

Reaktionstechnische Untersuchungen zur
enzymatischen *de novo* Synthese von
GDP- β -L-Fucose und der *in situ*
Fucosylierung von Oligosacchariden

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Christoph Hoh

aus

Bergisch-Gladbach

Bonn, November 2004

Angefertigt mit Genehmigung
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. C. Wandrey
2. Referent: Prof. Dr. H. Wamhoff

Tag der Promotion: 12. Juli 2005

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2005

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Technische Chemie und Biotechnologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. C. Wandrey angefertigt. Die praktischen Arbeiten wurden am Institut für Biotechnologie 2 der Forschungszentrum Jülich GmbH in der Zeit von Januar 2000 bis September 2002 durchgeführt. Die schriftliche Niederlegung der Dissertation wurde im September 2004 fertiggestellt.

Mein ganz besonderer Dank gilt:

zu allererst meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Christian Wandrey für die interessante Themenstellung, seine unermüdliche Bereitschaft zu fruchtbaren und offenen Diskussionen, seine Kritik - positiv wie negativ - in verschiedenen Seminaren und Gesprächen und für sein Vertrauen und seine Hilfestellungen

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Heinrich Wamhoff, Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn, für die freundliche Übernahme des Korreferates

Herrn Prof. Dr. Lothar Elling, Lehrstuhl für Biotechnologie und Helmholtz Institut für Biomedizinische Technik der RWTH Aachen, für den wissenschaftlichen Einstieg in das Promotionsthema, das stetige Interesse an meiner Arbeit, viele Diskussionen und Anregungen sowie die schnelle Bereitschaft zur Durchsicht der Dissertationsschrift

Herrn Prof. Dr. Andreas Liese, Institut für Biotechnologie der Technischen Universität Hamburg-Harburg, für die freundliche Betreuung, stete Diskussionsbereitschaft, das Interesse an den Möglichkeiten in der "Zuckerwelt" sowie die schnelle Durchsicht der Dissertationsschrift

Frau Prof. Dr. Vasic-Racki, Fakultät für Chemische Verfahrenstechnik der Universität Zagreb, für Ihre große Hilfe bei den kinetischen Berechnungen und Modellerierungen, ihre unermüdliche Bereitschaft zu wissenschaftlichen Diskussionen sowie die kritische Durchsicht des "Kinetik-Kapitels"

Herrn Prof. Dr. Michael Müller, Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie der Universität Freiburg, für das stete Interesse am Fortgang dieser Arbeit

Herrn Dr. Stefan Weidner für die erfolgreiche Zusammenarbeit und den gemeinsamen Willen, die Enzyme in die Hand zu bekommen

Herrn Dr. Satoshi Koizumi, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., für seine großzügige Einladung nach Japan, seine dort allgegenwärtige Unterstützung und die gewährenden Einblicke in die japanische Wissenschaft, Lebensart und Gesellschaft

Den übrigen Mitarbeitern der Firma Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd, denen ich ebenso eine wunderschöne und unvergessene Zeit in Japan verdanke: Herrn Dr. Tetsuo Endo, Herrn Dr. Sadao Teshiba, Herrn Yasuyuki Ono, Frau Mari Ishikawa, Herrn Nozomu Kamada, Herrn Takehide Kimura, Frau Natsumi Kudo, Herrn Keisuke Shiba und Yumino-san

Frau Lilia Härter, Frau Ursula Mackfeld, Frau Doris Hahn und Frau Heike Offermann für die tatkräftige Unterstützung bei den praktischen Arbeiten und das regelmäßige Nachfragen zum Stand der Dinge

der "Zuckergruppe" des Instituts für Enzymtechnologie der Universität Düsseldorf für hilfe-

che Diskussionen und das Überlassen diverser Geräte

Frau Dipl.-Chem. Andrea Rentmeister für ihre hervorragende Arbeit als Diplomandin und das sehr angenehme und erfolgreiche *team working*

Herrn Prof. Dr. Andreas Kirschning und Herrn Dr. Gerald Dräger, Institut für Organische Chemie der Universität Hannover, für die erfolgreiche Kooperation bei der Nucleotidzucker-Analytik

Herrn Dr. Arne Buchholz, Herrn Dr. Marco Oldiges, Herrn Dr. Ralph Brückner und Frau Christina Mack für ihre Hilfe bei LC/MS-Messungen

meinen Bürokollegen Herrn Dr. Lasse Greiner, Herrn David Kihumbu und Herrn Dr. Stephan Laue für eine gute Zeit in Raum 124

den übrigen Mitgliedern der Enzymgruppe für die gute Zeit und Arbeitsatmosphäre

Frau Marianne Hess für unzählige Hilfestellungen und die immer sichere Einschätzung der Stimmung in einem bestimmten Büro im IBT

Herrn Dr. Murillo Villela de Oliveira Filho für das gemeinsame Hausen in Zimmern diverser Jülicher Wohnungen und das hilfreiche und ehrliche Diskutieren und Nachdenken

Frau Dr. Evelyn Wolfram und Herrn David Kihumbu, die zwei Mit-Doktoranden Unterkunft gewährten

Herrn Dr. Gregor Dudziak für viele gute und wichtige Meinungen und Ratschläge

der Fahrgemeinschaft Bonn-Jülich - Herr Dr. Daniel Drocher, Herr Dr. Pascal Dünkermann, Herr Dr. Murillo Villela de Oliveira Filho und Herr Dr. Thomas Stillger - für Diskussionsthemen, die niemals in die Außenwelt dringen werden

allen übrigen Mitarbeitern des IBT ebenso wie den Werkstätten für die freundliche Arbeitsatmosphäre und Hilfestellungen

dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) für die großzügige, finanzielle Unterstützung während des Japan-Aufenthaltes

meinem Bruder Daniel, der immer an einen erfolgreichen Abschluss der Arbeit geglaubt hat sowie für seine Zeit, die er in die sehr sorgfältige Durchsicht der Dissertationsschrift gesteckt hat und ihr damit ein sprachliches Niveau gab

allen, die daran geglaubt haben, dass diese Arbeit fertiggestellt wird

und, nicht zuletzt, Martha.

Meiner Mutter

&

Meinem Vater gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	IX
Symbole und Abkürzungen	XI
1 Einleitung	1
1.1 Stellung und Vielfalt der Kohlenhydrate in der Natur	2
1.2 Oligosaccharide in Erkennungsprozessen	4
1.3 Die Bedeutung fucosylierter Strukturen	6
1.3.1 Das AB0 Blutgruppensystem	7
1.3.2 <i>Helicobacter pylori</i> und Lewis-Strukturen	8
1.3.3 Modifizierte Fucosylierung und Krankheiten	9
1.3.4 Humanmilch-Oligosaccharide	11
1.4 Enzymatischer Zugang zu fucosylierten Oligosacchariden	13
1.4.1 Die Bedeutung der Nucleotidzucker: der <i>Leloir pathway</i>	13
1.4.2 GDP- β -L-Fucose: der Donor	14
1.4.3 Fucosyltransferasen: die Katalysatoren	19
2 Motivation und Zielsetzung	21
2.1 Bioreaktionstechnik der GDP-Fuc-Synthese	21
2.2 Fucosylierung durch <i>in situ</i> Generierung von GDP-Fuc	22
3 Analytische Methoden	25
3.1 Das Reaktionssystem aus analytischer Sicht	25
3.2 Genetische Algorithmen zur Methodenentwicklung	28
3.2.1 Die Kapillarelektrophorese (CE)	28
3.2.2 Anwendung des genetischen Algorithmus	29
3.2.3 Ergebnisse der Optimierung	34
3.2.4 Einsatz von Ionenpaar-Reagenzien	38
3.3 Einsatz der HPLC	40
3.3.1 Analytik der Nucleotidzucker	40
3.3.2 Analytik von Oligosacchariden	41
3.4 Zusammenfassung	41
4 Bereitstellung der Enzyme GMD und GFS und einer α1,2-Fucosyltransferase	43
4.1 Gewinnung der GDP- α -D-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD)	43
4.1.1 Fermentation von <i>E. coli</i> BL21(DE3) pET17b/gmd	44
4.1.2 Partielle Aufreinigung der GMD	44

4.2	Gewinnung der GDP- β -L-Fucose-Synthetase (GFS)	48
4.2.1	Fermentation von <i>E. coli</i> BL21(DE3) pET16b/wcaG	49
4.2.2	Partielle Aufreinigung der GFS	50
4.3	Gewinnung der α 1,2-Fucosyltransferase (α 1,2FucT)	52
4.3.1	Fermentation von <i>E. coli</i> DH5 α pHPFT80	53
4.3.2	Partielle Aufreinigung der α 1,2FucT	54
4.4	Zusammenfassung	56
5	Kinetische Untersuchungen der enzymatischen GDP-Fuc-Synthese	57
5.1	Kinetische Modelle enzymatischer Reaktionen	58
5.2	Die GMD-Reaktion	60
5.2.1	Kinetische Untersuchungen zur GMD	62
5.2.1.1	Einfluss von Temperatur und pH-Wert	62
5.2.1.2	Einfluss der Nicotinamidcofaktoren NADP und NADPH	65
5.2.1.3	Einfluss von Substrat- und Produktkonzentration	79
5.2.1.4	Einfluss von GDP-Fuc	80
5.2.2	Kinetisches Modell der Cofaktor-abhängigen GMD-Aktivierung	81
5.3	Die GFS-Reaktion	95
5.3.1	Bereitstellung von GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose (GKDM)	97
5.3.2	Kinetische Untersuchungen zur GFS	101
5.3.2.1	Einfluss von Temperatur und pH-Wert	102
5.3.2.2	Einfluss von Substrat- und Produktkonzentration	103
5.3.2.3	Verifizierung des Modells - <i>batch</i> -Versuche	106
5.3.3	Integrierte Cofaktorregenerierung	107
5.4	Zusammenfassung	109
6	Syntheseverfahren zur Gewinnung von GDP-Fuc	111
6.1	Stabilitätsmessungen	111
6.1.1	Enzymstabilitäten	111
6.1.2	Substrat- und Produktstabilitäten	114
6.2	Konsequenzen aus der Enzymkinetik	115
6.3	Anforderungen an Synthese- und Reaktorkonzepte	116
6.4	Diskontinuierliche Synthese von GDP-Fuc	118
6.5	Kontinuierliche Synthese von GDP-Fuc	120
6.6	Produktisolierung	129
6.7	Zusammenfassung	133
7	Synthese fucosylierter Oligosaccharide durch <i>in situ</i> Generierung von GDP-Fuc	135
7.1	Substratspezifität der α 1,2FucT aus <i>H. pylori</i>	136
7.2	Kopplung von GDP-Fuc-Synthese und Fucosyltransfer im Satzreaktor	139
7.3	Zusammenfassung	142
8	Diskussion und Ausblick	145
8.1	Entwicklung analytischer Methoden	145
8.1.1	CE-Methodenentwicklung mit genetischen Algorithmen	145
8.1.2	GMD Aktivitätsassay	145
8.2	Enzymgewinnung	146

8.2.1	Fermentation der rekombinaten <i>E. coli</i> -Stämme	146
8.2.2	Enzymaufreinigung	147
8.3	Enzymkinetik	149
8.3.1	Kinetik der GDP- α -D-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD)	149
8.3.2	NMR-Untersuchungen zum GMD-Reaktionsmechanismus	151
8.3.3	Kinetik der GDP- β -L-Fucose-Synthetase (GFS)	154
8.4	Syntheseverfahren zur Gewinnung von GDP-Fuc	157
8.4.1	Evaluierung der Verfahren	157
8.4.2	Die NADPH-verbrauchende GMD-Nebenreaktion	159
8.4.3	Optimierungspotentiale	161
8.5	Enzymatische Synthese fucosylierter Oligosaccharide	166
9	Zusammenfassung	169
10	Material und Methoden	171
10.1	Analytik	171
10.1.1	Kapillarelektrophorese (CE)	171
10.1.2	HPLC-Systeme	173
10.1.3	Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS)	177
10.1.4	NMR-Spektroskopie	178
10.2	Bereitstellung der Enzyme	178
10.2.1	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	178
10.2.2	Fermentation rekombinanter <i>Escherichia coli</i> -Stämme	178
10.2.3	Zellernte und Zellaufschluss	179
10.2.4	Chromatographische Aufreinigung und Ultrafiltration (UF)	179
10.2.5	Protein-Analytik	183
10.3	Enzymatische Assays	183
10.3.1	GMD-Assay	183
10.3.2	GFS-Assay	184
10.3.3	FucT-Assay	184
10.4	Synthesevorschriften	185
10.4.1	Produktion von GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose	185
10.4.2	Produktion von GDP- β -L-Fucose	185
10.5	Massenspektrometrische Daten	186
10.5.1	GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose	186
10.6	NMR-spektroskopische Daten	187
10.6.1	GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose	187
10.6.2	GDP- β -L-Fucose	190
10.7	Verwendete Enzyme, Chemikalien und Geräte	192
10.8	SCIENTIST Software	192
	Literaturverzeichnis	195

Abbildungsverzeichnis

1.1	Zuckerfabrikation aus Runkelrüben durch Franz Carl Achard	1
1.2	Glycostrukturen: Lipopolysaccharid (LPS) und <i>colanic acid</i>	3
1.3	Kohlenhydrat-vermittelte Erkennungsvorgänge	5
1.4	Strukturformeln von L-Fucose	6
1.5	Struktur und Biosynthese der Blutgruppenantigene A, B und H	7
1.6	<i>H. pylori</i> assoziierte Lewis Strukturen	9
1.7	Struktur des Sialyl Lewis X (sLe ^X) Tetrasaccharids	10
1.8	<i>Leloir pathway</i>	14
1.9	Biosynthese von GDP- β -L-Fucose	15
1.10	Chemische Synthese von GDP- β -L-Fucose	17
1.11	GDP-Fuc-Verfahren von <i>Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd</i>	18
1.12	Strukturen von Fucosyltransferasen (FucTs)	20
2.1	Schritte zur Prozessentwicklung der enzymatischen GDP-Fuc-Synthese	22
2.2	Konzept der "Eintopf-Synthese" fucosylierter Oligosaccharide.	23
3.1	Das Reaktionssystem aus analytischer Sicht	26
3.2	<i>Alkali</i> -Methode	27
3.3	<i>Tritium</i> -Methode	28
3.4	Schematischer Aufbau einer CE-Apparatur.	29
3.5	CE-Methodenentwicklung durch Anwendung des genetischen Algorithmus.	33
3.6	Die Entwicklung der Trenngüte <i>total fitness</i>	35
3.7	Die Entwicklung der besten Individuen (1)	36
3.8	CE-Methode zur Bestimmung der GMD-Aktivität	37
3.9	GMD-Assay	38
3.10	Die Entwicklung der besten Individuen (2)	40
3.11	HPLC-Methode der Ionenpaarchromatographie.	41
4.1	Adsorptionsverhalten der GMD an Q-Sepharose FF	45
4.2	Aufreinigung der GMD an Q-Sepharose FF	46
4.3	SDS-PAGE-Analyse der GMD	46
4.4	Wiederherstellung der GMD-Aktivität	48
4.5	Fermentationsverlauf von <i>E. coli</i> BL21(DE3) pET16b/wcaG	50
4.6	SDS-PAGE-Analyse der GFS	51
4.7	Expressionskontrolle der FucT-rek. <i>E. coli</i> -Zellen.	54
5.1	Bausteine der Prozessentwicklung	57
5.2	Reaktionsmechanismus der GMD	60
5.3	Cofaktor- und Substratspezifität der GMD	61

5.4	Mg ²⁺ -Abhängigkeit der GMD	62
5.5	GMD: Einfluss der Temperatur	63
5.6	GMD: Einfluss des pH-Wertes	64
5.7	Aktivitätssteigerung der GMD durch Erhöhung der NADP-Konzentration	65
5.8	GMD: Variation der Assay-Bedingungen	67
5.9	Aktivitätssteigerung der GMD durch NADPH	68
5.10	GMD-Reaktion mit NADPH	69
5.11	NADPH-oxidierende Nebenaktivität der GMD-Enzympräparation	70
5.12	NADPH-Oxidation während der GMD-Reaktion	71
5.13	Umsatzverläufe in Abhängigkeit der Enzymkonzentration	72
5.14	GMD: NADP-Kinetik	74
5.15	GMD: NADPH-Kinetik	74
5.16	GMD: Verhältnis der Cofaktoren	75
5.17	Prinzip des <i>repetitive batch</i> -Verfahrens	77
5.18	GMD: <i>repetitive batch</i> bei konstanter NADP-Konzentration	77
5.19	GMD: <i>repetitive batch</i> bei veränderter NADP-Konzentration	78
5.20	GMD: GDP-Man-Kinetik	79
5.21	GMD: Produktinhibierung durch GKDM	80
5.22	GMD: <i>feedback</i> -Inhibierung durch GDP-Fuc	81
5.23	Simulation - Einfluss von NADP und $A_{max,NADP}$	86
5.24	Simulation - Einfluss von NADPH und $A_{max,NADP}$	87
5.25	Simulation - NADPH als Cofaktor	87
5.26	Simulation der GMD-Reaktion - <i>batch</i> -Synthese	89
5.27	GKDM-Synthese (<i>batch</i>): Parameteranpassung	90
5.28	GKDM-Synthese (<i>batch</i>): Zeitlicher Verlauf der kinetischen Größen	91
5.29	Parameteranpassung GKDM-Synthese - Einfluss von NADP	92
5.30	Kinetik der Enzymaktivierung - Einfluss von NADP	93
5.31	Parameteranpassung GKDM-Synthese - Einfluss von NADPH	94
5.32	Teilschritte der GFS-Reaktion	95
5.33	Mg ²⁺ -Abhängigkeit der GFS	96
5.34	Zerfall von GKDM bei Aufreinigung nach Standardprotokoll	98
5.35	Methode zur Gewinnung von GKDM	99
5.36	Stabilität von GKDM bei -20°C	99
5.37	Keto-Form und Ketohydrat von GKDM	100
5.38	GFS: Einfluss der Temperatur	102
5.39	GFS: Einfluss des pH-Werts	103
5.40	Produktinhibierungen der GFS	104
5.41	GFS: Verifizierung des kinetischen Modells - <i>batch</i> -Synthesen	106
5.42	GFS-Reaktion mit integrierter Cofaktorregenerierung	107
5.43	GDP-Fuc-Synthese mit integrierter Cofaktorregenerierung	108
6.1	GMD-Stabilitäten	112
6.2	GFS-Aktivierung und Enzymstabilität	113
6.3	Zerfall von GKDM	114
6.4	Zusammenfassung der Kinetik	115
6.5	Eintopf-Synthese von GDP-Fuc	116
6.6	<i>feedback</i> -Inhibierung der GMD - Experiment und <i>batch</i> -Anpassung	117

6.7	Diskontinuierliche Synthese von GDP-Fuc	118
6.8	Schema der 2-stufigen EMR-Kaskade	120
6.9	Foto der 2-stufigen EMR-Kaskade	121
6.10	Erste kontinuierliche Synthese von GDP-Fuc: Umsatz	122
6.11	Erste kontinuierliche Synthese von GDP-Fuc: Konzentrationen	123
6.12	Reaktionsschema zur Nebenreaktion der GMD	125
6.13	Zweite kontinuierliche Synthese von GDP-Fuc: Umsätze und Konzentrationen	126
6.14	EMR-Kaskade: Vermeidung der Nebenreaktion	127
6.15	EMR-Kaskade: Desaktivierung der FDH	128
6.16	Elutionsdiagramme GDP-Fuc (Dowex 1x2)	130
6.17	Nanofiltration von GDP-Fuc	132
7.1	Die FucT-Reaktion	135
7.2	Kopplung von GDP-Fuc-Synthese und Fucosyltransfer	136
7.3	Enzymatische Synthesewege von $Lewis^Y$	137
7.4	Eintopfsynthese von $Lewis^Y$ -Lactose mit der $\alpha 1,2$ -FucT	139
7.5	Eintopfsynthese von $Lewis^Y$ -Lactose mit $\alpha 1,2$ -FucT rek. Zellen	140
7.6	Eintopfsynthese von LNFP I mit der $\alpha 1,2$ -FucT	141
7.7	Gekoppeltes System in Abwesenheit des Akzeptors	142
8.1	Strategie zur Feinreinigung der GMD	148
8.2	GMD-Reaktion in H_2O bzw. D_2O	152
8.3	NMR-Signale für H-5" und H-6" von GKDM	153
8.4	NMR-Signale für H-6" der deuterierten Produkte	153
8.5	Bildung von GDP-X im <i>batch</i>	160
8.6	Reaktionsprodukte der 4-Reduktion von GDP-X	161
8.7	Simulation der NADPH-Konzentration im EMR-Auslauf (GMD)	162
8.8	NADPH-(Re)generierung für die GFS-Reaktion	163
8.9	Konzentrationsprofile von CSTR und <i>plug flow</i> Reaktor	164
8.10	Simulation GFS-Reaktion: Umsatz in verschiedenen Reaktortypen	165
8.11	GMD <i>feedback</i> -Inhibierung - Einfluss von Glycerin	166
10.1	CE-Kalibriergerade für GDP-Man	172
10.2	Chromatogramm der präparativen HPLC	175
10.3	HPLC-Chromatogramm zur Quantifizierung fucosylierter Oligosaccharide	176
10.4	ESI-MS-Spektrum der GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose	186
10.5	1H -NMR-Spektrum der GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose	187
10.6	HSQC-NMR-Spektrum der GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose	188
10.7	HMBC-NMR-Spektrum der GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose	189
10.8	1H -NMR-Spektrum der GDP- β -L-Fucose	191

Tabellenverzeichnis

1.1	Kohlenhydrat-vermittelte Erkennungsvorgänge	6
1.2	Oligosaccharide der Humanmilch	12
3.1	Parameter und ihre Variationsbreiten (1)	32
3.2	Entwicklung eines GMD-Assays	37
3.3	Parameter und ihre Variationsbreiten (2)	39
4.1	Aufreinigungstabelle der GMD	47
4.2	Aufreinigungsprobleme bei der GFS	52
4.3	Aufreinigungstabelle der FucT	55
5.1	Einfluss von NADP und NADPH auf GMD-Aktivität	71
5.2	Kinetische Parameter der GMD	82
5.3	Kinetische Parameter der GFS	105
6.1	Desaktivierung der GMD	113
6.2	Diskontinuierliche Synthese von GDP-Fuc	119
6.3	Bilanzierung von Synthese und Aufreinigung	133
7.1	Substratspezifität der α 1,2-FucT aus <i>H. pylori</i>	138
8.1	Kennzahlen der Fermentationen von GMD, GFS und FucT	146
8.2	Vergleich der kinetischen Parameter der GMD	150
8.3	Vergleich der kinetischen Parameter der GFS	155
8.4	Raum-Zeit-Ausbeuten und Enzymverbrauch verschiedener Syntheseverfahren	158
10.1	Übersicht der chemischen Verschiebungen für GKDM	190
10.2	^1H -NMR-Daten der GDP- β -L-Fucose	191

Symbole und Abkürzungen

Symbol	Wert, Einheit	Größe
A	U/mL, U/mg	volumen- oder massenspezifische Enzymaktivität
$A_{max,NADP}$	U/(mL·min)	maximale Aktivitätsänderungsgeschwindigkeit, NADP-abhängig (siehe Kapitel 5.2.2)
$A_{max,NADPH}$	U/(mL·min)	maximale Aktivitätsänderungsgeschwindigkeit, NADPH-abhängig (siehe Kapitel 5.2.2)
A_{NADP}	U/(mL·min)	Aktivitätsänderungsgeschwindigkeit, NADP-abhängig (siehe Kapitel 5.2.2)
A_{NADPH}	U/(mL·min)	Aktivitätsänderungsgeschwindigkeit, NADPH-abhängig (siehe Kapitel 5.2.2)
c_A	mol/L, mmol/L	Konzentration der Komponente A
$c(X)$	mol/L, mmol/L	Konzentration der Komponente X
δ	ppm	chemische Verschiebung
EV	U/g	Enzymverbrauch
J	Hz	Kopplungskonstante
k	min ⁻¹	Geschwindigkeitskonstante (1. Ordnung)
K_d	μmol/L	Dissoziationskonstante
k_{des}	min ⁻¹ , d ⁻¹	Desaktivierungskonstante (1. Ordnung)
K_I	μmol/L	Inhibierungskonstante
K_M	μmol/L	<i>Michaelis-Menten</i> -Konstante
λ	nm	Wellenlänge
pH	$-\log [H_3O^+]$	Maß der Protonenkonzentration in einer (wäßrigen) Lösung
R	8,314 J/(mol·K)	allgemeine Gaskonstante
RZA	g/(L·d)	Raum-Zeit-Ausbeute
t	min, h	Zeit
T	°C	Temperaturangabe in Grad Celsius
	K	Temperaturangabe in Kelvin
$\tau_{1/2}$	min, d	Halbwertszeit
U	μmol/min	Einheit der Enzymaktivität, <i>unit</i>
U	kV	Elektrische Spannung
V_0	ml, L	Retentatvolumen bei Diafiltration
V_D	mL, L	Spülvolumen bei Diafiltration
$V_{des,NADPH}$	U/mL	Geschwindigkeit der NADPH-Desaktivierung (siehe Kapitel 5.2.2)
V_{max}	U/mL, U/mg	maximale Reaktionsgeschwindigkeit

Fortsetzung nächste Seite

Symbole und Abkürzungen

Symbol	Wert, Einheit	Größe
V_{Prod}	U/mL	Geschwindigkeit der GMD-Produktionsreaktion (siehe Kapitel 5.2.2)
$V_{Prod,max}$	U/mL	maximale Geschwindigkeit der GMD-Produktionsreaktion (siehe Kapitel 5.2.2)
$V_{Prod,NADP}$	U/mL	Geschwindigkeit der GMD-Produktionsreaktion, NADP-abhängig (siehe Kapitel 5.2.2)
$V_{Prod,NADPH}$	U/mL	Geschwindigkeit der GMD-Produktionsreaktion, NADPH-abhängig (siehe Kapitel 5.2.2)

Abk.	Abkürzung für
2'-FL	2'-Fucosyllactose
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
CD	Cyclodextrin
CE	<i>capillary electrophoresis</i> , Kapillarelektrophorese
CMP	Cytidin-5'-monophosphat
CMP-Neu5Ac	Cytidin-5'-monophosphat-N-Acetylneuraminsäure
CSTR	<i>continuously stirred tank reactor</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dTDP	Desoxy-thymidin-5'-diphosphat
DTT	Dithiothreitol
DIME- β -CD	Dimethyl- β -cyclodextrin
E	Enzym
E_A	Aktivierungsenergie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Na ₂ -Salz)
EMR	Enzym-Membran-Reaktor
ES	Enzym-Substrat-Komplex
ESI	<i>electrospray ionization</i> - Ionisationsart in der Massenspektrometrie
FDH	Formiatdehydrogenase
FF	<i>fast flow</i> (Q-Sepharose FF)
FK	Fucokinase
FPLC	<i>fast performance liquid chromatography</i>
Fuc	L-Fucose
FucT	(α 1,2-)Fucosyltransferase
GA	Genetischer Algorithmus
Gal	D-Galactose
GalNAc	N-Acetyl-D-Galactose
GALOP	<i>Genetic Algorithms for the Optimization of Processes</i> , Software
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GDP-Fuc	GDP- β -L-Fucose
GDP-Fuc PP	GDP- β -L-Fucose Pyrophosphorylase
GDP-Man	GDP- α -D-Mannose
GDP-Man PP	GDP- α -D-Mannose Pyrophosphorylase
GF	Gelfiltration
GFS	GDP- β -L-Fucose-Synthetase

Fortsetzung nächste Seite

Abk.	Abkürzung für
GKDM	GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose
Glc	D-Glucose
GlcNAc	N-Acetyl-D-Glucose
GMD	GDP- α -D-Mannose-4,6-Dehydratase
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GST	Gluthathion-S-Transferase
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HMBC	<i>heteronuclear multi-bond connectivity</i> NMR Technik - Korrelation der Protonen mit umliegenden C-Atomen
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i> NMR Technik - Bestimmung der CH-Konnektivitäten
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JFC	<i>Jülich Fine Chemicals GmbH</i>
KP _i	Kaliumphosphat(puffer)
LAD II	<i>leukocyte adhesion deficiency II</i> Leukozyten-Adhäsions-Defizienz Typ II
Lac	Lactose (Milchzucker)
LacNAc	N-Acetylactosamin
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
Le ^{X,Y,A,B}	<i>Lewis</i> -Antigen des Typs X, Y, A, B
LNFP	Lacto-N-Fucopentaose
LNnT	Lacto-N- <i>neo</i> -Tetraose
LNT	Lacto-N-Tetraose
Man	D-Mannose
MES	2-(N-Morpholino)Ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure
NAD(H)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
NADP(H)	Nicotinamid-adeninphosphat-dinucleotid (reduziert)
NF	Nanofiltration
Ni-NTA	Nickel ²⁺ - <i>nitrilotriacetic acid</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PFK	Phosphofruktokinase
PGM	Phosphoglucomutase
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PMM	Phosphomannomutase
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
R	Retention
Rha	D-Rhamnose
S	Substrat
SDR	<i>short-chain dehydrogenase reductase</i>

Fortsetzung nächste Seite

Symbole und Abkürzungen

Abk.	Abkürzung für
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
TEA	Triethanolamin
TM	Transmembrandomäne
TP_i	<i>theoretical plates</i> , Anzahl der theoretischen Böden
<i>ttn</i>	<i>total turnover number</i>
UF	Ultrafiltration
TEA	Triethanolamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	Volt

"The 20th century has been the century of amino acids. We believe that the 21st century will be the century of oligosaccharides."

Yasuyuki Ono
Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.
Machida (Japan), April 2002

1 Einleitung

Die Bedeutung der "Zucker" in der Natur hat die Stellung dieser Substanzklasse in der Wissenschaft revolutioniert und ist heute unbestritten. Weit vor dieser Erkenntnis, die vor etwa 50 Jahren einsetzte, begann mit dem Bekanntwerden des Rohstoffs Zucker¹ im mittelalterlichen Europa jedoch eine ganz andere Revolution: eine gesellschaftliche. Die damalige neue Verfügbarkeit des Rohrzuckers lässt sich bis auf die Zeit der Kreuzzüge zurückführen; das arabische Wort *sukker* für "Zucker" ist ein Beleg dafür.² Jedoch wurde der Zucker damals nur von den Mächtigen und Reichen genossen. Der Zuckerhandel fußte bis in das 18. und 19. Jahrhundert auf der Sklavenhaltung; Sklavengegner sprachen in dieser Zeit daher oft von "Blutzucker".

Aus der heutigen Warengesellschaft ist Zucker nicht mehr wegzudenken. Die einsetzende Nutzung der Zuckerrüben im frühen 19. Jahrhundert wurde durch Franz Carl Achard (1753 - 1821) angestoßen (Abbildung 1.1). Im Jahre 1809 legte er in seinem dreiteiligen Hauptwerk *Die europäische Zuckerfabrikation aus Runkelrüben* die wissenschaftlichen Grundlagen für die Zuckergewinnung aus Rüben [1]. Achard war sich der Bedeutung seiner Ergebnisse durchaus bewusst und sah im Rübenzucker auch eine Waffe gegen die von ihm verabscheute Sklaverei.



Abbildung 1.1: Deckblatt der Erstausgabe *Die europäische Zuckerfabrikation aus Runkelrüben* [1] (links) von Franz Carl Achard (rechts) und Gemälde des Autors (um 1940, unbekannter Künstler).

¹gemeint ist der gewöhnliche Rohr- oder Haushaltszucker.

²Etymologische Wörterbücher sagen aus, dass das Wort "Zucker" mehrere Ursprünge besitzt. So bedeutet im Sanskrit *sakhara* "zerrissenes Stück". Damit ist das Zerkleinern und Zerquetschen des Zuckerrohrs gemeint, um den Saft herauszupressen.

Die zunehmende Industrialisierung der europäischen Zuckerfabrikation aus Rüben Ende des 19. Jahrhunderts ließ den Preis für Zucker massiv fallen. Zucker wurde somit auch für die Unterschicht zugänglich.

Dem Streben nach Zucker als Kalienträger für alle Bevölkerungsschichten geht seine Nutzung in der reichen europäischen sowie in der vorderasiatischen Gesellschaft als Heilmittel und wichtigstem Grundstoff für die Bereitung von Arzneimitteln im frühen Mittelalter voraus. Die Geschichte des Zuckers¹ findet damit einen ihrer Ursprünge in der mittelalterlichen Medizin. Bis in das 18. Jahrhundert hinein galt Zucker als Allheilmittel: so wurde er in der damaligen Zeit sogar als Zahnputzmittel vorgeschlagen [3].

In der heutigen Wissenschaft und Medizin spielt das Wort "Zucker" in unterschiedlichen Bereichen wieder eine große Rolle. Längst ist mit diesem Wort nicht mehr nur eine einzige Substanz gemeint und die Vielfalt und Bedeutung der heute bekannten Zucker und (Oligo)-Saccharide ist immer noch nicht vollständig aufgeklärt und verstanden. Die Gründe für die enorme Bedeutung zuckerartiger Strukturen in Wissenschaft und Natur sollen anhand einiger Beispiele in den folgenden Abschnitten verdeutlicht werden. Besonders wird dabei die Rolle des Monosaccharides Fucose hervorgehoben.

1.1 Stellung und Vielfalt der Kohlenhydrate in der Natur

Der Begriff *Kohlenhydrate* ist jedem Menschen vertraut. Dieses Wort ist historisch entstanden und leitet sich von der empirisch gefundenen Formel $C_n(H_2O)_n$ ab, die für eine Vielzahl von Zuckern gültig ist: Glucose, $C_6H_{12}O_6$ bzw. $C_6(H_2O)_6$, ist mit Abstand das in der Natur wichtigste Monosaccharid.

Die Bedeutung der Kohlenhydrate kann jeder Naturwissenschaftler erahnen. Elementare Begriffe der Biologie wie *Glykolyse* und *Pentosephosphatweg* (zentraler Stoffwechsel), *Glykogen* (Energiespeicher) oder *Photosynthese* (Biosynthese von Kohlenhydraten) zeigen, welche Rolle Zucker in der belebten Natur spielen. Auch die jährlich weltweit durch Photosynthese biosynthetisierte Masse von schätzungsweise 200 Milliarden Tonnen - überwiegend in Form von Stärke, Cellulose und Chitin - ist beeindruckend [4]. Trotz dieses Wissens über das ubiquitäre Auftreten der Kohlenhydrate in unserer Welt, kann man nur erstaunt sein über die vielfältigen Wirkorte, Wirkprinzipien und molekularen Mechanismen der Zucker, die sich zeigen, wenn man sich mit dieser Stoffklasse näher befasst.

Schon die Verknüpfung einzelner Monosaccharid-Bausteine, die hoch polyfunktionell sind, führt zu einer sehr großen Zahl möglicher Strukturen. Die enorme Strukturvielfalt der Kohlenhydrate ergibt sich aus den vielfältigen Verknüpfungsmöglichkeiten der einzelnen Monomere untereinander. Oligosaccharide können sich in der Monomersequenz, in der Art der anomeren Verknüpfung und im Verzweigungsmuster unterscheiden. Weitere Modifikationen der Hydroxyl- und Aminogruppen ermöglichen den Aufbau einer beinahe unbegrenzten Zahl komplexer Strukturen. In Säugern - und damit auch im Menschen - die in der Regel nur sieben oder acht Monosaccharid-Bausteine verwenden, kann auf diese Weise bereits ein beachtliches Informationsvolumen für biochemische Prozesse kodiert werden. Auf die Bedeutung von Oligosacchariden in Erkennungsprozessen wird im nächsten Unterkapitel eingegangen.

Die Vielfalt der Oligosaccharidstrukturen wird noch erweitert, dringt man in die Welt der Mikroorganismen vor. Zum einen existieren hier andersartige Monosaccharid-Bausteine, zum

¹Die Kulturgeschichte des Zuckers ist in [2] sehr ausführlich und ansprechend aufbereitet.

anderen finden sich viele Strukturen bzw. *backbones*, die erst durch entsprechende Glycosylierungen ihre biologische Aktivität erhalten [5].

Abbildung 1.2 zeigt beispielhaft zwei hochkomplexe, bakterielle Glycostrukturen: das **Lipopolysaccharid (LPS)** des gram-negativen Bakteriums *Salmonella enterica* LT 2 und das zellassozierte Kapselpolysaccharid **colanic acid** von *E. coli* K-12.

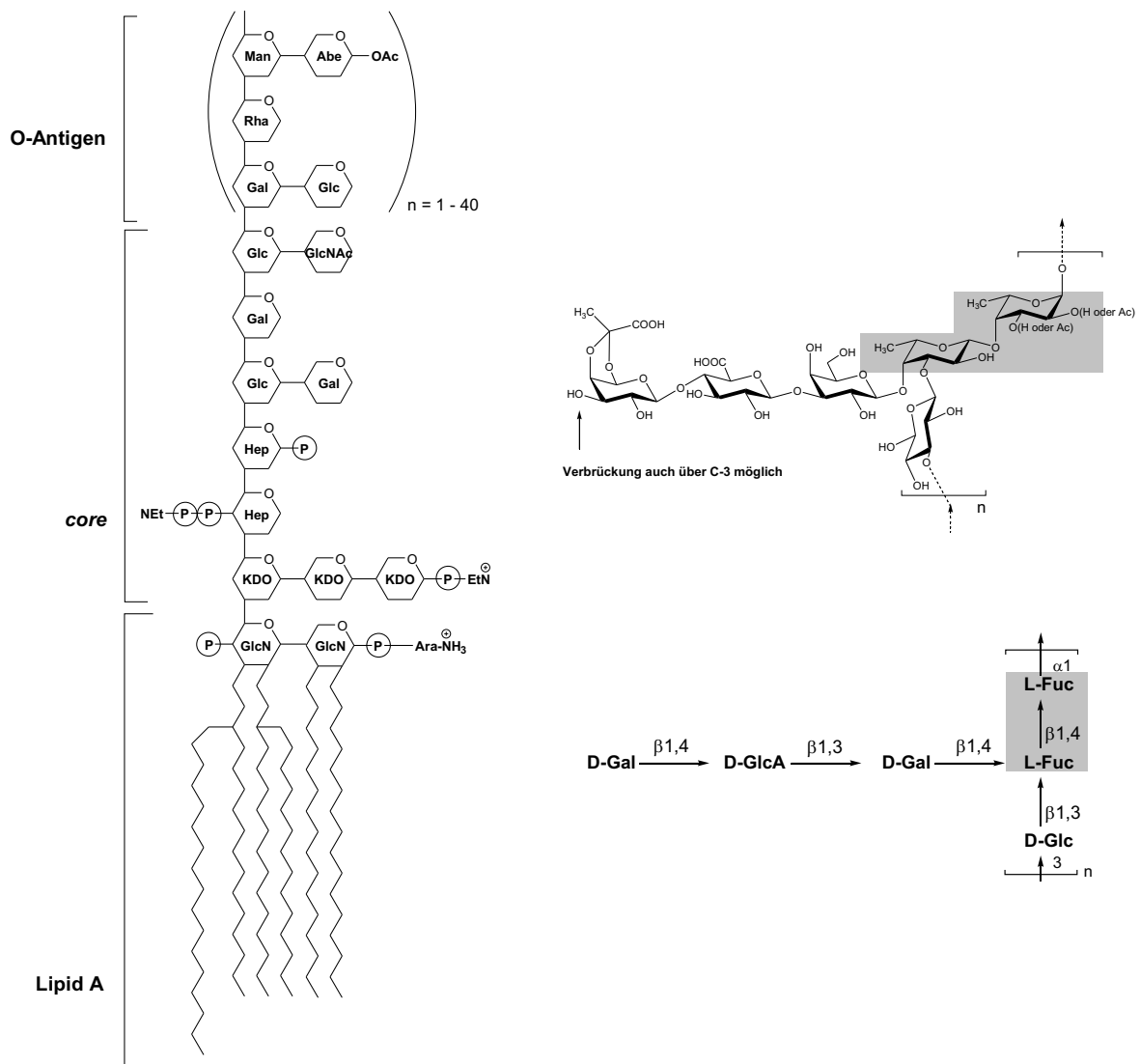


Abbildung 1.2: Struktur des Lipopolysaccharids (LPS) von *S. enterica* LT2 (**links**) und des Kapselpolysaccharids *colanic acid* [6–9] von *E. coli* K-12 (**rechts**).

Monosaccharide des LPS: D-Glucosamin (GlcN), 2-Keto-3-desoxyoctonsäure (KDO), L-Glycero-D-manno-Heptose, D-Glucose (Glc), D-Galactose (Gal), N-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc), L-Rhamnose (Rha), D-Mannose (Man), Abequose (Abe), 4-Amino-L-Arabinose (Ara-NH₃).

Monosaccharide von colanic acid: L-Fucose (Fuc, grau unterlegt), D-Glucuronsäure (GlcA), D-Glucose (Glc), D-Galactose (Gal).

Lipopolysaccharide sind charakteristische Bestandteile der äußeren Membran gram-negativer Bakterien. Sie wirken auf den Menschen als Endotoxine. In hohen Dosen verursachen sie die übermäßige Ausschüttung endogener Mediatoren (z.B. Cytokine, Prostaglandine und reduzierte Sauerstoffspezies), die zu einer Reihe pathologischer Reaktionen führen [10–12]. Lipopolysaccharide bestehen aus drei strukturellen Domänen, die über glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind: *Lipid A*, *core* Oligosaccharid und *O-Antigen* [13–16].

Das Lipid A fungiert als hydrophober Anker des LPS in der äußeren Membran. Es besteht aus Monosacchariden und Fettsäuren und ersetzt in einigen Spezies die Phospholipide [16–18]. Die *core* Region besteht aus einem phosphorylierten Oligosaccharid. Einige Antibiotika können diese Region nicht passieren, so dass die Organismen entsprechende Resistenzen zeigen [13, 17].

Das O-Antigen zeigt eine große strukturelle Vielfalt. Je nach Organismus besteht es aus drei bis sechs Monosacchariden. Diese bilden sich wiederholende Oligosaccharideinheiten (1 - 40) aus und zeigen eine hohe Variabilität. Wie auch die zellassozierten kapsulären Polysaccharide (KPS) bestimmen die O-Antigene die serologische Spezifität der gram-negativen Bakterien [16, 17, 19, 20].

Das Kapselsaccharid *colanic acid* (CA) wird nach heutigem Kenntnisstand von vielen, jedoch nicht allen Enterobakterien synthetisiert [21]. Es setzt sich aus einer Hexasaccharid Wiederholungseinheit zusammen, die aus den Zuckern Fucose, Glucose, Galactose und Glucuronsäure in einem Verhältnis von 2:1:2:1 besteht. Zusätzlich ist das Polysaccharid noch mit einem Pyruvatrest und einer Acetylgruppe modifiziert [22–26].

Für die Pathogenität von *E. coli* spielt *colanic acid* offensichtlich keine Rolle [27]. Vielmehr scheint CA eine wichtige Rolle für das Überleben von *E. coli* außerhalb seines Wirts zu spielen und eine Schutzfunktion gegen das Austrocknen des Bakteriums zu übernehmen [28, 29].

Bis Mitte der neunziger Jahre war wenig über die an der Synthese von CA beteiligten Gene bekannt. Die Identifizierung eines *colanic acid* Genclusters zeigte, dass diese DNA-Abschnitte für jene Enzyme kodieren, die zur Biosynthese dieses Polysaccharids erforderlich sind. Das seit dieser Zeit steigende Interesse an *colanic acid* [30–32] ist vor allem damit zu erklären, dass bisher nur wenige Bakterien gefunden wurden, die in der Lage sind, verschiedene Moleküle zu fucosylieren [33]. Da bei den Eukaryonten - und damit auch beim Menschen - die Bedeutung fucosylierter Strukturen schon lange bekannt und ihre Beteiligung an bestimmten Krankheiten unbestritten ist (s. unten), hoffte man mit diesen Erkenntnissen Analogien des Fucose-Stoffwechsels zwischen den Spezies aufdecken zu können. Auf die Bedeutung und Biosynthese fucosylierter Strukturen in Pro- und Eukaryonten wird in den Kapiteln 1.3 und 1.4 eingegangen.

Das *colanic acid* Gencluster ist seit seiner Entdeckung eine wichtige, bakterielle Quelle derjenigen Enzyme, die an der Synthese von GDP- β -L-Fucose beteiligt sind. So sind auch die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Enzyme bakteriellen Ursprungs: sie stammen aus *Escherichia coli* K-12 (siehe Kapitel 4).

1.2 Oligosaccharide in Erkennungsprozessen

Die Strukturvielfalt der Kohlenhydrate ist so groß, dass sie die Natur als Informationsspeicher nutzt, wobei die biologische Information strukturell verschlüsselt ist. Oligosaccharid-Strukturen sind aus diesem Grund prädestiniert, eine Schlüsselrolle in biochemischen Erkennungsprozessen zu spielen.

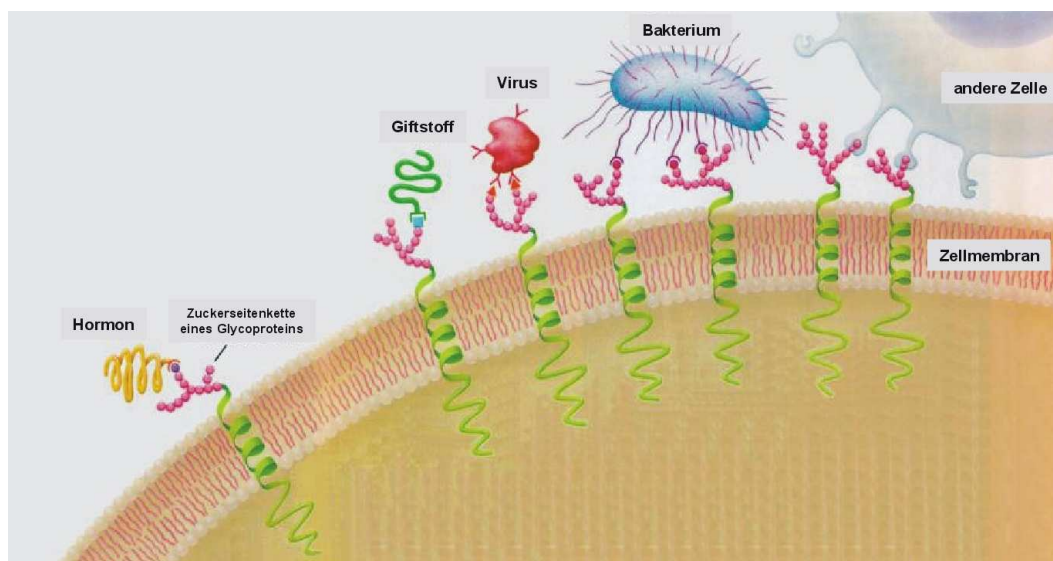


Abbildung 1.3: Kohlenhydrat-vermittelte Erkennungsvorgänge auf der Oberfläche eukaryontischer Zellen [34].

Eine besonders wichtige Rolle spielen die Kohlenhydrate dabei als Bestandteil der sog. Glycokonjugate. Dieser Begriff wurde erstmals 1973 von Montreuil geprägt und umfasst die Glycoproteine, Glycolipide und Proteoglycane¹ [35]. Der Oligosaccharidteil, der in den Glycoproteinen und -lipiden kovalent gebunden ist, besteht typischerweise aus bis zu 20 Monomereinheiten, ist gelegentlich aber auch viel größer [4]. Er bildet eine Zuckerschicht auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran aus, die die Zelle fast vollständig umgibt und als Glycocalix bezeichnet wird. Die Glycocalix ermöglicht die molekulare Erkennung zwischen Zellen, Bakterien und Viren oder dient als Erkennungsstelle bzw. Rezeptor für verschiedene Biomoleküle und Toxine, die ihrerseits ebenfalls glycosyliert sein können (Abbildung 1.3). Einige Beispiele biologischer Prozesse, bei denen die Oligosaccharidstrukturen von Glycokonjugaten eine elementare Rolle spielen, sind in Tabelle 1.1 auf der nächsten Seite aufgelistet.

Die in Tabelle 1.1 beispielhaft gewählten Erkennungsvorgänge erklären auch das steigende Interesse der pharmazeutischen Industrie an der Entwicklung neuer Wirkstoffe auf Basis von Sacchariden bzw. von Saccharidanaloga [47, 48]. Bis auf einige Ausnahmen ist diesen Wirkstoffen aber bisher nicht der entscheidene Durchbruch gelungen. Die hohe Komplexität der molekularen Vorgänge bei Erkennungsprozessen lässt viele Entwicklungskandidaten in frühen oder fortgeschrittenen Stadien der klinischen Prüfung verschwinden. Dennoch ist unbestritten, dass derartige Wirkstoffe enormes Potential in der Bekämpfung wichtiger Krankheiten besitzen und so befinden sich immer auch potentielle Kohlenhydratwirkstoffe in klinischer Prüfung. Mehrere Artikel in einer *Science*-Ausgabe des Jahres 2001 geben einen Überblick der Forschung auf diesem Gebiet [49–51]. Eine Übersicht bietet außerdem [52] sowie eine 2003 publizierte, zweibändige Reihe "Carbohydrate-based Drug Discovery" von Chi-Huey Wong [53]. Die automatisierte, kombinatorische Synthese einer Vielzahl von Oligosacchariden spielt bei der Entdeckung kohlenhydrat-basierter Wirkstoffe eine immer wichtigere Rolle [49, 54].

¹Proteoglycane (=Mucoproteine) sind Makromoleküle, die aus einer Hyaluronsäure-Kette und mehreren hoch-glycosylierten Glycoproteinen (sog. Kernproteine) bestehen.

Biologisches Ereignis	Erkennungsvorgang	Ref.
HIV-1 Infektion	Virales Hüllglycoprotein gp120 bindet an CD4 Rezeptoren	[36,37]
Entzündung (Leukozytenrekrutierung)	Selektin-vermittelte Leukozytenbindung auf Endothelzellen	[38–40]
Septischer Schock (bakterielle Endotoxine)	Bindung der Lipopolysaccharide (LPS) an das lösliche Bindungsprotein (LBP) im Blutserum	[41]
Fertilisation	Kohlenhydrate der <i>zona pellucida</i> (Eizelle) binden an Rezeptoren der Spermien	[42,43]
Metastatisierung	Bindung glycosylierter, tumor-assoziiertes Antigene der Krebszelle an bestimmte Rezeptoren	[40,44–46]

Tabelle 1.1: Beispiele für kohlenhydrat-vermittelte Erkennungsvorgänge in wichtigen biologischen Ereignissen.

1.3 Die Bedeutung fucosylierter Strukturen

In Säugern basieren eine Vielzahl biologischer Ereignisse und Funktionen auf der Struktur fucosylierter Glycokonjugate [55]. Dabei ist die Anwesenheit von L-Fucose-Einheiten auf den jeweiligen Molekülen entscheidend. Zwei wesentliche Strukturmerkmale unterscheiden diesen Zucker von den anderen Sechsring-Monosacchariden: 1. das Fehlen einer Hydroxylgruppe an Position C-6 (\rightarrow Desoxyzucker) und 2. die in Säugetieren ungewöhnliche L-Konfiguration des Zuckers. Abbildung 1.4 zeigt die Struktur von L-Fucose in der Sessel- sowie in der *Haworth*-Projektion.

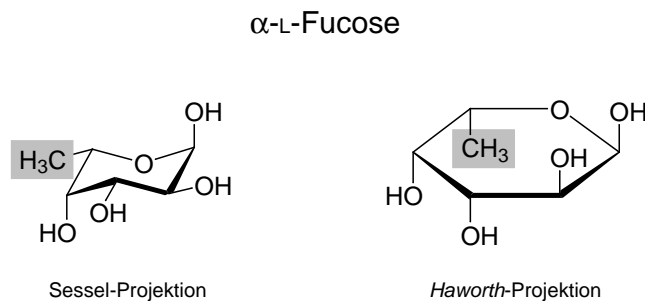


Abbildung 1.4: Strukturformeln des Desoxyzuckers L-Fucose.
Die Methylgruppe an Position C-6 ist grau unterlegt.

Die folgenden Unterkapitel sollen der enormen Bedeutung fucosylierter Glycane Rechnung tragen und die Gründe für das stetig steigende Interesse für diese Moleküle aufzeigen. Die Beispiele werden erkennen lassen, dass ein synthetischer Zugang zu diesen Strukturen unerlässlich für den erfolgreichen Fortgang der Glycobiotechnologie ist.

1.3.1 Das AB0 Blutgruppensystem

Die AB0 Blutgruppenantigene gehören zu den bekanntesten fucosylierten Glycanen. Sie finden sich auf verschiedenen Glycoproteinen oder Glycolipiden. Die An- oder Abwesenheit der jeweiligen Antigene bestimmt die Blutgruppen-Zugehörigkeit [55, 56]. Gemeinsames Strukturmerkmal ist das H-Antigen. Dieses wird bei Individuen der Blutgruppe A, B und AB durch Addition eines weiteren Zuckers verändert. Individuen, die nur das H-Antigen besitzen, werden der Blutgruppe 0 zugeordnet. Die drei Antigene A, B und H zeigt Abbildung 1.5.

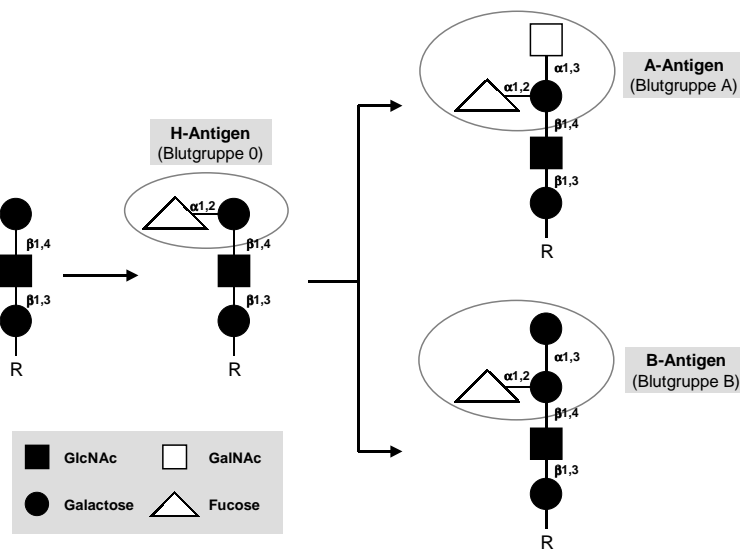


Abbildung 1.5: Struktur und Biosynthese der Blutgruppenantigene A, B und H.

Die Abbildung verdeutlicht, dass sich die Antigene A und B nur durch die An- oder Abwesenheit einer N-Acetylgruppe bei der terminalen Galactose voneinander unterscheiden.

Ausgehend von einem terminalen Galactose-Rest, der in der Regel Teil einer poly-LacNAc-Struktur $(\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc})_n$ ist, wird zur Ausbildung des H-Antigens zunächst ein Fucoserest übertragen.¹ Daran anschließend wird auf das H-Antigen ein weiterer Zucker übertragen: ein N-Acetylgalactosamin-Rest (GalNAc) im Falle des A-Antigens, eine Galactose im Falle des B-Antigens. Individuen der Blutgruppe AB besitzen beide Antigene (A und B).

Die Antigene sind hoch immunogen und es werden hohe Titer der jeweiligen Antikörper im Blut gefunden, wenn die entsprechenden Antigene fehlen. Diese Immunogenität ist Ursache der blutgruppen-abhängigen Kompatibilität von Blutspender und -empfänger.

¹Auf das Enzym, welches diesen Schritt katalysiert, wird in der Einleitung von Kapitel 4.3 (*Gewinnung der α 1,2-Fucosyltransferase (FucT)*) näher eingegangen.

1.3.2 *Helicobacter pylori* und Lewis-Strukturen

Die Entdeckung des gram-negativen Bakteriums *Helicobacter pylori* durch J. Robin Warren und seinen Schüler Barry J. Marshall im Jahre 1983 [57] war eine medizinische Sensation. Das Bakterium wurde in der Magenschleimhaut von Patienten mit chronischer Gastritis bzw. Magengeschwüren entdeckt [58]. Die damals postulierte Schlussfolgerung, *H. pylori* selbst sei Ursache dieser und weiterer Erkrankungen wie etwa Magenkrebs, stieß zunächst auf heftige Ablehnung [59], da man die mikrobielle Besiedlung des sauren Magens als unmöglich einschätzte. Heute weiß man, dass *H. pylori* in dieser Umgebung überleben kann: das Enzym *Urease* des Bakteriums hydrolysiert Harnstoff unter Freisetzung von Ammonium-Ionen [59], die zu einer Anhebung des pH-Wertes führen.¹

Die Verbreitung von *H. pylori* ist besorgniserregend. Etwa die Hälfte der Weltbevölkerung ist infiziert [60]. 1994 stufte die WHO das Bakterium als humanes Carcinogen der höchsten Stufe ein [61], jedoch wurden auch Spezies identifiziert, die möglicherweise einen schützenden Effekt für den Menschen zeigen [62]. Die Kombination verschiedener Antibiotika mit Protonenpumpen-Inhibitoren führt in der Regel zur Ausrottung von *H. pylori* in infizierten Individuen [61] und ermöglicht die erfolgreiche Therapie von Gastritis und Magengeschwüren. Auftretende Resistenzen sind aber bereits beobachtet worden [63].

Neben der Fähigkeit, den pH-Wert in der unmittelbaren Umgebung kontrollieren zu können, nutzt *H. pylori* noch eine andere, bemerkenswerte Überlebensstrategie, die als *molekulare Mimikry*² bezeichnet wird [64]. Das Bakterium ist in der Lage, fucosylierte Glycanstrukturen zu exprimieren, die denen der menschlichen Magenschleimhaut identisch sind [65]. Es wird vermutet, dass *H. pylori* auf diese Weise der Abwehr durch das Immunsystem entgeht.

Eine Vielzahl fucosylierter Oligosaccharide wurde auf der Oberfläche von *H. pylori* gefunden, jedoch gehören die meisten dieser Strukturen zu den sog. *Lewis*-Antigenen. Die Verteilung der einzelnen Determinanten ist dabei abhängig vom jeweiligen Stamm [66]. Diese Zuckerstrukturen sind immer Teil des O-Antigens der bakteriellen Lipopolysaccharide (LPS, s. dazu auch Abbildung 1.2 auf Seite 3) [67, 68]. Die Expression LPS-assoziiierter Gene ist hoch variabel und pH Wert-abhängig [69]. Die mit *H. pylori* assoziierten wichtigsten *Lewis*-Strukturen (Le^X , Le^Y , Le^A und Le^B)³ zeigt Abbildung 1.6 auf der nächsten Seite. Le^A und Le^B leiten sich vom sog. Typ I Vorläufer ab, Le^X und Le^Y sind die analogen Strukturen der Typ II Reihe. Typ I und Typ II unterscheiden sich lediglich in den glycosidischen Verknüpfungen voneinander. Eine einfache α 1,2-Fucosylierung der terminalen Galactose zur Ausbildung eines H-Antigens wurde in einigen Stämmen bisher nur für den Typ I Vorläufer beobachtet. Die entsprechende Struktur des Typs II scheint in *H. pylori* nicht zu existieren [70].

Neben der molekularen Mimikry zeigt speziell Le^B noch eine andere Funktion für die Wirt-Parasit-Interaktion: *H. pylori* nutzt die Le^B -Struktur der Epithel-Wirtszellen zu seiner eigenen Verankerung in der Magenschleimhaut [71].

Die Bedeutung fucosylierter Strukturen bei *H. pylori* ist seit der Entdeckung dieses Bakteriums schnell erkannt worden. Die heute angewandten Therapiemethoden sind gut. Vor dem Hintergrund der beobachteten Resistenzen werden jedoch auch andere Ansätze intensiv verfolgt. Der Einsatz anti-adhäsiver Wirk- oder Impfstoffe auf Kohlenhydrat-Basis spielt dabei

¹Das Internetportal www.helico.com von Barry J. Marshall (*The Helicobacter Foundation*) gibt eine hervorragende Übersicht über *H. pylori* und Indikationen, die mit diesem Bakterium in Verbindung gebracht werden.

²Mimikry, zool. Nachahmung wehrhafter Tiere durch nichtwehrhafte in Körpergestalt u. Färbung, *übertr.* für Anpassung.

³Abkürzung für die *Lewis*- Antigene: Le^i , $i = A, B, X$ und Y .

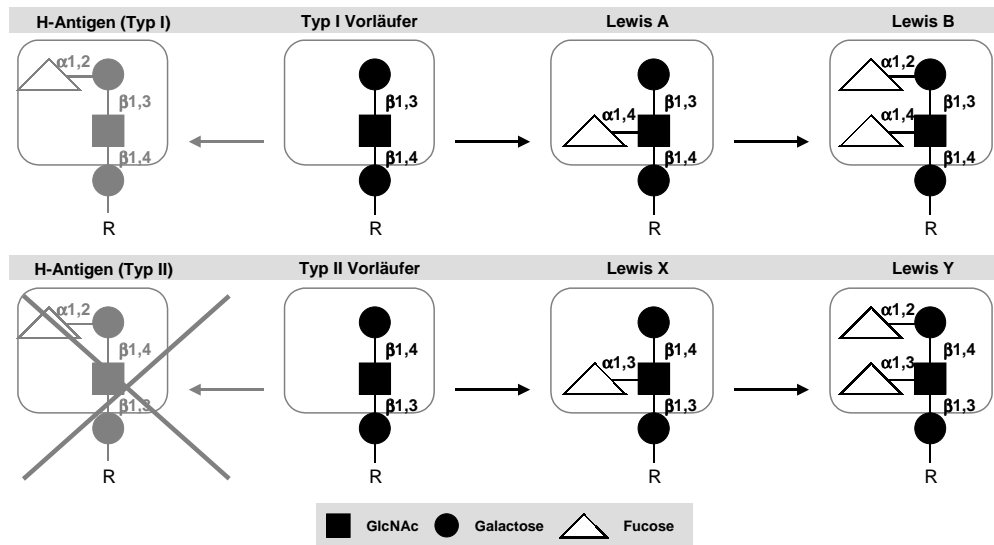


Abbildung 1.6: Strukturen der mit *H. pylori* assoziierten *Lewis* Antigene. **Oben:** Typ I Reihe, **Unten:** Typ II Reihe.

Das H-Antigen existiert in *H. pylori* nur für Typ I. Die Pfeile bezeichnen die für *H. pylori* spezifischen Biosynthesewege (siehe auch Kapitel 7.1).

eine wichtige Rolle [61] und zeigt auf, welche Bedeutung der synthetische Zugang zu fucosylierten Glycanstrukturen bekommen könnte. Bei der Suche alternativer Therapieansätze kommt erschwerend hinzu, dass die bei vielen Mikroorganismen bekannte *antigene Variation*, d.h. das An- oder Abschalten bestimmter Epitope auf den LPS durch Genregulation, auch bei *H. pylori* bekannt ist [60]. Der Grund für diese hohe Variabilität der Lipopolysaccharide ist bisher nicht bekannt.

Eine bemerkenswerte Hypothese zur Erklärung der Diversität von Glycanen in komplexen Wirt-Parasit-Systemen geben [72] und [73]: *Nothing in biology makes sense, except in the light of evolution*. Danach beruht die enorme Strukturvielfalt von Wirt (=Mensch) und Parasit auf dem permanenten, evolutionären Druck, der durch die Besiedlung des Menschen durch Viren und Bakterien auf beide entstanden ist.

1.3.3 Modifizierte Fucosylierung und Krankheiten

Fucosylierte Strukturen spielen bei verschiedenen Krankheitsbildern des Menschen eine wichtige Rolle. Eine Veränderung der Fucosylierung von Oligosacchariden in Glycoproteinen oder Glycolipiden wird etwa bei verschiedenen Krebsarten beobachtet [44, 74–76]. So gelten das H-Antigen, sialyl Le^X (siehe unten) und Le^B als Tumormarker bei Prostatakrebs [77, 78]. Eine Akkumulation von Le^B und Le^Y wird bei bestimmten Tumoren des Enddarms gefunden [79]. Sialylierte Oligosaccharide werden in verschiedenen Krebsarten übermäßig stark exprimiert [80–83] und es wird vermutet, dass sialyl Le^X (sLe^X) an der Ausbreitung von Krebszellen durch Metastatisierung wesentlich beteiligt ist [39, 84, 85]. Dabei bindet es selektiv an bestimmte Rezeptoren (sog. Selektine, [38]) nicht-maligner Zellen [86]. Abbildung 1.7 auf der nächsten Seite zeigt die Struktur dieses Tetrasaccharids. Der Fucose- und Galactoserest stellt,

zusammen mit der negativ geladenen Neuraminsäure¹, die essentiellen Funktionalitäten des Antigens dar, die zu den spezifischen Bindungseigenschaften dieses Moleküls führen [4, 87, 88].

Die Bindungseigenschaften von sLe^X sind in der Regel nicht pathogen. Sialyl Le^X ist terminaler Bestandteil vieler Oligosaccharid-Strukturen in Glycokonjugaten und wurde als Minimaligand der Selektine identifiziert. Die selektin-vermittelte Leukozytenadhäsion (siehe Tabelle 1.1) ist der einleitende Schritt bei Entzündungsprozessen, die mit der Wanderung der Leukozyten in das geschädigte Gewebe enden [40, 89].

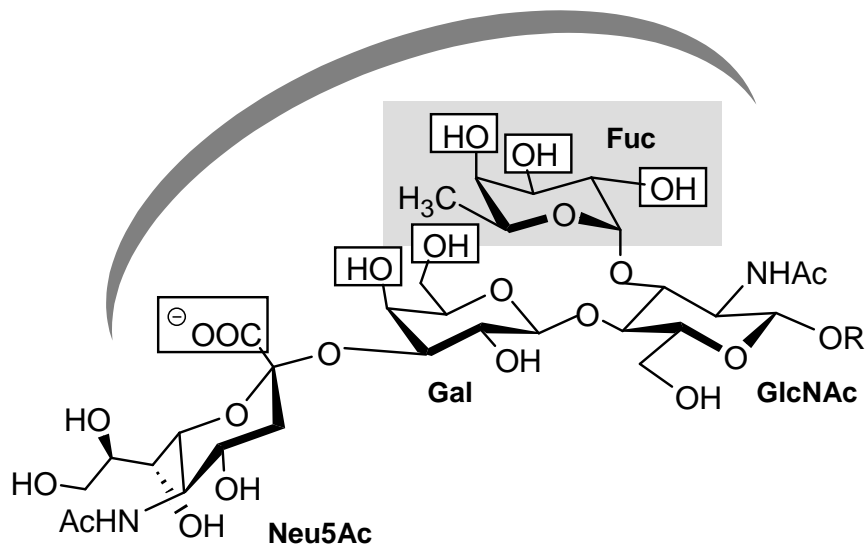


Abbildung 1.7: Struktur des Sialyl Lewis X (sLe^X) Tetrasaccharids.

Die für die Selektinbindung (graue Sichel) notwendigen funktionellen Gruppen sind eingerahmt, der Fucosestrest ist grau unterlegt. **Neu5Ac** = N-Acetylneuraminsäure, **Gal** = D-Galactose, **Fuc** = L-Fucose, **GlcNAc** = N-Acetylglucosamin.

Von einer erhöhten Expression fucosylierter Glycane auf Immunglobulinen (IgG) bei Patienten rheumatoider Arthritis² berichten [90] und [91]. Es ist unbekannt, ob diese Veränderungen der Fucosylierung ursächlich für die Krankheit sind oder ob es sich um Folgeerscheinungen einer Überregulation im Sinne der Autoimmunität handelt.

Säugerzellen, die nicht in der Lage sind, fucosylierte Glycane zu exprimieren, sind vital und zeigen ein normales Verhalten bei der Zellteilung [55]. Diese Beobachtung überrascht nicht, da fucosylierte Strukturen, wie oben beschrieben, vor allem an Zell-Zell-Interaktionen sowie Wirt-Mikroben-Prozessen beteiligt sind. Dennoch zeigen Menschen, die keine oder nur wenige fucosylierte Glycane auf den Zelloberflächen besonders der Leukozyten besitzen, ein Krankheitsbild, welches als *leucocyte adhesion deficiency, type II* (LAD II) bezeichnet wird.³ Übersichten zu dieser Krankheit geben [92] und [93]. Die Auswirkungen dieser sehr seltenen Erkrankung sind u.a. stetig wiederkehrende (mikrobielle) Infektionen sowie eine schwerwie-

¹Neuraminsäure ist eine Struktur aus der Klasse der Sialinsäuren und wird häufig als Sialylgruppe bezeichnet.

²Arthritis = (autoimmune) Entzündung der Gelenke

³*leucocyte adhesion deficiency*, dt. Leukozytenadhäsionsdefizienz; andere Bezeichnung: *congenital (=angeboren) disorder of glycosylation IIc* (CDG IIc).

gende Verzögerung der körperlichen und mentalen Entwicklung [94,95].

Die molekulare Ursache für das Fehlen typischer Antigene wie *Lewis*-Strukturen oder sialyl Le^X auf den Zelloberflächen ist bis heute nicht ganz aufgeklärt. Erste Vermutungen konzentrierten sich auf eine defekte Biosynthese von GDP- β -L-Fucose [96], jedoch wurden auch Patienten mit einer Hypofucosylierung beschrieben, die eine normale Biosynthese aufwiesen [97]. Auf die Biosynthese von GDP- β -L-Fucose und fucosylierter Strukturen wird ausführlich in Kapitel 1.4 auf Seite 13 eingegangen.

Später wurde eine weitere Ursache für LAD II entdeckt: die Biosynthese fucosylierter Glycane findet in bestimmten Zellkompartimenten (*Golgi*-Apparat) statt und erfordert daher den Transport der Substrate in diese Zellabschnitte [98,99]. Mehrere Arbeitsgruppen haben Defekte in GDP- β -L-Fucose-Transportern gefunden [100–102] und konnten zeigen, dass verschiedene Mutationen in den entsprechenden Genen Ursache dieser Fehlfunktionen und der daraus resultierenden Krankheitssymptome sind.

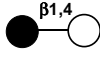
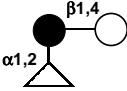
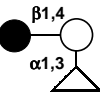
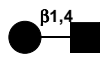
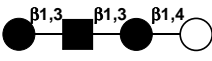
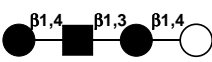
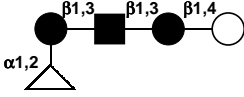
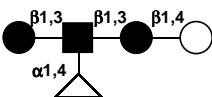
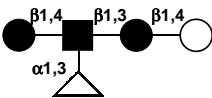
Es ist jedoch auch sicher, dass die molekularen Ursachen je nach Patient unterschiedlich sein können [95,103]. Dies ist auch der Grund für die Beobachtung, dass der übliche Therapieansatz - die orale Verabreichung von Fucose [104–106] - nur bei einem Teil der Patienten zum Erfolg führt.

1.3.4 Humanmilch-Oligosaccharide

Ein letztes Beispiel, welches die Relevanz fucosylierter Glycane unterstreichen soll, ist die strukturelle und funktionelle Vielfalt von Oligosacchariden in der Humanmilch. Diese Oligosaccharide sind teilweise fucosyliert und sialyliert [107]. Die ersten, auch fucosylierten Strukturen wurden bereits in den 1950er Jahren entdeckt und isoliert [108]. Die Arbeiten von Ginsburg in den 1960er und 1970er Jahren berichten über die Isolation und Charakterisierung einer Vielzahl bis dahin nicht bekannter Oligosaccharide [109–114].

Kohlenhydrate sind Hauptnährstoff der Milch: so sind in einem Liter etwa 10-13 g Proteine, 35-40 g Fett und 55-80 g Kohlenhydrate enthalten [115]. Hauptteil der Kohlenhydrate ist Lactose (Milchzucker, 50-70 g), jedoch besitzen die auf Lactose basierenden Oligosaccharide einen Anteil von etwa 10% (5-8 g). Tabelle 1.2 auf der nächsten Seite gibt eine Übersicht der wichtigsten in der Milch vorkommenden Oligosaccharide. Die dort angegebenen Gehalte sind Durchschnittswerte. Es ist bekannt, dass die Zusammensetzung je nach Mutter und Zeitpunkt der Laktation¹ variiert [116]. Die in der Tabelle exemplarisch aufgelisteten Strukturen verdeutlichen, dass Milch-Oligosaccharide häufig fucosyliert sind und entsprechende *Lewis*-Antigene tragen können [107]. Die Beobachtung, dass bei gestillten Kindern die Keimbildung des Darmtraktes vorwiegend aus günstigen Bifidusbakterien, diejenige der sog. "Flaschenkinder" jedoch vorwiegend aus pathogenen Keimen besteht [107], wird u.a. auf diese enorme Vielfalt von Oligosacchariden in der Frauenmilch (bisher sind über 100 Strukturen bekannt [117]) zurückgeführt [118]. Diese Oligosaccharide werden als lösliche Rezeptoranaloga zu Kohlenhydratstrukturen auf Epithelzellen angesehen, die möglicherweise zu einer besseren Infektabwehr bei Neugeborenen führen. Darüber hinaus gibt es Erkenntnisse, dass diese Zuckerstrukturen auch positive Auswirkungen auf die Entwicklung des Immunsystems und den Urinaltrakt besitzen [115], da sie probiotische Wirkungen zeigen [119]. (Fucosylierte) Oligosaccharide werden daher als wichtige, zukünftige Lebensmittel-Additive angesehen (*functional food*).

¹Laktation = Zeit des Stillens

Oligosaccharid	Abk.	Struktur	Typ	Gehalt [g/L]
Lactose	Lac		-/-	50-70
2'-Fucosyllactose	2'-FL		-/-	k.A.
3'-Fucosyllactose	3'-FL		-/-	k.A.
N-Acetyllactosamin	LacNAc		II	k.A.
Lacto-N-Tetraose	LNT		I	0.5-1.5
Lacto-N-neo-Tetraose	LNnT		II	k.A.
Lacto-N-Fucopentaose I	LNFP I		I (H-Ant.)	1.2-1.7
Lacto-N-Fucopentaose II	LNFP II		I (Le ^A)	0.3-1.0
Lacto-N-Fucopentaose III	LNFP III		II (Le ^X)	0.01-0.2




Tabelle 1.2: Beispiele für Oligosaccharide der Humanmilch. Die fucosylierten Strukturen können *Lewis*-Antigene tragen, die auf Lactose basieren [116,120,121] (k.A.: keine Angabe). **Fett gedruckte Oligosaccharide sind in Kapitel 7 relevant.**

1.4 Enzymatischer Zugang zu fucosylierten Oligosacchariden

Die vorangegangenen Kapitel haben gezeigt, welche Stellung und enorme Bedeutung Oligosaccharide im allgemeinen und fucosylierte Strukturen im besonderen haben. Es erstaunt daher nicht, dass ein großes Interesse besteht, synthetischen Zugang zu diesen Molekülen zu bekommen.

Die chemische Synthese dieser komplexen Strukturen gestaltet sich für den organischen Chemiker noch immer als besondere Herausforderung [122, 123], die häufig in der Multifunktionalität der Verbindungen begründet liegt [124]. Vor allem die selektive Knüpfung der glykosidischen Bindung ist problematisch [125, 126]. Jedoch wurden durchaus leistungsfähige Methoden entwickelt, die Synthesen bis in den Gramm- und Kilogramm-Maßstab ermöglichen.

1.4.1 Die Bedeutung der Nucleotidzucker: der *Leloir pathway*

Die enzymatische Synthese ist eine alternative Methode zum Aufbau von Glycanstrukturen. Die Biosynthese der Oligosaccharide erfolgt hoch stereo- und regiospezifisch. Die Enzyme, die diese Synthesen katalysieren, die Glycosyltransferasen [127], setzen als Glycosyl-Donor Monosaccharide ein, die als Nucleosidmono- oder Nucleosiddiphosphate (NDP- bzw. NMP) aktiviert sind. Die Entdeckung dieses allgemein gültigen *pathway* durch *Luis F. Leloir* und seine Arbeitsgruppe in den 1950er Jahren [128, 129] muss als Meilenstein der damals sich gerade entwickelnden Glycobiologie gesehen werden. Je nach übertragenem Monosaccharid werden die Glycosyltransferasen als Galactosyl- (Übertragung einer Galactose), Glucosyl- (Übertragung einer Glucose) oder Fucosyltransferase (Übertragung einer Fucose) bezeichnet. Je nach übertragenem Zucker variiert auch der Nucleotidteil: in Säugern nutzen Galactosyltransferasen z.B. UDP- α -D-Galactose, Fucosyltransferasen (**FucTs**) dagegen GDP- β -L-Fucose (**GDP-Fuc**). Abbildung 1.8 auf der nächsten Seite zeigt eine solche Übertragungsreaktion am Beispiel der enzymatischen Synthese von 2'-Fucosyllactose.

Der enzymatische Zugang zu definierten Glycanstrukturen über den *Leloir pathway* erklärt das enorme Interesse an den dazu notwendigen Nucleotidzuckern. Die Etablierung von Verfahren zur Gewinnung dieser Biomoleküle ist unerlässlich für effektive, enzymatische Oligosaccharid-Synthesen. Aus diesen Erkenntnissen erwuchs auch die Motivation für die vorliegende Arbeit.

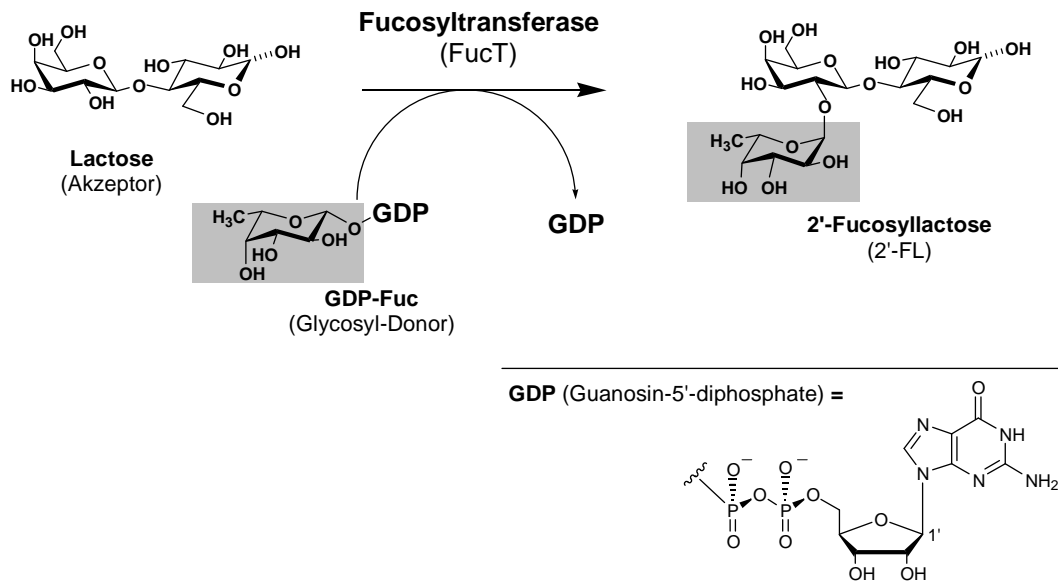


Abbildung 1.8: Der *Leloir pathway* am Beispiel der enzymatischen Synthese von 2'-Fucosyllactose.

Der Fucoseresst des Nucleotidzuckers (grau unterlegt) wird regio- und stereoselektiv auf die terminale Galactose übertragen.

Neben der Verfügbarkeit von GDP-Fuc ist der Zugang zu Fucosyltransferasen notwendig, um fucosylierte Strukturen gezielt aufbauen zu können. Die beiden folgenden Unterkapitel gehen daher abschließend auf die GDP-Fuc-Biosynthese und auf Verfahren zur Darstellung dieses Nucleotidzuckers ein. Zudem werden einige Besonderheiten von Fucosyltransferasen aufgezeigt.

1.4.2 GDP- β -L-Fucose: der Donor

Der Nucleotidzucker GDP-Fuc ist das natürliche Substrat aller bis heute bekannten *Leloir*-Fucosyltransferasen. Die Verfügbarkeit von GDP-Fuc ist damit Voraussetzung für die enzymatische Synthese fucosylierter Strukturen. GDP-Fuc ist noch immer eine schwer zugängliche Verbindung. Dieser Umstand erklärt auch den hohen Preis dieser Substanz. Mit über 90.000 €/g¹ ist GDP-Fuc zudem der mit Abstand teuerste Nucleotidzucker, der heutzutage kommerziell verfügbar ist, weshalb Versuche seiner *in situ* Regenerierung in Multi-Enzym-Systemen gemacht wurden (s. unten).

Es soll an dieser Stelle jedoch auch erwähnt werden, dass GDP-Fuc noch immer als "Forschungschemikalie" angesehen werden muss. Die damit verbundene geringe Nachfrage nach dieser Substanz ist sicherlich auch ein Grund der aktuellen Preise.

¹Katalogpreis Sigma-Aldrich 2003/2004.

Biosynthese der GDP- β -L-Fucose: *de novo* und *salvage pathway*

Es existieren zwei Biosynthesewege für die GDP-Fuc. Sie werden als *de novo* bzw. als *salvage pathway*¹ bezeichnet. Beide Synthesewege wurden in den frühen 1960er Jahren entdeckt [130–133]. In Bakterien, die in der Lage sind, Moleküle zu fucosylieren, wird GDP-Fuc ausschliesslich über die *de novo* Route biosynthetisiert, in Säugern existieren beide Wege nebeneinander. Die beiden Biosynthesewege von GDP-Fuc in einer Säugerzelle sind in Abbildung 1.9 dargestellt.

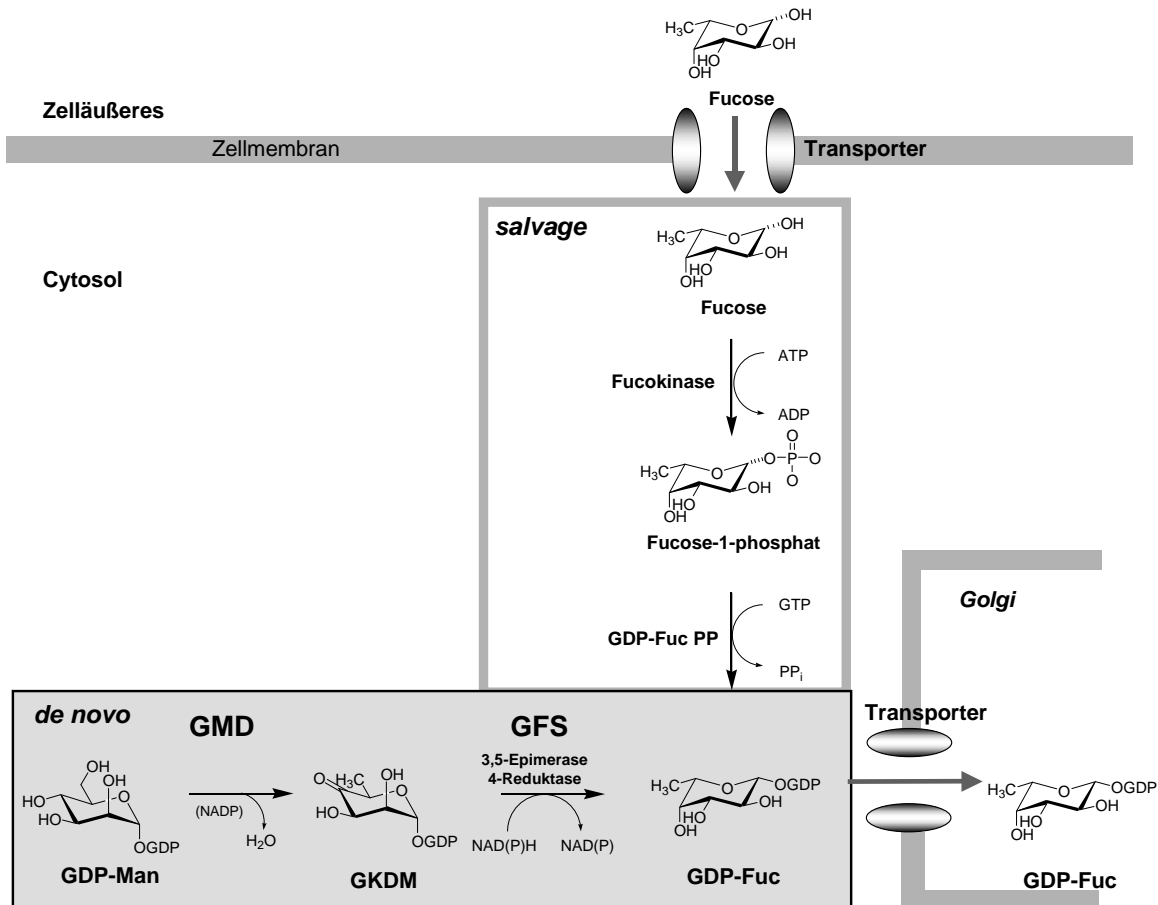


Abbildung 1.9: Biosynthese von GDP- β -L-Fucose über den *de novo* (grau unterlegt) und *salvage pathway* (grau eingrahmt) in einer Säugerzelle [92, 134]. **GMD:** GDP- α -D-Mannose-4,6-Dehydratase, **GFS:** GDP- β -L-Fucose-Synthetase.

Die im Cytosol synthetisierte GDP-Fuc wird zu ihrer weiteren Verwendung - die Fucosylierung komplexer Glycokonjugate durch FucTs - aktiv in den Golgi-Apparat transportiert.

Ausgangspunkt des *de novo* Weges ist der Nucleotidzucker GDP- α -D-Mannose (**GDP-Man**) [131, 135, 136]. Der Biosyntheseweg besteht aus drei enzymatischen Reaktionen, die jedoch nur durch zwei Enzyme katalysiert werden.

Im ersten Schritt findet eine (formale) Dehydratisierung von GDP-Man durch das Enzym GDP- α -D-Mannose-4,6-Dehydratase (**GMD**) statt. Diese Reaktion erfordert die Anwesenheit

¹salvage-work (engl.) = Bergung, Wiederverwertung von Altmaterial

des Cofaktors NADP, jedoch nicht in stöchiometrischen Mengen.¹ Das gebildete Intermediat, die GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose (**GKDM**), ist das Substrat für das zweite, bifunktionelle Enzym, die GDP- β -L-Fucose-Synthetase (**GFS**). Dieses Enzym katalysiert zunächst die 3,5-Epimerisierung von GKDM. Daran anschließend wird die Ketofunktion an Position 4 des Hexoserings durch die Reduktase-Aktivität des Enzyms stereoselektiv zur Alkoholfunktion reduziert [137, 138]. Die zur Bildung der **GDP-Fuc** notwendigen Reduktionsäquivalente liefern reduzierte Nicotinamid-Cofaktoren. Die GFS akzeptiert sowohl NADH als auch NADPH [139, 140]. Die Gene der beiden Enzyme wurden, ausgehend von verschiedenen biologischen Quellen, kloniert.

Eine wichtige Regulierungsstelle des *de novo* Weges ist die GDP- α -D-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD): GDP-Fuc, das Endprodukt des Biosynthesewegs, zeigt eine starke **feedback-Inhibierung** auf die GMD [141]. Diese Inhibierung wird maßgebend bei der Aufstellung eines Synthesekonzepts für GDP-Fuc sein (siehe Kapitel 6).

Der alternative, nur in Säugern existierende Biosyntheseweg der GDP-Fuc ist der *salvage pathway*. Er geht von freier, cytosolischer Fucose aus. Diese stammt entweder aus dem extrazellulären Milieu (z.B. durch Nahrungsaufnahme) oder aus Abbauprozessen von Glycokonjugaten in den Lysosomen der Zelle. Extrazelluläre Fucose wird über spezifische Plasmamembran-Transporter in die Zelle aufgenommen [142]; der Weg der freien Fucose aus den Lysosomen in das Cytosol ist bisher nicht bekannt.

Die cytosolische Fucose wird zunächst durch das Enzym L-Fucose-Kinase (Fucokinase, FK) an der 1-Position phosphoryliert [143]. Das Fucose-1-phosphat ist das Substrat der GDP-Fuc-Pyrophosphorylase (GDP-Fuc PP). Dieses Enzym katalysiert die reversible Synthese von GDP-Fuc ausgehend von Fucose-1-phosphat und GTP [144]. Diese Enzyme wurden auch bereits zur *in situ* Regeneration von GDP-Fuc in Multi-Enzym-Systemen eingesetzt [87, 145].

Aufgrund des *salvage* Biosynthesewegs kann in Zellen, denen die Fähigkeit fehlt, GDP-Fuc aus GDP-Man über den *de novo* Weg zu bilden, wieder eine normale GDP-Fuc-Konzentration erreicht werden, sofern genügend freie Fucose zur Verfügung steht. Dies erklärt, warum ein Teil der LAD II Patienten, die keine fucosylierten Glycokonjugate bilden können, durch orale Verabreichung von L-Fucose therapiert werden kann (vgl. Kapitel 1.3.3). In gesunden Zellen wird GDP-Fuc jedoch hauptsächlich über den *de novo* Weg gebildet, der *salvage* Weg trägt nur einen geringen Beitrag zum intrazellulären GDP-Fuc-Pool bei [146].

Die im Cytosol biosynthetisierte GDP-Fuc wird zu ihrer weiteren Verwendung - dem Aufbau komplexer Glycokonjugate - aktiv in den *Golgi*-Apparat transportiert [147–149]. Defekte in der Funktion dieser Transporter gelten als weitere Ursache bestimmter Formen von LAD II.

Syntheseverfahren zur Herstellung von GDP- β -L-Fucose

Zur **chemischen Synthese** von GDP-Fuc hat sich innerhalb der letzten 30 bis 40 Jahre die Morpholidat-Methode durchgesetzt, die bereits 1961 von Moffatt beschrieben wurde [150]². Diese Methode wurde in der Vergangenheit weiter entwickelt und verbessert [151–156], die wesentlichen Nachteile des Verfahrens blieben jedoch bestehen: arbeiten in wasserfreien organischen Lösungsmitteln, geringe Ausbeuten, Bildung von Anomerengemischen sowie die langen Reaktionszeiten über mehrere Tage. Erst 1997 berichteten Baisch und Öhrlein [157] bzw. Wittmann und Wong [158] von optimierten Synthesewegen. Abbildung 1.10 zeigt das

¹Auf die genauen Reaktionsmechanismen der Enzyme des *de novo* Weges wird in Kapitel 5 eingegangen.

²Diese Publikation beschreibt u.a. die Synthese von GDP-Man und wurde später auch zur Gewinnung von GDP-Fuc eingesetzt.

Prinzip der chemischen GDP-Fuc-Synthese. In Kapitel 8 wird dieses Verfahren hinsichtlich seiner Leistungsfähigkeit bewertet und den enzymatischen Synthesen gegenüber gestellt werden.

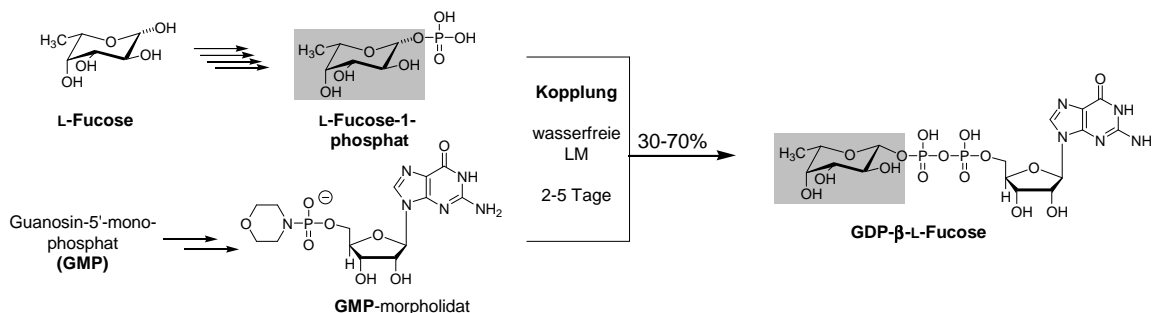


Abbildung 1.10: Prinzip der chemischen Synthese von GDP-Fuc nach der Morpholidat-Methode.

Kernschritt der Synthese ist die Kopplung von Fucose-1-phosphat mit dem GMP-Morpholidat. Der übertragene Fucoserest ist grau unterlegt.

Die **enzymatische Synthese** zur Herstellung von GDP-Fuc ist vielfach publiziert worden. Sowohl die Enzyme des *de novo* als auch diejenigen des *salvage* Weges wurden eingesetzt [159–161]. Da die beiden Enzyme des *de novo pathway* bereits seit Mitte der 1990er Jahre rekombinant zur Verfügung stehen, überwiegen die publizierten Synthesen mit diesen Biokatalysatoren, die in der Regel bakteriellen Ursprungs sind. So sind auch die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Enzyme aus *E. coli* (siehe Kapitel 4).

Von der erfolgreichen Überexpression der *salvage pathway* Enzyme wurde erst 1998 bzw. 2004 berichtet [144, 162]. Da dieser Biosyntheseweg nur in Säugern existiert, gelingt die erfolgreiche, rekombinante Überexpression bis heute nur in Zellkulturen. Der überwiegende Teil der publizierten Synthesen berichtet daher vom Einsatz nicht-rekombinanter Enzyme. Die Verwendung von Zellextrakten aus Schweinedrüsen ermöglicht die Synthese von GDP-Fuc ausgehend von L-Fucose mit Ausbeuten von 16-81% im 50-100 μmol Maßstab [143, 163]. Ähnliche Ausbeuten konnten mit der cytosolischen Fraktion des Protozoen *C. fasciculata* erzielt werden [164].

Erste GDP-Fuc Synthesen unter Einsatz der **Enzyme des *de novo pathway*** wurden in den 1960er Jahren von der Gruppe Ginsburg durchgeführt. Als Enzymquelle dienten Zellextrakte von *Aerobacter aerogenes*. Die Ausbeuten schwankten je nach Ansatzgröße (max. 100 μmol) in einem Bereich von 10-90% [135]. Die niedrigen Ausbeuten bei hohen Substratkonzentrationen lassen sich auf die damals kaum bekannte *feedback*-Inhibierung in diesem System (siehe oben) zurückführen. In einer ähnlichen Synthese diente ein Rohextrakt aus *Agrobacterium radiobacter* als Enzymquelle. Ausbeuten dieser Umsetzung sind nicht publiziert [165]. *In vitro* Synthesen im analytischen Maßstab wurden auch im Rahmen der Klonierung der DNA, die für die humane GDP-α-D-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) codiert, durchgeführt. Angaben über Ausbeuten der Reaktionen wurden ebenfalls nicht publiziert [166].

Die Grundlagen für die präparative *in vitro* Produktion von GDP-Fuc legte im Jahr 2000 die Gruppe um W. Piepersberg [140, 167]. Dort wurden die *de novo* Biosynthesegene aus *E. coli* K-12 kloniert, die rekombinanten Enzyme GMD und GFS erfolgreich in *E. coli* BL21

(DE3) überexprimiert und teilweise aufgereinigt. Die Umsetzung von GDP-Man zu GDP-Fuc im 100 mg Maßstab gelang mit einer isolierten Ausbeute von 78%, wenn das Produkt mit präparativer HPLC aufgereinigt wurde. Aufgrund der *feedback*-Inhibierung der GMD durch GDP-Fuc konnten diese Ausbeuten nur bei sequentiellem Einsatz der Enzyme erzielt werden. Eine Eintopf-Synthese gelang nicht. Das Verfahren zur enzymatischen Herstellung von Guanosindiphosphat-6-desoxyhexosen und deren Verwendung zur Synthese von Oligosacchariden wurde 1999 von der Gruppe Piepersberg in Kooperation mit Roche Diagnostics patentiert [168].

Im Jahr 2000 publizierte die Arbeitsgruppe um S. Koizumi (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Japan) ein neues, nicht-fermentatives Ganzzell-Biotransformationsverfahren zur Produktion von GDP-Fuc [169]. Grundlage des Verfahrens ist der Einsatz von stoffwechselmanipulierten Mikroorganismen: ausgehend von GMP ist ein *Corynebacterium ammoniagenes* in der Lage, GTP zu generieren; die Biosynthese von GDP-Fuc, ausgehend von D-Mannose, gelingt durch Kombination von insgesamt drei rekombinanten *E. coli*-Stämmen. Wird das Verfahren um einen FucT-rekombinanten *E. coli*-Stamm erweitert, so gelingt, unter Zugabe des jeweiligen Akzeptors, auch die direkte Synthese fucosylierter Oligosaccharide. Das Produktionssystem zeigt Abbildung 1.11.

