

**Biochemische Charakterisierung der Glycosyltransferase Dpm1 aus
S. cerevisiae und *in vitro* Dolichylphosphatmannose-Produktion**

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,

vorgelegt von
Herrn M.Sc. Matthias Schöpfer
geboren am 09.08.1988 in Wilhelmshaven

Erstgutachter: Prof. Dr. Markus Pietzsch
Zweitgutachter: Prof. Dr. Thomas Groth
Drittgutachter: Prof. Dr. Christoph Syldek

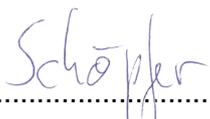
Tag der öffentlichen Verteidigung: 14.01.2020

Meinen Eltern

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die eingereichte schriftliche Fassung der Arbeit entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit noch nicht als Abschlussarbeit an anderer Stelle eingereicht wurde.

Hamburg, den 23.01.2020


.....
(Matthias Schöpfer)

Inhaltsverzeichnis und Abkürzungen

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	i
Inhaltsverzeichnis und Abkürzungen	ii
Inhaltsverzeichnis	ii
Abkürzungen	v
Anmerkungen	viii
1 Einleitung und Zielsetzung	1
1.1 Einleitung	1
1.1.1 N-Glykosylierung in Eukaryoten.....	1
1.1.2 Die Glycosyltransferase Dpm1 aus <i>S. cerevisiae</i>	5
1.1.3 Biotechnologische Ansätze zur Produktion therapeutischer Glykoproteine	9
1.1.4 Motivation	14
1.2 Zielsetzung	17
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Material	19
2.1.1 Chemikalien.....	19
2.1.2 Stammlösungen und Puffer	23
2.1.3 Organismus	25
2.1.4 Vektor	25
2.1.5 Marker und Antikörper	25
2.1.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien	26
2.2 Methoden	29
2.2.1 Mikrobiologische Methoden	29
2.2.1.1 Kultivierung und Stammhaltung von <i>Escherichia coli</i> -Stämmen	29
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	29
2.2.2.1 Gensynthese.....	29
2.2.2.2 Transformation von <i>E. coli</i>	30
2.2.2.3 Isolierung und Quantifizierung von Plasmid-DNA.....	30
2.2.3 Expression von Fusionsproteinen mit dem SUMO-System	30
2.2.4 Proteinchemische Methoden	30
2.2.4.1 Isolierung der His ₆ -SUMO-Dpm1.....	30
2.2.4.2 SDS-PAGE	32
2.2.4.3 <i>Western-Blot</i> -Analyse von SDS-PA-Gelen	33

2.2.5 Analytik.....	34
2.2.5.1 Proteinkonzentrationsbestimmung	34
2.2.5.2 UV/VIS-Spektroskopie.....	34
2.2.5.3 Standard His ₆ -SUMO-Dpm1 Aktivitätstest.....	34
2.2.5.4 <i>High performance liquid chromatography</i> (HPLC) und Massenspektrometrie	36
2.2.5.5 Dünnschichtchromatographie und Autoradiographie	36
2.2.5.6 DoIPM Aufarbeitung und Nachweis	37
2.2.5.7 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)	38
3 Ergebnisse	40
3.1 His ₆ -SUMO-Dpm1 Proteinproduktion.....	40
3.2 Entwicklung eines nicht-radioaktiven Aktivitätstests.....	43
3.3 Kinetische Charakterisierung der His ₆ -SUMO-Dpm1	45
3.3.1 Abhängigkeit von zweiwertigen Metallionen.....	45
3.3.2 Abhängigkeit von der Temperatur.....	46
3.3.3 Abhängigkeit von der Art des Lipid-Phosphats.....	47
3.4 Untersuchung der His ₆ -SUMO-Dpm1 Wechselwirkung mit GDP und GDPM	49
3.5 Immobilisierung und Reaktion im <i>Batch</i>	51
3.6 Kontinuierliche DoIPM-Produktion und -Aufarbeitung	53
3.6.1 Kontinuierliche His ₆ -SUMO-Dpm1-Reaktion	53
3.6.2 Produkt-Aufarbeitung.....	55
3.7 DoIPM-Produktnachweis	57
3.7.1 Nachweis von DoIPM mittels ESI-MS	57
3.7.2 Nachweis von DoIP nach milder saurer Hydrolyse von DoIPM.....	58
4 Diskussion	60
4.1 His ₆ -SUMO-Dpm1 Proteinproduktion.....	60
4.2 Assay-Entwicklung und Enzymkinetik.....	61
4.3 Untersuchung der Wechselwirkung von GDP und GDPM mit der His ₆ -SUMO-Dpm1 mittels isothermer Titrationskalorimetrie	65
4.4 His ₆ -SUMO-Dpm1-Immobilisierung, DoIPM-Produktion und -Nachweis.....	67
5 Zusammenfassung	70
6 Ausblick.....	72
7 Literatur	74
8 Abbildungsverzeichnis.....	83
9 Tabellenverzeichnis.....	84
10 Anhang	85
10.1 <i>S. cerevisiae</i> Wildtyp DPM1-Gen DNA-Sequenz (YPR183W, S000006387)	85

10.2 pETSUMOadapt-Vektorkarte	85
10.3 His ₆ -SUMO-Dpm1 Proteinsequenz	86
10.4 WB-Nachweis der His ₆ -SUMO-Dpm1-Produktion	86
10.5 Exemplarische Kalibriergeraden für GDP und GDPM	87
10.6 Radioaktiver His ₆ -SUMO-Dpm1-Kontrollassay mit GDP-[¹⁴ C]M	88
10.7 Progresskurven der kinetischen Untersuchung von DoIP und PhytP in Abhängigkeit von der GDPM-Konzentration	89
10.8 Massenspektrometrischer Nachweis von PhytP und PhytPM	90
10.9 Struktur IGEPAL [®] CA-630	91
10.10 Fällung von DoIPM mit Methanol	91
Danksagung	92
Lebenslauf	94

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Alg	<i>asparagin-linked glycosylation</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BFM	Biofeuchtmasse
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BSA	bovines Serumalbumin
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
d	deionisiert
Da	Dalton, entspricht 1 u, engl. <i>unified atomic mass unit</i>
DolP	Dolichylphosphat
DolPG/M	Dolichylphosphatglucose/mannose
Dpm1	Dolichylphosphatmannosesynthase 1
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS	Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie
EtOH	Ethanol
GDP/M	Guanosindiphosphat/mannose
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HPLC	hochauflösende Flüssigkeitschromatographie, engl. <i>high performance liquid chromatography</i>
IgG	Immunglobulin G
IMAC	immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITC	isotherme Titrationskalorimetrie, engl. <i>isothermal titration calorimetry</i>
k.A.	keine Angaben
Kan	Kanamycin
LB-Medium	Komplexmedium zur Kultivierung von <i>E. coli</i> , engl. <i>lysogenic broth</i>
M	Marker (molekularer Größenstandard)
mAB	monoklonaler Antikörper, engl. <i>monoclonal antibody</i>
MeOH	Methanol
MW	Molekulargewicht, engl. <i>molecular weight</i>
MWCO	Molekulargewichtsausschluss, engl. <i>molecular weight cut-off</i>
n	Anzahl verglichener oder bestimmter Werte
n.b.	nicht bestimmt

Fortsetzung: Abkürzungen

OD ₆₀₀	optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm
OST	Oligosaccharyltransferase
RB	Reaktionspuffer, engl. <i>reaction buffer</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl. <i>revolutions per minute</i>
Rt	Retentionszeit, engl. <i>retention time</i>
RT	Raumtemperatur
PA/GE	Polyacrylamid/Gelelektrophorese
PhytP/M	Phytanylphosphat/mannose
PTM	posttranslationale Modifikation
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
TA	<i>tail anchored</i>
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure, eng. <i>trifluoroacetic acid</i>
TLC	Dünnschichtchromatographie, engl. <i>thin layer chromatography</i>
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
üN	über Nacht
V	Volumen
(v/v)	Volumen pro Volumen
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp
(w/v)	Gewicht pro Volumen

Anmerkungen

Fachausdrücke aus der englischen Sprache ohne eine passende deutsche Entsprechung werden in der vorliegenden Arbeit kursiv geschrieben.

Die Versuche 3.3, 3.5, 3.6, 3.7.2, 10.7 und 10.10 wurden gemeinsam mit Herrn Jann Groen – der im Rahmen seiner Masterarbeit an dem Projekt mitgearbeitet hat [Groen, 2017] – geplant, durchgeführt und ausgewertet.

