

Modulare Enzym-Kaskaden zur Synthese von Glykanepitopen

VON DER FAKULTÄT FÜR MATHEMATIK, INFORMATIK UND
NATURWISSENSCHAFTEN DER RWTH AACHEN UNIVERSITY
ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
EINER DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN
GENEHMIGTE DISSERTATION

VORGELEGT VON

DIPLOM-BIOLOGIN
LEONIE ENGELS (GEB. RÜTTGERS)
AUS AACHEN

BERICHTER:
UNIVERSITÄTSPROFESSOR DR. RER. NAT. L. ELLING
UNIVERSITÄTSPROFESSOR DR. RER. NAT. U. SCHWANEBERG

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG: 27.01.15

DIESE DISSERTATION IST AUF DEN INTERNETSEITEN DER
HOCHSCHULBIBLIOTHEK ONLINE VERFÜGBAR

Mein Dank gilt:

Herrn Professor Dr. rer. nat. L. Elling, Lehr- und Forschungsgebiet Biomaterialien der RWTH Aachen, für die sehr interessante Themenstellung, für die Übernahme des Hauptreferates und die vielen motivierenden Fachgespräche während dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. rer. nat. U. Schwaneberg, Lehrstuhl für Biotechnologie der RWTH Aachen, für die Übernahme des Zweitgutachtens.

meinen Studenten Vera Werthmann und Manja Henze, die ihre Abschlussarbeit innerhalb meiner Promotionsarbeit gewissenhaft und mit viel Motivation und Arbeitsbereitschaft durchgeführt haben.

allen derzeitigen und ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe Biomaterialien der RWTH Aachen für die freundschaftliche und offene Arbeitsatmosphäre und für ihre stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

dem DWI Leibniz-Institut für Interaktive Materialien der RWTH Aachen für die Ausführungen der $^1\text{HNMR}$ Messungen und meinem Kollegen M. Sc. Ruben Rosencrantz für die Auswertung der $^1\text{HNMR}$ -Spektren.

dem BMBF und der Firma Jennewein Biotechnologie GmbH für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des BMBF *BiochancePlus* Projektes „Entwicklung eines innovativen Produktionsverfahrens für Fukosyllaktose“ (BMBF Az.: 0315170).

der Max-Buchner-Forschungstiftung (DECHEMA) für die Gewährung des Forschungsstipendiums „Entwicklung eines Enzym-Modul-Systems zur Synthese von UDP-Glukuronsäure aus Saccharose und UMP“.

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab im Rahmen von Publikationen und Fachtagungen veröffentlicht:

Publikationen dieser Arbeit:

Engels, L. und Elling, L. (2014). "WbgL: a novel bacterial α 1,2-fucosyltransferase for the synthesis of 2'-fucosyllactose." *Glycobiology* **24**(2): 170-178.

Engels, L., Henze, M., Hummel, W. und Elling, L. (2014). "Enzyme Module Systems for the Synthesis of UDP-Glucuronic acid and non-sulfated HNK-1 epitope." (in Vorbereitung)

Internationale Patentanmeldung dieser Arbeit:

Parkot, J., Hüfner, E., Jennewein, S., Elling, L. und Engels, L. (2012). Novel Fucosyltransferases and their applications.

Aktenzeichen PCT. Int. Appl. (2012), WO 2012097950 A1 20120726

Weitere Publikationen:

¹Sauerzapfe, B., ¹Engels, L. und Elling, L. (2008). "Broadening the biocatalytic properties of recombinant sucrose synthase 1 from potato (*Solanum tuberosum*) by expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*." *Enzyme and Microbial Technology* **43**(3): 289-296.

¹Both authors contributed equally to this paper.

Engels, L. und Elling, L. (2012). "Carbohydrate modifying enzymes and microorganisms. Enzymatic and Chemoenzymatic Synthesis of Nucleotide Sugars: Novel Enzymes, Novel Substrates, Novel Products, and Novel Routes". Grunwald, P., Stanford Publishing, Stanford: 237-251.

Purchartová, K., Engels, L., Marhol, P., Šulc, M., Kuzma, M., Elling, L. und Křen, V. (2013). "Enzymatic preparation of silybin phase II metabolites: sulfation using aryl sulfotransferase from rat liver." *Applied Microbiology & Biotechnology* **97**: 10391-10398.

Posterpräsentationen dieser Arbeit:

In vitro Synthesis of the Glycan Epitope HNK-1 with a Highly Flexible Enzyme-Module-System

International Colloquium Biointerface, Rolduc, Niederlande; 2008

In vitro Synthesis of UDP-glucuronic acid and the Glycan Epitope HNK-1 with a Highly Flexible Enzyme-Module-System

European BioPerspective, Hannover, Deutschland, 2008

In vitro Synthesis of UDP-Glucuronic acid and the Glycan Epitope HNK-1 with a Highly Flexible Enzyme-Module-System

Biomedica, Lüttich, Belgien; 2009

Combinatorial biocatalysis-An essential tool for the *in vitro* Synthesis of UDP-Glucuronic acid

28. Dechema Jahrestagung, Aachen, Deutschland; 2010

A novel promiscuous α 1,2-Fucosyltransferase for Glycosylation Engineering

29. Dechema Jahrestagung, Berlin, Deutschland; 2011

Vorträge dieser Arbeit:

In vitro Synthesis of UDP-Glucuronic acid and the Glycan Epitope HNK-1 with a Highly Flexible Enzyme-Module-System

27. Dechema Jahrestagung, Mannheim, Deutschland; 2009

In vitro Synthesis of UDP-Glucuronic acid and the Glycan Epitope HNK-1 with a Highly Flexible Enzyme-Module-System

COST Tagung, Semmering, Österreich; 2010

An Enzyme-Module-System for the Synthesis of Glucuronides

MECP-Tagung, Graz, Österreich, 2012

A multi-step enzyme-module for the synthesis of the non-sulfated HNK-1 epitope

MECP-Tagung, Madrid, Spanien; 2014

Weitere Vorträge:

Broadening the Biocatalytic Properties of recombinant Sucrose Synthase 1 from potato by Expression in *Echerischia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*

19. Glcycobiology Joint Meeting, Wageningen, Niederlande; 2008

1	EINLEITUNG	7
1.1	Bioaktive Glykokonjugate	7
1.2	Synthese der Glykokonjugate	12
1.2.1	Glykosidasen und Glykosynthasen	12
1.2.2	Glykosyltransferasen	13
1.2.3	Nukleotidzucker	15
1.2.4	Synthese von Glykokonjugaten mit Multi-Enzym-Kaskaden	17
1.3	Glykokonjugate für therapeutische und pharmazeutische Applikationen	26
1.3.1	HNK-1 Glykanepitop	26
1.3.2	Fukosylierte Oligosaccharide	28
2	ZIELSETZUNG	31
2.1	Modulare Enzym-Kaskaden zur Synthese von UDP-GlcA	31
2.2	Modulare Enzym-Kaskaden zur Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops	33
2.3	Modulare Enzym-Kaskade zur Synthese des Glykanepitops 2'-Fukosyllaktose	35
3	MATERIAL UND METHODEN	37
3.1	Allgemeine molekularbiologische Methoden	37
3.1.1	Isolation von RNA	37
3.1.2	Isolation von genomischer DNA aus <i>E. coli</i>	37
3.1.3	cDNA Synthese	38
3.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
3.1.5	Restriktionsverdau und Dephosphorylierung	39
3.1.6	Ligation	41
3.1.7	Transformation von <i>E. coli</i> und Plasmidisolation	42
3.1.8	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> und Plasmidisolation	43
3.1.9	Agarose-Gelelektrophorese zur Detektion der DNA	43
3.1.10	Aufreinigung der DNA	44
3.1.11	Konzentrationsbestimmung der DNA	45
3.2	Klonierung der Gene für die Enzym-Module zur Synthese von UDP-GlcA und des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops	46
3.2.1	Klonierung von <i>ump</i> aus <i>Homo sapiens</i>	46
3.2.2	Klonierung von <i>ugd</i> aus <i>E. coli</i> K12	47
3.2.3	Klonierung von <i>ugd1</i> aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	49
3.2.4	Klonierung von <i>ugdh</i> aus <i>Homo sapiens</i>	50
3.2.5	Klonierung von <i>kfiD</i> aus <i>E. coli</i> O6:K5:H1	51

3.2.6	Klonierung von <i>glcatp</i> und <i>glcats</i> aus <i>Mus musculus</i>	52
3.2.7	Klonierung von <i>sus1</i> aus <i>Solanum tuberosum</i>	55
3.3	Klonierung der Gene für die Enzym-Module zur Synthese des Glykanepitops 2'-Fukosyllaktose	57
3.3.1	Klonierung von Genen putativer α -1,2-Fukosyltransferasen	58
3.3.2	Klonierung von <i>fkp</i> aus <i>Bacterioides fragilis</i>	59
3.4	Expression klonierter Gene in <i>E. coli</i>	61
3.5	Expression von <i>sus1</i> in <i>S. cerevisiae</i>	63
3.5.1	Expression von <i>sus1</i> unter Induktion des Gal1-Promotors	63
3.5.2	Konstitutive Expression von <i>sus1</i> unter der Kontrolle des PMA1-Promotors	64
3.6	Aufreinigung der rekombinanten Enzyme	65
3.6.1	Herstellung des <i>E. coli</i> Rohextraktes	65
3.6.2	Herstellung des <i>S. cerevisiae</i> Rohextraktes	65
3.6.3	Aufreinigung über immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatografie	66
3.6.4	Aufreinigung über Anionenaustauschchromatografie	67
3.7	Bereitstellung von Enzymen für die Enzym-Module zur Synthese von UDP-GlcA und des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops	68
3.7.1	Biochemische Charakterisierung der His ₆ UMPK	68
3.7.2	Biochemische Charakterisierung der His ₆ UGDH und der His ₆ KFID	74
3.7.3	Biochemische Charakterisierung der His ₆ catGlcAT-P und His ₆ catGlcAT-S	77
3.7.4	Bestimmung der Enzymaktivität der SuSy1	83
3.7.5	Bestimmung der Enzymaktivität der His ₆ NOX	85
3.8	Bereitstellung von Enzymen für die Enzym-Module zur Synthese des Glykanepitops 2'-Fukosyllaktose	86
3.8.1	Biochemische Charakterisierung der His ₆ PropWbgL	86
3.8.2	Bestimmung der Enzymaktivität der His ₆ PropFKP	91
3.9	Entwicklung und Optimierung von modularen Enzym-Kaskaden zur Synthese von UDP-GlcA	93
3.9.1	Synthese von UDP-GlcA mit dem UGDH-Modul (Modul C)	93
3.9.2	Ein-Topf Synthese von UDP-GlcA durch Kopplung des UGDH-Moduls mit dem SuSy-Modul (Modul B + Modul C)	96
3.9.3	Ein-Topf Synthese von UDP-GlcA durch Kopplung des UGDH-Moduls mit dem SuSy- und UMPK-Modul (Modul A + Modul B + Modul C)	97
3.10	Entwicklung und Optimierung von modularen Enzym-Kaskaden zur Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops	99
3.10.1	Ein-Topf Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops durch Kopplung des UGDH-Moduls mit dem GlcAT-Modul (Modul C + Modul D)	99

3.10.2	Ein-Topf Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops durch Kopplung des SuSy-Moduls mit dem UGDH- und GlcAT-Modul (Modul B + Modul C + Modul D)	102
3.10.3	Bestimmung der β -Galaktosidase-Nebenaktivität	104
3.11	Entwicklung und Optimierung einer modularen Enzym-Kaskade zur Synthese des Glykanepitops 2'-Fukosyllaktose	105
3.11.1	Sequentielle Enzymkaskade zur Synthese von 2'-Fukosyllaktose im klassischen Zwei-Stufen Modus (Modul E + Modul F)	105
3.11.2	Sequentielle Synthese von 2'-Fukosyllaktose mit dem FKP- und FucT-Modul in einem Topf (Modul E + Modul F)	107
3.12	Analytik	109
3.12.1	Proteingehaltsbestimmung nach Bradford	109
3.12.2	Proteinanalyse mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	109
3.12.3	Proteinanalyse mittels Western Blot	111
3.12.4	Kapillarelektrophorese	112
3.12.5	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC)	113
3.12.6	HPAEC-PAD Analyse (High pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection)	115
3.12.7	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)	115
3.12.8	NMR-Analyse	116
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	117
4.1	Bereitstellung von Enzymen für die Enzym-Module zur Synthese von UDP-GlcA	117
4.1.1	Klonierung und Expression von <i>ugdhis₆</i> aus <i>E. coli</i> K12	117
4.1.2	Aufreinigung der UGDHis ₆ aus <i>E. coli</i> K12	118
4.1.3	Klonierung und Expression von <i>his₆ugd</i> aus <i>E. coli</i> K12	118
4.1.4	Aufreinigung der His ₆ UGD aus <i>E. coli</i> K12	119
4.1.5	Klonierung und Expression von <i>his₆ugdh1</i> aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	120
4.1.6	Aufreinigung der His ₆ UGDH1 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	120
4.1.7	Klonierung und Expression von <i>his₆ugdh</i> aus <i>Homo sapiens</i>	121
4.1.8	Aufreinigung der His ₆ UGDH aus <i>Homo sapiens</i>	121
4.1.9	Klonierung und Expression von <i>his₆kfiD</i> aus <i>E. coli</i> K5	122
4.1.10	Aufreinigung der His ₆ KfiD aus <i>E. coli</i> K5	123
4.1.11	Biochemische Charakterisierung der His ₆ UGDH und His ₆ KfiD	124
4.1.12	Klonierung und Expression von <i>his₆ump</i> aus <i>Homo sapiens</i>	130
4.1.13	Aufreinigung der His ₆ UMPK aus <i>Homo sapiens</i>	130
4.1.14	Biochemische Charakterisierung der His ₆ UMPK	133
4.1.15	Bereitstellung der SuSy1 aus <i>Solanum tuberosum</i>	138

4.1.16	Bereitstellung der His ₆ NOX aus <i>Lactobacillus brevis</i>	143
4.2	Entwicklung und Optimierung von modularen Enzym-Kaskaden zur Synthese von UDP-GlcA	145
4.2.1	Synthese von UDP-GlcA mit dem UGDH-Modul (Modul C)	145
4.2.2	Ein-Topf Synthese von UDP-GlcA durch Kopplung des SuSy-Moduls mit dem UGDH-Modul (Modul B + Modul C)	153
4.2.3	Ein-Topf Synthese von UDP-GlcA durch Kopplung des UMPK-Moduls mit dem SuSy- und UGDH-Modul (Modul A + Modul B + Modul C)	156
4.2.4	Evaluation der Synthesestrategien zur Produktion von UDP-GlcA	158
4.3	Bereitstellung von UDP-Glukuronyltransferasen für die Enzym-Module zur Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops	160
4.3.1	Klonierung und Expression von <i>his₆catglcatp</i> aus <i>Mus musculus</i>	160
4.3.2	Aufreinigung der His ₆ catGlcAT-P	160
4.3.3	Biochemische Charakterisierung der His ₆ catGlcAT-P	163
4.3.4	Klonierung und Expression von <i>his₆catglcats</i> aus <i>Mus musculus</i>	169
4.4	Entwicklung und Optimierung von modularen Enzym-Kaskaden zur Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops	178
4.4.1	Bereitstellung des Akzeptorsubstrates LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc	178
4.4.2	Ein-Topf Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops durch Kopplung des UGDH-Moduls mit dem GlcAT-Modul (Modul C + Modul D)	180
4.4.3	Ein-Topf Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1-Epitops durch Kopplung des SuSy-Moduls mit dem UGDH- und GlcAT-Modul (Modul B + Modul C + Modul D)	186
4.4.4	Evaluation der Synthesestrategien zur Produktion des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops	191
4.5	Bereitstellung von putativen α1,2-Fukosyltransferasen für die Enzym-Module zur Synthese des Glykanepitops 2'-Fukosyllaktose	192
4.5.1	Aufreinigung der His ₆ PropAmuc aus <i>Akkermansia muciniphila</i>	193
4.5.2	Aufreinigung der His ₆ PropEpsH aus <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NIZO B40	194
4.5.3	Aufreinigung der His ₆ PropEps11 aus <i>Streptococcus thermophilus</i> LMG18311	195
4.5.4	Aufreinigung der His ₆ PropWbdN aus <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Salamae</i>	195
4.5.5	Aufreinigung der His ₆ PropWbgN aus <i>E. coli</i> O55:H7	196
4.5.6	Aufreinigung der His ₆ PropWblA aus <i>Vibrio cholerae</i> 022	197
4.5.7	Aufreinigung der His ₆ PropWbgL aus <i>E. coli</i> O126	198
4.5.8	Biochemische Charakterisierung der His ₆ PropWgbL	200
4.5.9	Klonierung und Expression von <i>his₆propfkp</i> aus <i>Bacterioides fragilis</i>	208
4.5.10	Aufreinigung der His ₆ PropFKP	208

4.6	Entwicklung und Optimierung einer modularen Enzym-Kaskade zur Synthese des Glykanepitops 2'-Fukosyllaktose	210
4.6.1	Sequentielle Enzymkaskade zur Synthese von 2'-Fukosyllaktose mit dem FKP- und FucT-Modul (Modul E + Modul F)	210
4.6.2	Sequentielle Synthese von 2'-Fukosyllaktose mit dem FKP- und FucT-Modul in einem Topf (Modul E + Modul F)	214
5	ZUSAMMENFASSUNG	216
6	SUMMARY	218
7	VERZEICHNISSE	220
7.1	Literaturverzeichnis	220
7.2	Abbildungsverzeichnis	237
7.3	Tabellenverzeichnis	245
7.4	Abkürzungsverzeichnis	248
8	ANHANG	252
8.1	Proteinsequenzen	252
8.1.1	His ₆ catGlcAT-P	252
8.1.2	His ₆ KFID	252
8.1.3	His ₆ UGD	252
8.1.4	UGDHis ₆	253
8.1.5	His ₆ UGDH1	253
8.1.6	His ₆ UGDH	253
8.1.7	His ₆ UMP	254
8.1.8	His ₆ catGlcAT-S	254
8.1.9	His ₆ PropWbgL	254
8.1.10	His ₆ PropFKP	255
8.1.11	SuSy1	255
8.2	DNA Sequenzen	256
8.2.1	<i>his₆catglcatp</i>	256
8.2.2	<i>his₆kfiD</i>	257
8.2.3	<i>his₆ugd</i>	257
8.2.4	<i>ugdhis₆</i>	258
8.2.5	<i>his₆ugdh1</i>	259

8.2.6	<i>his₆ugd</i>	260
8.2.7	<i>his₆ump</i>	261
8.2.8	<i>his₆catglcats</i>	262
8.2.9	<i>his₆propwbgL</i>	262
8.2.10	<i>his₆propfcp</i>	263
8.3	Alignment verschiedener Aminosäuresequenzen	266
8.4	Elektropherogramme der CE-UV Analyse	269
8.5	HPLC Chromatogramme	271
8.6	Bestimmung der Enzymstabilität	273
8.6.1	Enzymstabilität der His ₆ UGDH	273
8.6.2	Enzymstabilität der His ₆ KfiD	273
8.6.3	Enzymstabilität der His ₆ GlcAT-P	274
8.7	Medien und Puffer	275
8.7.1	LB Medium und LB Agar	275
8.7.2	TE-Puffer	275
8.7.3	SD-Agar	275
8.7.4	TAE-Puffer	275
8.7.5	TB Medium	276
8.7.6	HEPES-NaOH Puffer für Anionenaustauschchromatographie	276
8.7.7	10x SDS-Laufpuffer	276
8.7.8	Coomassie-Färbelösung	277
8.7.9	Coomassie-Entfärbelösung	277
8.7.10	TBS-Puffer	277
8.7.11	TBS-Tween	277
8.7.12	TBS-Blocking-Puffer	277
8.7.13	Antikörperlösung für Western Blotting	278
8.7.14	DAB-Lösung für Western Blotting	278
8.7.15	Transfer-Puffer	278
8.7.16	Boratpuffer	278
8.8	Geräte	279
8.9	Chemikalien	281

1 Einleitung

1.1 Bioaktive Glykokonjugate

Mit ihren terminalen Glykanstrukturen zählen Glykoproteine, Glykolipide und Proteoglykane zu der bedeutenden Klasse der Glykokonjugate. Deren komplexe Zuckerstrukturen zeigen einen großen Einfluss auf die distinkte Bioaktivität der natürlichen Produkte oder auf die Detoxifikation von Xenobiotika (Engels und Elling 2012). Sie spielen eine aktive Rolle bei der Strukturgebung und Stabilitätsregulation, bei der Signaltransduktion und der Apoptoseinduktion (Alavi und Axford 2008). Darüber hinaus dienen die Glykokonjugate als multifunktionale Informations-Carrier in der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kommunikation. Sie sind an der Steuerung von Entwicklungsprozessen, Infektionen und Immunreaktionen beteiligt (Lis und Sharon 1993). Die zahllosen unterschiedlichen Verknüpfungsmöglichkeiten zwischen den einzelnen Saccharideinheiten, die durch ihre Stereo- und Regioselektivität definiert sind, bedingen die hohe Komplexität im Aufbau der Glykanstrukturen. Damit sind sie Biopolymere mit der höchsten Diversität, die in der Natur vorkommen. Dies führt neben dem genetischen Code zu einem weiteren Transfersystem biospezifischer Informationen, dessen enorme kodierende Kapazität fundamental für die Modulation zellulärer Funktionen ist (Gagneux und Varki 1999, Alavi und Axford 2008). In eukaryontischen Zellen lassen sich die Glykokonjugate hauptsächlich in N- und O-Glykoproteine, in Glykolipide und in Proteoglykane aufteilen. Im Gegensatz zu den Glykolipiden und Glykoproteinen überwiegt bei den Proteoglykanen der Glykananteil. Als Interzellulärmatrixkomponente tragen die Proteoglykane eine oder mehrere Glykosaminoglykanketten (GAGs), die bis auf die Hyaluronsäure alle kovalent mit einem *Core*-Protein verknüpft sind (Varki *et al.* 2009). Die GAGs, z. B. Chondroitinsulfat, Heparansulfat, Dermatansulfat oder Keratansulfat, sind in viele physiologische Prozesse involviert. Zu ihnen zählen auch Zell-Zell-Adhäsion, Zellmigration, Zellproliferation und Metastasierung von Tumoren. Die Glykane der Proteine sind kovalent an der Amid-Gruppe des Asparagins (N-Glykan) oder an der Hydroxylgruppe des Serins oder Threonins (O-Glykan) gebunden (Aebi *et al.* 2010). Das spezifische Glykosylierungsmotiv der N-Glykane ist durch die Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr

gezeichnet (Kottgen *et al.* 2003, Marino *et al.* 2010). Die N-Glykosylierung erfolgt im rauen endoplasmatischen Retikulum durch einen cotranslationalen *en bloc Transfer* eines Dolicholpyrophosphat-Oligosaccharidvorläufers, bestehend aus 14 Monosacchariden, auf ein Asparagin der Konsensussequenz (Kowarik *et al.* 2006, Varki *et al.* 2009). Das Glykantrimming, die Verlängerung und die Termination erfolgen im Golgi Apparat (Varki *et al.* 2009). Dabei entstehen in Abhängigkeit von den anwesenden Glykosyltransferasen und Monosaccharidbausteinen drei unterschiedliche Glykandeterminanten: der Oligomannose-Typ, der Hybrid-Typ und der komplexe Typ (Abbildung 1). Allen drei Klassen ist die so genannte *Core-Struktur* $\text{Man}(\alpha 1-6)[\text{Man}(\alpha 1-3)]\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-\text{Asn-X})$ gemeinsam.

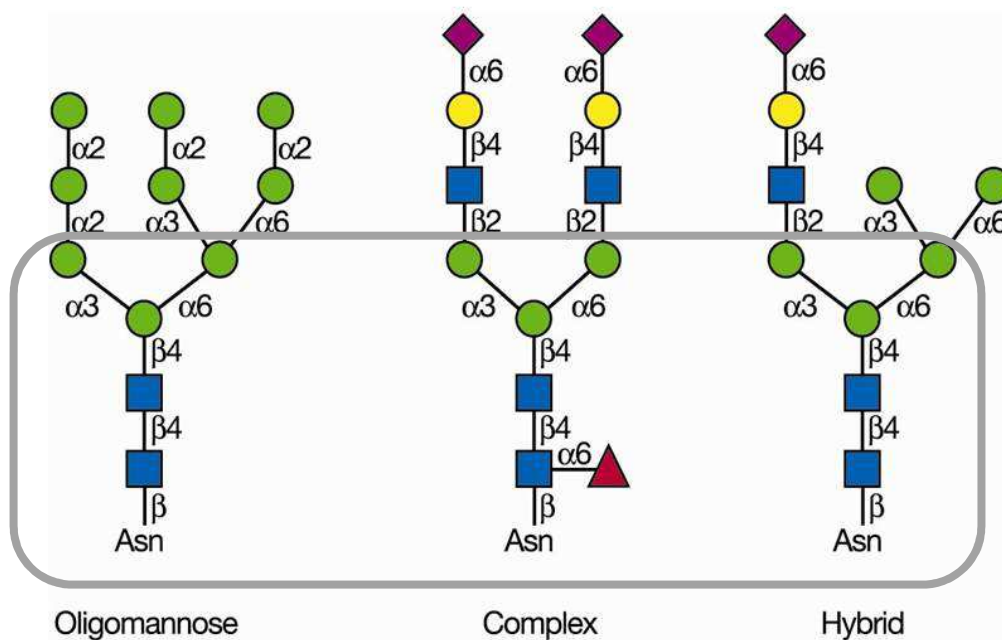


Abbildung 1: Klassen der N-Glykane nach Varki *et al.* (Varki *et al.* 2009)

Nach Glykantrimming, Verlängerung und Termination entstehen in Abhängigkeit von den anwesenden Glykosyltransferasen und Monosaccharidbausteinen drei unterschiedliche Glykan-Klassen: der Oligomannose-Typ, der Hybrid-Typ und der komplexe Typ. Die gemeinsame Kernregion (*Core-Struktur*) ist eingerahmt.

■ -GlcNAc; ● -Mannose; ▲ -Fucose; ● -Galaktose; ◆ -N-Acetylneuraminsäure

Im Vergleich zu N-Glykanen zeichnen sich O-Glykane durch kürzere Oligosaccharidstrukturen aus. Hierbei erfolgt die Biosynthese durch sequentiellen posttranslationalen Transfer der Monosaccharide auf das Polypeptid mithilfe spezifischer Glykosyltransferasen (Spiro 2002). Bei den O-Glykosylierungen findet man O-Glykane des

Mucin-Typs aber auch seltener vorkommende Strukturen wie z. B. Glukose-, *N*-Acetylglukosamin-, Galaktose-, Mannose- und Fukose-verknüpfte O-Glykane (Hossler *et al.* 2009). Serin, Threonin, Hydroxyprolin und Hydroxylysin mit Hydroxyl-Gruppen tragenden Seitenketten sind in der Lage O-glykosidische Verbindungen einzugehen. Bei der am häufigsten vorkommenden O-Glykosylierung des Mucin-Typs stellen Serin und Threonin die Bindungspartner der Polypeptide dar (Marino *et al.* 2010). Bei ihrer Biosynthese im Golgi Apparat wird in einem ersten Schritt *N*-Acetylgalaktosamin (GalNAc) durch Polypeptid-*N*-Acetylgalaktosaminyl-Transferasen (ppGalNAcTs) auf Serin oder Threonin übertragen (Bennett *et al.* 2012). Die Verlängerung der Glykankette erfolgt mit spezifischen Glykosyltransferasen, wobei 8 unterschiedliche Kernstrukturen entstehen können, die am nicht-reduzierenden Ende L-Fukose (L-Fuc), *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), D-Galaktose (Gal) oder *N*-Acetylgalaktosamin (GalNAc) tragen (Tabelle 1). Allen gemeinsam ist das Tn-Antigen GalNAc(α 1-Ser/Thr).

Tabelle 1: **Strukturen der O-Glykan-Kernstrukturen (Varki *et al.* 2009)**

Bezeichnung	Kernstruktur
Core 1 oder T-Antigen	Gal(β 1-3)GalNAc(α 1-Ser/Thr
Core 2	GlcNAc(β 1-6)[Gal(β 1-3)]GalNAc(α 1-Ser/Thr
Core 3	GlcNAc(β 1-3)GalNAc(α 1-Ser/Thr
Core 4	GlcNAc(β 1-6)[GlcNAc(β 1-3)]GalNAc(α 1-Ser/Thr
Core 5	GalNAc(α 1-3)GalNAc(α 1-Ser/Thr
Core 6	GlcNAc(β 1-6)GalNAc(α 1-Ser/Thr
Core 7	GalNAc(α 1-6)GalNAc(α 1-Ser/Thr
Core 8	Gal(α 1-3)GalNAc(α 1-Ser/Thr

Glykosphingolipide stellen wichtige Bestandteile der Zellmembran dar, bei denen die hydrophilen Kopfgruppen der Oligosaccharide als spezifische Erkennungssequenzen für Proteine fungieren. Die Grundstruktur dieser Glykokonjugate bildet das Ceramid, das sich vom Aminoalkohol Sphingosin ableitet. Durch Acetylierung der Aminogruppe mit einem Fettsäurerest und anschließender Verknüpfung der Hydroxylgruppe des Sphingosins mit dem ersten Zuckerrest entstehen Cerebroside. Bedingt durch die gebundene Hexose werden

Galaktocerebroside und Glukocerebroside unterschieden. Ausgehend vom Glukocerebrosid entsteht zunächst durch Transfer von Gal Laktosylceramid als gemeinsame Grundstruktur der neutralen Ceramidoligosaccharide (Globoside) und der sauren Glykosphingolipide. Ganglioside sind saure Sialinsäure enthaltende Glykosphingolipide (Abbildung 2), die sich durch mindestens eine, meistens mehrere Neu5Ac-Reste auszeichnen (Wennekes *et al.* 2009). Beispiele sind die Ganglioside der GM-, GD-, GT-, GQ-Serie.

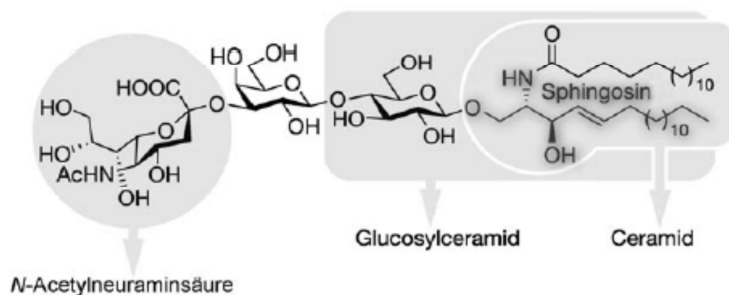


Abbildung 2: Struktur eines Glykosphingolipids (Gangliosid GM3) nach Wennekes *et al.* (Wennekes *et al.* 2009)

Die Grundstruktur dieser Glykokonjugate bildet das Ceramid, das sich vom Aminoalkohol Sphingosin ableitet. Durch Acetylierung der Aminogruppe mit einem Fettsäurerest und anschließender Verknüpfung der Hydroxylgruppe des Sphingosins mit dem ersten Zuckerrest entstehen Cerebroside.

Die sauren Glykosphingolipide sind Bestandteile der Membransysteme in Nervenzellen und der weißen Substanz des Gehirns. Im Nervensystem von Säugetieren ist eine fast zehnmal höhere Expression von Gangliosiden als in anderen Organen festzustellen (Kottgen *et al.* 2003). In einer neueren Publikation wird von der Regulation der Apoptose durch Sphingolipide in *S. cerevisiae* berichtet (Rego *et al.* 2014). Sie spielen eine bedeutende Rolle bei der zellulären Antwort auf diverse Stimuli und fungieren als *Messenger* in *Signal-Pathways*, die den Zellzyklusarrest, die Differenzierung, die Migration, die Angiogenese oder die Proliferation im zellulären Prozess kontrollieren (Hannun und Obeid 2008).

Trotz der hohen Diversität an vorkommenden Strukturen gibt es einige prominente Beispiele an Glykandeterminanten, die durch ihr häufiges Vorkommen für eine verstärkte Erkennung sprechen (Varki *et al.* 2009). Zu den häufigsten peripheren Strukturen zählen Typ 2 *N*-Acetyllaktosamin (LacNAc; Gal(β1-4)GlcNAc) und Typ 1 *N*-Acetyllaktosamin (Neo-LacNAc, Gal(β1-3)GlcNAc). Beide Grundstrukturen kommen im ABH(0)- und im Lewis Blutgruppensystem vor (Varki *et al.* 2009). Im Verlauf des Entwicklungsprozesses

unterliegen die terminalen Erkennungsstrukturen einer Regulation. Damit einher geht auch eine Veränderung des Informationsgehaltes der Glykandeterminanten. Während in der postnatalen Phase i-Blutgruppen-Antigene lineare poly-LacNAc Strukturen darstellen, werden die I-Gruppen eines älteren Menschen als verzweigte poly-LacNAc Struktur exprimiert. Veränderte Strukturen sind häufig assoziiert mit Krebserkrankungen oder auch Autoimmunerkrankungen. IgA Nephropathie und rheumatoide Arthritis repräsentieren eine pathologische Fehlsteuerung im Aufbau der Glykandeterminanten, die wegen einer A-Galaktosylierung zu einer entzündlichen Immunantwort führt (Floege und Feehally 2000, Floege 2003, Shinzaki *et al.* 2008). Ein abnormales O-Glykan vom Mucin-Typ, dessen Expression mit Krebserkrankungen und auch anderen Funktionsstörungen assoziiert ist, ist das Tn-Antigen, die Vorläuferstruktur vieler O-Glykane. Die Expression des Tn-Antigens kann als Folge einer Mutation einer spezifischen Galaktosyltransferase (T-Synthase) oder des Chaperons (Cosmc) auftreten (Ju *et al.* 2011). Auch in Prokaryonten kommen Glykokonjugate vor. Der Murein-Sacculus, das Stützskelett der Zellwand von grampositiven und gramnegativen Bakterien, ist ein netzartig aufgebautes Makromolekül aus Polysaccharidketten und quervernetzten Peptiden. Die Polysaccharidketten des Peptidoglykans sind alternierend aus *N*-Acetylglukosamin und *N*-Acetylmuraminsäure aufgebaut. Nach außen hin ist die Mureinhülle gramnegativer Bakterien mit einer Membran aus Lipoprotein und Lipopolysacchariden bedeckt. Die Lipopolysaccharide bestehen aus dem Lipid A, einem Kern-Oligosaccharid und den spezifischen O-Antigene (Samuel und Reeves 2003). Die Klassifizierung der gramnegativen Bakterien wird an Hand der O-Antigene, die extrem immunogen wirken, der H-Antigene (Flagellen) und der K-Antigene (Kapsel) vorgenommen (Nataro und Kaper 1998). Viele pathogene Stämme wie z. B. *E. coli* O128, O127 und O86 tragen Blutgruppen-Antigene auf ihrer äußeren Membran, um durch molekulares Mimikry dem Immunsystem des Wirtes zu entkommen (Ma *et al.* 2006, Moran 2008). Die klassische Definition der Glykokonjugate kann durchaus auf die in der Natur vorkommenden Sekundärmetabolite von Pflanzen und Mikroorganismen, wie z. B. Digitalis-Glykoside und die antibiotisch wirkenden Glykoside, Streptomycin und Kanamycin, ausgedehnt werden (Elling 1997). Die Biodiversität der natürlichen Produkte wird ermöglicht durch Mono- und Oligosaccharide, die an eine Aglykon-Einheit gebunden sind.

1.2 Synthese der Glykokonjugate

Das Verständnis von Struktur und Funktion der natürlich vorkommenden Glykokonjugate stellt immer noch eine Herausforderung dar. Studien zu den vielfältigen biologischen Prozessen erfordern die Bereitstellung definierter Glykokonjugatstrukturen als potentielle Zielprodukte für therapeutische und pharmazeutische Applikationen.

Aufgrund der strukturellen Diversität der Glykokonjugate ist die chemische Synthese dieser Biomoleküle schwierig. Das Schützen und Entschützen von funktionellen Gruppen ist zeitaufwendig und führt meist nur zu moderaten Ausbeuten. Die automatisierte Oligosaccharid-Synthese stellt einen innovativen Fortschritt auf chemischem Sektor dar (Seeberger 2009). Ferner konnten chemoenzymatische und Fest-Phasen unterstützte Synthesen die Produktion von Glykanen für funktionelle Studien erleichtern (Wu und Wong 2011, Bojarova *et al.* 2013). Für die präparative Synthese von Glykokonjugaten sind enzymatische Strategien jedoch attraktiver (Hancock *et al.* 2006, Rich und Withers 2009). Eine Voraussetzung hierfür ist die Verfügbarkeit von nativen oder rekombinanten Enzymen für die kovalente Ausbildung distinkter glykosidischer Verbindungen. Die enzymatische Synthese mithilfe von Glykosyltransferasen, Glykosidasen und Glykosynthasen in wässrigen Lösungen bei moderaten Temperaturen bewährte sich als zukunftsorientierte Methode mit einem Aspekt der Nachhaltigkeit.

1.2.1 Glykosidasen und Glykosynthasen

Glykosidasen stellen eine wichtige Gruppe von Enzymen dar, die neben ihrer hydrolysierenden Funktion auch zur Ausbildung einer glykosidischen Bindung durch reverse Hydrolyse oder Transglykosylierung befähigt sind (Schmaltz *et al.* 2011). Durch eine thermodynamisch oder kinetisch kontrollierte Reaktion wird die Synthesereaktion ermöglicht. Im Gegensatz zu der absoluten Stereo- und Regioselektivität der Transferasen kommt es wegen der fehlenden Präzision in der Regioselektivität zur Bildung von Regioisomeren (Bojarová und Křen 2009). Dies führt zusammen mit der Hydrolyse nur zu moderaten Produktausbeuten (Murata *et al.* 2005). Allgemein übliche Synthesestrategien sind hierbei der Einsatz von hohen Konzentrationen an Di- oder Oligosacchariden, kinetisch bevorzugten Substraten oder die Zugabe von organischen Solventien. Eine neuere Methode stellt die

Nutzung von Mikrowelleneinstrahlung zur Synthese von Nukleotid-aktivierten Oligosacchariden mit Galaktosidasen dar (Kamerke *et al.* 2012). Ein großer Vorteil bei der Synthese von Glykokonjugaten mit Glykosidasen ist die sehr gute Verfügbarkeit, viele werden im industriellen Maßstab produziert. Somit stellt der Einsatz an Glykosidasen oft keinen limitierenden Faktor dar. Maßgeschneiderte Mutagenesemethoden führten zu den sogenannten Glykosynthasen (Cobucci-Ponzano *et al.* 2011), die ohne glykanhydrolysierende Funktion effizient in Glykosylierungsreaktionen eingesetzt werden können (Perugino *et al.* 2004, Hancock *et al.* 2006). Diese Strategie ermöglichte den Aufbau eines enzymatischen Werkzeugkastens für gezielte Anwendungen (Kim *et al.* 2007).

1.2.2 Glykosyltransferasen

Zu den Glykosyltransferasen (GTs), einschließlich der Leloir- und Nicht-Leloir-Glykosyltransferasen, zählen 94 Familien. Sowohl putative als auch bereits identifizierte Enzyme sind aufgrund ihrer weitgehend übereinstimmenden Motive in der Primärsequenz in der CAZy-Datenbank (<http://www.CAZy.org/>) zu finden. Eine herausragende Eigenschaft der Glykosyltransferasen ist ihre absolute Stereo- und Regioselektivität, die die Synthese der Zielstrukturen ohne Entstehung von Nebenprodukten ermöglicht. Dabei katalysieren die Leloir-Glykosyltransferasen den Transfer eines Zuckerrestes von einem aktivierten Glykosyldonor (Nukleotidzucker) auf ein Akzeptorsubstrat. Das hohe Angebot von Akzeptorsubstraten umfasst Glykane, Lipide, Peptide, Nukleinsäuren sowie komplexe natürliche und synthetische Verbindungen (Bojarova *et al.* 2013). Gegenwärtige Limitationen für die Synthese der Glykanstrukturen sind allerdings der hohe Preis der erforderlichen Nukleotidzucker und die heterologe Produktion der Enzyme, die oft einhergeht mit nur moderaten Enzymaktivitäten. Darüber hinaus sind nicht alle Transferasen in rekombinanter Form für die Biokatalyse zugänglich. Des Weiteren zeigen einige GTs aufgrund der konservierten starren Strukturen der Donor-Akzeptor-Bindetasche der Enzyme keine Akzeptanz von modifizierten Akzeptorsubstraten, so dass der synthetische Zugang zu artifiziellen Neo-Glykokonjugaten eingeschränkt wird. Neuere Methoden des „Protein-Engineerings“ mit Sättigungsmutagenese, gezielter Mutagenese und zielgerichteter Evolution führten für einige Enzyme zu einem breiteren Substratspektrum (Williams *et al.* 2007, Williams *et al.* 2008). Die Promiskuität der Natur-Produkt-Glykosyltransferasen wird mit diesen Methoden enorm erweitert, so dass neue Applikationsmöglichkeiten zur

Verfügung stehen. Insgesamt betrachtet konnten ca. 65 Leloir-Glykosyltransferasen ihre hervorragende Funktionalität in der Glykokonjugatsynthese mit nahezu quantitativen Umsätzen beweisen (Schmaltz *et al.* 2011).

Unter den Nukleotidzucker-abhängigen GTs sind Vertreter der GT-A- und GT-B-Strukturen zu finden (Breton *et al.* 2006, Lairson *et al.* 2008). Die GT-B-Struktur besteht aus 2 einzelnen Rossmann Domänen mit einer verbindenden Linker-Region und einem katalytischen Zentrum zwischen den beiden Domänen. Ihre Struktur mit der C-terminalen Nukleotid-Binde-Domäne ist stark konserviert. Obwohl die GT-B Enzyme eine Enzymaktivierung durch divalente Metallionen erfahren, zeigen sie keine unbedingte Abhängigkeit von diesen Kofaktoren. Enzyme mit GT-A-Struktur weisen eine Rossmann Struktur mit $\alpha/\beta/\alpha$ Anordnung, bestehend aus 12 β -Faltblättern und 7 α -Helices, auf. Das typische DXD Motiv steht über die Koordination mit divalenten Kationen mit den Phosphatgruppen des Nukleotiddonors in Interaktion. So ergibt sich eine strikte Abhängigkeit von divalenten Metallionen für die Enzymaktivität. In beiden Struktur-Familien entspricht der Mechanismus des Glykosylgruppentransfers einer nukleophilen Substitution (Abbildung 3). Die Retention der Konfiguration am anomeren C1-Kohlenstoffatom des Zuckerringes erfolgt durch doppelte Verdrängung nach einer S_N1 -Reaktion, die Inversion verläuft durch einfache Verdrängung nach einer S_N2 Reaktion (Schmaltz *et al.* 2011).

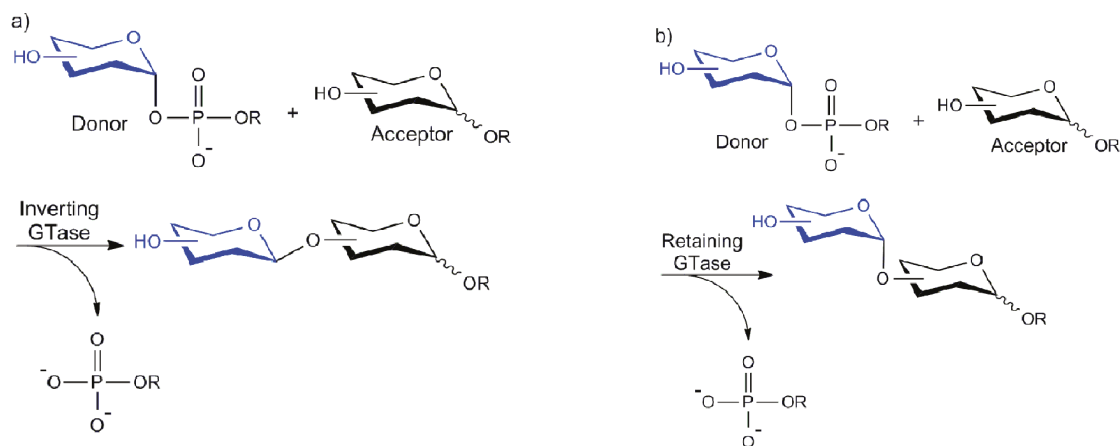


Abbildung 3: Nukleophile Substitution des Glykosylgruppentransfers nach Schmaltz *et al.* (Schmaltz *et al.* 2011)

Die Inversion der Konfiguration am anomeren C1-Kohlenstoffatom des Zuckerringes verläuft über einfache Verdrängung nach einer S_N2 Reaktion (a). Die Retention erfolgt über eine doppelte Verdrängung nach einer S_N1 Reaktion (b).

1.2.3 Nukleotidzucker

Für die Synthese von Glykokonjugaten mithilfe von Glykosyltransferasen sind die Nukleotidzucker als Donorsubstrate unerlässlich. Kommerziell verfügbar sind UDP- α -D-Glukose (UDP-Glc), UDP- α -D-Glukuronsäure (UDP-GlcA), UDP- α -D-Xylose (UDP-D-Xyl), UDP- α -D-Galaktose (UDP-Gal), UDP- α -D-Glukosamin (UDP-GlcNH₂), UDP- α -D-Galaktosamin (UDP-GalNH₂), CMP- β -D-Neuraminsäure (CMP-Neu5Ac), GDP- α -D-Mannose (GDP-Man) und GDP- β -L-Fukose (GDP-Fuc). Dabei offenbart sich GDP-Fuc mit einem Preis von circa 700 €/5 mg als der teuerste Nukleotidzucker. Wegen der sehr hohen Kosten ist die eigene Synthese dieser Donorsubstrate für die präparative Synthese von Glykokonjugaten von großem Interesse. Ausgehend von Nukleosid-Triphosphaten und einem aktivierten Zucker-1-Phosphat katalysieren Pyrophosphorylasen die Synthese der primären Nukleotidzucker. Die so hergestellten primären Nukleotidzucker können durch Epimerasen Dehydratasen, Reduktasen oder auch Carboxylasen zu sekundären Nukleotidzuckern modifiziert werden. Zu ihnen gehören UDP-Gal, UDP-GlcA, UDP-Xyl, UDP- α -D-Galakturonsäure (UDP-GalA) oder UDP-L-Arabinose (UDP-Ara). Zahlreiche Biosynthesewege der primären und sekundären Nukleotidzucker in Pro- und Eukaryonten sowie die präparative Synthese dieser natürlichen und nicht-natürlichen Zuckernukleotide sind umfangreich beschrieben worden (Elling 1997, Bültner und Elling 1999, Rupprath *et al.* 2005, Thibodeaux *et al.* 2008). Neuere verwendete Enzyme zur Synthese von UDP-aktivierten Zuckern sind UGPase aus *Helicobacter pylori* und CaLS7 aus *Micromonospora echinospora*, die zur *in vitro* Synthese von UDP-Glc und dTDP-Glukose (dTDP-Glc) eingesetzt wurden (Engels und Elling 2012). Ein sehr interessantes Beispiel wird von der Pyrophosphorylase aus *Populus deltoides* (kanadische Schwarz-Pappel) geliefert. Nach Expression in *E. coli* zeigte sie als GST-Fusionsprotein ausgehend von UTP und den entsprechenden Zucker-1-Phosphaten die Bildung von UDP-Glc und UDP-Gal (Kim und Ahn 2013). Die Promiskuität der UDP-Zucker-Pyrophosphorylase AtUSP aus *Arabidopsis thaliana* für die Nukleotide UTP, dUTP und dTTP ermöglichte die Synthese der natürlich vorkommenden UDP-Gal, UDP-Glc, dUDP-Galaktose und dTDP-Glc und der unnatürlichen Substrate UDP-D-6-Desoxy-Galaktose und UDP-4-Azido-Galaktose (Liu *et al.* 2013).

Die Rolle der bakteriellen dTDP-Zucker, die als Donorsubstrat für prokaryontische Glykosyltransferasen dienen, ist groß. Studien belegen die Rolle der Desoxyzucker als Erkennungselement beim Wirkungsmechanismus der Antibiotika und Anti-Tumor Pharmaka

(Rupprath *et al.* 2005). Die präparative Synthese von den dTDP-aktivierten Desoxyzuckern dTDP-6-Desoxy-4-Keto- α -D-Glukose (dTDP-4-Keto-6-Desoxy-Glc), dTDP- β -L-Rhamnose, (dTDP-Rha) dTDP- α -D-Quinovose und dTDP- α -D-Fukose ausgehend von dTDP und Saccharose ermöglichte den synthetischen Zugang zu Komponenten für die biochemische Charakterisierung des Biosynthesewegs der Desoxyzucker (Elling *et al.* 2005). Auch die in der Natur nicht vorkommenden derivatisierten Nukleotidzucker sind als Werkzeug für diagnostische Zwecke von großem Interesse. Durch chemoenzymatische Synthese gelang es, biotinylierte UDP-Gal- und UDP-GalNAc-Derivate herzustellen. Somit konnte eine neue Plattform-Technologie zur Diagnose von Krankheiten, die in Verbindung mit Glykandefekten stehen, entwickelt werden (Bülter *et al.* 1997, Bülter *et al.* 2001, Namdjou *et al.* 2007).

Ein Nukleotidzucker von besonderem kommerziellen Interesse ist UDP-GlcA, der in pflanzlichen, tierischen und bakteriellen Organismen im Glukuronatweg entsteht. Ausgehend von UDP-Glc katalysiert die UDP-Glukose-Dehydrogenase (EC 1.1.1.22) die Oxidation des C6-Kohlenstoffatoms zur Uronsäure. Im tierischen Stoffwechsel können viele körpereigene (z. B. Steroidhormone und Bilirubin) sowie körperfremde Stoffe, z. B. Pharmaka, nach Kopplung mit Glukuronsäure im Harn wasserlöslich ausgeschieden werden. Die UDP-GlcA ist daher ein bedeutender aktivierter Zucker. Die *in vitro* Glukuronidierung von Pharmazeutika ermöglicht eine schnelle Vorhersage über den Metabolismus neu entwickelter pharmazeutischer Wirkstoffe. In einem frühen Entwicklungsstadium kann eine Vorselektion von unerwünschten Eigenschaften des untersuchten Pharmakons, wie z. B. eine hohe hepatische *Clearance*, stattfinden und das Transferpotential der körpereigenen Glukuronyltransferasen untersucht werden. Diese frühzeitigen *in vitro* Untersuchungen zur Glukuronidierung reduzieren die hohen Kosten der Arzneimittelentwicklung in erheblichem Maße. Weiterhin stellt UDP-GlcA eine Synthesestufe von Glykosaminoglykanen, wie Hyaluronsäure (HA) und Chondroitinsulfat, dar, die im Gewebe Bestandteil der extrazellulären Matrix sind. Die fehlende Immunogenität macht HA zu einem sehr attraktiven Baustein für die Entwicklung neuartiger biopharmazeutischer Wirkstoffe und Biomaterialien. Zusammenfassend muss die UDP-GlcA für die *in vitro* Glukuronidierung von Pharmazeutika und für die *in vitro* Synthese von kurzkettiger Hyaluronsäure in ausreichenden Mengen zur Verfügung stehen. Nachteile bei der Isolierung der UDP-GlcA aus pflanzlichen und oder bakteriellen Organismen sind schwankende Konzentrationen und schlechte Ausbeuten. Im Mittelpunkt des Interesses stehen daher Systeme, die die Verfügbarkeit durch effektive und nachhaltige Syntheseverfahren garantieren. In den 50-iger Jahren wurde eine UDP-Glukose-

Dehydrogenase aus Kalbsleber zur *in vitro* Synthese von UDP-GlcA genutzt. *In vivo* konnte die Synthese von UDP-GlcA in *S. cerevisiae* etabliert werden. Hier wurde die in *S. cerevisiae* vorkommende intrinsische UDP-Glc zur Oxidation des Nukleotidzuckers durch Überexpression einer UDP-Glukose-Dehydrogenase genutzt (Oka und Jigami 2006). Eine enzymatische *in vitro* Synthese mit rekombinanten Enzymen wurde bislang nicht beschrieben. GDP-Fuc, ein weiterer Nukleotidzucker von großem Interesse, ist als Substrat für Fukosyltransferasen (FucTs) zur Synthese von fukosylierten Oligosacchariden unerlässlich. Des Weiteren ist auch der Einsatz von GDP-Fuc zur Entwicklung von Diagnostika bei Krankheiten, die mit einer A-Fukosylierung assoziiert sind, von Bedeutung. Zur Synthese von GDP-Fuc wurde das Salvage Pathway Gen *fkp* erstmals von Coyne *et al.* beschrieben (Coyne *et al.* 2005). Nach erfolgreicher Klonierung konnte es in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und die *in vitro* Funktion des Enzyms zur Produktion von GDP-Fuc ausgehend von L-Fuc, ATP und GTP nachgewiesen werden (Yi *et al.* 2009). Darüber hinaus fand das rekombinante Enzym Einsatz zur Synthese von Lewis^x Glykanderivaten (Wang *et al.* 2009).

1.2.4 Synthese von Glykokonjugaten mit Multi-Enzym-Kaskaden

Enzym-Kaskaden zur Synthese von Glykokonjugaten stellen eine attraktive Plattform dar, mit der hohe Ausbeuten von natürlichen und neuen hybriden Zuckerstrukturen erzielt werden können. Mit maßgeschneiderten Synthesestrategien kann ein breites Spektrum von Glykosidasen, Glykosyltransferasen und Kohlenhydrat-modifizierenden Enzymen sowie auch von Enzymen zur Nukleotidzucker Synthese aus unterschiedlichsten Quellen verwendet werden. Diese Multi-Enzym-Systeme können dabei als eine Kombination von Enzym-Modulen verstanden werden, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu nutzen sind (Sauerzapfe und Elling 2008).

1.2.4.1 *In vivo* Kaskaden

Die *in vivo* Kaskaden Synthese von Glykokonjugaten nutzt genetisch manipulierte Mikroorganismen als Zellreaktor. Mit gezielten Eingriffen in bekannte Biosynthesewege vieler Bakterien und niederer Eukaryonten werden durch Übertragen neuer Funktionalitäten Zellfabriken konstruiert. So werden entsprechende Gene zur Synthese von Glykanen aus gemeinsamen oder fremden Biosynthesewegen für die heterologe Expression in ausgewählte

Wirtsorganismen transformiert. Die Enzyme als Werkzeuge müssen nicht isoliert und aufgereinigt werden. Im Vergleich zu *in vitro* Bedingungen ist die Langzeitstabilität in der natürlichen Umgebung höher. Die *in situ* Regeneration der Kofaktoren kann durch den Metabolismus der genutzten Zellen bereitgestellt werden (Oroz-Guinea und García-Junceda 2013). Die mögliche Interaktion der Zielprodukte mit dem zentralen Metabolismus der Ganzzellreaktoren stellt einen generellen Nachteil für die Energieproduktion dar (Ruffing *et al.* 2006). Das Verhindern der Produktdegradierung erfordert die gezielte Ausschaltung der betreffenden Gene im Wirtsorganismus. Auch die Expression einer aktiven eukaryontischen Glykosyltransferase kann einen limitierenden Faktor darstellen, so dass der Wirt mit großer Sorgfalt ausgewählt werden muss (Ruffing *et al.* 2006). Reviews von Ruffing *et al.*, Sauerzapfe *et al.* und Chong *et al.* beschreiben eine Vielzahl von erfolgreichen Oligo- und Polysaccharidsynthesen in mikrobiellen Systemen mit kombinatorischer Biosynthese (Chong *et al.* 2005, Ruffing *et al.* 2006, Sauerzapfe und Elling 2008). Hervorzuheben sind hier insbesondere die Zielstrukturen, HA, 2'-Fukosyllaktose (2'-FL) und Rhamnolipide.

Die *in vivo* Produktion des Biopolymers HA, das in diverse biologische Prozesse involviert ist und wegen der fehlenden Immunogenität ein Substrat von kommerziellem Interesse darstellt, konnte in *Streptococcus zooepidemicus* erfolgreich etabliert werden (Blank *et al.* 2005, Chong *et al.* 2005). Hyaluronsäure ist ein nicht-sulfatiertes GAG, das aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten von β -1,4-D-Glukuronsäure und β -1,3-N-Acetyl-D-Glukosamin, (-4GlcA(β 1-3)GlcNAc(β 1-)) aufgebaut ist. Folglich müssen für die Synthese der HA mit der Hyaluronan Synthase (HasA in *Streptococcus zooepidemicus*) die Nukleotidzucker UDP-GlcA und UDP-GlcNAc bereitgestellt werden. Zur Produktion von HA wird der komplexe Syntheseweg von *Streptococcus zooepidemicus* genutzt (Abbildung 4). Beide Nukleotidzucker sind aber auch Komponenten der bakteriellen Zellwand. Daher steht die HA-Synthese in Konkurrenz mit dem Zellwachstum.

Zur Produktion des nicht-sulfatierten GAGs wird der komplexe Syntheseweg von *Streptococcus zooepidemicus* genutzt. Für die Synthese des Polymers mit der Hyaluronan Synthase (HasA) müssen die Nukleotidzucker UDP-GlcA und UDP-GlcNAc bereitgestellt werden.

Ein weiterer Fortschritt konnte mit einer Multi-Enzym-Kaskade zur Rhamnolipid Synthese (Abbildung 5) ausgehend von Glc mit dem nicht-pathogenen Bakterienstamm *Pseudomonas putida* erzielt werden (Wittgens *et al.* 2011). Rhamnolipide, aufgebaut aus ein oder zwei Hydroxyfettsäuren, glykosidisch mit ein oder zwei Rhamnoseresten verbunden, stellen in ihrer Eigenschaft als grenzflächenaktive Stoffe biologischer Herkunft Zielstrukturen von hohem industriellen Potential dar. Dazu wurden die Gene *rhlA* (3-Hydroxyacyl ACP O-3-Hydroxyacyltransferase) und *rhlB* (Rhamnosyltransferase) aus *Pseudomonas aeruginosa* in *Pseudomonas putida* exprimiert und der Entner Doudoroff Pathway sowie der Pentose-Phosphat Zyklus des Wirtes genutzt.

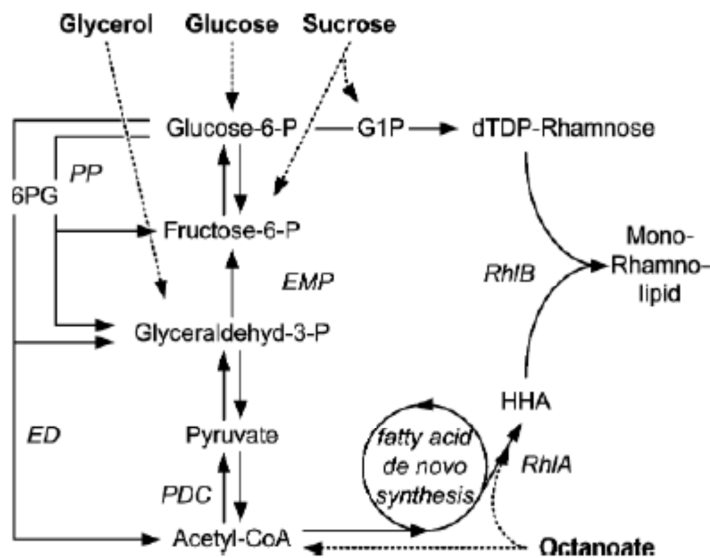


Abbildung 5: Syntheseweg zur Produktion von Rhamnolipiden in *Pseudomonas putida* nach Wittgens et. al. (Wittgens et al. 2011)

Zur Synthese der Rhamnolipide wurden die Gene *rhlA* (3-Hydroxyacyl ACP O-3-Hydroxyacyltransferase) und *rhlB* (Rhamnosyltransferase) aus *Pseudomonas aeruginosa* in *Pseudomonas putida* exprimiert und der Entner Doudoroff Pathway sowie der Pentose-Phosphat Zyklus des Wirtes genutzt. ED: Entner Doudoroff Pathway; PP: Pentose-Phosphat Zyklus; PDC: Pyruvatdecarboxylierung

Medizinisch relevante Glykanepitope stellen die Gal-Epitope dar. In der Natur kommen die Trisaccharide Gal(α 1,3)Gal(β 1,4)GlcNAc und Gal(α 1,3)Gal(β 1,4)Glc und das Pentasaccharid Gal(α 1,3)Gal(β 1,4)GlcNAc(β 1,3)Gal(β 1,4)Glc als Epitop auf Glykoproteinen und Glykolipiden bei nicht-Primaten Säugetieren vor. Aufgrund des nicht vorhandenen Epitops können α -Gal-Epitop modifizierte Vakzine zur verstärkten Immunisierung bei der Grippe-, HIV- und Krebstherapie verwendet werden. Ruffing et al. zeigten die erfolgreiche Produktion von Gal(α 1,3)Gal(β 1,4)Glc in *Agrobacterium* sp. (1 g/L Gal(α 1,3)Gal(β 1,4)Glc) durch Transformation eines Fusionskonstruktes einer UDP-Gal 4'-Epimerase und einer α 1,3-GalT unter Einsatz der Substrate Saccharose und Laktose (Ruffing und Chen 2010).

1.2.4.2 In vitro Kaskaden

Im Gegensatz zu den Ganzzellbiosynthesen von Glykokonjugaten stellen *in vitro* Synthesen weniger komplexe Systeme dar. Ein immer mehr expandierendes Angebot an Enzymen prokaryontischer und eukaryontischer Herkunft steht für *in vitro* Strategien zur Verfügung (Rosencrantz et al. 2014). Nach umfangreicher Charakterisierung der zu verwendenden Biokatalysatoren kann die Reaktionsführung im Hinblick auf eine ökonomische Synthese mit

einem minimalen Einsatz an Enzymen, durch Einstellen von unterschiedlichen Enzym- und Substratverhältnissen und durch Variation des pH-Wertes der Reaktionslösung optimiert werden. Für die verschiedenen Anwendungen können sowohl lösliche als auch immobilisierte Enzyme eingesetzt werden. Die Verwendung von immobilisierten Enzymen in der heterogenen Katalyse ermöglicht darüber hinaus eine kontinuierliche und wiederholte Reaktionsführung, die zu kostengünstigeren Arbeitsprozessen führt. Ein großer Nachteil ist allerdings die notwendige Enzymproduktion und Enzymbereinigung, die zeitintensiv ist. Die Produktisolation ist allerdings wegen der fehlenden Nebenprodukte, die die Aufreinigung des Zielproduktes bei der *in vivo* Biosynthese stören, weniger aufwendig. Im Allgemeinen führt dies auch zu höheren Produktausbeuten. Bei *in vitro* Kaskadensynthesen unterscheidet man zwischen sequentiellen und Ein-Topf Synthesen sowie konvergenten Synthesen, die jedoch alle ihre Vor- und Nachteile bieten.

Sequentielle Multi-Enzym-Kaskaden

Bei den sequentiellen Kaskadensystemen handelt es sich um offene Systeme von Mehrstufenprozessen mit einzelnen aufeinanderfolgenden Schritten der Enzymkatalyse. Jeder einzelne Schritt kann unabhängig von den anderen unter unterschiedlichen Reaktionsbedingungen geführt werden. Die Reaktionsführung erweist sich damit als wesentlich einfacher. Bei der klassischen Mehrstufensynthese werden die Zwischenprodukte zunächst isoliert. Dies ist zeitaufwendig und führt zu geringeren Ausbeuten an Zielprodukt. Darüber hinaus kann aber die aufwendige Isolation der Zwischenprodukte durch konsekutiven Einsatz der nächst folgenden Enzym-katalysierten Reaktion in einem Topf umgangen werden. Ein sehr bekanntes Beispiel liefert die chemoenzymatische Synthese von HA mit Einzelaktivitäten der GlcAT und GlcNAcT, die durch Mutagenese der bifunktionellen HA Synthase aus *Pasteurella multocida* generiert werden konnten (DeAngelis *et al.* 2003). Die immobilisierten Enzyme wurden hierbei sequentiell zur Synthese von HA-Einheiten mit definierter Länge eingesetzt. Eine weitere Applikation liefert die Synthese von Oligo-LacNAc Strukturen als Mediator der Zell-Zell-Kommunikation durch sequentiellen Einsatz der bakteriellen β 3-GlcNAcT aus *Helicobacter pylori* und der humanen β 4-GalT1 und den Substraten UDP-Gal und UDP-GlcNAc (Sauerzapfe *et al.* 2009). Ausgehend von einer chemisch modifizierten GlcNAc-Linker-*t*-Boc Struktur konnten mithilfe dieser Synthesestrategie bis zu 4 LacNAc-Einheiten mit definierter Länge produziert werden.

Zusätzlich gelang es, deren nicht reduzierendes Ende durch Verwendung von CMP-Neu5Ac mit Sialinsäure enzymatisch zu modifizieren (Abbildung 6). UDP-Gal und UDP-Gal-Biotin als Donorsubstrate führten mit einer α 1,3-GalT zu α 1,3-Galaktosyl-Derivaten.

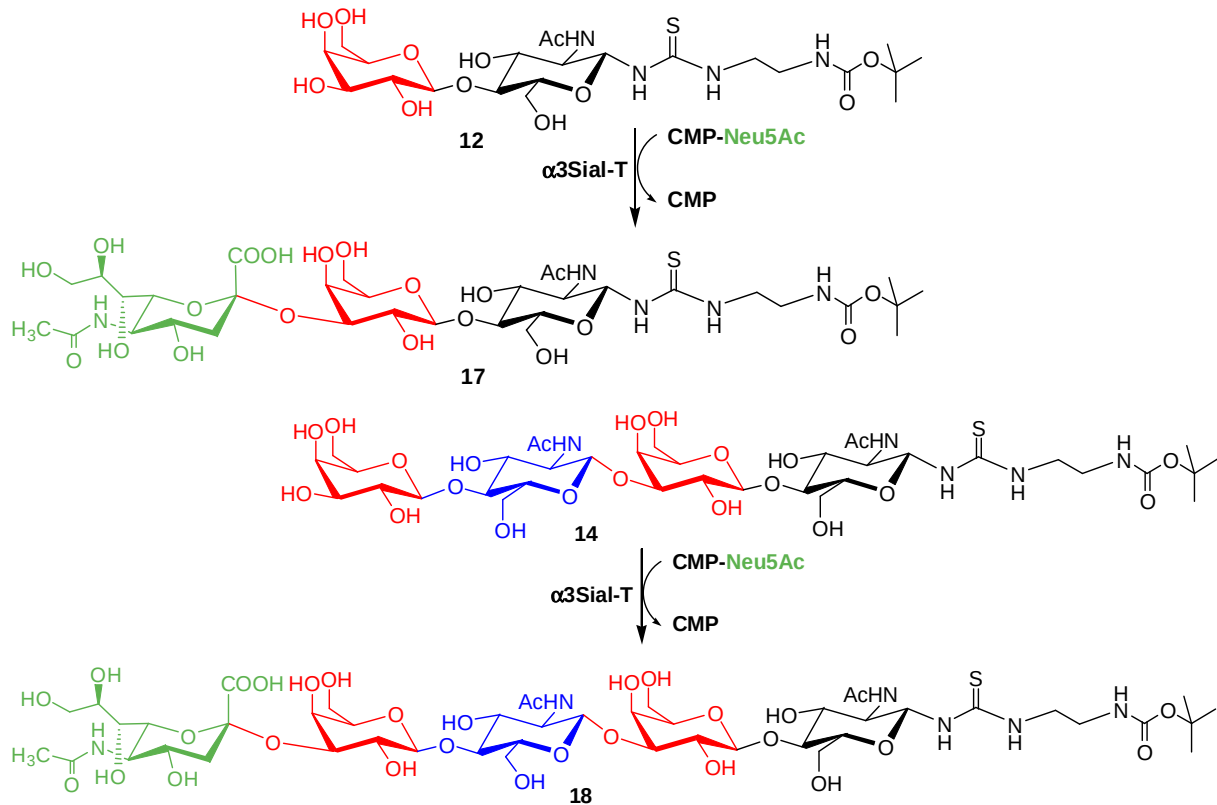


Abbildung 6: Enzymatische Modifikation von definierten LacNAc-Strukturen nach Sauerzapfe *et al.* (Sauerzapfe *et al.* 2009)

LacNAc (12) und DiLacNAc (14) wurden mit einer α 2,3-Sialyltransferase unter Verwendung von CMP-Neu5Ac als Donorsubstrat modifiziert.

N,N-Diacetyllaktosamin (LacDiNAc, GalNAc(β 1,4)GlcNAc) und seine Derivate GalNAc(β 1,4)GlcNAc-R sind hoch affine Liganden für Rezeptoren der immunstimulierenden natürlichen Killerzellen. Der synthetische Zugang zum immunstimulierenden Trisaccharid GalNAc(β 1,4)GlcNAc(β 1,4)ManNAc konnte durch eine Transglykosylierungsreaktion einer fungalen *N*- β -D-Acetylhexosaminidase (*Talaromyces flavus*) mit oxidierten GalNAc(β 1-*p*NP) Strukturen als Glykosyldonor und GlcNAc(β 1,4)ManNAc als Galaktosylakzeptor sowie anschließender chemischer Oxidation mit NaClO₄ ermöglicht werden (Fialová *et al.* 2005).

Multi-Enzym-Kaskaden in Ein-Topf Systemen

Multi-Enzym-Kaskaden in Ein-Topf Systemen finden alle im selben Reaktor statt, daher ist die Reaktionsführung allgemein anspruchsvoller als im sequentiellen Modus. Unter Berücksichtigung aller biochemischen Eigenschaften der involvierten Enzyme inklusive der Kreuzinhibition von Zwischenprodukten kann die Optimierung der Syntheseausbeute hier durch Variation des pH-Wertes, der Enzymverhältnisse und der Substratverhältnisse erfolgen. Des Weiteren ermöglicht dieses geschlossene System die Vermeidung der Produktinhibition einer einzelnen Enzym-katalysierten Reaktion. Ein großer Vorteil ist die Möglichkeit der *in situ* Regeneration der teuren Nukleotidzucker mit einem Synthesekreislauf, so dass die Synthesen kostengünstiger gestaltet werden können. Aufgrund der nicht notwendigen Isolation der Zwischenprodukte wird der Substratverlust von Intermediaten verhindert und die Gesamtausbeute des Zielproduktes erhöht. Gekoppelte Regenerationssysteme vermeiden darüber hinaus die Inhibition der Glykosyltransferasen durch die Nukleotidnebenprodukte. Der Aufwand von *in situ* Regenerationssystemen steigt mit der Enzymzahl und gleichzeitig sinkt die Ausbeute, so dass von der Enzymzahl kleinere Enzym-Modul-Systeme von Vorteil sind.

Erste *in situ* Regenerationssysteme für aktivierte Zucker wurden von der Arbeitsgruppe Wong beschrieben (Wong *et al.* 1982). Die enzymatische Synthese von LacNAc erfolgte durch *in situ* Regeneration von UDP-Glc und UDP-Gal. Die Arbeitsgruppe Elling verfolgte ebenfalls die *in situ* Regeneration von Nukleotidzuckern. Dabei stand die kombinierte enzymatische Synthese von aktivierten Zuckern ausgehend von Saccharose unter Verwendung der Saccharose Synthase 1 (SuSy1) im Fokus der Arbeiten. Mit einer Kaskade von drei Enzymen (SuSy1, UDP-Glc 4'-Epimerase und β 1,4-GalT) wurde die Synthese von LacNAc erfolgreich etabliert. Unter optimierten Bedingungen und unter Verwendung der repetitiven Batch-Technik ließen sich bei 100% Ausbeute 600 mg LacNAc produzieren (Zervosen und Elling 1996). Bei der Synthese des medizinisch relevanten Galili-Epitops mit seiner antigenen Determinante Gal(α 1,3)Gal(β 1,4)GlcNAc konnte die *in situ* Regeneration von UDP-Gal integriert werden. Hierzu wurden die Ausgangssubstrate GlcNAc und Saccharose sowie die Enzyme β 1,4-GalT, α 1,3-GalT, SuSy1 und UDP-Glc 4'-Epimerase benutzt (Hokke *et al.* 1996). Die Entwicklung eines Enzym-Modul-Systems zur Synthese von dTDP-Glc, dTDP-4-Keto-6-Desoxy-Glc und dTDP-Rha ausgehend von dTMP und Saccharose (Elling *et al.* 2005) lieferte eine exzellente Plattform für die Glykosylierung von Naturstoffen mit dem

ersten integrierten *in situ* Regenerationszyklus für dTDP-Desoxyzucker einschließlich der Regeneration des Kofaktors NADH (Rupprath *et al.* 2007). Aufgrund der Substratpromiskuität der Glykosyltransferase SorF aus *Sorangium cellulosum* ist es möglich, unterschiedliche bioaktive Sorangioside mit Hilfe von 6 Enzymen (SuSy1, RmlB, RmlC, RmlD, FDH und SorF) zu produzieren (Abbildung 7). Die Produktivität kann darüber hinaus durch wiederholten Gebrauch der involvierten Enzyme mit repetitiver Batch-Technik erhöht werden.

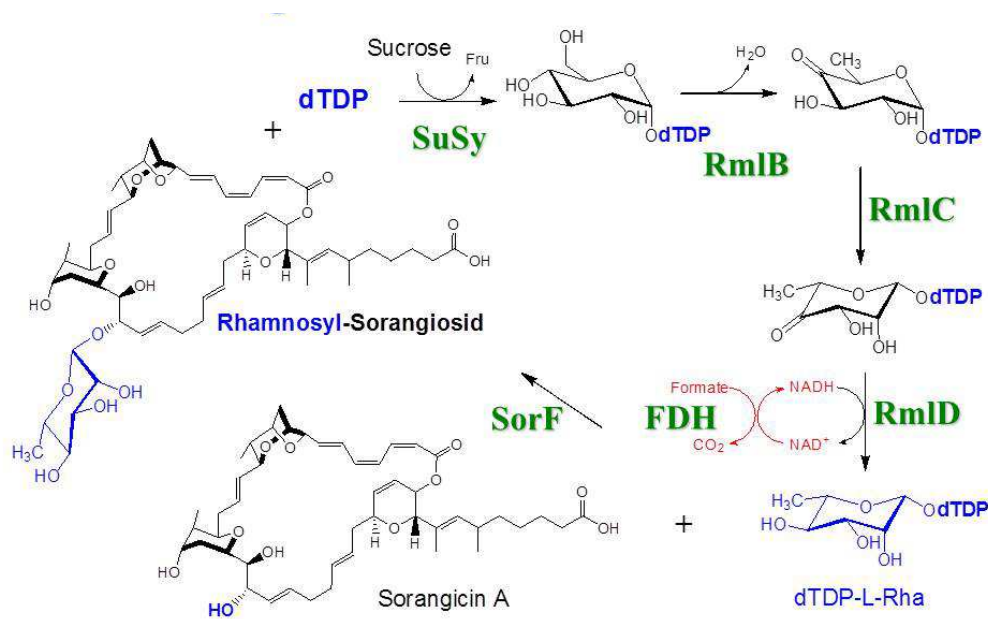


Abbildung 7: Synthese von Rhamnosylsorangiosid mit *in situ* Regeneration von dTDP-Rhamnose und NADH nach Rupprath *et al.* (Rupprath *et al.* 2007)

Mit der Glykosyltransferase SorF aus *Sorangium cellulosum* und SuSy1, RmlB, RmlC, RmlD und FDH gelang die Synthese von Rhamnosylsorangiosid einschließlich der *in situ* Regeneration von dTDP-Rhamnose und NADH. SuSy: Saccharose Synthase; RmlB: 4,6-Dehydratase; RmlC: 3,5-Epimerase; RmlD: 4-Ketoreduktase; FDH: Formiatdehydrogenase.

Die Ein-Topf Synthese von poly-*N*-Acetylaktosamin (poly-LacNAc), das als Ligand für die Biofunktionalisierung von Biomaterialoberflächen von großer Bedeutung ist, stellt den sequentiellen Synthesestrategien gegenüber ein effizienteres System dar. Mit einer gezielten Reaktionsführung konnten durch Kombination einer β 1,4-GalT, einer β 1,3-GlcNAcT und einer UDP-Glc 4'-Epimerase bis zu 6 LacNAc-Einheiten mit hohen Ausbeuten und minimiertem Produktverlust erreicht werden. Der Einsatz von optimierten

Enzymverhältnissen resultierte in einer Produktmischung mit dem Hexasaccharid als Hauptprodukt (Rech *et al.* 2011).

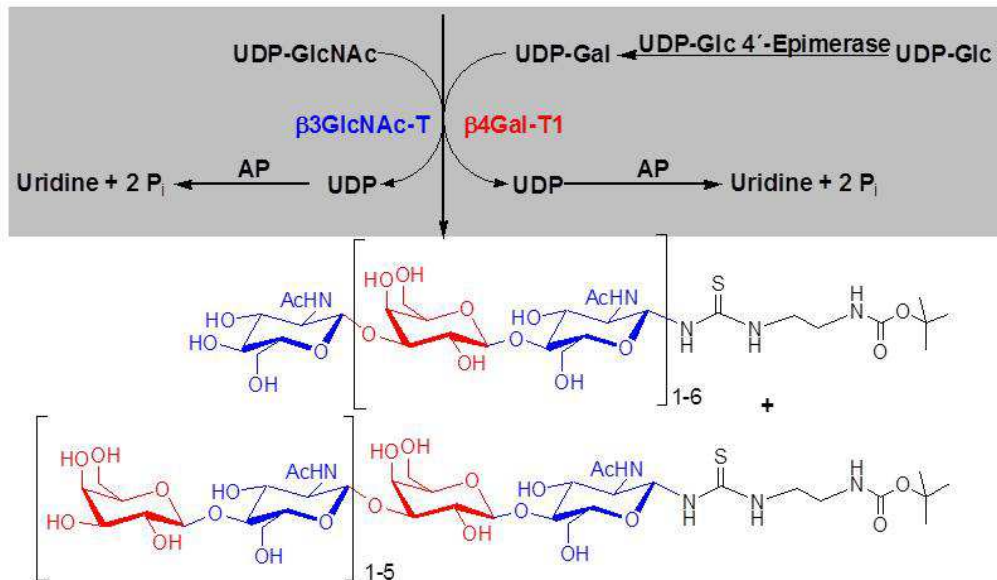


Abbildung 8: Kombinatorische Ein-Topf-Synthese von poly-LacNAc Oligomeren nach Rech *et al.* (Rech *et al.* 2011)

Durch Kombination einer β 1,4-GalT, einer β 1,3-GlcNAcT und einer UDP-GlcNAc 4-Epimerase können bis zu 6 LacNAc-Einheiten mit dem Hexasaccharid als Hauptprodukt synthetisiert werden. β 1,4-Galaktosyltransferase: β 1,4-GalT; β 1,3-N-Acetylglukosaminyltransferase: β 1,3-GlcNAcT; UDP-Glukose/N-Acetylglukosamin 4-Epimerase: UDP-Glukose 4'-Epimerase; alkalische Phosphatase: AP.

Konvergente Synthesen

In konvergenten Synthesen werden Produkte aus unabhängigen Synthesewegen in einer finalen Reaktion kombiniert (Rosencrantz *et al.* 2014). Hier kann jedes einzelne Substrat selbst in einer Kaskadenreaktion mit chemischen oder enzymatischen Methoden synthetisiert worden sein. Konvergente Synthesen eignen sich insbesondere bei der Verwendung von Ausgangssubstraten, deren Synthese sehr unterschiedliche Reaktionsbedingungen erfordert. Chemische Synthesestrategien, die meist auf Verwendung von organischen Lösungsmitteln und dem Einstellen von hohen Reaktionstemperaturen basieren, sind nicht kompatibel mit enzymatischen Schritten. Die konvergente Synthese erlaubt daher die Zusammenführung von Substraten zur Synthese von komplexen oder verzweigten Glykokonjugaten. Kupper *et al.* verwendeten diesen konvergenten Prozess zur chemoenzymatischen Modifikation von poly-LacNAc-Oligomeren und LacDiNAc (Kupper *et al.* 2012).

1.3 Glykokonjugate für therapeutische und pharmazeutische Applikationen

Die biologische Rolle der Glykokonjugate in physiologischen und pathologischen Prozessen machen sie zu potentiellen Zielstrukturen für therapeutische und pharmazeutische Applikationen. *In vivo* können die Vorläuferstrukturen der Glykoproteine und Glykolipide durch den Transfer von weiteren Monosacchariden mithilfe von Glykosyltransferasen verlängert werden und darüber hinaus auch durch Kohlenhydrat-modifizierende Enzyme verändert werden. Somit stehen hoch spezifische Epitope mit einem enormen Informationsgehalt für zelluläre Erkennungsreaktionen zur Verfügung.

1.3.1 HNK-1 Glykanepitop

Neben den schon bekannten Lewis Blutgruppenderminanten, den A/B/H(0)–Blutgruppenderminanten und den α 1,3-Gal Epitopen stellt das HNK-1 Epitop, (HSO₃-3GlcA(β 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc) eine weitere Zielstruktur für medizinische Applikationen dar. Bei der Biosynthese des HNK-1 Epitopes, das durch sequentiellen Transfer von D-Gal und D-GlcA auf ein endständiges GlcNAc eines verzweigten N- oder O-Glykans sowie eines Glykosphingolipids erfolgt, sind die β 1,4-GalT und die β 1,3-Glukuronyltransferase, GlcAT-P oder GlcAT-S, beteiligt. Die anschließende regiospezifische Sulfatierung der Glukuronsäure erfolgt mithilfe einer Sulfotransferase CHST10 (Abbildung 9). Das HNK-1 Epitop auf humanen natürlichen Killerzellen (*human natural killer cells*) wird von monoklonalen Antikörpern erkannt (Abo und Balch 1981). Die terminale Sulfo-3-Glukuronylgruppe ist dabei essentiell für die Immunoreaktivität mit den HNK-1 monoklonalen Antikörpern (Ilyas *et al.* 1990) und für ihre Funktionen (Schmitz *et al.* 1994).

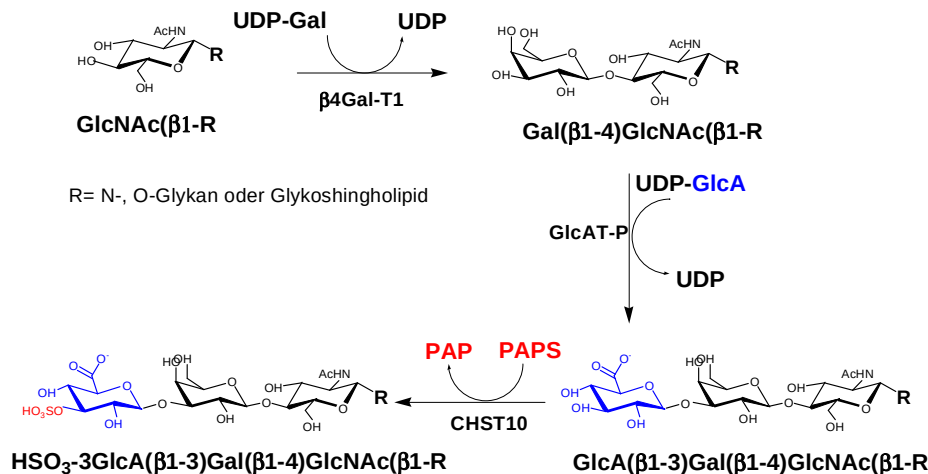


Abbildung 9: Biosynthese des HNK-1 Epitops

Die Biosynthese des HNK-1 Epitops erfolgt durch sequentiellen Transfer von Glukuronsäure (GlcA) auf eine LacNAc-Vorstufe eines verzweigten N- oder O-Glykans oder eines Glykosphingolipids mit anschließender regiospezifischer Sulfatierung der Glukuronsäure. Hierbei sind die Glukuronyltransferasen GlcAT-P oder GlcAT-S und die Sulfotransferase CHST10 beteiligt.

Die sulfatierte HNK-1 Glykanstruktur ist in viele physiologische Prozesse der Säugetiere involviert (Kleene und Schachner 2004). Das Epitop wird im peripheren und zentralen Nervensystem exprimiert und dort während der Entwicklungsphase temporär reguliert (Yoshihara *et al.* 1991). Das Vorkommen des sulfatierten Trisaccharids auf den Zelladhäsionsmolekülen (NCAM, L1, PO, MAG), auf den extrazellulären Matrixproteinen (Tenascin-R, Phosphacan) und auf den Glykosphingolipiden (SGGL-1, SGGL-2) (Morita *et al.* 2008) unterstreicht die Funktion in der Zellmigration, Zelladhäsion und im Axonwachstum (Kakuda *et al.* 2005). Interessanterweise sind Biomaterialoberflächen, die mit dem sulfatierten HNK-1 Epitop funktionalisiert sind, in der Lage, das Axonwachstum von motorischen Neuronen zu induzieren (Masand *et al.* 2012). Des Weiteren konnte in Zellkulturexperimenten von murinen und humanen Motoneuronen durch Zugabe des sulfatierten HNK-1-Peptids zum Wachstumsmedium neben einer verlängerten Lebensdauer eine signifikant längere Ausbildung von Neuriten beobachtet werden (Simova *et al.* 2006). Phylogenetisch scheint das HNK-1 Epitop hoch konserviert zu sein, da es nicht nur in Vertebraten sondern auch auf Glykoproteinen und Glykolipiden von Insekten zu finden ist (Liedtke *et al.* 2001, Morita *et al.* 2008). Die erhöhte Expression des HNK-1 Epitops beim Melanom (Casado *et al.* 2008) und beim Nephroblastom macht es als zukünftigen Tumormarker interessant (Allory *et al.* 2006). Das nicht-sulfatierte HNK-1 Epitop (GlcA(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc) konnte auf den Metallo-Proteasen, Meprin und

Aminopeptidase, in der murinen Niere nachgewiesen werden (Tagawa *et al.* 2005). Die Glykanstruktur soll hier eine Regulation der Enzymaktivität bewirken. Studien von Kizuka *et al.* bestätigten das Vorkommen des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops auf Laminin 1 der murinen Nierenrinde, das *in vitro* mit dem in der Basalmembran vorkommenden α -Dystroglykan Rezeptor interagiert (Kizuka *et al.* 2008). Insgesamt stellen das HNK-1 Epitop und seine nicht-sulfatierte Vorstufe interessante Glykanstrukturen zur Funktionalisierung von Biomaterialoberflächen dar, um die elementaren Mechanismen der Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen zu untersuchen.

Die chemische Synthese erweist sich aufgrund der aufwendigen Schutzgruppentechnik als arbeits- und zeitintensiv (Belot *et al.* 2003, Tsvetkov *et al.* 2012). *In vivo* konnte die Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops auf eine Neo-Laktohexaose Glykanstruktur in einem genetisch modifizierten *E. coli* K12 Stamm (Yavuz *et al.* 2008) etabliert werden. Die molekularen Mechanismen der Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktion des HNK-1 Epitops und seiner nicht-sulfatierten Vorstufe zu untersuchen, erfordert die Bereitstellung des Glukuronids in ausreichenden Mengen. Die Verfügbarkeit des Glukuronylliganden zur Biofunktionalisierung von Biomaterialien stellt gegenwärtig noch eine Limitierung dar.

1.3.2 Fukosylierte Oligosaccharide

Milch enthält neben Glykoproteinen und Glykolipiden eine große Menge an freien Oligosacchariden (Kobata 2010). Neben Laktose und Fettsäuren repräsentieren sie in der Muttermilch die dritte Hauptkomponente, die aus 3-15 Monosaccharidbausteinen bestehen können und Laktose am reduzierenden Ende enthalten (Garrido *et al.* 2013). Als weitere Monosaccharidbausteine kommen Glc, Gal, GlcNAc, Fuc und Neu5Ac vor. Die Oligosaccharide werden durch konzertierte Transferreaktion verschiedener Glykosyltransferasen produziert. Während die Milchnährstoffe wie Laktose, Lipide und Proteine unmittelbar verdaut und damit dem Energiestoffwechsel zur Verfügung gestellt werden können, passieren die freien Oligosaccharide, die Glykoproteine und Glykolipide den Gastro-Intestinaltrakt zur Regulation der Darmflora (Garrido *et al.* 2013). Ihre physiologische Rolle konnte bisher nicht vollständig geklärt werden. Schwertmann *et al.* identifizierten lösliche Sialyl-Lewis Strukturen (Sialyl Lewis^a, Sialyl Lewis^x, Lewis^x, und Lewis^y Epitope) aus der Milch als potentielle Liganden für Zelladhäsionsmoleküle (Schwertmann *et al.* 1996).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Oligosaccharide mit Fuc(α 1-2)Gal oder Fuc(α 1-3)Glc am nicht reduzierenden Ende eine wichtige Funktion bei der Bindung von bakteriellen Pathogenen übernehmen (Morrow *et al.* 2005, Perret *et al.* 2005). Humane Milch-Oligosaccharide sind in der Lage, die Bindungsepitope von pathogenen Mikroorganismen zu imitieren, zu binden und durch den Gastro-Intestinaltrakt auszuscheiden (Peterson *et al.* 2013). Diese natürliche Form der Immunabwehr wird auch als „Immun-Exklusion“ bezeichnet (Royle *et al.* 2003). Somit zeigen insbesondere Fuc- und Neu5Ac-terminierte Oligosaccharide einen wichtigen Beitrag bei der Immunabwehr von pathogenen Keimen (Garrido *et al.* 2013). Aufgrund der protektiven Eigenschaften stellen sie als Antieffektiva und als Praebiotikum eine sehr interessante Substanzklasse zur industriellen Produktion dar. Die *in vitro* Synthese von Fuc(α 1-2)Gal(β 1-4)Glc (2'-Fukosyllaktose, 2'-FL) wurde bereits von Albermann *et al.* beschrieben (Albermann *et al.* 2001). Hier wurden die GDP-Mannose 4,6-Dehydratase (Gmd) und die GDP-4-Keto-6-Desoxymannose 3,5-Epimerase 4-Reduktase für die bakterielle *de-novo* Biosynthese von GDP-Fuc mit einer α 1,2-FucT (FutC) aus *Helicobacter pylori* kombiniert. Drouillard *et al.* konnten bereits die Produktion von 2'-FL mit einem genetisch modifizierten *E. coli* Stamm durch Überexpression von FutC und Laktose als Substrat etablieren (Drouillard *et al.* 2006). Dabei konnte eine Ausbeute von 11 g/L Trisaccharid erzielt werden. Im Gegensatz dazu liefert die Synthesestrategie mit einer *de-novo* Synthese von GDP-Fuc in Kombination mit FutC nur 1,2 g/L (Lee *et al.* 2012). Neben der genetischen Manipulation des GDP-Mannose Biosyntheseweges, der Regeneration von NADPH und des GTP-Biosyntheseweges wurden die Gene *gmd* und *wcaG* sowie *manB* und *manC* zusätzlich Plasmid-gesteuert überexprimiert (Abbildung 10).

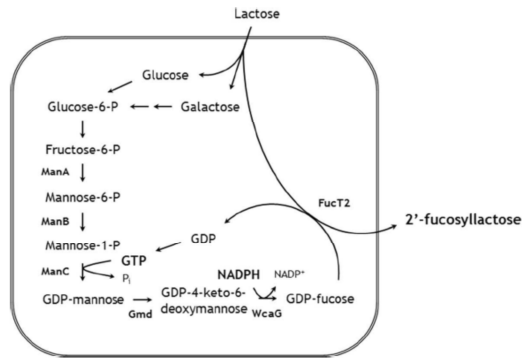


Abbildung 10: In vivo Synthese von GDP-Fuc und 2'-FL in rekombinanten *E. coli* nach Lee *et al.* (Lee *et al.* 2012)

Neben der genetischen Manipulation des GDP-Mannose Biosyntheseweges, der Regeneration von NADPH und des GTP-Biosyntheseweges wurden die Gene *gmd* und *wcaG* sowie *manB* und *manC* zusätzlich Plasmid-gesteuert überexprimiert. ManA: Mannose 6-P-Dehydrogenase; ManB: Phosphomannomutase; ManC: Mannose 1-P-Guanylyltransferase; GmD: GDP-Mannose 4,6-Dehydratase, WcaG: GDP-4-Keto-6-Desoxymannose 3,5-Epimerase 4-Reduktase; FucT2: α 1,2-FucT.

Eine deutliche Verbesserung konnte durch chromosomale Integration der Gene des *de-novo* Biosyntheseweges für GDP-Fuc (*gmd*, *wcaG*, *manB* und *manA*) und zwei zusätzlichen Kopien des *futC* Gens gezeigt werden (Baumgärtner *et al.* 2013). Ausgehend von den Substraten Laktose und Glycerin als C-Quelle konnte eine Produktkonzentration von 20 g/L erreicht werden. Weitere FucTs, die sich aufgrund ihrer guten Aktivität mit Laktose als Akzeptorsubstrat für einen industriellen Prozess eignen, waren zu Beginn dieser Arbeit nicht beschrieben.

2 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Dissertation beinhaltete die Entwicklung von modularen Enzym-Kaskaden zur Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops (GlcA(β 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-R) und des Glykanepitops 2'-Fukosyllaktose (2'FL, Fuc(α 1-2)Gal(β 1-4)Glc) sowie die Bereitstellung von UDP-Glukuronsäure (UDP-GlcA) als Donorsubstrat für das nicht-sulfatierte HNK-1 Epitop.

2.1 Modulare Enzym-Kaskaden zur Synthese von UDP-GlcA

Für die präparative *in vitro* Synthese von UDP-GlcA sollten Enzym-Kaskaden unterschiedlicher Komplexität durch Kombination von rekombinanten Enzymen aus diversen Quellen entwickelt und bewertet werden. Hierzu standen drei Enzym-Modul-Systeme (EMS) zur Auswahl: der einstufige Syntheseweg mit dem UGDH-Modul (Modul C), die Kopplung des UGDH-Moduls mit dem SuSy-Modul (Modul B + Modul C) sowie die Kopplung des UGDH-Moduls mit dem SuSy- und UMPK-Modul (Modul A + Modul B + Modul C). Die Oxidation von UDP-Glukose (UDP-Glc) zu UDP-GlcA mithilfe einer UDP-Glukose-Dehydrogenase stellt den direkten Weg zur Synthese von UDP-GlcA dar (Modul C, Abbildung 11). Für eine kostengünstige Synthese sollte zusätzlich eine Kofaktor-Regenerierung von NAD^+ integriert werden. Hier boten sich das Laktat-Dehydrogenase/Pyruvat-System oder das NADH-Oxidase/ O_2 -System an.