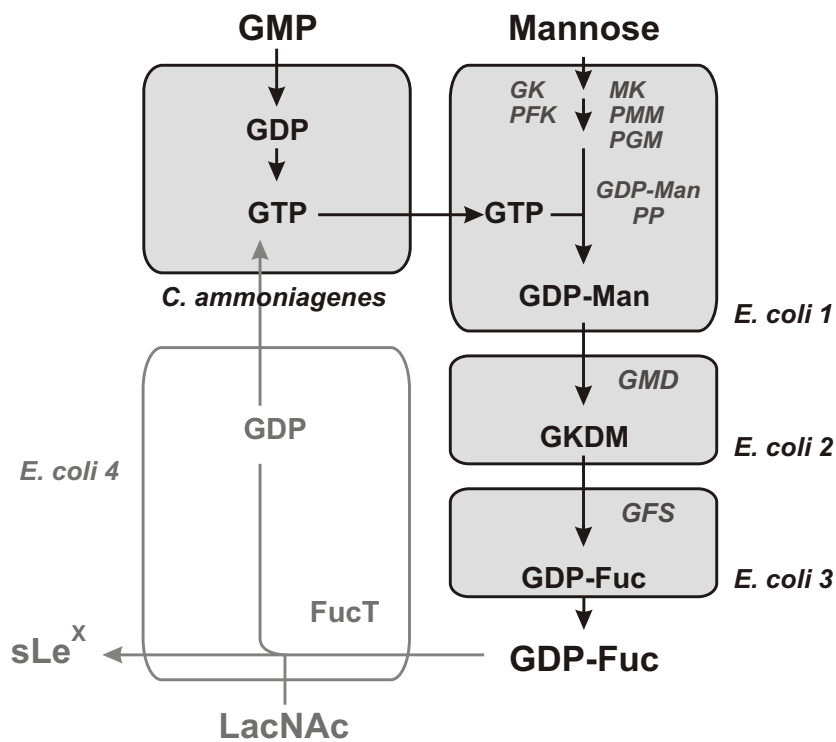


Abbildung 1.11: Schema des GDP-Fuc-Produktionsverfahrens von Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

Das Verfahren wurde bis zum industriellen Pilot-Maßstab entwickelt. Die Erweiterung des Systems zur Synthese fucosylierter Oligosaccharide (z.B. sLe^x) ist hellgrau dargestellt.

Überexprimierte Enzyme: Glucokinase (GK), Phosphomannomutase (PMM), GDP-Man Pyrophosphorylase (GDP-Man PP), Phosphoglucomutase (PGM), Phosphofruktokinase (PFK), GMD, GFS und *H. pylori* α 1,3-FucT.

Auch bei diesem Verfahren muss die *feedback*-Inhibierung der GMD durch GDP-Fuc berücksichtigt werden. In der Eintopfsynthese akkumuliert GDP-Man (28% bezogen auf GMP) und GDP-Fuc wird nur in 11% Ausbeute erhalten. Wird die Reaktion GDP-Man \rightarrow GKDM \rightarrow GDP-Fuc dagegen in zwei Schritten durchgeführt, so können nach 22 h Reaktionszeit 18,4 g/L GDP-Fuc erhalten werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 52% bezogen auf GMP und 17% bezogen auf die eingesetzte Mannose.

Ähnliche mikrobielle Produktionssysteme der Firma Kyowa Hakko konnten auch erfolgreich für die Synthese anderer Nucleotidzucker und Oligosaccharide eingesetzt werden [170]. Publiziert sind die Synthesen von UDP-Gal und Globotriose¹ [171], N-Acetyllactosamin [172], UDP-GlcNAc [173], N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), CMP-Neu5Ac sowie sialylierte Oligosaccharide [83, 174, 175].

Einen anderen Ansatz der GDP-Fuc-Synthese, jedoch auch unter Verwendung der Enzyme des *de novo* Biosynthesewegs, verfolgt seit einigen Jahren die finnische Arbeitsgruppe um Risto Renkonen. Als Produktionsstämme werden rekombinante Hefen (*S. cerevisiae*) eingesetzt. Die Hefezellen besitzen keinen eigenen Fucosestoffwechsel [176], zeigen aber hohe Aktivitäten für Mannosylierungen. In Folge dessen werden im Cytoplasma von *S. cerevisiae* hohe GDP-Man-Konzentrationen gemessen. Die Gewinnung von GDP-Man aus Hefe ist ein seit langem bekanntes Verfahren [177, 178]. Durch Transformation der Hefezellen mit Plasmiden, die für die Enzyme GMD und GFS kodieren, konnte die Arbeitsgruppe die Expression der aktiven Enzyme in den Hefezellen erreichen [179]. Auf diese Weise gelang die intrazelluläre Synthese von GDP-Fuc ausgehend von inherenter GDP-Man des Cytoplasmas. Im Falle der Expression der *E. coli*-Biosynthesegene war die Produktivität der rekombinanten Hefezellen mit 0,2 mg/L Kulturbrühe noch gering. Werden jedoch die klonierten Biosynthesegene aus *H. pylori* in der Hefe verwendet, so kann die Produktivität der Hefezellen, ohne Zusatz von GDP-Man, auf 3,1 g/L gesteigert werden [33].

1.4.3 Fucosyltransferasen: die Katalysatoren

Wie alle Glycosyltransferasen besitzen auch die Fucosyltransferasen (FucTs) eine hohe Substratspezifität, sowohl für den Akzeptor (Oligosaccharid) als auch für den Donor (GDP-Fuc). Diese hohe Selektivität wurde häufig als *one enzyme - one linkage* Konzept bezeichnet. Inzwischen hat sich aber gezeigt, dass für beide - Donor und Akzeptor - eine gewisse synthetische Breite möglich ist. In der Literatur findet sich eine Vielzahl von Arbeiten, die sich mit der enzymatischen Fucosylierung diverser Akzeptoren beschäftigen. Der überwiegende Teil der Publikationen untersucht die Akzeptorspezifität der Enzyme. Wichtige und interessante Referenzen zu diesem Thema sind [157, 180–189]. *Leloir*-Fucosyltransferasen gehören zur Klasse der invertierenden Glycosyltransferasen. Beim Transfer der Fucose-Einheit von GDP- β -L-Fucose auf den Akzeptor findet eine Inversion der Konfiguration am anomeren Zentrum der L-Fucose statt [190], so dass eine α -Verknüpfung der Fucose im Produkt vorliegt. Entsprechend werden alle bis heute bekannten *Leloir*-FucTs als α -FucTs bezeichnet. Im Humangenom wurden bislang die Gene für 13 FucTs mit unterschiedlichen Funktionen identifiziert [55], in *H. pylori* sind bisher lediglich drei α -FucTs bekannt [189] (siehe auch Kapitel 4).

Trotz identischer Funktionalität unterscheiden sich die Säuger- von den bakteriellen Enzymen wesentlich in ihrer Struktur und Organisation. Die Säuger- und damit auch die humanen Enzyme sind im *Golgi*-Apparat und im endoplasmatischen Retikulum als membranständige

¹Globotriose = Gal α 1,4Gal β 1,4Glc

Proteine lokalisiert, jedoch existieren auch lösliche Enzymformen in Blut oder Sekreten [191]. Die bakteriellen FucTs befinden sich im Cytoplasma. Es wird jedoch vermutet, dass sie membran-assoziiert vorliegen. Abbildung 1.12 zeigt schematisch die allgemeine Struktur eines Säuger-Enzyms und einer FucT aus *H. pylori*.

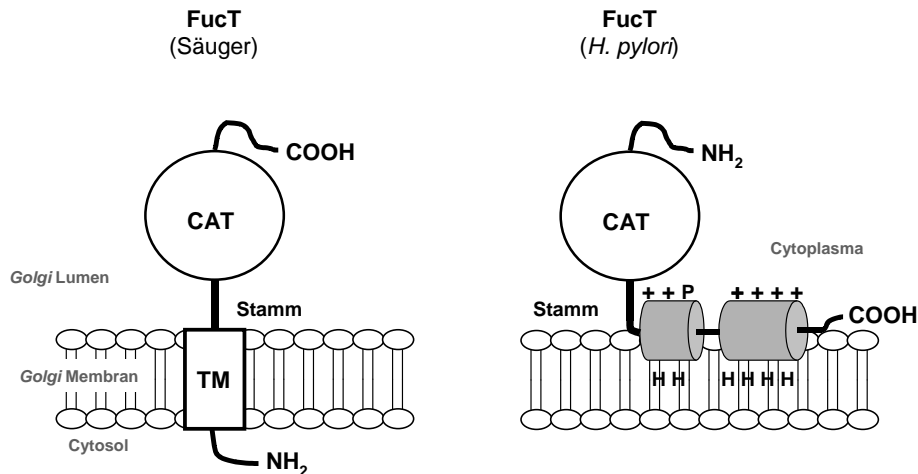


Abbildung 1.12: Schematische Strukturen einer FucT aus Säugern (**links**) und aus *H. pylori* (**rechts**) [189].

CAT = katalytische Domäne, *TM* = Transmembrandomäne, + = positiv geladene Aminosäurereste, *H* = hydrophobe Reste, *P* = polarer Rest.

Die Fucosyltransferasen aus Säugern bestehen aus einer kurzen N-terminalen, cytosolischen Sequenz, einer Transmembrandomäne (TM), einer kurzen Stammregion und einer großen C-terminalen, katalytischen Domäne. Der N-terminale Teil der Enzyme ist für die katalytische Aktivität nicht notwendig, weshalb rekombinante FucTs in löslicher, auf die katalytische Domäne reduzierter Form, exprimiert werden können [127, 192].

Die bakteriellen FucTs bestehen aus einer membran-assoziierten C-terminalen Domäne, einer kurzen Stammdomäne und einer großen N-terminalen, katalytischen Domäne [189]. Zur Assoziation an die Zellmembran trägt die C-terminale Domäne sowohl hydrophobe als auch positiv geladene Aminosäurereste. Auf diese Weise wird eine starke Bindung an die Phospholipide der Zellmembran erreicht. Es ist weitgehend unbekannt, welchen Einfluss die Einführung verschiedener *tags* (N-terminal oder C-terminal) zur einfachen Aufreinigung der bakteriellen Enzyme auf die Enzymaktivität und -stabilität haben.¹

¹persönliche Mitteilung von Dr. S. Koizumi, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

2 Motivation und Zielsetzung

Die Ziele dieser Arbeit können in zwei große, eng miteinander verbundene Themenbereiche gegliedert werden.

Die wesentliche Motivation der Arbeit zielt auf ein für die Synthese von GDP-Fuc notwendiges Verständnis der einzusetzenden Biokatalysatoren des *de novo* Wegs und soll die Frage beantworten, welche Möglichkeiten der Reaktionsführung sich aufgrund der Besonderheiten dieses Biosyntheseweges ergeben. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen und die daraus entstandenen Folgerungen aus Sicht der Reaktionstechnik stehen im Mittelpunkt der Arbeit.

Weiterhin ist es das Ziel, die enzymatische Synthese von GDP-Fuc mit der Fucosyltransferase (FucT)-Reaktion zu koppeln. Auf diese Weise soll der Aufbau fucosylierter Oligosaccharid-Strukturen, ausgehend von GDP-Man und einem Akzeptor, in einer Eintopf-Reaktion gelingen. GDP-Fuc wird dabei *in situ* gebildet.

2.1 Bioreaktionstechnik der GDP-Fuc-Synthese

Das Verständnis der beiden Enzyme GMD und GFS und ihrer Kinetiken sind Voraussetzung zur Aufstellung von Konzepten, die eine effektive Synthese von GDP-Fuc erlauben. Neben der Notwendigkeit, eine robuste Analytik zur Verfolgung der Reaktionen zu etablieren (Kapitel 3) sowie einen sicheren Zugang zu den rekombinanten Enzymen im *pilot scale* zu erhalten (Kapitel 4), steht die kinetische und reaktionstechnische Charakterisierung der Enzyme im Mittelpunkt der Arbeit (Kapitel 5). Hier gilt es, den natürlichen Biosyntheseweg, den *de novo-pathway*, ausgehend von der GDP-Man sinnvoll, d.h. unter Berücksichtigung wichtiger Systemeigenschaften, für die präparative Synthese von GKDM und GDP-Fuc zu nutzen. Dabei stellt sich vor allem die Frage, welchen Einfluss die Cofaktoren auf die Enzymaktivitäten haben, da an beiden Reaktionen Nicotinamid-Cofaktoren beteiligt sind. Ziel ist es, Synthese-Methoden aufzuzeigen, die die starke *feedback*-Inhibierung der GMD durch GDP-Fuc maßgeblich berücksichtigen und die Enzymaktivitäten optimal ausnutzen (Kapitel 6). Synthese-Strategien müssen zusätzlich eine einfache Aufarbeitung und Isolierung des Produkts bzw. der Produkte ermöglichen. Aus diesem Grund sollen Untersuchungen zur Aufreinigung der GDP-Fuc im kleineren Umfang durchgeführt werden. Hier können die Arbeiten an Erfahrungen des Instituts für Biotechnologie im Bereich der Gewinnung von Nucleotidzuckern anknüpfen. Die Ziele der Arbeit, die, basierend auf dem Verständnis der beiden Enzyme, auf die Prozessentwicklung einer enzymatischen Synthese von GDP-Fuc ausgerichtet sind, werden durch die Abbildung 2.1 auf der nächsten Seite graphisch formuliert.

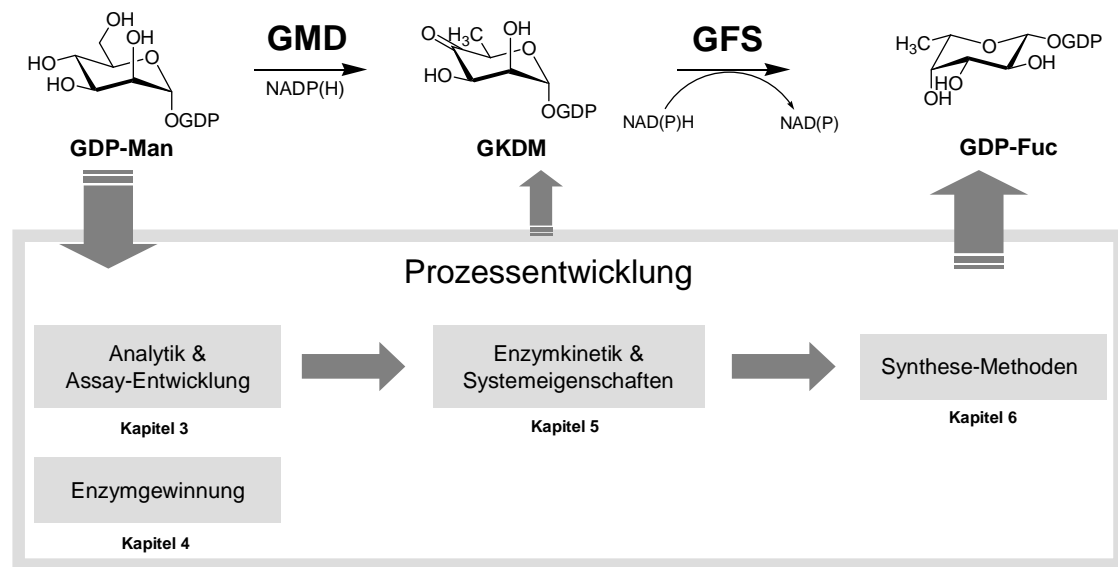


Abbildung 2.1: Schritte zur Prozessentwicklung der enzymatischen GDP-Fuc-Synthese. Ausgehend von GDP-Man sollen die Produkte GKDM und GDP-Fuc zugänglich gemacht werden.

2.2 Fucosylierung durch *in situ* Generierung von GDP-Fuc¹

Alle bisher bekannten *Leloir*-Fucosyltransferasen (FucTs) benötigen GDP-Fuc als Donorsubstrat. Die Enzyme übertragen einen Fucoserest regio- und stereoselektiv auf einen Akzeptor. Es erscheint daher sinnvoll, die Generierung der GDP-Fuc mit dem Transfer der Fucose auf einen Akzeptor zu koppeln. Das Substrat der FucT wird dabei *in situ* erzeugt. Eine solche "Eintopf-Reaktion" ermöglicht die Synthese fucosylierter Strukturen ausgehend von der GDP-Man. Auf diesem Wege würde die starke *feedback*-Inhibierung der GMD umgangen.

Auf die Fucosylierung verschiedener Oligosaccharide - ausgehend von der GDP-Man- wird in Kapitel 7 eingegangen. Die Gewinnung einer rekombinanten α 1,2-FucT aus *Helicobacter pylori* wird in Kapitel 4 beschrieben. Abbildung 2.2 auf der nächsten Seite zeigt das Konzept der Reaktionskopplung.

¹Diese Arbeiten wurden zu einem großen Teil während eines Forschungsaufenthalts bei der Firma Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. in Tokio (Japan) im Frühjahr 2002 durchgeführt. Die Arbeitsgruppe unter der Leitung von Dr. Satoshi Koizumi beschäftigt sich neben der enzymatischen Synthese von Nucleotidzuckern vor allem mit der Identifizierung und Anwendung neuer Glycosyltransferasen.

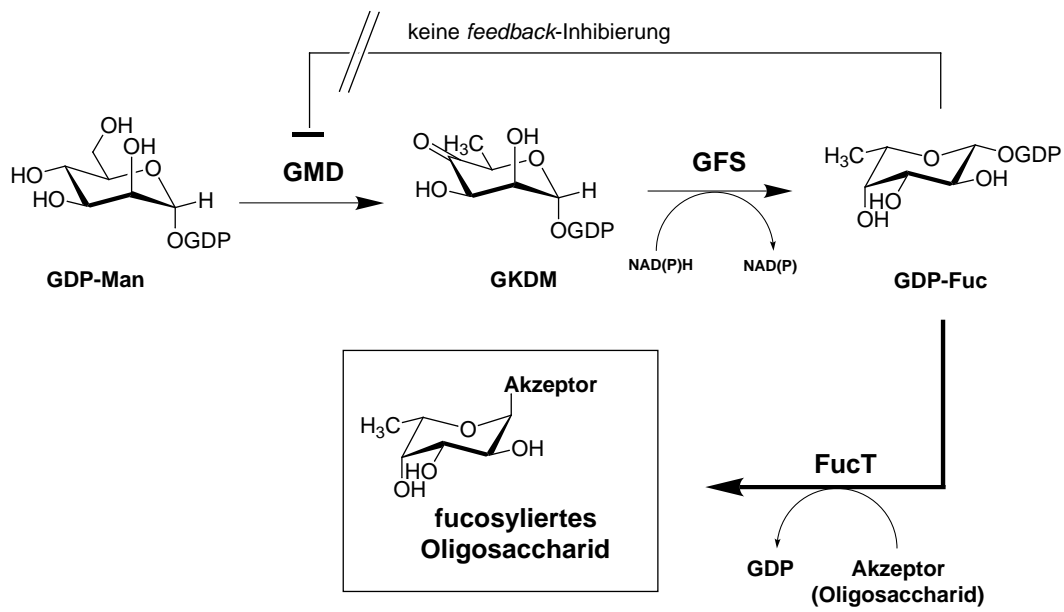


Abbildung 2.2: Konzept der "Eintopf-Synthese" fucosylierter Oligosaccharide.

3 Analytische Methoden

In diesem Kapitel werden die analytischen Methoden vorgestellt, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt und eingesetzt wurden, um die interessierenden, enzymatischen Reaktionen zu verfolgen. Ausgehend von dem bereits vorgestellten Reaktionssystem der GDP-Fuc-Synthese wird aufgezeigt, welche Möglichkeiten der instrumentellen Analytik aufgrund der Eigenschaften der Nucleotidzucker und der an den Reaktionen beteiligten Cofaktoren genutzt werden können. Der Schwerpunkt dieses Kapitels liegt hierbei auf der Methodenentwicklung in der Kapillarelektrophorese (CE) durch Anwendung eines genetischen Algorithmus (GA). Diese Untersuchungen mündeten in der Etablierung eines geeigneten, schnellen Enzymassays für die GMD-Reaktion.

3.1 Das Reaktionssystem aus analytischer Sicht

Um enzymatisch katalysierte Reaktionen verfolgen zu können, kommen meist analytische Methoden zum Einsatz, die auf dem (instrumentellen) Nachweis von Substrat bzw. Produkt beruhen. Eine Methode zur Bestimmung einer Enzymaktivität sollte folgenden Ansprüchen genügen:

- die Methode sollte keine (radioaktiv) markierten Substanzen benötigen (direkter Nachweis),
- die Methode muss möglichst schnell sein (Ideal: Echtzeit-Methode bzw. *online*-Messung)
- die Methode muss reproduzierbare Ergebnisse liefern.

Im Rahmen dieser Arbeit spielten diese Punkte die maßgebliche Rolle. Um diese Anforderungen an eine analytische Methode auf das Reaktionssystem der enzymatischen GDP-Fuc-Synthese übertragen zu können, stand bei der Etablierung einer geeigneten instrumentellen Analytik das Reaktionssystem selbst zunächst im Mittelpunkt. Abbildung 3.1 auf der nächsten Seite zeigt das System zur enzymatischen Synthese der GDP-Fuc ausgehend von der GDP-Man.

Wie bereits in Kapitel 1 erwähnt, besitzen die Cofaktoren in beiden Enzymreaktionen unterschiedliche Funktionen. Bei der GMD-Reaktion wird der Cofaktor NADP **nicht** in stöchiometrischen Mengen benötigt. Bei der anschließenden Umsetzung der Ketoverbindung zur GDP-Fuc durch die GFS sind die Cofaktoren NADH bzw. NADPH dagegen als Reduktionsäquivalente für die Reduktase-Aktivität dieses bifunktionellen Enzyms notwendig (siehe Abbildung 1.9 auf Seite 15). Da die beiden Cofaktoren eine Absorption elektromagnetischer Strahlung der Wellenlänge 340 nm nur in ihren reduzierten, nicht jedoch in den oxidierten Zuständen aufweisen, ist eine Verfolgung der GFS-Reaktion durch Messung der Absorption

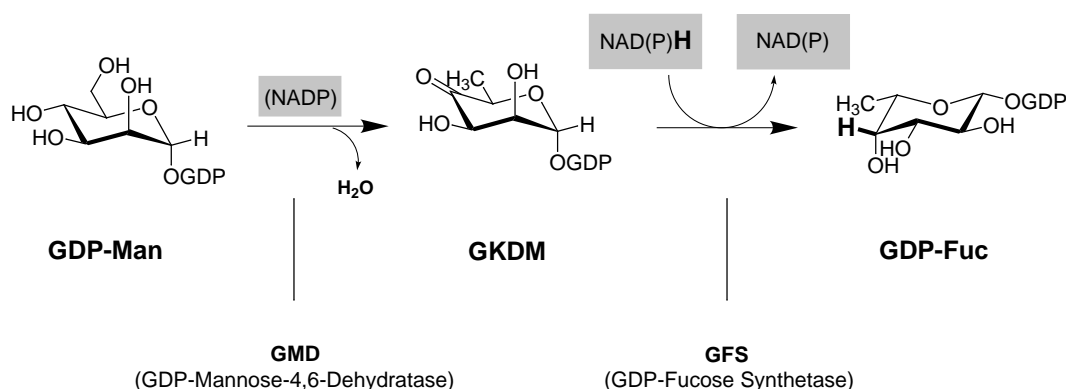


Abbildung 3.1: Das Reaktionssystem und beteiligte Cofaktoren aus analytischer Sicht.

bei dieser Wellenlänge in Echtzeit möglich. Die Enzymaktivität kann daher photometrisch bestimmt werden¹. Die Methode wurde zur Messung der GFS-Aktivität eingesetzt.

Alle enzymatischen Reaktionen, die NADH bzw. NADPH bilden oder verbrauchen, können auf diese Weise verfolgt werden. Für die GFS-Reaktion ist diese Analyseverfahren bereits in der Literatur beschrieben [130, 139, 140, 193, 194].

Da die Bestimmung der GMD-Aktivität auf analoge Weise nicht gelingt, muss zur Etablierung eines enzymatischen Assays auf andere Methoden zurückgegriffen werden. Substrat und Produkt der GMD-Reaktion zeigen annähernd identische UV-Spektren, da die UV-Absorptionseigenschaften der Verbindungen maßgeblich durch den Nucleotidteil des Moleküls (GDP) bestimmt werden. Dennoch sind in der Literatur Methoden publiziert worden, die die Bestimmung der GMD-Aktivität erlauben. Die wichtigsten Methoden sollen zunächst kurz vorgestellt werden. Anschließend wird begründet, warum diese Enzymassays den Anforderungen nicht genügen und die Entwicklung eines eigenen GMD-Assays mit der Kapillarelektrophorese erforderlich war.

Die bekannten Verfahren zur Bestimmung der Aktivität der GMD basieren auf Eigenschaften sowohl des Produktes, der GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose, wie auch auf den Besonderheiten des Reaktionsmechanismus. Wie in Kapitel 1 erwähnt, wurde der Biosyntheseweg der GDP-Fuc ausgehend von der GDP-Man bereits in den frühen 1960er Jahren entdeckt [130, 131, 135, 141]. Die damaligen Analysemethoden, die auch noch später Anwendung fanden [138, 166, 195], beruhten vor allem auf der Papier- bzw. der Dünnschicht-Chromatographie. Das gebildete Ketoprodukt (GKDM) wurde dabei zunächst mit NaBH₄ oder Rh/H₂ chemisch reduziert und die entstandenen Produkte durch Vergleich mit Standards identifiziert. Diese Vorgehensweise eignet sich zur Aufklärung des Syntheseweges, jedoch ist ihr Einsatz zur Messung von Reaktionsgeschwindigkeiten zu aufwendig und ungenau. Zudem benötigt diese Analyseverfahren hohe Substanzmengen.

In dieser Zeit und später in den 1980er Jahren wurden zwei Methoden zur Messung der GMD-Aktivität publiziert, die nicht mehr auf der Papier-Chromatographie basierten. Abbildung 3.2 auf der nächsten Seite und Abbildung 3.3 auf Seite 28 zeigen das Prinzip der beiden Methoden, die als *Alkali-* und *Tritium-*Methode bezeichnet werden können [141, 196–198].

¹Die Bedingungen des GFS-Enzymassays finden sich in Kapitel 10 und werden auch in der Diplomarbeit von Frau Dipl.-Chem. Andrea Rentmeister ausführlich beschrieben.

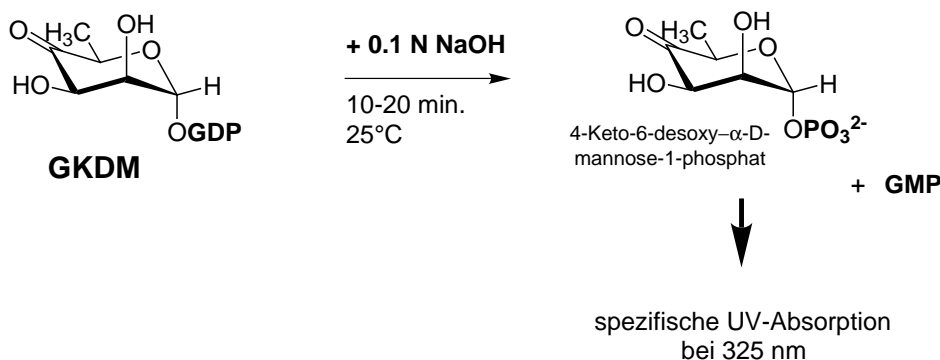


Abbildung 3.2: Alkali-Methode zur Bestimmung der GMD-Aktivität.

Bei der *Alkali*-Methode (Abbildung 3.2) wird das gebildete Produkt GKDM mit 0.1 N NaOH zunächst in 4-Keto-6-desoxy- α -D-mannose-1-phosphat und GMP gespalten. Das 1-Phosphat zeigt im Gegensatz zur GDP-Man wie auch zum Mannose-1-Phosphat eine charakteristische, sekundäre UV-Absorption mit einem Maximum bei 325 nm [197]. Diese Absorption kann bei dem phosphorylierten Zucker wie auch, in geringerem Umfang, bei GKDM beobachtet werden. In 0.1 N HCl ist eine solche Absorption nicht detektierbar. Bedingung für dieses Absorptionsverhalten ist das Vorhandensein der Ketogruppe an der C-4-Position sowie einer Phosphatgruppe an der 1-Position [196].

Zwar zeigen sowohl der Nucleotidzucker GKDM als auch das 1-Phosphat die Sekundärabsorption, die entsprechenden spezifischen Absorptionskoeffizienten sind jedoch nicht publiziert und die Berechnung einer Konzentrationsänderung damit nur relativ zu einer Referenzprobe möglich. Die nicht phosphorylierte 4-Keto-6-desoxy- α -D-mannose zeigt keine Absorption bei 325 nm, jedoch kann unter den basischen Bedingungen nicht ausgeschlossen werden, dass das Monosaccharid auch unphosphoryliert vorliegt. Dieser Endpunkt-Assay benötigt zudem eine lange Zeit für die Probenvorbereitung. Aufgrund der Instabilität der Substanzen in 0.1 N NaOH können die Proben außerdem nur wenige Male vermessen und nicht stabil gelagert werden.

Die *Tritium*-Methode (Abbildung 3.3 auf der nächsten Seite) basiert auf der Tatsache, dass während des Katalyse-Zyklus ein Äquivalent Wasser aus dem Mannose-Ring der GDP-Man austritt [198]. Bei dieser Dehydratisierung verliert die Mannose ein Proton an der C-5 Position, welches im weiteren Verlauf des Reaktionszyklus wieder aus dem Lösungsmittel aufgenommen wird. Während eines Zyklus wird an dieser Position also ein Proton ausgetauscht. Das freigesetzte Proton der GDP-Man wird dabei zunächst an einer Aminosäure des *active site* gebunden und anschließend an das Lösungsmittel (Wasser) abgegeben [199, 200]. Auf diese Weise wird im Laufe der Reaktion [^3H]-markiertes Wasser freigesetzt, welches quantifiziert werden kann.

Es ist offensichtlich, dass auch die *Tritium*-Methode ungeeignet für eine schnelle und einfache Bestimmung der GMD-Aktivität ist. Besonders der Einsatz von [^3H]-markierter GDP-Man und die damit verbundene Notwendigkeit, dieses Substrat chemisch zugänglich zu machen, lassen einen solchen Enzymassay auch aus Kostengründen als wenig sinnvoll erscheinen. Die hohe Spezifität des Assays wie auch seine gute Reproduzierbarkeit machen ihn aber interessant für den Einsatz in metabolischen Studien, etwa zur Bestimmung sehr geringer GMD-Aktivitäten in Geweben verschiedener Säuger. Hier ist diese Methode auch dem photometrischen oder

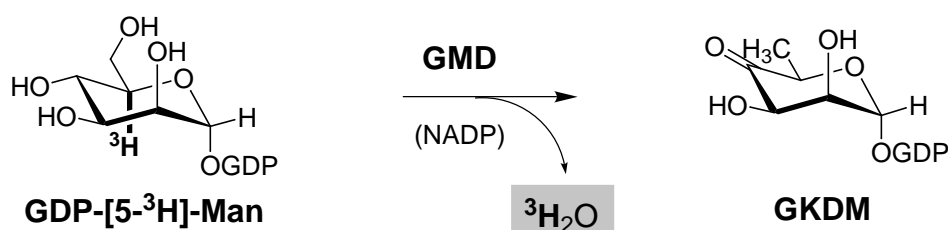


Abbildung 3.3: Tritium-Methode zur Bestimmung der GMD-Aktivität.

Papier-chromatographischen Assay überlegen [198].

Diese Ausführungen zeigen, dass zur Bestimmung der GMD-Aktivität ein Enzymassay etabliert werden musste, welcher einfach und schnell durchgeführt werden konnte und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Neben der HPLC¹ hat auch die Kapillarelektrophorese an Bedeutung in der Analytik gewonnen [201–203]. Auf die Kapillarelektrophorese (CE) wird kurz im folgenden Abschnitt 3.2 eingegangen. Die Kapillarelektrophorese (CE) wird zusammen mit der Kapillarelektrochromatographie (CEC)² als eine zur HPLC *related technique* bezeichnet [201].

3.2 Genetische Algorithmen zur Methodenentwicklung in der Kapillarelektrophorese³

3.2.1 Die Kapillarelektrophorese (CE)

Seit Beginn der 1980er Jahre hat die Kapillarelektrophorese (CE) als alternative und ergänzende Technik zu der HPLC immer mehr an Bedeutung gewonnen [202, 203, 206–208] und entwickelte sich zu einer routinemäßigen Analysemethode für eine Vielzahl verschiedener Substanzklassen, insbesondere in der pharmazeutischen und pharmakologischen Forschung [203, 209–211].

Hier soll das grundlegende Prinzip der kapillarelektrophoretischen Trennung angesprochen werden; weiterführende Monographien sind z.B. [212] und [213]. Der schematische Aufbau einer CE-Apparatur ist in Abbildung 3.4 auf der nächsten Seite gezeigt. Die dünne Quarzkapillare (25-100 μm Durchmesser) mit einer Länge von 20 bis 100 cm überbrückt die beiden Puffergefäße, zwischen denen eine Spannung von bis zu 40 kV angelegt wird. Ein kleiner Proben tropfen (einige nL!) wird am anodischen Ende der Kapillare aufgegeben. Dazu taucht das Kapillarendende in die Probelösung.

Die angelegte Spannung bewirkt die Migration der Probenzonen⁴. Die Migration ist proportional zum Verhältnis aus Masse zu Ladung der Analyten. Kleine, hoch geladene Teilchen werden im elektrischen Feld stärker beschleunigt als große, wenig geladene Teilchen. Der elektrophoretischen Wanderung ist ein elektroosmotischer Fluß (EOF) überlagert, der passiv zum Transport der Probenzonen beiträgt. Der EOF hängt stark vom pH-Wert des Puffers (Faust-

¹engl.: *High Performance Liquid Chromatography*

²Bei der Elektrophorese ist die Kapillare lediglich mit Trennpuffer gefüllt. Bei der Elektrochromatographie enthält die Trennkapillare zusätzlich noch eine stationäre Phase.

³Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden teilweise in Zusammenarbeit mit den Herren Dr. Arne Buchholz und Dr. Lasse Greiner publiziert [204] und patentiert [205].

⁴Da bei dieser Technik die Analyte als diskrete Zone in die Kapillare aufgegeben werden und als Zonen in der Kapillare wandern, wird sie auch als Kapillarzonenelektrophorese (CZE) bezeichnet.

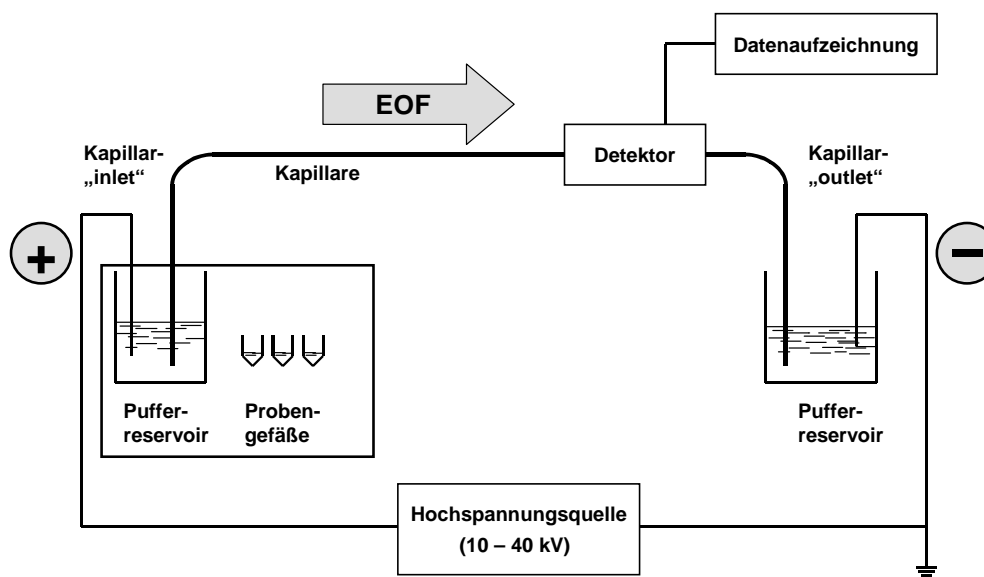


Abbildung 3.4: Schematischer Aufbau einer CE-Apparatur.

regel: hoher pH = hoher EOF) und von den Eigenschaften der Kapillaroberfläche ab. Er kann so groß sein, dass nicht nur neutrale Moleküle, sondern selbst negativ geladene Teilchen entgegen ihrer elektrophoretischen Migration zum Detektor transportiert werden. Dieser Effekt wird auch für die zu trennenden Nucleotidzucker beobachtet. Da der EOF in der Regel in Richtung Kathode verläuft, ist der Detektor üblicherweise in der Nähe des Kathodenraumes angebracht¹. In der Literatur sind neben der üblichen UV-Detektion vor allem die Massenspektrometrie [214], die elektrochemische Detektion [215] und die Laser-induzierte Fluoreszenz von Bedeutung [216]. Für die Nucleotidzucker erfolgt die Detektion durch Messung der UV-Absorption im Wellenlängenbereich zwischen 250-260 nm (siehe Kapitel 3.2.3).

Auf die Diskussion erweiterter Techniken wie die Kapillar-Elektro-Chromatographie (CEC) oder die micellare elektrokinetische Kapillarchromatographie (MECC) wird hier verzichtet. Hierzu soll auf einschlägige Literatur verwiesen werden [212, 213]. Diese Variationen der CE-Technik vergrößern das vorhandene Spektrum der analytischen Möglichkeiten und werden je nach Substanzklasse und analytischem Trennproblem eingesetzt. Die Möglichkeiten der CE sind sehr vielfältig und ihre wesentlichen Vorteile (kurze Analysezeiten, geringe Probenmengen) lassen sie als geeignete Analysemethode zur Verfolgung der Reaktionen der GDP-Fuc-Synthese erscheinen.

3.2.2 Anwendung des genetischen Algorithmus

Wie zu Beginn dieses Kapitels erläutert, war es Ziel dieser Methodenentwicklung, einen schnellen *offline*-Enzymassay zur Messung der GMD-Reaktion zu etablieren. Jedoch gab es einige Einschränkungen und Überlegungen, die die Methodenentwicklung beeinflussten:

- zu Beginn der Untersuchungen stand das Zwischenprodukt (GKDM) noch nicht zur

¹Bei den üblichen kommerziellen CE-Geräten kann die Trennungsspannung leicht umgepolt werden, so dass sich je nach Anwendung der Detektor dann in der Nähe des Anodenraumes befindet.

Verfügung,

- ein geeigneter interner Standard war nicht bekannt,
- trotz des Photometer-Assays für die GFS-Reaktion sollte eine alternative Analytik zur Verfolgung dieser Reaktion bereitgestellt werden.

Das Auffinden einer CE-Methode, die *ausschliesslich* auf die Trennung von GDP-Man und GKDM, d.h. Substrat und Produkt der GMD-Reaktion, zielt, war somit nicht möglich. Zur Untersuchung des Reaktionssystems der enzymatischen GDP-Fuc-Synthese sollte eine ideale CE-Methode in der Lage sein, alle relevanten Substanzen trennen und quantifizieren zu können. Neben der GDP-Man und den Produkten GKDM und GDP-Fuc sollten auch die Cofaktoren (NADP und NADPH) ebenso wie die Nucleotide GMP, GDP und GTP quantifizierbar sein. Die Nucleotide GMP und vor allem GDP sind Zerfallsprodukte von GKDM, GTP ist ein Substrat der enzymatischen GDP-Man Synthese [217–219]. Da eine Optimierung mit Hilfe eines genetischen Algorithmus viele Parameterkombinationen und damit eine große Menge an CE-Methoden zur Verfügung stellen wird (siehe unten), kann am Ende der erfolgten Optimierung eine Methode gewählt werden, die für die Bestimmung der GMD-Aktivität am besten geeignet ist.

Neben diesen Überlegungen sollte mit den Untersuchungen auch gezeigt werden, dass die Optimierung einer analytischen Methode durch Anwendung eines genetischen Algorithmus eine generell anwendbare Vorgehensweise für die Methodenentwicklung in der Kapillarelektrophorese sein kann.

Warum aber ist es sinnvoll, für die Methodenentwicklung in der CE einen genetischen Algorithmus anzuwenden? Die Vorteile der CE rühren besonders daher, dass eine Vielzahl von Parametern verändert werden kann, die einen Einfluss auf die Trenngüte einer analytischen Methode haben. So können etwa die Trennspannung, die Dimensionen und Materialeigenschaften der Kapillaren, die Pufferzusammensetzung, der pH-Wert und die Temperatur variiert werden. Die meisten Parameter können bequem über die Einstellungen der Software eines CE-Gerätes festgelegt werden. Die große Varianz der Parameter stellt aber auch eine große Herausforderung an die Methodenentwicklung dar: die Auswirkung auch nur eines einzigen variierten Parameters auf die Trenngüte ist in solch einem Multiparameter-System kaum vorhersagbar. Da die verschiedenen Trennmechanismen in der CE noch nicht genau verstanden sind, gibt es mehrere, oft sehr individuelle Strategien, effiziente Trennmethoden zu erhalten [220]. Ein Verständnis der Trennmechanismen würde zu idealen Trennmethoden führen, die auf Basis eines entsprechenden Modells erklärt werden könnten. Da diese Untersuchungen aber nur mit enormen praktischen und theoretischen Aufwendungen durchzuführen sind, muss auf rein empirische Optimierverfahren zurückgegriffen werden. Die Methodenentwicklung stellt sich damit als eine **black box-Optimierung** dar. Der genetische Algorithmus ist ein sehr effektives Werkzeug zur Optimierung solcher nichtlinearer Multiparameter-Systeme.

Einführung

Genetische Algorithmen beruhen auf den Prinzipien der natürlichen Evolution, die 1953 von J.D. Watson und F.H.C. Crick auf molekularer Ebene nachvollzogen werden konnten [221]. Erst 1962 nutzte J.H. Holland diese Optimierungsstrategie und übertrug sie auf künstliche Systeme [222]. Sein Ziel war es, Computerprogramme zu entwickeln, die sich durch adaptives Verhalten in willkürlichen Umgebungen zurecht finden. Eine Optimierung von Systemen mit

Hilfe genetischer Algorithmen ist universell anwendbar. Auch in der Biotechnologie gibt es zahlreiche Beispiele der Anwendung wie z.B. die Optimierung von Nährmedien [223, 224] und enzymatischen Synthesen [225, 226], Simulationen der Proteinfaltung [227, 228] sowie die computergestützte Modellierung von Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen [229, 230]. Die Monographie von D.E. Goldberg [231] sowie der Artikel von J.H. Holland [222] bieten einen guten Einstieg in die Thematik.

Codierung

In der Natur wird die genetische Information durch den Vier-Buchstaben Code entsprechend den vier Basen der DNA (A,T,G und C)¹ bestimmt. Das gesamte genetische Material eines Individuums, der Genotyp, wird in langkettigen DNA-Molekülen gespeichert und bestimmt dessen Aussehen, d.h. seinen Phenotyp. Einzelne Abschnitte auf diesen Molekülen, die Gene, codieren dabei für bestimmte Eigenschaften oder Funktionen.

Im Gegensatz zur Natur werden die Individuen bei genetischen Algorithmen binär codiert. Die variablen Parameter entsprechen dabei einzelnen Abschnitten auf einem *bit string*. Auf diese Weise können mehrere Parameter in einem *string* codiert werden. Im Falle der Methodenentwicklung entspricht daher ein bestimmter *string* einem Individuum und damit einer analytischen Methode.

Zielfunktion

Die Trenngüte der Methoden wurde durch Anwendung der Gleichung 3.1 quantifiziert. Ein hoher Wert dieser Größe bedeutet eine hohe Trenngüte. Diese Zielfunktion ist das Selektionskriterium der Optimierung. Nach dieser Gleichung wurden die einzelnen Individuen, d.h. die jeweiligen analytischen Methoden, bewertet.

$$\text{Trenngüte} = \underbrace{\left(\sum_{i=1}^{n-1} \frac{t_n}{t_i} + \sum_{i=1}^{n-2} \frac{t_n}{t_i} + \dots + \frac{t_2}{t_1} \right)}_{\text{Summe der relativen Migrationszeiten}} \cdot \underbrace{\sum_{i=1}^n \text{TP}_i}_{\text{Theoretische Böden}} \quad (3.1)$$

Hier sind: n = Peakanzahl; t_i = Retentionszeit des Peaks i und TP_i = Anzahl der theoretischen Böden.²

Durch diese Definition der Trenngüte werden auch Methoden berücksichtigt, die nur einen Teil der Substanzen trennen. Dennoch werden diese Methoden stark diskriminiert, da die Peakanzahl durch Multiplikation der theoretischen Böden mit den relativen Migrationszeiten stark gewichtet wird. Die maximale Analysezeit wurde auf 30 min. festgesetzt. Lediglich Peaks, die innerhalb dieser Zeit detektiert werden konnten, wurden zur Berechnung der Trenngüte berücksichtigt.

Variationsparameter

Insgesamt wurden bei dieser Optimierung sechs Parameter variiert, von denen anzunehmen war, dass sie einen starken Einfluss auf die Trenngüte haben. Die Parameter waren: Temperatur der Kapillare, Trennspannung, pH-Wert des Puffers, Pufferkonzentration, Anteil an

¹A = Adenin, T = Thymin, G = Guanin und C = Cytosin.

²theoretische Böden berechnet nach: $\text{TP}_i = 16(t_i/W)^2$ mit W = Peak-Halbwertsbreite.

Phosphat im Trennpuffer und die Cyclodextrin (CD)-Konzentration. In Tabelle 3.1 sind die Parameter zusammen mit ihren Variationsbreiten und der Anzahl der jeweiligen *bits* angegeben. Die Zahlen in Klammern kennzeichnen die Anzahl der verschiedenen Werte, die ein Parameter annehmen kann. Die Multiplikation dieser Zahlen ergibt die maximal mögliche Zahl analytischer Methoden in diesem Parameterraum (32420 mögliche Experimente). Auf die Wahl der einzelnen Parameter soll nun kurz eingegangen werden.

Parameter	Einheit	Variations- breite	Schrittweite		bits
Temperatur	°C	16 – 48	8	(5)	3
Trennungsspannung	kV	10 – 30	10	(3)	2
Puffer pH	–	6 – 9	0,5	(7)	3
Pufferkonzentration ^a	mM	50 – 200	50	(4)	2
Anteil Phosphat	%	0 – 100	10	(11)	4
DIME- β -CD Konzentration	mM	0 – 30	5	(7)	3

^aSumme aus Borat- und Phosphatpuffer

Tabelle 3.1: Parameter und ihre Variationsbreiten.

Die beiden Nucleotidzucker GDP-Man und GDP-Fuc unterscheiden sich kaum in ihren chemischen und elektrophoretischen Eigenschaften. Dies ist zum einen auf den gemeinsamen Nucleotidteil und andererseits auf die ähnliche Struktur des Hexoserings zurückzuführen. Dennoch sind bereits analytische HPLC-Methoden zur Trennung dieser beiden Substanzen beschrieben [232, 233], die entweder auf der Ionen- oder der *reversed phase* (RP)-Chromatographie beruhen. Die zweite Methode nutzt die hydrophoberen Eigenschaften der Fucose (Methylgruppe an C-6) im Gegensatz zur Mannose (Hydroxymethylgruppe an C-6). Diese Unterschiede der Hydrophobizität beider Moleküle waren der Grund für den Einsatz des Dimethyl- β -cyclodextrins (DIME- β -CD) im Rahmen dieser Methodenentwicklung. Cyclodextrine (CDs) sind Träger hydrophober Kavitäten. Eine selektive Komplexierung etwa der Methylgruppe der Fucose könnte in eine Veränderung der elektrophoretischen Eigenschaften von GDP-Fuc im Gegensatz zur GDP-Man und damit in einer Trennung der beiden Nucleotidzucker münden.

Freie Disaccharide können von Borat-Ionen derart komplexiert werden, dass die resultierenden, geladenen Spezies in der CE voneinander getrennt werden [234]. Auch die Trennung von UDP-Glucose von UDP-Galactose in einem Borat-Puffer ist für die HPLC [235], die FPLC [236] und die CE [237] publiziert. Durch Verwendung von Borat-/Phosphatpuffer Mischungen erhält man eine Pufferlösung von hoher Kapazität, die komplexierende Eigenschaften über einen weiten pH-Bereich besitzt.¹

Da die Stabilität von NADP und NADPH sehr stark vom pH-Wert und der Art des verwendeten Puffers abhängt, wurden vor der Optimierung entsprechende Stabilitätstests durchgeführt. Es zeigte sich, dass beide Cofaktoren unter den Bedingungen, die den CE-Trennpuffern entsprechen, hinreichend stabil sind.

¹Wenn ein reiner Boratpuffer (Borsäure: $pK_S = 9.3$) zum Einsatz kam (0% Phosphat), durfte der pH-Wert nur die Werte 8.5 bzw. 9 annehmen.

Durchführung

Analog zur natürlichen Evolution sind die drei elementaren Operatoren eines genetischen Algorithmus:

- **Selektion:** nur Individuen, die den durch die Zielfunktion vorgegebenen Selektionskriterien entsprechen, überleben.
- **Rekombination:** sie sichert den Bestand und die Weiterentwicklung einer Population. Mit jeder neuen Generation werden einmal erworbene, gute Merkmale beibehalten und untereinander durch *crossover* (siehe unten) vermischt.
- **Mutation:** zufällige Veränderung der Erbinformation (Punktmutation). Durch sie wird die Suche in bisher nicht erkundeten Bereichen des Parameterraumes gesichert.

Diese Prozesse werden bei Anwendung des genetischen Algorithmus auf die durch *bit strings* codierten Individuen ausgeführt. Im Rahmen der Optimierung wurden diese Vorgänge durch die Software GALOP¹ emuliert. Die Durchführung mehrerer Zyklen (Generationen) von Selektion, Rekombination und Mutation führt zu immer weiter optimierten Individuen. Abbildung 3.5 zeigt schematisch den Ablauf der Methodenentwicklung durch Anwendung des genetischen Algorithmus.

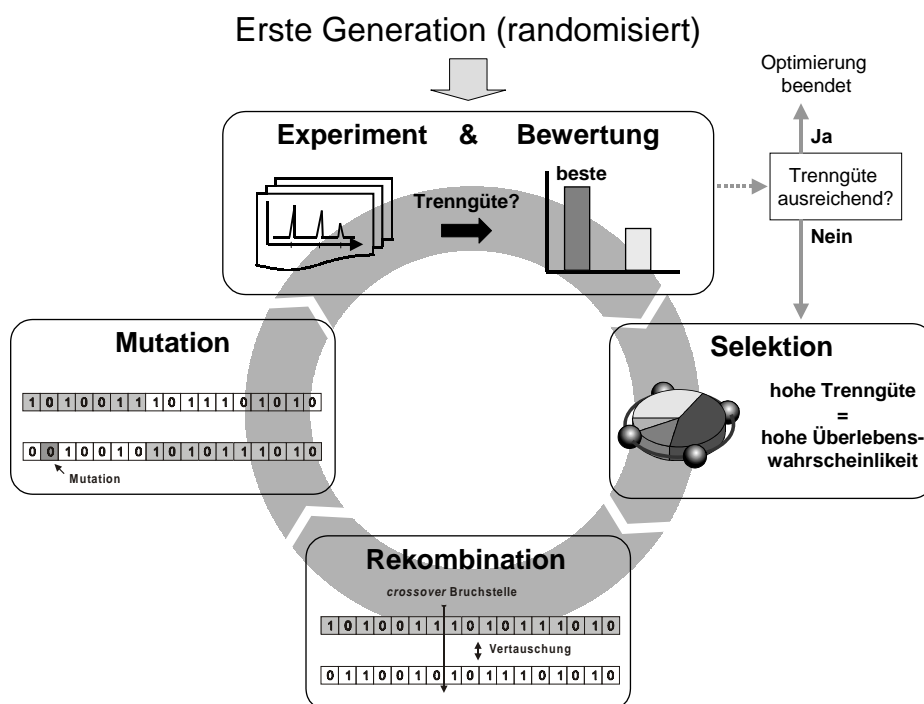


Abbildung 3.5: CE-Methodenentwicklung durch Anwendung des genetischen Algorithmus.

¹GALOP: Genetic ALgorithms for the Optimization of Processes; Software entwickelt am Institut für Biotechnologie, Forschungszentrum Jülich GmbH.

Zunächst wird eine erste, randomisierte Generation von Individuen (Analysemethoden) aus dem Parametersatz mit den entsprechenden Variationsbreiten generiert. Die einzelnen Experimente werden in einem CE-Gerät mit Autosampler und den programmierten Methoden durchgeführt. Die erhaltenen Elektropherogramme werden anhand der Zielfunktion bewertet. Die Größe der jeweiligen Trenngüte der Individuen entscheidet darüber, ob und in welcher Anzahl diese Individuen im nächsten Schritt der Selektion überleben. Auf diese Weise werden die "Eltern" der neuen Generation ausgewählt.

Der Selektionsvorgang gleicht dem Drehen eines Rouletterades. Die Größe der einzelnen Segmente entspricht der Güte eines Individuums bezüglich des Selektionskriteriums. Da die Anzahl der Individuen pro Generation konstant bleiben soll, wird das Rad so oft gedreht wie Individuen vorhanden sind. Das Programm GALOP erlaubt eine Auswahl verschiedener Methoden des Selektionsvorgangs. Die hier angewandte Methode (*keep best, ball bearing*¹) stellt sicher, dass das beste Individuum einer Generation in die nächste übernommen wird.

Nach Selektion der Eltern entstehen durch *crossover* und Punktmutation dann Individuen einer neuen Generation. Die jeweiligen *bit strings* entsprechen neuen CE-Methoden. Dieser Zyklus kann so lange wiederholt werden bis eine maximale Trenngüte eines Individuums erreicht ist. Im Idealfall entspricht dies der Trennung aller Analyte in möglichst kurzer Zeit.

Die Anzahl der Individuen pro Generation wurde auf 16 festgesetzt. Ein *bit string* eines Individuums besteht aus 17 bits, die für die sechs variierten Parameter codieren. Die *crossover*-Rate wurde auf 0.95 gesetzt, d.h. 95% aller "Eltern" kreuzen ihr Genom zur Erzeugung neuer Individuen. Die Mutationsrate wurde auf 0.05 gesetzt. Bei einer *bit*-Anzahl pro Generation von 272 (Anzahl Individuen mal Anzahl *bits* pro Individuum) mutieren im Mittel 13.6 *bits* in einer Generation.

Nach 4 Generationen und damit nach nur 64 der 32,340 möglichen Experimente konnte eine maximale Trenngüte erzielt werden. Die Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt vorgestellt und diskutiert.

3.2.3 Ergebnisse der Optimierung

Bei der Betrachtung der Ergebnisse sind besonders zwei Größen von Interesse:

- die Trenngüte der gesamten Population einer Generation (*total fitness*)
- die Entwicklung des jeweils besten Individuums einer Generation.

Abbildung 3.6 auf der nächsten Seite zeigt die Entwicklung der *total fitness* im Laufe der Optimierung.

¹*ball bearing*(engl.): Kugellager

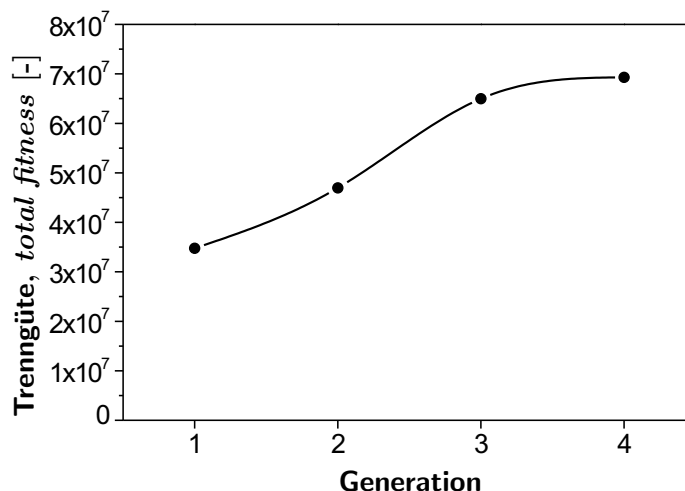


Abbildung 3.6: Die Entwicklung der Trenngüte der Populationen pro Generation (*total fitness*). Die gezeichnete Linie dient lediglich als visuelle Hilfe.

Die Zunahme dieser Größe von der dritten zur vierten Generation ist nicht so groß wie in den vorangegangenen Generationen. Diese Tatsache kann ein Hinweis darauf sein, dass sich der genetische Algorithmus auf ein lokales Maximum innerhalb des Parameterraumes zubewegt und sich in künftigen Generationen weiter darauf ausrichten wird. Die Gesamtgüte würde in diesem Falle über den Verlauf weiterer Generationen nur schwach zunehmen. Die Abbildung zeigt deutlich, dass die Gesamtgüte der Population im Laufe der Optimierung mehr als verdoppelt werden konnte.

Beim Vergleich der besten Individuen der ersten und vierten Generation (Abbildung 3.7 auf der nächsten Seite) fällt auf, dass die Peakbreite der meisten Substanzen deutlich abgenommen hat. Besonders für GDP, NADPH und GTP ist dies zu erkennen. Eine kleinere Peakbreite resultiert in einer größeren Anzahl der theoretischen Böden und damit in einer Zunahme der Trenngüte entsprechend dem Selektionskriterium der Gleichung 3.1. Auch die Analysezeit konnte im Laufe der Optimierung von 25 min. auf 22,5 min. verkürzt werden.

Mit beiden Methoden gelingt die Auftrennung von fünf der insgesamt sieben Substanzen. Eine elektrophoretische Trennung der GDP-Man von der GDP-Fuc konnte nicht erreicht werden. Diese Aussage gilt für alle Individuen der vier Generationen. Obwohl es eines der Hauptziele der Optimierung war, eine CE-Methode zur Auftrennung der beiden Substanzen zu finden, kann davon ausgegangen werden, dass es in diesem Parameterraum nicht möglich ist, beide Analyte voneinander zu trennen, da der genetische Algorithmus sonst eine entsprechende Parameterkombination vorgeschlagen hätte. In Kapitel 3.2.4 auf Seite 38 wird gezeigt, dass eine Auftrennung dieser beiden Nucleotidzucker mit der CE unter veränderten Bedingungen jedoch möglich ist.

Die im Laufe dieser Methodenentwicklung gewonnenen Daten erlauben nur in sehr begrenzter Weise eine Korrelation einzelner Parameter mit der Trenngüte einer Methode, da ein direkter Vergleich nur bei solchen Individuen möglich ist, die sich in nur einem Wert

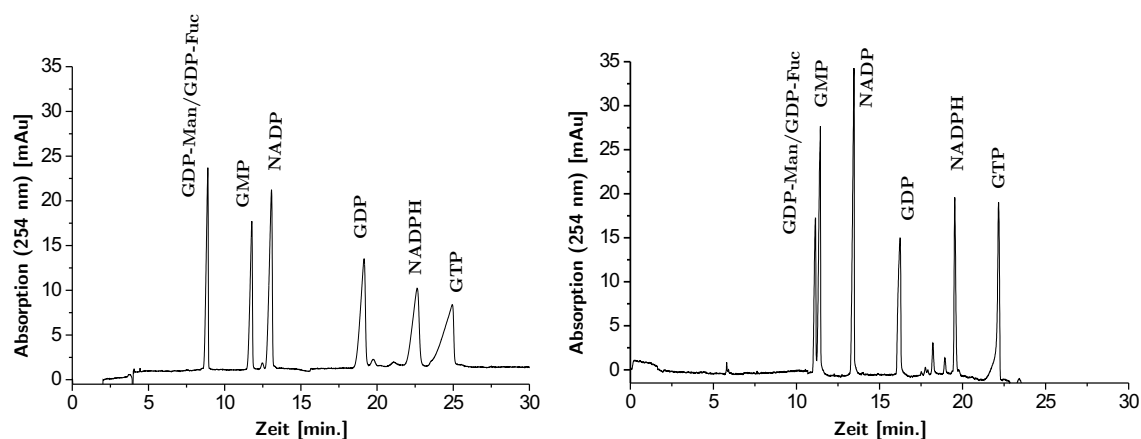


Abbildung 3.7: Die Entwicklung der besten Individuen der ersten (links) und vierten Generation (rechts).

links: $T = 48^{\circ}\text{C}$, $U = 20\text{ kV}$, Pufferkonzentration = 50 mM , 80% Phosphat (40 mM Phosphat + 10 mM Borat), DIME- β -CD Konz. = 5 mM , $\text{pH} = 8.5$; **rechts:** $T = 24^{\circ}\text{C}$, $U = 20\text{ kV}$, Pufferkonzentration = 100 mM , 50% Phosphat (50 mM Phosphat + 50 mM Borat), DIME- β -CD Konz. = 0 mM , $\text{pH} = 6$.

(des gleichen Parameters) unterscheiden. Jedoch lassen sich allgemeine Tendenzen der Parameterentwicklung mit der Evolution der *total fitness* korrelieren. So steigt beispielsweise der Mittelwert der Temperatur einer Generation von $33,5^{\circ}\text{C}$ in der ersten bis auf $37,0^{\circ}\text{C}$ in der vierten Generation. Die Erhöhung der mittleren Temperatur in einer Generation führt demnach zu einer Erhöhung der Gesamtgüte dieser Generation, der *total fitness*.

Die Optimierung zeigte, dass die DIME- β -CD Konzentration einen signifikanten Einfluss auf die Trenngüte einer CE-Methode hatte. Interessanterweise wird die beste Trennung mit einem Verzicht auf diesen "hydrophoben Selektor" erzielt.

Enzymassay der GMD-Reaktion

Wie zu Beginn von Kapitel 3.2.2 erwähnt, stand das Produkt der GMD-Reaktion, die GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose (GKDM), zu Beginn der Methodenentwicklung nicht zur Verfügung. Eine Trennung von GKDM von allen anderen relevanten Analyten konnte während der Optimierung daher nicht berücksichtigt werden.

Da der genetische Algorithmus über vier Generationen mit je 16 Individuen pro Generation durchgeführt wurde, standen am Ende der Methodenentwicklung 64 neue CE-Methoden zur Verfügung. Fünf Methoden der letzten Generation stellten sich als insgesamt sehr leistungsfähig heraus und wurden als Ausgangspunkt zur Etablierung eines GMD-Assays ausgewählt. Ausgehend von Individuum **2** der vierten Generation – es entspricht dem besten Individuum der ersten Generation – konnte durch einfache Parameteroptimierung eine CE-Methode erhalten werden, die die Anforderungen an einen schnellen Enzymassay erfüllt. Die Parameter des Individuums **2** sowie diejenigen des GMD-Assays sind in Tabelle 3.2 auf der nächsten Seite zusammengefasst.

Parameter	Individuum 2 (4. Generation)	GMD-Assay
Temperatur	48°C	40°C
Trennungsspannung	20 kV	25 kV
Puffer pH	8,5	8,5
Pufferkonzentration ^a	50 mM	50 mM
Anteil Phosphat	80%	80%
DIME- β -CD Konzentration	5 mM	0 mM

^aSumme aus Borat- und Phosphatpuffer

Tabelle 3.2: Entwicklung des GMD-Assays ausgehend von Individuum 2 der vierten Generation des GA.

Es zeigte sich, dass zum einen die Temperatur von 48°C auf 40°C gesenkt werden konnte, gleichzeitig aber die Trennungsspannung von 20 kV auf 25 kV erhöht werden musste, um zu insgesamt kürzeren Analysezeiten zu kommen. Ein Verzicht auf 5 mM DIME- β -Cyclodextrin war möglich, so dass diese Methode mit einem einfachen und sehr kostengünstigen Trennpuffer durchgeführt werden konnte.

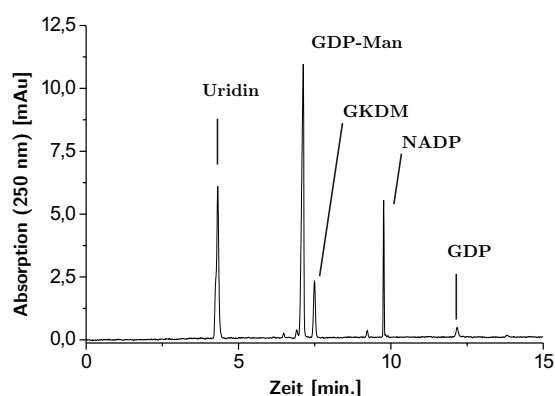


Abbildung 3.8: CE-Methode zur Bestimmung der GMD-Aktivität. Bedingungen entsprechend Tabelle 3.2.

Abbildung 3.8 zeigt ein typisches Elektropherogramm wie es zur Bestimmung des Umsatzes der GMD-Reaktion erhalten wird. GDP-Man, GKDM, NADP und GDP werden in weniger als 12,5 min. basisliniengetrennt. Uridin dient hier als interner Standard. Dieser ist notwendig, da die Reproduzierbarkeit der Probeninjektion auf die Kapillare mit einem Fehler von bis zu 10% für analytische Zwecke nicht ausreichend ist.¹ Diese CE-Methode erlaubt auch die schnelle Trennung von NAD, NADP, NADH sowie NADPH und ist für eine Vielzahl von (Enzym-)Reaktionen interessant, die diese Substanzen bilden oder verbrauchen.²

¹Fehler experimentell gemessen. Der Hersteller gibt einen Fehler von etwa 0,3% an.

²Am Institut für Biotechnologie fand diese CE-Methode u.a. für die Verfolgung einer NADPH-bildenden Hydrogenase-katalysierten Reaktion Verwendung.

Die CE-Methode zur Trennung der relevanten Substanzen ist geeignet, um einen Enzymassay für die GMD-Reaktion zu etablieren. Es handelt sich dabei um eine *offline*-Methode mittels CE nach Abstoppen der Reaktion. Aus der umgesetzten Menge GDP-Man bzw. der gebildeten Produktmenge nach definierten Zeitintervallen lässt sich ein Umsatz-Zeit-Plot generieren, der die Bestimmung der Enzymaktivität erlaubt.

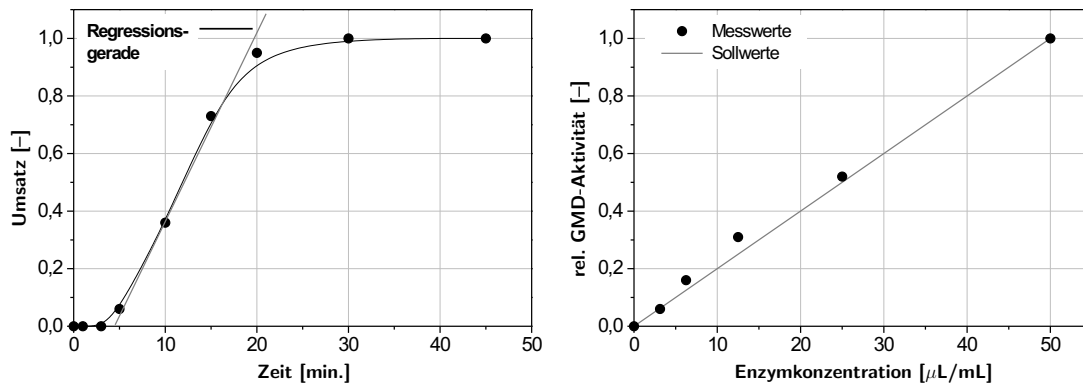


Abbildung 3.9: GMD-Assay: Umsatz-Zeit-Verlauf (links) und Linearität des CE-Assays (rechts).

Bedingungen: 1 mM GDP-Man, 0,1 mM NADP, 0,1 mM NADPH, 10 mM MgCl_2 , 50 mM Tris-HCl, pH 8, $T = 30^\circ\text{C}$, $V = 1\text{ mL}$; Abstoppen der Proben (50 μL): 1 min. erhitzen auf 95°C .

Der linke Graph der Abbildung 3.9 zeigt einen solchen Plot. Die Enzymaktivität wird, unter Berücksichtigung der Substratkonzentration sowie der Enzymverdünnung, aus der Steigung der Regressionsgeraden im linearen Bereich des Umsatz-Verlaufes berechnet. Bei dem Enzymassay handelt es sich nicht um eine Endpunktbestimmung im engeren Sinne, da die gebildete Produktmenge nach einer definierten Reaktionszeit nicht mit der eingesetzten Enzymmenge korreliert werden kann. Der Grund für diese Beobachtung liegt in der auftretenden *lag*-Phase bei der GMD-Reaktion, die auch in Abbildung 3.9 zu erkennen ist. Hier soll nicht weiter auf die Besonderheiten dieser Reaktion eingegangen werden; diese werden ausführlich in Kapitel 5 besprochen.

Die Eignung des CE-Assays zur Messung von Enzymaktivitäten dokumentiert der rechte Graph der Abbildung 3.9. Hier wird gezeigt, dass die aus den Umsatz-Zeit-Plots berechneten Enzymaktivitäten proportional zu der eingesetzten Enzymmenge sind. Die gemessene Aktivität nimmt bei Verdünnung der Enzymlösung mit Puffer linear ab. Dies belegt, dass die Reaktion durch das Erhitzen der entnommenen Proben effektiv abgestoppt werden kann und kein weiterer Umsatz des Substrates nach der Probennahme stattfindet.

3.2.4 Einsatz von Ionenpaar-Reagenzien

Die in Kapitel 3.2.2 vorgestellte CE-Methodenentwicklung führte zu einer Vielzahl von Analysemethoden, jedoch war keine der erhaltenen Methoden in der Lage, die beiden Nucleotidzucker GDP-Man und GDP-Fuc voneinander zu trennen. In der Literatur ist eine Vielzahl

von Ionenpaar-Reagenzien beschrieben, die eine zusätzliche elektrophoretische Selektivität der Analyte aufgrund verschiedener Komplexbildungsgleichgewichte bewirken [203, 237–240].

In einer weiteren Anwendung des genetischen Algorithmus zur CE-Methodenentwicklung war es daher das Ziel, GDP-Man und GDP-Fuc sowie Uridin, welches als interner Standard diente (vgl. Kapitel 3.2.3), in einer schnellen CE-Methode voneinander zu trennen. Hier kamen Tetraalkylammonium-Salze (siehe unten), die besonders in der RP Ionenpaar-Chromatographie angewandt werden [232, 235, 241], zum Einsatz. Durch Verwendung dieser Ionenpaarbildner konnten für andere Substanzklassen bereits eindrucksvolle Selektivitäten erzielt werden [239, 240]. Sowohl das Auftreten von "Ionenpaaren" als auch hydrophobe Effekte sind Ursachen der beobachteten Selektivitäten.

Die im Rahmen dieser Optimierung variierten Parameter sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Als neue Parameter wurden die Konzentration sowie die Art (Tetra**ethyl**- bzw. Tetra**butyl**ammoniumbromid) des Ionenpaar-Reagenzes eingeführt. Es ist wichtig zu erwähnen, dass diese Ionenpaarbildner als Additiv zum Trennpuffer zu geben sind, da diese Substanzen keinerlei Effekt auf die Selektivität zeigen, wenn sie lediglich der Analytlösung zugesetzt werden [239].

Parameter	Einheit	Variationsbreite	Schrittweite		bits
Temperatur	°C	16 – 48	4	(9)	4
Trennspannung	kV	10 – 30	5	(5)	3
Puffer pH	–	6 – 12	0,5	(13)	4
Pufferkonzentration ^a	mM	25 – 250	25	(10)	4
Anteil Phosphat	%	0 – 100	10	(11)	4
TXA-Konzentration	mM	0 – 100	10	(11)	4
X = E thyl/ B utyl ^b	–	E – B	–	(2)	1

^aSumme aus Borat- und Phosphatpuffer

^bAuswahl durch Münzwurf

Tabelle 3.3: Parameter und ihre Variationsbreiten.

Im Gegensatz zur ersten Optimierung wurde die Mutationsrate von 0,05 auf 0,01 verringert. Die übrigen Bedingungen des genetischen Algorithmus wie Zielfunktion, Selektionsmethode sowie *crossover*-Rate entsprachen denen der ersten Optimierung in Kapitel 3.2.2.

Über vier Generationen wurden jeweils 20 Individuen pro Generation vermessen. Durch Variation der insgesamt sieben Parameter ergaben sich damit mehr als 1,4 Mio. mögliche Experimente. Nach vier Generationen konnte ein bestes Individuum gefunden werden, welches alle drei Analyte basisliniengetrennt zeigt. Die besten Individuen der ersten und letzten Generation sind in Abbildung 3.10 auf der nächsten Seite dargestellt.

Beide Elektropherogramme machen deutlich, dass eine Auftrennung von GDP-Man und GDP-Fuc in der CE möglich ist. Das beste Individuum der vierten Generation zeigt die beiden Nucleotidzucker basisliniengetrennt. Ausserdem kann im Laufe der Optimierung die Analysezeit von 16 auf 13 min. reduziert werden.

Wie bereits zuvor erläutert, ist der Einfluss einzelner Parameter auf die Trenngüte nicht vorherzusagen. Tetraalkylammonium-Ionen können sowohl als Ionenpaarbildner wie auch, aufgrund ihrer Alkylketten, als hydrophobe Selektoren wirken. Welcher Mechanismus im Falle

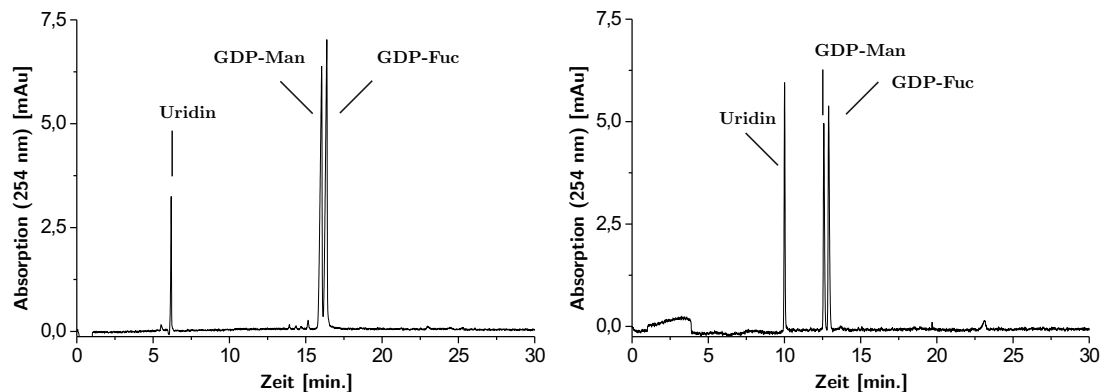


Abbildung 3.10: Die Entwicklung der besten Individuen der ersten (links) und vierten Generation (rechts).

links: $T = 24^{\circ}\text{C}$, $U = 30\text{ kV}$, Pufferkonzentration = 50 mM , 50% Phosphat ($25\text{ mM Phosphat} + 25\text{ mM Borat}$), TBA Konzentration = 90 mM , $\text{pH} = 6,5$; **rechts:** $T = 32^{\circ}\text{C}$, $U = 25\text{ kV}$, Pufferkonzentration = 75 mM , 30% Phosphat ($22,5\text{ mM Phosphat} + 52,5\text{ mM Borat}$), TBA Konzentration = 50 mM , $\text{pH} = 10,5$.

der Nucleotidzucker zum Tragen kommt, kann nur vermutet werden. Die höhere Selektivität in der vierten Generation könnte auf den höheren pH-Wert zurückzuführen sein, da eine größere resultierende negative Nettoladung der Analyte den Mechanismus der Ionenpaar-Bildung bevorzugen dürfte [240]. Andererseits ist bekannt, dass Ionenpaar-bildende Substanzen den EOF in aller Regel deutlich verringern, so dass die Trennung auch mit Phänomenen an der Kapillaroberfläche erklärt werden könnte.

Da das grundlegende Motiv der CE-Methodenentwicklung mit genetischen Algorithmen jedoch das "bewusste Ignorieren" der Trennmechanismen in der CE ist, soll hier nicht weiter über mögliche Ursachen der Trennung diskutiert werden. Das Beispiel belegt aber erneut, dass mit einem genetischen Algorithmus leistungsfähige CE-Methoden in einem definierten Parameterraum gefunden werden können, wenn die Optimierung auf eine geeignete Zielfunktion ausgerichtet wird.

Darüberhinaus erlaubt das Beispiel die allgemein gültige Aussage, dass die Ergebnisse evolutiver Methoden zu rationalen Ergebnissen führen können: die erste Optimierung mittels GA führte zu der Erkenntnis, dass die Trennung von zwei Substanzen nur durch die Zuhilfenahme einer weiteren Einflussgröße (Ionenpaarbildung) bewerkstelligt werden konnte. Somit eröffnet die Kombination von evolutiven und rationalen Methoden neue Chancen bei der Optimierung komplexer Systeme und leistet einen Beitrag, diese zu verstehen.

3.3 Einsatz der HPLC

3.3.1 Analytik der Nucleotidzucker

Die Etablierung enzymatischer Assays für die beiden Teilreaktionen der GDP-Fuc Synthese wurde in diesem Kapitel gezeigt. Wenn auch eine elektrophoretische Trennung von GDP-Man

und GDP-Fuc (Kapitel 3.2.4) durch den Einsatz von Ionenpaar-Reagenzien gelang, so war eine schnelle und vor allem stabile CE-Methode zur **gleichzeitigen** Analyse aller relevanten Substanzen (vor allem GDP-Man, GKDM und GDP-Fuc) nicht verfügbar, da sich die Ionenpaar-Methode für das Gesamtsystem als nicht robust genug erwies. Proben, die alle drei Nucleotidzucker enthielten, wurden daher mit der HPLC vermessen. Die eingesetzte, literaturbekannte Methode [168,232,233] – die Bedingungen sind in Kapitel 10 aufgeführt – beruht auf der Ionenpaar-Chromatographie. Abbildung 3.11 zeigt exemplarisch ein Chromatogramm zur Trennung der relevanten Substanzen.

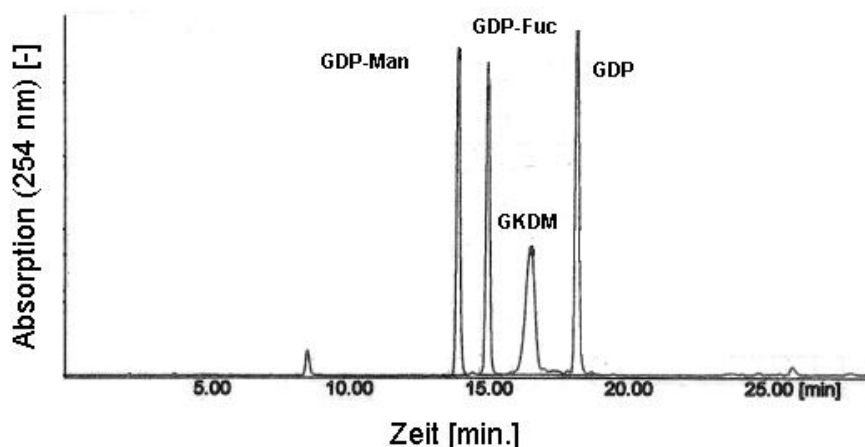


Abbildung 3.11: Ionenpaar-Chromatographie in der HPLC zur Verfolgung der enzymatischen GDP-Fuc Synthese. Bedingungen entsprechend Kapitel 10.

3.3.2 Analytik von Oligosacchariden

Die Analytik der fucosylierten Oligosaccharide (siehe Kapitel 7) zur Bestimmung der Fucosyltransferase-Aktivitäten erfolgte ebenfalls mit der HPLC. Die Methoden, die auf der Trennung der Analyte mittels Anionentausch und elektrochemischer Detektion¹ beruhen, wurden vom Kooperationspartner in Japan (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.) übernommen und sind in Kapitel 10 (Material und Methoden) aufgeführt.

3.4 Zusammenfassung

Methodenentwicklung in der CE Der erfolgreiche Einsatz genetischer Algorithmen zur Generierung effizienter CE-Methoden konnte gezeigt werden. In einer ersten Optimierung wurde nach vier Generationen und 64 von 23340 möglichen Experimenten (0,27%) eine CE-Methode erhalten, die innerhalb von 23 min. die Analyte GDP-Man/GDP-Fuc, GMP, NADP, GDP, NADPH und GTP trennen kann. Es wurden sechs Parameter variiert, die Bewertung der Trenngüte der einzelnen Methoden wurde anhand einer zuvor definierten Zielfunktion durchgeführt.

¹Detektionsprinzip ist die gepulste Amperometrie (*pulsed amperometric detection*, PAD).

Durch den Einsatz von Ionenpaar-Reagenzien gelang in einer zweiten Optimierung auch die elektrophoretische Trennung der beiden Nucleotidzucker GDP-Man und GDP-Fuc. Diese beiden Substanzen und ein geeigneter interner Standard können innerhalb von 13 min. analysiert werden. Die Anzahl der dazu notwendigen Experimente betrug lediglich 80 von 1,4 Mio. möglichen (0,006%). Sie wurden in vier Generationen zu je 20 Individuen und Variation von sieben Parametern durchgeführt.

GMD-Assay Ausgehend von einer Parameterkombination, die durch den genetischen Algorithmus erhalten wurde, konnte zur Verfolgung der GMD-Reaktion ein CE-Assay etabliert werden, der eine elektrophoretische Trennung der relevanten Substanzen (GDP-Man, GKDM, GDP, NADP, GMP und NADPH) in weniger als 15 min. erlaubt.

Zur Bestimmung der GMD-Aktivität müssen 8-10 Messpunkte eines Umsatz-Zeit Verlaufes im Satzreaktor mit der CE aufgenommen werden. Die kurze Messzeit der entwickelten Methode erweist sich daher zur Bestimmung der Enzymaktivität als besonderer Vorteil.

GFS-Assay Die Verfolgung der GFS-Reaktion durch Photometrie anhand der spezifischen NADPH-Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm ist literaturbekannt und wurde im Rahmen dieser Arbeit angewandt. Zum Einsatz kam ein Mikroplattenleser Assay, der die Durchführung von Parallelversuchen in einem Volumen von 100 µL erlaubt. Die Korrelation dieser photometrischen Methode mit der CE oder der HPLC konnte nachgewiesen werden.

HPLC und FucT-Assay Zur Auftrennung aller Nucleotidzucker mit nur einer Methode wurde die Ionenpaar-Chromatographie an einer *reversed phase* HPLC etabliert. Aufgrund der deutlich längeren Analysezeiten im Vergleich zur CE wurde sie jedoch nur dann eingesetzt, wenn GDP-Man, GKDM und GDP-Fuc zusammen in Proben vorlagen.

Die Analytik fucosylierter Oligosaccharide und die Messung der FucT-Aktivitäten wurden mit Hilfe von HPLC-Methoden durchgeführt, die in Japan zur Verfügung standen. Sie basieren auf der Anionenaustausch-Chromatographie und der elektrochemischen Detektion der Analyte.

4 Bereitstellung der Enzyme GMD und GFS und einer α 1,2-Fucosyltransferase

Dieses Kapitel beschreibt die Gewinnung der für die *de novo* Synthese von GDP-Fuc relevanten, rekombinanten Enzyme. Ausgehend von der GDP-Man sind dies die GDP- α -D-Mannose-4,6-Dehydratase (**GMD**) sowie die GDP- β -L-Fucose-Synthetase (**GFS**). Der Zugang zu diesen Biokatalysatoren ist Voraussetzung für die weitere Untersuchung der enzymatischen Reaktionen. Auch die Bereitstellung einer rekombinanten *H. pylori* α 1,2-Fucosyltransferase wird beschrieben. Dieses Enzym wurde während des Auslandsaufenthaltes in Japan gewonnen und ermöglicht die Synthese verschiedener fucosylierter Oligosaccharide (siehe Kapitel 7).

4.1 Gewinnung der GDP- α -D-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD)

Nach den grundlegenden Arbeiten über die GDP-Fuc Biosynthese in *Aerobacter aerogenes* durch Ginsburg zu Beginn der 1960er Jahre [130] und der Postulierung der Existenz einer GDP- α -D-Mannose-4,6-Dehydratase [131], wurde 1965 erstmalig eine GMD aus *E. coli* partiell aufgereinigt [242]. Hier konnte eine Enzympräparation mit einer spezifischen Aktivität von 280 mU/mg erhalten werden. Das Produkt der enzymatischen Reaktion, GKDM, diente zur Synthese von GDP-Colitose. Ein anderes Enzym aus einem gram-negativen Bodenbakterium, welches GDP-Rhamnose bildet, wurde bereits ein Jahr zuvor als GMD beschrieben [197].

Das Enzym war jedoch nicht nur aus bakteriellen Quellen zugänglich. Bereits 1961 konnte wiederum Ginsburg Enzymaktivitäten aus Kaninchengewebe gewinnen, die GDP-Fuc ausgehend von GDP-Man bildeten [132]. Die GMD wurde später aus einer Vielzahl von Organismen isoliert bzw. partiell aufgereinigt: aus grünen Bohnen [243], aus Schweineschilddrüsen [136] sowie aus Bakterien [193]. Die massenspezifischen Enzymaktivitäten lagen in einem Bereich von 3 bis 38 mU/mg Protein. Da das Enzym aus natürlichen Quellen gewonnen wurde, bedurfte es großer Mengen an Biomasse, um einen Zugang zum aufgereinigten Enzym zu bekommen.¹

Durch die Klonierung des Gens, welches für die GMD codiert, aus *Escherichia coli* K-12 wurde das Enzym ab 1996 auch rekombinant verfügbar [31]. Für die GMD kodierende Gene wurden in den folgenden Jahren in einer Vielzahl von Organismen gefunden, so z.B. in der Pflanze *Arabidopsis thaliana* [244], im Menschen [166] sowie in thermophilen und nicht-thermophilen Bakterien [33, 179, 245, 246]. Das Enzym aus *E. coli* konnte zudem bereits kristallisiert und seine Struktur aufgeklärt werden [200].

In der vorliegenden Arbeit wurde das Enzym aus *E. coli* K-12 eingesetzt, welches in einem IPTG-induzierbaren *E. coli* BL21(DE3)-Expressionsstamm homolog überexprimiert wurde. Die Klonierung des Gens und die Konstruktion des Expressionsvektors², wurden von Herrn Dr. Stefan Weidner am Institut für Enzymtechnologie der Universität Düsseldorf im Rahmen seiner Promotion durchgeführt. Die Aufreinigung des Enzyms wurde gemeinsam eta-

¹So waren z.B. 166 g Schilddrüsenewebe vom Schwein notwendig, um 36 mU der GMD zu erhalten [136].

²Plasmid: pET17b der Firma Novagen: T7-Promotor ist Initiationssignal der Transkription, *E. coli* BL21(DE3) exprimiert die T7-RNA-Polymerase, die das Signal erkennt.

bliert. Parallel zu diesen Arbeiten wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Piepersberg (Universität Wuppertal) die Klonierung und Expression der gleichen Gene publiziert. Dort konnte die GMD jedoch nicht erfolgreich aufgereinigt werden. Die beschriebenen Synthesen wurden ausschliesslich mit Rohextrakt durchgeführt [140]. Da im Rohextrakt aber Nucleotidzucker spaltende Aktivitäten beobachtet werden konnten, war eine partielle Aufreinigung des Enzyms notwendig.

4.1.1 Fermentation von *Escherichia coli* BL21(DE3) pET17b/gmd¹

Die Fermentation des rekombinanten *Escherichia coli*-Stammes wurde im 20 L-Maßstab in LB-Medium mit Temperatur- und pH-Regelung durchgeführt. Relevante Parameter wie Temperatur, pH-Wert, Zuluft, Drehzahl und Sauerstoffpartialdruck wurden *online* gemessen. Nach dem Animpfen des Fermenters mit einer Übernachtskultur ging der rekombinante *E. coli*-Stamm nach dreistündiger *lag*-Phase in exponentielles Wachstum über. Die Überproduktion der GMD wurde durch Zugabe von 0,4 mM IPTG nach 4 Stunden induziert. Nach etwa 8 Stunden (maximale OD) konnten die Zellen geerntet werden. Das beobachtete Wachstum der Zellen entspricht im wesentlichen der Fermentation zur Gewinnung der GFS (Abbildung 4.5 auf Seite 50). Insgesamt konnten 400 g Zellen (Biofeuchtmasse) erhalten werden, dies entspricht einer volumenspezifischen Ausbeute von 20 g Zellen / L Kulturbrühe. Es wurden volumenspezifische Enzymaktivitäten von 200-530 U/L Kulturbrühe und damit massenspezifische Aktivitäten von 10-26 U/g Zellfeuchtmasse erzielt. Auf diese Weise konnte eine Gesamtmenge an GDP- α -D-Mannose-4,6-Dehydratase im Bereich von 4060-10660 U gewonnen werden.²

4.1.2 Partielle Aufreinigung der GMD

Zur Aufreinigung des Enzyms wurden die Zellen zunächst mit Ultraschall lysiert. Da das Enzym in seiner nativen Form aufgereinigt wurde und keinen spezifischen *tag* besaß, musste eine Methode angewandt werden, die dennoch in der Lage war, die GMD von störenden Nebenaktivitäten zu trennen.

Dies gelang mittels Anionenaustausch-Chromatographie mit Q-Sepharose FF durch Elution mit KCl. Der starke Anionentauscher bindet das Enzym in Abhängigkeit des pH-Wertes unterschiedlich stark. Mit einem theoretischen pI-Wert der GMD aus *E. coli* von 5.78³, muss der pH-Wert mindestens 7 betragen, damit das Enzym an die Matrix bindet. Höhere pH-Werte bewirken zwar noch stärkere anziehende Wechselwirkungen zwischen Enzym und Träger, es werden dann jedoch auch unerwünschte Proteine stärker gebunden.

In Vorversuchen wurde zunächst die optimale Aufschlussdauer der Zellen mit Ultraschall bestimmt und das Bindungsverhalten des Enzyms an den Anionentauscher überprüft.

Es zeigte sich, dass Aufschlusszeiten von 4-5 Minuten unter Eiskühlung ausreichend sind, um die Zellen zu desintegrieren. Höhere Aufschlusszeiten führten zwar zu einer Erhöhung der Proteinkonzentration im Rohextrakt, die GMD-Aktivität nahm jedoch nicht mehr zu. Um bereits im Rohextrakt möglichst hohe massenspezifische Aktivitäten zu erzielen, wurde daher maximal 5 Minuten aufgeschlossen.

¹Die Fermentation wurde von Herrn Dr. Stefan Weidner im Rahmen seiner Promotionsarbeit durchgeführt.

²Die schwankenden Zahlen kommen aufgrund unterschiedlicher Assaybedingungen zustande. Bei den ersten Enzymaufreinigungen war der Einfluss einzelner Assayparameter, wie sie in Kapitel 5 beschrieben werden, noch nicht bekannt.

³Der pI-wert eines Enzyms ist der pH-Wert an dem die Nettoladung des Proteins gleich Null ist. Die Berechnung des pI der GMD ist unter <http://www.expasy.org/> zugänglich.

Die Bindung des Enzyms an Q-Sepharose und seine Elution vom Träger bei hohen Salzkonzentrationen dokumentiert Abbildung 4.1. In parallelen *batch*-Versuchen wurde der Rohextrakt in Gegenwart oder Abwesenheit von Q-Sepharose inkubiert. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden Proben gezogen, abzentrifugiert und die GMD-Aktivität im Überstand bestimmt. Der linke Graph der Abbildung zeigt, dass in Abwesenheit hoher Salzgehalte das Enzym an den Träger gebunden wird, da die GMD-Aktivität im Überstand nur in Anwesenheit von Q-Sepharose abnimmt. Der rechte Graph macht deutlich, dass das Enzym bei einer KCl-Konzentration von 200 mM KCl nicht mehr an die Q-Sepharose bindet und eine Elution der GMD vom Träger daher möglich sein sollte.

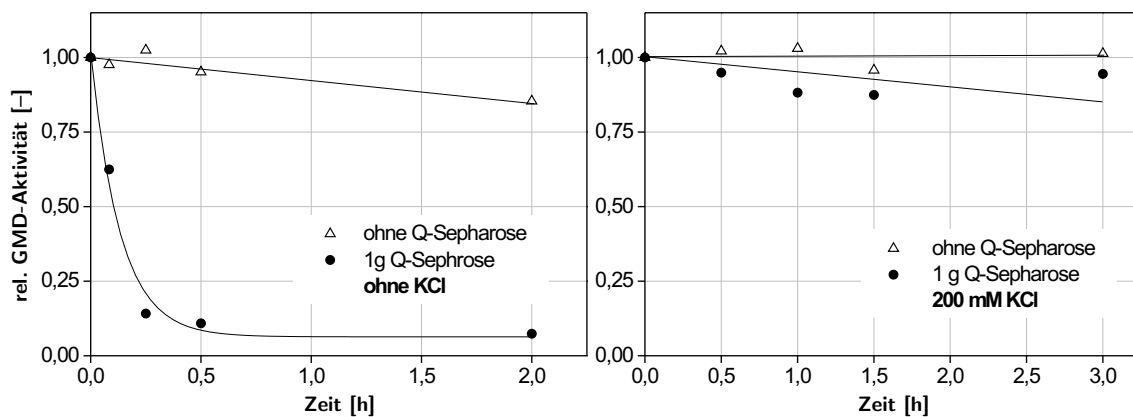


Abbildung 4.1: *batch*-Versuche zum Adsorptionsverhalten der GMD an Q-Sepharose FF. Bedingungen: 10 mL Rohextrakt aus einer 30%igen Zellsuspension in 50 mM MOPS, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 0,75 mM PMSF, 1% DMSO (v/v), pH 7, Raumtemperatur.

Mit den aus den Vorversuchen gewonnenen Erkenntnissen konnte das Enzym mehrfach chromatographisch aufgereinigt werden. Abbildung 4.2 auf der nächsten Seite zeigt exemplarisch ein Elutionsdiagramm einer solchen Chromatographie.

Nach der Probenaufgabe wurde die Säule bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie mit 100 mM KCl in Puffer gespült. Anschließend wurde die GMD mit einem linearen KCl-Gradienten in Puffer von 0,1 bis 0,6 M eluiert. Das Enzym wurde bei einer KCl-Konzentration von 0,2-0,4 M von der Säule gespült. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen der Vorversuche überein. Das Diagramm zeigt, dass durch das Spülen mit 100 mM KCl eine Proteinbande, die vor dem GMD-Peak erscheint, abgetrennt werden kann.

Die starke Verdünnung des Enzyms nach Elution von der Säule machte eine genaue Aktivitätsbestimmung in den Fraktionen unmöglich. Zwar gelang die Zuordnung der GMD-haltigen Fraktionen, jedoch konnte für die Chromatographie keine Bilanz erstellt werden.

Im Anschluss an den chromatographischen Schritt wurden die enzym-haltigen Fraktionen vereinigt und durch Ultrafiltration (*cut-off* der Membran: 10 kD) entsalzt und aufkonzentriert. Zur Stabilisierung der Enzympräparationen wurde die Enzymlösung mit 50% Glycerin versetzt und zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Unter diesen Bedingungen ist das Enzym über einen Zeitraum von mindestens 6 Monaten ohne signifikanten Aktivitätsverlust

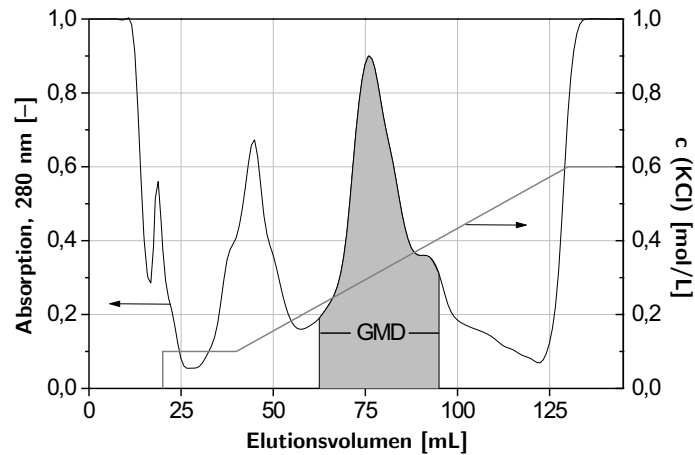


Abbildung 4.2: Aufreinigung der GMD durch Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose FF.

stabil. Abbildung 4.3 zeigt die SDS-PAGE-Analyse der partiellen Aufreinigung der GMD.