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

1.1.1 N-Glykosylierung in Eukaryoten

Die Primärstruktur eines Proteins ist genetisch kodiert. Darüber hinaus kann ein Protein prozessiert werden. Das Proteom kann zu jedem Zeitpunkt im Leben eines Organismus⁴ zwei bis drei Größenordnungen komplexer sein als das kodierende Genom [Santos und Lindner, 2017]. Eine Protease wird beispielsweise oft in einer inaktiven Form intrazellulär gebildet und wird erst nach proteolytischer Aktivierung außerhalb der Zelle in ihre funktionelle Form überführt. Man spricht von einer posttranslationalen Modifikation (PTM) des Proteins. Es wird geschätzt, dass 5 % der im eukaryotischen Genom kodierten Enzyme an PTMs von Proteinen beteiligt sind [Santos und Lindner, 2017].

Proteine können auf verschiedenste Art und Weise posttranslational modifiziert werden. Unter anderem können Methylierungen an Arginin- oder Lysinresten oder Phosphorylierungen an Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten erfolgen. Eine der häufigsten PTM in Eukaryoten sind Glykosylierungen. Viele eukaryotische Proteine werden nach der Translation durch Glykosylierungen modifiziert. Glykane sind als Verbindungen definiert, die aus glykosidisch verknüpften Monosacchariden bestehen [IUPAC, 2006].

Reaktionen mit und ohne enzymatische Beteiligung können zur Glykosylierung führen. Bei der N-, O- und C-Glykosylierung, der GPI-Verankerung sowie der Glypiation werden Enzyme katalytisch wirksam. Im Gegensatz dazu werden Monosaccharide infolge der Glykation nicht-enzymatisch glykosidisch verknüpft.

Die O-Glykosylierung ist von der Struktur eines Proteins abhängig ist. Häufig beginnt die O-Glykosylierung mit der gewebeabhängigen Übertragung von N-Acetylgalaktosamin auf Serin oder Threonin-Reste. Diese Reaktion wird als Mucin-Typ bezeichnet, findet im Golgi-Apparat statt und wird durch die N-Acetylgalaktosamin-Transferase katalysiert [Kennedy und Yuyun, 2010]. Eine stufenweise enzymatische Übertragung weiterer Saccharide führt zur Ausbildung von acht unterschiedlichen Kern-Oligosacchariden. Durch Sialysierung oder Acetylierung können weitere Modifizierungen erfolgen [Krasnova und Wong, 2016; Van den Steen *et al.*, 1998]. In Hefen werden hauptsächlich O-verknüpfte Oligomannosestrukturen gefunden, wobei die initiale N-Acetylgalaktosamin-Transferasereaktion im endoplasmatischen Retikulum (ER) stattfindet [Herscovics und Orlean, 1993; Van den Steen *et al.*, 1998]. Die O-Glykosylierung trägt zur Ausbildung rigider Proteinkonformationen und zur -stabilität bei [Van den Steen *et al.*, 1998].

Eine weitere Glykosylierungsart stellt die C-Glykosylierung dar. Hierbei wird ein Mannosylrest auf Tryptophan übertragen. Erstmals wurde die C-Glykosylierung der humanen RNase U_s durch Hofsteenge und Kollegen beschrieben [Hofsteenge *et al.*, 1994]. Die

Funktion dieser Proteinmodifizierung und das Kompartiment der Saccharid-Übertragung sind bislang ungeklärt [Hofsteenge *et al.*, 1996; Manabe *et al.*, 2003].

Besser verstanden wird dagegen die Membranverankerung von Proteinen durch das Glycosylphosphatidylinositollipids (GPI). Diese Art der Glykosylierung von Proteinen erfolgt dreistufig. Zunächst wird ein GPI Vorläufermolekül an der ER Membran synthetisiert. Das entstandene Vorläufermolekül ist aus Phosphatidylinositol, Phosphoethanolamin, N-Glucosamin und Mannosylresten zusammengesetzt. Im zweiten Schritt wird ein in das Lumen des ER translatiertes Protein nach proteolytischer Abspaltung seiner C-terminalen GPI-Signalsequenz mit einem GPI-Molekül verknüpft. Abschließend kann es zum Austausch von Lipiden im GPI-Anker bzw. zu Modifizierungen der Kohlenhydratseitenketten im ER oder dem Golgi-Kompartiment kommen. GPI-verankerte Proteine sind auf der Außenseite eukaryotischer Zellen lokalisiert und leisten einen Beitrag zur Asymmetrie der Biomembran. In Hefen wie *S. cerevisiae* werden GPI-verankerte, Mannose-verknüpfte Proteine zum Aufbau der Zellwand verwendet. Dagegen ist für Pflanzen wie *Arabidopsis* auch die Mitwirkung an der Morphogenese und der Pollenschlauchentwicklung beschrieben [Ferguson *et al.*, 2017].

Die enzymatische Verknüpfung von einem Saccharidphosphat mit einem Serin-Rest über eine Phosphodiesterbindung wird als Phosphoglykosylierung bezeichnet [Haynes, 1998]. Auf diese Weise modifizierte Proteine schützen *Leishmania*-Arten vor den Verdauungsenzymen im Darm ihres Wirts [Sacks *et al.*, 2000]. Beim nicht-enzymatischen Vorgang der Glykation werden Aminogruppen von Proteinen spontan durch reduzierende Saccharide modifiziert [Ghodsi und Kheirouri, 2018].

Zusammenfassend lässt sich eine enorme Vielfalt und Komplexität verschiedenster Glykosylierungsarten von Proteinen feststellen. Allerdings sind nicht alle Stoffwechselwege und Enzyme bekannt, die zu dieser Glykandiversität führen [Dicker und Strasser, 2015].

Die in Eukaryoten häufigste Form der Proteinglykosylierung ist die N-Glykosylierung. Bis zu 70 % aller eukaryotischen Proteine sind N-glykosyliert [Apweiler *et al.*, 1999], wenngleich einfachere Eukaryoten (bspw. Hefen) einen geringeren Glykoproteinanteil aufweisen [Zielinska *et al.*, 2012]. Die N-Glykosylierung ist als Übertragung eines präassemblierten Glykans auf die Amidseitengruppe von Asparagin definiert. Der Prozess umfasst den sukzessiven Aufbau eines Lipid-verknüpften Oligosaccharids, welches *en bloc* auf den Asparagin-Rest einer naszierenden Polypeptidkette übertragen wird. Dieser Ablauf ist in Abb. 1.1 dargestellt.

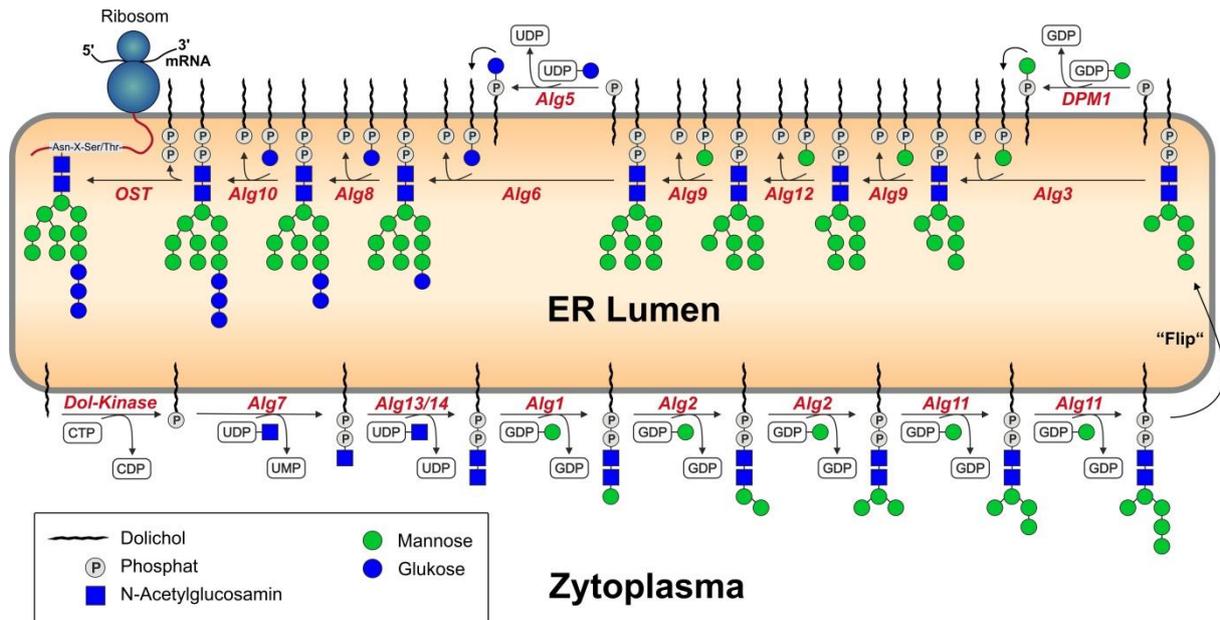


Abb. 1.1 *N*-Glykosylierung in Eukaryoten. Dargestellt sind die schrittweise Synthese des Lipid-verknüpften Glykans an der Membran des endoplasmatischen Retikulums und die co-translationale Übertragung des Dol-PP-verknüpften GlcNAc₂-Man₉-Glc₃-Glykans auf die naszierende Proteinkette durch die Oligosaccharyltransferase (OST). Dolichol - Dol, Nucleosidtriphosphat - TP, Nucleosiddiphosphat - DP, Nucleosidmonophosphat - MP. Nucleinbasen: Cytosin - C, Uridin - U, Guanosen - G. Enzyme werden mit roter Schrift gekennzeichnet. Die Dol-Kinase phosphoryliert Dolichol zu Dolichylphosphat. Alg7, Alg13/14, Alg1, Alg2 und Alg11 katalysieren die zytoplasmatischen Glycosyltransferasereaktionen bis zu Dol-PP-GlcNAc₂-Man₅. Dpm1 und Alg5 synthetisieren die Dolichylmonophosphat-verknüpften Saccharide für die lumenalen Glycosyltransferaseschritte der Alg3, Alg9, Alg12, Alg6, Alg8 und Alg10 bis zu Dol-PP-GlcNAc₂-Man₉-Glc₃. Modifiziert nach [Aebi, 2013].