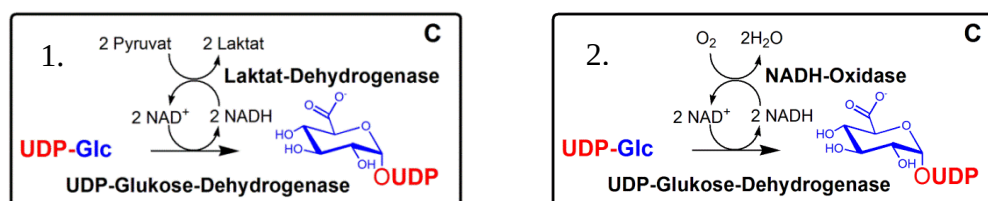


Abbildung 11: Modulare Enzym-Kaskaden zur Synthese von UDP-GlcA mit dem UGDH-Modul und *in situ* Regeneration von NAD^+ (Modul C)

Die UDP-Glukose-Dehydrogenase oxidiert mithilfe des Kofaktors NAD^+ UDP-Glc zu UDP-GlcA. Die *in situ* Regeneration von NAD^+ kann mithilfe des Laktat-Dehydrogenase/Pyruvat-Systems (1) oder mithilfe des NADH-Oxidase/ O_2 -Systems (2) ermöglicht werden.

Für die kombinatorische Synthesestrategie durch Kopplung des UGDH-Moduls mit dem SuSy-Modul (Modul B + Modul C, Abbildung 12) in einem Topf sollte die Saccharose Synthase 1 (SuSy1 aus *Solanum tuberosum*) eingesetzt werden. SuSy1 sollte ausgehend von UDP und dem nachwachsenden Rohstoff Saccharose im Modul B zur Synthese von UDP-Glc mit den Enzymen des UGDH-Moduls kombiniert werden. Für die Etablierung des Enzym-Modul-Systems stand die rekombinante SuSy1 aus den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Elling zur Verfügung, die eine sehr gute Basis für die Synthese der UDP-GlcA lieferte.

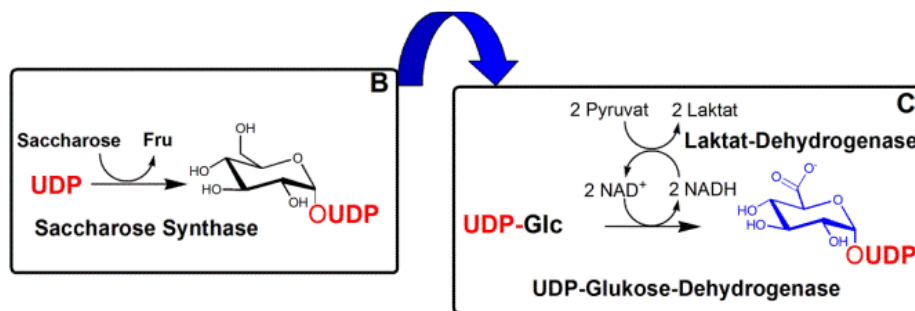


Abbildung 12: Modulare Enzym-Kaskade zur Synthese von UDP-GlcA durch Kopplung des SuSy-Moduls mit dem UGDH-Modul (Modul B + Modul C)

Im Modul B wird SuSy1 zur Synthese von UDP-Glc ausgehend von den Substraten UDP und Saccharose verwendet. Die UDP-Glukose-Dehydrogenase im Modul C oxidiert mithilfe des Kofaktors NAD⁺ UDP-Glc zu UDP-GlcA.

Als drittes EMS sollte die Kopplung des SuSy- und UGDH-Moduls mit dem UMPK-Modul (Modul A + Modul B + Modul C, Abbildung 13) überprüft werden. Das UMPK-Modul sollte die Bereitstellung von UDP mit einer UMP-Kinase und dem preiswerten Substrat UMP gewährleisten. Für die Regeneration des Phosphatdonors ATP wurde der Einsatz des PEP/Pyruvatkinase-Systems geplant.

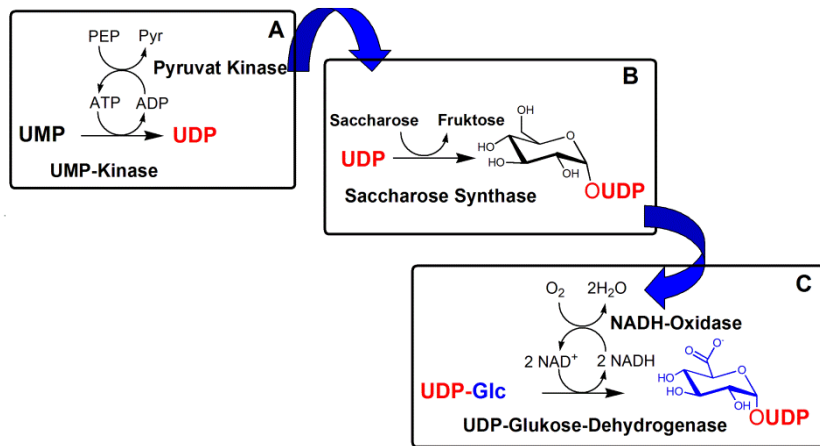


Abbildung 13: Modulare Enzym-Kaskade zur Synthese von UDP-GlcA durch Kopplung des SuSy-Moduls mit dem UGDH- und UMPK-Modul (Modul A + Modul B + Modul C)

Im UMPK-Modul (Modul A) erfolgt die Phosphorylierung von UMP zu UDP mithilfe der UMP-Kinase und unter Verwendung des Phosphatdonors ATP. Die Regeneration von ATP wird durch das PEP/Pyruvatkinase-System garantiert. Im Modul B wird SuSy1 zur Synthese von UDP-GlcA verwendet. Die UDP-Glukose-Dehydrogenase im Modul C oxidiert mithilfe des Kofaktors NAD⁺ UDP-GlcA zu UDP-GlcA.

So standen in einem ersten Schritt die Klonierung und Expression von Genen zur Synthese von UDP und UDP-GlcA an. Nach Produktion einer geeigneten UMP-Kinase und UDP-Glukose-Dehydrogenase sollte eine umfassende biochemische Charakterisierung der Enzyme Erkenntnisse zur Kompatibilität der Enzym-Module und der daraus abzuleitenden Reaktionsführung (Ein-Topf System oder Zwei-Reaktoren System) liefern. Nach der schrittweisen Kopplung der einzelnen Module war abschließend die Evaluation der verschiedenen Synthesestrategien vorgesehen.

2.2 Modulare Enzym-Kaskaden zur Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops

Ein herausragender Vorteil des hier verwendeten EMS ist die Möglichkeit der Kombination des SuSy- und UGDH-Moduls mit einem weiteren Enzym-Modul, dem Glukuronyltransferase-Modul (GlcAT-Modul), für die präparative Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops (Abbildung 14). Im GlcAT-Modul katalysiert eine Glukuronyltransferase die Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops durch regioselektiven Transfer von GlcA auf eine terminale *N*-Acetyllaktosamin-Struktur (Typ 2 LacNAc). Die hier verwendete modifizierte Typ 2 LacNAc Struktur, Gal(β1-4)GlcNAc(β1-

Linker-NH₂-*t*-Boc (LacNAc-Linker-*t*-Boc), soll der späteren Funktionalisierung von Biomateriäloberflächen dienen (Rech *et al.* 2011).

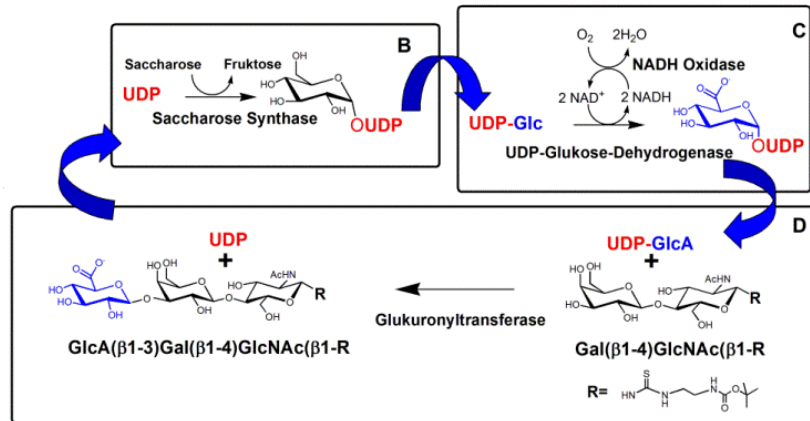


Abbildung 14: Modulare Enzym-Kaskaden zur Synthese von GlcA-LacNAc-Linker-*t*-Boc durch Kopplung des UGDH-Moduls mit dem GlcAT-Modul (Modul C + Modul D) oder durch Kopplung des SuSy-Moduls mit dem UGDH- und GlcAT-Modul (Modul B + Modul C + Modul D)

Bei der Kopplung von Modul C und Modul D oxidiert die UDP-Glukose-Dehydrogenase im Modul C mithilfe des Kofaktors NAD⁺ UDP-Glc zu UDP-GlcA. Im Modul D transferiert die Glukuronyltransferase UDP-GlcA auf das Akzeptorsubstrat Gal(β1-4)GlcNAc(β1-Linker-NH₂-*t*-Boc unter Freisetzung von UDP. Durch Kopplung von Modul B, Modul C und Modul D in einem Topf kann SuSy1 freigesetztes UDP zur Synthese von UDP-Glc verwenden, so dass sich im Modul B der Kreislauf schließt. Dies garantiert die *in situ* Regeneration von UDP-GlcA.

Für die Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops sollten Glukuronyltransferasen rekombinant in *E. coli* produziert und anschließend zwecks Einbindung in das geplante EMS umfassend biochemisch charakterisiert werden. Auch hier sollten die generierten Daten Erkenntnisse zur Kompatibilität der Enzym-Module und zur Reaktionsführung liefern. Ausgehend von der Kopplung des UGDH-Moduls mit dem GlcAT-Modul sollte die zusätzliche Kombination mit dem SuSy-Modul schrittweise erfolgen (Abbildung 14). Letztere Synthesestrategie sollte die *in situ* Regeneration der sehr teuren UDP-GlcA in einer Ein-Topf Synthese garantieren. Auch hier wurde nach der schrittweisen Kopplung der einzelnen Module abschließend die Evaluation der verschiedenen Synthesekonzepte geplant.

2.3 Modulare Enzym-Kaskade zur Synthese des Glykanepitops 2'-Fukosyllaktose

Im Rahmen des BMBF *BiochancePlus* Projektes „Entwicklung eines innovativen Produktionsverfahrens für Fukosyllaktose“ (BMBF Az.: **0315170**) mit der Fa. Jennewein Biotechnologie GmbH stellte sich die Aufgabe, neuartige α 1,2-L-Fukosyltransferasen (α 1,2-FucTs) für die enzymatische Produktion von 2'-Fukosyllaktose (2'-FL) zu identifizieren und zu charakterisieren. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war in der wissenschaftlichen Literatur sowie in der Patentliteratur nur eine einzige α 1,2-FucT, FutC aus *Helicobacter pylori*, beschrieben. Diese zeigt eine gute Aktivität für die Produktion von 2'-FL in einem genetisch veränderten *E. coli* Stamm (Drouillard *et al.* 2006). Das zu lösende technische Problem bestand nun darin, eine neuartige α 1,2-FucT zu finden, die eine niedrige Sequenzhomologie zu FutC aufweist und durch eine vergleichbare oder bessere Aktivität mit Laktose als Akzeptor die enzymatische Produktion von 2'-FL ermöglicht (Modul F, Abbildung 15). Nach Identifikation und biochemischer Charakterisierung einer geeigneten α 1,2-FucT im FucT-Modul wurde die präparative Synthese von 2'-FL in den Fokus gestellt. Um die Bereitstellung von GDP-Fukose (GDP-Fuc) ausgehend von den Substraten ATP, GTP und L-Fukose (L-Fuc) zu garantieren, sollte zusätzlich die Produktion der bifunktionalen L-Fukokinase/L-Fuc-1-P Guanylyltransferase (FKP) (UniProtKB/Swiss-Prot/accession number: Q58T34) aus *Bacterioides fragilis* 9343 im FKP-Modul eingeführt werden (Modul E, Abbildung 15). Abschließend sollten die Synthesestrategien zur Herstellung von 2'-FL im sequentiellen Modus überprüft werden.

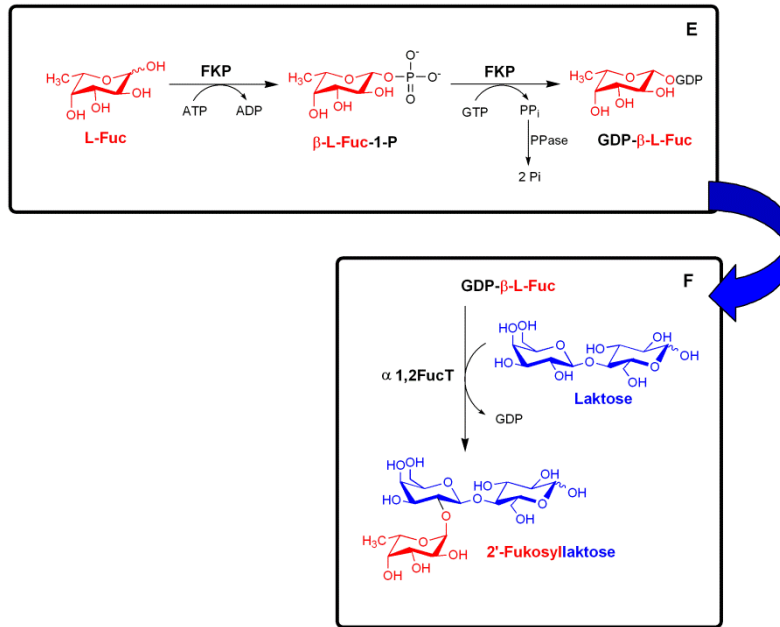


Abbildung 15: Modulare Enzym-Kaskade zur Synthese des Glykanepitops 2'-FL durch Kopplung des FKP-Moduls mit dem FucT-Modul (Modul E + Modul F) im sequentiellen Modus modifiziert nach Engels *et al.* (Engels und Elling 2014)

Im FKP-Modul (Modul E) erfolgt die Synthese von GDP-Fuc mit der bifunktionalen L-Fukokinase/L-Fuc-1-P Guanylyltransferase (FKP) ausgehend von den Substraten ATP, GTP und L-Fuc. Im FucT-Modul (Modul F) wird GDP-Fuc mithilfe einer α1,2-FucT unter Freisetzung von GDP auf das Akzeptorsubstrat Laktose übertragen.

3 Material und Methoden

3.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

3.1.1 Isolation von RNA

Für die Isolation der gesamten RNA wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen (Köln, Deutschland) verwendet. Mit dieser Technologie können Moleküle länger als 200 Nukleotide gereinigt werden. Dies führt zu einer Anreicherung der mRNA, da kleinere RNA-Moleküle wie z. B. 5,8S rRNA, 5S rRNA und tRNA selektiv ausgeschlossen werden können. Die Technologie verknüpft die selektive Bindeeigenschaft der Silika basierenden Membranen mit der Zentrifugationstechnologie im Mikromaßstab. Während Zellmaterial zunächst lysiert wird, werden Makromoleküle in Gegenwart von chaotrophen Ionen z. B. Guanidiniumthiocyanat denaturiert. Gleichzeitig werden auch degradierende RNasen inaktiviert. Durch Einfluss der chaotrophen Ionen binden die Nukleinsäuren an die Silikamembran. Die Zugabe von Ethanol unterstützt die Bindung der RNA an Silikamembranen und entfernt Verunreinigungen. Die Isolation der mRNA erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.1.2 Isolation von genomischer DNA aus *E. coli*

Aus einer stationären Übernachtskultur von *E. coli* K12 in LB Medium erfolgte die Isolation der genomischen DNA nach dem Protokoll des PrestoSpin D Universal Kit von Molzym, (Bremen, Deutschland). Grundlage dieser Technologie ist das Binden von RNA und DNA an Tonmineralien in kleinen Zentrifugationssäulen in Anwesenheit geringer Konzentrationen von multivalenten Kationen. Die gute Bindekapazität wird für die Präparation von hohen Mengen Nukleinsäuren ausgenutzt.

3.1.3 cDNA Synthese

Die reverse Transkription katalysiert mithilfe einer viralen reversen Transkriptase die Übersetzung der Sequenzabfolge der RNA in die komplementäre DNA (cDNA). Die Erststrangsynthese wurde ausgehend von der jeweiligen mRNA mit dem „Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis“ Sample Kit von Roche (Basel, Schweiz) durchgeführt. Die Kombination der *Transcriptor High Fidelity Reverse Transkriptase* mit der *Pwo Super Yield* Polymerase, die über eine sehr hohe Korrekturaktivität verfügt, führt zu einer 8,7 höheren Genauigkeit in der Übersetzung der Sequenzabfolge im Vergleich zur konventionellen reversen Transkriptasen (z. B. MMLV Transkriptase). Hierzu wurde für die zweistufige reverse Transkription mit einem „Anchored-Oligo-(dT)₁₈ Primer, der mit seinen 18 Thymidinresten an das 3'-PolyA⁺ Ende der mRNA bindet, das bereitgestellte Syntheseprotokoll von Roche verfolgt.

3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Technologie, die Mitte der 80-iger Jahre entwickelt wurde, ermöglicht die automatisierte *in vitro* Amplifikation eines definierten DNA-Fragmentes mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion. Zur Amplifikation der Gene wurde das *KOD Hot Start* DNA Polymerase-Kit der Firma Novagen (Merck, Darmstadt) verwendet. Die rekombinante thermostabile *KOD Hot Start* DNA-Polymerase aus *Thermococcus-kodakaraensis*-KOD1-DNA-Polymerase (Nishioka *et al.* 2001) generiert PCR-Produkte mit glatten Enden und zeichnet sich durch eine 3'-5' Exonuklease-abhängige Korrekturaktivität aus, die zu einer niedrigeren PCR-Mutationsfrequenz führt. Tabelle 2 zeigt die Zusammensetzung eines beispielhaften Pipettierschemas.

Tabelle 2: Beispielhaftes PCR Pipettierschema

Volumen [μL]	Reagenz	Endkonzentration
5,0	Polymerase Puffer (10-fach)	1-fach
5,0	dNTPs (jeweils 2 mM)	0,2 μM
3,0	MgSO ₄ 25 mM	1,5 mM
3,0	Fw- Primer 5 μM	0,3 μM
3,0	Rv- Primer 5 μM	0,3 μM
x	DNA n.b.	50-750 ng
1,0	KOD Hot Start	0,02 U
	DNA Polymerase (1 U/ μL)	
ad 50,0	H ₂ O	
50,0	Gesamtvolumen	

Für die Amplifikation der Gene wurde der Thermocycler (Master Cycler Gradient, Eppendorf) mit dem Programm nach Tabelle 3 verwandt.

Tabelle 3: Beispielhaftes PCR-Programm für die Amplifikation der Gene

PCR Schritt	Inkubationszeit	Inkubationstemperatur
Initiale Denaturierung	2 min	94°C
Denaturierung	20 s	94°C
Annealing	10 s	52-69°C
Elongation	60 s	68°C
Finale Elongation	10 min	72°C
Wiederholung: 35 Zyklen,		
anschließend Kühlung bei 4°C		

3.1.5 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung

Restriktionsendonukleasen gehören zu einer Klasse von Doppelstrang-DNA spaltenden Enzymen, die im Gegensatz zu anderen DNasen sequenzspezifisch spalten, und daher je nach Lage und Häufigkeit der Schnittstellen zu unterschiedlich großen aber exakt definierten DNA-Fragmenten führen. Zur Klonierung der Zielgene, müssen sowohl die PCR-Fragmente, als auch die Vektoren mit den geeigneten Restriktionsenzymen verdaut werden. Dies ist

erforderlich, um die jeweilige Schnittstelle bzw. den jeweiligen Überhang für die nachfolgende Ligation freizusetzen. In der vorliegenden Arbeit wurde mit den Restriktionsenzymen der Klasse II von Fermentas gearbeitet. Ihre Erkennungssequenz stimmt mit der Schnittsequenz an den definiten Stellen überein. Für Restriktionsanalysen (analytischer Restriktionsansatz, Tabelle 4) und DNA Präparationen (präparativer Restriktionsansatz, Tabelle 5) wurden die Ansätze nach Angaben des Herstellers von Fermentas (Vilnius, Litauen) zusammengesetzt.

Tabelle 4: Zusammensetzung eines analytischen Restriktionsansatzes

Reagenz	Volumen [μL]	Endkonzentration
Tango Puffer (Fermentas) für Doppelverdau 10-fach	4,0 oder 8,0	1- oder 2-fach
Restriktionsenzym A (10 U/ μL , Fermentas)	2,0	20 U
Restriktionsenzym B (10 U/ μL , Fermentas)	2,0	20 U
DNA Template	x	max. 1 μg
H ₂ O	ad 40,0	
Gesamtvolumen: 40,0 μL		

Tabelle 5: Zusammensetzung eines präparativen Restriktionsansatzes

Reagenz	Volumen [μL]	Endkonzentration
Tango Puffer (Fermentas) für Doppelverdau, 10-fach/	8,0 oder 16,0	1- oder 2-fach
Restriktionsenzym A (10 U/ μL , Fermentas)	4,0	40 U
Restriktionsenzym B (10 U/ μL , Fermentas)	4,0	40 U
DNA Template	x	max. 2 μg
H ₂ O	ad 80,0	
Gesamtvolumen: 80,0 μL		

Die Restriktionsansätze wurden mit den Restriktionsenzymen für 3 h bei 37°C inkubiert. Die Detektion der geschnittenen Fragmente erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.1.9). Die Aufreinigung der DNA Fragmente und die Bestimmung der DNA Konzentration wurde nach Kapitel 3.1.10 und 3.1.11 durchgeführt. Um eine Religation der durch Restriktion geschnittenen Vektor-DNA zu verhindern, wurden 1000 ng Vektor-DNA vor dem Einsatz in die Ligation dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung erfolgte mit alkalischer Phosphatase *FastAP*, Fermentas (Vilnius, Litauen) durch Inkubation der Vektor-DNA für 10 min bei 37°C und anschließender Deaktivierung der Phosphatase für 15 min bei 75°C (Tabelle 6).

Tabelle 6: Dephosphorylierung von Vektor DNA

Reagenz	Volumen [µL]	Endkonzentration
Vektor DNA	1,0-8,0	max. 1 µg
<i>FastAP</i> -Puffer (Fermentas, 10-fach)	1,0	1-fach
Alkalische Phosphatase <i>FastAP</i> (Fermentas, 1 U/µL)	1,0	1 U
H ₂ O	ad 10,0	
Gesamtvolumen: 10,0 µL		

3.1.6 Ligation

Während der Klonierungsarbeiten erfolgte die Verknüpfung der überhängenden Enden der geschnittenen DNA-Fragmente durch die T4-Ligase von Fermentas (Vilnius, Litauen). Die Ligationsansätze wurden nach Angaben des Herstellers zusammengestellt (Tabelle 7). Zur Optimierung der Ligation betrug das Konzentrationsverhältnis von Vektor zu Insert 1:3. Unterschiedliche Ligationszeiten von 1 h bei 22°C und 24 h bei 4°C wurden zusätzlich gewählt.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Ligationsansätze

Reagenz	Volumen [μ L]	Endkonzentration
T4-Ligase Puffer (Fermentas, 10-fach)	1,0	1- oder 2-fach
T4 Ligase (Fermentas, 1 U/mL)	1,0	1 U
Insert-DNA (PCR Fragment geschnitten)	3,0	300 ng
Vektor-DNA dephosphoryliert	1,0	100 ng
H ₂ O	4,0	
Gesamtvolumen: 10,0 μL		

3.1.7 Transformation von *E. coli* und Plasmidisolation

Für Klonierungsstrategien wurde in der vorliegenden Arbeit der bereits kompetente Stamm NovaBlue, ein *E. coli* K12 Stamm, von Novagen eingesetzt, dessen Kompetenz durch chemische Methoden induziert wurde und der sich insbesondere durch die hohe Transformationsfrequenz auszeichnet. Zur Expression wurden die erfolgreich klonierten Konstrukte in *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS, *E. coli* Origami(DE3) (Merck/Novagen, Darmstadt) transformiert. Die Transformation erfolgte nach dem Protokoll von Novagen (Competent Cells, Manual, Novagen).

Die Plasmidpräparation aus *E. coli* NovaBlue erfolgte mithilfe des E.Z.N.A Plasmid Miniprep Kit I von peQLab (Erlangen, Deutschland). Dabei wurde jeweils eine Übernachtskultur des transformierten NovaBlue Stammes kultiviert und abzentrifugiert. Die Plasmidisolation erfolgte nach dem entsprechenden Protokoll von peQLab. Auch hier benutzt man die Technologie der selektiven Bindeeigenschaft der Silikamembranen verknüpft mit der Zentrifugationstechnologie im Mikromaßstab.

3.1.8 Transformation von *S. cerevisiae* und Plasmidisolation

Die Aufnahmebereitschaft von fremder DNA ist für *S. cerevisiae* vor der Mitose hoch. Dies erfordert das Einstellen der exponentiellen Wachstumsphase. Durch Behandlung mit Lithiumacetat-Lösung wird die Membran der Hefezellen zusätzlich permeabilisiert. Die Zugabe von denaturierter Lachssperma-DNA Invitrogen (Invitrogen GmbH Darmstadt, Deutschland) dient als Carrier-DNA und der Zusatz von PEG zum Transformationsansatz als fusogenes Agens, um die Transformationsrate zu steigern. Die Aufnahme der DNA erfolgt durch Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad für exakt 15 min. Die Detektion der Transformanten erfolgt über Stoffwechselauxotrophien auf entsprechenden Minimalmedium-Selektiv-Platten. Die Transformation erfolgte nach dem Protokoll von Gietz *et al.* (Gietz und Woods 2002). Die Zusammensetzung des Transformationsansatzes ist in Tabelle 8 dargestellt. Zur Plasmidpräparation werden die Hefezellen zunächst enzymatisch mittels Lytikase, einer Endoglukanase aus *Arthrobacter luteus*, behandelt. Aus den so entstandenen Sphaeroplasten erfolgt die Plasmidpräparation analog dem Protokoll für *E. coli*. Für die Durchführung wurde das Protokoll von Scott und Schekmann verwendet (Scott und Schekman 1980).

Tabelle 8: Zusammensetzung des Transformationsansatzes für *S. cerevisiae*

Reagenz	Volumen/Ansatz [µL]	Endkonzentration
50% (W/V) PEG 4000	240	33,3% (W/V)
1 M Lithiumacetat	36	0,1 M
2 mg/mL Lachssperma	50	277 µg/mL
0,2 mg/mL pYES2/CT-SuSy1	5	2,77 µg/mL
H ₂ O	29	
Gesamtvolumen: 360,0 µL		

3.1.9 Agarose-Gelelektrophorese zur Detektion der DNA

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine einfache und effektive Methode, Gemische geladener Nukleinsäure-Fragmente (0,5 bis 25 kb Länge) voneinander zu trennen und zu identifizieren. Die aufzutrennenden negativ geladenen DNA Gemische wandern unter der Wirkung eines elektrischen Feldes in einer Pufferlösung innerhalb des Gels in Abhängigkeit von der Molekülmasse zur Anode. Zur Klonierung der Gene *ugd* (Kapitel 3.2.2), *ump* (Kapitel 3.2.1),

ugdh1 (Kapitel 3.2.3), *ugdh* (Kapitel 3.2.4) und *KfiD* (Kapitel 3.2.5) wurde Ethidiumbromid, das in doppelsträngige DNA interkalieren kann, zur Detektion der aufgetrennten DNA-Moleküle verwendet. Die Ethidiumbromid-Färbelösung wurde zum Gießen des Agarose-Gels in den horizontalen Gelträger zugegeben. Zur Klonierung aller anderen Gene wurde *GelRed*-Lösung (1x, Biotium, Hayward, CA, USA) benutzt. Dabei wurden die Agarose-Gele nach dem Elektrophoreselauf durch eine 30 minütige Inkubation in *GelRed*-Lösung gefärbt. In der vorliegenden Arbeit wurden nach Zahl der Proben Agarose-Gele (0,8-1% in TAE-Puffer) für eine 8-Slot-Kammer, (Bio-Rad) oder eine 20-Slot-Kammer (Bio-Rad) verwendet. Als Elektrophoresepuffer wurde TAE Puffer (siehe Anhang) eingesetzt. Die DNA-Proben wurden mit 6x Auftragspuffer (*DNA loading dye*; Glycerin-Bromphenolblau-Lösung) von Fermentas (Vilnius, Litauen) versetzt und Endvolumina von 20-80 µL in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard wurde der GeneRuler 1 kb DNA Leiter von Fermentas (Vilnius, Litauen) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 90 V für ca. 30 min, die Detektion und Dokumentation erfolgte am UV-Tisch bei 312 nm mithilfe des GelDocSystems von Bio-Rad (München, Deutschland).

3.1.10 Aufreinigung der DNA

Die Aufreinigung der DNA aus Agarose-Gelen (Kapitel 3.1.9), Restriktionsansätzen (Kapitel 3.1.5) oder PCR-Ansätzen (Kapitel 3.1.4) erfolgte mittels Nucleo Spin Extract II Kit von Macherey und Nagel (Düren, Deutschland). Auch hier benutzt man das Funktionsprinzip der selektiven Bindeeigenschaft der Nukleinsäuren an Silikamembranen in Gegenwart von chaotropen Ionen. Die DNA-Aufreinigung für die verschiedenen Anwendungen ist identisch. Die Probe wird dabei in einem Puffer mit chaotropen Ionen und einem pH kleiner als 7,5 aufgenommen. Proben aus Agarose-Gelen müssen zusätzlich bei 55°C-65°C geschmolzen werden. Die chaotropen Salze und der spezielle pH-Wert vermitteln die Bindung an die Silikamembranen der mitgelieferten Zentrifugationssäulen. Während der DNA-Adsorption können unerwünschte Primer, Agarose, Ethidiumbromidreste oder DMSO die Silikamembran ungehindert passieren. Waschen mit ethanolhaltigem Puffer entfernt Salze. Durch einen pH-Shift kann die DNA mit TE-Puffer oder DNase-freiem Wasser bei leicht basischem pH-Wert eluiert werden. Für die Reinigung der DNA wurde das Protokoll des Herstellers benutzt.

3.1.11 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte mithilfe der Absorptionsspektrometrie durch Ermittlung der optischen Dichte (OD) bei dem Absorptionsmaximum von 260 nm. Verdünnte DNA-Proben (100 µL) wurden in Mikrotiterplatten (UV-Star, 96 Well-Platten) von Greiner BioOne GmbH (Frickenshausen, Deutschland) gegeben und bei 260 nm und 280 nm mit dem Spektrophotometer (SPECTRAmax Plus und SOFTmax Pro 4.0 Software, Molecular Devices; Ismaning Deutschland) vermessen. Als Referenz diente eine Probe mit Millipore Wasser. Die Konzentration der DNA wurde nach .

Gleichung 1 bestimmt. Das Verhältnis der OD_{260nm} zu OD_{280nm} macht eine Aussage über eine Verunreinigung mit Proteinen. Bei reiner DNA sollte der Quotient zwischen 1,8 und 1,9 liegen. Eine OD von 1 entspricht per Definition 50 µg dsDNA/mL (Sambrook *et al.* 1989).

Gleichung 1: Bestimmung der DNA Konzentration

$$c \left[\frac{\mu g}{mL} \right] = OD_{260} * V * F$$

- c: Konzentration der zu bestimmenden DNA Probe
OD₂₆₀: optische Dichte bei 260 nm
V: Verdünnungsfaktor
F: Multiplikationsfaktor (50 für dsDNA)

3.2 Klonierung der Gene für die Enzym-Module zur Synthese von UDP-GlcA und des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops

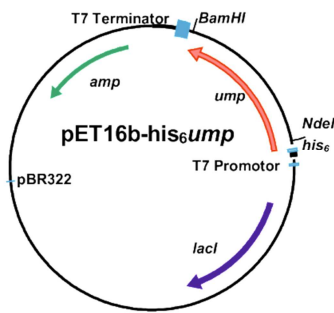
Für die Klonierung aller Gene im EMS standen unterschiedliche Quellen zur Verfügung, die in den einzelnen Kapiteln näher beschrieben werden. Mit Ausnahme der Glukuronyltransferasen GlcAT-P und GlcAT-S wurden alle Gene nach konventionellen Methoden der Kapitel 3.1.1 bis Kapitel 3.1.10 kloniert. Die Selektion der Transformanten erfolgte unter Zugabe von Kanamycin (Endkonzentration: 25 µg/mL), Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/mL), Chloramphenicol (Endkonzentration: 34 µg/mL). Nach erfolgreicher Klonierung wurden alle Konstrukte hinsichtlich ihrer Integrität durch Sequenzierung überprüft.

3.2.1 Klonierung von *ump* aus *Homo sapiens*

UMP-Kinasen (UMPKs) unterschiedlicher Organismen wurden vielfach untersucht. So konnte die Kristallstruktur der UMP-Kinase aus *Dictyostelium discoideum* aufgeklärt werden (Scheffzek *et al.* 1996). Die humane UMPK wurde erstmals 1999 von der Gruppe um Van Rompay kloniert und charakterisiert (Van Rompay *et al.* 1999). Auch in Prokaryonten, insbesondere in *E. coli*, konnten analoge Kinasen nachgewiesen werden (Bucurenci *et al.* 1996). Im Gegensatz zu den eukaryontischen Kinasen, gibt es in *E. coli* zwei verschiedene Enzyme, die jeweils spezifisch für UMP und CMP sind (Pasti *et al.* 2003). Die humane UMP-Kinase schien aufgrund ihrer sehr guten spezifischen Aktivitäten, für das geplante EMS geeignet zu sein. Die Sequenz der UMP-Kinase ist bekannt (UniProtKB/Swiss-Prot/accession number: P30085). Das Gen *ump* konnte aus Mesangialzellen humaner Nieren-cDNA mittels PCR vervielfältigt werden. Die cDNA wurde von Frau Dr. Claudia van Roeyen, Medizinische Klinik II des Universitätsklinikums der RWTH Aachen zur Verfügung gestellt. Für die Amplifikation und spätere Klonierung in den Expressionsvektor pET16b wurden Primer laut Tabelle 9 verwendet. Zur vereinfachten Aufreinigung des Enzyms über Ni²⁺-NTA-IMAC sollte bei der Klonierung ein N-terminaler His₆-Tag eingeführt werden (Abbildung 16).

Tabelle 9: Primer zur Klonierung von *his₆ump* aus *Homo Sapiens* in den Vektor pET16b

Primer Bezeichnung	Primersequenz 5'-3'	Verwendung
Vorwärtsprimer: Fw- <i>ump</i>	ATGAAGCCGCTGGTCGTGTTTCG	Zur Genamplifikation von <i>ump</i> (<i>Homo sapiens</i>)
Rückwärtsprimer: Rev- <i>ump</i>	TTAGCCTTCCTTGTCAAAAATCTGCA CAAC	Zur Genamplifikation von <i>ump</i> (<i>Homo sapiens</i>)
Vorwärtsprimer: Fw- <i>NdeI-ump</i> -	GGAATTCCATATGGAATTCCGCATGA AGCCGCTGGTC	Zur Klonierung von <i>his₆ump</i> in den Vektor pET16b
Rückwärtsprimer: Rev- <i>BamHI-ump</i>	CGGGATCCCGTTAGCCTTCCTTGTC AAA	Zur Klonierung von <i>his₆ump</i> in den Vektor pET16b

**Abbildung 16: Klonierung von *his₆ump* aus *Homo sapiens* in den Expressionsvektor pET16b**

Das Gen *ump* aus der cDNA der Niere wurde über die Schnittstellen *NdeI/BamHI* in den Expressionsvektor pET16b kloniert. Unter der Kontrolle eines T7-Promotors wurde es mit einem N-terminalem His₆-Tag exprimiert. Die Selektion erfolgte aufgrund seines Ampicillinresistenzgens.

3.2.2 Klonierung von *ugd* aus *E. coli* K12

Im Modul C sollte die Oxidation von UDP-Glc zu UDP-GlcA durch eine rekombinante UDP-Glukose-Dehydrogenase gewährleistet werden. Das kodierende Gen wurde bei Prokaryonten und Eukaryonten vielfach untersucht (Sieberth *et al.* 1995, Spicer *et al.* 1998, Campbell *et al.* 2000, Hinterberg *et al.* 2002, Sommer *et al.* 2004, Easley *et al.* 2007, Egger *et al.* 2011). Die Sequenzen der UDP-Glukose-Dehydrogenasen unterschiedlicher Herkunft sind bekannt und in der Uniprot Datenbank (<http://www.uniprot.org/help/uniprotkb>) zu finden. Zunächst wurde das Gen *ugd* aus *E. coli* K12 (UniProtKB/Swiss-Prot/accesion number: P76373) ausgewählt. Die Klonierung von *ugd* erfolgte ausgehend von der genomischen DNA aus *E. coli* K12. Der verwendete *E. coli* Stamm wurde freundlicherweise vom Institut für Biotechnologie, RWTH-Aachen (Prof. W. Hartmeier) zur Verfügung gestellt. Im ersten

Schritt erfolgte die Amplifikation des Gens *ugd* ausgehend von der bereits zuvor isolierten genomischen DNA aus *E. coli* K12 mit sequenzspezifischen Primern (Tabelle 10). Zur vereinfachten Aufreinigung der Enzyme über Ni^{2+} -NTA-IMAC sollte bei der Klonierung ein His₆-Tag eingeführt werden. Um den Einfluss des His₆-Tags auf die finale Enzymaktivität zu untersuchen, wurde das Gen zunächst mit einem C-terminalen His₆-Tag in den Vektor pET28a (Novagen/Merck Darmstadt, Deutschland) und alternativ mit einem N-terminalen His₆-Tag in den Vektor pET16b (Novagen/ Merck Darmstadt, Deutschland) kloniert.

3.2.2.1 Klonierung von *ugdhis₆* in den Vektor pET28a

Zur Klonierung des Gens *his₆ugd* in den Vektor pET28a (Abbildung 17) wurden die Restriktionsenzyme *NcoI* und *XhoI* ausgewählt und die Primer nach Tabelle 10 benutzt.

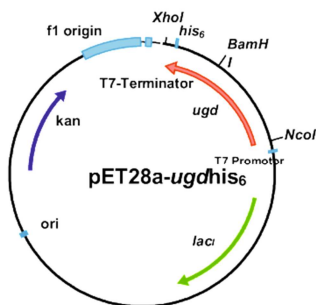


Abbildung 17: Klonierung von *ugdhis₆* aus *E. coli* K12 in den Expressionsvektor pET28a

Das Gen *ugd* wurde über die Schnittstellen *NcoI/XhoI* in den Expressionsvektor pET28a kloniert. Unter der Kontrolle eines T7-Promotors wurde es mit einem C-terminalen His₆Tag exprimiert. Die Selektion des Plasmids erfolgte aufgrund seiner Kanamycinresistenz.

Tabelle 10: Primer zur Klonierung von *ugdhis₆* aus *E. coli* K12 in den Vektor pET28a

Bezeichnung	Primersequenz 5'-3'	Verwendung
Vorwärtsprimer: Fw- <i>ugd</i>	ATGAAAATCACCATTTCGGTACTGG CTATGT	Zur Genamplifikation von <i>ugd</i> (<i>E. coli</i> K12)
Rückwärtsprimer: Rev- <i>ugd</i>	GTCGCTGCCAAAGAGATCGCGGGTGT ATAC	Zur Genamplifikation von <i>ugd</i> (<i>E. coli</i> K12)
Vorwärtsprimer: Fw- <i>NcoI-ugd</i> -	CATGCCATGGCATGGATGAAAATCAC CATTTCGGG	Zur Klonierung von <i>ugdhis₆</i> in den Vektor pET28a
Rückwärtsprimer: Rev- <i>XhoI-ugd</i>	CCGCTCGAGCGGGTCGCTGCCAAAGA GAT	Zur Klonierung von <i>ugdhis₆</i> in den Vektor pET28a

3.2.2.2 Klonierung von *his₆ugd* in den Vektor pET16b

Zur Klonierung des Gens *ugd* mit N-terminalem His₆-Tag in den Vektor pET16b (Abbildung 18) wurden die Schnittstellen *NdeI/BamHI*, die mittels PCR eingefügt wurden (Tabelle 11), verwendet.

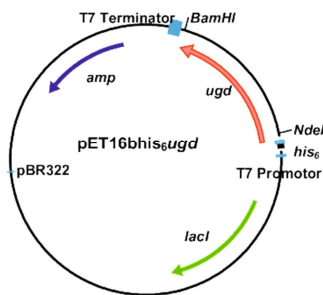


Abbildung 18: Klonierung von *his₆ugd* aus *E. coli* K12 in den Expressionsvektor pET16b

Das Gen *ugd* wurde über die Schnittstellen *NdeI/BamHI* in den Expressionsvektor pET16b kloniert. Unter der Kontrolle eines T7-Promotors wurde es mit einem N-terminalem His₆-Tag exprimiert. Selektiert wurde das Plasmid aufgrund seines Ampicillinresistenzgens.

Tabelle 11: Primer zur Klonierung von *his₆ugd* aus *E. coli* K12 in den Vektor pET16b

Bezeichnung	Primersequenz 5'-3'	Verwendung
Vorwärtsprimer: Fw- <i>NdeI-ugd</i> -	GGAATTCCATATGGAATCCGGATGA AAATCACCATTTCGGTAC	Zur Klonierung von <i>his₆ugd</i> in den Vektor pET16b
Rückwärtsprimer: Rev- <i>BamHI-ugd</i>	CGGGATCCCGTTAGTCGCTGCCAAAG AGAT	Zur Klonierung von <i>his₆ugd</i> in den Vektor pET16b

3.2.3 Klonierung von *ugdh1* aus *Arabidopsis thaliana*

Das Gen *ugdh1* (UniProtKB/Swiss-Prot/accesion number: Q9FZE1) wurde aus der cDNA der Blätter von *Arabidopsis thaliana*, welche von Prof. Slusarenko (Institut für Pflanzenphysiologie der RWTH Aachen) zur Verfügung gestellt wurde, mittels PCR vervielfältigt. Die Klonierung des amplifizierten Gens erfolgte mit den Primern über die Schnittstellen *NdeI/BamHI* (Tabelle 12) in den Vektor pET16b (Abbildung 19).

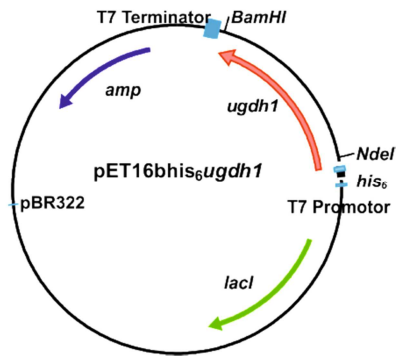


Abbildung 19: Klonierung von *his₆ugdh1* aus *Arabidopsis thaliana* in den Expressionsvektor pET16b

Das Gen *ugd1* wurde über die Schnittstellen *NdeI/BamHI* in den Expressionsvektor pET16b kloniert. Unter der Kontrolle eines T7-Promotors wurde es mit einem N-terminalem His₆-Tag exprimiert. Die Selektion des Plasmids erfolgte aufgrund seines Ampicillinresistenzgens.

Tabelle 12: Primer zur Klonierung von *his₆ugd1* aus *Arabidopsis thaliana* in den Vektor pET16b

Bezeichnung	Primersequenz 5'-3'	Verwendung
Vorwärtsprimer: Fw- <i>ugd1</i>	ATGGTGAAGATATGTTGTATTGGAGC T	Zur Genamplifikation von <i>ugd1</i>
Rückwärtsprimer: Rev- <i>ugd1</i>	TTAGGCAACGGCAGGCAT	Zur Genamplifikation von <i>ugd1</i>
Vorwärtsprimer: Fw- <i>NdeI-ugd1</i>	GGAATTCCATATGGAATTCCGGATGG TGAAGATATGTTGTGG	Zur Klonierung von <i>his₆</i> <i>ugd1</i> in den Vektor pET16b
Rückwärtsprimer: Rev- <i>BamHI-ugd1</i>	CGGGATCCCGATTAGGCAACGGCAG G	Zur Klonierung von <i>his₆ugd1</i> in den Vektor pET16b

3.2.4 Klonierung von *ugd1* aus *Homo sapiens*

Das Gen *ugd1* (UniProtKB/Swiss-Prot/accesion number: O60701) wurde aus der cDNA humaner Mesangialzellen (Niere) mittels PCR vervielfältigt. Frau Dr. Claudia van Roeyen, Medizinische Klinik II des Universitätsklinikums der RWTH Aachen stellte die cDNA zur Vervielfältigung zur Verfügung. Zur Amplifikation des Gens wurden die Primer nach (Tabelle 13) verwendet. Die Klonierung des amplifizierten Gens in den Vektor pETDuet-1 (Abbildung 20) von Novagen (Darmstadt, Deutschland) erfolgte mit den Primern nach Tabelle 13 über die Schnittstellen *PstI/NotI*.

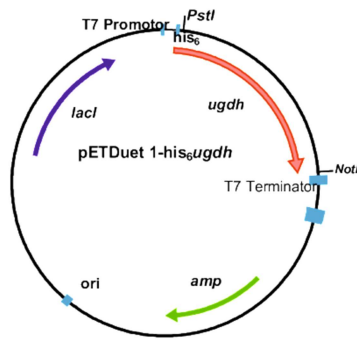


Abbildung 20: Klonierung von *his6ugdh* aus *Homo sapiens* in den Expressionsvektor pETDuet-1

Das Gen *ugdh* wurde über die Schnittstellen *PstI/NotI* in den Expressionsvektor pETDuet-1 kloniert. Unter der Kontrolle eines T7-Promotors wurde es mit einem N-terminalem His₆-Tag exprimiert. Die Selektion des Plasmids erfolgte aufgrund seines Ampicillinresistenzgens.

Tabelle 13: Primer zur Klonierung von *his6ugdh* aus *Homo sapiens* in den Vektor pETDuet-1

Bezeichnung	Primersequenz 5'-3'	Verwendung
Vorwärtsprimer: Fw- <i>ugdh</i>	ATGTTTGAAATTAAGAAGATCTGTTG CATCGG	Zur Genamplifikation von <i>ugdh</i> (<i>Homo sapiens</i>)
Rückwärtsprimer: Rev- <i>ugdh</i>	CTACACTTTAGGTTTCTTGTTAGGTGG ATC	Zur Genamplifikation von <i>ugdh</i> (<i>Homo sapiens</i>)
Vorwärtsprimer: Fw- <i>PstI-ugdh</i> -	AAAACTGCAGCCAATGCATTGGAAA ATGTTTGAAATTAAGAAGATCTGT	Zur Klonierung von <i>his6 ugdh</i> in den Vektor pETDuet-1
Rückwärtsprimer: Rev- <i>NotI-ugdh</i>	ATAAGAATGCGGCCGCTAAACTATCT ACACTTTAGGTTTCTTGT	Zur Klonierung von <i>his6ugdh</i> in den Vektor pETDuet-1

3.2.5 Klonierung von *kfiD* aus *E. coli* O6:K5:H1

Die UDP-Glukose Dehydrogenase (KfiD) aus *E. coli* O6:K5:H1 (*Nissle Strain*, 1917) bot eine Alternative. Im ersten Schritt erfolgte die Amplifikation des Gens *kfiD* ausgehend von der zuvor isolierten genomischen DNA des *E. coli* Stammes (*Nissle Strain* 1917), der von der Firma Ardeypharm (Herdecke, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurde. Für die Amplifikation des Gens (UniProtKB/Swiss-Prot/accession number: Q47329) und Klonierung in den Vektor pETDuet-1 (Abbildung 21) wurden Primer nach (Tabelle 14) verwendet.

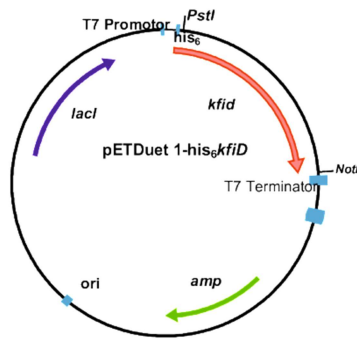


Abbildung 21: Klonierung von *his6kfiD* aus *E. coli* K5 in den Expressionsvektor pETDuet-1

Das Gen *kfiD* wurde über die Schnittstellen *PstI*/*NotI* in den Expressionsvektor pETDuet-1 kloniert. Unter der Kontrolle eines T7-Promotors wurde es mit einem N-terminalem His₆-Tag exprimiert. Die Selektion des Plasmids erfolgte aufgrund seines Ampicillinresistenzgens.

Tabelle 14: Primer zur Klonierung von *his6kfiD* aus *E. coli* K5 in den Vektor pETDuet-1

Bezeichnung	Primersequenz 5'-3'	Verwendung
Vorwärtsprimer: Fw- <i>kfiD</i>	ATGTTCCGAACACTAAAAATAACTG	Zur Genamplifikation von <i>kfiD</i>
Rückwärtsprimer: Rev- <i>kfiD</i>	TTAGTCACATTTAAACAAATCGCG	Zur Genamplifikation von <i>kfiD</i>
Vorwärtsprimer: Fw- <i>PstI-kfiD</i> -	AACTGCAGAACCAATGCATTGGCATG TTCGGAACACTAAAAATAACTG	Zur Klonierung von <i>his6kfiD</i> in den Vektor pETDuet-1
Rückwärtsprimer: Rev- <i>NotI-kfiD</i>	ATAAGAATGCGGCCGCTAAACTATCC TTAGTCACATTTAAACAAATCGCG	Zur Klonierung von <i>his6kfiD</i> in den Vektor pETDuet-1

3.2.6 Klonierung von *glcatp* und *glcats* aus *Mus musculus*

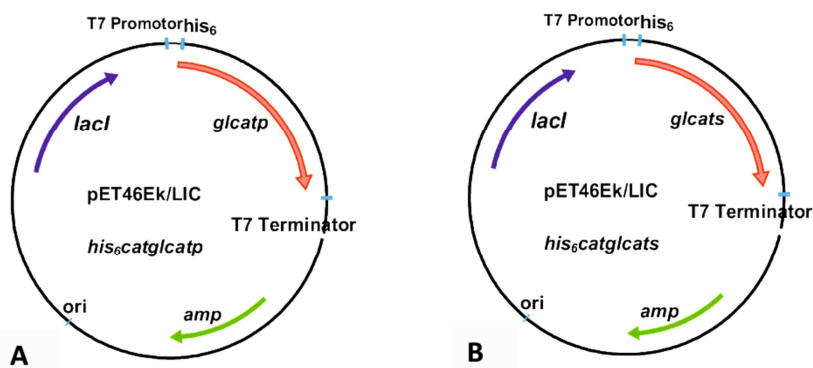
Die Klonierung und Expression der eukaryontischen GlcAT-P aus der Ratte, Maus und dem Menschen wurde bereits von Yamamoto *et al.* beschrieben (Yamamoto und Oka 2001, Yamamoto *et al.* 2002). Während GlcAT-P spezifisch für den Transfer von GlcA auf Typ 2 LacNAc sowie auch auf Glykoprotein-Akzeptoren NCAM und Asialo-orosomucoid (ASOR) ist, zeigt GlcAT-S eine duale Spezifität für Typ 2 LacNAc und Typ 1 LacNAc (Galβ1-3GlcNAc) (Kakuda *et al.* 2004, Kakuda *et al.* 2005). Yavuz *et al.* setzten die murine GlcAT-P zur Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops auf eine Neo-Laktohexaose Glykanstruktur in einem genetisch modifizierten *E. coli* K12 Stamm ein (Yavuz *et al.* 2008). Zur Klonierung der Gene *glcats* (UniProtKB/Swiss-Prot/accession number: P59270) und

glcatp (UniProtKB/Swiss-Prot/accession number: Q8R531) wurde mRNA, aus dem Maushirn stammend, vom Institut für Zell- und Molekularbiologie an Grenzflächen RWTH Aachen (Prof W. Jahnen-Dechent) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Im Anschluss an die cDNA Synthese (Kapitel 3.1.3.) konnte des Weiteren die Amplifikation der vollständigen Gene *glcats* und *glcatp* verfolgt werden. Eukaryontische Glykosyltransferasen gehören zu Typ II Membranproteinen, verankert in der Golgimembran. Der N-Terminus des Proteins ist zytosolisch, der C-Terminus ist luminal lokalisiert. Zur Klonierung in den Vektor pET46Ek/LIC wurde nur die C-terminale katalytische Domäne von GlcAT-S (As: 24-324) und von GlcAT-P (As: 27-334) amplifiziert. Die für die Klonierung der Gene benötigten Primer sind in Tabelle 16 zusammengefasst. Die Klonierung in den Vektor pET46Ek/LIC (Abbildung 22) wurde nach dem Protokoll von Novagen (Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Der Expressionsvektor ist geeignet für zeiteffizientes direktionales Klonieren von Genen ohne Restriktion und Ligation. Die Insertion des Zielgens erfolgte mithilfe von spezifisch generierten Primern. Die LIC (*ligation independent cloning*) Methode verwendet die 3'-5'-Exonukleaseaktivität der T4-DNA Polymerase, um Einzelstrang-Überhänge mit spezifischen 13- oder 14-Basen innerhalb des Vektors zu generieren. Im Gegenzug dazu wird ein PCR Produkt mit komplementären Überhängen durch 5'-Erweiterungen speziell entworfener Primer synthetisiert. Durch anschließende Inkubation des PCR Produktes mit T4-DNA Polymerase bei Anwesenheit von dATP werden Vektor-spezifische Überhänge produziert. Die kovalente Verknüpfung von Insert und Vektor findet nach Transformation in *E. coli* statt. Um spezifische Enden für die Klonierung in den Vektor pET46Ek/LIC zu generieren, wurde ein PCR Produkt unter Verwendung der speziellen Primer (Tabelle 16) synthetisiert. Das gereinigte PCR Produkt wurde mit dATP und einer T4-DNA-Polymerase versetzt, um Einzelstrang-Überhänge zu schaffen, die komplementär zu Einzelstrang-Überhängen des Vektors sind. Tabelle 15 zeigt den Reaktionsansatz der T4-DNA-Polymerase.

Tabelle 15: T4-DNA-Polymerase-Behandlung des PCR-Produktes zur Erzeugung von Einzelstrang-Überhängen

Reagenz	Volumen [μL]	Endkonzentration
T4-DNA	2	1-fach
Polymerase Puffer (10-fach)		
T4-DNA Polymerase	0,4	1 U
2,5 U/ μL		
dATP	2	2,5 mM
25 mM		
DTT	1	5 mM
100 mM		
H ₂ O nuklease-frei	13,6	
PCR-Produkt	x	0,02 pmol
Gesamtvolumen: 20,0 μL		

Durch Inaktivieren der T4-DNA Polymerase wurde die Reaktion für 20 min bei 75°C gestoppt. Anschließend wurden 2 μL des T4-DNA-Polymerase behandelten PCR Produktes mit 1 μL des Vektors und 1 μL EDTA (25 mM) gemischt und für 60 min bei 22°C inkubiert. Anschließend wurden kompetente *E. coli* NovaBlue GigaSingles™ mit 1 μL des Ansatzes transformiert. Die Transformation erfolgte nach dem Protokoll von Novagen (Kapitel 3.1.7).

**Abbildung 22: Klonierung von *his6catglcatp* (A) und *his6catglcats* (B) in den Expressionsvektor pET46Ek/LIC**

Die Gene *his6catglcatp* (A.) und *his6catglcats* (B.) wurden über eine „Ligation Independent Cloning“ Methode in den Expressionsvektor pET46Ek/LIC kloniert. Nach Amplifikation mit Primern, die 5'-LIC Überhänge tragen, wurde das PCR Produkt mit T4-DNA Polymerase (+dATP) inkubiert. Nach Anlagerung an den Ek/LIC Vektor wurde das zirkuläre noch nicht kovalent geschlossene Plasmid in *E. coli* transformiert. Unter der Kontrolle eines T7-Promotors wurde es mit einem N-terminalem His₆-Tag exprimiert. Selektiert wurden die Plasmide aufgrund der Ampicillinresistenz.

Tabelle 16: Primer zur Klonierung von *his₆catglcats* und *his₆catglcatp* aus *Mus musculus* in den Vektor pET46Ek/LIC

Bezeichnung	Primersequenz 5'-3'	Verwendung
Vorwärtsprimer: Fw- <i>glcats</i>	ATGAAGTCCGCGCTGTGCAG	Zur Genamplifikation
Rückwärtsprimer: Rev- <i>glcats</i>	CTACACCTCAATGTTCACTGTGTCC	Zur Genamplifikation
Vorwärtsprimer: Fw- <i>catglcats</i>	GACGACGACAAGATGGACGTG GACCCCCG	Zur Klonierung in den Vektor pET46Ek/LIC
Rückwärtsprimer: Rev- <i>catglcats</i>	GAGGAGAAGCCCGGTTACACC TCAATGTTCACTGTGT	Zur Klonierung in den Vektor pET46Ek/LIC
Vorwärtsprimer: Fw- <i>glcatp</i>	ATGGGTAATGAGGAGCTGTG	Zur Genamplifikation
Rückwärtsprimer: Rev- <i>glcatp</i>	TCAGATCTCCACTGAGGGGT	Zur Genamplifikation
Vorwärtsprimer: Fw- <i>catglcatp</i>	GACGACGACAAGATGCTCGCA CCTCTGCTTG	Zur Klonierung in den Vektor pET46Ek/LIC
Rückwärtsprimer: Rev- <i>catglcatp</i>	GAGGAGAAGCCCGGTCAGATT CACTGAGGGG	Zur Klonierung in den Vektor pET46-Ek/LIC

3.2.7 Klonierung von *sus1* aus *Solanum tuberosum*

Das Saccharose Synthase 1 (SuSy1) kodierende Gen *sus1* aus *Solanum tuberosum* (UniProtKB/Swiss-Prot/accession number: P10691) wurde zunächst ausgehend von dem bereits in der Arbeitsgruppe vorhandenen Plasmid pDR195-*sus1* (Abbildung 23) über Restriktionsverdau mittels *BamHI* in einem präparativen Ansatz von 80 µL isoliert (Tabelle 5). Der Ansatz wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese nach der Molekülgröße aufgetrennt (Kapitel 3.1.9), das Zielprodukt ausgeschnitten und anschließend über das *NucleoSpin Extract II*-Kit isoliert (Kapitel 3.1.10). Dieses Fragment diente als Ausgangsprodukt für die anschließende PCR (Kapitel 3.1.4) zur Klonierung in den Hefeexpressionsvektor pYES2/CT von Invitrogen (Invitrogen GmbH Darmstadt, Deutschland).

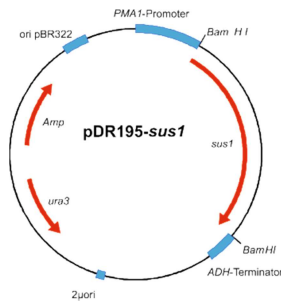


Abbildung 23: Expressionsvektor pDR195-sus1

Die Klonierung von *sus1* aus der Kartoffel in das Plasmid pDR195 erfolgte über die Schnittstellen *BamHI/BamHI*. Die konstitutive Expression von *sus1* steht unter der Kontrolle des PMA1 Promotors. Die Plasmidamplifikation wurde erzielt durch Transformation in *E. coli*. Mithilfe der Ampicillinresistenz konnten Transformanten selektiert werden.

Zur Klonierung in den Vektor pYES2/CT (Abbildung 24) wurden die Schnittstellen *BamHI* und *NotI* und die Primer nach Tabelle 17 benutzt. Unter der Kontrolle eines Gal-1 Promotors wurde das Gen exprimiert. Die Selektion des Plasmids erfolgte aufgrund seines Ampicillinresistenzgens.

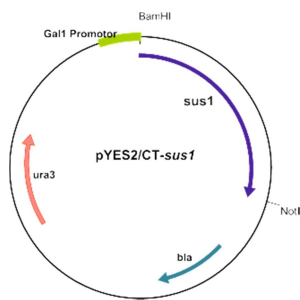


Abbildung 24: Klonierung von *sus1* aus *Solanum tuberosum* in den Expressionsvektor pYES2/CT

Die Klonierung von *sus1* aus der Kartoffel in den Vektor pYES2/CT erfolgte über die Schnittstellen *BamHI/NotI*. Die Expression von *sus1* steht unter der Kontrolle des induzierbaren Gal-1 Promotors. Die Plasmidamplifikation wurde erzielt durch Transformation in *E. coli*. Mithilfe der Ampicillinresistenz konnten Transformanten selektiert werden.

Tabelle 17: Primer zur Klonierung von *sus1* aus *Solanum tuberosum* in den Expressionsvektor pYES2/CT

Bezeichnung	Primersequenz 5'-3'	Verwendung
Vorwärtsprimer: Fw- <i>BamHI-sus1</i>	CGCGGATCCGCGATGGCTGAACGTG T	Zur Klonierung in den Vektor pYES2/CT über die Schnittstellen <i>BamHI/NotI</i>
Rückwärtsprimer: Rev- <i>NotI-sus1</i>	ATAAGAATGCGGCCGCTAACTATT CACTCAGCAGCCAA	Zur Klonierung in den Vektor pYES2/CT über die Schnittstellen <i>BamHI/NotI</i>

3.3 Klonierung der Gene für die Enzym-Module zur Synthese des Glykanepitops 2'-Fukosyllaktose

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war in der wissenschaftlichen Literatur sowie in der Patentliteratur nur eine einzige α -1,2-FucT beschrieben, die eine gute Aktivität für die Produktion von 2'-FL in einem genetisch veränderten *E. coli* Stamm zeigt (Drouillard *et al.* 2006). Es handelt sich dabei um die α -1,2-FucT, FutC (EC 2.4.1.69), aus dem humanpathogenen Bakterienstamm *Helicobacter pylori*. Eukaryontische FucTs sind aus dem Mensch bekannt und benötigen eukaryontische Expressionssysteme, um aktive Glykosyltransferasen für *in vitro* Synthesen zu gewinnen (de Vries *et al.* 2001, Vasiliu *et al.* 2006). Mögliche alternative Enzymquellen stellten die Weinbergschnecke (*Helix pomatia*) (Lüttge *et al.* 1997, Scheppokat *et al.* 2003) dar, aus denen eine α 1,2-FucT bzw. α -1,3-FucT partiell gereinigt und charakterisiert wurden. Eine Klonierung und heterologe Expression dieser FucTs war nach damaligem Wissensstand noch nicht gelungen und publiziert worden. Die Expression von bakteriellen FucT-Genen (z. B. aus *Helicobacter pylori* oder *E. coli*) in *E. coli* wurde häufig als Alternative zu eukaryontischen FucTs beschrieben. Innerhalb der Glykosyltransferase Familie 11 wurden bereits die α 1,2-FucTs WbsJ aus *E. coli* O128 (Shao *et al.* 2003, Li *et al.* 2008), FutC aus *Helicobacter pylori* (Albermann *et al.* 2001, Drouillard *et al.* 2006, Stein *et al.* 2008), WbiQ aus *E. coli* O127 (Pettit *et al.* 2010) und WbwK aus *E. coli* O86 (Li *et al.* 2008) beschrieben. Die *in vitro* Aktivität der funktionell überprüften FucTs mit dem nicht natürlichen Akzeptor Laktose konnte entweder gar nicht oder nur in geringem Maße detektiert werden. Für FutC wurde eine Aktivität mit Laktose von 89 mU/mg ermittelt (Albermann *et al.* 2001). Weitere Daten zu α 1,2-FucTs waren zu diesem Zeitpunkt nicht publiziert. Mit dem Ziel eine neuartige α 1,2-FucT zu identifizieren, wurde die Klonierung und heterologe Expression von putativen α 1,2-FucT-Genen (EC 2.4.1.69) aus der Glykosyltransferasen-Familie 11 (Tabelle 18) angestrebt (CAZy Datenbank). Zur Bereitstellung des Donorsubstrates GDP-Fuc wurde die bifunktionale L-Fukokinase/GDP-Fuc Pyrophosphorylase (FKP) aus *Bacterioides fragilis* 9343 favorisiert.

Tabelle 18: Putative α 1,2-FucTs aus der CAZy Datenbank

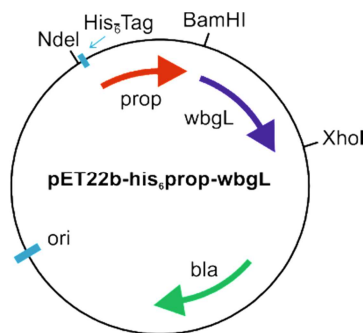
Genbezeichnung	UniProtKB/Swiss-Prot/accession number
<i>amuc_0942</i> aus <i>Akkermansia muciniphila</i>	B2UQN9
<i>epsH</i> aus <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NIZO B40	O06036
<i>eps11</i> aus <i>Streptococcus thermophilus</i> LMG18311	Q5M4A0
<i>wbdN</i> aus <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>salamae</i>	Q5UHB1
<i>wbgN</i> aus <i>E. coli</i> O55:H7	Q8VQ46
<i>wblA</i> aus <i>Vibrio cholerae</i> 022	O87157
<i>wbgL</i> aus <i>E. coli</i> O126	A6M9C2

3.3.1 Klonierung von Genen putativer α -1,2-Fukosyltransferasen

Alle Gene (Tabelle 18) wurden zur zytoplasmatischen Expression in *E. coli* in den modifizierten Expressionsvektor pET22b von Novagen (Darmstadt, Germany) kloniert. Hierzu wurde die *pelB* Leader Sequenz, verantwortlich für periplasmatische Expression in *E. coli*, unter Verwendung der Restriktionsenzyme *NdeI* und *BamHI* ausgeschnitten (Kapitel 3.1.5). In einem nächsten Schritt wurde die Propeptidsequenz (207 Aminosäuren) der Lipase von *S. hyicus* (Sauerzapfe *et al.* 2008) vom Plasmid pLGalT Δ 38 mit Primern nach Tabelle 19 amplifiziert und anschließend mit dem modifizierten pET22b Vektor fusioniert. Der resultierende Vektor wurde mit *BamHI* und *XhoI* verdaut (Kapitel 3.1.5). Die Synthese der Zielgene der putativen α 1,2-FucTs (Tabelle 18) inklusive der Restriktionsschnittstellen *BamHI* und *XhoI* erfolgte durch Geneart (Regensburg, Germany). Die synthetisierten Gene wurden ebenfalls mit *BamHI* und *XhoI* verdaut und anschließend in den Vektor pET22b-*his₆prop* ligiert (Abbildung 25).

Tabelle 19: Primer zur Klonierung der Propeptidsequenz der Lipase aus *S. hyicus*

Bezeichnung	Primersequenz 5'-3'	Verwendung
Vorwärtsprimer: Fw- <i>NdeI-prop</i>	CATATGCACCACCACCACCACACA ATGATTGACAACACAAACAACGAC	Amplifikation der Propeptidsequenz der Lipase von <i>S. hyicus</i> inklusive Schnittstelle <i>NdeI</i>
Rückwärtsprimer: Rev- <i>BamHI-prop</i>	GTTCGCTCGCTGTTTTTGGTATGCC TAGG	Amplifikation der Propeptidsequenz der Lipase von <i>S. hyicus</i> inklusive Schnittstelle <i>BamHI</i>

**Abbildung 25: Beispielhafte Klonierung von *his6propwbgL* in den Expressionsvektor pET22b**

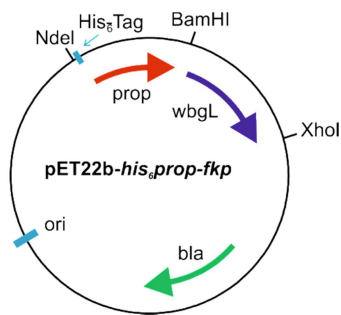
Zur zytoplasmatischen Expression der putativen α 1,2-FucT wurde der Expressionsvektor pET22b modifiziert. Die *pelB* Sequenz wurde mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *BamHI* entfernt. Die Propeptidsequenz (207 Aminosäuren) der Lipase von *S. hyicus* (Sauerzapfe *et al.* 2008) wurde vom Plasmid pLGalT Δ 38 amplifiziert und anschließend mit dem modifizierten pET22b Vektor fusioniert. Der resultierende Vektor wurde mit *BamHI* und *XhoI* verdaut. Das Gen *wbgL* fusionierte mit dem modifizierten Vektor pET22b-*his6prop* unter Verwendung der Restriktionsenzyme *BamHI* und *XhoI*.

3.3.2 Klonierung von *fkp* aus *Bacterioides fragilis*

Die Klonierung des bi-funktionalen L-Fukokinase/GDP-Fuc Pyrophosphorylase kodierenden Gens *fkp* (UniProtKB/TrEMBL Q58T34) erfolgte ausgehend von der genomischen DNA aus *Bacterioides fragilis* DSMZ 2151 (DSMZ, Braunschweig, Germany). Hierbei wurde *fkp* unter Verwendung der Primer (Tabelle 20) zunächst amplifiziert. Zur Ligation des PCR Produktes in den Vektor pET22b-*his6prop* (Abbildung 26) wurden die Schnittstellen *BamHI* und *XhoI* mittels Primern eingefügt und schließlich analog zur Klonierungsstrategie von *wbgL* kloniert (Kapitel 3.3.1).

Tabelle 20: Klonierung von *his₆propfkp* aus *Bacterioides fragilis* in den Vektor pET22b

Bezeichnung	Primersequenz 5´-3´	Verwendung
Vorwärtsprimer: Fw- <i>fkp</i>	ATGCAAAACTACTATCTTTACCGTC CAAT-3´.	Zur Genamplifikation von <i>fkp</i>
Rückwärtsprimer: Rev- <i>fkp</i>	TTATGATCGTGATACTTGGAATCCCTT ATC	Zur Genamplifikation von <i>fkp</i>
Vorwärtsprimer: Fw- <i>BamHI-fkp</i> -	CGCGGATCCGCGATGCAAAACTACT ATCTTTACCG	Zur Klonierung von <i>fkp</i> in den Vektor pET22b- <i>his₆prop</i>
Rückwärtsprimer: Rev- <i>XhoI-fkp</i>	CCGCTCGAGCGGTTATGATCGTGATA CTTGG	Zur Klonierung von <i>fkp</i> in den Vektor pET22b- <i>his₆prop</i>

**Abbildung 26: Klonierung von *his₆propfkp* in den Expressionsvektor pET22b**

Zur zytoplasmatischen Expression der bi-funktionalen L-Fukokinase/GDP-Fuc Pyrophosphorylase (FKP) wurde der Expressionsvektor pET22b modifiziert. Die *pelB* Sequenz wurde entfernt mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *BamHI*. Das Gen *fkp* fusionierte mit dem modifizierten Vektor pET22b-*his₆prop* unter Verwendung der Restriktionsenzyme *BamHI* und *XhoI*.

3.4 Expression klonierter Gene *in E. coli*

Für die Expression der in dieser Arbeit klonierten Gene wurden die bereits kompetenten Stämme (Merck/Novagen, Darmstadt) *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS und *E. coli* Origami B(DE3) verwendet. Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) trägt chromosomal die T7-Polymerase durch den lysogenen Phagen λ DE3. Darüber hinaus weisen die Proteasen ompT, einer Protease der äußeren Membran, und die lon Protease zwei Mutationen auf, die zu einem „knock out“ führen. Diese Strategie schützt vor dem Abbau der rekombinanten Proteine. Der Stamm *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS zeichnet sich durch die Bereitstellung seltener tRNAs aus und ist deshalb besonders für die heterologe Genexpression geeignet. Diese sind episomal mit einer zusätzlichen Chloramphenicolresistenz codiert. Das zusätzliche pLysS Gen verhindert, dass eine Grundexpression des Zielgens („leaky expression“) vor der Induktion, indem sie T7-Lysozym, ein natürlicher Inhibitor der T7-RNA Polymerasen, produzieren. Gleichzeitig spaltet das bifunktionelle Protein auch das Peptido-Glykan Gerüst der *E. coli* Zellwand und ermöglicht somit eine leichte Zellextraktpräparation. Der *E. coli* Stamm Origami B(DE3) mit einer Kanamycin- und Tetracyclinresistenz eignet sich besonders für die Expression von Proteinen, deren Disulfidbrücken für eine korrekte Proteinfaltung und für die volle Aktivität erforderlich sind. Ohne diese Disulfidbrücken degradieren sie oder akkumulieren als „inclusion bodies“. Zytoplasmatische *E. coli* Kompartimente weisen jedoch reduzierendes Milieu auf. Disulfidbrücken werden nach dem Transport ins Periplasma geknüpft. Der Origami Stamm besitzt im Gegensatz zu den anderen genannten Stämmen im Disulfidreduktionsweg eine Mutation der Glutathionreduktase (*gor*) und eine Mutation der Thioredoxinreduktase (*trxB*). Dies führt zu einer verstärkten Bildung von Disulfidbrücken im Zytoplasma von *E. coli*.

Für die Expression der Zielgene wurden Vorkulturen der *E. coli* Stämme (Tabelle 21) in 100-mL-Erlenmeyer-Schikanekolben (EMK) mit 20 mL LB-Medium unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums angezogen. Das Animpfen der Kulturen erfolgte durch Überführen einer Kolonie von erfolgreichen Transformationsansätzen in das Kulturmedium oder durch Einsatz von 50 μ L von Glycerin-Stammkulturen (Kryokulturen). Anschließend erfolgte die Inkubation über Nacht bei 37°C und 115 Upm. Am nächsten Morgen wurden die Hauptkulturen mit 2% einer Übernacht-Vorkultur in 5-L-EMKs, gefüllt jeweils mit 20% TB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum), angeimpft. Das Wachstum wurde durch

Messung der OD₆₀₀ kontrolliert. Ab einer OD₆₀₀ $\geq$ 0,6 wurde mit 100 μ M IPTG (Endkonzentration) induziert und über Nacht bei 25°C schüttelnd bei 80 Upm inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation (Sorvall-Zentrifuge RC-5B, SLA 3000-Rotor, 10000 Upm, 4°C, 20 min). Die Zellpellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Tabelle 21: *E. coli* Expressionsstämme mit entsprechenden Selektionsmarkern

<i>E. coli</i> Stamm	Endkonzentration des Selektionsmarkers
<i>E. coli</i> BL21(DE3)_pET16b- <i>his₆ump</i>	Ampicillin [100 μ g/mL]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)_pET16b- <i>his₆ugd</i>	Ampicillin [100 μ g/mL]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)_pET28a- <i>ugdhis₆</i>	Kanamycin [25 μ g/mL]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)_pETDuet-1- <i>his₆ugdh</i>	Ampicillin [100 μ g/mL]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)_pETDuet-1- <i>his₆kfiD</i>	Ampicillin [100 μ g/mL]
<i>E. coli</i> Rosetta(DE3)pLysS_pETDuet-1- <i>his₆ugdh</i>	Ampicillin [100 μ g/mL] Chloramphenicol [35 μ g/mL]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)_pET46Ek/LIC- <i>his₆catglcatp</i>	Ampicillin [100 μ g/mL]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)_pET46Ek/LIC- <i>his₆catglcats</i>	Ampicillin [100 μ g/mL]
<i>E. coli</i> Origami B(DE3)_pET46Ek/LIC- <i>his₆catglcats</i>	Ampicillin [100 μ g/mL] Tetracyclin [12,5 μ g/mL] Kanamycin [25 μ g/mL]
<i>E. coli</i> Rosetta(DE3)pLysS_pET46Ek/LIC- <i>his₆catglcats</i>	Ampicillin [100 μ g/mL] Chloramphenicol [35 μ g/mL]
<i>E. coli</i> JM109(DE3)_pET22b- <i>his₆propamuc</i>	Ampicillin [100 μ g/mL]
<i>E. coli</i> JM109(DE3)_pET22b- <i>his₆propespH</i>	Ampicillin [100 μ g/mL]
<i>E. coli</i> JM109(DE3)_pET22b- <i>his₆propwbgL</i>	Ampicillin [100 μ g/mL]
<i>E. coli</i> JM109(DE3)_pET22b- <i>his₆propesp11</i>	Ampicillin [100 μ g/mL]
<i>E. coli</i> JM109(DE3)_pET22b- <i>his₆propwbdN</i>	Ampicillin [100 μ g/mL]
<i>E. coli</i> JM109(DE3)_pET22b- <i>his₆propwblA</i>	Ampicillin [100 μ g/mL]
<i>E. coli</i> JM109(DE3)_pET22b- <i>his₆propwbgN</i>	Ampicillin [100 μ g/mL]
<i>E. coli</i> JM109(DE3)_pET22b- <i>his₆propfkp</i>	Ampicillin [100 μ g/mL]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)_pET28a- <i>sus1</i>	Kanamycin [25 μ g/mL]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)_pET28a- <i>his₆nox</i>	Kanamycin [25 μ g/mL]

3.5 Expression von *sus1* in *S. cerevisiae*

Die Expression von *sus1* erfolgte nach Transformation der Expressionskonstrukte pDR195-*sus1* und pYES2/CT-*sus1* in den Hefestamm *S. cerevisiae* BY 4742 (*mata*, *his3Δ1*, *leu2Δ0*, *met15Δ0*, *ura3Δ0*), der von EUROSCARF (Frankfurt, Deutschland) geliefert wurde. (Kapitel 3.1.8). Die Uracil-Auxotrophie wurde hierbei als Selektionsmarker verwendet. Dem Minimalmedium wurde Ura-drop-out (Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) zugesetzt (Tabelle 22 und Tabelle 23).

3.5.1 Expression von *sus1* unter Induktion des Gal1-Promotors

Die Expression des Zielgens *sus1* unter Induktion des Gal1-Promotors erfolgte nach einem modifizierten Protokoll (Manual part no. 25-0304) des Manuals pYES2/CT von Invitrogen (Darmstadt, Deutschland). In typischen *S. cerevisiae* Laborstämmen ist die Transkription ausgehend vom Gal1-Promotor bei Anwesenheit von Glc reprimiert. Die Transkription kann induziert werden durch Entfernen der Glc und Hinzugeben von Gal als C-Quelle. Im Gegensatz dazu wird der Gal1-Promotor durch Raffinose nicht reprimiert oder induziert, so dass direkt eine Anzucht der Hefezellen in Raffinose-Medium möglich ist. Die Induktion des Promotors erfolgte mit Raffinose-haltigem Medium unter Zugabe von Gal (2% Endkonzentration). Für die Anzucht der *S. cerevisiae* Vorkultur wurden 150 µL Kryokultur in SD Selektivmedium (Tabelle 22) inokuliert und 48 h bei 30°C und 150 Upm in einem 100 mL-Schikanekolben inkubiert.

Tabelle 22: SD-Medium für die Vorkultur

Komponente	Endkonzentration
SD Medium	0,67%
Raffinose	2,00%
Ura drop-out	0,77 g/L

Die Hauptkultur wurde in einem 5-L-Erlenmeyerkolben mit einer veränderten Komponentenkonzentration angezogen (Tabelle 23).

Tabelle 23: SD-Medium für die Hauptkultur

Komponente	Endkonzentration
SD Medium	1,34%
Raffinose	2,00%
Ura drop-out	0,77 g/L

Die Hefezellsuspension inkubierte bei 30°C und 80 Upm bis zu einer optischen Dichte von vier (OD=4). Zur Induktion der Transkription wurde das Medium mit einer 50%-igen Gal-Lösung (Endkonzentration 2%) versetzt. Nach Angaben des Herstellers (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) erfolgte die Inkubation der Hauptkultur bei 30°C und 80 Upm für 48 h (Herstellerprotokoll, Invitrogen). Anschließend wurden die Zellen geerntet (7000 Upm, 30 min, 4°C) und bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

3.5.2 Konstitutive Expression von *sus1* unter der Kontrolle des PMA1-Promotors

Für die konstitutive Expression von *sus1* in kleinem Maßstab wurden Vorkulturen von *S. cerevisiae* in 100-mL-Erlenmeyer-Schikanekolben (EMK) mit 20 mL SD-Medium unter Zusatz von 2% Glc und der entsprechenden Supplemente angezogen. Das Animpfen der Kulturen erfolgte durch Zusatz von 150 µL Kryokultur zum Kulturmedium. Anschließend erfolgte die Inkubation für 48 h bei 30°C und 80 Upm. Die Hauptkulturen wurden mit 2% einer Vorkultur in 5-L EMKs angeimpft, die jeweils 1 L SD-Medium mit 2% Glc inklusive der entsprechenden Supplemente enthielten. Die Expression von *sus1* erfolgte konstitutiv bei 30°C und 80 Upm für 48 h. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation (Sorvall-Zentrifuge RC-5B, SLA3000-Rotor, 10000 Upm, 4°C, 20 min). Die Zellpellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.6 Aufreinigung der rekombinanten Enzyme

3.6.1 Herstellung des *E. coli* Rohextraktes

Die Ultraschallbehandlung stellt eine schnelle Methode zum Aufschluss von Zellen ohne Zusatz von Detergenzien oder lytischen Enzymen dar. Ultraschall besitzt einen Frequenzbereich von etwa 16 kHz bis 100 kHz und breitet sich in Flüssigkeiten longitudinal aus. Die Methode ist jedoch auf den Labormaßstab beschränkt, da Probleme der Wärmeentwicklung und der Entstehung von Radikalen bei der Anwendung im industriellen Maßstab auftreten.

In der vorliegenden Arbeit kam das Ultraschallgerät Sonoplus GM 203 (Bandelin, Berlin, Deutschland) mit der Sonotrode MS72 und 52% Pulsierschaltung zum Einsatz. Für den Aufschluss wurde eine 40%-ige Zellsuspension mit Zusatz von Benzonase Nuklease (Novagen/Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Der hohe DNA-Gehalt der Zellen erfordert den Zusatz der Benzonase Nuklease. Im Großmaßstab wurden 10 g Zellen mit 15 mL Aufschlusspuffer, der jeweils für die Aufreinigung entsprechend ausgewählt wurde, gemischt und des Weiteren mit 10 µL Benzonase Nuklease versetzt. Die anschließende Ultraschallbehandlung erfolgte viermal für 15 s (mit jeweils 15 s Pause zwischen den Beschallungen). Um den negativen Einfluss der Wärmeentwicklung auf das Enzym zu reduzieren, wurde die Beschallung im Eisbad durchgeführt. Die Abtrennung der durch Ultraschall erhaltenen Zellfragmente erfolgte in der Sorvall-Zentrifuge (RC-5B, SLA3000-Rotor) durch Zentrifugation bei 13000 Upm und 4°C für 20 min. Der klare Rohextrakt kam in weiteren Untersuchungen zum Einsatz.

3.6.2 Herstellung des *S. cerevisiae* Rohextraktes

Zum Zellaufschluss von SuSy1 aus *S. cerevisiae* wurde eine Nassvermahlung mithilfe der Schwingmühle MM 200 von Retsch in Mahlbechern durchgeführt. Hierfür wurde eine 40%-ige (W/V) Zellsuspension in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,6) hergestellt. Die Mahlbecher wurden zur Enzymstabilisierung vorgekühlt und anschließend mit 10 g Glasperlen (Durchmesser: 0,5 mm) und 10 g der 40%-igen Hefezellsuspension befüllt. Nach einem dreimal wiederholten Mahlvorgang bei einer Frequenz von 20 Schwingungen/s für

3 min wurden die Glasperlen und Zellbruchstücke durch Zentrifugation (Sorvall Zentrifuge, 13.000 Upm, 4°C, 45 min) entfernt. Der Rohextrakt im Überstand wurde für die Anionenaustauschchromatografie verwendet.

3.6.3 Aufreinigung über immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatografie

Die Affinitätschromatografie stellt eine spezielle Form der Adsorptionschromatografie dar, die die bioselektive Adsorption zwischen zwei oder mehreren Partnern ausnutzt. In der vorliegenden Arbeit wurde als stationäre Phase ein Ni²⁺-NTA-Material (QIAGEN, Hilden, Deutschland) verwendet. Die Aufreinigungen erfolgten mit einer ÄktaPrime Chromatografieanlage von GE Healthcare (Hamburg, Deutschland) mit einer C16/20 Säule (Höhe: 9 cm, Radius: 0,8 cm, Gelbettvolumen: 18 mL). Eingesetzt wurde eine Stufenelution mit jeweils einer linearen Fließgeschwindigkeit von 3 mL/min. Hohe Salzkonzentrationen der Puffer sollten unspezifische Bindungen unterdrücken. Zur Aufreinigung der unterschiedlichen Enzyme wurden unterschiedliche Puffersysteme (Tabelle 24) verwendet. Die Äquilibration erfolgte mit 5 Volumen Lysepuffer mit einer linearen Fließgeschwindigkeit von 3 mL/min. Anschließend wurden 15 mL Rohextrakt mit halber Fließgeschwindigkeit mithilfe einer P1-Pumpe (GE Healthcare, Hamburg, Deutschland) aufgetragen. Nach zwei Waschschritten mit zwei Volumen Lysepuffer und drei Volumen Waschpuffer wurde das Protein mit Elutionspuffer eluiert. Während der Elution wurden 3-mL-Fractionen mittels Fraktionssammler gesammelt. Die einzelnen Durchfluss- und Elutionsfraktionen wurden auf ihre jeweilige Enzymaktivität getestet. Der Proteingehalt des aktiven Elutionspools wurde nach der Methode von Bradford (Kapitel 3.12.1) bestimmt.

Tabelle 24: Puffersysteme für Proteinaufreinigungen

Proteinbezeichnung	Puffersystem
His ₆ UMPK	Lysepuffer: 50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8
His ₆ UGD	Waschpuffer: 50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8
UGDHis ₆	(0,3 M NaCl, 1 mM DTT, 20 mM Imidazol)
His ₆ KFID	Elutionspuffer: 50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8 (0,3 M NaCl,
His ₆ UGDH	1 mM DTT, 300 mM Imidazol, Glycerin 20% (V/V)
His ₆ catGlcAT-P	
His ₆ catGlcAT-S	
His ₆ catGlcAT-P	Lysepuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8
His ₆ catGlcAT-S	Waschpuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8
His ₆ PropWbgL	(0,3 M NaCl, 1 mM DTT, 20 mM Imidazol)
His ₆ PropWblA	Elutionspuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8
His ₆ PropWbdN	(0,3 M NaCl, 1 mM DTT, 300 mM Imidazol, Glycerol
His ₆ PropAmuc	20% (V/V)
His ₆ PropEps11	
His ₆ PropEpsH	
His ₆ PropFKP	
His ₆ NOX	Lysepuffer: 50 mM KPi, pH 6,5
	Waschpuffer: 50 mM KPi, pH 6,5 (0,3 M NaCl, 1
	mM DTT, 20 mM Imidazol)
	Elutionspuffer: 50 mM KPi, pH 6,5
	(0,3 M NaCl, 1 mM DTT, 300 mM Imidazol, Glycerol
	20% (V/V)

3.6.4 Aufreinigung über Anionenaustauschchromatografie

Das bei der Anionenaustauschchromatografie verwendete Q-Sepharose FF Material (GE Healthcare, Hamburg, Deutschland) als stationäre Phase besteht aus einer stark quervernetzten Agarosematrix, die quartäre Amine als Liganden enthält, es zählt daher zu starken Ionentauschern. Die Separation erfolgt durch Gradientenelution. Für die Aufreinigung wurde eine Säule (5x40 cm) mit einem Gelbettvolumen von 75 mL genutzt. Die Detektion der Proteine erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm; einzelne Proben (4 mL) wurden durch den Fraktionssammler aufgefangen. Die Aufreinigung des Rohextraktes erfolgte nach dem Arbeitsprotokoll von Römer *et al.* (Römer *et al.* 2004).

3.7 Bereitstellung von Enzymen für die Enzym-Module zur Synthese von UDP-GlcA und des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops

Für die *in vitro* Synthese von UDP-GlcA und des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops sollten lösliche rekombinante Enzyme zum Einsatz kommen. Die erfolgreiche Etablierung der Synthesestrategien setzt jedoch für die beteiligten rekombinanten Enzyme spezifische Aktivitäten im Bereich von 0,1-1 U/mg voraus. Zur Erreichung dieses Ziels wurden eine humane Uridin-Monophosphat-Kinase (UMPK), vier UDP-Glukose-6-Dehydrogenasen unterschiedlicher Spezies und zwei murine Glukuronyltransferasen untersucht. Nach erfolgreicher Klonierung und Expression erfolgte die Überprüfung hinsichtlich der entsprechenden enzymatischen Aktivität. Des Weiteren wurden die ausgewählten Enzyme biochemisch charakterisiert, um mit optimalen Synthesestrategien hohe Produktumsätze zu erzielen.

3.7.1 Biochemische Charakterisierung der His₆UMPK

3.7.1.1 Aktivitätsbestimmung der UMP-Kinase

Aktivitätsbestimmung mittels Fotometer

Die enzymatische Aktivität der His₆UMPK kann mit dem kontinuierlichen Fotometertest bestimmt werden. Bei der Bestimmung der Aktivität des Enzyms wird das durch die His₆UMPK-Aktivität entstehende ADP mithilfe von 2 weiteren Hilfsenzymen nachgewiesen (Abbildung 27). Im Bereich der linearen Extinktionsabnahme wird zunächst nur ADP von den Hilfsenzymen umgesetzt. Die Abnahme von NADH + H⁺ bei 340 nm wird in einer Dreifachbestimmung verfolgt.

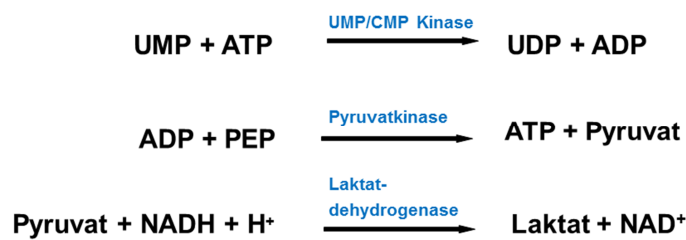


Abbildung 27: Reaktionsschema zur Bestimmung der Aktivität von UMP-Kinasen mittels Fotometer

Für die Bestimmung der Aktivität von His₆UMPK wird das entstehende ADP nachgewiesen. Dieses wird durch die Pyruvatkinase und die Laktat-Dehydrogenase weiter umgesetzt. Dabei wird der Umsatz von ADP über die Abnahme von NADH + H⁺ bei 340 nm fotometrisch verfolgt.

Die zu bestimmenden Proben wurden nach dem Pipettierschema der Tabelle 25 vorbereitet. Die Abnahme der Extinktion von NADH + H⁺ bei 340 nm ist dabei proportional zum gebildeten ADP des ersten Reaktionsschrittes.

Tabelle 25: Fotometertest zur Bestimmung der Aktivität von UMP-Kinasen

Volumen [μL]	Reagenz	Endkonzentration
10,0	1 M Tris-HCl, pH 8,7	50,00 mM
20,0	0,2 M KCl	20,00 mM
2,0	0,2 M K ₂ HPO ₄	2,00 mM
2,4	0,4 M MgCl ₂	5,00 mM
2,0	0,1 M PEP	1,00 mM
12,5	0,004 M NADH	0,25 mM
5,0	Pyruvatkinase (1 U/μL)	5,00 U
5,0	Laktat-Dehydrogenase (1 U/μL)	5,00 U
10,0	0,1 M DTT	5,00 mM
40,0	0,025 M UMP	5,00 mM
2,0	0,1 M ATP	1,00 mM
10,0	Enzym	
ad 200,0	H ₂ O	
200,0	Gesamtvolumen	

Die Stabilitätskontrolle von NADH + H⁺ in wässrigen Pufferlösungen erfolgte durch eine Probe mit Wasser. Diese diente als Nullwert für die zu bestimmenden Proben. Die Aktivität wurde nach Gleichung 2 mithilfe des linearen Extinktionsabfalls berechnet. Der Reaktionsverlauf wurde mithilfe der Software SOFTMAX Pro graphisch verfolgt und die Steigung ($\Delta E_{340\text{nm}}/\Delta t$) im linearen Bereich bestimmt. Die Aktivität von 1 Unit His₆UMPK

entspricht dabei der Enzymmenge, die unter Standardbedingungen pro min 1 μmol UDP synthetisiert (Gleichung 2).

Gleichung 2: Berechnung der volumetrischen Aktivität

$$\text{Aktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right] = \frac{\Delta E_{340 \text{ nm}} * X * F}{\Delta t * \epsilon * d * x} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL} * \text{min}} \right]$$

$\Delta E/\Delta t$: Anfangssteigung der Extinktionsmessung bei 340 nm in 1/min

X: Testansatzvolumen [mL]

F: Verdünnungsfaktor

d: Schichtdicke [cm]

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm = $6,2 \text{ mL} * \mu\text{mol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$

x: Probenvolumen [mL]

Aktivitätsbestimmung mittels Kapillarelektrophorese

Die CE-UV Analytik eignet sich zur Quantifizierung von Nukleotiden und Nukleotidzuckern. Bei der Bestimmung der Aktivität mittels CE-UV Analyse kann die Eduktabnahme von UMP und die Produktzunahme von UDP bei 254 nm direkt verfolgt werden (Abbildung 28). Für den Aktivitätsnachweis wurde ein Reaktionsansatz von 400 μL hergestellt (Tabelle 26) und bei 30°C inkubiert. Während der Reaktionszeit wurden zu Zeitpunkten linearer Produktbildung dem Ansatz Proben von 20 μL entnommen und anschließend bei 95°C für 5 min inkubiert. Ein Einfluss der Hitzeinaktivierung auf den Aktivitätstest konnte nicht festgestellt werden, d.h. ein Zerfall der Nukleotide und damit eine NMP Freisetzung fand in Kontrollexperimenten bei 95°C nicht statt.

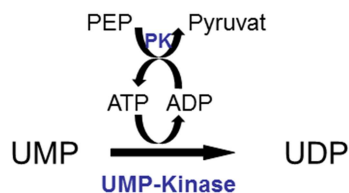


Abbildung 28: Reaktionsschema zur Bestimmung der Aktivität von UMP-Kinasen mittels CE-UV Analyse

Für die Bestimmung der Aktivität von His₆UMPK wird das entstehende UDP qualitativ und quantitativ bei 254 nm bestimmt. Zusätzlich kann auch die Abnahme des Eduktes UMP verfolgt und quantifiziert werden.

