substitution am Schwefelatom durch einen als Enol oder Hydrat vorliegenden Aldehyd. Aufschluß über den Mechanismus gaben Röntgenstrukturanalysen der Arylsulfatasen A^[12] und B^[13] sowie die biochemische Untersuchung einer gezielt modifizierten Sulfatase.^[14] Gemäß der kürzlich veröffentlichten Kristallstruktur liegt die Arylsulfatase A als Homooctamer vor, das aus vier Homodimeren (α_2)₄ besteht.^[12] Die Raumstruktur weist große Ähnlichkeit mit der der alkalischen Phosphatase auf, obwohl die Sequenzhomologie gering ist. Im vermuteten aktiven Zentrum befindet sich ein Magnesiumion, das unter anderem von einem Formylglycin-Sauerstoffatom komplexiert wird (Abb. 2). Die Autoren interpretieren die vorgefundene Elektronendichte dahin gehend, daß der Aldehyd als Hydrat vorliegt. Bei der alkalischen Phosphatase sind im aktiven Zentrum zwei Zinkionen vorhanden, die die Phosphatgruppe komplexieren; die katalytisch aktive Aminosäure ist dort ein Serin.

Ein möglicher Mechanismus der Sulfatspaltung ist in Schema 3 dargestellt. Eines der geminalen Sauerstoffatome des Aldehydhydrats greift das Schwefelatom des Sulfates

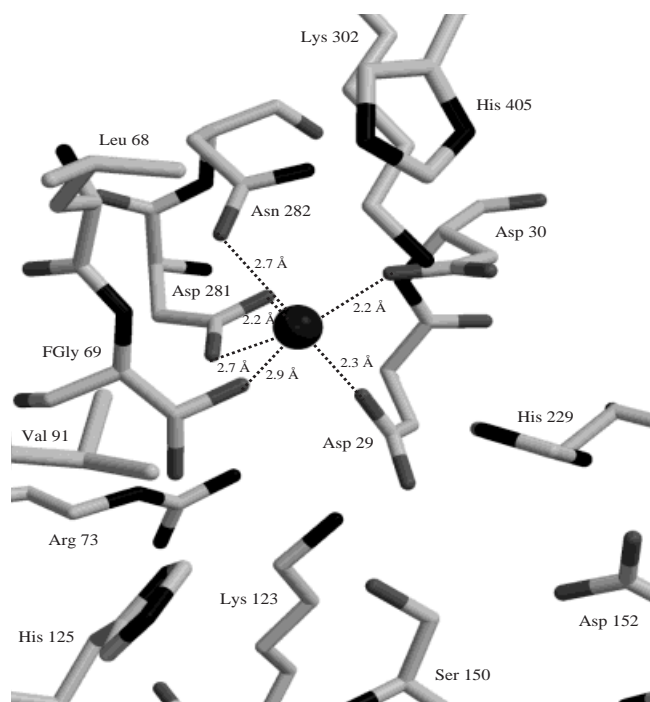
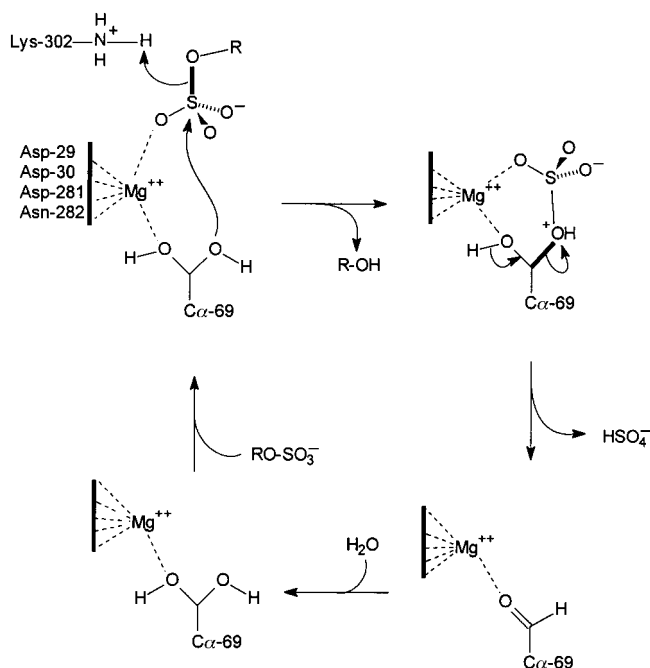