Die *N*-Glykosylierung findet an der Membran des endoplasmatischen Retikulums statt und wird durch die membrangebundenen, sogenannten *asparagin-linked glycosylation* (Alg) Glycosyltransferasen katalysiert. Der sukzessive Aufbau des Lipid-assoziierten Oligosaccharids ist einer Kompartimentierung unterworfen. In einem initialen Schritt wird auf der zytoplasmatischen Seite des ERs Dolichylphosphat durch das Enzym Alg7 mit UDP-N-Acetylglucosamin zu Dolichylpyrophosphoryl-N-Acetylglucosamin umgesetzt. Darüber hinaus bildet die Glycosyltransferase Alg7 einen Komplex mit den Enzymen Alg13 und Alg14 [Gao *et al.*, 2008]. Von der Alg13 wird ein zweiter N-Acetylglucosamin-Rest übertragen. Unter Verwendung von Guanosindiphosphat-Mannose (GDPM) werden fünf Mannosereste durch die enzymatische Aktivität der Alg1, Alg2 und Alg11 – die ebenfalls einen Komplex bilden [Gao *et al.*, 2004] – auf die wachsende Oligosaccharidkette transferiert. Die Alg2 und Alg11 katalysieren jeweils zwei Reaktionen. Das Ergebnis ist ein Lipid-Pyrophosphoryl-verknüpftes Heptasaccharid. Die Komplexbildung zwischen der Alg7 und Alg13/14 bzw. zwischen der Alg1, Alg2 und Alg11 könnte physiologisch sinnvoll sein, da auf diese Weise die Diffusion des Lipidakzeptors limitiert wird [Gao *et al.*, 2004].

Der weitere Aufbau des Oligosaccharids findet auf der luminalen Seite der ER-Membran unter Verwendung von Lipidphosphat-verknüpften, aktivierten Zuckerdonoren statt [Rush und Waechter, 1995; Snider und Rogers, 1984]. Zu diesem Zweck muss eine transversale

Übertragung (*flip*) des Oligonukleotids durch die ER-Membran erfolgen. Der Mechanismus dieses Transports ist nicht genau bekannt. Es wird davon ausgegangen, dass es sich nicht um einen spontanen, sondern um einen Membrantransporter-vermittelten Prozess handelt [Rush, 2015]. Die Glycosyltransferasen Alg3, Alg9 und Alg12 übertragen im Inneren des ER-Lumens weitere vier Mannosereste auf das wachsende Oligosaccharid. Im weiteren Verlauf werden durch die Alg6, Alg8 und Alg10 drei Glucosereste auf das Lipid-Pyrophosphoryl-verknüpfte Glykan transferiert [Burda und Aebi, 1998; Reiss *et al.*, 1996; Stagljar *et al.*, 1994]. Der letzte Schritt der *N*-Glykosylierung beinhaltet die Übertragung des zuvor stufenweise aufgebauten Glykans auf ein Protein. Die naszierende Polypeptidkette eines in das ER translozierten Proteins kann eine Erkennungssequenz mit einem Asparagin-X-Serin/Threonin-Motiv enthalten. An Position X ist mit Ausnahme von Prolin jede Aminosäure möglich. Wird diese Erkennungssequenz von der Oligosaccharyltransferase (OST) erkannt, kann das Glykan durch eine *N*-glykosidische Bindung am Asparagin mit dem Protein verknüpft werden [Bause, 1983].

N-glykosylierte Proteine können zur weiteren Prozessierung im ER-Lumen verbleiben oder in den Golgi-Apparat transportiert werden. Weitere Glycosyltransferasen vermitteln die Verknüpfung des Proteins mit Sialinsäure, Fukose oder N-Acetylglucosamin. Alternativ können dabei durch weitere Glycosyltransferasen hinzugefügt oder Saccharide durch Glycosidasen abgespalten werden [Larkin und Imperiali, 2011].

Zunächst wurde die *N*-Glykosylierung als PTM in ausschließlich eukaryotischen Zellen betrachtet. 1976 wurden erstmals Glykoproteine in dem extrem halophilen Archaeobakterium *Halobacterium salinarium* gefunden [Mescher und Strominger, 1976]. Bereits 1999 konnten Szymanski und Kollegen den Nachweis für ein *N*-Glykosylierungssystem in dem gramnegativen Bakterium *Campylobacter jejuni* erbringen [Szymanski *et al.*, 1999]. Damit sind *N*-Glykosylierungen in allen drei Domänen des Lebens vertreten [Larkin und Imperiali, 2011].

Die Erkennungssequenz in Bakterien setzt sich aus Aspartat/Glutamat-X-Asparagin-X-Serin/Threonin ($X \neq$ Prolin) zusammen und ist damit länger als das Erkennungsmotiv in Eukaryoten und Archaeen [Nothaft und Szymanski, 2010]. Des Weiteren wird in Bakterien Undecaprenylphosphat anstatt von Dolichylphosphat (Eukaryoten, Archae, s. Abb. 1.2) als Lipidanker verwendet [Jarrell *et al.*, 2014; Nothaft und Szymanski, 2010].

Die enorme Vielfalt verschiedener Glykanstrukturen, die Verbreitung in allen drei Domänen des Lebens und der Versuch, die Glykosylierung therapeutischer Proteine zu kontrollieren, bilden die Grundlage für die zunehmenden Forschungsbemühungen der letzten Dekade [Dicker und Strasser, 2015].

Anzahl und Zusammensetzung der übertragenen Glykane beeinflussen den intrazellulären Proteintransport [Scheiffele und Fullekrug, 2000], die -faltung und die -stabilität [Mitra *et al.*,

2003]. Auf der Zelloberfläche exponierte Glykane sind zudem maßgeblich an der Zell-Zell-Erkennung, der Zell-Adhäsion und der Immunantwort gegen Pathogene beteiligt [Agard und Bertozzi, 2009]. Immunreaktionen können durch Glykane auf dem Proteingerüst abgeschirmt werden [Dicker und Strasser, 2015]. Die Beteiligung glykosylierter Proteine an einer Vielzahl essentieller intra- und extrazellulärer Prozesse verdeutlicht, dass auftretende Fehler innerhalb der *N*-Glykosylierung zu schwerwiegenden Konsequenzen führen können.

Unter dem Begriff *congenital disorders of glycosylation* werden im Menschen die Krankheitsbilder gestörter Protein-Glykosylierungen zusammengefasst, die sich unter anderem als schwerwiegende kongenitale Muskeldystrophien, Entwicklungs- und neurologischen Störungen äußern [Lehle *et al.*, 2006].

Ein gut verstandenes Beispiel für die essentielle Funktion der *N*-Glykosylierung auf die Proteinmaturierung ist die Faltungskontrolle im Lumen des ER. Nach der Übertragung eines 14 Glykane umfassenden Oligosaccharids durch die OST, wird bereits co-translational durch die Glucosidase I der terminale Glucoserest abgetrennt. Im Anschluss spaltet die Glucosidase II einen oder beide endständigen Glucosereste ab. An ein mono-glucosyliertes, sich faltendes Glykoprotein können die Chaperone Calnexin und Calreticulin binden. Letztere vermitteln unter anderem durch Verlangsamung der Faltung und die Verhinderung von Aggregation die richtige Faltung des Zielproteins. Die Faltungskontrolle erfolgt durch die Glycosyltransferase UGT1. Das Enzym erkennt an der Oberfläche des Zielproteins exponierte hydrophobe Bereiche. In diesem Fall überträgt die UGT1 einen Glucoserest auf das Zielprotein, welches nun einen weiteren Calnexin/Calreticulin-vermittelten Entfaltungs- und Faltungszyklus durchlaufen kann. Korrekt gefaltete Glykoproteine werden nicht von der UGT1 gebunden. Durch die Aktivität der Glucosidase II werden sukzessiv alle Glucosereste entfernt und Calreticulin und Calnexin können nicht mehr binden. Die dynamische Übertragung und Abspaltung von Glucoseresten markieren das entstehende Protein für den richtigen Faltungsprozess [Braakman und Hebert, 2013].