Tabelle 26: CE-UV Analyse zur Bestimmung der Aktivität von UMP-Kinasen

Volumen [μL]	Reagenz	Endkonzentration
20,0	1 M Tris-HCl, pH 8,7	50,00 mM
40,0	0,2 M KCl	20,00 mM
4,0	0,2 M K_2HPO_4	2,00 mM
5,0	0,4 M MgCl_2	5,00 mM
2,0	0,1 M PEP	5,00 mM
5,0	Pyruvatkinase (1 U/ μL)	5,00 U
20,0	0,1 M DTT	5,00 mM
32,0	0,025 M UMP	2,00 mM
4,0	0,1 M ATP	2,00 mM
20,0	Enzym	
ad 400,0	H_2O	
400,0	Gesamtvolumen	

Nach Zentrifugation der Proben bei 13000 Upm für 10 min konnte der Überstand mithilfe der CE-UV Analytik bei 254 nm bestimmt werden. Die Zuordnung aller Peaks mit ihren spezifischen Migrationszeiten erfolgte mit kommerziell erhältlichen reinen Standardsubstanzen. Die Konzentration des synthetisierten Produktes UDP wurde mit einer Kalibriergeraden (Peakfläche/Konzentration) des Standards UDP bestimmt. Die ermittelten Konzentrationen des Produktes wurden für die Aktivitätsbestimmung nach Gleichung 3 verwendet.

Gleichung 3: Aktivitätsberechnung der His₆UMP-Kinasen mittels CE-UV Analyse

$$\text{Aktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right] = \frac{c * X * F}{\Delta t * x} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL} * \text{min}} \right]$$

X: Testansatzvolumen [mL]

F: Verdünnungsfaktor

Δt : Inkubationszeit der Probe [min]

x: Probenvolumen [mL]

Hierbei entspricht 1 Unit His₆UMP-Kinase der Enzymmenge, die unter Standardbedingungen 1 μmol UDP pro min und mL bei 30°C synthetisiert. Negativkontrollen enthielten kein UMP oder kein Enzym.

3.7.1.2 Bestimmung des pH- und Temperatur-Optimums

Für eine optimale Reaktionsführung sind die Untersuchungen der Reaktionsparameter wie pH-Optimum, Temperatur-Optimum und darüber hinaus auch die Substratkinetiken sowie Inhibitionsuntersuchungen unerlässlich. Für die Bestimmung des pH-Optimums wurden die Puffersysteme Tris-HCl und HEPES-NaOH (Endkonzentration: 50 mM) gewählt und pH-Werte im Bereich von 7,6-9,0 überprüft. Die Zusammensetzung der Reaktionslösungen erfolgte wie in Tabelle 25 beschrieben. Die Überprüfung des Temperatur-Optimums wurde ebenfalls bei Temperaturen von 25-39°C fotometrisch durchgeführt (Kapitel 3.7.1.1). Im Bereich der linearen Geschwindigkeit wurde für jeden pH- und Temperaturwert die Enzymaktivität berechnet und damit das pH- und Temperatur-Optimum ermittelt. Zur Bestimmung der Lagerstabilität der His₆UMPK wurde gereinigtes Enzym mit 4 mM Saccharose oder mit 20% (V/V) Glycerin versetzt und bei +4°C bzw. -20° gelagert.

3.7.1.3 Bestimmung der Substratkinetiken

Die Bestimmung des Substratumsatzes erfolgte mittels kontinuierlichem Fotometertest mit aufgereinigter His₆UMPK (Kapitel 3.7.1.1). Hierbei wurden Endkonzentrationen von 0-5 mM der Substrate UMP und ATP im Testansatz analysiert. 10 µL der jeweilig zu testenden Substratkonzentration wurden zusammen mit 180 µL Mastermix vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µL His₆UMPK gestartet. Die Konzentration des jeweils korrespondierenden Substrates lag mit 6 mM im Überschuss vor. Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mithilfe der Software Sigma Plot 10.0 (SPSS Science Software GmbH, Erkrath, Germany). Die kinetischen Daten wurden durch nicht lineare Regressionsanalyse der experimentellen Daten bestimmt. Bei den vorliegenden hyperbolen Kurvenverläufen wurden die kinetischen Konstanten K_m und V_{max} mit der Michaelis-Menten-Gleichung bestimmt (Gleichung 4). Beim hyperbolischen Verlauf der Zeit-Umsatz-Kurve ist die Reaktionsgeschwindigkeit im Bereich kleiner Umsätze idealerweise linear. Daher sollte der Umsatz nicht größer als 10% sein.

Gleichung 4: Michaelis-Menten-Gleichung

$$V = \frac{V_{\max} * S}{K_m + S}$$

S: Substratkonzentration [mM]

V: Reaktionsgeschwindigkeit [U/mg]

$V_{\max}$: maximale Reaktionsgeschwindigkeit [U/mg]

3.7.1.4 Inhibitionsuntersuchung

Das im EMS (Modul A + Modul B + Modul C) entstehende Endprodukt UDP-GlcA und die Zwischenprodukte UDP und UDP-Glc können einen Einfluss auf die Aktivität der His₆UMPK zeigen. Daher wurden in den kontinuierlichen Fotometertest Produktkonzentrationen von 0-5 mM UDP-Glc und UDP-GlcA eingesetzt und die Enzymaktivitäten bestimmt. Die Auswertung der experimentellen Daten erfolgte nach Kapitel 3.7.1.1. Die Produktinhibition für UDP mit Konzentrationen von 0-5 mM wurde mittels CE-UV Analyse untersucht. Hier wurde für die Ermittlung der Aktivität (Gleichung 3) die Konzentrationsabnahme des Eduktes UMP herangezogen. Für die Untersuchung der Produktinhibition durch ADP wurde ebenfalls die CE-UV Analytik verwendet.

3.7.1.5 Untersuchung des Substratspektrums

Zur Bestimmung des Substratspektrums wurden die Substrate UMP, dTMP, CMP, AMP, dUMP und GMP in der Endkonzentration von 5 mM eingesetzt. Die Enzymaktivität wurde mit dem kontinuierlichen Fotometertest bestimmt, wobei über 6 h in Intervallen von 2 min die Extinktion von NADH gemessen und das Integral der Zeit-Umsatz-Kurve bestimmt wurde. Die Berechnung der relativen Aktivität erfolgte nach Gleichung 5. Wasser diente als Kontrolle für den nicht-enzymatischen Zerfall von UDP. Die Aktivität für das Substrat UMP wurde mit 100% bewertet.

Gleichung 5: Berechnung der relativen Aktivität für das Substratspektrum

$$\text{Relative Aktivität}[\%] = \frac{\text{Fläche}_{\text{Wasseransatz}} - \text{Fläche}_{\text{Akzeptor}}}{\text{Fläche}_{\text{Wasseransatz}} - \text{Fläche}_{\text{natürliches Substrat}}} * 100\%$$

3.7.2 Biochemische Charakterisierung der His₆UGDH und der His₆KFID

3.7.2.1 Bestimmung der Aktivität von UDP-Glukose-Dehydrogenasen

Aktivitätsbestimmung mittels Fotometer

Die Aktivität der Dehydrogenasen kann mit dem kontinuierlichen Fotometertest bestimmt werden. Bei der Bestimmung der Aktivität des Enzyms wird das durch die Enzymaktivität entstehende NADH + H⁺ bei 340 nm in einer Dreifachbestimmung direkt verfolgt (Abbildung 29). Für die Oxidation von einem Molekül UDP-Glc werden zwei Moleküle NAD⁺ benötigt. Die volumetrische Aktivität wurde nach (Gleichung 2) berechnet. Dabei entspricht 1 Unit der Enzymmenge, die unter Standardbedingungen 1 µmol UDP-GlcA pro min und mL bei 30°C synthetisiert. Negativkontrollen ohne Kosubstrat oder Enzym wurden ebenfalls getestet.

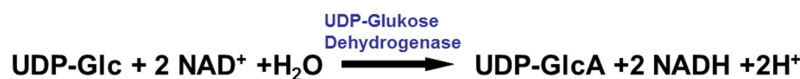


Abbildung 29: Reaktionsschema zur Bestimmung der Aktivität von UDP-Glukose-Dehydrogenasen mittels Fotometer

Für die Bestimmung der Aktivität der UDP-Glukose-Dehydrogenasen wird die Zunahme von NADH + H⁺ bei 340 nm fotometrisch verfolgt. Die Zusammensetzung der Proben erfolgte nach dem Pipettierschema der Tabelle 27. Die Zunahme der Extinktion bei 340 nm ist dabei proportional zum gebildeten NADH + H⁺. Die volumetrische Aktivität wurde nach (Gleichung 2) berechnet.

Tabelle 27: Fotometertest zur Bestimmung der Aktivität von UDP-Glukose-Dehydrogenasen

Volumen [µL]	Reagenz	Endkonzentration
100,0	100 mM Tris-HCl, pH 8,7	50,00 mM
20,0	30 mM NAD ⁺	3,00 mM
10,0	100 mM DTT	5,00 mM
20,0	20 mM UDP-Glc	2,00 mM
50,0	Enzym	
200,0	Gesamtvolumen	

Aktivitätsbestimmung mittels CE-UV Analyse

Bei der Bestimmung der Aktivität mittels CE-UV Analytik kann die Eduktabnahme von UDP-Glc und die Produktzunahme von UDP-GlcA direkt verfolgt werden (Abbildung 29). Die Probenvorbereitung erfolgte nach Tabelle 28.

Tabelle 28: CE-UV Analyse zur Bestimmung der Aktivität von UDP-Glukose-Dehydrogenasen

Volumen [μ L]	Reagenz	Endkonzentration
200,0	100 mM Tris-HCl, pH 8,7	50,00 mM
40,0	30 mM NAD ⁺	3,00 mM
20,0	100 mM DTT	5,00 mM
40,0	20 mM UDP-Glc	2,00 mM
100,0	Enzym	
400,0	Gesamtvolumen	

Die Reaktionsansätze wurden bei 30°C inkubiert. Sofort nach Zugabe des Enzyms sowie zu Zeitpunkten linearer Produktbildung wurden dem Ansatz Proben von 20 μ L entnommen. Die enzymatische Reaktion der Probe wurde bei 95°C für 5 min gestoppt. Die Konzentration von UDP-GlcA wurde mit einer Kalibriergeraden (Peakfläche/Konzentration) kommerziell verfügbarer UDP-GlcA bestimmt. Die ermittelten Konzentrationen des Produktes wurden für die Aktivitätsbestimmung nach Gleichung 3 verwendet.

3.7.2.2 Bestimmung des pH- und Temperatur-Optimums und der Lagerstabilität

Für die Bestimmung des pH-Optimums wurden die Puffersysteme Tris-HCl und HEPES-NaOH (Endkonzentration: 50 mM) gewählt und pH-Werte im Bereich von 7,2-9,0 überprüft. Die Zusammensetzung der Reaktionslösungen erfolgte nach Tabelle 27. Zur Ermittlung des Temperatur-Optimums wurde die Aktivität bei ermitteltem optimalem pH-Wert im Bereich von 25-39°C ebenfalls fotometrisch bestimmt. Zur Bestimmung der Lagerstabilität der His₆UGDH bzw. His₆KFID wurde gereinigtes Enzym ohne und mit 20% (V/V) Glycerin versetzt und bei +4°C bzw. -20°C gelagert. Über einen Zeitraum von 17 Tagen wurde die Enzymaktivität über den kontinuierlichen Fotometertest bestimmt. Die zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Enzymproben wurden hinsichtlich ihrer Enzymaktivität mittels Fotometertest (Tabelle 27) untersucht.

3.7.2.3 Bestimmung der Enzymstabilität unter Synthesebedingungen

Für die Untersuchung der Enzymstabilität wurde das gereinigte Enzym bei 30°C für 8 Tage in einem Thermoheizblock (HBT 130, HLC Biotech) inkubiert, zu verschiedenen Zeitpunkten Enzymproben entnommen und die Enzymaktivität für die Anfangsgeschwindigkeit mittels Fotometertest nach Kapitel 3.7.2.1 bestimmt. Die Halbwertszeit und der Inaktivierungskoeffizient wurden nach Arrhenius bestimmt (Gleichung 6).

Gleichung 6: Bestimmung der relativen Aktivität nach Arrhenius

$$A_t = A_0 * e^{-k*t}$$

t: Zeit [min]

k: Inaktivierungskoeffizient

A: relative Aktivität [%]

3.7.2.4 Bestimmung der Substratkinetiken

Die Aufnahme der Kinetik für die Substrate UDP-Glc und NAD⁺ wurde jeweils in Konzentrationen von 0-5 mM mittels Fotometer getestet. Auch hier wurden zuerst 10 µL des zu testenden Substrates und 140 µL des Mastermix vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von 50 µL des aufgereinigten Enzyms gestartet. Die Konzentration des jeweils korrespondierenden Substrates lag mit 6 mM im Überschuss vor. Die Auswertung der kinetischen Daten erfolgte mithilfe der Software Sigma Plot 10.0 (SPSS GmbH Software, Germany) durch Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 4).

3.7.2.5 Inhibitionsuntersuchung

Die Inhibitionsversuche sollten den Effekt des im EMS entstehenden Zwischenproduktes UDP und der Produktinhibition durch UDP-GlcA auf die Aktivität der beiden rekombinanten Dehydrogenasen verdeutlichen. Daher wurden in den kontinuierlichen Fotometertest Produktkonzentrationen von 0-5 mM der genannten Substrate eingesetzt und die Enzymaktivitäten bestimmt. Hierfür wurden 10 µL des zu testenden Substrates und 140 µL des Mastermix in eine Mikrotiterplatte vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µL Enzym gestartet. Die Auswertung der experimentellen Daten erfolgte nach Gleichung 2.

3.7.3 Biochemische Charakterisierung der His₆catGlcAT-P und His₆catGlcAT-S

3.7.3.1 Aktivitätsbestimmung von UDP-Glukuronyltransferasen

Aktivitätsbestimmung mittels Fotometer

Die Aktivität der Transferasen kann indirekt über eine Enzymkaskade im Fotometer bestimmt und die Abnahme von NADH + H⁺ bei 340 nm in einer Dreifachbestimmung verfolgt werden (Abbildung 30). Als Donorsubstrat diente UDP-GlcA, als Akzeptorsubstrat Typ 2 LacNAc für His₆catGlcAT-P und zusätzlich Typ 1 LacNAc für His₆catGlcAT-S. Das bei dieser Reaktion freiwerdende UDP wird durch die Pyruvatkinase (PK) zu UTP phosphoryliert. Das freiwerdende Pyruvat wird in Anwesenheit von NADH + H⁺ mithilfe der Laktat-Dehydrogenase (LDH) zu Laktat reduziert, als Oxidationsprodukt entsteht NAD⁺. Die Aktivitätsberechnung erfolgt mithilfe der Gleichung 2. Dabei entspricht 1 Unit His₆catGlcAT-P bzw. His₆catGlcAT-S der Enzymmenge, die unter Standardbedingungen 1 µmol Typ 2 GlcA-LacNAc oder Typ 1 GlcA-LacNAc pro min und mL bei 37°C synthetisiert.

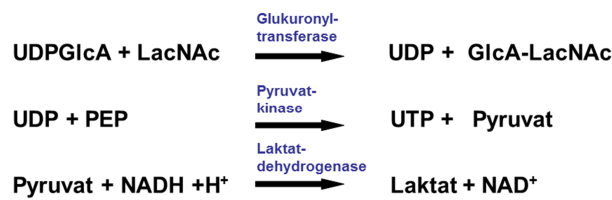


Abbildung 30: Reaktionsschema zur Bestimmung der Aktivität von UDP-Glukuronyltransferasen mittels Fotometer

Die Glukuronyltransferasen transferieren UDP-GlcA auf den Akzeptor LacNAc unter Freisetzung von UDP. Das dabei freigesetzte UDP wird zu UTP in Anwesenheit von PEP durch die Pyruvatkinase phosphoryliert. Das aus dieser Reaktion entstehende Pyruvat wird durch die Laktat-Dehydrogenase zu Laktat umgesetzt. Dabei kann die Abnahme von NADH + H⁺ bei 340 nm verfolgt werden.

In eine Mikrotiterplatte wurden 100 µL Enzymlösung vorgelegt und die Enzymkaskade unmittelbar nach Zugabe von 150 µL Mastermix (Tabelle 29) gestartet. Negativkontrollen ohne Akzeptorsubstrat oder Enzym wurden ebenfalls getestet.

Tabelle 29: Fotometertest zur Bestimmung der Aktivität von UDP-Glukuronyltransferasen

Volumen [µL]	Reagenz	Endkonzentration
50,0	0,25 M HEPES NaOH, pH 6,5	50,00 mM
5,0	1,0 M KCl	20,00 mM
2,5	0,2 M K ₂ HPO ₄	2,00 mM
1,0	1,0 M MgCl ₂	4,00 mM
6,25	0,04 M PEP	1,00 mM
6,25	0,01 M NADH	0,25 mM
5,0	Pyruvatkinase (1 U/µL)	5,00 U
5,0	Laktat-Dehydrogenase (1 U/µL)	5,00 U
12,5	0,1 M DTT	5,00 mM
25,0	0,02 M UDP-GlcA	2,00 mM
5,0	0,1 M LacNAc (Typ 1 oder Typ 2)	2,00 mM
5,0	0,1 M MnCl ₂	2,00 mM
100,0	Enzym	
ad 250,0	H ₂ O	
250,0	Gesamtvolumen	

Aktivitätsbestimmung mittels CE-UV Analyse

Die CE-UV Analytik ermöglicht die Quantifizierung des Nukleotidzuckers UDP-GlcA und des freiwerdenden Nukleotids UDP (Abbildung 31). Die Proben wurden nach Tabelle 30 vorbereitet und bei 37°C inkubiert.



Abbildung 31: Reaktionsschema zur Bestimmung der Aktivität von UDP-Glukuronyltransferasen mittels CE-UV Analyse

Für die Bestimmung der Aktivität von His₆catGlcAT-P und His₆catGlcAT-S wird das freiwerdende UDP qualitativ und quantitativ bei 254 nm bestimmt. Zusätzlich kann auch die Abnahme des Eduktes UDP-GlcA verfolgt und quantifiziert werden.

Tabelle 30: CE-UV Analyse zur Bestimmung der Aktivität von UDP-Glukuronyltransferasen

Volumen [µL]	Reagenz	Endkonzentration
50,0	0,25 M HEPES NaOH, pH 6,5	50,00 mM
5,0	0,5 M DTT	5,00 mM
10,0	0,1 M MnCl ₂	2,00 mM
50,0	0,02 M UDP-GlcA	2,00 mM
10,0	0,1 M LacNAc (Typ 1 oder Typ 2)	2,00 mM
200,0	Enzym	
ad 500,0	H ₂ O	
500,0	Gesamtvolumen	

Zur Bestimmung der Aktivität wurden dem zu untersuchenden Ansatz zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben von 20 µL entnommen. Nach Inkubation bei 95°C für 5 min und Zentrifugation der Proben bei 13000 Upm für 10 min konnte der Überstand mit der CE-UV Methode bei 254 nm analysiert werden. Zusätzlich erfolgten Messungen von Negativkontrollen ohne Akzeptorsubstrat oder ohne Enzym. Die Quantifizierung der Substrate UDP-GlcA und des Nukleotids UDP wurde ermöglicht durch Einsetzen entsprechender Kalibriergeraden. Die volumetrische Aktivität wurde durch die Quantifizierung von UDP nach Gleichung 3 bestimmt. Dabei ist die Konzentration an UDP proportional zur transferierten Glukuronsäure.

3.7.3.2 Bestimmung der Enzymstabilität unter Synthesebedingungen

Für die Untersuchung der Enzymstabilität wurde das gereinigte Enzym bei 30°C für 8 Tage in einem Thermoheizblock (HBT 130, HLC Biotech) inkubiert, zu verschiedenen Zeitpunkten Enzymproben entnommen und die Enzymaktivität für die Anfangsgeschwindigkeit mittels Fotometertest nach Kapitel 3.7.3.1 bestimmt. Die Halbwertszeit und der Inaktivierungskoeffizient wurden nach Arrhenius bestimmt (Gleichung 6).

3.7.3.3 Bestimmung des pH- und Temperatur-Optimums und der Lagerstabilität

Zur Bestimmung des optimalen pH-Wertes wurde die Aktivität des Enzyms über ein pH-Spektrum von pH 4,0-9,0 fotometrisch getestet. Hierzu wurden die Puffersysteme MES-NaOH (pH 4,0-6,0), HEPES-NaOH (pH 5,5-8,0) und Tris-HCl (pH 7,0-9,0) verwendet, die in einer 50 mM Endkonzentration in die Reaktionslösung (Tabelle 29) eingesetzt wurden. Um den Einfluss der Temperatur auf die Enzymaktivität zu bestimmen, wurde in einzelnen Versuchsansätzen die Temperatur im Bereich von 27-45°C variiert und die Aktivität analog Kapitel 3.7.3.1 fotometrisch bestimmt. Die Überprüfung der Lagerstabilität des Enzyms erfolgte durch Lagerung des Enzyms bei 4°C und -20°C im Zeitraum von 70 Tagen. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde eine entsprechend aliquotierte Enzymprobe entnommen und nach Kapitel 3.7.3.1 untersucht.

3.7.3.4 Einfluss von divalenten Kationen auf die Transferaseaktivität

Für die Aktivität der His₆catGlcAT-P, die eine GTA-Struktur aufweist, ist die Anwesenheit von divalenten Kationen essentiell. Hierzu wurde der Einfluss verschiedener Metallionen (NiCl₂, MnCl₂, CaCl₂, MgSO₄ und CoCl₂) in einer Konzentration von 2 mM auf die Enzymaktivität unter Verwendung des Fotometertestes (Kapitel 3.7.3.1) untersucht. Ebenso wurde ein Reaktionsansatz ohne Metallion (Wasser statt Metallion) gemessen.

3.7.3.5 Einfluss von alkalischer Phosphatase auf die Transferaseaktivität

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Aktivität der Glykosyltransferasen durch das in der Transferreaktion freiwerdende Nukleotid gehemmt wird (Unverzagt *et al.* 1990). Der Einfluss von alkalischer Phosphatase auf die Transferreaktion ist somit ein wichtiger Faktor. Daher wurde dem Ansatz zur Bestimmung der Enzymaktivität alkalische Phosphatase in einer Endkonzentration von 1 U zugefügt und die Enzymaktivität mit der CE-UV Analyse nach Kapitel 3.7.3.1 gemessen.

3.7.3.6 Bestimmung der Substratkinetiken

Die Aufnahme der Substratkinetik erfolgte mittels kontinuierlichem Fotometertest (Kapitel 3.7.3.1). Die Substrate UDP-GlcA, LacNAc-Linker-*t*-Boc und Typ 2 LacNAc wurden in Konzentrationen von 0-5 mM untersucht. Die Konzentration des korrespondierenden Substrates lag mit 6 mM im Überschuss vor. Bei der Durchführung des Versuches wurden 12,5 µL des zu testenden Substrates zusammen mit 100 µL des Enzyms vorgelegt. Vom Mastermix wurden unmittelbar vor der Messung 137,5 µL zugegeben. Nach Berechnung der volumetrischen Aktivität erfolgte die Auswertung der kinetischen Daten unter Verwendung der Software SigmaPlot 10.0 (SPSS Software GmbH, Erkrath, Germany) und der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 4).

3.7.3.7 Untersuchung des Akzeptorsubstratspektrums

Zur Untersuchung des Substratspektrums wurden die Substrate nach Tabelle 31 in den Fotometertest eingesetzt (Kapitel 3.7.3.1). Dafür wurden 25 µL der entsprechenden Substanz in einer Endkonzentration von 2 mM zusammen mit 100 µL Enzym vorgelegt und direkt vor der Messung mit 125 µL Mastermix versetzt. Die relative Aktivität bei der Reaktion von 2 mM Typ 2 LacNAc wurde mit 100% bewertet. Wasser wurde als Kontrollwert für den nicht-enzymatischen Zerfall von $\text{NADH} + \text{H}^+$ mitgeführt. Nach Beenden der Messung konnte die relative Aktivität mit den untersuchten Substraten bestimmt werden.

Tabelle 31: Akzeptorsubstrate der His₆catGlcAT-P

Substratbezeichnung	Substrat
1	D-Gal
2	Gal(β1-4)Glc
3	Gal(β1-4)Glc(β1-Octyl
4	Gal(β1-4)GlcNAc
5 ^a	Gal(β1-4)GlcNAc AzII
6 ^b	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-Linker- <i>t</i> -Boc
7 ^b	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-Linker- <i>t</i> -Boc
8	Gal(β1-3)GlcNAc
9	Gal(β1-4)Fru
10	Gal(α1-6)Glc(α1-2)Fru

^a siehe Adamiak *et al.* und Anders *et al.* für die Synthese des Substrates (Anders *et al.* 2011, Adamiak *et al.* 2012)

^b siehe Rech *et al.* (Rech *et al.* 2011) für die Synthese des Substrates

3.7.3.8 Inhibitionsuntersuchungen

Um den Einfluss von Saccharose und UDP-Glc auf die Enzymaktivität zu untersuchen, wurden Konzentrationen von 0-5 mM UDP-Glc und 300 mM Saccharose dem Fotometertest zugesetzt (Kapitel 3.7.3.1) und die Enzymaktivitäten bestimmt. Ein Testansatz ohne Additiv diente als Vergleich, die hierfür ermittelte Aktivität wurde mit 100% bewertet. Die Auswertung der experimentellen Daten erfolgte nach Gleichung 2.

3.7.4 Bestimmung der Enzymaktivität der SuSy1

Kontinuierlicher Fotometertest nach Barrat *et al.*

Barrat *et al.* entwickelten einen kontinuierlichen Fotometertest zur Bestimmung der Spaltaktivität (Barratt *et al.* 2001) der Saccharose Synthase. Bei der Bestimmung der Spaltaktivität des Enzyms wird die durch die SuSy1-Aktivität entstehende Fruktose mithilfe von 3 weiteren Hilfsenzymen nachgewiesen (Abbildung 32). Dabei entspricht 1 Unit SuSy1 genau der Enzymmenge, die unter Standardbedingungen bei 30°C 1 μmol Fruktose pro min und mL synthetisiert.

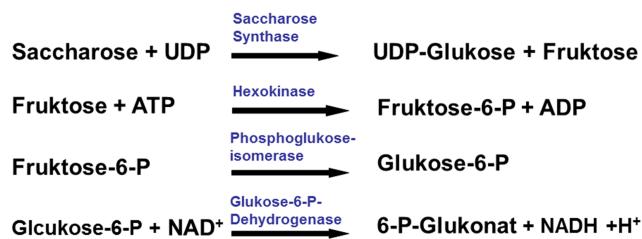


Abbildung 32: Reaktionsschema zur Bestimmung der Spaltaktivität der SuSy1 nach Barrat *et al.* (Barratt *et al.* 2001)

Die bei der Spaltaktivität von SuSy1 entstehende Fruktose wird mithilfe der Hexokinase, der Phosphoglukoseisomerase und der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase kontinuierlich umgesetzt. Gemessen wird die Extinktionszunahme von NADH + H⁺ bei 340 nm. Mithilfe der Anfangssteigung wurde die Aktivität bestimmt (Gleichung 2). Dabei entspricht 1 Unit SuSy1 genau der Enzymmenge, die unter Standardbedingungen 1 μmol Fruktose pro min und mL synthetisiert.

Zunächst wurden 150 μL Mastermix (Tabelle 32) in die Mikrotiterplatten vorgelegt und die Reaktion mit Zugabe der zu untersuchenden Probe gestartet. Die Aktivität wird mithilfe der Anfangssteigung nach Gleichung 2 bestimmt.

Tabelle 32: Fotometertest zur Bestimmung der Spalt-Aktivität der SuSy1

Volumen [μL]	Reagenz	Endkonzentration
12,5	1 M HEPES NaOH, pH 7,6	50,00 mM
25,0	10 mM MgCl_2	1,00 mM
25,0	5 mM ATP	0,50 mM
25,0	5 mM NAD^+	0,50 mM
1,25	Hexokinase (1,2 U/ μL)	1,90 U
1,25	Glukose-6-P-Dehydrogenase (1 U/mL)	1,25 U
1,3	Phosphoglukoseisomerase (0,7 U/mL)	0,90 U
31,25	2 M Saccharose	250,00 mM
12,5	20 mM UDP	1,00 mM
100,0	Enzym	
ad 250,0	H_2O	
250,0	Gesamtvolumen	

Aktivitätsbestimmung der SuSy1 mittels CE-UV Analyse

Die CE-UV Analytik ermöglicht die Quantifizierung der Substrate UDP und UDP-Glc bei 254 nm (Abbildung 33). Die Reaktionsansätze (Tabelle 33) wurden bei 30°C inkubiert. Sofort nach Zugabe des Enzyms sowie zu Zeitpunkten linearer Produktbildung wurden dem Ansatz Proben von 20 μL entnommen und bei 95°C für 5 min inkubiert. Der Zerfall des Nukleotidzuckers nach Inkubation bei 95°C konnte in Kontrollexperimenten nicht festgestellt werden. Die Quantifizierung von UDP-Glc wurde mit einer Standard Kalibriergeraden (Peakfläche/Konzentration) kommerziell verfügbarer UDP-Glc bestimmt. Die ermittelten Konzentrationen des Produktes wurden für die Aktivitätsbestimmung nach Gleichung 3 verwendet. Dabei entspricht 1 Unit SuSy1 genau der Enzymmenge, die unter Standardbedingungen bei 30°C 1 μmol UDP-Glc pro min und mL synthetisiert.

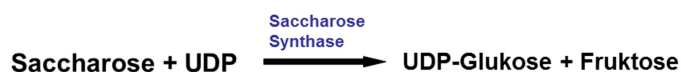


Abbildung 33: Reaktionsschema zur Bestimmung der Spalt-Aktivität der SuSy1 mittels CE-UV Analyse

Die Bestimmung der Aktivität mittels CE-UV Analyse ermöglicht die Quantifizierung der entstehenden UDP-Glc bei 254 nm. Darüber hinaus kann die Abnahme von UDP direkt verfolgt werden.

Tabelle 33: CE-UV Analyse zur Bestimmung der Spalt-Aktivität der SuSy1

Volumen [μL]	Reagenz	Endkonzentration
125,0	1 M HEPES Puffer, pH 7,6	50,00 mM
62,5	2 M Saccharose	250,00 mM
25,0	0,02 M UDP	1,00 mM
37,5	H ₂ O	
250,0	Enzym	
500,0	Gesamtvolumen	

3.7.5 Bestimmung der Enzymaktivität der His₆NOX

Die Ermittlung der Aktivität der His₆NOX über CE-UV Analyse stellt eine sehr sichere Methode dar. Hier kann die Eduktabnahme und Produktzunahme qualitativ und quantitativ bestimmt werden (Abbildung 34). Die fotometrische Bestimmung ist wegen der Hydrolyse von NADH sehr störanfällig und führt daher oft zu verfälschten Werten.

**Abbildung 34:** Reaktionsschema zur Bestimmung der Aktivität der His₆NOX mittels CE-UV Analyse

Die Bestimmung der Aktivität mittels CE-UV Analyse ermöglicht die Quantifizierung des Oxidationsproduktes NAD⁺ bei 254 nm. Darüber hinaus kann die Abnahme von NADH direkt verfolgt werden.

Die Proben wurden nach Tabelle 34 zusammengesetzt und bei 30°C im Heizblock inkubiert. Im Bereich der linearen Produktbildung wurden Proben (20 μL) entnommen und bei 95°C für 5 min inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Proben mittels CE-UV Analyse untersucht. Dabei entspricht 1 Unit His₆NOX genau der Enzymmenge, die unter Standardbedingungen bei 30°C 1 μmol NAD⁺ pro min und mL synthetisiert.

Tabelle 34: CE-UV Analyse zur Bestimmung der Aktivität der His₆NOX

Volumen [μL]	Reagenz	Endkonzentration
3,0	0,1 M NADH	1,00 mM
287,0	50 mM KPi, pH 6,5	48,07 mM
10,0	Enzym	
300,0	Gesamtvolumen	

3.8 Bereitstellung von Enzymen für die Enzym-Module zur Synthese des Glykanepitops 2'-Fukosyllaktose

3.8.1 Biochemische Charakterisierung der His₆PropWbgL

3.8.1.1 Bestimmung der Enzymaktivität von α 1,2-Fukosyltransferasen

Kontinuierlicher Fotometertest nach Barrat *et al.*

Der kontinuierliche Fotometeraktivitätstest wurde gemäß der Methode von Barrat *et al.* (Barratt *et al.* 2001) durchgeführt. Hierbei findet das Pyruvatkinase/Laktat-Dehydrogenase System zur Detektion von freigesetztem GDP Anwendung.

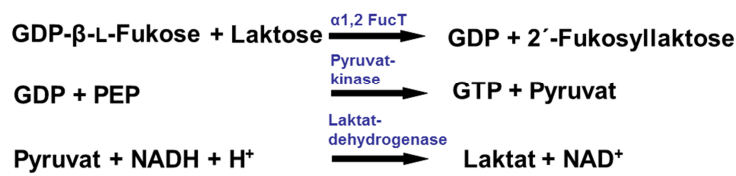


Abbildung 35: Reaktionsschema zur Bestimmung der Aktivität von α 1,2-FucTs nach Barrat *et al.* (Barratt *et al.* 2001)

Für die Bestimmung der Syntheseaktivität von α 1,2-FucTs nach Barrat wird das entstehende GDP nachgewiesen. Dieses wird durch die Pyruvatkinase weiter umgesetzt. Dabei wird der Umsatz von GDP über die Abnahme von NADH + H⁺ bei 340 nm kontinuierlich im Fotometer verfolgt.

Die Abnahme der Extinktion von NADH + H⁺ bei 340 nm ist dabei proportional zur Konzentration des gebildeten GDP des ersten Reaktionsschrittes. Als Referenzwert diente eine Probe ohne Enzym, um die Hydrolyse von NADH + H⁺ in wässrigen Pufferlösungen zu analysieren. Um darüber hinaus weitere Nebenaktivitäten auszuschließen, enthielten Kontrollansätze kein Donorsubstrat GDP-Fuc. Die Aktivität von 1 Unit His₆PropWbgL entspricht dabei der Enzymmenge, die unter Standardbedingungen pro min 1 μ mol GDP synthetisiert. Die zu bestimmenden Proben wurden nach dem Pipettierschema der Tabelle 35 vorbereitet.

Tabelle 35: Fotometertest zur Bestimmung der Aktivität von α 1,2-FucTs

Volumen [μ L]	Reagenz	Endkonzentration
12,5	1 M Tris-HCl, pH 7,6	50,00 mM
25,0	0,2 M KCl	20,00 mM
2,5	0,2 M K_2HPO_4	2,00 mM
2,5	0,1 M PEP	1,00 mM
25,0	2,5 mM NADH + H^+	0,25 mM
5,0	Pyruvatkinase (1 U/mL)	5,00 U
5,0	Laktat-Dehydrogenase(1 U/mL)	5,00 U
2,5	0,1 M DTT	1,00 mM
12,5	40 mM GDP-Fuc	2,00 mM
12,5	0,1 M Laktose	5,00 mM
5,0	0,1 M $MnCl_2$	2,00 mM
40,0	H_2O	5,00 mM
100,0	Enzym	
250,0	Gesamtvolumen	

Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 100 μ L Enzymprobe bei 27°C gestartet. Die Aktivitätsberechnung erfolgte ebenfalls nach Gleichung 2 mithilfe des linearen Extinktionsabfalls.

Aktivitätsbestimmung mittels HPAEC-PAD Analyse

Der diskontinuierliche Aktivitätstest wurde (Abbildung 36) mithilfe der HPAEC-PAD Analyse (high performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detection) zur Detektion der Produkte Laktose und 2'-FL durchgeführt (Kapitel 3.12.6).



Abbildung 36: Reaktionsschema zur Bestimmung der Aktivität von α 1,2-FucTs mittels HPAEC-PAD Analyse

Der diskontinuierliche Aktivitätstest wurde mithilfe der HPAEC-PAD Analyse (high performance anion-exchange chromatography - pulsed amperometric detection) zur Detektion der Produkte Laktose und 2'-FL durchgeführt.

Die Testansätze wurden gemäß Tabelle 36 zusammengesetzt. Durch Zugabe von 175 μ L Enzymprobe wurden die Reaktionen gestartet und weiterhin bei 27°C über einen Zeitraum

von 0-18 h inkubiert. Zu Zeitpunkten der linearen Produktbildung wurden aus dem Reaktionsansatz Proben (50 μ L) entnommen, durch Erhitzen bei 95° C für 5 min gestoppt und für 10 min bei 10000 Upm zentrifugiert. Die Konzentration des generierten Trisaccharids 2'-FL und des Disaccharids Laktose wurde mit einer Kalibriergeraden (Peakfläche/Konzentration) kommerziell erhältlicher 2'-FL und Laktose bestimmt. Die dabei ermittelten Konzentrationen von 2'-FL wurden für die Aktivitätsbestimmung nach Gleichung 3 verwendet. Hierbei entspricht 1 Unit His₆PropWbgL der Enzymmenge, die unter Standardbedingungen 1 μ mol 2'-FL pro min und mL bei 27°C synthetisiert. Negativkontrollen enthielten kein Donorsubstrat (GDP-Fuc) oder kein Enzym. Zusätzlich zum Nachweis des gebildeten Trisaccharids erfolgte eine qualitative Bewertung mittels CE-UV Analyse zwecks Freisetzung von GDP aus dem Donorsubstrat GDP-Fuc.

Tabelle 36: HPAEC-PAD Analyse zur Bestimmung der Aktivität von α 1,2-FucTs

Volumen [μ L]	Reagenz	Endkonzentration
35,0	1 M Tris-HCl, pH 7,6	50,00 mM
35,0	100 mM Laktose (Akzeptor)	5,00 mM
35,0	40 mM GDP-Fuc	2,00 mM
2,0	1 U/ μ L alkalische Phosphatase	1,00 U
7,0	100 mM DTT	1,00 mM
14,0	100 mM MnCl ₂	2,00 mM
222,0	H ₂ O	
350,0	Enzym	
700,0	Gesamtvolumen	

3.8.1.2 Bestimmung des pH- und Temperatur-Optimums

Für die Bestimmung des pH-Optimums wurde das Puffersystem Tris-HCl (Endkonzentration: 50 mM) gewählt und pH-Werte im Bereich von pH 6,8-8,4 mittels HPAEC-PAD Analyse überprüft (Kapitel 3.8.1.1). Die Zusammensetzung der Reaktionslösungen erfolgte wie in Tabelle 36 beschrieben. Dabei wurden die Proben bei 27°C für 1 h inkubiert. Für die Überprüfung des Temperatur-Optimums wurden Proben im Temperaturbereich von 25-37°C in einem Thermoheizblock (HBT 130, HLC Biotech) inkubiert und analysiert (Kapitel 3.8.1.1). Im Bereich der linearen Reaktionsgeschwindigkeit wurde für jeden pH- und Temperaturwert die Enzymaktivität berechnet und damit das pH- und Temperatur-Optimum für His₆PropWbgL nach Gleichung 3 festgestellt.

3.8.1.3 Bestimmung der Enzymstabilität unter Synthesebedingungen

Für die Untersuchung der Enzymstabilität wurde das gereinigte Enzym bei 27°C für 8 Tage in einem Thermoheizblock (HBT 130, HLC Biotech) inkubiert, zu verschiedenen Zeitpunkten Enzymproben entnommen und die Enzymaktivität für die Anfangsgeschwindigkeit mittels HPAEC-PAD Analyse nach Kapitel 3.8.1.1 bestimmt. Die Halbwertszeit und der Inaktivierungskoeffizient wurden nach Arrhenius bestimmt (Gleichung 6).

3.8.1.4 Bestimmung der Metallionenabhängigkeit für die Transferreaktion

Der Zusatz von MnCl₂, CaCl₂, MgCl₂ und CoCl₂ (Endkonzentration: 2 mM) zur Standardzusammensetzung des Aktivitätstestes (Tabelle 36) erlaubte die Überprüfung der Metallionenabhängigkeit von His₆PropWbgL für die Transferreaktion. Eine Probe ohne Zusatz divalenter Kationen wurde ebenfalls mitgeführt. Alle Proben wurden wie zuvor bei der Bestimmung des pH-Optimums beschrieben analysiert und ausgewertet.

3.8.1.5 Bestimmung der Substratkinetiken

Die Bestimmung der Substrataffinität für das Donorsubstrat GDP-Fuc und für das Akzeptorsubstrat Laktose erfolgte mittels kontinuierlichem Fotometertest nach Barrat (Tabelle 35) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Die Auswertung der

gewonnenen Daten erfolgte mithilfe der Software Sigma Plot 10.0 (SPSS Science Software GmbH, Erkrath, Germany). Die kinetischen Daten wurden durch nicht lineare Regressionsanalyse der experimentellen Daten bestimmt. Bei den vorliegenden hyperbolischen Verläufen der Kurven wurden die kinetischen Konstanten K_m und V_{max} mit der Michaelis-Menten-Gleichung bestimmt (Gleichung 4). Beim hyperbolischen Verlauf der Zeit-Umsatz-Kurve ist die Reaktionsgeschwindigkeit im Bereich kleiner Umsätze idealerweise linear und daher sollte der Umsatz nicht größer als 10% sein. Für die Aufnahme der Laktosekinetik wurden Endkonzentrationen im Testansatz von 0,05-40,00 mM bei einer konstanten Konzentration von 2 mM GDP-Fuc verwendet. Für das Donorsubstrat GDP-Fuc fanden Substratkonzentrationen von 0,02-4,00 mM bei einer konstanten Konzentration von 10 mM Laktose Einsatz.

3.8.1.6 Untersuchung des Akzeptorsubstratspektrums

Das Akzeptorsubstratspektrum der rekombinanten His₆PropWbgL wurde mithilfe eines modifizierten Fotometerassays in Anlehnung an Barrat *et al.* (Kapitel 3.8.1.1) analysiert. Hierzu wurde die Konzentration von NADH auf 2 mM erhöht und anstelle von 5 mM Laktose wurden die in Tabelle 37 angegebenen Substrate getestet und ihre relative Aktivität zu Laktose bestimmt (Gleichung 5). Bei ausgewählten Substraten (Tabelle 37: Substrat 1 und 6) erfolgte zusätzlich die Kontrolle der Freisetzung von Guanosin während des Glykosyltransfers und gleichzeitig auch die Überprüfung der Abnahme des Donorsubstrates GDP-Fuc mittels CE-UV Methode (Kapitel 3.12.4). Die Zusammensetzung der Proben wurde durchgeführt nach Tabelle 36. Die Identität von GDP-Fuc und des generierten Guanosins wurde bestätigt mit kommerziell erhältlichen Substraten. Die Substrate 10 und 11 (Tabelle 37) wurden zusätzlich mithilfe RP-HPLC (Kapitel 3.12.5.2) untersucht (Rech *et al.* 2011). Bei allen anderen in Tabelle 37 getesteten Substraten wurden darüber hinaus die Entstehung eines neuen Di- bzw. Trisaccharids überprüft.

Tabelle 37: Akzeptorsubstrate der His₆PropWbgL

Substratbezeichnung	Substrat	Analytik
1	D-Gal	Fotometer, CE-UV
2	Gal β -pNP	Fotometer, HPAEC-PAD
3	D-GalNH ₂	Fotometer, HPAEC-PAD
4	D-GalNAc	Fotometer, HPAEC-PAD
5	Gal(β 1-4)Glc	Fotometer, HPAEC-PAD
6	Gal(β 1-4)Glc(β 1-Bn	Fotometer, CE-UV
7	Gal(β 1-4)Glc(β 1-Octyl	Fotometer, HPAEC-PAD
8	Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]Glc	Fotometer, HPAEC-PAD
9	Gal(β 1-4)GlcNAc	Fotometer, HPAEC-PAD
10 ^a	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-Linker- <i>t</i> -Boc	Fotometer, RP-HPLC
11 ^a	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-Linker- <i>t</i> -Boc	Fotometer, RP-HPLC
12	Gal(β 1-3)GlcNAc	Fotometer, HPAEC-PAD
13	Gal(β 1-4)Fru	Fotometer, HPAEC-PAD
14	Gal(α 1-6)Glc(α 1-2)Fru	Fotometer, HPAEC-PAD

^a siehe Rech *et al.* (Rech *et al.* 2011) für die Synthese des Substrates

3.8.2 Bestimmung der Enzymaktivität der His₆PropFKP

Die CE-UV Analytik ermöglicht die Quantifizierung des synthetisierten Nukleotidzuckers GDP-Fuc. Als bifunktionales Enzym katalysiert FKP in einem ersten Schritt die Synthese von β -L-Fuc-1-P ausgehend von den Substraten ATP und L-Fuc. In einem zweiten Schritt erfolgt die Aktivierung durch GTP zu GDP-Fuc (Abbildung 37). Die Proben wurden nach Tabelle 38 vorbereitet und bei 37°C inkubiert. Im Bereich der linearen Produktbildung wurden Proben (20 μ L) entnommen und bei 95°C für 5 min inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Proben mittels CE-UV Analyse untersucht. Dabei entspricht 1 Unit His₆PropFKP genau der Enzymmenge, die unter Standardbedingungen bei 30°C 1 μ mol GDP-Fuc pro min und mL synthetisiert.



Abbildung 37: Reaktionsschema zur Bestimmung der Aktivität der His₆PropFKP mittels CE-UV Analyse

Für die Bestimmung der Aktivität von His₆PropFKP wird die entstehende GDP-Fuc quantitativ bei 254 nm bestimmt.

Tabelle 38: CE-UV Analyse zur Bestimmung Aktivität der His₆PropFKP

Volumen [µL]	Reagenz	Endkonzentration
17,5	1 M Tris-HCl, pH 7,6	50,00 mM
17,5	100 mM ATP	2,00 mM
35,0	20 mM L-Fuc	2,00 mM
2,0	2 U/µL anorganische Pyrophosphatase	1,00 U
7,0	100 mM GTP	2,00 mM
28,0	100 mM MnCl ₂	8,00 mM
100,0	Enzym	
ad 350,0	H ₂ O	
350,0	Gesamtvolumen	

3.9 Entwicklung und Optimierung von modularen Enzym-Kaskaden zur Synthese von UDP-GlcA

3.9.1 Synthese von UDP-GlcA mit dem UGDH-Modul (Modul C)

3.9.1.1 Synthese von UDP-GlcA und *in situ* Regeneration von NAD⁺ mit dem Laktat-Dehydrogenase/Pyruvat-System

Erste Synthesen von UDP-GlcA erfolgten im analytischen Maßstab unter Verwendung des Laktat-Dehydrogenase/Pyruvat-Systems im Batch-Verfahren. Der Syntheseansatz wurde nach Tabelle 39 zusammengesetzt und bei 30°C im Heizblock für 24 h inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben (30 µL) entnommen und bei 95°C für 5 min inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Proben mittels CE-UV Analyse (Kapitel 3.12.4) hinsichtlich der Produktbildung und Eduktabnahme untersucht.

Tabelle 39: Synthese von UDP-GlcA und *in situ* Regeneration von NAD⁺ mithilfe des Laktat-Dehydrogenase/Pyruvat-Systems (Modul C) im analytischen Maßstab (1 mL)

Volumen [µL]	Reagenz	Endkonzentration
100,0	500 mM Tris-HCl, pH 8,7	50,00 mM
5,0	100 mM NAD ⁺	0,50 mM
50,0	100 mM DTT	5,00 mM
40,0	100 mM Pyruvat	4,00 mM
20,0	100 mM UDP-Glc	2,00 mM
10,0	Laktat-Dehydrogenase (1 U/µL)	10,00 U
500,0	His ₆ UGDH	1,50 U
ad 1000,0	H ₂ O	
1000,0	Gesamtvolumen	

3.9.1.2 Synthese von UDP-GlcA und *in situ* Regeneration von NAD⁺ mit dem NADH-Oxidase/O₂-System

Für die *in situ* Regeneration des Kofaktors NAD⁺ mit der rekombinanten His₆NOX dient Sauerstoff als terminaler Wasserstoffakzeptor, so dass als Nebenprodukt H₂O entsteht. Für die Optimierung der Oxidationsreaktion von UDP-Glc einschließlich der Regeneration von NAD⁺ wurden 3 verschiedene Konzentrationen von NAD⁺ (0,25 mM, 0,5 mM und 1 mM NAD⁺) verwendet. Der Syntheseansatz wurde nach Tabelle 40 zusammengesetzt und bei 30°C im Heizblock für 3 h inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben (30 µL) entnommen und bei 95°C für 5 min inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Proben mittels CE-UV Analyse (Kapitel 3.12.4) hinsichtlich der Produktbildung untersucht.

Tabelle 40: Syntheseoptimierung von UDP-GlcA und *in situ* Regeneration von NAD⁺ mithilfe des NADH-Oxidase/O₂-Systems (Modul C) im analytischen Maßstab (1 mL)

Volumen [µL]	Reagenz	Endkonzentration
50,0	1000 mM Tris-HCl, pH 8,7	50,00 mM
2,5; 5,0; 10,0	100 mM NAD ⁺	0,25; 0,5; 1,0 mM
50,0	100 mM DTT	5,00 mM
50,0	His ₆ NOX	1,50 U
30,0	100 mM UDP-Glc	3,00 mM
600,0	His ₆ UGDH	1,00 U
ad 1000,0	H ₂ O	
1000,0	Gesamtvolumen	

3.9.1.3 *In vitro* Synthese von UDP-GlcA mit der His₆UGDH bzw. His₆KfiD (Modul C) im analytischen Maßstab

Um eine schnelle effiziente Regeneration von NAD⁺ zu garantieren, wurden in weiteren Synthesestrategien eine Konzentration von 0,5 mM NAD⁺ gewählt. Die Zusammensetzung des Syntheseansatzes erfolgte nach Tabelle 41 und die Inkubation der Lösung bei 30°C im Heizblock für 3 h. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben (30 µL) entnommen und bei 95°C für 5 min inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Proben mittels CE-UV Analyse (Kapitel 3.12.4) hinsichtlich der Produktbildung untersucht.

Tabelle 41: Synthese von UDP-GlcA und *in situ* Regeneration von NAD⁺ mithilfe der His₆NOX (Modul C) im analytischen Maßstab (1 mL)

Volumen [μL]	Reagenz	Endkonzentration
50,0	1000 mM Tris-HCl, pH 8,7	50,00 mM
5,0	100 mM NAD ⁺	0,50 mM
50,0	100 mM DTT	5,00 mM
50,0	His ₆ NOX	1,50 U
50,0	100 mM UDP-Glc	5,00 mM
600,0 bzw. 780,0	His ₆ UGDH bzw. His ₆ KfiD	1,00 U
ad 1000,0	H ₂ O	
1000,0	Gesamtvolumen	

3.9.1.4 *In vitro* Synthese von UDP-GlcA mit dem UGDH-Modul (Modul C) im semipräparativen Maßstab

Zur Produktcharakterisierung mittels ¹H-NMR Spektroskopie wurde eine semipräparative Synthese von UDP-GlcA im 10 mL Maßstab angestrebt (Tabelle 42). Dabei erfolgte eine Maßstabsvergrößerung des analytischen Ansatzes, der zuvor einen guten Umsatz von UDP-GlcA gezeigt hatte. Die Proben wurden analog des analytischen Ansatzes behandelt. Die Produktisolation erfolgte mithilfe der präparativen HILIC Methode (Kapitel 3.12.5.1). Im Anschluss fand eine Produktcharakterisierung mittels Massenspektrometrie (Kapitel 3.12.7) und NMR-Analyse (Kapitel 3.12.8) statt.

Tabelle 42: Synthese von UDP-GlcA und *in situ* Regeneration von NAD⁺ mithilfe der His₆NOX (Modul C) im semipräparativen Maßstab (10 mL)

Volumen [μL]	Reagenz	Endkonzentration
500,0	1000 mM Tris-HCl, pH 8,7	50,00 mM
500,0	100 mM NAD ⁺	0,50 mM
500,0	100 mM DTT	5,00 mM
500,0	His ₆ NOX	15,00 U
500,0	100 mM UDP-Glc	5,00 mM
6000,0	His ₆ UGDH	10,00 U
ad 10000,0	H ₂ O	
10000,0	Gesamtvolumen	

3.9.2 Ein-Topf Synthese von UDP-GlcA durch Kopplung des UGDH-Moduls mit dem SuSy-Modul (Modul B + Modul C)

Aufgrund der unterschiedlichen pH-Optima der verwendeten Enzyme wurde für das Puffersystem Tris-HCl ein pH-Wert von 7,8 ausgewählt und des Weiteren für den Ansatz mit SuSy1, produziert in *S. cerevisiae*, folgendes Enzymverhältnis festgelegt: 0,75 U/mL SuSy1, 1,5 U/mL His₆UGDH und 2,0 U His₆NOX. Für SuSy1 produziert in *E. coli* wurden reduzierte Enzymmengen eingesetzt: 0,5 U/mL SuSy1, 1 U/mL His₆UGDH und 1,5 U His₆NOX. Nach Zusammensetzung des Syntheseansatzes (Tabelle 43) erfolgte die Inkubation bei 30°C im Heizblock für 7 h. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben (30 µL) entnommen und bei 95°C für 5 min inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Proben mittels CE-UV Analyse (Kapitel 3.12.4) bezüglich der Eduktabnahme und Produktzunahme untersucht. Zur Produktabtrennung zwecks Massenbestimmung wurde die HILIC Methode (Kapitel 3.12.5.1) verwendet.

Tabelle 43: Ein-Topf Synthese von UDP-GlcA durch Kopplung des UGDH-Moduls mit dem SuSy-Modul (Modul B + Modul C) im analytischen Maßstab (1 mL)

Volumen [µL]	Reagenz	Endkonzentration
50,0	1000 mM Tris-HCl, pH 7,8	50,00 mM
5,0	100 mM NAD ⁺	0,50 mM
50,0	100 mM DTT	5,00 mM
80,0	His ₆ NOX	1,50 bzw. 2,00 U
150,0	2000 mM Saccharose	300,00 mM
250,0 bzw. 315,0	His ₆ UGDH	1,00 bzw. 1,50 U
290,0	SuSy1	0,50 bzw. 0,75 U
10,0	100 mM UDP	1,00 mM
ad 1000,0	H ₂ O	
1000,0	Gesamtvolumen	

3.9.3 Ein-Topf Synthese von UDP-GlcA durch Kopplung des UGDH-Moduls mit dem SuSy- und UMPK-Modul (Modul A + Modul B + Modul C)

Auch hier wurde analog Kapitel 3.9.2 aufgrund der unterschiedlichen pH-Optima der verwendeten Enzyme für das Puffersystem Tris-HCl ein pH-Wert von 7,8 ausgewählt und folgendes Enzymverhältnis festgelegt: 2 U/mL His₆UMPk, 1 U/mL SuSy1, 2 U/mL His₆UGDH und 2,5 U His₆NOX/mL. Um die Regeneration von ATP sicherzustellen wurde die Pyruvatkinase (pH-Optimum: pH 6,0) mit 10 U/mL und ebenfalls das Substrat PEP mit 6,00 mM im Überschuss zugegeben. Als Startkonzentrationen für den Phosphatdonor ATP wurden Konzentrationen von 0,2 mM ATP, 0,5 mM ATP und 1 mM ATP festgelegt. Nach Zusammensetzung des Syntheseansatzes (Tabelle 44) erfolgte die Inkubation bei 30°C im Heizblock für 7 h. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben (30 µL) entnommen und bei 95°C für 5 min inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Proben mittels CE-UV Analyse (Kapitel) bezüglich der Eduktabnahme und Produktzunahme untersucht. Zur Produktabtrennung zwecks Massenbestimmung wurde die HILIC Methode (Kapitel 3.12.5.1) verwendet.

Tabelle 44: Ein-Topf Synthese von UDP-GlcA durch Kopplung des UGDH-Moduls mit dem SuSy- und UMPK-Modul (Modul A + Modul B + Modul C) im analytischen Maßstab (1 mL)

Volumen [μ L]	Reagenz	Endkonzentration
25,0	2000 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 50 mM MgCl_2 , pH 7,8	50,00 mM
5,0	100 mM NAD^+	0,50 mM
50,0	100 mM DTT	5,00 mM
50,0	His ₆ NOX	2,50 U
150,0	2000 mM Saccharose	300,00 mM
150,0	His ₆ UGDH	2,00 U
60,0	100 mM PEP	6,00 mM
5,0	Pyruvatkinase (2 U/ μ L)	10,00 U
100,0	His ₆ UMPk	2,00 U
150,0	SuSy1	1,00 U
20,0	100 mM UMP	2,00 mM
2,5 bzw. 5,0 bzw. 10,0	100 mM ATP	0,20 mM, bzw. 0,50 mM bzw. 1,00 mM
ad 1000,0	H ₂ O	
1000,0	Gesamtvolumen	

3.10 Entwicklung und Optimierung von modularen Enzym-Kaskaden zur Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops

3.10.1 Ein-Topf Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops durch Kopplung des UGDH-Moduls mit dem GlcAT-Modul (Modul C + Modul D)

Für die Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops musste zunächst das Akzeptorsubstrat bereitgestellt werden. Alle in dieser Arbeit synthetisierten Glukuronide wurden ausgehend von der LacNAc-Linker-*t*-Boc-Struktur hergestellt. Die Produktion dieses Akzeptorsubstrates erfolgte nach *Rech et al.* (*Rech et al.* 2011) in einem 100-mL-Erlenmeyerkolben im präparativen Ansatz (Tabelle 45).

Tabelle 45: Syntheseansatz zur Herstellung von LacNAc-Linker-*t*-Boc im präparativen Maßstab (20 mL)

Volumen [mL]	Reagenz	Endkonzentration
2,0	1000 mM Hepes NaOH, 250 mM KCl, pH 7,2	100,00 mM
0,2	1000 mM UDP-Glc	10,00 mM
5,4	50 mU/mL β 4GalT1	0,27 U
2,0	28 U/mL UDP-Glukose Epimerase	56,00 U
10,0	10 mM GlcNAc-Linker- <i>t</i> -Boc	5,00 mM
0,4	100 mM MnCl ₂	2,00 mM
0,004	alkalische Phosphatase (1 U/ μ L)	4,00 U
20,0	Gesamtvolumen	

Die Synthese des Disaccharids fand bei 30°C und 60 Upm statt. Um den Syntheseverlauf mittels RP-HPLC Analytik (Kapitel 3.12.5.2) zu kontrollieren, wurden Proben (40 μ L) entnommen. Die enzymatische Reaktion wurde durch Erhitzen der Lösung auf 95°C gestoppt. Die Abtrennung der denaturierten Enzyme erfolgte über die Ultrafiltration. Das Filtrat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zur Syntheseoptimierung des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops wurden sowohl die Akzeptorkonzentration, die Konzentration der involvierten Enzyme als auch der Maßstab der Synthese verändert. Die ersten *in vitro* Synthesen wurden ausgehend von UDP-Glc mit einer Akzeptorkonzentration von 2 mM LacNAc-Linker-*t*-Boc gestartet und 1 U/mL His₆UGDH, 1,5 U/mL His₆NOX und 2 U/mL His₆catGlcAT-P an Enzymmenge eingesetzt (Tabelle 46). Die Einstellung der volumetrischen Aktivität der beteiligten Enzyme erfolgte über Vivaspin UF-Säulen (Sartorius, Göttingen). Die Inkubation des Ansatzes erfolgte in 1,5 mL Reaktionsgefäßen bei 30°C im Heizblock für 2 h. Der Syntheseverlauf wurde über CE-UV und RP-HPLC Analyse kontrolliert. Hierzu erfolgte die Abnahme eines Aliquots zu verschiedenen Zeitpunkten, die Denaturierung der Enzyme bei 95°C für 5 min und anschließende Lagerung bis zur Analyse bei -20°C.

Tabelle 46: Ein-Topf Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops mit 2 mM Akzeptor LacNAc-Linker-*t*-Boc (Modul C + Modul D) im analytischen Maßstab (1 mL)

Volumen [µL]	Reagenz	Endkonzentration
25,0	2000 mM Tris-HCl, pH 7,8	50,00 mM
5,0	100 mM NAD ⁺	0,50 mM
10,0	500 mM DTT	5,00 mM
30,0	100 mM UDP-Glc	3,00 mM
178,0	His ₆ UGDH	1,00 U
267,0	His ₆ NOX	1,50 U
356,0	His ₆ catGlcAT-P	2,00 U
50,0	40 mM LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc	2,00 mM
6,0	500 mM MnCl ₂	3,00 mM
2,0	alkalische Phosphatase (1U/µL)	2,00 U
ad 1000,0	H ₂ O	
1000,0	Gesamtvolumen	

In einem weiteren Schritt wurde die Akzeptorkonzentration auf 5 mM erhöht und die Enzymverhältnisse variiert. Dabei kamen jeweils gleiche Verhältnisse an Enzymaktivitäten von 0,5 U/mL bzw. 1 U/mL zum Einsatz. Die Enzymlösungen jeweils wurden auf 233 μ L mittels Vivaspin-UF (Sartorius, Göttingen) konzentriert. Der Syntheseansatz wurde nach Tabelle 47 zusammengesetzt und bei 30°C im Heizblock für 24 h inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben (40 μ L) entnommen und bei 95°C für 5 min inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Proben mittels CE-UV Analyse (Kapitel 3.12.4) und RP-HPLC Analyse (Kapitel 3.12.5.2) hinsichtlich der Produktbildung untersucht. Die Syntheseoptimierung wurde mit und ohne Zusatz von alkalischer Phosphatase durchgeführt.

Tabelle 47: Syntheseoptimierung des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops mit 5 mM LacNAc-Linker-*t*-Boc und 0,5 U bzw. 1,0 U der involvierten Enzyme (Modul C + Modul D) im analytischen Maßstab (1 mL)

Volumen [μ L]	Reagenz	Endkonzentration
25,0	2000 mM Tris-HCl, pH 7,8	50,00 mM
5,0	100 mM NAD ⁺	0,50 mM
10,0	500 mM DTT	5,00 mM
60,0	100 mM UDP-Glc	6,00 mM
233,0	His ₆ UGDH	0,50 bzw. 1,00 U
233,0	His ₆ NOX	0,50 bzw. 1,00 U
233,0	His ₆ catGlcAT-P	0,50 bzw 1,00 U
135,0	37 mM LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc	5,00 mM
12,0	500 mM MnCl ₂	6,00 mM
2,0	0 U bzw. 2 U alkalische Phosphatase	
ad 1000,0	H ₂ O	
1000,0	Gesamtvolumen	

Zur semipräparativen Synthese erfolgte eine Maßstabsvergrößerung im 5 mL Ansatz. Hierbei wurde der Reaktionsansatz nach Tabelle 48 im Rollrandglas zusammengesetzt und bei 30°C 24 h inkubiert. Die Enzymlösungen wurden jeweils auf 1250 μ L konzentriert. Die Kontrolle des Syntheseverlaufes erfolgte analog der analytischen Synthese.

Tabelle 48: Ein-Topf Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops mit 5 mM LacNAc-Linker-*t*-Boc und 0,5 U der involvierten Enzyme (Modul C + Modul D) im semipräparativen Maßstab (5 mL)

Volumen [μ L]	Reagenz	Endkonzentration
125,0	2000 mM Tris-HCl, pH 7,8	50,00 mM
25,0	100 mM NAD ⁺	0,50 mM
50,0	500 mM DTT	5,00 mM
301,2	100 mM UDP-Glc	6,00 mM
1250,0	0,5 His ₆ UGDH	2,50 U
1250,0	0,5 His ₆ NOX	2,50 U
1250,0	0,5 His ₆ catGlcAT-P	2,50 U
675,6	37 mM LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc	5,00 mM
60,0	500 mM MnCl ₂	6,00 mM
ad 5000,0	H ₂ O	
5000,0	Gesamtvolumen	

3.10.2 Ein-Topf Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops durch Kopplung des SuSy-Moduls mit dem UGDH- und GlcAT-Modul (Modul B + Modul C + Modul D)

Die zusätzliche Kopplung des UGDH- und GlcAT-Moduls mit dem SuSy-Modul ermöglicht die Regeneration von UDP und UDP-GlcA unter Verwendung von katalytischen Mengen UDP (Abbildung 14). Die Funktionalität der kombinierten Enzym-Module wurde zunächst im analytischen Maßstab überprüft. Dabei wurden 5 mM LacNAc-Linker-*t*-Boc, nur 0,2 mM UDP und jeweils 0,5 U/mL His₆UGDH, His₆NOX, His₆catGlcAT-P eingesetzt. Im Gegensatz dazu wurden für eine kosteneffektive Synthesestrategie nur 0,25 U/mL an SuSy1 verwendet. Die Enzymlösungen mit den jeweils entsprechenden volumetrischen Aktivitäten wurden auf 150 μ L mittels Vivaspin–Ultrafiltrationseinheit konzentriert. Der Synthesansatz wurde nach dem Pipettierschema der Tabelle 49 zusammengesetzt. Die Versuchsdurchführung und Analyse erfolgte nach Kapitel 3.12.5.2.

Tabelle 49: Ein-Topf Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops mit 5 mM LacNAc-Linker-*t*-Boc (Modul B + Modul C + Modul D) im analytischen Maßstab (1 mL)

Volumen [μ L]	Reagenz	Endkonzentration
25,0	2000 mM Tris-HCl, pH 7,8	50,00 mM
5,0	100 mM NAD ⁺	0,50 mM
10,0	500 mM DTT	5,00 mM
10,0	20 mM UDP	0,20 mM
150,0	2000 mM Saccharose	300,00 mM
150,0	0,5 U/mL His ₆ UGDH	0,50 U
150,0	0,5 U/mL His ₆ NOX	0,50 U
150,0	0,5 U/mL His ₆ catGlcAT-P	0,50 U
150,0	0,25 U/mL SuSy1	0,25 U
135,0	37 mM LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc	5,00 mM
10,0	500 mM MnCl ₂	1,00 mM
ad 1000,0	H ₂ O	
1000,0	Gesamtvolumen	

Zur Maßstabsvergrößerung erfolgte eine semipräparative Synthese im 5 mL Ansatz. Hierbei wurden die Versuchsparmeter des analytischen Ansatzes übernommen und die Enzymlösungen jeweils auf 750 μ L eingengt. Der Ansatz wurde nach Tabelle 50 im Rollrandglas vorbereitet und 24 h bei 30°C inkubiert. Die Versuchsdurchführung und Analyse erfolgte nach Kapitel 3.12.5.2.

Tabelle 50: Ein-Topf Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops mit 5 mM LacNAc-Linker-*t*-Boc (Modul B + Modul C + Modul D) im semipräparativen Maßstab (5 mL)

Volumen [μ L]	Reagenz	Endkonzentration
125,0	2000 mM Tris-HCl, pH 7,8	50,00 mM
25,0	100 mM NAD ⁺	0,50 mM
50,0	500 mM DTT	5,00 mM
50,0	20 mM UDP	0,20 mM
750,0	2000 mM Saccharose	300,00 mM
750,0	0,5 U/mL His ₆ UGDH	2,50 U
750,0	0,5 U/mL His ₆ NOX	2,50 U
750,0	0,5 U/mL His ₆ catGlcAT-P	2,50 U
750,0	0,25 U/mL SuSy1	1,25 U
675,0	37 mM LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc	5,00 mM
50,0	500 mM MnCl ₂	1,00 mM
ad 5000,0	H ₂ O	
5000,0	Gesamtvolumen	

3.10.3 Bestimmung der β -Galaktosidase-Nebenaktivität

Für das Kontrollexperiment wurden die unterschiedlichen Enzympräparationen nach Tabelle 51 zusammengesetzt und 24 h bei 30°C inkubiert. Eine Probe ohne Enzym diene als Negativkontrolle. Direkt nach Zugabe der Enzymlösungen und nach 24 h wurden Proben von 20 μ L entnommen und bei 95°C für 5 min inkubiert, und mittels RP-HPLC Analyse (Kapitel 3.12.5.2) untersucht.

Tabelle 51: Kontrollexperiment zur Untersuchung der β -Galaktosidase-Nebenaktivität

Volumen [μ L]	Reagenz	Endkonzentration
10,0	1000 mM Tris-HCl, pH 7,8	50,00 mM
25,0	10 mM LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc	2,00 mM
200,0	Enzymlösung	0,50 U SuSy1 bzw. His ₆ NOX bzw. His ₆ UGDH bzw. His ₆ catGlcAT-P
65,0	H ₂ O	
200,0	Gesamtvolumen	

3.11 Entwicklung und Optimierung einer modularen Enzym-Kaskade zur Synthese des Glykanepitops 2'-Fukosyllaktose

3.11.1 Sequentielle Enzymkaskade zur Synthese von 2'-Fukosyllaktose im klassischen Zwei-Stufen Modus (Modul E + Modul F)

3.11.1.1 Semipräparative Synthese von GDP-Fuc mit dem FKP-Modul (Modul E)

Die semipräparative Synthese wurde mit dem FKP-Modul (Modul E, Abbildung 15) im 10 mL Batch-Verfahren für 3 h Stunden bei 37°C in einem sterilen 15 mL Reaktionsgefäß gestartet (Tabelle 52).

Tabelle 52: Synthese von GDP-Fuc (Modul E) im semipräparativen Maßstab (10 mL)

Volumen [μ L]	Reagenz	Endkonzentration
500,0	1 M Tris-HCl, pH 7,6	50,00 mM
1000,0	100 mM ATP	10,00 mM
1000,0	100 mM GTP	10,00 mM
800,0	100 mM $MgCl_2$	8,00 mM
1000,0	100 mM L-Fuc	10,00 mM
10,0	1 U/ μ L anorganische Pyrophosphatase	10,00 U
2000,0	His ₆ PropFKP	2,00 U
ad 10000,0	H ₂ O	
10000,0	Gesamtvolumen	

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Proben von 30 μ L entnommen, denaturiert bei 95°C für 5 min, zentrifugiert und analysiert mittels CE-UV Analyse (Kapitel 3.12.4). Bei nahezu 100% Umsatz wurde die Reaktionsmischung mit 10 U alkalischer Phosphatase (Fast AP, Fermentas; Vilnius, Litauen) für 3 h bei 30°C inkubiert, um die entstandenen Nukleotide zu spalten. Die Abtrennung aller noch enthaltenen Enzyme erfolgte durch Denaturierung für 5 min bei 95°C und anschließender Zentrifugation. Für die Isolation der GDP-Fuc aus dem Syntheseansatz wurde die Gelchromatografie verwendet. Zur Volumenreduktion wurde die

Lösung mit einem Rotationsverdampfer (Heidolph VV1 mit Vacuubrand MD4C-Pumpeneinheit) bei Raumtemperatur auf ein Volumen von 2 mL aufkonzentriert und zur Aufreinigung auf eine Biogel-P2 Gelchromatografie Säule (1,6×90 cm) von BioRad, (München, Deutschland) injiziert. Biogel-P Gele bestehen aus einer porösen kopolymerisierten Gelmatrix aus Polyacrylamide und *N,N'*-Methylen-bis-Acrylamid. Das P2-Material eignet sich zur Trennung von Kohlenhydraten, kleineren Peptiden und zur Entsalzung. Der Trennungsbereich liegt bei einem Molekulargewicht von 100-1800 Da. Milli Q H₂O mit einer Flussrate von 0,1 mL/min (Pumpe in ÄktaPrime Anlage) diente als Elutionsmittel. Dabei wurden Fraktionen von 0,5 mL gesammelt und anschließend mit der CE-UV Analyse analysiert. Fraktionen, die das Zielprodukt enthielten wurden gepoolt und mittels Speed-VAC aufkonzentriert. Das konzentrierte Produkt wurde mithilfe der Massenspektrometrie (Kapitel 3.12.7) charakterisiert.

3.11.1.2 Semipäparative Synthese von 2'-Fukosyllaktose mit dem FucT-Modul (Modul F)

Im FucT Modul (Modul F, Abbildung 15) wurde die Synthese von 2'-FL mit dem in Kapitel 3.11.1.1 isolierten Nukleotidzucker durchgeführt. Die Synthese erfolgte im 10 mL Maßstab für 26 h bei 27°C in einem sterilem 15 mL Reaktionsgefäß (Tabelle 53).

Tabelle 53: Synthese von 2'-FL (Modul F) im semipräparativen Maßstab (10 mL)

Volumen [µL]	Reagenz	Endkonzentration
500,0	1 M Tris-HCl, pH 7,6	50,00 mM
100,0	800 mM Laktose	8,00 mM
1063	40 mM GDP-Fuc	4,25 mM
5,0	1 U/µL alkalische Phosphatase	5,00 U
100,0	100 mM DTT	1,00 mM
200,0	100 mM MnCl ₂	2,00 mM
3400,0	His ₆ PropWbgL	2,00 U
ad 10000,0	H ₂ O	
10000,0	Gesamtvolumen	

Nach vollständigem Umsatz von GDP-Fuc, überprüft durch CE-UV Analytik, wurden die Enzyme für 5 min bei 95°C denaturiert und durch Zentrifugation entfernt. Die Isolation des

Trisaccharids aus dem Reaktionsgemisch erfolgte analog den Parametern nach Kapitel 3.11.1.1. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels HPAEC-PAD Analyse (Kapitel 3.12.6) auf das Vorhandensein von 2'-FL überprüft. Anschließend wurden Fraktionen mit 2'-FL zusammengeführt und durch Evaporation zur späteren Produktcharakterisierung für die Massenspektrometrie (Kapitel 3.12.7) und NMR Analyse (Kapitel 3.12.8) getrocknet.

3.11.2 Sequentielle Synthese von 2'-Fukosyllaktose mit dem FKP- und FucT-Modul in einem Topf (Modul E + Modul F)

Eine alternative Methode zur sequentiellen Synthese im klassischen Zwei-Stufen Modus stellt die Zwei-Stufen-Synthese von 2'-FL durch Kopplung des FKP-Moduls mit dem FucT-Modul in einem Topf dar. Dabei wurde in der ersten Stufe im analytischen Maßstab (700 µL) GDP-Fuc für 3 h bei 37°C (Tabelle 54) synthetisiert.

Tabelle 54: Synthese von 2'-FL (Modul E + Modul F/Sequentieller Modus/1. Stufe) im analytischen Maßstab (700 µL)

Volumen [µL]	Reagenz	Endkonzentration
35,0	1 M Tris-HCl, pH 7,6	50,00 mM
35,0	100 mM ATP	5,00 mM
35,0	100 mM GTP	5,00 mM
56,0	100 mM MgCl ₂	8,00 mM
35,0	100 mM L-Fuc	5,00 mM
10,0	anorganische Pyrophosphatase	10,00 U
190,0	His ₆ PropFKP	1,00 U
ad 700,0	H ₂ O	
700,0	Gesamtvolumen	

Nach Synthesestart wurden Proben von 20 µL zu unterschiedlichen Zeitpunkten genommen und mittels CE-UV Analyse, wie zuvor in Kapitel 3.11.1.1 beschrieben, untersucht. Nach 4 h Reaktionszeit wurde die Reaktionsmischung mit 10 U alkalischer Phosphatase (Fast AP, Fermentas) versetzt und für 3 h bei 30°C inkubiert. Zur Denaturierung der Enzyme wurde die Reaktionslösung für 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend fand die Konzentrationsbestimmung von GDP-Fuc mithilfe einer Kalibriergeraden kommerzieller

GDP-Fuc im abzentrifugierten Überstand mittels CE-UV Analytik (Kapitel 3.12.4) statt. Die zweite Stufe beinhaltete die Synthese von 2'-FL ohne vorherige Aufreinigung des Nukleotidzuckers nach Tabelle 55 für 22 h bei 27°C. Zur Ermittlung der Konzentration von 2'-FL wurden Proben von 50 µL zu unterschiedlichen Zeitpunkten genommen und nach Kapitel 3.11.1.2 analysiert.

Tabelle 55: Synthese von 2'-FL (Modul E + Modul F/Sequentieller Modus/2. Stufe) im analytischen Maßstab (700 µL)

Volumen [µL]	Reagenz	Endkonzentration
566,0	Reaktionsmischung 1. Stufe, pH 7,6 mit 4,3 mM GDP-Fuc	50 mM Tris-HCl
28,0	200 mM Laktose	8,00 mM
5,0	1 U/µL alkalische Phosphatase	5,00U
7,0	100 mM DTT	1,00 mM
94,0	His ₆ PropWbgL	2,00 U
700,0	Gesamtvolumen	

3.12 Analytik

3.12.1 Proteingehaltsbestimmung nach Bradford

Die Proteingehaltsbestimmung der Proben erfolgte mit dem kolometrischen Test von Bradford (Bradford 1976). Durch Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliantblau G250 (Roth, Karlsruhe, Deutschland) an Histidin- und Argininresten sowie an Resten von aromatischen Aminosäuren werden blaue Farbkomplexe gebildet. Somit erfolgt eine Veränderung im Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm (protonierte braunrote kationische Form) zu 595 nm (unprotonierte blaue anionische Form). In der vorliegenden Arbeit wurde die Proteingehaltsbestimmung am Mikrotiterplattenfotometer SpectraMax Plus (Molecular Devices GmbH, Biberach) durchgeführt. Zur Vorbereitung werden 2 Teile Bradford-Stammlösung mit 5,5 Teilen H₂O versetzt. Dazu wurden 25 µL der zu untersuchenden Proben mit 100 µL Bradford-Reagenz versetzt, exakt 7 min inkubiert und anschließend am Fotometer gemessen. Die Kalibriergerade wurde mithilfe von BSA Eichlösungen (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in einem Bereich von 0-100 µg/mL Proteingehalt erstellt. Für quantitative Bestimmungen sollten die Extinktionswerte innerhalb der Eichgeraden liegen, dies erfordert eine weitere Verdünnung der Proben mit H₂O. Die Auswertung der Proben im dreifachen Ansatz erfolgte mit der SoftMax Pro 4.0 Software.

3.12.2 Proteinanalyse mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die Kontrolle der Proteinexpression, die Reinheitskontrolle von Proteinpräparationen und die Ermittlung der Molmasse der jeweiligen Protein-Monomere. In der vorliegenden Arbeit wurden die Polyacrylamidgele des NuPAGE-Systems von Invitrogen (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Herstellung der Gele erfolgte nach dem Protokoll von Invitrogen. Für die Herstellung des Trenngels werden die einzelnen Komponenten nach Vorschrift (Tabelle 56) gemischt. Die Polymerisation startet durch Zugabe der APS-Lösung. Im Anschluss daran erfolgt das Gießen des Gels in kommerziell erhältlichen Kassetten von Invitrogen. Nach Aushärten des Trenngels kann das Gießen des Sammelgels (Tabelle 57) und das Einfügen des Probenkamms erfolgen.

Tabelle 56: Vorschrift zur Herstellung des 10%-igen Trenngels

Reagenz	Volumen
30% Acrylamid (Roth)	8,3 mL
Trenngelpuffer 1 M Tris-HCl, pH 8,8 (Roth)	9,4 mL
Natriumdodecylsulfat (SDS 10%) (Roth)	250 µL
H ₂ O	6,5 mL
Temed Fertiglösung (Roth)	6,25 µL
Ammoniumpersulfat (50 mg/mL)	625 µL

Tabelle 57: Vorschrift zur Herstellung des 4%-igen Sammelgels

Reagenz	Volumen
30% Acrylamid (Roth)	1,7 mL
Sammelgelpuffer 375 mM Tris-HCl, pH 6,8 (Roth)	9,4 mL
Natriumdodecylsulfat (SDS 10%) (Roth)	125 µL
H ₂ O	6,5 mL
Temed Fertiglösung (Roth)	5 µL
Ammoniumpersulfat (50 mg/mL)	1 mL

Die Proteinproben wurden wie in Tabelle 58 beschrieben vorbehandelt und anschließend in die vorgegebenen Geltaschen der hergestellten SDS-Gele pipettiert. Der Gellauf betrug 1 h bei 200 V in SDS Laufpuffer. Anschließend folgte eine Anfärbung der Gele mit Coomassie Brilliant Blue R250. Für die Coomassie Färbung wurde das Gel dreimal 5 min mit Wasser gewaschen und anschließend 1 h in der Färbelösung inkubiert. Abschließend erfolgte die Entfärbung des Gels mittels 0,5 M NaCl über Nacht. Die Größenbestimmung der Proteine wurde über den Größenstandard PageRuler™ Prestained Protein (Fermentas; Vilnius, Litauen) vorgenommen.

Tabelle 58: Probenvorbereitung für die SDS-PAGE Analyse

Reagenz	Volumen
40 µg Protein in wässriger Lösung	39 µL
LDS-Probenpuffer (4x) von Invitrogen	6 µL
0,5 M DTT	5 µL
Inkubation für 10 min bei 70°C	

3.12.3 Proteinanalyse mittels Western Blot

Alternativ zu Färbungen der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine im Gel können diese Moleküle auf der Oberfläche von Membranen (PVDF oder Nitrocellulose) immobilisiert werden und durch Adsorption von hochmolekularen Liganden, z. B. Antikörper, visualisiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die untersuchten Proteinproben nach der SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran (Roth, Karlsruhe/BIORAD, München) immobilisiert. Vor dem Blot wurde die PVDF-Membran für 60 s in 100% Methanol und anschließend für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Der Blot erfolgte für 70 min bei 30 V und Raumtemperatur in Transfer-Puffer in einer XCell II Blot Kammer (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland). Anschließend wurde die Blotmembran 3 min in H₂O gewaschen und anschließend 1 h in eine 2%-ige BSA Lösung überführt. Zur Detektion der His₆-markierten Proteine erfolgte die Inkubation der Membran in einer Antikörperlösung mit Anti-His₆-Antikörper-HRP-Konjugat (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland). Danach wurde die Membran dreimal für 5 min in PBST Puffer gewaschen. Zur Detektion der Proteinbanden wurde die Membran ca. 2 min bis zur Visualisierung der Banden in einer DAB-Lösung inkubiert (1 mL DAB in 9 mL Peroxid-Puffer; Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland). Zum Stoppen der Reaktion wurde die Membran in ca. 0,5 L H₂O überführt.

3.12.4 Kapillarelektrophorese

Mithilfe der Kapillarelektrophorese (CE-UV) können Nukleoside, Nukleotide und nukleotidaktivierte Zucker in einem dünnen Kapillarrohr in einer Elektrolytlösung elektrophoretisch getrennt werden. Die Trennung der Analyten ist sowohl von der elektrophoretischen Geschwindigkeit als auch von dem elektroosmotischen Fluss (EOF) abhängig. Die Stärke des EOF hängt vom pH-Wert des Elektrolyten und von der Ladung in der Nähe der Kapillaroberfläche ab. Der EOF ist als Grenzflächeninteraktion zwischen Kapillarinnenwand und der Elektrolytlösung bei Anlegung von Spannung zu verstehen. Unter dem Einfluss des EOF wandern Kationen, neutrale Verbindungen und Anionen mit unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeit je nach elektrophoretischer Mobilität zur Kathode. Anhand von kommerziellen Standards kann die Zuordnung der Analyten über spezifische Migrationszeiten erfolgen. Die Quantifizierung der Komponenten erfolgte unter Verwendung von Kalibriergeraden (Peakfläche/Konzentration) im Bereich von 0,1-2 mM. Zur Bestimmung der Nukleotide und Nukleotidzucker wurde ein P/ACE-UV MDQ Carbohydrate Kapillarelektrophoresesystem der Firma Beckman Coulter (Krefeld, Germany) verwendet, das mit einem UV Detektor ausgestattet ist. Die Separation der Analyten wurde durchgeführt mit einer „fused-Silika Kapillare“ (Innendurchmesser: 75 µm; Gesamtkapillarlänge: 57 cm, effektive Kapillarlänge: 50 cm) in 50 mM Boratpuffer Puffer (50 mM Natriumborat, 64 mM Borsäure, pH 9,0). Für die Migrations- und Detektionsbedingungen wurden 25 kV (23 mA) bei 25°C UV und 254 nm ausgewählt. Die Probeninjektion erfolgte bei einem Druck von 0,5 psi für 10 s.

3.12.5 Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC)

In dieser Arbeit wurden für die Flüssigkeitschromatografie sowohl Normalphasen Verfahren (NP, normal phase) als auch Umkehrphasen Verfahren (RP, reversed phase) zur Auftrennung von Nukleotiden, Nukleotidzucker und Glykokonjugaten verwendet.

3.12.5.1 Hydrophile Interaktionschromatografie (HILIC)

Die hydrophile Interaktionschromatografie stellt ein Normalphasen Verfahren dar zur Trennung von polaren und relativ unpolaren Verbindungen. Hierbei wird eine polare Säulenmatrix als stationäre Phase und ein wässrig-organisches Lösungsmittel als mobile Phase verwendet (Jandera 2011). Der Puffer besteht üblicherweise aus über 70% AcN. Die stärkste Elutionskraft besitzt Wasser (Boersema *et al.* 2008).

HPLC Analyse zur Detektion und Trennung von UDP-GlcA im analytischen Maßstab

Die Separation und Detektion von UDP-GlcA im analytischen Maßstab wurde auf einer HPLC Anlage von Dionex (Sunnyvale, CA, USA; Software: Chromeleon 6.0) mit einer Hypersil APS2-3 μ Säule (100x3 mm) von ThermoQuest (Biberach, Deutschland) durchgeführt. Nach Injektion von 10 μ L der Reaktionsansätze auf die Trennsäule erfolgte die Elution mit 75% Acetonitril und 8% 400 mM $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ (pH 4,5) bei einer Flussrate von 0,5 mL/min. Das Elutionsprofil wurde mit einer Probe von 2 mM kommerziell erhältlicher UDP-GlcA verglichen. Die gesammelte Fraktion mit dem Zielprodukt wurde für die spätere MS Messung bei -20°C aufbewahrt.

HPLC Analyse zur Detektion und Trennung von UDP-GlcA im präparativen Maßstab

Die Produktisolation von UDP-GlcA aus dem Syntheseansatz wurde mit einer HPLC Anlage von Knauer (Germany, Software: EZChrom Elite) unter Verwendung einer Multospher APS-HP-5 μ 250x3 mm Säule (CS Chromatografie, Langerwehe, Germany) durchgeführt. Als mobile Phase diente ein Gradient von 100% Laufmittel A (MilliQ H_2O) bis 100% Laufmittel B (0,4 M $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ pH 6,7) bei einer Flussrate von 5 mL/min. Gesammelte Proben mit dem Zielprodukt wurden mit einem Konzentrator Plus von Eppendorf (Hamburg, Deutschland) aufkonzentriert und bis zur späteren Charakterisierung bei -20°C aufbewahrt.

3.12.5.2 Reversed Phase Chromatografie

HPLC Analyse zur Detektion und Trennung von *t*-Boc-Zuckern im analytischen Maßstab

Zur Analyse der hydrophoben *t*-Boc-Zucker, GlcA-LacNAc-Linker-*t*-Boc und LacNAc-Linker-*t*-Boc, wurden 20 µL Probe mittels der LiChrospher 100 RP 18-5µ Säule (Merck, Darmstadt, Deutschland) bei einer Flussrate von 1 mL/min isokratisch (15% AcN; 0,1% Ameisensäure, pH 2,5) auf der HPLC Anlage von Dionex (Sunnyvale, CA, USA; Software: Chromeleon 6.0) aufgetrennt (Rech *et al.* 2011). Die Einstellung des pH-Wertes ist bei der Trennung des Trisaccharids und Disaccharids von entscheidender Bedeutung. Bei einem pH-Wert unterhalb 3,18 liegt die Carboxylgruppe der endständigen Glukuronsäure protoniert vor. Dementsprechend wird sich der Elutionspeak des Trisaccharids zu früheren Retentionszeiten hin verschieben. Zwecks Quantifizierung der gewonnenen Produkte wurde eine Kalibriergerade mit dem Akzeptor GlcNAc-Linker-*t*-Boc erstellt.

HPLC Analyse zur Detektion und Trennung von *t*-Boc-Zuckern im präparativen Maßstab

Zur Produktisolation der *t*-Boc-Zucker GlcA-LacNAc-Linker-*t*-Boc und LacNAc-Linker-*t*-Boc, kann die Eurospher 100-10 C18-Säule (250x20 mm) verwendet werden (Rech *et al.* 2011). Die Flussrate für das isokratische Laufmittel (15% AcN für LacNAc-Linker-*t*-Boc; 15% AcN und 0,1% Ameisensäure für GlcA-LacNAc-Linker-*t*-Boc) betrug auf der präparativen HPLC Knauer Anlage (Berlin, Deutschland; Software: EZChrom Elite) 12,5 mL/min. Gesammelte Proben, die das Zielprodukt enthielten, wurden mit einem Konzentrador Plus von Eppendorf (Hamburg, Deutschland) aufkonzentriert und bis zur späteren Charakterisierung bei -20°C aufbewahrt.

3.12.6 HPAEC-PAD Analyse (High pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection)

Die HPAEC-PAD Analyse stellt ein Verfahren dar, Mono-, Oligo- und Polysaccharide eines Glykanpools unter alkalischen Bedingungen zu trennen. Bei den sehr hohen pH-Werten liegen die Zuckerstrukturen als anionische Alkoholate vor, die mit der Anionenaustauschermatrix interagieren. Die Analyse der Glykanstrukturen erfolgt über gepulste amperometrische Detektion PAD an einer Goldelektrode, nach Oxidation der betreffenden Zuckerstrukturen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine HPAEC-PAD-Anlage von Dionex (Sunnyvale, CA, USA; Software: Chromeleon™ Version 6.40) benutzt. Als Säule diente eine CarboPac™ PA1 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA), deren Matrix Aminopropylsilicagel trägt. Die Elution des Disaccharids (Laktose) und des fukosylierten Trisaccharids 2'-FL wurde mit 50 mM NaOH bei 30 °C (Flußrate 1 mL/min, 50 µL Injektionsvolumen) durchgeführt. Die Konzentration der Oligosaccharide wurde mit der jeweiligen Kalibriergeraden (Peakfläche/Konzentration) kommerziell erhältlicher Saccharide bestimmt.

3.12.7 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Um die Integrität der gereinigten Syntheseprodukte, UDP-GlcA, GDP-Fuc, 2'-FL und GlcA-LacNAc-Linker-*t*-Boc, zu bestätigen, wurde die Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (Thermo Finnigan Surveyor MSQ™, Software: Chromeleon 6.0) angewendet. Hierbei werden die Analyten mittels Elektrospray im elektrischen Feld unter Benutzung folgender Parameter ionisiert: Negativer Ionisationsmodus bei 400°C; Nadelspannung: 4,5 kV und Düsenspannung: 100 kV. Einspritzvolumen: 10 µL (Endkonzentration 0,1 mM). Die Probenlösungen wurden auf eine Multospher 120 RP 18 HP-3 µ (60 × 2 mm) mit einer Flussrate von 0,2 mL/min bei einer Laufzeit von 10 min injiziert. Das Laufmittel bestand aus 50% (V/V) Acetonitril in Millipore-Wasser. Die Analyten werden entsprechend ihrem Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) aufgetrennt.

3.12.8 NMR-Analyse

Bei der magnetischen Resonanzspektroskopie (NMR, *nuclear magnetic resonance*) werden Spektren von magnetisch aktiven Kernen (^1H , ^2H , ^{13}C) in einem angelegten Magnetfeld aufgenommen. Diese spektroskopische Methode dient vor allem der Strukturaufklärung von Molekülen. Die ^1H -Spektren wurden mit freundlicher Unterstützung von M.Sc. R. Rosencrantz analysiert. Die Messung erfolgte über das Bruker AV400 Ultra Shield Spektrometer in D_2O (400 MHz, 30°C) in der Arbeitsgruppe von Dr. A. Kühne (Prof. Dr. M. Möller, DWI am ITMC an der RWTH Aachen). Die chemischen Verschiebungen sind in δ -Scale [ppm] und Bindungskonstanten in Hz angegeben. Durch digitale Auflösung war es möglich, die chemischen *shifts* der Protonen und der Kohlenstoffe mit zwei Dezimalstellen zu präsentieren.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Bereitstellung von Enzymen für die Enzym-Module zur Synthese von UDP-GlcA

4.1.1 Klonierung und Expression von *ugdhis*₆ aus *E. coli* K12

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war aufgrund der sehr guten Verfügbarkeit des nicht pathogenen *E. coli* K12 Stammes die Klonierung des UDP-Glukose-Dehydrogenase kodierenden Gens *ugd* (UniProtKB/Swiss-Prot/acession number: P76373) von Interesse. In vorangegangenen Arbeiten wurde eine Aktivierung der Dehydrogenase durch eine *in vivo* Tyrosinphosphorylierung (Tyr-71) mittels Wzc oder Etk postuliert (Grangeasse *et al.* 2003, Lacour *et al.* 2008). Für das bevorstehende Projekt sollte zunächst die Aktivität der rekombinanten UGD nach Expression in *E. coli* BL21(DE3), einem Proteinkinase positiven Stamm, überprüft werden. Dehydrogenasen verfügen über ein charakteristisches N-terminales NAD⁺-Bindemotiv bestehend aus hoch konservierten Glycinresten (Feingold und Franzen 1981). Spicer *et al.* beschreiben die NAD⁺ bindende Konsensussequenz am N-terminalen Ende der humanen und murinen UGDH mit einem GXGXXG Motiv (Spicer *et al.* 1998). Das Alignment der Aminosäuresequenz der humanen UGDH und der UGD aus *E. coli* zeigt eine Übereinstimmung der NAD⁺-Bindemotive. Um die Bindung des Kofaktors NAD⁺ an das Enzym mit N-terminalem His₆-Tag nicht zu behindern, wurde zunächst ein Klonierungskonstrukt mit C-terminalem His₆-Tag geplant. Zur zytoplasmatischen Expression wurde die Sequenz *ugd*, die zuvor ausgehend von der genomischen DNA aus *E. coli* K12 amplifiziert wurde, in den Vektor pET28a über die Schnittstellen *NcoI* und *XhoI* kloniert (Kapitel 3.2.2.1). Nach dem die Sequenzierung die Integrität des Konstruktes bestätigte, wurde die Genexpression einschließlich des C-terminalen His₆-Tags unter der Kontrolle des T7-Promotors in *E. coli* BL21(DE3) induziert.

4.1.2 Aufreinigung der UGDHis₆ aus *E. coli* K12

Die Aufreinigung von 10 g *E. coli* BL21(DE3) Zellen über Ni²⁺-NTA Chromatografie ergab eine Gesamtausbeute von 0,15 U des rekombinanten Enzyms mit einer spezifischen Aktivität 20 mU/mg Protein (Tabelle 59). Die SDS-PAGE Analyse (Abbildung 38) bestätigte die erfolgreiche Aufreinigung und Expression des Fusionsproteins mit 45 kDa. Die spezifische Aktivität mit 20 mU/mg UGDHis₆ war jedoch für eine präparative Synthese von Glukuroniden und UDP-GlcA zu gering.

