

Entwicklung von Stabilisatoren und Hemmstoffen von menschlichen Sulfatierungswegen

Will Boosters of Sulfation Pathways become SuPa drugs?

Projektbericht

Sulfatierungswege sind ein integraler Bestandteil des normalen Metabolismus eines jeden Lebewesens. Diese schon lange bekannte Lehrmeinung wurde auf dem Internationalen Symposium „Sulfation Pathways“, das ich zum Abschluss meiner Fellow-Zeit gemeinsam mit Frau Professor Sabine Müller von der Universität Greifswald ausrichten durfte, eindrucksvoll bestätigt. Zentrales Motiv von Sulfatierungswegen ist der Dreiklang aus der Aktivierung eines Sulfates, der Sulfat-Übertragung sowie der Abspaltung des Sulfates. In Pflanzen und Bakterien kommt als Alternative zur Sulfat-Übertragung die Sulfat-Reduktion noch hinzu. Stets sind jedoch die gleichen drei atypischen Nucleotide bei diesen Prozessen beteiligt: Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS), 3'-Phospho-Adenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS) sowie 3'-Phospho-Adenosin-5'-Phosphat (PAP). Warum dies eigentlich so ist, ist jedoch keinesfalls abschließend geklärt.

In allen betrachteten Systemen, von den Bakterien *Escherichia coli* und *Mycobacterium tuberculosis* über verschiedene Pflanzenspezies sowie einen Fadenwurm bis zu Mann und Maus, waren die zentralen Fragen in den Vorträgen immer jene nach der Regulation der verschiedenen Komponenten sowie der Substratspezifität einzelner Sulfat-über-

tragender Enzyme, so genannter Sulfotransferasen. Ein Beispiel für eine möglicherweise konvergente Evolution ist der enzymatische Apparat zur Beseitigung des dritten der oben genannten Nucleotide – des 3'-Phospho-Adenosin-5'-Phosphats (PAP). Da PAP sowohl Sulfotransferasen als auch RNA-Nucleotidasen inhibiert, gibt es sowohl im Menschen, in der Pflanze als auch in Bakterien spezielle Phosphatasen, die dieses „problematische“ Nucleotid zu harmlosem Adenosinmonophosphat (AMP) und Phosphat abbauen. Darüber hinaus ist mittlerweile in Pflanzen und Bakterien evident, dass eben jenes PAP beziehungsweise APS und auch PAPS wichtige Rollen als *second messenger* spielen. Wird die weitere Forschung zeigen, dass ähnliche Mechanismen auch im menschlichen Metabolismus eine Rolle spielen?

Seit einigen Jahren habe ich mich in meiner Forschung mit der Transformation von reaktionsträgem Sulfat zum „Hochenergie-Molekül“ PAPS beschäftigt; diese Umwandlung wird von so genannten PAPS-Synthasen bewerkstelligt. Vor allem durch das Engagement mehrerer hervorragender Studierenden gelang es uns, die vielschichtige Regulierung der PAPS-Synthasen zu beschreiben. Erwähnt werden soll hier einzig die erstaunliche Instabilität der PAPS-Synthasen. Eines dieser

Privatdozent Dr. Jonathan W. Mueller war von April bis September 2015 Alfred Krupp Junior Fellow. Er ist Dozent für endokrine Biochemie an der Universität Birmingham (England).



Jonathan Wolf Mueller hat an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Biochemie studiert. Für seine Promotion im Jahre 2004 arbeitete er am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund. 2007 und 2011 erhielt er EMBO-Stipendien für Forschungsaufenthalte am MRC National Institute for Medical Research in London.

2012 habilitierte er sich an der Universität Duisburg-Essen im Fach Biochemie/Molekularbiologie. Seitdem forscht und lehrt Jonathan Mueller an der englischen Universität Birmingham, zunächst als Marie-Curie-Senior-Research-Fellow und seither Lecturer in Endocrine Biochemistry.

Kurzvita

» Entwicklung von Stabilisatoren und Hemmstoffen von menschlichen Sulfatierungswegen

Genau in diesem Moment laufen Tausende biochemische Prozesse in Ihrem Körper ab. Um diese aufeinander abzustimmen, werden zahlreiche chemische Botenstoffe ausgesandt. Eine der bedeutendsten Klassen dieser Botenstoffe sind die biologisch hoch potenten Steroid-Hormone. Ihre Konzentration im Körper muss genau reguliert sein.