1.1.2 Die Glycosyltransferase Dpm1 aus *S. cerevisiae*

Im Zytoplasma der Zelle liegen die Zucker (Glucose, Mannose und *N*-Acetylglucosamin), die für den membrangebundenen Aufbau des *N*-Glykans benötigt werden, in aktivierter, Nukleotid-gebundener Form vor. UDP-Glucose, GDP-Mannose und UDP-*N*-Acetylglucosamin sind wasserlöslich und diffundieren frei im Zytoplasma.

Im Gegensatz dazu verwenden Glycosyltransferasen im Inneren des ER Lumens Lipidphosphat-verknüpfte Zuckerdonoren als Co-Substrate. So wird Glucose in Form von Dolichylphosphatglucose (DoIPG) und Mannose als Dolichylphosphatmannose (DoIPM) aktiviert (Abb. 1.1). In *S. cerevisiae* wird DoIPG von der membranständigen Alg5 auf der zytoplasmatischen Seite des ERs aus UDP-Glucose und DoIP gebildet. Analog wird DoIPM

von der Dolichylphosphatmannosese synthase 1 (Dpm1, EC 2.4.1.83) aus GDPm und DolP synthetisiert (Abb. 1.2). Auf die Dpm1 ist der Fokus der vorliegenden Arbeit gerichtet.

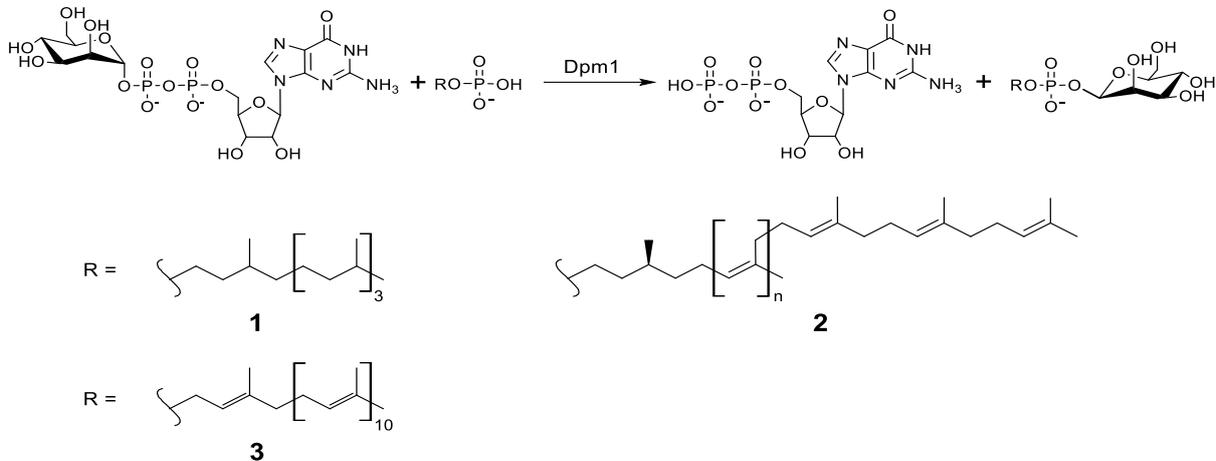


Abb. 1.2 Reaktionsschema der Dpm1 aus *S. cerevisiae*. Die Dpm1 kann verschiedene Lipidsubstrate verwenden. Exemplarisch werden die Strukturen von **1** Phytanol und **2** Dolichol dargestellt [Wilson *et al.*, 1993]. In *S. cerevisiae* sind hauptsächlich Dolichole mit einer Länge von 15-16 Isopreneinheiten vertreten [Jung und Tanner, 1973]. Zum Vergleich zeigt **3** die Struktur von Undecaprenol, das in Bakterien als Membrananker der *N*-Glykosylierung fungiert [Jarrell *et al.*, 2014] nach [Aebi, 2013].

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Interaktion mit ER-Membranen werden drei Dpm1-Klassen unterschieden. Zur ersten Klasse zählen die Dpm1-Enzyme aus *S. cerevisiae*, *Ustilago maydis*, *Trypanosoma brucei* und *Candida glabrata*. Sie besitzen eine 60-70 %-ige Aminosäuresequenzähnlichkeit und enthalten am C-Terminus einen hydrophoben Abschnitt. Die zweite Enzymklasse umfasst unter anderem die Enzyme der Organismen *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana*, *Danio rerio* (Zebrafisch) und *Pongo borneo* (Orang-Utan). Dpm1-Enzyme der zweiten Klasse weisen keine hydrophobe Domäne auf und zeigen eine Sequenzhomologie von 30-40 % zur ersten Dpm1-Klasse [Banerjee *et al.*, 2017]. Die Enzyme der Klasse zwei bilden mit zwei weiteren Proteinen (Dpm2 und Dpm3) einen Komplex, in dem die Dpm1 die katalytische Untereinheit darstellt. Dabei bildet die Dpm3-Untereinheit den Membrananker des Komplexes, während die Dpm2 (ebenfalls ein Membranprotein) die katalytische Aktivität der Dpm1-Untereinheit erhöht. Die genaue Funktion der Dpm2 ist ungeklärt.

Die Dpm1 aus *Pyrococcus furiosus* kann strukturell als Einzelpolypeptidkette aus allen drei humanen Dpm1-Proteinuntereinheiten betrachtet werden. Aufgrund der im Vergleich zur ersten und zweiten Dpm1-Klasse unterschiedlichen, strukturellen Topologie, wurde 2017 eine dritte Dpm1-Klasse postuliert [Gandini *et al.*, 2017].

Die Dpm1 der Klasse 1 gehört strukturell zu den sogenannten *tail anchored* (TA)-Proteinen. Letztere zeichnen sich durch eine *N*-terminale, funktionelle Domäne aus, die sich im Zytosol befindet. Verankert werden TA-Proteine mit einer C-terminal gelegenen

Transmembrandomäne (TMD), der sich eine bis zu 30 Aminosäuren lange, polare, luminaire Sequenz anschließt [Borgese und Fasana, 2011].

Transmembranproteine können auf verschiedene Art und Weise in die ER-Membran integriert werden. Viele Proteine werden co-translational durch das Zusammenwirken des *signal recognition particles* und des Sec61-Kanals in die ER-Membran transloziert. TA-Proteine hingegen werden durch den *guided entry of TA proteins* Mechanismus in die ER-Membran integriert. Dieser Mechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt und ist schematisch in Abb. 1.3 dargestellt, soweit er bisher beschrieben wurde.