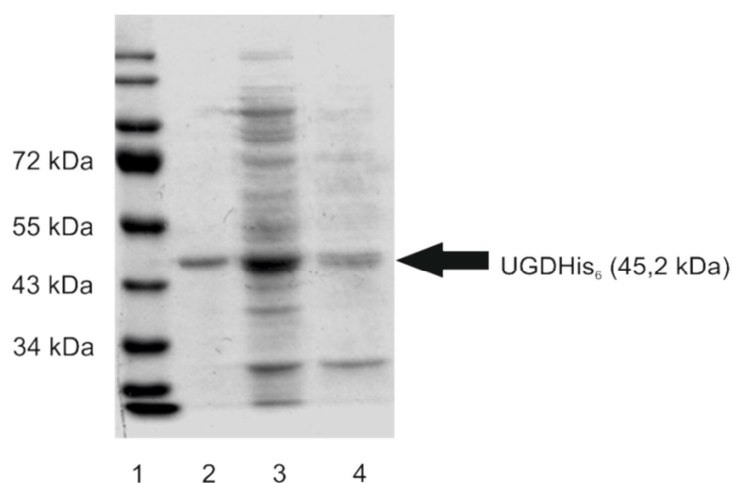


Abbildung 38: SDS-PAGE Analyse (Coomassie Färbung) der UGDHis₆ nach Aufreinigung mittels Ni²⁺-NTA Sepharose

Spur 1: Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas); Spur 2: IMAC-Pool, Spur 3: Rohextrakt; Spur 4: Zellpellet. Das detektierte Molekulargewicht entspricht dem theoretisch ermittelten von 45,2 kDa.

4.1.3 Klonierung und Expression von *his₆ugd* aus *E. coli* K12

Wegen der geringen Enzymaktivität von UGDHis₆ wurde in einem nächsten Schritt ein Fusionsprotein mit N-terminalem His₆-Tag anvisiert und die Gensequenz *ugd* mithilfe der Schnittstellen *NdeI* und *BamHI* in den Vektor pET16b kloniert (Kapitel 3.2.2.2). Dem erfolgreichen Sequenzierungsergebnis folgte die Expression in *E. coli* BL21(DE3).

4.1.4 Aufreinigung der His₆UGD aus *E. coli* K12

Die SDS-PAGE Analyse zeigt das Ergebnis der Aufreinigung mittels Ni²⁺-NTA Sepharose und untermauert die lösliche Expression der rekombinanten His₆UGD (Abbildung 39). Insgesamt wurden 0,43 U/10 g *E. coli* BL21(DE3) erzielt. Damit konnte die Ausbeute und die spezifische Aktivität von 0,04 U/mg für die His₆UGD nur geringfügig verbessert werden (Tabelle 59).

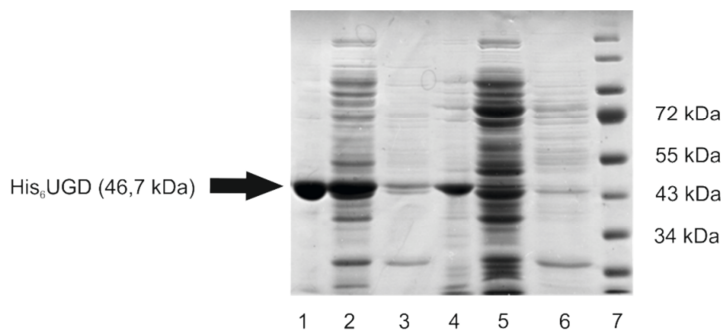


Abbildung 39: SDS-PAGE Analyse (Coomassie Färbung) der His₆UGD nach Aufreinigung mittels Ni²⁺-NTA Sepharose

Spur 1: IMAC-Pool; Spur 2: Rohextrakt; Spur 3: Waschfraktion; Spur 4: Zellpellet; Spur 5: Durchfluss; Spur 6: konzentrierte Waschfraktion; Spur 7: Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas). Das detektierte Molekulargewicht entspricht dem theoretisch ermittelten von 46,7 kDa.

Der Einsatz von His₆UGD in das Enzym-Modul-System schien aufgrund der geringen Effizienz nicht sinnvoll. Eine Aktivierung des Enzyms wurde aufgrund des ökonomischen Leitgedankens zu diesem Zeitpunkt nicht verfolgt. In einer kürzlich veröffentlichten Publikation wurde die postulierte Tyrosinphosphorylierung zur Aktivierung der UGD widerlegt (Mainprize *et al.* 2013). Als Grund für die geringe Enzymaktivität wird eine Substratinhibition durch NAD⁺ (K_{is} : 1,4 mM) angegeben. Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde im vorliegenden Fall 3 mM NAD⁺ eingesetzt. Die Aktivitätsmessung mit einer Konzentration von NAD⁺ unterhalb des K_{is} -Wertes wurde bisher nicht vorgenommen.

4.1.5 Klonierung und Expression von *his₆ugd_h1* aus *Arabidopsis thaliana*

Die publizierte UGDH1 aus *Glycine max* (UniProtKB/Swiss-Prot/acession number: Q96558) zeigt spezifische Aktivitäten von 1,4 U/mg (Hinterberg *et al.* 2002). Das Alignment der Aminosäuresequenz der UGDH1 (UniProtKB/Swiss-Prot/acession number: Q9FZE1) aus *Arabidopsis thaliana* zeigte eine Homologie von 91% zu der bereits untersuchten Dehydrogenase aus der Sojabohne (siehe Anhang, Abbildung 136) und bot daher eine interessante Alternative. Ausgehend von der cDNA aus Blättern von *Arabidopsis thaliana* erfolgte die Genamplifikation mittels RT-PCR und anschließend die Klonierung des Fusionsgens *his₆ugd_h* mithilfe der Schnittstellen *NdeI* und *BamHI* in den Vektor pET16b. Der erfolgreichen Klonierung, überprüft durch das Sequenzierungsergebnis, schloss sich die Expression in *E. coli* BL21(DE3) an.

4.1.6 Aufreinigung der His₆UGDH1 aus *Arabidopsis thaliana*

Die SDS-PAGE Analyse (Abbildung 40) bekräftigte die lösliche Expressionsstrategie des Fusionskonstruktes His₆UGHD1 (57 kDa). Die Überprüfung der Aktivität zeigte jedoch keine Verbesserung der spezifischen Aktivität der His₆UGDH1 (0,02 U/mg) gegenüber UGDHis₆ aus *E. coli* K12 (Tabelle 59). Gegenüber UGHDHis₆, die in *E. coli* Origami exprimiert wurde, erweist sich die hier gewählte Expressionsstrategie in *E. coli* BL21(DE3) jedoch erfolgreicher (Klinghammer und Tenhaken 2007). Dennoch eignete sich auch dieser Ansatz aufgrund der niedrigen Aktivität nicht für die geplanten Enzym-Modul-Systeme.

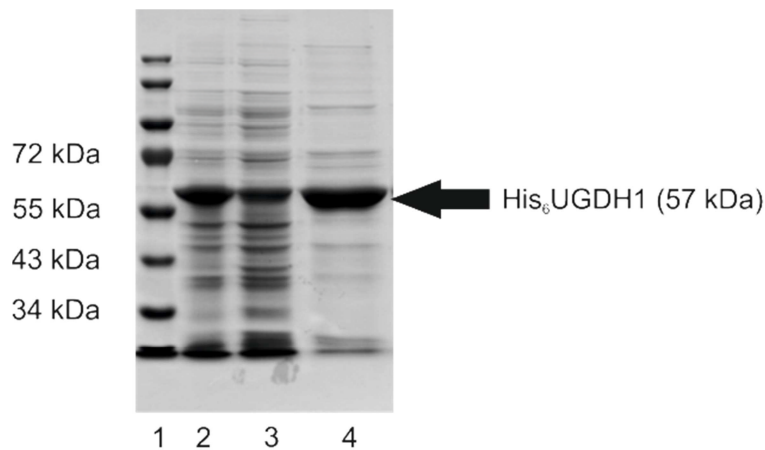


Abbildung 40: SDS-PAGE Analyse (Coomassie Färbung) der His₆UGDH1 nach Aufreinigung mittels Ni²⁺-NTA Sepharose

Spur 1: Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas); Spur 2: Rohextrakt; Spur 3: Zellpellet; Spur 4: IMAC-Pool. Das detektierte Molekulargewicht entspricht dem theoretisch ermittelten von 57 kDa.

4.1.7 Klonierung und Expression von *his₆ugdh* aus *Homo sapiens*

In einem weiteren Schritt wurde die in der Literatur (Sommer *et al.* 2004, Huh *et al.* 2005, Easley *et al.* 2007) bereits beschriebene eukaryontische humane UDP-Glukose-Dehydrogenase (UniProtKB/Swiss-Prot/acession number: O60701) untersucht. Hierbei erfolgte die Genamplifikation ausgehend von der cDNA aus Mesangialzellen der Niere. Bestätigt durch Sequenzierung gelang die Klonierung mit N-terminalem His₆-Tag in den Vektor pETDuet-1 über die Schnittstellen *Pst*I und *Not*I (Kapitel 3.2.4). Die Expression des Gens erfolgte anschließend in *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS.

4.1.8 Aufreinigung der His₆UGDH aus *Homo sapiens*

Nach Aufreinigung mittels Ni²⁺-NTA Sepharose zeigte die Western Blot Analyse eine gute lösliche Produktion des Zielproteins His₆UHDH (Abbildung 41) in *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS mit einem apparenten Molekulargewicht von 58 kDa, das der theoretischen Masse von 58,2 kDa entspricht. Die Überprüfung der Aktivität resultierte in ersten Versuchen zunächst in einer sehr zufriedenstellenden spezifischen Aktivität bis zu 0,5 U/mg His₆UGDH. Nach Expressionsoptimierung (Daten nicht gezeigt) durch Induktion mit 100 µM IPTG und einer Post-Induktionszeit von 18 h bei 25°C konnten 21 g *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS Zellen/L TB Medium geerntet werden. Die Aufreinigung von 10 g

E. coli Zellen mit Ni^{2+} -NTA Sepharose ergab 51 U des rekombinanten Enzyms mit einer spezifischen Aktivität von bis zu 0,98 U/mg Protein (Tabelle 59). Im Vergleich zu den bereits publizierten Daten resultierte unsere Expressionsstrategie in einer 7-8-fach höheren spezifischen Aktivität (Sommer *et al.* 2004, Huh *et al.* 2005). Darüber hinaus konnte unsere Ausbeute von ca. 109 mg aufgereinigtem Fusionsprotein His₆UGDH/L TB Medium im Gegensatz zu Easley *et al.* mit 30 mg pro Liter Zellkultur dreifach erhöht werden (Easley *et al.* 2007). Die sehr guten Expressionsergebnisse lieferten somit eine gute Voraussetzung für eine weitere Charakterisierung des Enzyms.

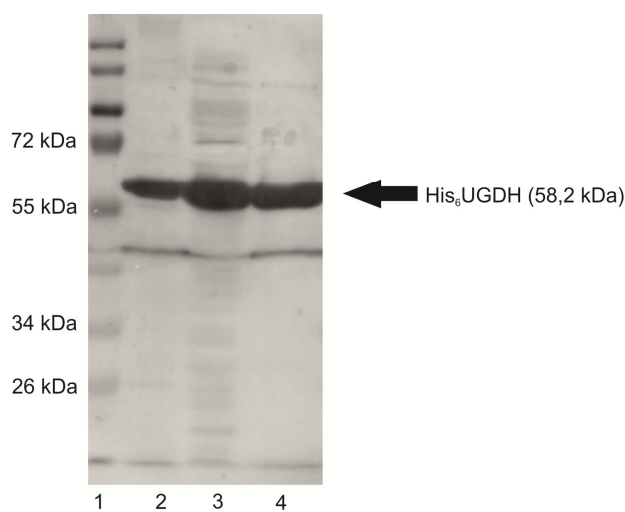


Abbildung 41: Western Blot Analyse der humanen His₆UGDH nach Aufreinigung mittels Ni^{2+} -NTA Sepharose

Spur 1: Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas); Spur 2: Zellpellet; Spur 3: Rohextrakt; Spur 4: IMAC-Pool. Das detektierte Molekulargewicht entspricht dem theoretisch ermittelten von 58,2 kDa.

4.1.9 Klonierung und Expression von *his₆kfiD* aus *E. coli* K5

Parallel zu den beschriebenen Untersuchungen der humanen UDP-Glukose-Dehydrogenase wurde die Klonierung und Expression des bakteriellen Gens *kfiD* aus *E. coli* K5 (UniProtKB/Swiss-Prot/accession number: Q47329) verfolgt, das bereits zur *in vivo* Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops in *E. coli* eingesetzt wurde (Yavuz *et al.* 2008). Der probiotische Stamm *E. coli* K5 (*Nissle Strain*) wurde von der Firma Ardeypharm (Herdecke, Deutschland) zur Isolation der genomischen DNA freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Nach Genamplifikation wurden die Schnittstellen *Pst*I und *Not*I zur Klonierung in den Vektor pETDuet-1 genutzt (Kapitel 3.2.5). Der Bestätigung der Integrität des Konstruktes folgte die

prokaryontische Expression des Fusionsproteins His₆KfiD in *E. coli* BL21(DE3). Die Induktion des T7-Promotors wurde mit einer Endkonzentration von 0,1 mM IPTG bei 25°C und einer Post-Induktionszeit von 18 h durchgeführt.

4.1.10 Aufreinigung der His₆KfiD aus *E. coli* K5

Die gewählten Expressionsbedingungen ergaben 32,2 U aufgereinigtes Protein/10 g *E. coli* BL21(DE3) Zellen. Die Proteinexpression, überprüft durch SDS-PAGE Analyse, zeigte eine erfolgreiche Produktion des Zielproteins mit einer Masse von 44 kDa (Abbildung 42). Aufgrund der erzielten Aktivität von 0,72 U/mg (Tabelle 59) schien sich His₆KfiD für eine weitere Charakterisierung zu eignen.

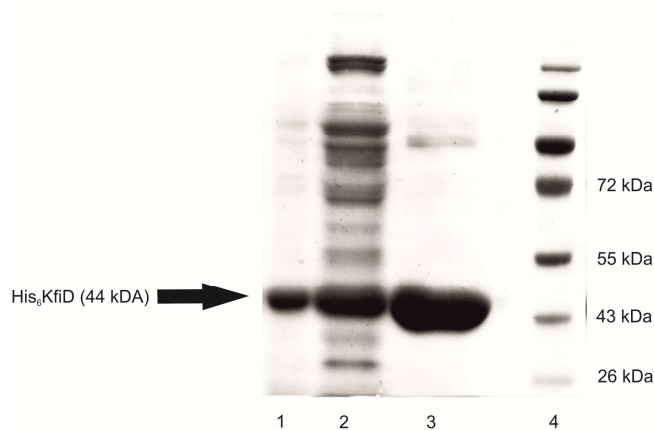


Abbildung 42: SDS-PAGE Analyse (Coomassie Färbung) der His₆KfiD nach Aufreinigung mittels Ni²⁺-NTA Sepharose

Spur 1: Zellpellet; Spur 2: Rohextrakt; Spur 3: IMAC-Pool; Spur 4: Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas). Das detektierte Molekulargewicht entspricht dem theoretisch ermittelten von 44 kDa.

Tabelle 59: Aufreinigung der UGDHis₆, His₆UGD, His₆UGDH1, His₆KfiD und His₆UGDH mittels Ni²⁺-NTA Sepharose

	Volumen [mL]	Gesamt- aktivität [U]	Gesamt protein [mg]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Aufreinigungs- faktor [-]	Aus- beute [%]
UGDHis ₆ (<i>E. coli</i> K12)	15	0,15	7,50	0,02	3,0	28
His ₆ UGD (<i>E. coli</i> K12)	18	0,43	10,81	0,04	2,8	38
His ₆ UGDH (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	16	0,18	8,80	0,02	2,5	23
His ₆ KfiD (<i>E. coli</i> K5)	15	32,18	45,00	0,72	5,8	67
His ₆ UGDH (<i>Homo sapiens</i>)	15	51,50	52,50	0,98	7,0	80

4.1.11 Biochemische Charakterisierung der His₆UGDH und His₆KfiD

Für die Optimierung von Ein-Topf Synthesen mit Enzym-Kaskaden ist eine umfassende biochemische Charakterisierung der involvierten Enzyme erforderlich. Für die humane UGDH lagen bis zu diesem Zeitpunkt nur teilweise Daten vor. Eine biochemische Charakterisierung der KfiD wurde bislang nicht durchgeführt.

In den verwendeten Untersuchungen zur Bestimmung der Enzymaktivität belegen His₆UGDH und His₆KfiD die Notwendigkeit reduzierender Bedingungen für freie Cystein Gruppen zur Oxidation von UDP-Glc. Dies unterstreicht die kritische Rolle der SH-Gruppe der Aminosäure Cystein276 im Katalysemechanismus der humanen His₆UGDH (Easley *et al.* 2007, Egger *et al.* 2011).

4.1.11.1 Bestimmung des Temperatur- und pH-Optimums

Die Lage des pH-Optimums eines Enzyms bezüglich der Enzymaktivität ist abhängig von der Temperatur und dem verwendeten Puffer. Dabei kann es hier zu Ladungsveränderungen von Substraten und funktionellen Gruppen des aktiven Zentrums aber auch von Nachbargruppen des aktiven Zentrums kommen. In diesen Untersuchungen zeigten beide rekombinante Dehydrogenasen für ihre enzymatische Aktivität ein Temperatur-Optimum von 30°C mit einer nachfolgenden Inaktivierung des Proteins bei Temperaturen oberhalb von 30°C (Abbildung 43).

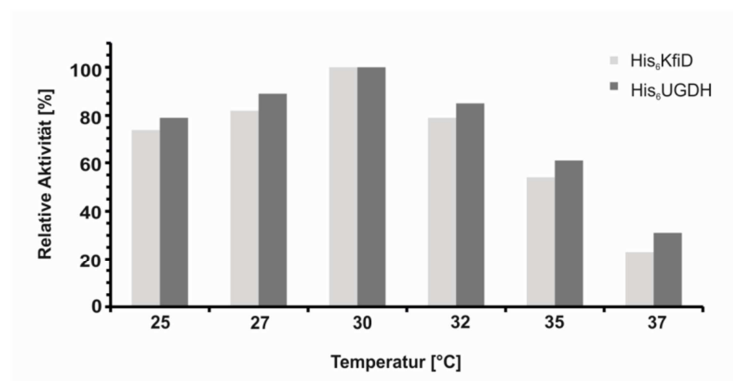


Abbildung 43: Bestimmung des Temperatur-Optimums der His₆UGDH und His₆KfiD

Beide Enzyme zeigen ein Temperatur-Optimum von 30°C. In 50 mM Tris-HCl (pH 8,7) entsprechen 100% relative Aktivität 0,80 U/mg für His₆UGDH, im Vergleich dazu konnten für His₆KfiD 100% relative Aktivität mit 0,57 U/mg in 50 mM Tris-HCl (pH 9,0) berechnet werden.

Die His₆UGDH und His₆KfiD reagieren sehr sensitiv auf pH-Veränderungen der verwendeten Puffer. In Tris-HCl Puffer (Abbildung 44) zeigt His₆KfiD die höchste Aktivität bei pH 9,0 (0,57 U/mg), wohin gegen das pH-Optimum von His₆UGDH bei pH 8,7 (0,80 U/mg) liegt.

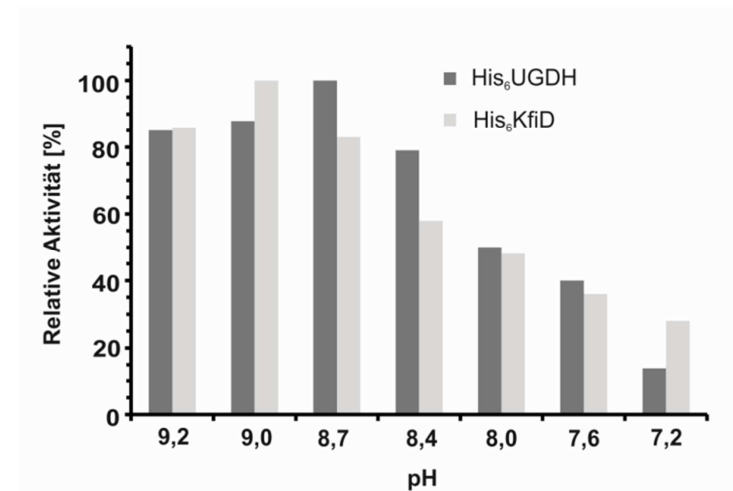


Abbildung 44: Bestimmung des pH-Optimums der His₆UGDH und His₆KfiD in 50 mM Tris-HCl

Die relative Aktivität wurde bestimmt in 50 mM Tris-HCl Puffer bei 30°C. His₆UGDH zeigt bei pH 8,7 100% Aktivität (0,80 U/mg) und His₆KfiD bei pH 9,0 100% relative Aktivität (0,57 U/mg).

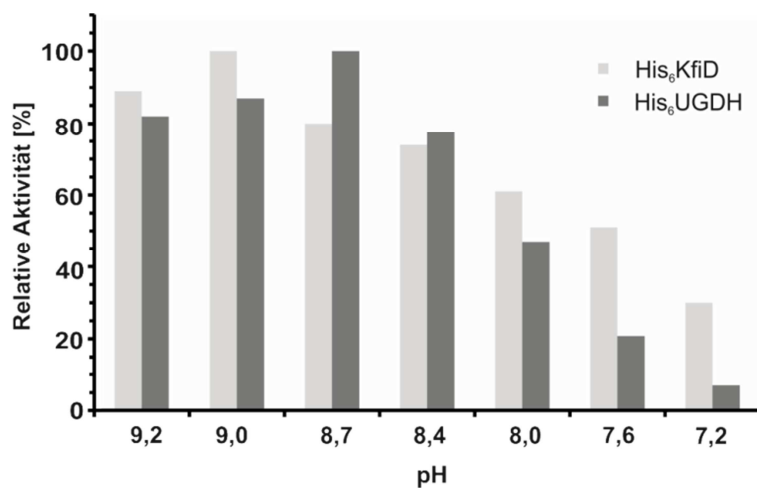


Abbildung 45: Bestimmung des pH-Optimums der His₆UGDH und His₆KfiD in 50 mM HEPES-NaOH

Die relative Aktivität wurde in 50 mM HEPES-NaOH Puffer bei 30°C bestimmt. His₆UGDH zeigt bei pH 8,7 100% Aktivität (0,77 U/mg) und His₆KfiD bei pH 9,0 100% relative Aktivität (0,5 U/mg).

Im Puffersystem HEPES-NaOH konnte für His₆UGDH die höchste Aktivität bei pH 8,7 (0,77 U/mg) und für His₆KfiD bei pH 9,0 (0,5 U/mg) gemessen werden. Für nachfolgende Versuche wurde wegen der höheren spezifischen Aktivitäten das Puffersystem Tris-HCl ausgewählt.

4.1.11.2 Bestimmung der Enzymstabilität

Die rekombinante His₆UGDH kann für drei Monate in 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 8,7) mit 20% Glycerin bei -20°C mit einer Restaktivität von 68% aufbewahrt werden. Im Gegensatz dazu führte die Aufbewahrung von His₆KfiD in 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 9,0) mit 20% Glycerin bei -20°C für einen Monat zu einer Restaktivität von 18%. Für die Enzymstabilität unter Synthesebedingungen bei 30°C wurde für His₆UGDH eine Halbwertszeit von 43,3 h und ein Inaktivierungskoeffizient k von 0,016 bestimmt (Anhang, Abbildung 150). Die Stabilität von His₆KfiD mit einer Halbwertszeit von 24,9 h und einem Inaktivierungskoeffizient k von 0,028 ist deutlich geringer (Anhang, Abbildung 151).

4.1.11.3 Bestimmung der Substratkinetik

Die kinetische Charakterisierung der humanen UGDH wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen verfolgt (Sommer *et al.* 2004, Huh *et al.* 2005, Egger *et al.* 2011). Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden die Kinetikdaten nochmals überprüft.

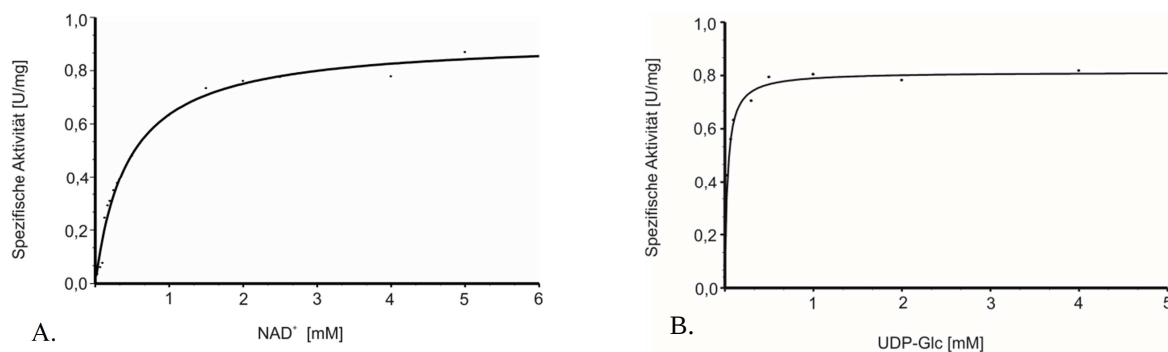


Abbildung 46: Kinetische Analyse der His₆UGDH für den Kofaktor NAD⁺ (A.) und für UDP-Glc (B.)

Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mithilfe der Software Sigma Plot 10.0. Die kinetischen Daten wurden durch nicht lineare Regressionsanalyse der experimentellen Daten bestimmt. Bei den vorliegenden hyperbolen Verläufen der Kurven wurden die kinetischen Konstanten K_m und V_{max} mit der Michaelis-Menten-Gleichung bestimmt. Die Untersuchungen ergaben einen K_m -Wert von 0,03 mM für UDP-Glc (R^2 : 0,9987; V_{max} : 0,81 U/mg) und für NAD⁺ einen K_m -Wert von 0,44 mM (R^2 : 0,993; V_{max} : 0,92 U/mg).

Tabelle 60: Kinetische Daten der rekombinanten His₆UGDH

Substrat	K _m [mM]	K _{cat} [s ⁻¹]	K _{cat} /K _m [s ⁻¹ *mM ⁻¹]
UDP-Glc	0,03	1,27	42,33
NAD ⁺	0,44	1,42	3,23

Die ermittelten K_m-Werte der His₆UGDH für UDP-Glc (0,03 mM) und NAD⁺ (0,44 mM) (Tabelle 60) sind in Übereinstimmung mit den Daten (Tabelle 61) von Egger *et al.*, Sommer *et al.* und Easley *et al.* (Sommer *et al.* 2004, Easley *et al.* 2007, Egger *et al.* 2011). Der ermittelte K_{cat}-Wert (0,85 s⁻¹) von Egger *et al.* liegt ebenfalls in der gleichen Größenordnung. Kinetikdaten des rekombinanten prokaryontischen KfiD-Enzyms lagen nicht vor und haben daher einen besonderen Stellenwert. Interessanterweise zeigt His₆KfiD eine höhere Affinität zu NAD⁺ (0,26 mM) und eine deutlich schlechtere Affinität zu UDP-Glc (0,24 mM).

Tabelle 61: Vergleich der K_m-Werte für UDP-Glc und NAD⁺ von UDP-Glukose-Dehydrogenasen aus der Literatur

	Egger (2011)	Easley (2007)	Sommer (2004)
K _m -Wert: UDP-Glc [mM]	0,035	0,009	0,011
K _m -Wert: NAD ⁺ [mM]	0,700	0,420	0,360

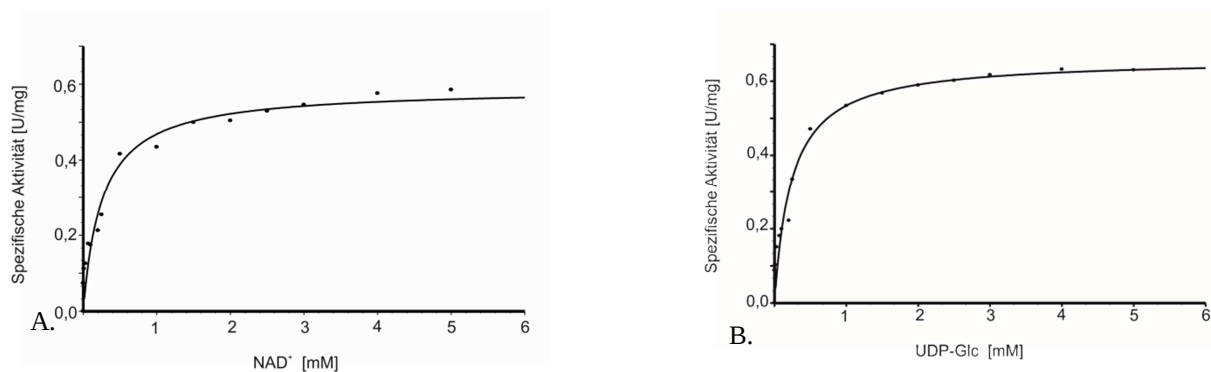


Abbildung 47: Kinetische Analyse der His₆KfiD für den Kofaktor NAD⁺ (A.) und für UDP-Glc (B.)

Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mithilfe der Software Sigma Plot 10.0. Die kinetischen Daten wurden durch nicht lineare Regressionsanalyse der experimentellen Daten bestimmt. Bei den vorliegenden hyperbolen Verläufen der Kurven wurden die kinetischen Konstanten K_m und V_{max} mit der Michaelis-Menten-Gleichung bestimmt. Die Untersuchungen ergaben einen K_m -Wert von 0,24 mM für UDP-Glc (R^2 : 0,9827; V_{max} : 0,66 U/mg) und für NAD⁺ einen K_m -Wert von 0,26 mM (R^2 : 0,9779; V_{max} : 0,589 U/mg).

Tabelle 62: Kinetische Daten der rekombinanten His₆KfiD

Substrat	K_m [mM]	K_{cat} [s ⁻¹]	K_{cat}/K_m [s ⁻¹ *mM ⁻¹]
UDP-Glc	0,24	0,24	1,00
NAD ⁺	0,26	0,21	0,81

In kinetischen Daten zeigt die His₆UGDH (Tabelle 60) gegenüber der rekombinanten His₆KfiD eine deutlich höhere katalytische Effizienz. Die katalytische Effizienz für das Substrat NAD⁺ ist 4-fach und für das Substrat UDP-Glc 42-fach erhöht. In weiteren kinetischen Studien konnte für His₆KfiD und His₆UGDH keine Inhibition durch die Substrate UDP-GlcA und UDP festgestellt werden (Abbildung 48). Zusammenfassend erweisen sich beide Enzyme als geeignete biokatalytische Werkzeuge zur Synthese von Glukuroniden und UDP-GlcA. Aufgrund der höheren katalytischen Effizienz ist die rekombinante His₆UGDH jedoch zu favorisieren.

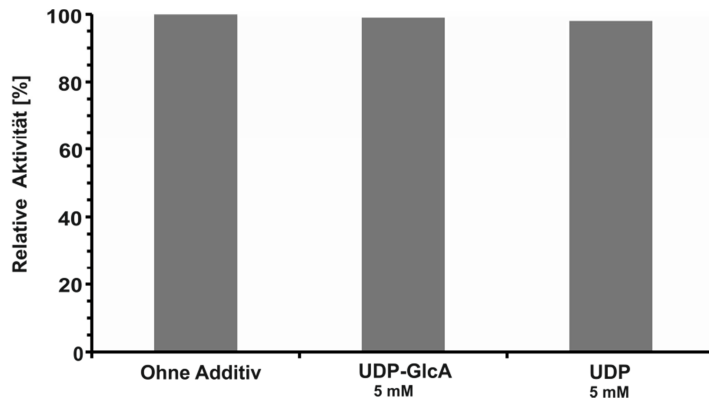


Abbildung 48: Produktinhibition der His₆UGDH und His₆KfiD durch UDP-GlcA und Kreuzinhibition durch UDP

Die Produktinhibition durch UDP-GlcA und die Kreuzinhibition durch UDP wurde mithilfe des Fotometertestes (Kapitel 3.7.2.1) durch Zugabe von 0,02-5 mM des entsprechenden Substrates untersucht. 100% relative Aktivität entsprechen 0,75 U für His₆UGDH und 0,43 U für His₆KfiD.

4.1.12 Klonierung und Expression von *his₆ump* aus *Homo sapiens*

Für das Modul A (Abbildung 13) zur Synthese von UDP wurde das UMP-Kinase kodierende Gen *ump* ausgehend von der cDNA der Niere amplifiziert und anschließend in den Vektor pET16b mit N-terminalem His₆-Tag zwecks Einschrittaufreinigung über Ni²⁺-NTA-IMAC kloniert. Nach positivem Sequenzierungsergebnis erfolgte die Enzymexpression unter Induktion mit IPTG in *E. coli* BL21(DE3).

4.1.13 Aufreinigung der His₆UMPK aus *Homo sapiens*

Zur Aufreinigungskontrolle und Expressionsanalyse wurden Proben des Zellpellets, des Rohextraktes und des IMAC-Pools über SDS-PAGE und Western Blot Analyse untersucht. Beide Methoden bestätigen eine erfolgreiche Produktion und Aufreinigung des rekombinanten Enzyms. Die geringe Menge an „inclusion bodies“ konnte auf Grund der ausreichenden Konzentration an löslichem Protein vernachlässigt werden. SDS-PAGE (Abbildung 49) und Western Blot Analyse (Abbildung 50) zeigen ein apparentes Molekulargewicht von 26 kDa, das theoretische Molekulargewicht abgeleitet von der Primärsequenz wurde mit 25,3 kDa berechnet. Des Weiteren zeigt sich das nach der IMAC-Aufreinigung bei hoher Proteinkonzentration schon zuvor beobachtete Ausfallen des Enzyms durch eine Bande agglutinierten Proteins bei ca. 50 kDa.

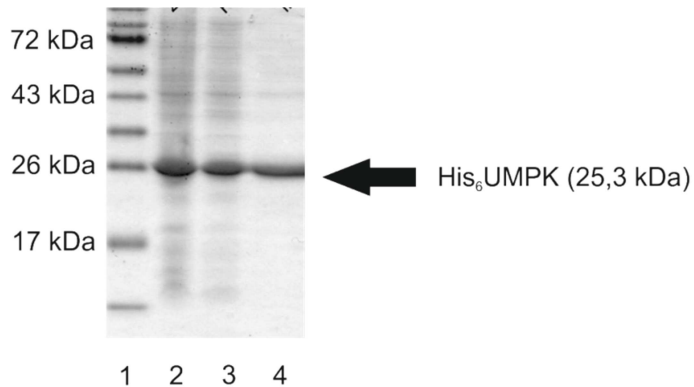


Abbildung 49: SDS-PAGE Analyse (Coomassie Färbung) der His₆UMPK nach Aufreinigung mittels Ni²⁺-NTA Sepharose

Spur 1: Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas); Spur 2: Rohextrakt; Spur 3: Zellpellet; Spur 4: IMAC-Pool.

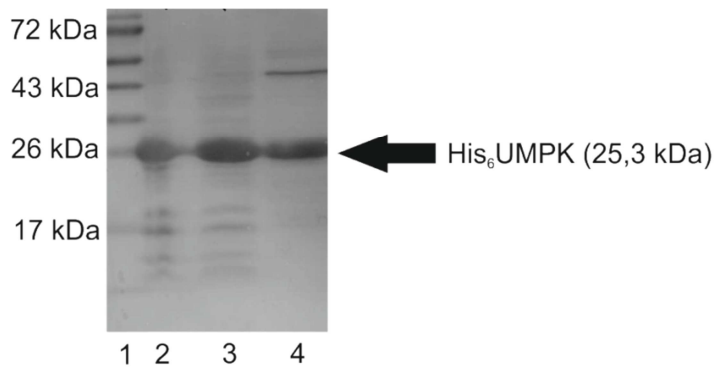


Abbildung 50: Western Blot Analyse der His₆UMPK nach Aufreinigung mittels Ni²⁺-NTA Sepharose

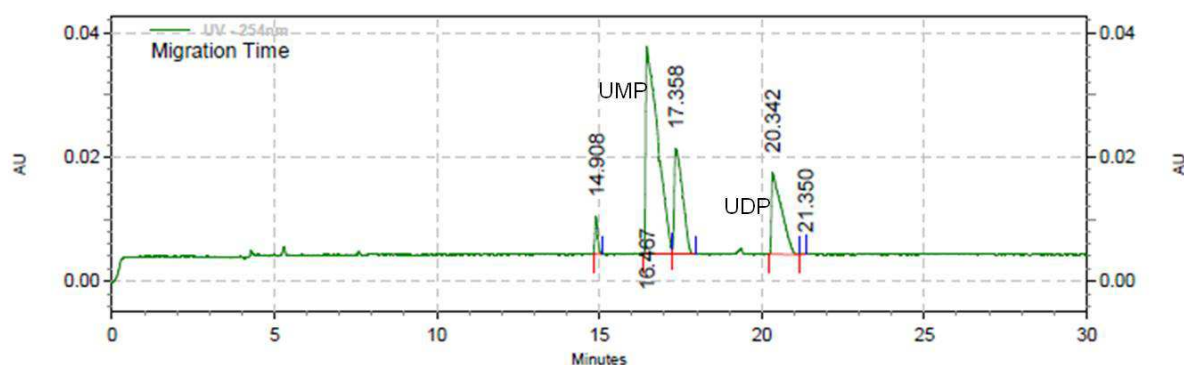
Spur 1: Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas); Spur 2: Zellpellet; Spur 3: Rohextrakt; Spur 4: IMAC-Pool.

Die Aufreinigung von 10 g *E. coli* Zellen mit Ni²⁺-NTA Sepharose ergab 4034 U des rekombinanten Enzyms mit einer spezifischen Aktivität von bis zu 70 U/mg Protein (Tabelle 63). Im Vergleich zu dem klonierten Fusionsprotein GST-UMPK von Van Rompay *et al.* konnte in der vorliegenden Arbeit die spezifische Aktivität 44-fach gesteigert werden (Van Rompay *et al.* 1999). Hier erfolgte die Bestimmung der Enzymaktivität jedoch mit der wesentlich ungenaueren Dünnschichtchromatografie-Methode. Die ermittelten Enzymaktivitäten der His₆UMPK sprachen in jedem Fall für eine weitere biochemische Charakterisierung.

Tabelle 63: Aufreinigung der His₆UMPK mittels Ni²⁺-NTA Sepharose

	Volumen [mL]	Gesamt- aktivität [U]	Gesamt- protein [mg]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Aufreinigungs- faktor [-]	Aus- beute [%]
Rohextrakt	15	8526	312	28	1	100
IMAC Pool	24	4034	58	70	2,5	47

Der Nachweis der Kinaseaktivität wurde ebenfalls mit CE-UV Analyse überprüft. In Abbildung 51 ist beispielhaft ein CE-UV Elektropherogramm dargestellt, welches den Umsatz von UMP (Migrationszeit: 14,9 min) zu UDP (Migrationszeit: 20,3 min) nach 5 min Reaktionszeit zeigt. Hier wurde eine spezifische Aktivität von 78 U/mg ermittelt. Die Differenz bezüglich der Ezymaktivität ist auf die unterschiedliche Zusammensetzung der Aktivitätstestes zurückzuführen.

**Abbildung 51:** Elektropherogramm der UMP/CMP-Kinaseaktivität

Durch CE-UV Analytik konnte die Bildung von UDP aus UMP mithilfe der His₆UMPK (Reaktionszeit: 5 min) bei 254 nm detektiert werden. Die Migrationszeiten von UMP (16,9 min) und UDP (20,3 min) stimmen mit den jeweiligen Migrationszeiten der kommerziellen Standardsubstanzen überein.

4.1.14 Biochemische Charakterisierung der His₆UMPCK

Die UMPCK konnte als lösliches Enzym mit 58 mg Protein/10 g *E. coli* BL21(DE3) produziert werden. Die Lagerung bei 4°C und -20°C führte jedoch zum Ausfallen des Enzyms. Die Zugabe von Saccharose (4 mM) hatte keinen Einfluss auf die Lagerstabilität der His₆UMPCK, bereits nach 24 h konnte keine Aktivität für die UMPCK mehr nachgewiesen werden. Die Zugabe von 20% (V/V) Glycerin stabilisierte das Enzym hingegen. Für die folgenden Aufreinigungen wurde der Elutionspuffer der Ni²⁺-NTA-IMAC daher direkt mit 20% (V/V) Glycerin versetzt.

4.1.14.1 Bestimmung des Temperatur- und pH-Optimums

Das rekombinante Enzym zeigte für das Tris-HCl- und HEPES-NaOH Puffersystem ein pH-Optimum von 8,7 (Abbildung 52) und ein Temperatur-Optimum von 30°C (Abbildung 53). Bisher gab es keine Daten in der Literatur bezüglich des pH- oder Temperatur-Optimums.

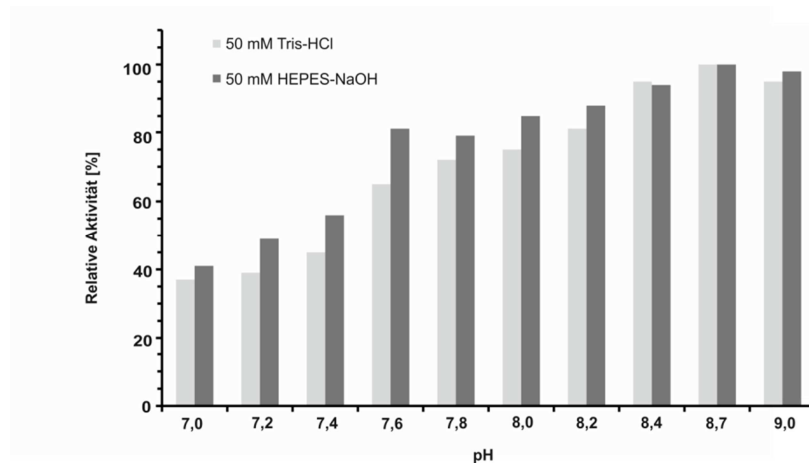


Abbildung 52: Bestimmung des pH-Optimums der His₆UMPCK in 50 mM Tris-HCl und 50 mM HEPES-NaOH

Die relative Aktivität wurde bestimmt in 50 mM Tris-HCl Puffer und 50 mM HEPES-NaOH Puffer bei 30°C. Die His₆UMPCK zeigt in beiden Puffersystemen bei pH 8,7 100% relative Aktivität (60,5 U/mg).

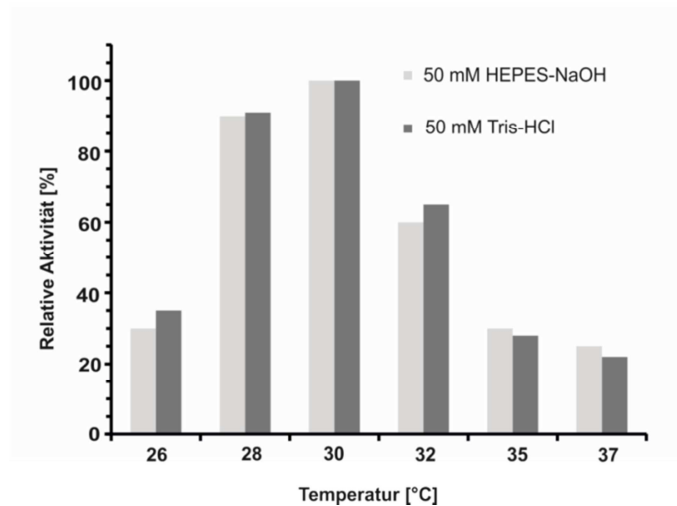


Abbildung 53: Bestimmung des Temperatur-Optimums der His₆UMPkinase

His₆UMPkinase zeigt ein Temperatur-Optimum von 30°C. In 50 mM Tris-HCl und 50 mM HEPES-NaOH Puffer (pH 8,7) entsprechen 100% relative Aktivität 56,8 U/mg.

4.1.14.2 Untersuchung des Substratspektrums

Sowohl UMP als auch CMP dienen als gleichwertige Substrate, für AMP konnte eine geringe Akzeptanz (10%) festgestellt werden (Abbildung 54). Die hier erhaltenen Ergebnisse spiegeln qualitativ betrachtet die zuvor veröffentlichten Daten wieder (Van Rompay *et al.* 1999, Pasti *et al.* 2003). Lediglich für dUMP wurde in der Literatur eine relative Aktivität von 12% beschrieben (Van Rompay *et al.* 1999), was in dieser Arbeit jedoch nicht festgestellt werden konnte.

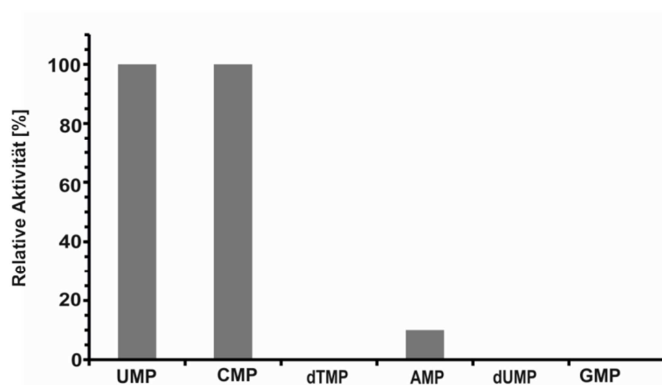


Abbildung 54: Substratspektrum der His₆UMPkinase

Die relative Aktivität für das Substrat UMP wurde mit 100% bewertet. Für CMP zeigt das rekombinante Enzym die gleiche Akzeptanz. Für AMP konnte eine geringe Akzeptanz (10%) festgestellt werden. Für dTMP, dUMP und GMP konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. 100% relative Aktivität entsprechen 65,0 U/mg.

4.1.14.3 Bestimmung der Substratkinetik

Die kinetischen Daten für das Substrat UMP und für den Phosphatdonor ATP zeigen eine einfache Michaelis-Menten-Kinetik (Abbildung 55 und Tabelle 64).

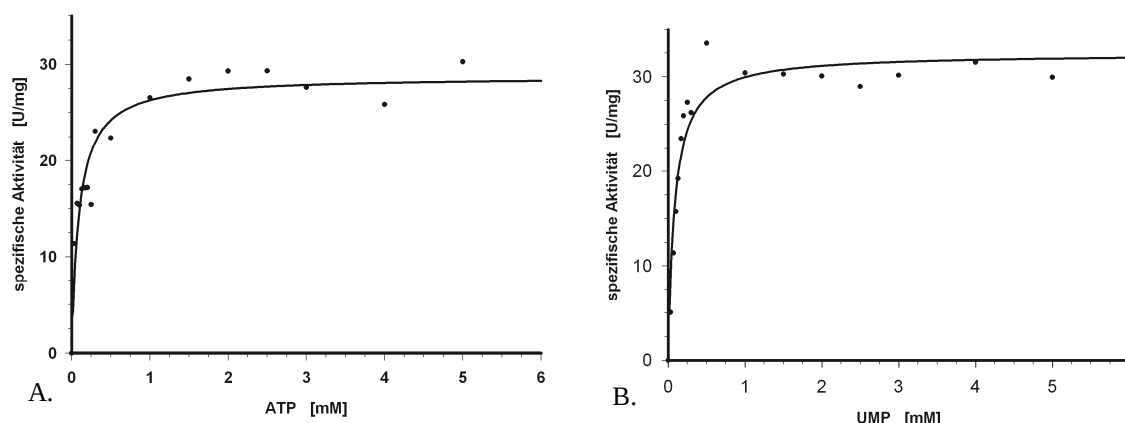


Abbildung 55: Kinetische Analyse der His₆UMPK für ATP (A.) und für UMP (B.)

Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mithilfe der Software Sigma Plot 10.0. Die kinetischen Daten wurden durch nicht lineare Regressionsanalyse der experimentellen Daten bestimmt. Bei den vorliegenden hyperbolen Verläufen der Kurven wurden die kinetischen Konstanten K_m und V_{max} mit der Michaelis-Menten-Gleichung bestimmt. Die Untersuchungen ergaben einen K_m -Wert von 0,09 mM für ATP (R^2 : 0,9875; V_{max} : 30,2 U/mg) und für UMP einen K_m -Wert von 0,08 mM (R^2 : 0,9881; V_{max} : 32,5 U/mg).

Tabelle 64: Kinetische Daten der rekombinanten His₆UMPK

Substrat	K_m [mM]	K_{cat} [s ⁻¹]	K_{cat}/K_m [s ⁻¹ *mM ⁻¹]
UMP	0,08	0,64	8,0
ATP	0,09	0,64	7,1

Der ermittelte K_m -Wert der His₆UMPK (Tabelle 64) für das Substrat UMP weicht geringfügig von den veröffentlichten Daten der Literatur ab (Tabelle 65). Die Abweichungen zu Pasti *et al.* und Segura *et al.* sind auf die jeweils unterschiedlichen Zusammensetzungen des Aktivitätstestes zurückzuführen (Pasti *et al.* 2003, Segura-Peña *et al.* 2004). Im Gegensatz zu GST-UMPK zeigt die His₆UMPK eine ca. 20-fach erhöhte Affinität für UMP (Van Rompay *et al.* 1999). Van Rompay *et al.* verwendeten für die K_m -Wert Bestimmung darüber

hinaus eine HPLC Methode, so dass ein direkter Vergleich auch hier nicht möglich ist. Für den Phosphatdonor ATP wurden keine vergleichbaren Daten in der Literatur gefunden.

Tabelle 65: Vergleich der K_m -Werte für UMP von UMP-Kinasen aus der Literatur

	Van Rompay (1999)	Pasti (2004)	Segura- Pena (2004)
K_m-Wert: UMP	1,60 mM	0,05 mM	0,03 mM

4.1.14.4 Inhibitionsuntersuchungen

Über die Edukt- und Produktkonzentration der einzelnen Substanzen von UMP und UDP wurde zunächst eine Zeit-Umsatz-Bestimmung für die Bildung von UDP ohne Zusatz von Inhibitoren aufgenommen. Hierzu wurde der Enzymassay einschließlich der Regeneration von ATP mittels CE-UV Analytik verwendet. Die Untersuchung zeigte hier schon eine deutliche Produktinhibition der His₆UMPK durch UDP nach 30 min (Abbildung 56).

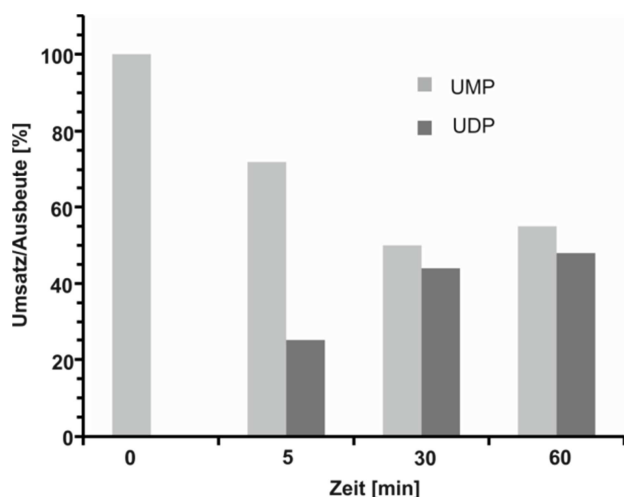


Abbildung 56: Zeit-Umsatz-Diagramm der His₆UMPK für die Synthese von UDP im analytischen Maßstab (1 mL)

Durch CE-UV Analytik konnte die Bildung von UDP aus UMP mithilfe der His₆UMPK bei 254 nm detektiert werden. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Produktinhibition nach 30 min. 100% Umsatz von UMP entspricht einer Konzentration von 2 mM.

Der Einfluss der Produktinhibition von UDP auf den Umsatz von UMP wurde nach Kapitel 3.7.1.4 mittels CE-UV Analyse untersucht. Hier konnte eine deutliche

Produktinhibition mit einem IC_{50} von 0,096 mM festgestellt werden (Abbildung 57, A). Unter der Berücksichtigung eines kompetitiven Inhibitionsmodells wurde mithilfe des IC_{50} - K_i Converters (<http://botdb.abcc.ncifcrf.gov/toxin/kiConverter.jsp>) für UDP eine Inhibitionskonstante K_i -Wert von 3,5 μ M ermittelt (Cer *et al.* 2009).

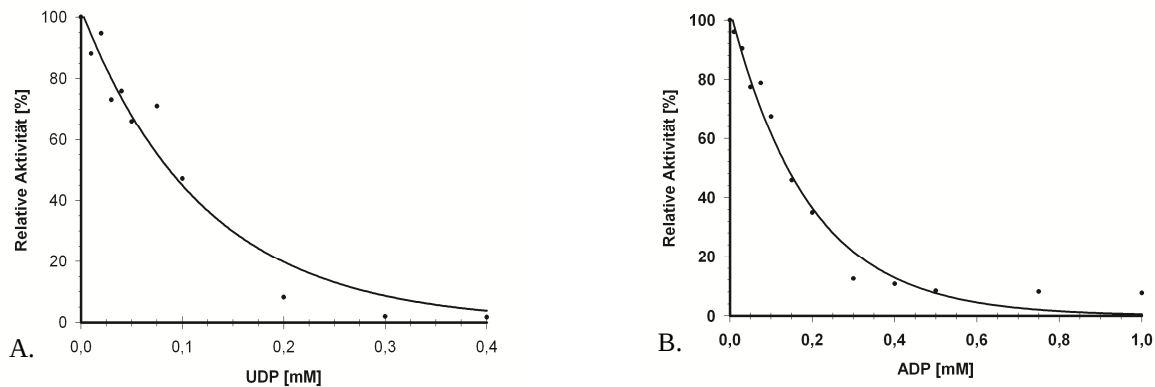


Abbildung 57: Produktinhibition der His₆UMPK durch UDP (A.) und Kreuzinhibition durch ADP (B.)

Die His₆UMPK zeigt eine starke Produktinhibition durch UDP (IC_{50} : 0,096 mM $\pm$ 0,0116) und eine Kreuzinhibition durch ADP (IC_{50} : 0,138 mM $\pm$ 0,010). Die Daten wurden unter Benutzung der Software Sigma Plot 10.0 (SPSS GmbH Software, Germany) berechnet. 100% relative Aktivität entsprechen 65 U/mg.

Die Kreuzinhibition durch ADP auf den Umsatz von UMP wurde nach Kapitel 3.7.1.4 mittels CE-UV Analyse untersucht. Die ermittelte Inhibition durch ADP mit einem IC_{50} von 0,138 mM (Abbildung 57, B) verdeutlicht die Notwendigkeit der Regeneration des Phosphatdonors ATP durch Phosphoenolpyruvat (PEP). Mithilfe des Fotometertestes nach Kapitel 3.7.1.4 konnte keine Inhibition für UDP-Glc und UDP-GlcA festgestellt werden.

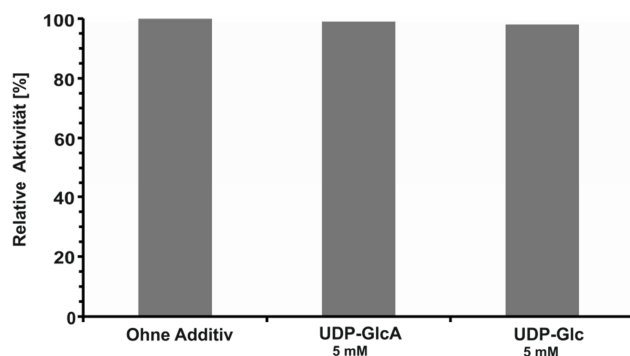


Abbildung 58: Kreuzinhibition der His₆UMPK durch UDP-GlcA und UDP-Glc

Die Kreuzinhibition der Substrate UDP-GlcA und UDP-Glc wurde mithilfe des Fotometertestes (Kapitel 3.7.1.1) durch Zugabe von 0,02-5 mM des entsprechenden Nukleotidzuckers untersucht. 100% relative Aktivität entsprechen 65 U/mg.

4.1.15 Bereitstellung der SuSy1 aus *Solanum tuberosum*

Zur Produktion der SuSy1 (*Solanum tuberosum*) standen die in der Arbeitsgruppe bereits etablierte eukaryontische Genexpression in *S. cerevisiae* als auch die prokaryontische Expression von *sus1* in *E. coli* zur Verfügung.

4.1.15.1 Produktion der SuSy1 in *E. coli* unter der Kontrolle des T7-Promotors

Für die heterologe Expression von *sus1* in *E. coli* wurde das Konstrukt pET28a-*sus1* unter der Kontrolle des T7-Promotors in *E. coli* BL21(DE3) genutzt (Sauerzapfe *et al.* 2008). Der T7-Promotor wurde mit 100 μ M IPTG/L TB-Medium induziert. Nach einer Postinduktionszeit von 20 h konnten 16 g *E. coli* Zellen/L Medium geerntet werden. Die SDS-PAGE Analyse bestätigte eine erfolgreiche Produktion von SuSy1 und Aufreinigung durch Anionenaustauschchromatografie (AEX) (Abbildung 59). Das Zellpellet lässt jedoch die Bildung von „inclusion bodies“ erkennen. Die spezifische Aktivität betrug 0,13 U/mg.

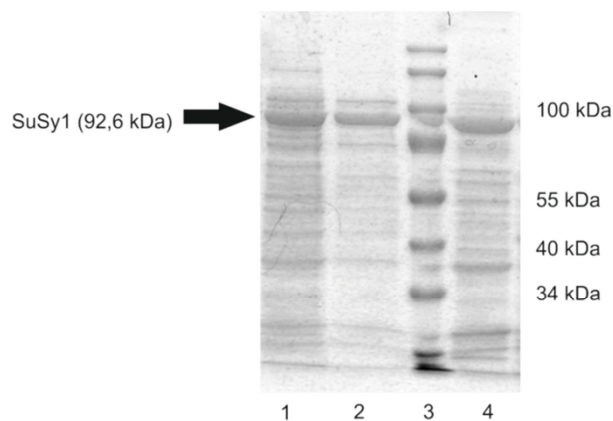


Abbildung 59: SDS-PAGE Analyse (Coomassie Färbung) der SuSy1, produziert in *E. coli* BL21(DE3) unter der Kontrolle des T7-Promotors

Spur 1: Rohextrakt; Spur 2: AEX-Pool; Spur 3: Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas); Spur 4: Zellpellet.

4.1.15.2 Produktion der SuSy1 in *S. cerevisiae* unter der Kontrolle des PMA1-Promotors

Schrader und Römer gelang die Produktion von SuSy1 in *S. cerevisiae* mithilfe des Konstruktes pDR195-*sus1* unter der Kontrolle des PMA1-Promotors (Schrader 1998, Römer *et al.* 2004)). PMA1 codiert die Plasma-Membran-H⁺-ATPase (Serrano *et al.* 1986). In der exponentiellen Wachstumsphase entfallen auf das gesamte Plasmamembran Protein 50% des PMA1 Proteins (Serano 1991). Der konstitutive Promotor macht eine aufwendige Induktion überflüssig und vereinfacht das Fermentationsverfahren in hohem Maße (Cox *et al.* 2000). Die Expression des Zielproteins erfordert jedoch strikte aerobe Bedingungen. Der fakultativ anaerobe Ascomyceten-Stamm ist bekannt für seinen Crabtree Effekt (De Deken 1966). Durch den Crabtree Effekt kommt es unter aeroben Bedingungen bei einer Glc-Konzentration $\geq 0,25$ g/L zur Bildung von Ethanol. Damit ist eine langfristige Repression der Atmung verbunden, involviert sind hier die Enzyme des Tricarbonsäurezyklus und der Atmungskette. Die Repression der Atmung geht einher mit der Repression des Promotors. Die negative Energiebilanz der Gärung führt zwangsläufig zu schlechten Zellausbeuten. Das Erreichen von hohen Zellausbeuten und die Expression von *sus1* unter der Kontrolle des konstitutiven PMA1-Promotors erfordern ein Zulaufverfahren (Fed-Batch-Verfahren), um hohe Glc-Konzentrationen zu vermeiden. Römer *et al.* konnten mit diesem Verfahren nach 36 h Fermentationszeit 12060 U/798 g Biofeuchtmasse in einem 40 L Fermenter erzielen (Römer *et al.* 2004). Wegen technischer Komplikationen wurden in der vorliegenden Arbeit nur Schüttelkolben-Expressionen durchgeführt. Hierbei erfolgte die konstitutive Expression des Glykosyltransferasgens für 48 h bei 30°C 1 L SD-Medium mit 2% Glc und entsprechenden Supplementen im 5 L Schüttelkolben. Die Zellausbeute betrug 6,5 g Hefezellen/L Medium. Die SDS-PAGE Analyse zeigte eine erfolgreiche Produktion und Aufreinigung des Enzyms (Abbildung 60). Die spezifische Aktivität betrug 0,12 U/mg.

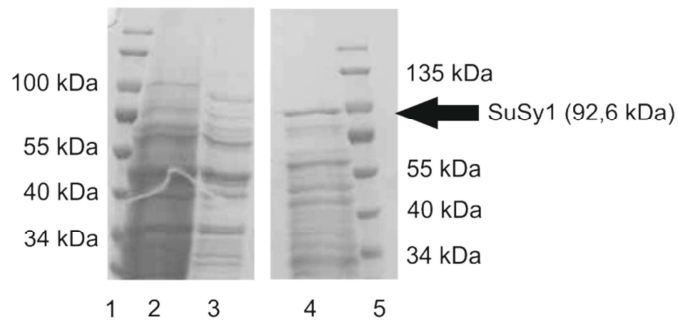


Abbildung 60: SDS-PAGE Analyse (Coomassie Färbung) der SuSy1, produziert in *S. cerevisiae* BY4742 unter der Kontrolle des PMA1-Promotors

Spur 1: Proteinmarker (PageRuler™Prestained Protein Ladder, Fermentas); Spur 2: Rohextrakt; Spur 3: Waschfraktionen; Spur 4: AEX-Pool; Spur 5: Proteinmarker (PageRuler™Prestained Protein Ladder, Fermentas).

4.1.15.3 Klonierung von *sus1* in den Vektor pYES2/CT zur Expression in *S. cerevisiae* unter der Kontrolle des Gal1-Promotors

Um auch die Expression von *sus1* in *S. cerevisiae* in kleinerem Maßstab ohne Zulaufverfahren zu ermöglichen, schien das pYES2/CT-System von Invitrogen mit einem Gal-induzierbaren Promotor eine alternative Strategie zu bieten. In Anwesenheit von Glc ist die Transkription unter der Kontrolle des Gal1-Promotors in *S. cerevisiae* reprimiert (West *et al.* 1984). Die Transkription kann induziert werden beim Entfernen der Glc und Hinzufügen von Gal als C-Quelle (Giniger *et al.* 1985). Eine alternative C-Quelle bietet das Trisaccharid Raffinose. Hier wird durch Raffinose die Transkription ausgehend vom Gal1-Promotor weder inhibiert noch induziert. Die Zugabe von Gal zum Medium induziert die Expression des Zielgens in Gegenwart von Raffinose (Info: pYES2/CT Manual, Invitrogen). Dabei ist die Induktion des Gal1-Promotors durch Gal schneller in Zellen, die von Beginn an in Raffinose kultiviert wurden. Um dieser Strategie zu folgen, wurde das *sus1* Gen ausgehend vom bereits vorhandenen Konstrukt pDR195-*sus1* in den Vektor pYES2/CT über die Schnittstellen *Bam*HI und *Not*I kloniert. Nach erfolgreicher Klonierung, bestätigt durch Sequenzierung, erfolgte die Expression von *sus1* in *S. cerevisiae* BY4742 unter Induktion des Gal1-Promotors mit speziellem Induktionsmedium in einem 1-L-Schüttelkolben. Diese Arbeiten wurden von B. Sc. Manja Henze im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.

4.1.15.4 Produktion der SuSy1 in *S. cerevisiae* unter der Kontrolle des Gal1-Promotors

Nach Aufreinigung von SuSy1 mittels Anionenaustauschchromatografie konnte mittels SDS-PAGE Analyse die erfolgreiche Produktion von SuSy1 mit dem theoretischen Molekulargewicht von 92,6 kDa bestätigt werden (Abbildung 61). Die Zellausbeute nach 48-stündiger Inkubationszeit bei 30°C betrug nur 4,3 g/L. Für die spezifische Aktivität konnte ein Wert von 0,21 U/mg ermittelt werden.

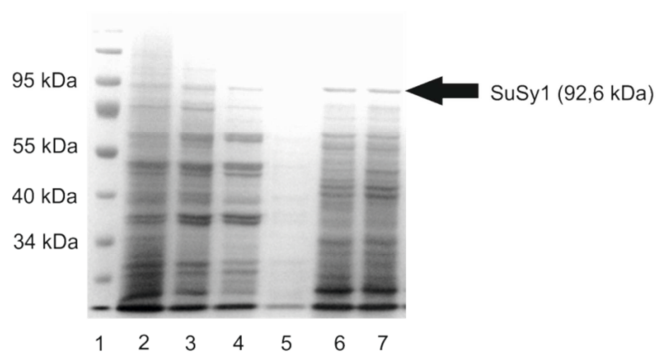


Abbildung 61: SDS-PAGE Analyse (Coomassie Färbung) der SuSy1, produziert in *S. cerevisiae* BY4742 unter der Kontrolle des Gal1-Promotors

Spur 1: Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas); Spur 2: Zellpellet; Spur 3: Rohextrakt; Spur 4: Durchfluß; Spur 5: Waschfraktion; Spur 6 und Spur 7: AEX-Pool.

4.1.15.5 Vergleich der verschiedenen Produktionsstrategien der SuSy1

Um eine Bewertung der unterschiedlichen Produktionsstrategien der SuSy1 im Schüttelkolben vorzunehmen, wurden die jeweiligen Pools der aufgereinigten Proteinfractionen (AEX-Pool) aus den unterschiedlichen Expressionssystemen hinsichtlich ihres Proteingehaltes und ihrer Enzymaktivität untersucht (Tabelle 66).

Tabelle 66: Vergleich der Produktionsstrategien der SuSy1

	Gesamt- aktivität/Batch [U]	Proteinausbeute/ Zellfeuchtmasse [mg/g]	Spezifische Aktivität [U/mg]
SuSy1 aus <i>S. cerevisiae</i> (pDR195- <i>sus1</i>)	1,9	2,4	0,12
SuSy1 aus <i>S. cerevisiae</i> (pYES/CT- <i>sus1</i>)	2,1	2,3	0,21
SuSy1 aus <i>E. coli</i> (pET28a- <i>sus1</i>)	4,8	2,3	0,13

Der Vergleich der spezifischen Aktivitäten von SuSy1 lieferte Werte in der gleichen Größenordnung. Die spezifische Aktivität der SuSy1 ausgehend vom induzierbaren Gal1-Promotor ist ca. 1,8-fach erhöht. Die Proteinausbeute beträgt in allen Fällen 2,3-2,4 mg/g Zellfeuchtmasse. Ein wesentlicher Unterschied besteht in der Ausbeute an Zellmasse. Für die Expression von *sus1* in *E. coli* BL21(DE3) konnten 16 g Zellen/L Batchansatz gewonnen werden. Dem gegenüber steht die Zellausbeute für die Hefeexpression mit 4-6 g Zellen/L. SuSy1, produziert in *S. cerevisiae* (pDR195-*sus1*) unter der Kontrolle des konstitutiven PMA1-Promotors verlangt, wie bereits schon gezeigt wurde, aufgrund des bekannten Crabtree Effektes ein Fed-Batch-Verfahren. Der Batch Ansatz führt zu geringerem Zellwachstum und geringeren spezifischen Aktivitäten. Die Funktionalität der Expression von *sus1* unter der Kontrolle des Gal1-Promotors konnte in diesem ersten Versuch bestätigt werden. Eine Optimierung wurde hier jedoch noch nicht durchgeführt, so dass in Zukunft mit höheren Zellausbeuten und eventuell auch höheren spezifischen Aktivitäten gerechnet werden kann. Insgesamt ist zu beachten, dass hier die C-Quelle, Raffinose, im Vergleich zu Glc langsamer verstoffwechselt wird und so zu einem verzögerten Anstieg des Zellwachstums führt. Die Expression von *sus1* in *E. coli* wurde bereits optimiert (Sauerzapfe *et al.* 2008). Die höhere Zellausbeute führt so zu einer höheren Aktivitätsausbeute. Für eine prokaryontische Expression einer Glykosyltransferase im Schüttelkolben-Maßstab stellt dieser Ansatz durchaus eine zufriedenstellende vertretbare Strategie dar.

4.1.16 Bereitstellung der His₆NOX aus *Lactobacillus brevis*

Die NADH-Oxidase (NOX) aus *Lactobacillus brevis*, die Wasser als Nebenprodukt produziert, eignet sich hervorragend zur Regeneration von NAD⁺ (Geueke *et al.* 2003, Hummel und Riebel 2003, Kuzu *et al.* 2005). Das Plasmid pET28a-*his₆nox* wurde zur Produktion der rekombinanten NADH-Oxidase, His₆NOX, von Prof. W. Hummel (Institut für Molekulare Enzym-Technologie, Forschungszentrum Jülich, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Jülich, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Gensequenz der NOX (UniProtKB/Swiss-Prot/accesion number: Q8KRG4) wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Hummel über die Schnittstellen *NdeI* und *XhoI* in den Vektor pET28a kloniert. Nach Transformation in *E. coli* BL21(DE3) erfolgte die Expression und Aufreinigung nach Kapitel 3.6.3. Die SDS-PAGE Analyse (Abbildung 62) zeigte aufgereinigtes Protein mit einem Molekulargewicht von 51 kDa. Nach Expression von *his₆nox* konnten 14 g *E. coli* BL21(DE3) Zellen/L TB Medium geerntet werden.

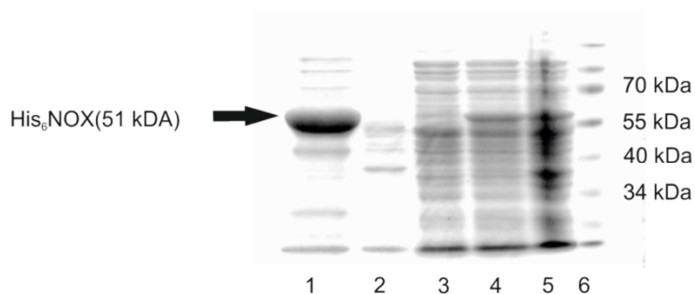


Abbildung 62: SDS-PAGE Analyse (Coomassie Färbung) der His₆NOX nach Aufreinigung mittels Ni²⁺-NTA Sepharose

Spur 1: Imac Pool; Spur 2: Waschfraktionen; Spur 3: Durchfluß; Spur 4: Rohextrakt; Spur 5: Zellpellet; Spur 6: Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas). Das detektierte Molekulargewicht entspricht dem theoretischen von 51 kDa.

Nach der Aufreinigung wurde der IMAC-Pool hinsichtlich des Proteingehaltes und der Enzymaktivität analysiert. Auf die Untersuchung des Rohextraktes wurde wegen der hohen Nebenaktivitäten von vorhandenen Oxidasen verzichtet. Insgesamt konnten 1955 U/10 g *E. coli* BL21(DE3) Zellen an Gesamtaktivität berechnet werden (Tabelle 67). Damit zeichnet sich die His₆NOX als enzymatisch hoch aktives Enzym zur Regeneration von NAD⁺ aus, das sich sehr effizient in *E. coli* produzieren lässt.

Tabelle 67: Aufreinigung der His₆NOX mittels Ni²⁺-NTA Sepharose

	Volumen	Gesamtaktivität	Gesamtprotein	Spezifische Aktivität
	[mL]	[U]	[mg]	[U/mg]
IMAC Pool	22,4	1954,5	30,0	87,3

4.2 Entwicklung und Optimierung von modularen Enzym-Kaskaden zur Synthese von UDP-GlcA

4.2.1 Synthese von UDP-GlcA mit dem UGDH-Modul (Modul C)

4.2.1.1 Synthese von UDP-GlcA mit dem UGDH-Modul (Modul C) unter Einsatz des Laktat-Dehydrogenase/Pyruvat-Systems

Eine kostengünstige Synthese von UDP-GlcA setzt die Regeneration des Kofaktors NAD^+ voraus. Hierfür wurde zunächst die kommerziell erhältliche Laktat-Dehydrogenase (LDH aus Kaninchenmuskel, Roche, Schweiz) verwendet und das Pyruvat/Laktat-System zur Regeneration angewandt (Abbildung 11, 1). Erste Versuche im analytischen Maßstab (1 mL) mit 0,5 mM NAD^+ , 2 mM UDP-Glc, 4 mM Pyruvat, 10 U/ μL LDH und 1,5 U His₆UGDH zeigten eine ineffiziente Regeneration von NAD^+ . Unter Einsatz der Kapillarelektrophorese konnte mithilfe der kommerziellen Standardsubstanz NADH bereits nach 10 min Syntheszeit die Bildung von NADH nachgewiesen werden (Abbildung 63).

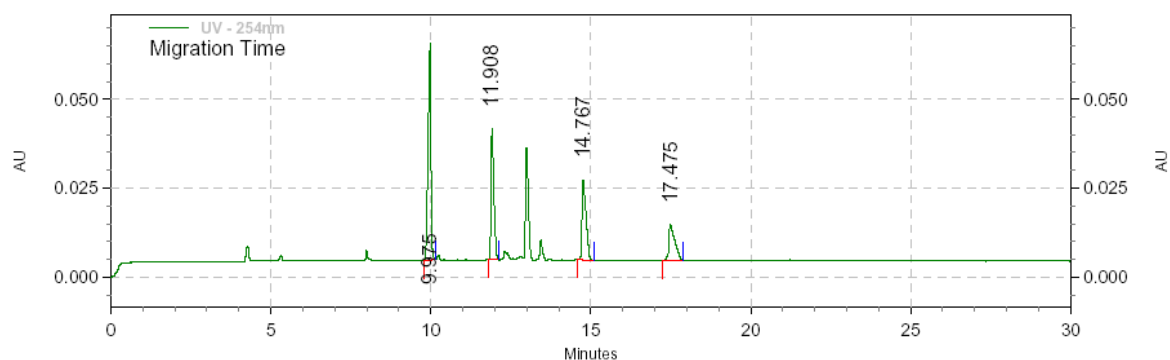


Abbildung 63: CE-UV-Analyse der Synthese von UDP-GlcA (Modul C) unter Einsatz des Laktat-Dehydrogenase/Pyruvat-Systems im analytischen Maßstab (1 mL)

Der Ansatz im analytischen Maßstab enthielt 0,5 mM NAD^+ , 2 mM UDP-Glc, 4 mM Pyruvat, 10 U/ μL LDH und 1,5 U His₆UGDH. Die Bildung von NADH (Migrationszeit: 14,7 min) kann schon nach 10 min Syntheszeit nachgewiesen werden. Die Migrationszeit von NAD^+ beträgt 9,9 min, von UDP-Glc 11,9 min und von UDP-GlcA 17,5 min.

Nach 24 h Syntheszeit (Abbildung 64) ist die Oxidation von UDP-Glc unter Verwendung des Laktat/Pyruvat-Systems trotz ca. 8-fachen Überschusses an LDH nicht quantitativ. Die stagnierende Umsetzung von UDP-Glc ist hier auf die fehlende Verfügbarkeit des Kofaktors NAD^+ zurückzuführen. Laut Literaturrecherche (Info Boehringer Mannheim) liegt das pH-Optimum der LDH aus Kaninchenmuskel bei pH 6,0. Der K_m -Wert für Pyruvat beträgt 0,12 mM und für NADH 0,012 mM. Die Restaktivität bei pH 8,7 beträgt 50%. Zusätzlich kommt es zu einer leichten Inhibition der LDH bei Pyruvatkonzentrationen ≥ 2 mM. Darüber hinaus wird nach ca. 3 h zusätzlich eine chemische Hydrolyse des Zielproduktes UDP-GlcA deutlich, erkennbar an der Freisetzung von UDP, so dass nach 24 h Syntheszeit nur noch ca. 0,2 mM UDP-GlcA zu detektieren sind. Die Ergebnisse deuten schon hier die Notwendigkeit einer schnellen Synthesestrategie an, um eine chemische Hydrolyse des Zielproduktes UDP-GlcA zu vermeiden.

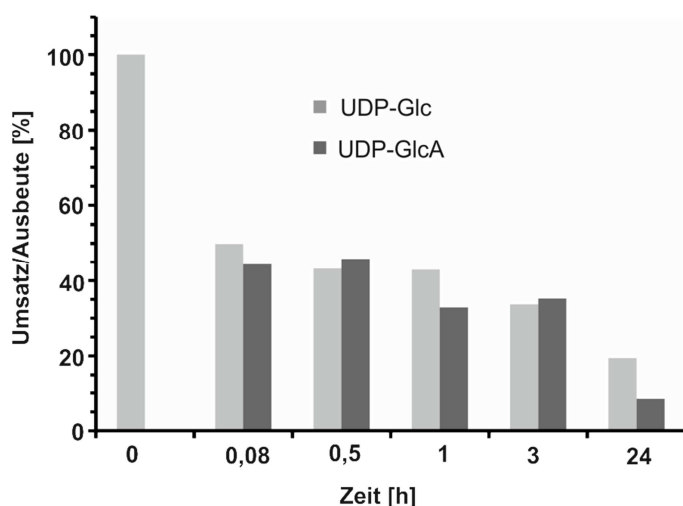


Abbildung 64: Synthese von UDP-GlcA mit der His₆UGDH (Modul C) unter Einsatz des Laktat-Dehydrogenase/Pyruvat-Systems im analytischen Maßstab (1mL)

Der Ansatz im analytischen Maßstab setzte sich zusammen aus 50 mM Tris-HCl (pH 8,7), 5 mM DTT, 0,5 mM NAD^+ , 2 mM UDP-Glc, 4 mM Pyruvat, 10 U LDH und 1,5 U His₆UGDH.

4.2.1.2 Synthese von UDP-GlcA mit dem UGDH-Modul (Modul C) unter Einsatz des NADH-Oxidase/O₂-Systems

Im Gegensatz zur LDH offenbarte sich die bereits von der Arbeitsgruppe Prof. W. Hummel charakterisierte NADH-Oxidase (NOX) aus *Lactobacillus brevis* (Geueke *et al.* 2003, Hummel und Riebel 2003) als leistungsstarkes Enzym für eine effiziente Kofaktorregeneration, (Abbildung 11, 2). Das homotetramere Flavoenzym, das bei der Oxidation von NADH Wasser als Nebenprodukt produziert, verfügt über eine sehr hohe Affinität zu NADH ($K_m = 24 \mu\text{M}$). Das pH-Optimum (0,1 M Zitronensäure/Natriumphosphatpuffer) wurde mit pH 6,0 angegeben.

4.2.1.3 Synthese von UDP-GlcA mit dem UGDH-/KfiD-Modul (Modul C) im analytischen Maßstab

Erste Versuche zur Synthese von 3 mM UDP-GlcA im analytischen Maßstab zeigten für die rekombinante His₆UGDH die erfolgreiche *in situ* Regeneration von NAD⁺. Um eine vollständige Regeneration des Kofaktors zu gewährleisten und das nicht optimale pH-Optimum auszugleichen, wurde ein 1,5-facher Überschuss an His₆NOX gewählt. Während der Synthesezeit wird ein Umsatz von UDP-Glc zu UDP-GlcA beobachtet. Der Kofaktor NAD⁺ wird sehr effizient regeneriert, da die Bildung von NADH nicht detektiert werden kann (Abbildung 65).

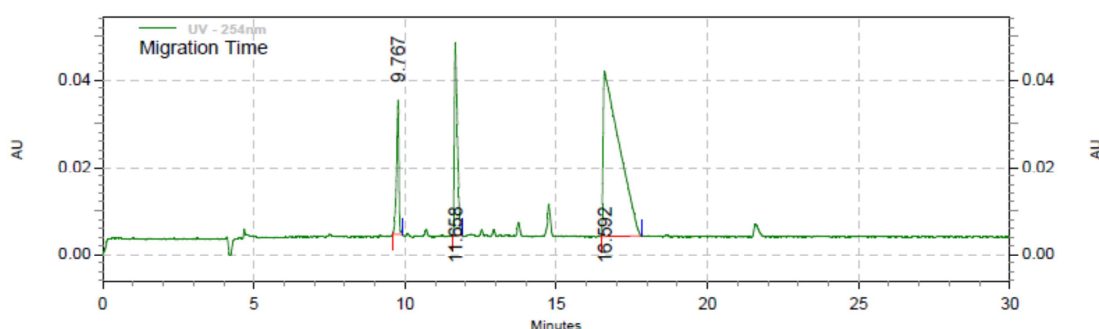


Abbildung 65: Synthese von UDP-GlcA mit der His₆UGDH (Modul C) unter Einsatz des NADH-Oxidase/O₂-Systems im analytischen Maßstab (1 mL)

Das CE-UV Elektropherogramm zeigt den Umsatz von 3 mM UDP-Glc (Migrationszeit: 11,9 min) zu UDP-GlcA (Migrationszeit: 17,2 min) mit His₆UGDH und die erfolgreiche *in situ* Regeneration von 0,5 mM NAD⁺ (Migrationszeit: 9,8 min) nach 2 h Synthesezeit. Die Migrationszeit von UDP-Glc beträgt 11,6 min und UDP-GlcA von 16,6 min.

Zur Optimierung der Oxidationsreaktion von UDP-Glc einschließlich der Regeneration von NAD^+ wurden 3 verschiedene Konzentrationen von NAD^+ (0,25 mM, 0,5 mM und 1 mM NAD^+) verwendet. Abbildung 66 zeigt die erfolgreiche *in situ* Regeneration von NAD^+ in Abhängigkeit von seiner eingesetzten Konzentration. Nach 3 h Syntheszeit ist ein vollständiger Umsatz von UDP-Glc zu verzeichnen. Der Einsatz von 1 mM NAD^+ erweist sich als schnellste Reaktion. Mit 0,5 mM und 0,25 mM NAD^+ ist nach 3 h Syntheszeit der Umsatz von UDP-Glc quantitativ. Die abfallende Konzentration von UDP-GlcA nach 3 h im Versuchsansatz mit 1 mM NAD^+ ist mit der Hydrolyse durch Freisetzung von UDP zu begründen. Um eine sichere und kosteneffiziente Produktion von UDP-GlcA zu gewährleisten wurde für weitere Synthesen von UDP-GlcA mit der humanen His₆UGDH eine Konzentration von 0,5 mM NAD^+ gewählt, die oberhalb des K_m -Wertes (K_m für NAD^+ : 0,44 mM) liegt (Abbildung 46).

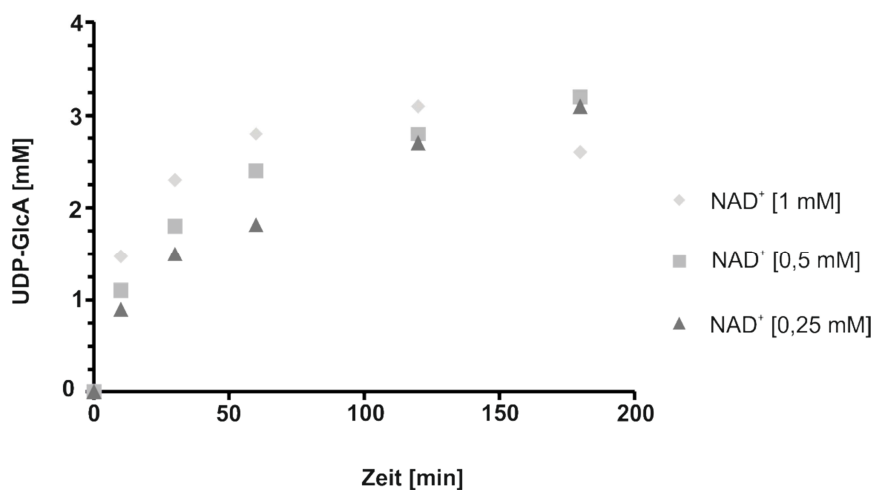


Abbildung 66: Optimierung der *in vitro* Synthese von UDP-GlcA mit der His₆UGDH (Modul C) unter Einsatz des NADH-Oxidase/ O_2 -Systems im analytischen Maßstab (1 mL)

Der Ansatz im analytischen Maßstab setzte sich zusammen aus 50 mM Tris-HCl (pH 8,7), 5 mM DTT, 1 U/mL His₆UGDH, 1,5 U/mL His₆NOX, 3 mM UDP-Glc und 1 mM bzw. 0,5 mM bzw. 0,25 mM NAD^+ .

In einem nächsten Schritt erfolgte eine Maßstabsvergrößerung der UDP-Glc-Konzentration im analytischen Maßstab (Abbildung 67). Mit 5 mM UDP-Glc beträgt die gewählte Substratkonzentration für His₆UGDH das 167-fache und für His₆KfiD das 20-fache des K_m -Wertes. Das Diagramm zeigt eine zufriedenstellende 4,9 mM (98%) Ausbeute für His₆UGDH bzw. 4,1 mM (82%) für His₆KfiD nach 5 h Syntheszeit. Der Grund für die geringere Ausbeute an UDP-GlcA durch Verwendung der His₆KfiD ist auf die schlechtere Enzymstabilität zurückzuführen (Anhang, Abbildung 151). Hier sind nach 5 h nur noch ca. 80% Restaktivität vorhanden. Nach 6 h ist in beiden Syntheseansätzen wieder eine chemische

Hydrolyse von UDP-GlcA zu verzeichnen. Hier wird sehr deutlich, dass eine schnelle Synthesestrategie für UDP-GlcA erforderlich ist, um eine Hydrolyse des Zielproduktes zu vermeiden. Mit beiden Synthesestrategien konnte die Masse der UDP-GlcA für $[M-H]^-$ mit m/z 579 und die Masse von UDP für $[M-H]^-$ mit m/z 403 detektiert werden (Abbildung 68).

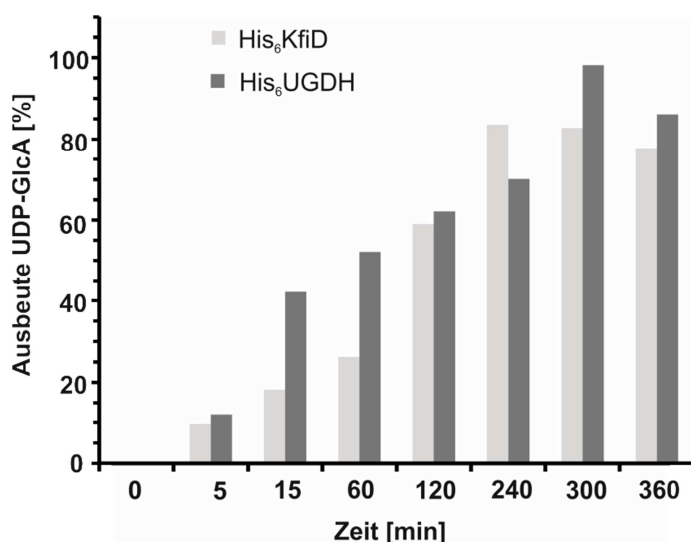


Abbildung 67: *In vitro* Synthese von UDP-GlcA mit der His₆UGDH bzw. His₆KfiD (Modul C) unter Einsatz des NADH-Oxidase/O₂-Systems im analytischen Maßstab (1 mL)

Der Ansatz im analytischen Maßstab setzte sich zusammen aus 50 mM Tris-HCl (pH 8,7), 5 mM DTT, 1 U/mL His₆UGDH bzw. 1 U/mL His₆KfiD, 1,5 U/mL His₆NOX, 5 mM UDP-Glc und 0,5 mM NAD⁺.

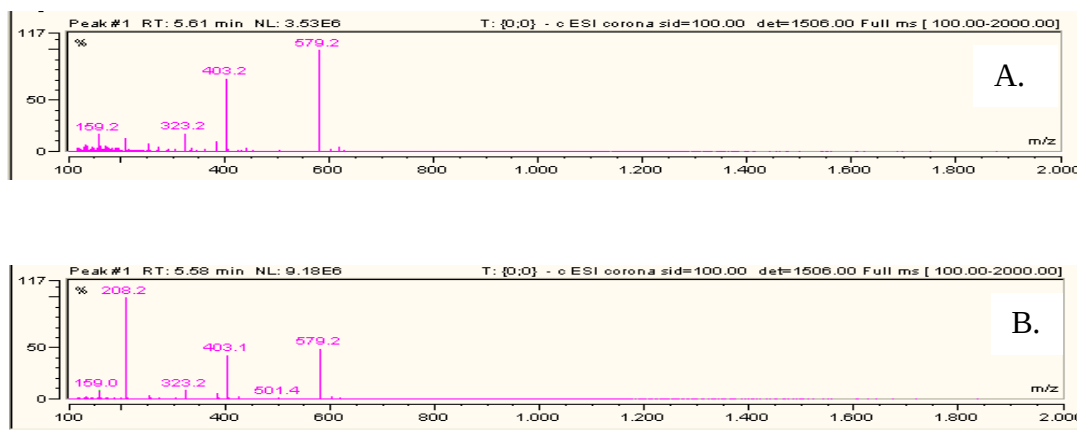


Abbildung 68: ESI-MS Analyse der Synthese von UDP-GlcA mit der His₆UGDH (A.) und His₆KfiD (B.) (Modul C) im analytischen Maßstab

In den Ansätzen A. und B. wurde die detektierte Masse m/z 579,2 für $[M-H]^-$ der berechneten Masse $[M]$ m/z 580,3 zugeordnet.

4.2.1.4 Semipräparative Synthese von UDP-GlcA mit dem UGDH-Modul (Modul C)

Um das Produkt UDP-GlcA auch mittels NMR Analyse zu charakterisieren, wurde eine semipräparative Synthese angestrebt. Obwohl beide Dehydrogenasen ihre Funktionalität im UGDH-Modul bestätigten, wurde der Einsatz von His₆UGDH aufgrund der höheren katalytischen Effizienz bevorzugt. In einem Ansatz von 10 mL, kontrolliert über CE-UV Analyse bei 254 nm (Abbildung 142), ermöglichte die His₆UGDH nach 5 h Synthesezeit einen 92%-igen Umsatz von UDP-Glc (4,6 mM) zu UDP-GlcA (Abbildung 69). Zu diesem Zeitpunkt wurde die Synthese abgebrochen, um die chemische Hydrolyse des Nukleotidzuckers zu vermeiden. Mit einer Ausbeute von 4,6 mM UDP-GlcA konnte der Kofaktor NAD⁺ in 19 Zyklen regeneriert werden.

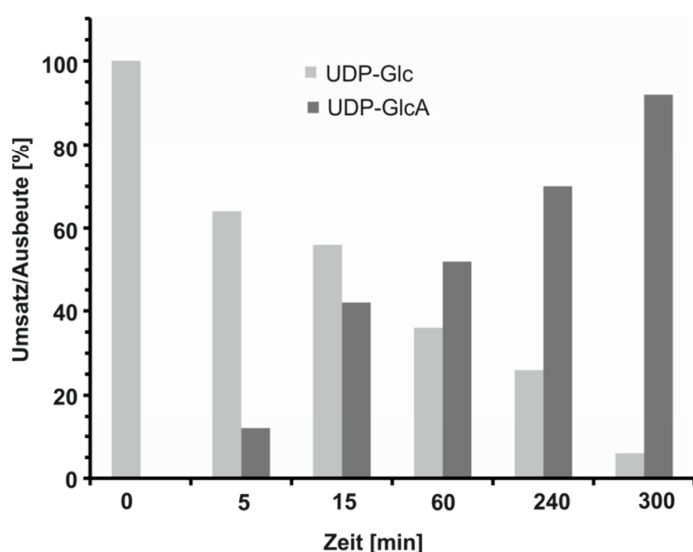


Abbildung 69: *In vitro* Synthese von UDP-GlcA mit der His₆UGDH (Modul C) unter Einsatz des NADH-Oxidase/O₂-Systems im semipräparativen Maßstab (10 mL)

Die Synthese der UDP-GlcA wurde mit 50 mM Tris-HCl (pH 8,7), 5 mM UDP-Glc, 0,5 mM NAD⁺, 1 U/mL His₆UGDH und 1,5 His₆NOX/mL für 5 h bei 30°C durchgeführt. Nach 5 h konnte ein Umsatz von 4,6 mM für UDP-Glc detektiert werden.

Die Aufreinigung der UDP-GlcA aus dem Syntheseansatz erfolgte mit der präparativen HILIC Methode (Kapitel 3.12.5.1). Durch Einstellung des Wasser/Puffer-Gradienten konnte eine gute Trennung der Substrate NAD^+ , UDP-Glc und UDP-GlcA erzielt werden (Abbildung 70).

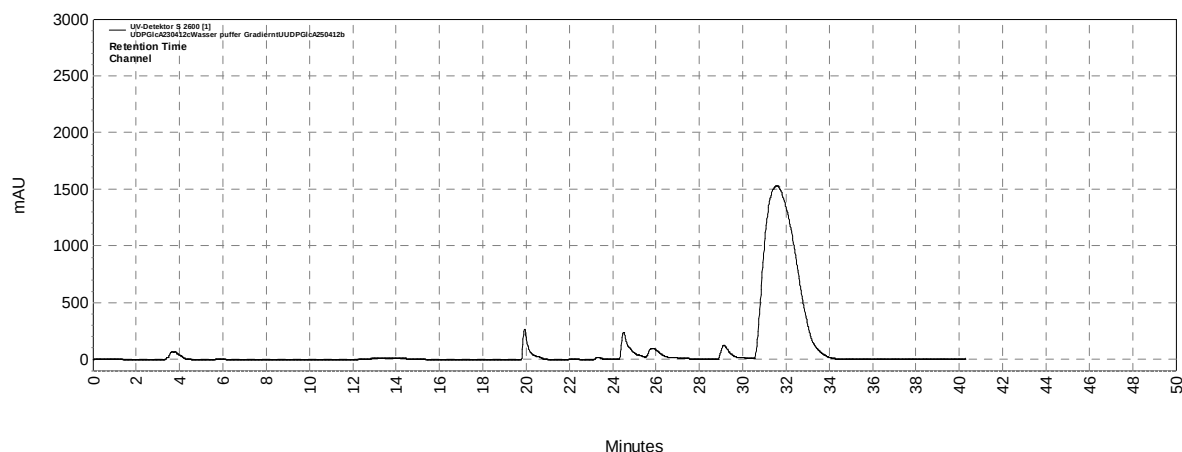


Abbildung 70: Produktisolierung von UDP-GlcA mit der präparativen HILIC Methode unter Einsatz einer Multospher APS-HP 5 μ L 100x3 mm Säule

Das Chromatogramm zeigt die Trennung der Substrate NAD^+ (Retentionszeit: 20 min), UDP-Glc (Retentionszeit: 24,5 min) und UDP-GlcA (Retentionszeit: 32 min) durch den Elutionsgradienten über 150 mL bei einer Flussrate von 5 mL/min. [Elutionslösung A (100% MilliQ H_2O) bis 100% Elutionslösung B (0,4 M $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, pH 6,7)].