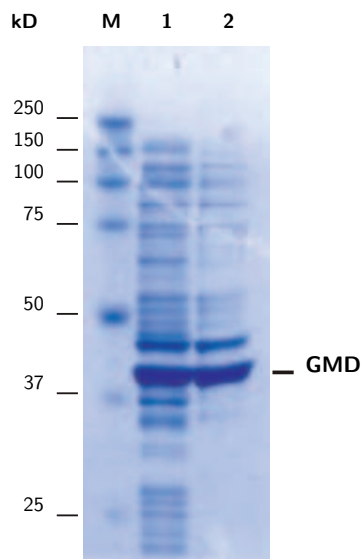


Abbildung 4.3: SDS-PAGE-Analyse der rek. GMD. Überproduktion in *E. coli* BL21(DE3) und Aufreinigung an Q-Sepharose FF.

M: Proteinmarker, *Spur 1*: Rohextrakt, *Spur 2*: Enzympräparation in 50% Glycerin;
Spur 1 und 2: je 7 μ g Gesamtprotein.

Für die GMD ergibt sich daraus ein Molekulargewicht von etwa 42,0 kD und entspricht damit der aus der Aminosäuresequenz berechneten Masse. Das Bild zeigt deutlich, dass das

Enzym nur partiell angereinigt ist; besonders Proteine mit höheren Molekulargewichten sind in der Präparation noch zu erkennen. Dagegen konnten Proteine mit einem Molekulargewicht kleiner als 30 kD offensichtlich effektiv durch Ultrafiltration abgetrennt werden, da im unteren Molekularbereich kaum Proteinbanden zu erkennen sind.

Die chromatographische Aufreinigung der GMD war sehr gut reproduzierbar, das Enzym wurde stets bei der gleichen Salzkonzentration von 0,2-0,4 M KCl eluiert. Hingegen konnte die anschließende Ultrafiltration zur Abtrennung des Elektrolyten sowie zur Aufkonzentrierung des Enzyms nur wenige Male erfolgreich durchgeführt werden. Es kam häufig zu der Bildung eines starken Proteinniederschlags während der Ultrafiltration. Verschiedene Ansätze, dies zu verhindern, wie etwa die Variation der Temperatur, Vermeidung von Scherkräften oder der Zusatz von 10% Glycerin zum Elutionspuffer, zeigten keine reproduzierbaren Verbesserungen.

Wie bereits angesprochen, war eine genaue Bestimmung der Enzymaktivität nach dem chromatographischen Schritt nicht möglich. In der Aufreinigungstabelle 4.1 werden die einzelnen Schritte der Aufreinigung zusammengefasst und, ausgehend vom Rohextrakt, die gewonnenen Enzymaktivitäten der Glycerin-Präparation bilanziert. Exemplarisch werden zwei Aufreinigungen gezeigt, eine Aufreinigung im Labormaßstab sowie eine Aufreinigung, die im Pilotmaßstab bei der Firma *Juelich Fine Chemicals (JFC)* durchgeführt wurde.

	Akt _{ges} [U]		Protein _{ges} [g]		Akt _M [mU/mg]		Faktor [-]		Ausbeute [%]	
	Labor ^a	Pilot ^b	Labor	Pilot	Labor	Pilot	Labor	Pilot	Labor	Pilot
Rohextrakt	186	1760	0,55	9,90	338	178	1	1	100	100
Q-Sepharose FF, Ultrafiltration ^c , 50% Glycerin	151	900	0,19	1,02	794	882	2,3	5,0	81	51

^a 6 g Zellen eingesetzt

^b 66 g Zellen eingesetzt

^c cut-off der Membran: 10 kD

Tabelle 4.1: Ergebnis der partiellen Aufreinigung der GDP- α -D-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) im Labor- bzw. Pilotmaßstab.

Assay-Bedingungen analog Kapitel 10.3, jedoch in Tris-HCl Puffer, pH 8.

Die Ausbeuten der partiellen Enzymaufreinigungen liegen mit 51-80% in einem zufriedenstellenden Bereich. Es werden Aufreinigungsfaktoren von 2,3 bis 5 erzielt. Die resultierenden Enzympräparationen zeigen Werte der massenspezifischen Aktivität von 794-882 mU/mg. Ausgehend von der SDS-PAGE Analyse der GMD (Abbildung 4.3), kann von einer Reinheit des Enzyms von etwa 50-60% ausgegangen werden (ca. 40-50% Fremprotein). Die erreichten massenspezifischen Aktivitäten der GMD unterhalb von 1 U/mg zeigen, dass die GMD ein Enzym mit recht niedrigen Wechselzahlen ist.

Der Grund für die etwas höhere Aktivität bei der Aufreinigung im großen Maßstab ist sicherlich die Verwendung eines großen Moduls für die Ultrafiltration. Das größere Verhältnis Membranfläche/Volumen im Gegensatz zur Laboraufreinigung macht eine schnellere Abtrennung des Salzes nach Elution möglich. Die dennoch geringere Ausbeute bei diesem Prozeß ist auf ein Platzen einer Säule während der Chromatographie zurückzuführen.¹

¹persönliche Mitteilung von Herrn Dipl. Biol. Georg Zeidler (JFC).

Die nach dem beschriebenen Aufreinigungsprotokoll erhaltene Proteinpräparation zeigte nur durch *exogene* Zugabe von NADP zur Reaktionslösung GMD-Aktivität. Das Enzym verliert offensichtlich im Laufe der Aufreinigung den Cofaktor und liegt als Apoenzym vor. Ein ähnliches Verhalten wurde bereits für das Enzym aus *Klebsiella pneumoniae* beschrieben [193], jedoch steht der Verlust des Cofaktors im Widerspruch zu den Ergebnissen für die GMD aus Schwein [136], Mensch [247] und *E. coli* [195,248]. Dort wird die Bindung des Cofaktors an das Enzym als sehr fest (*"tightly bound"*) beschrieben. Die Aufreinigung des rekombinanten, nativen Enzyms aus *E. coli* mittels Anionenaustausch-Chromatographie ist bisher jedoch nicht publiziert und der Verbleib des stark negativ geladenen NADP am Anionentauscher erscheint durchaus plausibel. Die Wiedergewinnung der Enzymaktivität durch Zugabe von NADP zur Reaktion veranschaulicht Abbildung 4.4: GDP-Man wird erst nach Zugabe des Cofaktors zum Produkt umgesetzt.

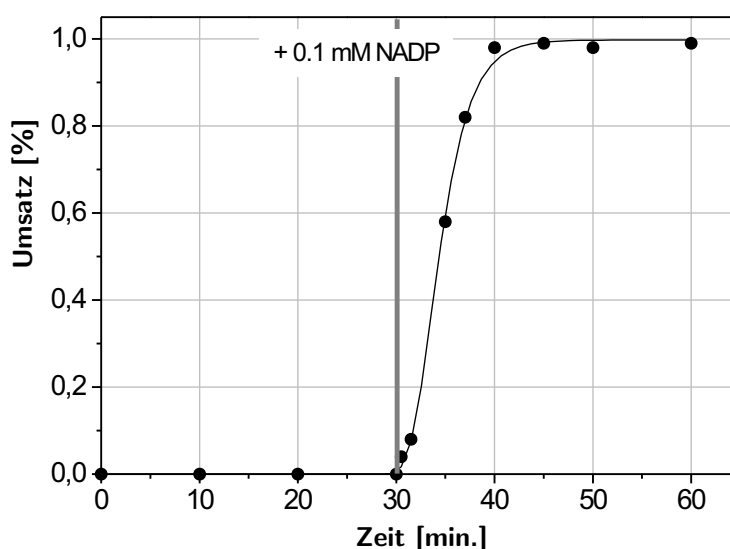


Abbildung 4.4: Wiederherstellung der GMD-Aktivität durch *exogene* NADP-Zugabe.
 Bedingungen: 1 mM GDP-Man, 10 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 8, T = 30°C, 1 mg/mL BSA, 0,26 mg/mL Protein (GMD-Präparation).

4.2 Gewinnung der GDP- β -L-Fucose-Synthetase (GFS)

Wie in Kapitel 4.1 zur Gewinnung der GMD bereits erwähnt, waren es die Arbeiten von Victor Ginsburg in den 1960er Jahren, die den Biosyntheseweg der GDP-Fuc in Bakterien untersuchten und das wissenschaftliche Interesse an den postulierten Enzymen prägen sollten [130–132]. Nach der Aufklärung des ersten Schrittes zur Synthese der GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose (GKDM) durch die Aufreinigung einer GMD [242], war bis in die späten 1980er Jahre lange unklar, welches Enzym bzw. welche Enzyme die Umsetzung von GKDM

zu GDP-Fuc katalysieren, obwohl entsprechende Aktivitäten auch in Pflanzen [249] und Würmern [250] gefunden und bestätigt werden konnten. Kurioserweise wurde die humane GFS unter dem Namen "FX Protein" sogar bereits 1977 bis zur Homogenität aufgereinigt [251,252], die biologische Funktion war aber damals völlig unbekannt.¹

Erst 1988 wurde die GFS erstmalig aus Schilddrüsengewebe aus Schwein als homogenes Protein aufgereinigt² und die biologische Bedeutung erkannt [137]. Damit wurde auch erstmals die Bifunktionalität der GFS bewiesen, da das Enzym sowohl die 3,5-Epimerisierung als auch die anschließende 4-Reduktion katalysiert (vgl. Abbildung 1.9 auf Seite 15). Diese Entdeckung war ungewöhnlich, da die Aktivitäten für Epimerisierung und Reduktion bei der enzymatischen Synthese anderer Nucleotidzucker auf zwei verschiedenen Proteinen zu finden sind [253], wie etwa im Falle der dTDP-L-Rhamnose [254] oder der CDP-6-Deoxygulose. Mitte der 1990er Jahre wurde dann das "FX Protein" durch Klonierung der entsprechenden cDNA als GFS erkannt [138].

Seit der erfolgreichen Klonierung und Überexpression des Gens der GFS aus *E. coli* K-12 im Jahre 1998 [32], steht das Enzym auch rekombinant zur Verfügung. Für die GFS kodierende Gene wurden in den folgenden Jahren in einer Vielzahl von Organismen gefunden, so z.B. in Pflanzen [255], im Menschen [138,166] und in verschiedenen Bakterien [33,139,256,257]. Das Enzym aus *E. coli* konnte zudem bereits mehrfach kristallisiert werden [194,258–260].

Wie im Falle der GMD, wurde in der vorliegenden Arbeit das Enzym aus *E. coli* K-12 eingesetzt, welches in einem IPTG-induzierbaren *E. coli* BL21(DE3)-Expressionsstamm homolog überexprimiert wurde. Im Gegensatz zur GMD besitzt dieses Enzym einen N-terminalen Histag, der eine Aufreinigung des Enzyms an einer Ni-NTA-Matrix erlaubt (siehe Kapitel 4.2.2). Die Klonierung des Gens und die Konstruktion des Expressionsvektors³ wurden von Herrn Dr. Stefan Weidner am Institut für Enzymtechnologie der Universität Düsseldorf im Rahmen seiner Promotion durchgeführt. Die Aufreinigung des Enzyms wurde gemeinsam etabliert. Die Gruppe um Prof. Piepersberg in Wuppertal hatte die Klonierung und Aufreinigung des gleichen Enzyms bereits im Jahre 2000 publiziert [140].

4.2.1 Fermentation von *Escherichia coli* BL21(DE3) pET16b/wcaG

Den Verlauf der Fermentation im 15 L-Maßstab dokumentiert die Abbildung 4.5 auf der nächsten Seite. Die Durchführung entspricht der Fermentation zur Gewinnung der GMD. Die Graphik der Abbildung 4.5 zeigt deutlich den durch das Wachstum der Zellen bedingten sinkenden Sauerstoffpartialdruck. Nach etwa 4 Stunden wurde die Protein-Expression durch Zugabe von 0,4 mM IPTG induziert und die Zellen nach weiteren 4 Stunden (maximale OD) mit einem Zellseparator abgeerntet und zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Insgesamt konnten 230 g Zellen (Biofeuchtmasse) gewonnen werden; dies entspricht einer volumenspezifischen Ausbeute von 15,3 g Zellen/L Kulturbrühe. Die Zellen exprimierten eine Gesamtaktivität von etwa 15 000 U.

¹Das Protein war lediglich als ein NADP- und NADPH-bindendes Protein bekannt.

²Insgesamt konnten damals, bei einer massenspezifischen Aktivität von 194 mU/mg, nur 22 mU des Enzyms isoliert werden. Dies entsprach einer Ausbeute von nur 3,7%, jedoch einem Aufreinigungsfaktor von etwa 1400. Zur Gewinnung dieser Enzymmenge mussten 170 g Schilddrüsengewebe eingesetzt werden.

³Plasmid: pET16b der Firma Novagen: T7-Promotor ist Initiationsignal der Transkription, *E. coli* BL21(DE3) exprimiert die T7-RNA-Polymerase, die das Signal erkennt. Der N-Terminus des Enzyms trägt 10 Histidin-Reste.

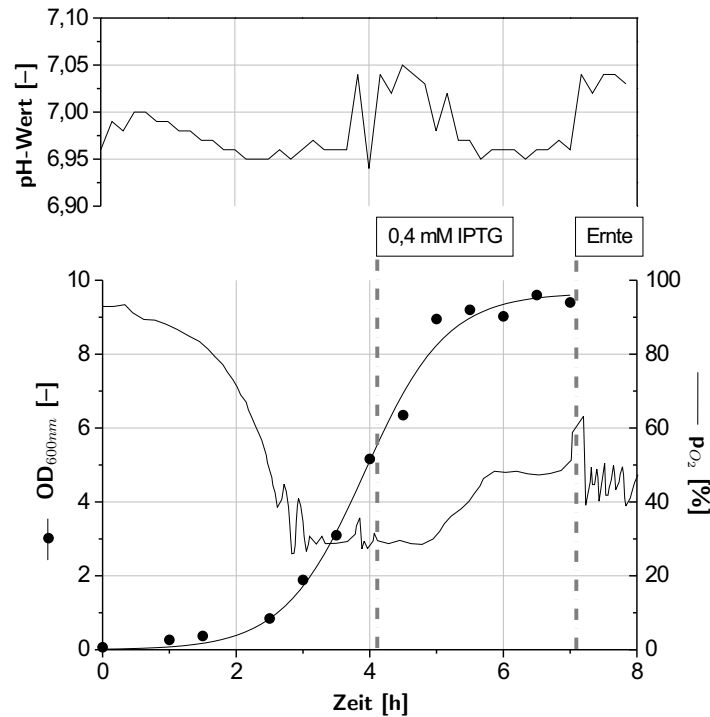


Abbildung 4.5: Fermentationsverlauf von *E. coli* BL21(DE3) pET16b/wcaG.

Bedingungen: 15 L LB-Medium, 0,1 g/L Ampicilin, $T = 37^\circ C$, $pH = 7$ (KOH), Belüftungsrate = 20 L/min, Drehzahl = 400 rpm.

4.2.2 Partielle Aufreinigung der GFS

Zur Aufreinigung des Enzyms werden die Zellen zunächst mit Ultraschall lysiert. Da das rekombinante Enzym einen N-terminalen His₁₀-tag besitzt, kann es mit der Immobilisierten-Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) aufgereinigt werden. Dieses Prinzip der Enzymaufreinigung beruht auf der Komplexbildung zweiwertiger, an der Matrix immobilisierter Ni-Ionen durch die Histidin-Reste des rekombinanten Proteins. Nach Auftragen des Rohextraktes wurde die Säule zunächst mit Laufpuffer gespült. Bei niedriger Imidazol-Konzentration (20 mM) wurden anschließend Proteine eluiert, die nicht-spezifisch an den Träger binden. Dies sind in der Regel natürlich auftretende, stark histidinreiche Proteine. Anschließend wurde die rekombinante GFS durch hohe Imidazol-Konzentrationen (200 mM) von der Säule gespült.

Wie schon bei der Aufreinigung der GMD bereitete der anschließende Schritt der Ultrafiltration Probleme. Das stark imidazolhaltige Eluat der Säule bewirkt offensichtlich eine irreversible Desaktivierung des Enzyms, da mitunter bereits die Fraktionen des chromatographischen Schrittes einen Proteinniederschlag zeigten. Der alternative Einsatz der Gelfiltration zur schnellen Abtrennung des Imidazols ließ erkennen, dass ein sehr schnelles Ausfallen des Proteins zumindest verzögert werden kann. Da das Enzym nach dem Schritt der Gelfiltration in sehr verdünntem Zustand vorliegt, musste es auch in diesem Fall ultrafiltriert werden. Die

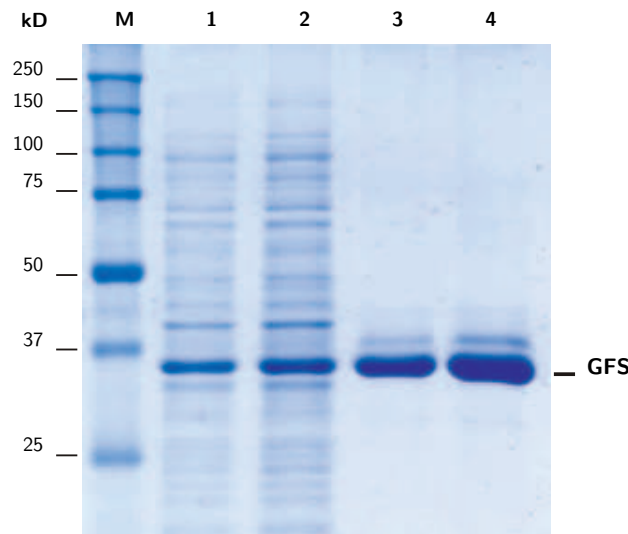


Abbildung 4.6: SDS-PAGE-Analyse der rek. His₁₀-tag GFS. Überproduktion in *E. coli* BL21(DE3) und Aufreinigung an Ni-NTA-Agarose.

M: Proteinmarker, *Spur 1 und 2*: Rohextrakt, *Spur 3 und 4*: Enzympräparation in 50% Glycerin; *Spur 1 und 3*: je 30 μ g Gesamtprotein; *Spur 2 und 4*: je 60 μ g Gesamtprotein.

aufkonzentrierte Enzymlösung wurde bis zu ihrer weiteren Verwendung mit 50% Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert. Unter diesen Bedingungen ist das Enzym über einen Zeitraum von etwa 4-6 Monaten ohne signifikanten Aktivitätsverlust stabil.

Abbildung 4.6 zeigt die SDS-PAGE-Analyse der partiellen Aufreinigung der GFS. Für die His-tag GFS ergibt sich aufgrund der Analyse ein Molekulargewicht von etwa 36,0 kD; das berechnete Gewicht aus der Aminosäuresequenz beträgt 36,1 kD. Bis auf eine schwache Bande bei etwa 37 kD zeigt das Gel lediglich das rekombinante Protein und belegt damit eindrucksvoll die Leistungsfähigkeit des chromatographischen Aufreinigungsprotokolls.

Die o.g. Schwierigkeiten mit der Aufarbeitung nach der Chromatographie machten eine Bilanzierung des Aufreinigungsprozesses sehr schwierig. Zudem war die Messung der Enzymaktivität zu Beginn der Aufreinigungsversuche nur begrenzt möglich, da das Substrat (GKDM) zum damaligen Zeitpunkt noch nicht in ausreichendem Maße verfügbar war. Die angegebenen Aktivitäten wurden mit einer Substratlösung bestimmt, die durch eine GMD *batch*-Reaktion erhalten wurde.

Die in Tabelle 4.2 auf der nächsten Seite dargestellten Zahlen dokumentieren die auftretenden Schwierigkeiten aufgrund der gemessenen Proteinkonzentrationen. Es zeigt sich ein starker Verlust an Protein während der Ultrafiltration. Dargestellt sind u.a. die Mengen des am Träger gebundenen Proteins sowie die Gesamtproteinmenge der gewonnenen Enzympräparationen (50% Glycerin). Wird von einer quantitativen Elution des Enzyms von der Säule ausgegangen, so können die Verluste vor allem dem Schritt der Ultrafiltration zugeordnet werden. Dies stimmt mit der beobachteten Ausbildung eines starken Proteinniederschlags während dieses Arbeitsschrittes überein. Verluste bei der Ultrafiltration (UF) um ca. 80% an Protein wurden beobachtet, die Gelfiltration (GF) zeigt sich mit einem Verlust von immerhin 58% etwas leistungsfähiger. Die SDS-PAGE-Analyse belegt, dass es sich bei dem verlorenen Protein ausschliesslich um die GFS handelt.

Aufreinigung ^a	Protein	Protein	Verlust	Aktivität _M	Aktivität	Aktivität
	Säule [mg]	Präparation [mg]	UF/GF [%]	[U/mg]	gesamt [U]	theoretisch ^b [U]
1	135	25	UF: 81	1,64	41	177
2	110	14	UF: 87	1,67	23	147
3	155	34	UF: 78	1,15	39	143
4	136	58	GF: 58	0,75	44	82
Summe:					147	549

^a Es wurde eine Säule mit 80 mL Gelvolumen eingesetzt.

^b Annahme: 80% Ausbeute für den Schritt der Ultrafiltration

Tabelle 4.2: Partielle Aufreinigung der GFS: Verluste bei der Ultrafiltration/Gelfiltration.

Gelöstes Protein zeigt dennoch massenspezifische Aktivitäten im Bereich von 0,75 bis 1,67 U/mg; die gemessenen volumenspezifischen Aktivitäten der Glycerin-Präparationen lagen nur bei 0,1 bis 0,6 U/mL.

Die letzte Spalte der Tabelle 4.2 macht deutlich, dass eine Verminderung des Enzymverlustes während der Ultrafiltration zu durchaus zufriedenstellenden Enzymaktivitäten führen würde. Wird von einer realistischen Ausbeute von 80% für den Schritt der Imidazolabtrennung ausgegangen, so könnten die in insgesamt vier Enzymaufreinigungen gewonnenen 147 U in einer einzigen Aufreinigung erhalten werden.

4.3 Gewinnung der α 1,2-Fucosyltransferase (α 1,2FucT)

In Kapitel 1 dieser Arbeit wurde bereits auf die Bedeutung der Fucosyltransferasen eingegangen. Das wissenschaftliche Interesse speziell an der α 1,2-Fucosyltransferase ist darauf zurückzuführen, dass dieses Enzym an der Bildung der Blutgruppen-Antigene ABH(0) beteiligt ist [261,262] (siehe auch Abbildung 1.5 auf Seite 7). Alle drei Antigene besitzen das Strukturmerkmal Fuc α 1,2Gal β -R, welches auch als H-Antigen bezeichnet wird¹ [263]. Beim (gesunden) Menschen werden zwei α 1,2FucTs unterschieden, die als H- und Se-Enzym bezeichnet werden [262]. Das H-Enzym katalysiert die Synthese der Blutgruppenantigene auf den Erythrocyten im Blut, während das Se-Enzym die Bildung der Antigene in den sekretorischen Drüsen bestimmt, etwa in Speichel oder in Magensekreten [261,264]. Dieses Se-Enzym ist auch für die Entstehung der 2'Fucosyllactose (2'-FL) in der Frauenmilch verantwortlich. Mütter, die 2'-FL nicht bilden, zeigen auch keine ABH-Antigene in den Sekreten, können jedoch allen Blutgruppen angehören [108,109]. Dies unterstreicht die Präsenz zwei verschiedener Enzyme.

Sowohl das H- als auch das Se-Enzym konnten aus Humanserum bis zur Homogenität aufgereinigt werden [265,266]. Aufgrund des sehr aufwendigen Reinigungsverfahrens konnten die Enzyme, ausgehend von bis zu 10 Litern Humanserum, nur in sehr geringen Mengen von 0,075

¹A-Antigen: Fuc α 1,2(GalNAc α 1,3)Gal β -R, B-Antigen: Fuc α 1,2(Gal α 1,3)Gal β -R

bis 2 mU Gesamtaktivität¹ gewonnen werden. Die erzielten massenspezifischen Aktivitäten lagen dennoch bei etwa 200-400 mU/mg Protein. Auch eine $\alpha 1,2$ -FucT aus Drüsengewebe vom Schwein wurde als homogenes Protein gewonnen [267, 268]. Hier konnten aus 16 kg Gewebe 19,7 U dieses Enzyms erhalten werden² [267].

Die Entdeckung, dass *Helicobacter pylori* auf seiner Oberfläche fucosylierte Lewis- und Blutgruppenantigene ausbildet [64, 65], machte dieses Bakterium als eine Quelle von Genen interessant, die für die entsprechenden Glycosyltransferasen kodieren und stellte darüberhinaus einen Zugang zu bakteriellen Fucosyltransferasen in für die Synthese interessanter Mengen in Aussicht. Bisher sind die Gene von drei FucTs des Bakteriums kloniert und rekombinant überexprimiert worden: eine $\alpha 1,3$ -FucT [67, 269], eine $\alpha 1,(3/4)$ -FucT [270] und die $\alpha 1,2$ -FucT [271]. Die Enzyme wurden bisher überwiegend für die Untersuchung der Substratspezifitäten eingesetzt. Auf die Substratspezifität der $\alpha 1,2$ -FucT aus *Helicobacter pylori* wird in Kapitel 7 eingegangen.

Zwei Fucosyltransferasen aus *Helicobacter pylori* konnten bereits in Mengen gewonnen werden, die ihren Einsatz in der Synthese erlauben. Die $\alpha 1,3$ -FucT wurde bei der Firma Kyowa Hakko in *E. coli* überexprimiert [169]. Der Einsatz der FucT-rekombinanten und permeabilisierten Zellen ermöglichte die Synthese von Lewis X ausgehend von LacNAc als Akzeptor (siehe Abbildung 1.11 auf Seite 18). Der Einsatz einer partiell aufgereinigten $\alpha 1,2$ -FucT aus *Helicobacter pylori* zur Synthese von 2'-Fucosyllactose wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Piepersberg publiziert [167]. Das Enzym wurde als GST-Fusionsprotein³ mit einer massenspezifischen Aktivität von 7,2 mU/mg Protein in *E. coli* überexprimiert. Durch Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie an Gluthathion-Sepharose konnte das Enzym mit einem Faktor von 13 aufgereinigt werden (90 mU/mg Protein).

Das im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Enzym wurde von der Firma Kyowa Hakko bereitgestellt. Basierend auf der publizierten Sequenz wurde das Gen, welches für die *H. pylori* $\alpha 1,2$ -FucT kodiert, durch chemische Verknüpfung einzelner DNA-Fragmente synthetisiert.⁴ Die Konstruktion eines geeigneten Expressionsvektors⁵ machte das Enzym als Protein mit N-terminalem His₆-tag zugänglich und wurde in einem IPTG-induzierbaren *E. coli* DH5 α -Expressionsstamm überexprimiert. Ein Protokoll zur Gewinnung des Enzyms war nicht bekannt, jedoch konnte in Vorversuchen gezeigt werden, dass das Enzym an eine Ni-NTA-Matrix bindet.

4.3.1 Fermentation von *Escherichia coli* DH5 α pHPFT80

Die Fermentation des rekombinanten *E. coli*-Stammes wurde in einer 300 mL Schüttelkolben-Kultur in LB-Medium bei 30°C durchgeführt. Nach Animpfen mit einer Übernachtskultur, die direkt von einer Agarplatte gezogen wurde, konnte die Überproduktion der FucT nach einer Stunde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert werden. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und zu ihrer weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Mit dieser Fermentation konnten 5,75 g Zellen (Biofeuchtmasse) gewonnen werden. Dies entspricht einer volumenspezifischen Ausbeute von etwa 19 g Zellen/L Kulturmedium.

¹Akzeptor: Phenyl- β -O-galactosid

²Akzeptor: *antifreeze glycoprotein*, es enthält endständige Gal-Reste.

³GST: Gluthathion-S-Transferase

⁴persönliche Mitteilung von Dr. Satoshi Koizumi, Kyowa Hakko; exprimiertes Enzym auf Grundlage der DNA von *Helicobacter pylori* zeigte keine $\alpha 1,2$ -FucT-Aktivität.

⁵Plasmid: pQE-80L der Firma Qiagen: T5-Promotor ist Initiationssignal der Transkription, die RNA-Polymerase aus *E. coli* DH5 α erkennt das Signal.

Die Überproduktion der FucT durch den rekombinanten *E. coli* Stamm wurde durch Bestimmung der Enzymaktivität der permeabilisierten Zellen nach Ende der Fermentation in einem Standardassay kontrolliert. Da die Überexpression der FucT in früheren Versuchen nur zum Teil reproduziert werden konnte,¹ war diese Kontrolle notwendig. Als Vergleich diente eine nicht-induzierte Kultur, die unter gleichen Bedingungen kultiviert wurde.

Abbildung 4.7 zeigt das Ergebnis dieser Expressionskontrolle. Es wird deutlich, dass die Zellen der induzierten Kultur in der Lage sind, das Produkt 2'-Fucosyllactose (2'-FL) ausgehend von Lactose und GDP-Fuc zu bilden. Die drei Proben der induzierten Kultur zeigen annähernd gleiche Produktbildungsraten. Die Zellen der nicht induzierten Kultur zeigen dagegen nur eine Hintergrundaktivität.

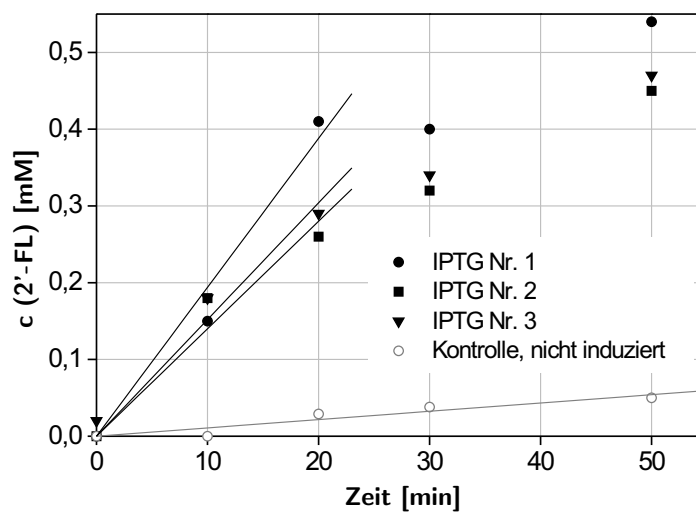


Abbildung 4.7: Expressionskontrolle der FucT-rek. *E. coli*-Zellen.

Standardassay der permeabilisierten Zellen entsprechend Kapitel 10. Anhand der Geraden wurden die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten ermittelt.

Aus diesen Experimenten kann die massenspezifische Aktivität der Zellen zu 72 mU/g Biofeuchtmasse errechnet werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Enzymaktivität der permeabilisierten Zellen gering ist. Ausgehend von äquivalenten Mengen an Zellmasse, sollte eine Aufreinigung der FucT die Bereitstellung höherer Enzymaktivitäten ermöglichen.

4.3.2 Partielle Aufreinigung der $\alpha 1,2$ FucT

Die Aufreinigung des Enzyms begann mit der Zellyse durch Ultraschall. Da das rekombinante Enzym ebenso wie die GFS einen N-terminalen His-tag besitzt, konnte die FucT mittels der Immobilisierten-Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) aufgereinigt werden. Nach Auftragen des Rohextraktes wurde die Säule zunächst mit Laufpuffer gespült. Nach Elution nicht spezifisch bindender Proteine bei niedriger Imidazol-Konzentration (20 mM) wurde die

¹persönliche Mitteilung von Dr. Satoshi Koizumi, Kyowa Hakko.

rekombinante FucT durch hohe Imidazol-Konzentrationen (200 mM) vom Träger gespült. Die Abtrennung des Imidazols erfolgte durch Ultrafiltration; das aufkonzentrierte Retentat wurde zur weiteren Verwendung mit 50% Glycerin (v/v) versetzt und bei -20°C gelagert. Es wurde das gesamte vorhandene Zellmaterial eingesetzt.

Tabelle 4.3 fasst die Ergebnisse der FucT-Gewinnung zusammen. Die angegebenen Aktivitäten beziehen sich alle auf Lactose als Akzeptorsubstrat, das resultierende Produkt ist die 2'-Fucosyllactose. In Kapitel 7 wird gezeigt, dass für die $\alpha 1,2$ -Fucosyltransferase aus *H. pylori* mit anderen Substraten höhere Aktivitäten erzielt werden können.

	Aktivität_{ges} [mU]	Protein_{ges} [mg]	Akt._M [mU/mg]	Faktor [-]	Ausbeute [%]
Rohextrakt	709	367,5	1,9	1	100
IMAC (Pool)	424	5,5	77,1	41	59,8
UF Retentat ^a	113	4,3	26,3	14	15,9
50% Glycerin	69	2,4	28,8	15	9,7

^a cut-off der Membran: 10 kD

Tabelle 4.3: Ergebnis der partiellen Aufreinigung der rekombinanten *H. pylori* $\alpha 1,2$ -Fucosyltransferase.

Die Ausbeute der Aufreinigung von etwa 10% ist nicht zufriedenstellend. Ähnlich wie bei der partiellen Aufreinigung der GFS ist es besonders die Ultrafiltration der Enzymlösung nach Chromatographie, welche die Ausbeute gering ausfallen lässt. In parallelen Versuchen im Mikromaßstab zeigte sich jedoch, dass eine Abtrennung des Imidazols durch Gelfiltration¹ zu besseren Ergebnissen führt. Im Gegensatz zu den 26% Ausbeute für den Schritt der Membran-Ultrafiltration, konnten hier 83% der FucT-Aktivität des Elutionspools wiedergefunden werden. Für eine Optimierung des Aufreinigungsprotokolls wäre der Einsatz dieser Methode daher ein sinnvoller Ansatzpunkt. Auch das Versetzen des UF Retentates mit 50% Glycerin führte zu der Bildung eines weißen Proteinniederschlags. Bei konstanter massenspezifischer Aktivität gehen in diesem Schritt etwa 50% der Enzymaktivität verloren. Dennoch zeigt der Aufreinigungsfaktor von 41 für den Schritt der Chromatographie, dass das Enzym durch IMAC von unerwünschten Proteinen abgetrennt werden kann. Auch die Ausbeute von 60% für diesen Schritt ist zufriedenstellend. Der Grund für die Abnahme der massenspezifischen Aktivität nach Ultrafiltration ist nicht bekannt.

Die gewonnenen 69 mU entsprechen einer massenspezifischen Aktivität von ca. 14 mU/g Biofeuchtmasse. Die SDS-PAGE-Analyse im Verlauf der Aufreinigung zeigte, dass die FucT nur sehr schwach überexprimiert wurde. Zur Gewinnung großer Mengen dieses Enzyms muss, neben einer Optimierung des Aufreinigungsprotokolls, daher auch die Überexpression in den rekombinanten *E. coli*-Stämmen deutlich verbessert werden. Diese Untersuchungen sind Gegenstand der aktuellen Forschung bei der Firma Kyowa Hakko. Die Expression und partielle

¹Pharmacia PD 10-Säule mit Sephadex G-25 M, 2,5 mL Probevolumen

Aufreinigung einer His-getaggenen α 1,2-FucT aus *H. pylori* ist bisher nicht publiziert.

4.4 Zusammenfassung

GDP- α -D-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) Das rekombinante Enzym konnte durch Fermentation von *E. coli* BL21(DE3) pET17b/gmd im 20 L Fermenter mit einer Gesamtaktivität von 4060-10660 U gewonnen werden (400 g Biofeuchtmasse). Dies entspricht einer volumenspezifischen Ausbeute von 20 g Zellen bzw. 200-530 U/L Kulturmedium.

Die Etablierung eines Aufreinigungsprotokolls ermöglichte die Gewinnung des Enzyms mittels der Anionenaustausch-Chromatographie an Q-Sepharose FF durch Elution mit einem linearen KCl-Gradienten. Auf diese Weise konnten Nucleotidzucker-spaltende Nebenaktivitäten abgetrennt und das Enzym in einer für die Synthese ausreichenden Reinheit als lagerstabile Glycerin-Präparation gewonnen werden. Mit diesem Protokoll wurden 1100 U der GMD aufgereinigt, die Ausbeuten der Aufreinigung lagen bei 61-80%. Ein *scale-up* des Verfahrens in den Pilot-Maßstab wurde durchgeführt. Die Enzympräparationen zeigten massenspezifische Aktivitäten von 794-882 mU/mg Protein.

Die GMD verliert während der Aufreinigung den Cofaktor NADP und liegt nach der Chromatographie als nicht-aktives Apoenzym vor. Durch *exogene* Zugabe des Cofaktors kann die Enzymaktivität wiedergewonnen werden.

GDP- β -L-Fucose-Synthetase (GFS) Die rekombinante GFS konnte durch Fermentation von *E. coli* BL21(DE3) pET16b/wcaG im 15 L-Maßstab mit einer Gesamtaktivität von etwa 15000 U gewonnen werden (230 g Biofeuchtmasse). Dies entspricht einer massenspezifischen Ausbeute von 65 U/g Zellen.

Das Enzym konnte aufgrund eines N-terminalen His₁₀-tags mittels IMAC an einer Ni-NTA-Matrix aufgereinigt und nahezu homogen erhalten werden. Insgesamt wurden etwa 150 U des Enzyms als 50%ige Glycerin-Präparation erhalten. Aufgrund der starken, irreversiblen Desaktivierung der GFS während der Abtrennung des Imidazols durch Ultrafiltration oder Gelfiltration lagen die Ausbeuten lediglich im Bereich von 15-40%. Die massenspezifischen Aktivitäten lagen dennoch zwischen 0,75 und 1,65 U/mg. Wie die GMD ist das Enzym bis zu 6 Monate ohne signifikanten Aktivitätsverlust bei -20°C lagerstabil.

H. pylori α 1,2-Fucosyltransferase (α 1,2-FucT) Das rekombinante, bakterielle Enzym wurde durch eine 300 mL-Schüttelkolben Fermentation von *E. coli* DH5 α pHPFT80 erhalten. Mit einer Ausbeute von 5,75 g Zellen (Biofeuchtmasse) entspricht dies einer volumenspezifischen Produktivität von 19 g Zellen/L Kulturmedium.

Erstmalig konnte die *H. pylori* α 1,2-FucT als Protein mit einem N-terminalen His₆-tag erfolgreich überexprimiert und partiell aufgereinigt werden. Die Aufreinigung der Fucosyltransferase mittels IMAC an einer Ni-NTA-Matrix lieferte 69 mU des funktionalitätsreinen Enzyms, bezogen auf Lactose als Akzeptor. Ähnlich wie bei der GFS ließ eine irreversible Desaktivierung des Proteins die Gesamtausbeute mit 10% gering ausfallen. Der Aufreinigungsfaktor von 41 für den chromatographischen Schritt zeigt aber das Potential der Aufreinigungsstrategie. Auch die Lagerstabilität der Fucosyltransferase als Glycerin-Präparation ist zufriedenstellend.

5 Kinetische Untersuchungen der enzymatischen GDP-Fuc-Synthese

In den beiden vorangegangenen Kapiteln wurden die Voraussetzungen für einen Zugang zur GDP-Fuc auf enzymatischem Wege geschaffen. Nach der Etablierung einer robusten Analytik (Kapitel 3) und von Verfahren zur Gewinnung der Biokatalysatoren (Kapitel 4) sollen in diesem Kapitel die beiden Teilreaktionen kinetisch und reaktionstechnisch näher untersucht werden.

Die vorgestellten Ergebnisse sind Grundlage der Reaktorwahl für dieses System und zentrale Elemente der Prozessentwicklung [272–274]. Neben dem **Reaktionssystem** selber, seiner **Kinetik** sowie der **Verfahrenstechnik**, ist auch die **Thermodynamik** ein wichtiger Baustein innerhalb der Prozeßentwicklung [273]. Die thermodynamische Betrachtung der enzymatischen GDP-Fuc-Synthese war nicht erforderlich; die Gleichgewichte der beiden Teilreaktionen liegen auf Seiten der Produkte. Weder konnten im Rahmen dieser Arbeit noch in bisherigen Publikationen Anzeichen für auftretende Rückreaktionen gefunden werden, so dass hier von zwei irreversiblen Enzymreaktionen ausgegangen werden kann. Abbildung 5.1 skizziert die Gliederung der in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen.

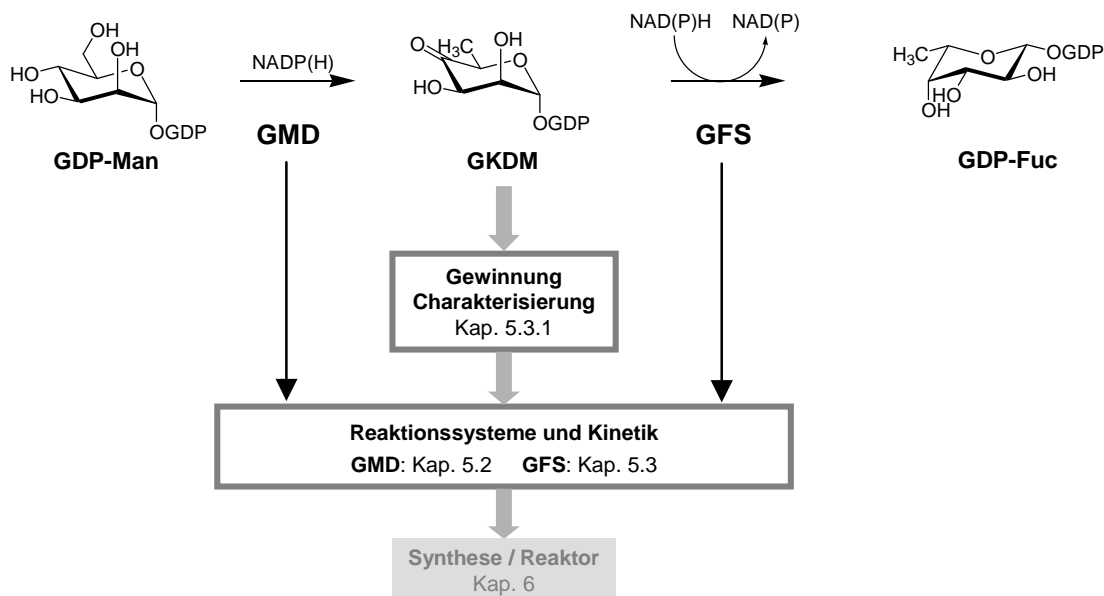


Abbildung 5.1: Bausteine der Prozessentwicklung für die GDP-Fuc-Synthese.

Die kinetische Analyse der beiden Reaktionen erfordert zunächst die Bereitstellung der beiden Substrate für GMD (GDP-Man) und GFS (GKDM). GDP-Man war zu Beginn der

Arbeiten verfügbar.¹ Dieser Nucleotidzucker ist zudem kommerziell erhältlich.² Auf die Bereitstellung von GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose (GKDM) wird in Kapitel 5.3.1 eingegangen. Diese Verbindung wird als instabil beschrieben [137, 193, 245] und ist nicht kommerziell verfügbar.

Die Kapitel 5.2 und 5.3 beschreiben die detaillierte kinetische Analyse der beiden Reaktionssysteme. Zu Beginn der beiden Kapitel wird jeweils auf die Spezifität der beiden komplexen, mehrstufigen Reaktionen eingegangen. In Kapitel 6 werden die Konsequenzen, die sich aus der Kinetik der beiden Enzyme ergeben, zunächst aus synthetischer Sicht diskutiert und anschließend Methoden und Reaktorkonzepte zur effektiven GDP-Fuc-Synthese vorgestellt.

5.1 Kinetische Modelle enzymatischer Reaktionen

Da Enzyme katalytisch wirken und ihre Konzentration damit in der Regel nur einen Bruchteil der jeweiligen Substrate beträgt, müssen enzymatische Reaktionen einer Sättigungskinetik folgen. Die Möglichkeit, die Enzymkatalyse als mikroheterogene Katalyse in Lösung anzusehen [275–277], verdeutlicht - in Analogie zu Gasphasenreaktionen an festen Katalysatoren - dass während einer Enzymreaktion die Zahl der freien *active sites* begrenzt ist und demnach bei entsprechenden Substratkonzentrationen "abgesättigt" sein können. Das grundlegende kinetische Modell, welches eine solche Sättigungskinetik in der Enzymkatalyse beschreibt, wurde im Jahre 1913 von Michaelis und Menten aufgestellt [278]. Das folgende Schema zeigt die Reaktionsfolge, auf welcher dieses Modell beruht.



Es sind:

k_1	[L/(mol·min)]	Assoziationskonstante
k_{-1}	[min ⁻¹]	Dissoziationskonstante
k_2	[min ⁻¹]	Wechselzahl, <i>turnover number</i> (k_{cat})

In diesem Modell wird die enzymatische Umsetzung eines Substrats (S) in das Produkt (P) als der irreversible Zerfall eines Enzym-Substrat-Komplexes (ES) betrachtet, der zuvor in einem schnellen, vorgelagerten Gleichgewicht zwischen Enzym (E) und Substrat gebildet wurde. Die Konzentration des ES-Komplexes bleibt bis zur Substraterschöpfung konstant (*steady state*). Die Konstante k_2 ist sehr viel kleiner als k_1 und k_{-1} , so dass der Zerfall des ES-Komplexes in Produkt und freies Enzym geschwindigkeitsbestimmend ist. Unter Berücksichtigung der von Michaelis und Menten aufgestellten Postulate, kann aus dem obigen Reaktionsschema die sog. *Michaelis-Menten-Gleichung* abgeleitet werden.

$$v = \frac{v_{max} \cdot c_S}{K_M + c_S} \quad (5.1)$$

mit:

¹Die GDP-Man wurde von Herrn Dr. Sven Fey im Rahmen seiner Promotion am IBT hergestellt.

²Preis: 3.590 €/g (Sigma Katalog 2002/2003; Gewinnung aus Hefe [177]) bzw. 1.500 €/g (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Tokyo; Enzymatische Synthese mit rek. *E. coli* Stämmen [169]).

v	[mol/(L·min)]	Reaktionsgeschwindigkeit
v_{max}	[mol/(L·min)]	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
c_S	[mol/L]	Substratkonzentration
K_M	[mol/L]	Dissoziationskonstante des ES-Komplexes <i>Michaelis-Menten-Konstante</i>

Die *Michaelis-Menten*-Gleichung (5.1) beschreibt eine Sättigungskinetik, die bei kleinen Substratkonzentrationen einer Kinetik 1. Ordnung und bei hohen Substratkonzentrationen einer Kinetik 0. Ordnung folgt. K_M wird als die *Michaelis-Menten-Konstante* bezeichnet und entspricht derjenigen Substratkonzentration bei welcher v_{max} halbmaximal ist.

Nur wenige Enzymreaktionen gehorchen einer exakten *Michaelis-Menten*-Kinetik [274]. Dennoch kann dieses Modell in makrokinetischen Ansätzen Enzymreaktionen oft sehr gut beschreiben. Eine genaue Kenntnis des Reaktionsmechanismus ist in diesen Fällen nicht notwendig. Auch die in dieser Arbeit vorgestellten kinetischen Modelle zur GMD und GFS beruhen auf einer *Michaelis-Menten*-Kinetik. Enzymreaktionen mit zwei oder mehreren Substraten können durch die Multiplikation einzelner, für das jeweilige Substrat getrennt aufgestellter *Michaelis-Menten*-Terme beschrieben werden, sofern das Gleichgewicht der Reaktion eindeutig auf einer Seite liegt [279]. Für den häufigsten Fall einer Reaktion mit zwei Substraten wird das entsprechende Geschwindigkeitsgesetz häufig als "Doppelsubstratkinetik" bezeichnet (Gleichung (5.2)).

$$v = v_{max} \cdot \frac{c_A}{K_{M,A} + c_A} \cdot \frac{c_B}{K_{M,B} + c_B} \quad (5.2)$$

mit:

v	[mol/(L·min)]	Reaktionsgeschwindigkeit
v_{max}	[mol/(L·min)]	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
c_A	[mol/L]	Konzentration von Substrat A
c_B	[mol/L]	Konzentration von Substrat B
$K_{M,A}$	[mol/L]	<i>Michaelis-Menten-Konstante</i> für Substrat A
$K_{M,B}$	[mol/L]	<i>Michaelis-Menten-Konstante</i> für Substrat B

Dieses Modell der "Doppelsubstratkinetik" wurde in erweiterter Form für die GFS eingesetzt. Auch das in Kapitel 5.2.2 vorgestellte kinetische Modell der GMD basiert auf einer *Michaelis-Menten*-Kinetik.

5.2 Die GDP- α -D-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD)-Reaktion

Der erste Schritt der *de novo* Synthese von GDP-Fuc ist die Umsetzung der GDP-Man zu GKDM durch das Enzym GDP- α -D-Mannose-4,6-Dehydratase. Dieses Enzym wird als Lyase klassifiziert¹, da während der Reaktion die C-O-Bindung an C-6 heterolytisch getrennt wird [280].

In Kapitel 4.1.2 wurde gezeigt, dass die GMD nach der Aufreinigung als Apoenzym gewonnen wird; der Biokatalysator verliert aufgrund der Bindung an einen Anionentauscher den Cofaktor NADP. GDP-Man kann erst nach *exogener* Zugabe von NADP zu GKDM, dem Reaktionsprodukt, umgesetzt werden (siehe Abbildung 4.4 auf Seite 48).

Der Einblick in den Reaktionsmechanismus dieses Enzyms (Abbildung 5.2) verdeutlicht, warum ein Nicotinamidcofaktor benötigt wird.

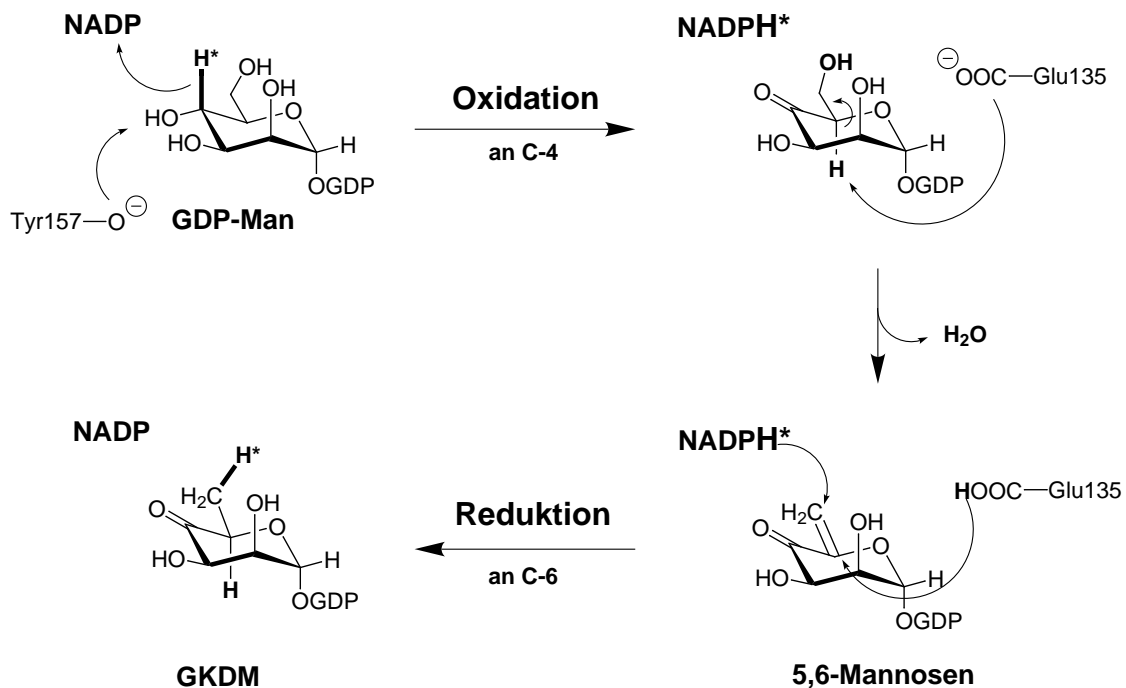


Abbildung 5.2: Postulierter Mechanismus der GMD-Reaktion nach [199] und [200].

Es handelt sich um einen Zweistufenmechanismus: Zunächst wird GDP-Man an der C-4-Position unter Ausbildung der Ketofunktion **oxidiert**, dabei wird aus NADP die reduzierte Form, NADPH, generiert. Nach Austritt eines Äquivalents Wasser aus dem Ring bildet sich ein sog. 5,6-Mannosen. Diese Spezies wird abschließend durch das zuvor gebildete NADPH an C-6 und unter Bildung des Produktes GKDM **reduziert**. Es findet also eine Cofaktorvermittelte, *intramolekulare* Hydrid-Verschiebung von C-4 nach C-6 statt, die durch entsprechende Markierungsexperimente belegt werden konnte [199]. Das Proton an der Position 5 wird während eines Katalysezyklus ausgetauscht. Zwar konnte das 5,6-Mannosen bisher noch nicht nachgewiesen werden, jedoch gelang der Nachweis für die nahezu identische Reaktion

¹EC Nummer: 4.2.1.47; die GMD wurde früher auch als GDP-Mannose-4,6-hydro-lyase bezeichnet (Angabe der *BRENDA* Datenbank, <http://www.brenda.uni-koeln.de>).

mit dTDP-D-Glucose¹ [281]. Hier konnte erstmalig das entsprechende 5,6-Glucosen detektiert werden [282, 283], so dass auch im Fall der GMD ein solcher Mechanismus sehr wahrscheinlich ist. Eigene NMR-Experimente, die in den Kapiteln 5.3.1 und 8 erläutert werden, untermauern zudem die Gültigkeit des postulierten Mechanismus.

Die enge Cofaktor- und Substratspezifität der GMD aus *E. coli* konnte analog zu den Hinweisen in der Literatur [166, 195] für das eigene gewonnene Enzym bestätigt werden. Abbildung 5.3 beweist, dass lediglich NADP, nicht jedoch NAD, als Cofaktor eingesetzt werden kann. Mit dem nicht-phosphorylierten Cofaktor findet kein Umsatz zum Produkt statt. Die hohe Spezifität des Enzyms dokumentiert auch der rechte Graph der Abbildung: das 2-Epimere der GDP-Man, die GDP-Glc, wird nicht umgesetzt. Dieses Ergebnis belegt zudem die Abwesenheit unspezifischer, Nucleotidzucker-spaltender Aktivitäten in der GMD Enzympräparation.

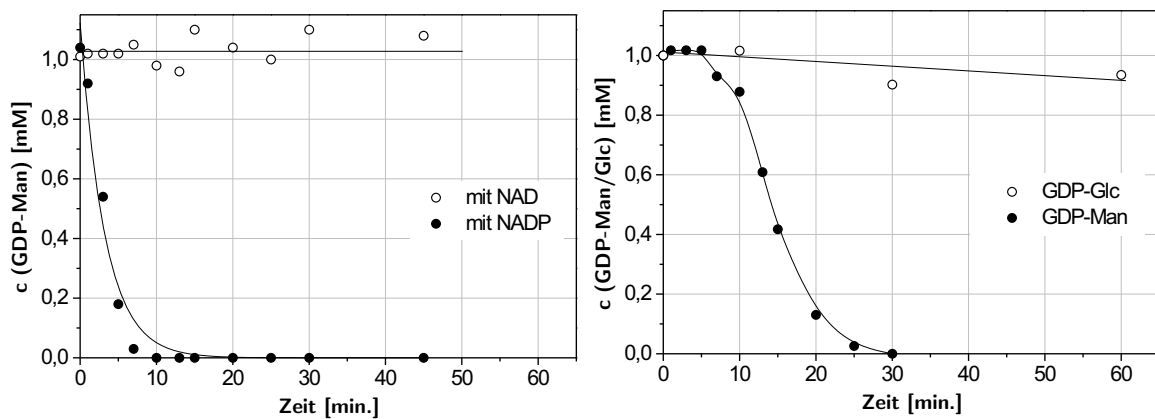


Abbildung 5.3: Spezifität der GMD für Cofaktor (links) und Substrat (rechts). Die Linien dienen lediglich als visuelle Hilfe.

Bedingungen: 1 mM Substrat (GDP-Man bzw. GDP-Glc), Cofaktor: 5 mM (links) bzw. 0,1 mM (rechts) NADP, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM Tris-HCl, pH 8, $T = 30^\circ C$, 0,26 mg/mL Protein (GMD-Präparation), $V = 1$ mL.

Die GMD benötigt zur Katalyse Magnesium-Ionen. Werden die in den Enzym-Präparationen noch vorhandenen Mg-Ionen durch einen starken Komplexbildner wie EDTA² maskiert, so verliert das Enzym seine katalytischen Eigenschaften. Über die Bindung des Magnesiums an das Enzym ist wenig bekannt, der Graph der Abbildung 5.4 auf der nächsten Seite zeigt, dass Konzentrationen um 1 mM die GMD sehr stark aktivieren. Die Enzymaktivität kann bei einer Konzentration von 10 mM noch gesteigert werden. Diese Beobachtung deckt sich mit bereits publizierten Daten zur GMD aus *E. coli* [195]. In den weiteren Versuchen wurde daher eine Mg^{2+} -Konzentration von 10 mM standardisiert eingesetzt.

¹D-Glucose ist das 2-Epimer der D-Mannose. Die dTDP-D-Glucose-4,6-Dehydratase ist NAD-abhängig.

²EDTA = Ethylenediamintetraacetic acid

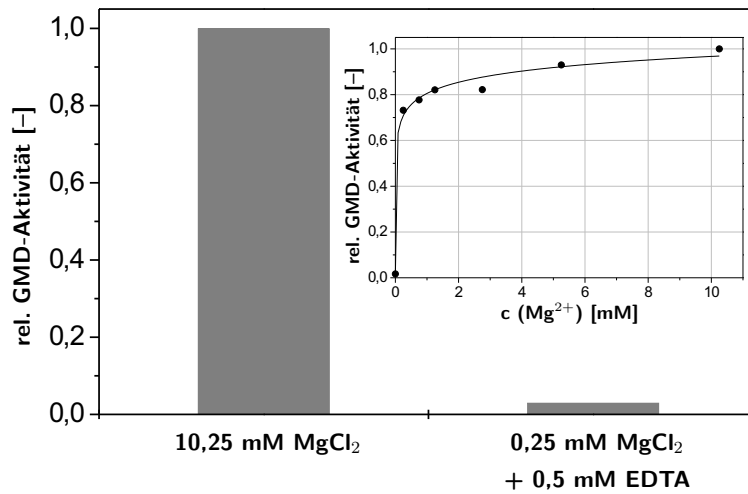


Abbildung 5.4: Mg²⁺-Abhängigkeit der GMD. Verlust der Enzymaktivität bei Abwesenheit von zweiwertigem Magnesium.

Bedingungen: 1 mM GDP-Man, 0,1 mM NADP und NADPH, MgCl₂ variiert, 50 mM Tris-HCl, pH 8, T = 30° C, 0,26 mg/mL Protein (GMD-Präparation), V = 1mL; mit EDTA (0,5 mM) maskierter Versuch mit 5 mM NADP gemessen.

5.2.1 Kinetische Untersuchungen zur GMD

In diesem Unterkapitel zur GMD werden die Ergebnisse der enzymkinetischen Messungen vorgestellt. Der Schwerpunkt liegt dabei auf der Rolle der Nicotinamidcofaktoren, NADP und NADPH. Die Messungen wurden mit dem in Kapitel 3.2.3 vorgestellten CE-Assay durchgeführt. Einige Versuche erforderten den Einsatz der HPLC-Methode. Der hier angewandte Enzymassay erlaubt die Messung des Substrats (GDP-Man), des Produkts (GKDM) sowie der beiden Cofaktoren NADP und NADPH. Die entsprechend dem Mechanismus intermediär auftauchenden Spezies können nicht detektiert werden.

5.2.1.1 Einfluss von Temperatur und pH-Wert

Die Berechnung der Aktivierungsenergie wurde auf der Basis von Standard-Versuchen unter Sättigungsbedingungen und unterschiedlichen Temperaturen erreicht. Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Temperatur kann, in Analogie zu chemisch-katalysierten Reaktionen, durch die *Arrhenius*-Gleichung (5.3) beschrieben werden [284].

$$A_{\text{GMD,rel}} = k \cdot e^{\frac{-E_A}{RT}} \quad (5.3)$$

mit:

$A_{\text{GMD,rel}}$	[$\mu\text{mol}/\text{min}$]	rel. GMD-Aktivität (Sättigungsbedingungen)
k	[$\mu\text{mol}/\text{min}$]	Frequenzfaktor
E_A	[J/mol]	Aktivierungsenergie
R	8,314 [J/(mol·K)]	allgemeine Gaskonstante
T	[K]	Temperatur (Kelvin)

Abbildung 5.5 zeigt das Ergebnis dieser Messungen. Aus der Linearisierung der Daten (*Arrhenius*-plot) ergibt sich für die GMD-Reaktion eine Aktivierungsenergie von $78,4 \pm 3,3$ kJ/mol, die damit in einem für Enzyme hohen Bereich liegt [285]. Der linke, nicht linearisierte Graph lässt erkennen, dass die GMD bei Temperaturen größer 35°C bereits stark desaktiviert. Da der Verlauf der Enzymaktivität als Funktion der Temperatur das Resultat der gegenläufigen Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit (Erhöhung von k_{cat}) und zunehmender Inaktivierung des Enzyms darstellt, ist die Beobachtung eines Aktivitätsmaximums zu erwarten. Im Falle der GMD liegt es mit etwa 35°C in der Nähe der gewöhnlichen Körpertemperatur.

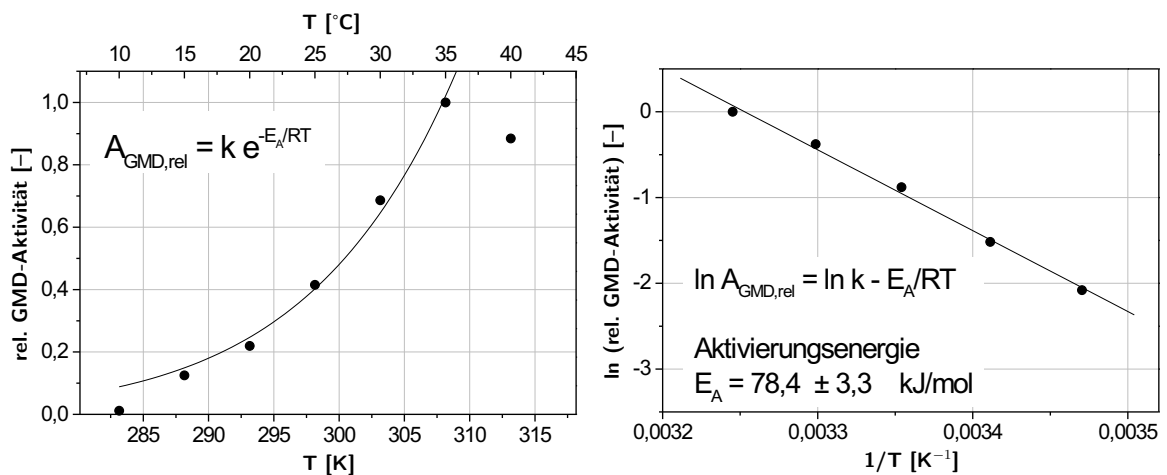


Abbildung 5.5: Einfluss der Temperatur auf die GMD-Aktivität (links) und Berechnung der Aktivierungsenergie (rechts, *Arrhenius* plot).

Bedingungen: 2,5 mM GDP-Man, 0,1 mM NADP und NADPH, 10 mM MgCl_2 , 50 mM Tris-HCl, pH 8, $T = 30^\circ\text{C}$, 0,125 mg/mL Protein (GMD-Präparation), $V = 1$ mL.

Zur Bestimmung der Abhängigkeit der GMD-Aktivität vom pH-Wert wurde ein Puffergemisch aus Tris und Maleinsäure verwendet. Dieses Gemisch puffert in einem pH-Bereich von 5 bis einschließlich 9 [286]. Auf diese Weise werden Einflüsse auf die Enzymaktivität durch unterschiedliche Puffersubstanzen vermieden. Abbildung 5.6 auf der nächsten Seite zeigt das pH-Profil der Dehydratase.

Hohe Enzymaktivitäten werden bei pH-Werten zwischen 6,5 und 8,0 und damit im physiologischen Bereich erzielt. Ob die Abnahme der Enzymaktivität außerhalb dieses Bereichs durch zunehmende Desaktivierung bedingt ist oder Auswirkungen auf den Katalysevorgang hat, kann aus diesen Messungen nicht abgeleitet werden.

Im Rahmen dieser Messungen wurde neben dem hier verwendeten Tris/Malein-Puffergemisch auch der Einfluss anderer Substanzen, welche im pH-Bereich 7 und 8 Puffereigenschaften

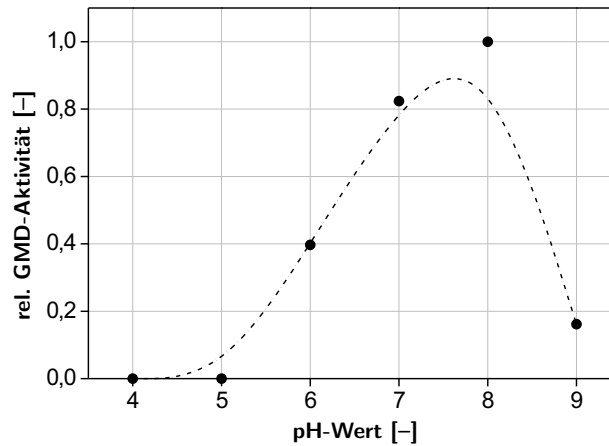


Abbildung 5.6: Einfluss des pH-Wertes auf die GMD-Aktivität. Die Linie dient lediglich der Veranschaulichung.

Bedingungen: 1 mM GDP-Man, 0,1 mM NADP und NADPH, 10 mM MgCl₂, Tris-Maleat-Puffer (50 mM Tris + 50 mM Maleat), T = 30° C, 0,26 mg/mL Protein (GMD-Präparation), V = 1 mL.

ten besitzen, auf die GMD-Aktivität untersucht. Es wurden insgesamt sechs übliche Puffer verglichen.¹ Die gemessenen Werte der Enzymaktivitäten variierten in einem Bereich um 15%, so dass für keine der verwendeten Substanzen eine starke Desaktivierung oder Aktivierung festgestellt werden konnte. Für die weiteren kinetischen Untersuchungen zur GMD wurde - bis auf wenige Ausnahmen - ein Tris-HCl-Gemisch bei einem pH-Wert von 8 als Standardpuffer gewählt.

¹verwendete Puffersubstanzen: HEPES, KPi, MES, MOPS, TEA und Tris, je 50 mM

5.2.1.2 Einfluss der Nicotinamidcofaktoren NADP und NADPH

Da die GMD nach der Aufreinigung als Apoenzym vorliegt, ist die Zugabe von NADP notwendig, um die Enzymaktivität wiederzugewinnen. Obwohl der Cofaktor entsprechend dem postulierten Mechanismus (Abbildung 5.2 auf Seite 60) in **nicht**-stöchiometrischen Mengen benötigt wird, stellt sich die Frage, welchen Einfluss unterschiedliche NADP-Konzentrationen auf die Enzymaktivität haben. Wie schon in Abbildung 5.3 auf Seite 61 zu erkennen, zeigen hohe NADP-Konzentrationen (5 mM) höhere Enzymaktivitäten als niedrige Konzentrationen (0,1 mM). Abbildung 5.7 zeigt den Umsatz-Verlauf für diese beiden Cofaktorkonzentrationen. Eine Erhöhung der Enzymaktivität durch Steigerung der NADP-Konzentration konnte auch für eine GMD aus *Klebsiella pneumoniae* beobachtet werden [193]; allerdings wurde das Enzym nicht in der Apoform gewonnen.

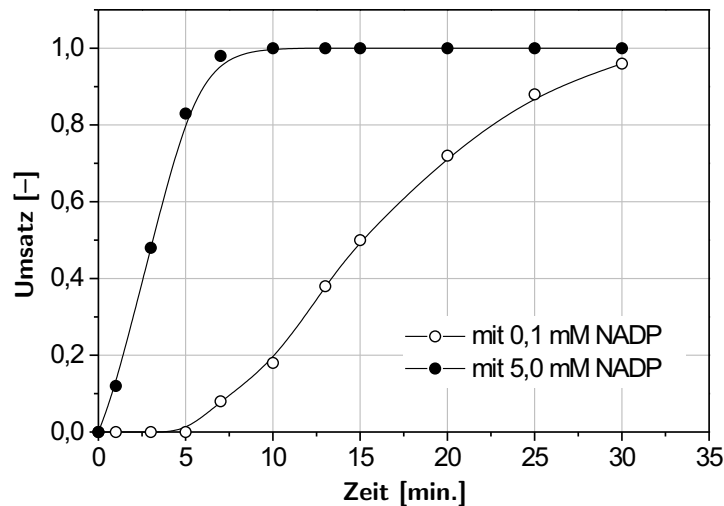


Abbildung 5.7: Aktivitätssteigerung der GMD durch Erhöhung der NADP-Konzentration. Die Linien dienen lediglich als visuelle Hilfe.

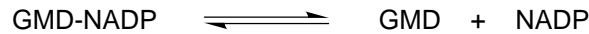
Bedingungen: 1 mM GDP-Man, Cofaktor: variiert, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM Tris-HCl, pH 8, $T = 30^\circ C$, 0,26 mg/mL Protein (GMD-Präparation), $V = 1$ mL.

Zwei wichtige Aussagen lassen sich aus diesem Ergebnis ableiten:

- Bei hohen NADP-Konzentrationen wird die Enzymaktivität erhöht.
- Bei niedrigen NADP-Konzentrationen (0,1 mM) tritt eine **lag-Phase** auf.

Eine solche *lag*-Phase und der sigmoidale Umsatz-Verlauf bei dieser Reaktion wurden in der Literatur bisher nicht beschrieben. In den Experimenten konnte dieses Verhalten des Enzyms jedoch reproduziert werden. Überraschend ist diese Beobachtung besonders vor dem Hintergrund, dass die Bindung des Cofaktors an das Enzym in der Literatur als sehr fest, "*tightly bound*" beschrieben wird [136, 195, 247]. Bei einer NADP-Konzentration von 0,1 mM

ist der Cofaktor in einem mehr als 15-fachen Überschuß zum Enzym gelöst, wenn vereinfachend angenommen wird, dass gelöstes Protein zu 100% aus GMD besteht. 0,26 mg/mL Protein entsprechen dann einer Konzentration von 6 μM .¹ Eine erste Vermutung, das Enzym sei unter diesen Bedingungen nicht ausreichend mit Cofaktor abgesättigt kann jedoch durch die folgende Überlegung ausgeschlossen werden: der Grad der Absättigung der *active sites* unter diesen Konzentrationsverhältnissen von Enzym und Cofaktor wird durch die Größe der Dissoziationskonstanten (K_d) für das Gleichgewicht



bestimmt. Es sind:

GMD-NADP	Konzentration der mit NADP "belegten" GMD im Gleichgewicht
GMD	Konzentration der freien GMD im Gleichgewicht
NADP	Konzentration des nicht gebundenen NADP im Gleichgewicht

Für die GMD aus *E. coli* und NADP ist der publizierte K_d -Wert [200]² mit 1,5 μM sehr klein. Der Sättigungsgrad der GMD unter den o.g. Bedingungen kann durch die Gleichung 5.4 berechnet werden.

$$\text{Sättigung} = \frac{\text{GMD-NADP}}{E_0} \quad (5.4)$$

E_0 ist die Konzentration des freien Enzyms vor Einstellung des Gleichgewichts. Ist K_d bekannt, so kann GMD-NADP berechnet werden.³

$$\text{GMD-NADP} = \frac{E_0}{\frac{K_d}{\text{NADP}_0} + 1} \quad (5.5)$$

NADP_0 kann hier in Näherung der Konzentration des freien NADP im Gleichgewicht gleichgesetzt werden, da es im Überschuß vorliegt. Das Einsetzen der Werte ergibt eine Sättigung der GMD mit NADP von mehr als 98%. Eine Belegung aller *active sites* mit NADP kann folglich bei einer Konzentration von 0,1 wie auch 5 mM angenommen und das Auftauchen der *lag*-Phase damit nicht auf eine geringere Absättigung des Enzyms mit NADP zurückgeführt werden.

Um die Durchführung des Enzymassays als mögliche Ursache der *lag*-Phase ausschließen zu können, wurden die Bedingungen in mehreren Punkten variiert. Abbildung 5.8 auf der nächsten Seite zeigt zwei Veränderungen und deren Auswirkung auf die beobachteten Reaktionsverläufe.

Falls die Bindung des Cofaktors an das (Apo)Enzym (Einstellung des Gleichgewichts) bei niedrigen Cofaktorkonzentrationen langsamer verläuft als bei hohen Konzentrationen, so sollte mit der Verlängerung der Inkubationszeit⁴ des Enzyms mit 0,1 mM NADP vor der Zugabe des Substrats GDP-Man (Start der Reaktion) die *lag*-Phase verkürzt werden können. Der linke Graph der Abbildung lässt jedoch erkennen, dass auch bei einer Vorinkubation von bis

¹Das Molekulargewicht der GMD beträgt 42,0 kD.

²Wert durch Fluoreszenz-Spektroskopie ermittelt.

³Herleitung aus der **allg. Bindungsgleichung** $\text{GMD-NADP} = \frac{E_0 \cdot \text{NADP}}{K_d + \text{NADP}}$. Näherung: $\text{NADP} = \text{NADP}_0$. Division durch NADP ergibt Formel 5.5.

⁴Standardmäßig wurde das Enzym 5-10 min. mit Cofaktor vorinkubiert.

zu einer Stunde identische Reaktionsverläufe resultieren. Ein langsames "Belegen" der NADP-Bindungstasche als Ursache des Reaktionsverlaufs kann damit ausgeschlossen werden.

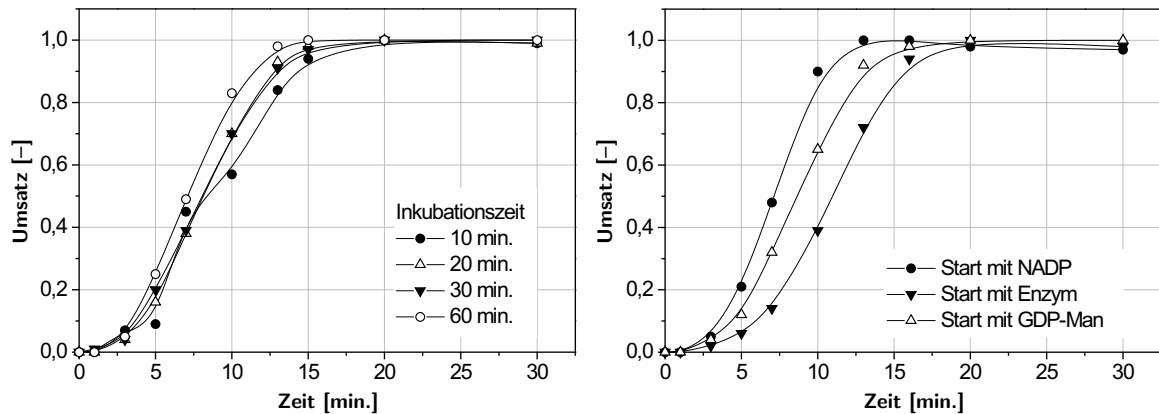


Abbildung 5.8: Variation der Assay-Bedingungen und der Einfluss auf die *lag*-Phase. Die Linien dienen lediglich als visuelle Hilfe.

Bedingungen: 1 mM GDP-Man, 0,1 mM NADP, 10 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 8, T = 30°C, 0,26 mg/mL Protein (GMD-Präparation), V = 1 mL.

Auch die Änderung der Startbedingungen der GMD-Reaktion zeigt keinen wesentlichen Einfluss auf die Verzögerung zu Beginn der Umsetzung (rechter Graph). Die Kurvenverläufe, und damit auch die berechneten Enzymaktivitäten, unterscheiden sich zwar voneinander, in allen Fällen ist aber dennoch eine deutliche *lag*-Phase und ein Anstieg des Umsatzes erst nach 5 min. Reaktionszeit zu erkennen. Die hohe Viskosität der GMD-Ezympräparation (50% Glycerin) könnte den beobachteten, langsameren Verlauf der Reaktion erklären, wenn diese mit Zugabe des Enzyms gestartet wird.

Neben diesen hier dargestellten Ergebnissen wurden auch weitere Punkte als mögliche Ursache des beobachteten sigmoidalen Reaktionsverlaufs bei niedrigen NADP-Konzentrationen untersucht. Eine Änderung des Verhältnisses von NADP/Mg²⁺ oder der Zusatz von BSA¹ bzw. DTT² (Stabilisierung bzw. Aufbrechen von Proteinstrukturen) zeigten aber keine Auswirkungen.

Die Kenntnis des Reaktionsmechanismus ebenso wie die 1998 publizierte Beobachtung, dass der Zusatz des reduzierten Cofaktors NADPH zur Reaktion die Enzymaktivität steigern kann,

Zitat [166]:

"Quite unexpectedly, both enzymes (human and from E. coli) are stimulated by NADPH at micromolar concentrations, although this cofactor does not play a role in catalysis."

ließ einen Einfluss von NADPH auf die *lag*-Phase als möglich erscheinen.

Abbildung 5.9 auf der nächsten Seite bestätigt diese Vermutung: der Zusatz von 0,1 mM

¹BSA = bovine serum albumine

²DTT = Dithiothreitol

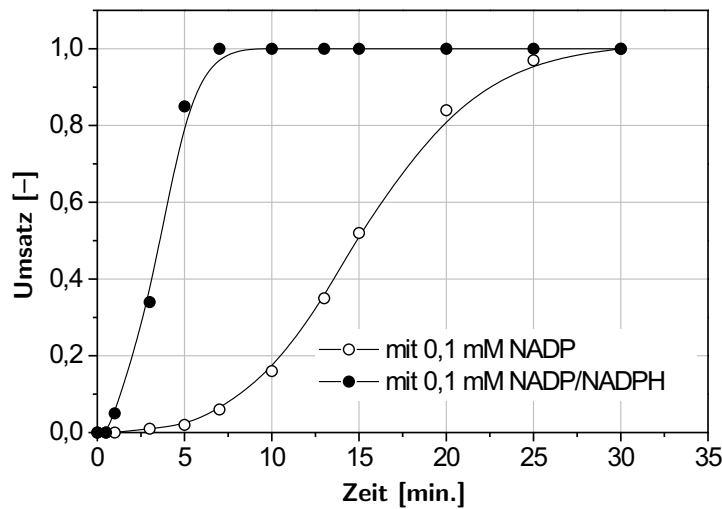


Abbildung 5.9: Aktivitätssteigerung der GMD durch Zugabe von NADPH. Die Linien dienen lediglich als visuelle Hilfe.

Bedingungen: 1 mM GDP-Man, Cofaktor: variiert, 10 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 8, T = 30° C, 0,26 mg/mL Protein (GMD-Präparation), V = 1 mL.

NADPH zu der gleichen Menge NADP hat, bei gleicher Enzymkonzentration, zwei wichtige Effekte auf den Reaktionsverlauf:

- die lag-Phase verschwindet,
- die Enzymaktivität wird erhöht.

Die Ursachen der Enzymaktivierung durch NADPH sind unbekannt. Auf Basis der publizierten Daten zum Reaktionsmechanismus und der Enzymeigenschaften allgemein muss davon ausgegangen werden, dass die GMD lediglich den oxidierten Cofaktor NADP zur Katalyse nutzen kann.

Ein Einfluss von NADPH auf den Katalysezyklus erscheint möglich, da der reduzierte Cofaktor im Laufe eines Zyklus gebildet und verbraucht wird. Eine Auswirkung auf die Enzymkonformation oder -agglomeration ist ebenfalls denkbar; jedoch sind die bisher publizierten Daten zur aktiven Spezies der GMD sehr unterschiedlich. Für das Enzym aus *E. coli* wird, wie für die GMD aus Schwein [136], von einer hexameren Struktur ausgegangen [195], jedoch wurde für die Dehydratase aus anderen Quellen zusätzlich auch von Homodimeren¹ und -tetrameren² berichtet.

Abbildung 5.10 auf der nächsten Seite zeigt den Verlauf der GMD-Reaktion bei Anwesenheit von ausschliesslich NADPH (0,1 mM) als verwendetem Cofaktor. Es überrascht, dass

¹*Klebsiella pneumoniae* [193] und Mensch [247]

²Mensch [247]

auch hier eine hohe Enzymaktivität gemessen werden kann, da die GMD-Reaktion - die Richtigkeit des Reaktionsmechanismus vorausgesetzt - doch durch eine **Oxidation** des Zuckers und **Reduktion** des Cofaktors NADP eingeleitet wird.

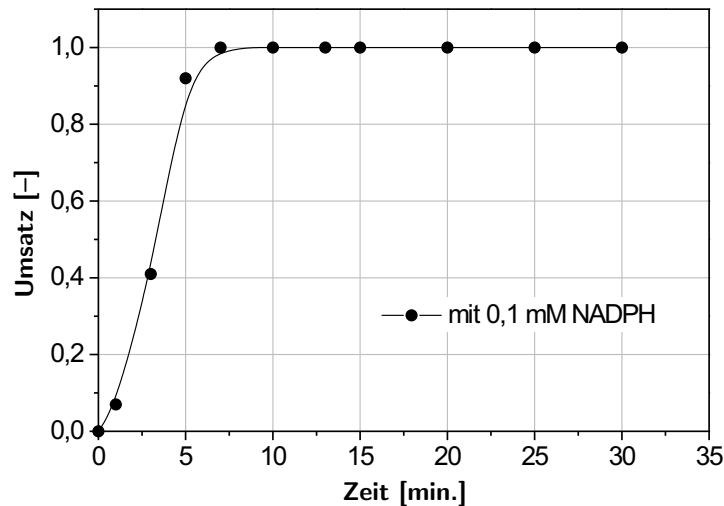


Abbildung 5.10: GMD-Reaktion mit NADPH als Cofaktor. Die Linien dienen lediglich als visuelle Hilfe.

Bedingungen: 1 mM GDP-Man, 0,1 mM NADPH, 10 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 8, T = 30° C, 0,26 mg/mL Protein (GMD-Präparation), V = 1 mL.

Zur Erklärung der dennoch beobachteten GMD-Aktivität lassen sich zwei Punkte heranziehen:

- Gehaltsbestimmungen von NADPH zeigten, dass übliche Präparationen bis zu 5% des oxidierten Cofaktors NADP enthalten.
- Es konnte eine schwache NADPH-oxidierende Aktivität in der GMD-Enzympräparation gemessen werden (s. unten).

Geringe Konzentrationen von NADPH können aus diesen Gründen ausreichend sein, um den Ablauf des Katalysezyklus zu ermöglichen. Dennoch ist eine erhebliche Steigerung der GMD-Aktivität durch NADPH dadurch bewiesen, dass die Enzymaktivität bei einer NADP-Konzentration, die einer 5%igen Verunreinigung des NADPH entspricht - bei 0,1 mM NADPH resultiert eine NADP-Konzentration von 5 µM - nur einen Bruchteil beträgt.

Bei Anwesenheit von **ausschliesslich** NADPH als Cofaktor sollte das (Apo)Enzym keine Aktivität zeigen. Eine experimentelle Überprüfung konnte aber im Rahmen dieser Arbeit nicht realisiert werden. Zwar ist es möglich, NADPH in sehr reiner Form enzymatisch herzustellen [287, 288], jedoch würde die vorhandene NADPH-Oxidase-Nebenaktivität der GMD-Präparation (siehe linker Graph der Abbildung 5.11 auf der nächsten Seite) immer kleine

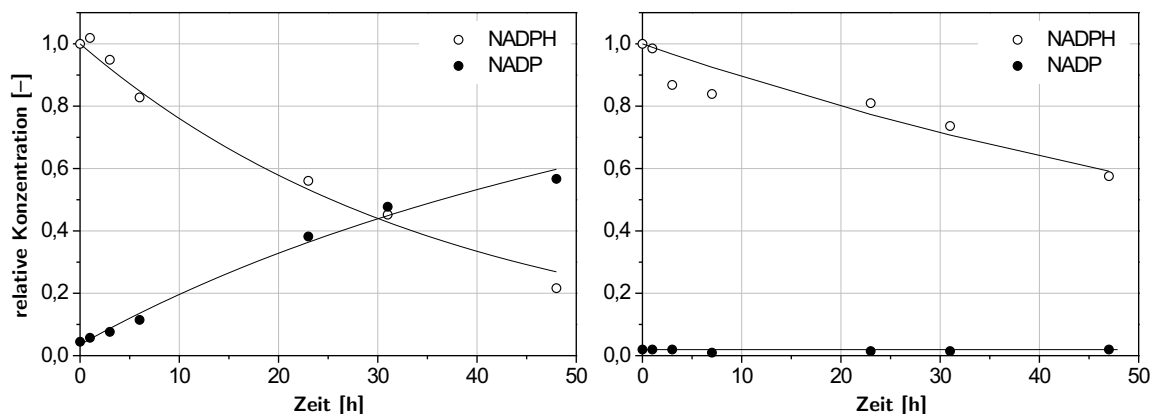


Abbildung 5.11: NADPH-oxidierende Nebenaktivität der GMD-Enzympräparation (**links**) und Kontrollversuch (**rechts**). Die Linien dienen lediglich als visuelle Hilfe.
 Bedingungen: (links) 2 mM NADPH, 10 mM $MgSO_4$, 50 mM MOPS, pH 7, $T = 30^\circ C$, 0,125 mg/mL Protein (GMD-Präparation) entsprechen 134 mU GMD bezogen auf Assay mit 0,1 mM NADP und 0,1 mM NADPH, (rechts) gleiche Bedingungen ohne Enzym; $V = 1$ mL.

Mengen NADP bilden. Ob es sich bei dieser Nebenaktivität um ein Fremdprotein der Enzympräparation oder um eine Eigenschaft der GMD handelt, ist unklar.

Beim nicht enzymkatalysierten Zerfall von NADPH (rechter Graph der Abbildung 5.11) wird kein NADP gebildet. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit einer Vielzahl von Publikationen, die sich mit der Desaktivierung der Nicotinamidcofaktoren unter verschiedenen Bedingungen befassen [289–292].

Die Geschwindigkeit der NADP-Bildung konnte zu 0,2% pro Einheit der GMD-Aktivität berechnet werden. Bei einer GMD-Enzymaktivität von 134 mU^1 , die in diesen Versuchen eingesetzt wurde, wird NADP, bei einer NADPH-Startkonzentration von 2 mM, mit einer Geschwindigkeit von 0,31 mU gebildet. Nach nur 10 Minuten werden 3 μM NADP gebildet. Diese NADP-Konzentration entspricht bereits derjenigen der Enzymkonzentration selber.² Diese Überlegung unterstreicht, dass mit den verwendeten Enzympräparationen eine Bildung von NADP aus NADPH nicht zu verhindern ist.

Eine NADPH-Oxidation kann auch während des Umsatzes von GDP-Man zu GKDM beobachtet werden. Abbildung 5.12 auf der nächsten Seite zeigt exemplarisch einen solchen Reaktionsverlauf. Die Konzentrationen der Cofaktoren, NADP und NADPH, betragen zu Beginn der Reaktion je 0,1 mM.

Die berechnete GMD-Aktivität dieses Versuchs beträgt 46 mU ,³ die Geschwindigkeit der NADP-Bildung kann hier zu 0,64 mU berechnet werden (1,4% der GMD-Aktivität). NADP wird schneller gebildet als im Fall der Messung von Abbildung 5.11. Jedoch wurde hier eine

¹bezogen auf den GMD-Standardassay entsprechend Kapitel 10

²Annahme: eingesetztes Protein (0,125 mg/mL) ist zu 100% GMD ($M = 42,0$ kD); es ergibt sich dann eine Enzymkonzentration von etwa 3 μM .

³Es konnte bei diesem Experiment nicht dieselbe Enzympräparation wie in Tabelle 5.1 auf Seite 71 eingesetzt werden. Die massenspezifische Aktivität der Präparation der Abbildung 5.12 war geringer.

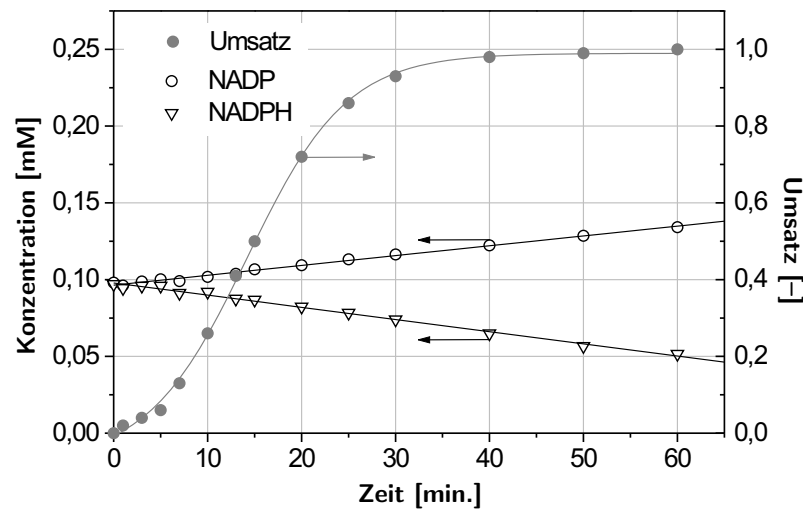


Abbildung 5.12: NADPH-Oxidation während der GMD-Reaktion. Ermittlung der Geschwindigkeit der NADP-Bildung durch lineare Regression.

Bedingungen: 1 mM GDP-Man, 0,1 mM NADP und NADPH, 10 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 8, T = 30°C, 0,21 mg/mL Protein (GMD-Präparation), V = 1 mL.

andere Enzympräparation eingesetzt. Unter den gleichen Prämissen¹ wären gleiche Konzentrationen von Enzym und NADP in weniger als 10 Minuten erreicht.

Tabelle 5.1 fasst die wichtigsten Abhängigkeiten der GMD-Aktivität von den unterschiedlichen Cofaktor-Konzentrationen zusammen.

c_{NADP}	c_{NADPH}	GMD-Aktivität normiert	lag-Phase
[mM]	[mM]	[-]	
0,1	–	0,29	ja
5,0	–	0,83	nein
0,1	0,1	0,93	nein
–	0,1	1,00	nein

Tabelle 5.1: Einfluss von NADP und NADPH auf die GMD-Aktivität. Zusammenfassung der Abbildungen 5.7, 5.9 und 5.10. Die normierte Enzymaktivität 1 entspricht einer GMD-Aktivität von 214 mU.

Bedingungen: 1 mM GDP-Man, 10 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 8, T = 30°C, 0,26 mg/mL Protein (GMD-Präparation), V = 1 mL.

¹Annahme: eingesetztes Protein (0,21 mg/mL) ist zu 100% GMD (M = 42,0 kD); es ergibt sich dann eine Enzymkonzentration von etwa 5 µM.

Bei gleicher Enzymkonzentration wird mit NADPH alleine die höchste Enzymaktivität erzielt. Liegen die Cofaktoren im Verhältnis 1:1 vor, jedoch in doppelter Gesamtkonzentration, so ist die gemessene Aktivität fast identisch. Bei hohen Konzentrationen von NADP (5 mM) werden noch 83% der Aktivität erzielt, dieser Wert sinkt jedoch auf 29% bei 0,1 mM NADP.

Die Experimente der Tabelle 5.1 wurden bei gleicher Enzymkonzentration durchgeführt (0,26 mg/mL Protein). Neben der Steigerung der Enzymaktivität bei unterschiedlichen Cofaktorkonzentrationen fällt auf, dass die *lag*-Phase nur bei der NADP-Konzentration auftaucht, die eine geringe Enzymaktivität zur Folge hat, in diesem Fall bei 0,1 mM.

Es wurde angenommen, dass das Auftauchen der *lag*-Phase nicht ausschliesslich in der Konzentration der Cofaktoren begründet liegt, sondern abhängig von der **Enzymaktivität** ist. Kleine Aktivitäten führen zu einer *lag*-Phase, hohe Aktivitäten setzen das Substrat ohne Verzögerung um. Eine Steigerung der Enzymaktivität kann dabei einerseits, entsprechend Tabelle 5.1, durch die Wahl der Cofaktoren erreicht werden, andererseits aber auch durch eine Erhöhung der **Enzymkonzentration** bei gleicher Cofaktorkonzentration.

Abbildung 5.13 zeigt das Wiederauftauchen der *lag*-Phase in Abhängigkeit der Enzymverdünnung bzw. -konzentration. Dargestellt sind die einzelnen Umsatz-Verläufe der *batch*-Versuche mit je 0,1 mM NADP und NADPH. Wie zu erwarten, nimmt die Enzymaktivität mit zunehmender Verdünnung ab. Gleichzeitig nimmt die Länge der *lag*-Phase zu.

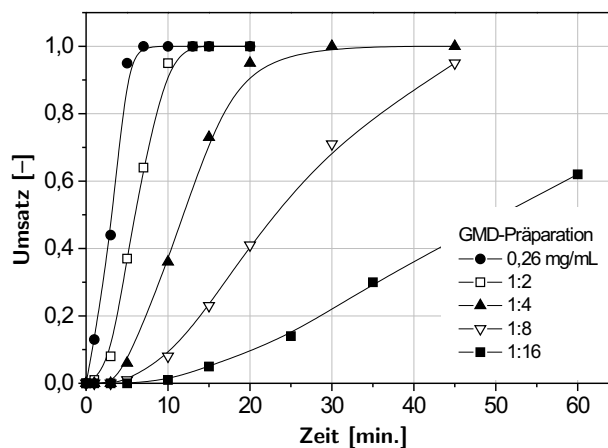


Abbildung 5.13: Umsatzverläufe in Abhängigkeit der Enzymkonzentration. Die Linien dienen lediglich als visuelle Hilfe.

Bedingungen: 1 mM GDP-Man, 0,1 mM NADP, 0,1 mM NADPH, 10 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 8, T = 30°C, 0,016-0,26 mg/mL Protein (GMD-Präparation), V = 1 mL.

Bei einer Verdünnung von 16 (0,016 mg/mL Protein) ist erst nach einer Zeit von 10 min. eine Umsetzung der GDP-Man zu erkennen. Bei Einsatz der nicht-vorverdünnten Enzympräparation tritt keine *lag*-Phase auf und der Umsatzverlauf entspricht demjenigen der Abbildung 5.9 auf Seite 68.

Im Laufe der Arbeiten kamen unterschiedliche Enzympräparationen zum Einsatz, die sich in ihrer massenspezifischen Aktivität unterschieden. Bei gleicher Proteinkonzentration wurden

daher unterschiedliche Enzymaktivitäten gemessen sowie voneinander abweichende Umsatzverläufe beobachtet.

Die Ergebnisse der Tabelle 5.1 und der Abbildung 5.13 lassen sich in zwei Punkten zusammenfassen:

- Die Enzymaktivität kann, bei gleicher Enzymkonzentration, durch Änderung der Cofaktorkonzentrationen erhöht oder erniedrigt werden. Dabei wird vorausgesetzt, dass das Enzym in allen untersuchten Fällen mit Cofaktor abgesättigt ist.
- Hohe Enzymaktivitäten verhindern das Auftreten einer *lag*-Phase.

Ausgehend von den bisherigen Ergebnissen soll nun die Abhängigkeit der Enzymaktivität von den einzelnen Cofaktorkonzentrationen (NADP und NADPH) untersucht werden. Bei Variation der NADPH-Konzentration kann aufgrund der o.g. Schwierigkeiten nicht eindeutig geklärt werden, welchen Einfluss das vorhandene NADP bei diesen Messungen haben wird. Der Einfluss der NADPH-Konzentration auf die Enzymaktivität ist jedoch entscheidend, da offensichtlich bereits kleine Konzentrationen das Enzym stark aktivieren können. Da die Messung der Einzelreaktionen der GMD-Reaktion im Rahmen dieser Arbeit experimentell nicht möglich war, konnte der Einfluss der Cofaktorkonzentrationen nur für die Gesamtreaktionen gemessen werden.

An dieser Stelle soll auf eine durch die *lag*-Phase bedingte Konsequenz und Schwierigkeit zur Messung von Geschwindigkeiten der GMD-Reaktion hingewiesen werden. Wie in Kapitel 3.2 vorgestellt, wird die Geschwindigkeit der GMD-Reaktion durch Anlegen einer Geraden durch mehrere Messpunkte im linearen Bereich der Umsatzfunktion berechnet. Neben der Einschränkung, dass dieser Enzymassay lediglich die Gesamtreaktion ($\text{GDP-Man} \rightarrow \text{GKDM}$) messen kann, ist durch das Auftreten der *lag*-Phase auch die Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit nur eingeschränkt möglich. Der für die Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit notwendige lineare Bereich des Umsatzverlaufs (*steady-state*-Bereich), beginnt, in Abhängigkeit der *lag*-Phase, bei zum Teil sehr unterschiedlichen Umsatzpunkten.