Abb. 2. Ausschnitt aus der Kristallstruktur der humanen Arylsulfatase A.^[12] Angegeben sind die Abstände ausgewählter Seitenkettenatome zum zentralen Magnesiumion.



Schema 3. Hypothetischer Mechanismus der Sulfathydrolyse (mit Veränderungen aus Lit. [12] übernommen).

nucleophil an. Dabei dient der Galactosylceramid-Rest als Nucleofug. Das Magnesiumion erhöht die Elektrophilie des Schwefelatoms und erleichtert den nucleophilen Angriff des Hydrat-Sauerstoffatoms. Als Intermediat entsteht ein sulfatiertes Enzym. Eine solche Zwischenstufe wurde schon früher wegen der anomalen Kinetik der Arylsulfatase A postuliert.^[15] Mit einem [³⁵S]-markierten Substrat wurde nachgewiesen, daß die ASA Sulfat bindet. Das so modifizierte

Enzym war allerdings nicht charakterisierbar, da es die Markierung bei der Denaturierung verlor. Man schloß daraus, daß die Sulfatgruppe nicht als Ester an das Enzym gebunden ist, da dieser unter den Bedingungen der Denaturierung stabil sein sollte.^[16, 17]

Anhand der aktuellen Forschungsergebnisse ist die Erklärung einfach: Die treibende Kraft für die Spaltung des sulfatierten Enzyms ist die Rückbildung der Carbonylbindung von Formylglycin. Eine Spaltung der stabilen S-O-Bindung ist nicht erforderlich, statt dessen wird die labilisierte C-O-Bindung gespalten. Die aus der Kristallstruktur abgeleiteten Überlegungen zum katalytischen Mechanismus der ASA werden durch Untersuchungen an einem modifizierten Enzym bestätigt. Durch ortsspezifische Mutagenese wurde Cystein in den Proteinvorstufen von ASA und ASB durch Serin ersetzt, das in der zur Expression verwendeten Zelllinie posttranslational nicht zu Formylglycin oxidiert wird. Diese Enzymmutanten können zwar [³⁵S]-markiertes Substrat spalten, aber die Sulfatgruppe bleibt an das Enzym gebunden.^[14] Das Sauerstoffatom von Serin ist also nucleophil genug, um den Sulfatester zu spalten, es fehlt aber die Unterstützung des zweiten Sauerstoffatoms zur Freisetzung des enzymgebundenen Sulfats. Erst im alkalischen Milieu und nach Zugabe von Galactose als Acceptor für das abzusplattend Sulfat kommt es zu einer Desulfatierung des Enzyms und damit zum Anlaufen des Katalysezyklus. Der hier postulierte Mechanismus ähnelt dem der alkalischen Phosphatase: Zuerst greift dort eine Serinseitenkette den Phosphorsäureester des Substrates an. In einem zweiten Schritt wird das gebildete Phosphoserin durch den Angriff eines Wassermoleküls hydrolysiert. Bei der Sulfatasereaktion ist für die Freisetzung des Sulfats die zweite Hydroxyfunktion des hydratisierten Formylglycins erforderlich.