Insgesamt konnten mit diesem Verfahren 13 mg (22,4 μmol) Nukleotidzucker mit einer Gesamtausbeute von 49% gewonnen werden. Der hohe Verlust an Gesamtausbeute ist auf die chemische Produktinstabilität während des Aufreinigungsverfahrens zurückzuführen. Die anschließende MS Analytik bestätigte die molekulare Masse des Nukleotidzuckers mit m/z 579,2 für $[\text{M}-\text{H}]^-$ und die Masse für UDP mit m/z 403,1 für $[\text{M}-\text{H}]^-$ (Abbildung 71). Somit zeigt die MS Analytik auch hier wieder das Nebenprodukt UDP an. Die abschließende Untersuchung mittels ^1H -NMR Spektroskopie bestätigt eindeutig die Integrität der UDP-GlcA (Abbildung 72). Die berechneten Daten sind in Übereinstimmung mit den Literaturwerten von (Yang und Bar-Peled 2010).

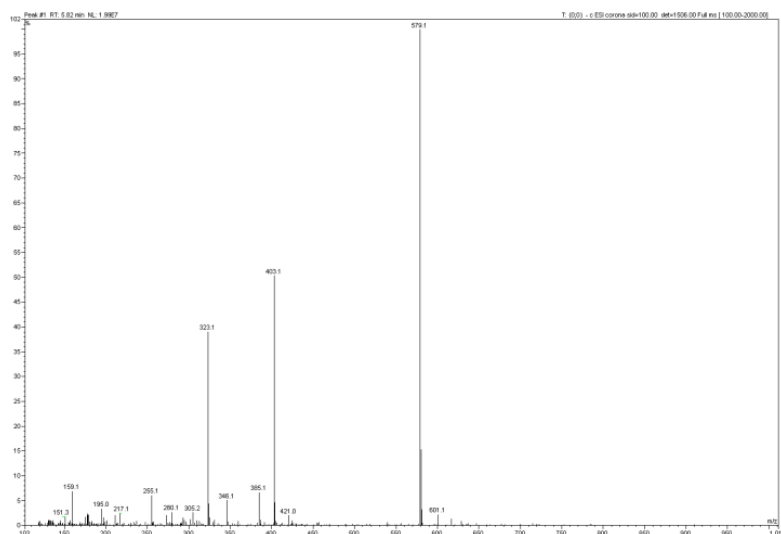


Abbildung 71: ESI-MS Analyse der Synthese von UDP-GlcA mit der His₆UGDH (Modul C) im semipräparativen Maßstab

Die detektierte Masse m/z 579,2 für $[M-H]^-$ wurde der berechneten Masse $[M]$ m/z 580,3 zugeordnet.

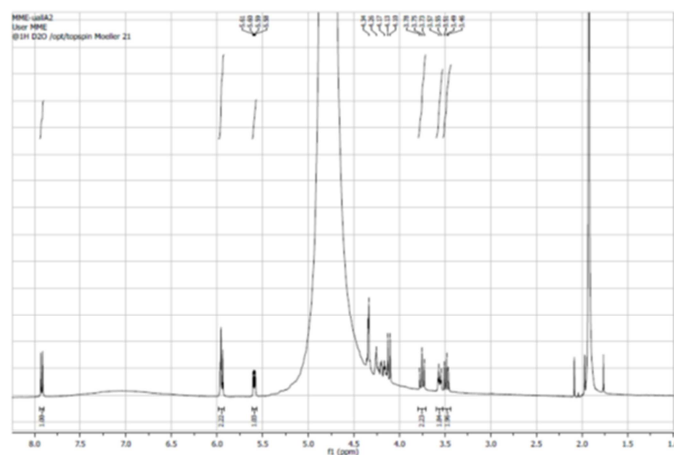


Abbildung 72: ¹H-NMR Spektrum von UDP-α-D-GlcA

Das Spektrum wurde aufgenommen in D₂O (400 MHz; 30°C) mit einem Bruker AV 400 Ultra Shield Spektrometer. Die chemische Verschiebung ist angegeben in δ-Maßstab [ppm] und die Kopplungskonstanten in Hertz.

δ=7,92 (d, $J=8,14$ Hz, 1H, Ura H-6''); 5,96 (m, 2H, Rib H-1', Ura H-5''); 5,61 (d, $J=3,44$ Hz, 0,5 H, GlcA-α H-1*); 5,59 ($J=3,46$ Hz, 0,5 H, GlcA-α H-1**); 4,34 (m, Rib H-2'; Rib H-3'); 4,26 (m, Rib H-4'); 4,17 (m, Rib H-5'); 4,12 (d, $J=10,2$ Hz; 2H, GlcA H-5); 3,75 (t; $J=9,46$ Hz; 2H, GlcA H-3); 3,56 (dt, $J=9,79$ Hz, 2H, GlcA H-2); 3,49 (t, $J=9,39$ Hz, 2H, GlcA H-4)

4.2.2 Ein-Topf Synthese von UDP-GlcA durch Kopplung des SuSy-Moduls mit dem UGDH-Modul (Modul B + Modul C)

Der einstufigen Synthese von UDP-GlcA sollte eine kombinatorische Synthesestrategie ausgehend von UDP und der preiswerten Saccharose gegenübergestellt werden (Abbildung 12). In Modul B wird die Saccharose Synthase 1 verwendet zur Synthese von UDP-Glc. Zur Expression von *sus1* standen zwei unterschiedliche Systeme zur Verfügung. Die Charakterisierung von SuSy1 produziert in Hefe erfolgte bereits durch Römer *et al.* (Römer *et al.* 2004). Sauerzapfe *et al.* führten die Expression von *sus1* in *E. coli* durch (Sauerzapfe *et al.* 2008). Die verschiedenen Expressionsstrategien führten zu rekombinanten Enzymen mit unterschiedlichen biokatalytischen Eigenschaften.

4.2.2.1 Synthese von UDP-GlcA mit SuSy1, produziert in *S. cerevisiae*

Nach Expression von *sus1* in *S. cerevisiae* zeigt das aufgereinigte Enzym eine starke Substratinhibition durch UDP ($K_{is}=0,11$ mM). Aus diesem Grund wurde zunächst zur Kopplung des UGDH-Moduls mit dem SuSy-Modul für die Ausgangssubstrate eine 1 mM UDP-Konzentration und eine 300 mM Saccharose-Konzentration gewählt. Des Weiteren erfolgte aufgrund der unterschiedlichen pH-Profile der Enzyme der Einsatz unterschiedlicher Verhältnisse an Enzymaktivitäten (0,75 U SuSy1; 1,5 U His₆UGDH; 2 U His₆NOX) für das Puffersystem 50 mM Tris-HCl (pH 7,8) bei einer Temperatur von 30°C. Die Synthese (Abbildung 73) im analytischen Maßstab (1 mL) wurde mittels CE-UV Analyse, die eine gute Trennung von UDP, UDP-Glc und UDP-GlcA ermöglicht, kontrolliert. Nach 2 h wurde ein 90%-iger Umsatz von UDP zu UDP-GlcA mittels His₆UGDH verzeichnet. Längere Syntheszeiten bestätigen wieder die chemische Hydrolyse des Nukleotidzuckers.

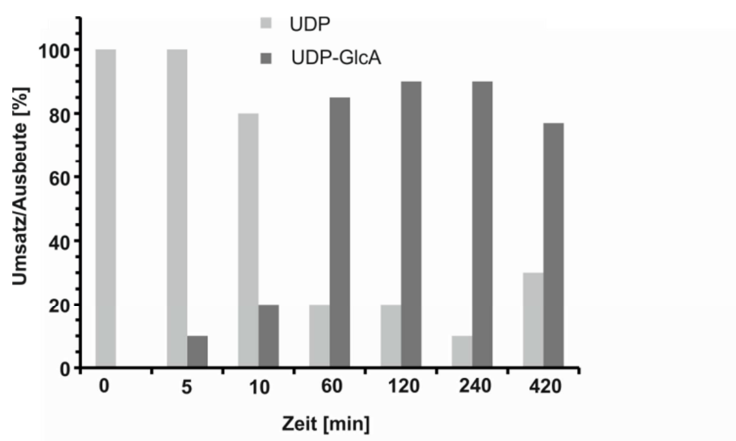


Abbildung 73: Ein-Topf Synthese von UDP-GlcA mit der His₆UGDH und SuSy1, produziert in *S. cerevisiae*, (Modul B + Modul C) im analytischen Maßstab (1 mL)

Die Synthese der UDP-GlcA wurde durchgeführt mit 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 1 mM UDP, 300 mM Saccharose, 0,5 mM NAD⁺, 0,75 U SuSy1 (produziert *S. cerevisiae*), 1,5 U His₆UGDH und 2 U His₆NOX für 7 h bei 30°C. Nach 2 h konnte ein 90%-iger Umsatz von UDP-Glc detektiert werden.

Nach HPLC Trennung von UDP-GlcA aus dem Syntheseansatz (Kapitel 3.12.5.1) bestätigte die Massenspektrometrie (ESI-MS) die erwartete Masse (Abbildung 74). Wiederholt zeigte sich die Masse m/z 403,1, die dem Nukleotid UDP zuzuordnen ist. Insgesamt konnte durch Produktcharakterisierung die Funktionalität der kombinatorischen Synthesestrategie abgesichert werden.

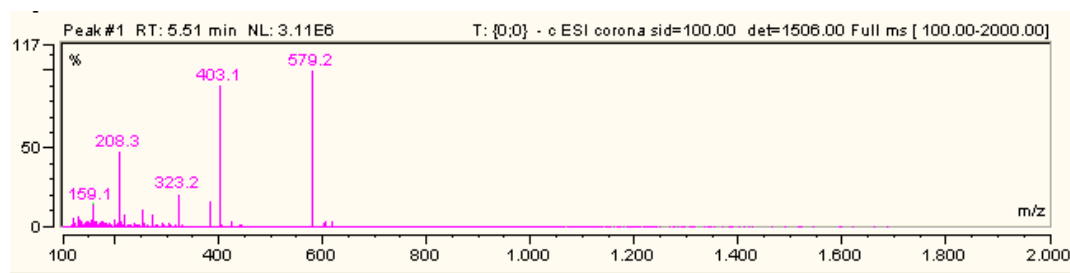


Abbildung 74: ESI-MS Analyse der Ein-Topf Synthese von UDP-GlcA mit der His₆UGDH und SuSy1, produziert in *S. cerevisiae*, (Modul B + Modul C) im analytischen Maßstab

Die detektierte Masse m/z 579,2 für $[M-H]^-$ wurde der berechneten Masse $[M]$ m/z 580,3 zugeordnet.

4.2.2.2 Synthese von UDP-GlcA mit SuSy1, produziert in *E. coli*

Für Susy1, produziert in *E. coli*, wurde ein K_m -Wert für UDP von 0,2 mM und für Saccharose ein K_m -Wert von 80,3 mM berechnet. Zur Kopplung des UGDH-Moduls mit dem SuSy-Modul wurden hier ebenfalls für die Ausgangssubstrate eine 1 mM UDP-Konzentration und eine 300 mM Saccharose-Konzentration für das Puffersystem 50 mM Tris-HCl (pH 7,8) bei einer Synthesetemperatur von 30°C gewählt. Da SuSy1 hier keine Substratinhibition durch UDP zeigt, wurde der Einsatz an Enzymaktivitäten reduziert (0,5 U SuSy1; 1 U His₆UGDH; 1,5 U His₆NOX). Trotz des reduzierten Einsatzes an Enzymaktivitäten konnte mit CE-UV Analyse nach 4 h ein 90%-iger Umsatz von UDP zu UDP-GlcA festgestellt werden (Abbildung 75). Damit entspricht diese Synthese in ihrem Verlauf weitgehend der Synthese von UDP-GlcA mit SuSy1, produziert in Hefe, mit einem 90%-igen Umsatz des Ausgangssubstrates UDP nach 4 h. Die Charakterisierung des Zielproduktes durch MS Analytik (Abbildung 76) sicherte die Integrität des Nukleotidzuckers. Die Funktionalität des gekoppelten SuSy- und UGDH-Moduls konnte auch hier bestätigt werden.

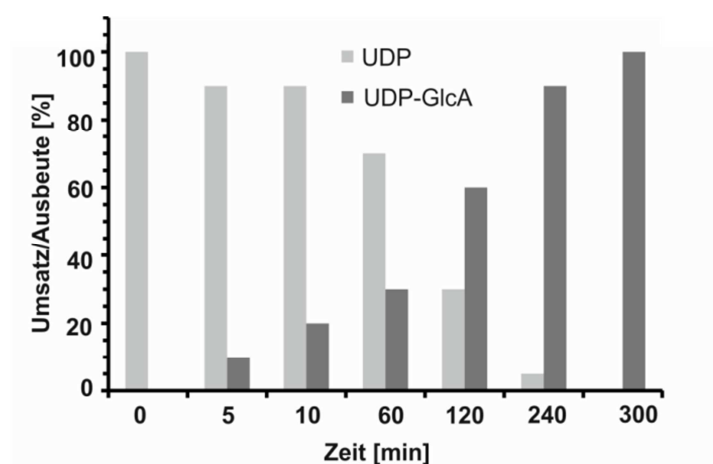


Abbildung 75: Ein-Topf Synthese von UDP-GlcA mit der His₆UGDH und SuSy1, produziert in *E. coli*, (Modul B + Modul C) im analytischen Maßstab (1 mL)

Die Synthese des Nukleotidzuckers UDP-GlcA erfolgte in 50 mM Tris-HCl (pH 7,8) mit 0,5 mM NAD⁺, 1 mM UDP, 300 mM Saccharose, 0,5 U SuSy1 (produziert in *E. coli*), 1 U His₆UGDH und 1,5 U His₆NOX für 5 h bei 30°C.

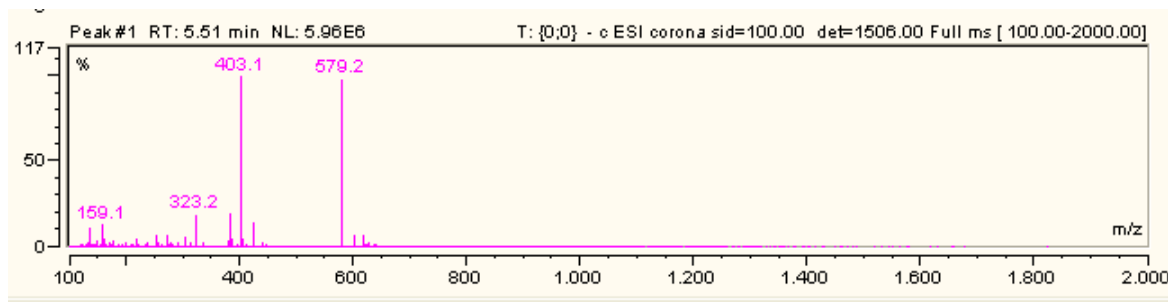


Abbildung 76: ESI-MS Analyse der Ein-Topf Synthese von UDP-GlcA mit der His₆UGDH und SuSy1, produziert in *E. coli*, (Modul B + Modul C) im analytischen Maßstab

Die detektierte Masse m/z 579,2 für $[M-H]^-$ wurde der berechneten Masse $[M]$ m/z 580,3 zugeordnet.

4.2.3 Ein-Topf Synthese von UDP-GlcA durch Kopplung des UMPK-Moduls mit dem SuSy- und UGDH-Modul (Modul A + Modul B + Modul C)

Der letzte kombinatorische Schritt umfasste die Kopplung des UMPK-Moduls mit dem SuSy- und UGDH-Modul (Abbildung 13). Die Charakterisierung der His₆UMPk zeigte eine starke Produktinhibition durch UDP (IC_{50} : 0,096 mM; K_i : 3,5 μ M). Der langsamere Regenerationsprozess des Phosphatdonors ATP durch das PEP/Pyruvatkinase-System sollte die Produktinhibition durch UDP begünstigen. Die Regeneration von ATP ist unbedingt erforderlich, da die His₆UMPk durch ADP in ihrer Enzymaktivität inhibiert wird. Untersuchungen hierzu ergaben einen IC_{50} -Wert von 0,1380 mM (Abbildung 57). Da SuSy1 nach Produktion in *S. cerevisiae* eine starke Substratinhibition durch UDP (K_{is} : 0,1 mM) zeigt, wurde in Modul B SuSy1 aus dem *E. coli* Expressionssystem eingesetzt. Um die reduzierte Enzymaktivität der His₆UMPk bei pH 7,8 (80% Restaktivität) zu kompensieren, wurde ein Überschuss an Kinaseaktivität gewählt, so dass nun folgende Verhältnisse an Enzymaktivitäten eingesetzt wurden: 2 U His₆UMPk; 1 U SuSy1; 2 U His₆UGDH; 2,5 U His₆NOX und 10 U Pyruvatkinase für das Puffersystem 50 mM Tris-HCl (pH 7,8). Die Synthesen im analytischen Maßstab (Abbildung 77) wurden mit 2 mM UMP und 0,2 mM bzw. 0,5 mM und 1 mM ATP gestartet. Wie erwartet ist die Synthese im Ansatz 1 (1 mM ATP) mit der höchsten Startkonzentration des Phosphatdonors ATP die schnellste Reaktion. Der Einsatz von 0,2 mM ATP offenbart sich jedoch als sehr langsam. Aufgrund der starken Produktinhibition durch UDP (EC_{50} : 0,096 mM) wurden im Ansatz 1 nicht mehr als 1,6 mM UMP (80%) umgesetzt. Nach 7 h Synthesezeit wurden laut CE-UV Analyse jedoch nur 1,2 mM UDP-GlcA (Ansatz 1) erzielt. Nach dieser Zeit sind laut Berechnungen in den

Ansätzen noch 0,3-0,5 mM UDP-Glc zu finden. Eine Erhöhung der Konzentration an rekombinanter His₆UGDH könnte für einen schnelleren Umsatz von UDP-Glc sorgen. Eine stark anwachsende UDP-Konzentration ist keinem der untersuchten Ansätze zu beobachten. Die berechnete Konzentration an UDP (0,2 mM) nach 7 h Syntheszeit wird der Hydrolyse von UDP-GlcA zugeordnet. Die massenspektrometrische Charakterisierung der UDP-GlcA (Abbildung 78) bestätigte die Funktionalität des kombinatorischen Systems. Auffallend ist auch hier erneut der Massenpeak von UDP (m/z 403). Zur Optimierung der Synthesestrategie in einem Ansatz ausgehend von 2 mM UMP könnte in zukünftigen Versuchen ein Enzymverhältnis von 2 U His₆UMPCK; 1 U SuSy1; 4 U His₆UGDH; 4,5 U His₆NOX und 10 U Pyruvatkinase verwendet werden. Aufgrund des hohen erforderlichen Enzymeinsatzes und der starken Produktinhibition der His₆UMPCK, die eine Maßstabsvergrößerung in einem Ein-Topf-Batch-Verfahren sehr erschwert, wurde zunächst von weiteren Versuchen abgesehen und eine frühzeitige Evaluation der verschiedenen Synthesestrategien zur Produktion von UDP-GlcA angestrebt.

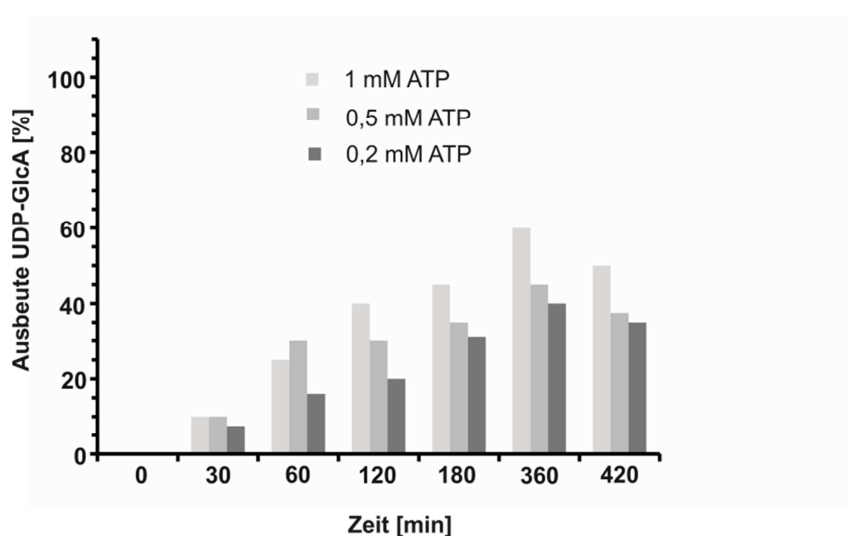


Abbildung 77: Ein-Topf Synthese von UDP-GlcA mit der His₆UMPCK, SuSy1 und His₆UGDH (Modul A + Modul B + Modul C) im analytischen Maßstab (1 mL)

Die Synthese von UDP-GlcA erfolgte in 50 mM Tris-HCl (pH 7,8) mit 0,5 mM NAD⁺, 2 mM UMP, 300 mM Saccharose, 2 U His₆UMPCK, 1 U SuSy1 (produziert in *E. coli*), 2 U His₆UGDH und 2,5 U His₆NOX für 7 h bei 30°C. Die Regeneration von ATP wurde durchgeführt mit 10 U Pyruvatkinase und 6 mM PEP. Als Startkonzentration wurden 1 mM ATP bzw. 0,5 mM ATP und 0,2 mM ATP eingesetzt. Das Diagramm zeigt eine Ausbeute von 1,2 mM UDP-GlcA (Ansatz 1: 1 mM ATP) bzw. 0,9 mM UDP-GlcA (Ansatz 2: 0,5 mM ATP) und 0,8 mM UDP-GlcA (Ansatz 3: 0,2 mM ATP) nach 6 h Syntheszeit. Nach 7 h ist Hydrolyse von UDP-GlcA zu detektieren.

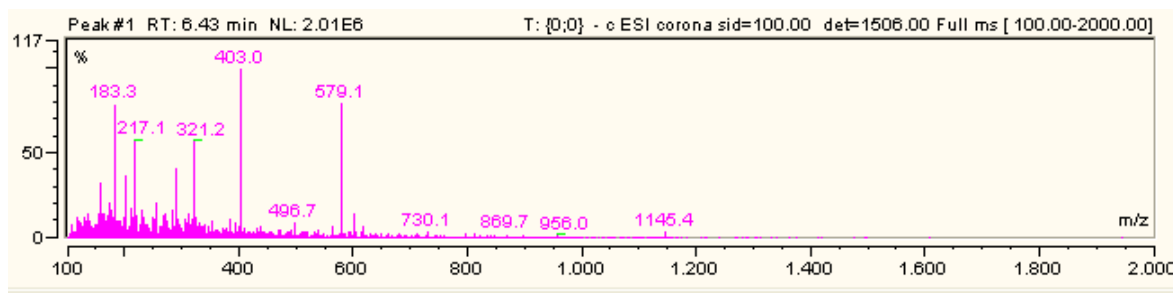


Abbildung 78: ESI-MS Analyse der Ein-Topf Synthese von UDP-GlcA mit der His₆UMPk, SuSy1 und His₆UGDH (Modul A + Modul B + Modul C) im analytischen Maßstab

Die detektierte Masse m/z 579,2 für $[M-H]^-$ wurde der berechneten Masse $[M]$ m/z 580,3 von UDP-GlcA zugeordnet.

4.2.4 Evaluation der Synthesestrategien zur Produktion von UDP-GlcA

Die chemische Instabilität der UDP-GlcA erfordert kurze Synthesezeiten. Standzeiten von mehr als 5 h unter den hier verwendeten Synthesebedingungen sind ungünstig. Folglich ist eine kurze Synthesezeit erforderlich. Kombinatorische Strategien, die Kombination des UGDH-Moduls mit dem SuSy-Modul alleine oder die Kombination des UGDH-Moduls mit dem SuSy-Modul und dem UMPK-Modul, verlangsamten den Syntheseprozess in einem Ein-Topf-Batch-Verfahren. Die unterschiedlichen pH-Optima der involvierten Enzyme verlangen die Einstellung unterschiedlicher Enzymverhältnisse. Die starke Produktinhibition der His₆UMPk durch UDP erschwert die Einstellung der Substratverhältnisse. Die enzymkinetischen Daten der His₆UMPk und der SuSy1 sprechen für ein Fed-Batch-Verfahren oder für einen Membranreaktor. Im Fed-Batch-Verfahren könnten die Ausgangssubstrate UMP und der Phosphatdonor PEP zur Regeneration von ATP stufenweise zugeführt werden. Der Membranreaktor im kontinuierlichen Produktionsmodus lässt eine gleichmäßige geringe Zugabe der Ausgangssubstrate in Anpassung an die bekannten Inhibitionsdaten zu. Nach Diskussion aller Ergebnisse ist eine Produktion von UDP-GlcA auf direktem Weg ausgehend vom UGDH-Modul empfehlenswert. Die Synthese des Nukleotidzuckers (1 g UDP-GlcA/1390 €) mit kombinatorischer Biokatalyse macht die Produktion der rekombinanten Enzyme His₆UMPk und SuSy1 erforderlich, dies ist zeit- und kostenintensiv. Der hohe Preis des Phosphoenolpyruvates (1 g PEP/307 €) und der Pyruvatkinase (10 mg PK/424 €) kann die Kopplung des UMPK-Moduls mit dem SuSy- und UGDH-Modul nicht rechtfertigen. Die Kombination des UGDH-Moduls mit dem SuSy-Modul alleine gestaltet sich nicht wesentlich kostengünstiger, da hier das Substrat UDP

(500 mg UDP/229 €) verwendet werden muss. Dem gegenüber steht der direkte Syntheseweg ausgehend von UDP-Glc (1 g UDP-Glc/432 €). Nach Charakterisierung eignen sich beide rekombinante Dehydrogenasen His₆KfiD und His₆UGDH für die Synthese von UDP-GlcA. Aufgrund der höheren katalytischen Effizienz der His₆UGDH und den höheren Produktausbeute bei der Synthese von UDP-GlcA ist die humane Dehydrogenase jedoch favorisiert. Um die Synthesezeit mit dieser Strategie zu verkürzen, könnte der Einsatz an Enzymmenge erhöht und damit die Hydrolyse des Endproduktes weiter reduziert werden. Die Produktion der Biokatalysatoren His₆NOX und His₆UGDH ist kein limitierender Faktor. Des Weiteren ist die Erhöhung der NAD⁺ Konzentration auf 0,8 mM (2-fach über dem K_m-Wert) denkbar, um die Synthese zu beschleunigen. Mit der Synthese von UDP-GlcA auf direktem Weg unter Einsatz von His₆NOX und His₆UGDH kann das Donorsubstrat für die Synthese von Glukuroniden kosteneffizient bereitgestellt werden.

4.3 Bereitstellung von UDP-Glukuronyltransferasen für die Enzym-Module zur Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops

4.3.1 Klonierung und Expression von *his₆catglcatp* aus *Mus musculus*

Bei der für die Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops ausgesuchten Leloir-Glykosyltransferase GlcAT-P handelt es sich um ein Transmembran-Protein des Golgi-Apparates mit einer C-terminalen lumenalen katalytischen Domäne und einer N-terminalen zytoplasmatischen Domäne. Zur zytoplasmatischen Expression *in E. coli* sollte daher nur die katalytische Domäne des murinen Gens in den Vektor pET46Ek/LIC kloniert werden. Zunächst wurde die Gesamtsequenz des Gens nach Isolation der mRNA aus Maushirn mittels RT-PCR erfolgreich amplifiziert, in einem weiteren Schritt wurde die Sequenz der katalytischen Domäne in den Expressionsvektor pET46Ek/LIC kloniert. Nachdem die Sequenzierung die Integrität des Konstruktes pET46Ek/LIC-*his₆catglcatp* bestätigte, erfolgte die Expression in *E. coli* BL21(DE3). Nach Induktion des Zielproteins mit 100 μ M IPTG und einer Postinduktionszeit von 18 h bei 25°C konnten 19 g Biofeuchtmasse/L TB Medium gewonnen werden.

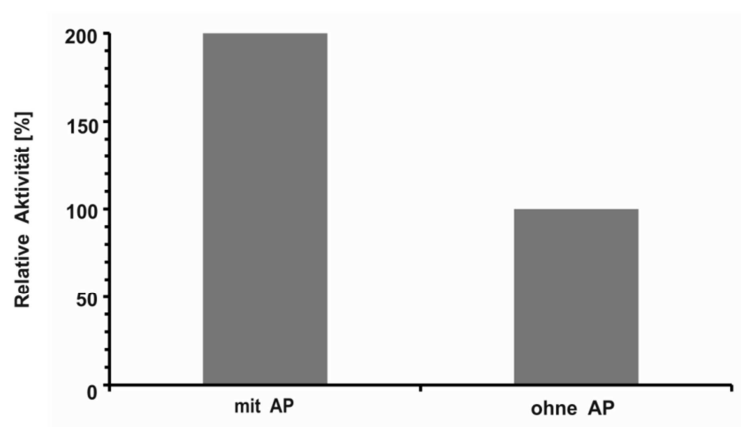
4.3.2 Aufreinigung der His₆catGlcAT-P

Nach Aufreinigung der rekombinanten His₆catGlcAT-P mit Ni²⁺-NTA Sepharose konnten unter optimalen Bedingungen (5 mM DTT, 2 mM MnCl₂) spezifische Aktivitäten bis zu 0,44 U/mg berechnet werden (Tabelle 68). Der Zusatz von 5 mM DTT erhöhte die spezifische Aktivität 1,7-fach. Untersuchungen zur Enzymstabilität unter Synthesebedingungen bei 30°C ergaben eine Halbwertszeit von 61,3 h und ein Inaktivierungskoeffizient *k* von 0,011 (Anhang, Abbildung 152).

Tabelle 68: Aufreinigung der His₆catGlcAT-P mittels Ni²⁺-NTA Sepharose

	Volumen [mL]	Gesamt- aktivität [U]	Gesamt protein [mg]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Aufreinigungs- faktor [-]	Aus- beute [%]
Rohextrakt	15	25,2	420,1	0,06	1,0	100
IMAC-Pool	22	7,7	17,6	0,44	7,3	31

Für eukaryontische Glykosyltransferasen ist bekannt, dass das in der Transferreaktion freiwerdende Nukleotid einen inhibierenden Einfluss auf die Enzymaktivität zeigt (Unverzagt *et al.* 1990). Dies konnte auch hier demonstriert werden. Der Zusatz von 2 U alkalischer Phosphatase erhöhte die spezifische Aktivität 2,4-fach (Abbildung 79). Hierbei wurde die spezifische Aktivität über die Abnahme des Donorsubstrates UDP-GlcA mithilfe der CE-UV Analytik bestimmt

**Abbildung 79: Einfluss von alkalischer Phosphatase (AP) auf die Transferaseaktivität der His₆catGlcAT-P**

Der Einfluss von 2 U alkalischer Phosphatase wurde bei 30°C in 50 mM HEPES-NaOH (pH 6,5) getestet. 100 % relative Aktivität entsprechen 0,38 U/mg.

Detaillierte Daten bezüglich der Proteinaufreinigung fehlen soweit in der Literatur. Im Vergleich zu ProtA-GlcAT-P (Ratte), produziert in COS-1 Zellen, scheint die spezifische Aktivität der murinen His₆catGlcAT-P für das Akzeptorsubstrat Typ 2 LacNAc 60-fach höher zu sein (Kakuda *et al.* 2005). Darüber hinaus übertrifft unsere Expressionsstrategie in *E. coli* die Expression des humanen *glcatp* Gens in *Pichia pastoris*, die zu einer spezifischen

Aktivität von nur 9,83 mU/mg für das Wildtyp-Enzym führt (Fondeur-Gelinotte *et al.* 2007). In Übereinstimmung mit der humanen rekombinanten GlcAT-P zeigen unsere Ergebnisse, dass die heterologe Expression des murinen Glukuronyltransferase-Gens in *E. coli* zu einer Aktivität führt, die dem nativen Enzyms entspricht (Kakuda *et al.* 2004).

Die SDS-PAGE Analyse bestätigte die lösliche Überexpression des Gens. Das detektierte Molekulargewicht von His₆catGlcAT-P entspricht dem theoretischen Wert von 36,8 kDa (Abbildung 80).

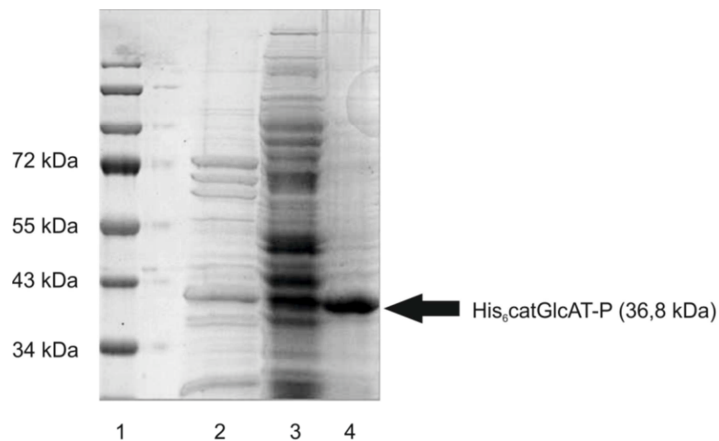


Abbildung 80: SDS-PAGE Analyse (Coomassie Färbung) der His₆catGlcAT-P nach Aufreinigung mittels Ni²⁺-NTA Sepharose

Spur 1: Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas); Spur 2: Zellpellet; Spur 3: Rohextrakt; Spur 4: IMAC-Pool. Das detektierte Molekulargewicht von His₆catGlcAT-P entspricht dem theoretischen Wert von 36,8 kDa.

4.3.3 Biochemische Charakterisierung der His₆catGlcAT-P

4.3.3.1 Einfluss von divalenten Kationen auf die Transferaseaktivität

Untersuchungen zur Transferaseaktivität der His₆catGlcAT-P ließen eine Abhängigkeit der Enzymaktivität von divalenten Metallionen erkennen (Abbildung 81).

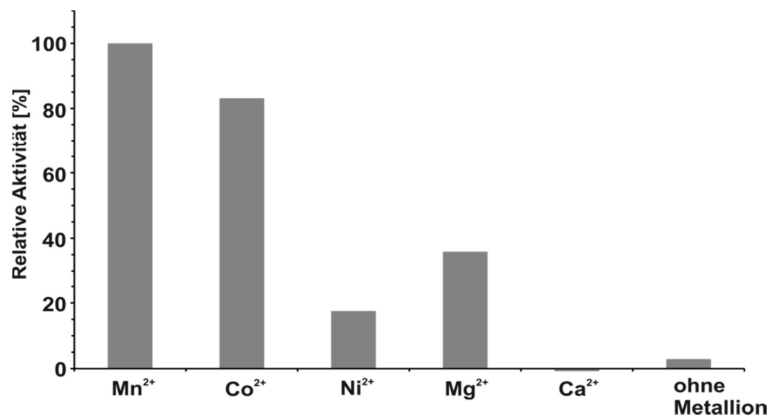


Abbildung 81: Einfluss von divalenten Metallionen auf die Transferaseaktivität der His₆catGlcAT-P

Der Einfluss von 2 mM divalenten Metallionen wurde bei 30°C in 50 mM HEPES-NaOH (pH 6,5) getestet. 100 % relative Aktivität entsprechen 0,37 U/mg.

Die höchste Aktivität wurde in Gegenwart von 2 mM Mn²⁺ (100%), gefolgt von Co²⁺ Ionen (83%) gemessen. Die Zugabe von Mg²⁺ Ionen hatte nur einen moderat aktivierenden Effekt von ca. 30%, wohingegen die Zugabe von Ca²⁺ Ionen zu keiner Aktivität führte. Mit der starken Abhängigkeit der Enzymaktivität von divalenten Metallionen und dem DXD Motiv in der Aminosäuresequenz, welches konserviert ist bei Leloir-Glykosyltransferasen (Negishi *et al.* 2003), gehört His₆catGlcAT-P zur GT-A Strukturfamilie mit einer Rossmann-ähnlichen Struktur, bestehend aus 12 β -Faltblättern und 7 α -Helices (Breton *et al.* 2006). Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit der humanen GlcAT-P (Anhang, Abbildung 137), die ebenfalls eine GT-A Struktur aufweist (Kakuda *et al.* 2004).

4.3.3.2 Bestimmung des Temperatur- und pH-Optimums

Bei der Überprüfung des Temperatur- und pH-Optimums der His₆catGlcAT-P konnte ein pH-Optimum bei pH 6,5 (Abbildung 82) und ein Temperatur-Optimum bei 45°C in 50 mM HEPES-NaOH Puffer (Abbildung 83) detektiert werden.

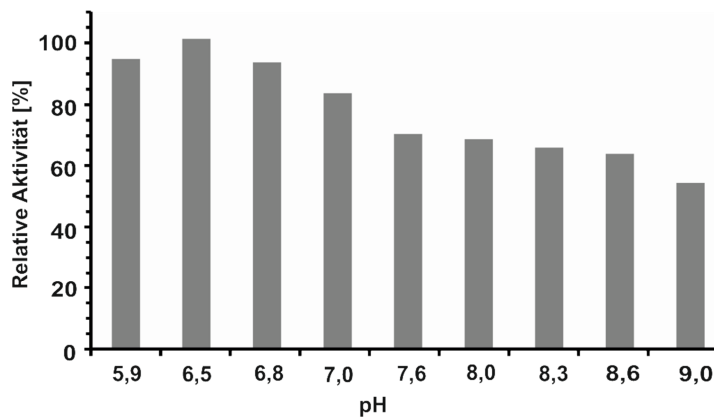


Abbildung 82: Bestimmung des pH-Optimums der His₆catGlcAT-P

Das pH-Optimum wurde in 50 mM HEPES-NaOH Puffer (pH 5,9-7,0) und 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,6-9,0) bei 30°C bestimmt. 100% relative Aktivität von His₆catGlcAT-P in 50 mM HEPES-NaOH Puffer entsprechen 0,44 U/mg.

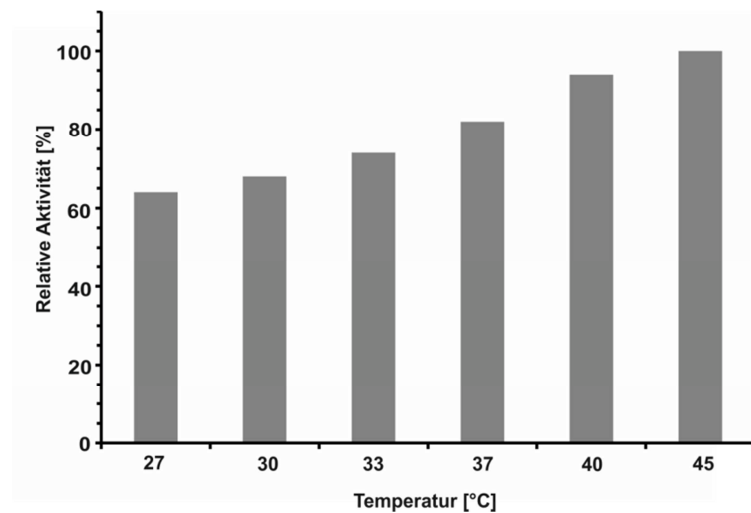


Abbildung 83: Bestimmung des Temperatur-Optimums der His₆catGlcAT-P

Der Temperatureinfluss auf die Enzymaktivität von His₆catGlcAT-P wurde in 50 mM HEPES-NaOH (pH 6,5) gemessen. 100% Aktivität bei 45°C entsprechen 0,55 U/mg.

4.3.3.3 Untersuchung des Akzeptorsubstratspektrums

Zur Untersuchung des Akzeptorsubstratspektrums wurden Substrate nach Kapitel 3.7.3.7 getestet (Abbildung 84 und Tabelle 69). Die murine His₆catGlcAT-P ist sehr spezifisch gegenüber Typ 2 LacNAc-Strukturen (Nr. 4 und Nr. 8 in Tabelle 69). Die strikte Stereo- und Regioselektivität der Glykosyltransferase stehen in Übereinstimmung mit der humanen GlcAT-P und der GlcAT-P der Ratte (Kakuda *et al.* 2005, Fondeur-Gelinotte *et al.* 2007). Unter den getesteten Akzeptorsubstraten zeigt das murine Enzym die höchste Aktivität für das Disaccharid LacNAc (Nr. 4). Die Linker-Struktur scheint die Enzymaktivität auf unterschiedliche Weise zu beeinflussen. Der hydrophobere *t*-Boc-Linker wird besser akzeptiert als der Azid-Linker (Nr. 5 und Nr. 6). Darüber hinaus spiegelt sich dieser Einfluss auch in der Akzeptanz des Enzyms für die Substrate Laktose und Octyllaktose (Nr. 2 und Nr. 3) wider. Das Tetrasaccharid mit zwei LacNAc Einheiten offenbart sich ebenfalls als gutes Akzeptorsubstrat. Laktulose und das Trisaccharid Raffinose erweisen sich als neue Substrate (Nr. 9 und Nr. 10). Für Raffinose mit α 1-verknüpfter Gal zeigt das murine Enzym jedoch eine geringere Akzeptanz. Dieses Ergebnis unterstreicht die Hypothese der starken Präferenz für β -verknüpfte Gal.

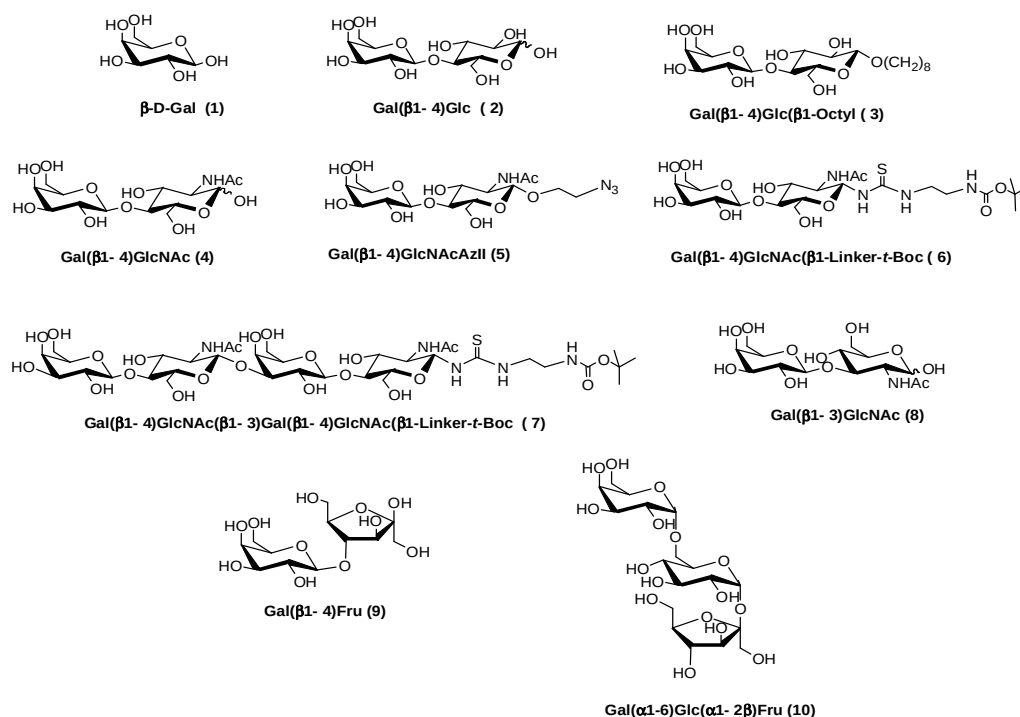


Abbildung 84: Akzeptorsubstratspektrum der His₆catGlcAT-P

2 mM Akzeptorsubstrat wurden mit 2 mM UDP-GlcA in 50 mM HEPES-NaOH Puffer (pH 6,5) untersucht. 100% relative Aktivität der His₆catGlcAT-P entsprechen 0,38 U/mg.

Tabelle 69: Akzeptorsubstrate der His₆catGlcAT-P

Nr.	Substrat	Relative Aktivität [%]
1	D-Gal	ND
2	Gal(β1-4)Glc	18
3	Gal(β1-4)Glc(β1-Octyl	33
4	Gal(β1-4)GlcNAc	100
5 ^a	Gal(β1-4)GlcNAc AzII	20
6 ^b	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-Linker- <i>t</i> -Boc	116
7 ^b	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-Linker- <i>t</i> -Boc	55
8	Gal(β1-3)GlcNAc	ND
9	Gal(β1-4)Fru	35
10	Gal(α1-6)Glc(α1-2)Fru	6,7

^a siehe Adamiak *et al.* und Anders *et al.* für die Synthese des Substrates (Anders *et al.* 2011, Adamiak *et al.* 2012)

^b siehe Rech *et al.* (Rech *et al.* 2011) für die Synthese des Substrates
 ND: keine Aktivität detektiert

4.3.3.4 Bestimmung der Substratkinetiken

Im Anschluss an die Bestimmung des Akzeptorsubstratspektrums wurde für das Donorsubstrat UDP-GlcA und für die ausgewählten Akzeptorsubstrate LacNAc und für LacNAc-Linker-*t*-Boc eine kinetische Charakterisierung vorgenommen (Tabelle 70, Abbildung 85 und Abbildung 86).

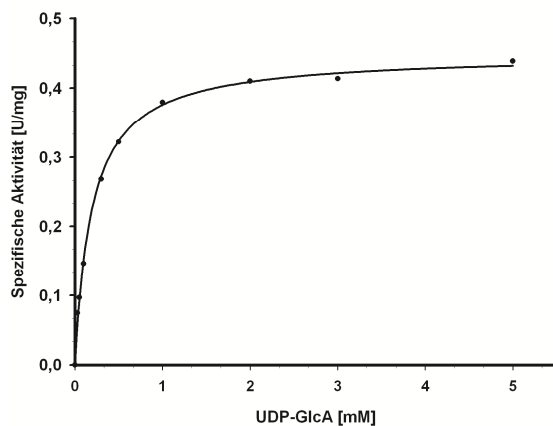


Abbildung 85: Kinetische Analyse der His₆catGlcAT-P für das Donorsubstrat UDP-GlcA

Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mithilfe der Software Sigma Plot 10.0. Die kinetischen Daten wurden durch nicht lineare Regressionsanalyse der experimentellen Daten bestimmt. Bei den vorliegenden hyperbolen Verläufen der Kurven wurden die kinetischen Konstanten K_m und V_{max} mit der Michaelis-Menten-Gleichung bestimmt. Die Untersuchungen ergaben für UDP-GlcA einen K_m -Wert von 0,19 mM (R^2 : 0,9982; V_{max} : 0,45 U/mg).

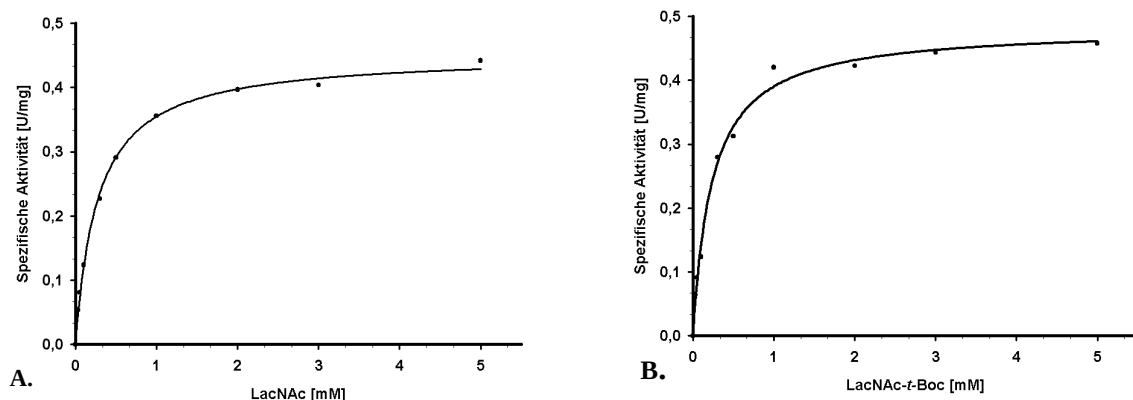


Abbildung 86: Kinetische Analyse der His₆catGlcAT-P für die Akzeptorsubstrate Typ 2 LacNAc (A.) und LacNAc-Linker-*t*-Boc (B.)

Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mithilfe der Software Sigma Plot 10.0. Die kinetischen Daten wurden durch nicht lineare Regressionsanalyse der experimentellen Daten bestimmt. Bei den vorliegenden hyperbolen Verläufen der Kurven wurden die kinetischen Konstanten K_m und V_{max} mit der Michaelis-Menten-Gleichung bestimmt. Die Untersuchungen ergaben für das Akzeptorsubstrat Typ 2 LacNAc einen K_m -Wert von 0,28 mM (R^2 : 0,9976; V_{max} : 0,45 U/mg) und für LacNAc-Linker-*t*-Boc einen K_m -Wert von 0,24 mM (R^2 : 0,9934; V_{max} : 0,48 U/mg).

Die rekombinante humane GlcAT-P zeigt für Typ 2 LacNAc mit einem K_m -Wert von 0,49 mM eine in der Größenordnung mit Literaturdaten vergleichbare Affinität (Fondeur-Gelinotte *et al.* 2007). In dieser Arbeit wurde der K_m -Wert mit einer HPLC Methode bestimmt. Ein direkter Vergleich ist aufgrund der unterschiedlich angewendeten Methoden nicht sinnvoll. Für das rekombinante Enzym aus der Ratte ermittelten Kakuda *et al.* einen

K_m -Wert von 0,065 mM für UDP-GlcA (Kakuda *et al.* 2005). Hier wurde die K_m -Wert-Bestimmung mit UDP-[^{14}C]-GlcA durchgeführt, eine Methode die wesentlich sensitiver ist. Mit der etwas besseren katalytischen Effizienz für das modifizierte LacNAc Substrat zeigt die GlcAT-P Präferenz für hydrophobere Akzeptorsubstrate. Die Bestimmung der katalytischen Effizienz an Hand von vorhandenen Literaturdaten ist nicht möglich, so dass ein Vergleich nicht durchgeführt werden kann. Interessanterweise ergaben weitere Inhibitionsstudien keine Hinweise auf eine Inhibition von His₆catGlcAT-P durch die Substrate Saccharose und UDP-Glc (Abbildung 87). Nach der Charakterisierung bleibt festzustellen, dass die rekombinante His₆catGlcAT-P sich sehr gut für die Einbindung in das geplante EMS eignet. Die Untersuchungen zur Charakterisierung wurden von B. Sc. Vera Werthmann im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.

Tabelle 70: Kinetische Daten der rekombinanten His₆catGlcAT-P

Substrat	K_m [mM]	K_{cat} [min ⁻¹]	K_{cat}/K_m [min ⁻¹ *mM ⁻¹]
UDP-GlcA	0,19	4,20	22,11
Typ 2 LacNAc	0,28	4,20	15,00
LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc	0,24	4,48	18,67

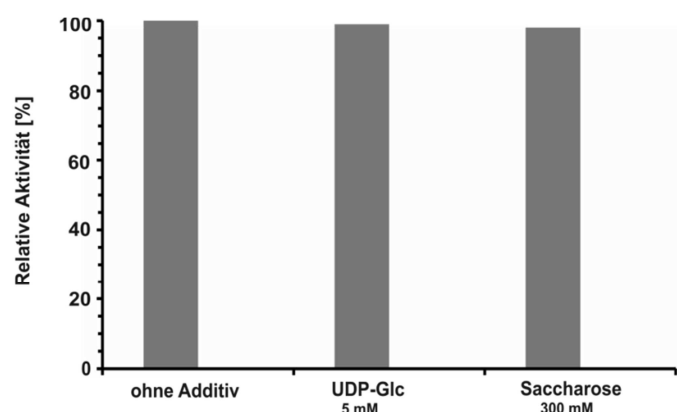


Abbildung 87: Kreuzinhibition der His₆catGlcAT-P durch UDP-Glc und Saccharose

Die Kreuzinhibition durch UDP-Glc und Saccharose wurde mithilfe des Fotometertests (Kapitel 3.7.3.1) durch Zugabe von 0,02-5 mM UDP-Glc und 300 mM Saccharose untersucht. 100% relative Aktivität entsprechen 0,3 U/mg.

4.3.4 Klonierung und Expression von *his₆catglcats* aus *Mus musculus*

Im Gegensatz zu GlcAT-P zeigt GlcAT-S (*Homo sapiens* und *Rattus norvegicus*) neben der Akzeptanz von Typ 2 LacNAc auch die Akzeptanz von Lakto-N-biose (Gal(β1-3)GlcNAc, Typ 1 LacNAc) (Morita *et al.* 2008). Um auch hier diese Möglichkeit zu nutzen, glukuronidierte Typ 1 LacNAc-Strukturen zu synthetisieren, wurde die katalytische Domäne des murinen Gens aus dem Gehirn analog dem Prozedere von GlcAT-P in den pET46Ek/LIC Vektor kloniert. Das Sequenzierungsergebnis bestätigte bis auf eine Abweichung die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz des Wildtyp-Proteins und des rekombinanten Enzyms ohne Transmembrandomäne. Hier handelt es sich um einen Austausch der Aminosäure Valin gegen Alanin am C-Terminus (Anhang, Abbildung 138). Diese Abweichung wird in der Expasy Datenbank <http://www.uniprot.org/uniprot/P59270> jedoch als Konflikt bezeichnet.

4.3.4.1 Expression von *his₆catglcats* in *E. coli* BL21(DE3)

Bei der Expression von *his₆catglcats* in *E. coli* BL21(DE3) wurden die gleichen Expressions- und Induktionsbedingungen, die bereits bei dem P-Enzym zum Erfolg geführt hatten, genutzt. Nach der Zellernte konnten 15 g Biofeuchtmasse/L TB Medium erzielt werden. Die Aufreinigung zeigte ein gutes Elutionsprofil nach Elution des Zielproteins mit 300 mM Imidazol (Abbildung 88).

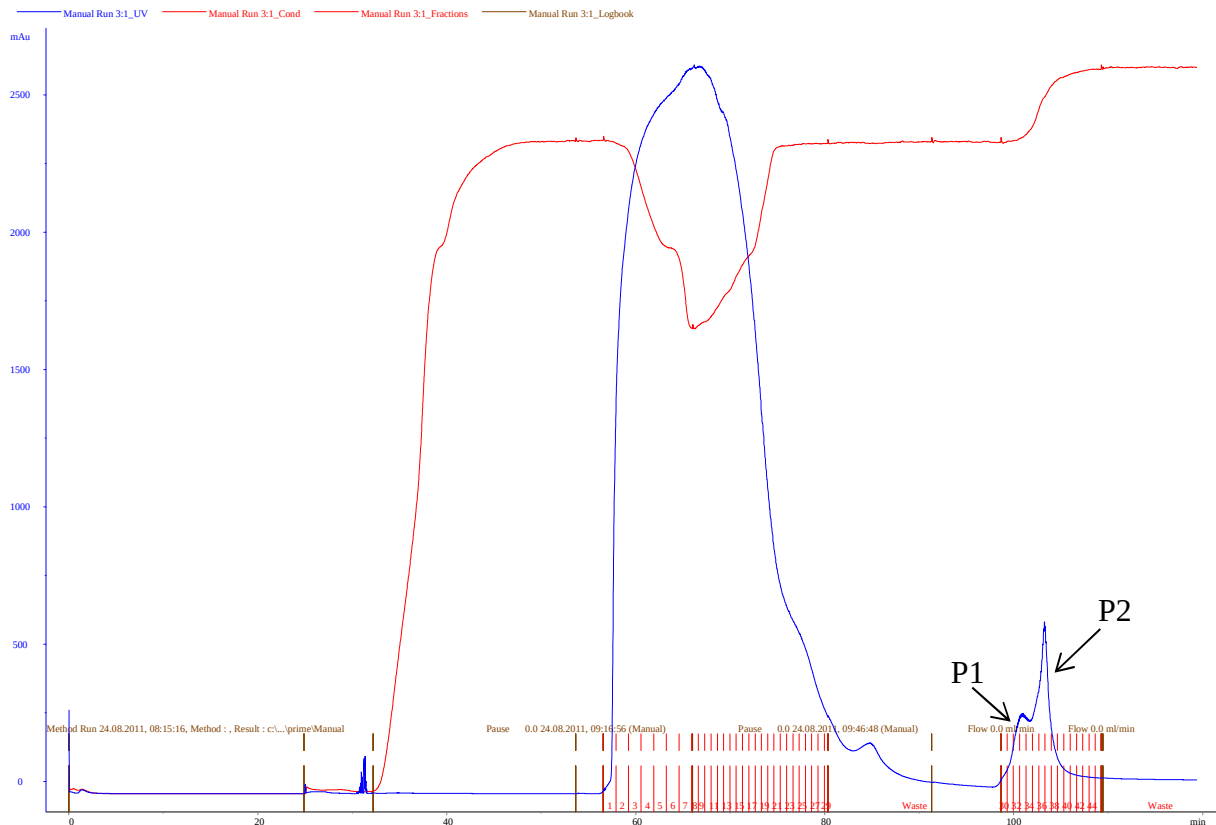


Abbildung 88: Aufreinigung der His₆catGlcAT-S über IMAC nach Expression des Gens in *E. coli* BL21(DE3)

Die IMAC Aufreinigung der His₆catGlcAT-S nach Expression des Gens in *E. coli* BL21(DE3) wurde über eine Säule mit einem Gelbettvolumen von 18 mL (Höhe: 9 cm, Radius: 0,8 cm) durchgeführt. Die Äquilibration der Säule wurde mit 5 Volumen Lysepuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8) bei einer Fließgeschwindigkeit von 3 mL/min durchgeführt. Nach dem Auftragen von 15 mL Rohextrakt bei halber Fließgeschwindigkeit wurde die Säule zunächst mit 2 Volumen Lysepuffer und dann mit 3 Volumen Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8; 0,3 M NaCl; 1 mM DTT; 20 mM Imidazol) gewaschen. Die Elution der His₆catGlcAT-S erfolgte mit dem Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8; 0,3 M NaCl; 0,3 M Imidazol; 20% Glycerin (V/V)). Das Chromatogramm zeigt die Absorption bei 280 nm (–) und die Leitfähigkeit [mSiemens] (–). Es wurden zwei unterschiedliche Enzymfraktionen gepoolt (P1 und P2).

Während der Aufreinigung wurden die Durchflussfraktionen, d. h. die Proteine, die nicht an das Ni²⁺-NTA-Säulenmaterial binden, getrennt aufgefangen, um sie mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse zu analysieren. Es wurden zwei unterschiedliche Enzymfraktionen gepoolt (P1 und P2). Insgesamt zeigt die Peakspitze mit mehr als 500 mAU eine deutliche UV-Absorption, der Elutionspeak ist vergleichbar mit dem Elutionsverhalten vieler Leloir-Glykosyltransferasen. Der Bradford Test ergab eine Proteinkonzentration für den Pool P1 von 0,4 mg/mL und für den Pool P2 von 2 mg/mL Protein, eine durchaus durchschnittliche Proteinkonzentration. Die SDS-PAGE Analyse und der anschließende Western Blot diente zur Detektion des Zielproteins und zur Überprüfung der Aufreinigung (Abbildung 89).

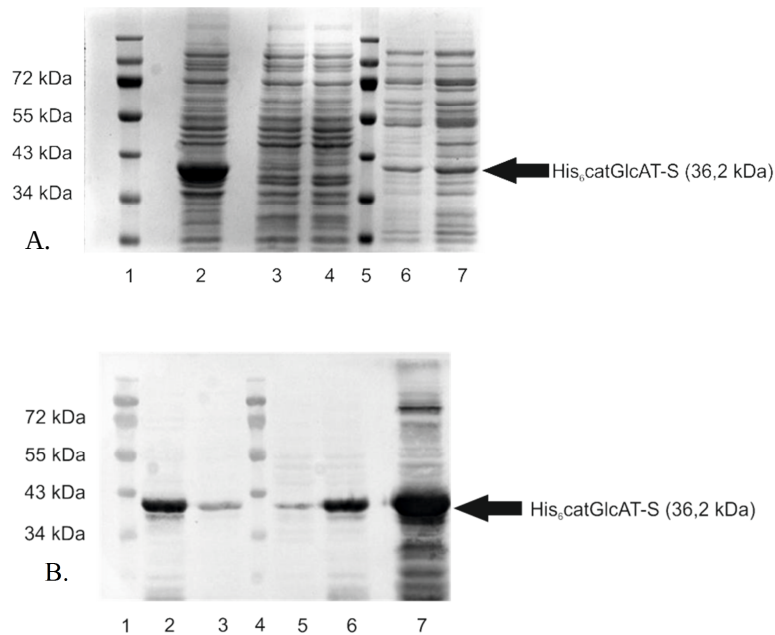


Abbildung 89: SDS-PAGE und Western Blot Analyse der His₆catGlcAT-S, produziert in *E. coli* BL21(DE3)

A. SDS-PAGE (Coomassie Färbung), Spur 1: Proteinmarker (PageRuler™Prestained Protein Ladder, Fermentas); Spur 2: Zellpellet; Spur 3: Rohextrakt; Spur 4: Durchfluß; Spur 5: Proteinmarker; Spur 6: IMAC Pool P1; Spur 7: IMAC Pool P2. **B.** Western Blot, Spur 1: Proteinmarker (PageRuler™Prestained Protein Ladder, Fermentas), Spur 2: IMAC Pool P2; Spur 3: IMAC Pool P1; Spur 4: Proteinmarker; Spur 5: Durchfluss; Spur 6: Rohextrakt; Spur 7: Zellpellet. His₆catGlcAT-S weist ein apparentes Molekulargewicht von ca. 37-40 kDa auf.

Die SDS-PAGE Analyse lässt erkennen, dass sich in jeder der untersuchten Proben eine Bande von ca. 37-40 kDa detektieren lässt. Die theoretisch berechnete Größe des rekombinanten Proteins beträgt 36,2 kDa. Die abweichende Größe kann aufgrund der selbstgefertigten SDS-Gele zurückzuführen sein, die oft nicht gleichmäßig polymerisiert sind und deshalb ein verändertes Laufverhalten hervorrufen. Ein weiterer Grund könnte der 32% Anteil an Glutamin- und Asparaginsäure sein, der die Anlagerung mit SDS erschwert und deshalb zu einer reduzierten Mobilität führt (Mizanur und Pohl 2008). Auffallend ist die starke Bande des putativen Zielproteins im Zellpellet. Dies deutet auf die Bildung von „inclusion bodies“ hin, einem falschgefalteten Proteinaggregat und damit auch inaktivem Protein. Die Proben des IMAC-Pools P1 und P2 zeigen schwache Banden, die gering von der erwarteten Größe abweichen. Darüber hinaus wird auch klar, dass die Ni²⁺-NTA-Aufreinigung nicht zu einem homogen aufgereinigten Protein führte. Eine Überexpression des His₆catGlcAT-S im Rohextrakt ist ebenfalls nicht zu detektieren. Die Probe des Durchflusses zeigt auch keinen größeren Anteil von nicht gebundenem Zielprotein. Die Western Blot

Analyse (Abbildung 89) lieferte jedoch mehr Informationen. Mit dem spezifischen His₆-Antikörper im Western Blot ließ sich das rekombinante Fusionsprotein in allen untersuchten Fraktionen nachweisen. Auch hier weicht die experimentell ermittelte Masse von der theoretischen geringfügig ab. Der Hauptanteil der His₆catGlcAT-S wurde als „inclusion bodies“ im Zellpellet vorgefunden. Darüber hinaus schien das Enzym diesmal jedoch auch in löslicher Form aufzutreten. Bei der Überprüfung der enzymatischen Aktivität beider IMAC-Pools P1 und P2 konnte keine Transferaseaktivität mittels Fotometertest (Kapitel 3.7.3.1) für die Akzeptorsubstrate Typ1 LacNAc und Typ 2 LacNAc detektiert werden. Die CE-UV Analyse bestätigte das Ergebnis. Es konnte hier keine Freisetzung von UDP beobachtet werden, die auf eine Transferaseaktivität hinweist (Abbildung 90).

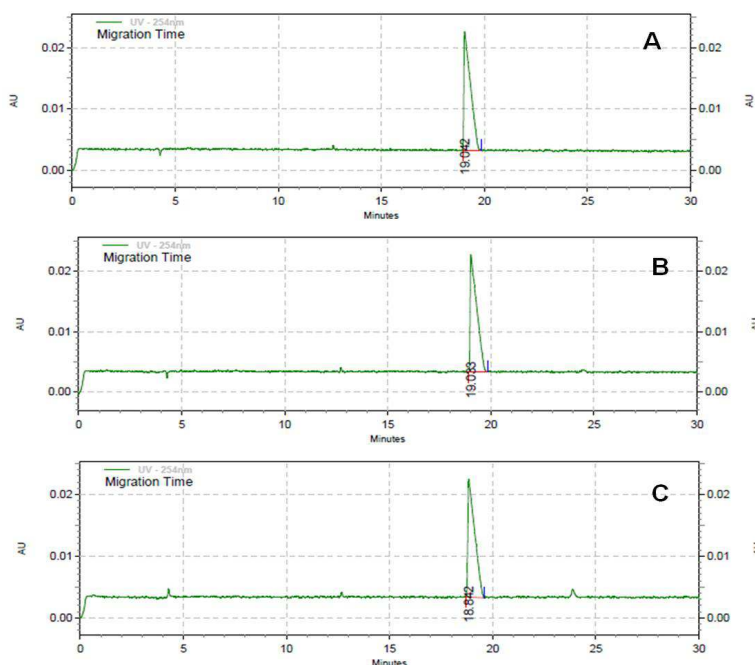


Abbildung 90: CE-UV Elektropherogramm zur Bestimmung der Aktivität der His₆catGlcAT-S

Die Konzentration des Donorsubstrates UDP-GlcA (2 mM) wurde mittels UV-Absorption bei 254 nm nach 0 min (Abbildung A), 60 min (Abbildung B) gemessen. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Enzym nach 60 min (Abbildung C). Die Elektropherogramme zeigen keine Freisetzung von UDP, die auf eine Transferaseaktivität hinweist.

In weiteren Untersuchungen wurde eine HPLC Analyse mit dem Akzeptormolekül LacNAc-Linker-*t*-Boc durchgeführt. Hier ist es möglich, gleichzeitig die sich verändernden Konzentrationen des Eduktes LacNAc-Linker-*t*-Boc und des Produktes GlcA-LacNAc-Linker-*t*-Boc über HPLC Analytik zu verfolgen (Kapitel 3.12.5.2). Doch auch hier konnte kein Transfer von UDP-GlcA detektiert werden (Abbildung 91).

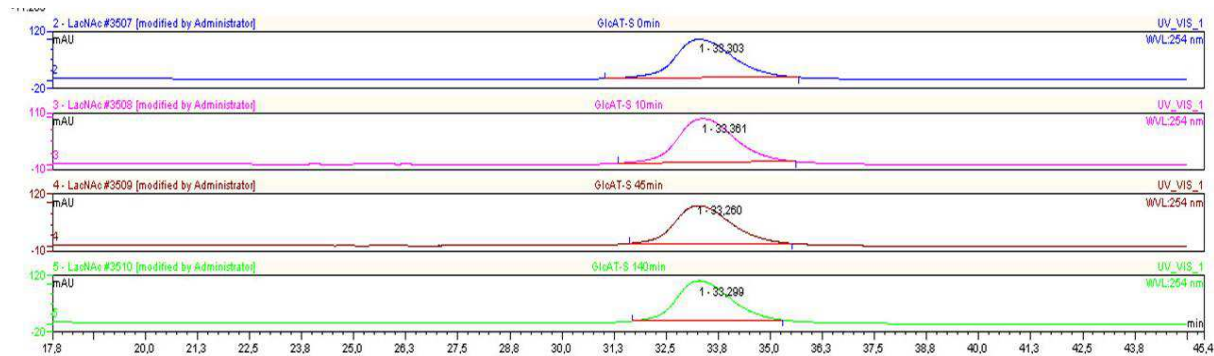


Abbildung 91: HPLC-Chromatogramm zur Bestimmung der Aktivität der His₆catGlcAT-S

Die Bestimmung der Aktivität von His₆catGlcAT-S mittels HPLC erfolgte mit dem Akzeptorsubstrat LacNAc-Linker-*t*-Boc. Hier können gleichzeitig die sich verändernden Konzentrationen des Eduktes LacNAc-Linker-*t*-Boc und Produktes GlcA-LacNAc-Linker-*t*-Boc verfolgt werden. Proben nach 0 min, 10 min, 45 min und 140 min zeigen keinen Transfer von UDP-GlcA, lediglich das Ausgangssubstrat ist zu detektieren.

4.3.4.2 Expression von *his₆catglcats* in *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS

Nach den ersten erfolglosen Versuchen zur Produktion von aktiver His₆catGlcAT-S wurde mithilfe des Tools ExPASyProtParam (www.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam) eine Analyse der Aminosäuresequenz angestrebt. Hier ergab sich ein Gesamtanteil von 33% Arginin, 27% Leucin, 7% Isoleucin, 26% Prolin, und 16% Glycin. Die Translation dieser Aminosäuren in *E. coli* ist aufgrund der Bereitstellung von tRNAs, die seltenen Codons entsprechen, schwierig. Der *E. coli* Rosetta Stamm besitzt ein zusätzliches Plasmid, um die Bereitstellung dieser tRNAs zu gewährleisten. Um dieses Problem des seltenen „codon usage“ in *E. coli* BL21(DE3) auszuschließen, wurde in einem nächsten Schritt der *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS Stamm zur Expression genutzt. Die Expressionsbedingungen erfolgten analog den Konditionen des P-Enzyms. Nach Expression wurden 14,3 g *E. coli* /L TB Medium geerntet. Abbildung 92 präsentiert das Aufreinigungschromatogramm mit einem deutlichen Elutionspeak nach Elution mit 300 mM Imidazol. Die Fraktionen des Elutionspeaks mit einer Proteinkonzentration von 0,73 mg/mL wurden hinsichtlich der Aktivität mit dem Fotometertest und der CE-UV Analyse überprüft. Jedoch konnte auch mit dieser Strategie keine Transferaseaktivität festgestellt werden. Darüber hinaus konnte die Zugabe von 2 mM oder 5 mM DTT, die reduzierte SH-Gruppen des Cysteins garantieren, die Aktivitätsergebnisse der His₆catGlcAT-S nicht verbessern.

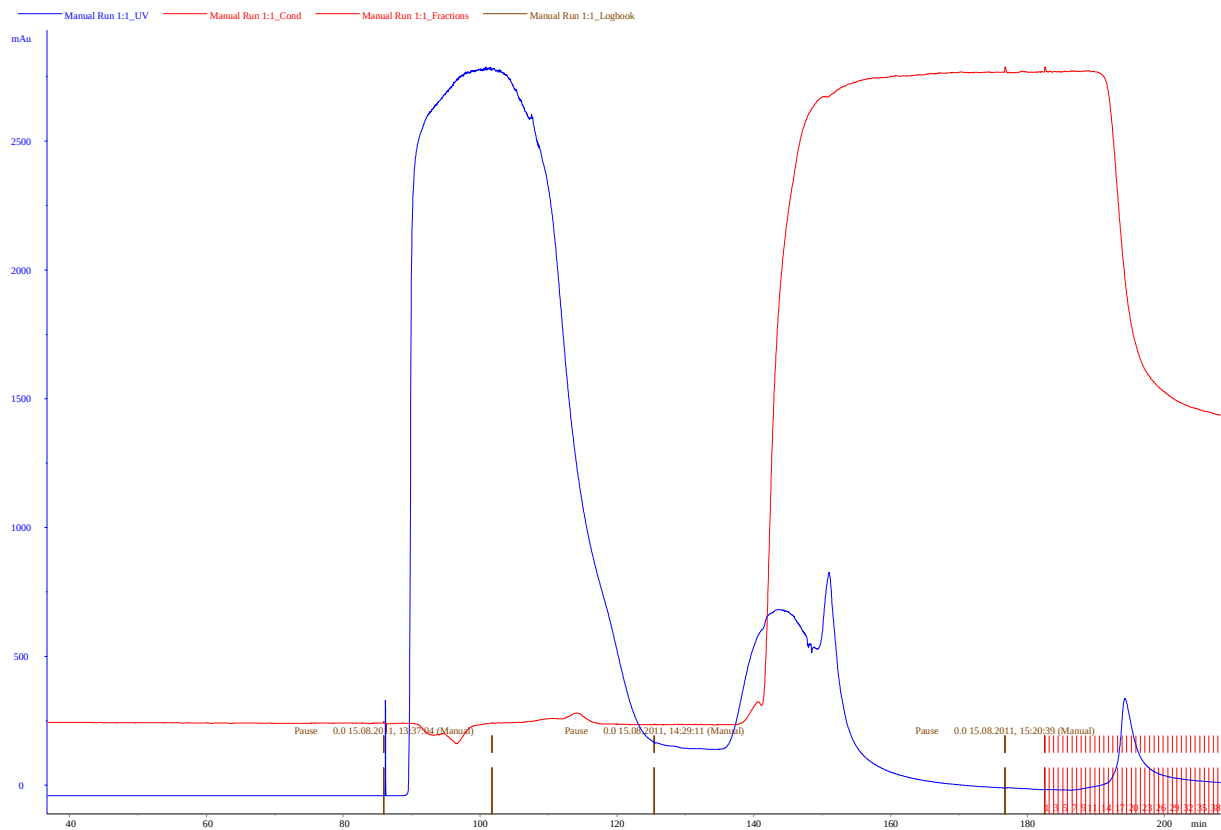


Abbildung 92: Aufreinigung der His₆catGlcAT-S über IMAC nach Expression des Gens in *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS

Die IMAC Aufreinigung der His₆catGlcAT-S nach Expression des Gens in *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS wurde über eine Säule mit einem Gelbettvolumen von 18 mL (Höhe: 9 cm, Radius: 0,8 cm) durchgeführt. Die Äquilibration der Säule wurde mit 5 Volumen Lysepuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8) bei einer Fließgeschwindigkeit von 3 mL/min durchgeführt. Nach dem Auftragen von 15 mL Rohextrakt bei halber Fließgeschwindigkeit wurde die Säule zunächst mit 2 Volumen Lysepuffer und dann mit 3 Volumen Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8; 0,3 M NaCl; 1 mM DTT; 20 mM Imidazol) gewaschen. Die Elution der His₆catGlcAT-S erfolgte mit dem Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0; 0,3 M NaCl; 0,3 M Imidazol; 20% Glycerin (V/V)). Das Chromatogramm zeigt die Absorption bei 280 nm (–) und die Leitfähigkeit [mSiemens] (–). Die Fraktionen des Elutionspeaks wurden gepoolt.

4.3.4.3 Expression von *his₆catglcats* in *E. coli* Rosetta Origami(DE3)

Viele Proteine benötigen für ihre korrekte Faltung und damit verbunden auch für ihre enzymatische Aktivität die Bildung von Disulfidbrücken. Das Zytoplasma in *E. coli* verfügt jedoch über reduzierende Bedingungen und erschwert somit die Ausbildung der Disulfidbrücken. Der *E. coli* Origami(DE3) Stamm mit einer Mutation in der Glutathion- und Thioredoxin-Reduktase, fördert die Ausbildung von Disulfidbrücken im Zytoplasma von *E. coli*. Obwohl die Sequenzanalyse mithilfe des ExPASyProtParam Tools reduzierte SH-Gruppen der beiden Cystein Aminosäuren vorhersagte, erfolgte zusätzlich aus Absicherungsgründen eine Expression in *E. coli* Origami(DE3). Nach Expression analog den

Bedingungen des P-Enzyms wurden 15 g *E. coli* Origami(DE3) Zellen/L TB Medium erzielt. Das Chromatogramm der Ni^{2+} -NTA-Aufreinigung zeigt einen deutlichen Elutionspeak (Abbildung 93), die Bestimmung des Proteingehaltes der gesammelten Fraktionen lieferte 0,66 mg Protein/mL. Obwohl auch hier die Ausbeute an löslichem Protein zufriedenstellende Ergebnisse lieferte, konnte keine Transferaseaktivität mittels CE-UV Analyse und Fotometertest nachgewiesen werden. Die Verwendung von 50 mM Tris-HCl (pH 7,8) als Puffersystem zur Aufreinigung und auch das Umpuffern der Elutionsfraktionen mit 50 mM HEPES-NaOH (pH 6,5) führten nicht zu dem gewünschten Erfolg.

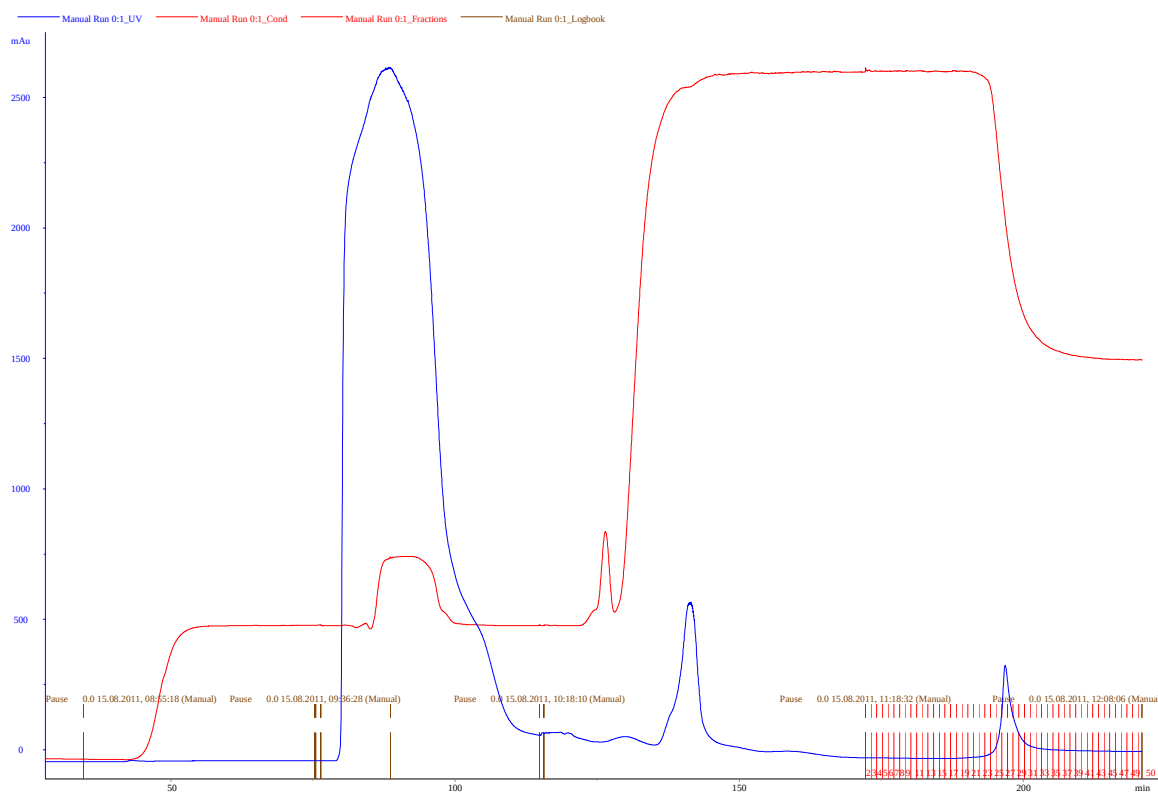


Abbildung 93: Aufreinigung der His₆catGlcAT-S über IMAC nach Expression des Gens in *E. coli* Origami(DE3)

Die IMAC Aufreinigung der His₆catGlcAT-S nach Expression des Gens in *E. coli* Origami(DE3) wurde über eine Säule mit einem Gelbettvolumen von 18 mL (Höhe: 9 cm, Radius: 0,8 cm) durchgeführt. Die Äquilibration der Säule wurde mit 5 Volumen Lysepuffer (50 mM NaH_2PO_4 ; pH 8) bei einer Fließgeschwindigkeit von 3 mL/min durchgeführt. Nach dem Auftragen von 15 mL Rohextrakt bei halber Fließgeschwindigkeit wurde die Säule zunächst mit 2 Volumen Lysepuffer und dann mit 3 Volumen Waschpuffer (50 mM NaH_2PO_4 , pH 8; 0,3 M NaCl; 1 mM DTT; 20 mM Imidazol) gewaschen. Die Elution der His₆catGlcAT-S erfolgte mit dem Elutionspuffer (50 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0; 0,3 M NaCl; 0,3 M Imidazol; 20% Glycerin (V/V)). Das Chromatogramm zeigt die Absorption bei 280 nm (–) und die Leitfähigkeit [mSiemens] (–). Die Fraktionen des Elutionspeaks wurden gepoolt.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass His₆catGlcAT-S relativ gut löslich mit Proteinkonzentrationen von 0,4-2 mg/mL produziert wurde, jedoch konnte keine *in vitro* Aktivität nachgewiesen werden. Die unterschiedlichen Expressionsstrategien wurden von B. Sc. Vera Werthmann im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt. Bisher wurden keine Arbeiten zur Produktion eines aktiven murinen GlcAT-S Enzyms beschrieben. Shiba *et al.* gelang es, das humane Enzym, das 47% Homologie zum murinen Enzym zeigt (Anhang, Abbildung 139), in *E. coli* BL21(DE3)pLysS zu produzieren und aufzureinigen (Shiba *et al.* 2006). Ein Aktivitätsnachweis wird jedoch hier nicht eindeutig beschrieben. GlcAT-S aus der Ratte zeigt nur 97% Homologie zu dem murinen Enzym (Abbildung 139). Für das Fusionsprotein protA-GlcAT-S, aus der Ratte stammend, konnte nach Expression des Gens in COS-1-Zellen die enzymatische Aktivität mittels radioaktiv markierter UDP-GlcA und Oligosacchariden als Akzeptor nachgewiesen werden (Kakuda *et al.* 2005). Für die His₆catGlcAT-S ist das untersuchte Akzeptorsubstrat Typ 2 LacNAc im Gegensatz zu den präferierten Tri- und Tetra-antennären N-Glykanen *in vivo* nicht das natürliche Substrat (Kakuda *et al.* 2005). Dennoch würde man im Fall eines aktiven Enzyms die Spaltung des natürlichen Donorsubstrates UDP-GlcA und damit die Freisetzung von UDP erwarten.

Weitere Untersuchungen mithilfe der ExpasyProtParam Software (www.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam) berechnen für das Protein einen Instabilitätsindex von 62,85 und klassifizieren die rekombinante His₆catGlcAT-S als instabil. Aufgrund dessen wurde das gereinigte Enzym unmittelbar nach der Aufreinigung in die unterschiedlichen Enzymteste eingesetzt, aber auch hier konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Eine Möglichkeit zukünftig aktives Enzym zu produzieren, bietet möglicherweise eine Expression des Fusionsgens in eukaryontischen Zelllinien wie z. B. COS-1 oder CHO-Zelllinien. Imiya *et al.* postulieren 2 potentielle Glykosylierungsstellen für GlcAT-S (Abbildung 94), die in der Ratte und der Maus konserviert sind (Imiya *et al.* 2002). Eine weitere Möglichkeit bietet das „*active site engineering*“ von GlcAT-P durch rationales Design. Das Alignment der Aminosäuresequenzen von His₆catGlcAT-P und His₆catGlcAT-S aus der Maus weist eine Homologie von 52% auf (Abbildung 140). Die Kristallstruktur der humanen GlcAT-S und GlcAT-P konnte von Shiba *et al.* aufgeklärt werden (Shiba *et al.* 2006). Die Aminosäuren Tryptophan²³⁴ und Alanin³⁰⁹ konnten als Aminosäuren, die insbesondere mit der Erkennung der β 1,3-verknüpften Akzeptorsubstrate assoziiert sind, identifiziert werden. Mithilfe einer zielgerichteten Mutagenese, mit der Glycin²³⁴ gegen Tryptophan und Valin³⁰⁹

gegen Alanin in der Aminosäuresequenz von GlcAT-P ausgetauscht werden können, besteht die Möglichkeit die Akzeptorsubstratspezifität zu erweitern.

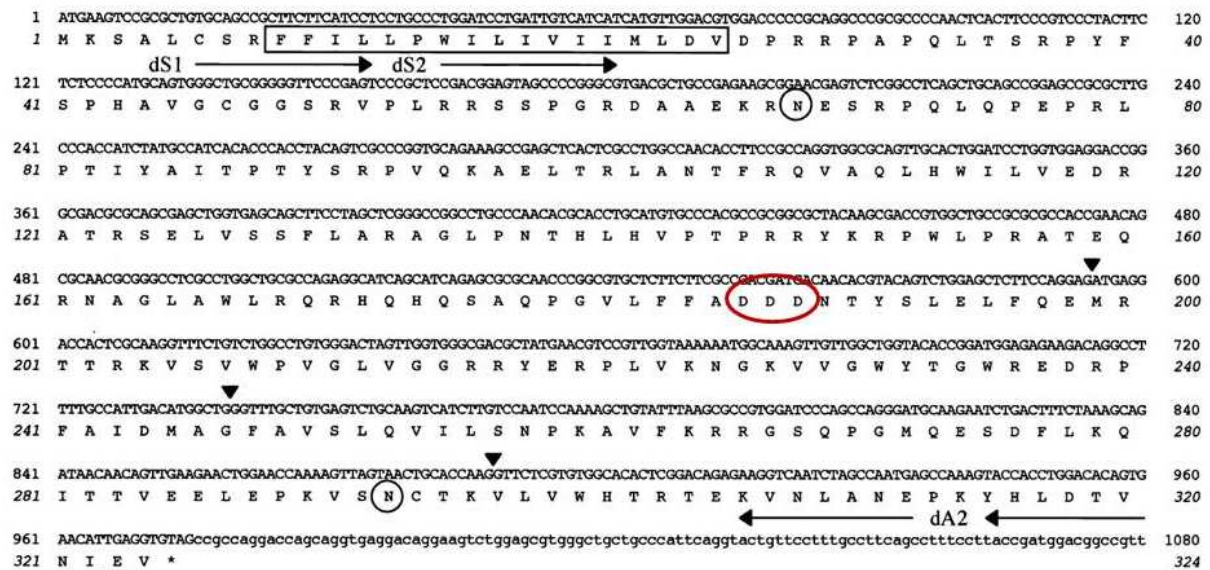


Abbildung 94: Nukleotid- und Aminosäuresequenz der murinen GlcAT-S (Imiya *et al.* 2002)

Die Abbildung zeigt die Nukleotidsequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz. Die Aminosäuren der putativen Transmembranregion sind eingerahmt. Die potentiellen N-Glykosylierungsstellen sind mit einem schwarzen Kreis versehen, wohingegen das charakteristische DXD-Motiv rot markiert ist.

4.4 Entwicklung und Optimierung von modularen Enzym-Kaskaden zur Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops

Basierend auf der Untersuchung des Akzeptorsubstratspektrums der His₆catGlcAT-P wurde das Linker-modifizierte Typ 2 LacNAc als Substrat für die Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops ausgewählt. Um einen optimalen Substratumsatz mit einem minimalen Einsatz an Enzymmengen und an Ausgangssubstraten zu erreichen, wurde das EMS schrittweise kombiniert und zusätzlich *eine in situ* Regeneration von UDP-GlcA etabliert. Die genannten Arbeiten wurden von B. Sc. Manja Henze im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.

4.4.1 Bereitstellung des Akzeptorsubstrates LacNAc-Linker-*t*-Boc

Die Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops erforderte zunächst die Herstellung des Akzeptorsubstrates LacNAc-Linker-*t*-Boc in großem Maßstab. Hierbei wurde die Synthesestrategie von Rech *et al.* verfolgt (Rech *et al.* 2011). Bedingt durch die chemische Struktur von GlcNAc-Linker-*t*-Boc kann die Zunahme der Produktbildung und die Abnahme des Eduktes über RP-HPLC mit UV-Detektion bei 254 nm erfolgen. Nach enzymatischem Transfer von D-Gal auf das Akzeptormolekül GlcNAc-Linker-*t*-Boc ist die Hydrophilie, bedingt durch die erhöhte Anzahl an Hydroxylgruppen, im Vergleich zum Monosaccharid erhöht. Die resultierende verringerte Retentionszeit ermöglicht somit die chromatografische Trennung des Eduktes vom Zielprodukt (Kapitel 3.12.5.2). Während der Synthese des Disaccharids LacNAc-Linker-*t*-Boc konnte mit der analytischen RP-HPLC Methode der enzymatische Transfer von D-Gal auf den Akzeptor GlcNAc-Linker-*t*-Boc kontrolliert werden (Abbildung 95).

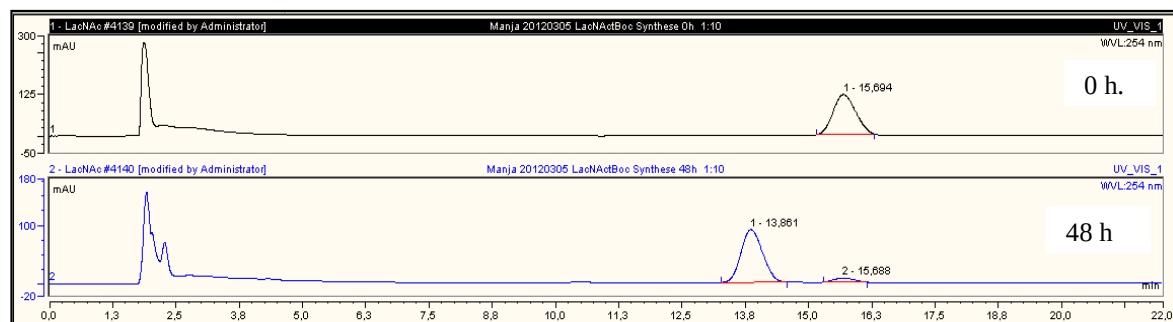


Abbildung 95: HPLC-Chromatogramm zur Synthesekontrolle von LacNAc-Linker-*t*-Boc

Die Abbildung zeigt den Umsatz einer präparativen 20 mL-Disaccharidsynthese zu Beginn der Synthese (0 h) und nach 48 h Reaktionszeit. Hierbei konnte ein 98%-iger Umsatz berechnet werden. Die Retentionszeit für GlcNAc-Linker-*t*-Boc beträgt 15,7 min und für LacNAc-Linker-*t*-Boc 13,9 min.

Das HPLC-Chromatogramm zeigt, dass nach 48 h Reaktionszeit ein fast vollständiger Umsatz (98%) von 10 mM UDP-Glc erzielt wurde. Um reines Akzeptorsubstrat in die geplanten Synthesen von Glukuroniden einsetzen zu können, erfolgte die Produktisolierung mittels präparativer RP-HPLC Methode (Kapitel 3.12.5.2).

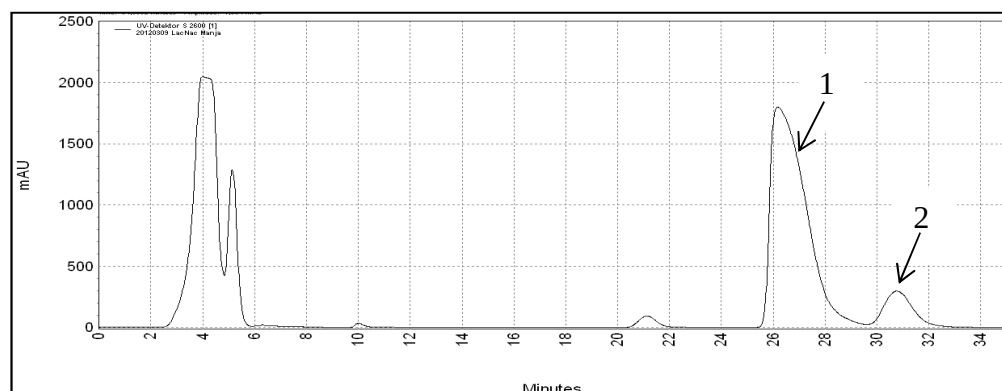


Abbildung 96: Produktisolierung von LacNAc-Linker-*t*-Boc mit der präparativen RP-HPLC Methode unter Einsatz einer Multospher APS-HP Säule (5 μ L 100x3 mm)

Das Chromatogramm zeigt die Trennung der Substrate LacNAc-Linker-*t*-Boc (Retentionszeit: 26-28 min) und GlcNAc-Linker-*t*-Boc (Retentionszeit: 30-32 min) bei einer Flussrate von 12,5 mL/min für 30 min mit einem isokratischen Laufmittel (15% AcN).

Während der Produktisolierung wurden die Fraktionen des Elutionspeaks 1 und des Peaks 2 manuell aufgefangen und anschließend noch einmal zwecks Verifizierung mittels analytischer RP-HPLC Analytik untersucht. Dabei konnte die Identität von LacNAc-Linker-*t*-Boc (Peak 1) bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Der Elutionspeak 2 zeigte dagegen nicht umgesetztes GlcNAc-Linker-*t*-Boc. Da es sich bei der Herstellung dieses Disaccharids um eine bereits

etablierte Methode handelte (Rech *et al.* 2011), wurde auf eine massenspektroskopische Überprüfung verzichtet. Die Bestimmung der Konzentration des Zielproduktes erfolgte über die Kalibriergerade von GlcNAc-Linker-*t*-Boc. Nach Aufreinigung konnten in verschiedenen Syntheseansätzen 24-44 mg Produkt isoliert werden. Der Verlust des Produktes nach Isolierung über die präparative HPLC Methode variierte dabei stark zwischen 10-40%. Diese Abweichungen lassen sich unter anderem auf Ungenauigkeiten bei der Probeninjektion, auf den Verlust beim unvollständigen Lösen der Substanz nach der Einengung oder auf das mehrmalige Überführen der Lösungen in andere Gefäße zurückführen.

4.4.2 Ein-Topf Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops durch Kopplung des UGDH-Moduls mit dem GlcAT-Modul (Modul C + Modul D)

In einem ersten Schritt erfolgte die *in vitro* Synthese des Trisaccharids GlcA-LacNAc-Linker-*t*-Boc ausgehend von UDP-Glc durch Kopplung des UGDH-Moduls mit dem GlcAT-Modul (Abbildung 14) in einer Ein-Topf Synthese. Die Kontrolle des Syntheseverlaufes wurde sowohl über die analytische RP-HPLC Analytik als auch über die CE-UV Analyse durchgeführt. Der quantitative Umsatz des Akzeptorsubstrates wurde mithilfe einer Kalibriergeraden von GlcNAc-Linker-*t*-Boc über HPLC-Analytik berechnet. Aufgrund der divergenten pH-Profile der involvierten Enzyme wurde für die Synthese im analytischen Maßstab eine Akzeptorkonzentration von 2 mM LacNAc-Linker-*t*-Boc sowie 1 U/mL His₆UGDH, 1,5 U/mL His₆NOX und 2 U/mL His₆catGlcAT-P an volumetrischer Aktivität gewählt. Für das Puffersystem Tris-HCl wurde ein pH-Wert von 7,8 festgelegt. Schon nach 2 h konnte ein 86%-iger Umsatz von LacNAc-Linker-*t*-Boc zu GlcA-LacNAc-Linker-*t*-Boc bei einer Akzeptorkonzentration von 2 mM und einer Temperatur von 30°C beobachtet werden.