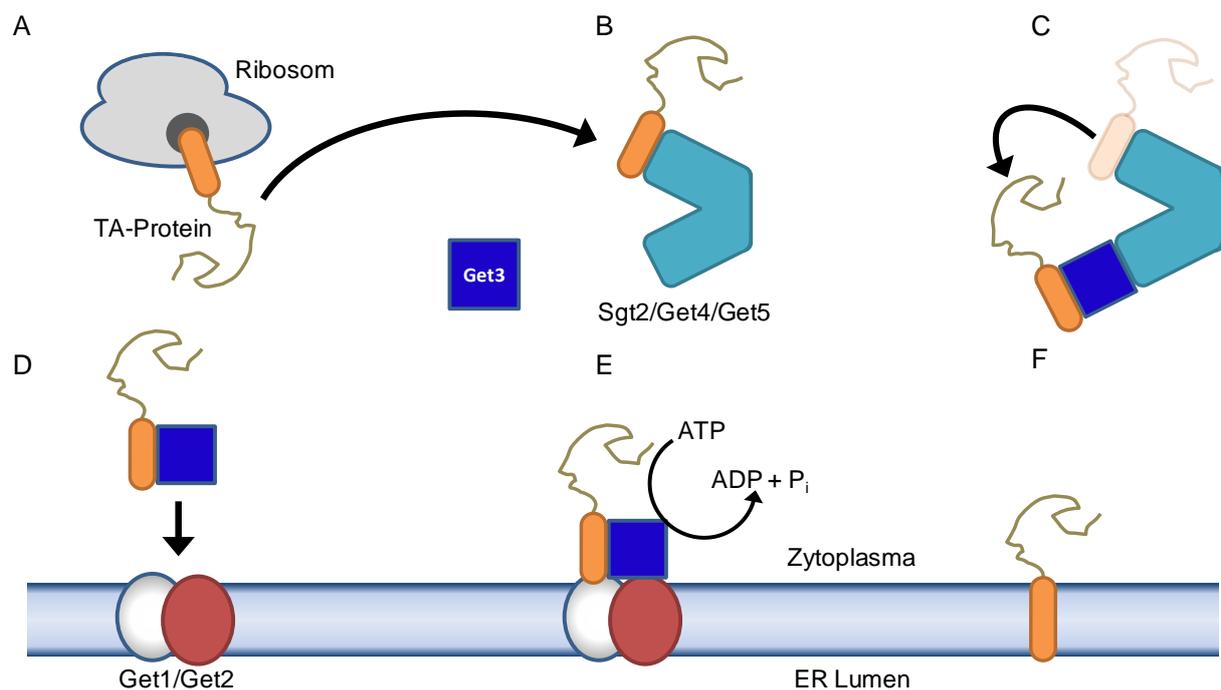


Abb. 1.3 Hypothetischer Weg des Einbaus von TA-Proteinen in die ER-Membran. A - Das naszierende TA-Protein (gold) wird durch das Ribosom (grau) mit der C-terminalen TMD-Sequenz (orange) in das Zytoplasma transloziert. B - Die TMD wird von Sgt2 im Komplex mit Get4 und Get5 (hellblau) gebunden. C - Dieser Komplex überträgt wahrscheinlich die TMD auf das Get3-Dimer (dunkelblau). Nachgelagert löst sich der Sgt2/Get4/Get5-Komplex vom Get3-Dimer. D und E - An das Get3-Dimer gebundenes TA-Protein wird vom Get3-Rezeptor bestehend aus Get1 und Get2 erkannt und gelangt so an die Oberfläche der ER-Membran. F - Diese Interaktion führt unter ATP-Hydrolyse zur TA-Protein-Insertion in die ER-Membran. Details im Text. Modifiziert nach [Denic, 2012].

Sobald die TMD des TA Proteins das Ribosom verlässt, wird sie vom Protein Sgt2 gebunden, das im Komplex mit Get4 und Get5 vorliegt. Es wird vermutet, dass dieser Komplex das TA-Protein auf die homodimere ATPase Get3 überträgt. Get3 transportiert das TA-Protein an die ER-Membran. Get1 und Get2 sind Transmembranproteine des ERs und bilden in *S. cerevisiae* den Rezeptor für Get3. Die Interaktion des Get3-Rezeptors mit der ATPase Get3, die mit TA-Protein beladenen ist, führt zur Insertion der TMD des TA-Proteins in die ER Membran [Borgese und Fasana, 2011; Denic, 2012; Schuldiner *et al.*, 2008].

Das strukturelle Gen, das für die Dpm1 aus *S. cerevisiae* kodiert, konnte 1988 von Orlean und Kollegen isoliert werden [Orlean *et al.*, 1988]. Zu diesem Zweck wurde eine Hefetransformanten-Bibliothek auf erhöhte Dpm1-Aktivität untersucht.

Das DPM1-Gen aus *S. cerevisiae* konnte in *Trichoderma atroviride* Stamm P1 [Zembek *et al.*, 2011], *Schizosaccharomyces pombe* [Colussi *et al.*, 1997], *Trichoderma reesei* [Perlińska-Lenart *et al.*, 2006] und *E. coli* [Schutzbach *et al.*, 1993] funktional exprimiert werden. Die rekombinante Expression des DPM1-Gens und die native Reinigung des Proteins in aktiver Form wurden erstmals 1993 beschrieben [Schutzbach *et al.*, 1993]. Hierfür wurde das Protein in *E. coli* produziert und nach Ultraschall-Zellaufschluss mittels Nonidet P-40 (heute IGEPAL® CA-630, Merck) solubilisiert. Die chromatographische Reinigung wurde mithilfe einer Hydroxylapatitsäule durchgeführt.

Zur Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften der Dpm1 wird bis heute ein Verfahren angewandt, das auf dem Einsatz radioaktiv markierter Nucleotidzucker (³H, ¹⁴C, Details unter 3.2 im Text) basiert [Banerjee *et al.*, 2005; Lamani *et al.*, 2006; Schutzbach *et al.*, 1993; Xing *et al.*, 2000; Zimmerman und Robbins, 1993]. Diese Methode ist sehr sensitiv aber auch sehr aufwendig. Die Verwendung radioaktiver Substanzen ist mit strengen Sicherheitsvorgaben, einer gesonderten Abfallentsorgung und der Nutzung speziell ausgestatteter Laborräume verbunden. Ein weiteres Verfahren zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Dpm1 aus *S. cerevisiae* wurde bisher nicht beschrieben. Ebenso existiert kein beschriebenes Verfahren zur Synthese von DoIPM.

Bei der Untersuchung der Dpm1 in verschiedenen Organismen wurde das Nebenprodukt GDP als Inhibitor der enzymatischen Aktivität identifiziert. Dazu zählt die Dpm1 aus *Acanthamoeba castellanii* [Carlo und Villemez, 1979], *Entamoeba histolytica* [Villagomez-Castro *et al.*, 1998], *Gallus gallus* [McDowell und Schwarz, 1989], *Mus musculus* [Gasnier *et al.*, 1987], *Rattus norvegicus* [Jensen und Schutzbach, 1986] und *Zea mays* [Riedell und Miernyk, 1988]. McDowell und Kollegen stellten eine kompetitive Inhibition fest [McDowell und Schwarz, 1989], wohingegen in den übrigen Untersuchungen die Art der Inhibition nicht bestimmt wurde. Unklar ist, ob GDP für die Dpm1 aus *S. cerevisiae* ebenfalls inhibitorisch wirkt.

Arbeiten von Albright und Kollegen wiesen darauf hin, dass ein hydrophobes, 13-Aminosäuren langes, hydrophobes Peptid in der Aminosäuresequenz der Dpm1 für die Dolichol-Substraterkennung verantwortlich ist [Albright *et al.*, 1989]. Diese These wurde in anderen Studien widerlegt, da auch ohne diese konservierte Domäne Dpm1-Aktivität nachgewiesen werden konnte [Schutzbach *et al.*, 1993; Xing *et al.*, 2000]. 2006 folgte ein erster Vorschlag zum Katalysemechanismus der Dpm1. Dazu wurden fluoreszierende Gruppen in Dolichylphosphatmoleküle eingebracht und nachfolgend der Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer analysiert. Mit diesem Experiment sollten Erkenntnisse über die

Struktur und die Interaktion von Dolichylphosphat mit der Dpm1 gewonnen werden. Durch die Bestimmung inter- und intramolekularer Abstände zwischen dem Substrat und dem aktiven Zentrum des Enzyms, wurde ein invertierender Mannosyltransfermechanismus postuliert [Lamani *et al.*, 2006]. Details zur Wechselwirkung zwischen Dpm1-Enzym und dem Lipidanker werden in 3.3.3 erörtert.

Die Dpm1-Aktivität kann durch Phosphorylierung des Enzyms an Serin 141 um das ungefähr Dreifache gesteigert werden. Diese Beobachtung geht aus *in vivo*-Studien mit gereinigtem Enzym und cAMP-abhängiger Proteinkinase hervor [Samuelson *et al.*, 2005]. Ob diese Phosphorylierung auch *in vivo* stattfindet, ist nicht bekannt.

Die immense Bedeutung der Dpm1 in der Glykosylierung von Proteinen zeigt sich in den acht bisher beschriebenen Fällen fehlender Dpm1-Aktivität im Menschen. Das Krankheitsbild wird unter dem Begriff *congenital disorder of glycosylation* Typ Ie zusammengefasst und ist unter anderem mit schweren Entwicklungsstörungen, Mikrozephalie, Krampfanfällen und dysmorphen Merkmalen assoziiert [Bursle *et al.*, 2017; Dancourt *et al.*, 2006; Garcia-Silva *et al.*, 2005; Imbach *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2013a].

Da das Produkt der Dpm1, DolPM, in verschiedenen metabolischen Wegen verwendet wird, nimmt die Dpm1 eine Schlüsselrolle in vier eukaryotischen Glykosylierungswegen ein [Gandini *et al.*, 2017]. Sowohl in der *N*-Glykosylierung, der *O*- und der *C*-Mannosylierung und der GPI-Ankersynthese wird DolPM als Mannosendonator verwendet [Freeze *et al.*, 2017; Loibl und Strahl, 2013; Sanyal und Menon, 2010].