Die mit dem Assay gemessene Reaktionsgeschwindigkeit ist also *keine* Anfangsreaktionsgeschwindigkeit im strengen Sinne. Es ist zwar die Geschwindigkeit im *steady-state*, da Linearität beobachtet wird, jedoch kann durch die Berechnung aus der Geraden im linearen Umsatzbereich nur eine *gemittelte* Reaktionsgeschwindigkeit im jeweiligen Umsatzbereich gemessen werden. Aufgrund der Eigenschaften der GMD-Reaktion sowie der beschriebenen Auswertung des Enzymassays müssen die erhaltenen kinetischen Parameter daher als apparente Konstanten ($K_{M,app}$ und $v_{max,app}$) angesehen werden.¹ Die beobachteten Kinetiken werden jedoch bei der Aufstellung eines einfachen (makro)kinetischen Modells der GMD-Reaktion berücksichtigt werden (Kapitel 5.2.2).

Abbildung 5.14 auf der nächsten Seite zeigt den Einfluss der NADP-Anfangskonzentration auf die Enzymaktivität. Es ist der Verlauf einer Sättigungsfunktion zu beobachten. Auf der Basis eines einfachen *Michaelis-Menten*-Modells kann für den Cofaktor NADP ein K_M -Wert von $240,2 \pm 41,6 \mu\text{M}$ bestimmt werden; v_{max} beträgt $0,59 \pm 0,02 \text{ U/mg}$. Der hohe K_M -Wert steht im Widerspruch zu der zuvor gemachten Überlegung, dass das Enzym bereits bei einer NADP-Konzentration von 0,1 mM fast vollständig abgesättigt ist. Die Ursache für diese Diskrepanz ist unklar.

¹Auf gesonderte Abkürzungen wurde verzichtet.

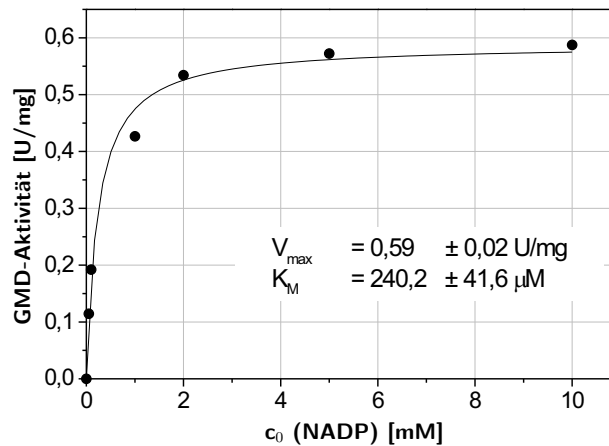


Abbildung 5.14: Abhängigkeit der GMD-Aktivität von der NADP-Anfangskonzentration. Bedingungen: 1 mM GDP-Man, NADP variiert, 10 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 8, T = 30° C, 1 mg/mL BSA, 0,26 mg/mL Protein (GMD-Präparation), V = 1 mL.

Auch im Falle des NADPH kann für die GMD-Reaktion eine Sättigungskinetik beobachtet werden (Abbildung 5.15). Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten wurde auch hier das *Michaelis-Menten*-Modell zugrunde gelegt.

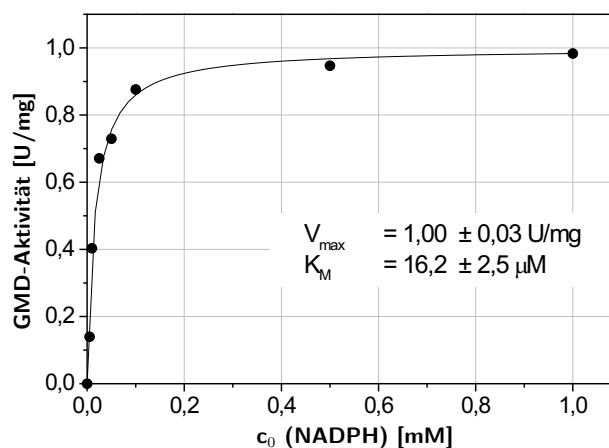


Abbildung 5.15: Abhängigkeit der GMD-Aktivität von der NADPH-Anfangskonzentration. Bedingungen: 1 mM GDP-Man, NADPH variiert, 10 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 8, T = 30° C, 1 mg/mL BSA, 0,13 mg/mL Protein (GMD-Präparation), V = 1 mL.

Es wird deutlich, dass der K_M -Wert für NADPH mit $16,2 \pm 2,5 \mu\text{M}$ um einen Faktor von etwa 15 kleiner ist. Die Affinität des Enzyms ist für den reduzierten Cofaktor offenbar höher

als für den oxidierten Cofaktor NADP. Diese Beobachtung deckt sich in der Grundaussage mit den veröffentlichten Daten der Dissoziationskonstanten der GMD aus *E. coli* für beide Cofaktoren. Für NADP ist ein Wert von $1,5 \mu\text{M}$ publiziert, für NADPH konnte er zu $0,5 \mu\text{M}$ bestimmt werden [200]. Weiterhin fällt auf, dass mit NADPH als verwendetem Cofaktor die spezifische Aktivität der GMD höher ist als mit NADP. Konnte für NADP ein v_{max} von $0,59 \pm 0,02 \text{ U/mg}$ bestimmt werden, so liegt es für NADPH bei $1,00 \pm 0,03 \text{ U/mg}$ und damit um mehr als ein Drittel höher. Damit wird die in der Tabelle 5.1 dokumentierte Feststellung bestätigt, dass, bei gleichen Anfangskonzentrationen, mit dem reduzierten Cofaktor NADPH höhere Enzymaktivitäten erreicht werden können als mit NADP.

Bereits Abbildung 5.2, die den Reaktionsmechanismus der GMD-Reaktion zeigt, macht deutlich, dass sowohl die oxidierte als auch die reduzierte Form des Cofaktors für die Katalyse notwendig ist. Die Kinetiken zeigen zudem deutliche Unterschiede für die beiden Formen NADP und NADPH. Es stellte sich daher die Frage, welchen Einfluss das *Verhältnis* der beiden Cofaktoren (NADP/NADPH) auf die Enzymaktivität haben würde, wenn die Gesamtkonzentration der Cofaktoren konstant bleibt. Diese Fragestellung ist besonders aus ökonomischer Sicht von Interesse. Da NADP mit 39 €/g^1 um einen Faktor von etwa 5 kostengünstiger als der reduzierte Cofaktor ist (190 €/g), muss geklärt werden, ob bei gleicher Gesamtkonzentration ein hoher Anteil an NADP gleich hohe oder sogar höhere Enzymaktivitäten bewirkt als der Einsatz von ausschliesslich NADPH.

Abbildung 5.16 stellt die Ergebnisse dieser Messungen graphisch dar. Die Gesamtkonzentration der Cofaktoren beträgt für alle Messpunkte $0,2 \text{ mM}$.

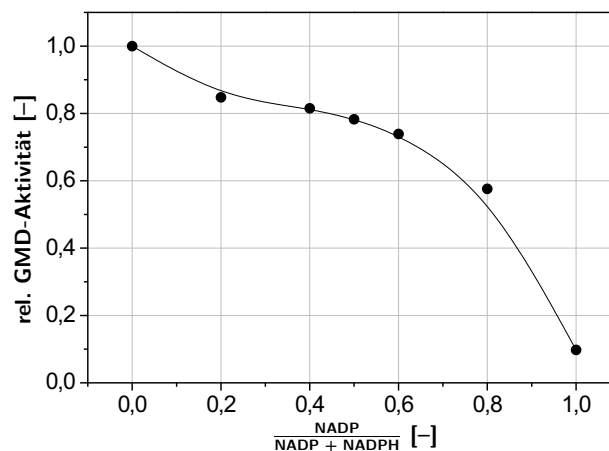


Abbildung 5.16: GMD-Aktivität als Funktion des Verhältnisses $\frac{\text{NADP}}{\text{NADP} + \text{NADPH}}$. Die dargestellte Linie dient lediglich als visuelle Hilfe.

Bedingungen: 1 mM GDP-Man , NADP und NADPH variiert, 10 mM MgCl_2 , 50 mM Tris-HCl , $\text{pH } 8$, $T = 30^\circ \text{ C}$, $0,13 \text{ mg/mL Protein (GMD-Präparation)}$, $V = 1 \text{ mL}$.

Die Graphik zeigt, dass der Anteil an NADP bei einer gegebenen Gesamtkonzentration der Cofaktoren einen entscheidenden Einfluss auf die Enzymaktivität besitzt. Es muss aber betont

¹Preise nach JFC - Juelich Fine Chemicals GmbH, D-52428 Juelich, Katalog 15/03.

werden, dass diese Messung nur die Situation für **eine** Gesamtkonzentration der Cofaktoren zeigt (hier 0,2 mM). Diese Konzentration entspricht etwa dem gemessenen K_M -Wert für NADP, im Falle des NADPH ist diese Konzentration höher als das Zehnfache des K_M -Werts. Es ist daher möglich, dass sich die Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Verhältnis der Cofaktoren ändert, wenn sich die Gesamtkonzentration ändert.

Auch diese Messung bestätigt, dass ein hoher Anteil an NADPH zu höheren Enzymaktivitäten der GMD führt. Bei der Messung mit "100%" NADPH muss auch hier die Einschränkung berücksichtigt werden, dass es nicht möglich ist, NADP-freie Reaktionsbedingungen zu schaffen.

Die Ergebnisse der Abbildung 5.16 lassen sich in drei wichtigen Punkten zusammenfassen:

- Die höchste Enzymaktivität wird beim höchstmöglichen Anteil an NADPH erzielt.
- In einem Bereich von 0,2 - 0,6 wird eine annähernd konstante Enzymaktivität beobachtet.
- Die niedrigste Enzymaktivität wird mit 100%igem Anteil an NADP gemessen (10% der maximalen Aktivität).

Die bisherigen Erkenntnisse zum Einfluss der beiden Cofaktoren, NADP und NADPH, auf die GMD-Aktivität wurden ausschliesslich in *batch*-Versuchen gewonnen. Die Anfangskonzentrationen der Cofaktoren waren daher über die gesamte Reaktionszeit konstant, wenn vereinfachend angenommen wird, dass der Einfluss der (langsamen) NADPH-Oxidation das Verhältnis der Cofaktoren während der Reaktion nur unwesentlich verändert.

Es stellt sich an dieser Stelle die Frage, ob eine einmalige Aktivierung des Enzyms ausreicht, um in weiteren Reaktionen mit dann veränderten Cofaktorkonzentrationen die gleichen Aktivitäten zu zeigen. Die Beantwortung dieser Frage ist für eine eventuelle, kontinuierliche Reaktionsführung von entscheidender Bedeutung, da bei der Reaktion unter Auslaufbedingungen eine nur einmalige Aktivierung (z.B. durch irreversible Bindung des Cofaktor oder durch Induktion einer aktiven Enzymkonformation) wesentlich kostengünstiger wäre als eine kontinuierliche Dosierung des Cofaktors. Das einmalig aktivierte Enzym könnte dann das kontinuierlich zugefügte Substrat (GDP-Man) ohne weitere Zufuhr der Cofaktoren umsetzen.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden zwei *repetitive batch*-Versuche durchgeführt. Das Prinzip eines *repetitive batch* ist schematisch in Abbildung 5.17 auf der nächsten Seite dargestellt. Es handelt sich um ein Reaktionsgefäß mit einer Membran, welche für die Pufferlösung und die darin enthaltenen Reaktanden, nicht jedoch für das Enzym durchlässig ist.

Nach Befüllen des Reaktionsgefäßes mit Enzym, Substrat und Cofaktoren, wird die Reaktion bis zur quantitativen Umsetzung der GDP-Man zu GKDM durchgeführt. Anschließend kann die Produktlösung zusammen mit den Cofaktoren abfiltriert werden, das Enzym wird in einem Restvolumen durch die Membran zurückgehalten. Ein erneutes Befüllen des Reaktionsgefäßes ermöglicht die Durchführung der Reaktion unter veränderten Bedingungen. Auf diese Weise können mehrere Umsetzungen mit demselben Enzym realisiert werden.

Im ersten *repetitive batch*-Versuch wurde die GMD-Reaktion viermal hintereinander mit der gleichen Cofaktorkonzentration (0,1 mM NADP) durchgeführt. Der Cofaktor wurde in jedem Zyklus neu zudosiert. Den Verlauf der Reaktionen zeigt Abbildung 5.18 auf der nächsten Seite.

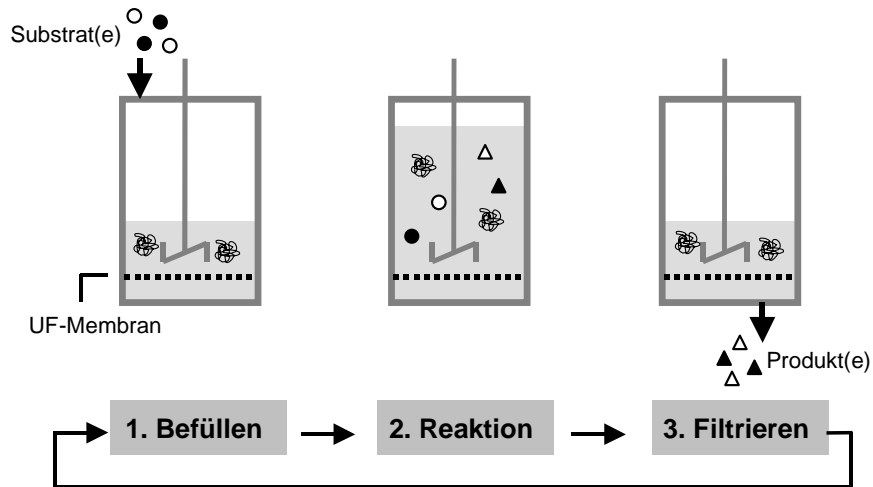


Abbildung 5.17: Schematische Darstellung des *repetitive batch*-Verfahrens.

Das Verfahren erlaubt die sequentielle Durchführung mehrerer Reaktionen bei unterschiedlichen Bedingungen, jedoch mit demselben Enzym.

Es zeigte sich, dass die GMD unter den Bedingungen eines *repetitive batch*-Verfahrens hinreichend stabil ist, um vier Cyclen der Reaktion unter identischen Bedingungen durchführen zu können. Jedoch nimmt die Enzymaktivität in jedem Lauf etwas ab; es ist zu erkennen, dass im dritten und vierten Cyclus eine kurze *lag*-Phase auftritt.

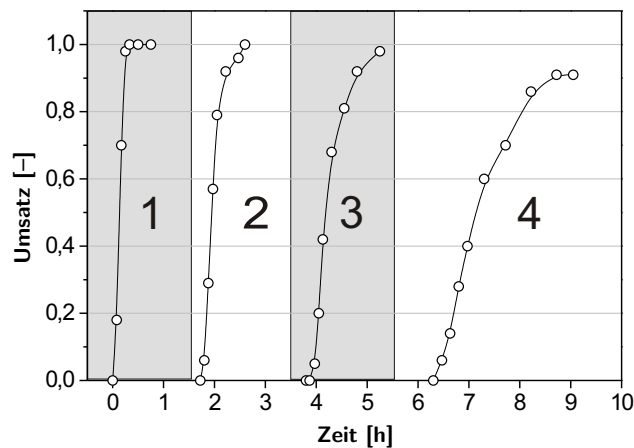


Abbildung 5.18: *Repetitive batch*-Verfahren der GMD-Reaktion bei konstanter NADP-Konzentration. Die dargestellten Linien dienen lediglich als visuelle Hilfe.

Bedingungen: je 1 mM GDP-Man, je 0,1 mM NADP in Cyclus 1, 2, 3 und 4, 10 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 8, T = 30°C, 1 mg/mL BSA, 0,52 mg/mL Protein (GMD-Präparation), V = 5 mL, YM10-Membran.

Aus den Werten der Enzymaktivität pro *cycle* konnte die Desaktivierung des Enzyms, ausgedrückt durch die Desaktivierungskonstante k_{des} , unter diesen Bedingungen bestimmt werden. Sie beträgt $k_{des} = 0,315 \text{ h}^{-1}$. Bei der Annahme einer Zerfallskinetik erster Ordnung ergibt sich damit eine Halbwertszeit von nur $\tau_{1/2} = 2,2 \text{ h}$.¹

Im zweiten *repetitive batch*-Versuch wurden erneut vier Cyclen der GMD-Reaktion durchgeführt. Die Bedingungen gleichen denen des ersten Versuchs, jedoch wurde nun in jedem *cycle* die Cofaktor-, d.h. die NADP-Konzentration variiert. Es wurden folgende NADP-Konzentrationen eingestellt:

<i>cycle</i> 1	: 0,1 mM
<i>cycle</i> 2	: 0,02 mM
<i>cycle</i> 3	: 5 mM
<i>cycle</i> 4	: 1 mM

Das Ergebnis dieser Versuche zeigt Abbildung 5.19. Der Verlauf des ersten Umsatz-Zeit-plots entspricht wie erwartet dem des ersten *repetitive batch*, da hier die Reaktionsbedingungen identisch sind. Im zweiten Cyclus ist zu erkennen, dass bei einer Abnahme der NADP-Konzentration (0,1 mM \rightarrow 0,02 mM) die GMD-Aktivität sinkt. Zusätzlich tritt eine *lag*-Phase auf: im zweiten Cyclus wird erst nach etwa 10 min. (nach Substratzugabe) Produkt gebildet.

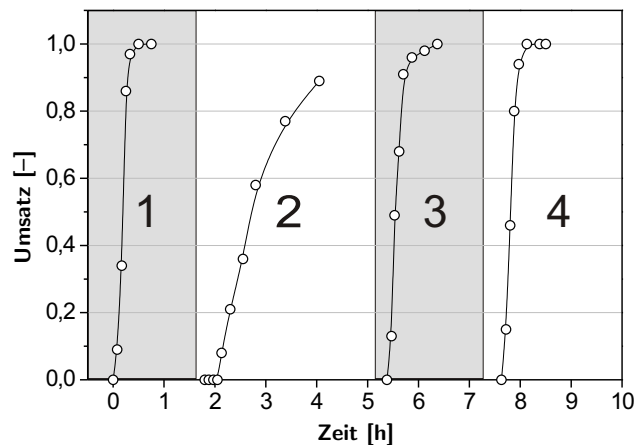


Abbildung 5.19: *Repetitive batch*-Verfahren der GMD-Reaktion bei veränderter NADP-Konzentration. Die dargestellten Linien dienen lediglich als visuelle Hilfe. *Bedingungen: entsprechend Abbildung 5.18, NADP-Konzentrationen siehe Text.*

Wird die NADP-Konzentration im dritten Cyclus auf 5 mM erhöht (entspricht etwa dem 20-fachen K_M -Wert), so steigt die Enzymaktivität wieder an und bleibt im vierten Cyclus (1 mM NADP) annähernd konstant. Diese Ergebnisse belegen eindeutig, dass eine einmalige Aktivierung der GMD durch eine günstige Cofaktorkonzentration nicht ausreichend ist, um

¹berechnet nach: $\tau_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{des}}$.

die Enzymaktivität auch unter anderen Reaktionsbedingungen (wechselnde Cofaktorkonzentrationen) gleich hoch zu halten.

Überlegungen, dass bestimmte Cofaktorkonzentrationen die Ausbildung aktiver Enzymkonformere oder höherer Aggregate (dimer oder hexamer) begünstigen, können als Ursache der Aktivierung zwar nicht ausgeschlossen werden, jedoch müssten diese eine so geringe Stabilität aufweisen, dass sie bei Wechsel der Reaktionsbedingungen auseinanderbrechen und in weniger aktive Formen zerfallen. Stabile "aktivierte" Formen der GMD wären sonst in der Lage, auch bei niedrigeren Cofaktorkonzentrationen die Reaktion gleich schnell zu katalysieren wie bei höheren NADP-Konzentrationen. Besonders die Umsatz-Verläufe des ersten und zweiten Cyclus sprechen gegen eine solche Annahme.

Eine Bestimmung der Enzymstabilität im zweiten *repetitive batch* ist aufgrund der unterschiedlichen Aktivierung des Enzyms in jedem *cycle* nicht möglich. Hier sind die Enzymaktivierung durch den Cofaktor und die thermische Desaktivierung des Biokatalysators gegenläufige Effekte.

5.2.1.3 Einfluss von Substrat- und Produktkonzentration

Bei der Messung der GMD-Kinetik bezüglich des Substrats, GDP-Man, sollte vor allem die Frage geklärt werden, ob unterschiedliche Cofaktorkonzentrationen eine Veränderung der kinetischen Parameter bewirken. Den Einfluss der GDP-Man-Konzentration auf die GMD-Aktivität zeigt Abbildung 5.20. Die kinetischen Messungen wurden bei zwei unterschiedlichen Cofaktorkonzentrationen durchgeführt: bei 5 mM NADP bzw. bei 0,1 mM NADP und 0,1 mM NADPH.

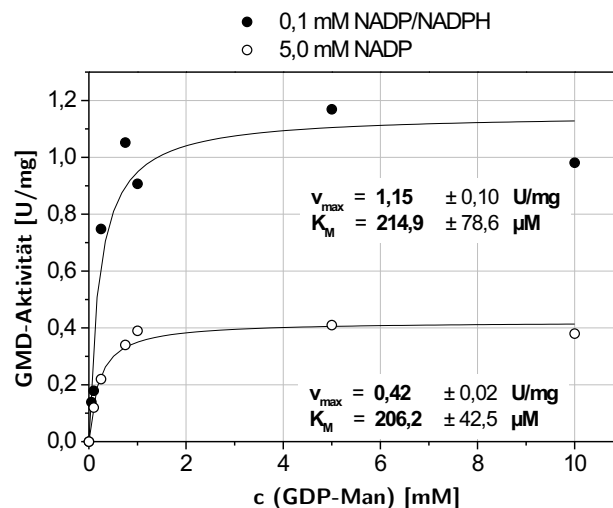


Abbildung 5.20: Abhängigkeit der GMD-Aktivität von der GDP-Man-Konzentration.
Bedingungen: GDP-Man variiert, Cofaktoren siehe Graph, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM Tris-HCl, pH 8, $T = 30^\circ C$, 0,13 mg/mL Protein (GMD-Präparation), $V = 1$ mL.

Die Messungen zeigen drei wichtige Eigenschaften der GDP-Man-Kinetik:

- in beiden Fällen wird eine Sättigungskinetik beobachtet.
- bei 0,1 mM NADP/NADPH liegt v_{max} um einen Faktor 2,7 höher als im Falle von 5 mM NADP ($v_{max} = 1,15$ bzw. $0,42$ U/mg).
- der K_M -Wert für GDP-Man verändert sich trotz der verschiedenen Cofaktorkonzentrationen **nicht**.

Eine Wiederholung der Messung ergab höhere K_M -Werte (317,2 bzw. 334,6 μM) bei etwa gleichen Werten für v_{max} . Der apparente K_M -Wert für GDP-Man wurde daher als Mittelwert der vier Messungen zu $268,2 \pm 82,2$ μM berechnet. Auch hier diente das Modell einer einfachen *Michaelis-Menten*-Kinetik als Grundlage zur Berechnung der Parameter.

Abbildung 5.21 zeigt die Abhängigkeit der GMD-Aktivität von der Produktkonzentration (GKDM). Es muss erwähnt werden, dass das Produkt erst in einem späten Stadium der Arbeit in einem für die Messungen ausreichendem Maße zur Verfügung stand. Die beobachtete Produktinhibierung mit einem K_I -Wert von $472,7$ μM ist bisher nicht publiziert. Die schwache Inhibierung der Reaktion bei Produktkonzentration bis 1 mM wurde für die weiteren kinetischen Untersuchungen und Berechnungen vernachlässigt. Wird bei höheren Substrat- bzw. Produktkonzentrationen gearbeitet, so muss diese Produktinhibierung jedoch berücksichtigt werden. Zur Ermittlung der Inhibitorkonstanten wurde der K_M -Wert für GDP-Man fixiert und K_I an die Messreihe angepasst. Als Modell wurde eine einfache *Michaelis-Menten*-Kinetik mit kompetitiver Produktinhibierung vorausgesetzt.

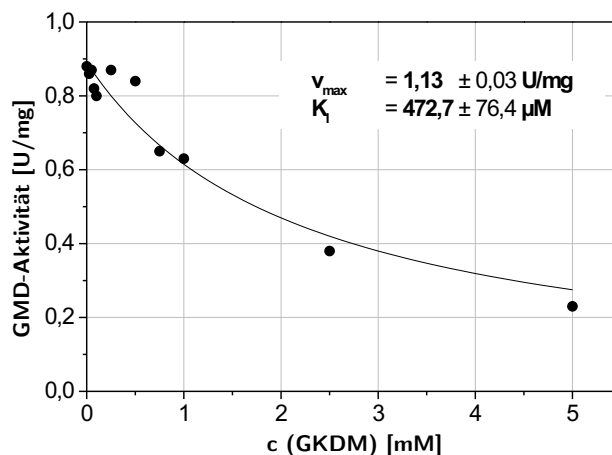


Abbildung 5.21: Abhängigkeit der GMD-Aktivität von der GKDM-Konzentration.

Bedingungen: 1 mM GDP-Man, 0,1 mM NADP, 0,1 mM NADPH, 10 mM MgCl_2 , 50 mM Tris-HCl, pH 8, $T = 30^\circ\text{C}$, 0,125 mg/mL Protein (GMD-Präparation), $V = 1$ mL.

5.2.1.4 Einfluss von GDP-Fuc

Wie bereits in der Einleitung (Kapitel 1) erwähnt, wird die Biosynthese der GDP-Fuc *in vivo* durch einen *feedback*-Mechanismus kontrolliert: das Produkt der Reaktionskaskade GDP-Man

→ GKDM → GDP-Fuc wirkt stark inhibierend auf das erste Enzym, die GMD. Als Folge wird die Bildung von GKDM verlangsamt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *feedback*-Inhibierung unter Annahme einer einfachen *Michaelis-Menten*-Kinetik mit kompetitiver Produktinhibierung als kinetisches Modell quantifiziert. Abbildung 5.22 fasst das Ergebnis der Messreihe zusammen.

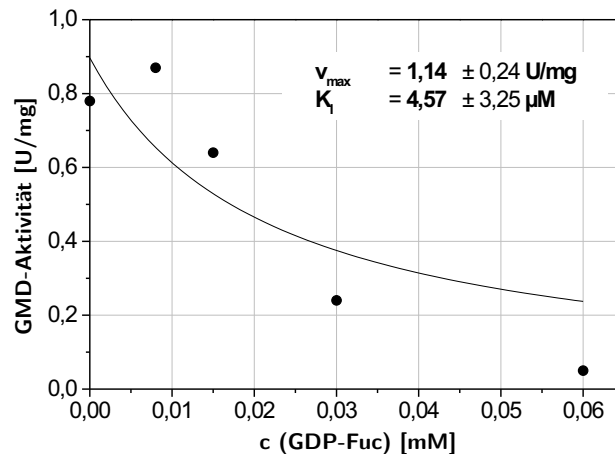


Abbildung 5.22: Abhängigkeit der GMD-Aktivität von der GDP-Fuc-Konzentration (*feedback*-Inhibierung).

Bedingungen: 1 mM GDP-Man, GDP-Fuc variiert, 0,1 mM NADP, 0,1 mM NADPH, 10 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 8, T = 30° C, 0,13 mg/mL Protein (GMD-Präparation), V = 1 mL.

Wie im Falle der Produktinhibierung der GMD durch GKDM wurde zur Ermittlung der Inhibitorkonstanten der K_M -Wert für GDP-Man fixiert und K_I an die Messreihe angepasst. Der gemessene Wert für die Inhibitorkonstante liegt mit 4,6 μM sehr niedrig und unterstreicht die starke Inhibierung der GMD durch GDP-Fuc. Bei einer GDP-Fuc-Konzentration von nur 0,1 mM kommt die GMD-Reaktion beinahe vollständig zum Erliegen, wenn 1 mM GDP-Man umgesetzt werden sollen. Diese Eigenschaft des Systems macht deutlich, dass ein Verfahren zur effizienten Synthese von GDP-Fuc vor allen Dingen diese auftretende *feedback*-Inhibierung vermeiden muss. In Kapitel 6 wird auf diesen Punkt näher eingegangen.

5.2.2 Kinetisches Modell der Cofaktor-abhängigen GMD-Aktivierung

Die Werte der kinetischen Parameter der GMD-Reaktion wurden alle in voneinander unabhängigen Messungen durch Anpassung an die jeweiligen Messreihen erhalten. Hierzu wurde eine einfache *Michaelis-Menten*-Kinetik als Modell zugrunde gelegt, erweitert um die jeweiligen Inhibierungsterme. Ziel dieser kinetischen Messungen war das Erkennen der einzelnen Abhängigkeiten und der Einfluss verschiedener Faktoren auf die Enzymaktivität.

Zur Übersicht sind die kinetischen Parameter und deren Werte in Tabelle 5.2 auf der nächsten Seite nochmals zusammengestellt.

	K_M [μM]	K_I [μM]	V_{max} [U/mg]
NADP	240,2 \pm 41,6	–	0,59 \pm 0,02
NADPH	16,2 \pm 2,5	–	1,00 \pm 0,03
GDP-Man	268,2 \pm 82,2	–	1,15 \pm 0,10 ^a 0,42 \pm 0,02 ^b
GKDM	–	472,7 \pm 76,4	1,13 \pm 0,03
GDP-Fuc	–	4,6 \pm 3,3	1,14 \pm 0,24

^a c (NADP) = c (NADPH) = 0,1 mM

^b c (NADP) = 5 mM

Tabelle 5.2: Kinetische Parameter der GMD.

Die Messungen wurden mit der gleichen Enzymcharge durchgeführt, jedoch in einem zeitlichen Abstand von mehreren Monaten.

Der Einfluss der Cofaktoren NADP und NADPH auf die GMD-Reaktion lässt sich in zwei wesentlichen Punkten zusammenfassen:

1. Die Geschwindigkeit der Produktionsreaktion GDP-Man \rightarrow GKDM ist, zusätzlich zur GDP-Man-Konzentration, abhängig von der NADP- bzw. NADPH-Konzentration. Es resultieren **Sättigungskinetiken für beide Cofaktoren** mit unterschiedlichen K_M -Werten (vgl. Abbildung 5.14 und 5.15 auf Seite 74). In Abhängigkeit des Cofaktors resultieren darüber hinaus **unterschiedliche Werte für V_{max}** .
2. Bei niedrigen Enzymaktivitäten ist der Beginn der Produktionsreaktion verzögert; es tritt eine **lag-Phase** auf. Eine Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit resultiert entweder aus der Erniedrigung der Enzymkonzentration oder aus einer Erniedrigung der Cofaktorkonzentrationen bei einer konstanten Enzym- (=Protein-)Konzentration (siehe dazu Abbildung 5.7 auf Seite 65 und Abbildung 5.13 auf Seite 72).

Die Tatsache, dass in Abhängigkeit des verwendeten Cofaktors unterschiedliche V_{max} -Werte für die GMD-Reaktion resultieren, zeigt, dass eine kinetische Beschreibung dieser Reaktion komplex ist. Das einfache Modell einer Einsubstrat *Michaelis-Menten*-Kinetik, welches lediglich eine Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der GDP-Man-Konzentration beschreiben würde, kann hier keine Anwendung finden. Zwar benötigt die GMD offensichtlich NADP und/oder NADPH zur Umsetzung der GDP-Man; da der Cofaktor jedoch die Funktion einer *prosthetischen Gruppe* einzunehmen scheint, können klassische Modelle, die eine kinetische Charakterisierung von Zwei- oder Mehrsubstrat-Reaktionen erlauben, für die GMD-Reaktion ebensowenig herangezogen werden.

Vor allem ist das Auftauchen der beobachteten *lag*-Phase in Abhängigkeit der Enzymaktivität bzw. der Cofaktor-Konzentrationen eine Besonderheit der GMD-Reaktion. Die (mechanistischen) Ursachen dieses Phänomens sind bisher nicht verstanden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher versucht werden, formalkinetische Ansätze zur Beschreibung solcher verzögerter Reaktionsverläufe zu finden.

Dieser Abschnitt stellt ein einfaches kinetisches Modell vor, welches eine zeitabhängige Aktivierung der GMD durch die Cofaktoren NADP bzw. NADPH beschreibt. Die Formulierung einer zeitabhängigen Enzymaktivierung erlaubt es, das Auftreten einer *lag*-Phase bei der Umsetzung der GDP-Man zu GKDM zu simulieren bzw. durch Optimierung relevanter Parameter, das Modell an die experimentellen Daten anzupassen.

Die Aufstellung eines solchen kinetischen Modells muss folgende Punkte berücksichtigen:

- Der K_M -Wert für GDP-Man ist unabhängig von der jeweiligen Cofaktorkonzentration.
- Für NADP bzw. NADPH existieren unterschiedliche Affinitäten (K_M -Werte) und es resultieren daraus unterschiedliche Enzymaktivitäten (V_{max} -Werte).
- Die Produktinhibierung durch GKDM kann für den Konzentrationsbereich bis 1 mM in Näherung vernachlässigt werden.

Diese Anforderungen an das kinetische Modell resultieren aus den Ergebnissen der weiter oben dargestellten Messungen. Zusätzlich muss das Modell aber sowohl die bisher bekannten Eigenschaften der Reaktion, die aufgrund von Publikationen bekannt sind, berücksichtigen als auch die Einschränkung, dass lediglich Werte für Substrat-, Produkt- und Cofaktorkonzentrationen experimentell zugänglich sind. Eine Bewertung des Modells kann nur durch Vergleich von berechneten mit experimentellen Reaktionsverläufen erfolgen, die durch Messung dieser Größen erhalten werden. Das kinetische Modell muss daher weiterhin den folgenden Bedingungen genügen:

- Die GMD-Reaktion wird als eine Einsubstrat-Reaktion $\text{GDP-Man} \rightarrow \text{GKDM}$ betrachtet.
- Eine Aktivierung des Enzyms mit NADPH kann lediglich erfolgen, wenn es bereits NADP gebunden hat. Katalyse ausschliesslich mit NADPH als Cofaktor ist nicht möglich.

Der letzte Punkt berücksichtigt die Ergebnisse von Publikationen, die sich mit dem Reaktionsmechanismus der GMD befassen und bereits einleitend zu Kapitel 5.2 auf Seite 60 dargestellt wurden. GKDM wird ausgehend von der GDP-Man in einem Oxidations-Reduktions-Mechanismus gebildet. Danach muss zu Beginn der Reaktion ein Molekül NADP im aktiven Zentrum gebunden sein, da sonst keine Katalyse stattfinden kann.

Die postulierten Zusammenhänge des kinetischen Modells werden im Folgenden vorgestellt und erläutert.

1. Die Geschwindigkeit der zu katalysierenden **Haupt-** bzw. **Produktionsreaktion** zur Umsetzung der GDP-Man zu GKDM



wird durch eine einfache *Michaelis-Menten*-Gleichung beschrieben und als V_{Prod} bezeichnet:

$$V_{Prod} = V_{Prod,max} \cdot \frac{c(\text{GDP-Man})}{K_{M,\text{GDP-Man}} + c(\text{GDP-Man})} \quad (5.6)$$

Die maximal mögliche Reaktionsgeschwindigkeit $V_{Prod,max}$ hat ebenso wie V_{Prod} die Dimension einer Enzymaktivität und setzt sich aus den beiden Aktivitäten $V_{Prod,NADP}$ und $V_{Prod,NADPH}$ zusammen, die durch Bindung von NADP bzw. NADPH an das Apoenzym entstanden sind. Nur Enzymformen mit diesen Aktivitäten können nach dem Modell die Reaktion $GDP-Man \rightarrow GKDM$ katalysieren.

$$V_{Prod,max} = V_{Prod,NADP} + V_{Prod,NADPH} \quad (5.7)$$

$V_{Prod,max}$ ist danach ein variabler, von den Cofaktoren abhängiger Wert. Die Einheit der Enzymaktivitäten bzw. Reaktionsgeschwindigkeiten ist [U/mL].

Für einen *batch*-Reaktor lauten die Massenbilanzen für die GMD-Reaktion:

$$\frac{dc(GKDM)}{dt} = V_{Prod} \quad \frac{dc(GDP-Man)}{dt} = -V_{Prod}$$

2. Die Enzymaktivitäten $V_{Prod,NADP}$ und $V_{Prod,NADPH}$ werden im kinetischen Modell durch die beiden **Aktivitätsänderungsgeschwindigkeiten** A_{NADP} bzw. A_{NADPH} unterschiedlich schnell gebildet. Die Generierung der GMD-Aktivität ist also selbst zeitabhängig. Die Änderungsgeschwindigkeiten werden formalkinetisch - bei gegebenen K_M -Werten für NADP bzw. NADPH - jeweils als *Michaelis-Menten*-Sättigungskinetiken betrachtet.

$$A_{NADP} = A_{max,NADP} \cdot \frac{c(NADP)}{K_{M,NADP} + c(NADP)} \quad (5.8)$$

$$A_{NADPH} = A_{max,NADPH} \cdot \frac{c(NADPH)}{K_{M,NADPH} + c(NADPH)} \quad (5.9)$$

Die Größen $A_{max,NADP}$ und $A_{max,NADPH}$ beschreiben die maximalen Änderungsgeschwindigkeiten und werden bei Sättigung mit den Cofaktoren erreicht. Sie besitzen die Dimension einer Enzymaktivität pro Zeiteinheit. Die Einheit ist [U/(mL·min)]. Für einen *batch*-Reaktor werden die Massenbilanzen der einzelnen Größen aufgestellt:

$$\begin{aligned} \frac{dV_{Prod,NADP}}{dt} &= A_{NADP} & \frac{dV_{Prod,NADPH}}{dt} &= A_{NADPH} \\ \frac{dA_{max,NADP}}{dt} &= -A_{NADP} & \frac{dA_{max,NADPH}}{dt} &= A_{NADP} - A_{NADPH} \end{aligned}$$

Die Änderung der NADP-abhängigen, maximalen Änderungsgeschwindigkeit $\frac{dA_{max,NADP}}{dt}$ ist negativ proportional zur NADP-abhängigen Aktivitätsänderungsgeschwindigkeit A_{NADP} : je größer die Änderungsgeschwindigkeit A_{NADP} ist, desto größer ist auch die Abnahme der maximalen Änderungsgeschwindigkeit $A_{max,NADP}$. Zur Formulierung dieser Abhängigkeit muss formal ein Proportionalitätsfaktor der Größe eins und der Einheit min^{-1} eingeführt werden. Die Änderung der NADPH-abhängigen, maximalen Änderungsgeschwindigkeit ist die Differenz aus NADP- und NADPH-abhängiger Änderungsgeschwindigkeit.

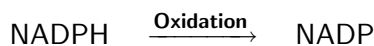
Durch die Formulierung dieser Abhängigkeiten wird erreicht, dass die Änderungsgeschwindigkeiten A_{NADP} und A_{NADPH} im Verlauf der Reaktion gegen Null gehen, so dass eine permanente Aktivierung des Enzyms verhindert wird. Auf diese Weise gelingt es, einen Sättigungseffekt bei der Enzymaktivierung zu beschreiben.

Die Größen $V_{Prod,NADP}$, $V_{Prod,NADPH}$, $A_{max,NADP}$ und $A_{max,NADPH}$ sind experimentell nicht zugänglich. $A_{max,NADP}$ muss zu Beginn der Reaktion einen Wert größer Null besitzen, da sonst keine Aktivierung der GMD durch NADP und damit auch keine Aktivierung durch NADPH stattfinden kann. Die Geschwindigkeiten der Bildung von $V_{Prod,NADP}$ und $A_{max,NADPH}$ sind gleich groß und betragen A_{NADP} .

Sobald $A_{max,NADPH}$ einen Wert größer Null besitzt, kann die NADPH-abhängige Enzymaktivität $V_{Prod,NADPH}$ mit der Geschwindigkeit A_{NADPH} , in Abhängigkeit der NADPH-Konzentration, erhöht werden. Aus den Differentialgleichungen folgt, dass $V_{Prod,NADP}$ und $V_{Prod,NADPH}$ maximal den nominellen Wert von $A_{max,NADP}$ annehmen können.

Zur Simulierung von Reaktionsverläufen muss ein Wert für $A_{max,NADP}$ vorgegeben werden. Die Größe $A_{max,NADP}$ ist damit **Anpassungsparameter** der Cofaktor-abhängigen Enzymaktivitäten und muss bei der Anpassung des Modells an experimentelle Daten optimiert werden (siehe unten).

3. Die enzymatische **NADPH-Oxidation** als Nebenaktivität



wird vereinfachend als eine Reaktion erster Ordnung beschrieben:

$$V_{des,NADPH} = k_{des,NADPH} \cdot c(\text{NADPH}) \quad (5.10)$$

Diese Nebenaktivität einer enzymatischen NADPH-Oxidation ermöglicht die Katalyse auch bei Anwesenheit von lediglich NADPH zu Beginn der Reaktion, da durch sie NADP gebildet wird.

Satzreaktor-Simulationen

In diesem Abschnitt wird anhand von Satzreaktor-Simulationen untersucht, inwieweit das kinetische Modell geeignet ist, das Auftreten einer *lag*-Phase während der GMD-Reaktion zu beschreiben. Damit verbunden stellt sich außerdem die Frage, ob das Modell prinzipiell den Einfluss verschiedener Cofaktorkonzentrationen auf die Umsatzverläufe vorhersagen und beschreiben kann. Für die Berechnungen wurden die o.g. kinetischen Parameter der GMD-Reaktion eingesetzt. Die Abbildungen zeigen jeweils die berechneten Umsatzverläufe.

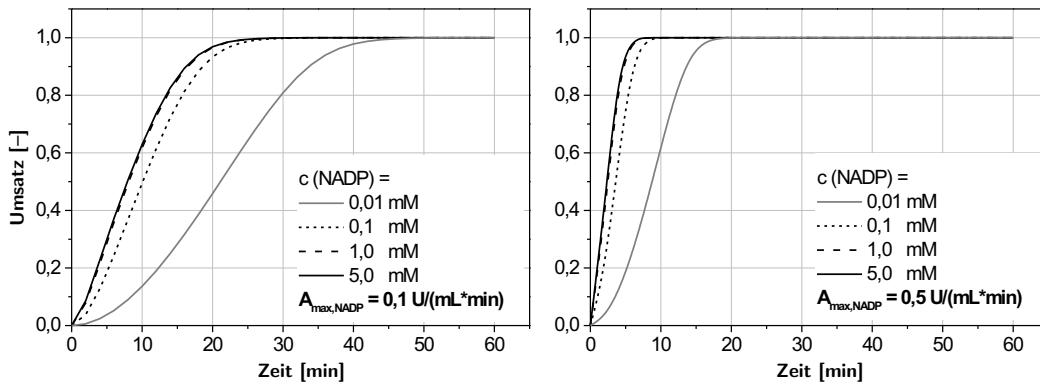


Abbildung 5.23: *batch*-Simulation der GMD-Reaktion unter Variation der NADP-Konzentration sowie von $A_{\text{max},\text{NADP}}$.

Da nur NADP als Cofaktor eingesetzt wird, ist $k_{\text{des},\text{NADPH}}$ nicht relevant. Kinetische Parameter entsprechend Tabelle 5.2, $c(\text{GDP-Man}) = 1 \text{ mM}$.

An dieser Stelle ist es wichtig zu wiederholen, dass $A_{\text{max},\text{NADP}}$ Anpassungsparameter ist und darüberhinaus den maximal möglichen, nominellen Wert für $V_{\text{Prod},\text{NADP}}$ bzw. $V_{\text{Prod},\text{NADPH}}$ vorgibt. Die Simulationen wurden daher bei jeweils zwei unterschiedlichen Werten für $A_{\text{max},\text{NADP}}$ durchgeführt. Abbildung 5.23 stellt zwei Serien simulierter *batch*-Verläufe dar. Die beiden Serien unterscheiden sich im Wert für $A_{\text{max},\text{NADP}}$ (links: $0,1 \text{ U}/(\text{mL}\cdot\text{min})$; rechts: $0,5 \text{ U}/(\text{mL}\cdot\text{min})$). In beiden Fällen wurde zudem die NADP-Konzentration variiert.

Die Verläufe bestätigen, dass das Modell eine Erhöhung der Enzymaktivität - ausgedrückt in einem höheren Wert für $A_{\text{max},\text{NADP}}$ - und damit der Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender NADP-Konzentration simulieren kann. Darüber hinaus kann gezeigt werden, dass mit diesem Modell das Auftreten einer *lag*-Phase beschrieben werden kann. Bei abnehmender NADP-Konzentration wird die Phase des verzögerten Umsatzes länger. Eine Erhöhung von $A_{\text{max},\text{NADP}}$ verkürzt dagegen die *lag*-Phase.

Der Einfluss von NADPH auf den Umsatzverlauf der GMD-Reaktion wird durch das kinetische Modell ebenfalls beschrieben. Die drei Reaktionsverläufe der Abbildung 5.24 auf der nächsten Seite zeigen den Einfluss von $0,1 \text{ mM}$ NADPH **zusätzlich** zu $0,1 \text{ mM}$ NADP. Bei gleichen Werten für $A_{\text{max},\text{NADP}}$ ($0,1 \text{ U}/(\text{mL}\cdot\text{min})$) ist bei Anwesenheit von NADPH zusätzlich zu NADP eine Verkürzung der *lag*-Phase sowie eine Erhöhung der resultierenden Reaktionsgeschwindigkeit zu erkennen. Wird $A_{\text{max},\text{NADP}}$ weiter erhöht ($0,5 \text{ U}/(\text{mL}\cdot\text{min})$), so kann die Reaktion noch weiter beschleunigt werden. Die *lag*-Phase tritt unter diesen Bedingungen

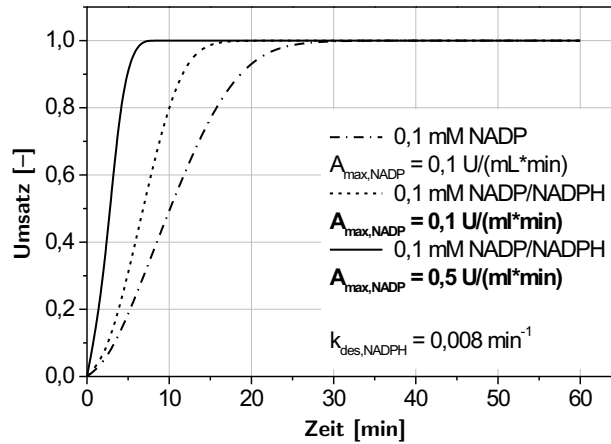


Abbildung 5.24: *batch*-Simulation der GMD-Reaktion unter Zusatz von NADPH. Kinetische Parameter entsprechend Tabelle 5.2, $c(\text{GDP-Man}) = 1 \text{ mM}$.

gar nicht mehr auf.

Die Geschwindigkeit der NADPH-Oxidation wird durch die Größe der Konstanten $k_{des,NADPH}$ bestimmt. Der hier eingesetzte Wert ($k_{des,NADPH} = 0,008 \text{ min}^{-1}$) wurde durch Parameteranpassung mittels *simplex*-Optimierung bei einem Satzreaktorversuch erhalten (siehe unten).

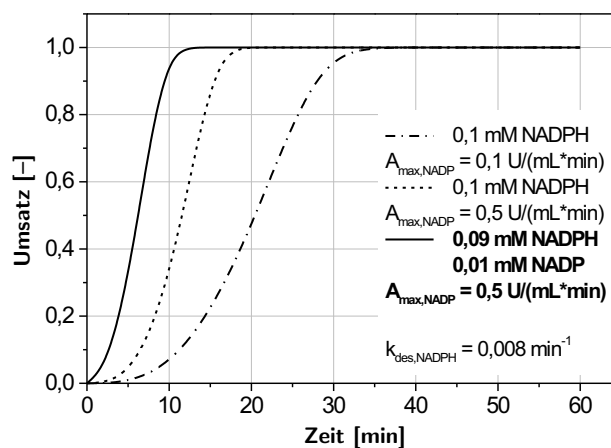


Abbildung 5.25: *batch*-Simulation der GMD-Reaktion mit NADPH als Cofaktor. Kinetische Parameter entsprechend Tabelle 5.2, $c(\text{GDP-Man}) = 1 \text{ mM}$.

Das letzte Beispiel simulierter *batch*-Verläufe (Abbildung 5.25) zeigt u.a. den Verlauf einer

GMD-katalysierten Reaktion in Gegenwart von ausschließlich NADPH. Wie bereits erwähnt, kann die Reaktion in Abwesenheit von NADP nicht stattfinden. Durch die Formulierung der NADPH-Oxidation ($k_{des,NADPH}$ ist Geschwindigkeitskonstante) wird jedoch während der Reaktion NADP gebildet und GDP-Man kann zu GKDM umgesetzt werden. Der langsame Reaktionsverlauf bei 0,1 mM NADPH (gestrichelte Linie) mag zunächst überraschen. Der Grund für die lange *lag*-Phase ist die langsame Bildung von NADP aus NADPH. Wird in der Simulation der Wert für $k_{des,NADPH}$ erhöht, so kann auch die GMD-Reaktion schneller stattfinden (nicht dargestellt). Bei gleicher Geschwindigkeit der NADP-Bildung führt aber auch die Erhöhung der Aktivitätsänderungsgeschwindigkeit zu einer Beschleunigung der Reaktion, d.h. die *lag*-Phase verkürzt sich (gepunktete Linie). Liegt bereits zu Beginn der Reaktion eine geringe Menge NADP, etwa als Verunreinigung des NADPH, vor (0,01 mM), so kann die Reaktion noch weiter beschleunigt werden, da der zur Katalyse notwendige oxidierte Cofaktor nicht erst gebildet werden muss. Die Aktivierung des Enzyms durch NADPH kann in diesem Falle sehr viel schneller erfolgen, so dass die *lag*-Phase sehr kurz und die Reaktionsgeschwindigkeit deutlich erhöht ist (durchgezogene Linie).

Berechnung und Experiment im Satzreaktor - Anpassung relevanter Parameter

Im vorangegangenen Abschnitt konnte anhand von *batch*-Simulationen gezeigt werden, dass das Modell prinzipiell in der Lage ist, die Einflüsse der Cofaktoren und der Enzymmenge auf die Reaktionsverläufe zu beschreiben. Durch die Formulierung einer von den Cofaktoren abhängigen Geschwindigkeit zur Bildung der GMD-Aktivität $V_{Prod,max}$ können unterschiedlich lange *lag*-Phasen vorhergesagt werden. In diesem Abschnitt werden nun berechnete *batch*-Verläufe mit den entsprechenden Experimenten verglichen. Da $A_{max,NADP}$ den maximalen, nominellen Wert von $V_{Prod,max}$ vorgibt (siehe oben), musste dieser Wert bei den Berechnungen stets angepasst werden, um eine gute Übereinstimmung von Berechnung und Experiment zu erhalten.

$A_{max,NADP}$ ist experimentell nicht zugänglich. Wird für eine *batch*-Simulation der nominelle Wert der experimentell bestimmten GMD-Aktivität - diese entspricht V_{Prod} im linearen Bereich der Umsetzung - als Startwert für $A_{max,NADP}$ eingesetzt, so ist zu erwarten, dass Berechnung und Experiment keine gute Übereinstimmung zeigen werden.

Zur Verifizierung dieser Aussage wird in Abbildung 5.26 ein experimentell durchgeführter *batch*-Versuch mit einer solchen Simulation verglichen. Es sind die experimentellen und simulierten Verläufe von Produkt (GKDM) und Substrat (GDP-Man) dargestellt. Die Cofaktoren wurden in diesem Versuch in gleicher Konzentration eingesetzt (jeweils 0,1 mM). Für die Simulation wurde der experimentell bestimmte Wert der Enzymaktivität (0,046 U/mL, Aktivität nach Standardassay, vgl. Kapitel 10) als nomineller Startwert für $A_{max,NADP}$ eingesetzt.

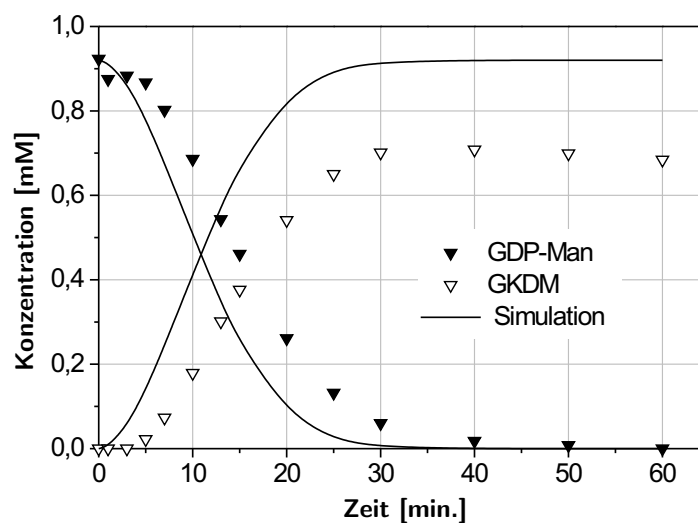


Abbildung 5.26: Vergleich von experimenteller *batch*-Synthese und Simulation.

Bedingungen: 1 mM GDP-Man, 0,1 mM NADP und NADPH, 10 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 8, T = 30°C, 0,21 mg/mL Protein (GMD-Präparation), $A_{max,NADP} = 0,046$ U/(mL*min) (nomineller Wert der Aktivität nach Standardassay, vgl. Kapitel 10), V = 1 mL.

Die simulierten Verläufe zeigen, dass das Modell zwar in der Lage ist, die experimentellen Reaktionsverläufe prinzipiell zu beschreiben. Jedoch zeigt die Simulation eine höhere Gesamt-

Reaktionsgeschwindigkeit für die Umsetzung der GDP-Man. Darüber hinaus wird im Experiment eine deutlich niedrigere Produktkonzentration beobachtet.

Eine gute Übereinstimmung von berechneten und experimentellen Reaktionsverläufen ist möglich, wenn der Wert für $A_{max,NADP}$ mittels *simplex*- bzw. *least square fit*-Optimierung durch das Programm SCIENTIST™ angepasst wird. Darüberhinaus wird die Desaktivierung des Produktes (GKDM) sowie von NADPH berücksichtigt. Die K_M -Werte für GDP-Man, NADP und NADPH wurden fixiert.

Abbildung 5.27 zeigt die berechneten Reaktionsverläufe nach Parameteranpassung (Linien) sowie die entsprechenden experimentellen Daten (Symbole). Es sind die Verläufe für GDP-Man, GKDM und den Umsatz dargestellt (linker Graph) sowie der Verlauf der Co-faktorkonzentrationen während der Reaktion (rechter Graph). Die experimentellen Daten entsprechen denen der Abbildung 5.26.

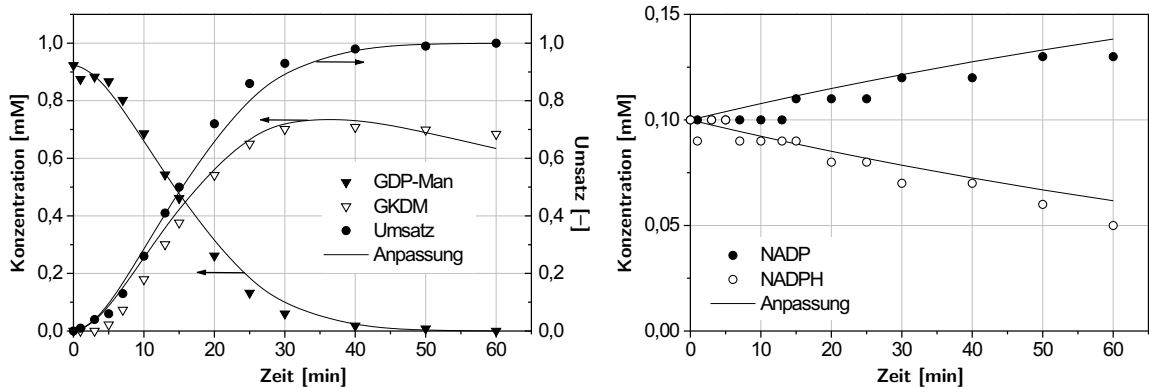


Abbildung 5.27: Parameteranpassung für die GKDM-Synthese im *batch*-Verfahren. Es wurden $A_{max,NADP}$, $k_{des,NADPH}$ und die Desaktivierungskonstante des Produkts ($k_{des,GKDM}$) optimiert. Bedingungen der *batch*-Versuche entsprechend Abbildung 5.26.

Für die Geschwindigkeitskonstante $k_{des,NADPH}$ der NADPH-Oxidation wurde ein Wert von $0,008 \text{ min}^{-1}$ berechnet. Die Desaktivierung des Produkts GKDM wurde vereinfachend ebenfalls als ein Zerfall erster Ordnung angenommen. Der Wert der entsprechenden Desaktivierungskonstanten ($k_{des,GKDM}$) wurde zu $0,009 \text{ min}^{-1}$ bestimmt. Mit den optimierten Werten der Parameter wird der Verlauf aller relevanten Konzentrationen einschliesslich der *lag*-Phase vom Modell sehr gut wiedergegeben.

Der Vergleich der berechneten¹ mit der experimentell bestimmten Reaktionsgeschwindigkeit² bestätigt die gute Übereinstimmung von Modell und Experiment:

Berechnete Reaktionsgeschwindigkeit V_{Prod}	: 0,038 U/mL
Experimentelle Reaktionsgeschwindigkeit	: 0,046 U/mL

Mit dem kinetischen Modell der GMD-Reaktion wurde ein Ansatz gefunden, welcher die verzögerten Umsatzverläufe zu beschreiben vermag. Abbildung 5.28 auf der nächsten Seite stellt

¹berechneter Wert bei 10 min.

²gemessen als Steigung der Regressionsgeraden im linearen Bereich des Umsatz-Zeit-plots.

den zeitlichen Verlauf der wichtigen kinetischen Größen des Modells im Laufe der Reaktion aus Abbildung 5.27 auf der vorherigen Seite dar.¹ Es sind jeweils die berechneten Verläufe der Aktivitätsänderungsgeschwindigkeiten (linker Graph) sowie der Reaktionsgeschwindigkeiten der GDP-Man-Umsetzung (rechter Graph) gezeigt.

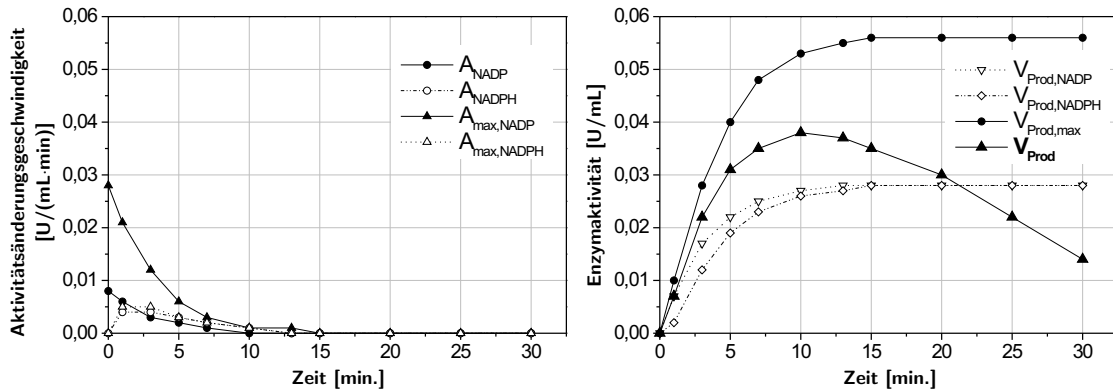


Abbildung 5.28: Zeitlicher Verlauf der kinetischen Größen im *batch*-Reaktor.

Bedingungen entsprechend Abbildung 5.27. Es sind die ersten 30 min. der Reaktion dargestellt. Die Symbole dienen lediglich als visuelle Hilfe.

Der Wert des (optimierten) Anpassungsparameters $A_{max,NADP}$ beträgt bei Reaktionsbeginn $0,028 \text{ U}/(\text{mL}\cdot\text{min})$. Ausgehend von dieser Größe werden entsprechend den kinetischen Abhängigkeiten innerhalb des Modells die NADP- bzw. NADPH-abhängigen Enzymaktivitäten $V_{Prod,NADP}$ und $V_{Prod,NADPH}$ gebildet. Die Summe dieser beiden Größen ergibt $V_{Prod,max}$. Mit Zunahme dieser Größe nimmt auch die Reaktionsgeschwindigkeit der GDP-Man-Umsetzung V_{Prod} zu (rechter Graph, schwarze Dreiecke). Zu Beginn der Reaktion ist V_{Prod} gleich Null. Durch Enzymaktivierung durch die Cofaktoren - ausgedrückt durch die jeweiligen Aktivitätsänderungsgeschwindigkeiten - steigen die Werte für $V_{Prod,NADP}$ und $V_{Prod,NADPH}$ an. Nach etwa 15 min. erreichen sie mit jeweils $0,028 \text{ U}/\text{mL}$ ihr Maximum. $V_{Prod,max}$ erreicht damit auch den maximal möglichen Wert von $0,056 \text{ U}/\text{mL}$. Die Aktivitätsänderungsgeschwindigkeiten sind zu dieser Zeit jeweils gleich Null, da eine maximale Aktivierung durch die Cofaktoren erreicht wurde.

Die Geschwindigkeit der GMD-Reaktion erreicht ihr Maximum mit $0,038 \text{ U}/\text{mL}$ nach etwa 10 min. (s.o.). $V_{Prod,max}$ wird also gar nicht erreicht, da durch die Substratverarmung im Laufe der Reaktion keine Sättigung mit GDP-Man mehr vorliegt. Entsprechend sinkt der Wert für V_{Prod} immer weiter ab. Durch die zeitliche Veränderung der einzelnen kinetischen Größen gelingt es, die *lag*-Phase durch das Modell wiederzugeben.

Das Ergebnis der Parameteranpassung für die GKDM-Synthese im Satzreaktor bei unterschiedlichen NADP-Konzentrationen zeigt Abbildung 5.29 auf der nächsten Seite. Bei Verwendung der optimierten Werte für $A_{max,NADP}$ stimmen die angepassten Reaktionsverläufe mit den experimentell bestimmten sehr gut überein ($R = 0,992$). Die Simulation der Reaktionen bei gleichen (fixierten) Werten für $A_{max,NADP}$ und variierenden NADP-Anfangskonzentra-

¹Zur besseren Übersicht sind lediglich die ersten 30 Minuten dargestellt.

tionen zeigten keine gute Übereinstimmung von Experiment und Simulation (Daten nicht gezeigt). Das Modell kann die Steigerung der Enzymaktivität also nicht ausschliesslich auf die Erhöhung der NADP-Konzentration zurückführen. Für eine gute Anpassung der berechneten Verläufe an die Experimente muss $A_{max,NADP}$ optimiert werden.

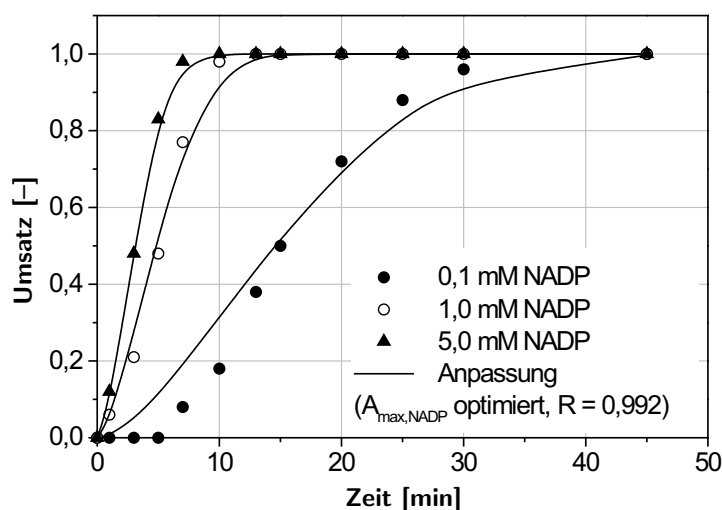


Abbildung 5.29: Parameteranpassung für die GKDM-Synthese im *batch*-Verfahren - Einfluss der NADP-Konzentration.

Es wurde lediglich $A_{max,NADP}$ optimiert. Bedingungen der batch-Versuche: 1 mM GDP-Man, NADP variiert, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM Tris-HCl, pH 8, $T = 30^\circ C$, 0,26 mg/ml Protein (GMD-Präparation), $V = 1$ mL.

Neben den graphischen Verläufen bestätigt auch der Vergleich der berechneten (V_{Prod}) mit den experimentell bestimmten Reaktionsgeschwindigkeiten die gute Übereinstimmung von Berechnung und Experiment:

c (NADP)	[mM]	0,1	1,0	5,0
Exp. Reaktionsgeschwindigkeit	[U/mL]	0,049	0,110	0,147
V_{Prod} (berechnet)	[U/mL]	0,042 ^a	0,094 ^b	0,202 ^c

^a berechneter Wert bei 10 min., ^b berechneter Wert bei 7 min., ^c berechneter Wert bei 3 min.

Die recht hohe Differenz der Reaktionsgeschwindigkeiten bei einer NADP-Konzentration von 5 mM resultiert aus der ungenauen experimentellen Bestimmung: da die Reaktion bei dieser Cofaktorkonzentration sehr schnell verläuft, ist der lineare Bereich der Reaktion nur kurz. Die Bestimmung der Enzymaktivität basiert somit auf nur wenigen Datenpunkten, das Ergebnis der linearen Regression ist entsprechend fehlerbehaftet.

Die Enzymaktivierung bei unterschiedlicher NADP-Konzentration zeigt graphisch Abbildung 5.30 auf der nächsten Seite. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der jeweiligen maximalen

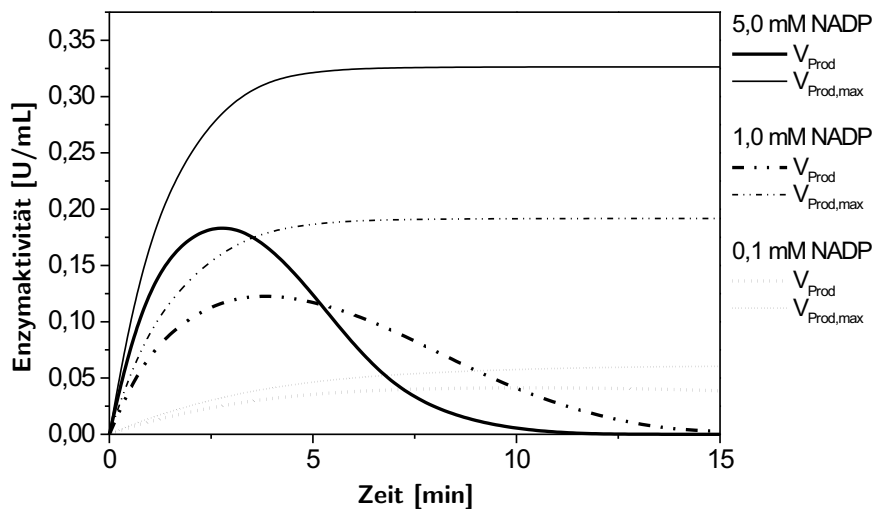


Abbildung 5.30: Kinetik der Entstehung von $V_{Prod,max}$ und Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeiten V_{Prod} bei unterschiedlichen NADP-Konzentrationen.

Dargestellt sind die Verläufe nach Parameteranpassung entsprechend Abbildung 5.29.

Enzymaktivität $V_{Prod,max}$ ¹ (dünn gezeichnete Linien) sowie die berechneten Reaktionsgeschwindigkeiten V_{Prod} (fett gezeichnete Linien) bei drei verschiedenen NADP-Konzentrationen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur die ersten 15 Minuten der Satzreaktorversuche aus Abbildung 5.29 wiedergegeben.

Es fällt auf, dass die Aktivierung zu $V_{Prod,max}$ bei hohen NADP-Konzentrationen schneller verläuft und gleichzeitig in höheren Enzymaktivitäten endet. Bei einer NADP-Konzentration von 0,1 mM wird die höchstmögliche Aktivität $V_{Prod,max}$ erst nach etwa 10 Minuten erreicht, entsprechend ist bei diesem Versuch die *lag*-Phase deutlich ausgebildet (vgl. Abbildung 5.29). Bei einer Cofaktorkonzentration von 5 mM ist die maximal erreichbare Aktivität in weniger als 5 Minuten erreicht. Da die Enzymaktivität auch nominell höher ist als bei 0,1 mM NADP, beginnt die GMD-Reaktion ohne eine Verzögerungsphase. Die jeweils beobachtete Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit (V_{Prod}) beruht auf der Substratverarmung im Laufe der GDP-Man-Umsetzung.

Durch *simplex*-Optimierung des Parameters $A_{max,NADP}$ können die berechneten Verläufe auch für den Fall der Anwesenheit von NADPH - zusätzlich zu NADP - an die experimentellen Daten gut angepasst werden. Die Reaktionsverläufe der Abbildung 5.31 auf der nächsten Seite zeigen für eine Cofaktorkonzentration von 0,1 mM NADP und NADPH ebenso wie für 0,1 mM NADP eine gute Übereinstimmung der experimentellen mit den berechneten Daten nach Anpassung ($R = 0,992$). Liegt sowohl der oxidierte als auch der reduzierte Cofaktor vor, so ist zu erkennen, dass die *lag*-Phase bei dieser Enzymaktivität nicht auftaucht.

¹Da lediglich NADP Cofaktor ist, gilt: $V_{Prod,max} = V_{Prod,NADP}$.

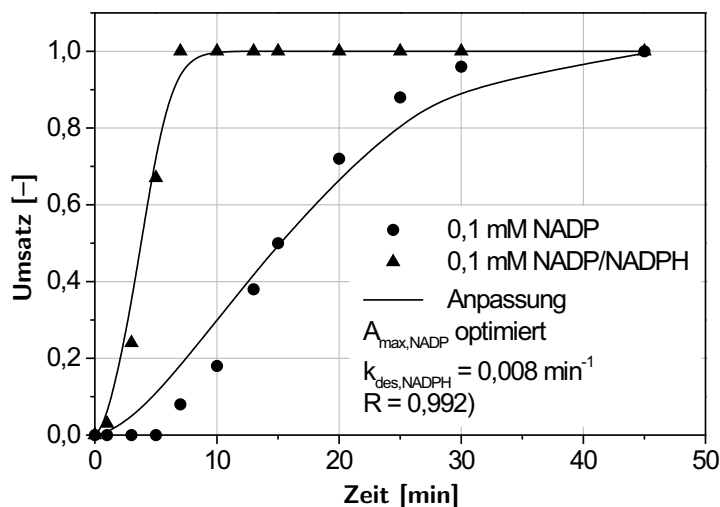


Abbildung 5.31: Parameteranpassung für die GKDM-Synthese im *batch*-Verfahren - Einfluss von NADPH.

Es wurde lediglich $A_{\max,NADP}$ optimiert. Bedingungen der *batch*-Versuche: 1 mM GDP-Man, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM Tris-HCl, pH 8, $T = 30^\circ C$, 0,26 mg/ml Protein (GMD-Präparation), $V = 1$ mL.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch Anpassung relevanter Parameter die auf dem kinetischen Modell basierenden, berechneten Verläufe den jeweiligen experimentellen Daten gut angepasst werden können. Das Modell postuliert eine zeit- und Cofaktor-abhängige Aktivierung der GMD. Aus dieser Aktivierung des Enzyms ergeben sich variable, maximale Enzymaktivitäten ($V_{Prod,max}$). Wird eine solche Enzymaktivität nur langsam gebildet, so resultiert eine langsame Reaktionsgeschwindigkeit zu Beginn der Substratumsetzung. Sobald $V_{Prod,max}$ erreicht ist, wird die Umsetzung von GDP-Man durch eine einfache *Michaelis-Menten*-Kinetik beschrieben. Auf diese Weise kommt es auch im Modell zur Ausbildung der im Experiment beobachteten *lag*-Phase. Wenn auch die molekularen bzw. mechanistischen Ursachen der GMD-Aktivierung durch NADP und NADPH bisher nicht aufgeklärt sind, so ist diese Modellvorstellung einer Enzymaktivierung doch offensichtlich ein geeigneter, formal-kinetischer Ansatz zur Beschreibung solcher Reaktionsverläufe.

5.3 Die GDP- β -L-Fucose-Synthetase (GFS)-Reaktion

Der zweite Schritt der enzymatischen *de novo* Synthese von GDP-Fuc ist die Umsetzung von GKDM zu GDP-Fuc durch das Enzym GDP- β -L-Fucose-Synthetase. Da dieses Enzym bifunktional ist (Epimerase- und Reduktase-Aktivität auf einem Protein [137, 138]), kann es nicht entsprechend der E.C.-Nomenklatur klassifiziert werden. Jedoch wird es in die Gruppe der *short chain dehydrogenases/reductases* (SDRs) eingeordnet. Die Biokatalysatoren dieser großen Enzymfamilie besitzen in der Regel eine charakteristische N-terminale Domäne (*Rossman fold*, Bindung des Cofaktors) sowie die katalytische Triade Ser-Lys-Tyr.¹ Die beiden durch das Enzym katalysierten Reaktionen sind in Abbildung 5.32 dargestellt.

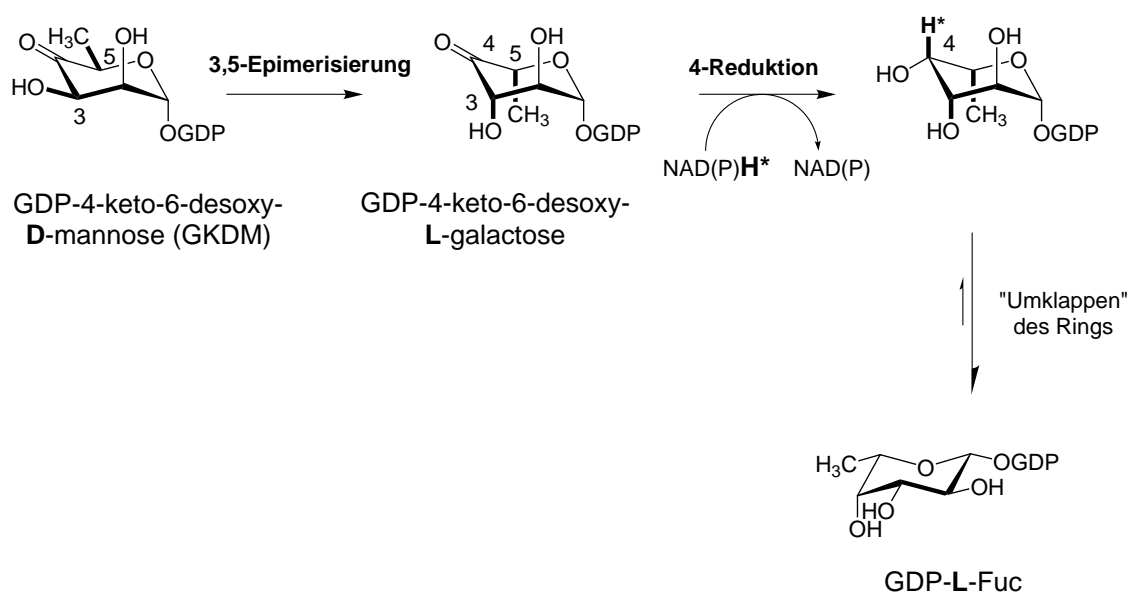


Abbildung 5.32: Teilreaktionen der GFS-katalysierten Umsetzung von GKDM zu GDP-Fuc.

Zur Epimerisierung an den Positionen C-3 und C-5 benötigt das Enzym keinen Cofaktor. Das durch diese Reaktion gebildete Intermediat, die GDP-4-keto-6-desoxy-L-galactose, konnte bisher nicht isoliert oder mit HPLC von den anderen Komponenten getrennt werden. Durch Inkubation des Enzyms zusammen mit GKDM in Abwesenheit des Cofaktors, anschließende chemische Reduktion (NABH_4) und Analyse der Produkte konnte sein Auftreten und seine Struktur bewiesen werden [139].

Dieses Intermediat der L-Reihe wird im zweiten Schritt der GFS-Reaktion stereoselektiv an der C-4-Position reduziert. Die GFS akzeptiert für diesen Schritt sowohl NADPH als auch NADH [140, 166], jedoch werden NADPH und NADP fester gebunden, da ein Arginin-Rest im *active site* des Enzyms die Phosphatgruppe des NADP(H) zusätzlich binden kann [139]. Es konnte auch gezeigt werden, dass das 4S-Hydrid von NADPH zur Reduktion genutzt wird. Nach Reduktion des Intermediats findet ein Umklappen des Rings statt, so dass GDP-Fuc in der stabilen Konformation als Produkt vorliegt.

¹Ein bekanntes Mitglied dieser Enzymfamilie ist die UDP-Gal Epimerase.

Auch Magnesium-Ionen scheinen bei der Katalyse eine Rolle zu spielen, jedoch ist bisher unklar, welche Funktion sie im Laufe der Reaktionen einnehmen könnten. Eigene Messungen der Enzymaktivität in Abhängigkeit der Mg^{2+} -Ionenkonzentration zeigten zwar, dass die GFS auch bei Abwesenheit von Magnesium-Ionen enzymatische Aktivität besitzt, jedoch führt eine Erhöhung der Konzentration an Mg^{2+} auf 10-50 mM zu einer annähernden Verdoppelung der Enzymaktivität (siehe Abbildung 5.33). Ein ähnlicher Einfluss der Mg^{2+} - bzw. der Ca^{2+} -Konzentration auf die GFS-Aktivität wurde bereits publiziert [140]. In den weiteren Versuchen wurde eine Mg^{2+} -Konzentration von 10 mM standardisiert eingesetzt. Die Natur des Gegenions ist dabei nicht relevant.

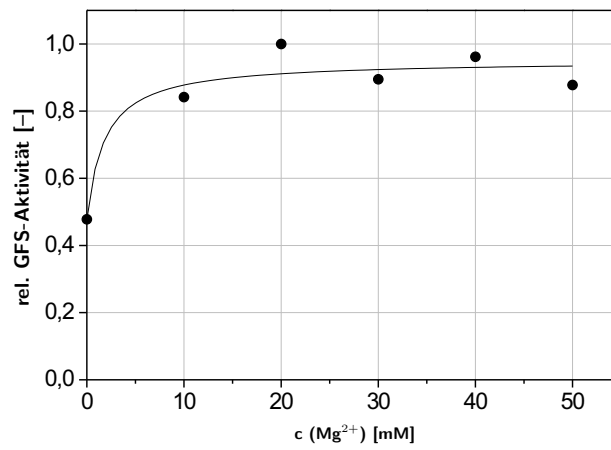


Abbildung 5.33: Mg^{2+} -Abhängigkeit der GFS.

Bedingungen: 0,26 mM GKDM, 0,5 mM NADPH, MgCl_2 variiert, 50 mM Tris-HCl, pH 8, $T = 30^\circ\text{C}$, 0,061 mg/mL Protein (GFS-Präparation), $V = 100 \mu\text{L}$; Zur Herstellung einer Mg^{2+} -freien Lösung wurde mit EDTA maskiert.

Auch für die GFS konnte, in Analogie zur GMD, eine geringe NADPH-oxidierende Nebenaktivität festgestellt werden (vgl. Abbildung 5.11 auf Seite 70). Für die weiteren Untersuchungen war diese jedoch nicht relevant.

Bevor nun die kinetischen Untersuchungen zur GFS-Reaktion besprochen werden, soll in dem folgenden Unterkapitel zunächst auf die Bereitstellung des Substrats der GFS, der GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose (GKDM), eingegangen werden. Der überwiegende Teil dieser Arbeiten wurde von Frau Dipl.-Chem. Andrea Rentmeister im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt [293].

5.3.1 Bereitstellung von GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose (GKDM)¹

Die Verfügbarkeit von GKDM ist die Grundvoraussetzung zur kinetischen Charakterisierung der GDP- β -L-Fucose-Synthetase. GKDM ist ein Nucleotid-Desoxyzucker, dessen Sechsring aufgrund der Ketofunktion an der 4-Position deutlich gespannt ist. Die vielfach beschriebene und dokumentierte Instabilität dieser Verbindung [137, 197] lässt sich, zusätzlich zur Manno-Konfiguration des Sechsrings an C-2,² auf dieses besondere Strukturmerkmal zurückführen. In der Literatur finden sich auch bereits Hinweise auf die Zerfallsprodukte von GKDM; diese sind vornehmlich GDP und GMP [245], so dass GKDM, in Abhängigkeit der Bedingungen, offensichtlich in einen Nucleotid- und einen Zucker- bzw. Zuckerphosphat-Teil zerfällt.

Die Etablierung einer Methode zur Aufreinigung bzw. Isolierung von GKDM gestaltete sich aufgrund der Instabilität dieser Substanz sehr schwierig. Ziel eines solchen Aufreinigungsprotokolls ist die selektive und quantitative Abtrennung des Produkts von anderen Bestandteilen der enzymatischen Synthese von GKDM. Das Reaktionsgemisch der GMD-katalysierten Reaktion enthält neben den Cofaktoren vor allem Pufferbestandteile sowie Mg^{2+} -Salze. Konventionelle Methoden zur Aufreinigung anderer Nucleotidzucker, z.B. von GDP-Man, konnten nicht übertragen werden. Im Falle der GDP-Man gelingt eine effektive Aufreinigung durch Bindung des Produkts an einen starken Anionentauscher, Elution mit 0,5 M Li- bzw. NaCl und anschließender Entsalzung mittels Nanofiltration [295]. Es zeigte sich aber, dass die auftretenden hohen Salzkonzentrationen zu einer raschen Desaktivierung von GKDM führen.

Zur Vermeidung derart hoher Salzkonzentrationen wurde eine andere Strategie zur Isolierung von GKDM untersucht. Die Schritte dieser Methode waren:

- **Ultrafiltration:** Abtrennung des Enzyms
- **Gelfiltration:** Abtrennung des Produkts von den übrigen Bestandteilen durch Größenausschluß-Chromatographie (Elution mit 25 mM NaCl zur Vermeidung ionischer Wechselwirkungen notwendig)
- **Nanofiltration:** Abtrennung des NaCl
- **Lyophilisation:** Abtrennung des Wassers durch Gefriertrocknung

Auch diese Strategie erwies sich als unzureichend zur Gewinnung der Substanz in aufgereinigter Form. Abbildung 5.34 auf der nächsten Seite zeigt schematisch die einzelnen Schritte dieser Strategie sowie die daraus resultierenden Ausbeuten bzw. gebildeten Mengen an unerwünschtem Zerfallsprodukt (GDP).

Bereits nach der Gelfiltration geht etwa ein Viertel des Produktes verloren, die anschließende Nanofiltration zur Abtrennung des Salzes zeigt einen weiteren erheblichen Produktverlust. Beide Schritte wurden bei jeweils 4°C durchgeführt. Die abschließende Lyophilisation bewirkt einen starken Zerfall von GKDM in das Zerfallsprodukt GDP. Der GDP-Anteil des isolierten Produktes ist sogar höher als vor der Aufreinigung.

Es zeigte sich, dass GKDM auch in einer wäßrigen, **pufferfreien** Lösung enzymatisch hergestellt werden kann. In einem typischen, semi präparativen Ansatz können 200 μ mol GDP-Man umgesetzt werden (5 mM Substrat, 0,1 mM NADP bzw. NADPH). Da die Nucleotidzucker

¹Die Etablierung einer geeigneten Methode zur Gewinnung von GKDM wurde von Frau Dipl.-Chem. Andrea Rentmeister im Rahmen ihrer Diplomarbeit bearbeitet.

²Das 2-Epimere des Sechsrings (Gluco-Konfiguration), etwa in dTDP-4-keto-6-desoxy-D-glucose, ist deutlich stabiler [294].

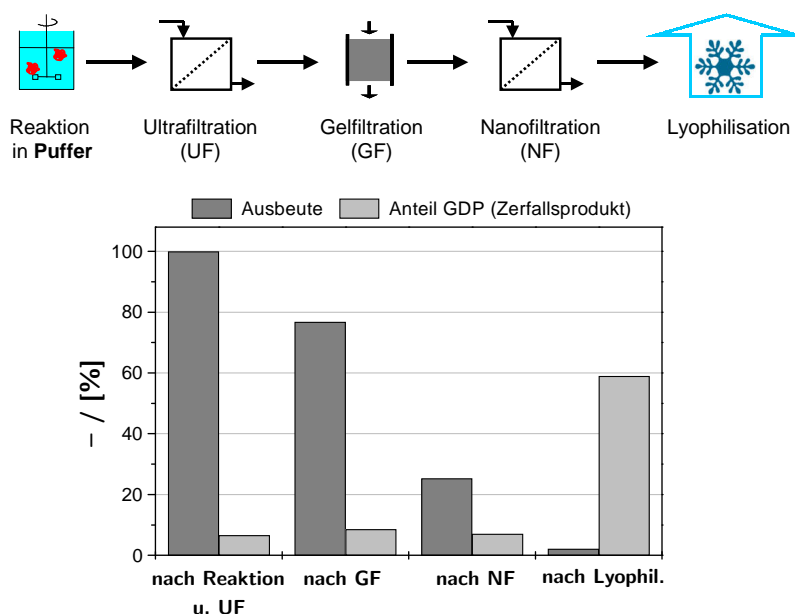


Abbildung 5.34: Zerfall von GKDM während der Aufreinigung mit den Schritten Ultrafiltration (UF), Gelfiltration (GF), Nanofiltration (NF) und Lyophilisation.

UF: Membran mit 10 kD cut off; GF: Biogel P-2, 4° C, Säule: 550x26 mm, Elution mit 25 mM NaCl; NF: Membran DK (Osmonics), 4° C.

aufgrund ihrer Phosphatgruppen puffernde Eigenschaften besitzen, ist die Einstellung eines konstanten pH-Wertes von 8,0 vor der Reaktion möglich. Zudem werden bei der GMD-Reaktion Protonen weder gebildet noch verbraucht.

Nach der Synthese wird die GMD mittels Ultrafiltration abgetrennt. Die Reaktionslösung kann anschließend sofort lyophilisiert werden. Zur Stabilisierung des Produkts während der Gefriertrocknung wird der Reaktionslösung vorher Glycerin zugesetzt. Durch diese Maßnahme sowie durch permanente Kühlung auf -20°C und Handhabung von GKDM in einer Argon-Atmosphäre während und nach der Lyophilisation konnte der Zerfall von GKDM deutlich verringert werden. Abbildung 5.35 auf der nächsten Seite zeigt schematisch die Vereinfachung des Aufreinigungsprotokolls sowie die sehr guten Produktausbeuten von über 90% nach den Schritten Synthese/Ultrafiltration und Lyophilisation.

GKDM wird nach der Lyophilisation als Glycerin-Lösung erhalten; diese Lösung enthält weniger als 4% des Zerfallsprodukts GDP und weniger als 5% an gesamten Verunreinigungen.¹ Der Gehalt dieser Glycerinlösung an GKDM kann einfach über HPLC-Analyse bestimmt werden.² Das so gewonnene Produkt weist eine ausgezeichnete Lagerstabilität aus, wenn es in einer Argonatmosphäre bei -20°C aufbewahrt wird. Abbildung 5.36 zeigt den Zerfall von GKDM über einen Zeitraum von etwa 60 Tagen. Zur Berechnung der Desaktivierungskonstanten wurde ein Zerfall erster Ordnung vorausgesetzt. Wird das Produkt als Glycerin-Präparation ($k_{des} = 1,4 \cdot 10^{-3} \text{ d}^{-1}$, $\tau_{1/2} = 481$ Tage) gelagert, so ist es um einen Faktor 9 stabiler als die gefrorene, wässrige Lösung der Substanz ($k_{des} = 12,9 \cdot 10^{-3} \text{ d}^{-1}$, $\tau_{1/2} = 53$ Tage).

¹bestimmt durch HPLC-Analyse.

²Verwendung des spezifischen, molaren Extinktionskoeffizienten für GDP-Man.

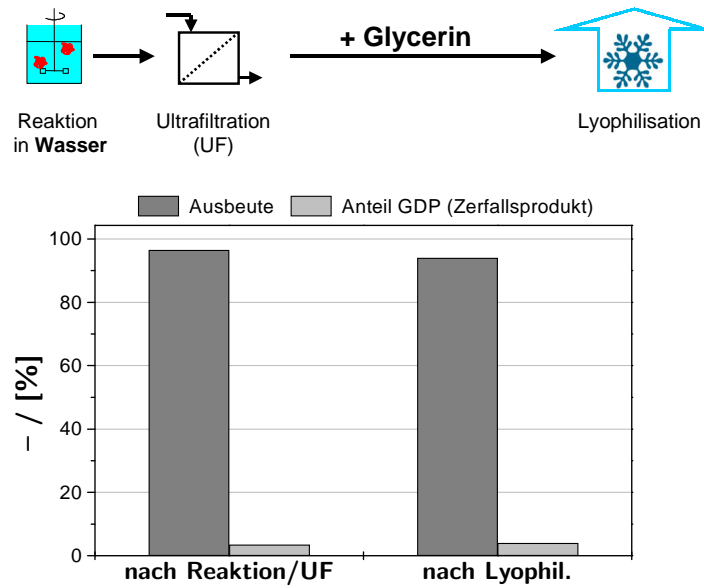


Abbildung 5.35: Optimierung der Methode zur Gewinnung von GKDM. Zugabe von Glycerin vor der Lyophilisation (Details zu den einzelnen Schritten siehe Text).

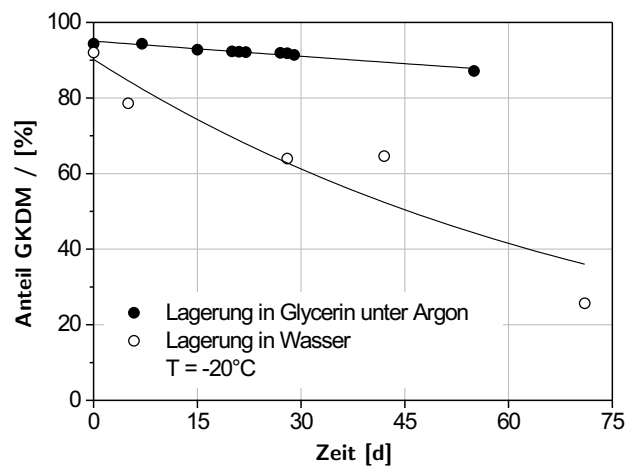


Abbildung 5.36: Stabilität von GKDM in Wasser bzw. Glycerin bei -20°C (Ar-Atmosphäre). Für den Zerfall wurde eine Reaktion erster Ordnung vorausgesetzt.

Durch dieses einfache Protokoll zu Synthese und Bereitstellung von GKDM ist es möglich, auch größere Mengen dieses instabilen Nucleotidzuckers zu handhaben. Alle kinetischen Messungen zur GFS konnten auf diese Weise mit einer einzigen Produktlösung gemessen und störende Einflüsse unterschiedlicher Zerfallsprodukte somit ausgeschlossen werden.

NMR-Analyse von GKDM¹

Aufgrund der beschriebenen Instabilität von GKDM sind bisher keine eindeutigen und vollständigen Daten der NMR-Analyse zu dieser Verbindung publiziert. Zwar wurde bereits von Teilergebnissen der NMR-Analyse berichtet [166], jedoch konnte aufgrund dieser Daten die Struktur von GKDM in Lösung nicht eindeutig identifiziert werden. Diese Arbeiten gaben aber wichtige Hinweise, dass GKDM in Lösung offenbar in unterschiedlichen Formen vorliegt (siehe auch Kapitel 8).

Die NMR-Analyse von GKDM in Form der Glycerin-Präparation gelang nur bedingt, da die starken Signale des Lösungsmittels in allen Spektren zu intensiv waren. Die Charakterisierung des Ketozuckers gelang daher nur, wenn die enzymatische Umsetzung von GDP-Man zu GKDM direkt in einem NMR-Probengefäß durchgeführt wurde. Die Produktbildung wurde *in situ* durch wiederholte Aufnahme von NMR-Spektren nach definierten Zeitintervallen verfolgt. Nach vollständiger Umsetzung der GDP-Man zu GKDM konnte das Produkt anschließend durch ein- und zweidimensionale homonukleare und zweidimensionale heteronukleare NMR-Experimente vollständig charakterisiert werden.

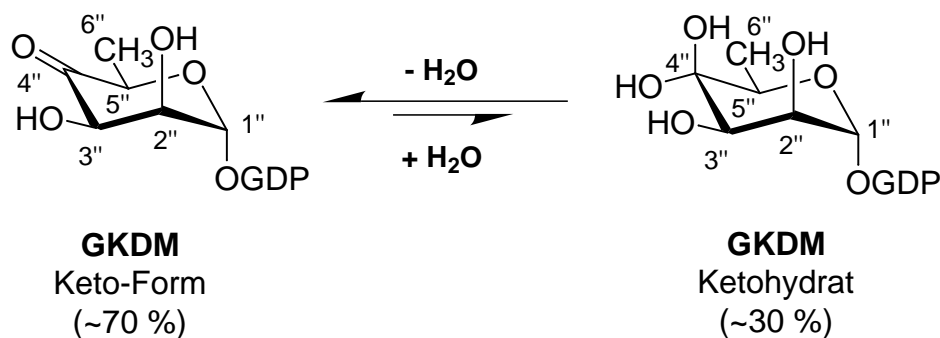


Abbildung 5.37: Ergebnis der NMR-Analyse von GKDM. Die Verbindung liegt sowohl in der Keto-Form wie auch als Ketohydrat vor.

Das angegebene Verhältnis der beiden Formen resultiert aus den gemessenen NMR-Signalintensitäten. **Vollständige NMR-Daten (chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten) in Kapitel 10 auf Seite 187.**

Diese *in situ* Charakterisierung von GKDM zeigte, dass das enzymatisch gewonnene Produkt in wässriger Lösung in zwei Formen vorliegt. Diese beiden Formen sind die Keto-Form von GKDM und das entsprechende Hydrat dieser Verbindung, welches durch Anlagerung von Wasser an die Ketofunktion gebildet wird. Die beiden Formen des Nucleotidzuckers sind in der Abbildung 5.37 dargestellt. In den NMR-Spektren erscheinen beide Formen als eigenständige, unabhängige Datensätze. Die ¹³C-NMR-Daten des Hexoserings für beide Formen zeigen eindeutig, dass lediglich die Ketoform von GKDM eine Ketofunktion an C-4'' innerhalb des Mannoserings trägt ($\delta = 208,57$ ppm, q). Die Hydratform zeigt keinerlei Signal, welches für eine Ketofunktion typisch wäre. Die chemische Verschiebung für C-4'' ($\delta = 93,56$ ppm) belegt die Existenz des Hydrats. Außerdem zeigten die ¹³C-Signale an C-4'' keinerlei heterologe ¹J_{C-4'',H}-Kopplungskonstanten; dies belegt eindeutig, dass keine der beiden Formen ein Proton an dieser Position trägt.

¹Diese Messungen wurden in Kooperation mit Herrn Dr. Gerald Dräger und Prof. Andreas Kirschning (Institut für Organische Chemie, Universität Hannover) durchgeführt.

Die Verschiebungen und ^1H - ^1H -Kopplungskonstanten der Protonen an C-1'', C-2'', C-3'', C-5'' und C-6'' zeigen typische Werte für die beschriebenen Strukturen. Beide Verbindungen konnten als 6-Desoxyhexosen ($\delta_{\text{H-6''}} = 1,24$ ppm, Ketoform; $\delta_{\text{H-6''}} = 1,22$ ppm, Hydrat) mit einer Manno-Konfiguration charakterisiert werden.

Der Vergleich der Signalintensitäten für beide Datensätze weist darauf hin, dass die beiden Formen von GKDM in wässriger Lösung in einem Verhältnis von etwa 70:30 (Ketoform/Hydrat) vorliegen. Die Existenz entsprechender Hydrate konnte auch bereits für die Nucleotidzucker dTDP-2,6-dideoxy-4-keto-glucose und dTDP-4-keto-6-desoxy-glucose nachgewiesen werden [296, 297].

Weitere Messungen konnten zudem auch den postulierten Reaktionsmechanismus der GMD-Reaktion in Teilen bestätigen. Dazu wurde die GMD-Reaktion sowohl in Wasser wie auch in D_2O durchgeführt. Auf die Ergebnisse dieser Untersuchungen wird in Kapitel 8 eingegangen.