Die Aminosäure Cystein, aus der posttranslational Formylglycin entsteht, ist bei allen bekannten eukaryontischen Sulfatasen konserviert (Abb. 1).^[10] Von den fünf bekannten Sequenzen prokaryontischer Sulfatasen wird allerdings bei *Klebsiella pneumoniae* und bei *Escherichia coli* Serin statt Cystein von der DNA codiert. Die proteinchemischen Untersuchungen an der Sulfatase aus *Klebsiella pneumoniae* ergaben, daß auch der primär eingebaute Serinrest teilweise zu Formylglycin oxidiert wird (Schema 2).^[18] Die nur unvollständige Reaktion wird mit der Sättigung der Enzyme erklärt, die für diese Umsetzung nötig sind. Bemerkenswert ist, daß hier Serin als Vorstufe für den katalytisch aktiven Aminosäurerest fungiert, das von eukaryontischen Zellen nicht umgesetzt wird. Bislang ist nicht bekannt, ob *Klebsiella pneumoniae* einen Cystein- zu einem Formylglycinrest umsetzen kann.

Anhand der bisherigen Ergebnisse sollte es möglich sein, die Enzyme, die die Oxidation von Cystein- oder Serinresten katalysieren, mit geeigneten Methoden wie der des „Two-hybrid-system“ zu identifizieren. So könnten die molekularen Ursachen der multiplen Sulfatasedefizienz aufgeklärt werden, die als Folge einer fehlerhaften posttranslationalen Modifikation interpretiert wird. Die zitierten Arbeiten verdeutlichen, daß durch die Analyse von Erbkrankheiten nach wie vor neue chemische und biochemische Prinzipien offengelegt werden können.

Stichwörter: Enzymkatalyse • Glycolipide • Proteine • Sulfatasen

- [1] B. Schmidt, T. Selmer, A. Ingendoh, K. von Figura, *Cell* **1995**, 82, 271–278.
- [2] E. F. Neufeld, J. Muenzer in *The Metabolic Bases of Inherited Disease* (Hrsg.: C. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle), McGraw-Hill, New York, **1995**, S. 2465–2494.
- [3] A. Ballabio, L. J. Shapiro in Lit. [2], S. 2999–3022.
- [4] E. H. Kolodny, A. L. Fluharty in Lit. [2], S. 2693–2741.
- [5] J. H. Austin, A. S. Balasubramanian, T. N. Paattabiraman, S. Saraswathi, D. K. Basu, B. K. Bachhawat, *J. Neurochem.* **1963**, 10, 805–816.
- [6] E. Mehl, H. Jatzkewitz, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1964**, 339, 260–276.
- [7] K. Fedde, A. L. Horwitz, *Am. J. Hum. Genet.* **1984**, 36, 623–633.
- [8] A. Ballabio, G. Parenti, E. Napolitano, P. Di Natale, G. Andria, *Hum. Genet.* **1985**, 70, 315–317.
- [9] W. Rommerskirch, K. von Figura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 2561–2565.
- [10] T. Selmer, A. Hallmann, B. Schmidt, M. Sumper, K. von Figura, *Eur. J. Biochem.* **1996**, 238, 341–345.
- [11] T. Dierks, B. Schmidt, K. von Figura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 11963–11968.
- [12] G. Lukatela, N. Krauss, K. Theis, T. Selmer, V. Gieselmann, K. von Figura, W. Saenger, *Biochemistry* **1998**, 37, 3654–3664.
- [13] C. S. Bond, P. R. Clements, S. J. Ashby, C. A. Collyer, S. J. Harrop, J. J. Hopwood, J. M. Guss, *Structure* **1997**, 5, 277–289.
- [14] M. Recksiek, T. Selmer, T. Dierks, B. Schmidt, K. von Figura, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 6096–6103.
- [15] C. I. Prosser, A. B. Roy, *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, 613, 130–139.
- [16] A. Waheed, R. L. Van Etten, *Arch. Biochem. Biophys.* **1980**, 203, 11–24.
- [17] A. B. Roy, T. J. Mantle, *Biochem. J.* **1989**, 261, 689–697.
- [18] C. Miech, T. Dierks, T. Selmer, K. von Figura, B. Schmidt, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 4835–4837.

Eine rationale Synthese großporiger Zeolith-artiger Materialien?