DolPM wird von den Enzymen Alg3, Alg9 und Alg12 (*N*-Glykosylierung), PIG-M, PIG-X, PIG-V und PIG-B (GPI-Verankerung von Proteinen), *O*-Mannosyltransferasen Pmt1 bis Pmt6 (*O*-Mannosylierung), den nicht identifizierten Mannosyltransferasen der *C*-Mannosylierung und den unverstandenen Flippasen als Substrat benutzt [Aebi, 2013; Helenius *et al.*, 2002; Kinoshita und Fujita, 2016; Loibl und Strahl, 2013; Wang *et al.*, 2009]. Wenige dieser Enzyme sind in der BRENDA-Datenbank beschrieben, und detaillierte kinetische Charakterisierungen zu ihrem Verständnis fehlen. Besonders der bifunktionelle Mechanismus der Alg9 (Abb. 1.1) konnte bislang ähnlich wie die Wirkungsweise der Alg2 und Alg11 nicht mechanistisch aufgeklärt werden. Dies könnte auch auf die fehlende kommerzielle Verfügbarkeit von DolPM zurückzuführen sein.

1.1.3 Biotechnologische Ansätze zur Produktion therapeutischer Glykoproteine

Etwa 70 % der therapeutischen Proteine in der pharmazeutischen Industrie sind glykosyliert [Sethuraman und Stadheim, 2006]. Therapeutische Glykoproteine wurden unter anderem zur Behandlung von Multipler Sklerose (Interferon β -1a) oder des akuten Myokardinfarkts (*tissue plasminogen activator*), zur Vorbeugung und Kontrolle von hämorrhagischen Episoden bei Patienten mit Hämophilie B (Moroctocog α (CF VIII)) oder zur Detektion von

Schilddrüsenkrebs und Hypothyreose (Thyrotropin α) eingesetzt [Sola und Griebenow, 2010].

Glykosylierungen beeinflussen die pharmakokinetischen Eigenschaften eines therapeutischen Proteins [Higel *et al.*, 2016; Sola und Griebenow, 2010]. Die derzeit eingesetzten Expressionssysteme für die Produktion therapeutischer Glykoproteine sind z.B. Babyhamster-Nierenzellen, chinesische Hamstero-varienzellen (CHO), humane Zellen (Fibroblasten, Leukozyten, embryonale Nierenzellen) und Hefezellen [Sola und Griebenow, 2010]. Problematisch ist, dass die verwendeten Expressionssysteme zu einem heterogen glykosylierten Produkt führen, welches sogar nicht-humane Glykosylierungen enthalten kann [Ghaderi *et al.*, 2010]. Diese Heterogenität kann unerwünschte Nebeneffekte zur Folge haben. Deshalb sind die Hersteller therapeutischer Proteine bestrebt ein homogenes Produkt anzubieten.

Das Überspringen von Glykosylierungsstellen oder die zusätzliche Glykosylierung eines Proteins werden als sogenannte Makroheterogenitäten zusammengefasst. Neben Protein-intrinsischen Faktoren ist das Glykosylierungssystem von der Spezies, der Physiologie- und Gewebespezifität einer Zelle abhängig [Dicker und Strasser, 2015]. Mammalische Produktionsstämme besitzen als essentielle Glykosylierungserkennungssequenz das konservierte Asparagin-X-Serin/Threonin-Motiv. Unterschiede bestehen allerdings zwischen den OST-Präferenzen verschiedener Spezies in Bezug auf die umgebenden Aminosäuren der Erkennungssequenz. Zusätzlich können Faktoren wie die co-translationale Ausbildung von Disulfidbrücken oder Sekundärstrukturen die Ursache dafür sein, dass Glykosylierungsstellen aufgrund sterischer Hinderung übersprungen oder zusätzlich verwendet werden [Shrimal *et al.*, 2015; Zielinska *et al.*, 2012].

Im Gegensatz zu Makroheterogenitäten sind Mikroheterogenitäten bei der Produktion therapeutischer Proteine hauptsächlich auf die Funktion Glykan-prozessierender Enzyme zurückzuführen. Die Aktivität von Glycosidasen und Glycosyltransferasen ist von der Zeit abhängig, die sich ein Glykoprotein in einem bestimmten Kompartiment befindet. Weiter wird die Aktivität vom Zell- und Gewebetyp, der Konzentration der Glykan-prozessierenden Enzyme und der Zugänglichkeit von Nukleotid-Zuckern beeinflusst [Dicker und Strasser, 2015]. Darüber hinaus kann die Glykosylierung auch die Faltung, die Qualität, die Stabilität und die Löslichkeit eines Proteins beeinflussen [Xu und Ng, 2015]. Sie kann die *in vivo* Aktivitäten und Halbwertszeiten (Bioavidität) erhöhen und zu gesteigerter Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau (*Clearence*) führen [Werner *et al.*, 2012]. Da die Glykosylierung diesen enormen Einfluss auf die biologische Aktivität des Glykoproteins besitzt, müssen die Produktionsbedingungen genauestens kontrolliert werden, um eine definierte Wirkung zu gewährleisten.

In den letzten Jahren wurden unterschiedliche *Glyco-Engineering*-Strategien entwickelt um die Heterogenität therapeutischer Glykoproteine zu verringern und eine neue Wirkstoffgeneration mit erhöhter biologischer Aktivität zu entwickeln [Dicker und Strasser, 2015]. Prinzipiell sind zwei Wege zur *in vitro* Synthese von Oligosacchariden möglich [Endo und Koizumi, 2000; Schmaltz *et al.*, 2011]. Bei der ersten Methode werden Monosaccharide über glykosidische Bindungen chemisch miteinander verknüpft. Die Entwicklung orthogonaler Schutzgruppenstrategien ermöglicht dabei die stereoselektive Verknüpfung der Monosaccharide. Der hohe technische Aufwand verhindert derzeit den Einsatz für industrielle Zwecke [Agard und Bertozzi, 2009; Endo und Koizumi, 2000].

Als zweite Methode sind biotechnologische Ansätze entwickelt worden. Hier stehen *in vitro* und *in vivo* Methoden zur Verfügung. Typischerweise werden mammalische Zelllinien zur Produktion therapeutischer Wirkstoffe als *in vivo*-System eingesetzt. Dass die Glykosylierungsmuster nicht humaner Zelllinien ähnlich aber nicht identisch zum humanen System sind, stellt ein Problem dar. Denn nicht-humane Glykoformen können zu Immunogenizität führen [Wacker *et al.*, 2011]. 2014 wurde der Einfluss der Serumkonzentration im Medium von CHO K-1 Zellen auf die Produktion eines glykosylierten, monoklonalen Antikörpers (mAB) untersucht. Durch die Reduktion der Serumkonzentration im Medium wurde eine Erhöhung der mAB-Galaktosylierung von 53 auf ~80 % erreicht [Costa *et al.*, 2014]. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Qualität des Produktes bereits durch kleinste Veränderungen der physiologischen Bedingungen, denen die Zelle ausgesetzt ist, beeinflusst werden kann.

In Ansätzen des *in vivo-Glyco-Engineerings* wurden genetisch veränderte Mutanten des Expressionsorganismus erzeugt, um ein einheitliches und/oder humanisiertes Glykanmuster zu generieren oder sogar neue Glykosylierungsstellen in das Zielprotein einzubringen [Dicker und Strasser, 2015].

Die beiden folgenden Beispiele werden hierzu exemplarisch vorgestellt. Das erste Beispiel ist der erste mAB mit einer gezielt veränderten Glykosylierung (Mogamulizumab). Mogamulizumab wird zur Behandlung von Mykose und der Sézary-Krankheit eingesetzt. Unter dem Markennamen Poteligeo® wurde das therapeutische Protein 2012 durch das japanische Ministerium für Gesundheit, Arbeit und Soziales zugelassen [Beck und Reichert, 2012]. Die zugrunde liegende Technologie trägt den Namen Pottelligent® Technologie. Durch homologe Rekombination wurden hierbei CHO *knock-out* Zellen erzeugt, in denen das Gen FUT8 genetisch ausgeschaltet wurde. Die entstandene CHO-Zelllinie kann folglich keine Golgi- α -1,6-Fukosyltransferase mehr bilden. Der in diesem *knock-out* Stamm produzierte mAB Mogamulizumab ist komplett defukosyliert [Gupta und Shukla, 2018; Lagasse *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2017].

Im zweiten Beispiel wurde unter Verwendung der MabTech Technologie der Firma Roche der mAB Obinutuzumab (GA101) produziert [Gupta und Shukla, 2018]. Dieser mAB wird zur Behandlung der therapieresistenten, chronisch lymphatischen Leukämie und/oder eines folliculären Lymphoms, dem häufigsten Typ des indolenten Non-Hodgkin-Lymphoms eingesetzt. Obinutuzumab bindet das CD20 Antigen, welches auf der Oberfläche von B-Lymphozyten gebildet wird. Die Zulassung durch die *Food and Drug Administration* der USA erfolgte 2013 [Goede *et al.*, 2014; Usmani *et al.*, 2017]. Durch den Einsatz der MabTech Technologie wird durch die Überexpression der β -1,4-N-Acetylglucosaminyltransferase III in CHO Zellen ein N-Acetylglucosaminylrest auf die erste Mannose übertragen (s. Abb. 1.4 A).