Einen Mechanismus zur Kontrolle von Steroid-Hormonen stellt die Anheftung eines Sulfat-Restes dar, was einer biologischen Inaktivierung gleich kommt. Darüber hinaus steuern Sulfatierungen zahlreiche weitere Funktionen im Stoffwechsel des gesunden Menschen. Der enzymatische Apparat, der humane Sulfatierungsprozesse realisiert, besteht aus Proteinen, die das Sulfat aktivieren, und solchen, die aktiviertes Sulfat auf entsprechende Zielmoleküle übertragen. Zur Abspaltung des Sulfates von Steroiden dient die sogenannte Steroid-Sulfatase, die in Tumor-Arten wie Prostata- oder Brustkrebs vermehrt zu finden ist. Sie sorgt

dafür, dass diese Zellen inaktivierte Sulfo-Steroide aus der Blutbahn aufnehmen und re-aktivieren können, was das Tumor-Wachstum fördert. Einige Hemmstoffe der Steroid-Sulfatase werden zurzeit in klinischen Studien untersucht.

Analog zur gehemmten De-Sulfatierung suchen wir nach Wegen, die Sulfatierungsrate zu steigern. Eigene Forschungsarbeiten der letzten Jahre haben gezeigt, dass jene Proteine, die Sulfat in seine aktive Form, das so genannte PAPS, überführen, bemerkenswert instabil sind – sie entfalten sich, verlieren somit ihre aktive Konformation und aggregieren dann relativ schnell. Das von uns untersuchte Nucleotid APS ist jedoch in der Lage, diese Prozesse wirkungsvoll zu unterdrücken. Jetzt sind wir auf der Suche nach Substanzen, die ähnlich stabilisierend wirken wie APS, jedoch nicht dessen hemmende Eigenschaften aufweisen und besser bioverfügbar sind.

Fellow-Projekt



Abb. 1: Veranstaltungsplakat des Internationalen Symposiums zu Sulfation Pathways, welches eine Kooperation zwischen Privatdozent Dr. Jonathan Mueller und Professor Dr. Sabine Müller (Universität Greifswald) darstellte

Proteine, die PAPSS2, ist bereits bei physiologischen Temperaturen partiell entfaltet und neigt stark zur Aggregation. Das Intermediat APS der PAPS-Biosynthese spielt hier gleich mehrere Rollen. Es ist nicht nur Produkt der Sulfurylase- und Substrat der APS-Kinase-Reaktion, es inhibiert darüber hinaus beide enzymatische Aktivitäten, stabilisiert das Protein deutlich und unterdrückt schon bei niedrigsten Konzentrationen die Aggregation des Proteins. Der Greifswalder Forschungsaufenthalt diente dazu, mehr über die Chemie der Nucleotide APS und PAPS zu erfahren.

Eine weitere Säule für das vorliegende Projekt neben meiner eigenen Forschungsarbeit stellt das Abspalten von Sulfat von im Vorfeld sulfatierten Biomolekülen, jene dritte zentrale Komponente von Sulfatierungswegen, dar. Ein Birminger Kollege von mir treibt aktiv die Weiterentwicklung von Inhibitoren der menschlichen Steroid-Sulfatase an. Dieses Enzym trägt wesentlich zur lokalen

Östradiol-Biosynthese in Östrogen-Rezeptor-positiven Brustkrebs-Zellen bei. Vermehrte Steroid-Sulfatase-Aktivität ist jedoch auch in anderen Steroid-abhängigen Tumorarten beschrieben worden. Inhibitoren der Steroid-Sulfatase sind derzeit in der klinischen Entwicklung (Phase II/III) und finden teils in Kombination mit Östrogen-Rezeptor-Antagonisten Anwendung.

Analog wollen wir nun die Wirkung des Nucleotides APS als chemisches Chaperon mit einer niedermolekularen Substanz imitieren. Da genetische Defekte, die die PAPS-Synthase-Aktivität reduzieren, mit allerhand Krankheiten des Knorpel/Knochensystems sowie mit der Fehlregulierung im Steroid-Hormon-Haushalt in Verbindung gebracht worden ist, wollen wir uns in diesem Projekt auf PAPS-Synthase-Stabilisatoren konzentrieren. Hemmstoffe dieser Enzyme könnten zwar weiterhin von großem Wert in der Forschung sein, derzeit schätzen wir deren klinische Anwendbarkeit eher kritisch ein. Was würden also Stabilisatoren/Aktivatoren der PAPS-Synthasen bewirken? Die intrazelluläre PAPS-Konzentration liegt eher im niedrigen mikromolaren Bereich und kann schnell erschöpft sein. Durch entsprechende PAPS-Synthase-Aktivierung erwarten wir eine Steigerung der PAPS-Produktion und somit eine Steigerung der Gesamt-Sulfatierungsrate, da Sulfotransferasen generell durch die Verfügbarkeit von PAPS reguliert sind.