5.3.2 Kinetische Untersuchungen zur GFS¹

In diesem Unterkapitel werden die wichtigsten Ergebnisse der kinetischen Analyse der GDP- β -L-Fucose-Synthetase vorgestellt. Die Untersuchung der Reaktionsgeschwindigkeiten der GFS-katalysierten Umsetzung von GKDM zu GDP-Fuc in Abhängigkeit verschiedener Faktoren ist wichtiger Bestandteil einer prozess-orientierten Charakterisierung dieses Enzyms. Gewonnene Erkenntnisse über diese Reaktion werden bei der Konzeption effizienter Synthesen von GDP-Fuc eine wichtige Rolle spielen.

Wie in Abbildung 5.32 auf Seite 95 dargestellt, ist mit der Synthese von GDP-Fuc aus GKDM ein Verbrauch an NAD(P)H in stöchiometrischen Mengen verbunden. Aufgrund dieser Eigenschaft kann die Reaktion, wie bereits in Kapitel 3 erwähnt, photometrisch verfolgt werden. Aus der an einem Mikroplattenleser bestimmten Abnahme der Absorption bei 340 nm kann der Verbrauch des Cofaktors berechnet werden. Die Korrelation der Substratabnahme (GKDM und NAD(P)H) mit der Produktzunahme (GDP-Fuc und NAD(P)) wurde mittels HPLC bestätigt.

Die Bestimmung der kinetischen Größen und Parameter wurde durch Messung der jeweiligen Abhängigkeiten in Satzreaktorversuchen durchgeführt. Mit dem photometrischen Enzymassay wurden die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten bei unterschiedlichen Bedingungen und variierenden Konzentrationen von Substrat und Produkten gemessen. Wenn der Umsatz 5-10% im Assay nicht überschreitet, können Einflüsse von Konzentrationsänderungen während des Assays vernachlässigt und die Bedingungen der Anfangskonzentrationen in guter Näherung als erfüllt angesehen werden.

Alle Messungen wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt; zur Berechnung der Enzymaktivitäten wurde das arithmetische Mittel verwendet. Es muss betont werden, dass der photometrische Assay nicht in der Lage ist, die beiden Reaktionen der GFS-Reaktion (Epimerisierung und Reduktion, siehe Abbildung 5.32) zu unterscheiden. Die Werte der Enzymaktivität können lediglich die Geschwindigkeit der **Gesamtreaktion GKDM \rightarrow GDP-Fuc** widerspiegeln.

¹Teile der hier vorgestellten Ergebnisse werden ausführlicher in der Diplomarbeit von Frau Dipl.-Chem. A. Rentmeister ausgeführt und diskutiert [293].

5.3.2.1 Einfluss von Temperatur und pH-Wert

Die beiden Abbildungen 5.38 und 5.39 zeigen den Einfluss der Temperatur sowie des pH-Wertes auf die Geschwindigkeit der GFS-Reaktion. Wie im Falle der GMD wurde auch für die GFS die Berechnung der Aktivierungsenergie auf der Basis von Standard-Assays unter Sättigungsbedingungen und unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. Auch diesen Berechnungen liegt die *Arrhenius*-Gleichung 5.3 auf Seite 62 zugrunde.

Abbildung 5.38 zeigt den Einfluss steigender Temperatur auf die GFS-Enzymaktivität. Es ist deutlich die zu erwartende, exponentielle Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit zu erkennen. Durch Linearisierung der Daten und Generierung des entsprechenden *Arrhenius*-plots konnte die Aktivierungsenergie E_A dieser Reaktion zu $66,8 \pm 2,3$ kJ/mol bestimmt werden; sie liegt damit etwas niedriger als jene der GMD-Reaktion¹ jedoch in einer für enzymatische Reaktionen typischen Größenordnung.

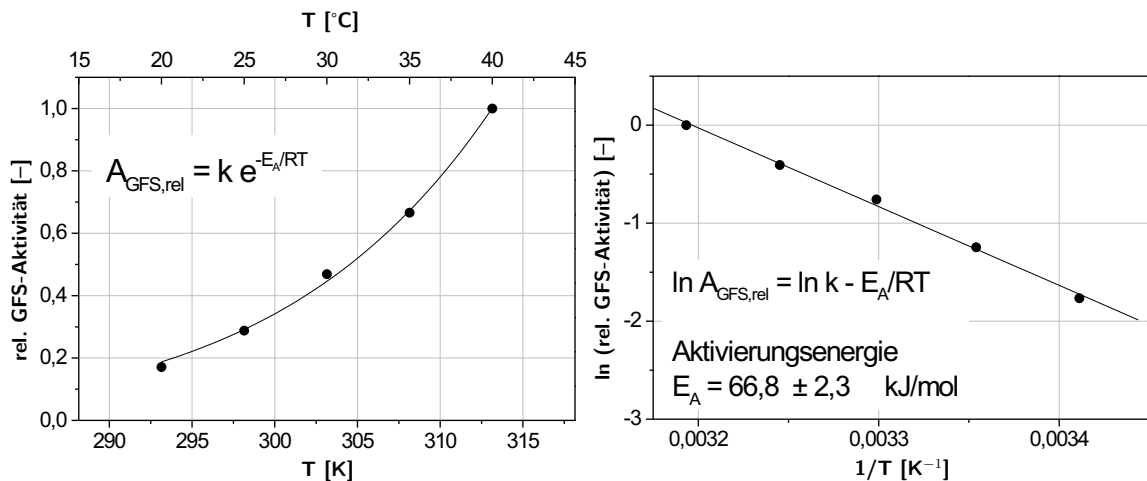


Abbildung 5.38: Einfluss der Temperatur auf die GFS-Aktivität (links) und Berechnung der Aktivierungsenergie (rechts, *Arrhenius* plot).

Bedingungen: 0,25 mM GKDM, 0,5 mM NADPH, 10 mM MgCl_2 , 50 mM Tris-HCl, pH 8, $T = \text{variiert}$, 0,061 mg/mL Protein (GFS-Präparation), $V = 0,1$ mL.

Auch bei einer Temperatur von 40°C ist noch keine starke Desaktivierung der GFS für die Zeit des Enzymassays zu erkennen, ein Aktivitätsmaximum wird daher nicht ausgebildet.

Zur Untersuchung unterschiedlicher pH-Werte auf die GFS-Reaktion wurde wiederum ein Puffergemisch aus Tris und Maleinsäure eingesetzt. Dieses Gemisch puffert in einem pH-Bereich von 5 bis einschließlich 9 [286]. Durch Einsatz eines solchen Puffers können Einflüsse unterschiedlicher Puffersubstanzen auf die Enzymaktivität vermieden werden. Abbildung 5.39 auf der nächsten Seite zeigt das pH-Profil der GFS.

Es ist zu erkennen, dass die Enzymaktivität mit dem pH-Wert ansteigt. Bei einem pH von 5 werden nur noch 20% der Reaktionsgeschwindigkeit erzielt, die bei einem pH-Wert von 9 gemessen werden kann. Das pH-Profil unterscheidet sich von dem bisher publizierten

¹ $E_A = 78,4 \pm 3,3$ kJ/mol

[140]. In jener Veröffentlichung, die sich ebenfalls mit dem Enzym aus *E. coli* beschäftigt, wurde ein pH-Bereich von 5 bis einschließlich 10 abgedeckt. Die GFS weist dort ein deutliches Maximum im Bereich von pH 7/pH 8 auf, jedoch fehlt eine Angabe über die dort eingesetzten Puffersubstanzen.

Im Rahmen der eigenen Arbeiten wurde, neben dem pH-Wert, auch der Einfluss verschiedener Puffersubstanzen auf die GFS-Aktivität untersucht.¹ Dabei wurde der pH-Wert für alle Messungen auf 7 bzw. 8 eingestellt. Es konnten keine wesentlichen Einflüsse des Puffers auf die Enzymaktivität beobachtet werden. Die bereits für den Tris/Maleat-Puffer nachgewiesene höhere Enzymaktivität bei pH 8 im Vergleich zu pH 7 konnte auch für alle anderen Puffer bestätigt werden.

Aufgrund der hier dargestellten Ergebnisse, wurden die weiteren kinetischen Messungen in einem Tris-HCl Puffer bei einem pH-Wert von 8 und bei einer Temperatur von 30°C durchgeführt.

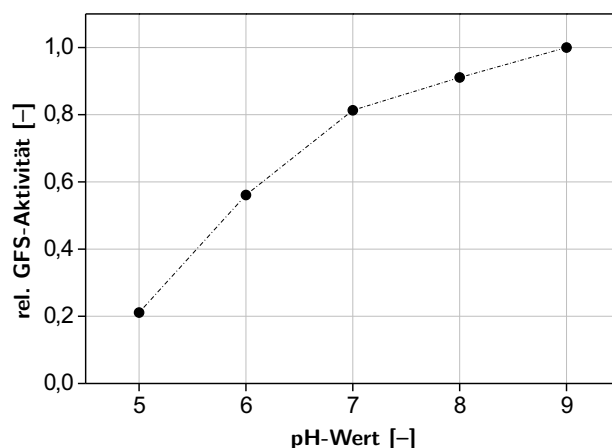


Abbildung 5.39: Einfluss des pH-Werts auf die GFS-Aktivität. Die Linie dient lediglich als visuelle Hilfe.

Bedingungen: 0,25 mM GKDM, 0,5 mM NADPH, 10 mM MgCl₂, Tris-Maleat-Puffer (50 mM Tris + 50 mM Maleat), T = 30°C, 0,061 mg/mL Protein (GFS-Präparation), V = 0,1 mL.

5.3.2.2 Einfluss von Substrat- und Produktkonzentration

Ziel dieser Untersuchungen war es, die Parameter eines geeigneten kinetischen Modells für die GFS-Reaktion an die gemessenen Daten anzupassen. Die gewonnenen Parameter sollen anschließend zur Simulation verschiedener Reaktionen im Satzreaktor genutzt werden, um das kinetische Modell durch den Vergleich von Experiment und Simulation verifizieren zu können.

Wie bereits erwähnt, kann mit Hilfe des verwendeten, photometrischen Assays nur die Gesamtreaktion GKDM \rightarrow GDP-Fuc verfolgt werden. Ein formalkinetischer Ansatz zur Beschreibung der Reaktion kann daher auch lediglich die kinetischen Parameter bezüglich

¹verwendete Puffersubstanzen: KPi, HEPES, MOPS, MES und TEA (jeweils pH 7 und pH 8).

Substrat, Cofaktor(en) und Produkt liefern. Vereinfachend kann die GFS-Reaktion als eine Reaktion mit zwei Substraten und zwei daraus resultierenden Produkten angesehen werden. Einleitend zu diesem Kapitel 5 wurde bereits der Begriff der "Doppelsubstratkinetik" eingeführt: eine Reaktion mit zwei Substraten wird nach diesem Modell durch die Multiplikation der einzelnen, für das jeweilige Substrat getrennt aufgestellten *Michaelis-Menten*-Terme beschrieben. Durch Erweiterung des Nenners können auch Inhibierungen berücksichtigt werden.

Eine Besonderheit der GFS-Reaktion ist die Tatsache, dass das Enzym sowohl NADPH wie auch NADH als reduzierenden Cofaktor akzeptiert (s. oben). Der Einfluss der Substrate und Produkte wurde daher in unabhängigen Messreihen für beide Cofaktoren gemessen.

Es zeigte sich, dass die GFS sowohl durch das Produkt, GDP-Fuc, wie auch durch die oxidierten Cofaktoren (NADP bzw. NAD) inhibiert wird. Abbildung 5.40 fasst die kinetischen Messungen zur Produktinhibierung der GFS zusammen.

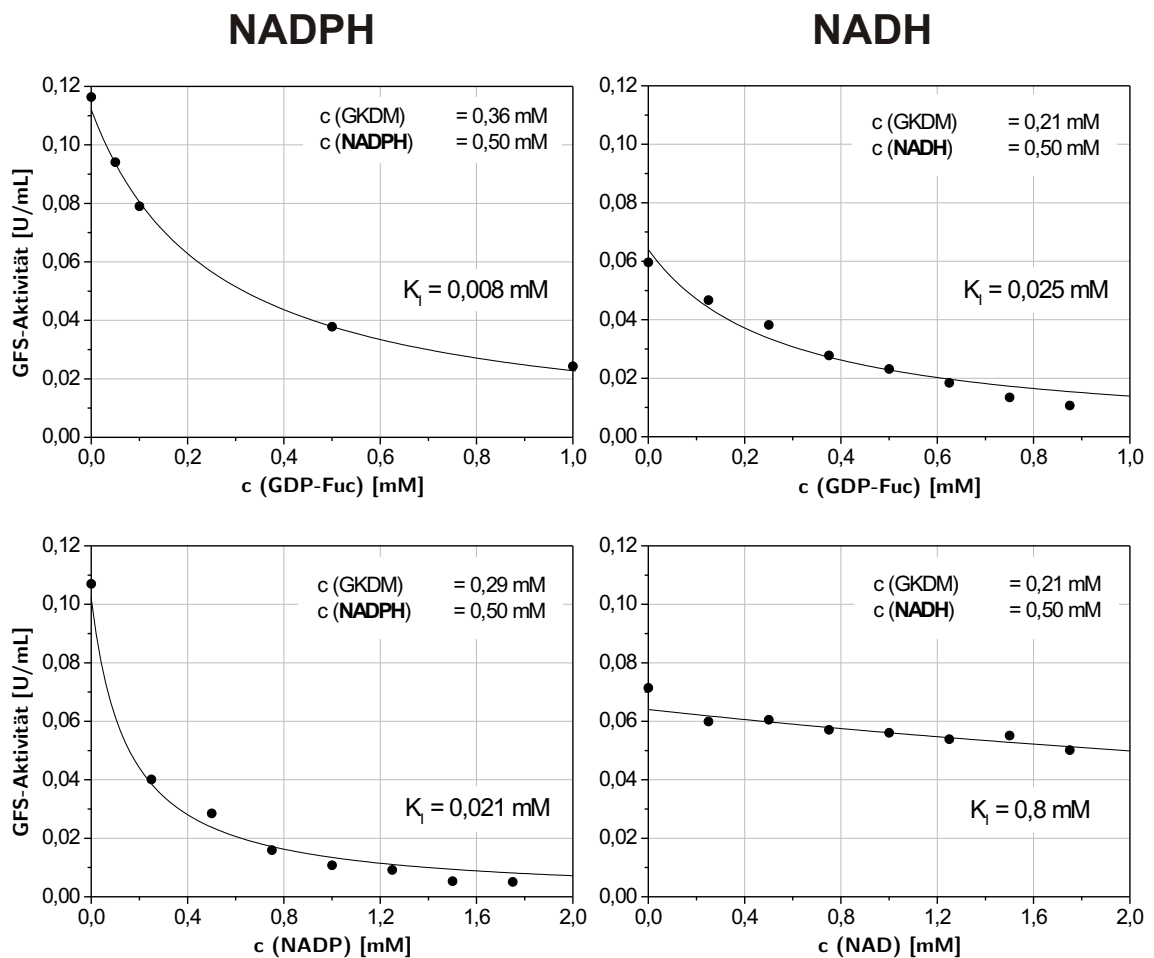


Abbildung 5.40: Kinetische Messungen zu den Produktinhibierungen der GFS.

Bedingungen: 50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM MgCl₂, T = 30°C, V = 0,1 mL.

Aufgrund dieser beobachteten Inhibierungen wurde die Geschwindigkeit der GFS-Reaktion durch eine Doppelsubstratkinetik mit kompetitiver Produktinhibierung (Gleichung (5.11)) für beide Produkte beschrieben. Die beiden vollständigen Datensätze (NADPH bzw. NADH als Cofaktor) konnten mit dem Programm SCIENTIST™ mit einer Korrelation von je >99% an das kinetische Modell angepasst werden.

$$v = v_{max} \cdot \frac{[\text{GKDM}]}{K_{M,\text{GKDM}} \cdot \left(1 + \frac{[\text{GDP-Fuc}]}{K_{I,\text{GDP-Fuc}}}\right) + [\text{GKDM}]} \cdot \frac{[\text{NAD(P)H}]}{K_{M,\text{NAD(P)H}} \cdot \left(1 + \frac{[\text{NAD(P)}]}{K_{I,\text{NAD(P)}}}\right) + [\text{NAD(P)H}]} \quad (5.11)$$

Die daraus ermittelten Parameter sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst. Auch der Einfluss von GDP-Man, GDP und GMP auf die Enzymaktivität wurde gemessen. Dieser konnte aber in dem für die GFS-Reaktion relevanten Konzentrationsbereich (bis 1 mM) vernachlässigt werden. Die GFS erzielt höhere Reaktionsgeschwindigkeiten mit NADPH ($v_{max} = 0,122$ U/mL) als mit NADH ($v_{max} = 0,080$ U/mL) als Cofaktor. Mit dem nicht-phosphorylierten Cofaktor werden noch 66% der Aktivität erzielt. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten zur GFS [139, 140], jedoch wurden die vollständigen, kinetischen Parameter der GFS für beide Cofaktoren bisher nicht veröffentlicht. Die K_M -Werte für beide Substrate unterscheiden sich je nach verwendetem Cofaktor. Mit NADPH liegen die K_M -Werte für Substrat und Cofaktor niedriger als mit NADH (vgl. Tabelle 5.3). Die Affinität der GFS zum Substrat ist mit NADPH offensichtlich höher. Das bedeutet, dass die GFS mit NADH als Cofaktor die maximale Aktivität erst bei höheren Konzentrationen von Substrat und Cosubstrat erzielen kann.

Wird der phosphorylierte Cofaktor NADPH zur Synthese genutzt, so zeigt sich jedoch auch eine stärkere Produktinhibierung - verglichen mit dem nicht-phosphorylierten Nicotinamidcofaktor NADH. Für NADP liegt der ermittelte K_I -Wert mit 0,021 mM sehr niedrig, die Inhibierung durch den oxidierten Cofaktor ist stark. Dem gegenüber steht ein K_I -Wert von 0,8 mM für NAD. Auch die Produktinhibierung durch GDP-Fuc fällt mit NADH als Cofaktor geringer aus als mit NADPH. Die Hemmung der GFS-Reaktion durch die im Verlauf der Umsetzung gebildeten Produkte wird mit NADH als Cofaktor also nicht so stark ausfallen. Bei einer vorgegebenen Produktkonzentration ist die Geschwindigkeit der GFS-Reaktion mit NADH somit höher als mit NADPH.

		NADPH	NADH
v_{max}	[U/mL]	0,122 ± 0,005	0,080 ± 0,003
$K_{M,\text{GKDM}}$	[mM]	0,012 ± 0,002	0,021 ± 0,003
$K_{M,\text{NAD(P)H}}$	[mM]	0,032 ± 0,005	0,065 ± 0,009
$K_{I,\text{GDP-Fuc}}$	[mM]	0,008 ± 0,002	0,025 ± 0,004
$K_{I,\text{NAD(P)}}$	[mM]	0,021 ± 0,005	0,8 ± 0,2

Tabelle 5.3: Kinetische Parameter der GFS für NADPH bzw. NADH als Cofaktor. Alle Messungen wurden mit der gleichen Enzymcharge durchgeführt.

5.3.2.3 Verifizierung des Modells - *batch*-Versuche

Das oben dargestellte, vereinfachte kinetische Modell der GFS-Reaktion wurde durch den Vergleich experimentell durchgeführter Satzreaktor- (*batch*-) Versuche mit simulierten Reaktionsverläufen validiert. Für beide Cofaktoren (NADPH bzw. NADH) wurden je drei unterschiedliche Substratkonzentrationen entsprechend Abbildung 5.41 gewählt. Der Verlauf der NAD(P)H-Oxidation und damit der Fortgang der Reaktion wurde experimentell durch photometrische Echtzeit-Messungen verfolgt. Die Simulationen der Reaktionen wurden für die gleichen Substratkonzentrationen mit dem Programm SCIENTIST™ durchgeführt und hierfür die kinetischen Parameter entsprechend Tabelle 5.3 verwendet. Abbildung 5.41 zeigt die experimentellen Werte als Symbole, die simulierten Reaktionsverläufe sind als Linien dargestellt.

Der Vergleich der beiden Graphen zeigt, dass die Übereinstimmung der experimentellen Daten mit den Simulationen für NADH als verwendetem Cofaktor größer ist als mit NADPH. Jedoch ist die Simulation auch für den phosphorylierten Cofaktor noch durchaus zufriedenstellend.

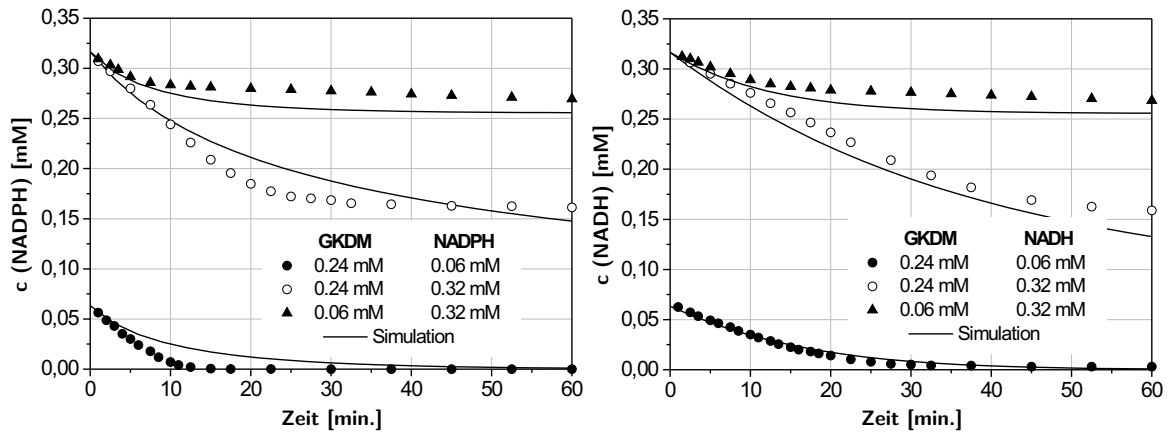


Abbildung 5.41: Verifizierung des kinetischen Modells für NADPH (**links**) bzw. NADH (**rechts**) als Cofaktor.

Bedingungen der Satzreaktorversuche: 0,012 U/mL GFS, 50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM MgCl₂, T = 30°C, V = 0,1 mL.

Für NADPH sagt das Modell bei hohen GKDM-Startkonzentrationen (0,24 mM) eine niedrigere Reaktionsgeschwindigkeit voraus als sie im Experiment gemessen wurde. Jedoch zeigen die Experimente auch eine starke Verringerung der Geschwindigkeit nach etwa 20 Minuten; möglicherweise ist die im Modell berücksichtigte Produktinhibierung – sowohl durch GDP-Fuc wie auch durch NADP – zu stark, die entsprechenden K_I -Werte sind eventuell zu klein. Dies würde die unterschiedlichen Reaktionsverläufe in den ersten 30 Minuten erklären. Nach dem Modell der Doppelsubstratkinetik ist die Bindung des einen Substrates (und die entsprechende Produktinhibierung) unabhängig von der Bindung des anderen Substrates (und dieser Produktinhibierung). K_M -Wert für GKDM und K_I -Wert für GDP-Fuc müssten nach diesem Modell, unabhängig vom verwendeten Cofaktor, gleich sein. Ein K_I -Wert von 0,025 mM erscheint daher plausibler als 0,008 mM.

Vergleicht man die simulierten Reaktionsverläufe für das Wertepaar der Startkonzentrationen $c(\text{GKDM}) = 0,24 \text{ mM}$ / $\text{NADPH} = 0,32 \text{ mM}$ (weiße Datenpunkte), so stellt man fest, dass die Reaktion mit NADH zwar zunächst langsamer verläuft, aufgrund der schwächeren Produktinhibierungen wird nach 60 Minuten jedoch ein größerer Umsatz erzielt als mit NADPH. Die gute Übereinstimmung der Experimente mit den simulierten Reaktionsverläufen belegt, dass das gewählte kinetische Modell einer Doppelsubstratkinetik mit doppelter, kompetitiver Produktinhibierung und die ermittelten kinetischen Parameter zur Beschreibung von GFS-katalysierten Reaktionen geeignet sind.

5.3.3 Integrierte Cofaktorregenerierung

Die starke Inhibierung der GFS durch die Produkte GDP-Fuc und NAD(P) hat einen wesentlichen Einfluss auf die Realisierung von Verfahren zur Synthese von GDP-Fuc (siehe Kapitel 6). Die Produktinhibierung durch GDP-Fuc kann entweder durch Arbeiten mit möglichst niedrigen Substratkonzentrationen oder - wie in Kapitel 7 demonstriert - durch Erweiterung der Reaktionssequenz mit einer Fucosyltransferase vermindert werden. Aus einer geringeren Produktkonzentration resultiert, bei gleicher Enzymkonzentration, eine insgesamt größere Reaktionsgeschwindigkeit. Die gleiche Überlegung kann auch für den oxidierten Cofaktor (NADP bzw. NAD) angestellt werden. Wird der reduzierte Cofaktor jedoch in stöchiometrischen Mengen zur Reaktion gegeben, so muss seine Konzentration immer mindestens derjenigen der GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose (GKDM) entsprechen.

Eine Absenkung der erforderlichen Cofaktorkonzentration kann mit Hilfe der integrierten Cofaktorregenerierung erreicht werden. Der große Vorteil der Cofaktorregenerierung liegt darin, dass der Cofaktor nun nicht mehr in stöchiometrischen Mengen zur Reaktion gegeben werden muss. Neben dem positiven, ökonomischen Aspekt sollte die GFS-Reaktion durch die Regenerierung zudem beschleunigt werden können: da die NADP-Konzentration gering bleibt, kann sich die Produktinhibierung nicht so stark auswirken.

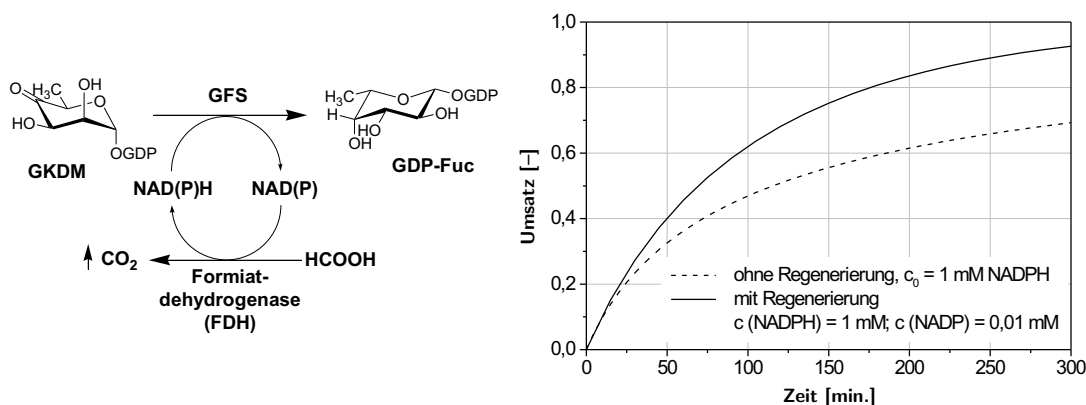


Abbildung 5.42: GFS-Reaktion und integrierte, enzymgekoppelte Cofaktorregenerierung mit der Formiatdehydrogenase (FDH). links: Reaktionsschema, rechts: simulierte Umsatz-Zeit-Verläufe.

Bedingungen Simulation: 1 mM GKDM, 0,012 U/mL GFS; Desaktivierungen aller Art und Kinetik der FDH wurden nicht berücksichtigt.

Prinzipiell kann die integrierte Cofaktorregenerierung substrat- oder enzymgekoppelt betrieben werden. Bei der ersten Variante wird der Cofaktor mit demselben Enzym aber mit einem zusätzlichen Substrat, welches als Hydriddonor fungiert, regeneriert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erste Untersuchungen zur **enzymgekoppelten** Cofaktorregenerierung mit einer NADP-abhängigen Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Pseudomonas sp. 101* durchgeführt [298, 299] (Reaktionsschema der Abbildung 5.42 auf der vorherigen Seite). Formiat ist der Hydriddonor, das Oxidationsprodukt CO_2 entsteht als Folge der Reduktion von NADP zu NADPH.

Der rechte Graph der Abbildung zeigt die Simulation eines Satzreaktorversuchs mit integrierter Regenerierung von NADPH (durchgezogene Linie). Dabei wird angenommen, dass der Cofaktor, aufgrund einer sehr hohen FDH-Aktivität, zu jeder Zeit zu 99% in seiner reduzierten Form vorliegt. Dem gegenübergestellt ist die *batch*-Synthese ohne Cofaktorregenerierung (gestrichelte Linie). Die Simulationen bestätigen, dass die GFS-Reaktion durch die Regenerierung des Cofaktors beschleunigt werden kann. Wird mit NAD(H) als Cofaktor gerechnet, so fällt der Effekt, wegen der schwächeren Inhibierung der GFS durch NAD, deutlich geringer aus (nicht dargestellt).

Weitere Untersuchungen der FDH zeigten, dass das Enzym mit dem Reaktionssystem der GDP-Fuc-Synthese prinzipiell kompatibel ist. So findet keine wesentliche Inhibierung oder Desaktivierung der FDH durch die Substrate oder Produkte statt. Wenn sie in statischen Reaktionsgefäßen inkubiert wird¹, ist die FDH in Anwesenheit von GKDM, GDP-Fuc sowie der GFS hinreichend stabil (vgl. dazu auch Kapitel 6.5 auf Seite 120).

Abbildung 5.43 zeigt exemplarisch eine Umsetzung von GKDM zu GDP-Fuc im *batch*-Verfahren mit Cofaktorregenerierung. Es wurde ein Überschuß an FDH eingesetzt (5 U/mL), um zu verhindern, dass die enzymatische Reduktion des Cofaktors geschwindigkeitsbestimmend ist. Der Reaktionsverlauf belegt, dass die Synthese mit integrierter Cofaktorregenerierung prinzipiell durchgeführt werden kann.

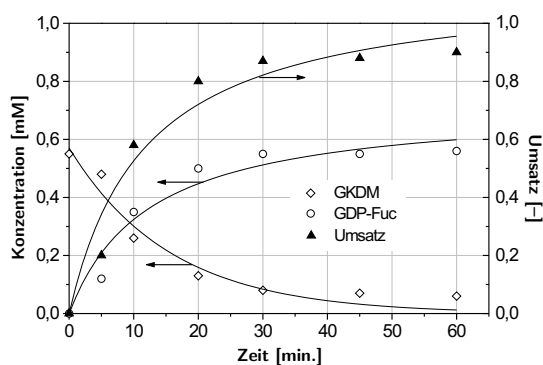


Abbildung 5.43: GDP-Fuc-Synthese im Satzreaktor mit integrierter, enzymgekoppelter Cofaktorregenerierung. Die Linien dienen lediglich als visuelle Hilfe.

Bedingungen: 0,5 mM GKDM, 0,1 mM NADP, 100 mM Na-Formiat, 1 mM DTT, 50 mM MOPS, pH 7, $T = 30^\circ\text{C}$, 47 mU GFS, 5 U FDH (Aktivitäten entsprechend Kapitel 10), $V = 1\text{ mL}$.

¹Bedingungen: 50 mM MOPS, 10 mM MgSO_4 , 1 mM DTT, $T = 20^\circ\text{C}$. Variiert: Zugabe von GKDM und GFS-Präparation.

5.4 Zusammenfassung

GDP- α -D-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD)-Reaktion Die GMD-Reaktion ist eine zwei-stufige Reaktion; das Enzym katalysiert eine cofaktor-vermittelte, *intramolekulare* Hydrid-Verschiebung von C-4" nach C-6" innerhalb des Hexoserings. Das Enzym benötigt für die Umsetzung den Nicotinamidcofaktor NADP sowie zweiwertige Magnesium-Ionen.

Die Aktivierungsenergie (E_A) der Reaktion konnte zu $78,4 \pm 3,3$ kJ/mol bestimmt werden. Die GMD besitzt ein Aktivitätsmaximum bei pH-Werten zwischen 7 und 8. Die Enzympräparation besitzt eine schwache NADPH-oxidierende Nebenaktivität.

Die Erhöhung der NADP-Konzentration hat eine Beschleunigung der Reaktion zur Folge, es wird aber ein Maximum der Reaktionsgeschwindigkeit erreicht (Sättigungskinetik). Auch für den reduzierten Cofaktor NADPH sowie das Substrat, die GDP-Man, wird eine Sättigungskinetik beobachtet. NADPH aktiviert die GMD (Erhöhung von v_{max}). Eine einmalige Aktivierung des Enzyms ist zur Durchführung eines *repetitive batch*-Versuchs aber nicht ausreichend. Die apparenten K_M -Werte für GDP-Man und die Cofaktoren liegen im μ molaren Bereich. Der K_M für NADPH liegt jedoch um das 16-fache niedriger als für NADP. GDP-Fuc hemmt die GMD-Reaktion in einer sehr starken *feedback*-Inhibierung.

Niedrige Enzymaktivitäten führen zur Ausbildung einer *lag*-Phase im Umsatz-Zeit-plot, die Umsetzung GDP-Man \rightarrow GKDM wird in Abhängigkeit der Enzymaktivität verzögert oder beschleunigt.

Es konnte ein einfaches, formalkinetisches Modell zur Beschreibung der GMD-Reaktion aufgestellt werden, welches die beobachteten Sättigungskinetiken sowie die Enzymaktivierung durch die Cofaktoren berücksichtigt. Das Modell ist in der Lage, die Ausbildung einer *lag*-Phase sowie die unterschiedlichen Aktivierungen vorherzusagen.

Durch Optimierung der Parameter $A_{max,NADP}$ und/oder $k_{des,NADPH}$ (Desaktivierungskonstante NADPH-Oxidation) bzw. $k_{des,GKDM}$ (Desaktivierungskonstante GKDM-Zerfall) mittels *simplex* oder *least square fit* und Fixierung der übrigen kinetischen Parameter können die berechneten Reaktionsverläufe mit einer Korrelation $>99\%$ an die experimentellen Daten angepasst werden.

GDP- β -L-Fucose-Synthetase (GFS)-Reaktion Die Umsetzung GKDM \rightarrow GDP-Fuc verläuft in zwei Schritten: 3,5-Epimerisierung und 4-Reduktion. Nur die Reduktion benötigt einen Nicotinamid-Cofaktor (NADPH oder NADH).

Die Aktivierungsenergie (E_A) der Reaktion konnte zu $66,8 \pm 2,3$ kJ/mol bestimmt werden. Die GFS zeigt bei pH-Werten zwischen 7 und 9 die höchsten Aktivitäten. Wie die GMD besitzt auch die GFS-Enzympräparation eine schwache NADPH-oxidierende Nebenaktivität.

Das Substrat der GFS, die GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose (GKDM), konnte durch Erarbeitung eines einfachen Protokolls mit den Schritten Synthese/Ultrafiltration und Lyophilisation bereitgestellt werden. GKDM, welches in wässriger Lösung sowohl in der Keto-Form als auch als Ketohydrat vorliegt, wird durch Glycerin effektiv stabilisiert.

Die Umsetzung von GKDM zu GDP-Fuc kann makrokinetisch und für beide Cofaktoren durch eine Doppelsubstratkinetik mit kompetitiver Produktinhibierung beschrieben werden. Die Korrelation der Daten lag für beide Cofaktoren über 99%. Mit NADPH wird ein höherer v_{max} -Wert erreicht als mit NADH, jedoch sind die Produktinhibierungen bei Verwendung des nicht-phosphorylierten Cofaktors schwächer ausgeprägt.

Das kinetische Modell sowie die ermittelten Parameter konnten durch den Vergleich experimentell durchgeführter Satzreaktorversuche mit den simulierten Reaktionsverläufen erfolg-

reich verifiziert werden.

Die GFS-Reaktion kann im *batch*-Verfahren mit enzymgekoppelter, integrierter Cofaktoregenerierung durchgeführt werden. Daraus resultieren höhere Reaktionsgeschwindigkeiten verglichen mit der Umsetzung ohne Regenerierung (Simulation).

6 Syntheseverfahren zur Gewinnung von GDP-Fuc

Im Anschluß an die kinetischen Untersuchungen werden in diesem Kapitel nun Konzepte zur Durchführung effektiver Synthesen von GDP-Fuc vorgestellt. Die wichtigsten Konsequenzen für die Synthese ergeben sich aus den Charakteristiken von GMD und GFS, jedoch soll zunächst auf die Enzym-, Substrat- und Produktstabilitäten eingegangen werden. Das Kapitel schliesst mit Ergebnissen zur Produktisolierung.

6.1 Stabilitätsmessungen

Stabilitätsmessungen für die beiden Enzyme GMD und GFS sind bisher nicht publiziert. Die Untersuchung ihrer Stabilitäten unter verschiedenen Bedingungen ist daher notwendig.

Bereits in Kapitel 5.3.1 wurde auf die Instabilität von GKDM hingewiesen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Bedingungen gesucht, die den Zerfall dieses Nucleotidzuckers verlangsamen können.

6.1.1 Enzymstabilitäten

GDP- α -D-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD)

Die maximale Aktivität der GMD liegt bei pH 7-8 (Kapitel 5.2.1.1 auf Seite 62). Bei diesen pH-Werten zeigt das Enzym auch die höchsten Stabilitäten im Syntheseprozess, d.h. bei Temperaturen zwischen 20 und 30°C. Als besonders günstig erwies sich die Verwendung von MOPS-Puffer mit einem pH-Wert von 7. Der Zusatz von 1 mM Dithiothreitol (DTT) zeigte grundsätzlich einen stabilisierenden Effekt. Rinderserumalbumin (BSA) führte zu keiner signifikanten Verbesserung der Enzymstabilität unter den Messbedingungen.¹ Abbildung 6.1 auf der nächsten Seite zeigt einige Messergebnisse. Die Enzymaktivitäten sind zur besseren Vergleichbarkeit auf relative Werte normiert. Für die Berechnung der Desaktivierungskonstanten wurde ein Zerfall erster Ordnung nach Gleichung (6.1) postuliert:

$$A = A_0 \cdot e^{-k_{\text{des}} t} \quad (6.1)$$

mit:

A	[U/mL]	Enzymaktivität
A_0	[U/mL]	Anfangs-Enzymaktivität
k_{des}	[h ⁻¹]	Desaktivierungskonstante
t	[h]	Zeit in Stunden

¹1 mg/mL BSA wurde jedoch bei Verwendung von Membranen zur Enzymrückhaltung standardmäßig eingesetzt. BSA verringert die Adsorption des Enzyms auf der Membranoberfläche.

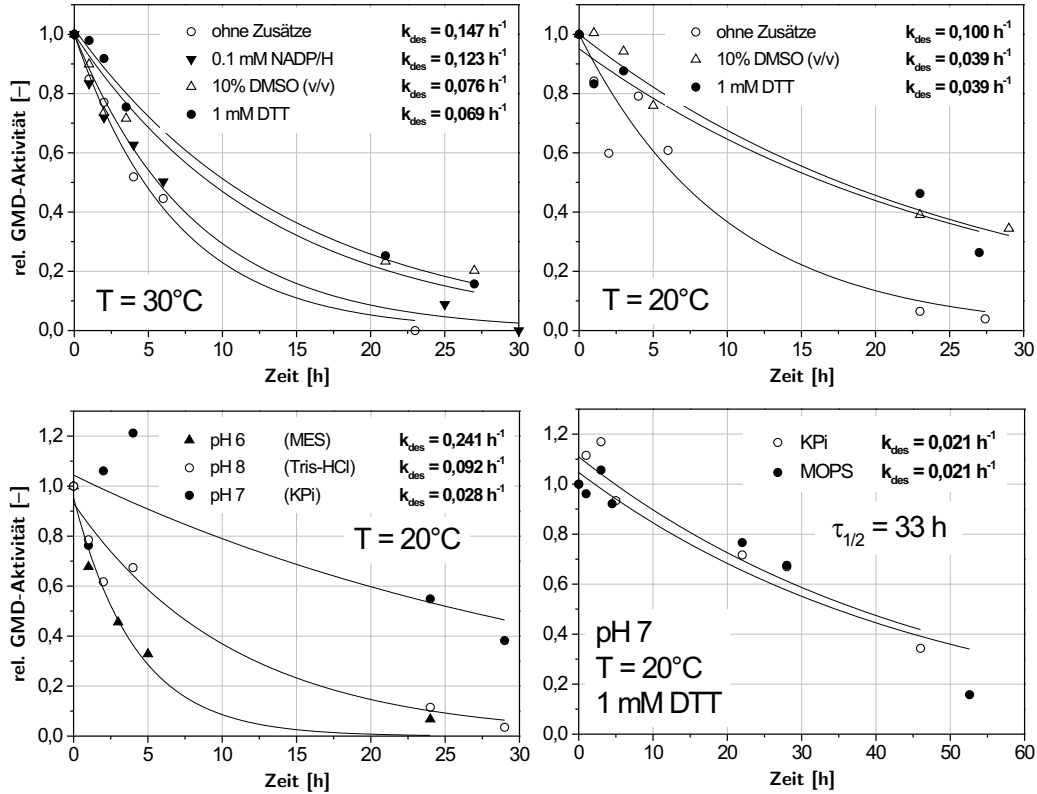


Abbildung 6.1: GMD-Stabilitäten in Abhängigkeit von Temperatur und Zusätzen (oben) bzw. von Puffer und pH-Wert (unten links). Optimierte Bedingungen unten rechts. *Bedingungen: alle Puffer 50 mM; Puffer oben: Tris-HCl, pH 8, alle Versuche mit 10 mM MgCl₂, Aktivitätsmessungen entsprechend Standard-Assay (siehe Kapitel 10.)*

Tabelle 6.1 auf der nächsten Seite zeigt einige Werte der Desaktivierung für die GMD sowie die entsprechenden Halbwertszeiten¹.

Die bei diesen Messungen maximal erreichbare Halbwertszeit von etwa 1,5 Tagen (33 h) zeigt, dass die GMD unter Prozess-Bedingungen nicht besonders stabil ist, jedoch für Synthesen im semi-präparativen Maßstab eingesetzt werden kann.

In Kapitel 5.2.1.1 auf Seite 62 wurde gezeigt, dass die GMD-Reaktion eine hohe Aktivierungsenergie aufweist. Damit verbunden ist eine große Differenz der Enzymaktivitäten bei unterschiedlichen Temperaturen (vgl. Abbildung 5.5). Die geringere Aktivität der GMD bei 20°C im Vergleich zu 30°C kann aufgrund der höheren Stabilität des Enzyms bei der niedrigeren Temperatur jedoch kompensiert werden.

¹berechnet nach $\tau_{1/2} = \ln 2 / k$

Bedingungen	Desaktivierungs-	Halbwertszeit $\tau_{1/2}$
	konstante k_{des}	
	$[\text{h}^{-1}]$	$[\text{h}]$
50 mM Tris-HCl, pH 8, 30°C	0,147	4,7
50 mM Tris-HCl, pH 8, 30°C, 1 mM DTT	0,069	10,0
50 mM Tris-HCl, pH 8, 20°C, 1 mM DTT	0,039	17,7
50 mM MES, pH 6, 20°C	0,241	2,9
50 mM MOPS (KPi), pH 7, 20°C, 1 mM DTT	0,021	33,0

Tabelle 6.1: Desaktivierung der GMD bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen.

GDP- β -L-Fucose-Synthetase (GFS)

Auch für die GFS wurden die Stabilitäten zunächst in Tris-HCl-Puffer unter Zugabe verschiedener Additive (DTT, BSA und PEG) untersucht. Wie im Falle der GMD konnte lediglich für DTT ein stabilisierender Effekt beobachtet werden. Die Messungen zeigten zudem, dass die Zugabe von 1 mM DTT sowie 1 mg/mL BSA die Enzymaktivität deutlich steigert (Abbildung 6.2, linker Graph).

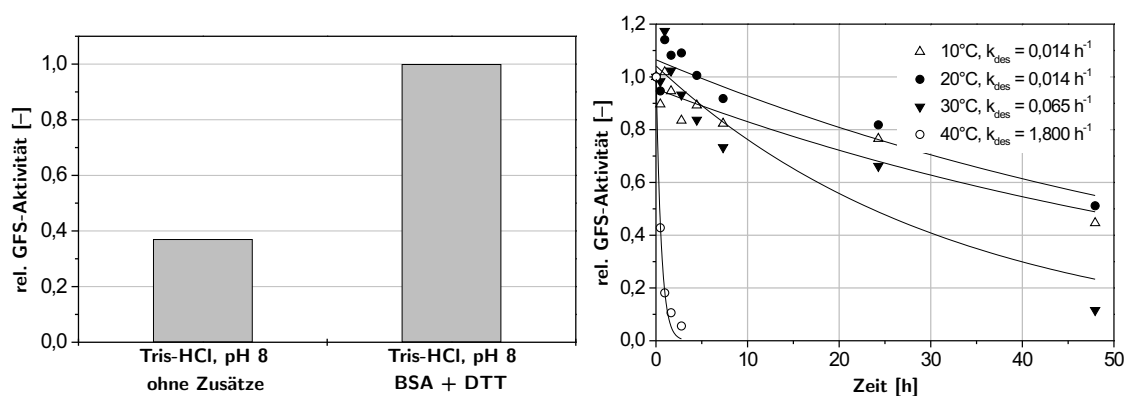


Abbildung 6.2: Steigerung der GFS-Aktivität durch BSA und DTT (links) und Enzymstabilität als Funktion der Temperatur in MOPS-Puffer (rechts).

Bedingungen: alle Puffer 50 mM; links: Tris-HCl, pH 8; rechts: MOPS, pH 7, alle Versuche mit 10 mM MgCl_2 . Aktivitätsmessungen entsprechend Standard-Assay (siehe Kapitel 10).

Weitere Messungen zeigten, dass auch für die GFS der Einsatz von MOPS-Puffer bei einem pH-Wert von 7 günstig für die Enzymstabilität ist. In diesem Puffer sind die Desaktivierungskonstanten bei sonst gleichen Bedingungen stets kleiner als für den Tris-HCl-Puffer. Da die GFS bei pH 7 auch hohe Aktivitäten zeigt (vgl. Abbildung 5.39), sind die Bedingungen der Abbildung 6.2 (rechter Graph) für synthetische Zwecke gut geeignet. Die Desaktivierungskonstante k_{des} bei 20°C liegt mit $0,014 \text{ h}^{-1}$ noch etwas niedriger als für die GMD unter gleichen Bedingungen. Wird für die Enzymdesaktivierung eine Kinetik 1. Ordnung vorausgesetzt, so ergibt sich für die GFS eine Halbwertszeit von $\tau_{1/2} = 48 \text{ h}$ (2 Tage).

6.1.2 Substrat- und Produktstabilitäten

In der Literatur finden sich einige Untersuchungen, die sich mit der Stabilität von GDP-Man, GKDM und GDP-Fuc unter verschiedenen Bedingungen befassen. Der größte Teil dieser Publikationen beschäftigt sich jedoch mit Zerfallseigenschaften dieser Verbindungen im Aufarbeitungsprozess [143, 152, 180, 295]. Ziel ist dort die Isolierung der Nucleotidzucker nach der Synthese. Die publizierten Ergebnisse machen bereits deutlich, dass GDP-Man und GDP-Fuc stabiler sind als das Zwischenprodukt GKDM [137, 166, 245] (vgl. auch Kapitel 5.3.1).

Daten zur Stabilität *unter Reaktionsbedingungen* finden sich vereinzelt, jedoch nur für GDP-Man und GDP-Fuc [151, 295, 300]. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass diese beiden Substanzen für Reaktionen im physiologischen pH-Bereich und in einem Temperaturbereich bis 35°C hinreichend stabil sind. Selbst bei sauren oder basischen pH-Werten ist der Zerfall der beiden Nucleotidzucker langsam. So besitzt beispielsweise GDP-Man bei pH 2¹ und 25°C eine Halbwertszeit von über 120 Stunden [295], bei einem pH-Wert von 8 (HEPES Puffer) und 37°C wird in Gegenwart von 20 mM Mn²⁺ keinerlei Zerfall nach 9 Stunden gemessen [300]. GDP-Fuc ist bei pH-Werten zwischen 5 und 8 (PIPES Puffer) und bei 37°C über eine Woche stabil [151].

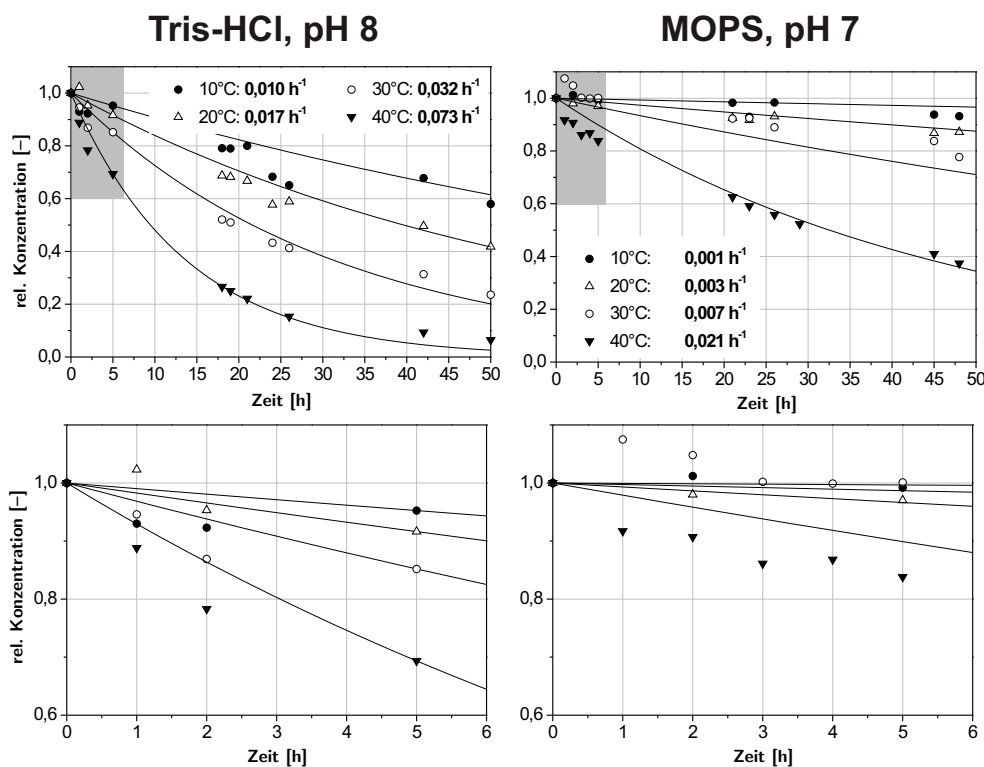


Abbildung 6.3: Zerfall von GKDM unter Reaktionsbedingungen. Einfluss der Temperatur in Tris-HCl-Puffer, pH 8 (links) bzw. in MOPS-Puffer, pH 7 (rechts). alle Puffer 50 mM; der untere Graph zeigt jeweils den grau unterlegten Ausschnitt in Vergrößerung.

¹wässrige Ameisensäure

Für das Zwischenprodukt GKDM sind solche Daten bisher nicht publiziert worden. Da sich dieser Nucleotidzucker bereits während der Aufarbeitung als instabil erwies (vgl. Kapitel 5.3.1), waren Stabilitätsmessungen dieser Verbindung unter verschiedenen Prozessbedingungen notwendig. Abbildung 6.3 auf der vorherigen Seite zeigt die Desaktivierungen von GKDM in Abhängigkeit der Temperatur sowie des ausgewählten Puffers.

Die Messergebnisse zeigen die erwartete Abhängigkeit der Stabilitäten von der Temperatur. In MOPS-Puffer bei einem pH-Wert von 7 ist die Substanz stabiler als in Tris-HCl-Puffer bei pH 8. In MOPS ist die Substanz bei 20°C auch nach einem Tag um weniger als 10% zerfallen (Halbwertszeit¹ $\tau_{1/2} = 231$ h), in Tris-Puffer verliert man unter sonst gleichen Bedingungen über 20% des Nucleotidzuckers.

Fazit der Stabilitätsuntersuchungen Die optimalen Prozess-Bedingungen für die Enzyme GMD und GFS sind mit jenen der Nucleotidzucker und speziell von GKDM kompatibel: alle GDP-Fuc-Synthesen wurden in MOPS Puffer bei einem pH-Wert von 7 durchgeführt. Die Temperatur variierte zwischen 20 und 30°C. Standardmäßig wurden zudem 10 mM Mg^{2+} und 1 mM DTT für die Umsetzungen eingesetzt. Membranen zur Enzymrückhaltung wurden darüberhinaus mit einer 1 mg/mL BSA Pufferlösung konditioniert.

6.2 Konsequenzen aus der Enzymkinetik

Die kinetischen Eigenschaften des Reaktionssystems, die in Kapitel 5 ausführlich dargestellt wurden, sind in Abbildung 6.4 noch einmal zusammengefasst.

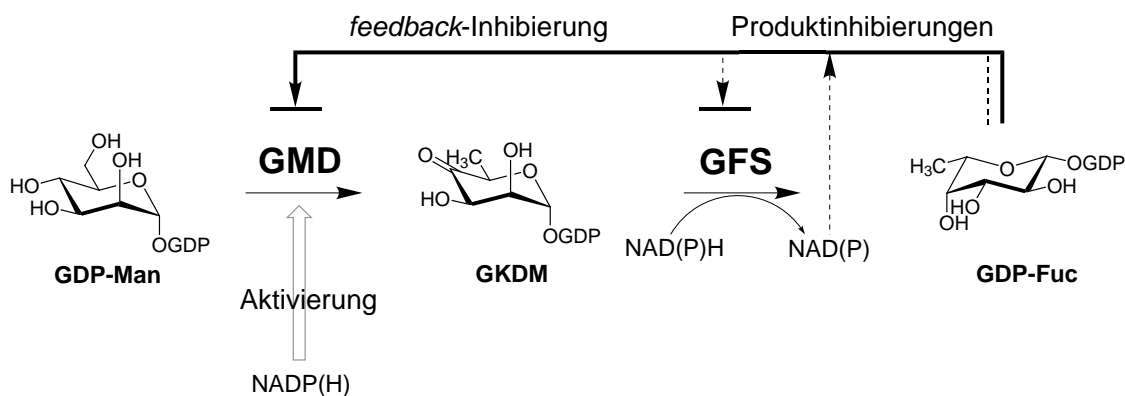


Abbildung 6.4: Zusammenfassende Darstellung der kinetischen Zusammenhänge innerhalb des Reaktionssystems.

GDP-Fuc hemmt mit einem *feedback*-Mechanismus die GMD. GDP-Fuc-Konzentrationen im μ molaren Bereich sind ausreichend, um die GMD-Reaktion drastisch zu verlangsamen. Zusätzlich zu dieser *feedback*-Inhibierung wird die GFS durch GDP-Fuc und den jeweiligen oxidierten Cofaktor (NADP bzw. NAD) gehemmt. Aufgrund dieser auftretenden Inhibitionen kann eine "Eintopf-Synthese" von GDP-Fuc ausgehend von GDP-Man nicht gelingen.

¹einen Zerfall erster Ordnung vorausgesetzt

Abbildung 6.5 belegt dies: dargestellt ist der Versuch einer "Eintopf-Synthese" unter Bedingungen, die für die voneinander getrennt durchgeführten Reaktionen günstig sind und eine nahezu quantitative Umsetzung der GDP-Man zu GDP-Fuc innerhalb kurzer Zeit erlauben. Werden jedoch beide Enzyme gemeinsam im *batch*-Verfahren eingesetzt, so ist der Fortgang der Reaktion deutlich gehemmt. Selbst nach einer Reaktionszeit von über 15 Stunden sind nur etwa 20% der GDP-Man umgesetzt.

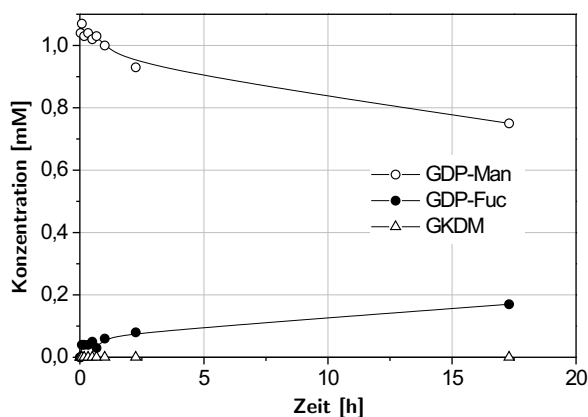


Abbildung 6.5: Versuch der "Eintopf-Synthese" von GDP-Fuc ausgehend von GDP-Man. Die Linien dienen lediglich als visuelle Hilfe.

Bedingungen: 1 mM GDP-Man, 2 mM NADPH, 10 mM MgSO₄, 1 mM DTT, 50 mM MOPS, pH 7, T = 30°C, 0,1 U/mL GMD, 0,07 U/mL GFS, (Aktivitäten nach Standardassay entsprechend Kapitel 10), V = 1 mL.

Der Reaktionsverlauf zeigt, dass die stationäre Konzentration von GKDM unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Zwar wird das gebildete Zwischenprodukt offensichtlich sehr schnell zu GDP-Fuc umgesetzt, jedoch hemmt das Endprodukt die GMD-Reaktion bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen. Eine weitere Umsetzung der GDP-Man wird somit verhindert. In diesem Versuch wurde NADPH im Überschuß eingesetzt; der Cofaktor sollte die notwendigen Äquivalente für die Reduktion von GKDM durch die GFS liefern. Da die Reaktionskaskade aufgrund der vielfachen Inhibierungen jedoch stark verzögert ist, werden diese Reduktionsäquivalente ebenfalls nicht umgesetzt. Eine Aktivierung der GMD durch NADPH ist nicht ausreichend, um die *feedback*-Inhibierung durch GDP-Fuc zu verhindern.

6.3 Anforderungen an Synthese- und Reaktorkonzepte

An dieser Stelle wird deutlich, dass Synthese- und Verfahrenskonzepte zur enzymatischen Darstellung von GDP-Fuc mehreren Anforderungen gerecht werden müssen. Im wesentlichen lassen sich diese Anforderungen zu drei Punkten zusammenfassen:

- **Trennung der Reaktionen** voneinander zur Vermeidung der *feedback*-Inhibierung der GMD durch GDP-Fuc.

- Vermeidung hoher Substrat- bzw. Produktkonzentrationen für die GFS-Reaktion zur **Verringerung der Produktinhibierungen**.
- Berücksichtigung der **NADP(H)-Spezifität der GMD**. Der Cofaktor der GMD-Reaktion soll auch für die GFS-Reaktion genutzt werden können, bevorzugt soll er dabei regeneriert werden.

Die *feedback*-Inhibierung der GMD durch GDP-Fuc kann hinsichtlich der sich ergebenden Konsequenz für die Synthese - Trennung von GMD- und GFS-Reaktion - als bedeutendste Eigenschaft des Reaktionssystems bezeichnet werden. Zur Verdeutlichung zeigt Abbildung 6.6 die experimentellen Umsatz-Zeit-Verläufe von Satzreaktorversuchen mit steigender Konzentration an GDP-Fuc, sowie die entsprechenden berechneten Reaktionsverläufe nach Parameteranpassung (Optimierung von V_1) auf der Basis des kinetischen Modells der GMD.¹ Es wird deutlich, dass bereits Konzentrationen im μ molearen Bereich die GMD-Aktivität stark herabsetzen. Bei 0,06 mM GDP-Fuc wird erst nach 90 min. ein Umsatz von 50% erzielt; in Abwesenheit von GDP-Fuc wird bereits nach 10 min. ein quantitativer Umsatz erreicht. Synthese-Konzepte zur Darstellung von GDP-Fuc müssen die *feedback*-Inhibierung der GMD verhindern.

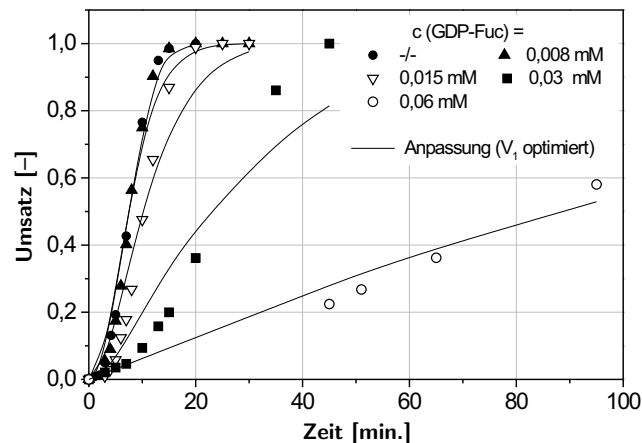


Abbildung 6.6: Experimentelle und berechnete GMD-Reaktionsverläufe nach Parameteranpassung bei zunehmender *feedback*-Inhibierung durch GDP-Fuc.

Bedingungen entsprechend Abbildung 5.22 auf Seite 81. Parameteranpassung (V_1) mittels simplex-Optimierung.

Die Anforderungen an die Auslegung einer enzymatischen Synthese von GDP-Fuc konnten in zwei unterschiedlichen Reaktorkonzepten realisiert werden. Bei dem **diskontinuierlichen Verfahren** werden die beiden Reaktionen nacheinander im *batch*- (GMD) bzw. *repetitive batch*-Verfahren (GFS) durchgeführt (Kapitel 6.4).

¹Zur Berücksichtigung der *feedback*-Inhibierung wurde für die Produktionsreaktion der Term einer kompetitiven Produktinhibierung ($v = v_{max} \cdot \frac{[GDP-Man]}{K_{M,GDP-Man} \cdot (1 + [GDP-Fuc]/K_{I,GDP-Fuc}) + [GDP-Man]}$) in die Geschwindigkeitsgleichung integriert.

Die **kontinuierliche Synthese von GDP-Fuc** gelingt in einer 2-stufigen EMR-Kaskade (Kapitel 6.5). Dieses Verfahren ermöglicht die direkte Synthese von GDP-Fuc ausgehend von der GDP-Man. GKDM wird lediglich als Intermediär während des Verfahrens gebildet. Ziel des Verfahrens ist vor allem die effektive Ausnutzung der Enzymaktivitäten.

6.4 Diskontinuierliche Synthese von GDP-Fuc

Abbildung 6.7 zeigt schematisch die beiden Teilschritte des Verfahrens sowie die jeweiligen Reaktionsverläufe.

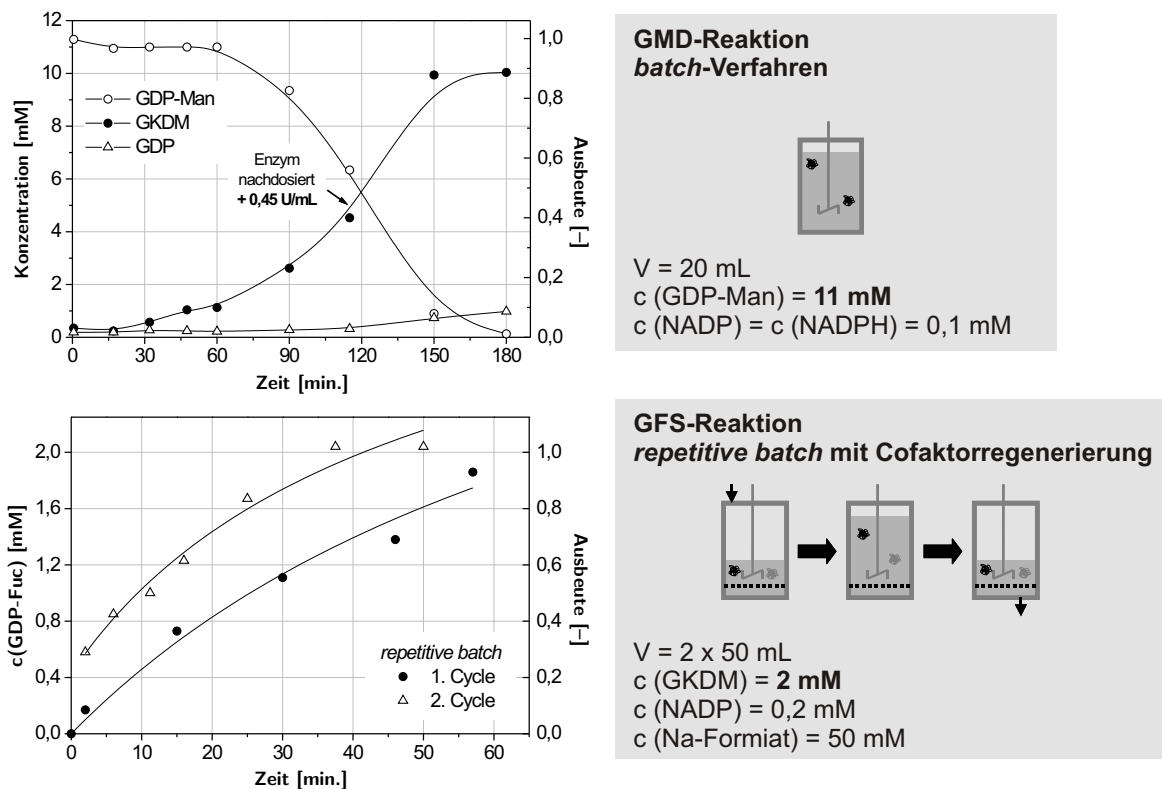


Abbildung 6.7: Synthese von GDP-Fuc im diskontinuierlichen Verfahren. GMD-Reaktion: *batch* (oben), GFS-Reaktion: *repetitive batch* (unten). Die Linien dienen lediglich als visuelle Hilfe.

Bedingungen: 50 mM MOPS, pH 7, 10 mM MgSO₄, 1 mM DTT; GMD-Reaktion: T = 30°C, 0,11 U/mL GMD (0,45 U/mL ab 120 min), GFS-Reaktion: T = 20°C, 0,1 U/mL GFS, 0,1 U/mL FDH (alle Aktivitäten nach Standardassay entsprechend Kapitel 10).

Die GMD-Reaktion wird im *batch*-Verfahren durchgeführt. Da die Produktinhibierung der GMD durch GKDM schwach ist, kann mit hohen Substratkonzentrationen (11 mM) gearbeitet werden. Um eine hohe Enzymaktivität der GMD zu erzielen, werden die beiden Cofaktoren NADP und NADPH zu je 0,1 mM eingesetzt. Nach 120 min. musste Enzym nachdosiert

werden, so dass nach 3 Stunden die Reaktion mit einer Ausbeute von über 90% beendet werden konnte. Nach Abtrennen des Enzyms durch Ultrafiltration kann die Produktlösung, je nach Zeitpunkt der weiteren Umsetzung durch die GFS, bei 4°C aufbewahrt werden oder, nach Zusatz von Glycerin, lyophilisiert und eingelagert werden.

Die Umsetzung des gewonnenen Zwischenproduktes GKDM zu GDP-Fuc wurde anschließend in einem *repetitive batch*-Verfahren durchgeführt. Aufgrund der starken Produktinhibierung der GFS durch GDP-Fuc wurde die Substratkonzentration auf 2 mM erniedrigt. Zur Verringerung der Inhibierung durch den oxidierten Cofaktor NADP wurde mit einer integrierten Cofaktorregenerierung gearbeitet. Die Formiatdehydrogenase-Aktivität (FDH) wurde hoch gewählt (0,1 U/mL, 5 U Gesamtaktivität), um eine schnelle Regenerierung des NADPH zu erreichen und die Inhibierung gering zu halten. Der Hydriddonor Formiat wurde in einer Konzentration von 50 mM eingesetzt.

In zwei aufeinander folgenden *repetitive batch*-Versuchen (*cycles*) wurde das Produkt der GMD-Reaktion (GKDM) mit je 95% Ausbeute zu GDP-Fuc umgesetzt. Die beiden Reaktionsverläufe sowie die Bedingungen der Reaktionen sind im unteren Teil der Abbildung 6.7 auf der vorherigen Seite dargestellt.

Die wichtigsten Ergebnisse der beiden Umsetzungen sind in Tabelle 6.2 zusammengefasst. Die Ausbeuten für die Reaktionen sind mit 90 bis 95% sehr zufriedenstellend. Die Raum-Zeit-Ausbeuten (RZA) von 48 g/(L·d) für die GMD-Reaktion bzw. 29 g/(L·d) für die GFS-Reaktion sind hoch. Damit verbunden ist jedoch ein hoher produktmengenspezifischer Enzymverbrauch für beide Enzyme. Die niedrige maximale Zykluszahl (*ttn*)¹ von 10 für den Cofaktor NADP ist sicherlich steigerungsfähig, jedoch konnte das Konzept der integrierten Cofaktorregenerierung bei der GFS-Reaktion durch die FDH erfolgreich umgesetzt werden. In weiteren Versuchen konnte der Wert für die *ttn* auf immerhin 50 gesteigert werden (nicht dargestellt).

		GMD-Reaktion	GFS-Reaktion
Ausbeute	[%]	> 90	je 95
RZA	[g/(L·d)]	48,0	28,8
Enzymverbrauch	[U/gGDP-Fuc]	75^a	41
<i>ttn</i> (NADP) ^b	[-]	–	10

^a Enzym musste nach 120 min. nachdosiert werden.

^b keine Angabe für die GMD-Reaktion (siehe Reaktionsmechanismus auf Seite 60).

Tabelle 6.2: Ergebnisse der diskontinuierlichen Synthese von GDP-Fuc.

Vorteile des Verfahrens Die Einfachheit der Durchführung beider Reaktionen ist ein großer Vorteil dieser diskontinuierlichen Synthesemethode. Zwischen den beiden Schritten kann zudem eine beliebig große Zeitspanne liegen, da das Produkt der GMD-Reaktion bis zur weiteren Umsetzung durch die GFS stabil gelagert werden kann (vgl. Kapitel 5.3.1 auf Seite 97). Die hohe Selektivität und damit die hohen Ausbeuten für beide Reaktionen eröffnen einen sicheren Zugang zur GDP-Fuc ausgehend von der GDP-Man.

¹engl.: *total turnover number*

Nachteil des Verfahrens Der hohe Enzymverbrauch für beide Reaktionen ist der wesentliche Nachteil dieses Verfahrens. Zwar können auf diese Weise hohe Raum-Zeit-Ausbeuten erzielt werden, jedoch zwingt die eingeschränkte Verfügbarkeit der GDP-Fuc-Enzyme zur Steigerung ihrer Ausnutzung.

6.5 Kontinuierliche Synthese von GDP-Fuc

Das diskontinuierliche Verfahren ermöglicht es bereits, GDP-Fuc in sehr guten Ausbeuten ausgehend von GDP-Man herzustellen, jedoch erlaubt dieses Verfahren nicht die maximale Ausnutzung der Enzyme. Im *batch*-Verfahren zur Gewinnung von GKDM wird das eingesetzte Enzym nur einmalig verwendet¹, bei der GFS-Reaktion kann es entsprechend der Anzahl an Zyklen im *repetitive batch*-Verfahren zwar mehrfach genutzt werden, dennoch ist der Enzymverbrauch hoch.

Eine kontinuierliche Betriebsweise der GDP-Fuc -Synthese soll in der Lage sein, den Enzymverbrauch weiter zu senken. Für enzymkatalysierte Reaktionen hat sich in der Vergangenheit der Enzym-Membran-Reaktor (EMR) etabliert. Durch Anwendung dieses Reaktorkonzeptes wird eine Entkopplung der Verweilzeiten von Enzym und Substraten (Produkten) erreicht. Zentrales Element des EMRs ist eine Ultrafiltrationsmembran, die den Biokatalysator im Reaktor zurückhält, während Substrat- und Produktmoleküle das kontinuierlich durchflossene System ungehindert passieren können. Zur Substratförderung wird lediglich eine Pumpe benötigt. Ein wichtiger Vorteil des EMRs ist, dass die Reaktionen in homogener, flüssiger Phase durchgeführt werden können. Stofftransport-Limitierungen wie sie etwa bei Reaktoren mit trägerfixierten Enzymen auftauchen, sind damit ausgeschlossen. Weiterhin ist es möglich, lösliches Enzym in den Reaktor nachzudosieren. Auf diese Weise kann auch bei begrenzter Enzymstabilität eine konstante Enzymaktivität aufrecht erhalten werden.

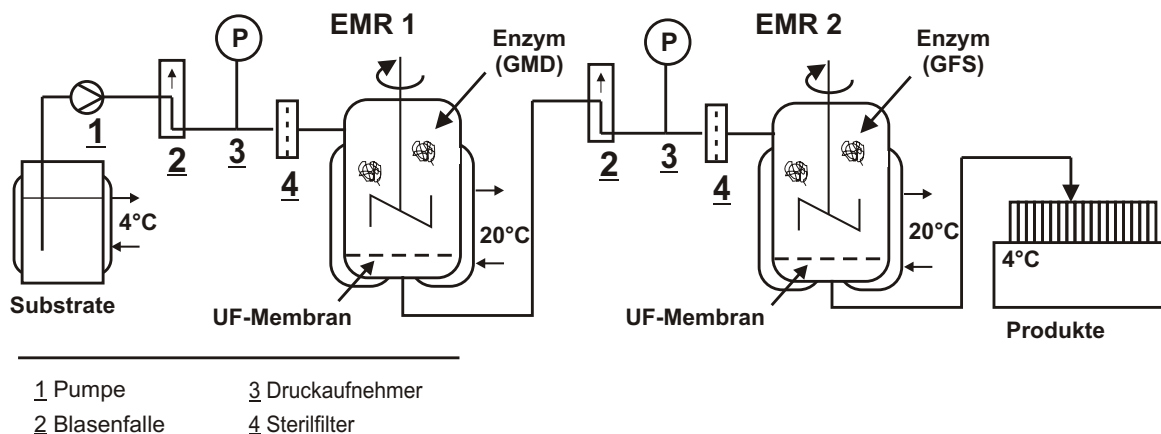


Abbildung 6.8: Schematischer Aufbau der 2-stufigen Rührkessel (EMR)-Kaskade. Über die Blasenfallen kann Enzym nachdosiert werden. Die Blasenfalle hinter dem ersten EMR ermöglicht zudem die Probenahme und Reaktionskontrolle der GMD-Reaktion.

Das Reaktorkonzept der kontinuierlichen, enzymatischen GDP-Fuc-Synthese ist schematisch in Abbildung 6.8 dargestellt. Die Trennung der beiden Reaktionen voneinander wird

¹auch hier ist natürlich ein *repetitive batch*-Verfahren möglich.

durch eine 2-stufige Rührkesselkaskade erreicht. Abbildung 6.9 zeigt ein Foto des Reaktors und die entsprechenden Peripheriegeräte.

Die GMD-Reaktion wird im ersten EMR durchgeführt, der Auslauf des ersten EMRs ist gleichzeitig die Substratlösung für den zweiten Reaktor; hier findet die GFS-Reaktion statt. Neben der Trennung der Reaktionen erfüllt dieses Reaktorkonzept damit eine weitere Anforderung an eine effiziente Synthese: der Cofaktor der GMD-Reaktion kann auch für die GFS-Reaktion genutzt werden. Dies kann zum einen durch kontinuierliches Zuführen von NADPH erreicht werden; wird aber der oxidierte Cofaktor NADP zugeführt, so muss er für die GFS-Reaktion, d.h. nach der GMD-Reaktion, zunächst reduziert werden (s. unten). Das Reaktorkonzept erlaubt zudem die schnelle Umsetzung des Zwischenproduktes GKDM zu GDP-Fuc, die relativ geringe Stabilität von GKDM stellt damit keine Limitierung mehr dar.

Die beiden Reaktoren gleichen Volumens (3 mL) bestehen aus Plexiglas. Dadurch sollte einer möglichen Desaktivierung der Biokatalysatoren durch Schwermetall-Verunreinigungen in Edelstahl-Reaktoren vorgebeugt werden. Wie schon im *repetitive batch*-Verfahren (s. oben) wurde eine Ultrafiltrationsmembran¹ mit einem *cut off* von 10 kD eingesetzt.

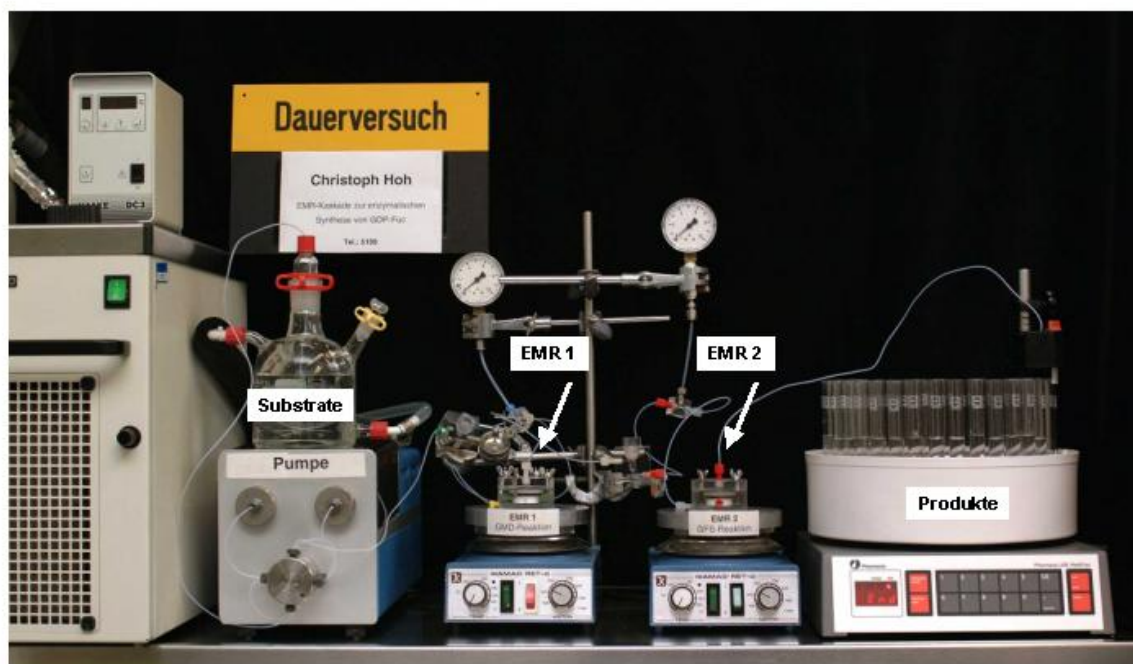


Abbildung 6.9: Foto der 2-stufigen Rührkessel (EMR)-Kaskade. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Gefäße zur Temperierung der Reaktoren nicht dargestellt.

Die Reaktorwahl stellt einen Kompromiß aus den kinetischen Daten der beiden Reaktionen (GMD und GFS) dar. Aufgrund der Produktinhibierung der GFS durch GDP-Fuc und NADP ist der Enzym-Membran-Reaktor, der im Prinzip das reaktionstechnische Verhalten eines kontinuierlich betriebenen Rührkessels aufweist, keine optimale Lösung, da die Reaktionsgeschwindigkeit im Arbeitspunkt – d.h. unter Auslaufbedingungen des Reaktors – schon

¹Diaflo YM 10 der Firma Millipore (Amicon).

verringert ist. Die nur schwache Produktinhibierung der GMD, ebenso wie die Notwendigkeit, den Cofaktor für diese Reaktion permanent zuzuliefern zu müssen, rechtfertigt den Einsatz des EMR für diese Reaktion.

In einem ersten Experiment zur kontinuierlichen Synthese sollte untersucht werden, ob für eine Kaskade aus zwei Enzym-Membran-Reaktoren entsprechend Abbildung 6.8 ein stabiler Betriebspunkt gefunden werden kann. Der Reaktion wurden kontinuierlich GDP-Man und NADPH zugeführt. GDP-Man wurde in einer Konzentration von 1 mM, NADPH wurde mit 1,5 mM im Überschuss eingesetzt. Auf diese Weise sollte sichergestellt werden, dass der reduzierte Cofaktor für die GFS-Reaktion, trotz unerwünschter NADPH-Oxidation, mindestens in stöchiometrischer Menge zur Verfügung stand. Abbildung 6.10 zeigt, dass für diese Kaskade ein stabiler Betriebspunkt erreicht werden konnte. Über einen Zeitraum von 20 h betrug der Umsatz für beide Reaktoren über 90%, jedoch ist ein schwacher Umsatzrückgang aufgrund der Desaktivierung der Enzyme zu erkennen.

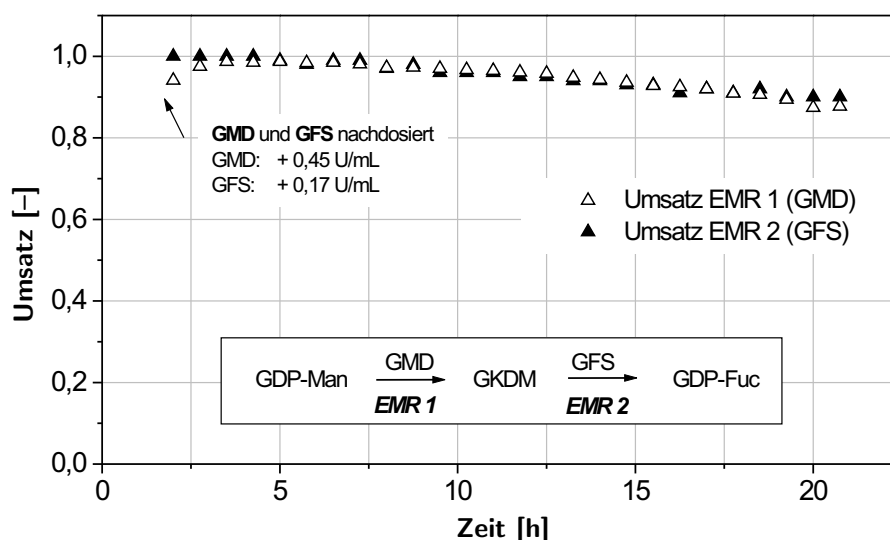


Abbildung 6.10: Umsatz-Zeit-Verlauf der ersten kontinuierlichen Synthese von GDP-Fuc. Bedingungen: 50 mM MOPS, pH 7, 10 mM MgSO₄, 1 mM DTT, T = 20° C, τ = 60 min., V (Reaktor) = je 3 mL. GFS: 0,33 U/mL (Start), einmalig mit 0,17 U/mL nachdosiert; GMD: 0,4 U/mL (Start), einmalig mit 0,45 U/mL nachdosiert. Feed: 1 mM GDP-Man, 1,5 mM NADPH.

Der Umsatz wurde durch Messung der Proben im Auslauf, d.h. nach dem zweiten EMR der Kaskade, bestimmt. Die Versuche wurden bei hohen Enzymkonzentrationen durchgeführt (siehe Legende der Abbildung 6.10). Dementsprechend ist der produktmengenspezifische Enzymverbrauch hoch. Für die GFS-Reaktion beträgt er **9,7 U/g_{GDP-Fuc}**, für die GMD-Reaktion wurde er zu **41,6 U/g_{GDP-Fuc}** bestimmt. Auch die Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) ist mit 11,4 g/(L·d) für die einzelnen Reaktionen noch steigerungsfähig.¹ Für die Gesamtreaktion GDP-Man → GDP-Fuc beträgt die RZA aufgrund der doppelten Verweilzeit 5,7 g/(L·d).

¹Es wurde mit einer Produktkonzentration von 0,75 mM gerechnet.

Abbildung 6.11 zeigt den Verlauf der Konzentrationen der gekoppelten EMR-Läufe. Die gemessenen Konzentrationen im Auslauf der Kaskade, d.h. Probenahme nach EMR 2, sind plausibel.

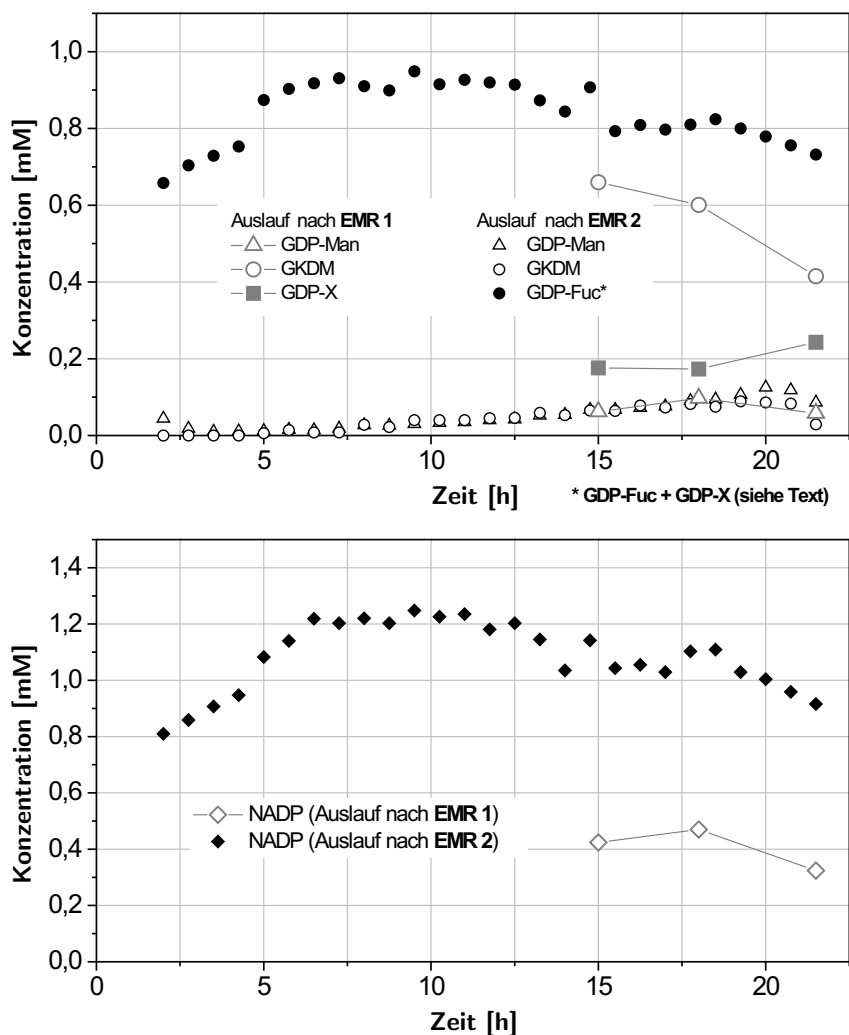


Abbildung 6.11: Verlauf der Konzentrationen der ersten kontinuierlichen Synthese von GDP-Fuc. oben: Nucleotidzucker; unten: NADP. Bedingungen entsprechend Abbildung 6.10.

Im Zeitraum zwischen 15 und 22 h wurden auch drei Proben aus dem Auslauf des **ersten** EMRs der Kaskade (nach der GMD-Reaktion) vermessen (graue, durch Linien verbundene Symbole). Es überraschte, dass neben GDP-Man und GKDM eine weitere Substanz – hier als **GDP-X** bezeichnet – detektiert werden konnte. Das Verhalten dieser bisher unbekannt Komponente auf der HPLC und CE ließ vermuten, dass es sich ebenfalls um einen GDP-

tragenden Nucleotidzucker handelt.¹ GDP-X coeluiert mit GDP-Fuc in der HPLC; in der Abbildung 6.11 sind daher die Konzentrationen von GDP-Fuc und GDP-X zusammengefasst. Das Auftauchen dieser Verbindung wirft vor allem folgende Fragen auf:

- Aus welcher Substanz wird GDP-X gebildet?
- Handelt es sich um eine chemische oder enzymatische Nebenreaktion?

Zur Beantwortung dieser Fragen soll zunächst wieder Abbildung 6.11 herangezogen werden. Offensichtlich wird GDP-X während der GMD-Reaktion gebildet, da die Substanz im Auslauf des ersten EMRs gemessen wird. GDP-X wird im zweiten EMR (GFS-Reaktion) nicht weiter umgesetzt. Die Summe aus GKDM und GDP-X des ersten EMRs ergibt die gemessene Konzentration von GDP-X und GDP-Fuc nach dem zweiten EMR. Es stellt sich nun die Frage, ob GDP-X in einer Folgereaktion aus GKDM gebildet wird oder aber in einer Parallelreaktion direkt aus GDP-Man. Einen Hinweis zur Beantwortung dieser Frage kann der untere Graph der Abbildung 6.11 geben. Dort ist die NADP-Konzentration im Auslauf des zweiten EMRs wiedergegeben (schwarze Rauten) sowie die NADP-Konzentration der drei Proben aus dem ersten EMR (offene Rauten). Im *feed* sind 1,5 mM NADPH enthalten. Im Auslauf der Kaskade werden zwischen 15 und 22 h etwa 1 mM NADP gemessen, im Auslauf des ersten EMRs etwa 0,4 mM NADP. Somit werden im zweiten EMR etwa 0,6 mM NADP gebildet und damit 0,6 mM NADPH verbraucht. Diese NADPH-Menge wird zur Reduktion von 0,6 mM GKDM, die nach dem ersten EMR gemessen werden (s. oberer Graph), benötigt. Damit werden bereits 0,4 mM NADP im ersten EMR gebildet, bzw. 0,4 mM NADPH oxidiert. Die Vermutung liegt daher nahe, dass GDP-X, unter NADPH-Oxidation, aus GKDM in einer Folgereaktion entsteht.

In *batch*-Versuchen konnte diese These gestützt werden: wurde eine 1 mM GKDM-Lösung in Gegenwart von NADPH und GMD inkubiert, so bildete sich, in einer langsamen Reaktion, GDP-X unter gleichzeitiger Bildung von NADP. Diese Reaktion blieb aus, wenn das Enzym vorher deaktiviert wurde. Daraus konnte gefolgert werden, dass:

- GDP-X aus GKDM unter Bildung von NADP entsteht, und
- die Reaktion enzymatisch katalysiert wird.

Abbildung 6.12 auf der nächsten Seite zeigt das aus diesen Überlegungen resultierende Reaktionsschema zur Bildung von GDP-X aus GKDM. Danach kann GKDM sowohl zu GDP-Fuc umgesetzt werden (GFS-Reaktion) als auch, eventuell katalysiert durch die GMD, zu der unbekannteren Verbindung GDP-X. In jedem Fall wird zur Bildung von GDP-X NADPH benötigt.

Mit einem zweiten Lauf der EMR-Kaskade sollte die These der vermuteten Nebenreaktion im ersten EMR überprüft und die Frage beantwortet werden, ob es gelingt, die Bildung von GDP-X durch Wahl des Cofaktors zu unterdrücken. Da GDP-X vermutlich aus GKDM unter NADPH-Oxidation gebildet wird, sollte diese Nebenreaktion ausbleiben, wenn anstelle von NADPH der oxidierte Cofaktor NADP eingesetzt wird. Die Generierung von NADPH, welches für die GFS-Reaktion notwendig ist, erfolgt im zweiten EMR durch die Formiatdehydrogenase-Reaktion (integrierte Cofaktorregenerierung).

¹neben der Retentionszeit weist die Substanz vor allem das charakteristische UV-Spektrum Guanosin-haltiger Verbindungen auf. Quantifizierung basiert auf der HPLC-Kalibrierung mit GDP-Man.

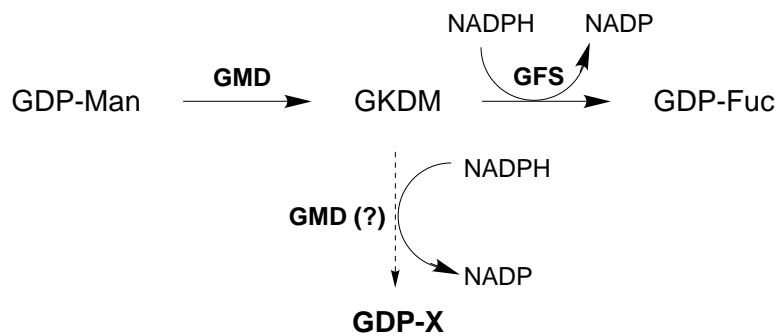


Abbildung 6.12: Reaktionsschema zur Erklärung der Bildung von GDP-X in einer GMD-katalysierten(?) Nebenreaktion.

Der Reaktorlauf wurde mit drei unterschiedlichen Substratlösungen durchgeführt (**feed 1-3**). Der Verlauf des Umsatzes für beide Reaktoren sowie die entsprechenden Konzentrationen von GDP-Man, GKDM und GDP-Fuc sind in Abbildung 6.13 auf der nächsten Seite dargestellt. Die Daten wurden nur aus Proben des Auslaufes am Ende der Kaskade gewonnen.

feed 1 (0 - 28 h):	1 mM GDP-Man	1,5 mM NADPH
feed 2 (28 - 52 h):	1 mM GDP-Man	1,5 mM NADP, 50 mM Formiat
feed 3 (52 - 68 h):	1 mM GDP-Man	0,5 mM NADP, 50 mM Formiat

Im ersten Abschnitt des kontinuierlichen Laufes (**feed 1**) werden für beide EMRs Umsätze über 90% erreicht. Im zweiten Abschnitt (**feed 2**) ist der Umsatz im ersten EMR zunächst noch hoch, jedoch fällt der Umsatz schneller ab. Dies könnte an einer stärkeren Desaktivierung der GMD durch Formiat liegen. Drastisch ist jedoch der Abfall des Umsatzes im zweiten EMR (GFS-Reaktion) nach etwa 35 h. Die GFS setzt GKDM nicht mehr um (unterer Graph). Die Nachdosierung von FDH bei 48 h führt jedoch wieder zu einem sofortigen Anstieg des Umsatzes im zweiten EMR. Offensichtlich steht der GFS nicht genügend NADPH zur Reaktion zur Verfügung, die Cofaktorregenerierung scheint nicht ausreichend schnell zu sein. Auf diesen Punkt wird weiter unten noch genauer eingegangen. Auch im letzten Abschnitt (**feed 3**) können, nach Zugabe von GMD und GFS, zunächst hohe Umsätze erzielt werden, der Umsatz im zweiten EMR fällt aber auch hier stark ab.

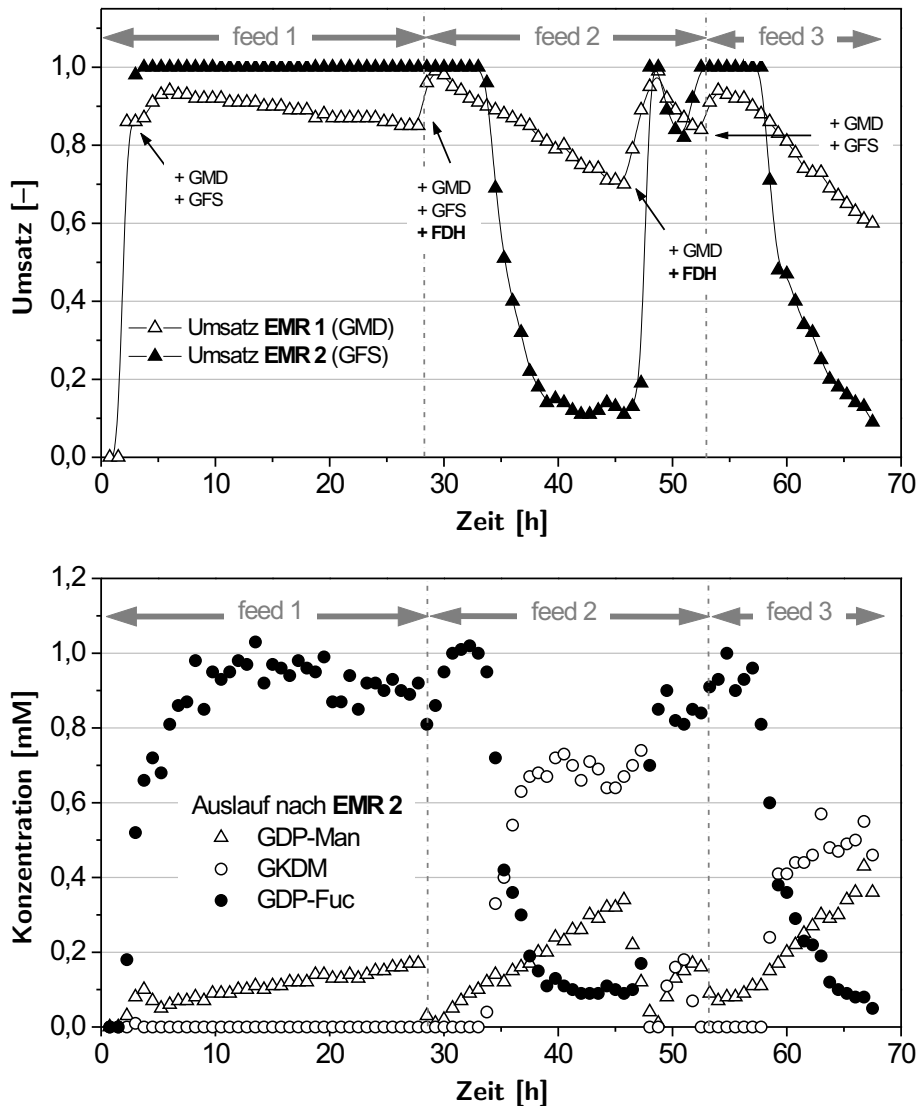


Abbildung 6.13: Verlauf der zweiten kontinuierlichen Synthese von GDP-Fuc in der 2-stufigen EMR-Kaskade.