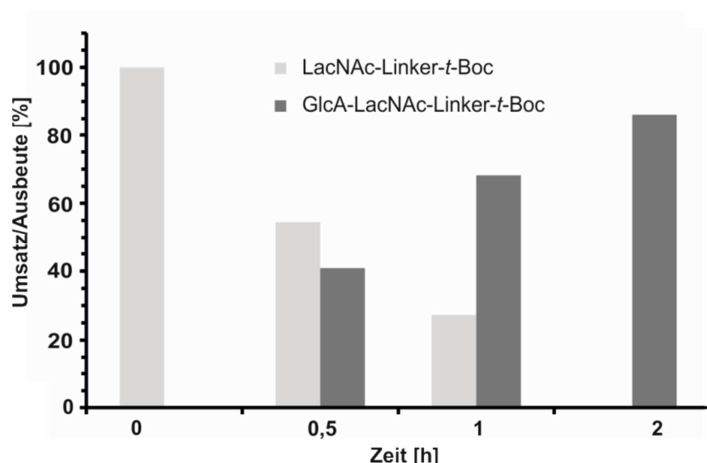


Abbildung 97: Ein-Topf Synthese von GlcA-LacNAc-Linker-*t*-Boc (Modul C + Modul D) im analytischen Maßstab (1 mL)

Die Synthese des hybriden Glukuronids wurde in 50 mM Tris-HCl (pH 7,8) mit 0,5 mM NAD⁺, 2 mM UDP-Glc, 2 mM LacNAc-Linker-*t*-Boc, 1 U His₆UGDH, 1,5 U His₆NOX und 2 U His₆catGlcAT-P für 2 h bei 30°C durchgeführt und mit RP-HPLC Analyse kontrolliert.

Mit dem Ziel eine ökonomische Synthesestrategie zu etablieren, wurden zwei weitere Experimente im analytischen Maßstab durchgeführt. Die Akzeptorkonzentration wurde auf 5 mM erhöht und der Einsatz an Enzymaktivität in zwei unterschiedlichen Ansätzen reduziert. Um die Inhibition der Glukuronyltransferase durch freigesetztes UDP (5 mM) zu vermeiden, wurde den Ansätzen zunächst alkalische Phosphatase zugefügt.

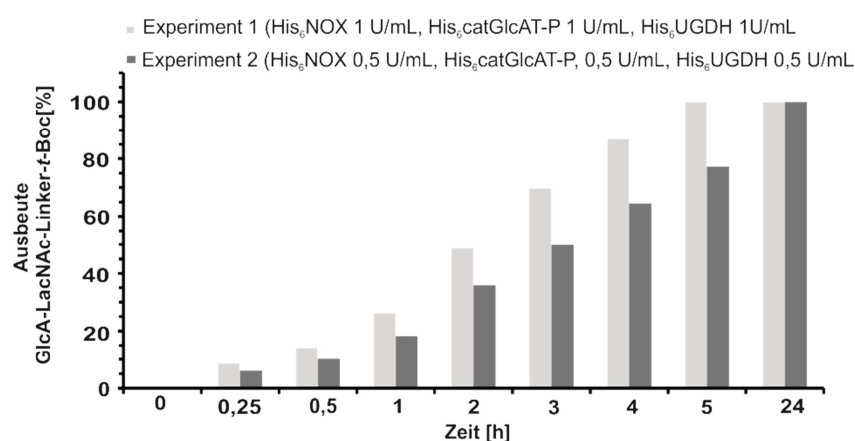


Abbildung 98: Syntheseoptimierung von GlcA-LacNAc-Linker-*t*-Boc (Modul C + Modul D) im analytischen Maßstab (1 mL)

Die Synthese des hybriden Glukuronids wurde in 50 mM Tris-HCl (pH 7,8) mit 0,5 mM NAD⁺, 5 mM UDP-Glc, 5 mM LacNAc-Linker-*t*-Boc und mit 0,5 U His₆NOX/His₆UGDH/His₆GlcAT-P bzw. mit 1 U His₆NOX/His₆UGDH/His₆GlcAT-P und 2 U alkalische Phosphatase für 24 h bei 30°C durchgeführt und mit RP-HPLC Analyse kontrolliert.

Mithilfe dieser Strategie konnte in beiden Experimenten nach 5 h bzw. 24 h Syntheszeit eine Ausbeute von 5 mM GlcA-LacNAc-Linker-*t*-Boc detektiert werden (Abbildung 98). In einem weiteren Schritt wurde die Synthese des Zielproduktes aus ökonomischen Gründen nun mit 0,5 U/mL aller beteiligten Enzyme und ohne Zusatz von alkalischer Phosphatase eingesetzt.

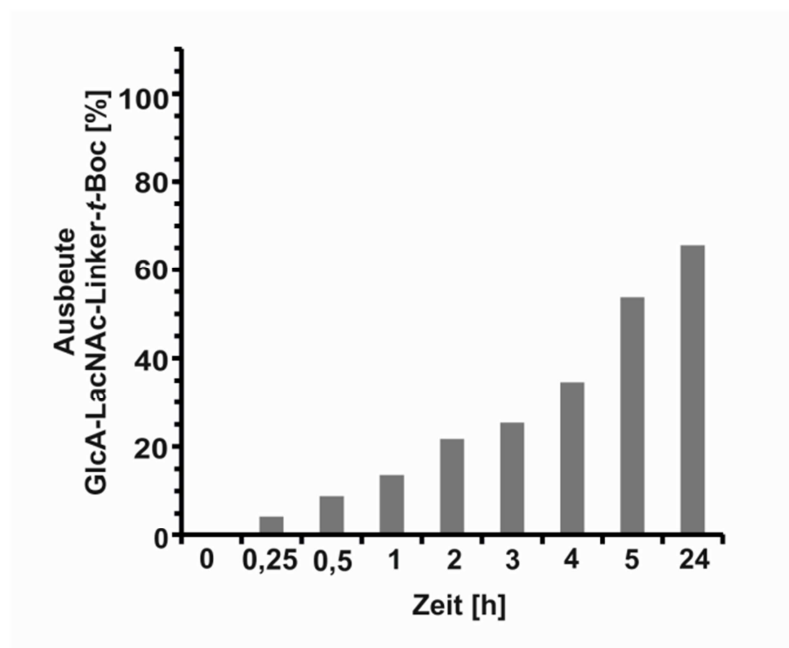


Abbildung 99: Ein-Topf Synthese von GlcA-LacNAc-Linker-*t*-Boc (Modul C + Modul D) ohne Zusatz von alkalischer Phosphatase im analytischen Maßstab (1 mL)

Die Synthese des hybriden Glukuronids wurde in 50 mM Tris-HCl (pH 7,8) mit 0,5 mM NAD⁺, 5 mM UDP-Glc, 5 mM LacNAc-Linker-*t*-Boc und mit 0,5 U His₆NOX/His₆UGDH/His₆GlcAT-P für 24 h bei 30°C durchgeführt und mit RP-HPLC Analyse kontrolliert. Eine Ausbeute von 66% nach 24 h entspricht 3,3 mM Produkt.

Im analytischen Maßstab zeigt die Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops ohne Zusatz von alkalischer Phosphatase nach 24 h eine Aubeute von 66% (3,3 mM) (Abbildung 99). Der nicht vollständige Umsatz des Eduktes ist auf die Akkumulation des inhibitorisch wirkenden UDP auf die Enzymaktivität der His₆catGlcAT-P während der Synthese zurückzuführen. Die Kontrolle des Syntheseverlaufs im semipräparativen Maßstab (5 mL) ergab nach 24 h eine 64%-ige (3,2 mM) Produktausbeute (Abbildung 100), so dass hier 3,2 mM UDP akkumulierten (Abbildung 101). Insgesamt wurde die Funktionalität der gekoppelten Systeme jedoch bestätigt.

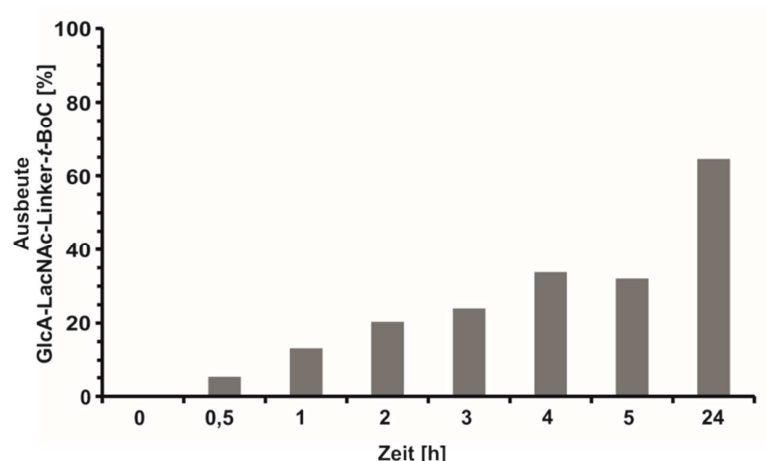


Abbildung 100: Ein-Topf Synthese von GlcA-LacNAc-Linker-*t*-Boc (Modul C + Modul D) im semipräparativen Maßstab (5 mL)

Die Synthese des hybriden Glukuronids wurde in 50 mM Tris-HCl (pH 7,8) mit 0,5 mM NAD^+ , 5 mM UDP-Glc, 5 mM LacNAc-Linker-*t*-Boc und 2,5 U aller involvierten Enzyme für 24 h bei 30°C durchgeführt und mit RP-HPLC und CE-UV Analyse kontrolliert. Eine Ausbeute von 64% nach 24 h entspricht 3,2 mM Produkt.

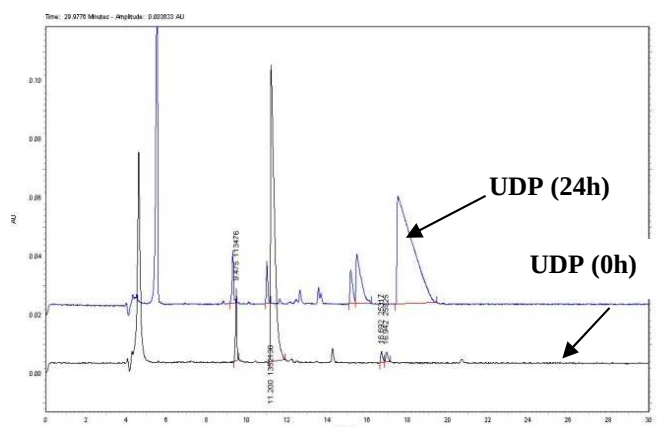


Abbildung 101: CE-UV Analyse der Ein-Topf Synthese von GlcA-LacNAc-Linker-*t*-Boc (Modul C + Modul D) im semipräparativen Maßstab (5 mL)

Die CE-UV Analyse im semipräparativen Maßstab von 5 mL dokumentiert die Akkumulation von UDP (Retentionszeit: 18,9 min) durch Freisetzung von UDP in der Transferreaktion der His₆catGlcAT-P während der Syntheszeit von 24 h.

Nach der erfolgreichen Synthese des Trisaccharids erfolgte die Isolierung aus dem Synthesegemisch nach Kapitel 3.12.5.2. Das Chromatogramm der analytischen HPLC Methode (Abbildung 102, A) zeigt den nicht vollständigen Umsatz von LacNAc-Linker-*t*-Boc zum Trisaccharid GlcA-LacNAc-Linker-*t*-Boc und des Weiteren die partielle Spaltung des Eduktes zu GlcNAc-Linker-*t*-Boc. Die Entstehung von GlcNAc-Linker-*t*-Boc (Retentionszeit:

13,9 min) wird mit einer β -Galaktosidase-Aktivität erklärt. Dennoch konnte die Isolierung des Trisaccharids mit einer Retentionszeit von 22-25 min über die präparative HPLC Analytik mit einem isokratischen Laufmittel (15% AcN; 0,1% Ameisensäure) erfolgreich durchgeführt werden. Die vereinigten Fraktionen wurden anschließend am Rotationsverdampfer eingengt und abschließend über die analytische HPLC Analytik erneut kontrolliert (Abbildung 102, C). Mit einer Ausbeute von 36% konnten 6,8 mg (9 μ mol) Produkt während der Synthese im 5 mL-Maßstab erzielt werden. Der hohe Produktverlust erfordert zukünftig eine Optimierung der Aufreinigungsstrategie. Die abschließende Untersuchung mittels Massenspektroskopie (Abbildung 103) und ^1H -NMR Spektroskopie (Abbildung 104) bestätigte eindeutig die Identität des Trisaccharids.

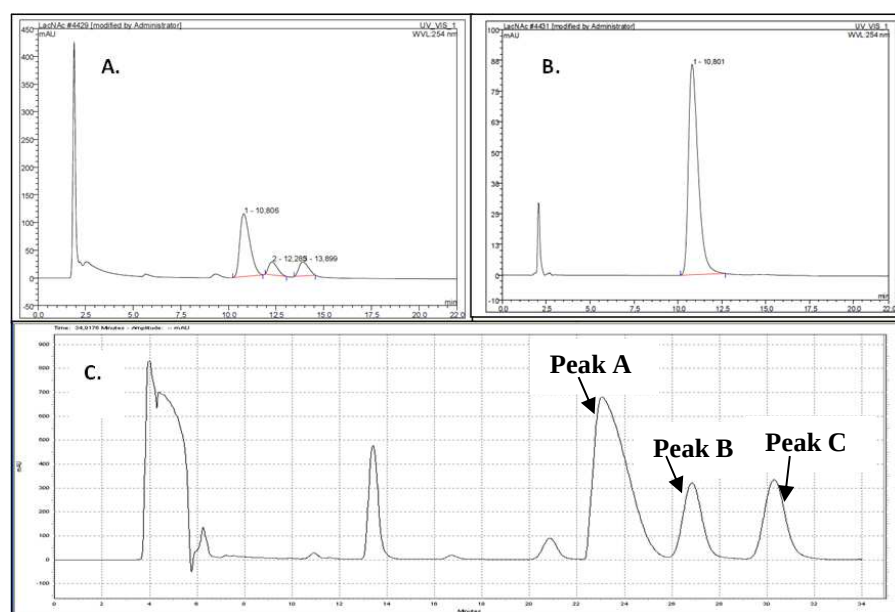


Abbildung 102: Produktisolierung von GlcA-LacNAc-Linker-*t*-Boc mit der präparativen RP-HPLC Methode

Nach quantitativer Umsatzbestimmung des semipräparativen Syntheseansatzes über analytische RP-HPLC (A.) erfolgte die Produktisolierung des Zielproduktes mit der präparativen RP-HPLC Methode (C.). Die Elution von GlcA-LacNAc-Linker-*t*-Boc erfolgt nach 22-25 min (Peak A), die Elution von LacNAc-Linker-*t*-Boc nach 26-28 min (Peak B) und die Elution von GlcNAc-Linker-*t*-Boc nach 30-32 min (Peak C). Abschließend wurden die manuell gesammelten Produktfraktionen erneut über die HPLC-Analytik überprüft (B.).

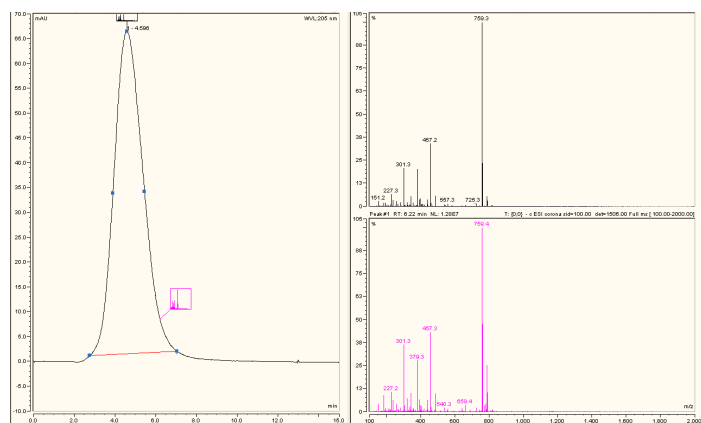


Abbildung 103: ESI-MS Analyse der Ein-Topf Synthese von GlcA-LacNAc-Linker-*t*-Boc (Modul C + Modul D) im semipräparativen Maßstab

Die detektierte Masse m/z 759,3 für $[M-H]^-$ wurde der berechneten Masse $[M]$ m/z 760,2 zugeordnet.

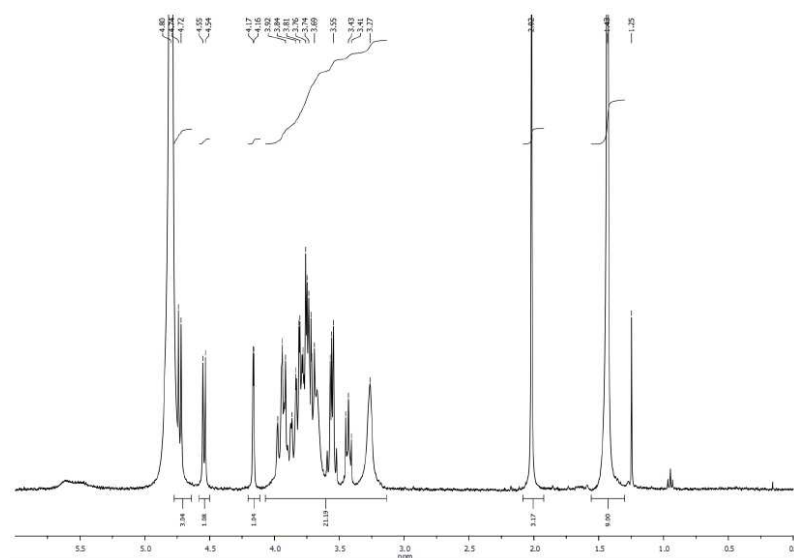


Abbildung 104: ^1H -NMR Spektrum von GlcA(β 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-Linker- NH_2 -*t*-Boc

Das Spektrum wurde aufgenommen in D_2O (400 MHz; 30°C) mit einem Bruker AV 400 Ultra Shield Spektrometer. Die chemische Verschiebung ist in δ -Maßstab [ppm] und die Kopplungskonstanten in Hertz angegeben.

$\delta=4,73$ (d, $J=7,82$ Hz, H-1 GlcA'' β 1-3, H-1 Gal' β 1-4); $4,55$ (d, $J=7,77$ Hz, H-1 GlcNAc β 1-); $4,16$ (d, $J=2,92$ Hz, 1H, H-5 GlcA''); $3,92$ (tr, $J=9,4$ Hz, H-3 Gal''); $2,02$ (s, 3H, CH_3), $1,43$ (s, 9H, Boc).

4.4.3 Ein-Topf Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1-Epitops durch Kopplung des SuSy-Moduls mit dem UGDH- und GlcAT-Modul (Modul B + Modul C + Modul D)

Zur Regeneration von UDP-GlcA ausgehend von UDP und Saccharose wurden die Module C und D zusätzlich mit dem Modul B in einer Ein-Topf-Synthese gekoppelt (Abbildung 14). Die *in situ* Regeneration ermöglicht den Einsatz von katalytischen Mengen UDP und verhindert so die Inhibition der Glykosyltransferasen SuSy1 und GlcAT-P durch UDP. Für das SuSy-Modul wurde sowohl SuSy1 in *S. cerevisiae* als auch in *E. coli* produziert.

4.4.3.1 Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops mit der SuSy1, produziert in *E. coli*

Die Syntheseoptimierung ohne UDP-Regeneration im analytischen Maßstab hatte gezeigt, dass eine 5 mM Akzeptorkonzentration mit einem Einsatz von 0,5 U/mL aller betreffenden Enzyme und unter Zusatz von alkalischer Phosphatase zu einer erfolgreichen Synthese führten (Kapitel 4.4.2). Auf Basis dieser Strategie erfolgte zunächst im analytischen 1 mL-Maßstab die zusätzliche Kopplung der Module C und D mit dem Modul B in einer Ein-Topf-Synthese. Dabei zeigte die Synthese des hybriden Glukuronids mit SuSy1, produziert in *E. coli* BL21(DE3), im analytischen Maßstab einen 98%-igen (4,9 mM) Umsatz des Akzeptorsubstrates LacNAc-Linker-*t*-Boc (Abbildung 105). Somit konnten für UDP und darüber hinaus für den Kofaktor NAD⁺ 23,5 bzw. 17,6 Regenerationszyklen von maximal 24 bzw. 19 Zyklen erreicht werden.

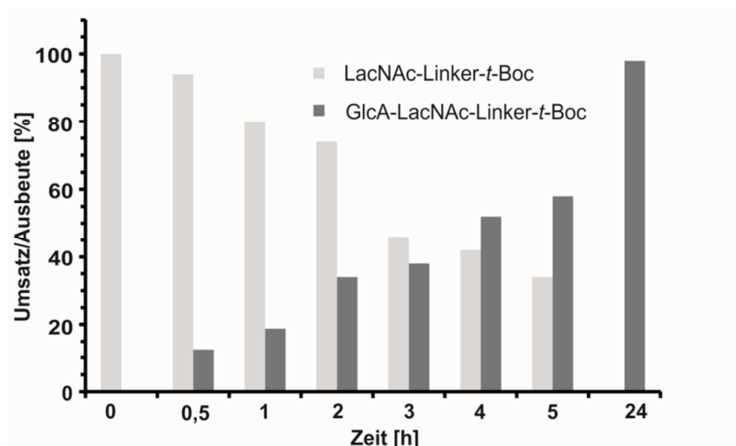


Abbildung 105: Ein-Topf Synthese von GlcA-LacNAc-Linker-*t*-Boc mit der SuSy1, produziert in *E. coli*, (Modul B + Modul C + Modul D) im analytischen Maßstab (1 mL)

Die Synthese des hybriden Glukuronids wurde in 50 mM Tris-HCl (pH 7,8) mit 0,2 mM UDP, 300 mM Saccharose, 0,5 mM NAD^+ , 5 mM LacNAc-Linker-*t*-Boc sowie 0,25 U SuSy1, 0,5 U His₆UGDH, 0,5 U His₆NOX und 0,5 U His₆catGlcAT-P für 24 h bei 30°C durchgeführt und mit RP-HPLC Analyse kontrolliert. Ein Umsatz von 98% Edukt entspricht 4,9 mM LacNAc-Linker-*t*-Boc.

Bei gleichbleibenden Reaktionsparametern wurden nach Maßstabsvergrößerung der Ein-Topf-Synthese (5 mL Batch) 79% des Zielproduktes mit ähnlicher Anzahl an Regenerationszyklen für UDP und NAD^+ (19 bzw. 14) erreicht (Abbildung 106).

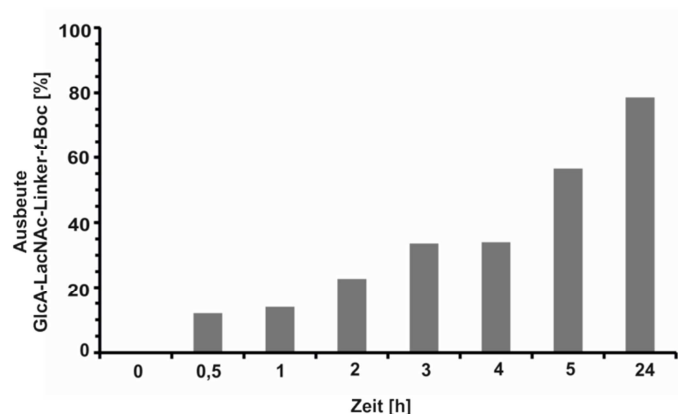


Abbildung 106: Ein-Topf Synthese von GlcA-LacNAc-Linker-*t*-Boc mit der SuSy1, produziert in *E. coli*, (Modul B + Modul C + Modul D) im semipräparativen Maßstab (5 mL)

Die Synthese des hybriden Glukuronids wurde in 50 mM Tris-HCl (pH 7,8) mit 0,2 mM UDP, 300 mM Saccharose, 0,5 mM NAD^+ , 5 mM LacNAc-Linker-*t*-Boc und 1,25 U SuSy 1 (produziert in *E. coli*), 2,5 U His₆UGDH, 2,5 U His₆NOX und 2,5 U His₆catGlcAT-P für 24 h bei 30°C durchgeführt und mit RP-HPLC kontrolliert. Eine Ausbeute von 79% entspricht 4 mM GlcA-LacNAc-Linker-*t*-Boc.

Wiederholt wurde die Bildung von GlcNAc(β 1-Linker-*t*-Boc (20%), welches vermutlich durch eine β -Galaktosidase-Aktivität entstanden ist, detektiert. Eine Optimierung des Aufreinigungsprotokolls der rekombinanten His₆UGDH schien daher für eine effiziente Synthese notwendig zu sein. Eine Fremdkontamination während des Aufreinigungsprozesses kann ausgeschlossen werden, da ebenfalls neue Ni²⁺-NTA Sepharose verwendet wurde. Auch die Erhöhung der Imidazolkonzentration während des Waschschrtes ergab keine nennenswerte Verbesserung. In weiteren Kontrollexperimenten, in denen SuSy1, His₆UGDH, His₆NOX und His₆GlcAT-P bezüglich ihrer Nebenaktivität untersucht wurden, zeigte nur die gereinigte Enzympräparation von His₆UGDH eine β -Galaktosidase-Nebenaktivität (Abbildung 107). Vermutlich agglutinieren eine intrinsische β -Galaktosidase des *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS Stamms und die rekombinante His₆UGDH.

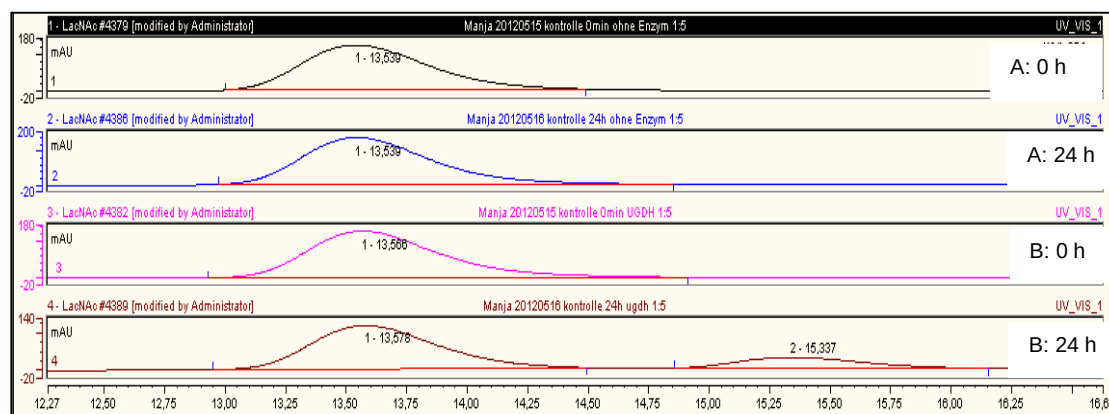


Abbildung 107: Kontrollexperiment zur Spaltung des Akzeptorsubstrates LacNAc-Linker-*t*-Boc

Das Kontrollexperiment wurde durch Inkubation von 0,5 U His₆UGDH with 2 mM LacNAc-Linker-*t*-Boc in 50 mM Tris-HCl (pH 7,8) für 24 h bei 30°C. Eine Probe ohne Enzym diente als Negativkontrolle. Die Retentionszeit für LacNAc-Linker-*t*-Boc beträgt 13,5 min und für GlcNAc-Linker-*t*-Boc 15,3 min (Rech *et al.* 2011).

Nach Produktisolation mit der präparativen RP-HPLC Methode bestätigte die massenspektrometrische Untersuchung die Integrität des Trisaccharids (Abbildung 108). Insgesamt konnten 9 mg (11,9 μ mol) reines Produkt gewonnen werden. Auch hier weist die Produktausbeute von 47,6% deutlich darauf hin, dass bei dem Aufreinigungsprotokoll des Trisaccharids noch weiterer Optimierungsbedarf besteht.

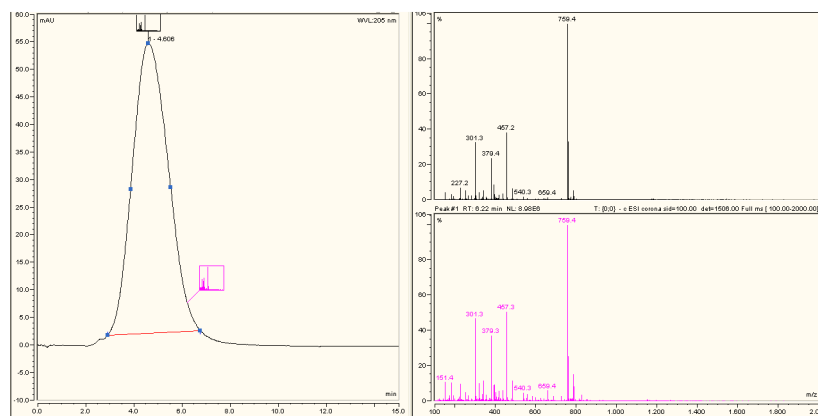


Abbildung 108: ESI-MS Analyse der Ein-Topf Synthese von GlcA-LacNAc-Linker-*t*-Boc mit der SuSy1, produziert in *E. coli*, (Modul B + Modul C + Modul D) im semipräparativen Maßstab
Die detektierte Masse m/z 759,4 für $[M-H]^-$ wurde der berechneten Masse $[M]$ m/z 760,2 zugeordnet.

4.4.3.2 Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1-Epitops mit der SuSy1, produziert in *S. cerevisiae*

Zur Synthese des Trisaccharids mithilfe von SuSy1, produziert in Hefe, wurden die Reaktionsparameter des semipräparativen Ansatzes aus Kapitel 4.4.3.1 übernommen. Nach 24 h konnte eine 76%-ige Ausbeute (3,8 mM Produkt) ermittelt werden (Abbildung 109). Da die MS Analyse die Identität des Produktes nach Trennung mittels der RP-HPLC Methode bestätigte, wurde aus Zeitgründen auf eine Aufreinigung verzichtet. Somit konnten für UDP 18 von 24 Regenerationszyklen und für den Kofaktor NAD^+ 13 von 19 Zyklen berechnet werden.

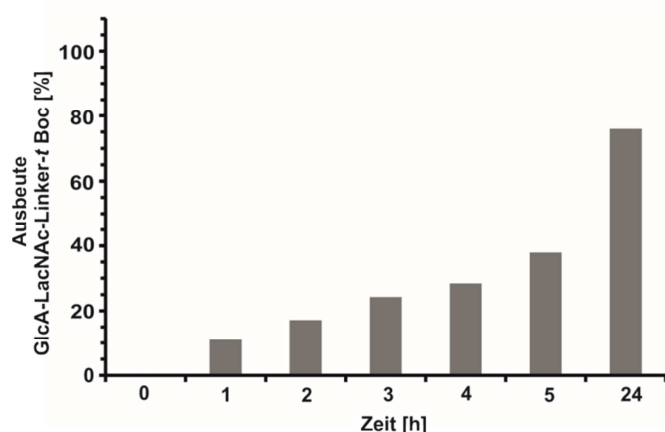


Abbildung 109: Ein-Topf Synthese von GlcA-LacNAc-Linker-*t*-Boc mit der SuSy1, produziert in *S. cerevisiae*, (Modul B + Modul C + Modul D) im semipräparativen Maßstab (5 mL)

Die Synthese des hybriden Glukuronids wurde in 50 mM Tris-HCl (pH 7,8) mit 0,2 mM UDP, 300 mM Saccharose, 0,5 mM NAD⁺, 5 mM LacNAc-Linker-*t*-Boc und 1,25 U SuSy 1 (produziert in *S. cerevisiae*), 2,5 U His₆UGDH, 2,5 U His₆NOX und 2,5 U His₆catGlcAT-P für 24 h bei 30°C durchgeführt und mit RP-HPLC Analyse kontrolliert. Eine Ausbeute von 76% entspricht 3,8 mM GlcA-LacNAc-Linker-*t*-Boc.

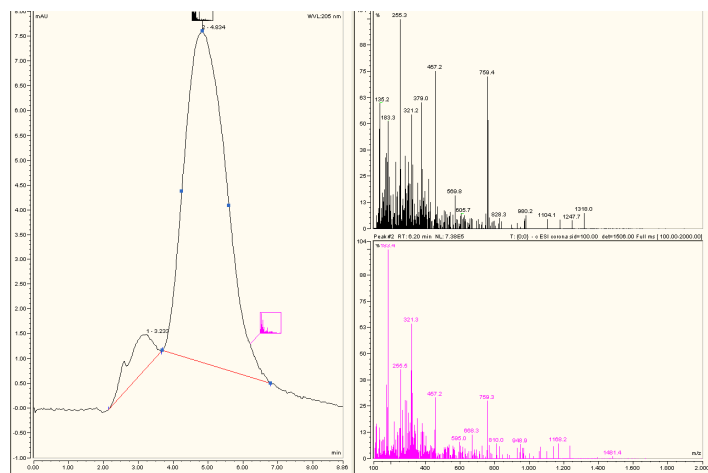


Abbildung 110: ESI-MS Analyse der Ein-Topf Synthese von GlcA-LacNAc-Linker-*t*-Boc synthetisiert mit der SuSy1, produziert in *S. cerevisiae*, (Modul B + Modul C + Modul D) im semipräparativen Maßstab

Die detektierte Masse m/z 759.4 für $[M-H]^-$ wurde der berechneten Masse $[M]$ m/z 760,2 zugeordnet.

4.4.4 Evaluation der Synthesestrategien zur Produktion des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops

Die kombinatorische Synthesestrategie durch Kopplung des SuSy-Moduls mit dem UGDH- und GlcAT-Modul ist gegenüber dem Reaktionsansatz durch die Kombination des UGDH-Moduls mit dem GlcAT-Modul zu favorisieren. In ersten Versuchen konnte nach integrierter *in situ* Regeneration von UDP-GlcA der Umsatz von LacNAc-Linker-*t*-Boc um 15% erhöht werden. Die *in situ* Regeneration ermöglicht eine 25-fache Reduktion der Ausgangskonzentration von UDP. Dem gegenüber steht eine 5 mM Ausgangskonzentration für UDP-Glc bei der Verwendung des Reaktionsansatzes ohne Regeneration (Modul C + Modul D). Somit können die Kosten für die Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops trotz notwendiger Produktion von SuSy1 erheblich gesenkt werden. Mit der Regenerationsstrategie wurde unter Einsatz von SuSy1 aus zwei verschiedenen Produktionssystemen ein Umsatz in der gleichen Größenordnung (*E. coli*: 79% und *S. cerevisiae*: 76%) nach einer Reaktionszeit von 24 h erreicht. Ein nennenswertes Problem scheint die Verunreinigung der Syntheseansätze mit β -Galaktosidase zu sein. Ob es sich bei der β -Galaktosidase-Aktivität um eine intrinsische Aktivität aus dem *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS Stamm konnte noch nicht geklärt werden. Zukünftig kann der Einsatz an volumetrischer Aktivität von His₆GlcAT-P im zwei- bis dreifachen Überschuss einen schnelleren Syntheseverlauf garantieren und so die Spaltung des Akzeptorsubstrates, die bei Synthesezeiten von 24 h detektiert werden kann, verhindern. Zusammenfassend liefert die Strategie der Kopplung der Module B, C und D einschließlich der integrierten *in situ* Regeneration von UDP-GlcA eine gute Basis für eine weitere Syntheseoptimierung.

4.5 Bereitstellung von putativen α 1,2-Fukosyltransferasen für die Enzym-Module zur Synthese des Glykanepitops 2'-Fukosyllaktose

Die heterologe Expression von eukaryontischen und bakteriellen FucTs in *E. coli* ist problematisch. Häufig besitzen diese Enzyme, ähnlich wie die Galaktosyltransferasen, hochkonservierte Cysteinreste (de Vries *et al.* 2001), die zur Bildung von „inclusion bodies“ führen und somit die Ausbeute an löslichem Protein drastisch reduzieren. Voraussetzung für aktiv exprimierte Enzyme ist jedoch die lösliche Expression. Daher erfordert die heterologe Expression von eukaryontischen und bakteriellen FucTs in *E. coli* eine maßgeschneiderte Klonierungsstrategie. In der Natur ist darüber hinaus Laktose nicht das natürliche Akzeptorsubstrat der α 1,2-FucTs. Es ist daher, eine fehlende oder reduzierte Enzymaktivität zu erwarten.

Putative α 1,2-FucTs (EC [2.4.1.69](#)) aus der Glykosyltransferase-Familie 11 sind aufgrund ihrer mehr oder weniger ausgeprägten Sequenzhomologie in der CAZy Datenbank (<http://www.CAZy.org/>) zu finden. Der Nachweis ihrer FucT-Aktivität ist jedoch für die meisten Enzyme nicht erbracht. Deshalb lag die Strategie nahe, putative α 1,2-FucTs mit Laktose als Akzeptor zu testen und damit ein neuartiges Enzym zu identifizieren. Zunächst wurden auf der Basis ihrer entfernten Homologie zu FutC drei putative α 1,2-FucT Gene (*amuc*, *epsH*, *eps11*) nicht pathogener Bakterien sowie vier Gene pathogener Bakterienstämme (*wbgN*, *wbdN*, *wblA*, *wbgL*) ausgewählt und die Klonierung der Konstrukte mit N-terminaler Fusion des Propeptids aus *Staphylococcus hyicus* in den modifizierten Vektor pET22bHis₆Prop geplant. Aus vorangegangenen Untersuchungen konnten wir schließen, dass das Propeptid in diesem Konstrukt wahrscheinlich eine Schutzfunktion bei der Faltung der Glykosyltransferase übernimmt (Sauerzapfe *et al.* 2008). Die Homologie der ausgewählten Gene zu FutC (*Helicobacter pylori* NCTC364) entspricht 25-29% (Anhang, Abbildung 141). Darüber hinaus weisen alle Gene das HXRRXD Motiv (*GDP binding motif*) auf, welches wahrscheinlich das potentielle Bindemotiv für GDP-Fuc darstellt. Die Gensequenzen wurden entsprechend der EMBL Datenbank von der Firma Geneart (Regensburg) zur Expression in *E. coli* codonoptimiert synthetisiert und anschließend in den modifizierten Vektor pET22b-his₆prop umkloniert und in *E. coli* JM109(DE3) exprimiert.

4.5.1 Aufreinigung der His₆PropAmuc aus *Akkermansia muciniphila*

Akkermansia muciniphila ist ein strikt anaerobes, intestinal Mucin-degradierendes Bakterium, das im humanen Intestinaltrakt vorkommt. Nach erfolgreicher Klonierung und Expression des Gens *amuc* aus dem Prokaryonten (Stamm: ATCC BAA-835) (UniProtKB/Swiss-Prot/accession number: B2UQN9) erfolgte die Aufreinigung des Fusionsproteins. Die SDS-PAGE Analyse (Abbildung 111) zeigt lösliches Protein im IMAC Pool (Spur: 1), „inclusion bodies“ im Zellpellet (Spur: 4) und eine Überexpression des Fusionsproteins im Rohextrakt (Spur: 3). Die Ausbeute an löslichem Protein betrug 0,74 mg/g *E. coli* JM109(DE3) Zellen. Die lösliche Expression des Gens bestätigte die Strategie der Verwendung des Propeptids in der Fusion mit der putativen FucT Amuc als potentiellen Schutz bei der Faltung der katalytischen Domäne der Glykosyltransferase. Für die gereinigte FucT wurde ein apparentes Molekulargewicht von 70 kDa (Abbildung 111) ermittelt. Das theoretische Molekulargewicht, berechnet an Hand der Aminosäuresequenz, beträgt 57,7 kDa. Ursache für die Abweichung des Molekulargewichtes ist die hohe Anzahl an sauren Aminosäuren in der Propeptidsequenz (207 Aminosäuren), die zu einer reduzierten SDS-Beladung und damit zu einer geringeren Mobilität in der SDS-PAGE Analyse führen (Mizanur und Pohl 2008).

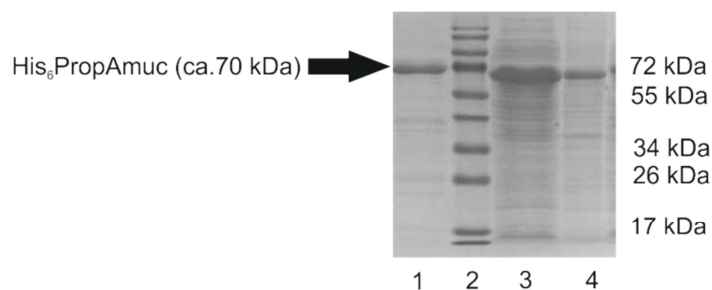


Abbildung 111: SDS-PAGE Analyse der His₆PropAmuc (Coomassie Färbung) nach Aufreinigung mittels Ni²⁺-NTA Sepharose

Spur 1: IMAC-Pool; Spur 2: Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas); Spur 3: Rohextrakt; Spur 4: Zellpellet. Die SDS-PAGE Analyse zeigt ein apparentes Molekulargewicht von ca. 70 kDa, das theoretische Molekulargewicht abgeleitet von der Primärsequenz wurde berechnet mit 57,7 kDa. Die Größenabweichung wird verursacht durch den Aufbau der Propeptidsequenz mit einer hohen Anzahl von sauren Aminosäuren, die zu einer reduzierten Mobilität im SDS-PAGE führen (Mizanur und Pohl 2008).

Der Nachweis der FucT-Aktivität für das Akzeptorsubstrat Laktose konnte mit den unterschiedlichen verwendeten Testmethoden (Kapitel 3.8.1.1) jedoch nicht erbracht werden. Der Fotometertest zeigte keine signifikante Abnahme von NADH. Darüber hinaus konnte auch keine Aktivität des Fusionsproteins sowohl mit Rohextrakt als auch mit gereinigtem Protein nach 30 h Synthesezeit mittels der HPAEC-PAD Methode nachgewiesen werden. Die CE-UV Analytik zeigte ebenfalls im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante Abnahme des Donorsubstrates GDP-Fuc.

4.5.2 Aufreinigung der His₆PropEpsH aus *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40

Lactococcus lactis ist ein grampositives Bakterium, das zur Herstellung von Milch- und Käseprodukten verwendet wird. Das Gen *epsH* (UniProtKB/Swiss-Prot/accession number: O06036), das aus dem *eps*-Gencluster stammt, ist in der Exopolysaccharid Biosynthese involviert (van Kranenburg *et al.* 1997, van Kranenburg *et al.* 1999). Nach Aufreinigung bestätigte die SDS-PAGE Analyse (Abbildung 112) die lösliche Produktion des Zielproteins. In ersten Versuchen konnten an löslichem Protein 0,76 mg/g Zellen *E. coli* JM109(DE3) produziert werden. Mittels CE-UV und HPAEC-PAD Analyse wurde keine Aktivität für das Konstrukt His₆PropEpsH mit Laktose nach 30 h Synthesezeit nachgewiesen.

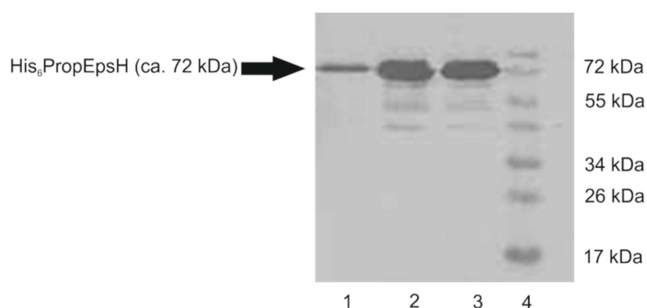


Abbildung 112: Western Blot Analyse der His₆PropEpsH nach Aufreinigung mittels Ni²⁺-NTA Sepharose
Spur 1: IMAC-Pool; Spur 2: Rohextrakt; Spur 3: Zellpellet; Spur 4: Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas). Die Western Blot Analyse zeigt auch ein apparentes Molekulargewicht von 72 kDa für His₆PropEpsH mit einer Größenabweichung von 10 kDa.

4.5.3 Aufreinigung der His₆PropEps11 aus *Streptococcus thermophilus* LMG18311

Streptococcus thermophilus ist ein anaerobes Milchsäurebakterium, das ebenfalls zur Herstellung von fermentierten Milch- und Käseprodukten dient. Das Genprodukt wird der Exopolysaccharid Biosynthese zugeordnet (Bolotin *et al.* 2004). Die Aufreinigungskontrolle des Fusionsproteins (Abbildung 113) erfolgte mit Western Blot Analyse. Diese zeigte lösliches Protein im gereinigten Enzympool und die Überexpression des Gens im Rohextrakt. Die Ausbeute an löslichem Protein betrug 1,2 mg/g Zellen *E. coli* JM109(DE3). Die wiederholte Überprüfung der Aktivität mittels CE-UV und HPAEC-PAD Analyse ergab keinerlei Hinweise auf aktives Fusionsprotein His₆PropEps11 für Laktose als Akzeptorsubstrat.

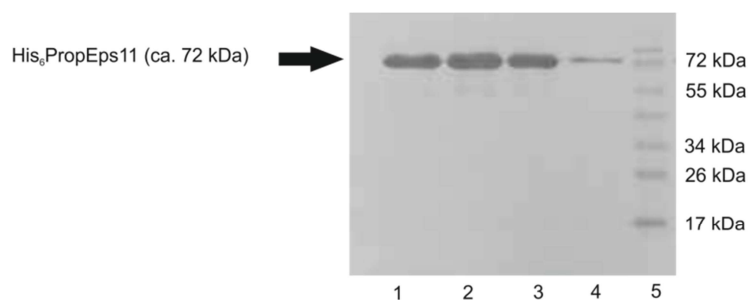


Abbildung 113: Western Blot Analyse der His₆PropEps11 nach Aufreinigung mittels Ni²⁺-NTA Sepharose
Spur 1: IMAC-Pool; Spur 2: Rohextrakt; Spur 3: Zellpellet; Spur 4: Waschfraktion, Spur 5: Proteinmarker (PageRuler™Prestained Protein Ladder, Fermentas). Die Western Blot Analyse zeigt auch ein apparentes Molekulargewicht von 72 kDa für His₆PropEps11 mit einer Größenabweichung von 10 kDa. Das theoretisch Molekulargewicht abgeleitet von der Primärsequenz beträgt 62,6 kDa.

4.5.4 Aufreinigung der His₆PropWbdN aus *Salmonella enterica subsp. Salamae*

Die putative α 1,2-FucT WbdN (UniProtKB/Swiss-Prot/accession number: Q5UHB1) des gramnegativen human-pathogenen Bakteriums *Salmonella enterica subsp. Salamae* (Serovar Greenside M290), wird dem O-Antigen Cluster zugeordnet (Samuel *et al.* 2004). Nach Aufreinigung bestätigte die Ausbeute an löslichem Protein von 1,75 mg/g *E. coli* JM109(DE3) Zellen eine gute Expressionsrate, was durch die SDS-PAGE Analyse

(Abbildung 114) überprüft wurde. Eine Enzymaktivität des Fusionsproteins für Laktose konnte mittels CE-UV und HPAEC-PAD Analytik nicht nachgewiesen werden.

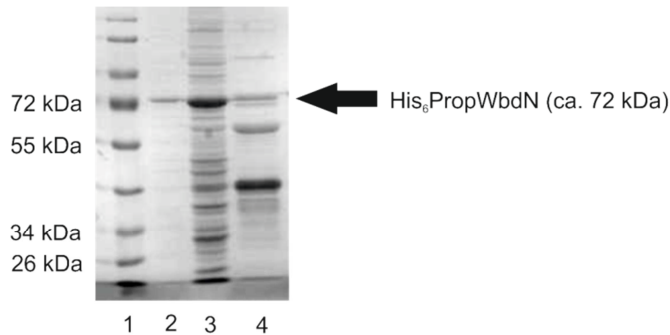


Abbildung 114: SDS-PAGE Analyse (Coomassie Färbung) der His₆PropWbdN nach Aufreinigung mittels Ni²⁺-NTA Sepharose

Spur 1: Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas); Spur 2: IMAC-Pool; Spur 3: Rohextrakt; Spur 4: Zellpellet. Die SDS-PAGE Analyse zeigt ein apparentes Molekulargewicht von ca. 72 kDa, das theoretische Molekulargewicht abgeleitet von der Primärsequenz wurde berechnet mit 57 kDa.

4.5.5 Aufreinigung der His₆PropWbgN aus *E. coli* O55:H7

Das Genprodukt WbgN (UniProtKB/Swiss-Prot/accession number: Q8VQ46) ist an der Synthese des O55:H7-Antigens von enteropathogenen *E. coli* Bakterien beteiligt (Wang *et al.* 2002). Die Proteinaufreinigung ergab 1,4 mg/g *E. coli* JM109(DE3) Zellen an löslichem gereinigtem Fusionsprotein His₆PropWbgN. Der Nachweis der enzymatischen Synthese von 2'-FL mittels CE-UV und HPAEC-PAD Analytik war negativ; somit konnte für das betreffende Fusionsprotein keine Aktivität mit Laktose als Akzeptorsubstrat nachgewiesen werden.

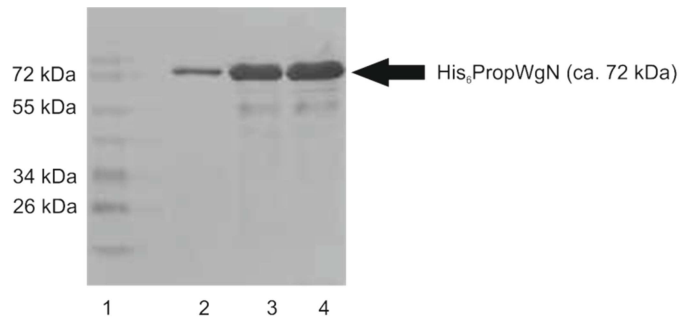


Abbildung 115: Western Blot Analyse der His₆PropWbgN nach Aufreinigung mittels Ni²⁺-NTA Sepharose

Spur 1: Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas); Spur 2: IMAC-Pool; Spur 3: Zellpellet; Spur 4: Rohextrakt. Die Western Blot Analyse zeigt ein apparentes Molekulargewicht von 72 kDa für His₆PropWbgN mit einer Größenabweichung von 14,2 kDa.

4.5.6 Aufreinigung der His₆PropWblA aus *Vibrio cholerae* 022

Das Gen *wblA* (UniProtKB/Swiss-Prot/accession number: O87157) aus den pathogenen *Vibrio cholerae* Bakterien wird der Biosynthese des O22-Antigens zugeordnet (Yamasaki *et al.* 1999). Die Aufreinigung des Proteins ergab an löslichem Fusionsprotein His₆PropWblA 0,73 mg/g *E. coli* JM109(DE3) Zellen. Die Aufreinigungskontrolle erfolgte mit Western Blot Analyse (Abbildung 116). Wiederholte Versuche zur Aktivitätsbestimmung mittels CE-UV und HPAEC-PAD Analytik zeigten keine Aktivität für His₆PropWblA mit Laktose als Akzeptorsubstrat.

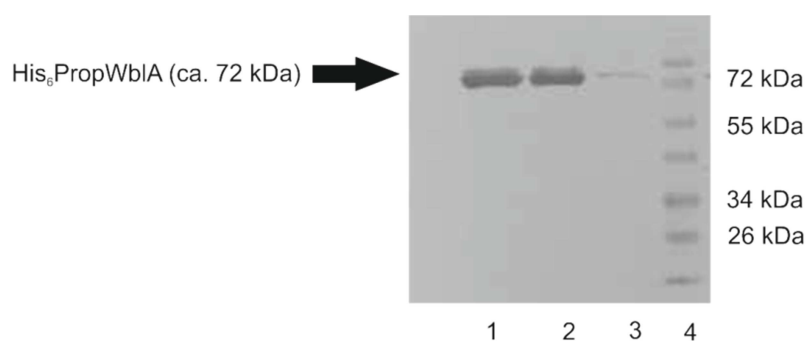


Abbildung 116: Western Blot Analyse der His₆PropWblA nach Aufreinigung mittels Ni²⁺-NTA Sepharose

Spur 1: IMAC-Pool; Spur 2: Rohextrakt; Spur 3: Zellpellet; Spur 4: Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas). Die Western Blot Analyse zeigt auch ein apparentes Molekulargewicht von 72 kDa für His₆PropWblA mit einer Größenabweichung von 15,5 kDa.

4.5.7 Aufreinigung der His₆PropWbgL aus *E. coli* O126

Das *wbgL* Gen (UniProtKB/Swiss-Prot/accession number: A6M9C2) wird dem O-Antigen Cluster (Abbildung 117) des pathogenen *E. coli* O126 Stammes zugeordnet. Die O-Antigen Wiederholungseinheit (Abbildung 118) zeigt hier folgende Zusammensetzung: 2)- β -D-Man-(1 $\rightarrow$ 3)-[α -L-Fuc-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-Gal(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-GlcNAc-(1- (Liu *et al.* 2007).



Abbildung 117: *E. coli* O126 Antigen Biosynthese Cluster (EMBL-Bank DQ465248) nach Liu *et al.* (Liu *et al.* 2007)

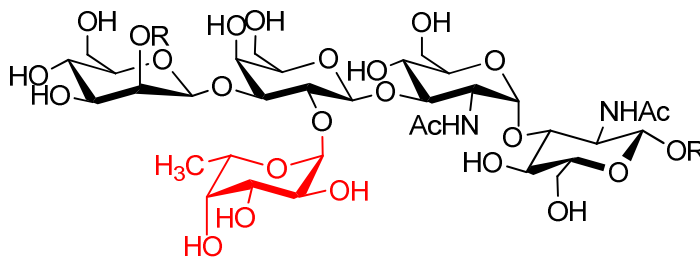


Abbildung 118: *E. coli* O126 Antigen Wiederholungseinheit aus *E. coli* O126 nach Liu *et al.* (Liu *et al.* 2007)

2)- β -D-Man-(1 $\rightarrow$ 3)-[α -L-Fuc-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-Gal(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-GlcNAc-(1-

Nach Induktion der Expression mit 0,1 mM IPTG bei 25°C und einer Postinduktionszeit von 24 h konnten aus einem Liter TB Medium 15 g *E. coli* JM109(DE3)_pET22b-*his6propwbgL* (Feuchtgewicht) in der Schüttelkolbenexpression erzielt werden. Trotz fehlender Regulation der Sauerstoffzufuhr, zeigt die Schüttelkolbenexpression damit eine gute Ausbeute an Zellmasse. Mit der Ein-Stufen-Aufreinigung über Ni²⁺-NTA-IMAC konnten 3 mg gereinigtes Protein/g *E. coli* JM109(DE3) Zellen gewonnen werden. Die Funktion des Propeptids für die lösliche Expression des Proteins wurde damit bestätigt. Der Erfolg der Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse kontrolliert. Sie zeigen eine gereinigte FucT mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 70 kDa (Abbildung 119 und Abbildung 120). Das theoretische Molekulargewicht, berechnet an Hand der Aminosäuresequenz, beträgt 59 kDa. Die Ursache für die Abweichung des Molekulargewichtes ist die hohe Anzahl an sauren Aminosäuren in der Propeptidsequenz (207 Aminosäuren), die zu einer reduzierten

SDS Beladung und damit zu einer geringeren Mobilität in der SDS-PAGE Analyse führen (Mizanur und Pohl 2008). Die Integrität des Konstruktes wurde darüber hinaus durch Sequenzierung überprüft.

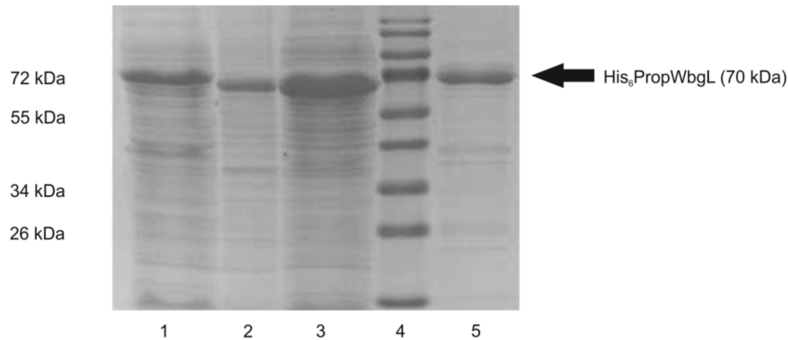


Abbildung 119: SDS-PAGE Analyse (Coomassie Färbung) der His₆PropWgbL nach Aufreinigung mittels Ni²⁺-NTA Sepharose nach Engels *et al.* (Engels und Elling 2014)

Spur 1: Rohextrakt; Spur 2: Durchfluss; Spur 3: Zellpellet; Spur 4: Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas); Spur 5: IMAC-Pool. Die SDS-PAGE Analyse zeigt ein apparentes Molekulargewicht von 72 kDa, das theoretische Molekulargewicht abgeleitet von der Primärsequenz wurde berechnet mit 59 kDa.

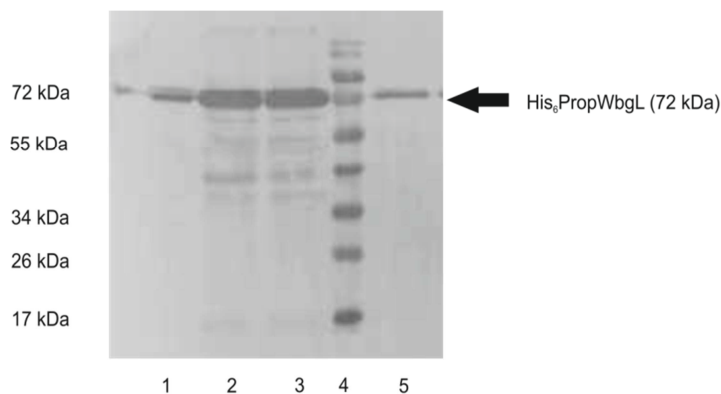


Abbildung 120: Western Blot Analyse der His₆PropWgbL nach Aufreinigung mittels Ni²⁺-NTA Sepharose nach Engels *et al.* (Engels und Elling 2014)

Spur 1: IMAC-Pool; Spur 2: Rohextrakt; Spur 3: Zellpellet; Spur 4: Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas); Spur 5: Durchfluss. Analog der SDS-PAGE Analyse zeigte die Western Blot Analyse auch ein apparentes Molekulargewicht von 72 kDa für His₆PropWgbL mit einer Größenabweichung von 13 kDa.

Für Laktose (Tabelle 71) zeigt das Fusionsprotein eine spezifische Aktivität von bis 0,25 U/mg Protein. Somit konnte überraschender Weise die putative His₆PropWbgL für das nicht natürliche Akzeptorsubstrat Laktose als aktive α 1,2-FucT identifiziert werden. Die Überprüfung der Aktivität und der Identität des Syntheseproduktes 2'-FL erfolgte mittels Fotometer und HPAEC-PAD Analyse (Kapitel 3.8.1.1). In der wissenschaftlichen Literatur sowie in der Patentliteratur ist eine einzige α 1,2-FucT FutC (EC 2.4.1.69) aus *Helicobacter pylori* beschrieben, die eine *in vitro* Aktivität von ca. 89 mU/mg Protein mit Laktose als Akzeptor zeigt (Albermann *et al.* 2001). Aus *Arabidopsis thaliana* wurden zwei putative α 1,2-FucTs, AtFUT4 und AtFUT6, identifiziert, die jedoch ausschließlich Arabinogalaktan-Proteine fukosylieren (Wu *et al.* 2010). Damit stand eine neuartige α 1,2-FucT für die Synthese von fukosylierten Oligosacchariden zur Verfügung.

Tabelle 71: Aufreinigung der His₆PropWbgL mittels Ni²⁺-NTA Sepharose modifiziert nach Engels *et al.* (Engels und Elling 2014)

	Volumen [mL]	Gesamt- aktivität [U]	Gesamt- protein [mg]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Aufreinigungs- faktor [-]	Aus- beute [%]
Rohextrakt	15	20,3	225	0,09	1,0	100
IMAC Pool	31	7,8	31	0,25	2,8	38

4.5.8 Biochemische Charakterisierung der His₆PropWbgL

Auch hier verlangte die Optimierung der Synthese von 2'-FL eine umfassende Charakterisierung der Enzymeigenschaften wie z. B. pH- und Temperatur-Optimum, Enzymstabilität, Substratkinetiken und Substratspezifitäten.

4.5.8.1 Bestimmung des pH- und Temperatur-Optimums

Glykosyltransferasen weisen allgemein ein Temperatur-Optimum im Bereich von 25-37°C auf. Zur Bestimmung des Temperatur-Optimums wurde die HPAEC-PAD Analyse ausgewählt und die relative Aktivität des Enzyms in einem Puffersystem von 50 mM

Tris-HCl (pH 7,6) bei unterschiedlichen Temperaturen bestimmt. Bei einer Temperatur von 27°C erfährt die enzymkatalysierte Reaktion die stärkste Beschleunigung. Temperaturen über 27°C führen zu einer Inaktivierung des Enzyms durch Denaturierung (Abbildung 121).

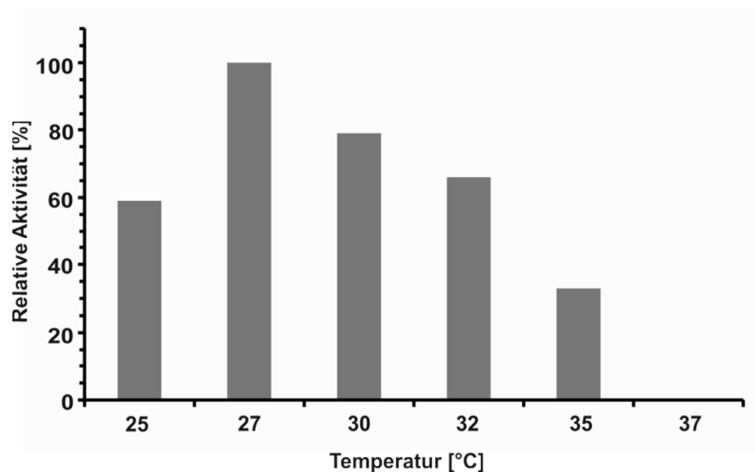


Abbildung 121: Bestimmung des Temperatur-Optimums der His₆PropWgbL modifiziert nach Engels *et al.* (Engels und Elling 2014)

Bei 27°C zeigt das Enzym eine relative Aktivität von 100% in 50 mM Tris-HCl Puffer(pH 7,6). 100% relative Aktivität entsprechen 0,23 U/mg.

His₆PropWgbL zeigt für das Puffersystem Tris-HCl ein relativ breites pH-Optimum im Bereich von pH 7-8. Die höchste Aktivität wird jedoch bei pH 7,6 erreicht. Das relativ breite pH-Optimum sprach zunächst für die Applikation des Enzyms in der kombinatorischen Biokatalyse.

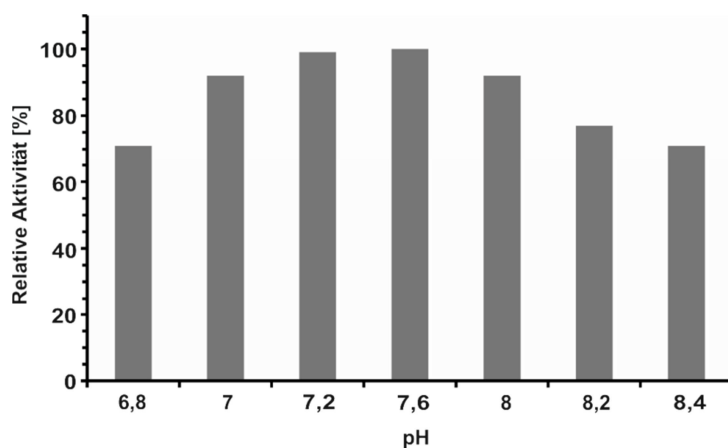


Abbildung 122: Bestimmung des pH-Optimums der His₆PropWgbL in 50 mM Tris-HCl modifiziert nach Engels *et al.* (Engels und Elling 2014)

Die relative Aktivität der α 1,2-FucT wurde bestimmt in 50 mM Tris-HCl und 27°C. Das pH-Optimum für dieses Puffersystem liegt bei pH 7,6. 100% relative Aktivität entsprechen 0,23 U/mg.

4.5.8.2 Untersuchung der Enzymstabilität

Der Einfluss der Temperatur hinsichtlich der Stabilität kann aufgrund des Proteincharakters der Enzyme erheblich sein. Enzymatische Synthesen erfordern daher die Überprüfung der Proteinstabilität über einen bestimmten Zeitraum. Die Proteinstabilität wurde hier mittels HPAEC-PAD Analyse bei einer Temperatur von 27°C in 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,6) über einen Zeitraum von 8 Tagen überprüft. Dabei wurde eine Halbwertszeit von 57 h und ein Inaktivierungskoeffizient ($k=0,012$) nach Arrhenius ermittelt (Abbildung 123). Die Daten wurden mithilfe der Arrhenius (Gleichung 6) unter Benutzung der Software Sigma Plot 10.0 (SPSS GmbH Software, Germany) berechnet. Die Lagerung des frisch gereinigten Enzyms bei -20°C für 2 Monate führte zu einer Restaktivität von 70%. Damit zeichnet sich das Enzym als stabiler Biokatalysator aus, geeignet für Synthesen über einen längeren Zeitraum.

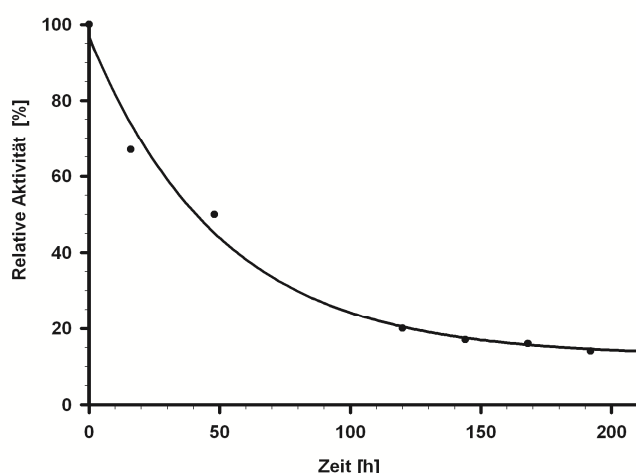


Abbildung 123: Enzymstabilität der His₆PropWgbL bei 27°C in 50 mM Tris-HCl Puffer modifiziert nach Engels *et al.* (Engels und Elling 2014)

Bei der Untersuchung der Enzymstabilität in 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,6) mittels HPAEC-PAD Analyse konnte eine Halbwertszeit von 57 h und ein Inaktivierungskoeffizient k von 0,012 ermittelt werden. Die Daten wurden mithilfe der Arrhenius Gleichung unter Benutzung der Software Sigma Plot 10.0 (SPSS GmbH Software, Germany) berechnet. 100% relative Aktivität entsprechen 0,22 U/mg.

4.5.8.3 Einfluss von divalenten Kationen auf die Enzymaktivität

Die α 1,2-FucT WbgL wurde der Glykosyltransferasen Familie 11 (EC2.4.1.69) zugeordnet. Vertreter dieser Familie katalysieren die Reaktion unter einer direkten Verdrängung des Substituenten über eine S_N2 Reaktion. Dadurch kommt es zur Inversion der Konfiguration am anomeren C-Atom des Donors (Lairson *et al.* 2008). Die Notwendigkeit von divalenten

Kationen für die Katalyse ist abhängig von der weitgehend konservierten Struktur der Nukleotidzucker-abhängigen Glykosyltransferasen (Breton *et al.* 2006). Der Zusatz von den Metallionen Mn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} und Co^{2+} (Endkonzentration: 2 mM) zur Standardzusammensetzung des Aktivitätstestes erlaubte die Überprüfung der Metallionenabhängigkeit von His₆PropWbgL mittels HPAEC-PAD Analyse.

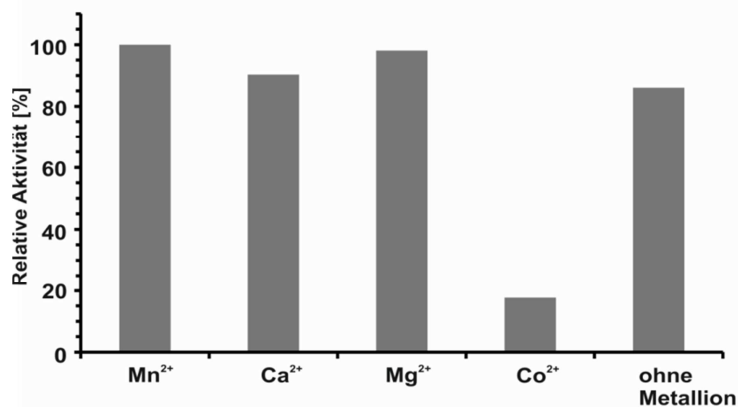


Abbildung 124: Einfluss von divalenten Metallionen auf die Enzymaktivität der His₆PropWbgL modifiziert nach Engels *et al.* (Engels und Elling 2014)

Der Einfluss von 2 mM divalenten Metallionen wurde bei 27°C in 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,6) getestet. 100% relative Aktivität entsprechen 0,22 U/mg.

Die Ergebnisse (Abbildung 124) zeigen eine relative Aktivität von 86% für His₆PropWbgL ohne Zusatz von Metallionen. Die höchste Aktivität wurde gemessen in Gegenwart von 2 mM Mn^{2+} (100%) und Mg^{2+} (90%). Die Zugabe von Co^{2+} Ionen führte zu einer Restaktivität von 17%. Insgesamt zeigt WbgL keine strikte Notwendigkeit für divalente Metallionen. Das fehlende DXD Motiv in der Aminosäuresequenz ordnet WbgL in die GT-B Strukturfamilie ein. Diese Glykosyltransferasen zeichnen sich durch zwei separate Rossmann Domänen mit einer verbindenden Linker Region und einem katalytischen Zentrum zwischen den Domänen aus (Breton *et al.* 2006). Die Ergebnisse stehen in Einklang mit den GT-B Typ FucTs WbsJ (*E. coli* O128) und WbiQ (*E. coli* O127) (Li *et al.* 2008, Pettit *et al.* 2010). His₆PropWbgL präsentiert demnach typische Eigenschaften einer FucT mit GT-B Struktur.

4.5.8.4 Untersuchung des Akzeptorsubstratspektrums

Die Untersuchung des Akzeptorsubstratspektrums der His₆PropWgbL war neben dem bereits identifizierten nicht natürlichen Substrat Laktose von großem Interesse. Hierbei wurden die relativen Aktivitäten der rekombinanten α 1,2 FucT mit dem kontinuierlichen Fotometertest nach Barrat *et al.* untersucht (Abbildung 125).

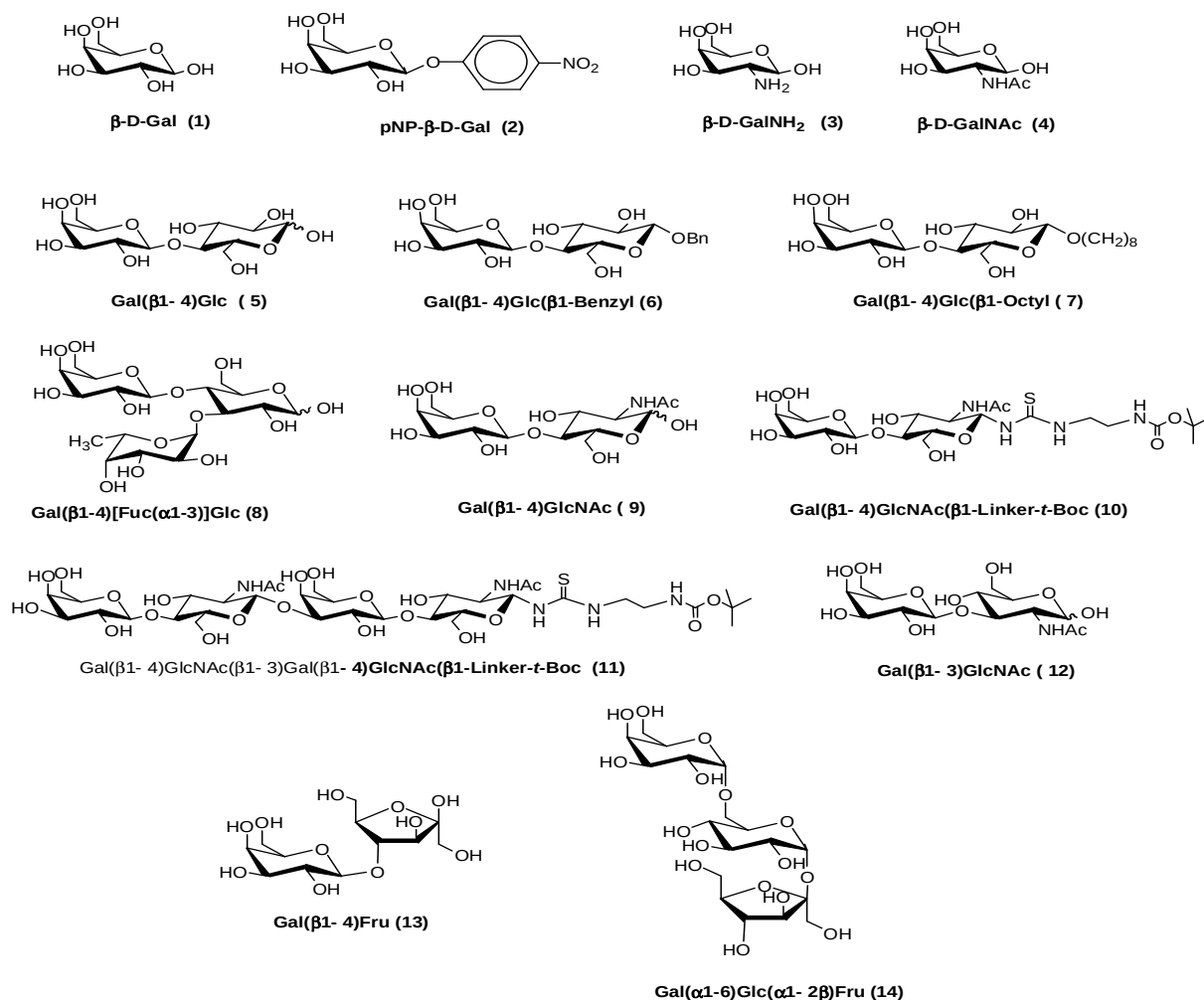


Abbildung 125: Akzeptorsubstrate der His₆PropWgbL modifiziert nach Engels *et al.* (Engels und Elling 2014)

5 mM Akzeptorsubstrat wurden mit 2 mM Donorsubstrat GDP-Fuc in 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,6) getestet. 100% relative Aktivität von His₆PropWgbL entsprechen 0,214 U/mg.

Tabelle 72 gibt einen Überblick über die Aktivitäten der rekombinanten α 1,2-FucT für diverse Akzeptorsubstrate in Relation zu dem Substrat Laktose. Die getesteten Monosaccharide D-Gal (1), Gal β -pNP (2), D-GalNH₂ (3) und D-GalNAc (4) machen deutlich, dass His₆PropWbgL eine klare Präferenz für die C2 Position der D-Gal zeigt und darüber hinaus auch eine strikte Regioselektivität demonstriert. Das Monosaccharid β -D-Gal (70%) ist ein besseres Substrat als das modifizierte und hydrophobere Gal β -pNP (28%). Unter den getesteten Di- und Oligosacchariden erweisen sich Laktose (5) und Laktulose (13) als Akzeptorsubstrate mit der höchsten Aktivität. Die relativ hohe Aktivität (85%) für Typ 2 LacNAc (9) steht im Gegensatz zu der Aktivität (10%) für das hydrophobere Linker-modifizierte Typ 2 LacNAc Substrat (10). Darüber hinaus führt dies zum vollständigen Verlust der Aktivität für Laktose-Akzeptoren, die am reduzierenden Ende hydrophobe Octyl- oder Benzyl-Gruppen (6 und 7) tragen. Längere Saccharide mit zwei Typ 2 LacNAc Einheiten (11) und verzweigte Oligosaccharide werden ebenfalls nicht akzeptiert. Diese Eigenschaft deutet auf eine enge Substrat-Bindetasche von WbgL hin. Wie die Struktur des O-Antigens ($-\beta$ -D-Man-(1 $\rightarrow$ 3)-[α -L-Fuc-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-Gal(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-GlcNAc-) aus *E. coli* O126 (Liu *et al.* 2007) schon vermuten lässt, dient auch Typ 1 LacNAc (12) als Akzeptorsubstrat für His₆PropWbgL, so dass sich hiermit weitere synthetische Möglichkeiten ergeben. Somit wäre beispielsweise die Synthese des Antigens H Typ 1 und Typ 2 denkbar. Im Gegensatz zu den bereits publizierten α 1,2-FucTs der GT Familie 11 (WbsJ, WbnK, WbwK und WbiQ) zeichnet sich WbgL durch die klare Präferenz von β 4-verknüpfter Galaktose-Akzeptoren aus. Die rekombinante GST-WbiQ, eine weitere α 1,2-FucT aus *E. coli* O127, zeigt vielmehr strikte Substratspezifität gegenüber Akzeptoren, die Gal(β 1-3)GalNAc-OR Verknüpfungen (T-Antigen) enthalten (Yi *et al.* 2005, Li *et al.* 2008, Pettit *et al.* 2010). Dennoch ist WbgL von besonderem Interesse für die Synthese von 2'-FL. Hier kann es als Alternative zu FutC aus *Helicobacter pylori*, das bereits zur Synthese von 2'-FL eingesetzt wurde (Albermann *et al.* 2001, Drouillard *et al.* 2006) und Typ 1 LacNAc Akzeptorsubstrate priorisiert (Stein *et al.* 2008), benutzt werden.

Tabelle 72: Akzeptorsubstrate der His₆PropWbgL modifiziert nach Engels *et al.* (Engels und Elling 2014)

Nr.	Substrate	Relative Aktivität [%]
1	D-Gal	70
2	pNP-(β 1Gal	28
3	D-GalNH ₂	ND
4	D-GalNAc	ND
5	Gal(β 1-4)Glc	100
6	Gal(β 1-4)Glc(β 1-Benzyl	ND
7	Gal(β 1-4)Glc(β 1-Octyl	ND
8	Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]Glc	ND
9	Gal(β 1-4)GlcNAc	85
10 ^a	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-Linker- <i>t</i> -Boc	10
11 ^a	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-Linker- <i>t</i> -Boc	ND
12	Gal(β 1-3)GlcNAc	28
13	Gal(β 1-4)Fru	125
14	Gal(α 1-6)Glc(α 1-2)Fru	ND

^a Referenz Rech *et al.* (Rech *et al.* 2011)

ND: Keine Aktivität detektierbar

4.5.8.5 Bestimmung der Substratkinetiken

Im Hinblick auf die Synthese von 2'-FL wurden die kinetischen Daten für das Akzeptorsubstrat Laktose und für den Donor GDP-Fuc bestimmt (Tabelle 73). Die kinetischen Konstanten für das Substrat Laktose und GDP-Fuc wurden anhand der Anfangsgeschwindigkeit im Bereich der linearen Steigung bei variablen Substratkonzentrationen mithilfe des Fotometertests nach Barrat berechnet. Für das nicht natürliche Substrat Laktose wurde ein K_m Wert von 5,3 mM (R^2 : 0,9935) und für GDP-Fuc von 0,27 mM (R^2 : 0,9907) bestimmt (Abbildung 126).

Tabelle 73: Kinetische Daten der His₆PropWgbL modifiziert nach Engels *et al.* (Engels und Elling 2014)

Substrat	K_m [mM]	K_{cat} [min ⁻¹]	K_{cat}/K_m [min ⁻¹ *mM ⁻¹]
Laktose	5,30	4,20	0,76
GDP-Fuc	0,27	3,96	14,67

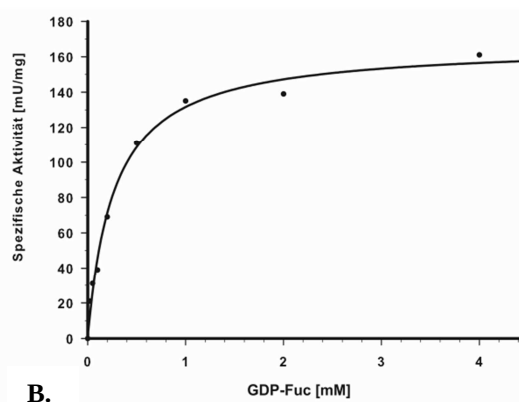
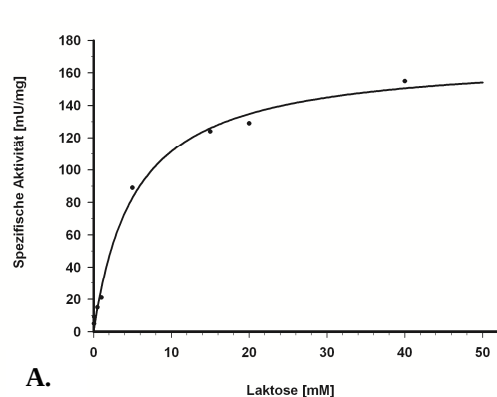


Abbildung 126: Kinetische Analyse der His₆PropWgbL für das Akzeptorsubstrat Laktose (A.) und für das Donorsubstrat GDP-Fuc (B.) modifiziert nach Engels *et al.* (Engels und Elling 2014)

Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mithilfe der Software Sigma Plot 10.0. Die kinetischen Daten wurden durch nicht lineare Regressionsanalyse der experimentellen Daten bestimmt. Bei den vorliegenden hyperbolen Verläufen der Kurven wurden die kinetischen Konstanten K_m und V_{max} mit der Michaelis-Menten-Gleichung bestimmt. Die Untersuchungen ergaben für das Akzeptorsubstrat Laktose einen K_m -Wert von 5,3 mM (R^2 : 0,9935; V_{max} : 170 mU/mg) und für das Donorsubstrat GDP-Fuc einen K_m -Wert von 0,27 mM (R^2 : 0,9907; V_{max} : 167 mU/mg).

Im Vergleich zu GST-WbsJ (Li *et al.* 2008) zeigt His₆PropWgbL einen signifikant höheren k_{cat} -Wert für Laktose (81-fach) und GDP-Fuc (30-fach). Der K_m -Wert von 5,3 mM für das unnatürliche Substrat Laktose ist geringfügig niedriger. Darüber hinaus spiegelt sich die überlegene katalytische Effizienz von WgbL im Vergleich zu WbsJ im k_{cat}/K_m -Wert für Laktose (120-fach höher) und GDP-Fuc (12-fach höher) wider. Obwohl die Affinität der Glutathion-S-Transferase-FucT2 (GST-FucT2) für Laktose (K_m : 0,168 mM) wesentlich höher ist (Albermann *et al.* 2001), überzeugt die drei-fach höhere spezifische Aktivität von WgbL für Laktose. Insgesamt eignet sich WgbL aufgrund seiner günstigen kinetischen Eigenschaften sehr gut für die Synthese von 2'-FL.

4.5.9 Klonierung und Expression von *his₆propfkp* aus *Bacterioides fragilis*

Zur Synthese von 2'-FL sollte des Weiteren die Bereitstellung des teuren Nukleotidzuckers GDP-Fuc garantiert werden. Nach Amplifikation des Gens *fkp* ausgehend von der genomischen DNA von *Bacterioides fragilis* (DSM 2151) erfolgte die Klonierung in den modifizierten Expressionsvektor pET22b-*his₆prop*. Der Vektor sollte die lösliche Expression von rekombinantem aktivem Protein in hohen Konzentrationen im Zytoplasma von *E. coli* JM109(DE3) gewährleisten. Der Erfolg der Klonierung und die Integrität des Konstruktes wurden durch Sequenzierung überprüft.

4.5.10 Aufreinigung der His₆PropFKP

Nach Anzucht von *E. coli* BL21(DE3)_pET22b-*his₆propfkp* zur Produktion von His₆PropFKP wurden in Schüttelkolbenexpression aus 1 Liter TB-Medium im Durchschnitt 18 g Zellen *E. coli* BL21(DE3) (Feuchtgewicht) gewonnen. Die hohe Ausbeute an Zellmasse verdeutlicht gute Wachstumsbedingungen während der Schüttelkolbenexpression. Die SDS-PAGE Analyse bestätigt die erfolgreiche Expression und Aufreinigung (Abbildung 127). Obwohl das Zellpellet die Bildung von „inclusion bodies“ zeigt, können insgesamt ausreichende Mengen an löslichem aufgereinigtem Protein gewonnen werden (Tabelle 74). Das in der SDS-PAGE Analyse detektierte Molekulargewicht von 130 kDa entspricht dem theoretisch berechneten Molekulargewicht von 129,68 kDa.

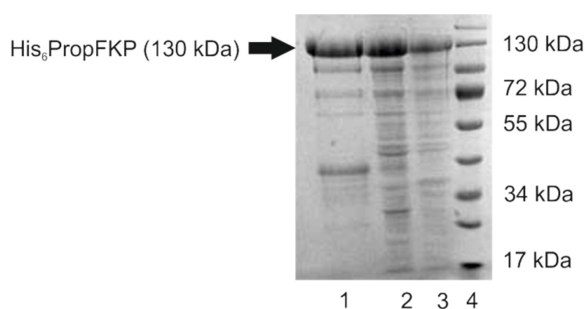


Abbildung 127: SDS-PAGE Analyse (Coomassie Färbung) der His₆PropFKP nach Aufreinigung mittels Ni²⁺-NTA Sepharose

Spur 1: IMAC-Pool; Spur 2: Rohextrakt; Spur 3: Zellpellet; Spur 4: Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas). Die SDS-PAGE Analyse zeigt ein apparentes Molekulargewicht von 130 kDa, das theoretische Molekulargewicht abgeleitet von der Primärsequenz wurde berechnet mit 129,7 kDa.

Tabelle 74: Aufreinigung der His₆PropFKP mittels Ni²⁺-NTA Sepharose

	Volumen [mL]	Gesamt- aktivität [U]	Gesamt- protein [mg]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Aufreinigungs- faktor [-]	Aus- beute [%]
Rohextrakt	15	67,50	225,0	0,30	1,0	100
IMAC Pool	18	53,46	52,5	1,98	3,0	79

Die spezifische Aktivität der rekombinanten His₆PropFKP liegt mit ca. 2 U/mg Protein in der gleichen Größenordnung wie His₆FKP (Wang *et al.* 2009). Gegenüber AtFKGP aus *Arabidopsis thaliana* ist die spezifische Aktivität jedoch ca. 15-fach erhöht (Kotake *et al.* 2008). Insgesamt stellt die Produktion von aktivem His₆PropFKP eine sehr gute und kostengünstige Basis für die *in vitro* Synthese von GDP-Fuc dar.

4.6 Entwicklung und Optimierung einer modularen Enzym-Kaskade zur Synthese des Glykanepitops 2'-Fukosyllaktose

Für die enzymatische Synthese von 2'-FL mit kombinatorischer Biokatalyse sollten zwei verschiedene Synthesestrategien überprüft werden. Im klassischen Zwei-Stufen Modus wird GDP-Fuc (FKP-Modul, Modul E, Abbildung 15) mithilfe von His₆PropFKP synthetisiert und anschließend isoliert. Das aufgereinigte Donorsubstrat sollte in einem zweiten Reaktor zur Synthese des Zielproduktes 2'-FL (FucT-Modul, Modul F, Abbildung 15) mit His₆PropWbgL eingesetzt werden. Im sequentiellen Modus in einem Topf wird unmittelbar nach der Synthese von GDP-Fuc die Synthese von 2'-FL im selben Reaktor durch His₆PropWbgL eingeleitet.

4.6.1 Sequentielle Enzymkaskade zur Synthese von 2'-Fukosyllaktose mit dem FKP- und FucT-Modul (Modul E + Modul F)

Die sequentielle Synthese von 2'-FL wurde zunächst im klassischen Zwei-Stufen Modus gestartet. Dabei konnten für die Synthese des Donorsubstrates GDP-Fuc und für das Trisaccharid 2'-FL unabhängige Reaktionsbedingungen gewählt werden. Das Zwischenprodukt GDP-Fuc wurde hier isoliert.

4.6.1.1 Semipräparative Synthese von GDP-Fuc mit dem FKP-Modul (Modul E)

Mit der CE-UV Analyse zeigte die Synthese des Schlüsselintermediates GDP-Fuc mit His₆PropFKP nach 3 h Reaktionszeit einen quantitativen Umsatz von 10 mM L-Fuc (Abbildung 128). Die geringe Ausbeute von 43% Produkt (25 mg, 42,5 µmol) nach Isolation des Donorsubstrates ist mit dem Gelchromatografie-Verfahren zu erklären, welches durch die starke Verdünnung des Zielproduktes mit dem Laufmittel zu hohem Produktverlust führt. Für eine zukünftige Optimierung stellt die Verwendung der präparativen HILIC-Methode (Kapitel 3.12.5.1) eine Alternative dar. Die Identität des isolierten Substrates wurde durch

Vergleich mit kommerzieller GDP-Fuc und durch Massenspektrometrie bestätigt (Abbildung 129).

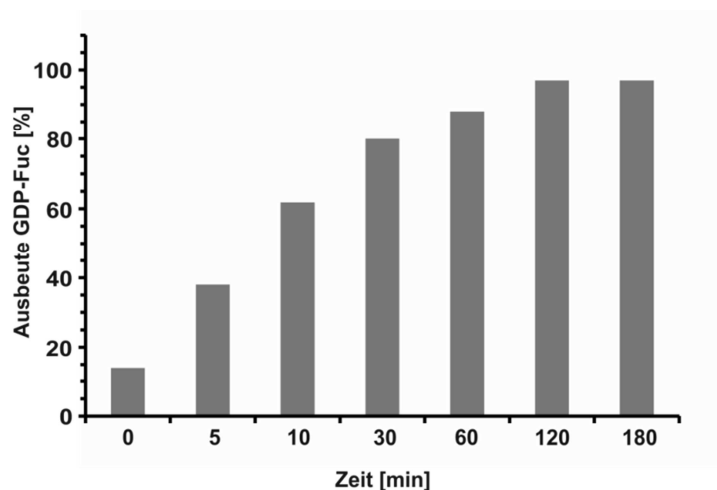


Abbildung 128: Synthese von GDP-Fuc mit dem FKP-Modul (Modul E) im semipräparativen Maßstab (10 mL) modifiziert nach Engels *et al.* (Engels und Elling 2014)

Die Synthese von GDP-Fuc wurde mit 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 8 mM MgCl₂, 10 mM GTP, 10 mM ATP, 10 mM L-Fuc, 10 U anorganischer Pyrophosphatase und 2 U His₆PropFKP für 3 h bei 37°C durchgeführt. 100% Ausbeute entsprechen 10 mM GDP-Fuc.

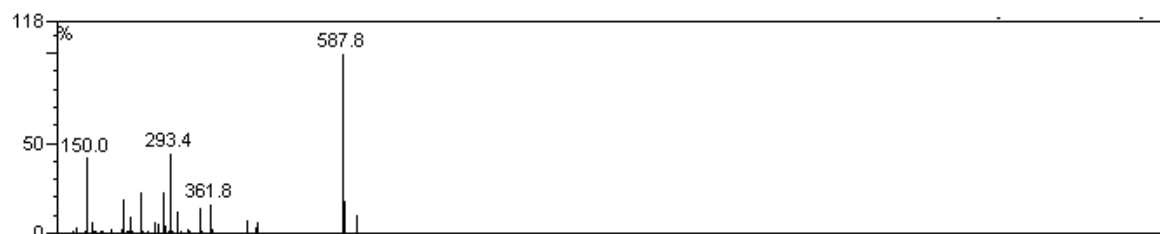


Abbildung 129: ESI-MS Analyse der Synthese von GDP-Fuc mit dem FKP-Modul (Modul E) nach Engels *et al.* (Engels und Elling 2014)

Die detektierte Masse m/z 587,8 für $[M-H]^-$ wurde der berechneten Masse $[M]$ m/z 588,3 von GDP-Fuc zugeordnet.

4.6.1.2 Semipräparative Synthese von 2'-Fukosyllaktose mit dem FucT-Modul (Modul F)

Die anschließende Synthese von 2'-FL mit His₆PropWgbL, GDP-Fuc und Laktose wurde in einem separaten Reaktionsgefäß gestartet. Nach 26 h Reaktionszeit konnte über CE-UV und HPAEC-PAD Analyse eine 90%-ige Ausbeute von 2'-FL beobachtet werden (Abbildung 130).

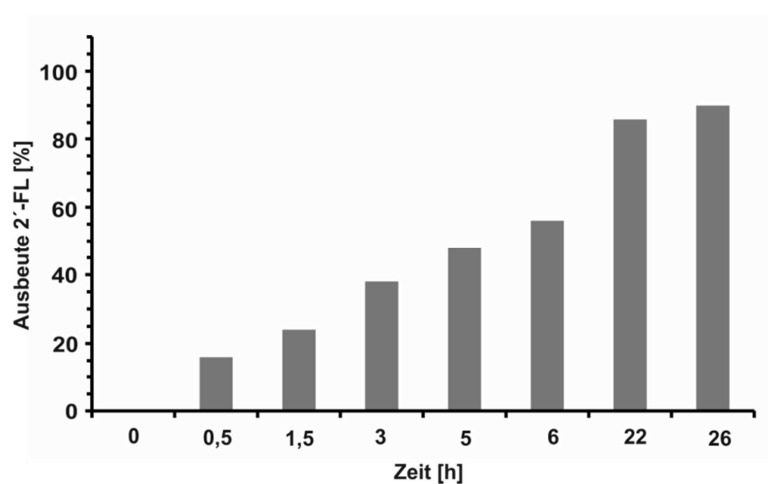


Abbildung 130: Synthese von 2'-FL mit dem FucT-Modul (Modul F) im semipräparativen Maßstab (10 mL) modifiziert nach Engels *et al.* (Engels und Elling 2014)

Der Syntheseansatz enthielt 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 8 mM Laktose; 1 mM DTT, 4,25 mM GDP-Fuc, 2 mM MnCl₂, 5 U alkalische Phosphatase und 2 U His₆PropWgbL. Der Ansatz wurde 26 h bei 27°C inkubiert. 100% Ausbeute entsprechen 4,25 mM 2'-FL.