Im Menschen spielen Sulfatierungswege vor allem eine wichtige Rolle bei der Knorpel-

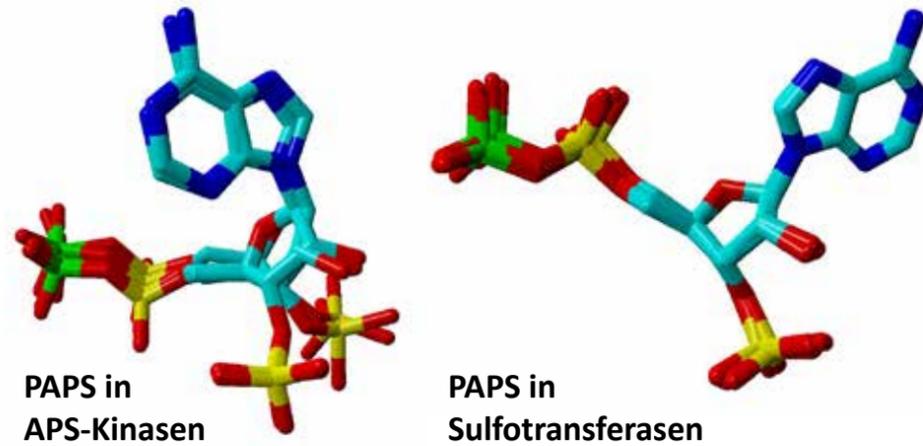
und Knochenentwicklung, und hier besonders bei der frühen Entwicklung. Im erwachsenen Menschen scheint die Regulierung von Steroid-Hormonen eine Hauptaufgabe von Sulfatierungswegen zu sein. Substanzen, die die Sulfatierungsrate steigern können – „Sulfation Booster“, werden höchstwahrscheinlich einen ähnlichen Effekt wie Sulfatase-Inhibitoren haben, jedoch mit einem völlig neuen Wirkmechanismus. Analog zu den Sulfatase-Inhibitoren wären dann steroidabhängige Tumore das am wahrscheinlichsten zu erwartende Indikationsgebiet. In diesem Indikationsgebiet müssten sich diese Substanzen dann im Wettbewerb mit eben jenen Sulfatase-Inhibitoren bewähren, eventuell auch im Vergleich mit Rezeptor-Antagonisten. Ein weiteres Indikationsgebiet könnte die Behandlung von Steroid-Hormon-Überschuss-Erkrankungen wie dem Polycystische-Ovarien-Syndrom sein. Dieses ist unter anderem durch einen Androgen-Überschuss gekennzeichnet. Wenn Sulfation-Booster anti-androgene Effekte zeigen, könnten sie bei der Therapie dieses Hormon-Überschusses eingesetzt werden.

Bisher ist es noch nicht klar, welchen Anteil die beiden PAPS-Synthasen jeweils für sich an Sulfatierungswegen von Steroiden haben. Unsere unveröffentlichten Ergebnisse legen nahe, dass einzig PAPSS2 eine Rolle bei der Sulfatierung von Androgenen spielt. Im menschlichen Genom sind jedoch zwei Gene für PAPS-Synthasen zu finden, PAPSS1 und PAPSS2. Die entsprechenden Proteine sind zu 77 Prozent identisch in ihrer Aminosäure-Sequenz. Die Unterschiede sind jedoch nicht statistisch über die Sequenz verteilt; N- und C-Terminus sowie die Linker-Sequenz zwischen den beiden Domänen unterscheiden sich deutlich zwischen PAPSS1 und PAPSS2. Einige Kristallstrukturen sind von der PAPS-Synthase 1 bzw. von einzelnen Domänen bereits publiziert worden. PAPSS2 hat sich bisher jedoch allen (unseren) Kristallisierungsversu-

chen widersetzt, einzig eine nicht veröffentlichte Struktur der APS-Kinase-Domäne ist verfügbar. Gemeinsam mit Bioinformatikern aus London sind wir derzeit damit beschäftigt, bessere Modelle von PAPSS2 zu entwickeln, um die beiden Isoformen strukturell miteinander vergleichen zu können.