Bedingungen: 50 mM MOPS, pH 7, 10 mM MgSO₄, 1 mM DTT, T = 20°C, τ = 60 min., V (Reaktor) = je 3 mL. GMD: 75 mU/mL (Start), + 50 mU/mL (nach 28 h, 48 h und 52 h); GFS: 67 mU/mL (Start), + 17 mU/mL (28 h), + 33 mU/mL (52 h), FDH: 833 mU/mL (28 h), + 4,2 U/mL (48 h)
feed 1: 1 mM GDP-Man, 1,5 mM NADPH; **feed 2:** 1 mM GDP-Man, 1,5 mM NADP, 50 mM Na-Formiat; **feed 3:** 1 mM GDP-Man, 0,5 mM NADP, 50 mM Na-Formiat.

Wie bereits erwähnt, sollte mit diesem EMR-Lauf auch untersucht werden, ob die beobachtete Nebenreaktion zur Bildung von GDP-X durch die Wahl des Cofaktors unterdrückt werden kann. Abbildung 6.14 auf der nächsten Seite zeigt, dass GDP-X (schwarze Quadrate)

nur im ersten Abschnitt des kontinuierlichen Versuchs gebildet wird, d.h. nur in Gegenwart von NADPH im ersten EMR (feed 1). Wird dagegen NADP als Cofaktor eingesetzt (feed 2 und feed 3), so wird kein GDP-X gebildet.¹ Dieses Ergebnis belegt, dass GDP-X in einer enzymatischen Reaktion aus GKDM und NADPH entsteht. In Kapitel 8 soll auf die mögliche Identität von GDP-X eingegangen werden.

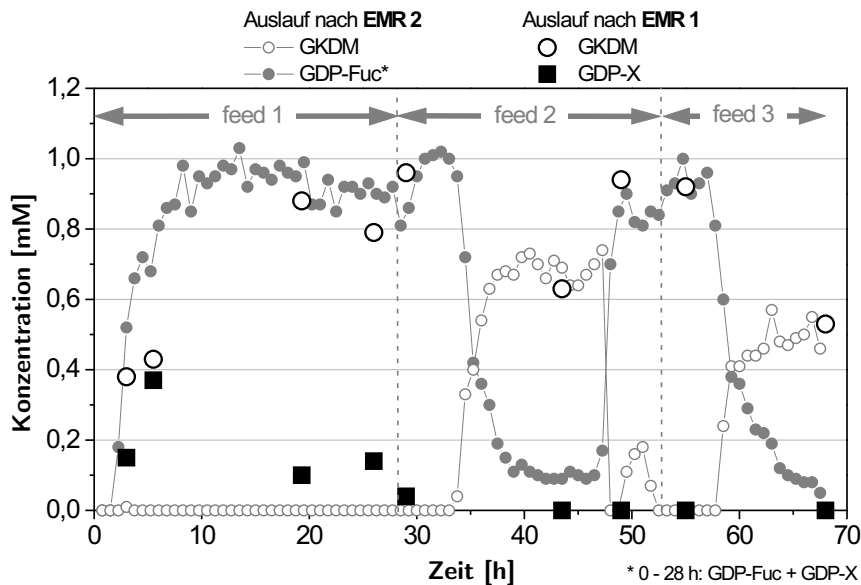


Abbildung 6.14: Vermeidung der Nebenreaktion in der EMR-Kaskade durch Wahl des Cofaktors.

Bedingungen: entsprechend Abbildung 6.13. Die Konzentration von GDP-X wurde näherungsweise auf Basis einer externen Kalibrierung mit GDP-Man berechnet.

Abbildung 6.15 auf der nächsten Seite zeigt die Ursache für den starken Einbruch des Umsatzes im zweiten EMR (GFS-Reaktion), wenn NADP als Cofaktor eingesetzt wird. Die Vermutung, dass die Cofaktorregenerierung mit der FDH unter diesen Bedingungen nicht funktioniert, wird durch den Verlauf der NADP-Konzentration in der EMR-Kaskade bestätigt. Die Umstellung von NADPH auf NADP erfolgte bei 28 h Laufzeit. Zur Generierung von NADPH für die GFS-Reaktion wurden 833 mU/mL FDH in den zweiten EMR dosiert. Es ist zu erkennen, dass die NADP-Konzentration zunächst stark abfällt und GDP-Fuc gebildet wird (28 – 32 h). NADPH muss also gebildet worden sein. Dann steigt die NADP-Konzentration jedoch wieder an, die Konzentration an GDP-Fuc sinkt, die GKDM-Konzentration steigt. Die erneute Nachdosierung von FDH bei 48 h (4,2 U/mL), jedoch nicht von GFS, lässt die NADP-Konzentration wieder auf beinahe Null absinken. Auch wird GKDM wieder zu GDP-Fuc umgesetzt. Aus diesem Sachverhalt muss gefolgert werden, dass die FDH unter den Bedingungen des EMR stark deaktiviert und nicht in der Lage ist, den Cofaktor NADPH

¹Im unteren Graph der Abbildung 6.13 handelt es sich bei den schwarzen Kreisen im ersten Abschnitt (feed 1) demnach um GDP-Fuc **und** GDP-X.

effektiv für die GFS-Reaktion zur Verfügung zu stellen. Dieses Verhalten der FDH ist spezifisch für den EMR. Wurde das Enzym unter sonst identischen Bedingungen im Satzreaktor inkubiert, so war es über Tage stabil (nicht dargestellt).

Die Raum-Zeit-Ausbeute liegt für diese zweite EMR-Kaskade bei 13,7 g/(L·d) für die einzelnen Reaktionen. Für die Gesamtreaktion GDP-Man \rightarrow GDP-Fuc beträgt sie, aufgrund der doppelten Verweilzeit, 6,8 g/(L·d). Diese Werte gelten für die Betriebspunkte mit den höchsten Umsätzen.¹

Im Gegensatz zum ersten kontinuierlichen Experiment, welches vor allem die Möglichkeit zur Realisierung dieses Reaktorkonzeptes belegen sollte, wurden bei dieser zweiten Kaskade geringere Enzymkonzentrationen eingesetzt. Dementsprechend liegt der produktmengen-spezifische Enzymverbrauch für beide Reaktionen sehr viel niedriger. Für die GMD-Reaktion beträgt er nur **2,8 U/gGDP-Fuc** (0 – 28h), für die GFS-Reaktion hervorragende **1,6 U/gGDP-Fuc** (0 – 28h).

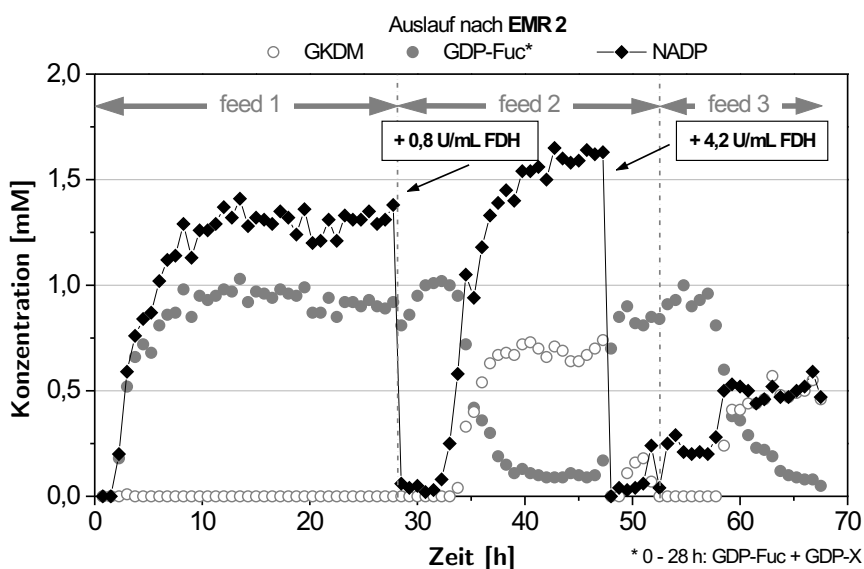


Abbildung 6.15: Desaktivierung der FDH im zweiten EMR.

Bedingungen: entsprechend Abbildung 6.13; aufgrund der Instabilität von NADPH in der HPLC kann diese Konzentration nicht angegeben werden.

¹Es wurde mit einer Produktkonzentration von 0,9 mM gerechnet, d.h. 90% Umsatz für beide Reaktionen.

6.6 Produktisolierung

In diesem Unterkapitel wird die Strategie zur Aufreinigung der enzymatisch gewonnenen GDP-Fuc vorgestellt. Die abschließende Bilanzierung von Synthese und Aufreinigung ist für eine Bewertung des gesamten Prozesses notwendig.

In der Literatur finden sich bereits mehrere Verfahren zur Aufreinigung von GDP-Fuc aus Reaktionslösungen [143, 151, 152, 156]. Die dort beschriebenen Methoden konnten zum Teil auch im Rahmen dieser Arbeit angewandt werden. Die Strategie zur Aufreinigung des Nucleotidzuckers umfasst die folgenden Schritte:

1. **Ultrafiltration** zur Abtrennung des Enzyms. Für das Syntheseverfahren im *repetitive batch* bzw. im kontinuierlichen Verfahren entfällt dieser Schritt.
2. **Anionenaustauschchromatographie** an einem Dowex™ 1x2 Harz. Die starke Bindung der GDP-Fuc an den Anionentauscher ermöglicht die Abtrennung von Puffersubstanzen und Salzen. Elution erfolgt mit LiCl.
3. **Nanofiltration** zur Abtrennung von LiCl. Dieser Schritt kann in einer Diafiltrationsanlage kontinuierlich gefahren werden.
4. **Lyophilisation** zur Gewinnung und Trocknung der Substanz aus dem Retentat der Nanofiltration.

Ultrafiltration

Sofern notwendig, können die Enzyme durch Einsatz einer UF-Membran effektiv von der Reaktionslösung abgetrennt werden. Zum Einsatz kam eine Membran mit einem *cut-off* von 10 kD. Die Ultrafiltrationen wurden in Amiconzellen bzw. in üblichen, kommerziellen Filtermodulen durchgeführt.

Anionenaustausch-Chromatographie

Die Bindung von Nucleotidzuckern an einen starken Anionentauscher zur Abtrennung von Puffersubstanzen, Salzen und anderen Reaktionsbestandteilen ist eine bekannte und effektive Methode der Reinigung. Notwendige Voraussetzung ist eine ausreichende Selektivität für den Nucleotidzucker. Die Substanz kann anschließend durch hohe Salzkonzentrationen vom Träger eluiert werden. Die Arbeiten konnten an Erfahrungen einiger Mitarbeiter des Institutes für Biotechnologie anknüpfen: neben GDP-Man [295] und CMP-Neu5Ac [301] wurde auch schon GDP-Fuc, die chemisch gewonnen wurde, an einem Dowex™ Harz aufgereinigt [302].

Bei der Aufreinigung enzymatisch gewonnener GDP-Fuc muss zusätzlich die Anwesenheit der Nicotinamidcofaktoren NADP bzw. NADPH in der Reaktionslösung berücksichtigt werden. Da diese Cofaktoren ähnliche Masse/Ladung-Verhältnisse wie GDP-Fuc besitzen, kann davon ausgegangen werden, dass sie an einem Anionentauscher ähnliches Bindungsverhalten zeigen.

Wird der Cofaktor bei der enzymatischen Synthese in stöchiometrischen Mengen eingesetzt, so muss der chromatographische Schritt entsprechend leistungsfähig sein, um das Produkt von den Cofaktoren abtrennen zu können. Wird jedoch der Cofaktor in geringeren Mengen eingesetzt (integrierte Cofaktorregenerierung), so erleichtert dies auch die anschließende Chromatographie.

Die Elutionsdiagramme der Abbildung 6.16 sollen diesen Sachverhalt verdeutlichen. Der linke Graph zeigt das Elutionsprofil von GDP-Fuc in Anwesenheit hoher Mengen NADP. Es wird deutlich, dass die beiden Substanzen nicht vollständig getrennt werden können. Da NADP mit GDP-Fuc coeluiert, kann zur Isolierung des Nucleotidzuckers nur ein geringer Anteil des Produktpeaks genutzt ("geschnitten") werden. Zusätzlich zeigt vorhandenes GDP ähnliche Bindungseigenschaften wie NADP und GDP-Fuc. Der Nucleotidzucker wird bei einer LiCl-Konzentration von 500 bis 600 mM vom Träger gespült.

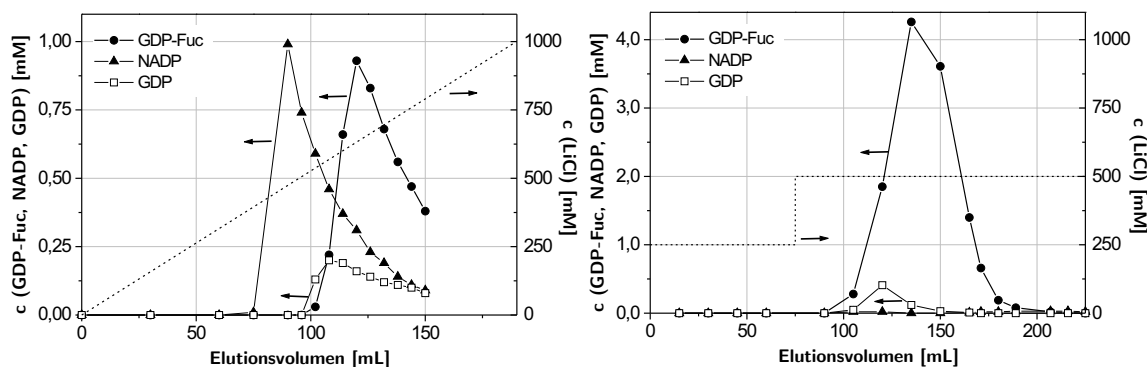


Abbildung 6.16: Chromatographische Aufreinigung von GDP-Fuc an Dowex 1x2.

Säule: XK 16, 19 mL Bettvolumen, Fluß: 1-2 mL/min.

links: Beladung 34,3 mg GDP-Fuc, 48,6 mg NADP, linearer LiCl-Gradient (0 - 1 M LiCl), **rechts** Beladung: 120,7 mg GDP-Fuc, 12,4 mg NADP, Stufengradient 0,25 M und 0,5 M LiCl.

Der rechte Graph der Abbildung zeigt, dass die Anwesenheit nur geringer Mengen an NADP zu einer Ausbeutesteigerung von 30-40% für den chromatographischen Schritt führt. Die NADP-Konzentration des Eluats ist zu gering, um noch detektiert werden zu können. GDP-Fuc eluiert als großer Produktpeak vom Träger. GDP coeluiert mit GDP-Fuc. Im Gegensatz zum links dargestellten Experiment wurde das Produkt mittels eines Stufengradienten vom Träger gespült (250 mM LiCl → 500 mM LiCl).

Eine Aufreinigung von GDP-Fuc durch Anionenaustausch-Chromatographie ist somit möglich. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Vermeidung hoher NADP-Konzentrationen mittels integrierter Cofaktorregenerierung Ausbeute steigernd auf den chromatographischen Schritt auswirkt. Je geringer die NADP-Konzentration ist, desto höher ist die Ausbeute des Chromatographie-Schrittes, wenn man die oben gezeigte Selektivität voraussetzt. Dies ist ein weiteres, wichtiges Argument zur Implementierung der Cofaktorregenerierung bei der GFS-Reaktion.

Nanofiltration und Lyophilisation

Der nächste notwendige Schritt zur Isolierung von GDP-Fuc ist die Abtrennung der hohen Salzmengen vom Produkt. In der Regel wird für diesen Schritt die Gelpermeationschromatographie (GPC) eingesetzt. Sie ist jedoch zeitaufwendig und nur bedingt *scale-up* fähig. Arbeiten am Institut für Biotechnologie haben gezeigt, dass Membranprozesse eine leistungsfähige Alternative zur GPC darstellen. So konnten mittels Nanofiltration bereits die Nucleo-

tidzucker GDP-Man, CMP-Neu5Ac und auch GDP-Fuc in hohen Ausbeuten entsalzt werden [295, 302, 303].

Auf die Ergebnisse dieser Untersuchungen konnte im Rahmen dieser Arbeit zurückgegriffen werden. Zur Entsalzung der GDP-Fuc kam die Laboranlage P 28 der Firma Celfa zum Einsatz. Diese Anlage ermöglicht ein kontinuierliches Auswaschen des Salzes (LiCl) während der Wertstoff (GDP-Fuc) durch die Membran retentiert wird. Dabei wird das Volumen des Retentats (thermostatisierter Druckzylinder) durch eine Kolbenpumpe, die über einen Füllstandmesser gesteuert wird, konstant gehalten. Diese Betriebsweise wird als Diafiltration bezeichnet. Das Membranmodul ist oberhalb des Druckzylinders angebracht, eine Zahnradpumpe sorgt für die Umwälzung der Lösung zum Membranmodul und zurück in den Druckbehälter. Drücke bis zu 40 bar werden durch Drucküberlagerung mit Stickstoff erreicht.

Diafiltrationen im kleineren Maßstab konnten in einem Enzym-Membran-Reaktor, der mit einer Nanofiltrationsmembran versehen wurde, durchgeführt werden. Die kontinuierliche Zuführung von Wasser zum Auswaschen des Salzes wurde mit einer gegen druckstabilen Kolbenpumpe bewerkstelligt.

Der Verlauf einer Diafiltration wird durch die exponentielle Funktion der Gleichung (6.2) beschrieben. Das Verhältnis V_D/V_0 beschreibt die Anzahl der ausgetauschten Volumina des Retentats (Anzahl der Verweilzeiten).

$$C_{\text{Ret}} = C_0 \cdot e^{-(1-R) \cdot \frac{V_D}{V_0}} \quad (6.2)$$

mit:

C_{Ret}	[mol/L]	Konzentration einer Komponente im Retentat
C_0	[mol/L]	Anfangs-Konzentration einer Komponente
R	[-]	Retention
		Die Retention R ist definiert als $1 - \frac{C_{\text{Permeat}}}{C_{\text{Retentat}}}$.
$\frac{V_D}{V_0}$	[-]	Anzahl der ausgetauschten Volumina (Verweilzeiten)

Zur Trennung zweier Komponenten mittels Nanofiltration müssen die Retentionsfaktoren der einzelnen Komponenten für eine bestimmte Membran verschieden sein. Für eine effektive Entsalzung muss die Retention für den Wertstoff mindestens 99% betragen, der Retentionsfaktor der permeierenden Komponente sollte unterhalb 70% liegen. Abbildung 6.17 auf der nächsten Seite zeigt exemplarisch den Verlauf einer Entsalzung von GDP-Fuc mittels Diafiltration. Die Retentionswerte für GDP-Fuc und LiCl wurden durch Anpassung der Parameter der Gleichung (6.2) an die experimentellen Daten mittels nicht-linearer Regression erhalten.

Der Retentionswert für GDP-Fuc liegt mit 0,992 in der gleichen Größenordnung wie der bereits von G. Dudziak ermittelte Wert [302]. Die Retention des LiCl wurde zu 0,617 bestimmt. Es wurde eine Membran der Firma *Osmonics* eingesetzt.¹ Nach 20 Verweilzeiten konnte die Entsalzung von GDP-Fuc mit einer Ausbeute von 84% erzielt werden. Die LiCl-Konzentration lag am Ende der Diafiltration bei etwa 0,6 mM.

Um das Produkt in fester Form zu erhalten, wurden die wässrigen Retentatlösungen zunächst in der Diafiltrationsanlage aufkonzentriert und anschließend lyophilisiert. Die so gewonnene GDP-Fuc wurde als gräuliches, amorphes Pulver erhalten. Die Gehalte der Lyophilisate schwankten zwischen 60 und 90%, da der Salzgehalt je nach Präparation unterschiedlich

¹Bezeichnung der Membran: **DK** (Osmonics). Diese Membran entspricht der **MX07**-Membran (Osmonics), die in früheren Arbeiten eingesetzt wurde [302].

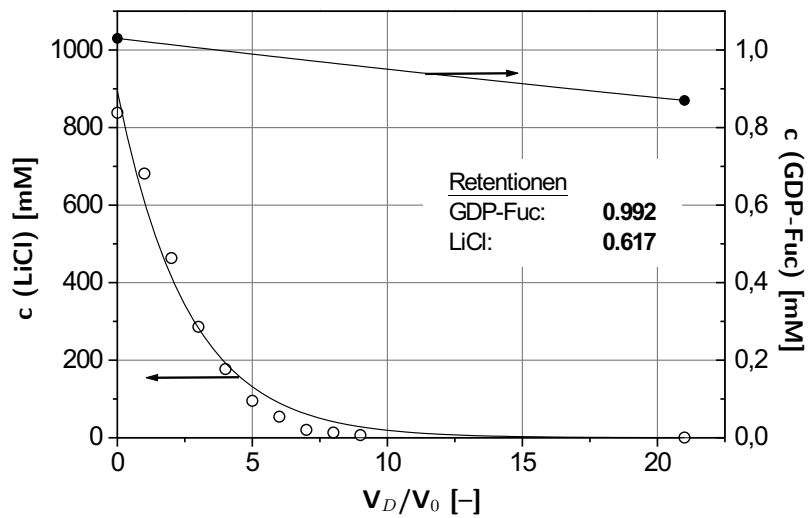


Abbildung 6.17: Entsalzung von GDP-Fuc mittels Nanofiltration.

Bedingungen: 20 bar, $V_D = V_0 = 125$ mL, pH 7, $T = 4^\circ$ C.

hoch war. Im NMR-Spektrum konnte das Produkt eindeutig als GDP- β -L-Fucose in einer Reinheit >90% identifiziert werden (vgl. Kapitel 10).

Bilanzierung von Produktsynthese und -aufreinigung

Abschließend zu diesem Kapitel soll eine Bilanz der Gewinnung von GDP-Fuc ausgehend von der GDP-Man gezogen werden. Tabelle 6.3 auf der nächsten Seite zeigt zusammenfassend die Ausbeuten der enzymatischen Synthese sowie der einzelnen Schritte der Produktisolierung. Die Ausbeuten der Synthese entsprechen den Werten der Tabelle 6.2 auf Seite 119 (diskontinuierliche Synthese). Synthese und Aufreinigung des Produktes wurden in einem 200 μ mol Ansatz durchgeführt.

	Produkt	Stoffmenge [μmol]	Masse [mg]	Ausbeute [%]
Ansatz	GDP-Man·2 Na	200	130	100
GMD-Reaktion	GKDM·2 Na	190	120	95
GFS-Reaktion	GDP-Fuc·2 Na	180	114	95
Anionenaustausch- Chromatographie (Dowex 1x2)	GDP-Fuc·2 Li	166	99	92
Nanofiltration (Osmonics™ DK)	GDP-Fuc·2 Li	140	84	84
Lyophilisation	GDP-Fuc·2 Li	126	76	90
Gesamtausbeute				63%

Tabelle 6.3: Bilanzierung der enzymatischen Synthese und Aufreinigung von GDP-Fuc.

Die Stufe der Nanofiltration zeigte mit 84% die geringste Ausbeute. Dennoch ist dieser Wert zufriedenstellend. Für den gesamten Prozess - Synthese in zwei Stufen und dreistufige Produktisolierung - konnte eine Gesamtausbeute von 63% (76 mg) erzielt werden.

6.7 Zusammenfassung

Enzym- und Produktstabilitäten Die beiden Enzyme GMD und GFS zeigen in MOPS-Puffer bei pH 7 die höchsten Stabilitäten. Der Zusatz von 10 mM MgCl_2 und 1 mM DTT weist für beide Biokatalysatoren einen stabilisierenden Effekt auf. Die maximal erreichbaren Halbwertszeiten lagen, bei 20°C, für die GMD bei 33 h, für die GFS bei 48 h.

Die Desaktivierung von GDP-Man und GDP-Fuc kann für die Synthese und Aufreinigung vernachlässigt werden. Erstmals wurden die Stabilitäten von GKDM unter Reaktionsbedingungen gemessen. Bei 20°C ist GKDM unter den optimalen Bedingungen (MOPS-Puffer, pH 7) nach einem Tag zu weniger als 10% zerfallen; die Halbwertszeit beträgt über 9 Tage.

Reaktorkonzepte der enzymatischen Synthese von GDP-Fuc Zur Etablierung einer effektiven Synthese von GDP-Fuc ausgehend von GDP-Man ist die Trennung der beiden enzymatischen Schritte notwendig.

Im diskontinuierlichen Verfahren wird die GMD-Reaktion im *batch*-Modus gefahren, die GFS-Reaktion wird anschließend als *repetitive batch* mit FDH-gekoppelter, integrierter Co-faktorregenerierung geführt. Für beide Schritte wurden Ausbeuten bis zu 95% erzielt. Die Raum-Zeit-Ausbeuten lagen bei 28 bis 48 g/(L·d). Dem gegenüber stand ein hoher Enzymverbrauch von 40 bis 75 U/g GDP-Fuc.

Ein kontinuierliches Syntheseverfahren konnte mit einer 2-stufigen Rührkesselkaskade realisiert werden. Für die Gesamtreaktion GDP-Man \rightarrow GDP-Fuc beträgt die Raum-Zeit-Aus-

beute bis zu 6,8 g/(L·d). Der produktmengenspezifische Enzymverbrauch konnte im Gegensatz zum diskontinuierlichen Verfahren auf hervorragende 2,8 U/g_{GDP-Fuc} für die GMD bzw. 1,6 U/g_{GDP-Fuc} für die GFS gesenkt werden. Die integrierte Cofaktorregenerierung ist aufgrund der Instabilität der eingesetzten NADP-abhängigen FDH nur bedingt möglich.

Im kontinuierlichen Experiment kann ein unbekannter Nucleotidzucker GDP-X aus GKDM gebildet werden. Diese Reaktion ist vermutlich enzymatisch katalysiert und findet im GMD-Reaktor statt. GDP-X entsteht unter gleichzeitiger Bildung von NADP aus NADPH. Ist lediglich NADP anwesend, so wird GDP-X nicht gebildet.

Produktisolierung Enzymatisch gewonnene GDP-Fuc konnte in einer 3-stufigen Aufreinigung bestehend aus Anionenaustausch-Chromatographie, Nanofiltration und Lyophilisation isoliert werden. Die Ausbeuten der einzelnen Schritte lagen bei 84 bis 92%. Für den gesamten Prozess - Synthese und Produktisolierung - konnte eine Gesamtausbeute von 63% erzielt werden.

7 Synthese fucosylierter Oligosaccharide durch *in situ* Generierung von GDP-Fuc¹

Im vorangegangenen Kapitel 6 wurden Reaktorkonzepte für die enzymatische Synthese von GDP-Fuc vorgestellt. Grundlage der dortigen Verfahrensentwicklung war die Vermeidung der *feedback*-Inhibierung der GMD durch GDP-Fuc. Diese Inhibierung der Dehydratase macht eine Eintopfsynthese von GDP-Fuc, ausgehend von der GDP-Man, unmöglich.

Ziel der in diesem Kapitel vorgestellten Arbeiten war die Kopplung der GDP-Fuc-Synthese mit der Fucosyltransferase (FucT)-Reaktion in einem Eintopfverfahren. Zielprodukt war zunächst das Trisaccharid 2'-Fucosyllactose (2'-FL), jedoch wurden auch andere Akzeptoren eingesetzt (siehe unten). Abbildung 7.1 zeigt die α 1,2-FucT-Reaktion zur Synthese von 2'-Fucosyllactose.

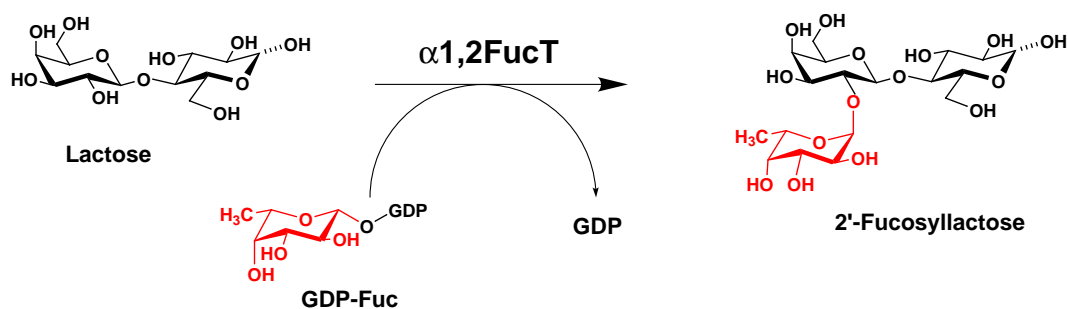


Abbildung 7.1: Die Fucosyltransferase (FucT)-Reaktion am Beispiel der Synthese von 2'-Fucosyllactose.

Die FucT sollte in der Lage sein, gebildete GDP-Fuc aus der Kaskade von GMD- und GFS-Reaktion auf einen in der Reaktionslösung anwesenden Akzeptor zu übertragen. Auf diese Weise wird dem gekoppelten System GDP-Fuc entzogen. Die stationäre GDP-Fuc-Konzentration ist dadurch gering und somit nicht ausreichend, um die GMD- bzw. GFS-Reaktion zu inhibieren. Eine solche Eintopfreaktion sollte die Synthese fucosylierter Oligosaccharide ausgehend von der GDP-Man ermöglichen. GDP-Fuc wird lediglich *in situ* gebildet.

Die Bereitstellung der α 1,2-FucT aus *H. pylori*, die im Rahmen der eigenen Arbeiten eingesetzt wurde, ist in Kapitel 4.3 auf Seite 52 beschrieben. Wie für alle bisherigen Arbeiten wurden die GDP-Fuc-Enzyme (GMD und GFS) in Form ihrer Glycerin-Präparationen eingesetzt.

Der Versuch, die enzymatische GDP-Fuc-Synthese mit einer FucT-Reaktion in einer Eintopfreaktion zu koppeln, ist bisher nicht publiziert. Koizumi *et al.* [169] konnten zwar zeigen,

¹Die Arbeiten dieses Kapitels wurden während eines Forschungsaufenthalts in Tokio (Japan) bei der Firma Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. im Frühjahr 2002 durchgeführt.

dass die Synthese von *Lewis*^X mit rekombinanten, ruhenden Zellen - ausgehend von Manno- se, GMP und LacNAc (Akzeptor) - gelingt, jedoch wurden die Schritte GKDM → GDP-Fuc → *Lewis*^X erst bei maximaler GKDM-Konzentration durchgeführt, um so die *feedback*-Inhi- bierung zu umgehen. Die Synthese kann daher nicht als Eintopfverfahren angesehen werden. Das Produktionssystem wurde in Kapitel 1 vorgestellt (Abbildung 1.11 auf Seite 18). Der Einsatz der α 1,2-FucT aus *H. pylori* zur Herstellung von 2'-Fucosyllactose wurde bereits von der Gruppe Piepersberg publiziert [167], jedoch fand bei diesen Arbeiten keine Kopplung von enzymatischer GDP-Fuc-Synthese und Fucosyltransfer statt.

Neben der partiell aufgereinigten α 1,2-FucT kamen auch die permeabilisierten, α 1,2FucT- rekombinanten *E. coli*-Zellen für die Fucosylierung zum Einsatz. Diese Zellen sollen in zukünf- tigen Arbeiten bei Kyowa Hakko zur Fucosylierung eingesetzt werden.¹ Die Effizienz dieser Zellen sollte mit jener der aufgereinigten FucT verglichen werden. Das Konzept der Kopplung der Reaktionen fasst schematisch Abbildung 7.2 zusammen.

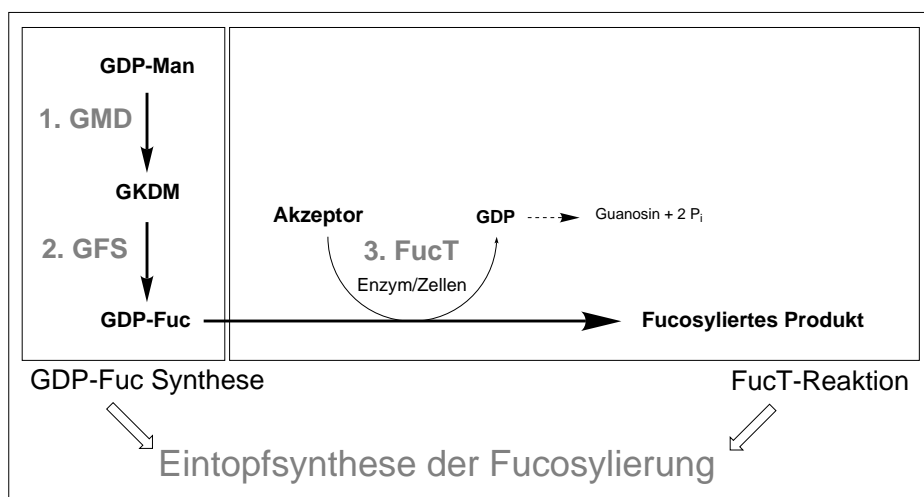


Abbildung 7.2: Das Konzept der Kopplung von enzymatischer GDP-Fuc-Synthese und Fucosyltransfer zur Eintopfsynthese fucosylierter Oligosaccharide.

7.1 Substratspezifität der α 1,2FucT aus *H. pylori*

In Kapitel 4.3.2 wurde gezeigt, dass die zur Verfügung stehende Menge an partiell aufgereinigter α 1,2-FucT gering war (insgesamt 69 mU, bezogen auf Lactose als Substrat). Die niedrige Ausbeute kann auf die geringe Überexpression des Enzyms sowie auf eine nicht optimierte Aufreinigung zurückgeführt werden. Da diese Enzymmenge nicht ausreichend für die weiteren Experimente war, wurden andere Substrate für die FucT getestet.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die α 1,2-FucT aus *H. pylori* terminale Galactose- Reste von Typ I-Oligosacchariden wesentlich schneller fucosyliert als die der entsprechen- den Typ II-Oligosaccharide [271]², wozu auch Lactose gehört. Jedoch ist auch beschrieben, dass Typ II-Oligosaccharide gute Substrate für die α 1,2-FucT aus *H. pylori* sind, wenn der

¹Dr. Satoshi Koizumi, Kyowa Hakko, persönliche Mitteilung.

²Typ I: Gal- β 1,3-Glc(NAc), Typ II: Gal- β 1,4-Glc(NAc)

N-Acetylglucosamin-Rest der Gal- $\beta 1,4$ -Glc(NAc)-Einheit bereits fucosyliert ist [70, 304]. Auf diese Weise kann z.B. Le^Y durch $\alpha 1,2$ -Fucosylierung ausgehend von Le^X gebildet werden (siehe Abbildung 7.3).

Diese Reihenfolge der doppelten Fucosylierung ist eine Besonderheit der $\alpha 1,2$ -FucT aus *H. pylori*. Klassische Modelle der Fucosylierung in Säugern sagen aus, dass difucosylierte Strukturen wie Le^Y oder Le^B durch die sequentielle Aktivität einer $\alpha 1,2$ -FucT und anschließend, je nach Oligosaccharid-Typ, einer $\alpha 1,3/4$ -FucT gebildet werden [56, 305]. Die hier eingesetzte FucT ist jedoch in der Lage, Le^Y, ausgehend von Le^X, zu synthetisieren. Ähnliche, ungewöhnliche $\alpha 1,2$ -FucT-Aktivitäten konnten auch in einigen humanen Krebszellen bzw. -geweben [79, 306] wie auch in nicht-pathogenen Kaninchenzellen [307] gefunden werden. Abbildung 7.3 zeigt schematisch die beiden Möglichkeiten der doppelten Fucosylierung am Beispiel der Le^Y-Synthese ausgehend von LacNAc (Typ II-Oligosaccharide).

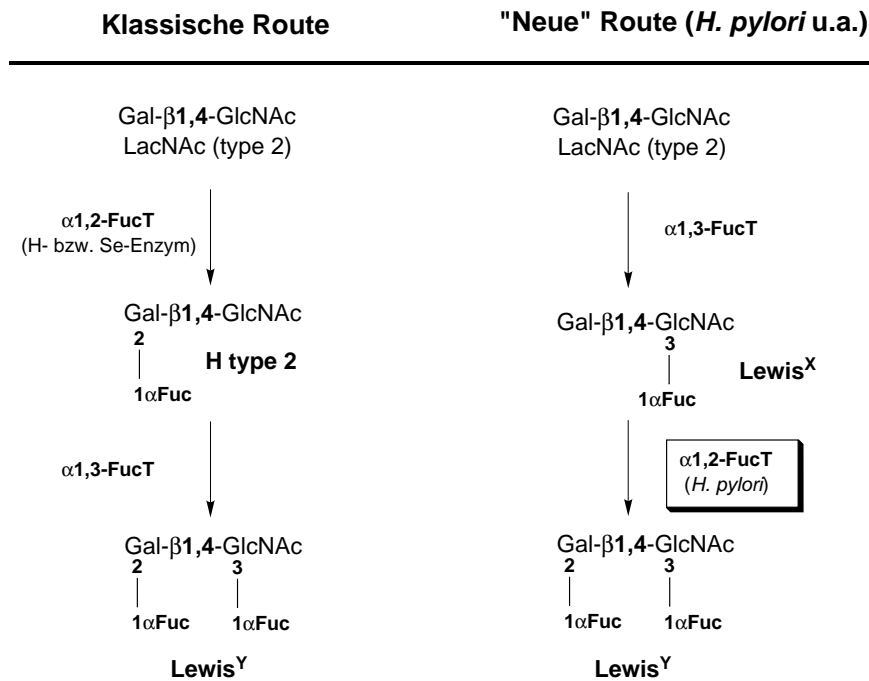


Abbildung 7.3: Möglichkeiten der enzymatischen Synthese von Lewis^Y (Typ II-Oligosaccharid).

Analoge Biosynthesewege existieren für die Antigene Le^A und Le^B (siehe Abbildung 1.6 auf Seite 9).

Aufgrund dieser Überlegungen wurden in einem FucT-Standardassay¹ verschiedene Akzeptoren als Substrate für die α 1,2-FucT aus *H. pylori* getestet. Die zu untersuchende Reaktion zeigt die folgende Reaktionsgleichung:



Tabelle 7.1 fasst diese Untersuchungen zusammen. Insgesamt wurden 5 verschiedene Akzeptoren getestet. Vier dieser Substanzen sind Typ II-Oligosaccharide, lediglich ein Substrat des Typs I war verfügbar.

Akzeptor	Struktur	Typ	spez. FucT Aktivität [mU/mg]
Lactose	Gal- β 1,4-Glc	II	9
LacNAc	Gal- β 1,4-GlcNAc	II	n.d.
LNnT	Gal- β 1,4-GlcNAc- β 1,3-Gal- β 1,4-Glc	II	n.d.
LNFP III	Gal- β 1,4[Fuc- α 1,3]-GlcNAc- β 1,3Gal- β 1,4-Glc (<i>Lewis</i> ^X -Lactose)	II	127
LNT	Gal- β 1,3-GlcNAc- β 1,3-Gal- β 1,4-Glc	I	154

Tabelle 7.1: Substratspezifität der α 1,2-FucT aus *H. pylori* (n.d. = *not detected*).

Wie erwartet, fucosyliert das Enzym das Typ I-Oligosaccharid (LNT) sehr viel schneller als die nicht-fucosylierten Typ II-Oligosaccharide. Mit LacNAc und LNnT kann keine Enzymaktivität detektiert werden. Dagegen zeigt die FucT mit *Lewis*^X-Lactose eine ähnlich hohe Aktivität wie mit dem Typ I-Akzeptor. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den publizierten Daten zur α 1,2-FucT aus *H. pylori*.

Im Vergleich zu Lactose kann mit LNFP III bzw. LNT die spezifische Aktivität um einen Faktor 14 bzw. 17 gesteigert werden. Das Ziel, nämlich die Synthese von 2'-Fucosyllactose ausgehend von der Lactose zu untersuchen, wurde daher neu definiert. Für die weiteren Untersuchungen zur Kopplung der GDP-Fuc-Synthese mit der FucT-Reaktion wurden LNFP III und LNT als Akzeptoren eingesetzt.

¹Bedingungen: siehe Kapitel 10.

7.2 Kopplung von GDP-Fuc-Synthese und Fucosyltransfer im Satzreaktor

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Satzreaktorversuche vorgestellt, die eine Fucosylierung der beiden Akzeptoren LNFP III und LNT, ausgehend von der GDP-Man und NADPH, ermöglichen. Als Cofaktor wurde stets NADPH eingesetzt. Der reduzierte Cofaktor hat dabei zwei Funktionen: zum einen aktiviert er die GMD, zum anderen liefert er die notwendigen Reduktionsäquivalente für die GFS zur Generierung von GDP-Fuc ausgehend von GKDM. Die Akzeptoren sowie NADPH wurden in zweifachem Überschuß zur Reaktion gegeben. Alle durchgeführten *batch*-Versuche wurden im analytischen Maßstab durchgeführt, der Verlauf der Reaktionen wurde mit HPLC verfolgt.

Abbildung 7.4 zeigt die Eintopfsynthese eines fucosylierten Oligosaccharids mit der partiell aufgereinigten α 1,2-FucT. LNFP III ist der Akzeptor. Das fucosylierte Produkt (*Lewis*^Y Lactose) wird in einer Konzentration von etwa 1 mM gebildet.¹ Dies entspricht einer quantitativen Ausbeute bezogen auf GDP-Man. Demnach wurde die im System gebildete GDP-Fuc vollständig zur Fucosylierung des Akzeptors genutzt.

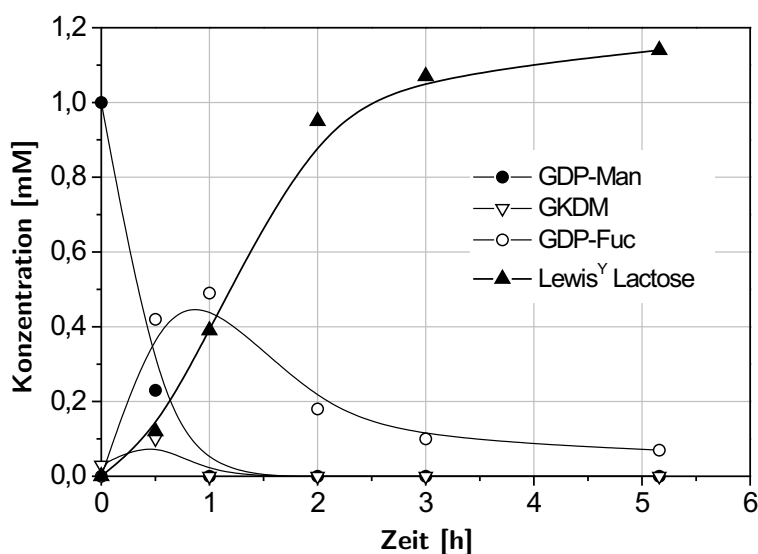


Abbildung 7.4: Synthese von *Lewis*^Y-Lactose, ausgehend von *Lewis*^X-Lactose (LNFP III), mit aufgereinigter α 1,2-FucT.

Bedingungen: 1 mM GDP-Man, 2 mM NADPH, 2 mM LNFP III, 100 mU GMD, 68 mU GFS, 17 mU FucT; 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgSO₄, 5 mM MnCl₂, 1 mM DTT, pH 8, T = 30° C, V = 1 mL, Enzymaktivitäten nach Standard-Assays (s. Kapitel 10). Start der Reaktion mit GDP-Man.

Die Konzentrationen der Nucleotidzucker zeigen den für Folgereaktionen typischen Verlauf. GDP-Man ist nach 1 Stunde quantitativ verbraucht, GKDM ist kaum zu detektieren, da es

¹Die angegebene Produktkonzentration über 1 mM liegt in einem Fehler der HPLC-Analytik begründet.

sofort weiter zu GDP-Fuc umgesetzt wird. Die GDP-Fuc-Konzentration zeigt ihr Maximum nach etwa 1 Stunde. Die stetige Produktbildung durch die FucT-Reaktion lässt die GDP-Fuc-Konzentration wieder absinken.

In einem zweiten *batch*-Versuch (Abbildung 7.5) sollte untersucht werden, ob auch FucT-rekombinante *E. coli*-Zellen den Akzeptor LNFP III in gleicher Weise fucosylieren können. Die Reaktionsbedingungen ebenso wie die eingesetzten Enzymaktivitäten entsprechen denen des ersten Experiments.

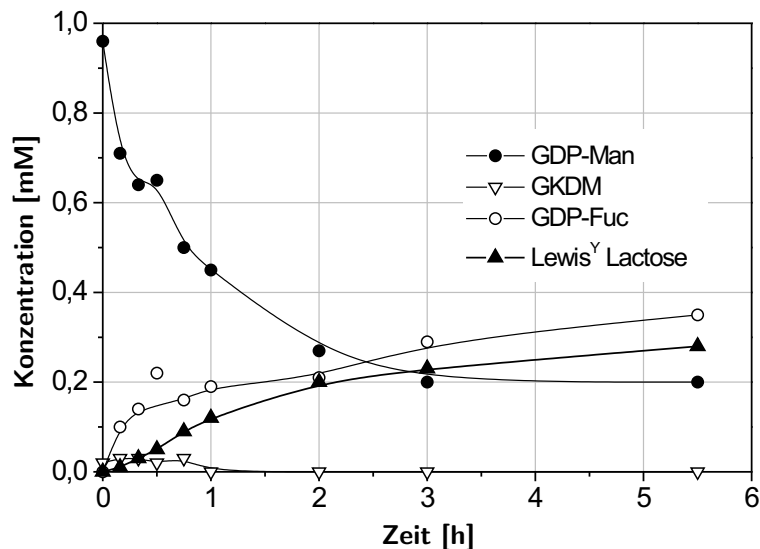


Abbildung 7.5: Synthese von *Lewis*^Y-Lactose, ausgehend von *Lewis*^X-Lactose (LNFP III), mit α 1,2-FucT-rek. *E. coli*-Zellen.

Bedingungen: 1 mM GDP-Man, 2 mM NADPH, 2 mM LNFP III, 100 mU GMD, 68 mU GFS, 15 mU FucT; 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgSO₄, 5 mM MnCl₂, 1 mM DTT, pH 8, T = 30° C, V = 1 mL, Enzymaktivitäten nach Standard-Assays (s. Kapitel 10). Start der Reaktion mit GDP-Man.

Der Verlauf der Reaktion zeigt, dass mit den Zellen eine nur wesentlich geringere Produktkonzentration von 0,2 mM *Lewis*^Y-Lactose erzielt werden kann. GDP-Man wird zwar zu 80% umgesetzt, eine Bilanzierung von Substrat und Produkten ist aber nicht möglich. GDP-Man wird nicht quantitativ zu GDP-Fuc umgesetzt, zudem kann gebildete GDP-Fuc offensichtlich nicht zur weiteren Fucosylierung des Akzeptors genutzt werden. Als Ursache für die Lücke in der Massenbilanz erscheint die hohe, eingesetzte *E. coli*-Zellkonzentration von etwa 40 mg/mL plausibel, da die Adsorption bzw. Aufnahme von GDP-Man durch die permeabilisierten Zellen möglich sein sollte. Im Unterschied zum ersten Experiment konnte beobachtet werden, dass eingesetztes NADPH bereits zu Beginn der Reaktion größtenteils zu NADP oxidiert war (etwa 1 mM, nicht dargestellt). Dies könnte auf eine noch hohe Stoffwechselaktivität der Zellen zurückgeführt werden. Als Folge stehen die Reduktionsäquivalente nicht mehr für die GDP-Fuc-Synthese zur Verfügung.

In einer dritten Eintopfsynthese sollte das Konzept der *in situ* Fucosylierung mit einem

anderen Akzeptor überprüft werden. Abbildung 7.6 zeigt den Reaktionsverlauf mit LNT als Substrat für die partiell aufgereinigte FucT. Das fucosylierte Produkt (Lacto-N-Fucopentose I, LNFP I) wird bis zu einer Konzentration von 0,7 mM gebildet. Bezogen auf die eingesetzte GDP-Man entspricht dies einer Ausbeute von 70%. Da aber die eingesetzte GDP-Man sowie gebildete GDP-Fuc vollständig umgesetzt werden, besteht auch hier eine Lücke in der Massenbilanz. Mit LNFP III als Akzeptor (vgl. Abbildung 7.4) wurden unter identischen Bedingungen nahezu 100% Ausbeute erzielt. Ein hoher Fehler der HPLC-Analytik für die Oligosaccharide könnte eine Erklärung für diese Diskrepanz sein.

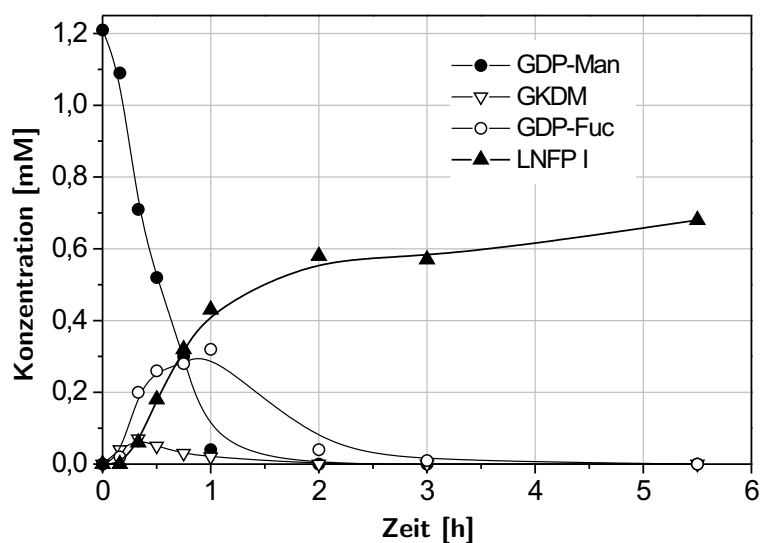


Abbildung 7.6: Synthese von LNFP I ausgehend von LNT mit aufgereinigter α 1,2-FucT. Bedingungen: 1 mM GDP-Man, 2 mM NADPH, 2 mM LNT, 100 mU GMD, 68 mU GFS, 15 mU FucT; 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgSO₄, 5 mM MnCl₂, 1 mM DTT, pH 8, T = 30°C, V = 1 mL, Enzymaktivitäten nach Standard-Assays (s. Kapitel 10). Start der Reaktion mit GDP-Man.

Wie auch im Falle des LNFP III, resultierte aus dem Einsatz der FucT-rek. Zellen - verglichen mit dem Einsatz des aufgereinigten Enzyms (nicht gezeigt) - eine deutlich geringere Effizienz der Eintopf-Fucosylierung von LNT.

Zur Kontrolle der durchgeführten *batch*-Experimenten wurden alle Versuche auch in Abwesenheit des jeweiligen Akzeptors durchgeführt. Auf diese Weise sollten eventuell auftretende Nebenaktivitäten der FucT-Präparation erkannt werden. Ohne Akzeptor in der Reaktionslösung sollte die Synthese von GDP-Fuc, aufgrund der wieder auftretenden *feedback*-Inhibition der GMD, nicht möglich sein. Überraschenderweise zeigte sich aber, dass unter den o.g. Reaktionsbedingungen GDP-Man nach 2 h zu 90% zu GDP-Fuc umgesetzt werden konnte. Abbildung 7.7 auf der nächsten Seite zeigt den Verlauf einer solchen Reaktion in Abwesenheit eines Akzeptors.

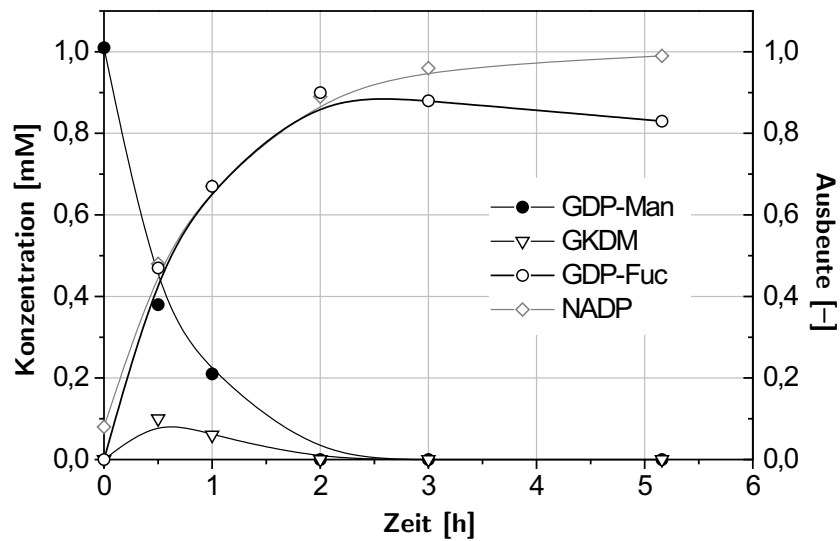


Abbildung 7.7: Gekoppeltes System in Abwesenheit eines Akzeptors für die $\alpha 1,2$ -FucT. Bedingungen entsprechend Abbildung 7.4 bzw. 7.6 jedoch *ohne* Akzeptor. Enzymaktivitäten nach Standard-Assays (s. Kapitel 10). Start der Reaktion mit GDP-Man.

Eine Erklärung für diese Beobachtung kann bisher nicht gegeben werden. Vergleicht man die Bedingungen der Experimente mit jenen zuvor durchgeführter, so wurden zwei Parameter geändert:

- Da die volumenspezifische Aktivität der FucT-Präparation (50% Glycerin) sehr gering war, mussten große Mengen der Enzymlösung eingesetzt werden. Der Glyceringehalt in den Eintopfreaktionen lag daher bei bis zu 25% (v/v).
- Fucosyltransferasen benötigen Mn^{2+} -Ionen für die Katalyse. Dieser Cofaktor wurde bisher nicht für die GDP-Fuc-Synthese eingesetzt.

Um einen möglichen Einfluß dieser Komponenten auf die Reaktionsfolge GDP-Man \rightarrow GKDM \rightarrow GDP-Fuc zu erkennen, wurden verschiedene Versuche zur Eintopfsynthese mit der GMD und GFS durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Dabei konnte reproduziert werden, dass, in Anwesenheit hoher Mengen an Glycerin sowie in Anwesenheit von Mn^{2+} -Ionen, GDP-Fuc ausgehend von GDP-Man sehr viel schneller gebildet wird als in Abwesenheit dieser beiden Komponenten. 1 mM GDP-Man wurde jeweils nach 2 h quantitativ zu GDP-Fuc umgesetzt.

7.3 Zusammenfassung

Substratspezifität der $\alpha 1,2$ FucT Die $\alpha 1,2$ FucT zeigt mit Typ I-Oligosacchariden (LNT) bzw. mit mono-fucosylierten Typ II-Oligosacchariden (LNFP III) bis zu 17-fach höhere spezifische Aktivitäten als mit Lactose als Substrat. Mit LacNAc bzw. LNnT konnte keine FucT-Aktivität gemessen werden.

Kopplung von GDP-Fuc-Synthese und FucT-Reaktion In Eintopfsynthesen mit GMD, GFS und partiell aufgereinigter FucT konnten die beiden Akzeptoren LNFP III bzw. LNT mit *in situ*-gebildeter GDP-Fuc erfolgreich fucosyliert werden. Bezogen auf die eingesetzte Menge GDP-Man lag die Ausbeute bei > 99% für LNFP III bzw. 70% für LNT als Akzeptor. Aus dem Einsatz von α 1,2FucT-*rek. E. coli*-Zellen resultierten - im Vergleich zum partiell aufgereinigten Enzym - stets geringere Produktausbeuten sowie unvollständiger Umsatz der eingesetzten GDP-Man.

Die Anwesenheit hoher Mengen an Glycerin (25%, v/v) und Mn^{2+} -Ionen (5 mM) erlaubt die schnelle Umsetzung von GDP-Man mit GMD und GFS im Satzreaktor. Diese beiden Komponenten scheinen somit in der Lage, die starke *feedback*-Inhibierung der GMD durch GDP-Fuc zu mindern.

8 Diskussion und Ausblick

Die in den vorherigen Abschnitten dargestellten Ergebnisse werden hier in einem übergreifenden Zusammenhang nochmals beleuchtet und hinterfragt. Dieses Kapitel soll helfen, die Arbeit in das Gebiet der enzymatischen GDP-Fuc-Synthese einzuordnen und möchte Anstöße für zukünftige Arbeiten auf dem Gebiet der Nucleotidzucker-Synthese geben.

8.1 Entwicklung analytischer Methoden

Der Schwerpunkt dieser Arbeiten lag auf der Entwicklung eines Enzymassays zur Bestimmung der Aktivität der GDP- α -D-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) mittels Kapillarelektrophorese. Die Untersuchungen auf der Basis eines genetischen Algorithmus mündeten in der Etablierung eines robusten *offline* Assays, der eine sichere Bestimmung der GMD-Aktivität innerhalb von 15 Minuten erlaubt. Der Assay kann, in Ergänzung zur Photometrie, auch für die GFS-Reaktion eingesetzt werden.

8.1.1 CE-Methodenentwicklung mit genetischen Algorithmen

Die dargestellte Anwendung genetischer Algorithmen zur Methodenentwicklung in der Kapillarelektrophorese zeigt, dass diese methodische Strategie mehrere Vorteile gegenüber anderen, häufig auf *trial and error* basierten Optimierungsstrategien aufzuweisen hat. Durch die Anwendung eines GA ist es möglich, komplexe Trennsysteme in einer kleinen Anzahl parallel durchführbarer Experimente zu optimieren. Die Entwicklungszeit einer analytischen Methode kann auf diese Weise ebenso verringert werden wie damit verbundene Laborkosten. Bei Verwendung üblicher, kommerzieller CE-Geräte, die eine Vielzahl notwendiger Prozesse (Kapillarspülung, Probenaufgabe etc.) automatisiert haben, ist es auch möglich, eine große Anzahl an Individuen "über Nacht" zu vermessen. Der Anwender wird die meiste Zeit mit der Auswertung der Daten zur Generierung neuer Methoden verbringen.

Der genetische Algorithmus führt nicht nur zu einer optimalen Trennmethode innerhalb eines Parameterraums. Ein großer Vorteil liegt darin, dass im Laufe einer Optimierung eine Vielzahl analytischer Methoden zur Verfügung gestellt werden, die Ausgangspunkt neuer Entwicklungen sein können. Auf diese Weise gelang die Etablierung eines Enzymassays zur Verfolgung der GMD-Reaktion. Zudem kann eine Methodenentwicklung in aller Regel mit weniger als 1% der möglichen Experimente – diese Anzahl wird durch die Parameter und ihre Variationsbreiten bestimmt – erfolgreich durchgeführt werden.

8.1.2 GMD Aktivitätsassay

Da aufgrund der Charakteristika der GMD-Reaktion, auf die in Kapitel 5 ausführlich eingegangen wurde, ein Endpunktassay nicht eingesetzt werden konnte, erforderte die Messung der Enzymaktivitäten eine Verfolgung des Umsatzes über die Zeit durch mehrere Probenahmen. Anhand des Umsatz-Zeit-Graphen wurde aus der Steigung der Regressionsgeraden im

linearen Bereich die Aktivität berechnet. Es handelt sich bei der so bestimmten Aktivität *nicht* um die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit, sondern um eine *gemittelte* Geschwindigkeit. Diese Methode führte zu einer sicheren Bestimmung der *apparenten* kinetischen Parameter der GMD-Reaktion. Für die Durchführung der Reaktion und die anschließende Messung auf der CE werden jedoch etwa 4 Stunden pro zu messender Enzymaktivität benötigt. Bei hohen Probeaufkommen - etwa bei kinetischen Messungen - war stets die Kapazität der instrumentellen CE-Analytik limitierend. Der Assay erwies sich jedoch als sehr robust und lieferte stets sehr gut reproduzierbare Werte für die entsprechenden Enzymaktivitäten.

Eine Verkürzung der notwendigen Analysezeit könnte durch Einsatz sog. Mikro-CEs erreicht werden. Stichwort ist hier die *CE on the chip* [308, 309]. Mit Hilfe dieser miniaturisierten Kapillarelektrophorese-Geräte wurde bereits von der Auftrennung komplexer Stoffgemische in weniger als einer Minute berichtet.

Prinzipiell denkbar wäre auch der Einsatz der IR-Spektroskopie, um die GMD-Reaktion verfolgen zu können. Im Laufe der enzymatischen Umsetzung wird an C-4 der Mannose eine C=O-Doppelbindung generiert, die sich durch eine spezifische Bande im IR-Spektrum auszeichnen sollte. Mit Hilfe dieser Technik könnte möglicherweise eine *online*-Analytik für die Reaktion etabliert werden.

8.2 Enzymgewinnung

8.2.1 Fermentation der rekombinaten *E. coli*-Stämme

Die drei Enzyme GMD, GFS und FucT konnten durch Fermentation der entsprechenden rekombinanten *E. coli*-Stämme für die weiteren enzymatischen Arbeiten zugänglich gemacht werden. An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass die Lagerstabilität der rekombinanten Stämme für GMD und GFS begrenzt war. In der Regel war eine zeitnahe Transformation der kompetenten Zellen vor einer Fermentation notwendig.¹

Die Fermentationsprozesse sind hinsichtlich ihrer Produktivität an Biomasse vergleichbar, jedoch schwankt die Ausbeute an Enzymaktivität pro Biofeuchtmasse sehr stark. Tabelle 8.1 verdeutlicht dies.

Enzym	Produktivität der rek. <i>E. coli</i> -Stämme	
	Biomasse [g/L Kulturbrühe]	Enzymaktivität [U/g Biofeuchtmasse]
GMD	20,0	10-26
GFS	15,3	65
FucT	19,0	0,072

Tabelle 8.1: Kennzahlen der Fermentationen von GMD, GFS und FucT.
GMD und GFS: Enzymaktivität im Rohextrakt; FucT: Aktivität der permeabilisierten Zellen.

Mit 65 U/g Zellen ist die Produktivität der GFS-rek. Zellen am höchsten. Für die GMD liegt sie mit 10-26 U/g schon deutlich darunter. Dies kann vor allem auf die Beobachtung zurückgeführt werden, dass die GMD größtenteils als unlösliches Protein (*inclusion bodies*)

¹Dr. Stefan Weidner, persönliche Mitteilung.

exprimiert wird, welches durch das verwendete Aufreinigungsprotokoll nicht zugänglich ist. Im Falle der GFS ist die Bildung von unlöslichem Protein in der Zelle nicht so stark ausgeprägt [310]. Die Expressionsraten der FucT sind prinzipiell sehr gering. Um große Mengen dieses Enzyms gewinnen zu können, ist eine deutliche Verbesserung der Expression löslichen Proteins zwingend notwendig.

Die Fermentationsverfahren zur Gewinnung der drei Enzyme sind bisher nicht optimiert worden, eine weitere Erhöhung der Ausbeuten ist somit durch Parameteroptimierung (z.B. Induktionszeitpunkt, IPTG-Konzentration, Temperatur etc.) sicherlich möglich. Dennoch waren die genutzten Fermentationsverfahren bereits in der Lage, Zellmaterial und Enzymaktivitäten in ausreichenden Mengen zu liefern.

8.2.2 Enzymaufreinigung

GDP- α -D-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD)

Das Enzym konnte in seiner nativen Form mittels Anionenaustausch-Chromatographie an Q-Sepharose FF erfolgreich partiell aufgereinigt werden. Eine solche Aufreinigung des Enzyms ist bisher nicht publiziert. Die Gesamtausbeute der Aufreinigung über die Schritte *Aufschluß der Zellen* \rightarrow *Chromatographie* \rightarrow *Ultrafiltration* lag in einem Bereich von 50 bis sehr guten 80%.

Im Laufe der Untersuchungen zur Expression und Aufreinigung des Enzyms wurde die GDP- α -D-Mannose-4,6-Dehydratase auch in Form eines N-terminal His-*tag*-tragenden Proteins kloniert und erfolgreich in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert [310]. Versuche zur Aufreinigung dieser Varianten erfolgten analog zum Protokoll der GFS-Aufreinigung. Es zeigte sich jedoch, dass das Enzym während der Aufreinigung mittels **Immobilisierter-Metallionen-Affinitäts-Chromatographie** (IMAC) sehr schnell desaktivierte. Nähere Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Gegenwart von Imidazol und zweiwertiger Metallionen (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} oder Co^{2+}) Ursache dieser Desaktivierung sind [310].

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass diese Variante der GMD aktiv in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert werden kann, da ein entsprechender Rohextrakt etwa die gleiche Aktivität zeigt wie das native, nicht *getaggte* Enzym. Diese Beobachtung ist bemerkenswert, steht sie doch im Widerspruch zu einer Publikation der Gruppe um Prof. Piepersberg [140]. Darin wird der His-*tag* selbst für die inaktive Überexpression der GMD im Produzenten verantwortlich gemacht. Bei diesen Arbeiten wurde jedoch ein imidazolhaltiger Aufschlußpuffer verwendet, der, wie oben beschrieben, zu einer Desaktivierung des Enzyms führt.

Die alternative Gewinnung der GMD in der nativen Form mittels Anionenaustausch-Chromatographie lieferte eine Enzympräparation, die als 50%ige Glycerin-Präparation bei -20°C über mehrere Monate stabil ist. Die SDS-PAGE-Analyse zeigte, dass neben dem Enzym noch andere Fremdproteine Bestandteil der Präparation sind.

Eine weitere Feinreinigung wäre durch einen weiteren chromatographischen Schritt denkbar. Zur Aufreinigung NAD- bzw. NADP-bindender Enzyme existieren Chromatographie-Materialien, welche durch Immobilisierung spezieller Farbstoffe, die eine ähnliche Ladungsverteilung wie NAD bzw. NADP aufweisen, selektiv diese Enzyme binden können.¹ Die Farbstoffmoleküle besetzen dabei bevorzugt die Bindungstasche, die in der Katalyse durch den Cofaktor besetzt wird.

¹So wird z. B. *Blue Sepharose* (Farbstoff: Cibacron Blue F3G-A) oder *Red Sepharose* (Farbstoff: Procion HE-3B) häufig zur Aufreinigung NAD- und NADP-bindender Enzyme eingesetzt.

Erste Versuche zur Aufreinigung der GMD mittels *Blue Sepharose* aus dem Rohextrakt zeigten, dass eine selektive Bindung des Enzyms an den Träger möglich ist. Auch wurde dieses Material bereits für die Aufreinigung einer GMD aus *Klebsiella pneumoniae* eingesetzt [193]. Da die GMD den Cofaktor bei der Aufreinigung an Q-Sepharose FF verliert und als Apoenzym vorliegt, erscheint eine anschließende Affinitäts-Chromatographie als durchaus aussichtsreich, da nun alle Bindungstaschen der GMD durch den Farbstoff belegt werden können. Die Bindung großer Mengen GMD an die Matrix wäre die Folge. Proteine, die keine Bindungstaschen für den Cofaktor besitzen, werden nicht gebunden. Die abschließende Elution des Enzyms würde die GMD in deutlich reinerer Form liefern. Das Konzept einer solchen Feinreinigung der GMD zeigt Abbildung 8.1. Im Falle von [193] konnte mit einem ähnlichen Konzept für den Schritt der Affinitäts-Chromatographie ein Aufreinigungsfaktor größer 15 erreicht werden.

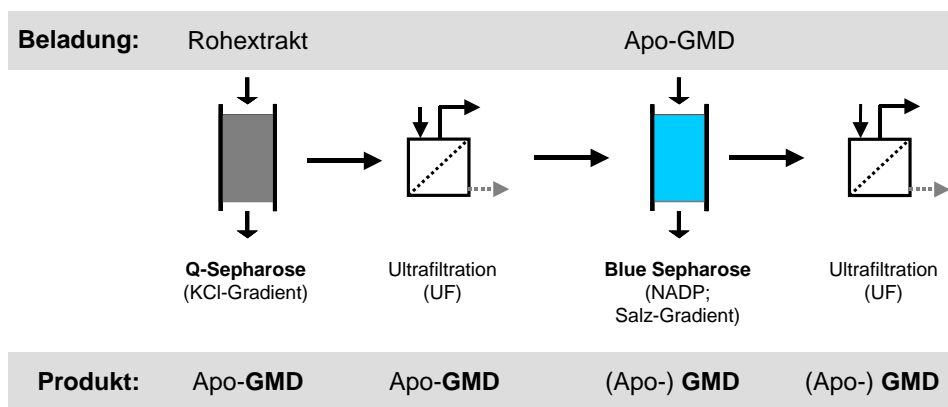


Abbildung 8.1: Strategie zur Feinreinigung der GMD mit den Chromatographie-Schritten *Q-Sepharose* und *Blue Sepharose*.
Aus Kostengründen sollte bei der *Blue Sepharose* eine Salzelution der Elution mit NADP vorgezogen werden.

GDP- β -L-Fucose-Synthetase (GFS) und α 1,2-Fucosyltransferase (FucT)

Wie auch im Falle der GMD ist die Vermeidung der Proteinausfällung während der Ultrafiltration zwingend notwendig, um die Ausbeuten der Enzymaufreinigung von GFS und FucT zu verbessern. Der Einsatz leistungsfähiger Module mit hohen Permeatflüssen ist ein sinnvoller, apparativer Ansatz.

Dennoch ist der Grund für die Bildung der Proteinniederschläge nicht bekannt. Ein Konzentrationseffekt kann ausgeschlossen werden, da dieses Phänomen auch bei deutlich geringerer Beladung der Chromatographie-Säule mit Rohextrakt beobachtet wurde. Für beide Enzyme müsste daher eine individuelle Optimierung des IMAC-Aufreinigungsprotokolls durchgeführt werden. Zu untersuchende Parameter wären hier Temperatur, pH-Wert, Imidazol-Konzentration, Einfluss des Puffers und entsprechende Additive. Auf diese Weise könnte ein Protokoll erarbeitet werden, welches die schnelle Desaktivierung von GFS und FucT durch Proteinniederschlag zumindest deutlich verlangsamt.

Ein anderer Ansatz wäre sicherlich die Überexpression der beiden Enzyme entweder in ihrer nativen Form oder alternativ die Konstruktion entsprechend *getaggtter* Varianten. Ziel müsste es dabei sein - bei gleichzeitiger hoher Stabilität der Enzyme - ein einfaches und schnelles Aufreinigungsprotokoll etablieren zu können. Für native Fucosyltransferasen ist eine Vielzahl von Aufreinigungsmethoden beschrieben; zu erwähnen ist besonders die Affinitäts-Chromatographie an GDP-Sepharose [78, 267, 311].

8.3 Enzymkinetik

8.3.1 Kinetik der GDP- α -D-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD)

In Kapitel 5.2 wurden die relevanten kinetischen Parameter der GMD-Reaktion bestimmt. Die Analyse ergab, dass die Geschwindigkeit der GMD-Reaktion GDP-Man \rightarrow GKDM zum einen von der GDP-Man-Konzentration entsprechend einer Sättigungskinetik abhängt, zum anderen aber auch dass die beiden Cofaktoren NADP und NADPH einen wesentlichen Einfluss auf die Umsetzungsgeschwindigkeit besitzen. So resultieren je nach verwendetem Cofaktor unterschiedliche Werte für V_{max} . Darüberhinaus existieren auch für NADP und NADPH jeweils Sättigungskinetiken. Die unterschiedlichen K_M -Werte zeigten, dass die GMD eine höhere Affinität zum reduzierten Cofaktor NADPH besitzt.

Das besondere Merkmal der GMD-Reaktion - das Auftauchen einer *lag*-Phase zu Beginn der GDP-Man-Umsetzung - konnte in einem ersten Ansatz durch ein einfaches kinetisches Modell beschrieben werden. Zentraler Punkt des Modells ist die zeitabhängige Aktivierung des Enzyms durch die Cofaktoren. Durch die Formulierung von Aktivitätsänderungsgeschwindigkeiten, die Cofaktor-abhängig sind, kann das Modell variable, maximale Enzymaktivitäten bzw. Geschwindigkeiten der Produktionsreaktion ($V_{Prod,max}$, V_{Prod}) berechnen. Dadurch gelingt auch in der Simulation die Beschreibung einer *lag*-Phase sowie die Vorhersage einer Reaktionsbeschleunigung bei Anwesenheit von NADPH.

Zur Anpassung berechneter Reaktionsverläufe an experimentelle Daten musste der Anpassungsparameter $A_{max,NADP}$ stets optimiert werden. Dieser Parameter gibt die maximale, nominelle Größe der jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeiten $V_{Prod,NADP}$ bzw. $V_{Prod,NADPH}$ vor. Daneben wurden bei den Anpassungen auch die Parameter der NADPH-Oxidation ($k_{des,NADPH}$) sowie die Desaktivierung des Produktes GKDM ($k_{des,GKDM}$) optimiert. Das Modell ist dann in der Lage, die experimentellen Reaktionsverläufe mit einer Korrelation von >99% sehr gut wiederzugeben.

Allerdings soll nicht unerwähnt bleiben, dass dieser formalkinetische Ansatz auch Schwächen besitzt.

- Die Notwendigkeit, den Parameter $A_{max,NADP}$ stets anpassen bzw. optimieren zu müssen, zeigt, dass eine "echte" Simulation von Reaktionen mit dem Modell nicht möglich ist. Ursache ist, dass mit diesem Modell lediglich die Cofaktorabhängigkeit der Bildungsgeschwindigkeit von $V_{Prod,max}$ beschrieben wird, nicht jedoch die Cofaktorabhängigkeit der Produktionsreaktion. Diese ist in dem (optimierten) Wert für $A_{max,NADP}$ "enthalten". Die Absolutgröße von $V_{Prod,max}$ wird durch $A_{max,NADP}$ vorgegeben. Bei Anwesenheit von NADP und NADPH kann $V_{Prod,max}$ maximal doppelt so groß werden wie $A_{max,NADP}$, da eine Parallelaktivierung der GMD durch NADP bzw. NADPH postuliert wird und $V_{Prod,max}$ als die Summe aus einmal $V_{Prod,NADP}$ und einmal $V_{Prod,NADPH}$

festgelegt wurde. Diese Postulierung ist vermutlich eine sehr starke Vereinfachung der tatsächlichen Prozesse der Enzymaktivierung durch die Cofaktoren.

- Das Modell besitzt zudem nur eine eingeschränkte Gültigkeit in einem definierten Parameterraum. Bei Substratkonzentrationen größer 1 mM kann die auftretende Produktinhibierung durch GKDM nicht mehr vernachlässigt werden.

Da die Enzymaktivierung auf molekularer Ebene bisher nicht verstanden worden und ein experimenteller Zugang zur Quantifizierung aller auftretenden reaktiven Spezies im Laufe des Katalysezyklus nicht möglich ist, kann das Modell nur auf der Datenbasis beruhen, welche mit den in Kapitel 3 beschriebenen analytischen Methoden zugänglich ist. Die Quantifizierung aller reaktiven Spezies - etwa mit der Massenspektrometrie - würde eine genauere Modellierung der GMD-Reaktion ermöglichen.

Vergleich der kinetischen Parameter der GMD

Die GMD und die Reaktion, die dieses Enzym katalysiert, sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Die in dieser Arbeit gemessenen kinetischen Parameter der GMD sollen daher mit bereits publizierten Werten verglichen werden.

Quelle GMD	V_{max} [mU/mg]	K_M [μ M]			K_I [μ M]		Ref.
		GDP-Man	NADP	NADPH	GKDM	GDP-Fuc	
<i>E. coli</i>	420-1150 ¹	268 ± 82	240 ± 42	16,2 ± 2,5	473 ± 76	4,6 ± 3,3	diese Arbeit
<i>E. coli</i>	38 ± 3,3	222 ± 44	-	-	-	-	[195] ^a
<i>E. coli</i>	730	260	-	-	-	10 (=IC ₅₀)	[166] ^b
<i>E. coli</i>	-	280 ± 12	38 ± 2	-	-	78,9 ± 10,1	[200] ^c
Mensch							
L-Form	632 ± 43	3,64 ± 1,2	-	-	-	11,3 ± 1,7	[247] ^d
M-Form	667 ± 108	3,50 ± 0,7	-	-	-	11,3 ± 1,7	[247] ^d
Mensch	110	80	-	-	-	75 (=IC ₅₀)	[166] ^b
Schwein	-	3,3	-	-	-	-	[136] ^e

¹ V_{max} variiert je nach verwendetem Cofaktor (siehe Tabelle 5.2).

^a GST-Fusionsprotein, Bed.: 50 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM MgCl₂, T = 37°C.

^b Stimulierung der GMD-Reaktion durch NADPH beschrieben (*E. coli*: 3,3-fach, Mensch: 4,5-fach).

Bed.: 25 mM MOPS, pH 7, 100 mM NaCl, 10 mM DTT, 5 mM EDTA, 1 mM NADP, T = 37°C.

^c Bed.: 100 mM MOPS, pH 7, 100 mM NaCl, 10 mM DTT, 5 mM EDTA, 1 mM NADP, T = 37°C.

^d Humane cDNA kodiert für drei Formen der GMD. Nur die L- und M-Form konnten als lösliche, aktive Proteine exprimiert werden. Bed.: 100 mM NaP_i, pH 8, 2 mg/mL BSA.

^e Bed.: 50 mM Tris-HCl, pH 8,2, 0,5 mM DTT, T = 37°C.

Tabelle 8.2: Vergleich der kinetischen Parameter der GMD mit Literaturdaten.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Werte sind **fett** dargestellt.

Die Literaturwerte wurden unter verschiedenen Reaktionsbedingungen gewonnen; zudem sind die eingesetzten Assay-Methoden unterschiedlich (siehe dazu auch Kapitel 3.1). Dennoch lohnt ein Vergleich der Daten, da sich aus ihm generelle Aussagen ableiten lassen. Tabelle 8.2 auf der vorherigen Seite fasst die Daten zusammen. Es fällt auf, dass in der Literatur bisher vor allem der K_M -Wert für GDP-Man, entsprechende V_{max} -Werte sowie Inhibierungskonstanten für GDP-Fuc bestimmt wurden. Da die Literatur den Cofaktor NADP als eine Art "prothetische Gruppe" auffasst, wird die GMD-Reaktion in der kinetischen Analyse als Einstufenreaktion betrachtet, die auf einer einfachen *Michaelis-Menten*-Kinetik fusst. GDP-Man ist dann das einzige Substrat. Lediglich Somoza *et al.* [200] geben einen K_M -Wert für NADP an.

Der in dieser Arbeit bestimmte K_M -Wert für GDP-Man liegt mit 268 μM in der selben Größenordnung wie die publizierten Werte für das *E. coli*-Enzym (222-280 μM). Für das humane Enzym und das Enzym aus Schwein (Schilddrüse) werden deutlich kleinere K_M -Werte gemessen. Offensichtlich zeigen die "Säuger"-Enzyme generell eine höhere Affinität zum natürlichen Substrat GDP-Man als das bakterielle Enzym aus *E. coli*.

Die V_{max} -Werte zeigen keinen eindeutigen Trend; die GMD-Präparationen liegen zudem in sehr unterschiedlichen Reinheiten vor. Im Rahmen der eigenen Arbeit konnte eine Abhängigkeit von V_{max} hinsichtlich der eingesetzten Cofaktoren beobachtet werden. Sullivan *et al.* [166] konnten ebenfalls einen Einfluss von NADPH auf die Reaktionsgeschwindigkeit ("stimulation") nachweisen. Eine Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der NADPH-Konzentration wurde jedoch nicht publiziert.

Bereits in den sechziger Jahren wurde die *feedback*-Inhibierung der GMD durch GDP-Fuc beschrieben [141]. Dieser Mechanismus ist in der Lage, den Bedarf an GDP-Fuc an verschiedenen Orten eines Organismus wirkungsvoll zu steuern. In der Literatur findet sich daher eine Vielzahl von Inhibierungswerten, ausgedrückt als K_I - oder IC_{50} -Wert¹. Die publizierten Daten liegen alle im $\mu\text{molaren}$ Bereich. Der eigene Wert von 4,6 μM ist der kleinste und zeigt die starke, inhibierende Wirkung der GDP-Fuc auf die GMD.

In der vorliegenden Arbeit wurde der *Michaelis-Menten*-Term der Produktionsreaktion **GDP-Man** \rightarrow **GKDM** mit zwei Termen verknüpft, welche die Cofaktorabhängigkeit der GMD-Reaktion beschreiben. Im kinetischen Modell folgen die Terme für NADP und NADPH ebenfalls einer Sättigungskinetik. Die K_M -Werte für NADP ($240 \pm 42 \mu\text{M}$) und NADPH ($16,2 \pm 2,5 \mu\text{M}$) lassen den Schluss zu, dass die reduzierte Form des Cofaktors eine weitaus höhere Affinität zur GMD aufweist als die oxidierte Form. Für die ermittelten Werte K_M (NADPH) und K_I (GKDM) existieren in der Literatur bisher keine Daten.

8.3.2 NMR-Untersuchungen zum GMD-Reaktionsmechanismus

Wie bereits erwähnt, sind der Nachweis und die Quantifizierung der auftretenden, reaktiven Spezies im Laufe eines Katalysezyklus experimentell bisher nicht realisierbar. Die Formulierung eines Reaktionsmechanismus der GMD-Reaktion wie in [199] und [200] muss daher noch immer als wissenschaftliches Postulat verstanden werden. Immerhin konnte die postulierte Stufe eines 5,6-Mannosens (siehe Abbildung 5.2 auf Seite 60) bereits für die nahezu identische Reaktion mit dTDP-D-glucose nachgewiesen werden [282, 283].

Im Rahmen eigener NMR-Messungen² zur eindeutigen Charakterisierung des Produkts der

¹ IC_{50} = *inhibitory concentration 50%*, Inhibitor-Konzentration, die zu einer 50%igen Inhibierung führt.

²in Kooperation mit dem Institut für Organische Chemie der Universität Hannover.

GMD-Reaktion (GKDM) konnten erstmalig wichtige Hinweise anhand von NMR-Daten gewonnen werden, die den postulierten Reaktionsmechanismus stützen.

In Kapitel 5.3.1 wird die Synthese und Charakterisierung von GKDM beschrieben. Bei der NMR-Analyse des Produkts stellte sich heraus, dass GKDM in zwei Formen vorliegt: in der Keto-Form sowie in einer Ketohydrat-Form. Diese Experimente widerlegen die publizierte Vermutung, dass neben der 4-Ketoverbindung auch ein 3-Ketoprodukt im Laufe der Reaktion gebildet werden kann [166]. Der dort gezogene Rückschluss auf die 3-Ketoverbindung basiert auf unvollständigen NMR-Daten: die chemischen Verschiebungen entsprechen zwar denen der hier identifizierten Ketohydratverbindung, jedoch waren in [166] die ^{13}C -NMR-Daten nicht vollständig. Nur die Kenntnis aller NMR-Verschiebungen belegt eindeutig die Existenz einer Hydratverbindung - und keiner weiteren Ketokomponente.

Der postulierte Mechanismus der GMD-Reaktion sagt voraus, dass das Proton an der Position 5 des Hexoserings während eines Katalysezyklus ausgetauscht wird. Das ausgetauschte Proton muss nach diesem Mechanismus-Modell aus dem Lösungsmittel (Wasser) stammen. Zur Überprüfung dieses Postulats wurde daher die GMD-Reaktion einmal in Wasser und einmal in D_2O durchgeführt. Je nach Lösungsmittel trägt das Produkt an C-5 dann entweder ein Wasserstoff- oder ein Deuterium-Atom. Abbildung 8.2 verdeutlicht dies. Die beiden Spezies sollten im NMR-Spektrum anhand der Signale für H-6'' und H-5'' zu unterscheiden sein. In beiden Fällen wird das Produkt GKDM wiederum in der Keto- wie auch in der Ketohydrat-Form vorliegen.

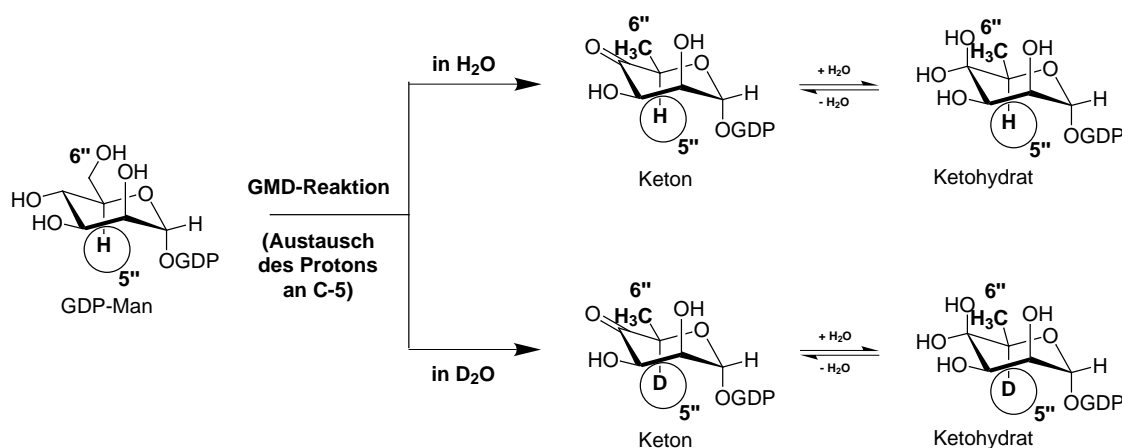


Abbildung 8.2: Mögliche Reaktionsprodukte der GMD-Reaktion in Wasser bzw. D_2O . In beiden Fällen wird das Produkt (GKDM) in der Keto- wie auch in der Ketohydratform vorliegen.

Abbildung 8.3 auf der nächsten Seite zeigt die NMR-Signale für H-6'' und H-5'' von Keto und Ketohydrat, wenn die Reaktion in Wasser durchgeführt wird. Wie erwartet, sind für die Methylprotonen an C-6'' zwei Dubletts zu erkennen (linkes Bild). Das stärkere Signal (1.24 ppm) zeigt die $-\text{CH}_3$ -Gruppe der Ketoverbindung, das Signal bei 1.22 ppm zeigt die Methylgruppe des Ketohydrats. Beide Signale erscheinen als Dubletts, da die Methylprotonen mit dem Wasserstoffatom an C-5'' koppeln. Entsprechend sind die Signale für die H-5''-Protonen als deutliche Quartetts zu erkennen (rechtes Bild, eingekreiste Signale; Keto: 4.70 ppm, Ketohydrat: 4.07 ppm). Die Signale erscheinen als Quartetts, da die Protonen an C-5'' mit den drei Protonen der Methylgruppe koppeln.

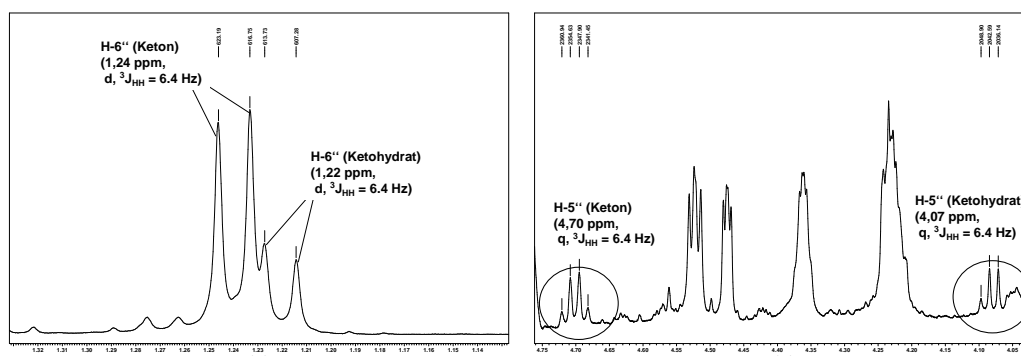


Abbildung 8.3: NMR-Signale für H-5'' und H-6'' von GKDM. Erklärungen siehe Text. Die GMD-Reaktion wurde in **Wasser** durchgeführt.

Bei einem Austausch des Wasserstoffatoms an C-5'' muss bei der Reaktion in D₂O diese Position deuteriert sein. Dieser H/D-Austausch ist im entsprechenden NMR-Spektrum (Abbildung 8.4) deutlich zu erkennen: da an Position C-5'' kein Proton mehr vorhanden ist, zeigen die Methylprotonen an C-6'' keine Kopplung mehr. Die Signale der -CH₃-Gruppen für Keton und Ketohydrat erscheinen daher als Singulett (linkes Bild). Die Deuteriumatome an C-5'' ergeben im ¹H-NMR-Spektrum keine Signale, sie fehlen daher im Spektrum (rechtes Bild, leere Kreise).

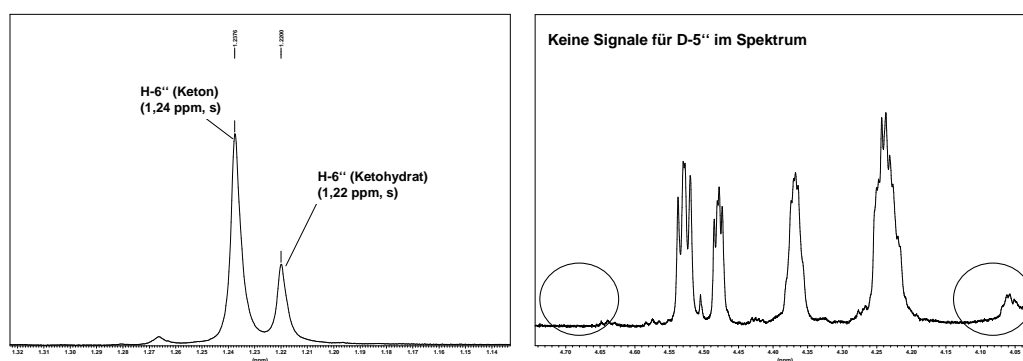


Abbildung 8.4: NMR-Signale für H-6'' von deuteriertem GKDM. Erklärungen siehe Text. Die GMD-Reaktion wurde in **D₂O** durchgeführt.

Diese Ergebnisse belegen, dass während des Katalysezyklus ein Austausch der Protonen an C-5'' erfolgt. In früheren Publikationen wurde der Beweis dafür bereits erbracht, indem an C-5''-Tritium-markierte GDP-Man mit der GMD umgesetzt wurde und Tritium-markiertes Wasser detektiert werden konnte [198] (siehe auch Kapitel 3.1). Jedoch gelang der Nachweis am nicht markierten Substrat mittels NMR bisher nicht.

Trotz der bisherigen Erkenntnisse über den Reaktionsmechanismus der GMD bleiben of-

fene Fragen bestehen. So kann beispielsweise die beobachtete Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit durch NADPH immer noch nicht erklärt werden. Ob der *exogen zugeführte* reduzierte Cofaktor einen Einfluss auf die Konformation des Enzyms besitzt oder am Katalysezyklus selbst beteiligt ist, bleibt zu klären. Versuche mit Deuterium-markiertem NADPH könnten hier eine Antwort geben. Nach wie vor höchst interessant ist die Antwort auf die Frage, ob eine Umsetzung von GDP-Man mit 100% reinem NADPH überhaupt möglich ist. Um diese Reaktionsbedingungen erfüllen zu können, müssen zwei Voraussetzungen gegeben sein:

1. NADP-freies NADPH muss verfügbar sein. Dieses könnte z.B. enzymatisch gewonnen werden.
2. Es muss eine GMD-Präparation vorliegen, die das Enzym in der Apoform enthält und frei von jeder NADPH-oxidierenden Nebenaktivität ist.

Können solche Bedingungen realisiert werden, so müsste, da der oxidierte Cofaktor NADP nicht vorhanden ist, dann eine Umsetzung von GDP-Man ausbleiben, wenn der postulierte Reaktionsmechanismus gültig ist.

8.3.3 Kinetik der GDP- β -L-Fucose-Synthetase (GFS)

In Kapitel 5.3.2 wurden die kinetischen Parameter für die GFS-katalysierte Umsetzung von GKDM zu GDP-Fuc für die beiden Cofaktoren NADPH bzw. NADH vorgestellt. Die Bestimmung der Parameter erfolgte auf der Basis eines makrokinetischen Modells, das aus zwei separaten *Michaelis-Menten*-Termen besteht und die auftretenden Produktinhibitionen ebenfalls berücksichtigt. Das Modell wird als *Doppelsubstratkinetik mit doppelter kompetitiver Produktinhibition* bezeichnet. Der Vergleich der Parametersätze zeigte, dass höhere V_{max} -Werte und kleinere K_M -Werte dann gemessen werden, wenn NADPH Cofaktor ist. Mit dem phosphorylierten Cofaktor sind zudem auch die beiden K_I -Werte für GDP-Fuc und NADP kleiner, wenn man sie mit den Werten für NADH als Cofaktor vergleicht. Die Bestimmung der kinetischen Parameter durch nicht-lineare Regression war notwendige Voraussetzung für die Simulation von *batch*-Versuchen.

Vergleich der kinetischen Parameter der GFS

Wie schon im Falle der GMD, sollen die in dieser Arbeit gemessenen kinetischen Parameter der GFS mit in der Literatur publizierten Werten verglichen werden. Die Ergebnisse der eigenen Messungen wurden in Kapitel 5.3.2.2 auf Seite 103 vorgestellt. Neben dem Vergleich der Parameter in Abhängigkeit des verwendeten Cofaktors (NADPH bzw. NADH), wurden dort auch die kinetischen Konstanten anhand experimentell durchgeführter *batch*-Experimente verifiziert.

Tabelle 8.3 auf der nächsten Seite stellt die eigenen ermittelten Parameter den bereits publizierten gegenüber. Auch im Falle der GFS muss dieser Vergleich unterschiedliche Reaktions- und Assaybedingungen berücksichtigen. Diese sind in den Fußnoten zu Tabelle 8.3 zusammengefasst.

Zunächst fällt auf, dass der kinetischen Charakterisierung des Enzyms mit NADH als Cofaktor bisher nur wenig Aufmerksamkeit geschenkt wurde. Für das Enzym aus *E. coli* ist bisher lediglich der K_M -Wert für NADH von Menon *et al.* [139] bestimmt worden. In der Literatur finden sich mehr Daten für die Umsetzung mit NADPH.

Die V_{max} -Werte für NADPH als Cofaktor variieren für das Enzym aus *E. coli* sehr stark. Dies kann vermutlich auf die unterschiedlichen Varianten des Enzyms (nativ oder *getaggt*) bzw. auf den unterschiedlichen Aufreinigungsaufwand zurückgeführt werden. Das Enzym mit der höchsten massenspezifischen Aktivität [139] wurde über drei Chromatographiestufen gewonnen, für die übrigen *E. coli*-Enzyme bestand die Aufreinigung lediglich aus einem chromatographischen Schritt. Leider lassen sich die von Piepersberg *et al.* [140] angegebenen Werte nur schwer mit den eigenen vergleichen. Der Vergleich wäre interessant, da auch dort ein N-terminal His-*tag* tragendes Protein eingesetzt wurde. Jedoch liegen die Sättigungskonzentrationen der kinetischen Messungen bei etwa $100 K_M$; in diesem Bereich ist eine Substratüberschußinhibition für NADH belegt [137] und kann auch für NADPH nicht ausgeschlossen werden.

NADPH als Cofaktor

Quelle	V_{max} [U/mg]	K_M [μ M]		K_I [μ M]		Ref.
		GKDM	NADPH	GDP-Fuc	NADP	
<i>E. coli</i>	$0,31 \pm 0,01^1$	12 ± 2	32 ± 5	8 ± 2	21 ± 5	diese Arbeit
<i>E. coli</i>	$363,5 \pm 21,2$	$29 \pm 1,4$	$9 \pm 0,8$	$55,3 \pm 3,9$	$69,3 \pm 5,9$	[139] ^a
<i>E. coli</i>	$0,6 / 1,38^2$	40	21	-	-	[140] ^b
<i>E. coli</i>	$12,3 \pm 0,3$	$38,6 \pm 4,4$	$14,1 \pm 1,3$	-	-	[194] ^c

NADH als Cofaktor

Quelle	V_{max} [U/mg]	K_M [μ M]		K_I [μ M]		Ref.
		GKDM	NADH	GDP-Fuc	NAD	
<i>E. coli</i>	$0,21 \pm 0,01^1$	21 ± 3	65 ± 9	25 ± 4	800 ± 200	diese Arbeit
<i>E. coli</i>	$6,6 \pm 2$	-	$108,8 \pm 9$	-	-	[139] ^a
<i>E. coli</i>	60% von $V_{max, NADPH}$	-	-	-	-	[140] ^b
Schwein ³	-	14	23	-	-	[137] ^d

¹ c (Protein) = 0,39 mg/mL (Bradford), ² Je ein V_{max} -Wert pro Substrat angegeben, ³ Schilddrüse.