Die Isolation von 2'-FL mithilfe der Gelchromatografie führte nach Evaporisation zu 8 mg 2'-FL (22 µmol). Auch hier ist die berechnete Ausbeute von 44% nicht zufriedenstellend. Anstelle der Gelchromatografie könnte eine HPLC Methode unter Benutzung einer Hypercarb HPLC Säule zu einer verbesserten Trennleistung führen. Den Angaben des Herstellers Thermo Fisher zufolge eignen sich Hypercarb Säulen, bestehend aus porösem Graphit-Carbon Material, hervorragend zur Trennung von hoch polaren Oligosacchariden mit ähnlichen Strukturen. Die Charakterisierung des Trisaccharids über MS Analyse (Abbildung 131) und ¹H-NMR Spektroskopie (Abbildung 132) bestätigte eindeutig die Produktidentität. Die NMR-Daten sind in Übereinstimmung mit den bereits publizierten Daten von Urashima *et al.* (Urashima *et al.* 1997).

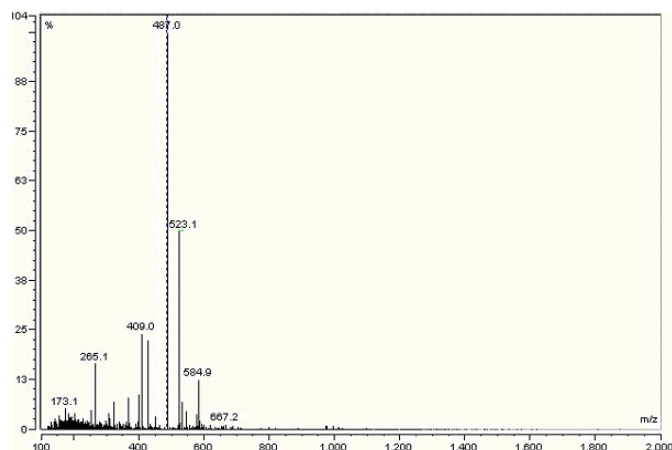


Abbildung 131: ESI-MS Analyse der Synthese von 2'-FL mit der His₆PropWbgL (Modul F) nach Engels *et al.* (Engels und Elling 2014) im semipräparativen Maßstab
Die detektierte Masse m/z 487,0 für $[M-H]^-$ wurde der berechneten Masse $[M]$ m/z 488,44 von 2'-FL zugeordnet.

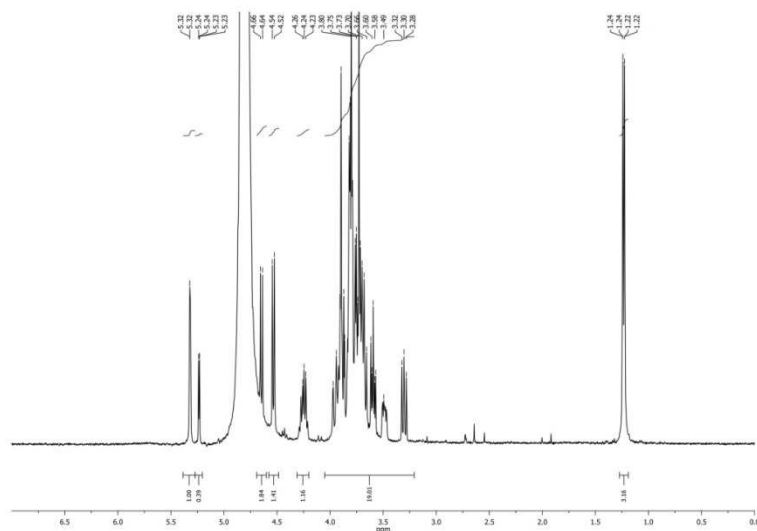


Abbildung 132: ¹H-NMR von Fuc(α1-2)Gal(β1-4)Glc (2'-FL)

Das Spektrum wurde aufgenommen in D₂O (400 MHz; 30°C) mit einem Bruker AV 400 Ultra Shield Spektrometer. Die chemische Verschiebung ist angegeben in δ-Maßstab [ppm] und die Kopplungskonstanten in Hertz.

δ=5,32 (s, 1H, H-1 Fuc'' α1-2); 5,24 (d, $J=3.7$ Hz, H-1 Glc-α); 4,65 (d, $J=7.9$ Hz, H-1 Glc-β); 4,53 (d, $J=7.7$ Hz, H-1 Gal' β1-4); 4,24 (m, 1H, H-5 Fuc'' α1-2); 1,23 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, CH₃ Fuc'' α1-2)

4.6.2 Sequentielle Synthese von 2'-Fukosyllaktose mit dem FKP- und FucT-Modul in einem Topf (Modul E + Modul F)

Um die zeitintensive und aufwendige Isolation des Donorsubstrates GDP-Fuc zu umgehen, wendeten wir eine Kaskaden-Synthese in einem Topf an. Die erste Stufe umfasste die Synthese von GDP-Fuc mit der rekombinanten His₆PropFKP, deren Reaktionsverlauf mittels CE-UV Analyse verfolgt wurde. Nach 3 h Reaktionszeit wurde der Ansatz mit alkalischer Phosphatase inkubiert, um die Nukleotid-Nebenprodukte zu spalten (Reaktionslösung I). Dieser Schritt war zwingend notwendig, da eine Inhibitionsuntersuchung bei Zusatz von 5 mM ATP und 5 mM GTP in den Reaktionsansatz eine Restaktivität von 33,3% für His₆PropWbgL ergab (Abbildung 133).

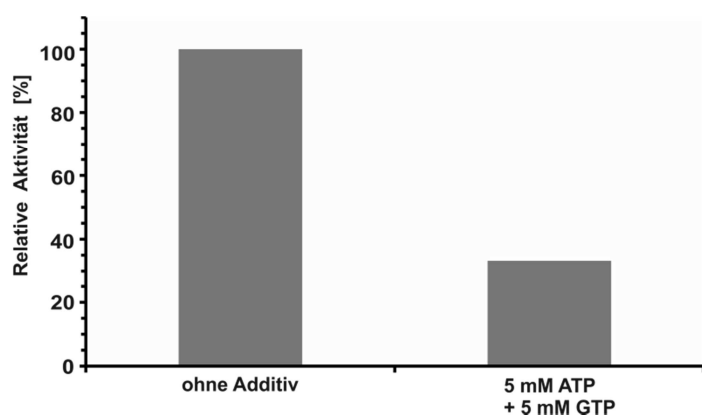


Abbildung 133: Einfluss von GTP und ATP auf die Enzymaktivität der His₆PropWbgL

Der Einfluss von 5 mM ATP und 5 mM GTP wurde bei 27°C in 50 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,6) getestet. 100% relative Aktivität entsprechen 0,23 U/mg.

Die zweite Stufe beinhaltete die Zugabe von 8 mM Laktose zur Reaktionslösung I (mit 4,3 mM GDP-Fuc) für die *in vitro* Synthese von 2'-FL mit His₆PropWbgL. Nach 22 h konnte ein vollständiger Umsatz von 4,3 mM GDP-Fuc mittels HPAEC-PAD Analyse verzeichnet werden (Abbildung 134). In einem metabolisch veränderten *E. coli* Stamm konnten mit überexprimiertem FutC aus *Helicobacter pylori* extrazellulär 120 mg 2'-FL/L/h erzielt werden (Drouillard *et al.* 2006, Aas *et al.* 2007). Der analytische Ansatz der Zwei-Stufen-Synthese von 2'-FL in einem Topf würde unter Berücksichtigung einer Maßstabsvergrößerung mit 99,6 mg/L/h ein Ergebnis der gleichen Größenordnung liefern. Damit liefert diese Synthesestrategie des analytischen Ansatzes eine vielversprechende Basis für zukünftige Synthesen im präparativen Maßstab.

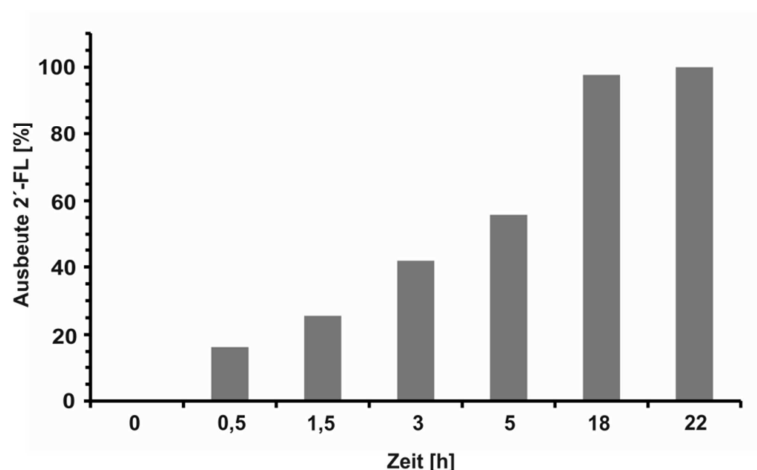


Abbildung 134: Synthese von 2'-FL (Modul E + Modul F/Sequentieller Modus in einem Topf) im analytischen Maßstab (700 μ L) modifiziert nach Engels *et al.* (Engels und Elling 2014)

Die Synthese wurde durchgeführt in 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 8 mM $MgCl_2$, 5 mM GTP, 5 mM ATP, 5 mM L-Fuc, 10 U Pyrophosphatase und 1 U His₆PropFKP für 4 h bei 37°C. Nach vollständigem Umsatz von ATP wurde die Reaktionslösung I mit 10 U alkalischer Phosphatase für 3 h bei 30°C inkubiert. Im 2. Syntheseschritt wurde die Reaktionslösung I (mit 4,3 mM GDP-Fuc) mit 8 mM Laktose, 1 mM DTT, 5 U alkalischer Phosphatase und 2 U His₆PropWbgL versetzt und für 22 h bei 27°C inkubiert. 100% 2'-FL entsprechen einer Konzentration von 4,3 mM Produkt.

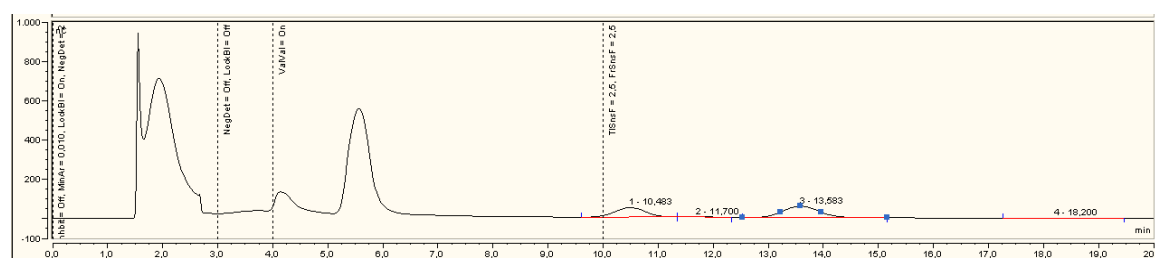


Abbildung 135: HPAEC-PAD Analyse der Synthese von 2'-FL (Modul E + Modul F/Sequentieller Modus in einem Topf) nach Engels *et al.* (Engels und Elling 2014)

Das HPAEC-PAD Chromatogramm zeigt die Synthese von 2'-FL mit His₆PropWbgL nach 5 h Syntheszeit. Die Retentionszeit von 2'-FL (13,6 min) und von Laktose (10,4 min) wurde mit den entsprechenden kommerziellen Produkten zugeordnet.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die *in vitro* Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops (GlcA(β 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-R) und des Glykanepitops 2'-Fukosyllaktose (2'-FL, Fuc(α 1-2)Gal(β 1-4)Glc) sowie die Bereitstellung von UDP-Glukuronsäure (UDP-GlcA) als Donorsubstrat für das nicht-sulfatierte HNK-1 Epitop mithilfe von modularen Enzym-Kaskaden.

Für die Synthese von UDP-GlcA erwiesen sich zwei UDP-Glukose-Dehydrogenasen, die humane His₆UGDH und die bakterielle His₆KfiD aus *E. coli* K5, als geeignete Enzyme. Aufgrund der höheren katalytischen Effizienz wurde die rekombinante His₆UGDH jedoch favorisiert. Für die Synthese von UDP-GlcA wurden drei verschiedene Lösungsansätze überprüft. Dem direkten einstufigen Weg mit dem UGDH-Modul wurden zwei kombinatorische Synthesestrategien gegenübergestellt. In einem Ein-Topf System erfolgte die Kopplung des SuSy-Moduls mit dem UGDH-Modul und die Kopplung des SuSy- und UGDH-Moduls mit dem UMPK-Modul. Für das UMPK-Modul wurde die humane UMP-Kinase erfolgreich kloniert und charakterisiert. In allen Synthesestrategien konnte die Funktionalität der ausgewählten Enzym-Modul-Systeme (EMS) durch die Bestätigung der molekularen Masse von UDP-GlcA mittels ESI-MS Analyse nachgewiesen werden. Der direkte Syntheseweg für UDP-GlcA wird wegen seiner kürzeren Syntheszeit und der chemischen Instabilität des Nukleotidzuckers bevorzugt. Mit der Regeneration des Kofaktors NAD⁺ stellt dieser Weg ausgehend von UDP-Glukose (UDP-Glc) und den rekombinanten Enzymen His₆UGDH und His₆NOX eine kosten- und zeiteffiziente Methode dar, mit der 92% Ausbeute erreicht werden.

Für die Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops mit dem GlcAT-Modul musste zunächst eine Glukuronyltransferase, die GlcA von UDP-GlcA regiospezifisch auf die Akzeptorstruktur LacNAc-Linker-*t*-Boc überträgt, in *E. coli* produziert und biochemisch charakterisiert werden. Die murine His₆catGlcAT-P erwies sich dabei für das geplante EMS zur Synthese von Glukuroniden als sehr gut geeignet. Bei der stufenweisen Optimierung der Enzym-Kaskaden gelang erstmals die Kopplung des SuSy-Moduls mit dem UGDH- und GlcAT-Modul in einem Ein-Topf System. Dabei wurde im präparativen Maßstab für das nicht-sulfatierte HNK-1 Epitop eine Ausbeute von 79% erzielt. Mithilfe der integrierten *in*

situ Regeneration von UDP-GlcA wurde der teure Nukleotidzucker in ca. 18 Umläufen rezykliert. Somit führt der Einsatz von katalytischen Mengen UDP zu reduzierten Synthesekosten. Das entwickelte EMS stellt einen innovativen Ansatz zur *in vitro* Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Eptitops dar und bietet mit seiner hohen Flexibilität darüber hinaus die Möglichkeit, weitere Glukuronyltransferasen zu testen und neue Glukuronide zu synthetisieren.

Zur Produktion des Glykanepitops 2'-FL konnte WbgL aus *E. coli* O126 als neuartige α 1,2-Fukosyltransferase identifiziert werden. Diese zeigt im Vergleich zu FutC trotz der niedrigen Sequenzhomologie eine dreifach höhere Aktivität für das nicht-natürliche Akzeptorsubstrat Laktose. Damit ist WbgL für die enzymatische Produktion von 2'-FL und weiteren natürlichen sowie modifizierten α 1,2-fukosylierten Galakto-Oligosacchariden geeignet.

Darüber hinaus ermöglichte die Produktion der bifunktionalen L-Fukokinase/L-Fuc-1-P Guanylyltransferase (FKP) aus *Bacterioides fragilis* 9343 die präparative Synthese des Donorsubstrates GDP-Fukose (GDP-Fuc) mit einer Ausbeute von 100% im FKP-Modul. Durch Kopplung des FKP-Moduls mit dem FucT-Modul konnte die abschließende präparative Synthese von 2'-FL im klassischen sequentiellen Modus etabliert werden. Die neuartige α 1,2-Fukosyltransferase WbgL wurde unter dem Aktenzeichen PCT. Int. Appl. (2012), WO 2012097950 A1 20120726, zum internationalen Patent angemeldet. Zurzeit wird sie von der Fa. Jennewein Biotechnologie GmbH (Bonn, Germany) im industriellen Maßstab genutzt.

.

6 Summary

The aim of this work was the *in vitro* synthesis of the non-sulfated HNK-1 epitope (GlcA(β 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-R) and the glycan epitope 2'-fucosyllactose (2'-FL, Fuc(α 1-2)Gal(β 1-4)Glc) and furthermore the provision of UDP-glucuronic acid (UDP-GlcA) as donor substrate for the non-sulfated HNK-1 epitope with modular enzyme-cascades.

For the synthesis of UDP-GlcA two UDP-glucose-dehydrogenases, the human His₆UGDH and His₆KfiD of *E. coli* K5 revealed as suitable enzymatic tools. However, because of its higher catalytic efficiency recombinant His₆UGDH was preferred. Three different synthesis strategies were tested. The one-step process with the UGDH-module was compared with two combinatorial strategies. In a one-pot system the combination of the SuSy-module with the UGDH-module and furthermore the combination of the SuSy- and UGDH-module with the UMPK-module were carried out. For the UMPK-module a human UMP-kinase was successfully produced and characterized. The functionality of all selected enzyme-module systems was proven by ESI-MS analysis of the target product UDP-GlcA.

However, due to the shorter synthesis period and the chemical instability of the nucleotide sugar the one-step process was favoured. With the regeneration of the cofactor NAD⁺, -realized by applying His₆NOX-, this strategy reveals as a cost- and time-efficient method with a yield of 92% for UDP-GlcA.

Establishing the GlcAT-module required the production of a glucuronyltransferase, which catalyses the regio-specific transfer of GlcA from UDP-GlcA onto the acceptor substrate LacNAc-linker-*t*-Boc. The biochemical characterization confirmed recombinant His₆catGlcAT-P from *Mus musculus* as a potential enzymatic tool for the synthesis of the non-sulfated HNK-1 epitope in combinatorial biocatalysis.

For the first time step by step optimization of the enzyme cascades led to the combination of the SuSy-module with the UGDH- and GlcAT-module in a one-pot system with a yield of 79% on preparative scale. Based on this result the integrated *in situ* regeneration of UDP-GlcA was accomplished with cycle numbers of 18. Thus, this strategy rationalizes synthesis cost for the expensive nucleotide sugar UDP-GlcA. The demonstrated EMS has the potential to be used for the synthesis of the non-sulfated HNK-1 epitope modified by various

linkers as well as glucuronides by exchange of the acceptor substrates or glucuronyltransferases, respectively.

For the production of the glycan-epitope 2'-FL WbgL of *E. coli* O126 could be identified as novel α 1,2-fucosyltransferase with low sequence homology to FutC. In comparison to FutC WbgL shows a three-fold higher activity for the non-natural acceptor substrate lactose. In line with these results WbgL is a favourable enzyme for the enzymatic synthesis of 2'-FL and other natural as well as modified α 1,2-fucosylated galakto-oligosaccharides.

Furthermore the production of bifunctional L-fucokinase/L-Fuc-1-P guanylyltransferase (FKP) of *Bacterioides fragilis* 9343 allowed the preparative synthesis of the donor substrate GDP-Fucose (GDP-Fuc) with a yield of 100% in the FKP-module. The combination of the FKP-module with the FucT-module offered the possibility for preparative synthesis of 2'-FL in classical sequential mode. An international patent was granted for the identification of a novel bacterial α 1,2'-fucosyltransferase in the synthesis of 2'-FL (reference number: PCT. Int. Appl. (2012), WO 2012097950 A1 20120726). To date the identified novel enzyme is introduced into industrial production of 2'-FL by the company "Jennewein Biotechnologie GmbH" (Bonn, Germany).

7 Verzeichnisse

7.1 Literaturverzeichnis

Aas, F. E., Vik, Å., Vedde, J., Koomey, M. und Egge-Jacobsen, W. (2007). "Neisseria gonorrhoeae O-linked pilin glycosylation: functional analyses define both the biosynthetic pathway and glycan structure." *Molecular Microbiology* **65**(3): 607-624.

Abo, T. und Balch, C. M. (1981). "A differentiation antigen of human NK-cells and K-cells identified by a monoclonal-antibody (HNK-1)." *Journal of Immunology* **127**(3): 1024-1029.

Adamiak, K., Anders, T., Henze, M., Keul, H., Möller, M. und Elling, L. (2012). "Chemo-enzymatic synthesis of functionalized oligomers of N-acetylglucosamine glycan derivatives and their immobilization on biomaterial surfaces." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **84**: 108-114.

Aebi, M., Bernasconi, R., Clerc, S. und Molinari, M. (2010). "N-glycan structures: recognition and processing in the ER." *Trends in Biochemical Sciences* **35**(2): 74-82.

Alavi, A. und Axford, J. S. (2008). "Sweet and sour: the impact of sugars on disease." *Rheumatology: Oxford Journals* **47**(6): 760-770.

Albermann, C., Piepersberg, W. und Wehmeier, U. F. (2001). "Synthesis of the milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose using recombinant bacterial enzymes." *Carbohydrate Research* **334**(2): 97-103.

Allory, Y., Commo, F., Boccon-Gibod, L., Sibony, M., Callard, P., Ronco, P. und Debiec, H. (2006). "Sulfated HNK-1 Epitope in Developing and Mature Kidney: A New Marker for Thin Ascending Loop of Henle and Tubular Injury in Acute Tubular Necrosis." *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **54**(5): 575-584.

Anders, T., Adamiak, K., Keul, H., Elling, L. und Möller, M. (2011). "Synthesis of a Difunctional Orthogonal Coupler for the Preparation of Carbohydrate-Functionalized sP(EO-stat-PO) Hydrogels." *Macromolecular Bioscience* **11**: 1201–1210.

Barratt, D. H. P., Barber, L., Kruger, N. J., Smith, A. M., Wang, T. L. und Martin, C. (2001). "Multiple, Distinct Isoforms of Sucrose Synthase in Pea." *Plant Physiology* **127**: 655–664.

Baumgärtner, F., Seitz, L., Sprenger, G. A. und Albermann, C. (2013). "Construction of *Escherichia coli* strains with chromosomally integrated expression cassettes for the synthesis of 2'-fucosyllactose." *Microbial Cell Factories* **12**: 40-53.

Belot, F., Otter, A., Fukuda, M. und Hindsgaul, O. (2003). "Efficient Synthesis of Two HNK-1 Related Pentasaccharides." *Synlett* **2003**(09): 1315-1318.

Bennett, E. P., Mandel, U., Clausen, H., Gerken, T. A., Fritz, T. A. und Tabak, L. A. (2012). "Control of mucin-type O-glycosylation: A classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family." *Glycobiology* **22**(6): 736-756.

Blank, L. M., McLaughlin, R. L. und Nielsen, L. K. (2005). "Stable production of hyaluronic acid in *Streptococcus zooepidemicus* chemostats operated at high dilution rate." *Biotechnology and Bioengineering* **90**(6): 685-693.

Boersema, P. J., Mohammed, S. und Heck, A. J. R. (2008). "Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **391**(1): 151-159.

Bojarová, P. und Křen, V. (2009). "Glycosidases: a key to tailored carbohydrates." *Trends in Biotechnology* **27**(4): 199-209.

Bojarova, P., Rosencrantz, R. R., Elling, L. und Kren, V. (2013). "Enzymatic glycosylation of multivalent scaffolds." *Chemical Society Reviews* **42**(11): 4774-4797.

Bolotin, A., Quinquis, B., Renault, P., Sorokin, A., Ehrlich, S. D., Kulakauskas, S., Lapidus, A., Goltsman, E., Mazur, M., Pusch, G. D., Fonstein, M., Overbeek, R., Kyprides, N., Purnelle, B., Prozzi, D., Ngui, K., Masuy, D., Hancy, F., Burteau, S., Boutry, M., Delcour, J., Goffeau, A. und Hols, P. (2004). "Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*." *Nature Biotechnology* **22**(12): 1554-1558.

Bradford, M. M. (1976). "Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding." *Analytical Biochemistry* **72**(1-2): 248-254.

Breton, C., Snajdrova, L., Jeanneau, C., Koca, J. und Imberty, A. (2006). "Structures and mechanisms of glycosyltransferases." *Glycobiology* **16**(2): 29R-37R.

Bucurenci, N., Sakamoto, H., Briozzo, P., Palibroda, N., Serina, L., Sarfati, R. S., Labesse, G., Briand, G., Danchin, A., Bârză, O. und Gilles, A.-M. (1996). "CMP Kinase from *Escherichia coli* Is Structurally Related to Other Nucleoside Monophosphate Kinases." *Journal of Biological Chemistry* **271**(5): 2856-2862.

Bülter, T. und Elling, L. (1999). "Enzymatic synthesis of nucleotide sugars." *Glycoconjugate Journal* **16**(2): 147-159.

Bülter, T., Schumacher, T., Namdjou, D.-J., Gutiérrez Gallego, R., Clausen, H. und Elling, L. (2001). "Chemoenzymatic Synthesis of Biotinylated Nucleotide Sugars as Substrates for Glycosyltransferases." *ChemBioChem* **2**(12): 884-894.

Bülter, T., Wandrey, C. und Elling, L. (1997). "Chemoenzymatic synthesis of UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine." *Carbohydrate Research* **305**(3-4): 469-473.

Campbell, R. E., Mosimann, S. C., van de Rijn, I., Tanner, M. E. und Strynadka, N. C. J. (2000). "The First Structure of UDP-Glucose Dehydrogenase Reveals the Catalytic Residues Necessary for the Two-fold Oxidation^{†,‡}." *Biochemistry* **39**(23): 7012-7023.

Casado, J. G., Delgado, E., Patsavoudi, E., Duran, E., Sanchez-Correa, B., Morgad, S., Solana, R. und Tarazona, R. (2008). "Functional Implications of HNK-1 Expression on Invasive Behaviour of Melanoma Cells." *Journal of Tumor Biology* **29**(5): 304-310.

Cer, R. Z., Mudunuri, U., Stephens, R. und Lebeda, F. J. (2009). "IC50-to-Ki: a web-based tool for converting IC50 to Ki values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding." *Nucleic Acids Research* **37**(suppl 2): W441-W445.

Chong, B. F., Blank, L. M., Maclaughlin, R. und Nielsen, L. K. (2005). "Microbial hyaluronic acid production." *Applied Microbiology & Biotechnology* **90**(6): 341-351.

Cobucci-Ponzano, B., Strazzulli, A., Rossi, M. und Moracci, M. (2011). "Glycosynthases in Biocatalysis." *Advanced Synthesis & Catalysis* **353**(13): 2284-2300.

Cox, H., Mead, D., Sudbery, P., Eland, R. M., Mannazzu, I. und Evans, L. (2000). "Constitutive expression of recombinant proteins in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* using the PMA1 promoter." *Yeast* **16**(13): 1191-1203.

Coyne, M. J., Reinap, B., Lee, M. M. und Comstock, L. E. (2005). "Human Symbionts Use a Host-Like Pathway for Surface Fucosylation." *Science* **307**: 1778-1781.

De Deken, R. H. (1966). "The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast." *Journal of General Microbiology* **44**(2): 149-156.

de Vries, T., Knegt, R. M. A., Holmes, E. H. und Macher, B. A. (2001). "Fucosyltransferases: structure/function studies." *Glycobiology* **11**(10): 119R-128R.

DeAngelis, P. L., Oatman, L. C. und Gay, D. F. (2003). "Rapid chemoenzymatic synthesis of monodisperse hyaluronan oligosaccharides with immobilized enzyme reactors." *Journal of Biological Chemistry*: M306431200.

Drouillard, S., Driguez, H. und Samain, E. (2006). "Large-Scale Synthesis of H-Antigen Oligosaccharides by Expressing *Helicobacter pylori* α 1,2-Fucosyltransferase in Metabolically Engineered *Escherichia coli* Cells." *Angewandte Chemie International Edition* **45**(11): 1778-1780.

Easley, K. E., Sommer, B. J., Boanca, G., Barycki, J. J. und Simpson, M. A. (2007). "Characterization of human UDP-glucose dehydrogenase reveals critical catalytic roles for lysine 220 and aspartate 280." *Biochemistry* **46**(2): 369-378.

Egger, S., Chaikuad, A., Kavanagh, K. L., Oppermann, U. und Nidetzky, B. (2011). "Structure and Mechanism of Human UDP-glucose 6-Dehydrogenase." *Journal of Biological Chemistry* **286**(27): 23877-23887.

Elling, L. (1997). *Glycobiotechnology: Enzymes for the synthesis of nucleotide sugars. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Scheper, T. Berlin, Springer-Verlag. **58**: 89-144.

Elling, L., Rupprath, C., Günther, N., Römer, U., Verseck, S., Weingarten, P., Dräger, G., Kirschning, A. und Piepersberg, W. (2005). "An Enzyme Module System for the Synthesis of dTDP-activated Deoxysugars from dTMP and Sucrose." *ChemBioChem* **6**: 1423-1430.

Engels, L. und Elling, L. (2012). *Carbohydrate modifying enzymes and microorganisms. Enzymatic and Chemoenzymatic Synthesis of Nucleotide Sugars: Novel Enzymes, Novel Substrates, Novel Products, and Novel Routes*. Grunwald, P., Stanford Publishing, Stanford: 237-251.

Engels, L. und Elling, L. (2014). "WbgL: a novel bacterial α 1,2-fucosyltransferase for the synthesis of 2'-fucosyllactose." *Glycobiology* **24**(2): 170-178.

Feingold, D. S. und Franzen, J. S. (1981). "Pyridine nucleotide-linked four-electron transfer dehydrogenases." *Trends in Biochemical Sciences* **6**(0): 103-105.

Fialová, P., Namdjou, D.-J., Ettrich, R., Přikrylová, V., Rauvolfová, J., Křenek, K., Kuzma, M., Elling, L., Bezouška, K. und Křen, V. (2005). "Combined Application of Galactose Oxidase and β -N-Acetylhexosaminidase in the Synthesis of Complex Immunoactive N-Acetyl-D-galactosaminides." *Advanced Synthesis & Catalysis* **347**(7-8): 997-1006.

Floege, J. (2003). "Recurrent glomerulonephritis following renal transplantation: an update." *Nephrology Dialysis Transplantation* **18**(7): 1260-1265.

Floege, J. und Feehally, J. (2000). "IgA Nephropathy: Recent Developments." *Journal of the American Society of Nephrology* **11**(12): 2395-2403.

Fondeur-Gelinotte, M., Lattard, V., Gulberti, S., Oriol, R., Mulliert, G., Coughtrie, M. W., Magdalou, J., Netter, P., Ouzzine, M. und Fournel-Gigleux, S. (2007). "Molecular basis for acceptor substrate specificity of the human beta1,3-glucuronosyltransferases GlcAT-I and GlcAT-P involved in glycosaminoglycan and HNK-1 carbohydrate epitope biosynthesis, respectively." *Glycobiology* **17**(8): 857-867.

Gagneux, P. und Varki, A. (1999). "Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function." *Glycobiology* **9**(8): 747-755.

Garrido, D., Dallas, D. C. und Mills, D. A. (2013). "Consumption of human milk glycoconjugates by infant-associated bifidobacteria: mechanisms and implications." *Microbiology* **159**(Pt 4): 649-664.

Geueke, B., Riebel, B. und Hummel, W. (2003). "NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*: a new catalyst for the regeneration of NAD." *Enzyme and Microbial Technology* **32**(2): 205-211.

Gietz, R. D. und Woods, R. A. (2002). "Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method." *Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology, Pt B* **350**: 87-96.

Giniger, E., Varnum, S. M. und Ptashne, M. (1985). "Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast." *Cell* **40**(4): 767-774.

Grangeasse, C., Obadia, B., Mijakovic, I., Deutscher, J., Cozzzone, A. J. und Doublet, P. (2003). "Autophosphorylation of the *Escherichia coli* Protein Kinase Wzc Regulates Tyrosine Phosphorylation of Ugd, a UDP-glucose Dehydrogenase." *Journal of Biological Chemistry* **278**(41): 39323-39329.

Hancock, S. M., Vaughan, M. D. und Withers, S. G. (2006). "Engineering of glycosidases and glycosyltransferases." *Current Opinion in Chemical Biology* **10**(5): 509-519.

Hannun, Y. A. und Obeid, L. M. (2008). "Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**(2): 139-150.

Hinterberg, B., Klos, C. und Tenhaken, R. (2002). "Recombinant UDP-glucose dehydrogenase from soybean." *Plant Physiology and Biochemistry* **40**(12): 1011-1017.

Hokke, C. H., Zervosen, A., Elling, L., Joziassse, D. H. und van den Eijnden, D. H. (1996). "One-pot enzymatic synthesis of the Gal(α 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc sequence with *in situ* UDP-Gal regeneration." *Glycoconjugate Journal* **13**(4): 687-692.

Hossler, P., Khattak, S. F. und Li, Z. J. (2009). "Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture." *Glycobiology* **19**(9): 936-949.

Huh, J. W., Lee, H. J., Choi, M. M., Yang, S. J., Yoon, S. Y., Kim, D. W., Kim, S. Y., Choi, S. Y. und Cho, S. W. (2005). "Identification of a UDP-glucose-binding site of human UDP-glucose dehydrogenase by photoaffinity labeling and cassette mutagenesis." *Bioconjugate Chemistry* **16**(3): 710-716.

Hummel, W. und Riebel, B. (2003). "Isolation and biochemical characterization of a new NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*." *Biotechnology Letters* **25**(1): 51-54.

Ilyas, A. A., Chou, D. K. H., Jungalwala, F. B., Costello, C. und Quarles, R. H. (1990). "Variability in the Structural Requirements for Binding of Human Monoclonal Anti-Myelin-Associated Glycoprotein Immunoglobulin M Antibodies and HNK-1 to Sphingoglycolipid Antigens." *Journal of Neurochemistry* **55**(2): 594-601.

Imiya, K., Ishizaki, T., Seiki, T., Saito, F., Inazawa, J., Oka, S. und Kawasaki, T. (2002). "cDNA cloning, genomic structure and chromosomal mapping of the mouse glucuronyltransferase-S involved in the biosynthesis of the HNK-1 carbohydrate epitope." *Gene* **296**(1-2): 29-36.

Jandera, P. (2011). "Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review." *Analytica Chimica Acta* **692**(1-2): 1-25.

Ju, T., Otto, V. I. und Cummings, R. D. (2011). "The Tn Antigen—Structural Simplicity and Biological Complexity." *Angewandte Chemie International Edition* **50**(8): 1770-1791.

Kakuda, S., Sato, Y., Tonoyama, Y., Oka, S. und Kawasaki, T. (2005). "Different acceptor specificities of two glucuronyltransferases involved in the biosynthesis of HNK-1 carbohydrate." *Glycobiology* **15**(2): 203-210.

Kakuda, S., Shiba, T., Ishiguro, M., Tagawa, H., Oka, S., Kajihara, Y., Kawasaki, T., Wakatsuki, S. und Kato, R. (2004). "Structural Basis for Acceptor Substrate Recognition of a Human Glucuronyltransferase, GlcAT-P, an Enzyme Critical in the Biosynthesis of the Carbohydrate Epitope HNK-1." *Journal of Biological Chemistry* **279**(21): 22693-22703.

Kamerke, C., Pattky, M., Huhn, C. und Elling, L. (2012). "Synthesis of UDP-activated oligosaccharides with commercial β -galactosidase from *Bacillus circulans* under microwave irradiation." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **79**(0): 27-34.

Kim, B.-G. und Ahn, J.-H. (2013). "Characterization of uridine diphosphate-sugar pyrophosphorylase from *Populus deltoids*." *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* **56**(5): 525-531.

Kim, Y.-W., Chen, H.-M., Kim, J. H., Müllegger, J., Mahuran, D. und Withers, S. G. (2007). "Thioglycoligase-Based Assembly of Thiodisaccharides: Screening as β -Galactosidase Inhibitors." *ChemBioChem* **8**(13): 1495-1499.

Kizuka, Y., Kobayashi, K., Kakuda, S., Nakajima, Y., Itoh, S., Kawasaki, N. und Oka, S. (2008). "Laminin-1 is a novel carrier glycoprotein for the nonsulfated HNK-1 epitope in mouse kidney." *Glycobiology* **18**(4): 331-338.

Kleene, R. und Schachner, M. (2004). "Glycans and neural cell interactions." *Nature Reviews Neuroscience* **5**(3): 195-208.

Klinghammer, M. und Tenhaken, R. (2007). "Genome-wide analysis of the UDP-glucose dehydrogenase gene family in *Arabidopsis*, a key enzyme for matrix polysaccharides in cell walls." *Journal of Experimental Botany* **58**(13): 3609-3621.

Kobata, A. (2010). "Structures and application of oligosaccharides in human milk." *Proceedings of the Japan Academy, Series B* **86**(7): 731-747.

Kotake, T., Hojo, S., Tajima, N., Matsuoka, K., Koyama, T. und Tsumuraya, Y. (2008). "A Bifunctional Enzyme with L-Fucokinase and GDP-L-fucose Pyrophosphorylase Activities Salvages Free L-Fucose in *Arabidopsis*." *Journal of Biological Chemistry* **283**(13): 8125-8135.

Kottgen, E., Reutter, W. und Tauber, R. (2003). "Human lectins and their correspondent glycans in cell biology and clinical medicine." *Medizinische Klinik* **98**(12): 717-738.

Kowarik, M., Numao, S., Feldman, M. F., Schulz, B. L., Callewaert, N., Kiermaier, E., Catrein, I. und Aebi, M. (2006). "N-Linked Glycosylation of Folded Proteins by the Bacterial Oligosaccharyltransferase " *Science* **314**: 1148-1150.

Kupper, C. E., Rosencrantz, R. R., Henßen, B., Pelantová, H., Thönes, S., Drozdová, A., Křen, V. und Elling, L. (2012). "Chemo-enzymatic modification of poly-N-acetyllactosamine (LacNAc) oligomers and N,N-diacetyllactosamine (LacDiNAc) based on galactose oxidase treatment." *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **8**: 712-725.

Kuzu, M., Niefind, K., Hummel, W. und Schomburg, D. (2005). "Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a flavoprotein NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*." *Acta Crystallographica Section F* **61**(5): 528-530.

- Lacour, S., Bechet, E., Cozzzone, A. J., Mijakovic, I. und Grangeasse, C. (2008). "Tyrosin phosphorylation of the UDP-Glucose dehydrogenase of *Escherichia coli* is at the crossroads of colanic acid synthesis and polymyxin resistance." *PloS One* **3**: e3051
- Lairson, L. L., Henrissat, B., Davies, G. J. und Withers, S. G. (2008). "Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms." *Annual Review of Biochemistry* **77**(1): 521-555.
- Lee, W.-H., Pathinabul, P., Quarterman, J., Jo, J.-H., Han, N. S., Miller, M. J., Jin, Y.-S. und Seo, J.-H. (2012). "Whole cell biosynthesis of a functional oligosaccharide, 2'-fucosyllactose, using engineered *Escherichia coli*." *Microbial Cell Factories* **11**: 49-57.
- Li, M., Shen, J., Liu, X., Shao, J., Yi, W., Chow, C. S. und Wang, P. G. (2008). "Identification of a New α 1,2-Fucosyltransferase Involved in O-Antigen Biosynthesis of *Escherichia coli* O86:B7 and Formation of H-Type 3 Blood Group Antigen." *Biochemistry* **47**(44): 11590-11597.
- Liedtke, S., Geyer, H., Wuhrer, M., Geyer, R., Frank, G., Gerardy-Schahn, R., Zahringer, U. und Schachner, M. (2001). "Characterization of N-glycans from mouse brain neural cell adhesion molecule." *Glycobiology* **11**(5): 373-384.
- Lis, H. und Sharon, N. (1993). "Protein glycosylation. Structural and functional aspects." *European Journal of Biochemistry* **218**(1): 1-27.
- Liu, J., Zou, Y., Guan, W., Zhai, Y., Xue, M., Jin, L., Zhao, X., Dong, J., Wang, W., Shen, J., Wang, P. G. und Chen, M. (2013). "Biosynthesis of nucleotide sugars by a promiscuous UDP-sugar pyrophosphorylase from *Arabidopsis thaliana* (AtUSP)." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **23**(13): 3764-3768.
- Liu, Y., DebRoy, C. und Fratomico, P. (2007). "Sequencing and analysis of the *Escherichia coli* serogroup O117, O126, and O146 O-antigen gene clusters and development of PCR assays targeting serogroup O117-, O126-, and O146-specific DNA sequences." *Molecular and Cellular Probes* **21**(4): 295-302.
- Lüttge, H., Heidelberg, T., Stangier, K., Thiem, J. und Bretting, H. (1997). "The specificity of an α -(1-2)-L-galactosyltransferase from albumen glands of the snail *Helix pomatia*." *Carbohydrate Research* **297**(3): 281-288.
- Ma, B., Simala-Grant, J. L. und Taylor, D. E. (2006). "Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes." *Glycobiology* **16**(12): 158R-184R.

Mainprize, I. L., Bean, J. D., Bouwman, C., Kimber, M. S. und Whitfield, C. (2013). "The UDP-glucose Dehydrogenase of *Escherichia coli* K-12 Displays Substrate Inhibition by NAD That Is Relieved by Nucleotide Triphosphates." *Journal of Biological Chemistry* **288**(32): 23064-23074.

Marino, K., Bones, J., Kattla, J. J. und Rudd, P. M. (2010). "A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze." *Nature Chemical Biology* **6**(10): 713-723.

Masand, S. N., Perron, I. J., Schachner, M. und Shreiber, D. I. (2012). "Neural cell type-specific responses to glycomimetic functionalized collagen." *Biomaterials* **33**(3): 790-797.

Mizanur, R. M. und Pohl, N. L. (2008). "A thermostable promiscuous glucose-1-phosphate uridylyltransferase from *Helicobacter pylori* for the synthesis of nucleotide sugars." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **50**(1): 13-19.

Moran, A. P. (2008). "Relevance of fucosylation and Lewis antigen expression in the bacterial gastroduodenal pathogen *Helicobacter pylori*." *Carbohydrate Research* **343**(12): 1952-1965.

Morita, I., Kizuka, Y., Kakuda, S. und Oka, S. (2008). "Expression and function of the HNK-1 carbohydrate." *Journal of Biochemistry* **143**(6): 719-724.

Morrow, A. L., Ruiz-Palacios, G. M., Jiang, X. und Newburg, D. S. (2005). "Human-Milk Glycans That Inhibit Pathogen Binding Protect Breast-feeding Infants against Infectious Diarrhea." *The Journal of Nutrition* **135**(5): 1304-1307.

Murata, T., Honda, H., Hattori, T. und Usui, T. (2005). "Enzymatic synthesis of poly-N-acetyllactosamines as potential substrates for endo- β -galactosidase-catalyzed hydrolytic and transglycosylation reactions." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1722**(1): 60-68.

Namdjou, D.-J., Sauerzapfe, B., Schmiedel, J., Dräger, G., Bernatchez, S., Wakarchuk, W. W. und Elling, L. (2007). "Combination of UDP-Glc(NAc) 4'-Epimerase and Galactose Oxidase in a One-Pot Synthesis of Biotinylated Nucleotide Sugars." *Advanced Synthesis & Catalysis* **349**(3): 314-318.

Nataro, J. P. und Kaper, J. B. (1998). "Diarrheagenic *Escherichia coli*." *Clinical Microbiology Reviews* **11**(1): 142-201.

Negishi, M., Dong, J., Darden, T. A., Pedersen, L. G. und Pedersen, L. C. (2003). "Glucosaminylglycan biosynthesis: what we can learn from the X-ray crystal structures of glycosyltransferases GlcAT1 and EXTL2." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **303**(2): 393-398.

Nishioka, M., Mizuguchi, H., Fujiwara, S., Komatsubara, S., Kitabayashi, M., Uemura, H., Takagi, M. und Imanaka, T. (2001). "Long and accurate PCR with a mixture of KOD DNA polymerase and its exonuclease deficient mutant enzyme." *Journal of Biotechnology* **88**(2): 141-149.

Oka, T. und Jigami, Y. (2006). "Reconstruction of de novo pathway for synthesis of UDP-glucuronic acid and UDP-xylose from intrinsic UDP-glucose in *Saccharomyces cerevisiae*." *FEBS Journal* **273**(12): 2645-2657.

Oroz-Guinea, I. und García-Junceda, E. (2013). "Enzyme catalysed tandem reactions." *Current Opinion in Chemical Biology* **17**(2): 236-249.

Pasti, C., Gallois-Montbrun, S., Munier-Lehmann, H., Veron, M., Gilles, A.-M. und Deville-Bonne, D. (2003). "Reaction of human UMP-CMP kinase with natural and analog substrates." *European Journal of Biochemistry* **270**(8): 1784-1790.

Perret, S., Sabin, C., Dumon, C., Pokorná, M., Gautier, C., Galanina, O., Ilia, S., Bovin, N., Nicaise, M., Desmadril, M., Gilboa-Garber, N., Wimmerová, M., Mitchell, E. P. und Imberty, A. (2005). "Structural basis for the interaction between human milk oligosaccharides and the bacterial lectin PA-IIL of *Pseudomonas aeruginosa*." *Biochemical Journal* **389**(2): 325-332.

Perugino, G., Trincone, A., Rossi, M. und Moracci, M. (2004). "Oligosaccharide synthesis by glycosynthases." *Trends in Biotechnology* **22**(1): 31-37.

Peterson, R., Cheah, W. Y., Grinyer, J. und Packer, N. (2013). "Glycoconjugates in human milk: Protecting infants from disease." *Glycobiology* **23**(12): 1425-1438.

Pettit, N., Styslinger, T., Mei, Z., Han, W., Zhao, G. und Wang, P. G. (2010). "Characterization of WbiQ: An [alpha]1,2-fucosyltransferase from *Escherichia coli* O127:K63(B8), and synthesis of H-type 3 blood group antigen." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **402**(2): 190-195.

Rech, C., Rosencrantz, R. R., Krenek, K., Pelantova, H., Bojarova, P., Roemer, C. E., Hanisch, F.-G., Kren, V. und Elling, L. (2011). "Combinatorial One-Pot Synthesis of Poly-N-acetyllactosamine Oligosaccharides with Leloir-Glycosyltransferases." *Advanced Synthesis & Catalysis* **353**(13): 2492-2500.

Rego, A., Trindade, D., Chaves, S. R., Manon, S., Costa, V., Sousa, M. J. und Corte-Real, M. (2014). "The yeast model system as a tool towards the understanding of apoptosis regulation by sphingolipids." *Fems Yeast Research* **14**(1): 160-178.

Rich, J. R. und Withers, S. G. (2009). "Emerging methods for the production of homogeneous human glycoproteins." *Nature Chemical Biology* **5**(4): 206-215.

Römer, U., Schrader, H., Günther, N., Nettelstroth, N., Frommer, W. B. und Elling, L. (2004). "Expression, purification and characterization of recombinant sucrose synthase 1 from *Solanum tuberosum* L. for carbohydrate engineering." *Journal of Biotechnology* **107**(2): 135-149.

Rosencrantz, R. R., Lange, B. und Elling, L. (2014). Chemo-Enzymatic Cascade Reactions for the Synthesis of Glycoconjugates. *Cascade Biocatalysis*. Riva, S. und Fessner, W.-D., Wiley-VCH, Weinheim: 133-161.

Royle, L., Roos, A., Harvey, D. J., Wormald, M. R., Van Gijlswijk-Janssen, D., Redwan, E.-R. M., Wilson, I. A., Daha, M. R., Dwek, R. A. und Rudd, P. M. (2003). "Secretory IgA N- and O-Glycans Provide a Link between the Innate and Adaptive Immune Systems." *Journal of Biological Chemistry* **278**(22): 20140-20153.

Ruffing, A., Mao, Z. und Ruizhen Chen, R. (2006). "Metabolic engineering of *Agrobacterium* sp. for UDP-galactose regeneration and oligosaccharide synthesis." *Metabolic Engineering* **8**(5): 465-473.

Ruffing, A. M. und Chen, R. R. (2010). "Metabolic engineering of *Agrobacterium spec.* strain ATCC 31749 for production of an a-Gal epitope." *Microbial Cell Factories* **9**: 1-12.

Rupprath, C., Kopp, M., Hirtz, D., Mueller, R. und Elling, L. (2007). *Advanced Synthesis & Catalysis* **349**: 1489.

Rupprath, C., Kopp, M., Hirtz, D., Müller, R. und Elling, L. (2007). "An Enzyme Module System for *in situ* regeneration of dTDP-activated deoxysugars." *Advanced Synthesis & Catalysis* **349**(8-9): 1489-1496.

Rupprath, C., Schumacher, T. und Elling, L. (2005). "Nucleotide Deoxysugars: Essential Tools for the Glycosylation Engineering of Novel Bioactive Compounds." *Current Medicinal Chemistry* **12**(14): 1637-1675.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning a laboratory manual second edition Vol. 1, 2 and 3*. Cold Spring Harbor, New York, USA, Cold Spring Harbor Press.

Samuel, G., Hogbin, J.-P., Wang, L. und Reeves, P. R. (2004). "Relationships of the *Escherichia coli* O157, O111, and O55 O-Antigen Gene Clusters with Those of *Salmonella enterica* and *Citrobacter freundii*, Which Express Identical O Antigens." *Journal of Bacteriology* **186**(19): 6536-6543.

Samuel, G. und Reeves, P. (2003). "Biosynthesis of O-antigens: genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly." *Carbohydrate Research* **338**(23): 2503-2519.

Sauerzapfe, B. und Elling, L. (2008). *Multi-Enzyme Systems for the Synthesis of Glycoconjugates. Multi-Step Enzyme Catalysis: Biotransformations and Chemoenzymatic Synthesis*. Garcia-Junceda, E. Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH: 83-107.

Sauerzapfe, B., Engels, L. und Elling, L. (2008). "Broadening the biocatalytic properties of recombinant sucrose synthase 1 from potato (*Solanum tuberosum* L.) by expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*." *Enzyme and Microbial Technology* **43**(3): 289-296.

Sauerzapfe, B., Krenek, K., Schmiedel, J., Wakarchuk, W. W., Pelantová, H., Kren, V. und Elling, L. (2009). "Chemo-enzymatic synthesis of poly-*N*-acetylactosamine (poly-LacNAc) structures and their characterization for CGL2-galectin-mediated binding of ECM glycoproteins to biomaterial surfaces." *Glycoconjugate Journal* **26**: 141–159.

Sauerzapfe, B., Namdjou, D. J., Schumacher, T., Linden, N., Krenek, K., Kren, V. und Elling, L. (2008). "Characterization of recombinant fusion constructs of human beta 1,4-galactosyltransferase 1 and the lipase pre-propeptide from *Staphylococcus hyicus*." *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **50**(2-4): 128-140.

Scheffzek, K., Kliche, W., Wiesmüller, L. und Reinstein, J. (1996). "Crystal Structure of the Complex of UMP/CMP Kinase from *Dictyostelium discoideum* and the Bisubstrate Inhibitor P1-(5'-Adenosyl) P5-(5'-Uridyl) Pentaphosphate (UP5A) and Mg²⁺ at 2.2 Å: Implications for Water-Mediated Specificity‡." *Biochemistry* **35**(30): 9716-9727.

Scheppokat, A. M., Bretting, H. und Thiem, J. (2003). "Fast and efficient synthesis of a novel homologous series of l-fucosylated trisaccharides using the *Helix pomatia* α -(1→2)-l-galactosyltransferase." *Carbohydrate Research* **338**(20): 2083-2090.

Schmaltz, R. M., Hanson, S. R. und Wong, C.-H. (2011). "Enzymes in the Synthesis of Glycoconjugates." *Chemical Reviews* **111**(7): 4259-4307.

Schmitz, B., Schachner, M., Ito, Y., Nakano, T. und Ogawa, T. (1994). "Determination of the structural elements of L2/HNK-1 carbohydrate epitope required for its function." *Glycoconjugate Journal* **11**: 345-352.

Schrader, H. (1998). Expression of the gene *sus1* from *Solanum tuberosum*, purification of the gene product Sucrose Synthase (EC 2.4.1.13) und its characterisation PhD-thesis, Heinrich-Heine-University.

Schwertmann, A., Rudloff, S. und Kunz, C. (1996). "Potential Ligands for Cell Adhesion Molecules in Human Milk." *Annals of Nutrition and Metabolism* **40**(5): 252-262.

Scott, J. H. und Schekman, R. (1980). "Lyticase - endoglucanase and protease activities that act together in yeast-cell lysis." *Journal of Bacteriology* **142**(2): 414-423.

Seeberger, P. H. (2009). "Chemical glycobiology: why now?" *Nature Chemical Biology* **5**(6): 368-372.

Segura-Peña, D., Sekulic, N., Ort, S., Konrad, M. und Lavie, A. (2004). "Substrate-induced Conformational Changes in Human UMP/CMP Kinase." *Journal of Biological Chemistry* **279**(32): 33882-33889.

Serano, R. (1991). Transport across yeast vacuolar and plasma membranes. *The Molecular and Cell Biology of the Yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis and Energetics*. Jones, E. W. und BJR, J. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 523-585.

Serrano, R., Kielland-Brandt, M. C. und Fink, G. R. (1986). "Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases." *Nature* **319**(6055): 689-693.

Shao, J., Li, M., Jia, Q., Lu, Y. und Wang, P. G. (2003). "Sequence of Escherichia coli O128 antigen biosynthesis cluster and functional identification of an [alpha]-1,2-fucosyltransferase." *FEBS Letters* **553**(1-2): 99-103.

Shiba, T., Kakuda, S., Ishiguro, M., Morita, I., Oka, S., Kawasaki, T., Wakatsuki, S. und Kato, R. (2006). "Crystal structure of GlcAT-S, a human glucuronyltransferase, involved in the biosynthesis of the HNK-1 carbohydrate epitope." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **65**(2): 499-508.

Shinzaki, S., Iijima, H., Nakagawa, T., Egawa, S., Nakajima, S., Ishii, S., Irie, T., Kakiuchi, Y., Nishida, T., Yasumaru, M., Kanto, T., Tsujii, M., Tsuji, S., Mizushima, T., Yoshihara, H., Kondo, A., Miyoshi, E. und Hayashi, N. (2008). "IgG oligosaccharide alterations are a novel diagnostic marker for disease activity and the clinical course of inflammatory bowel disease." *American Journal of Gastroenterology* **103**(5): 1173-1181.

Sieberth, V., Rigg, G. P., Roberts, I. S. und Jann, K. (1995). "Expression and characterization of UDPGlc dehydrogenase (KfiD), which is encoded in the type-specific region 2 of the *Escherichia coli* K5 capsule genes." *Journal of Bacteriology* **177**(15): 4562-4565.

Simova, O., Irintchev, A., Mehanna, A., Liu, J., Dihne, M., Bachle, D., Sewald, N., Loers, G. und Schachner, M. (2006). "Carbohydrate mimics promote functional recovery after peripheral nerve repair." *Annals of Neurology* **60**(4): 430-437.

Sommer, B. J., Barycki, J. J. und Simpson, M. A. (2004). "Characterization of human UDP-glucose dehydrogenase. CYS-276 is required for the second of two successive oxidations." *Journal of Biological Chemistry* **279**(22): 23590-23596.

Spicer, A. P., Kaback, L. A., Smith, T. J. und Seldin, M. F. (1998). "Molecular Cloning and Characterization of the Human and Mouse UDP-Glucose Dehydrogenase Genes." *Journal of Biological Chemistry* **273**(39): 25117-25124.

Spiro, R. G. (2002). "Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds." *Glycobiology* **12**(4): 43R-56R.

Stein, D. B., Lin, Y.-N. und Lin, C.-H. (2008). "Characterization of *Helicobacter pylori* α 1,2-Fucosyltransferase for Enzymatic Synthesis of Tumor-Associated Antigens." *Advanced Synthesis & Catalysis* **350**(14-15): 2313-2321.

Tagawa, H., Kizuka, Y., Ikeda, T., Itoh, S., Kawasaki, N., Kurihara, H., Onozato, M. L., Tojo, A., Sakai, T., Kawasaki, T. und Oka, S. (2005). "A non-sulfated form of the HNK-1 carbohydrate is expressed in mouse kidney." *Journal of Biological Chemistry* **280**(25): 23876-23883.

Thibodeaux, C. J., Melançon, C. E. und Liu, H.-w. (2008). "Natural-Product Sugar Biosynthesis and Enzymatic Glycodiversification." *Angewandte Chemie International Edition* **47**(51): 9814-9859.

Tsvetkov, Y. E., Burg-Roderfeld, M., Loers, G., Arda, A., Sukhova, E. V., Khatuntseva, E. A., Grachev, A. A., Chizhov, A. O., Siebert, H.-C., Schachner, M., Jimenez-Barbero, J. und Nifantiev, N. E. (2012). "Synthesis and Molecular Recognition Studies of the HNK-1 Trisaccharide and Related Oligosaccharides. The Specificity of Monoclonal Anti-HNK-1 Antibodies as Assessed by Surface Plasmon Resonance and STD NMR." *Journal of the American Chemical Society* **134**(1): 426-435.

Unverzagt, C., Kunz, H. und Paulson, J. C. (1990). "High-efficiency synthesis of sialyloligosaccharides and sialoglycopeptides." *Journal of the American Chemical Society* **112**(25): 9308-9309.

Urashima, T., Hiramatsu, Y., Murata, S., Nakamura, T. und Messer, M. (1997). "Identification of 2'-Fucosyllactose in Milk of the Crabeater Seal (*Lobodon carcinophagus*)."

Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology **116**(3): 311-314.

van Kranenburg, R., Marugg, J. D., Van Swam, I. I., Willem, N. J. und De Vos, W. M. (1997). "Molecular characterization of the plasmid-encoded eps gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*." *Molecular Microbiology* **24**(2): 387-397.

van Kranenburg, R., van Swam, I. I., Marugg, J. D., Kleerebezem, M. und de Vos, W. M. (1999). "Exopolysaccharide Biosynthesis in *Lactococcus lactis* NIZO B40: Functional Analysis of the Glycosyltransferase Genes Involved in Synthesis of the Polysaccharide Backbone." *Journal of Bacteriology* **181**(1): 338-340.

Van Rompay, A. R., Johansson, M. und Karlsson, A. (1999). "Phosphorylation of Deoxycytidine Analog Monophosphates by UMP-CMP Kinase: Molecular Characterization of the Human Enzyme." *Molecular Pharmacology* **56**(3): 562-569.

Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Carolyn R. Bertozzi, Hart, G. W. und Etzler, M. E. (2009). *Essentials of Glycobiology*

Cold Spring Harbour N.Y, Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Vasiliu, D., Razi, N., Zhang, Y., Jacobsen, N., Allin, K., Liu, X., Hoffmann, J., Bohorov, O. und Blixt, O. (2006). *Carbohydrate Research* **341**: 1447.

Wang, L., Huskic, S., Cisterne, A., Rothmund, D. und Reeves, P. R. (2002). "The O-Antigen Gene Cluster of *Escherichia coli* O55:H7 and Identification of a New UDP-GlcNAc C4 Epimerase Gene." *Journal of Bacteriology* **184**(10): 2620-2625.

Wang, W., Hu, T., Frantom, P. A., Zheng, T., Gerwe, B., del Amo, D. S., Garret, S., Seidel, R. D. und Wu, P. (2009). "Chemoenzymatic synthesis of GDP-l-fucose and the Lewis X glycan derivatives." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**(38): 16096-16101.

Wennekes, T., van den Berg, R. J. B. H. N., Boot, R. G., van der Marel, G. A., Overkleeft, H. S. und Aerts, J. M. F. G. (2009). "Glycosphingolipide – Natur, Funktion und pharmakologische Modulierung." *Angewandte Chemie* **121**(47): 9006-9028.

West, R. W., Yocum, R. R. und Ptashne, M. (1984). "Saccharomyces cerevisiae GAL1-GAL10 divergent promoter region: location and function of the upstream activating sequence UASG." *Molecular and Cellular Biology* **4**(11): 2467-2478.

Williams, G. J., Goff, R. D., Zhang, C. und Thorson, J. S. (2008). "Optimizing Glycosyltransferase Specificity via "Hot Spot" Saturation Mutagenesis Presents a Catalyst for Novobiocin Glycorandomization." *Chemistry & Biology* **15**(4): 393-401.

Williams, G. J., Zhang, C. und Thorson, J. S. (2007). "Expanding the promiscuity of a natural-product glycosyltransferase by directed evolution." *Nature Chemical Biology* **3**(10): 657-662.

Wittgens, A., Tiso, T., Arndt, T. T., Wenk, P., Hemmerich, J., Müller, C., Wichmann, R., Küpper, B., Zwick, M., Wilhelm, S., Hausmann, R., Syltatk, C., Rosenau, F. und Blank, L. M. (2011). "Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440." *Microbial Cell Factories* **10**(1): 80-98.

Wong, C. H., Haynie, S. L. und Whitesides, G. M. (1982). "Enzyme-catalyzed synthesis of N-acetylglucosamine with in situ regeneration of uridine 5'-diphosphate glucose and uridine 5'-diphosphate galactose." *The Journal of Organic Chemistry* **47**(27): 5416-5418.

Wu, C.-Y. und Wong, C.-H. (2011). "Chemistry and glycobiology." *Chemical Communications* **47**(22): 6201-6207.

Wu, Y., Williams, M., Bernard, S., Driouich, A., Showalter, A. M. und Faik, A. (2010). "Functional Identification of Two Nonredundant Arabidopsis α (1,2)Fucosyltransferases Specific to Arabinogalactan Proteins." *Journal of Biological Chemistry* **285**(18): 13638-13645.

Yamamoto, S. und Oka, S. (2001). "Glucuronyltransferases Involved in the HNK-1 Carbohydrate Epitope Biosynthesis." *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* **Vol.13** (70): 193–208.

Yamamoto, S., Oka, S., Saito-Ohara, F., Inazawa, J. und Kawasaki, T. (2002). "Molecular cloning and genomic analysis of mouse glucuronyltransferase involved in biosynthesis of the HNK-1 epitope." *Journal of Biochemistry* **131**(3): 337-347.

Yamasaki, S., Shimizu, T., Hoshino, K., Ho, S.-T., Shimada, T., Nair, G. B. und Takeda, Y. (1999). "The genes responsible for O-antigen synthesis of *Vibrio cholerae* O139 are closely related to those of *Vibrio cholerae* O22." *Gene* **237**(2): 321-332.

Yang, T. und Bar-Peled, M. (2010). "Identification of a novel UDP-sugar pyrophosphorylase with a broad substrate specificity in *Trypanosoma cruzi*." *Biochemical Journal* **429**(3): 533-543.

Yavuz, E., Drouillard, S., Samain, E., Roberts, I. und Priem, B. (2008). "Glucuronylation in *Escherichia coli* for the bacterial synthesis of the carbohydrate moiety of nonsulfated HNK-1." *Glycobiology* **18**(2): 152-157.

Yi, W., Liu, X., Li, Y., Li, J., Xia, C., Zhou, G., Zhang, W., Zhao, W., Chen, X. und Wang, P. G. (2009). "Remodeling bacterial polysaccharides by metabolic pathway engineering." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**(11): 4207-4212.

Yi, W., Shao, J., Zhu, L., Li, M., Singh, M., Lu, Y., Lin, S., Li, H., Ryu, K., Shen, J., Guo, H., Yao, Q., Bush, C. A. und Wang, P. G. (2005). "Escherichia coli O86 O-Antigen Biosynthetic Gene Cluster and Stepwise Enzymatic Synthesis of Human Blood Group B Antigen Tetrasaccharide." *Journal of the American Chemical Society* **127**(7): 2040-2041.

Yoshihara, Y., Oka, S., Watanabe, Y. und Mori, K. (1991). "Developmentally and spatially regulated expression of HNK-1 carbohydrate antigen on a novel phosphatidylinositol-anchored glycoprotein in rat brain." *Journal of Cell Biology* **115**(3): 731-744.

Zervosen, A. und Elling, L. (1996). "A Novel Three-Enzyme Reaction Cycle for the Synthesis of N-Acetylglucosamine with in Situ Regeneration of Uridine 5'-Diphosphate Glucose and Uridine 5'-Diphosphate Galactose." *Journal of the American Chemical Society* **118**(8): 1836-1840.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Klassen der N-Glykane nach Varki <i>et al.</i> (Varki <i>et al.</i> 2009)	8
Abbildung 2:	Struktur eines Glykosphingolipids (Gangliosid GM3) nach Wennekes <i>et al.</i> (Wennekes <i>et al.</i> 2009)	10
Abbildung 3:	Nukleophile Substitution des Glykosylgruppentransfers nach Schmaltz <i>et al.</i> (Schmaltz <i>et al.</i> 2011)	14
Abbildung 4:	Biosyntheseweg zur Produktion von HA nach Blank <i>et al.</i> (Blank <i>et al.</i> 2005)	19
Abbildung 5:	Syntheseweg zur Produktion von Rhamnolipiden in <i>Pseudomonas putida</i> nach Wittgens <i>et al.</i> (Wittgens <i>et al.</i> 2011)	20
Abbildung 6:	Enzymatische Modifikation von definierten LacNAc-Strukturen nach Sauerzapfe <i>et al.</i> (Sauerzapfe <i>et al.</i> 2009)	22
Abbildung 7:	Synthese von Rhamnosylorangiosid mit <i>in situ</i> Regeneration von dTDP-Rhamnose und NADH nach Rupprath <i>et al.</i> (Rupprath <i>et al.</i> 2007)	24
Abbildung 8:	Kombinatorische Ein-Topf-Synthese von poly-LacNAc Oligomeren nach Rech <i>et al.</i> (Rech <i>et al.</i> 2011)	25
Abbildung 9:	Biosynthese des HNK-1 Epitops	27
Abbildung 10:	<i>In vivo</i> Synthese von GDP-Fuc und 2'-FL in rekombinanten <i>E. coli</i> nach Lee <i>et al.</i> (Lee <i>et al.</i> 2012)	30
Abbildung 11:	Modulare Enzym-Kaskaden zur Synthese von UDP-GlcA mit dem UGDH-Modul und <i>in situ</i> Regeneration von NAD ⁺ (Modul C)	31
Abbildung 12:	Modulare Enzym-Kaskade zur Synthese von UDP-GlcA durch Kopplung des SuSy-Moduls mit dem UGDH-Modul (Modul B + Modul C)	32
Abbildung 13:	Modulare Enzym-Kaskade zur Synthese von UDP-GlcA durch Kopplung des SuSy-Moduls mit dem UGDH- und UMPK-Modul (Modul A + Modul B + Modul C)	33
Abbildung 14:	Modulare Enzym-Kaskaden zur Synthese von GlcA-LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc durch Kopplung des UGDH-Moduls mit dem GlcAT-Modul (Modul C + Modul D) oder durch Kopplung des SuSy-Moduls mit dem UGDH- und GlcAT-Modul (Modul B + Modul C + Modul D)	34
Abbildung 15:	Modulare Enzym-Kaskade zur Synthese des Glykanepitops 2'-FL durch Kopplung des FKP-Moduls mit dem FucT-Modul (Modul E + Modul F) im sequentiellen Modus modifiziert nach Engels <i>et al.</i> (Engels und Elling 2014)	36
Abbildung 16:	Klonierung von <i>his₆ump</i> aus <i>Homo sapiens</i> in den Expressionsvektor pET16b	47

Abbildung 17:	Klonierung von <i>ugdhis₆</i> aus <i>E. coli</i> K12 in den Expressionsvektor pET28a	48
Abbildung 18:	Klonierung von <i>his₆ugd</i> aus <i>E. coli</i> K12 in den Expressionsvektor pET16b	49
Abbildung 19:	Klonierung von <i>his₆ugdh1</i> aus <i>Arabidopsis thaliana</i> in den Expressionsvektor pET16b	50
Abbildung 20:	Klonierung von <i>his₆ugdh</i> aus <i>Homo sapiens</i> in den Expressionsvektor pETDuet-1	51
Abbildung 21:	Klonierung von <i>his₆kfiD</i> aus <i>E. coli</i> K5 in den Expressionsvektor pETDuet-1	52
Abbildung 22:	Klonierung von <i>his₆catglcatp</i> (A.) und <i>his₆catglcats</i> (B.) in den Expressionsvektor pET46Ek/LIC	54
Abbildung 23:	Expressionsvektor pDR195- <i>sus1</i>	56
Abbildung 24:	Klonierung von <i>sus1</i> aus <i>Solanum tuberosum</i> in den Expressionsvektor pYES2/CT	56
Abbildung 25:	Beispielhafte Klonierung von <i>his₆propwbgL</i> in den Expressionsvektor pET22b	59
Abbildung 26:	Klonierung von <i>his₆propfkp</i> in den Expressionsvektor pET22b	60
Abbildung 27:	Reaktionsschema zur Bestimmung der Aktivität von UMP-Kinasen mittels Fotometer	69
Abbildung 28:	Reaktionsschema zur Bestimmung der Aktivität von UMP-Kinasen mittels CE-UV Analyse	70
Abbildung 29:	Reaktionsschema zur Bestimmung der Aktivität von UDP-Glukose-Dehydrogenasen mittels Fotometer	74
Abbildung 30:	Reaktionsschema zur Bestimmung der Aktivität von UDP-Glukuronyltransferasen mittels Fotometer	78
Abbildung 31:	Reaktionsschema zur Bestimmung der Aktivität von UDP-Glukuronyltransferasen mittels CE-UV Analyse	79
Abbildung 32:	Reaktionsschema zur Bestimmung der Spaltaktivität der SuSy1 nach Barrat <i>et al.</i> (Barratt <i>et al.</i> 2001)	83
Abbildung 33:	Reaktionsschema zur Bestimmung der Spalt-Aktivität der SuSy1 mittels CE-UV Analyse	84
Abbildung 34:	Reaktionsschema zur Bestimmung der Aktivität der His ₆ NOX mittels CE-UV Analyse	85
Abbildung 35:	Reaktionsschema zur Bestimmung der Aktivität von α 1,2-FucTs nach Barrat <i>et al.</i> (Barratt <i>et al.</i> 2001)	86
Abbildung 36:	Reaktionsschema zur Bestimmung der Aktivität von α 1,2-FucTs mittels HPAEC-PAD Analyse	87
Abbildung 37:	Reaktionsschema zur Bestimmung der Aktivität der His ₆ PropFKP mittels CE-UV Analyse	92

Abbildung 38:	SDS-PAGE Analyse (Coomassie Färbung) der UGDH _{His6} nach Aufreinigung mittels Ni ²⁺ -NTA Sepharose	118
Abbildung 39:	SDS-PAGE Analyse (Coomassie Färbung) der His ₆ UGD nach Aufreinigung mittels Ni ²⁺ -NTA Sepharose	119
Abbildung 40:	SDS-PAGE Analyse (Coomassie Färbung) der His ₆ UGDH1 nach Aufreinigung mittels Ni ²⁺ -NTA Sepharose	121
Abbildung 41:	Western Blot Analyse der humanen His ₆ UGDH nach Aufreinigung mittels Ni ²⁺ -NTA Sepharose	122
Abbildung 42:	SDS-PAGE Analyse (Coomassie Färbung) der His ₆ KfiD nach Aufreinigung mittels Ni ²⁺ -NTA Sepharose	123
Abbildung 43:	Bestimmung des Temperatur-Optimums der His ₆ UGDH und His ₆ KfiD	125
Abbildung 44:	Bestimmung des pH-Optimums der His ₆ UGDH und His ₆ KfiD in 50 mM Tris-HCl	126
Abbildung 45:	Bestimmung des pH-Optimums der His ₆ UGDH und His ₆ KfiD in 50 mM HEPES-NaOH	126
Abbildung 46:	Kinetische Analyse der His ₆ UGDH für den Kofaktor NAD ⁺ (A.) und für UDP-Glc (B.)	127
Abbildung 47:	Kinetische Analyse der His ₆ KfiD für den Kofaktor NAD ⁺ (A.) und für UDP-Glc (B.)	129
Abbildung 48:	Produktinhibition der His ₆ UGDH und His ₆ KfiD durch UDP-GlcA und Kreuzinhibition durch UDP	130
Abbildung 49:	SDS-PAGE Analyse (Coomassie Färbung) der His ₆ UMPK nach Aufreinigung mittels Ni ²⁺ -NTA Sepharose	131
Abbildung 50:	Western Blot Analyse der His ₆ UMPK nach Aufreinigung mittels Ni ²⁺ -NTA Sepharose	131
Abbildung 51:	Elektropherogramm der UMP/CMP-Kinaseaktivität	132
Abbildung 52:	Bestimmung des pH-Optimums der His ₆ UMPK in 50 mM Tris-HCl und 50 mM HEPES-NaOH	133
Abbildung 53:	Bestimmung des Temperatur-Optimums der His ₆ UMPK	134
Abbildung 54:	Substratspektrum der His ₆ UMPK	134
Abbildung 55:	Kinetische Analyse der His ₆ UMPK für ATP (A.) und für UMP (B.)	135
Abbildung 56:	Zeit-Umsatz-Diagramm der His ₆ UMPK für die Synthese von UDP im analytischen Maßstab (1 mL)	136
Abbildung 57:	Produktinhibition der His ₆ UMPK durch UDP (A.) und Kreuzinhibition durch ADP (B.)	137
Abbildung 58:	Kreuzinhibition der His ₆ UMPK durch UDP-GlcA und UDP-Glc	137
Abbildung 59:	SDS-PAGE Analyse (Coomassie Färbung) der SuSy1, produziert in <i>E. coli</i> BL21(DE3) unter der Kontrolle des T7-Pomotors	138

Abbildung 60:	SDS-PAGE Analyse (Coomassie Färbung) der SuSy1, produziert in <i>S. cerevisiae</i> BY4742 unter der Kontrolle des PMA1-Promotors	140
Abbildung 61:	SDS-PAGE Analyse (Coomassie Färbung) der SuSy1, produziert in <i>S. cerevisiae</i> BY4742 unter der Kontrolle des Gal1-Promotors	141
Abbildung 62:	SDS-PAGE Analyse (Coomassie Färbung) der His ₆ NOX nach Aufreinigung mittels Ni ²⁺ -NTA Sepharose	143
Abbildung 63:	CE-UV-Analyse der Synthese von UDP-GlcA (Modul C) unter Einsatz des Laktat-Dehydrogenase/Pyruvat-Systems im analytischen Maßstab (1 mL)	145
Abbildung 64:	Synthese von UDP-GlcA mit der His ₆ UGDH (Modul C) unter Einsatz des Laktat-Dehydrogenase/Pyruvat-Systems im analytischen Maßstab (1mL)	146
Abbildung 65:	Synthese von UDP-GlcA mit der His ₆ UGDH (Modul C) unter Einsatz des NADH-Oxidase/O ₂ -Systems im analytischen Maßstab (1 mL)	147
Abbildung 66:	Optimierung der <i>in vitro</i> Synthese von UDP-GlcA mit der His ₆ UGDH (Modul C) unter Einsatz des NADH-Oxidase/O ₂ -Systems im analytischen Maßstab (1 mL)	148
Abbildung 67:	<i>In vitro</i> Synthese von UDP-GlcA mit der His ₆ UGDH bzw. His ₆ KfiD (Modul C) unter Einsatz des NADH-Oxidase/O ₂ -Systems im analytischen Maßstab (1 mL)	149
Abbildung 68:	ESI-MS Analyse der Synthese von UDP-GlcA mit der His ₆ UGDH (A.) und His ₆ KfiD (B.) (Modul C) im analytischen Maßstab	149
Abbildung 69:	<i>In vitro</i> Synthese von UDP-GlcA mit der His ₆ UGDH (Modul C) unter Einsatz des NADH-Oxidase/O ₂ -Systems im semipräparativen Maßstab (10 mL)	150
Abbildung 70:	Produktisolierung von UDP-GlcA mit der präparativen HILIC Methode unter Einsatz einer Multospher APS-HP 5µL 100x3 mm Säule	151
Abbildung 71:	ESI-MS Analyse der Synthese von UDP-GlcA mit der His ₆ UGDH (Modul C) im semipräparativen Maßstab	152
Abbildung 72:	¹ H-NMR Spektrum von UDP-α-D-GlcA	152
Abbildung 73:	Ein-Topf Synthese von UDP-GlcA mit der His ₆ UGDH und SuSy1, produziert in <i>S. cerevisiae</i> , (Modul B + Modul C) im analytischen Maßstab (1 mL)	154
Abbildung 74:	ESI-MS Analyse der Ein-Topf Synthese von UDP-GlcA mit der His ₆ UGDH und SuSy1, produziert in <i>S. cerevisiae</i> , (Modul B + Modul C) im analytischen Maßstab	154
Abbildung 75:	Ein-Topf Synthese von UDP-GlcA mit der His ₆ UGDH und SuSy1, produziert in <i>E. coli</i> , (Modul B + Modul C) im analytischen Maßstab (1 mL)	155

Abbildung 76:	ESI-MS Analyse der Ein-Topf Synthese von UDP-GlcA mit der His ₆ UGDH und SuSy1, produziert in <i>E. coli</i> , (Modul B + Modul C) im analytischen Maßstab	156
Abbildung 77:	Ein-Topf Synthese von UDP-GlcA mit der His ₆ UMPK, SuSy1 und His ₆ UGDH (Modul A + Modul B + Modul C) im analytischen Maßstab (1 mL)	157
Abbildung 78:	ESI-MS Analyse der Ein-Topf Synthese von UDP-GlcA mit der His ₆ UMPK, SuSy1 und His ₆ UGDH (Modul A + Modul B + Modul C) im analytischen Maßstab	158
Abbildung 79:	Einfluss von alkalischer Phosphatase (AP) auf die Transferaseaktivität der His ₆ catGlcAT-P	161
Abbildung 80:	SDS-PAGE Analyse (Coomassie Färbung) der His ₆ catGlcAT-P nach Aufreinigung mittels Ni ²⁺ -NTA Sepharose	162
Abbildung 81:	Einfluss von divalenten Metallionen auf die Transferaseaktivität der His ₆ catGlcAT-P	163
Abbildung 82:	Bestimmung des pH-Optimums der His ₆ catGlcAT-P	164
Abbildung 83:	Bestimmung des Temperatur-Optimums der His ₆ catGlcAT-P	164
Abbildung 84:	Akzeptorsubstratspektrum der His ₆ catGlcAT-P	165
Abbildung 85:	Kinetische Analyse der His ₆ catGlcAT-P für das Donorsubstrat UDP-GlcA	167
Abbildung 86:	Kinetische Analyse der His ₆ catGlcAT-P für die Akzeptorsubstrate Typ 2 LacNAc (A.) und LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc (B.)	167
Abbildung 87:	Kreuzinhibition der His ₆ catGlcAT-P durch UDP-Glc und Saccharose	168
Abbildung 88:	Aufreinigung der His ₆ catGlcAT-S über IMAC nach Expression des Gens in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	170
Abbildung 89:	SDS-PAGE und Western Blot Analyse der His ₆ catGlcAT-S, produziert in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	171
Abbildung 90:	CE-UV Elektropherogramm zur Bestimmung der Aktivität der His ₆ catGlcAT-S	172
Abbildung 91:	HPLC-Chromatogramm zur Bestimmung der Aktivität der His ₆ catGlcAT-S	173
Abbildung 92:	Aufreinigung der His ₆ catGlcAT-S über IMAC nach Expression des Gens in <i>E. coli</i> Rosetta(DE3)pLysS	174
Abbildung 93:	Aufreinigung der His ₆ catGlcAT-S über IMAC nach Expression des Gens in <i>E. coli</i> Origami(DE3)	175
Abbildung 94:	Nukleotid-und Aminosäuresequenz der murinen GlcAT-S (Imiya <i>et al.</i> 2002)	177
Abbildung 95:	HPLC-Chromatogramm zur Synthesekontrolle von LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc	179

Abbildung 96:	Produktisolierung von LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc mit der präparativen RP-HPLC Methode unter Einsatz einer Multospher APS-HP Säule (5µL 100x3 mm)	179
Abbildung 97:	Ein-Topf Synthese von GlcA-LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc (Modul C + Modul D) im analytischen Maßstab (1 mL)	181
Abbildung 98:	Syntheseoptimierung von GlcA-LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc (Modul C + Modul D) im analytischen Maßstab (1 mL)	181
Abbildung 99:	Ein-Topf Synthese von GlcA-LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc (Modul C + Modul D) ohne Zusatz von alkalischer Phosphatase im analytischen Maßstab (1 mL)	182
Abbildung 100:	Ein-Topf Synthese von GlcA-LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc (Modul C + Modul D) im semipräparativen Maßstab (5 mL)	183
Abbildung 101:	CE-UV Analyse der Ein-Topf Synthese von GlcA-LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc (Modul C + Modul D) im semipräparativen Maßstab (5 mL)	183
Abbildung 102:	Produktisolierung von GlcA-LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc mit der präparativen RP-HPLC Methode	184
Abbildung 103:	ESI-MS Analyse der Ein-Topf Synthese von GlcA-LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc (Modul C + Modul D) im semipräparativen Maßstab	185
Abbildung 104:	¹ H-NMR Spektrum von GlcA(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-Linker-NH ₂ - <i>t</i> -Boc	185
Abbildung 105:	Ein-Topf Synthese von GlcA-LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc mit der SuSy1, produziert in <i>E. coli</i> , (Modul B + Modul C + Modul D) im analytischen Maßstab (1 mL)	187
Abbildung 106:	Ein-Topf Synthese von GlcA-LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc mit der SuSy1, produziert in <i>E. coli</i> , (Modul B + Modul C + Modul D) im semipräparativen Maßstab (5 mL)	187
Abbildung 107:	Kontrollexperiment zur Spaltung des Akzeptorsubstrates LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc	188
Abbildung 108:	ESI-MS Analyse der Ein-Topf Synthese von GlcA-LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc mit der SuSy1, produziert in <i>E. coli</i> , (Modul B + Modul C + Modul D) im semipräparativen Maßstab	189
Abbildung 109:	Ein-Topf Synthese von GlcA-LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc mit der SuSy1, produziert in <i>S. cerevisiae</i> , (Modul B + Modul C + Modul D) im semipräparativen Maßstab (5 mL)	190
Abbildung 110:	ESI-MS Analyse der Ein-Topf Synthese von GlcA-LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc synthetisiert mit der SuSy1, produziert in <i>S. cerevisiae</i> , (Modul B + Modul C + Modul D) im semipräparativen Maßstab	190
Abbildung 111:	SDS-PAGE Analyse der His ₆ PropAmuc (Coomassie Färbung) nach Aufreinigung mittels Ni ²⁺ -NTA Sepharose	193
Abbildung 112:	Western Blot Analyse der His ₆ PropEpsH nach Aufreinigung mittels Ni ²⁺ -NTA Sepharose	194

Abbildung 113: Western Blot Analyse der His ₆ PropEps11 nach Aufreinigung mittels Ni ²⁺ -NTA Sepharose	195
Abbildung 114: SDS-PAGE Analyse (Coomassie Färbung) der His ₆ PropWbdN nach Aufreinigung mittels Ni ²⁺ -NTA Sepharose	196
Abbildung 115: Western Blot Analyse der His ₆ PropWbgN nach Aufreinigung mittels Ni ²⁺ -NTA Sepharose	197
Abbildung 116: Western Blot Analyse der His ₆ PropWblA nach Aufreinigung mittels Ni ²⁺ -NTA Sepharose	197
Abbildung 117: <i>E. coli</i> O126 Antigen Biosynthese Cluster (EMBL-Bank DQ465248) nach Liu <i>et al.</i> (Liu <i>et al.</i> 2007)	198
Abbildung 118: <i>E. coli</i> O126 Antigen Wiederholungseinheit aus <i>E. coli</i> O126 nach Liu <i>et al.</i> (Liu <i>et al.</i> 2007)	198
Abbildung 119: SDS-PAGE Analyse (Coomassie Färbung) der His ₆ PropWgbL nach Aufreinigung mittels Ni ²⁺ -NTA Sepharose nach Engels <i>et al.</i> (Engels und Elling 2014)	199
Abbildung 120: Western Blot Analyse der His ₆ PropWgbL nach Aufreinigung mittels Ni ²⁺ -NTA Sepharose nach Engels <i>et al.</i> (Engels und Elling 2014)	199
Abbildung 121: Bestimmung des Temperatur-Optimums der His ₆ PropWgbL modifiziert nach Engels <i>et al.</i> (Engels und Elling 2014)	201
Abbildung 122: Bestimmung des pH-Optimums der His ₆ PropWgbL in 50 mM Tris-HCl modifiziert nach Engels <i>et al.</i> (Engels und Elling 2014)	201
Abbildung 123: Enzymstabilität der His ₆ PropWgbL bei 27°C in 50 mM Tris-HCl Puffer modifiziert nach Engels <i>et al.</i> (Engels und Elling 2014)	202
Abbildung 124: Einfluss von divalenten Metallionen auf die Enzymaktivität der His ₆ PropWbgL modifiziert nach Engels <i>et al.</i> (Engels und Elling 2014)	203
Abbildung 125: Akzeptorsubstrate der His ₆ PropWgbL modifiziert nach Engels <i>et al.</i> (Engels und Elling 2014)	204
Abbildung 126: Kinetische Analyse der His ₆ PropWbgL für das Akzeptorsubstrat Laktose (A.) und für das Donorsubstrat GDP-Fuc (B.) modifiziert nach Engels <i>et al.</i> (Engels und Elling 2014)	207
Abbildung 127: SDS-PAGE Analyse (Coomassie Färbung) der His ₆ PropFKP nach Aufreinigung mittels Ni ²⁺ -NTA Sepharose	208
Abbildung 128: Synthese von GDP-Fuc mit dem FKP-Modul (Modul E) im semipräparativen Maßstab (10 mL) modifiziert nach Engels <i>et al.</i> (Engels und Elling 2014)	211
Abbildung 129: ESI-MS Analyse der Synthese von GDP-Fuc mit dem FKP-Modul (Modul E) nach Engels <i>et al.</i> (Engels und Elling 2014)	211

Abbildung 130: Synthese von 2'-FL mit dem FucT-Modul (Modul F) im semipräparativen Maßstab (10 mL) modifiziert nach Engels <i>et al.</i> (Engels und Elling 2014)	212
Abbildung 131: ESI-MS Analyse der Synthese von 2'-FL mit der His ₆ PropWbgL (Modul F) nach Engels <i>et al.</i> (Engels und Elling 2014) im semipräparativen Maßstab	213
Abbildung 132: ¹ H-NMR von Fuc(α1-2)Gal(β1-4)Glc (2'-FL)	213
Abbildung 133: Einfluss von GTP und ATP auf die Enzymaktivität der His ₆ PropWbgL	214
Abbildung 134: Synthese von 2'-FL (Modul E + Modul F/Sequentieller Modus in einem Topf) im analytischen Maßstab (700 µL) modifiziert nach Engels <i>et al.</i> (Engels und Elling 2014)	215
Abbildung 135: HPAEC-PAD Analyse der Synthese von 2'-FL (Modul E + Modul F/Sequentieller Modus in einem Topf) nach Engels <i>et al.</i> (Engels und Elling 2014)	215
Abbildung 136.: Alignment der Aminosäuresequenz der UGDH1 aus <i>Arabidopsis thaliana</i> und der UGDH aus <i>Glycine max</i>	266
Abbildung 137: Alignment der Aminosäuresequenz der murinen und humanen GlcAT-P	266
Abbildung 138: Alignment der Aminosäuresequenz des Wildtyps GlcAT-S und der rekombinanten His ₆ catGlcAT-S.	267
Abbildung 139: Alignment der Aminosäuresequenz der GlcAT-S aus <i>Mus musculus</i> , <i>Homo sapiens</i> und <i>Rattus norvegicus</i>	267
Abbildung 140: Alignment der Aminosäuresequenz der His ₆ catGlcAT-P und His ₆ catGlcAT-S aus <i>Mus musculus</i>	267
Abbildung 141: Alignment der Aminosäuresequenz von Amuc 0942, Eps11, EpsH, WbgN, WbdN, WblA, WbgL und FutC	268
Abbildung 142: CE-UV Analyse der Synthese von UDP-GlcA nach 5 h mit dem UGDH-Modul (Modul C) im semipräparativen Maßstab (10 mL)	269
Abbildung 143: CE-UV Analyse der Synthese von UDP-GlcA nach 2 h durch Kopplung des SuSy-Moduls mit dem UGDH-Modul (Modul B + Modul C) im analytischen Maßstab (1 mL)	269
Abbildung 144: CE-UV Analyse der Synthese von UDP-GlcA nach 1 h durch Kopplung des SuSy-Moduls mit dem UGDH-Modul (Modul B + Modul C) im analytischen Maßstab (1 mL)	270
Abbildung 145: CE-UV Analyse der Synthese von UDP-GlcA nach 3 h durch Kopplung des UMPK-Moduls mit dem SuSy- und UGDH-Modul (Modul A + Modul B + Modul C) im analytischen Maßstab (1 mL)	270
Abbildung 146: CE-UV Analyse der Synthese von GDP-Fuc nach 3 h (Modul A) im semipräparativen Maßstab (10 mL)	270

Abbildung 147: HPLC Analyse der Synthese von UDP-GlcA durch Kopplung des UMPK-Moduls mit dem SuSy- und UGDH-Modul (Modul A + Modul B + Modul C) im analytischen Maßstab (1 mL)	271
Abbildung 148: HPLC Analyse der Synthese von UDP-GlcA durch Kopplung des SuSy-Moduls mit dem UGDH-Modul (Modul B + Modul C) im analytischen Maßstab (1 mL)	271
Abbildung 149: HPLC Analyse zur Detektion von GlcA-LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc	272
Abbildung 150: Enzymstabilität der His ₆ UGDH unter Synthesebedingungen bei 30°C	273
Abbildung 151: Enzymstabilität der His ₆ KfiD unter Synthesebedingungen bei 30°C	273
Abbildung 152: Enzymstabilität der His ₆ GlcAT-P unter Synthesebedingungen bei 30°C	274

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Strukturen der O-Glykan-Kernstrukturen (Varki <i>et al.</i> 2009)	9
Tabelle 2:	Beispielhaftes PCR Pipettierschema	39
Tabelle 3:	Beispielhaftes PCR-Programm für die Amplifikation der Gene	39
Tabelle 4:	Zusammensetzung eines analytischen Restriktionsansatzes	40
Tabelle 5:	Zusammensetzung eines präparativen Restriktionsansatzes	40
Tabelle 6:	Dephosphorylierung von Vektor DNA	41
Tabelle 7:	Zusammensetzung der Ligationsansätze	42
Tabelle 8:	Zusammensetzung des Transformationsansatzes für <i>S. cerevisiae</i>	43
Tabelle 9:	Primer zur Klonierung von <i>his₆ump</i> aus <i>Homo Sapiens</i> in den Vektor pET16b	47
Tabelle 10:	Primer zur Klonierung von <i>ugdhis₆</i> aus <i>E. coli</i> K12 in den Vektor pET28a	48
Tabelle 11:	Primer zur Klonierung von <i>his₆ugd</i> aus <i>E. coli</i> K12 in den Vektor pET16b	49
Tabelle 12:	Primer zur Klonierung von <i>his₆ugdh1</i> aus <i>Arabidopsis thaliana</i> in den Vektor pET16b	50
Tabelle 13:	Primer zur Klonierung von <i>his₆ugdh</i> aus <i>Homo sapiens</i> in den Vektor pETDuet-1	51
Tabelle 14:	Primer zur Klonierung von <i>his₆kfiD</i> aus <i>E. coli</i> K5 in den Vektor pETDuet-1	52

Tabelle 15:	T4-DNA-Polymerase-Behandlung des PCR-Produktes zur Erzeugung von Einzelstrang-Überhängen	54
Tabelle 16:	Primer zur Klonierung von <i>his₆catglcats</i> und <i>his₆catglcatp</i> aus <i>Mus musculus</i> in den Vektor pET46Ek/LIC	55
Tabelle 17:	Primer zur Klonierung von <i>sus1</i> aus <i>Solanum tuberosum</i> in den Expressionsvektor pYES2/CT	56
Tabelle 18:	Putative α 1,2-FucTs aus der CAZy Datenbank	58
Tabelle 19:	Primer zur Klonierung der Propeptidsequenz der Lipase aus <i>S. hyicus</i>	59
Tabelle 20:	Klonierung von <i>his₆propf_{kp}</i> aus <i>Bacterioides fragilis</i> in den Vektor pET22b	60
Tabelle 21:	<i>E. coli</i> Expressionsstämme mit entsprechenden Selektionsmarkern	62
Tabelle 22:	SD-Medium für die Vorkultur	63
Tabelle 23:	SD-Medium für die Hauptkultur	64
Tabelle 24:	Puffersysteme für Proteinaufreinigungen	67
Tabelle 25:	Fotometertest zur Bestimmung der Aktivität von UMP-Kinasen	69
Tabelle 26:	CE-UV Analyse zur Bestimmung der Aktivität von UMP-Kinasen	71
Tabelle 27:	Fotometertest zur Bestimmung der Aktivität von UDP-Glukose-Dehydrogenasen	74
Tabelle 28:	CE-UV Analyse zur Bestimmung der Aktivität von UDP-Glukose-Dehydrogenasen	75
Tabelle 29:	Fotometertest zur Bestimmung der Aktivität von UDP-Glukuronyltransferasen	78
Tabelle 30:	CE-UV Analyse zur Bestimmung der Aktivität von UDP-Glukuronyltransferasen	79
Tabelle 31:	Akzeptorsubstrate der His ₆ catGlcAT-P	82
Tabelle 32:	Fotometertest zur Bestimmung der Spalt-Aktivität der SuSy1	84
Tabelle 33:	CE-UV Analyse zur Bestimmung der Spalt-Aktivität der SuSy1	85
Tabelle 34:	CE-UV Analyse zur Bestimmung der Aktivität der His ₆ NOX	85
Tabelle 35:	Fotometertest zur Bestimmung der Aktivität von α 1,2-FucTs	87
Tabelle 36:	HPAEC-PAD Analyse zur Bestimmung der Aktivität von α 1,2-FucTs	88
Tabelle 37:	Akzeptorsubstrate der His ₆ PropWbgL	91
Tabelle 38:	CE-UV Analyse zur Bestimmung Aktivität der His ₆ PropFKP	92
Tabelle 39:	Synthese von UDP-GlcA und <i>in situ</i> Regeneration von NAD ⁺ mithilfe des Laktat-Dehydrogenase/Pyruvat-Systems (Modul C) im analytischen Maßstab (1 mL)	93