Um nun effiziente Stabilisatoren zu entwickeln, sind verschiedene Ansätze denkbar. Stabilisatoren können mittels Thermofluor im 96-Well-Format getestet werden. Dabei wird das rekombinante PAPSS2-Protein mit der zu testenden Substanz sowie einem speziellen solvatochromen Farbstoff versetzt und in einem Real-Time-PCR-Gerät erhitzt. Wenn sich das Protein entfaltet, bindet der Farbstoff an die hydrophoben Bereiche des Proteins, wodurch seine Fluoreszenz stark ansteigt. Als Ergebnis sind Substanzen zu erwarten, die das PAPSS2-Protein zwar stabilisieren, von denen aber noch nicht bekannt ist, ob sie nicht weiterhin Inhibitoren sind. Diese Stabilisatoren müssten im Anschluss also in einem biochemischen Assay auf ihren Einfluss auf die PAPSS-Aktivität hin getestet werden. Alternativ werden die oben beschriebenen Strukturen und Strukturmodelle für virtuelle Substanzscreens verwendet. Auch diese Substanzen müssen in einem weiteren Schritt verifiziert werden. Schließlich wäre noch ein integrierter Screen denkbar, bei dem zum Beispiel eine auxotrophe Hefe zum Einsatz kommt. Der Screen müsste so gestaltet sein, dass bei niedrigen Temperaturen PAPSS2 einen auxotrophen Schwefel-Stoffwechsellmarker kompensieren kann, bei erhöhten Temperaturen jedoch nur noch, wenn PAPSS2 stabilisiert wird. Vor allem bei toxischen Aggregaten der PAPS-Synthase wäre dieser Weg viel versprechend.

Wo stehen wir derzeit in diesem Projekt? Von einer mit uns kooperierenden Arbeitsgruppe in Warschau wurden im vergangenen Jahr vielversprechende Ergebnisse zur opti-



mierten chemischen APS- und PAPS-Synthese publiziert. Mit diesen Ergebnissen als Grundlage sollte es nun möglich sein, auch zu verschiedenen Derivaten chemisch-synthetischen Zugang zu erlangen. Darüber hinaus analysiere ich gemeinsam mit einer Gruppe in London Struktur-Funktions-Beziehungen von PAPS als Co-Faktor. PAPS ist nicht besonders häufig in der Protein-Struktur-Datenbank PDB zu finden. Fünf Strukturen von Sulfotransferasen binden PAPS mit dem Adenin-Rest in *anti*-Konformation. Die zwei vorhandenen Strukturen von APS-Kinasen zeigen diesen besonderen Co-Faktor mit dem Adenin-Rest in *syn*-Stellung. Interessant für uns ist hier die besondere Nähe des 3'- und des 5'-Phosphats. Insgesamt ist das vorliegende Projekt, vor allem konzeptionell, in den vergangenen Monaten wesentlich vorangeschritten, wofür ich ziemlich vielen Menschen in Greifswald, aber auch an anderen Orten, dankbar bin.

Das Semester am Krupp-Kolleg stand für mich ganz entscheidend unter dem Motto „Entschleunigung“. Fernab von meinem normalen Dienstort konnte ich so einige Konzepte beziehungsweise tradierte Denkmuster meiner bisherigen Forschungsarbeit überdenken. So ist meine Achtung vor Therapien

deutlich gestiegen, die in der klinischen Praxis zwar offensichtlich positive Effekte zeigen, deren molekularer Wirkmechanismus jedoch (noch) nicht bekannt ist. Ein Beispiel hierfür ist die Therapie der bipolaren Störung mittels Lithium-Salzen. Die wissenschaftliche Literatur listet so einige Kinasen und Phosphatasen auf, die im Reagenzglas durch Lithium inhibiert werden. Eines dieser Enzyme, die Bisphospho-Nucleotidase 1 (BPNT1), sei hier gesondert erwähnt; zum einen da dieses Enzym schon bei sehr niedrigen millimolaren Lithium-Konzentrationen inhibiert wird, zum anderen da auch dieses Protein als PAP-entgiftendes Enzym Teil von Sulfatierungswegen ist. Trotz dieser molekularen Effekte bleibt jedoch der unstrittig vorhandene therapeutische Effekt des Lithiums unerklärt.