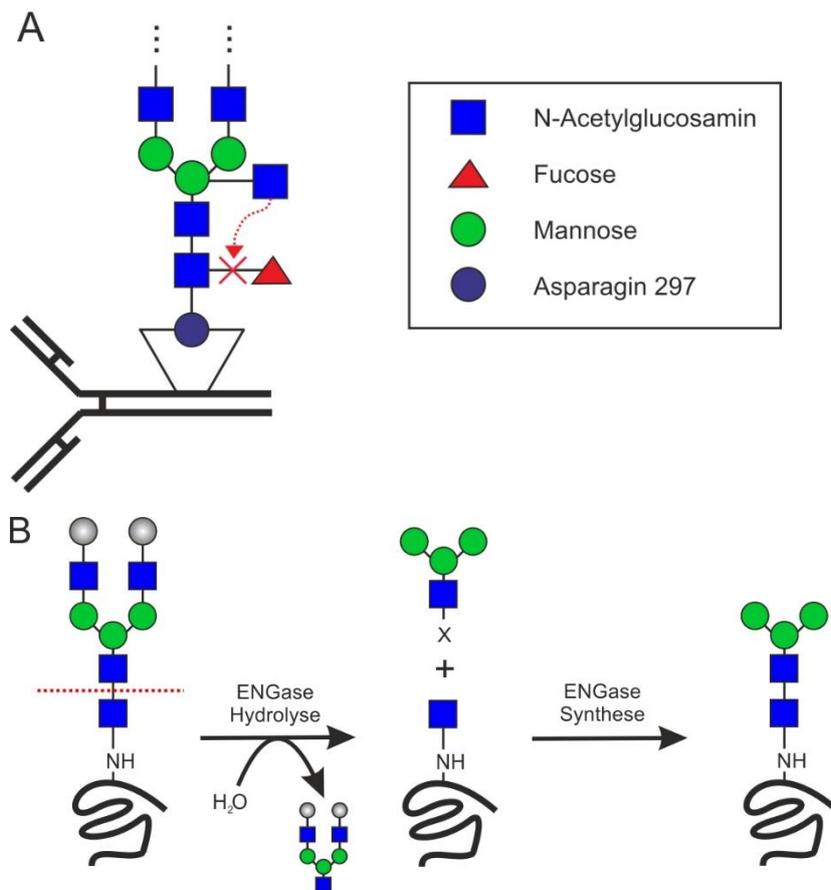


Abb. 1.4 Biotechnologische Ansätze zur Produktion homogener therapeutischer Proteine. A -Verhinderung der Kern-Fukosylierung eines therapeutischen mABs. Durch Überexpression der β -1,4-N-Acetylglucosaminyltransferase III in CHO-Zellen wird ein zusätzlicher N-Acetylglucosaminylrest auf die erste Mannose des *N*-Glykans übertragen. Durch sterische Hinderung (roter Pfeil) wird die Kernfukosylierung am ersten N-Acetylglucosaminylrest verhindert. Das Ergebnis ist ein defukosylierter mAB. Modifiziert nach [Klein *et al.*, 2014]. B - Verwendung von ENGasen zur Herstellung homogener Glykoproteine. Im ersten Schritt wird der Diacetylchitobiosekern des heterogenen glykosylierten Proteins mittels einer ENGase hydrolytisch gespalten. Ein N-Acetylglucosaminrest verbleibt am Protein. Im zweiten Schritt wird ein definiertes Glykan, das einen N-Acetylrest enthält, zugesetzt. Eine modifizierte ENGase verknüpft dieses Glykan in einer Synthesereaktion mit dem am Glykoprotein verbliebenen N-Acetylrest. Das Resultat ist ein homogen glykosyliertes Protein. Modifiziert nach [Fairbanks, 2017]. Details im Text.

Es kommt zu einer starken Verringerung der Fukosylierung am ersten GlcNAc-Rest der Fc-Region des mABs durch sterische Hinderung. Verantwortlich dafür ist der zusätzlich übertragene N-Acetyl-Glucosaminylrest [Ferrara *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2014; Umana *et al.*,

1999]. Die in beiden Beispielen erzielte, verringerte sogenannte Kernfukosylierung erhöht sowohl die Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) als auch die Phagozytose.

Im Gegensatz zu den beschriebenen *in vivo*-Methoden werden bei *in vitro*-Strategien des *Glyco-Engineerings* unter anderem Glycosidasen und Glycosyltransferasen eingesetzt. Diese Enzyme werden verwendet, um ein bereits produziertes Glykoprotein nach dem *downstream processing* zu modifizieren. Dabei werden zunächst alle Glykane mit Hilfe von Glycosidasen auf eine einheitliche Struktur gebracht. Im Anschluss erfolgt durch Glycosyltransferasen der Aufbau der gewünschten, einheitlichen Glykanstruktur [Roche, 2016].

Ein weiterer möglicher enzymatischer Ansatz zur Synthese homogener Glykoproteine könnte in zwei Schritten durch endo- β -N-Acetylglucosaminidasen (ENGasen) realisiert werden. ENGasen gehören zu einer Glycosidasen-Klasse (E.C. 3.2.1.96), die den Diacetylchitobiose-Kern (GlcNAc β (1–4) GlcNAc) N-verknüpfter Glykane zwischen den beiden N-Acetylglucosaminresten selektiv und hydrolytisch spaltet (s. Abb. 1.4 B). Dementsprechend verbleibt ein N-Acetylglucosaminrest am Glykoprotein oder -peptid. Durch Ausnutzung der Rückreaktion der Hydrolyse dieser Enzymklasse, können definierte Glykane, die einen N-Acetylglucosaminrest beinhalten, auf das Protein übertragen werden. Auf diese Weise konnten Proteine und Peptide mit definierten Oligosaccharidresten synthetisiert werden. Beispielsweise wurde die Glykosylierung eines humanen mABs der Subklasse IgG1 (produziert in *Pichia pastoris*) mithilfe dieser Technik verändert. Durch die enzymatische Aktivität von Wildtyp Endo A wurde die heterogene Mischung nicht-fukosylierter Hefeglykoformen auf einen einzelnen GlcNAc-Rest reduziert. Durch Zusatz von Endo H und entsprechenden Sacchariden in Oxazolin-Form, wurden tetra- und Hexasaccharide auf dem mAB der Subklasse IgG1 gebildet [Fairbanks, 2017; Wei *et al.*, 2008]. Diese Methode könnte als Basis für die vielseitige N-Glykosylierung verschiedenster Proteine und Peptide genutzt werden, die einen N-Acetylglucosaminrest beinhalten [Fairbanks, 2017].

1.1.4 Motivation

Eine der am schnellsten wachsenden Wirkstoffklassen in der pharmazeutischen Industrie sind therapeutische Proteine [Castilho, 2015]. Die meisten therapeutischen mABs gehören zur Klasse der Immunglobuline G (IgG). IgGs besitzen eine Glykosylierungsstelle an der Aminosäureposition 297 im Fc-Teil des Proteins [Liu *et al.*, 2018]. Immunzell-vermittelte Effektorfunktionen wie die Komplement-Aktivierung, die zu Komplement-abhängiger Zytotoxizität und ADCC führen kann, werden durch die Glykosylierung direkt beeinflusst [Thomann *et al.*, 2016]. Eine gezielte Kontrolle der Glykosylierung und deren Eigenschaften könnte durch eine homogene Glykanstruktur leichter erforscht und der Einfluss auf die therapeutischen Eigenschaften eines Glykoproteins besser abgeschätzt werden [Dicker und Strasser, 2015].

Die in 1.1.3 beschriebenen vielseitigen Methoden der *in vivo*- und *in vitro*-Glykosylierung therapeutischer Proteine bergen ein großes Potenzial zur Entwicklung neuartiger Wirkstoffe. In einer Publikation der Firma Roche wird festgestellt, dass die Glykosylierung über die Markteinführung eines neuen Wirkstoffes entscheiden könnte [Roche, 2016].

Alle im Folgenden vorgestellten zell-basierten Technologien zur Produktion von Glykoproteinen führen aufgrund unterschiedlicher Verweilzeiten in den Glykanprozessierenden Kompartimenten (ER und Golgi) zu Mikroheterogenitäten. Deshalb besteht ein weiterer Forschungsbedarf zum besseren Verständnis der Regulation intrazellulärer Transportprozesse, auch um der Bildung von Mikroheterogenitäten bei diesen Prozessen entgegenzuwirken [Dicker und Strasser, 2015].