Tabelle 40:	Syntheseoptimierung von UDP-GlcA und <i>in situ</i> Regeneration von NAD ⁺ mithilfe des NADH-Oxidase/O ₂ -Systems (Modul C) im analytischen Maßstab (1 mL)	94
Tabelle 41:	Synthese von UDP-GlcA und <i>in situ</i> Regeneration von NAD ⁺ mithilfe der His ₆ NOX (Modul C) im analytischen Maßstab (1 mL)	95
Tabelle 42:	Synthese von UDP-GlcA und <i>in situ</i> Regeneration von NAD ⁺ mithilfe der His ₆ NOX (Modul C) im semipräparativen Maßstab (10 mL)	95
Tabelle 43:	Ein-Topf Synthese von UDP-GlcA durch Kopplung des UGDH-Moduls mit dem SuSy-Modul (Modul B + Modul C) im analytischen Maßstab (1 mL)	96
Tabelle 44:	Ein-Topf Synthese von UDP-GlcA durch Kopplung des UGDH-Moduls mit dem SuSy- und UMPK-Modul (Modul A + Modul B + Modul C) im analytischen Maßstab (1 mL)	98
Tabelle 45:	Syntheseansatz zur Herstellung von LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc im präparativen Maßstab (20 mL)	99
Tabelle 46:	Ein-Topf Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops mit 2 mM Akzeptor LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc (Modul C + Modul D) im analytischen Maßstab (1 mL)	100
Tabelle 47:	Syntheseoptimierung des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops mit 5 mM LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc und 0,5 U bzw. 1,0 U der involvierten Enzyme (Modul C + Modul D) im analytischen Maßstab (1 mL)	101
Tabelle 48:	Ein-Topf Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops mit 5 mM LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc und 0,5 U der involvierten Enzyme (Modul C + Modul D) im semipräparativen Maßstab (5 mL)	102
Tabelle 49:	Ein-Topf Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops mit 5 mM LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc (Modul B + Modul C + Modul D) im analytischen Maßstab (1 mL)	103
Tabelle 50:	Ein-Topf Synthese des nicht-sulfatierten HNK-1 Epitops mit 5 mM LacNAc-Linker- <i>t</i> -Boc (Modul B + Modul C + Modul D) im semipräparativen Maßstab (5 mL)	104
Tabelle 51:	Kontrollexperiment zur Untersuchung der β -Galaktosidase-Nebenaktivität	104
Tabelle 52:	Synthese von GDP-Fuc (Modul E) im semipräparativen Maßstab (10 mL)	105
Tabelle 53:	Synthese von 2'-FL (Modul F) im semipräparativen Maßstab (10 mL)	106
Tabelle 54:	Synthese von 2'-FL (Modul E + Modul F/Sequentieller Modus/1. Stufe) im analytischen Maßstab (700 μ L)	107
Tabelle 55:	Synthese von 2'-FL (Modul E + Modul F/Sequentieller Modus/2. Stufe) im analytischen Maßstab (700 μ L)	108
Tabelle 56:	Vorschrift zur Herstellung des 10%-igen Trenngels	110

Tabelle 57:	Vorschrift zur Herstellung des 4%-igen Sammelgels	110
Tabelle 58:	Probenvorbereitung für die SDS-PAGE Analyse	111
Tabelle 59:	Aufreinigung der UGDH _{His₆} , His ₆ UGD, His ₆ UGDH1, His ₆ KfiD und His ₆ UGDH mittels Ni ²⁺ -NTA Sepharose	124
Tabelle 60:	Kinetische Daten der rekombinanten His ₆ UGDH	128
Tabelle 61:	Vergleich der K _m -Werte für UDP-Glc und NAD ⁺ von UDP-Glukose-Dehydrogenasen aus der Literatur	128
Tabelle 62:	Kinetische Daten der rekombinanten His ₆ KfiD	129
Tabelle 63:	Aufreinigung der His ₆ UMPK mittels Ni ²⁺ -NTA Sepharose	132
Tabelle 64:	Kinetische Daten der rekombinanten His ₆ UMPK	135
Tabelle 65:	Vergleich der K _m -Werte für UMP von UMP-Kinasen aus der Literatur	136
Tabelle 66:	Vergleich der Produktionsstrategien der SuSy1	142
Tabelle 67:	Aufreinigung der His ₆ NOX mittels Ni ²⁺ -NTA Sepharose	144
Tabelle 68:	Aufreinigung der His ₆ catGlcAT-P mittels Ni ²⁺ -NTA Sepharose	161
Tabelle 69:	Azeptorsubstrate der His ₆ catGlcAT-P	166
Tabelle 70:	Kinetische Daten der rekombinanten His ₆ catGlcAT-P	168
Tabelle 71:	Aufreinigung der His ₆ PropWgbL mittels Ni ²⁺ -NTA Sepharose modifiziert nach Engels <i>et al.</i> (Engels und Elling 2014)	200
Tabelle 72:	Azeptorsubstrate der His ₆ PropWgbL modifiziert nach Engels <i>et al.</i> (Engels und Elling 2014)	206
Tabelle 73:	Kinetische Daten der His ₆ PropWgbL modifiziert nach Engels <i>et al.</i> (Engels und Elling 2014)	207
Tabelle 74:	Aufreinigung der His ₆ PropFKP mittels Ni ²⁺ -NTA Sepharose	209

7.4 Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	„base pairs“, Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
c	Konzentration

°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca	Chloramphenicol
CE-UV	Kapillarelektrophorese mit UV-Detektion
cm	Zentimeter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMS	Enzym-Modul-System
ESI-MS	Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie
g	Gramm
FKP	L-Fukokinase/L-Fuc-1-P Guanylyltransferase
L-Fuc	L-Fukose
L-Fuc-1-P	L-Fukose-1-Phosphat
FucT	Fukosyltransferase
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GDP-Fuc	GDP-β-L Fukose
h	Stunden
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His ₆ -Tag	Motiv aus sechs Histidinresten
HPAEC-PAD	High pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection
Hz	Hertz (Schwingung)
Kan	Kanamycin
L	Liter
LacNAc	N-Acetyllaktosamin
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LB	<i>Luria broth</i>
M	molar
MES	2-(N-Morpholino-)Ethansulfonsäure
mg	Milligramm

min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MS	Massenspektrometrie
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
Ni ²⁺ -NTA	Ni ²⁺ -Nitrilotriessigsäure
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
NTA	Nitrilotriessigsäure
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins
PAA	Polyacrylamid
PEG	Polyethylenglykol
PEP	Phosphoenolpyruvat
PK	Pyruvatkinase
PPase	anorganische Pyrophosphatase
PPi	Pyrophosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SuSy	Saccharose Synthase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polacryamid-Gelelektrophorese
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	„Unit“, Umsatz eines µmol Substrates pro min
UMP	Uridinmonophosphat
UDP	Uridindiphosphat
UDP-Glc	Uridindiphosphat-Glukose
UDP-GlcA	Uridindiphosphat-Glukuronsäure
UpM	Umdrehungen pro Minute

V/V	V/V	„volume per volume“, Volumenprozent pro Volumen
W/V		„weight per volume“, Gewichtsprozent pro Volumen

8 Anhang

8.1 Proteinsequenzen

8.1.1 His₆catGlcAT-P

MAHHHHHHVDDDDKMLAPLLAVHKDEGSDPRHEAPPGADPREYCMSDRDIVEVVR
TEYVYTRPPPWSDTLPTIHVVTPTYSRPVQKAELTRMANTLLHVPNLHWLVVEDAPR
RTPLTARLLRDTGLNYTHLHVETPRNYKLRGDARDPRIPRGTMQRNLALRWLRETFP
RNSTQPGVVYFADDDNTYSLELFEEMRSTRRVSVWPVAFVGGRLYEAPRVNGAGKV
VGWKTVPDHRPFAIDMAGFAVNLRLILQRSQAYFKLRGVKGGYQESSLLRELVTLN
DLEPKAANCTKILVWHTRTEKPVLVNEGKKGFTDPSVEI

8.1.2 His₆KFID

MGSSHHHHHHSQDPNSSSARLQNCIGMFGTLKITVSGAGYVGLSNGILMAQNHEV
VAFDTHQKKVDLLNDKLSPIEDKEIENYLSTKILNFRATTNKYEAYKNANYVIIATPT
NYDPGSNYFDTSSVEAVIRDVTEINPNAIMVVKSTVPVGFTKTIKEHLGINNIIFSPEFL
REGRALYDNLHPSRIIIGECSEARAERLAVLFQEGAQKQIPVLFTDSTEAEAIKLFSNTY
LAMRVAFFNELDSYAESFGLNTRQIIDGVCLDPRIGNYYNNPSFGYGGYCLPKDTKQ
LLANYQSVPNKLISAIVDANRTRKDFITNVILKHRPQVVG VYRLIMKSGSDNFRDSSIL
GIIKRIKKKGVKVIIYEPLISGDTFFNSPLERELAIKFKGADIITNRMSEELNDVVDKVY
SRDLFKCD

8.1.3 His₆UGD

MGHHHHHHHHHHSSGHIEGRHMEFRMKITISGTGYVGLSNGLLIAQNHEVVALDILP
SRVAMLNDRISPIVDKEIQQLQSDKIHFNATLDKNEAYRDADYVIIATPTDYDPKTN
YFNTSSVESVIKDVVEINPYAVMVIKSTVPVGFTAAMHKKYRTENIIFSPEFLREGKAL
YDNLHPSRIVIGERSERAERFAALLQEGAQKQIPMLFTDSTEAEAIKLFANTYLAMRV
AYFNELDSYAESLGLNSRQIIEGVCLDPRIGNHYNNPSFGYGGYCLPKDTKQLLANYQ

SVPNNLISAIVDANRTRKDFIADAILSRKPQVVGIYRLIMKSGSDNFRASSIQGIMKRIK
AKGVEVIIYEPVMKEDSFFNSRLERDLATFKQQADVIIISNRMAEELKDVADKVYTRD
LFGSD

8.1.4 UGDHis₆

MAWMKITISGTGYVGLSNGLLIAQNHEVVALDILPSRVAMLNDRISPIVDKEIQQLQ
SDKIHFNATLDKNEAYRDADYVIIATPTDYDPKNTNYFNTSSVESVIKDVVEINPYAVM
VIKSTVPVGFTAAMHKKYRTENIIFSPEFLREGKALYDNLHPSRIVIGERSERAERFAA
LLQEGAIKQNIPMLFTDSTEAEAIKLFANTYLAMRVAYFNELD SYAESLGLNSRQIIEG
VCLDPRIGNHYNNPSFGYGGYCLPKDTKQLLANYQSV PNNLISAIVDANRTRKDFIAD
AILS RKPQVVGIYRLIMKSGSDNFRASSIQGIMKRIKAKGVEVIIYEPVMKEDSFFNSRL
ERDLATFKQQADVIIISNRMAEELKDVADKVYTRDLFGSDPLEHHHHHH

8.1.5 His₆UGDH1

MGHHHHHHSSGHIEGRHMEFRMVKICIGAGYVGGPTMAVIALKCPDVEVAVVDIS
VPRINAWNSDTLPIYEPGLDDVVKQCRGKNLFFSTDVEKHVREADIVFVSVNTPTKTR
GLGAGKAADLTYWESAARMIADVSVSDKIVVEKSTVPVKTAEAIEKILTHNSKGIKF
QILSNPEFLAEGTAIKDLFNPDRV LIGGRETPEGFKAVQTLKNVYAHWVPEGQIITNL
WSAELSKLAANAFLAQRISSVNAMSALCEATGADVTQVSYAVGTDSRIGPKFLNSSV
GFGGSCFQKDILNLVYICECNGLPEVAEYWKQVIKINDYQKS R FVNRVVSSMFNSVS
NKKIAVLGFAFKKDTGDTRET PAIDVCKGLLEDKARLSIYDPQVTEDQIQRDL SMNKF
DWDHPLHLQPMSP TTVKQVTVTW DAYEATKDAHGICIMTEWDEFKNLDFQKIFDN
MQKPAFVFDGRNIMNLQKLREIGFIVYSIGKPLDDWLKDMPAVA

8.1.6 His₆UGDH

MGSSHHHHHHSQDPNSSSARLQPMHWKMFEIKKICIGAGYVGGPTCSVIAHMCPEI
RVTVDVNESRINAWNSPTLPIYEPGLKEVVESCRGKNLFFSTNIDDAIKEADLVFISV
NTPTKTYGMGKGRAADLKYIEACARRIVQNSNGYKIVTEKSTVPVRAAESIRRIDAN
TKPNLNLQVLSNPEFLAEGTAIKDLKNPDRV LIGGDETPEGQRAVQALCAVYEHWVP

REKILTTNTWSSSELSKLAANAFQAQRSSINSISALCEATGADVEEVATAIGMDQRIGN
KFLKASVGFSGSCFQKDVNLVYLCEALNLPEVARYWQQVIDMNDYQRRRFASRIID
SLFNTVTDKKIAILGFAFKKDTGDTRESSSIYISKYLMDEGAHLHIYDPKVPREQIVVD
LSHPGVSEDDQVSRLVTISKDPYEACDGAHAVVICTEWDMMFKELDYERIHKKMLKPA
FIFDGRRVLDGLHNELQTIGFQIETIGKKVSSKRIPYAPSGEIPKFSLQDPPNKKPKV

8.1.7 His₆UMP

MGHHHHHHHHHHSSGHIEGRHMEFRMKPLVVFVLGGPGAGKGTQCARIVEKYGYT
HLSAGELLRDERKNPDSQYGELIEKYIKEGKIVPVEITISLLKREMDQTMAANAQKNK
FLIDGFPRNQDNLQGWNKTMGKADVSVLFFDCNNEICIERCLERGKSSGRSDDNR
ESLEKRIQTYLQSTKPIIDL YEEMGKVKKIDASKSVDEVFDEVVQIFDKEG

8.1.8 His₆catGlcAT-S

MAHHHHHHVDDDDKMDVDPRRPAPQLTSRPYFSPHAVGCGGSRVPLRRSSPGRDA
AEKRNESRPQLQPEPRLPTIYAITPTYSRPVQKAELTRLANTFRQVAQLHWILVEDRA
TRSELVSSFLARAGLPNTHLHVPTPRRYKRPWLPRATEQRNAGLAWLRQRHQHQA
QPGVLFFADDDNTYSLELFQEMRTTRKVSVPVGLVGGRRYERPLVKNGKVVGWY
TGWREDRPFADIMAGFAVSLQVILSNPKAVFKRRGSQPGMQESDFLKQITTVEELEPK
ASNCTKVLVWHTRTEKVNLANEPKYHLDTVNIEV

8.1.9 His₆PropWbgL

MHHHHHHNDSTTTQTTTPEVAQTSQQETHTHQTPVTSLHTATPEHVDDSKEATPLPE
KAESPKTEVTVQPSSHTQEVPAHKKKTQQQPAYKDKTVPSTIASKSVESNKAENE
MSPVEHHASNVEKREDRLETNETTPPSVDREFSHKIINNAHVNPKTGQTNVNVDTK
TIDTVSPKDDRIDTAQPKQVDAPKENTTAQNKFTSQASDKKPYGSMIIRLQGGGLNQ
LFQFSFGYALSKINGTPLYFDISHYAENDDHGGYRLNNLQIPEEYLQYYTPKINNIYKL
LVRGSRLYPDIFLFLGFCNEFHAYGYDFEYIAQKWKSCKYIGYWQSEHFFHKHILDLK
EFFIPKNVSEQANLLAAKILESQSSLSIHRRGDYIKNKATLTHGVCSLEYKKAALNKI
RDLAMIRDVFIFSDDIFWCKENIETLLSKKYNIIYSEDLSQEEDLWLMSLANHHIIANS
SFSWWGAYLGSSASQIVYIYPTPWYDITPKNTYIPIVNHWINVDKHSSC

8.1.10 His₆PropFKP

MHHHHHHNDSTTQTTTPLEVAQTSQQETHTHQTPVTSLHTATPEHVDDSKSATPLPE
KAESPKTEVTVQPSSHTQEVPA LHKKTQQQPAYKDKTVPESTIASKSVESNKATENE
MSPVEHHASNVEKREDRLETNETTPPSVDREFSHKIINNAHVNP KTDGQTNVNVDTK
TIDTVSPKDDRIDTAQPKQVDAPKENTTAQNKFTSQASDKKPYGSAMQKLLSLPSNL
VQSFHELERNRTDWFCTSDPVGKKLGSGGGT SWLLEECYNEYSDGATFGEWLEKE
KRILLHAGGQSRRLPGYAPSGKILTPVPVFRW ERGQHLGQNLLSLQLPLYEKIMSLAP
DKLHTLIASGDVYIRSEKPLQSIPEADVVCYGLWVDPSLATHHG VFASDRKHPEQLDF
MLQKPSLAELESLSKTHLFLMDIGIWLLSDRAVEILMKRSHKESSEELKYYDLYSDFG
LALGTHPRIEDEEVNTLSVAILPLPGGEFYHYGT SKELISSTLSVQNKVYDQRRIMHRK
VKPNPAMFVQNAVVRIP LCAENADLWIENSHIGPKWKIASRHIITGV PENDWSLAVPA
GVCVDVVPMDGKGFVARPYGLDDVFKGDLRDSKTTLTGIPFGEWMSKRGLSYTDLK
GRTDDLQAVSVFPMVNSVEELGLVLRWMLSEPELEEGKNIWLRSEHFSADEISAGAN
LKRLYAQREEFRKGNWKALAVNHEKSVFYQLDLADAAEDFVRLGLDMPPELLPEDA
LQMSRIHNRMLRARILKLDGKDYRPEEQAAFDLLRDGLLDGISNRKSTPKLDVYSDQI
VWGRSPVRIDMAGGWTDTPPYSLYSGGNVVNLAIELNGQPPLQVYVKPCKDFHIVL
RSIDMGAMEIVSTFDELQDYKKIGSPFSIPKAALSLAGFAPAFSAVSYASLEEQLKDFG
AGIEVTLLAAIPAGSGLGTSSILASTVLGAINDFCGLAWDKNEICQRTLVL EQLLTTGG
GWQDQYGGVLQGVKLLQTEAGFAQSPLVRWLPDHLFTHPEYKDCHLLYYTGITRTA
KGILAEIVSSMFLNSSLHLNLLSEMKAHALDMNEAIQRGSFVEFGRLVGKTWEQNKA
LDSGTNPPAVEAII DLIKDYTLGYKLPGAGGGGYLYMVAKDPQAAVRIRKILTENAPN
PRARFVEMTLSDKGFQVSRS

8.1.11 SuSy1

MAERVLTRVHSLRERV DATLAAHRNEILLFLSRIESHGKGILK PHELLAEFDAIRQDD
KNKLNEHA FEELLKSTQEAIVLPPWVALAIRLRPGVWEYIRVNVNALVVEELSVPEY
LQFKEELVDGASNGNFVLELDFEPFTASFPKPTLT KSIGNGVEFLNRHLSAKMFHDKE
SMTPLLEFLRAHHYKGKTMMLNDRIQNSNTLQNVLRKAEEYLIMLP PETPYFEFEHK
FQEIGLEKGWGD TAERVLEMVCMLLDLLEAPDSCTLEKFLGRIPMVFNVVILSPHGY
FAQENVLGYPDTGGQVVYILDQVPALEREMLKRIKEQGLDIIPRILIVTRLLPD AVGTT
CGQRIEKVYGAESHILRV PFRTEKGIVRKWISRFEVWPYMETFIEDVAKEISAE LQA

KPDLIIGNYSEGNLAASLLAHKLGVTQCTIAHALEKTKYPDSDIYWKKFDEKYHFSSQ
 FTADLIAMNHTDFIITSTFQEIAGSKDTVGGYESHMAFTMPGLYRVVHGINVFDPKFNI
 VSPGADINLYFSYSETEKRLTAFHPEIDELLYSDVENDEHLCVLKDRTKPILFTMARLD
 RVKNLTGLVIEWYAKNPRLRGLVNLVVVGGDRRKESKDLEEQAEMKKMYELIETHN
 LNGQFRWISSQMNRVRNGELYRYIADTKGAFVQPAFYEAFLTVVEAMTCGLPTFA
 TNHGGPAEIIVHGKSGFHIDPYHGEQAADLLADFFEKCKKDPSHWETISMGGLKRIEE
 KYTWQIYSERLLTLAAVYGFWKHVSKLDRLEIRRYLEMFYALKYRKMAEAVPLAAE

8.2 DNA Sequenzen

8.2.1 *his₆catglcatp*

ATGGCACATCACCACCACCATCACGTGGATGACGACGACAAGATGCTCGCACCTC
 TGCTTGCTGTGCACAAGGATGAGGGAAGTGACCCCCGCCATGAGGCACCACCTG
 GTGCGGACCCTAGGGAGTACTGCATGTCCGACCGTGACATCGTGGAAGTGGTGCG
 CACAGAGTACGTGTACACGAGGCCGCCACCCTGGTCCGACACGCTGCCCACCATC
 CATGTGGTGACGCCCACCTACAGTAGACCGGTGCAGAAGGCAGAGCTGACGCGA
 ATGGCCAACACACTACTGCATGTGCCAACCTTCACTGGCTAGTGGTGGAGGATG
 CTCCACGCAGGACGCCCCCTACCGCGCGCTTGCTGCGCGACACTGGCCTCAACTA
 CACACACCTGCACGTAGAGACACCACGCAACTATAAGCTGCGAGGTGATGCCCCG
 AGACCCTCGCATCCCACGTGGCACCATGCAGCGCAACCTGGCACTGCGCTGGCTG
 CGGGAGACCTTCCCACGGAACCTCTACTCAGCCAGGCGTAGTGTACTTCGCGGATG
 ATGACAACACGTACAGTCTGGAGCTCTTTGAAGAGATGCGCAGCACAAGAAGGG
 TGTCCGTGTGGCCTGTGGCCTTTGTTGGTGGCCTTCGGTATGAGGCCCCACGGGTG
 AATGGGGCAGGGAAAGTGGTTGGCTGGAAGACAGTCTTTGACCCCCACCGGCCC
 TTTGCAATAGACATGGCTGGATTTGCTGTCAACCTCCGGCTCATCTTGCAGCGAA
 GTCAAGCCTACTTTAAGCTACGTGGTGTGAAGGGAGGCTACCAGGAAAGCAGTCT
 CCTTCGAGAACTTGTCAACCCTCAATGACCTGGAGCCCAAGGCAGCAAACCTGTACC
 AAGATCTTGGTCTGGCATAACGAACAGAGAAGCCAGTGCTGGTCAATGAGGGG
 AAGAAGGGCTTACCGACCCCTCAGTGGAGATCTGACCGGGCTTCTCCTCAAATC
 TCGAGTCTGGTAAAGAAACCGCTGCTGCGAAATTTGAACGCCAGCACATGGACTC
 GTCTACTAGCGCAGCTTAATTAA

8.2.2 *his₆kfiD*

ATGGGCAGCAGCCATCACCATCATCACCACAGCCAGGATCCGAATTCGAGCTCGG
CGCGCCTGCAGAACCAATGCATTGGCATGTTTCGGAACACTAAAAATAACTGTTTC
AGGCGCTGGTTACGTTGGGCTTTCAAATGGAATTCTAATGGCTCAAAATCATGAA
GTGGTTGCATTTGATACCCATCAAAAAAAGTTGACTTACTTAATGATAAACTCT
CTCCTATAGAGGATAAGGAAATTGAAAATTATCTTTCAACTAAAATACTTAATTT
TCGCGCAACTACTAACAAATATGAAGCCTATAAAAAATGCCAATTACGTTATTATT
GCTACACCAACGAATTATGACCCAGGTTCAAATTACTTTGATACATCAAGCGTTG
AAGCTGTCATTCGTGACGTAACGGAAATCAACCCAAACGCAATTATGGTGGTTAA
ATCTACGGTCCCAGTAGGTTTCACAAAAACAATTAAAGAACATTTAGGTATTAAT
AATATTATCTTCTCTCCAGAATTTTTACGAGAAGGAAGAGCCCTATACGATAATC
TCCATCCATCTCGCATTATTATCGGTGAATGTTCTGAACGGGCAGAACGTTTGGC
AGTGTTATTTTCAGGAAGGAGCGATTAAACAAAATATACCCGTTTTATTACAGAT
TCTACGGAAGCGGAAGCGATTAAAGTTATTTTCAAATACTTATTTGGCTATGCGAG
TTGCATTTTTTAATGAATTGGATAGTTACGCAGAAAGTTTTGGTCTGAATACGCGT
CAGATTATTGACGGTGTTTGGTTGGATCCGCGCATTGGTAATTACTACAATAATCC
TTCTTTTGGTTATGGTGGCTACTGTTTGCCAAAAGATACCAAGCAATTATTAGCCA
ACTATCAGTCTGTTCCGAATAAACTTATATCTGCAATTGTTGATGCTAACCGTACA
CGTAAGGACTTTATCACTAATGTTATTTTGAAACATAGACCACAAGTTGTGGGGG
TTTATCGTTTGATTATGAAAAGTGGTTCAGATAATTTTAGAGATTCTTCTATTCTT
GGTATTATAAAGCGTATCAAGAAAAAAGGCGTGAAAGTAATTATTTATGAGCCG
CTTATTTCTGGAGATACATTCTTTAACTCACCTTTGGAACGGGAGCTGGCGATCTT
TAAAGGGAAAGCTGATATTATTATCACTAACCGAATGTCAGAGGAGTTGAACGAT
GTGGTCGACAAAGTCTATAGTCGCGATTTGTTTAAATGTGACTAAGGATAGTTTA
GCGGCCGCATAATGCTTAAGTCGAACAGAAAGTAATCGTAA

8.2.3 *his₆ugd*

ATGGGCAGCAGCCATCACCATCATCACCACAGCCAGGATCCGAATTCGAGCTCGG
CGCGCCTGCAGCCAATGCATTGGAAAATGGTGAAGATTTGCTGCAGTGGAGCTGG
CTATGTTGGTGGCCCAACCATGGCTGTGATTGCCTTGAAGTGTCTGAGATCGAG
GTGGTCGTGGTGGACATTGCTGCTCCACGAATCAACGCGTGGAACAGTGACCACC

TCCCGATATACGAGCCCGGCCTTGATGATGTGGTGAAGCAGTGTAGGGGGAAGA
ATCTCTTCTTCAGCACTGATGTGGAGAAGCATGTTGCTGAGGCTGACATTGTCTTT
GTCTCGGTGAACACACCGACAAAGACTCAGGGTCTTGGAGCCGGTAAGGCGGCT
GATCTCACATATTGGGAGAGTGCTGCCAGGATGATTGCTGATGTATCAAAATCGG
ACAAGATCGTGGTTGAGAAATCGACCGTGCCTGTGAAAACAGCTGAGGCAATTG
AGAGGATTCTGACTCACAATAGGAAAGGCATCAATTTACAATTCTGTCAAACCC
TGAGTTTCTTGCTGAGGGTACAGCAATTGCAGACCTGTTTAAGCCGGATCGAGTC
CTCATCGGAGGCAGGGAAACCCAGAGGGTCAAAAGGCTATTCATTCTCTGAAG
AGTGCTTATGCCCATTGGGTTCCTGAGGACAGAATCCTTTGCACCAATTTGTGGTC
TGCTGAACTCTCAAAGCTTGCAGCCAATGCTTTCCTGGCCCAGAGGATCTCCTCTG
TGAATGCCATGTCGGCGCTTTGCGAGGCAACTGGTGCTGATGTCTCCAGGTGTC
ACACTCAATCGGGACAGACTCGAGAATTGGACCAAAGTTCCTGAATGCCAGTGTT
GGTTTTGGTGGATCATGCTTCCAGAAGGACATATTGAACTTGGTCTATATCTGTGA
GTGCAATGGCCTACCAGAGGTGGCCAATTACTGGAAACAGGTCATCAAGGTGAA
TGACTACCAGAAAATGCGGTTTCGTAAATCGCGTGGTGTCATCAATGTTCAACACA
GTCTCAGGGAAGAAGATTGCTGTTTTGGGATTTGCTTTCAAGAAGGACACTGGTG
ACACTAGGGAGACCCAGCCATTGATGTGTGCAAGGGCCTTTTGGGAGACAAGG
CCAAGTTGAGCATATATGATCCTCAGGTCCTGAGGATCAAATCATGAGGGATTT
AGCAATGAAGAAGTTTGATTGGGACCACCCTGCTCATCTTCAACCACTGAGTCCA
ACTTCCAACAAACAAGTATCTGTGGTTTGGGATGCCTATGAGGCAATCAAGGATG
CACATGGCATCTGCGTCATGACTGAGTGGGATGAGTTCAAGAACCTTGATTACCA
GAAGGTTTATGACAGCATGCAGAAGCCTGCATTCATTTTCGATGGCCGCAACGTC
GTGGATGTTAACAAGCTGAGGGAAATTGGTTTCATTGTTTACTCCATTGGCAAAC
CTCTAGATTCATGGCTCAAGGACATGCCTGCTGTGGCATAAGGATAGTTTAGCGG
CCGCATAATGCTTAAGTCGAACAGAAAGTAATCGTA

8.2.4 *ugdhis₆*

ATGGCATGGATGAAAATCACCATTTCCGGTACTGGCTATGTAGGCTTGTCAAACG
GGCTTCTAATCGCACAAAATCATGAGGTTGTGGCATTAGATATTTTACCGTCACG
CGTTGCTATGCTGAATGATCGGATATCTCCTATTGTTGATAAGGAAATTCAGCAG
TTTTTGCAATCAGATAAAATACACTTTAATGCCACATTAGATAAAAATGAAGCCT
ACCGGGATGCTGATTATGTCATCATCGCCACTCCAACCGACTATGATCCTAAAC

TAATTATTTCAATACATCCAGTGTAGAATCAGTAATTAAAGACGTAGTTGAGATA
AATCCTTATGCGGTTATGGTCATCAAATCAACGGTTCCTCGTTGGTTTTACCGCAGC
GATGCATAAGAAATATCGCACTGAAAATATTATATTCTCCCCGGAATTTCTCCGT
GAGGGTAAAGCCCTTTACGATAATCTCCATCCTTCACGTATTGTCATCGGTGAGC
GTTCAGAACGCGCAGAACGTTTTGCTGCTCTGTTACAGGAAGGCGCGATTAAAGCA
AAATATCCCGATGCTGTTTACCGACTCCACTGAAGCAGAAGCGATTAACTTTTT
GCAAACACCTACCTGGCGATGCGCGTGGCGTACTTTAACGAACTGGATAGCTATG
CAGAAAGTTTAGGTCTGAATTCCCGTCAAATAATCGAAGGCGTTTGTCTCGACCC
ACGTATTGGCAACCATTACAACAATCCGTCGTTTGGTTATGGTGGTTATTGTCTGC
CGAAAGATACCAAGCAGTTACTGGCGAACTACCAGTCTGTGCCGAATAACCTGAT
CTCGGCAATTGTCGATGCTAACCGCACGCGTAAAGATTTTATTGCCGATGCCATTT
TGTCACGCAAGCCGCAAGTGGTGGGTATTTATCGTCTGATTATGAAGAGCGGTTC
AGATAACTTCCGTGCGTCTTCTATTACAGGGGATTATGAAACGTATCAAGGCGAAA
GGTGTGGAAGTGATCATCTACGAGCCAGTGATGAAAGAAGACTCATTCTTCAACT
CTCGCCTGGAACGTGATCTCGCCACCTTCAAACAACAAGCCGACGTCATTATCTC
TAACCGAATGGCAGAAGAGCTTAAGGATGTGGCAGATAAGGTATACACCCGCGA
TCTCTTTGGCAGCGACCCGCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCT
GCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCAC

8.2.5 *his₆ugd_h1*

ATGGGCCATCATCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCATATCGAAG
GTCGTCATATGGAATTCGGATGGTGAAGATATGTTGTATTGGAGCTGGGTATGT
TGGTGGACCAACAATGGCAGTGATTGCATTGAAATGTCCAGACGTTGAAGTAGCG
GTTGTTGATATCTCTGTACCACGTATCAACGCTTGGAACAGTGACACGCTTCCGAT
TTACGAGCCTGGTCTTGATGATGTTGTGAAGCAATGCCGTGGCAAGAACCTTTTC
TTAGTACTGATGTTGAGAAACATGTTAGGGAAGCTGATATTGTGTTTGTTTCTGT
CAACACACCGACTAAGACTAGAGGTCTTGGTGCTGGTAAAGCTGCGGATCTTACG
TACTGGGAGAGCGCTGCGCGTATGATCGCTGATGTTTCGGTATCGGATAAGATTG
TCGTTGAGAAATCGACTGTTCCGGTTAAACAGCTGAAGCTATTGAGAAGATTTT
GACACATAACAGTAAAGGGATTAAGTTTCAGATTCTTTCGAATCCCGAGTTTTTG
GCGGAAGGAACCGCGATTAAAGGACCTATTTAATCCGGACCGTGTTCTTATCGGAG
GGCGGGAAACCCCGAAGGGTTTAAAGCGGTGCAGACTCTCAAGAATGTGTATG

CACACTGGGTTTCCTGAAGGCCAAATCATAACAACCAATCTCTGGTCTGCTGAGCT
GTCCAAGCTTGCGGCAAACGCTTTCTTGGCTCAAAGGATTTTCATCAGTGAATGCT
ATGTCGGCTCTGTGTGAAGCCACAGGCGCAGATGTCACGCAAGTGTCTTACGCGG
TTGGTACAGACTCAAGGATTGGTCCCAAGTTCTTGAAGTCGAGTGTGGATTTCGG
TGGTTCGTGTTTCCAGAAGGACATTCTGAATCTTGTCTACATCTGTGAGTGCAACG
GACTCCCGGAAGTGGCAGAGTACTGGAAGCAAGTCATCAAGATCAATGACTACC
AGAAGAGCCGGTTCGTGAACCGTGTTGTTTCCTCCATGTTCAACTCTGTATCAAAC
AAGAAGATTGCGGTTCCTCGGTTTCGCATTCAAGAAAGACACCGGTGACACAAGG
GAGACTCCAGCCATCGATGTGTGCAAGGGTCTTTTAGAAGACAAAGCAAGGCTA
AGCATTTACGACCCACAAGTGACTGAGGATCAGATCCAGAGGGATTTATCCATGA
ACAAGTTCGACTGGGACCATCCTCTACATTTGCAGCCAATGAGCCCAACAACAGT
GAAACAAGTGACCGTTACTTGGGACGCATACGAAGCAACTAAGGACGCTCACGG
TATCTGCATCATGACCGAGTGGGATGAGTTCAAGAACCTTGATTTCCAGAAGATC
TTTGACAACATGCAGAAACCAGCTTTCGTGTTTCGATGGAAGAAACATTATGAATC
TGCAAAAGCTAAGGGAGATTGGTTTCATTGTTTACTCCATTGGTAAGCCTCTCGA
CGACTGGCTCAAGGACATGCCTGCCGTTGCCTAATCGGGATCCGGCTGCTAACAA
AGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCAC

8.2.6 *his₆ugd*

ATGGGCAGCAGCCATCACCATCATCACCACAGCCAGGATCCGAATTCGAGCTCGG
CGCGCCTGCAGCCAATGCATTGGAAAATGGTGAAGATTTGCTGCAGTGGAGCTGG
CTATGTTGGTGGCCCAACCATGGCTGTGATTGCCTTGAAGTGTCTGAGATCGAG
GTGGTTCGTGGTGGACATTGCTGCTCCACGAATCAACGCGTGGAACAGTGACCACC
TCCCGATATACGAGCCCGGCCTTGATGATGTGGTGAAGCAGTGTAGGGGGAAGA
ATCTCTTCTTCAGCACTGATGTGGAGAAGCATGTTGCTGAGGCTGACATTGTCTTT
GTCTCGGTGAACACACCGACAAAGACTCAGGGTCTTGGAGCCGGTAAGGCGGCT
GATCTCACATATTGGGAGAGTGCTGCCAGGATGATTGCTGATGTATCAAAATCGG
ACAAGATCGTGGTTGAGAAATCGACCGTGCCTGTGAAAACAGCTGAGGCAATTG
AGAGGATTCTGACTCACAATAGGAAAGGCATCAATTTACAATTCTGTCAAACCC
TGAGTTTCTTGCTGAGGGTACAGCAATTGCAGACCTGTTTAAGCCGGATCGAGTC
CTCATCGGAGGCAGGGAAACCCAGAGGGTCAAAAGGCTATTCATTCTCTGAAG
AGTGCTTATGCCCATTTGGGTTCCTGAGGACAGAATCCTTTGCACCAATTTGTGGTC

TGCTGAACTCTCAAAGCTTGCAGCCAATGCTTTCCTGGCCCAGAGGATCTCCTCTG
TGAATGCCATGTCTGGCGCTTTGCGAGGCAACTGGTGCTGATGTCTCCCAGGTGTC
ACACTCAATCGGGACAGACTCGAGAATTGGACCAAAGTTCCTGAATGCCAGTGTT
GGTTTTGGTGGATCATGCTTCCAGAAGGACATATTGAACTTGGTCTATATCTGTGA
GTGCAATGGCCTACCAGAGGTGGCCAATTACTGGAAACAGGTCATCAAGGTGAA
TGACTACCAGAAAATGCGGTTTCGTAAATCGCGTGGTGTCATCAATGTTCAACACA
GTCTCAGGGAAGAAGATTGCTGTTTTGGGATTTGCTTTCAGAAGGACACTGGTG
ACACTAGGGAGACCCCAGCCATTGATGTGTGCAAGGGCCTTTTGGGAGACAAGG
CCAAGTTGAGCATATATGATCCTCAGGTCACTGAGGATCAAATCATGAGGGATTT
AGCAATGAAGAAGTTTGATTGGGACCACCCTGCTCATCTTCAACCACTGAGTCCA
ACTTCCAACAAACAAGTATCTGTGGTTTGGGATGCCTATGAGGCAATCAAGGATG
CACATGGCATCTGCGTCATGACTGAGTGGGATGAGTTCAAGAACCTTGATTACCA
GAAGGTTTATGACAGCATGCAGAAGCCTGCATTCATTTTCGATGGCCGCAACGTC
GTGGATGTTAACAAGCTGAGGGAAATTGGTTTCATTGTTTACTCCATTGGCAAAC
CTCTAGATTCATGGCTCAAGGACATGCCTGCTGTGGCATAAGGATAGTTTAGCGG
CCGCATAATGCTTAAGTCGAACAGAAAGTAATCGTA

8.2.7 *his₆ump*

ATGGGCCATCATCATCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCATATCGAAG
GTCGTCATATGGAATTCCGCATGAAGCCGCTGGTCGTGTTTCGTCCTCGGCGGCCC
CGGCGCCGGCAAGGGGACCCAGTGCGCCCGCATCGTCGAGAAATATGGCTACAC
ACACCTTTCTGCAGGAGAGCTGCTTCGTGATGAAAGGAAGAACCCAGATTCACAG
TATGGTGAACCTTATTGAAAAGTACATTAAAGAAGGAAGATTGTACCAGTTGAG
ATAACCATCAGTTTATTAAAGAGGGGAAATGGATCAGACAATGGCTGCCAATGCTC
AGAAGAATAAATTCTTGATTGATGGGTTTCCAAGAAATCAAGACAACCTTCAAGG
ATGGAACAAGACCATGGATGGGAAGGCAGATGTATCTTTCGTTCTCTTTTTTGAC
TGTAATAATGAGATTTGTATTGAACGATGTCTTGAGAGGGGAAAGAGTAGTGGTA
GGAGTGATGACAACAGAGAGAGCTTGGAAGAGAGAATTCAGACCTACCTTCAGT
CAACAAAGCCAATTATTGACTTATATGAAGAAATGGGGAAAGTCAAGAAAATAG
ATGCTTCTAAATCTGTTGATGAAGTTTTTGATGAAGTTGTGCAGATTTTTGACAAG
GAAGGCTAACGGGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCT
GCTGCCAC

8.2.8 *his₆catglcats*

ATGGCACATCACCACCACCATCACGTGGATGACGACGACAAGATGGACGTGGAC
CCCCGCAGGCCCGCGCCCCAACTCACTTCCCGTCCCTACTTCTCTCCCCATGCAGT
GGGCTGCGGGGGCTCCCGAGTCCCGCTCCGACGGAGTAGCCCCGGGCGTGACGC
TGCCGAGAAGCGGAACGAGTCTCGGCCTCAGCTGCAGCCGGAGCCGCGCTTGCC
CACCATCTATGCCATCACACCCACCTACAGTCGCCCCGGTGCAGAAAGCCGAGCTC
ACTCGCCTGGCCAACACCTTCCGCCAGGTGGCGCAGTTGCACTGGATCCTGGTGG
AGGACCGGGCGACGCGCAGCGAGCTGGTGAGCAGCTTCCTAGCTCGGGCCGGCC
TGCCCAACACGCACCTGCATGTGCCACGCCGCGGCGCTACAAGCGACCGTGGCT
GCCGCGCGCCACCGAACAGCGCAACGCGGGCCTCGCCTGGCTGCGCCAGAGGCA
TCAGCATCAGAGCGCGCAACCCGGCGTGCTCTTCTTCGCCGACGATGACAACACG
TACAGTCTGGAGCTCTTCCAGGAGATGAGGACCACTCGCAAGGTTTCTGTCTGGC
CTGTGGGACTAGTTGGTGGGCGACGCTATGAACGTCCGTTGGCAAAAAATGGCA
AAGTTGTTGGCTGGTACACCGGATGGAGAGAAGACAGGCCTTTTGCCATTGACAT
GGCTGGGTTTGCTGTGAGTCTGCAAGTCATCTTGTCCAATCCGAAAGCTGTATTTA
AGCGCCGTGGATCCCAGCCAGGGATGCAAGAATCTGACTTTCTAAAGCAGATAA
CAACAGTTGAAGAACTGGAACCAAAAAGCTAGTAACTGCACCAAGGTTCTCGTGT
GGCACACTCGGACAGAGAAGGTCAATCTAGCCAATGAGCCAAAGTATCACCTGG
ACACAGTGAACATTGAGGTGTAACCGGGCTTCTCCTCAAATCTCGAGTCTGGTAA
AGAAACCGCTGCTGCGAAATTTGAACGCCAGCACATGGACTCGTCTACTAGCGCA
GCTTAATTAACCTAGGCTGCTGCCA

8.2.9 *his₆propwbgL*

ATGCACCACCACCACCACCACAATGATTCGACAACACAAACAACGACACCACTG
GAAGTCGCTCAAACGTCGCAGCAAGAAACACATACACATCAAACACCTGTTACA
TCATTACATACTGCAACACCTGAACATGTTGATGACTCTAAAGAAGCAACACCTT
TACCTGAAAAAGCAGAGTCACCAAAAACCGAAGTGACAGTTCAACCTTCATCGC
ATACACAGGAAGTACCTGCGTTACATAAAAAAACACAGCAACAACCGGCGTATA
AGGATAAAACGGTACCAGAGTCAACGATAGCATCAAAGTCGGTTGAATCAAATA
AAGCAACAGAAAATGAGATGTCACCTGTTGAACATCATGCTTCAAATGTGGAAA
AACGTGAAGATAGATTGGAGACTAATGAGACAACACCGCCATCAGTGGACCGTG

AATTTAGCCATAAAATCATCAATAATGCGCACGTAAATCCAAAAACGGATGGAC
AAACAAACGTTAATGTTGATACGAAAACGATAGACACCGTTTCACCGAAAGATG
ACAGAATAGATACGGCGCAACCGAAACAAGTCGACGCTCCTAAAGAAAATACAA
CGGCACAAAATAAATTTACATCACAAGCGAGCGACAAAAAACCATACGGATCCA
TGAGCATTATTCGTCTGCAGGGTGGTCTGGGTAAATCAGCTGTTTCAGTTTAGCTTT
GGTTATGCCCTGAGCAAAATTAATGGTACACCGCTGTATTTTCGACATTAGCCATT
ATGCCGAAAACGATGATCATGGTGGTTATCGTCTGAATAATCTGCAGATTCCGGA
AGAATATCTGCAGTATTATACCCCGAAAATTAATAATATTTATAAACTGCTGGTG
CGTGGCAGCCGTCTGTATCCGGATATTTTTCTGTTTCTGGGCTTTTGCAACGAATT
TCATGCCTATGGCTACGATTTTGAATATATTGCCCAGAAATGGAAAAGCAAAAAA
TACATTGGCTACTGGCAGAGCGAACACTTTTTTCATAAACATATTCTGGACCTGA
AAGAATTTTTTATTCCGAAAAATGTGAGCGAACAGGCAAATCTGCTGGCAGCAAA
AATTCTGGAAAGCCAGAGCAGCCTGAGCATTTCATATTCGTCTGGCGATTATATT
AAAAACAAAACCGCAACCCTGACACATGGTGTGTTGTAGCCTGGAATATTATAAAA
AAGCCCTGAACAAAATCCGCGATCTGGCAATGATTTCGTGATGTGTTTATCTTTAG
CGACGATATCTTCTGGTGCAAAGAAAATATTGAAACCCTGCTGAGCAAAAAATAT
AATATTTATTATAGCGAAGATCTGAGCCAAGAAGAGGATCTGTGGCTGATGAGCC
TGGCAAATCATCATATTATTGCCAATAGCAGCTTTAGTTGGTGGGGTGCATATCT
GGGTAGCAGCGCAAGCCAGATTGTTATTTATCCGACCCCGTGGTATGATATTACC
CCGAAAAACACCTATATCCCGATTGTGAACCATTGGATCAACGTTGATAAACATA
GCAGCTGCTAA

8.2.10 *his₆propfkp*

ATGCACCACCACCACCACCACAATGATTTCGACAACACAAACAACGACACCACTG
GAAGTCGCTCAAACGTCGCAGCAAGAAACACATACACATCAAACACCTGTTACA
TCATTACATACTGCAACACCTGAACATGTTGATGACTCTAAAGAAGCAACACCTT
TACCTGAAAAAGCAGAGTCACCAAAAACCGAAGTGACAGTTCAACCTTCATCGC
ATACACAGGAAGTACCTGCGTTACATAAAAAAACACAGCAACAACCGGCGTATA
AGGATAAAACGGTACCAGAGTCAACGATAGCATCAAAGTCGGTTGAATCAAATA
AAGCAACAGAAAATGAGATGTCACCTGTTGAACATCATGCTTCAAATGTGGAAA
AACGTGAAGATAGATTGGAGACTAATGAGACAACACCGCCATCAGTGGACCGTG
AATTTAGCCATAAAATCATCAATAATGCGCACGTAAATCCAAAAACGGATGGAC

AAACAAACGTTAATGTTGATACGAAAACGATAGACACCGTTTCACCGAAAGATG
ACAGAATAGATACGGCGCAACCGAAACAAGTCGACGCTCCTAAAGAAAATACAA
CGGCACAAAATAAATTTACATCACAAGCGAGCGACAAAAAACCATACGGATCCG
CGATGCAAAAACACTACTATCTTTACCGTCCAATCTGGTTCAGTCTTTTCATGAACTG
GAGAGGGTGAATCGTACCGATTGGTTTTGTACTTCCGACCCGGTAGGTAAGAAAC
TTGGTTCCGGTGGTGGAACATCCTGGCTGCTTGAAGAATGTTATAATGAATATTC
AGATGGTGCTACTTTTGGAGAGTGGCTTGAAAAAGAAAAAGAATTCTTCTTCAT
GCGGGTGGGCAAAGCCGTCGTTTACCCGGCTATGCACCTTCTGGAAAGATTCTCA
CTCCGGTTCCTGTGTTCCGGTGGGAGAGAGGGCAACATCTGGGACAAAATCTGCT
TTCTCTGCAACTTCCCCTATATGAAAAAATCATGTCTTTGGCTCCGGATAAACTCC
ATACACTGATTGCGAGTGGTGATGTCTATATTCGTTCCGAGAAACCTTTGCAGAG
TATTCCCGAAGCGGATGTGGTTTGTTATGGACTGTGGGTAGATCCGTCTCTGGCTA
CCCATCATGGCGTGTTTGCTTCCGATCGCAAACATCCCGAACAACCTCGACTTTATG
CTTCAGAAGCCTTCGTTGGCAGAATTGGAATCTTTATCGAAGACCCATTTGTTCCCT
GATGGACATCGGTATATGGCTTTTGAGTGACCGTGCCGTAGAAATCTTGATGAAA
CGTTCTCATAAAGAAAGCTCTGAAGAACTAAAGTATTATGATCTTTATTCCGATTT
TGGATTAGCTTTGGGAACATCATCCCCGTATTGAAGACGAAGAGGTCAATACGCTA
TCCGTTGCTATTCTGCCTTTGCCGGGAGGAGAGTTCTATCATTACGGGACCAGTA
AAGAACTGATTTCTTCAACTCTTTCCGTACAGAATAAGGTTTACGATCAGCGTCGT
ATCATGCACCGTAAAGTAAAGCCCAATCCGGCTATGTTTGTCCAAAATGCTGTCTG
TGCGGATACCTCTTTGTGCCGAGAATGCTGATTTATGGATCGAGAACAGTCATAT
CGGACCAAAGTGGAAGATTGCTTCACGACATATTATTACCGGGGTTCCGGAAAAT
GACTGGTCATTGGCTGTGCCTGCCGGAGTGTGTGTAGATGTGGTTCCGATGGGTG
ATAAGGGCTTTGTTGCCCGTCCATACGGTCTGGACGATGTTTTCAAAGGAGATTT
GAGAGATTCCAAAACAACCCTGACGGGTATTCTTTTTGGTGAATGGATGTCCAAA
CGCGGTTTGTTCATATACAGATTTGAAAGGACGTACGGACGATTTACAGGCAGTTT
CCGTATTCCCTATGGTTAATTCTGTAGAAGAGTTGGGATTGGTGTGAGGTGGAT
GTTGTCCGAACCCGAACCTGGAGGAAGGAAAGAATATCTGGTTACGTTCCGAACAT
TTTTCTGCGGACGAAATTTCCGGCAGGTGCCAATCTGAAGCGTTTGTATGCACAAC
GTGAAGAGTTCAGAAAAGGAAACTGGAAAGCATTGGCCGTTAATCATGAAAAAA
GTGTTTTTTATCAACTTGATTTGGCCGATGCAGCTGAAGATTTTGTACGTCTTGGT
TTGGATATGCCTGAATTATTGCCTGAGGATGCTCTGCAGATGTCACGCATCCATA
ACCGGATGTTGCGTGCGCGTATTTTGAAATTAGACGGGAAAGATTATCGTCCGGA

AGAACAGGCTGCTTTTGATTTGCTTCGTGACGGCTTGCTGGACGGGATCAGTAAT
CGTAAGAGTACCCCAAATTGGATGTATATTCCGATCAGATTGTTTGGGGACGTA
GCCCCGTGCGCATCGATATGGCAGGTGGATGGACCGATACTCCTCCTTATTCACT
TTATTCGGGAGGAAATGTGGTGAATCTAGCCATTGAGTTGAACGGACAACCTCCC
TTACAGGTCTATGTGAAGCCGTGTAAAGACTTCCATATCGTCCTGCGTTCTATCGA
TATGGGTGCTATGGAAATAGTATCTACGTTTGATGAATTGCAAGATTATAAGAAG
ATCGGTTACCTTTCTCTATTCCGAAAGCCGCTCTGTCATTGGCAGGCTTTGCACC
TGCGTTTTCTGCTGTATCTTATGCTTCATTAGAGGAACAGCTTAAAGATTTTCGGTG
CAGGTATTGAAGTGACTTTATTGGCTGCTATTCCTGCCGGTTCCGGTTTGGGCACC
AGTTCCATTCTGGCTTCTACCGTACTTGGTGCCATTAACGATTTCTGTGGTTTAGC
CTGGGATAAAAATGAGATTTGTCAACGTACTCTTGTTCTTGAACAATTGCTGACT
ACCGGAGGTGGATGGCAGGATCAGTATGGAGGTGTGTTGCAGGGTGTGAAGCTT
CTTCAGACCGAGGCCGGCTTTGCTCAAAGTCCATTGGTGCGTTGGCTACCCGATC
ATTTATTTACGCATCCTGAATACAAAGACTGTCACTTGCTTTATTATACCGGTATA
ACTCGTACGGCAAAAGGGATCTTGGCAGAAATAGTCAGTTCCATGTTCCCTCAATT
CATCGTTGCATCTCAATTTACTTTTCGGAAATGAAGGCGCATGCATTGGATATGAA
TGAAGCTATACAGCGTGGAAGTTTTGTTGAGTTTGGCCGTTTGGTAGGAAAAACC
TGGGAACAAAACAAAGCATTGGATAGCGGAACAAATCCTCCGGCTGTGGAGGCA
ATTATCGATCTGATAAAAGATTATACCTTGGGATATAAATTGCCGGGAGCCGGTG
GTGGCGGGTACTTATATATGGTAGCGAAAGATCCGCAAGCTGCTGTTTCGTATTCTG
TAAGATACTGACAGAAAACGCTCCGAATCCGCGGGCACGTTTTGTGCGAAATGACG
TTATCTGATAAGGGATTCCAAGTATCACGATCATAA

8.3 Alignment verschiedener Aminosäuresequenzen

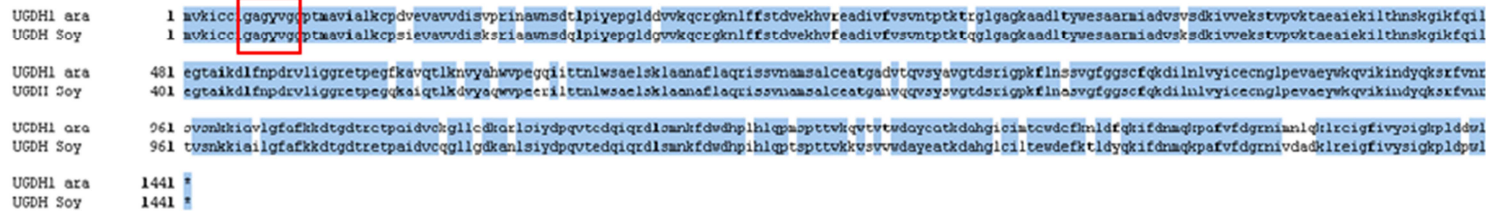


Abbildung 136.: Alignment der Aminosäuresequenz der UGDH1 aus *Arabidopsis thaliana* und der UGDH aus *Glycine max*
Die beiden Dehydrogenasen zeigen eine Homologie von 91% mit dem charakteristischen GXGXXG Motiv für die Bindung von NAD⁺.

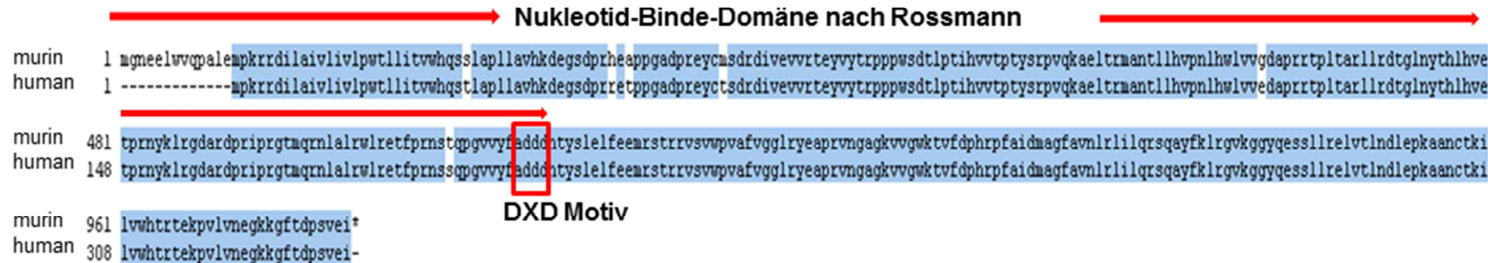


Abbildung 137: Alignment der Aminosäuresequenz der murinen und humanen GlcAT-P

Die murine und humane GlcAT-P (GT Familie 43; <http://www.CAZy.org/fam/acc/GT.html>) weisen eine GT-A Struktur auf, eine Rossmann-ähnliche Struktur bestehend aus 12 β -Faltblättern und 7 α -Helices (Breton *et al.* 2006). Das typische DXD Motiv steht über die Koordination mit divalenten Kationen mit den Phosphatgruppen des Nukleotiddonors in Interaktion.

```

GlcAT-S      70  dvdprrpapqltsrpyfshavcggsrvplrrsspgdaaknesrplqpeprlptiyaitptysrvpqkaeltriantfrqvaqlhwilvedratrselvsflaraglpnthlhvptprykrpwlprateqrnaglawlrqhqhsaqpgvlf
H6catGlcAT-S 113  .....
GlcAT-S      550 faddndtyslelfqemrttrkvsvpglvggrryerplvknkvvgwtgwredrpfaidmagfavlqvilsnpkavfkrrgsqgmgesdfikqittveelepksnctkvilvwhtrtekvnlanepkyhldtvniev*
H6catGlcAT-S 593 .....*
    
```

Abbildung 138: Alignment der Aminosäuresequenz des Wildtyps GlcAT-S und der rekombinanten His₆catGlcAT-S.
 Die Aminosäuresequenzen (ohne Transmembrandomäne) stimmen bis auf eine Abweichung überein. Hier handelt es sich um einen Austausch der Aminosäure Valin gegen Alanin am C-Terminus.

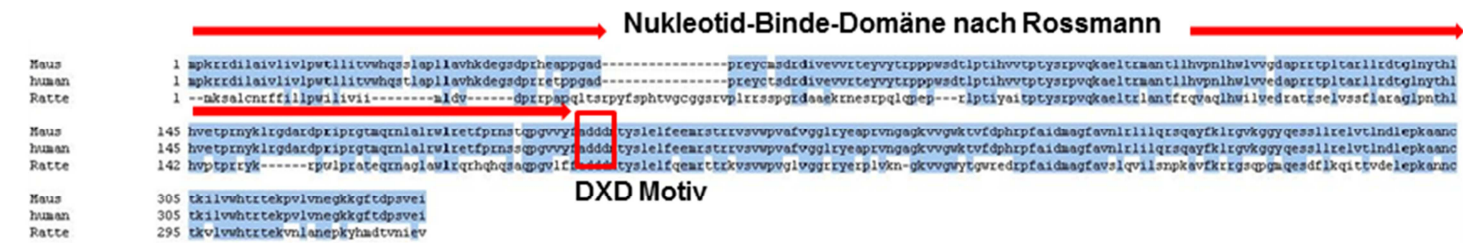


Abbildung 139: Alignment der Aminosäuresequenz der GlcAT-S aus *Mus musculus*, *Homo sapiens* und *Rattus norvegicus*
 Die GlcAT-S aus *Mus musculus*, *Homo sapiens* und *Rattus norvegicus* (GT family 43; [http://www.CAZy.org/fam/acc GT.html](http://www.CAZy.org/fam/acc%20GT.html)) weisen eine GT-A Struktur, eine Rossmann-ähnliche Struktur bestehend aus 12 β -Faltblättern und 7 α -Helices (Breton *et al.* 2006) auf. Das typische DXD Motiv steht über die Koordination mit divalenten Kationen mit den Phosphatgruppen des Nukleotiddonors in Interaktion. GlcAT-S der Ratte zeigt 97%, GlcAT-S des Menschen zeigt 47% Homologie zum murinen Enzym.

```

GlcAT-P      1  mahlhhhhvdddkmlapilavhkdsgsdprheap-----pgad-----preycmsdrdivvrtetyvtrpppsdltptihvvtptysrvpqkaeltraantlihvplnhwlvvedaprrtpitarllrdtqinythlhvvetprnyklrgd
GlcAT-S      1  .....-dw...rp..qltsrpyfs.h.vgcggsrv.lrrsspg..aa.knesrplqf.g.--r....yai.....l...frg.ag...il...rat.se.vssf.ara..pn.....p...r...---
GlcAT-P     145  ardprprgtatqnlalrvtetfprnstgpgvvvfaddndtyslelfqemrttrkvsvpglvggrryerplvknkvvgwtgwredrpfaidmagfavlqvilsnpkavfkrrgsqgmgesdfikqittveelepkaanc
GlcAT-S     143  --x.wl..a.e...ag.a...grhqhg.a...lf.....g...t.e.k.....gl...x...e.l.kn.....y.gwred.....s.gv..snpk.v...r...sqm.m...df.kqat.vee.....s....v.....v
GlcAT-P     305  vlvnegkkgftdpavei
GlcAT-S     300  n.a..p.yhldtvni.v
    
```

Abbildung 140: Alignment der Aminosäuresequenz der His₆catGlcAT-P und His₆catGlcAT-S aus *Mus musculus*
 Die Aminosäuresequenzen von His₆catGlcAT-P und His₆catGlcAT-S zeigen eine Homologie von 52%.

```

futC      1 mafkvvgicgg-ignqmfqya--fakslqk-hsntpvilditsfd-----wdrkm---qlelfpid-----lp---yasakeiaiak-----mq-hl-----pk-lvrda--lkcmg----fdrvs
amuc_0942 1 ----arlfgg-ignqlfqya--flfalsr-qggk-arletssye-----hddkrvc---elhhrvs-----lp---ieggpppwaf--ks-ri-----pa-clrsl--faapk----yphfr
epsH      1 miy--veirgm-ignqlfiya--takkiqk-ltgqkiqintttlnky-----fpnykf---glsefimedpdcfiesykklp---wftneyllpikifkkin-kt-----pk-inki--lsdff--fkafe
eps11     1 ---miyiqgggragnqlfsya--faqrirqygneeicfvlsaiknkaamddcngaywed-----slkyfdvq-----dy-----svsfedniwtk-----eg-nlfqrflryqfwrgrsk-lnnii--fsltgvefskfslll
wbdN      1 mkivviriltgg-ignqlfqya--mgyaek-egncqlkidlrqy-----kky---hlh-ggyr-----ln---nlkikpamltkre--ml-yf-----pn-ilvra--in--r----yprls
wbgN      1 msivvarlagg-ignqmfqyagyaesver--nsslkldlrqykny-----tlhggf---rldklnid-----nt---fvaskk---e---mc-if-----pnfivrai--nkfpk-----lslcs
wblA      1 --mivmkisgg-ignqlfqya--vgraiai-qygvplklvdsay-----knyklhngyrldqfnin-----ad---ianedeifhlkgs--sn-rl-----sr-ilrrlgwlkknt---yyaek
wbgL      1 --msiirlqgg-ignqlfqs--fgyalsk-ingtplyfdishya-----enddhg---gyrlnnlq-----ipeeylqytpkinniyk-----llvrg-----sr-lypdi--flflg----fcnef

                                     HXRRXD Motiv
futC      268 qeiv-fe-----ye---pkllkps-rl--t---yffgyfqpdyfdaisplikqtftlppp--pemknmnkkeeeyqckslilaakns--vfhrrgdy-v-----g---igcql-----g--id-----
amuc_0942 253 eekr-hg-----fd---pglaapp-rrh-t---yfkgyfqtqyflhcreqlcrefrlktptpenar---iledirsc-----cs-is-hirrtdy-l-----s---npyl-----sppple-----
epsH      313 kkg-y-fi-----wr---getkfkf-sl--gnhknyylsgfwseeyfydirdeleait---pinsir-----ecnfellnlrnsesicvshrrgdy-vdnpkis--a---iynvc-----d--in-----
eps11     340 nrsv-fnlisrfglyiithgfs--esikktsfkn--k---fiygsfednrwfsdieskrlref---k---pkynln---ekalqlynellngna--icvslrkwsidv-----h---ddselekreidc--rn-----
wbdN      253 lykrf-----seyfsvknkehs-ks--i---efigfwgmeqyfkryknelrkift---pvnissdvllker-----iqgqns--ia-hirrgdy-isneamnthg---v-csl-----n-----
wbgN      265 krfe-se-----qy---skkings-mkgsv---efigfwgmeqyflehekelrkift---pininldake-----lsdvircrtns--vs-hirrgdy-v-----s---nveal-----k---ihglcter
wblA      280 qrti-yd-----vs---vfmqap-----r---yldgywmeqyfsqiravilqelwpmq--lsin---aqahqikiq---qtha--vs-hvrrgdy-l-----nhpeigv-l-----d--id-----
wbgL      280 hayg-yd-----fe---yiaqkw-ks--k---kyigywqsehfhnkhildkerfi---pkn-----vseqanllaakilesqgs--ls-hirrgdy-iknktatlthg---v-csl-----e-----

futC      547 yqkkaleymakrv-----pnmelfvfcedle-----ft-q-nld--lg---ypfmdmtt--rdkeeeaywdml---lmqscqhglianstyswaaaylienpekiilgpkhwl-fghe--n-----i--l---ck
amuc_0942 511 yylksmaeegrkraagapgeslryfifsdie-----warq-nlr--pa---lphvhvdi--nd-ggtgyfdle---lmrcrhhianstfswaawlnhaekiviapriwf-nree--gdryhtddal--i---pg
epsH      595 yfiesvneikknv-----vkvvicfsddve-----wv-kknik-----fdcet---hyetygmslsekvlmscckhfvlnssfswwtefl-sirggitiapkmwy-aderead-----i---y---tk
eps11     652 yyekainhiintv-----ekpifvfvfsddle-----wa-s-elm-rsiikdrypl--v---ekgdnnvaeklf---lmstckhfiianstfswaaylgefsdkivvsnpiwf-kenk--qfhp---l---i---ld
wbdN      529 yyissvsvykgmv-----anisffvfvfsddiq-----wcke-nar-ei-----fnsddevn--yvegnsqevdmw---lmsaakhhianstfswagwglardannatlapipw--fdkk--e-----l---sgfdpcp
wbgN      535 yyidsirykerf-----nnlvffvfvfsddiewckkykneifs-r-sdd-v-----kfiegmt--qev---dmw---lmsnakyhiianstfswagwglknydigitiaptpw--fere--e-----l---nsfdpcp
wblA      526 yykravdyikeki-----eapvfvfvfsndva-----wc-k-d-----n---fnfdspvfiedtqteid-dlm---lmcqgghniianstfswaawlnsnvdkiviapktum--ae--n-----p--k---gy
wbgL      544 yykalknkirdla-----mirdvfvfsddif-----wcke-nietlls---kkyiniyys--edlsqee--dlw---lmslanhhianstfswagaylgssasqiviypptwyditpk--n-----tyipi---vn

futC      847 e-wvklshfevks--qkyna*
amuc_0942 856 s-wlra*-----
epsH      892 n-wyledkte-ee*-----
eps11     967 d-wklncq*-----
wbdN      841 eswirikk*-----
wbgN      847 ekwvriek*-----
wblA      814 k-wvp-dswrei*-----
wbgL      859 h-minwdkhs--sn*-----

```

Abbildung 141: Alignment der Aminosäuresequenz von Amuc 0942, Eps11, EpsH, WbgN, WbdN, WblA, WbgL und FutC

Das Alignment der Aminosäuresequenz von Amuc 0942, Eps11, EpsH, WbgN, WbdN, WblA, WbgL mit FutC als Referenz zeigt eine 25-29% Homologie zu FutC.

8.4 Elektropherogramme der CE-UV Analyse

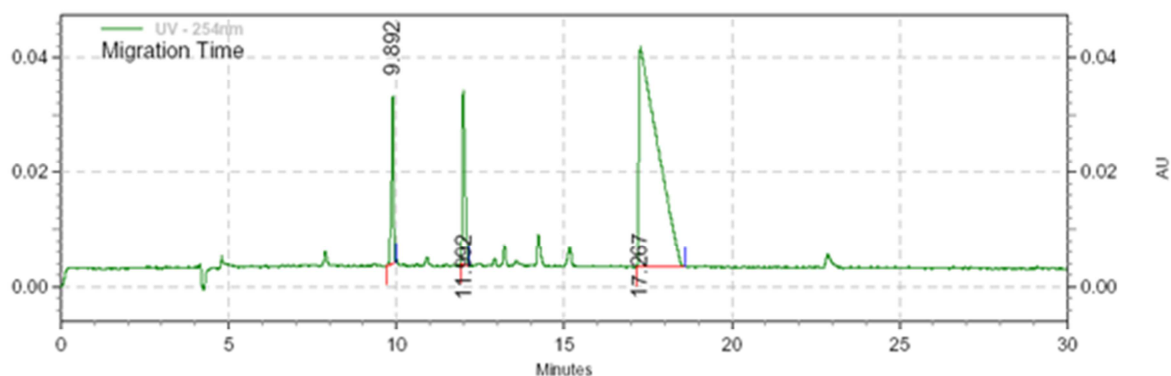


Abbildung 142: CE-UV Analyse der Synthese von UDP-GlcA nach 5 h mit dem UGDH-Modul (Modul C) im semipräparativen Maßstab (10 mL)

Das CE-UV Elektropherogramm zeigt den Umsatz von UDP-Glc (Migrationszeit: 11,9 min) zu UDP-GlcA (Migrationszeit: 17,2 min) und die erfolgreiche Regeneration von NAD^+ (Migrationszeit: 9,8 min).

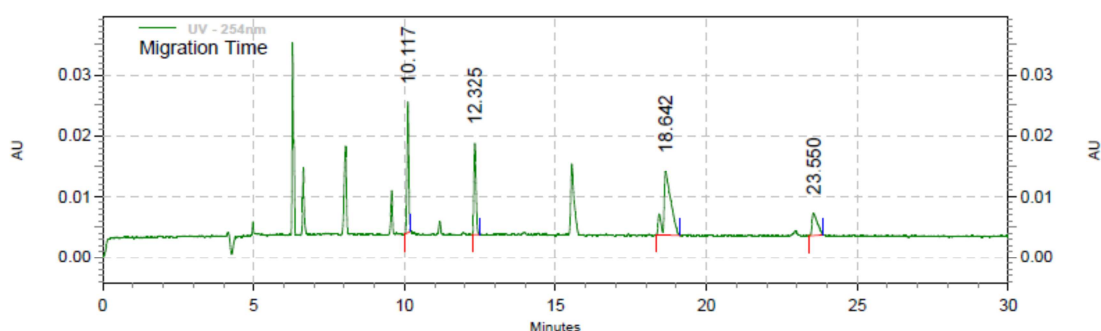


Abbildung 143: CE-UV Analyse der Synthese von UDP-GlcA nach 2 h durch Kopplung des SuSy-Moduls mit dem UGDH-Modul (Modul B + Modul C) im analytischen Maßstab (1 mL)

Das CE-UV Elektropherogramm zeigt den Umsatz von UDP (Migrationszeit: 23,5 min) zu UDP-Glc (Migrationszeit: 12,3 min) und weiterhin zu UDP-GlcA (Migrationszeit: 18,6 min). Die erfolgreiche Regeneration von NAD^+ (Migrationszeit: 10,1 min) ist ebenfalls zu erkennen.

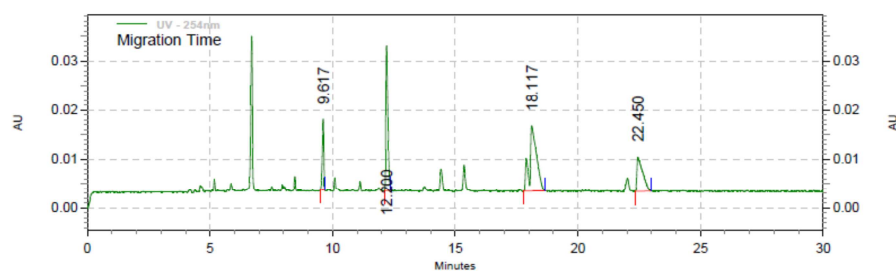


Abbildung 144: CE-UV Analyse der Synthese von UDP-GlcA nach 1 h durch Kopplung des SuSy-Moduls mit dem UGDH-Modul (Modul B + Modul C) im analytischen Maßstab (1 mL)

Das CE-UV Elektropherogramm zeigt den Umsatz von UDP (Migrationszeit: 22,4 min) zu UDP-Glc (Migrationszeit: 12,2 min) und weiterhin zu UDP-GlcA (Migrationszeit: 18,1 min). Die erfolgreiche Regeneration von NAD^+ (Migrationszeit: 9,6 min) ist ebenfalls zu erkennen. Die Identität der Substrate wurde bestätigt mit kommerziell erhältlichem UDP, NAD^+ , UDP-Glc und UDP-GlcA.

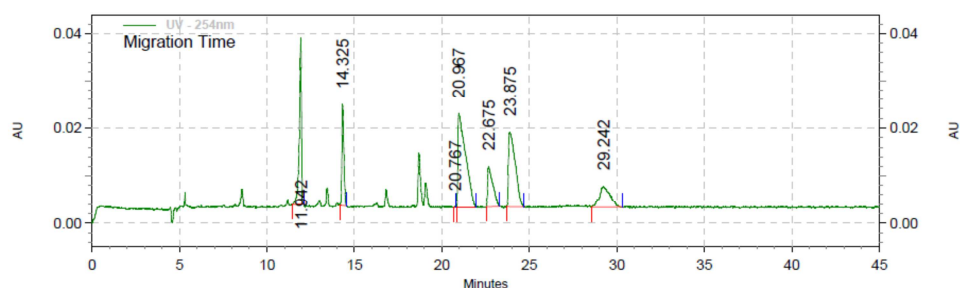


Abbildung 145: CE-UV Analyse der Synthese von UDP-GlcA nach 3 h durch Kopplung des UMPK-Moduls mit dem SuSy- und UGDH-Modul (Modul A + Modul B + Modul C) im analytischen Maßstab (1 mL)

Das CE-UV Elektropherogramm zeigt den Umsatz von UMP (Migrationszeit: 23,8 min) zu UDP (Migrationszeit: 29,2 min) mit 0,5 mM ATP (Migrationszeit: 22,6 min) als Phosphatdonor. Als Zwischenprodukte sind UDP-Glc (Migrationszeit: 14,3 min) und weiterhin das Zielprodukt UDP-GlcA (Migrationszeit: 20,9 min) zu detektieren. Die erfolgreiche Regeneration von NAD^+ (Migrationszeit: 11,9 min) ist ebenfalls zu erkennen.

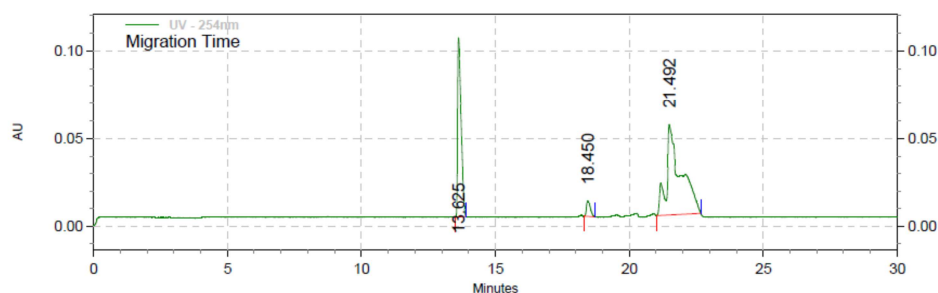


Abbildung 146: CE-UV Analyse der Synthese von GDP-Fuc nach 3 h (Modul A) im semipräparativen Maßstab (10 mL)

Das CE-UV Elektropherogramm zeigt die Synthese von GDP-Fuc (Migrationszeit: 16,65 min) und die Entstehung des Nebenproduktes ADP (Migrationszeit: 21,5 min).

8.5 HPLC Chromatogramme

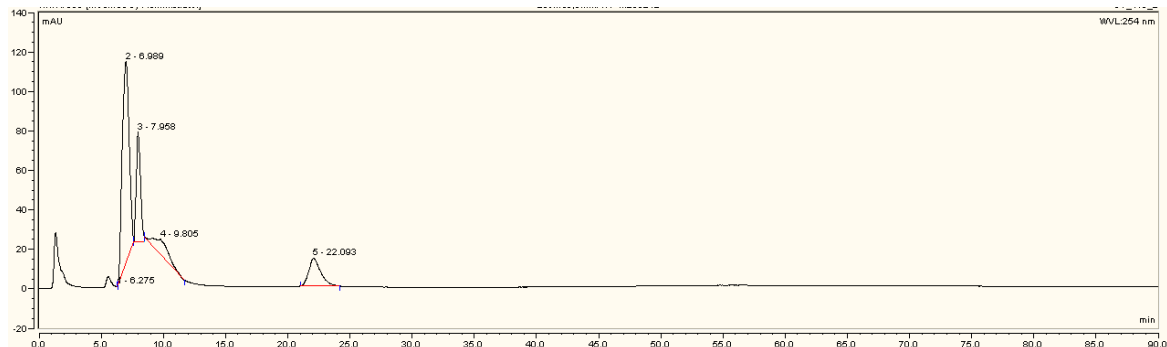


Abbildung 147: HPLC Analyse der Synthese von UDP-GlcA durch Kopplung des UMPK-Moduls mit dem SuSy- und UGDH-Modul (Modul A + Modul B + Modul C) im analytischen Maßstab (1 mL)

Das HPLC Chromatogramm zeigt die Synthese von UDP-GlcA nach 3 h durch Kopplung des UMPK-, SuSy- und UGDH-Moduls (Modul A + Modul B + Modul C) unter Verwendung von 0,5mM ATP als Phosphatdonor. Die Synthese von UDP-GlcA erfolgte in 50 mM Tris-HCl (pH 7,8) mit 0,5 mM NAD^+ , 2 mM UMP, 300 mM Saccharose, 2 U His₆UMPk, 1 U SuSy1 (produziert in *E. coli*), 2 U His₆UGDH und 2,5 U His₆NOX für 7 h bei 30°C. Die Retentionszeit von UDP-GlcA beträgt 22 min.

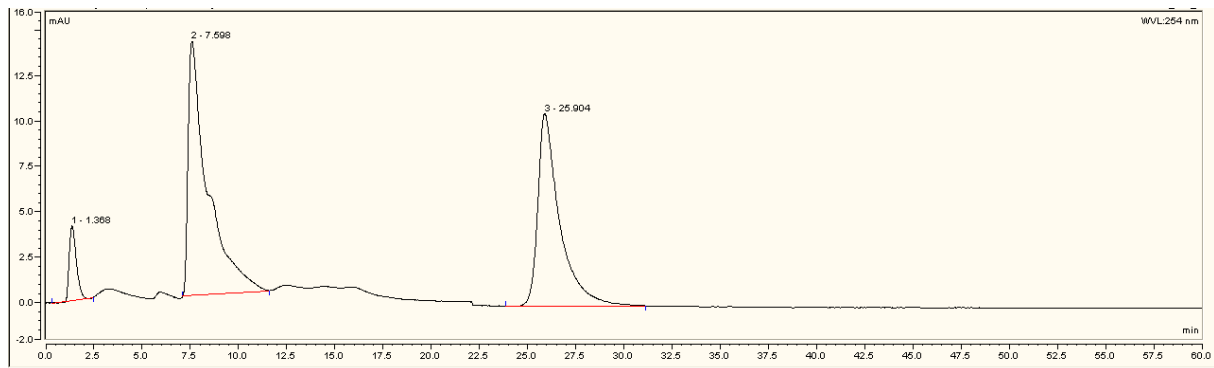


Abbildung 148: HPLC Analyse der Synthese von UDP-GlcA durch Kopplung des SuSy-Moduls mit dem UGDH-Modul (Modul B + Modul C) im analytischen Maßstab (1 mL)

Das HPLC Chromatogramm zeigt die Synthese von UDP-GlcA nach 2 h durch Kopplung des SuSy-Moduls mit dem UGDH-Modul (Modul B + Modul C). Die Retentionszeit von UDP-GlcA beträgt 25,9 min. Die Synthese der UDP-GlcA wurde durchgeführt mit 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 1 mM UDP, 300 mM Saccharose, 0,5 mM NAD^+ , 0,75 U SuSy1 (produziert in *S. cerevisiae*), 1,5 U His₆UGDH und 2 U His₆NOX bei 30°C.

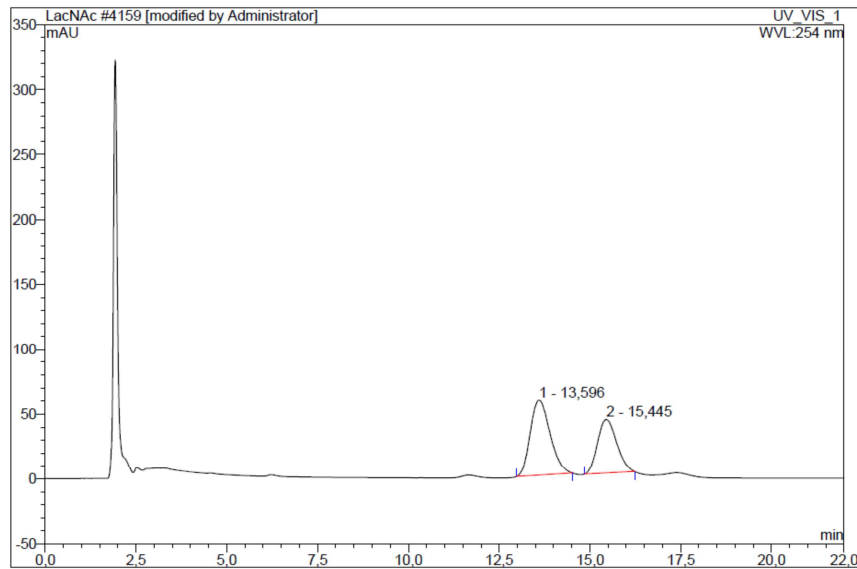


Abbildung 149: HPLC Analyse zur Detektion von GlcA-LacNAc-Linker-*t*-Boc

Das HPLC Chromatogramm zeigt die Synthese von GlcA-LacNAc-Linker-*t*-Boc durch Kopplung von Modul C und Modul D nach 2 h. Die Synthese des hybriden Glukuronids wurde durchgeführt in 50 mM Tris-HCl (pH 7,8) mit 0,5 mM NAD^+ , 5 mM UDP-Glc, 5 mM Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-Linker-*t*-Boc und mit 0,5 U His₆NOX/His₆UGDH/His₆GlcAT-P und 0,5 U His₆NOX/His₆UGDH/His₆GlcAT-P und 2 U alkalische Phosphatase für 24 h bei 30°C. Die Retentionszeit von GlcA(β 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-Linker-*t*-Boc beträgt 13,6 min und von Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-Linker-*t*-Boc 15,4 min.

8.6 Bestimmung der Enzymstabilität

8.6.1 Enzymstabilität der His₆UGDH

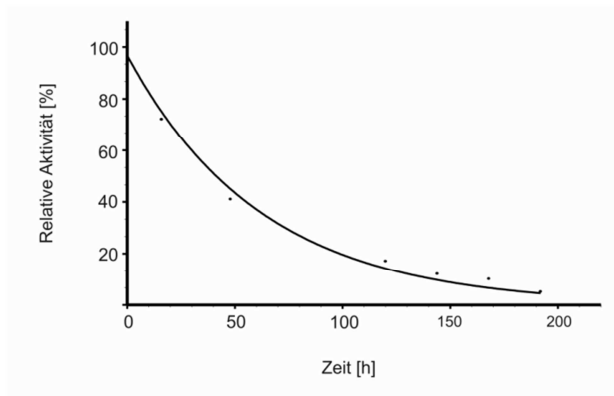


Abbildung 150: Enzymstabilität der His₆UGDH unter Synthesebedingungen bei 30°C

Stabilität der His₆UGDH in 50 mM Tris-HCl (pH 8,7) bei 30°C. Die Bestimmung der Enzymstabilität ergab eine Halbwertszeit von 43,3 h und einen Inaktivierungskoeffizient k von 0,016. 100 % relative Aktivität entsprechen 0,78 U/mg. Die Daten wurden unter Benutzung der Arrhenius Gleichung und der Software Sigma Plot 10.0 (SPSS GmbH Software, Germany) berechnet.

8.6.2 Enzymstabilität der His₆KfiD

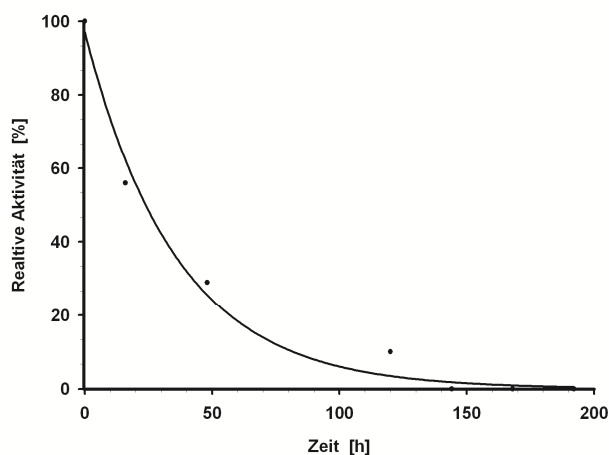


Abbildung 151: Enzymstabilität der His₆KfiD unter Synthesebedingungen bei 30°C

Stabilität der His₆KfiD in 50 mM Tris-HCl (pH 9) bei 30°C. Die Bestimmung der Enzymstabilität ergab eine Halbwertszeit von 24,9 h und einen Inaktivierungskoeffizient k von 0,0278. 100 % relative Aktivität entsprechen 0,48 U/mg. Die Daten wurden unter Benutzung der Arrhenius Gleichung und der Software Sigma Plot 10.0 (SPSS GmbH Software, Germany) berechnet.

8.6.3 Enzymstabilität der His₆GlcAT-P

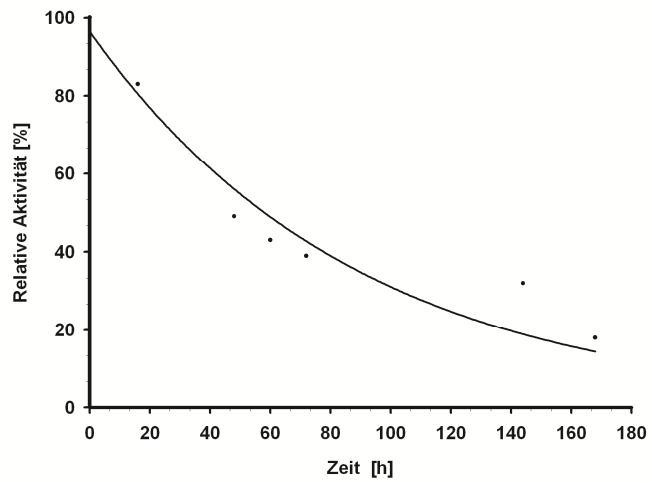


Abbildung 152: Enzymstabilität der His₆GlcAT-P unter Synthesebedingungen bei 30°C

Stabilität von His₆GlcAT-P in 50 mM HEPES-NaOH (pH 6,5) bei 30°C. Die Bestimmung der Enzymstabilität ergab eine Halbwertszeit von 61,3 h und einen Inaktivierungskoeffizient k von 0,011. 100 % relative Aktivität entsprechen 0,37 U/mg. Die Daten wurden unter Benutzung der Arrhenius Gleichung und der Software Sigma Plot 10.0 (SPSS GmbH Software, Germany) berechnet.

8.7 Medien und Puffer

8.7.1 LB Medium und LB Agar

Substanz	Konzentration
Trypton	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	5 g/L
für LB Agar	1,5% (W/V)

8.7.2 TE-Puffer

Substanz	Konzentration
Tris-HCl, pH 7,6	10 mM
EDTA	0,1 mM

8.7.3 SD-Agar

Substanz	Konzentration
SD	0,67%
Glukose	2%
Ura drop out	0,77 g/L
Agar	1,5% (W/V)

8.7.4 TAE-Puffer

Substanz	Konzentration
Tris	0,4 M
Acetat	0,01 M
NaOH	0,01 M

8.7.5 TB Medium

Substanz	Konzentration
Wasser	900 mL
Trypton	12 g/L
Hefeextrakt	24 g/L
Glycerin	4 mL
K-Phosphatpuffer	100 mL (23,1 g/L KH_2PO_4 ; 125,4 g/L K_2HPO_4)

8.7.6 HEPES-NaOH Puffer für Anionenaustauschchromatografie

8.7.6.1 Äquilibrierungspuffer

Substanz	Konzentration
HEPES-NaOH, pH 8,0	50 mM

8.7.6.2 Waschpuffer

Substanz	Konzentration
HEPES-NaOH	50 mM
KCl	0,1 M
Puffer auf pH 8,0 einstellen	

8.7.6.3 Elutionspuffer

Substanz	Konzentration
HEPES-NaOH	50 mM
KCl	0,4 M
Puffer auf pH 8,0 einstellen	

8.7.7 10x SDS-Laufpuffer

Substanz	Konzentration
Tris	250 mM
Glycin	1,29 M
SDS	1%

8.7.8 Coomassie-Färbelösung

Substanz	Konzentration
Coomassie Blue R-250	0,1% (W/V)
Ethanol	40% (V/V)
Konz. Essigsäure	10% (V/V)

8.7.9 Coomassie-Entfärbelösung

Substanz	Konzentration
Ethanol	40% (V/V)
Konz. Essigsäure	10% (V/V)

8.7.10 TBS-Puffer

Substanz	Konzentration
Tris/HCl	10 mM
NaCl	150 mM
Puffer auf pH 7,2 einstellen	

8.7.11 TBS-Tween

Substanz	Konzentration
Tris/HCl	10 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,1% (V/V)
Puffer auf pH 7,2 einstellen	

8.7.12 TBS-Blocking-Puffer

Substanz	Konzentration
Tris-HCl	10 mM
NaCl	150 mM
BSA	3% (W/V)
Puffer auf pH 7,2 einstellen	

8.7.13 Antikörperlösung für Western Blotting

Substanz	Konzentration
Anti-His ₆ -Antikörperkonjugat	40 µL
Blocking-Puffer	6,6 mL
TBS	13,4 mL

8.7.14 DAB-Lösung für Western Blotting

Substanz	Konzentration
10x DAB	2 mL
Peroxid-Puffer	18 mL

8.7.15 Transfer-Puffer

Substanz	Konzentration
10x SDS-Laufpuffer	100 mL
100% Methanol	100 mL
H ₂ O	800 mL

8.7.16 Boratpuffer

Substanz	Konzentration
Na-Tetraborat	50 mM
Borsäure	64 mM
Puffer auf pH 9,0 einstellen	

8.8 Geräte

ÄktaPrime	Äkta™prime PrimeView™ Software	GE Healthcare, Freiburg
Autoklav	Zentracert 5169 Steuerung SPS 2003 mit APC 620	F. u. M. Lautenschläger GmbH und Co KG, Köln
Blotapparatur	Xcell II™ Blot Modul, Version G	Invitrogen, Paisley, UK
Geldokumentationssystem	VersaDoc 4000 MP oder GelDoc XR Software QuantitiyOne	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Gelkammer vertikal	Xcell SureLock™ Mini-Cell, Version G	Invitrogen, Paisley, UK
Gelkammer horizontal	SubCell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
HPLC	Probengeber ASI-100 Detektor 160S Pumpe P680 Chromeleon Software (Client Version 4.10 Build 2.80)	Dionex GmbH, Idstein
HPLC	Probengeber ASI-100 Pumpe P580 Chromeleon Software Detektor 160S	Dionex GmbH, Idstein
HPLC	Probengeber 3900 Smartline Pump 1000	GynkoteK GmbH, Germering
HPLC-Säulen	Multokrom 100-5 C18 (250x4 mm)	CS Chromatographie Langerwehe, Deutschland
	Eurospher 100-10 C18 (250x20 mm)	Knauer, Berlin
	Hypersil APS2-3µ Säule (100x3 mm)	ThermoQuest (Biberach, Deutschland)
	Multospher APS-HP-5 µ 250x3 mm Säule	CS Chromatografie, Langerwehe, Deutschland
	LiChrospher 100 RP 18-5µ Säule (250x4 mm)	Merck, Darmstadt, Deutschland
HPAEC-PAD	HPAEC-PAD-Anlage,	eine CarboPac™ PA1

	Dionex (Sunnyvale, CA, USA; Software: Chromeleon™ Version 6.40	Dionex, Sunnyvale, CA, USA
Inkubator	Multitron®	Infors, Bottmingen
Kapillarelektrophorese	P/ACE MDQ Glycoprotein System 32 Karat Software Version 5.0	Beckman Coulter, Krefeld
Mikrotiterplatten für Photometer	Rotilabo F-Profil	Roth, Karlsruhe
Massenspektrometer	MSQ Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PCR-Cycler	Mastercycler gradient	Eppendorf
pH-Meter	pH-Meter CG842	Schott, Mainz
Photometer	SPECTRAmax Plus SOFTmax Pro Software	Molecular Devices, Ismaning
Pumpe	Peristaltik-Pumpe P1	GE Healthcare, Freiburg
Rotationsverdampfer	Heidolph VV1	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Säulen für Festphasenextraktion	C18 Sep-Pak®-Säulen	Waters GmbH, Eschborn
Labor-Schwingmühle	Labor-Schwingmühle Retsch	Haan, Deutschland
Sterilbank	Hera Safe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tischautoklav	Systec 2540EL	Tuttnauer GmbH, Breda, Niederlande
Heizblock	Thermo Heizblock HLC HBT 130	JUMO eco TROM Fulda, Deutschland
Ultraschallaufschluss	Sonopuls	Bandelin, Berlin
Vakuumzentrifuge	Concentrator Plus	Eppendorf
VivaSpin-Konzentratoren	VivaSpin 20 und 500	VivaScience, Hannover
Wippschüttler	Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Zentrifuge	Rotina 35R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge	Rotanta 460R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge	Sorvall Evolution RC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

8.9 Chemikalien

Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ammoniumperoxidsulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Anti-His ₆ -Peroxidase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
AMP, ADP, ATP	Sigma Aldrich, Taufkirchen,
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G-250	Roth, Karlsruhe
Diaminobenzidin-Substrat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dithiothreitol	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethylendinitroltetraessigsäure	Roth, Karlsruhe
Dinatriumsalz	
GelRed	Biotium, Hayward, USA
GlcNAc-linker- <i>t</i> Boc	zur Verfügung gestellt vom Institut für Mikrobiologie, Akademie der Wissenschaften, Prag, Tschechische Republik
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
GMP, GDP, GTP	Sigma Aldrich, Taufkirchen
GDP-Fuc	Jennewein Biotechnologie, Rheinbreitbach
H ₂ O ₂	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	MP Biomediacals, LLC, Solon/Ohio
HEPES	Roth, Karlsruhe
Imidazol	Roth, Karlsruhe
IPTG	Roth, Karlsruhe
K ₂ HPO ₄	Roth, Karlsruhe
KH ₂ PO ₄	Roth, Karlsruhe

KOD-Polymerase-Kit	Merck, Darmstadt
LacNAc (Typ 1 und Typ 2)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Laktat-Dehydrogenase	Roche, Mannheim
LDS Probenpuffer	Invitrogen™, Paisley, UK
Lyticase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MES	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
MnCl ₂	Roth, Karlsruhe
Na ₂ B ₄ O ₇	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Na ₂ CO ₃	Merck, Darmstadt
NaCl	Roth, Karlsruhe
NAD ⁺ , NADH	Roth, Karlsruhe
Ni ²⁺ -NTA-Material	Qiagen, Hilden
PEP	Biomol, Hamburg
Plasmidpräparationskit	Peqlab, Erlangen
prestained protein ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
PVDF-Membran	Bio-Rad, München
Pyruvatkinase (1U/μl)	Roche, Mannheim
Raffinose	Fluka, Steinheim
Restriktionsenzyme	Fermentas, St. Leon-Roth
Rinderserumalbumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypton	Roth, Karlsruhe
Tween® 20	AppliChem, Darmstadt
UMP, UDP, UTP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
UDP-Gal	Fluka, Steinheim
UDP-Glc	Fluka, Steinheim
UDP-GlcNAc	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
UDP-GlcA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ura-Drop-out	Clontech, St.Germain-en-Laye, Frankreich