^a native Sequenz; Bed.: 100 mM MOPS, pH 7, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM DTT, T = 37°C.

^b His-*tag* (N-terminal); Bed.: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, T = 37°C.

^c prozessiertes GST-Fusionsprotein; Bed.: 50 mM Tris-HCl, pH 7, 150 mM NaCl, 2,5 mM MgCl₂, T = 25°C.

^d natives Enzym, Assay mit radioaktiv markierten Substraten.

Bed.: Tris-HCl Puffer, pH 7, T = 37°C.

Tabelle 8.3: Vergleich der kinetischen Parameter der GFS mit Literaturdaten.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Werte sind **fett** dargestellt. Die kinetischen Parameter der *E. coli*-Enzyme wurden alle durch Absorptionsabnahme bei 340 nm bestimmt.

Sowohl die eigenen als auch die publizierten K_M - und K_I -Werte von Substraten und Produkten liegen im mikromolaren Bereich. Bemerkenswert erscheint jedoch, dass bei allen publizierten kinetischen Messungen mit der GFS aus *E. coli* der K_M -Wert für GKDM größer als derjenige für NADPH ist, während dies bei den eigenen Ergebnissen genau umgekehrt ist. Diese Beobachtung kann möglicherweise mit den unterschiedlichen Methoden der Substrat- (GKDM-) Gewinnung erklärt werden. In der vorliegenden Arbeit konnten alle kinetischen Experimente mit der gleichen Substratcharge durchgeführt werden. Die Reinheit von GKDM betrug über den ganzen Zeitraum über 95% (HPLC bzw. CE-Analytik). In der Literatur finden sich dazu keinerlei Angaben, jedoch wird dort ausdrücklich auf die bekannte Instabilität von GKDM hingewiesen.

Daten zur Produktinhibierung der GFS finden sich nur in [139]. Dort ist sie - bei Verwendung von NADPH als Cofaktor - um einen Faktor von 7 (K_I -Wert für GDP-Fuc) bzw. 3 (K_I -Wert für NADP) schwächer ausgeprägt als in der vorliegenden Arbeit.

Unterschiede zeigen sich auch beim Vergleich der maximalen Aktivitäten je nach verwendetem Cofaktor: Sullivan *et al.* [139] beobachten nur 2% von V_{max} bei Verwendung von NADH anstelle von NADPH, während bei Piepersberg *et al.* [140] 60% und bei den eigenen Messungen 66% erreicht wurden.

Für die gemessenen Werte $K_I(\text{GDP-Fuc})$ und $K_I(\text{NAD})$ gibt es keine vergleichbaren Daten.

8.4 Syntheseverfahren zur Gewinnung von GDP-Fuc

In Kapitel 6 wurden zwei Verfahren zur Synthese von GDP-Fuc vorgestellt. Im diskontinuierlichen Prozess wird das Substrat GDP-Man im *batch*-Verfahren zum Ketoprodukt GKDM umgesetzt und dieses anschließend im *repetitive batch* weiter zum Endprodukt GDP-Fuc. Das Reaktorkonzept einer zweistufigen Rührkessel-Kaskade erlaubt die kontinuierliche Synthese von GDP-Fuc ausgehend von GDP-Man und dem notwendigen Cofaktor.

An dieser Stelle sollen die vorgestellten Prozesse unter folgenden Gesichtspunkten diskutiert werden:

- Evaluierung der Verfahren hinsichtlich Raum-Zeit-Ausbeute und Enzymverbrauch und Vergleich mit Literaturdaten.
- Erklärung der beobachteten GMD-Nebenreaktion im kontinuierlichen Verfahren.
- Optimierungspotentiale im kontinuierlichen Verfahren.

8.4.1 Evaluierung der Verfahren

Wichtige Kennzahl jeder (chemischen) Synthese ist die volumetrische Produktivität einer Reaktion.¹ Diese wird in der Regel durch die Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) ausgedrückt und bezeichnet die maximal zugängliche Produktmenge pro Volumen und Zeit. Diese Größe kann für alle chemischen Reaktionen ermittelt werden.

Bei katalytischen Umsetzungen interessiert zudem die Menge des Katalysators, die notwendig ist, um eine bestimmte Produktmasse zugänglich zu machen. Dabei kann es sich um einen chemischen oder um einen biologischen Katalysator handeln. Werden (isolierte) Enzyme als Katalysator eingesetzt, so wird meist der Produktmengen-spezifische Enzymverbrauch angegeben. Dieser bezeichnet die erforderliche Enzym**aktivität** pro Gramm Produkt.

Tabelle 8.4 auf der nächsten Seite fasst die Raum-Zeit-Ausbeuten für GDP-Fuc sowie den Produktmengen-spezifischen Enzymverbrauch für die beiden Prozesse der vorliegenden Arbeit zusammen und vergleicht sie, sofern sinnvoll, mit anderen, publizierten Verfahren. Neben der enzymatischen Synthese werden auch chemische Wege zur Bereitstellung von GDP-Fuc berücksichtigt. Sicherlich ist dieser Vergleich nur eingeschränkt zulässig, da eine Gegenüberstellung von Enzymologie und Chemie weiter gefasst werden müsste. Andererseits soll diese Zusammenstellung einen Überblick über die heutigen Möglichkeiten der GDP-Fuc-Gewinnung geben und die eigenen Ergebnisse in diesem Zusammenhang bewerten. Auf die chemische Synthese von GDP-Fuc wurde bereits in Kapitel 1 eingegangen.

¹Auf andere wichtige Kennzahlen chemischer Reaktionen wie Atomökonomie oder *environmental quotient* (E-Faktor) sei hingewiesen [312]. Auf sie wird hier aber nicht eingegangen.

Verfahren	RZA ^a	EV ^b
	[g/(L·d)]	[U/g] bzw. [g/g] ^c
Kontinuierliches Verfahren , Kap. 6.5 2-stufige Rührkessel-Kaskade GMD: EMR GFS: EMR	6,8	2,8 U/g 1,6 U/g
Diskontinuierliches Verfahren , Kap. 6.4 GMD: <i>batch</i> GFS: <i>rep. batch</i> (integrierte Cofaktorregenerierung)	18,0	75 U/g 41 U/g
Piepersberg <i>et al.</i> , Referenz [140] GMD: <i>batch</i> GFS: <i>batch</i> , Überschuß NADPH	156,0	90 U/g 90 U/g
Kyowa Hakko , Referenz [169] und Kap. 1.4.2 Ganzzellbiotransformation, <i>batch</i> -Verfahren 1. Schritt: GMD rek. <i>E. coli</i> -Zellen 2. Schritt: GFS rek. <i>E. coli</i> -Zellen	20,0	0,75 g/g 1 g/g
Chemische Synthese, Referenzen [151–154] Morpholidat-Methode	2,1 - 8,9	-/-
Chemische Synthese, Referenzen [157, 158] Optimierte Methoden	28,5 - 42,5	-/-

^a RZA = Raum-Zeit-Ausbeute (GDP-Fuc)

^b EV = Enzymverbrauch

^c [g/g] entspricht m(Biofeuchtmasse)/m(Produkt)

Tabelle 8.4: Übersicht der Raum-Zeit-Ausbeuten sowie des Enzymverbrauchs verschiedener Verfahren zur Synthese von GDP-Fuc.

Die Raum-Zeit-Ausbeuten der chemischen Verfahren beziehen sich auf den eigentlichen Kopplungsschritt innerhalb der mehrstufigen Synthesen (vgl. Abbildung 1.10 auf Seite 17).

Tabelle 8.4 zeigt die Kennzahlen vier verschiedener enzymatischer Verfahren, die jedoch alle auf dem gleichen Syntheseweg beruhen, da bei allen gezeigten Prozessen die Enzyme GMD und GFS aus *E. coli* zum Einsatz kommen. Beim Verfahren von *Kyowa Hakko* handelt es sich um eine Ganzzellbiotransformation mit ruhenden, permeabilisierten Zellen.

Ein direkter Vergleich der eigenen Prozesse mit den Daten aus der Literatur ist nur für das Verfahren der Arbeitsgruppe Piepersberg möglich, da hier ebenfalls die partiell aufgereinigten *E. coli*-Enzyme zum Einsatz kamen. Die GMD wurde in Form eines Rohextraktes eingesetzt, die GFS konnte als His-tag-Protein aufgereinigt werden.

Die sehr hohe Raum-Zeit-Ausbeute von 156 g/(L·d) kann auf der Basis der eigenen Erkenntnisse über diese Enzyme nicht nachvollzogen werden. So wird beschrieben, dass die Umsetzung GKDM \rightarrow GDP-Fuc bei Substratkonzentrationen von über 20 mM durchgeführt wurde. NADPH wurde dazu noch im Überschuß eingesetzt. Die hohe RZA für diesen Syntheseschritt steht im Widerspruch zur starken Produktinhibierung der GFS durch GDP-Fuc und NADP. Zwar ist der Produktmengen-spezifische Enzymverbrauch mit 90 U/g ebenfalls sehr hoch, eine Extrapolation der eigenen Daten mit dieser Enzymkonzentration ist jedoch

bei weitem nicht in der Lage, solch hohe Raum-Zeit-Ausbeuten zu erzielen.

Die Tabelle zeigt, dass die eigenen Verfahren mit dem Prozess von Kyowa Hakko durchaus konkurrieren können. Beim diskontinuierlichen Prozess werden annähernd gleiche Raum-Zeit-Ausbeuten erzielt. Die kontinuierliche Reaktionsführung ist weniger produktiv, jedoch kann der Enzymverbrauch um den Faktor 25 gesenkt werden. Jedoch ist auch hier ein Vergleich der Produktivitäten nur bedingt zulässig. Beim Verfahren von Kyowa Hakko sind die Ausgangsstoffe Mannose und GMP, neben einigen anderen Zusätzen zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels der Zellen. Die eigenen Arbeiten betrachten dagegen die definierte Umsetzung der GDP-Man zu GDP-Fuc. Im Ganzzell-Verfahren ist diese Reaktionsfolge nur der letzte Teil einer ganzen Reaktionskaskade (vgl. Abbildung 1.11 auf Seite 18). Für eine umfassende Beurteilung der verschiedenen Prozesse hinsichtlich Produktivität und Wirtschaftlichkeit müssten daher die Gesamt-Prozesse betrachtet werden. Die dafür notwendigen Daten sind jedoch nur sehr begrenzt zugänglich bzw. gar nicht bekannt. Darüberhinaus gestalten sich die Verfahren zur Produktaufarbeitung im Anschluss an die Produktions-Prozesse sehr unterschiedlich. Auch wenn keine genauen Kenntnisse zur Aufreinigung der GDP-Fuc aus dem Ganzzell-Ansatz von Kyowa Hakko bekannt sind, so kann doch gemutmaßt werden, dass sich die Isolierung des Nucleotidzuckers schwierig gestaltet. In der Tat ist dieser Prozess-Schritt der Kosten-intensivste im gesamten Verfahren.¹ Auf eine ökonomische Beurteilung der Gesamt-Prozesse wird aufgrund der o.g. Schwierigkeiten an dieser Stelle verzichtet.

Die wesentlichen Nachteile des chemischen Verfahrens - Arbeiten in wasserfreien organischen Lösungsmitteln, Bildung von Anomerengemischen sowie die ebenfalls erforderlichen, langen Reaktionszeiten - spiegeln sich in den niedrigen Raum-Zeit-Ausbeuten der nicht-optimierten Synthesen wider. Die optimierten Methoden, die ab 1997 durch Baisch und Öhrlein [157] bzw. Wittmann und Wong [158] etabliert wurden, zeigen höhere Raum-Zeit-Ausbeuten, die mit den enzymatischen Verfahren vergleichbar sind. Jedoch muss erwähnt werden, dass sich diese Werte nur auf den Kopplungsschritt beziehen (siehe Kapitel 1.4.2). Die eigentliche Herausforderung der chemischen GDP-Fuc-Synthese - ein effektiver Zugang zum instabilen Fucose-1-phosphat [155] - bleibt bei dieser Betrachtung unberücksichtigt.

8.4.2 Die NADPH-verbrauchende GMD-Nebenreaktion

In Kapitel 6.5 wurde bereits auf die GMD-Nebenreaktion eingegangen, die zur Bildung einer unbekanntes Verbindung (GDP-X) führt. Aus den Ergebnissen der kontinuierlichen GPF-Fuc-Synthesen konnte gefolgert werden, dass GDP-X in einer enzymatischen Reaktion aus GKDM unter NADPH-Oxidation gebildet werden muss. Folglich stellt sich die Frage nach der Identität von GDP-X.

Ausgehend von den Ergebnissen der EMR-Versuche wurden in *batch*-Versuchen zunächst geringe Mengen GDP-X enzymatisch hergestellt: nach Synthese von GKDM mit der GMD ausgehend von GDP-Man wurde die Reaktionslösung in Gegenwart von 1 mM NADPH 42 h bei 20°C inkubiert. Als Kontrollexperiment wurde die GMD nach Bildung von GKDM thermisch deaktiviert und der Ansatz, nach Zugabe von ebenfalls 1 mM NADPH, ebenfalls bei 20°C 42 h inkubiert. Abbildung 8.5 auf der nächsten Seite zeigt die Reaktionsverläufe der beiden Ansätze.

Der linke Graph verdeutlicht, dass unter diesen Bedingungen etwa 50% GKDM zu GDP-X umgesetzt werden. NADP wird dagegen bis zu einer Konzentration von 0,8 mM gebildet.

¹persönliche Mitteilung von Dr. S. Koizumi.

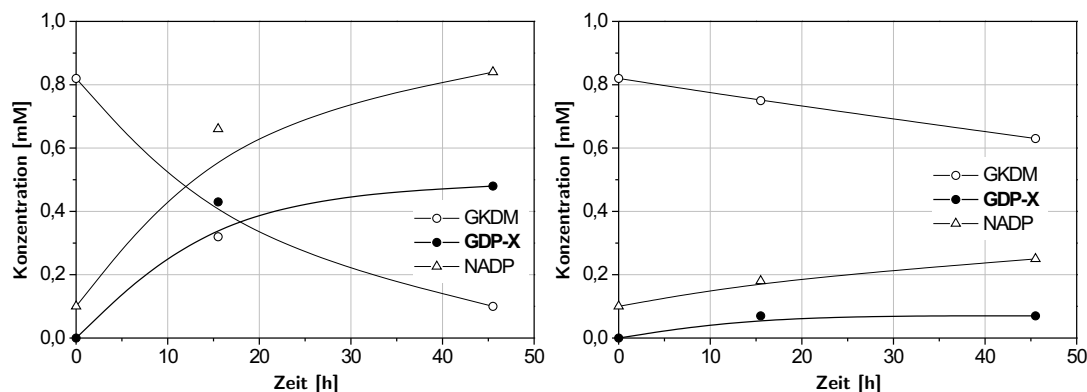


Abbildung 8.5: GMD-katalysierte Bildung von GDP-X im *batch* ausgehend von GKDM und NADPH (linker Graph) und Kontrollversuch (rechter Graph). Die Linien dienen lediglich als visuelle Hilfe.

Bedingungen: 0,8 mM GKDM, 1 mM NADPH, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 50 mM MOPS, pH 7, T = 20°C. Kontrollversuch = Desaktivierung der GMD nach GKDM-Synthese.

Diese hohe NADP-Menge kann nicht ausschliesslich auf die Bildung von GDP-X zurückgeführt werden. Vermutlich wird NADPH in einer weiteren, unspezifischen Reaktion zu NADP oxidiert. Das Kontrollexperiment (thermische Desaktivierung der GMD) bekräftigt die Vermutung, dass GDP-X enzymatisch aus GKDM gebildet werden muss, da GKDM in diesem Fall kaum umgesetzt wird.

Die auf diesem Wege hergestellten, analytischen Mengen GDP-X waren ausreichend, um die Molekülmasse dieser Verbindung mit LC/MS zu bestimmen.¹ Die Reaktionslösung zeigt einen Hauptpeak mit m/z = 588.5 ([M-H]⁻) und entspricht damit dem erwarteten Wert einer an der 4-Position reduzierten GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose.²

Dieses Ergebnis belegt, dass die GMD aus *E. coli* in der Lage ist, GKDM in Gegenwart von NADPH an der 4-Position zu reduzieren. Damit besitzt das Enzym neben der Dehydratase-Aktivität eine zusätzliche, wenn auch schwache, Reduktase-Aktivität. Eine Reduktion der Keto-Funktion an der 4-Position des Hexoserings kann prinzipiell zu zwei verschiedenen Produkten führen, wenn von einer nicht-stereoselektiven Reaktion ausgegangen wird. Je nach Konfiguration der entstehenden OH-Gruppe (äquatorial oder axial) wird GDP- α -D-Rhamnose oder GDP- α -6-desoxy-D-Talose gebildet (Abbildung 8.6 auf der nächsten Seite).

Zwei Publikationen, die sich mit GDP- α -D-Mannose-4,6-Dehydratasen (GMDs) aus anderen Organismen beschäftigen, belegen, dass dieses Enzym durchaus Reduktase-Aktivität besitzt. Kneidinger *et al.* berichten von einer GMD aus *Aneurinibacillus thermoaerophilus* L420-91^T, die GKDM mit einer Ausbeute von 2% zu GDP- α -D-Rhamnose (GDP-Rha) umsetzt. Der Nachweis der stereospezifischen Reduktion von GKDM erfolgte durch Hydrolyse des Nucleo-

¹Diese Messungen wurden in Kooperation mit dem IBT 1 (Dr. Ralph Brückner) durchgeführt, s. Kapitel 10.1.3.

²M (GKDM) = 587.3 \rightarrow M (GKDM + 2 [H]) = 589.3. GDP-Fuc besitzt die gleiche Molekülmasse (589.3), jedoch muss zur Synthese von GDP-Fuc vor der Reduktion an C-4 eine Epimerisierung an C-3 und C-5 stattfinden.

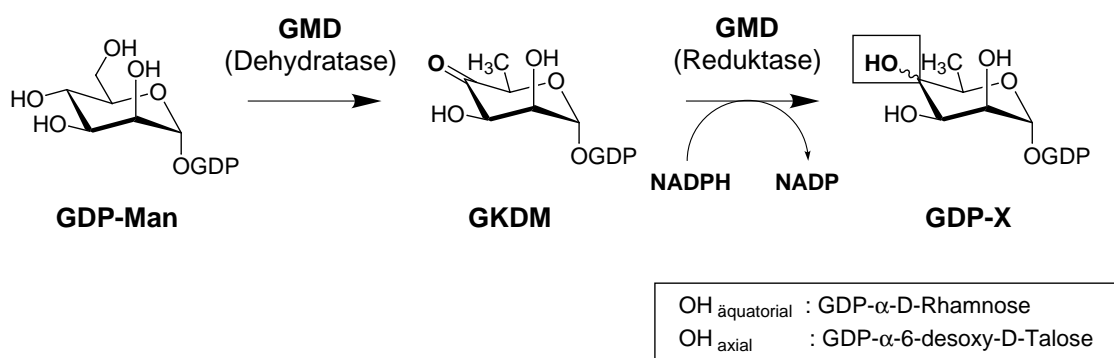


Abbildung 8.6: Mögliche Reaktionsprodukte der 4-Reduktion von GDP-X durch die GMD. Erklärungen siehe Text.

Die GMD aus *E. coli* besitzt demnach eine Dehydratase und eine Reduktase-Aktivität.

tidzuckers und anschließender NMR-Charakterisierung der freien Rhamnose [245].

Tonetti *et al.* konnten erstmalig die GDP-Fuc-Enzyme eines Virus charakterisieren und heterolog in *E. coli* überexprimieren. Die GMD aus dem *Paramecium bursaria Chlorella* Virus 1 zeigte ebenfalls eine Reduktase-Aktivität, die GKDM in Gegenwart von NADPH zu GDP-Rha umsetzt [313].

Die Vermutung liegt daher nahe, dass auch das Enzym aus *E. coli* die beobachtete Reduktion von GKDM stereoselektiv katalysieren kann. Die bakterielle GMD ist damit in der Lage, GDP-Rha ausgehend von GDP-Man und NADP bzw. NADPH zu generieren. Der Beweis dieser Annahme sollte in zukünftigen Arbeiten mittels NMR gelingen.

8.4.3 Optimierungspotentiale

Die Bewertung der in dieser Arbeit vorgestellten Verfahren hat gezeigt, dass GDP-Fuc im Labormaßstab bis in den Gramm-Bereich prinzipiell zugänglich ist. Die exemplarische Synthese im kontinuierlichen Verfahren und die weitere Aufreinigung der Substanz im 100 mg Maßstab belegt zudem die Effizienz der Verfahren besonders hinsichtlich des Enzymverbrauchs.

Trotz dieses Erfolgs besteht für die Synthese von GDP-Fuc mit isolierten Enzymen noch Optimierungspotential. Auf einige Punkte soll in diesem Abschnitt eingegangen und mögliche, verbesserte Reaktorkonzepte vorgestellt werden.

Cofaktorverbrauch und -regenerierung im kontinuierlichen Verfahren

Die optimale Nutzung der eingesetzten Cofaktoren (NADP/NADPH bzw. NAD/NADH) ist ein erster wichtiger Ansatzpunkt zur weiteren Verfahrensoptimierung. Bei der GMD-Reaktion kann sowohl NADP als auch NADPH als Cofaktor eingesetzt werden, die nicht phosphorylierten Cofaktoren werden nicht akzeptiert. Die Affinität zu NADPH ist dabei größer. Mit dem reduzierten Cofaktor werden zudem höhere Aktivitäten erreicht. Es erschien daher zunächst sinnvoll, NADPH für die GMD-Reaktion einzusetzen und den reduzierten Cofaktor anschließend für die GFS-Reaktion weiter zu nutzen. Dieses Konzept war Grundlage für die ersten kontinuierlichen Synthesen von GDP-Fuc in einer 2-stufigen EMR-Kaskade. Die Eigenschaft der GMD, NADPH in einer unerwünschten Nebenreaktion zu verbrauchen und zusätzlich auf

unbekanntem Weg zu NADP oxidieren zu können, hat jedoch eine geringe Produktausbeute zur Folge. Ein solches Reaktorkonzept erfordert zudem eine Überdosierung des reduzierten Cofaktors, da NADPH im ersten EMR (GMD) zwar verbraucht wird, jedoch nicht zur Produktsynthese beiträgt. Zur Verdeutlichung zeigt Abbildung 8.7 eine Simulation der GMD-Reaktion im EMR: der Umsatz sowie die NADPH-Konzentration des Auslaufs sind als Funktion der Verweilzeit dargestellt. Die Parallelreaktion GDP-Man \rightarrow GDP-Rha/Tal wurde nicht explizit berücksichtigt, lediglich die Oxidation von NADPH zu NADP - im kinetischen Modell ausgedrückt durch die Geschwindigkeitskonstante k - wurde betrachtet. Hohe Umsätze (> 98%) werden danach nur bei Verweilzeiten erreicht, die zu einer deutlichen Abnahme der NADPH-Konzentration im Auslauf führen. Als Folge stehen für die anschließende GFS-Reaktion nicht genügend Reduktionsäquivalente zur Verfügung. Der Verlust an NADPH kann nur durch Überdosierung ausgeglichen werden.

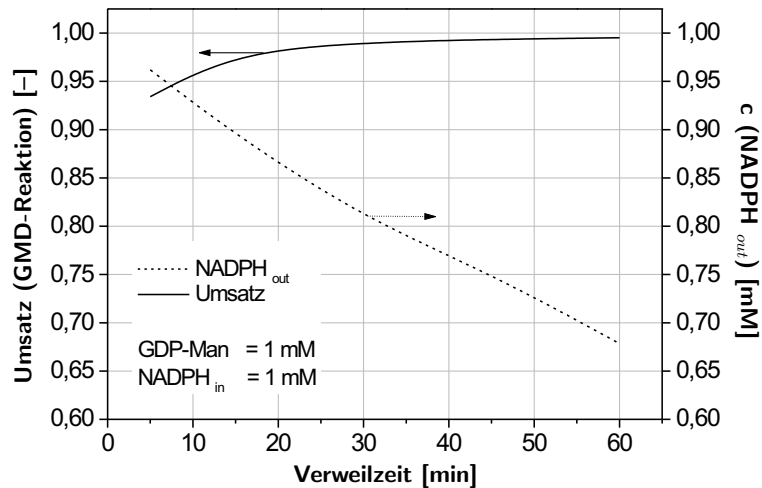


Abbildung 8.7: Simulation der GMD-Reaktion: Umsatz und NADPH-Konzentration im EMR-Auslauf als Funktion der Verweilzeit.

Kinetisches Modell der GMD entsprechend Kapitel 5.2.2. Parameter: $V_1 = 0,474$ U/mL, $k = 0,008$ min⁻¹.

Eine Überdosierung von NADPH sowie die beobachtete Nebenreaktion können vermieden werden, wenn lediglich NADP als Cofaktor für die GMD-Reaktion eingesetzt wird. Für die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten für die GFS-Reaktion muss NADP dann jedoch vor oder innerhalb des GFS-Reaktors reduziert werden. Der eigene Ansatz der integrierten Cofaktorregenerierung mit der NADP-abhängigen Formiatdehydrogenase führte aufgrund der geringen Stabilität dieses Enzyms unter Prozessbedingungen nur zu geringen Umsätzen in der GFS-Reaktion. Die Ursache der beobachteten schnellen Desaktivierung der FDH konnte nicht eindeutig geklärt werden, jedoch wurde ein deutlicher Aktivitätsverlust des Enzyms an Membranen auch unter ähnlichen Prozessbedingungen beobachtet.¹

¹persönliche Mitteilung von Herrn Dipl. Chem. David Kihumbu; Einsatz des Enzyms zur Reduktion von aromatischen α -Hydroxyketonen.

Die enzymatische Regenerierung von NADPH ist in der Literatur ausführlich beschrieben [291, 292]. Abbildung 8.8 veranschaulicht die verschiedenen Möglichkeiten der NADPH-(Re)generierung für die GFS-Reaktion. Neben dem Einsatz der FDH werden bei der enzymgekoppelten NADPH-Regenerierung auch die Enzyme Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) bzw. die Glucose-Dehydrogenase (GluDH) eingesetzt, die beide kommerziell erhältlich sind [1]. Die Kompatibilität dieser Biokatalysatoren mit dem GDP-Fuc-System müsste untersucht und bewertet werden. Besonders die quantitative Abtrennung der Regenerationsprodukte (Gluconat bzw. Gluconat-6P) bei der anschließenden Aufreinigung der GDP-Fuc muss bei einem solchen Verfahren sichergestellt werden. Beide Enzyme werden als hinreichend stabil beschrieben.

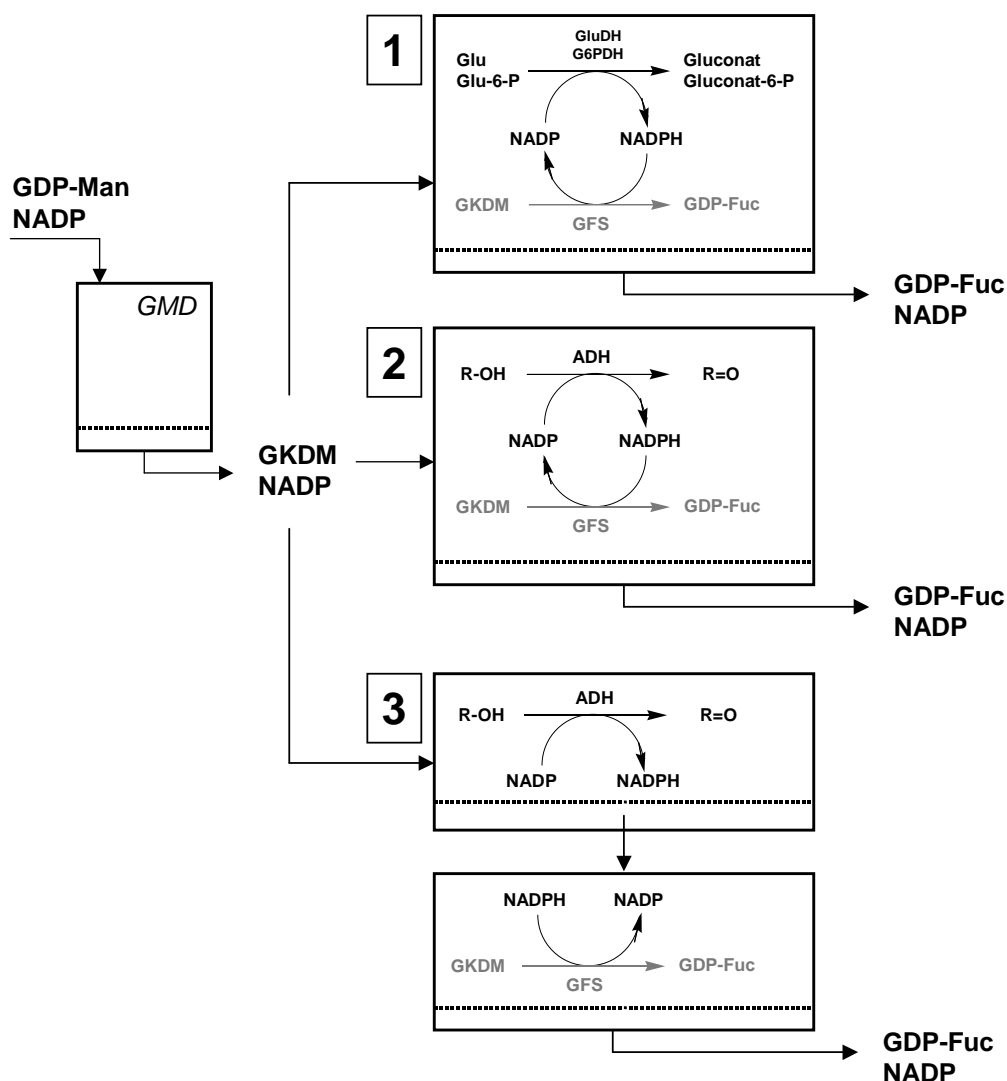


Abbildung 8.8: Möglichkeiten der NADPH-(Re)generierung für die GFS-Reaktion im kontinuierlichen Verfahren.

Die Integration einer Alkohol-Oxidation zur Generierung von NADPH mit einer zusätzlichen, NADP-abhängigen Alkoholdehydrogenase (ADH) wäre eine weitere Alternative, die hier genannt werden soll ([2] und [3]). Als Hydriddonor fungiert ein zweites, kostengünstiges Substrat, in der Regel ein Alkohol wie etwa 2-Propanol. Es sind verschiedene ADHs bekannt, die diese einfachen Alkohole unter Generierung von NADPH oxidieren können. Diese Reduktionsreaktion könnte entweder im gleichen Reaktor wie die GFS-Reaktion stattfinden [2] oder aber in Form eines zusätzlichen Reaktors vor den GFS-EMR geschaltet werden [3]. Im ersten Fall wäre eine integrierte Cofaktorregenerierung analog Fall [1] möglich; hohe Zykluszahlen (*ttn*) für den Cofaktor könnten erzielt werden. Wird die Cofaktorgenerierung wie in [3] von der GFS-Reaktion räumlich getrennt, so muss der oxidierte Cofaktor mindestens in äquimolaren Mengen eingesetzt werden, je nach Umsatz der ADH-Reaktion im "Reduktionsreaktor".

Die GFS-Reaktion im kontinuierlichen Verfahren

Die oben genannten Verfahren zur Regeneration von NADPH, welches zur Reduktion von GKDM durch die GFS bereitgestellt werden muss, bauen auf dem Konzept einer zweistufigen Rührkesselnkaskade auf, die in der vorliegenden Arbeit zur kontinuierlichen Synthese von GDP-Fuc eingesetzt werden konnte. Die Kenntnis der GFS-Kinetik (siehe Kapitel 5.3.2) sagt jedoch voraus, dass der Enzym-Membran-Reaktor (EMR) aufgrund seiner Charakteristiken - kontinuierlich betriebener Rührkessel (CSTR) unter Auslaufbedingungen - nicht der optimale Reaktor sein kann. Bei hohen Umsätzen im EMR stellt sich im stationären Zustand (*steady state*) dann eine hohe Produktkonzentration im gesamten Reaktorvolumen ein, wenn eine ideale Durchmischung vorausgesetzt wird (Abbildung 8.9, linker Graph). Die starken Produktinhibierungen von GDP-Fuc und NADP auf die GFS bewirken im EMR eine Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit. Neben dem Ansatzpunkt der integrierten Cofaktorregenerierung (Verringerung der Inhibierung bzgl. NADP) bzw. der geringen Substratkonzentration (Verringerung der Produkt-Inhibierung) bietet die Wahl eines alternativen Reaktortypen weiteres Potential der Prozessoptimierung.

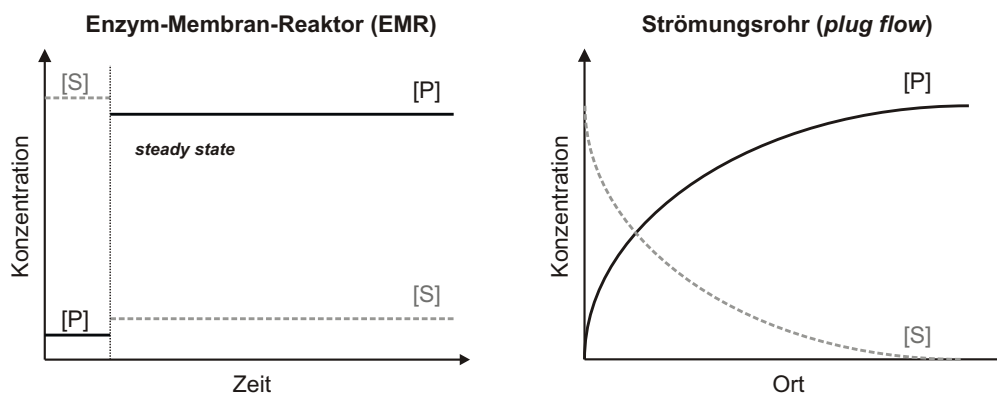


Abbildung 8.9: Konzentrationsprofile von CSTR und *plug flow* Reaktor.

Erklärungen siehe Text.

Für eine kontinuierliche Reaktionsführung ist das Strömungsrohr (*plug flow*-Reaktor) aufgrund seiner Charakteristiken besser geeignet. Das Konzentrationsprofil eines Strömungsrohres entspricht dem eines Satzreaktors mit dem Unterschied, dass die Zeit-Achse der Orts-

Achse entspricht. Der Reaktionsumsatz ist eine Funktion des Ortes und nicht der Zeit (Abbildung 8.9 auf der vorherigen Seite, rechter Graph). Da die Produktkonzentration im Gegensatz zum EMR im Laufe der Reaktion ansteigt, sind die Produktinhibierungen im Strömungsrohr geringer als im EMR. Als Folge werden im Strömungsrohr, bei gleicher Verweilzeit, höhere Umsätze erzielt.

Für die GFS-Reaktion kann dies durch einen Vergleich von Simulationen, die auf dem Modell einer Doppelsubstrat-Kinetik mit doppelter Produktinhibierung beruhen, bestätigt werden. Abbildung 8.10 zeigt die simulierten Reaktionsverläufe in drei verschiedenen Reaktortypen. Bei gleicher Verweilzeit und Enzymkonzentration werden im Strömungsrohr deutlich höhere Umsätze erzielt als im EMR (CSTR). Die Berechnungen zeigen zudem, dass sich eine zweistufige EMR-Kaskade (nur für die GFS-Reaktion) bereits an die Charakteristiken eines *plug flow*-Reaktors annähert.¹

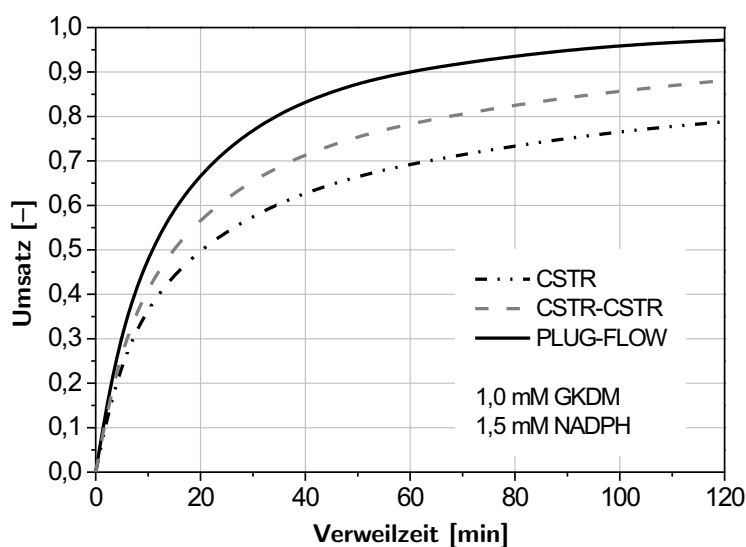


Abbildung 8.10: Simulation der GFS-Reaktion: Umsatzverläufe im EMR, zweistufiger EMR-Kaskade und Strömungsrohr (*plug-flow*) als Funktion der Verweilzeit.

Kinetisches Modell der GFS entsprechend Kapitel 5.3.2. Parameter: $GFS = 0,122 \text{ U/mL}$, 1 mM GKDM , $1,5 \text{ mM NADPH}$.

Voraussetzung für die Etablierung der GFS-Reaktion im Strömungsrohr ist die effektive Immobilisierung des Enzyms. Techniken der Enzym-Immobilisierung an einen geeigneten Träger sind sehr zahlreich beschrieben [285, 314], jedoch gibt es bisher keine Publikation hinsichtlich der GFS. Ein erster Ansatzpunkt zur Immobilisierung des Enzyms ist die Ausnutzung des N-terminalen His-tags: analog zur Enzymreinigung könnte die GFS an eine Ni-NTA Matrix gebunden werden. Die durch den His-tag vermittelte Bindung an die Agarose-beads konnte bereits erfolgreich zur Immobilisierung einer Fucosyltransferase genutzt werden [315]. Die Immobilisierungsausbeute einer α -3/4-FucT wird in dieser Arbeit mit bis zu 92% ange-

¹Annahme: jeweils halbe Verweilzeit und Enzymkonzentration pro EMR.

geben. Mit der FucT-beladenen Ni^{2+} -Agarose konnten u.a. die *Lewis*^A und *Lewis*^X-Antigene synthetisiert werden.

Shao *et al.* [316] berichten sogar von der Co-Immobilisierung von fünf Enzymen auf einer Ni-NTA-Matrix zur Synthese des Nucleotidzuckers UDP-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc). Zwar wurden die immobilisierten Enzyme im *repetitive batch*-Verfahren eingesetzt, die Arbeit zeigt aber auf beeindruckende Weise die Leistungsfähigkeit der funktionalisierten Agarose - *beads*. So konnten 1,18 g UDP-GlcNAc im 100 mL Maßstab gewonnen werden. Die Raum-Zeit-Ausbeute der Reaktion lag bei etwa 12 g/(L·d).

8.5 Enzymatische Synthese fucosylierter Oligosaccharide

In Kapitel 7 konnte gezeigt werden, dass zwei Oligosaccharide in Eintopfsynthesen ausgehend von GDP-Man sowie den Enzymen GMD, GFS und FucT quantitativ fucosyliert werden. GDP-Fuc wurde dabei *in situ* gebildet. Durch die Kopplung der GDP-Fuc-Synthese mit der FucT-Reaktion wird die *feedback*-Inhibierung der GMD durch GDP-Fuc verhindert. Eine Kopplung dieser drei Reaktionen zur Synthese fucosylierter Strukturen mit den isolierten Enzymen im Eintopf-Verfahren ist bisher nicht beschrieben.

Im Zuge dieser Arbeiten zeigte sich, dass die Anwesenheit hoher Mengen Glycerin (25%, v/v) die schnelle Umsetzung von GDP-Man mit GMD und GFS im Satzreaktor erlaubt. Auch Mn^{2+} -Ionen, die für die katalytische Aktivität der FucT essentiell sind, scheinen die starke *feedback*-Inhibierung der GMD durch GDP-Fuc mindern zu können.

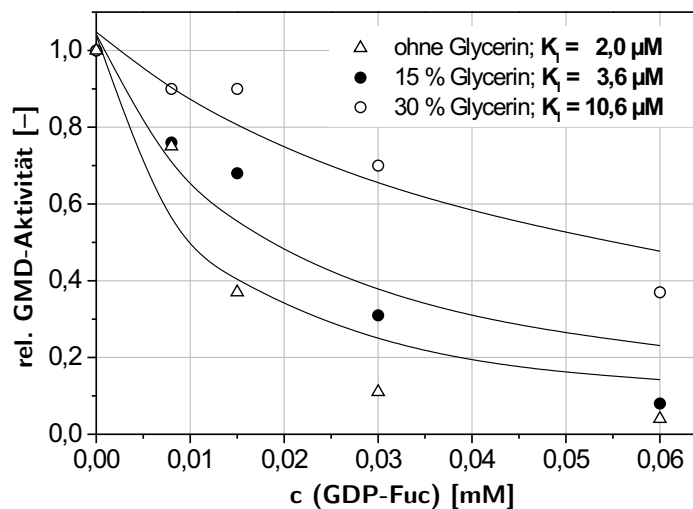


Abbildung 8.11: Erniedrigung der GMD *feedback*-Inhibierung durch Glycerin.

Es sind relative GMD-Aktivitäten angegeben. Kinetisches Modell: MM-Kinetik mit kompetitiver Produktinhibierung; Fixierung der kinetischen Konstanten und Anpassung von K_I an die Messreihen.

Bedingungen: 1 mM GDP-Man, GDP-Fuc variiert, 2 mM NADPH, 50 mM MOPS, pH 7, 10 mM MgSO_4 , 1 mM DTT, $T = 30^\circ\text{C}$.

Ein erster Versuch, dieses beobachtete Phänomen zu verstehen, zeigt Abbildung 8.11 auf der vorherigen Seite. Es wurde die *feedback*-Inhibierung der GMD bei unterschiedlichen Glycerin-Gehalten gemessen. Danach nimmt der K_I -Wert für GDP-Fuc mit steigender Glycerin-Konzentration zwar zu, jedoch liegen die beobachteten Inhibierungskonstanten noch immer im μ molaren Bereich. Im Vergleich zur Messung ohne Glycerin-Zugabe ist der K_I -Wert bei einem Glycerin-Gehalt von 25% um einen Faktor fünf größer.

Auch wenn mit diesem Experiment ein erster Anhaltspunkt zum Einfluss des Glycerins auf das Enzymsystem gegeben werden kann, so sind doch weitere Messungen notwendig, um die beobachtete Synthese von GDP-Fuc im Eintopfverfahren unter diesen Bedingungen zu verstehen. Besonders der Einfluss von Mn^{2+} -Ionen auf die Enzyme müsste untersucht werden.

Es bleibt zu betonen, dass eine solche, eventuelle Aufhebung der limitierenden Inhibierungen im GDP-Fuc-System aus synthetischer Sicht höchst interessant ist. Auf diese Weise wäre in einem sehr einfachen *batch*-Verfahren GDP-Fuc zugänglich. Denkbar ist auch die kontinuierliche Fucosylierung eines Oligosaccharid-Akzeptors im EMR. Dieses Reaktorkonzept baut auf den *batch*-Versuchen des Kapitels 7 auf. Betrachtet man allerdings die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte, rekombinante $\alpha 1,2$ -Fucosyltransferase aus *Helicobacter pylori*, so muss erwähnt werden, dass bisher keinerlei kinetische Daten zu diesem Enzym vorliegen.

9 Zusammenfassung

Gegenstand der Arbeit war die Entwicklung von Verfahren zur enzymatischen Synthese von GDP-Fuc mit den Enzymen des *de novo* Biosyntheseweges (GMD und GFS). Durch Erweiterung des Systems mit einer α 1,2-Fucosyltransferase (α 1,2-FucT) wurde darüberhinaus die *in situ* Fucosylierung von Oligosacchariden untersucht.

Analytische Methoden

- Die erfolgreiche **Methodenentwicklung in der Kapillarelektrophorese (CE) durch Anwendung genetischer Algorithmen** konnte gezeigt werden. Eine robuste CE-Methode zur Auftrennung der Analyte GDP-Man/GDP-Fuc, GMP, NADP, GDP, NADPH und GTP wurde erhalten.
- Ein **CE-Assay zur Verfolgung der GMD-Reaktion** wurde etabliert. In weniger als 15 Minuten gelingt die elektrophoretische Trennung von GDP-Man, GKDM, GMP, NADP, GDP und NADPH.
- Komplementär zur Kapillarelektrophorese wurden **HPLC-Methoden** zur Verfolgung der relevanten Reaktionen (GMD, GFS und FucT) etabliert.

Bereitstellung der Enzyme GMD und GFS und einer α 1,2-Fucosyltransferase

- In einer 20 L-Fermentation wurden mit einem rekombinanten *E. coli*-Stamm bis zu **10000 U der GDP- α -D-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) produziert**. Durch Anionenaustausch-Chromatographie wurden insgesamt **1100 U** des Enzyms aufgereinigt. Die Ausbeuten lagen bei 61-80%.
- Die GMD liegt nach der Chromatographie als **Apoenzym** vor. Die Enzymaktivität kann durch *exogene* Zugabe von NADP wiedergewonnen werden.
- Die **GDP- β -L-Fucose-Synthetase** konnte durch die 15 L-Fermentation eines rekombinanten *E. coli*-Stammes mit einer **Ausbeute von etwa 15000 U** gewonnen werden. Durch Aufreinigung mittels IMAC wird das Enzym in nahezu homogener Form erhalten. Die Ausbeuten lagen bei 15-40%.
- Erstmals konnte eine **His-tag α 1,2-Fucosyltransferase aus *H. pylori*** fermentiert und partiell aufgereinigt werden. Ausgehend von etwa 6 g Zellen wurden **966 mU** (LNFP III als Akzeptor) des Enzyms gewonnen.

Kinetische Untersuchungen der enzymatischen GDP-Fuc-Synthese

- Die Reaktionssysteme von GMD und GFS wurden untersucht und die Enzyme kinetisch charakterisiert.

- Die Aktivität der GDP- α -D-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) zeigt für die Cofaktoren NADP und NADPH Sättigungskinetiken. **NADPH aktiviert die GMD**. Niedrige Enzymaktivitäten führen zur **Ausbildung einer lag-Phase**; die Umsetzung GDP-Man \rightarrow GKDM wird in Abhängigkeit der Enzymaktivität verzögert oder beschleunigt.
- Es wurde ein **formalkinetisches Modell der Cofaktor-abhängigen GMD-Aktivierung** aufgestellt. Dieses Modell ist in der Lage, die Ausbildung einer lag-Phase und die beobachteten Aktivierungen der GMD durch NADP bzw. NADPH vorherzusagen. Berechnete Reaktionsverläufe konnten durch Parameteroptimierung an die experimentellen Daten mit einer Korrelation von $> 99\%$ angepasst werden.
- Ein einfaches Protokoll zur **Synthese und Handhabung der GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose (GKDM)** wurde erarbeitet. GKDM liegt in wässriger Lösung in einer **Keto- und einer Ketohydrat-Form** vor.
- Die GFS-Reaktion kann durch eine **Doppelsubstratkinetik mit doppelter, kompetitiver Produktinhibierung** beschrieben werden. Mit NADPH wird ein höherer v_{max} -Wert erreicht als mit NADH, jedoch sind die Produktinhibierungen bei Verwendung des phosphorylierten Cofaktors stärker.
- Für die GFS-Reaktion resultieren aus der **enzymgekoppelten, integrierten Cofaktorregenerierung** höhere Reaktionsgeschwindigkeiten verglichen mit der Umsetzung ohne Regenerierung (Simulation).

Syntheseverfahren zur Gewinnung von GDP-Fuc

- Aufgrund der *feedback*-Inhibierung der GMD durch GDP-Fuc ist eine Eintopfsynthese nicht möglich.
- Im **diskontinuierlichen Verfahren** wird GDP-Fuc durch die Kombination eines *batch*- (GMD) und eines *repetitive batch*-Verfahrens (GFS) gewonnen. Für beide Schritte werden Ausbeuten von 90-95% erzielt. Die Raum-Zeit-Ausbeuten lagen bei 28 bis 48 g/(L·d).
- Ein **kontinuierliches Syntheseverfahren** konnte mit einer zweistufigen Rührkesselkaskade realisiert werden. Die Raum-Zeit-Ausbeute beträgt 6,8 g/(L·d) bei einem Enzymverbrauch von lediglich 2,8 U/g_{GDP-Fuc} (GMD) bzw. 1,6 U/g_{GDP-Fuc} (GFS).
- Enzymatisch gewonnene GDP-Fuc kann in einer dreistufigen Aufreinigung (Anionenaustausch-Chromatographie, Nanofiltration und Lyophilisation) mit einer **Gesamtausbeute von 63% (76 mg)** isoliert werden.

Synthese fucosylierter Oligosaccharide durch *in situ* Generierung von GDP-Fuc

- Durch die Kopplung der GDP-Fuc-Synthese mit einer FucT-Reaktion kann die *feedback*-Inhibierung der GMD durch GDP-Fuc vermindert werden.
- In einem Eintopfverfahren konnten verschiedene Akzeptoren mit Ausbeuten zwischen 70 und 99% (bezogen auf GDP-Man) fucosyliert werden.

10 Material und Methoden

10.1 Analytik

10.1.1 Kapillarelektrophorese (CE)

Alle Experimente wurden mit folgendem Gerät durchgeführt:

Gerät:	P/ACE™ MDQ
Hersteller:	Beckman-Coulter
Detektion:	UV, Photo Dioden Array
Wellenlänge:	250 nm (Nucleotidzucker der G-Reihe) 260 nm (Interner Standard, Uridin) Referenzwellenlänge: 360 nm
Software:	P/ACE™ MDQ Software, Version 1.6

Alle Experimente wurden mit folgenden Kapillaren durchgeführt:

Kapillare:	CElect FS50CE (Sigma, München) oder TSP050192 (Polymicro Technologies, Phoenix, USA) unbeschichtete Quarzkapillaren (<i>fused silica</i>)
Innendurchmesser (ID):	50 μm
Gesamtlänge:	57 cm
Länge bis zum Detektor:	50 cm

Vor jedem Lauf wurde die Kapillare wie folgt gespült: 1 min. mit Wasser bei 20 psi, 1 min. mit 1 N NaOH bei 20 psi, 1 min. mit Wasser bei 20 psi und 5 min. mit dem jeweiligen Puffer. Diese Vorgehensweise stellte sicher, dass sich die Kapillaroberfläche in einem definierten Gleichgewichtszustand befand, so dass die Unterschiede in den Retentionszeiten für eine Methode möglichst gering waren. Parameter der Trennung sowie Puffer entsprechend Kapitel 3.2.3 auf Seite 36.

Weitere Parameter:

Injektionsmethode:	Drucküberlagerung
Druck	0,5 psi
Dauer	5 sec.

Nach Injektion der Probe wurde die gleiche Menge Trennpuffer in die Kapillare injiziert, um ein Zurücklaufen der Probe aus der Kapillare zu verhindern.

Als interner Standard (IS) diente Uridin. Die Kalibrierung des Geräts erfolgte durch Zugabe von 1 mM Uridin zu den Analyten bzw. Eichlösungen (40 μL Probe + 10 μL Uridin, $c = 5 \text{ mM}$). Es wurde das Verhältnis Analyt/IS gegen die Konzentration des jeweiligen Analyten aufge-

tragen. Die resultierenden Kalibriergeraden wurden zur Berechnung der Analytkonzentrationen eingesetzt. Abbildung 10.1 zeigt exemplarisch eine Kalibriergerade zur Bestimmung der GDP-Man Konzentration.

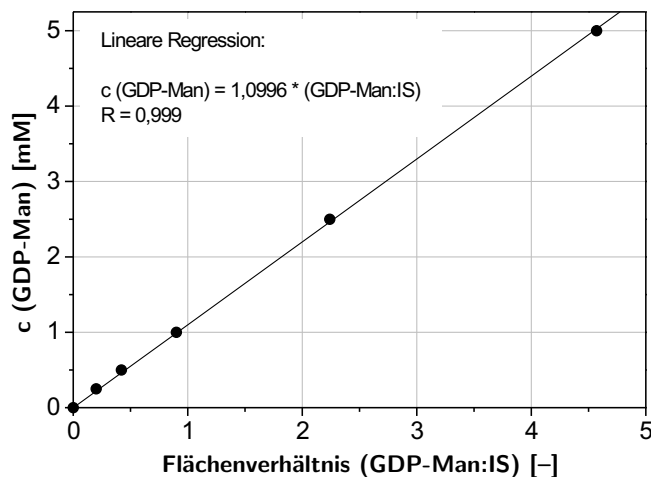


Abbildung 10.1: CE-Kalibriergerade für GDP-Man.

CE-Methodenentwicklung Alle CE-Experimente wurden mit den entsprechenden Methoden, die der genetische Algorithmus vorgegeben hatte, doppelt durchgeführt. Die Standard-Lösung der ersten Optimierung enthielt die sieben Analyte (GMP, GDP, GTP, NADP, NADPH, GDP-Man und GDP-Fuc) in einer Konzentration von jeweils 0,5 mM. Bei der zweiten Optimierung lagen jeweils GDP-Man, GDP-Fuc und Uridin (Interner Standard) in einer Konzentration von 0,5 mM vor.

Entsprechend den vorgegebenen Werten für Puffer- und DIME- β -CD-Konzentration der einzelnen Individuen durch den GA wurden pro Individuum 1600 μ L des jeweiligen Trennpuffers angesetzt. Dabei wurde von folgenden Stammlösungen ausgegangen:

DIME- β -CD	= 200 mM
KPi-Puffer	= 400 mM
Borat-Puffer	= 400 mM

Die zu pipettierenden Volumina ergeben sich daraus zu:

$$\text{Vol.}_{\text{Trennpuffer}} = 1600 \quad \mu\text{L} \quad (10.1)$$

$$\text{Vol.}_{\beta\text{-CD}} \quad [\mu\text{L}] = \frac{1600}{(200 \text{ mM}/c_{\text{ges}})} \quad (10.2)$$

$$\text{Vol.}_{Kpi} [\mu L] = \frac{1600}{(400 \text{ mM}/c_{ges})} \cdot \frac{\%P}{100} \quad (10.3)$$

$$\text{Vol.}_{Borat} [\mu L] = \frac{1600}{(400 \text{ mM}/c_{ges})} \cdot \frac{100 - \%P}{100} \quad (10.4)$$

$$\text{Vol.}_{Wasser} [\mu L] = 1600 - \text{Vol.}_{\beta-CD} - \text{Vol.}_{Kpi} - \text{Vol.}_{Borat} \quad (10.5)$$

c_{ges} entspricht dem Variationsparameter *Pufferkonzentration* (Kpi + Borat) des GA und %P dem Anteil an Phosphat im Puffer. Nach Pipettieren der einzelnen Lösungen wurde der pH-Wert der jeweiligen Trennpuffer mit 4 N KOH bzw. 2 N HCl auf den vorgegebenen Wert eingestellt.

10.1.2 HPLC-Systeme

System 1

Diese Methode der Ionenpaarchromatographie an einer *reversed phase*-Säule zur Analyse der (Zucker)Nucleotide beruht auf der Publikation von Payne *et al.* aus dem Jahre 1982 [232]. Von der Gruppe Pipersberg ist diese Methode bereits für das GDP-Fuc System eingesetzt worden [168].

Gerät:	LC Series 1100
Hersteller:	Hewlett-Packard
Detektion:	UV, Photo Dioden Array
Wellenlänge:	254 nm (Nucleotidzucker der G-Reihe) 262 nm (Interner Standard, Uridin) Referenzwellenlänge: 360 nm
Software:	HP ChemStation, Version 5
Stationäre Phase:	Multospher 100 RP-18; 5 μ m Partikelgröße Dimension: 250 x 4 mm (CS-Chromatographie, Langerwehe), Inertsil ODS-2 (Octadecyl) Dimension: 250 x 4.6 mm (GL Sciences, Tokyo, Japan)
Vorsäule:	Multosper 100 RP-18; 5 μ m Partikelgröße (CS-Chromatographie, Langerwehe)
Säulentemperatur:	40°C
Eluent A:	30 mM KPi-Puffer 5 mM Tetrabutylammonium (TBA)-hydrogensulfat

	2% Acetonitril
	pH 6
Eluent B:	Acetonitril
	5 mM Tetrabutylammonium (TBA)-hydrogensulfat
Gradient:	0 min: 100% A
	30 min: 30% B
	35 min: 100% A
	40 min: 100% A
Fluß:	1 mL/min

Wie bei der CE diente hier Uridin als interner Standard (1 mM). Zur Kalibrierung wurde das Verhältnis Analyt/IS gegen die Konzentration des jeweiligen Analyten aufgetragen. Die daraus resultierenden Kalibriergeraden wurden zur Berechnung der Analytkonzentrationen eingesetzt. Das Injektionsvolumen betrug 10-20 µL.

Sämtliche Laufmittel wurden vor ihrer Benutzung filtriert (0,22 µm) und entgast. Wurde die HPLC über längere Zeit nicht genutzt, so war ein Spülen der Säule mit 70% Acetonitril in Wasser notwendig, um mikrobiellen Bewuchs zu vermeiden.

System 2

Eine präparative HPLC wurde für Aufreinigungsversuche von GDP-Fuc im semi-präparativen Maßstab eingesetzt. Das Trennprinzip und die Methode ist mit jener der analytischen HPLC (System 1) identisch.

Gerät:	125 <i>solvent module</i>
Hersteller:	Beckman Coulter, München
Detektion:	2-Kanal UV-Meter
Wellenlänge:	254 nm
Software:	Beckman <i>Gold</i>
Stationäre Phase:	Multospher 100 RP-18; 5 µm Partikelgröße Dimension: 250 x 20 mm (CS-Chromatographie, Langerwehe),
Säulentemperatur:	40°C
Eluent A:	30 mM KPi-Puffer
	5 mM Tetrabutylammonium (TBA)-hydrogensulfat
	2% Acetonitril
	pH 6
Eluent B:	Acetonitril
	5 mM Tetrabutylammonium (TBA)-hydrogensulfat
Gradient:	0 min: 100% A
	40 min: 40% B
	45 min: 100% A
	50 min: 100% A
Probenaufgabe:	manuelles Ventil (Rheodyne, Cotati, USA) <i>Hamilton</i> -Spritze

Fraktionssammler: Frac 100 (Pharmacia, Freiburg)
 Fluß: 5 mL/min

Abbildung 10.2 zeigt exemplarisch ein Chromatogramm einer semi-präparativen Auftrennung von GDP-Fuc, NADP und NADPH. Die GDP-Fuc haltigen Fraktionen wurden vereinigt und anschließend lyophilisiert.

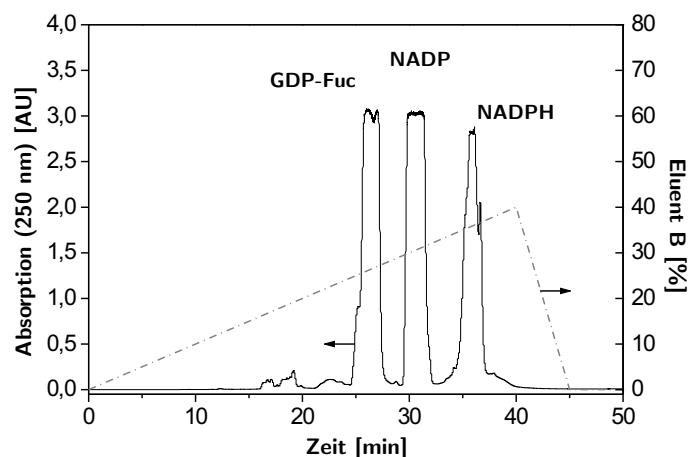


Abbildung 10.2: Beispielchromatogramm der präparativen HPLC zur GDP-Fuc-Aufreinigung.

System 3

Diese HPLC-Methode wurde zur Analyse von Oligosacchariden während des Japanaufenthaltes bei Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. eingesetzt. Die Methode ist auch Grundlage des Fucosyltransferase-Assays im Hinblick auf die Produktbildung (fucosylierte Oligosaccharide).

Gerät: Dionex 500 System
 Hersteller: Dionex
 Detektion: Elektrochemische Detektion
 PAD (*pulsed amperometric detection*)
 ED40 Detektor
 Pumpe: Dionex GP40
 Software: Dionex PEAKNET™ Version 5
 Stationäre Phase: CarboPac PA10 analytical column
 Dimension: 250 x 4 mm
 (Dionex, Sunnyvale, USA)
 Vorsäule: CarboPac PA10 guard column
 Dimension: 50 x 4 mm

	(Dionex, Sunnyvale, USA)
Säulentemperatur:	30°C
Eluent A:	Wasser (demineralisiert)
Eluent B:	0,5 M NaOH
Gradient:	0 min: 8% B 20 min: 20% B 28 min: 100% B 35 min: 8% B
Fluß:	0,8 mL/min

Die Laufmittel wurden vor ihrer Benutzung filtriert (0,22 µm) und entgast. Das Injektionsvolumen betrug 50 µL. Zur Kalibrierung wurde die Peakfläche der einzelnen Analyte gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen. Die resultierenden Kalibriergeraden wurden zur Berechnung der Analytkonzentrationen eingesetzt.

Abbildung 10.3 zeigt ein Beispiel-Chromatogramm zur Quantifizierung von 2'-Fucosyllactose, die, ausgehend von Lactose und GDP-Fuc, durch die Fucosyltransferase-Reaktion gebildet wird.

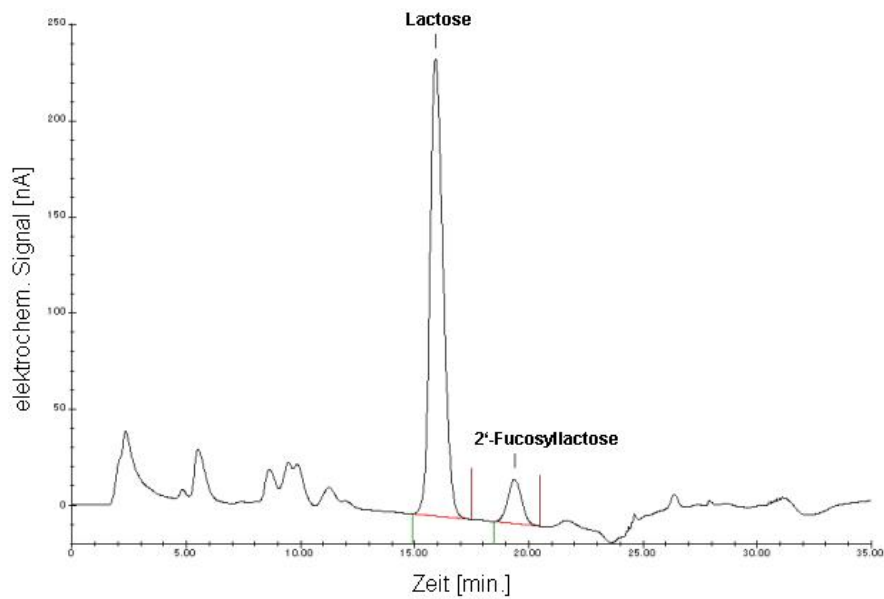


Abbildung 10.3: HPLC-Chromatogramm zur Quantifizierung fucosylierter Oligosaccharide.

10.1.3 Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Direktinjektion

Die ESI-MS-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Arne Buchholz und Herrn Dr. Marco Oldiges am Institut für Biotechnologie durchgeführt (Fermentationsgruppe). Die zu analysierenden, wässrigen Proben (20% Methanol, v/v) wurden per Direktinjektion der ESI-Quelle zugeführt. Weitere Analyse-Bedingungen waren:

Gerät:	Mono-Q™
Hersteller:	Thermo Finnigan
Ionenquelle:	Elektrospray Ionisierung
Detektion:	Ionenfalle
Modus:	negativ
cone voltage:	40 V
Fluß der Direktinjektion:	10 µL/min
Software:	Chromeleon™ Dionex, Version 1.6

Die Technik wurde zu Beginn der Arbeiten mit der GDP- α -D-Mannose-4,6-Dehydratase eingesetzt. Ziel war es, die Identität des Produktes der Reaktion (GKDM) eindeutig zu belegen. Das entsprechende Massenspektrum zeigt die Abbildung 10.4 auf Seite 186.

LC-ESI-MS

Weitere Untersuchungen zur Massenspektrometrie wurden auf einer LC-MS-Anlage des IBT 1 durchgeführt (Ionenchromatographie-Massenspektrometrie, IC-MS). Es kam eine analytische Anionentauschersäule zum Einsatz.

Gerät:	Dionex System
Hersteller:	Dionex
Ionenquelle:	<i>TurboIonSource</i>
Detektion:	Quadrupol MS
Stationäre Phase:	Dionex IonPAC AS II Dimension: 250 x 2 mm (Dionex, Sunnyvale, USA)
Vorsäule:	AG II
Säulentemperatur:	RT
Gradient:	0 min: 1 mM KOH 3,5-7,5 min: auf 20 mM KOH 7,5-10,5 min: 20 mM KOH 10,5-17,5 min: auf 100 mM KOH 17,5-23,5 min: 100 mM KOH
Fluß:	0,25 mL/min

10.1.4 NMR-Spektroskopie

Die im Rahmen dieser Arbeiten synthetisierten Nucleotidzucker (GKDM und GDP-Fuc) wurden durch ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie identifiziert und charakterisiert. Auf die Charakterisierung von GKDM wurde bereits in Kapitel 5.3.1 eingegangen. Die entsprechenden NMR-Spektren finden sich in Kapitel 10.6.

Die Aufnahmen erfolgten mit einem Bruker AM-300 MHz NMR-Spektrometer des IBT 2 bzw. mit einem Bruker Avance 500 DRX Spektrometer der Universität Hannover. Die chemischen Verschiebungen der Protonen beziehen sich auf Tetramethylsilan (TMS), die der C-Atome des GKDM auf das C-1' der Verbindung. Es bedeuten: **s** Singulett, **d** Dublett, **dd** Dublett von Dubletts, **t** Triplett, **q** Quartett und **m** Multiplett. Die Angabe der Kopplungskonstanten erfolgt in Hz.

10.2 Bereitstellung der Enzyme

10.2.1 Transformation von *Escherichia coli*

Zur Transformation von *Escherichia coli* wurde ein Protokoll nach *D. Hanahan* verwendet [317]. Hierbei wurden 100-200 μL kompetente *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut und mit 20-100 ng DNA aus einem Ligationsansatz versetzt. Die Plasmid/Zellsuspension wurde 20 min. auf Eis gestellt und anschließend für 90 sec. bei 42°C inkubiert. Nach weiteren 5 min. Inkubation auf Eis wurden dem Ansatz vier Volumen LB-Medium zugegeben und die Zellen zur Regeneration eine Stunde lang bei 37°C geschüttelt. Proben des Transformationsansatzes (200 μL) wurden auf den entsprechenden Selektionsmedien ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

10.2.2 Fermentation rekombinanter *Escherichia coli*-Stämme

Schüttelkulturen

Fermentationsversuche im Schüttelkolbenmaßstab wurden in Langhals-Erlenmeyerkolben mit vier Schikanen durchgeführt. Um einen ausreichenden Sauerstoff-Eintrag in die Kulturen zu gewährleisten, wurden die Versuche mit einer Füllmenge an Nährlösung von 10-20% des Kolbenvolumens durchgeführt. Die Kolben wurden mit 1% des Endvolumens oder mit Einzelkolonien von Selektionsplatten angeimpft. Zum Wachstum der Zellen wurden die Schüttelkolben bei 30 oder 37°C auf einer Rotationsschüttelmaschine inkubiert.

Fermentation im Pilot-Maßstab (Fermenter)

Die Fermentationen zur Gewinnung der GMD und der GFS wurden in Blattrührreaktoren vom Typ Techfors (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) mit einem Volumen von 20 bzw. 40 Litern am Institut für Enzymtechnologie (Universität Düsseldorf) durchgeführt. Die Sterilisation der Fermenter erfolgte bei 121°C und 250 mbar Überdruck innerhalb eines Zeitraumes von 30 min. Vor dem Autoklavieren wurde der Fermenter mit Antischaummittel (Antifoam 289, Sigma-Aldrich, München) beschickt und der pH-Wert mit 3 N KOH bzw. 3 N H_3PO_4 auf pH 7 eingestellt. Die Anzucht der rekombinanten *E. coli*-Stämme erfolgte in LB-Medium mit 0,5% Glycerin im 15 bzw. 20 L-Maßstab. Standardparameter der Fermentationen waren:

Arbeitsvolumen:	15 bzw. 20 L
Rührwerk:	2- oder 3-fach 6-Blatt Scheibenrührer
Medium:	LB _{Amp} -Medium 0,5% Glycerin (zusätzliche C-Quelle)
Inokulum:	0,5%
Temperatur:	37°C
Drehzahl:	400 rpm
Belüftungsrate:	20 L/min.
pO ₂ -Regelung:	über Rührer bis max. 1200 rpm

Die Erfassung relevanter Fermentationsparameter (pH-Wert, pO₂, Temperatur und Drehzahl) sowie Regelung und Steuerung der Bioreaktoren erfolgten *online* über einen PC mit der Steuerungssoftware "IRIS 1.0" der Firma Infors (Infors AG, Bottmingen, Schweiz).

pH-Messung/Regelung am Fermenter Der pH-Wert wurde *online* mittels einer sterilisierbaren Elektrode vom Typ 465 (Mettler-Toledo, Gießen) bestimmt und wurde mit 3 N KOH bzw. 3 N H₃PO₄ in den Vorlagen eingestellt.

pO₂-Messung am Fermenter Der Sauerstoffpartialdruck wurde mit einer sterilisierbaren, amperometrischen Sauerstoffelektrode (Mettler-Toledo, Gießen) *online* gemessen. Vor Beginn der Fermentation wurde der relative Wert auf 100% eingestellt.

10.2.3 Zellernte und Zellaufschluss

Zellernte Zur Ernte der Biomasse wurde der Inhalt des Fermenters portionsweise in einer Sorvall RC5B-Kühlzentrifuge (DuPont, Bad Homburg) 20 min. lang bei 4°C und 8000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und verworfen, das Zellmaterial bis zu seiner weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Zellaufschluß Es wurden 30%ige *E. coli* Zellsuspensionen in den entsprechenden Aufschlußpuffern eingesetzt. Zum Aufschluß der Zellen mit Ultraschall (Eiskühlung) kam ein Bandelin Sonoplus (Bandelin, Berlin) mit max. 60 W Leistung und einer Arbeitsfrequenz von 20 kHz zum Einsatz. Leistung und Beschalldauer konnten einzeln und stufenlos eingestellt werden (i.d.R. 90% Leistung). Das gewonnene Zellhomogenat wurde anschließend in einer Sorvall RC5B-Kühlzentrifuge 30 min. lang bei 4°C und 18000 g zentrifugiert. Der Überstand (Rohextrakt) wurde für die weitere Aufreinigung der Enzyme eingesetzt. Für die Aufreinigung der Fucosyltransferase wurden in Japan die entsprechenden Geräte eingesetzt.

10.2.4 Chromatographische Aufreinigung und Ultrafiltration (UF)

Anionenaustausch-Chromatographie

Bei der Methode zur Aufreinigung der GMD kam Q-Sepharose FF (Pharmacia, Freiburg) als Säulenmaterial zum Einsatz. Dieser Träger zeigt hohe Bindungskapazitäten für Proteine und erlaubt hohe Flußgeschwindigkeiten.

Labormaßstab Zur Aufreinigung der GMD im kleinen Maßstab wurden folgende Materialien eingesetzt bzw. galten folgende Bedingungen:

Säule:	Betthöhe: 12 cm
(Pharmacia XK 26)	Radius: 1,3 cm
	Gelvolumen: 64 mL
Probenaufgabe:	29 mL Rohextrakt, 554 mg Gesamtprotein
	8,6 mg Protein / mL Gelvolumen
Aufschluß- und Äquilibrierungspuffer:	50 mM MOPS, pH 7
	10 mM MgCl ₂
	1 mM DTT
	0,75 mM PMSF
	1% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)
Spülpuffer:	50 mM MOPS, pH 7
	10 mM MgCl ₂
	1 mM DTT
	100 mM KCl
Elution:	linearer Gradient 0,1 M bis 0,6 M KCl in:
	50 mM MOPS, pH 7
	10 mM MgCl ₂
	1 mM DTT
	Gradient in 10 Säulenvolumina (640 mL)
Puffer für UF:	50 mM MOPS, pH 7
	10 mM MgCl ₂
	1 mM DTT
	10% (v/v) Glycerin
Flußraten:	3 mL/min. (Auftragen)
	5 mL/min. (Spülen)
	10 mL/min. (Elution)
Temperatur:	Raumtemperatur
Detektion:	UV-Detektion, 280 nm

Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und der Pool in einer Ultrafiltrationszelle der Firma AMICON über einer YM10-Membran, die zuvor mit 5% (w/v) PEG4000 belegt wurde, entsalzt und aufkonzentriert. Alternativ kam ein *cross flow*-Modul der Firma Millipore (Pellicon XL 50, Millipore, Schwalbach) zum Einsatz. Das UF-Retentat wurde als 50%ige Enzympräparation in Glycerin (v/v) bei -20°C gelagert.

Pilot-Maßstab Für die Aufreinigung im *pilot scale* wurden die gleichen Puffer eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch UV-Absorption. Einige Aufreinigungsparameter wurden aufgrund der Maßstabsvergrößerung jedoch verändert. Die Bereitstellung der in Kapitel 4.1.2 bilanzierten Enzymmenge wurde in zwei separaten Läufen durchgeführt, hier sind exemplarisch die Parameter eines Laufes angegeben.

FPLC-Anlage	Biocad Sprint (Applied Biosystems, Foster City, USA)
Säule: (Pharmacia XK 26)	Betthöhe: 22 cm Radius: 2,5 cm Gelvolumen: 430 mL
Probenaufgabe:	120 mL Rohextrakt, 4,95 g Gesamtprotein 11,5 mg Protein / mL Gelvolumen
Elution:	wie Labormaßstab, aber in 5 Säulenvolumina (2150 mL)
Flußraten:	10 mL/min. für alle Schritte
Temperatur:	Raumtemperatur
Detektion:	UV-Detektion, 280 nm

Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und der Pool in einem Ultrafiltrationsmodul S3Y10 der Firma AMICON über einer YM10-Membran entsalzt und aufkonzentriert. Dieses Modul erlaubt die Entsalzung und Aufkonzentrierung großer Volumina (hier: 1200 mL pro Pool) und erreicht hohe Transmembranflüsse. Das UF-Retentat wurde anschließend als 50%ige Enzympräparation bei -20°C gelagert.

Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC)

Bei der Methode zur Aufreinigung der GFS kam Ni-NTA Superflow (Qiagen, Hilden) als Säulenmaterial zum Einsatz. Es können hohe Bindungskapazitäten für Proteine erreicht werden, die zur Aufreinigung der GFS ausreichend sind. Der Träger kann durch ein einfaches Regenerationsprotokoll nach mehreren Anwendungen neu mit Ni²⁺ beladen werden.

Aufreinigung der GFS Es galten die folgenden Bedingungen. Einige Parameter zeigen schwankende Werte, da diese bei den einzelnen Aufreinigungen variierten.

Säule: (Pharmacia XK 26)	Betthöhe: 15 cm Radius: 1,3 cm Gelvolumen: 80 mL
Probenaufgabe:	20-40 mL Rohextrakt, 510-890 mg Gesamtprotein 6,3-11,1 mg Protein / mL Gelvolumen
Aufschluß- und Äquilibrierungspuffer:	50 mM Tris-HCl, pH 8 10 mM MgCl ₂ 5 mM Mercaptoethanol
Spülpuffer:	Aufschlußpuffer + 20 mM Imidazol
Elution:	Aufschlußpuffer + 200 mM Imidazol
Puffer für UF:	wie Aufschlußpuffer
Puffer für GF:	Aufschlußpuffer + 10% (v/v) Glycerin
Flußraten:	ca. 1 mL/min. (Auftragen) 3 mL/min. (Spülen) 3 mL/min. (Elution)
Temperatur:	Raumtemperatur
Detektion:	UV-Detektion, 280 nm

Die GFS-haltigen Fraktionen wurden anschließend gepoolt und das Imidazol durch Ultrafiltration oder Gelfiltration abgetrennt. Im Falle der Ultrafiltration kam eine Ultrafiltrationszelle der Firma Vivascience (Vivascience, Göttingen) oder ein *cross flow*-Modul der Firma Millipore (Pellicon XL 50, Millipore, Schwalbach) zum Einsatz. Die verwendeten Membranen (Polyethersulfon oder regenerierte Cellulose) besaßen einen *cut off* von 10 kD und wurden vor ihrer Benutzung mit PEG4000 belegt.

Zum Abtrennen des Imidazols mittels Gelfiltration wurde eine FPLC-Säule (Pharmacia XK 50) eingesetzt, die mit Sephadex G 25 M Material beladen war.

Säule:	Betthöhe: 48 cm
(Pharmacia XK 50)	Radius: 2,5 cm
	Gelvolumen: 300 mL
Probenaufgabe:	120 mL Ni-NTA-Pool
	5 mL/min.
Flußrate (Elution)	20 mL/min.

Zur Aufkonzentrierung des imidazolfreien Gelfiltrationspools wurde erneut die Ultrafiltration (s.o.) eingesetzt.

Aufreinigung der α 1,2-FucT Es galten die folgenden Bedingungen. Auf Möglichkeiten einer Optimierung des Aufreinigungsprotokolls wurde bereits in Kapitel 4.3.2 auf Seite 54 kurz eingegangen.

Säule:	Betthöhe: 12,5 cm
(Pharmacia XK 16)	Radius: 0,8 cm
	Gelvolumen: 25 mL
Probenaufgabe:	15 mL Rohextrakt, 367 mg Gesamtprotein
	14,7 mg Protein / mL Gelvolumen
Aufschluß- und Äquibrierungspuffer:	50 mM Tris-HCl, pH 8
	150 mM NaCl
Spülpuffer:	Aufschlußpuffer + 20 mM Imidazol
Elution:	Aufschlußpuffer (ohne NaCl) + 200 mM Imidazol
Flußraten:	2 mL/min. (Äquibrieren)
	1 mL/min. (Auftragen Rohextrakt)
	2 mL/min. (Waschen und Elution)
Temperatur:	4°C
Detektion:	UV-Detektion, 280 nm

Nach Poolen der FucT-aktiven Fraktionen wurde überschüssiges Imidazol durch Ultrafiltration in einem Centriprep-Modul (Millipore, Schwalbach) abgetrennt. Untersuchungen zur Gelfiltration im Mikromaßstab wurden mit Einmal-Kartuschen der Firma Pharmacia durchgeführt (PD-10TM oder NAP-10TM).

10.2.5 Protein-Analytik

Proteinbestimmung nach Bradford

Bei diesem Standard-Verfahren zur quantitativen Proteinbestimmung wird der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 eingesetzt, der eine nicht-stöchiometrische Anfärbung der Proteine bewirkt. Der Extinktionskoeffizient des Protein-Farbstoff-Komplexes bei $\lambda = 595$ nm ist um ein Vielfaches größer als der des freien Farbstoffes [318].

Für alle Bestimmungen wurde ein gebrauchsfertiges *Bradford*-Reagenz der Firma BioRad (München) verwendet. 50 μ L des Reagenzes wurden mit 200 μ L der (verdünnten) Probelösung vermischt und die Extinktion bei 595 nm nach einer Inkubationszeit von 5 min. bei 30°C im Mikroplattenleser (Molecular Devices GmbH, München) gemessen. BSA-Standardlösungen dienten zur Aufnahme einer Kalibriergeraden.

SDS-PAGE Analyse

Die denaturierende SDS-PAGE Analyse beruht auf der Methode nach *Lämmli* [319]. Die (vorverdünnten) Proteinproben bzw. Zellsuspensionen wurden 1:2 mit *Lämmli*-Puffer versetzt und 2 min. lang bei 95°C denaturiert. Nach Abkühlen auf Eis wurden die Proben abzentrifugiert und ein Aliquot (20 μ L) des Überstandes in die Probetaschen des Gels aufgetragen.

Gerät:	Criterion Precast System (BioRad, München)
Gele:	Midi-Gele (8 x 12 cm ²) Tris-HCl Gele (12,5%)
Trennbedingungen:	20 mA (constant)
Temperatur:	15°C
MW-Standard:	Premixed Standard (Boehringer Mannheim) 1:20 mit <i>Lämmli</i> -Puffer verdünnt

Nach der Elektrophorese wurden die Gele 30-40 min. mit einer *Bradford*-Färbelösung und zur Entfärbung des Hintergrundes anschließend mit einer Entfärbelösung versetzt.

Färbelösung:	50% (v/v) demineralisiertes Wasser 40% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Eisessig 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250
Entfärbelösung:	entspricht Färbelösung ohne Coomassie Brilliant Blue G250

10.3 Enzymatische Assays

10.3.1 GMD-Assay

Die GMD-Aktivität wurde durch Bestimmung der Substrat- (GDP-Man) Abnahme bzw. Produkt- (GKDM) Bildung mit Hilfe der Kapillarelektrophorese gemessen. Die Entwicklung

des enzymatischen Assays wurde ausführlich in Kapitel 3.2.3 besprochen. Die Bedingungen des Standardassays waren wie folgt: 50 mM MOPS Puffer, pH 7, 1 mM GDP-Man, 0,1 mM NADPH, 0,1 mM NADP, 10 mM MgSO₄ und 0,05-0,1 U/mL GMD in einem Volumen von 1 mL. Nach Inkubation aller Komponenten mit Ausnahme der GDP-Man für 5 min. bei 30°C wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates gestartet. Proben (50 µL) wurden nach definierten Zeitintervallen genommen, diese anschließend 1 min. lang bei 95°C erhitzt, um die Reaktion zu stoppen. Die Überstände der zentrifugierten Proben (5 min. bei 14000 rpm und 4°C) wurden dann mit der Kapillarelektrophorese vermessen (siehe Kapitel 10.1.1). Alternativ wurde die HPLC (System 1) zur Messung der Analyt-Konzentrationen eingesetzt.

Kinetische Messungen wurden so durchgeführt, dass die zu untersuchende Komponente in ihrer Konzentration variiert wurde, während die übrigen Komponenten konstant und in Sättigung gehalten wurden.

Inhibierungen wurden in gleicher Weise bestimmt; die zu untersuchende Komponente wurde in variierenden Konzentrationen zusätzlich zum Assay pipettiert.

10.3.2 GFS-Assay

Die GFS-Aktivität wurde photometrisch bestimmt, indem aus der an einem Mikroplattenleser bestimmten Abnahme der Absorption bei 340 nm die Änderung der NADPH- bzw. NADH-Konzentration berechnet wurde. Mit Hilfe der HPLC wurden Kontrollmessungen durchgeführt, die eine Korrelation der Substrat- (GKDM bzw. NAD(P)H) Abnahme und der Produkt- (GDP-Fuc bzw. NAD(P)) Zunahme belegen. Im Standardassay wurden die NAD(P)H-Konzentrationen so gewählt, dass ein linearer Zusammenhang zwischen Extinktion und Konzentration der reduzierten Cofaktoren gegeben war.

Die Assaybedingungen zur Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten waren wie folgt: 50 mM Tris-HCl Puffer, pH 8, 0,2-0,3 mM GKDM, 0,5 mM NAD(P)H, 10 mM MgCl₂ und 0,012 U/mL GFS in einem Volumen von 100 µL. Nach Inkubation der Reaktionslösung für 10 min. bei 30°C wurde die Enzymreaktion durch Substratzugabe gestartet. Die Abnahme der Extinktion wurde auf einem Thermomax™ Mikroplattenleser (Molecular Devices GmbH, München) verfolgt. Aus dem arithmetischen Mittel der Doppelbestimmungen der zeitlichen Extinktionsabnahmen wurde die GFS-Aktivität berechnet.

Kinetische Messungen wurden so durchgeführt, dass die zu untersuchende Komponente in ihrer Konzentration variiert wurde, während die übrigen Komponenten konstant und in Sättigung gehalten wurden.

Inhibierungen wurden in gleicher Weise bestimmt; die zu untersuchende Komponente wurde in variierenden Konzentrationen zusätzlich zum Assay pipettiert.

10.3.3 FucT-Assay

Die FucT-Aktivität wurde durch Messung der gebildeten fucosylierten Oligosaccharide bestimmt. Die Bedingungen des Standardassays waren wie folgt: 50 mM Tris-HCl Puffer, pH 8, 10 mM Akzeptor, 10 mM GDP-Fuc, 5 mM MnCl₂ und 40 µL FucT in einem Volumen von 100 µL. Nach Inkubation des Reaktionsgemisches für 30 min. bei 30°C wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von GDP-Fuc gestartet. Proben von je 20 µL wurden nach 0, 20, 40, 60 und 120 min. genommen und 2 min. lang bei 95°C erhitzt. Die Proben wurden anschließend 1:10 mit Wasser verdünnt und bei 4°C 30 min. zentrifugiert. Die Konzentration des fucosylierten Akzeptors wurde mittels HPLC bestimmt (System 3).

10.4 Synthesevorschriften

10.4.1 Produktion von GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose

Synthese im 200 μ mol Ansatz Die Synthese von 200 μ mol GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose (GKDM) wurde in einer 50 mL Amicon-Zelle durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe der GDP-Man gestartet. Die Bedingungen eines solchen semi-präparativen Ansatzes waren:

Gesamtvolumen	20 mL
GDP-Man	10 mM
NADP	0,1 mM
NADPH	0,1 mM
MgCl ₂	10 mM
GMD	0,14 U/mL
Glycerin	1,35 M
pH	7,9

Nach vollständiger Umsetzung des Substrates wurde das Enzym durch Ultrafiltration bei 4°C abgetrennt (Membran mit 10 kD *cut-off*).

Lyophilisation des Produktes Nach Zugabe von 2 mL Glycerin zum Filtrat der ultrafiltrierten Reaktionslösung wurden je 11 mL der produkthaltigen Lösung in einem Schlenk-Gefäß mit Kühlmantel eingefroren und an die Gefriertrocknungsanlage angeschlossen. Der Kühlmantel wurde während des gesamten Trocknungsprozesses mit einer Kühlflüssigkeit, die mit Hilfe eines Kryostaten auf -20°C temperiert wurde, durchströmt. Nach erfolgter Trocknung wurde die Anlage mit Argon belüftet und das Produkt bis zur weiteren Verwendung bei -20°C in einer Argonatmosphäre gelagert.

10.4.2 Produktion von GDP- β -L-Fucose

Verschiedene Synthesemethoden von GDP-Fuc wurden in Kapitel 6 ausführlich dargestellt und diskutiert. Die Reaktionsbedingungen der diskontinuierlichen und kontinuierlichen Verfahren finden sich jeweils in den Bildunterschriften. Hier soll für die beiden Verfahren das allgemeine experimentelle Vorgehen kurz beschrieben werden.

Diskontinuierliche Synthesen im "repetitive batch" Die Synthesen wurden in einer 50 mL Amiconzelle durchgeführt. Die eingesetzten Enzyme (GFS und FDH) wurden durch eine UF-Membran mit einem *cut-off* von 10 kD retentiert. Vor Befüllen des Reaktionsgefäßes wurde die Membran mit einer BSA-Lösung in Wasser (1 mg/mL) gespült, um die Adsorption der Enzyme auf der Membran zu verringern. Abfiltrieren der Reaktionslösung nach Beendigung eines Reaktionszyklus wurde durch Überdruck mit Stickstoff ermöglicht.

Kontinuierliche Synthesen Die Synthesen wurden in Enzym-Membran-Reaktoren aus Plexiglas mit einem Volumen von je 3 mL durchgeführt. Zur Retention der Enzyme kam auch hier eine Membran mit einem *cut-off* von 10 kD zum Einsatz. Die Reaktionstemperatur wurde

durch Eintauchen der Plexiglasreaktoren in entsprechend temperierte Wasserbäder kontrolliert. Die generelle Vorgehensweise bei der Vorbereitung und Durchführung eines kontinuierlichen Experimentes umfasste die Schritte:

- Sterilisation der Anlage mit 0,1% Peressigsäure
- Spülen mit Puffer
- Vorbelegen der UF-Membran mit BSA-Lösung
- Einspritzen der Enzyme über die Blasenfallen
- Zufuhr der gekühlten Substratlösung
- Verweilzeitkontrolle über Fördergeschwindigkeit der Pumpe.

10.5 Massenspektrometrische Daten

10.5.1 GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose

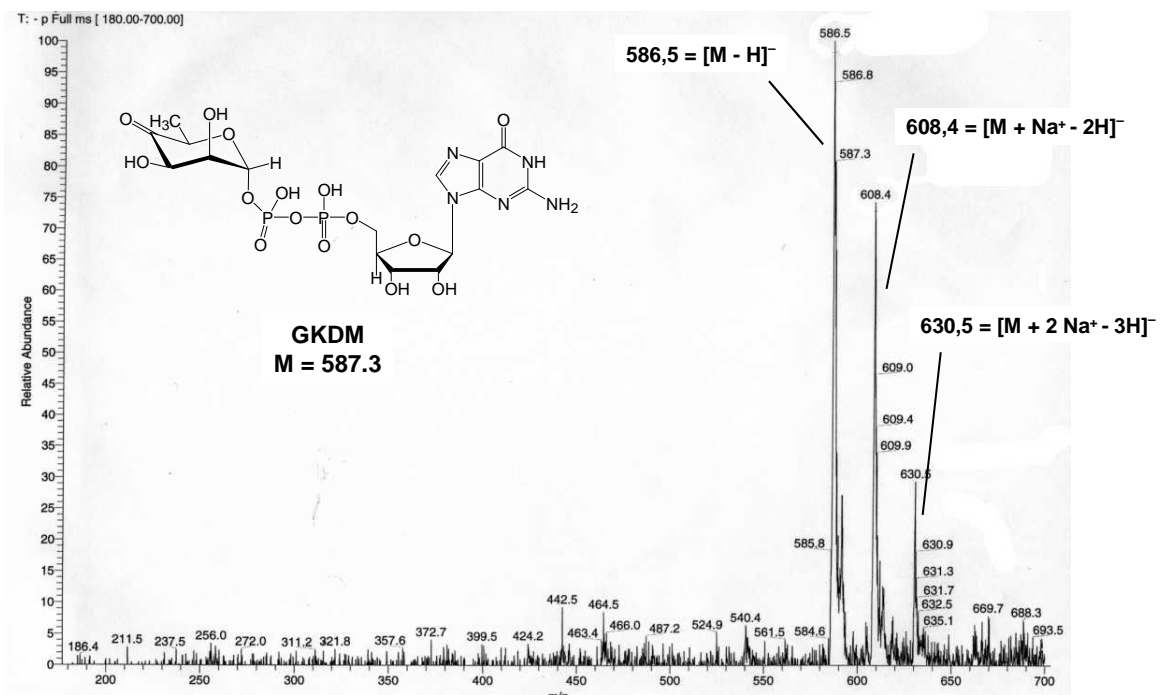


Abbildung 10.4: ESI-MS-Spektrum der GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose (GKDM).

10.6 NMR-spektroskopische Daten

10.6.1 GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose

Die NMR-spektroskopische Charakterisierung der GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose (GKDM) erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Organische Chemie der Universität Hannover (Dr. Gerald Dräger, Arbeitskreis Prof. Dr. Andreas Kirschning). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind Teil einer Publikation [320]. Die folgenden Abbildungen 10.5, 10.6 und 10.7 zeigen die entsprechenden NMR-Spektren (1-D/2-D). Tabelle 10.1 auf Seite 190 fasst die gemessenen chemischen Verschiebungen zusammen. Auf die Charakterisierung von GKDM wurde bereits in Kapitel 5.3.1 eingegangen.

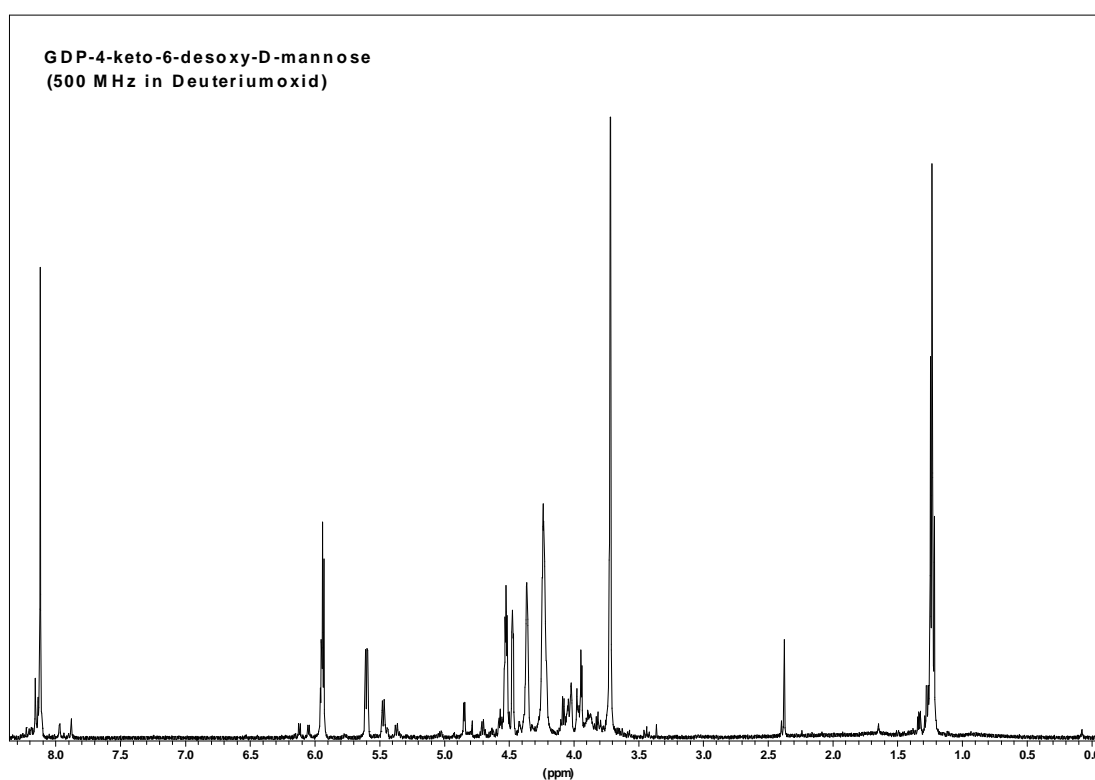


Abbildung 10.5: ^1H -NMR-Spektrum der GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose, GKDM (D_2O , 500 MHz).