Duncan E. Akporiaye

Bis vor zehn Jahren suchten die Zeolithforscher hauptsächlich nach Materialien, deren Strukturen große sowie extrem große Poren enthalten, die von zwölf oder mehr T-Atomen begrenzt werden und Durchmesser von 0.75 nm oder mehr aufweisen (T-Atome sind die tetraedrisch koordinierten Kationen des Gerüsts). Diese Suche wurde angeregt durch den Wunsch, ein Ersatzmaterial für den allgegenwärtigen, Zwölferring-Poren aufweisenden Faujasit zu finden und zu neuartigen Anwendungen in der Katalyse, bei der Adsorption und beim Ionenaustausch zu gelangen. Die Strukturbestimmungen von VPI-5 (Achtzehnnerring-Kanäle) und AIPO₄-8^[1] (Vierzehnnerring-Kanäle) deuteten die Entdeckungen der Alumophosphate mit extrem großen Poren, die in Tabelle 1

Tabelle 1. Porengrößen einiger Zeolith-artiger Materialien mit extrem großen Poren.

Porengröße (Zahl der T-Atome)	Alumophosphat	Alumosilicat
20	Cloverit ^[1]	–
20	JDF-20 ^[13]	–
18	VPI-5 ^[1]	–
16	ULM-16 ^[14]	–
14	AIPO ₄ -8 ^[1]	UTD-1 ^[5]
14	–	CIT-5 ^[6]

aufgeführt sind, bereits an. Die anschließende Entdeckung einer neuen Gruppe von Materialien mit geordneten Mesoporen, die unter Verwendung von auf oberflächenaktiven Stoffen basierenden strukturdirigierenden Reagentien herge-

stellt wurden,^[2] hat diese Suche nach großporigen Materialien möglicherweise etwas abgewertet, da nun Porengrößen zwischen ungefähr 1.8 und mehr als 20 nm zugänglich wurden. Leider können diese geordneten mesoporösen Materialien nur bei wenigen katalytischen Verfahren eingesetzt werden, da die Säurestärken dieser Alumosilicate zu gering sind.

Die Entwicklung rationaler Synthesestrategien – dies ist der Trend in neueren Arbeiten – könnte eine Schlüsselmethode für die Entdeckung neuer großporiger Zeolith-artiger Strukturen werden. Dies wird durch die umfangreichen Untersuchungen von Zones et al.^[3] zur Synthese von Zeolithen mit hohem Siliciumgehalt gut dokumentiert, die auf dem Verständnis der Rolle des organischen, strukturdirigierenden Reagens (Gast) beim Gelverfahren und der Struktur des kristallinen Endprodukts (Wirt) im Sinne einer Wirt-Gast-Beziehung basieren. So verwendete man bei der Jagd nach Materialien mit hohem Siliciumgehalt und mehrdimensionalen Kanalsystemen große, sperrige, polycyclische organische Amine, damit die innere hydrophobe Silicatoberfläche der Silicatespezies maximal stabilisiert wird. Großporige Materialien wie SSZ-31^[4] (Zwölferring-Kanäle) sind die Früchte dieser Arbeiten; allerdings wies die vor kurzem durchgeführte Strukturbestimmung auch auf die wahrscheinlichen Grenzen dieses Ansatzes hin. Bei der Wahl großer und sperriger organischer Amine geht der Trend zu niedrigen Ladungsdichten am organischen Molekül und am Gerüst (hohes Si/Al-Verhältnis). Bei dieser Strategie wird das organische Molekül offensichtlich hauptsächlich als inerter Raumfüller verwendet, und der Synthetiker ist herausgefordert, den Einfluß zu maximieren, den die Form des strukturdirigierenden Reagens auf die Zeolithstruktur hat. Die Folge davon ist die Tendenz zur Bildung von Systemen mit eindimensionalen Kanälen, die gemeinsam mit Mischungen stark verwachsener, strukturell sehr ähnlicher Polymorphe entste-

[*] Dr. D. E. Akporiaye
Sintef Applied Chemistry
P.O. Box 124 Blindern, N-0314 Oslo (Norwegen)
Fax: (+47) 2206-7350
E-mail: duncan.akporiaye@chem.sintef.no