Während meiner Zeit am Krupp-Kolleg gab es einige erfreuliche Publikationen. Hervorheben möchte ich den umfassenden Übersichtsartikel, den ich gemeinsam mit Birminghamer Kollegen in der renommierten Zeitschrift *Endocrine Reviews* (*Impact Factor* 2014: 21,06) zum Thema Steroid Sulfatierung/Desulfatierung veröffentlicht habe. Der Hauptteil der Veröffentlichungen aus der Greifswalder Zeit liegt jedoch in der Zukunft. Hier ist als erstes der Tagungsband zum

Greifswalder Symposium über Sulfatierungswege zu nennen (weitere Angaben dazu sind unter „Publikationen“ zu finden). Darüber hinaus bergen aber die in Greifswald erhaltenen Denkanstöße durchaus das Potential, bald zu achtbaren Publikationen zu reifen. Dazu werden sicherlich auch die neuen wissenschaftlichen Kontakte zu Arbeitsgruppen aus dem Ostsee-Raum dienen; hier sind sowohl Greifswald und Rostock, aber auch Dänemark zu nennen.

Ich habe meinen Fellow-Bericht mit dem Symposium über Sulfatierungswege begonnen. Deshalb möchte ich auch damit schließen und noch einmal ausdrücklich dem Krupp-Kolleg, der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Gesellschaft Deutscher Chemiker – Fachgruppe Biochemie sowie der Firma ChemGenes für ihre Unterstützung danken. Es war ein Mee-

ting mit sehr intensivem gedanklichem Austausch auf wissenschaftlich bemerkenswert hohem Niveau. Besonders hat mich gefreut, dass das Symposium Kontakte mit international renommierten Wissenschaftlern meines Forschungsgebietes ermöglicht hat. Sicherlich hat das Symposium die Sichtbarkeit des Forschungsgebietes Sulfatierung gesteigert. Erklärtes Ziel ist nun, die entstandenen Kontakte zu pflegen und zu stärken und schließlich als Netzwerk Fördermittel einzuwerben. Insgesamt war die Zeit am Krupp-Kolleg von hoher persönlicher und wissenschaftlicher Wertschätzung und Professionalität geprägt. Den interdisziplinären Diskurs am Kolleg habe ich ebenfalls als äußerst anregend und produktiv empfunden. Einen ganz besonderen Dank dafür an alle im Kolleg Wirkenden.

Oostdijk W, Idkowiak J, Mueller JW, House PJ, Taylor AE, O'Reilly MW, Hughes BA, de Vries MC, Kant SG, Santen GW, Verkerk AJ, Uitterlinden AG, Wit JM, Losekoot M, Arlt W. PAPS2 deficiency causes androgen excess via impaired DHEA sulfation--in vitro and in vivo studies in a family harboring two novel PAPS2 mutations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015 Apr;100(4):E672-80. PubMed PMID: 25594860

Mueller JW, Gilligan LC, Idkowiak J, Arlt W, Foster PA. The Regulation of Steroid Action by Sulfation and Desulfation. *Endocr Rev.* 2015 Oct;36(5):526-63. PubMed PMID: 26213785

Mueller JW, Idkowiak J, Hardman RE, Ferreira T, Vallet C, McNelis JC, Rose IT, Dhir V, Rosta E, Knauer SK, Arlt W. The differential impact of PAPS synthase isoforms on DHEA sulfation may be explained by an isoform-specific interaction of SULT2A1 with PAPS2, but not

PAPSS1. Poster at the European Society of Endocrinology European Congress of Endocrinology, May 2015, Dublin, Ireland, ECE 2015 Poster Prize.

Chemico-Biological Interactions – Special Issue on Sulfation Pathways
Submission deadline: 15th Jan 2016
Publication expected in autumn 2016
Editorial: Jonathan W Mueller & Sabine Müller (Greifswald)

Guest Editors: Jonathan W Mueller & Stan Kopriva (Cologne)

Kai Xun Chan, Peter D Mabbitt, Su Y Phua, Jonathan W Mueller, Nazia Nisar, Tamara Gogolashvili, Elke Strocher, Julia Grassl, Wiebke Arlt, Gonzalo M Estavillo, Colin J Jackson, Barry J. Pogson. Sensing and signaling of oxidative stress in chloroplasts by inactivation of the SAL1 phosphoadenosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* in print

Ausgewählte
Veröffentlichungen