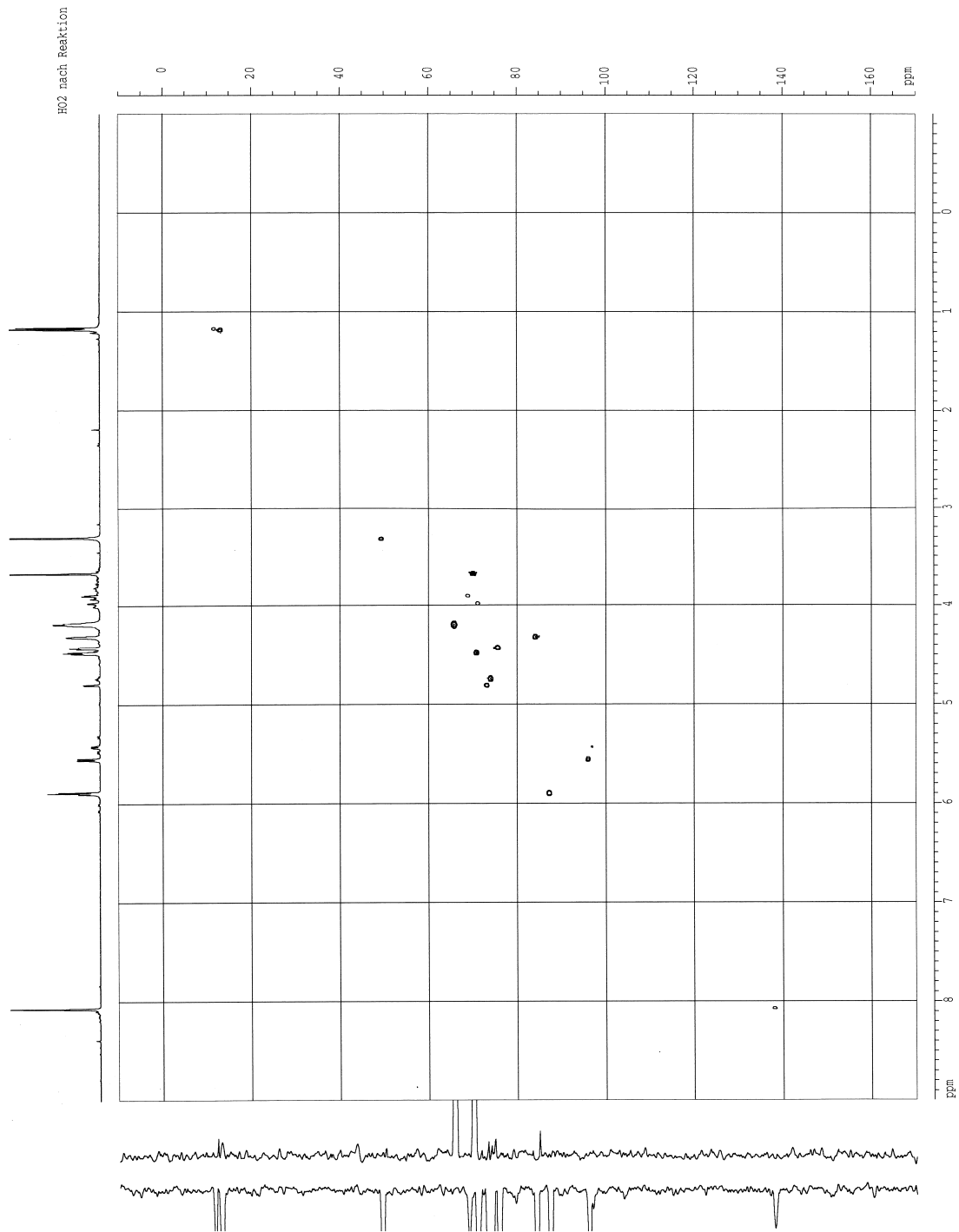


Abbildung 10.6: HSQC-NMR-Spektrum der GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose, GKDM (H_2O , 500 MHz).
 Mit der HSQC-Technik können CH-Konnektivitäten auf der Basis des ^1H -NMR-Spektrums ermittelt werden.

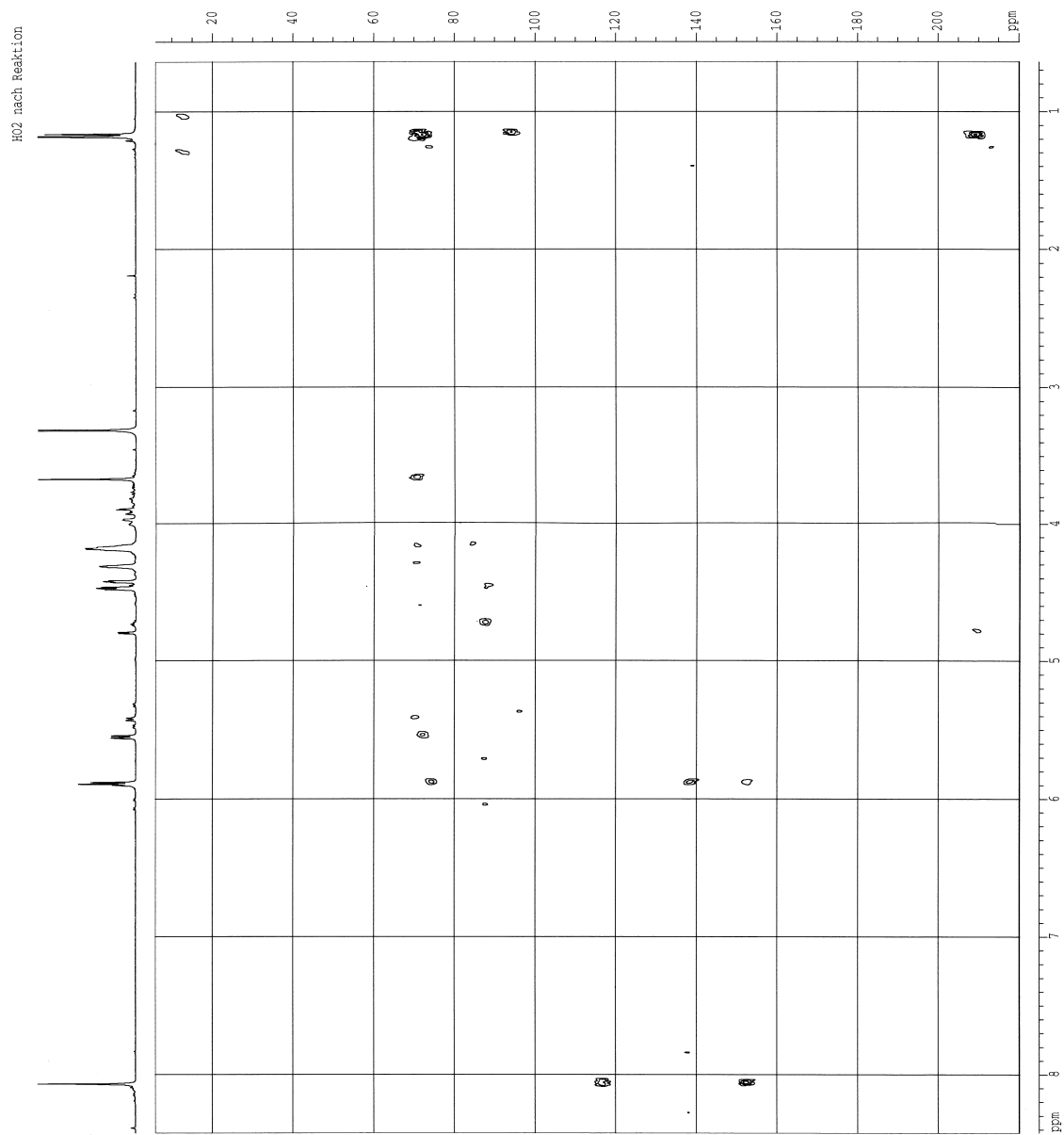


Abbildung 10.7: HMBC-NMR-Spektrum der GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose, GKDM (H_2O , 500 MHz).

Mit der HMBC-Technik können Protonen mit umliegenden C-Atomen korreliert werden.

	GDP-4-keto-6-deoxy- α -D-mannose (ketone form)				GDP-4-keto-6-deoxy- α -D-mannose (hydrate form)			
	^{13}C δ [ppm]	^1H δ [ppm]	Mult	J [Hz]	^{13}C δ [ppm]	^1H δ [ppm]	Mult	J [Hz]
Base								
2	154.28				154.28			
4	152.10				152.10			
5	116.46				116.46			
6	159.14				159.14			
8	137.95	8.11	s		137.95	8.11	s	
Ribose								
1'	87.39	5.93	d	5.9	87.39	5.94	d	5.9
2'	74.12 ^a	4.75	hidden		74.12 ^a	4.75	hidden	
3'	70.92 ^a	4.52	dd	4.9, 3.8	70.92 ^a	4.52	dd	4.9; 3.8
4'	83.99	4.38	m		83.99	4.38	m	
5' a,b	65.85	4.23	m		65.85 ^a	4.23	m	
Mannose								
1''	96.10	5.60	dd	7.5, 2.2	97.02	5.47	dd	7.6; 1.7
2''	75.73a	4.47	dd	3.6, 2.2	71.22 ^a	4.02	dd	3.4; 1.7
3''	73.26 ^a	4.84	d	3.6	68.98 ^a	3.94	d	3.4
4''	208.57				93.56 ^b			
5''	70.42 ^b	4.70	q	6.4	70.10 ^b	4.07	q	6.4
6''	13.16 ^a	1.24	d	6.4	11.70 ^a	1.22	d	6.4

^a data extracted from the HMBC experiment δ (C-1') = 87.39 ppm
^b data extracted from the HSQC-Edit experiment δ (C-1') = 87.39 ppm

Tabelle 10.1: Übersicht der chemischen ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen für die GDP-4-keto-6-desoxy- α -D-Mannose in ihrer Keto- und Hydratform. Daten publiziert in [320].

10.6.2 GDP- β -L-Fucose

NMR-Spektren der enzymatisch gewonnenen GDP-Fuc wurden am Institut für Biotechnologie aufgenommen. Sie dienen der eindeutigen Identifikation der Substanz. Die gemessenen chemischen Verschiebungen entsprechen bekannten Literaturdaten [143, 151, 152].

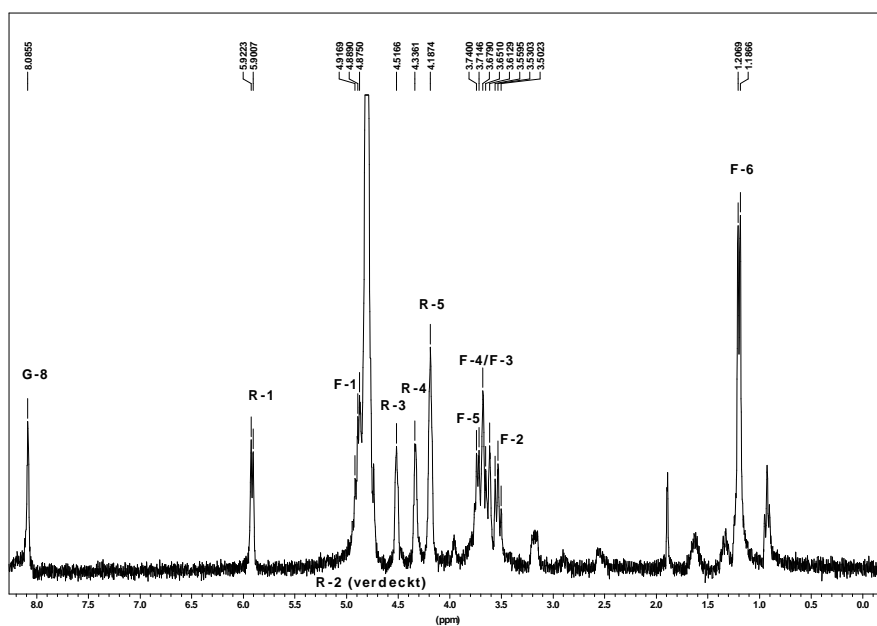


Abbildung 10.8: ^1H -NMR-Spektrum der GDP- β -L-Fucose (D_2O , 300 MHz).
Zuordnung der Protonen: **G** = Guanosin, **R** = Ribose, **F** = Fucose.

Verschiebung	Integral	Multiplizität	Position des H-Atoms
8.08	1 H	s	G-8
5.91	1 H	d	R-1
		$(^3J_{HH} = 6.4 \text{ Hz})$	
4.88 (Signal verdeckt)	1 H	m	F-1
4.80 (Signal verdeckt)	1 H	-/-	R-2
4.52	1 H	m	R-3
4.34	1 H	m	R-4
4.18	2 H	m	R-5 (H_a/H_b)
3.73	1 H	q	F-5
3.68	1 H	m	F-4
3.63	1 H	dd	F-3
3.53	1 H	m	F-2
1.20	3 H	d	F-6
		$(^3J_{HH} = 6.0 \text{ Hz})$	

Tabelle 10.2: ^1H -NMR-Daten der GDP- β -L-Fucose.

10.7 Verwendete Enzyme, Chemikalien und Geräte

Enzyme

GDP- α -D-Mannose-4,6-Dehydratase (<i>E. coli</i> , rek.)	IBT 2/ IET, FZ Jülich GmbH
GDP- β -L-Fucose-Synthetase (<i>E. coli</i> , rek.)	IBT 2/ IET, FZ Jülich GmbH
α 1,2-Fucosyltransferase (<i>H. pylori</i> , rek.)	Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Japan
Formiatdehydrogenase, NADP spez. (<i>Pseudomonas sp. 101</i> , rek.)	Juelich Fine Chemicals GmbH
Alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1) (Kälberdarm)	Boehringer, Mannheim

Chemikalien

GDP-Man	Sigma, München Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Japan
GDP-Fuc	Sigma, München Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Japan
NADPH, NADP, NADH, NAD	BIOMOL, Hamburg
Ni-NTA-Agarose (SuperFlow)	Qiagen, Hilden
Q-Sepharose FF	Amersham Biosciences Europe, Freiburg

Laborchemikalien wie Puffer, Salze etc. wurden von den üblichen Zulieferern bezogen und waren mindestens in p.a. Qualität.

Geräte

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Laborgeräte wie Zentrifugen, Wasserbäder, Schüttler, Pumpen, FPLC-Säulen etc. waren Eigentum des Institutes für Biotechnologie, des Institutes für Enzymtechnologie bzw. der Universität Bonn. Auf eine explizite Auflistung der Geräte soll hier verzichtet werden.

10.8 SCIENTIST Software

Zur Anpassung relevanter Modell-Parameter und zur Simulation von Reaktionsverläufen wurde das Programm SCIENTIST™ (Version 2.0) der Firma MicroMath verwendet. Die benutzten Befehle und Ihre Bedeutungen lauten:

//Text	Bemerkungen und Kommentare
IndVars	Liste der unabhängigen Variablen
DepVars	Liste der abhängigen Variablen
Params	Liste der (Anpassungs-)Parameter

Der Anfangswert der zu optimierenden oder zu simulierenden Größen muss vorgegeben werden. An dieser Stelle sollen nicht sämtliche Programme, die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden, wiedergegeben werden. Exemplarisch ist das Programm zur Simulation eines *batch*-Versuches der GMD-Reaktion gezeigt. Nach der Simulation können die berechneten Verläufe durch Optimierung relevanter Modell-Parameter an die experimentellen Daten angepasst werden.

```
//Beispiel für ein Programm zur batch-Simulation der GMD-Reaktion
//Abkürzungen:
//Konzentrationen [mM]: A=GDP-Man, B=GKDM, NADP, NADPH
//Bezeichnungen:
//R1=VProd, R2=ANADP, R3=ANADPH, R4=Vdes,NADPH
//V=VProd,max, VM1=Amax,NADP, VM2=Amax,NADPH, VM11=VProd,NADP, VM3=VProd,NADPH
//k=kdes,NADPH

IndVars: t
DepVars:A,B,NADP,NADPH,U,V,VM11,VM2,VM3,R1,R2,R3
Params:KMA,KMNADP,KMNADPH,VM1,k
R1=V*A/(KMA+A)
R2=VM1*NADP/(KMNADP+NADP)
R3=VM2*NADPH/(KMNADPH+NADPH)
R4=k*NADPH
Equations:
A'=-R1
B'=R1
NADP'=R4
NADPH'=-R4
VM1'=-R2
VM11'=R2
VM2'=R2-R3
VM3'=R3
V=VM11+VM3
U=(A0-A)/A0
//Initial conditions
t=0
A=1
B=0
VM11=0
VM2=0
VM3=0
NADP=0.1
NADPH=0.1

//Parameter values
KMA=0.2682
KMNADP=0.2402
```

```
KMNADPH=0.0162  
VM1=0.046  
k=0.008  
//Constants  
A0=1  
***
```


Literaturverzeichnis

- [1] ACHARD, F.C.: *Die europäische Zuckerfabrikation aus Runkelrüben*. Leipzig : Deutsches Museum - Sign.: 1900 A 167, 1809
- [2] MINTZ, S.W.: *Die süße Macht. Kulturgeschichte des Zuckers*. Frankfurt/Main : Campus Verlag, 1996
- [3] KRAMANN, S.: Ohne Zucker sähe die Welt ganz anders aus. In: *Kurier - Bayer Crop-Science* 1 (2003), S. 7–9
- [4] LINDHORST, T.: Struktur und Funktion von Kohlenhydraten. In: *Chemie in unserer Zeit* 34 (2000), Nr. 1, S. 38–52
- [5] KREN, V. ; MARTINKOVA, L.: Glycosides in medicine: "The role of glycosidic residue in biological activity" In: *Current Medicinal Chemistry* 8 (2001), S. 1313–1338
- [6] ANDERSON, E.S. ; ROGERS, A.H.: Slime polysaccharides of the *Enterobacteriaceae*. In: *Nature* 198 (1963), S. 714–715
- [7] GRANT, W.D. ; SUTHERLAND, I.W. ; WILKINSON, J.F.: Exopolysaccharide colanic acid and its occurrence in the *Enterobacteriaceae*. In: *Journal of Bacteriology* 100 (1969), Nr. 3, S. 1187–1193
- [8] GAREGG, P.J. ; LINDBERG, P. ; ONN, T. ; SUTHERLAND, I.W.: Comparative structural studies on the M-antigen from *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* and *Aerobacter cloacae*. In: *Acta Chimica Scandinavica* 25 (1971), S. 2103–2108
- [9] MARKOVITZ, A.: Genetics and regulation of bacterial polysaccharide synthesis and radiation sensitivity. In: SUTHERLAND, I.W. (Hrsg.): *Surface carbohydrates of the prokaryotic cell* Bd. 1. New York : Academic Press, 1977, S. 415–462
- [10] RIETSCHEL, E.T. ; BRADE, L. ; SCHADE, F.U. ; BRADE, H.: Bakterielle Endotoxine: Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und biologischer Wirkung. In: *Immunität und Infektion* 21 (1993), Nr. 2, S. 26–35
- [11] HOLST, O. ; ULMER, A.J. ; BRADE, H. ; FLAD, H.-D. ; RIETSCHEL, E.T.: Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. In: *FEMS Immunology and Medicinal Microbiology* 16 (1996), S. 83–104
- [12] PIOTROWSKI, J. ; PIOTROWSKI, E. ; SKRODZKA, D. ; SLOMIANY, A. ; SLOMIANY, B.L.: Induction of acute gastritis and epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. In: *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 32 (1997), S. 203–211

- [13] NIKAIDO, H. ; VAARA, M.: Outer membrane. In: NEIDHARDT, F.C. (Hrsg.) ; INGRAHAM, J.L. (Hrsg.) ; LOW, K.B. (Hrsg.) ; MAGASANIK, B. (Hrsg.) ; SCHAECHTER, M. (Hrsg.) ; UMBARGER, H.E. (Hrsg.): *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology* Bd. 1. 1. Washington D.C. : ASM, 1987, S. 7–22
- [14] RICK, P.D.: Lipopolysaccharide biosynthesis. In: NEIDHARDT, F.C. (Hrsg.) ; INGRAHAM, J.L. (Hrsg.) ; LOW, K.B. (Hrsg.) ; MAGASANIK, B. (Hrsg.) ; SCHAECHTER, M. (Hrsg.) ; UMBARGER, H.E. (Hrsg.): *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology* Bd. 1. 1. Washington D.C. : ASM, 1987, S. 648–662
- [15] SCHNAITMAN, C.A. ; KLENA, J.D.: Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. In: *Microbiological reviews* 57 (1993), Nr. 3, S. 655–682
- [16] RAETZ, C.R.H.: Bacterial lipopolysaccharides. In: NEIDHARDT, F.C. (Hrsg.) ; INGRAHAM, J.L. (Hrsg.) ; LOW, K.B. (Hrsg.) ; MAGASANIK, B. (Hrsg.) ; SCHAECHTER, M. (Hrsg.) ; UMBARGER, H.E. (Hrsg.): *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology* Bd. 1. 2. Washington D.C : ASM, 1996, S. 1035–1063
- [17] RAETZ, C.R.H.: Bacterial endotoxins: extraordinary lipids that activate eucaryotic signal transduction. In: *Journal of Bacteriology* 175 (1993), S. 5745–5753
- [18] REEVES, P.R. ; HOBBS, M. ; VALVANO, M.A. ; SKURNIK, M. ; WHITFIELD, C. ; COPLIN, D. ; KIDO, N. ; KLENA, J.D. ; MASKELL, D. ; RAETZ, C.R.H. ; RICK, P.D.: Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. In: *Trends in Microbiology* 4 (1996), S. 495–503
- [19] REEVES, P.R.: Evolution of *Salmonella* O antigen variation by interspecific gene transfer on a large scale. In: *Trends in Genetics* 9 (1993), S. 17–22
- [20] WILKINSON, S.G.: Bacterial lipopolysaccharides - themes and variations. In: *Progress in Lipid Research* 35 (1996), S. 283–343
- [21] DRUMMELSMITH, J. ; WHITFIELD, C.: Translocation of group 1 capsular polysaccharide to the surface of *Escherichia coli* requires a multimeric complex in the outer membrane. In: *EMBO Journal* 19 (2000), S. 57–66
- [22] GOEBEL, W.F.: Colanic acid. In: *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 49 (1963), S. 464–471
- [23] SUTHERLAND, I.W.: Structural studies on colanic acid, the common exopolysaccharide found in the *Enterobacteriaceae*, by partial acid hydrolysis - oligosaccharides from colanic acid. In: *Biochemical Journal* 115 (1969), S. 935–945
- [24] GRANT, W.D. ; SUTHERLAND, I.W. ; WILKINSON, J.F.: Control of colanic acid synthesis. In: *Journal of Bacteriology* 103 (1970), S. 89–96
- [25] SUTHERLAND, I.W.: Enzymic hydrolysis of colanic acid. In: *European Journal of Biochemistry* 23 (1971), S. 582–587
- [26] GOTTESMAN, S. ; STOUT, V.: Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K12. In: *Molecular Microbiology* 5 (1991), S. 1599–1606

- [27] RUSSO, T.A. ; SHARMA, G. ; WEISS, J. ; BROWN, C.: The construction and characterization of colanic acid deficient mutants in an extraintestinal isolate of *Escherichia coli* (O4/K54/H5). In: *Microbial pathogenesis* 18 (1995), S. 269–278
- [28] OPHIR, T. ; GUTNICK, D.L.: A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. In: *Applied and Environment Microbiology* 60 (1994), S. 740–745
- [29] SLEDJESKI, D.D. ; GOTTESMAN, S.: Osmotic shock induction of capsule synthesis in *Escherichia coli* K12. In: *Journal of Bacteriology* 178 (1996), S. 1204–1206
- [30] AOYAMA, K. ; HAASE, A.M. ; REEVES, P.R.: Evidence for effect of random genetic drift on G+C content after lateral transfer of fucose pathway genes to *Escherichia coli* K-12. In: *Mol. Biol. Evol.* 11 (1994), Nr. 6, S. 829–838
- [31] STEVENSON, G. ; ANDRIANOPOULOS, K. ; HOBBS, M. ; REEVES, P.R.: Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. In: *Journal of Bacteriology* 178 (1996), Nr. 16, S. 4885–4893
- [32] ANDRIANOPOULOS, K. ; WANG, L. ; REEVES, P.R.: Identification of the fucose synthetase gene in the colanic acid gene cluster of *Escherichia coli* K-12. In: *Journal of Bacteriology* 180 (1998), Nr. 4, S. 998–1001
- [33] JÄRVINEN, N. ; MÄKI, M. ; RÄBINÄ, J. ; ROOS, C. ; MATTILA, P. ; RENKONEN, R.: Cloning and expression of *Helicobacter pylori* GDP-L-fucose synthesizing enzymes (GMD and GMER) in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *European Journal of Biochemistry* 268 (2001), S. 6458–6464
- [34] SHARON, N. ; LIS, H.: Kohlenhydrate und Zellerkennung. In: *Spektrum der Wissenschaft* 3 (1993), S. 66–74
- [35] MONTREUIL, J.: The history of glycoprotein research, a personal view. In: MONTREUIL, J. (Hrsg.) ; SCHACHTER, H. (Hrsg.) ; Vliegenthart, J.F.G. (Hrsg.): *Glycoproteins* Bd. 29a. Amsterdam : Elsevier Science, 1995, S. 1–12
- [36] LIS, H. ; SHARON, N.: Protein glycosylation Structural and functional aspects. In: *European Journal of Biochemistry* 218 (1993), S. 1–27
- [37] POLZER, S. ; DITTMAR, M.T. ; SCHMITZ, H. ; MEYER, B. ; MÜLLER, H. ; KRÄUSSLICH, H.-G. ; SCHREIBER, M.: Loss of N-linked glycans in the V3-loop region of gp120 is correlated to an enhanced infectivity of HIV-1. In: *Glycobiology* 11 (2001), Nr. 1, S. 11–19
- [38] LASKY, L.A.: Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. In: *Science* 258 (1992), S. 964–969
- [39] GIANNIS, A.: Die Sialyl-Lewis-X-Gruppe und ihre Analoga als Liganden für Selektine: chemoenzymatische Synthesen und biologische Funktionen. In: *Angewandte Chemie* 106 (1994), Nr. 2, S. 188–191
- [40] MCEVER, R.P.: Selectin-carbohydrate interactions during inflammation and metastasis. In: *Glycoconjugate Journal* 14 (1997), S. 585–591

- [41] SEARS, P. ; WONG, C.-H.: Kohlenhydratmimetika: ein neuer Lösungsansatz für das Problem der kohlenhydratvermittelten biologischen Erkennung. In: *Angewandte Chemie* 111 (1999), S. 2446–2471
- [42] OEHNINGER, S. ; PATANKAR, M. ; SEPPALA, M. ; CLARK, G.F.: Involvement of selectin-like carbohydrate binding specificity in human gamete interaction. In: *Andrologia* 30 (1998), Nr. 4-5, S. 269–274
- [43] MENGERINK, K.J. ; VACQUIER, V.D.: Glycobiology of sperm-egg interactions in deuterostomes. In: *Glycobiology* 11 (2001), Nr. 4, S. 37R–43R
- [44] BROCKHAUSEN, I. ; SCHUTZBACH, J. ; KUHN, W.: Glycoproteins and their relationship to human disease. In: *Acta Anatomica* 161 (1998), Nr. 1-4, S. 36–78
- [45] MAGNANI, J.L.: The tumor markers, sialyl Lewis a and sialyl Lewis x bind ELAM-1. In: *Glycobiology* 1 (1991), S. 318–320
- [46] VARKI, A.: Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. In: *Glycobiology* 3 (1993), Nr. 2, S. 97–130
- [47] SIMON, P.M.: Pharmaceutical oligosaccharides. In: *Drug Discovery Today* 1 (1996), Nr. 12, S. 522–528
- [48] MCAULIFFE, J.C. ; HINDSGAUL, O.: Carbohydrate drugs - an ongoing challenge. In: *Chemistry & Industry* 3 (1997), S. 170–174
- [49] SERVICE, R.F.: The best of both worlds? In: *Science* 291 (2001), S. 2342
- [50] SERVICE, R.F.: After the fall. In: *Science* 291 (2001), S. 2340–2341
- [51] ALPER, J.: Searching for the medicine's sweet spot. In: *Science* 291 (2001), S. 2338–2343
- [52] MCAULIFFE, J.C. ; HINDSGAUL, O.: Carbohydrates in medicine. In: FUKUDA, M. (Hrsg.) ; HINDSGAUL, O. (Hrsg.): *Molecular and Cellular Glycobiology* Bd. 30. 2. Oxford University Press, 2000, S. 249–285
- [53] WONG, C.-H. (Hrsg.): *Carbohydrate-based drug discovery*. Weinheim : Wiley-VCH, 2003
- [54] SEARS, P. ; WONG, C.-H.: Toward automated synthesis of oligosaccharides and glycoproteins. In: *Science* 291 (2001), S. 2344–2350
- [55] BECKER, D.J. ; LOWE, J.B.: Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. In: *Glycobiology* 13 (2003), Nr. 7, S. 41R–53R
- [56] WATKINS, W.M.: Biosynthesis. Molecular basis of antigenic specificity in the ABO, H, and Lewis blood group systems. In: MONTREUIL, J. (Hrsg.) ; SCHACHTER, H. (Hrsg.) ; Vliegenthart, J.F.G. (Hrsg.): *Glycoproteins*. Amsterdam : Elsevier, 1995, S. 313–390
- [57] WARREN, J.R. ; MARSHALL, B.J.: Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. In: *The Lancet* (1983), S. 1273–1275
- [58] MARSHALL, B.J. ; WARREN, J.R.: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. In: *The Lancet* (1984), S. 1311–1314

-
- [59] MARSHALL, B.J.: The *Campylobacter pylori* story. In: *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 23 (1988), Nr. suppl 146, S. 58–66
- [60] WANG, G. ; GE, Z. ; RASKO, D.A. ; TAYLOR, D.E.: Lewis antigens in *Helicobacter pylori*: biosynthesis and phase variation. In: *Molecular Microbiology* 36 (2000), Nr. 6, S. 1187–1196
- [61] KARLSSON, K.-A.: The human gastric colonizer *Helicobacter pylori*: a challenge for host-parasite glycobiology. In: *Glycobiology* 10 (2000), Nr. 8, S. 761–771
- [62] BLASER, M.J.: Hypothesis: the changing relationships of *Helicobacter pylori* and humans: implications for health and disease. In: *Journal of Infectious Diseases* 179 (1999), S. 1523–1530
- [63] GASBARRINI, A. ; BRANCA, G. ; OJETTI, V. ; CANDELORO, L. ; DE VITIS, I. ; PASTORELLI, A. ; FRANCESCHI, F. ; ARMUZZI, A. ; TORRE, E.S. ; CANDELLI, M. ; CANDUCCI, M. ; ANTI, M.: *H. pylori* polyantibiotic resistant strains in dyspeptic patients not eradicated by two consecutive eradication regimens. In: *Gastroenterology* 116 (1999), Nr. 4, S. G0734
- [64] APPELMELK, B.J. ; NEGRINI, R. ; MORAN, A.P. ; KUIPERS, E.J.: Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* and the host. In: *Trends in Microbiology* 5 (1997), Nr. 2, S. 70–73
- [65] MONTEIRO, M.A. ; CHAN, K.H.N. ; RASKO, D.A. ; TAYLOR, D.E. ; ZHENG, P.Y. ; APPELMELK, B.J. ; WIRTH, H.-P. ; YANG, M. ; BLASER, M.J. ; HYNES, S.O. ; MORAN, A.P. ; PERRY, M.B.: Simultaneous expression of type 1 and type 2 Lewis blood group antigens by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides. In: *The Journal of Biological Chemistry* 273 (1998), Nr. 19, S. 11533–11543
- [66] MONTEIRO, M.A. ; APPELMELK, B.J. ; RASKO, D.A. ; MORAN, A.P. ; HYNES, S.O. ; MACLEAN, L.L. ; CHAN, K.H. ; ST MICHAEL, F. ; LOGAN, S.M. ; O'ROURKE, J. ; LEE, A. ; TAYLOR, D.E. ; PERRY, M.B.: Lipopolysaccharide structures of *Helicobacter pylori* genomic strains 26695 and J99, mouse model *H. pylori* strain, *H. pylori* P466 carrying sialyl Lewis X, and *H. pylori* UA915 expressing Lewis B - Classification of *H. pylori* lipopolysaccharides into glyco-type families. In: *European Journal of Biochemistry* 267 (2000), S. 305–320
- [67] MARTIN, S.L. ; EDBROOKE, M.R. ; HODGMAN, T.C. ; VAN DEN EIJNDEN, D.H. ; BIRD, M.I.: Lewis X biosynthesis in *Helicobacter pylori*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 272 (1997), Nr. 34, S. 21349–21356
- [68] ENDO, T. ; KOIZUMI, S. ; TABATA, K. ; OZAKI, A.: Cloning and expression of β 1,4-galactosyltransferase gene from *Helicobacter pylori*. In: *Glycobiology* 10 (2000), Nr. 8, S. 809–813
- [69] MCGOWAN, C.G. ; NECHEVA, A. ; THOMPSON, S.A. ; COVER, T.L. ; BLASER, M.J.: Acid-induced expression of an LPS-associated gene in *Helicobacter pylori*. In: *Molecular Microbiology* 30 (1998), Nr. 1, S. 19–31

- [70] WANG, G. ; RASKO, D.A. ; SHERBURNE, R. ; TAYLOR, D.E.: Molecular genetic basis for the variable expression of Lewis Y antigen in *Helicobacter pylori*: analysis of the $\alpha(1,2)$ fucosyltransferase gene. In: *Molecular Microbiology* 31 (1999), Nr. 4, S. 1265–1274
- [71] BOREN, T. ; FALK, P. ; ROTH, K.A. ; LARSON, G. ; NORMARK, S.: Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. In: *Science* 262 (1993), S. 1892–1895
- [72] GAGNEUX, P. ; VARKI, A.: Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. In: *Glycobiology* 9 (1999), Nr. 8, S. 747–755
- [73] DOBZHANSKY, T.: Nothing in biology makes sense, except in the light of evolution. In: *The American Biology Teacher* 35 (1973), S. 125–129
- [74] FEIZI, T.: Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are oncodevelopmental antigens. In: *Nature* 314 (1985), S. 53–57
- [75] KOJIMA, N. ; HANDA, K. ; NEWMAN, W. ; HAKOMORI, S.I.: Inhibition of selectin-dependent tumor cell adhesion to endothelial cells and platelets by blocking O-glycosylation of these cells. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 182 (1992), S. 1288–1295
- [76] ORNTOFT, T.F. ; VESTERGAARD, E.M.: Clinical aspects of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. In: *Electrophoresis* 20 (1999), S. 362–371
- [77] IDIKIO, H.A.: Sialyl-lewis-X, Gleason grade and stage in non-metastatic human prostate cancer. In: *Glycoconjugate Journal* (1997), Nr. 14, S. 875–877
- [78] CHANDRASEKARAN, E.V. ; CHAWDA, R. ; LOCKE, R.D. ; PISKORZ, C.F. ; MATTA, K.L.: Biosynthesis of the carbohydrate antigenic determinants, Globo H, blood group H, and Lewis b: a role for prostate cancer cell $\alpha(1,2)$ -L-fucosyltransferase. In: *Glycobiology* 12 (2002), Nr. 3, S. 153–162
- [79] YAZAWA, S. ; NAKAMURA, J. ; ASAO, T. ; NAGAMACHI, Y. ; SAGI, M. ; MATTA, K.L. ; TACHIKAWA, T. ; AKAMATSU, M.: Aberrant $\alpha(1,2)$ fucosyltransferases found in human colorectal carcinoma involved in the accumulation of the Le b and Y antigens in colorectal tumours. In: *Japanese Journal of Cancer Research* 84 (1993), S. 989–995
- [80] GAMBERT, U. ; THIEM, J.: Chemoenzymatic synthesis of the Thomsen-Friedenreich antigen determinant. In: *Carbohydrate Research* (1997), Nr. 299, S. 85–89
- [81] BROCKHAUSEN, I. ; YANG, J. ; DICKINSON, N. ; OGATA, S. ; ITZKOWITZ, S.H.: Enzymatic basis for sialyl-Tn expression in human colon cancer cells. In: *Glycoconjugate Journal* 15 (1998), S. 595–603
- [82] GAMBERT, U. ; THIEM, J.: Multienzyme system for synthesis of the sialylated Thomsen-Friedenreich antigen determinant. In: *European Journal of Organic Chemistry* (1999), S. 107–110

- [83] ENDO, T. ; KOIZUMI, S. ; TABATA, K. ; KAKITA, S. ; OZAKI, A.: Large-scale production of the carbohydrate portion of the sialyl-Tn epitope, α -NeuAc-(2-6)-D-GalNAc, through bacterial coupling. In: *Carbohydrate Research* 330 (2001), S. 439–443
- [84] HIRAIWA, N. ; DOHI, T. ; KAWAKAMI-KIMURAT, N. ; YUMEN, M. ; OHMORI, K. ; MAEDA, M. ; KANNAGI, R.: Suppression of Sialyl Lewis X Expression and E-selectin-mediated Cell Adhesion in Cultured Human Lymphoid Cells by Transfection of Antisense cDNA of an α 1-3 Fucosyltransferase (FUC-T VII). In: *The Journal of Biological Chemistry* 271 (1996), Nr. 49, S. 31556–31561
- [85] OHYAMA, C. ; KANTO, S. ; KATO, K. ; NAKANO, O. ; ARAI, Y. ; KATO, T. ; CHEN, S. ; FUKUDA, M. N. ; FUKUDA, M.: Natural killer cells attack tumor cells expressing high levels of sialyl Lewis x oligosaccharides. In: *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 99 (2002), Nr. 21, S. 13789–13794
- [86] VARKI, A.: Selectin ligands. In: *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 91 (1994), S. 7390–7397
- [87] ICHIKAWA, Y. ; LIN, Y. ; DUMAS, D.P. ; SHEN, G. ; GARCIA-JUNCEDA, E. ; WILLIAMS, M.A. ; BAYER, R. ; KETCHAM, C. ; WALKER, L.E. ; PAULSON, J.C. ; WONG, C.H.: Chemical-enzymatic synthesis and conformational analysis of Sialyl Lewis x and derivatives. In: *Journal of the American Chemical Society* 114 (1992), S. 9283–9298
- [88] BÄNTELI, R. ; ERNST, B.: Synthesis of Sialyl Lewis X Mimics: Replacement of Galactose by Aromatic Spacers. In: *Tetrahedron Letters* 38 (1997), Nr. 23, S. 4059–4062
- [89] HORWITZ, A.F.: Integrine. In: *Spektrum der Wissenschaft* (1998), Nr. Januar, S. 86–94
- [90] FLOGEL, M. ; LAUC, G. ; GORNIK, I. ; MACEK, B.: Fucosylation and galactosylation of IgG heavy chains differ between acute and remission phases of juvenile chronic arthritis. In: *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 36 (1998), S. 99–102
- [91] GORNIK, I. ; MARAVIC, G. ; DUMIC, J. ; FLOGEL, M. ; LAUC, G.: Fucosylation of IgG heavy chains is increased in rheumatoid arthritis. In: *Clinical Biochemistry* 32 (1999), S. 605–608
- [92] BECKER, D.J. ; LOWE, J.B.: Leukocyte adhesion deficiency type II. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1455 (1999), S. 193–204
- [93] ETZIONI, A. ; TONETTI, M.: Leukocyte adhesion deficiency II - from A to almost Z. In: *Immunological Reviews* 178 (2000), S. 138–147
- [94] ETZIONI, A. ; STURLA, L. ; ANTONELLIS, A. ; GREEN, E.D. ; GERSHONI-BARUCH, R. ; BERNINSOME, P.M. ; HIRSCHBERG, C.B. ; TONETTI, M.: Leukocyte adhesion deficiency (LAD) II/ Carbohydrate deficient glycoprotein (CDG) IIc founder affect and genotype/phenotype correlation. In: *American Journal of Medical Genetics* 110 (2002), S. 131–135
- [95] STURLA, L. ; RAMPAL, R. ; HALTIWANGER, R.S. ; FRUSCIONE, F. ; ETZIONI, A. ; TONETTI, M.: Differential terminal fucosylation of N-linked glycans *versus* protein O-fucosylation in leukocyte adhesion deficiency type II (CDG IIc). In: *The Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), Nr. 29, S. 26727–26733

- [96] STURLA, L. ; ETZIONI, A. ; BISSO, A. ; ZANARDI, D. ; DE FLORA, G. ; SILENGO, L. ; DE FLORA, A. ; TONETTI, M.: Defective intracellular activity of GDP-D-mannose-4,6-dehydratase in leukocyte adhesion deficiency type II syndrome. In: *FEBS Letters* 429 (1998), S. 274–278
- [97] KÖRNER, C. ; LINNEBANK, M. ; KOCH, H.G. ; HARMS, E. ; VON FIGURA, K. ; MARQUARDT, T.: Decreased availability of GDP-L-fucose in a patient with LAD II with normal GDP-D-mannose dehydratase and FX protein activities. In: *Journal of Leukocyte Biology* 66 (1999), S. 95–98
- [98] PUGLIELLI, L. ; HIRSCHBERG, C.B.: Reconstitution, identification, and purification of the rat liver golgi membrane GDP-fucose transporter. In: *The Journal of Biological Chemistry* 274 (1999), Nr. 50, S. 35596–35600
- [99] LÜBKE, T. ; MARQUARDT, T. ; VON FIGURA, K. ; KÖRNER, C.: A new type of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome due to a decreased import of GDP-fucose into the golgi. In: *The Journal of Biological Chemistry* 274 (1999), Nr. 37, S. 25986–25989
- [100] LÜHN, K. ; WILD, M.K. ; ECKHARDT, M. ; GERARDY-SCHAHN, R. ; VESTWEBER, D.: The gene defective in leukocyte adhesion deficiency II encodes a putative GDP-fucose transporter. In: *Nature Genetics* 28 (2001), S. 69–72
- [101] HIRSCHBERG, C.B.: Golgi nucleotide sugar transport and leukocyte adhesion deficiency II. In: *The Journal of Clinical Investigation* 108 (2001), Nr. 1, S. 3–6
- [102] LÜBKE, T. ; MARQUARDT, T. ; ETZIONI, A. ; HARTMANN, E. ; VON FIGURA, K. ; KÖRNER, C.: Complementation cloning identifies CDG-IIc, a new type of congenital disorders of glycosylation, as a GDP-fucose transporter deficiency. In: *Nature Genetics* 28 (2001), S. 73–76
- [103] STURLA, L. ; PUGLIELLI, L. ; TONETTI, M. ; BERNINSOME, P.M. ; HIRSCHBERG, C.B. ; DE FLORA, A. ; ETZIONI, A.: Impairment of the golgi GDP-L-Fucose transport and unresponsiveness to fucose replacement therapy in LAD II patients. In: *Pediatric Research* 49 (2001), Nr. 4, S. 537–542
- [104] LÜHN, K. ; MARQUARDT, T. ; HARMS, E. ; VESTWEBER, D.: Discontinuation of fucose therapy in LAD II causes rapid loss of selectin ligands and rise of leukocyte counts. In: *Blood* 97 (2001), Nr. 1, S. 330–332
- [105] ALPER, J.: Saving lives with sugar. In: *Science* 291 (2001), S. 2339
- [106] FREEZE, H.H.: Sweet solution: sugars to the rescue. In: *The Journal of Cell Biology* 158 (2002), Nr. 4, S. 615–616
- [107] SCHWERTMANN, A. ; RUDLOFF, S. ; KUNZ, C.: Potential ligands for cell adhesion molecules in human milk. In: *Annals of Nutrition & Metabolism* 40 (1996), S. 252–262
- [108] KUHN, R. ; BAER, H.H. ; GAUHE, A.: Fucosido-lactose, das Trisaccharid der Frauenmilch. In: *Chemische Berichte* 88 (1955), Nr. 8, S. 1135–1346

-
- [109] GROLLMAN, E.F. ; GINSBURG, V.: Correlation between secretor status and the occurrence of 2'-fucosyllactose in human milk. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 28 (1967), Nr. 1, S. 50–53
- [110] KOBATA, A. ; GINSBURG, V. ; TSUDA, M.: Oligosaccharides of human milk - I. Isolation and characterization. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 130 (1969), S. 509–513
- [111] KOBATA, A. ; GINSBURG, V.: Oligosaccharides of human milk - II. Isolation and characterization of a new pentasaccharide, lacto-N-fucopentaose III. In: *The Journal of Biological Chemistry* 244 (1969), Nr. 20, S. 5496–5502
- [112] KOBATA, A. ; GINSBURG, V.: Oligosaccharides of human milk - III. Isolation and characterization of a new hexasaccharide, lacto-N-hexaose. In: *The Journal of Biological Chemistry* 247 (1972), Nr. 5, S. 1525–1529
- [113] KOBATA, A. ; GINSBURG, V.: Oligosaccharides of human milk - IV. Isolation and characterization of a new hexasaccharide, lacto-N-neohexaose. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 150 (1972), S. 273–281
- [114] GINSBURG, V. ; ZOPF, D.A. ; YAMASHITA, K. ; KOBATA, A.: Oligosaccharides of human milk - Isolation of a new pentasaccharide, lacto-N-fucopentaose V. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 175 (1976), S. 565–568
- [115] OBERMEIER, S. ; RUDLOFF, S. ; POHLENTZ, G. ; LENTZE, M.J. ; KUNZ, C.: Secretion of ¹³C-labelled oligosaccharides into human milk and infant's urine after an oral [¹³C]galactose load. In: *Isotopes in Environmental and Health Studies* 35 (1999), S. 119–125
- [116] KUNZ, C. ; RUDLOFF, S. ; BAIER, W. ; KLEIN, N. ; STROBEL, S.: Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. In: *Annual Review of Nutrition* 20 (2000), S. 699–722
- [117] RENCUOSI, A. ; POLETTI, L. ; GUERRINI, M. ; RUSSO, G. ; LAY, L.: Human milk oligosaccharides: an enzymatic protection step simplifies the synthesis of 3'- and 6'-O-sialyllactose and their analogues. In: *Carbohydrate Research* 337 (2002), S. 473–483
- [118] KUNZ, C. ; RUDLOFF, S.: Biological functions of oligosaccharides in human milk. In: *Acta Paediatrica* 82 (1993), Nr. 11, S. 903–912
- [119] GNOTH, M.J. ; KUNZ, C. ; KINNE-SAFFRAN, E. ; RUDLOFF, S.: Human milk oligosaccharides are minimally digested in vitro. In: *The Journal of Nutrition* 130 (2000), Nr. 12, S. 3014–3020
- [120] KUNZ, C. ; RUDLOFF, S.: Strukturelle und funktionelle Aspekte von Oligosacchariden in Frauenmilch. In: *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* 35 (1996), S. 22–31
- [121] KUNZ, C. ; RODRIGUEZ-PALMERO, M. ; KOLETZKO, B. ; JENSEN, R.: Nutritional and biochemical properties of human milk, part I: General aspects, proteins, and carbohydrates. In: *Clinics in Perinatology* 26 (1999), Nr. 2, S. 307–333

- [122] SCHMIDT, R.R.: Neue Methoden zur Glycosid- und Oligosaccharidsynthese- gibt es Alternativen zur Koenigs-Knorr-Methode? In: *Angewandte Chemie* 98 (1986), S. 213–236
- [123] SCHMIDT, R.R.: Synthesis of glycosides. In: *Comprehensive Organic Synthesis* Bd. 6. Oxford : Pergamon Press, 1991, S. 33–64
- [124] PAULSEN, H.: Fortschritte bei der selektiven chemischen Synthese komplexer Oligosaccharide. In: *Angewandte Chemie* 94 (1982), S. 184–201
- [125] KONDO, H. ; AOKI, S. ; ICHIKAWA, Y. ; HALCOM, R.L. ; RITZEN, H. ; WONG, C.H.: Glycosyl phosphites as glycosylation reagents: scope and mechanism. In: *Journal of Organic Chemistry* 59 (1994), S. 864–877
- [126] UCHIYAMA, T. ; HINDSGAUL, O.: Per-O-trimethylsilyl- α -L-fucopyranosyl iodide: a novel glycosylating agent for terminal α -L-fucosylation. In: *Synlett Letters* 6 (1996), S. 499–501
- [127] PAULSON, J.C. ; COLLEY, K.J.: Glycosyltransferases - Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. In: *The Journal of Biological Chemistry* 264 (1989), Nr. 30, S. 17615–17618
- [128] CAPUTTO, R. ; LELOIR, L.F. ; CARDINI, C.E. ; PALADINI, A.C.: Isolation of the coenzyme of the galactose phosphate - glucose phosphate transformation. In: *The Journal of Biological Chemistry* 184 (1950), S. 333–350
- [129] LELOIR, L.F.: Two decades of research on the biosynthesis of saccharides. In: *Science* 172 (1971), S. 1299–1303
- [130] GINSBURG, V.: Formation of guanosine diphosphate L-fucose from guanosine diphosphate D-mannose. In: *The Journal of Biological Chemistry* 235 (1960), Nr. 8, S. 2196–2201
- [131] GINSBURG, V.: Studies on the biosynthesis of guanosine diphosphate L-fucose. In: *The Journal of Biological Chemistry* 236 (1961), Nr. 9, S. 2389–2393
- [132] FOSTER, D.W. ; GINSBURG, V.: Biosynthesis of L-fucose by mammalian tissue. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 54 (1961), S. 376–378
- [133] COFFEY, J. ; MILLER, O. ; SELLINGER, O.: The metabolism of L-fucose in the rat. In: *The Journal of Biological Chemistry* 239 (1964), S. 4011–4017
- [134] SMITH, P.L. ; MYERS, J.T. ; ROGERS, C.E. ; ZHOU, L. ; PETRYNIAK, B. ; BECKER, D.J. ; HOMEISTER, J.W. ; LOWE, J.B.: Conditional control of selectin ligand expression and global fucosylation events in mice with a targeted mutation at the FX locus. In: *The Journal of Cell Biology* 158 (2002), Nr. 4, S. 801–815
- [135] GINSBURG, V.: Formation of GDP-L-fucose from GDP-D-mannose. In: *Methods in Enzymology* 8 (1966), S. 293–295
- [136] BROCHAT, K.O. ; CHANG, S. ; SERIF, G.: Purification and characterization of GDP-D-mannose 4,6-dehydratase from porcine thyroid. In: *European Journal of Biochemistry* 153 (1985), S. 397–401

- [137] CHANG, S. ; DUERR, B. ; SERIF, G.: An epimerase-reductase in L-fucose synthesis. In: *The Journal of Biological Chemistry* 263 (1988), Nr. 4, S. 1693–1697
- [138] TONETTI, M. ; STURLA, L. ; BISSO, A. ; BENATTI, U. ; DE FLORA, A.: Synthesis of GDP-L-fucose by the human FX protein. In: *The Journal of Biological Chemistry* 271 (1996), Nr. 44, S. 27274–27279
- [139] MENON, S. ; STAHL, M. ; KUMAR, R. ; XU, G.-Y. ; SULLIVAN, F.: Stereochemical course and steady-state mechanism of the reaction catalyzed by the GDP-fucose synthetase from *Escherichia coli*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 274 (1999), Nr. 38, S. 26743–26750
- [140] ALBERMANN, C. ; DISTLER, J. ; PIEPERSBERG, W.: Preparative synthesis of GDP- β -L-fucose by recombinant enzymes from enterobacterial sources. In: *Glycobiology* 10 (2000), Nr. 9, S. 875–881
- [141] KORNFELD, R.H. ; GINSBURG, V.: Control of synthesis of guanosine 5'-diphosphate D-mannose and guanosine 5'-diphosphate L-fucose in bacteria. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 117 (1966), S. 79–87
- [142] WIESE, T. ; DUNLAP, J. ; YOREK, M.: L-Fucose is accumulated via a specific transport system in eukaryotic cells. In: *The Journal of Biological Chemistry* 269 (1994), S. 22705–22711
- [143] STILLER, R. ; THIEM, J.: Enzymatic synthesis of β -L-fucose-1-phosphate and GDP-fucose. In: *Liebigs Annalen der Chemie* (1992), S. 467–471
- [144] PASTUSZAK, I. ; KETCHUM, C. ; HERMANSON, G. ; SJOBERG, E.J. ; DRAKE, R. ; ELBEIN, A.D.: GDP-L-fucose pyrophosphorylase - Purification, cDNA cloning and properties of the enzyme. In: *The Journal of Biological Chemistry* 273 (1998), Nr. 46, S. 30165–30174
- [145] ICHIKAWA, Y. ; WANG, R. ; WONG, C.-H.: Regeneration of sugar nucleotide for enzymatic oligosaccharide synthesis. In: *Methods in Enzymology* 247 (1994), S. 107–127
- [146] YURCHENKO, P. ; ATKINSON, P.: Equilibration of fucosyl glycoprotein pools in HeLa cells. In: *Biochemistry* 16 (1977), S. 944–953
- [147] KORNFELD, R. ; KORNFELD, S.: Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. In: *Annual Review of Biochemistry* 54 (1985), S. 631–664
- [148] BERNINSONE, P. ; MIRET, J.J. ; HIRSCHBERG, C.B.: The Golgi guanosine diphosphatase is required for transport of GDP-mannose into the lumen of *Saccharomyces cerevisiae* Golgi vesicles. In: *The Journal of Biological Chemistry* 269 (1994), Nr. 1, S. 207–211
- [149] BERNINSOME, P.M. ; HIRSCHBERG, C.B.: Nucleotide sugar transporters of the golgi apparatus. In: *Current Opinion in Structural Biology* 10 (2000), S. 542–547
- [150] ROSEMAN, S. ; DISTLER, J.J. ; MOFFATT, J.G. ; KHORANA, H.G.: Nucleoside polyphosphates. XI. An improved general method for the synthesis of nucleotide coenzymes. Synthesis of uridine-5', cytidine-5' and guanosin-5' diphosphate derivatives. In: *Journal of the American Chemical Society* 83 (1961), S. 659–663

- [151] NUNEZ, H.A. ; O'CONNOR, J.V. ; ROSEVEAR, P.R. ; BARKER, R.: The synthesis and characterization of α - and β -L-fucopyranosyl phosphates and GDP-fucose. In: *Canadian Journal of Chemistry* 59 (1981), S. 2086–2095
- [152] GOKHALE, U.B. ; HINDSGAUL, O.: Chemical synthesis of GDP-fucose analogs and their utilization by the Lewis α (1-4) fucosyltransferase. In: *Canadian Journal of Chemistry* 68 (1990), S. 1063–1070
- [153] HESKAMP, B.M. ; BROXTERMAN, H.J.G. ; VAN DER MAREL, G.A. ; VAN BOOM, J.H.: Synthesis of guanosine 5'-(β -fucopyranosyl)-diphosphate revisited. In: *Journal of Carbohydrate Chemistry* 15 (1996), Nr. 5, S. 611–622
- [154] SCHMIDT, R.R. ; WEGMANN, B. ; JUNG, K.-H.: Stereospecific synthesis of α - and β -L-fucopyranosyl phosphates and of GDP-fucose via trichloroacetimidate. In: *Liebigs Annalen der Chemie* (1991), S. 121–124
- [155] ICHIKAWA, Y. ; SIM, M.M. ; WONG, C.-H.: Efficient chemical synthesis of GDP-fucose. In: *Journal of Organic Chemistry* 57 (1992), S. 2943–2946
- [156] ARLT, M. ; HINDSGAUL, O.: Rapid chemical synthesis of sugar nucleotides in a form suitable for enzymatic oligosaccharide synthesis. In: *Journal of Organic Chemistry* 60 (1995), Nr. 1, S. 14–15
- [157] BAISCH, G. ; ÖHRLEIN, R.: Convenient chemoenzymatic synthesis of β -purine-diphosphate sugars (GDP-fucose-analogues). In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 5 (1997), Nr. 2, S. 383–391
- [158] WITTMANN, V. ; WONG, C.-H.: 1H-Tetrazole as catalyst in phosphomorpholidate coupling reactions: Efficient synthesis of GDP-Fucose, GDP-Mannose, and UDP-Galactose. In: *Journal of Organic Chemistry* 62 (1997), S. 2144–2147
- [159] ELLING, L.: Glycobiotechnology: enzymes for the synthesis of nucleotide sugars. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 58 (1997), S. 89–144
- [160] BÜLTER, T. ; ELLING, L.: Enzymatic synthesis of nucleotide sugars. In: *Glycoconjugate Journal* 16 (1999), S. 147–159
- [161] ELHALABI, J.M. ; RICE, K.G.: Synthesis and applications for unnatural sugar nucleotides. In: *Current Medicinal Chemistry* 6 (1999), S. 93–116
- [162] NIITTYMÄKI, J. ; MATTILA, P. ; ROOS, C. ; HUOPANIEMI, L. ; SJÖBLOM, S. ; RENKONEN, R.: Cloning and expression of murine enzymes involved in the salvage pathway of GDP-L-fucose. In: *European Journal of Biochemistry* 271 (2004), S. 78–86
- [163] PROHASKA, R. ; SCHENKEL-BRUNNER, H.: A simple and efficient method for the preparation of GDP-fucose. In: *Analytical Biochemistry* 69 (1975), Nr. 2, S. 536–544
- [164] MENGELING, B.J. ; TURCO, S.J.: A high-yield, enzymatic synthesis of GDP-D-[3 H]arabinose and GDP-L-[3 H]fucose. In: *Analytical Biochemistry* 267 (1999), S. 227–233

- [165] YAMAMOTO, K. ; MARUYAMA, T. ; KUMAGAI, H. ; TOCHIKURA, T. ; SENO, T. ; YAMAGUCHI, H.: Preparation of GDP-L-fucose by using microbial enzymes. In: *Agricultural and biological chemistry* 48 (1984), Nr. 3, S. 823–824
- [166] SULLIVAN, F.X. ; KUMAR, R. ; KRIZ, R. ; STAHL, M. ; XU, G.-Y. ; ROUSE, J. ; CHANG, X.-J. ; BOODHOO, A. ; POTVIN, B. ; CUMMING, D.A.: Molecular cloning of human GDP-mannose-4,6-dehydratase and reconstitution of GDP-fucose biosynthesis in vitro. In: *The Journal of Biological Chemistry* 273 (1998), Nr. 14, S. 8193–8202
- [167] ALBERMANN, C. ; PIEPERSBERG, W. ; WEHMEIER, U.F.: Synthesis of the milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose using recombinant bacterial enzymes. In: *Carbohydrate Research* 334 (2001), S. 97–103
- [168] PIEPERSBERG, W. ; DISTLER, J. ; ALBERMANN, C.: Verfahren zur enzymatischen Herstellung von Guanosindiphosphat-6-desoxyhexosen und deren Verwendung zur Herstellung von Oligosacchariden. In: *Internationale Patentanmeldung, WO 99/09180* (1999)
- [169] KOIZUMI, S. ; ENDO, T. ; TABATA, K. ; NAGANO, H. ; ONISHI, J. ; OZAKI, A.: Large-scale production of GDP-fucose and Lewis X by bacterial coupling. In: *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 25 (2000), S. 213–217
- [170] ENDO, T. ; KOIZUMI, S.: Large-scale production of oligosaccharides using engineered bacteria. In: *Current Opinion in Structural Biology* 10 (2000), S. 536–541
- [171] KOIZUMI, S. ; ENDO, T. ; TABATA, K. ; OZAKI, A.: Large-scale production of UDP-galactose and globotriose by coupling metabolically engineered bacteria. In: *Nature Biotechnology* 16 (1998), S. 847–850
- [172] ENDO, T. ; KOIZUMI, S. ; TABATA, K. ; KAKITA, S. ; OZAKI, A.: Large-scale production of N-acetyllactosamine through bacterial coupling. In: *Carbohydrate Research* 316 (1999), S. 179–183
- [173] TABATA, K. ; KOIZUMI, S. ; ENDO, T. ; OZAKI, A.: Production of UDP-N-acetylglucosamine by coupling metabolically engineered bacteria. In: *Biotechnology Letters* 22 (2000), S. 479–483
- [174] ENDO, T. ; KOIZUMI, S. ; TABATA, K. ; OZAKI, A.: Large-scale production of CMP-NeuAc and sialylated oligosaccharides through bacterial coupling. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 53 (2000), S. 257–261
- [175] TABATA, K. ; KOIZUMI, S. ; ENDO, T. ; OZAKI, A.: Production of N-acetyl-D-neuraminic acid by coupling bacteria expressing N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase and N-acetyl-D-neuraminic acid synthase. In: *Enzyme and Microbial Technology* 30 (2002), S. 327–333
- [176] HASHIMOTO, H. ; SAKAKIBARA, A. ; YAMASAKI, M. ; YODA, K.: Saccharomyces cerevisiae VIG9 encodes GDP-mannose pyrophosphorylase, which is essential for protein glycosylation. In: *The Journal of Biological Chemistry* 272 (1997), Nr. 26, S. 16308–16314
- [177] MUNCH-PETERSEN, A.: Enzymatic synthesis and pyrophosphorolysis of guanosine diphosphate mannose. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 55 (1955), S. 592–593

- [178] KAWAGUCHI, K. ; OGATA, K. ; TOCHIKURA, T.: Studies on microbial metabolisms of sugar nucleotides (V) - Production of GDP-mannose, GDP and GTP from 5'-GMP by air-dried cells of Baker's Yeast. In: *Agricultural and biological chemistry* 34 (1970), Nr. 6, S. 908–918
- [179] MATTILA, P. ; RÄBINÄ, J. ; HORTLING, S. ; HELIN, J. ; RENKONEN, R.: Functional expression of Escherichia coli enzymes synthesizing GDP-L-fucose from inherent GDP-D-mannose in Saccharomyces cerevisiae. In: *Glycobiology* 10 (2000), Nr. 10, S. 1041–1047
- [180] HÄLGREN, C. ; HINDSGAUL, O.: An aminated GDP-fucose analog useful in the fucosyltransferase catalyzed addition of biological probes onto oligosaccharide chains. In: *Journal of Carbohydrate Chemistry* 14 (1995), Nr. 4&5, S. 453–464
- [181] ÖHRLEIN, R. ; BAISCH, G. ; KATOPODIS, A. ; STREIFF, M. ; KOLBINGER, F.: Transferase-catalyzed synthesis of non-natural oligosaccharide-libraries (SLe^a- and SLe^b-analogues). In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 5 (1998), S. 125–127
- [182] ERNST, B. ; ÖHRLEIN, R.: Substrate and donor specificity of glycosyl transferases. In: *Glycoconjugate Journal* 16 (1999), S. 161–170
- [183] ÖHRLEIN, R.: Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of non-natural oligosaccharides. In: *Topics in Current Chemistry* 200 (1999), S. 227–254
- [184] LUBINEAU, A. ; LE NARVOR, C. ; AUGÉ, C. ; GALLET, P.F. ; PETIT, J.M. ; JULIEN, R.: Chemo-enzymatic synthesis of a selectin ligand using recombinant yeast cells. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 5 (1998), S. 229–234
- [185] DING, Y. ; HINDSGAUL, O. ; PALCIC, M.M.: β Gal(1-S-4) β GlcNAc-OR: a galactosidase-stable substrate for α (1,3) fucosyltransferase. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 8 (1998), S. 3199–3202
- [186] SHINODA, K. ; TANAHASHI, E. ; KFUKUNAGA, K. ; ISHIDA, H. ; KISO, M.: Detailed acceptor specificities of human α 1,3-fucosyltransferases, Fuc-TVII and Fuc-TVI. In: *Glycoconjugate Journal* 15 (1998), S. 969–974
- [187] NIMTZ, M. ; GRABENHORST, E. ; GAMBERT, U. ; COSTA, J. ; WRAY, V. ; MORR, M. ; THIEM, J. ; CONRADT, H.S.: In vitro α 1,3 or α 1,4 fucosylation of type I and II oligosaccharides with secreted forms of recombinant human fucosyltransferases III and VI. In: *Glycoconjugate Journal* 15 (1998), S. 873–883
- [188] STANGIER, K. ; PALCIC, M.M. ; BUNDLE, D.R. ; HINDSGAUL, O. ; THIEM, J.: Fucosyltransferase-catalyzed formation of L-galactosylated Lewis structures. In: *Carbohydrate Research* 305 (1998), S. 511–515
- [189] MA, B. ; WANG, G. ; PALCIC, M.M. ; HAZES, B. ; TAYLOR, D.E.: C-terminal amino acids of *Helicobacter pylori* α 1,3/4 fucosyltransferases determine type I and type II transfer. In: *The Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), Nr. 24, S. 21893–21900
- [190] MURRAY, B.W. ; WITTMANN, V. ; BURKART, M.D. ; HUNG, S.-C. ; WONG, C.-H.: Mechanism of human α -1,3-fucosyltransferase V: glycosidic cleavage occurs prior to nucleophilic attack. In: *Biochemistry* 36 (1997), S. 823–831

-
- [191] WONG, C. H. ; HALCOMB, R.L. ; ICHIKAWA, Y. ; KAJIMOTO, T.: Enzyme in der organischen Synthese: das Problem der molekularen Erkennung von Kohlenhydraten (Teil 2). In: *Angewandte Chemie* 107 (1995), S. 569–593
- [192] PAULSON, J.C. ; IUJITA-LEE, E. ; COLLEY, K.J. ; ADLER, B. ; BROWNE, J.K.: Method for producing secretable glycosyltransferases and other golgi processing enzymes. In: *US Patentanmeldung 5,032,519* (1991)
- [193] YAMAMOTO, K. ; KATAYAMA, I. ; ONODA, Y. ; INAMI, M. ; KUMAGAI, H. ; TOCHIKURA, T.: Evidence that the enzyme catalyzing the conversion of guanosine diphosphate D-mannose to a 4-keto sugar nucleotide intermediate requires nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 300 (1993), Nr. 2, S. 694–698
- [194] ROSANO, C. ; BISSO, A. ; IZZO, G. ; TONETTI, M. ; STURLA, L. ; DE FLORA, A. ; BOLOGNESI, M.: Probing the catalytic mechanism of GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose epimerase/reductase by kinetic and crystallographic characterization of site-specific mutants. In: *Journal of Molecular Biology* 303 (2000), S. 77–91
- [195] STURLA, L. ; BISSO, A. ; ZANARDI, D. ; BENATTI, U. ; DE FLORA, A. ; TONETTI, M.: Expression, purification and characterization of GDP-D-mannose-4,6-dehydratase from *Escherichia coli*. In: *FEBS Letters* 412 (1997), S. 126–130
- [196] OKAZAKI, R. ; OKAZAKI, T. ; STROMINGER, J.L. ; MICHELSON, A.M.: Thymidine diphosphate 4-keto-6-deoxy-D-glucose, an intermediate in thymidine diphosphate L-rhamnose synthesis in *Escherichia coli* strains. In: *The Journal of Biological Chemistry* 237 (1962), Nr. 10, S. 3014–3026
- [197] MARKOVITZ, A.: Biosynthesis of guanosine diphosphate D-rhamnose and guanosine diphosphate D-talomethyllose from guanosine diphosphate α -D-mannose. In: *The Journal of Biological Chemistry* 239 (1964), Nr. 7, S. 2091–2098
- [198] CHANG, S. ; BROCHAT, K.O. ; SERIF, G.: An assay for GDP-D-mannose-4,6-dehydratase. In: *Analytical Biochemistry* 144 (1985), S. 253–257
- [199] OTHS, P.J. ; MAYER, R.M. ; FLOSS, H.G.: Stereochemistry and mechanism of the GDP-mannose dehydratase reaction. In: *Carbohydrate Research* 198 (1990), S. 91–100
- [200] SOMOZA, J.R. ; MENON, S. ; SCHMIDT, H. ; JOSEPH-MCCARTHY, D. ; DESSEN, A. ; STAHL, M.L. ; SOMERS, W.S. ; SULLIVAN, F.X.: Structural and kinetic analysis of *Escherichia coli* GDP-mannose-4,6-dehydratase provides insights into the enzyme's catalytic mechanism and regulation by GDP-fucose. In: *Structure* 8 (2000), S. 123–135
- [201] STEINER, F.: Die Entwicklung der modernen Flüssigchromatographie. In: *Nachrichten aus der Chemie* 50 (2002), Nr. 11, S. 1239–1242
- [202] ENGELHARDT, H. ; BECK, W. ; KOHR, J. ; SCHMITT, T.: Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten. In: *Angewandte Chemie* 105 (1993), S. 659–680
- [203] ALTRIA, K.D.: Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. In: *Journal of Chromatography A* 856 (1999), S. 443–463

- [204] BUCHHOLZ, A. ; GREINER, L. ; HOH, C. ; LIESE, A.: Genetic algorithms as a tool for capillary electrophoresis method development. In: *Journal of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology* 7 (2002), Nr. 3/4, S. 51–60
- [205] BUCHHOLZ, A. ; GREINER, L. ; HOH, C. ; WANDREY, C.: Verfahren zur Optimierung der Parameter eines Trennungsverfahrens für Stoffgemische. In: *Offenlegungsschrift, DE 100 21 597 A 1* (2001)
- [206] KARGER, B.L.: Capillary electrophoresis. In: *Current Opinion in Biotechnology* 3 (1992), S. 59–64
- [207] COPPER, C.L.: Capillary Electrophoresis; Part I. Theoretical and Experimental Background. In: *Journal of Chemical Education* 75 (1998), Nr. 3, S. 343–347
- [208] COPPER, C.L. ; WHITAKER, K.W.: Capillary Electrophoresis; Part II. Applications. In: *Journal of Chemical Education* 75 (1998), Nr. 3, S. 347–351
- [209] KURTH, B. ; BLASCHKE, G.: Achiral and chiral determination of tramadol and its metabolites in urine by capillary electrophoresis. In: *Electrophoresis* 20 (1999), S. 555–563
- [210] SOETEBEER, U.B. ; SCHIERENBERG, M.-O. ; SCHULZ, H. ; HEMPEL, G. ; ANDRESEN, P. ; BLASCHKE, G.: Simultaneous quantification of etoposide and etoposide phosphate in human plasma by capillary electrophoresis using laser-induced native fluorescence detection. In: *Analytical Chemistry* 73 (2001), Nr. 10, S. 2178–2182
- [211] VERAART, J.R. ; LINGEMANN, H. ; BRINKMAN, U.A.Th.: Coupling of biological sample handling and capillary electrophoresis. In: *Journal of Chromatography A* 856 (1999), S. 483–514
- [212] ENGELHARDT, H. ; BECK, W. ; SCHMITT, T.: *Kapillarelektrophorese - Methoden und Möglichkeiten*. Braunschweig/Wiesbaden : Vieweg Verlag, 1994. – ISBN 3540670076
- [213] GROSSMANN, P.D. (Hrsg.) ; COLBURN, J.C. (Hrsg.): *Capillary Electrophoresis: Theory & Practice*. Academic Press, 1997
- [214] FANALI, S. ; DESIDERIO, C. ; SCHULTE, G. ; HEITMEIER, S. ; STRICKMANN, D. ; CHANK-VETADZE, B. ; BLASCHKE, G.: Chiral capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry coupling using vancomycin as chiral selector. In: *Journal of Chromatography A* 800 (1998), Nr. 1, S. 69–76
- [215] EL RASSI, Z.: Recent developments in capillary electrophoresis of carbohydrate species. In: *Electrophoresis* 18 (1997), S. 2400–2407
- [216] CHEN, F.A. ; DOBASHI, S. ; EVANGELISTA, R.A.: Quantitative analysis of sugar constituents of glycoproteins by capillary electrophoresis. In: *Glycobiology* 8 (1998), Nr. 11, S. 1045–1052
- [217] ELLING, L. ; RITTER, J.E. ; VERSECK, S.: Expression, purification and characterization of recombinant phosphomannomutase and GDP- α -D-mannose pyrophosphorylase from *Salmonella enterica*, group B, for the synthesis of GDP- α -D-mannose from D-mannose. In: *Glycobiology* 6 (1996), Nr. 6, S. 591–597

-
- [218] FEY, S. ; ELLING, L. ; KRAGL, U.: The cofactor Mg^{2+} - a key switch for effective continuous enzymatic production of GDP-mannose using recombinant GDP-mannose pyrophosphorylase. In: *Carbohydrate Research* 305 (1997), S. 475–481
- [219] SHIMMA, Y. ; NISHIKAWA, A. ; BIN KASSIM, B. ; ETO, A. ; JIGAMI, Y.: A defect in GTP synthesis affects mannose outer chain elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Molecular and general genetics* 156 (1997), S. 469–480
- [220] CHAPMAN, J. ; HOBBS, J.: Putting capillary electrophoresis to work. In: *LC-GC* 17 (1999), Nr. 3, S. 86–99
- [221] WATSON, J.D. ; CRICK, F.H.C.: Molecular structure of nucleic acids. In: *Nature* 171 (1953), S. 737–738.
- [222] HOLLAND, J.H.: Genetische Algorithmen. In: *Spektrum der Wissenschaft* (1992), S. 44–51
- [223] WEUSTER-BOTZ, D. ; WANDREY, C.: Medium optimization by genetic algorithm for continuous production of formate dehydrogenase. In: *Process Biochemistry* 30 (1995), Nr. 6, S. 563–571
- [224] WEUSTER-BOTZ, D. ; PRAMATAROVA, V. ; SPASSOV, G. ; WANDREY, C.: Use of a genetic algorithm in the development of a synthetic growth medium for *Arthrobacter simplex* with high hydrocortisone Δ^1 -dehydrogenase activity. In: *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 64 (1995), S. 386–392
- [225] UHLENBROCK, K.: *Methoden zur reaktionstechnischen Optimierung enzymatischer synthesen - dargestellt am Beispiel der enantioselektiven Reduktion von p-Chloracetophenon im organisch-wässrigen Zwei-Phasen-System*, Rheinische Friedrich Wilhelms Universität Bonn, Diss., 1994
- [226] HOH, C. ; DUDZIAK, G. ; LIESE, A.: Optimization of the enzymatic synthesis of O-glycan core 2 structure by use of a genetic algorithm. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12 (2002), S. 1031–1034
- [227] DANDEKAR, T. ; ARGOS, P.: Potential of genetic algorithms in protein folding and protein engineering simulations. In: *Protein Engineering* 5 (1992), Nr. 7, S. 637–645
- [228] DANDEKAR, T. ; ARGOS, P.: Applying experimental data to protein fold prediction with the genetic algorithm. In: *Protein Engineering* 10 (1997), Nr. 8, S. 877–893
- [229] JONES, G. ; WILLET, P. ; GLEN, R.C.: Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with description of desolvation. In: *Journal of Molecular Biology* 245 (1995), S. 43–53
- [230] WILLET, P.: Genetic algorithms in molecular recognition and design. In: *Trends in Biotechnology* 13 (1995), S. 516–521
- [231] GOLDBERG, D.E.: *Genetic algorithms in search, optimization and machine learning*. Reading, MA : Addison-Wesley Publishing, 1989

- [232] PAYNE, S.M. ; AMES, B.N.: A procedure for rapid extraction and high-pressure liquid chromatographic separation of the nucleotides and other small molecules from bacterial cells. In: *Analytical Biochemistry* 123 (1982), S. 151–161
- [233] MARTIN, A. ; RUGGIERO-LOPEZ, D. ; BROQUET, P. ; RICHARD, M. ; LOUISOT, P.: High-performance liquid chromatographic study of GDP-mannose and GDP-fucose metabolism. In: *Journal of Chromatography (Biomedical Applications)* 497 (1989), S. 319–325
- [234] PLOCEK, J ; CHMELIK, J.: Separation of disaccharides as their borate complexes by capillary electrophoresis with indirect detection in visible range. In: *Electrophoresis* 18 (1997), Nr. 7, S. 1148–1152
- [235] LAGUNAS, R. ; DÍEZ-MASA, J.C.: Separation and analysis of 4'-epimeric UDP-sugars by ion-pair reversed-phase HPLC. In: *Analytical Biochemistry* 216 (1994), S. 188–194
- [236] ELLING, L. ; GROTHUS, M. ; KULA, M.-R.: Investigation of sucrose synthase from rice for the synthesis of various nucleotide sugars and saccharides. In: *Glycobiology* 3 (1993), Nr. 4, S. 349–355
- [237] XU, G. ; LEHMANN, R. ; SCHLEICHER, E. ; HÄRING, H.U. ; LIEBICH, H.: Advantages in the analysis of UDP-sugars by capillary electrophoresis-comparison of the conventional HPLC method with two new capillary electrophoretic micro-procedures. In: *Biomedical Chromatography* 12 (1998), S. 113–115
- [238] WERNER, A.: Reversed-phase and ion-pair separations of nucleotides, nucleosides and nucleobases: analysis of biological samples in health and disease. In: *Journal of Chromatography (Biomedical Applications)* 618 (1993), S. 3–14
- [239] SHELTON, C.M. ; KOCH, J.T. ; DESAI, N. ; WHEELER, J.F.: Enhanced selectivity for capillary zone electrophoresis using ion-pair agents. In: *Journal of Chromatography A* 792 (1997), S. 455–462
- [240] WELDON, M.K. ; ARRINGTON, C.M. ; RUNNELS, P.L. ; WHEELER, J.F.: Selectivity enhancement for free zone capillary electrophoresis using conventional ion-pairing agents as complexing additives. In: *Journal of Chromatography A* 758 (1997), S. 293–302
- [241] RYLL, T. ; WAGNER, R.: Improved ion-pair high-performance liquid chromatographic method for the quantification of a wide variety of nucleotides and sugar-nucleotides in animal cells. In: *Journal of Chromatography (Biomedical Applications)* 570 (1991), S. 77–88
- [242] ELBEIN, A.D. ; HEATH, E.C.: The biosynthesis of cell wall lipopolysaccharide in *Escherichia coli*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 240 (1965), Nr. 5, S. 1926–1931
- [243] LIAO, T.-H. ; BARBER, G.A.: Purification of guanosine 5'-diphosphate D-mannose oxidoreductase from *Phaseolus vulgaris*. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 276 (1972), S. 85–93
- [244] BONIN, C.P. ; POTTER, I. ; VANZIN, G.F. ; REITER, W.-D.: The MUR1 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes an isoform of GDP-D-mannose-4,6-dehydratase, catalyzing the

- first step in the de novo synthesis of GDP-L-fucose. In: *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 94 (1997), S. 2085–2090
- [245] KNEIDINGER, B. ; GRANINGER, M. ; ADAM, G. ; PUCHBERGER, M. ; KOSMA, P. ; ZAYNI, S. ; MESSNER, P.: Identification of two GDP-6-deoxy-D-lyxo-4-hexulose reductases synthesizing GDP-D-rhamnose in *Aneurinibacillus thermoaerophilicus* L420-91. In: *The Journal of Biological Chemistry* 276 (2001), Nr. 8, S. 5577–5583
- [246] ALBERMANN, C. ; PIEPERSBERG, W.: Expression and identification of the RfbE protein from *Vibrio cholerae* O1 and its use for the enzymatic of GDP-D-perosamine. In: *Glycobiology* 11 (2001), Nr. 8, S. 655–661
- [247] BISSO, A. ; STURLA, L. ; ZANARDI, D. ; DE FLORA, A. ; TONETTI, M.: Structural and enzymatic characterization of human recombinant GDP-D-mannose-4,6-dehydratase. In: *FEBS Letters* 456 (1999), S. 370–374
- [248] TONETTI, M. ; STURLA, L. ; BISSO, A. ; ZANARDI, D. ; BENATTI, U. ; DE FLORA, A.: The metabolism of 6-deoxyhexoses in bacterial and animal cells. In: *Biochimie* 80 (1998), S. 923–931
- [249] LIAO, T.-H. ; BARBER, G.A.: The synthesis of guanosine 5'-diphosphate L-fucose by enzymes of a higher plant. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 230 (1971), S. 64–71
- [250] BULET, P. ; HOFLACK, B. ; PORCHET, M. ; VERBERT, A.: Study of the conversion of GDP-mannose into GDP-fucose in nereids: a biochemical marker of oocyte maturation. In: *European Journal of Biochemistry* 144 (1984), S. 255–259
- [251] DE FLORA, A. ; MORELLI, A.: Isolation and partial characterization of an NADP- and NADPH-binding protein from human erythrocytes. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 179 (1977), S. 698–705
- [252] MORELLI, A. ; BENATTI, U. ; RADIN, L. ; WRIGLEY, N.G. ; DE FLORA, A.: Subunit structure and physical properties of an NADP(H)-binding protein from human erythrocytes. In: *FEBS Letters* 80 (1977), Nr. 1, S. 1–4
- [253] GIRAUD, M.-F. ; NAISMITH, J.H.: The rhamnose pathway. In: *Current Opinion in Structural Biology* 10 (2000), S. 687–696
- [254] GRANINGER, M. ; NIDETZKY, B. ; HEINRICH, D.E. ; WHITFIELD, C. ; MESSNER, P.: Characterization of dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase and dTDP-4-dehydrorhamnose reductase, required for dTDP-L-rhamnose biosynthesis in *Salmonella enterica* serovar typhimurium LT2. In: *The Journal of Biological Chemistry* 274 (1999), Nr. 35, S. 25069–25077
- [255] BONIN, C.P. ; REITER, W.-D.: A bifunctional epimerase-reductase acts downstream of the MUR1 gene product and completes the *de novo* synthesis of GDP-L-fucose in *Arabidopsis*. In: *The Plant Journal* 21 (2000), Nr. 5, S. 445–454
- [256] MERGAERT, P. ; VAN MONTAGU, M. ; HOLSTERS, M.: The nodulation gene *nolK* of *Azorhizobium caulinodans* is involved in the formation of GDP-fucose from GDP-mannose. In: *FEBS Letters* 409 (1997), S. 312–316

- [257] STEVENSON, G. ; LAN, R. ; REEVES, P.R.: The colanic acid gene cluster of *Salmonella enterica* has a complex history. In: *FEMS Microbiology Letters* 191 (2000), S. 11–16
- [258] TONETTI, M. ; RIZZI, M. ; VIGEVANI, P. ; STURLA, L. ; BISSO, A. ; DE FLORA, A. ; BOLOGNESI, M.: Preliminary crystallographic investigations of recombinant GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose epimerase/reductase from *E. coli*. In: *Acta Crystallographica Section D* 54 (1998), S. 684–686
- [259] SOMERS, W.S. ; STAHL, M.L. ; SULLIVAN, F.X.: GDP-fucose synthetase from *Escherichia coli*: structure of a unique member of the short-chain dehydrogenase/reductase family that catalyzes two distinct reactions at the same active site. In: *Structure* 6 (1998), Nr. 12, S. 1601–1612
- [260] ROSANO, C. ; IZZO, G. ; STURLA, L. ; BISSO, A. ; TONETTI, M. ; BOLOGNESI, M.: The high resolution structure of GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose epimerase/reductase. In: *Croatia Chemical Acta* 73 (2000), Nr. 3, S. 887–899
- [261] RAJAN, V.P. ; LARSEN, R.D. ; AJMERA, S. ; ERNST, L.K. ; LOWE, J.B.: A cloned human DNA restriction fragment determines expression of a GDP-L-fucose: β -D-galactoside 2- α -L-fucosyltransferase in transfected cells. In: *The Journal of Biological Chemistry* 264 (1989), Nr. 19, S. 11158–11167
- [262] LARSEN, R.D. ; ERNST, L.K. ; NAIR, R.P. ; LOWE, J.B.: Molecular cloning, sequence, and expression of a human GDP-L-fucose: β -D-galactoside 2- α -L-fucosyltransferase cDNA that can form the H blood group antigen. In: *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 87 (1990), S. 6674–6678
- [263] YAMAMOTO, F. ; CLAUSEN, H. ; WHITE, T. ; MARKEN, J. ; HAKOMORI, S.: Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. In: *Nature* 345 (1990), S. 229–233
- [264] KUMAZAKI, T. ; YOSHIDA, A.: Biochemical evidence that secretor gene, *Se*, is a structural gene encoding a specific fucosyltransferase. In: *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 81 (1984), S. 4193–4197
- [265] SARNESTO, A. ; KÖHLIN, T. ; THURIN, J. ; BLASZCZYK-THURIN, M.: Purification of H gene-encoded β -galactoside α 1,2 fucosyltransferase from human serum. In: *The Journal of Biological Chemistry* 265 (1990), Nr. 25, S. 15067–15075
- [266] SARNESTO, A. ; KÖHLIN, T. ; HINDSGAUL, O. ; THURIN, J. ; BLASZCZYK-THURIN, M.: Purification of the secretor-type β -galactoside α 1,2 fucosyltransferase from human serum. In: *The Journal of Biological Chemistry* 267 (1992), Nr. 4, S. 2737–2744
- [267] BEYER, T.A. ; HILL, R.L.: Purification to homogeneity of the H blood group β -galactoside α 1,2 fucosyltransferase from porcine submaxillary gland. In: *The Journal of Biological Chemistry* 255 (1980), Nr. 11, S. 5364–5372
- [268] THURIN, J. ; BLASZCZYK-THURIN, M.: Porcine submaxillary gland GDP-L-fucose: β -D-galactoside α -2-L-fucosyltransferase is likely a counterpart of the human secretor gene-encoded blood group transferase. In: *The Journal of Biological Chemistry* 270 (1995), Nr. 44, S. 26577–26580

- [269] GE, Z. ; CHAN, N.W.C. ; PALCIC, M.M. ; TAYLOR, D.E.: Cloning and heterologous expression of an α 1,3-fucosyltransferase gene from the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 272 (1997), Nr. 34, S. 21357–21363
- [270] RASKO, D.A. ; WANG, G. ; PALCIC, M.M. ; TAYLOR, D.E.: Cloning and characterization of the α (1,3/4) fucosyltransferase of *Helicobacter pylori*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 275 (2000), Nr. 7, S. 4988–4994
- [271] WANG, G. ; BOULTON, P.G. ; CHAN, N.W.C. ; PALCIC, M.M. ; TAYLOR, D.E.: Novel *Helicobacter pylori* α 1,2-fucosyltransferase, a key enzyme in the synthesis of Lewis antigens. In: *Microbiology* 145 (1999), S. 3245–3253
- [272] BISELLI, M. ; KRAGL, U. ; WANDREY, C.: Reaction Engineering for Enzyme-Catalyzed Biotransformations. In: DRAUZ, Waldmann H. (Hrsg.): *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*. Erstaufgabe. Weinheim : VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1995, S. 89–155
- [273] KRAGL, U.: *Reaktionstechnik der asymmetrischen Synthese mit Homogen- und Biokatalysatoren*, Universität Bonn, Habilitationsschrift, 1997
- [274] CORNISH-BOWDEN, A.: *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. London : Portland Press Ltd., 1995. – ISBN 1–855–78072–0
- [275] LANGMUIR, I.: The constitution and fundamental properties of solids and liquids Part 1: Solids. In: *Journal of the American Chemical Society* 38 (1916), Nr. 11, S. 2221–2295
- [276] LANGMUIR, I.: The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. In: *Journal of the American Chemical Society* 40 (1918), Nr. 9, S. 1361–1403
- [277] HITCHCOCK, D.I.: The formal identity of Langmuir's adsorption equation with the law of mass action. In: *Journal of the American Chemical Society* 48 (1926), Nr. 11, S. 2870
- [278] MICHAELIS, L. ; MENTEN, M.: Die Kinetik der Invertinwirkung. In: *Biochemische Zeitschrift* 49 (1913), S. 333–369
- [279] BISELLI, M.: *Enzymkatalysierte Racematspaltung von Aminosäuren mit integrierter Rückführung, dargestellt am Beispiel der Umsetzung von D,L-Alanin zu L-Alanin*, Rheinische Friedrich Wilhelms Universität Bonn, Diss., 1991
- [280] HOH, C. ; VILLELA FILHO, M.: Enzyme Classification. In: LIESE, A. (Hrsg.) ; SEELBACH, K. (Hrsg.) ; WANDREY, C. (Hrsg.): *Industrial Biotransformations*. Weinheim : Wiley-VCH, 2000, S. 31–56
- [281] GROSS, J.W. ; HEGEMAN, A.D. ; VESTLING, M.M. ; FREY, P.A.: Pre-steady-state kinetics of deoxythymidine diphosphate glucose 4,6-dehydratase: detection and quantification of reaction intermediates by mass spectroscopy. In: *Biochemistry* 39 (2000), Nr. 6, S. 1559
- [282] GROSS, J.W. ; HEGEMAN, A.D. ; VESTLING, M.M. ; FREY, P.A.: Characterization of enzymatic processes by rapid mix-quench mass spectrometry: the case of dTDP-glucose 4,6-dehydratase. In: *Biochemistry* 39 (2000), Nr. 45, S. 13633–13640

- [283] HEGEMAN, A.D. ; GROSS, J.W. ; FREY, P.A.: Concerted and stepwise dehydration mechanisms observed in wild-type and mutated *Escherichia coli* dTDP-glucose 4,6-dehydratase. In: *Biochemistry* 41 (2002), Nr. 8, S. 2797–2804
- [284] COPELAND, R.A.: *Enzymes - A practical introduction to structure, mechanism and data analysis*. New York : VCH Publishers, Inc., 1996
- [285] BUCHHOLZ, K. ; KASCHE, V.: *Biokatalysatoren und Enzymtechnologie*. Weinheim : VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1997. – ISBN 3–527–28238–6
- [286] GOMORI, G.: Preparation of buffers for use in enzyme studies. In: FASMAN, G.D. (Hrsg.): *Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*. Boca Raton : CRC Press LLC, 1992, S. 553–560
- [287] LAMED, R.J. ; KEINAN, E. ; ZEIKUS, J.G.: Potential applications of an alcohol-aldehyde/ketone oxidoreductase from thermophilic bacteria. In: *Enzyme and Microbial Technology* 3 (1981), S. 144–148
- [288] VALERA, V. ; FUNG, M. ; WESSLER, A.N. ; RICHARDS, W.R.: Synthesis of 4R- and 4S-tritium labeled NADPH for the determination of the coenzyme stereospecificity of NADPH: Protochlorophyllide oxidoreductase. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 148 (1987), Nr. 1, S. 515–520
- [289] LOWRY, O.H. ; PASSONNEAU, J.V. ; ROCK, M.K.: The stability of pyridine nucleotides. In: *The Journal of Biological Chemistry* 236 (1961), Nr. 10, S. 2756–2759
- [290] WU, J.T. ; WU, L.H. ; KNIGHT, J.A.: Stability of NADPH: effect of various factors on the kinetics of degradation. In: *Clinical Chemistry* 32 (1986), Nr. 2, S. 314–319
- [291] WONG, C.-H.: Nicotinamide cofactor-requiring enzymatic synthesis in organic solvent-water biphasic systems. In: *Biocatalysis in Organic Media*. Wageningen, The Netherlands : Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1986, S. 197–208
- [292] CHENAULT, H.K. ; WHITESIDES, G.M.: Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology* 14 (1987), S. 147–197
- [293] RENTMEISTER, A.: *Kinetische Untersuchungen der Guanosin-5'-diphospho- β -L-fucose Synthetase*, Universität Bonn, Diplomarbeit, 2002
- [294] STEIN, A. ; KULA, M.-R. ; ELLING, L.: Combined preparative enzymatic synthesis of dTDP-6-deoxy-4-keto-D-glucose from dTDP and sucrose. In: *Glycoconjugate Journal* 15 (1998), S. 139–145
- [295] FEY, S.: *Reaktionstechnik der chemoenzymatischen Synthese natürlicher und nicht-natürlicher Guanosin-5'-diphospho-aktivierter Kohlenhydrate*, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Dissertation, 1998
- [296] STEIN, A. ; KULA, M.-R. ; ELLING, L. ; VERSECK, S. ; KLAFFKE, W.: Synthesis of dTDP-6-deoxy-4-ketoglucose and analogues with native and recombinant dTDP-glucose-4,6-dehydratase. In: *Angewandte Chemie International Edition* 34 (1995), Nr. 16, S. 1748–1749

- [297] AMANN, S. ; DRÄGER, G. ; RUPPRATH, C. ; KIRSCHNING, A. ; ELLING, L.: (Chemo)enzymatic synthesis of dTDP-activated 2,6-dideoxysugars as building blocks of polyketide antibiotics. In: *Carbohydrate Research* 335 (2001), S. 23–32
- [298] SEELBACH, C. ; RIEBEL, B. ; HUMMEL, W. ; KULA, M.-R. ; TISHKOV, V.I. ; EGOROV, A.M. ; WANDREY, C. ; KRAGL, U.: A novel, efficient regenerating method of NADPH using a new formate dehydrogenase. In: *Tetrahedron Letters* 37 (1996), Nr. 9, S. 1377–1380
- [299] TISHKOV, V.I. ; GALKIN, A.G. ; FEDORCHUK, V.V. ; SAVITZKY, P.A. ; ROJKOVA, A.M. ; GIEREN, H. ; KULA, M.-R.: Pilot scale production and isolation of recombinant NAD⁺- and NADP⁺-specific formate dehydrogenase. In: *Biotechnology and Bioengineering* 64 (1999), Nr. 2, S. 187–193
- [300] NUNEZ, N.A. ; BARKER, R.: The metal ion catalyzed decomposition of nucleoside diphosphate sugars. In: *Biochemistry* 15 (1976), Nr. 17, S. 3843–3847
- [301] BELICZEY, J.: *Reaktionstechnische Untersuchungen zur präparativen enzymatischen Synthese und Aktivierung der Neuraminsäurederivate 3-Fluorneuraminsäure und Glycolylneuraminsäure*, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Dissertation, 2003
- [302] DUDZIAK, G.: *Reaktionstechnische Untersuchungen zur enzymatischen Glycosylierung von Peptiden*, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Dissertation, 2000
- [303] DUDZIAK, G. ; FEY, S. ; HASBACH, L. ; KRAGL, U.: Nanofiltration for purification of nucleotide sugars. In: *Journal of Carbohydrate Chemistry* 18 (1999), Nr. 1, S. 41–49
- [304] RASKO, D.A. ; WANG, G. ; MONTEIRO, M.A. ; PALCIC, M.M. ; TAYLOR, D.E.: Synthesis of mono- and di-fucosylated type I Lewis blood group antigens by *Helicobacter pylori*. In: *European Journal of Biochemistry* 267 (2000), S. 6059–6066
- [305] AVENT, N.D.: Human erythrocyte antigen expression: its molecular bases. In: *British Journal of Biomedical Sciences* 54 (1997), S. 16–37
- [306] BLASZCZYK-THURIN, M. ; SARNESTO, A. ; THURIN, I. ; HINDSGAUL, O. ; KOPROWSKI, H.: Biosynthetic pathways for the Le b and Y glycolipids on the gastric carcinoma cell line KATOIII as analyzed by a novel assay. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 151 (1988), S. 100–108
- [307] HITOSHI, S. ; KUSUNOKI, S. ; KANAZAWA, I. ; TSUJI, S.: Molecular cloning and expression of a third type of rabbit GDP-L-fucose:β-D-galactoside 2-α-L-fucosyltransferase. In: *The Journal of Biological Chemistry* 271 (1996), S. 16975–16981
- [308] WATERS, L.C. ; JACOBSON, S.C. ; KROUTCHININA, N. ; KHANDURINA, J. ; FOOTE, R.S. ; RAMSEY, J.M.: Multiple sample PCR amplification and electrophoretic analysis on a microchip. In: *Analytical Chemistry* 70 (1998), S. 5172–5176
- [309] REGNIER, F.E. ; HE, B. ; LIN, S. ; BUSSE, J.: Chromatography and electrophoresis on chips: critical elements of future integrated, microfluidic analytical systems for life science. In: *Trends in Biotechnology* 17 (1999), Nr. 3, S. 85–134

- [310] WEIDNER, S.: *Enzymatische Synthese von GDP- β -L-Fucose ausgehend von D-Mannose: Klonierung, Expression und Charakterisierung von Enzymen aus nicht-pathogenen Enterobacteriaceae*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Dissertation, 2003
- [311] VINCENT, S.P. ; GASTINEL, L.N.: An efficient synthesis of GDP-hexanolamine, a key tool for the purification of fucosyltransferases. In: *Carbohydrate Research* 337 (2002), S. 1039–1042
- [312] SHELDON, R.A.: Consider the environmental quotient. In: *Chemtech* (1994), Nr. 3, S. 38–47
- [313] TONETTI, M. ; ZANARDI, D. ; GURNON, J.R. ; FRUSCIONE, F. ; ARMIROTTI, A. ; DAMONTE, G. ; STURLA, L. ; DE FLORA, A. ; VAN ETTEN, J.L.: *Paramecium bursaria chlorella virus 1 encodes two enzymes involved in the biosynthesis of GDP-L-fucose and GDP-D-rhamnose*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), Nr. 24, S. 21559–21565
- [314] TISCHER, W. ; KASCHE, V.: Immobilized enzymes: crystals or carriers? In: *Trends in Biotechnology* 17 (1999), S. 326–335
- [315] AUGÉ, C. ; MALLERON, A. ; TAHRAT, H. ; MARC, A. ; GOERGEN, J.-L. ; CERUTTI, M. ; STEELANT, W.F.A. ; DELANNOY, P. ; LUBINEAU, A.: Outstanding stability of immobilized recombinant $\alpha(1-3/4)$ fucosyltransferases exploited in the synthesis of Lewis a and Lewis x trisaccharides. In: *Chemical Communications* (2000), S. 2017–2018
- [316] SHAO, J. ; ZHANG, J. ; NAHALKA, J. ; WANG, P.G.: Biocatalytic synthesis of uridine 5'-diphosphate N-acetylglucosamine by multiple enzymes co-immobilized on agarose beads. In: *Chemical Communications* (2002), S. 2586–2587
- [317] HANAHAN, D.: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. In: *Journal of Molecular Biology* 166 (1983), S. 557–580
- [318] BRADFORD, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical Biochemistry* 72 (1976), S. 248–254
- [319] LAEMMLI, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (1970), S. 680–685
- [320] RENTMEISTER, A. ; HOH, C. ; WEIDNER, S. ; DRÄGER, G. ; ELLING, L. ; LIESE, A. ; WANDREY, C.: Kinetic examination and simulation of GDP- β -L-fucose synthetase reaction using NADPH or NADH. In: *Biocatalysis and Biotransformation* 22 (2004), Nr. 1, S. 49–56