Die derzeit weit verbreitete Technologie zur Erzeugung glykosylierter, therapeutischer Proteine ist die Produktion in mammalischen Zellen. Problematisch sind hierbei die Verwendung kostenintensiver, komplexer Medien, die Bildung nicht-humaner Glykoformen, der teure Produktionsprozess und die mögliche virale Kontamination der Zellkulturen [Castilho, 2015]. Darüber hinaus stellt die Anpassung des Glykanmusters durch Adaption der Produktionsstämme an eine veränderte Medienzusammensetzung einen zeitaufwendigen und eher unvorhersehbaren Prozess dar. Die Glykosylierung eines therapeutischen Proteins wird als sogenanntes kritisches Qualitätsmerkmal betrachtet. Eine Veränderung der Fermentationsbedingungen zur Optimierung des Glykosylierungsmusters kann dazu führen, dass andere kritische Qualitätsmerkmale außerhalb ihres Spezifikationsbereichs geraten und so Projekte verzögern [Costa *et al.*, 2014; Roche, 2016].

Bei der Herstellung therapeutischer Proteine in nicht-mammalischen Zellen wird häufig das Hefe-Produktionssystem verwendet. Hefen könnten das Zielprotein sekretieren und damit die Aufarbeitung vereinfachen. Des Weiteren besitzen Hefen einen ähnlichen Glykosylierungsapparat wie mammalische Zellen [Castilho, 2015], zeigen aber nicht-humane Hypermannosylierung im Golgi-Apparat. Die Initiierung der Hypermannosylierung geht vom

Enzym Och1 aus [Nakayama *et al.*, 1992]. Durch Deletion des für Och1 kodierenden Gens konnte in verschiedenen Spezies (*S. cerevisiae*, *P. komagatella* u.a.) bereits eine Verringerung Hefe-spezifischer Glykosylierungsmuster erzielt werden. Die Glykanprozessierung im Golgi-Apparat von Hefen ist allerdings hauptsächlich auf Mannosylierungen und Galaktosylierungen limitiert und unterscheidet sich damit deutlich von den komplexeren, humanen Strukturen [Castilho, 2015].

Erfolgreich konnte das Einbringen mammalischer *N*-Glykosylierungsreaktionen in Produktionsstämme für rekombinante Proteine wie *Escherichia coli* gezeigt werden. Die natürlichen Grenzen dieser Methode liegen in der Substratspezifität bakterieller OSTs [Valderrama-Rincon *et al.*, 2012].

In vitro-Glyco-Engineering könnte zahlreiche der beschriebenen Hürden überwinden. Künstlich geschaffene Kompartimente mit definierten Reaktionsbedingungen würden den gezielten Einsatz von Glycosidasen und Glycosyltransferasen ermöglichen. Auf diese Weise könnten Proteine mit einheitlichen Glykanen auf ihrer Oberfläche produziert werden.

Die vorliegende Dissertation entstand im Rahmen eines vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Projektes mit dem Titel: „Forschertandem zum Aufbau einer Plattform zur *in vitro N*-Glykosylierung von (therapeutischen) Proteinen unter Ausnutzung einer Kaskade isolierter Enzyme“. Im Rahmen des vom BMBF 2010 begonnenen Strategieprozesses „Nächste Generation biotechnologischer Verfahren – Biotechnologie 2020+“ sollten neuartige „Basistechnologien (*enabling technologies*) mit generischem Charakter und einem breiten Anwendungspotenzial“ entwickelt werden [BMBF, 2011].

Der Leitgedanke dieses Projektes war die Entwicklung eines flexiblen Systems zur Produktion und gezielten Übertragung definierter Glykanstrukturen auf Proteine. Die theoretischen Vorteile und Möglichkeiten der Verwendung isolierter Enzyme sind im Vergleich zu den unter 1.1.3 beschriebenen Methoden folgende:

1. Flexibel variierbare, definierte Glykosylierung des Zielproteins unter gleichzeitiger Vermeidung von Mikroheterogenitäten
2. Vermeidung OST-abhängiger Makroheterogenitäten durch definierte Reaktionsbedingungen
3. Entfernung inhibierender Produkte der Katalyse
4. Ersatz von tierischen Zellkulturen, da ein zellfreies System (keine viralen Kontaminationen) verwendet wird
5. Neukombination von spezifischen Enzymreaktionen zur Generierung artifizierender Glykane.

Der Aufbau der Glykanstrukturen wurde – ausgehend von der Projektidee – durch den Einsatz von Glycosyltransferasen aus der *N*-Glykosylierung der Hefe *S. cerevisiae* realisiert.

Die Glycosyltransferasen Alg3, Alg9 und Alg12 (Abb. 1.1) benötigen als aktivierten Zucker das Lipidphosphat-verknüpfte DolPM. Die *in vitro*-Synthese von DolPM durch das Enzym Dpm1 und die Charakterisierung dieser Reaktion sind Schwerpunkte dieser Arbeit.

1.2 Zielsetzung

Die chemische Synthese von DoIP ist ausgehend von isolierten Polyprenolen aus Kiefern (*Pinacea*) zugänglich, wobei bis zu 2 % der Nadel-Biotrockenmasse dieser Organismen aus Polyprenolen bestehen [Ibata *et al.*, 1984]. Im Jahr 2000 konnten erstmals fluorophore Gruppen chemisch in das DoIP-Molekül eingebracht werden [Shibaev *et al.*, 2000]. Biotechnologische Verfahren zur DoIP-Synthese sind nicht beschrieben worden. DoIP ist mit unterschiedlichen Moleküllängen von C₅₅-C₁₂₀ kommerziell über die Firma Larodan AB (Schweden) erhältlich [Gandini *et al.*, 2017]. Der Mannosedonor DoIPM ist nicht kommerziell verfügbar.

Primäres Ziel dieser Arbeit ist es, DoIPM enzymatisch herzustellen. Es soll eine Methode zur präparativen Synthese und Reinigung von DoIPM etabliert werden. Nach der Reinigung des Reaktionsprodukts soll DoIPM mit voneinander unabhängigen Verfahren identifiziert und quantifiziert werden.

Die DoIPM-Synthese soll – der Projektidee folgend – mit der Dpm1 aus *S. cerevisiae* durchgeführt werden. Die Wahl des Enzyms bietet sich aufgrund der beschriebenen rekombinanten Produktion in *E. coli* und der Daten zur Reinigung an [Schutzbach *et al.*, 1993]. Um die Produktaufarbeitung zu erleichtern und das Enzym wiederholt einsetzen zu können, soll die Katalyse mit immobilisiertem Enzym durchgeführt werden. Mithilfe eines Epitop-tags soll die Immobilisierung der Dpm1 erfolgen. Dazu soll mittels Gensynthese eine N-terminal mit einem Hexahistidin-tag verknüpfte His₆-SUMO-Dpm1-Proteinfusion erstellt werden. Die Verwendung des SUMO-Proteins als Fusionspartner hat in der Vergangenheit zur Erhöhung der Produktion und Löslichkeit rekombinanter Proteine in *E. coli* geführt [Marblestone *et al.*, 2006]. Durch die Einführung des Hexahistidin-tags soll nicht nur die Möglichkeit zum immobilisierten Einsatz der His₆-SUMO-Dpm1 gewährleistet werden, sondern die bisher verwendete native Präparation [Schutzbach *et al.*, 1993] um die Möglichkeit der Affinitätschromatographie erweitert werden. Dabei muss sichergestellt werden, dass ausreichend gereinigte Enzymmengen für folgende biochemische und biophysikalische Untersuchungen der His₆-SUMO-Dpm1 in Lösung zur Verfügung steht.

Um geeignete Reaktionsbedingungen für die enzymatische DoIPM-Synthese zu bestimmen, sollen zunächst unterschiedliche Cofaktoren und Reaktionstemperaturen mit gereinigtem Enzym in Lösung getestet werden. Darüber hinaus soll die enzymatische Aktivität der Dpm1 in Gegenwart des natürlichen Substrats DoIP, aber auch des artifiziellen, weniger hydrophoben Substrats Phytanylphosphat (PhytP) in Lösung untersucht werden. PhytP ist kommerziell leicht erhältlich und deutlich günstiger als DoIP.

Bisher wurde die enzymatische Aktivität der Dpm1 mittels radioaktiv-markierter Substanzen analysiert [Banerjee *et al.*, 2005; Lamani *et al.*, 2006; Schutzbach *et al.*, 1993; Xing *et al.*, 2000]. Ein nicht-radioaktives Verfahren soll in dieser Arbeit entwickelt werden. Dies

gewährleistet neben ökonomischen Vorteilen auch den direkten Einsatz in (bio-)chemischen Standardlaboratorien ohne Strahlenschutzauflagen.

Das Nebenprodukt der Dpm1-Reaktion GDP bindet an die Dpm1 aus anderen Organismen und inhibiert das Enzym [Carlo und Villemez, 1979; Gasnier *et al.*, 1987; Jensen und Schutzbach, 1986; McDowell und Schwarz, 1989; Riedell und Miernyk, 1988; Villagomez-Castro *et al.*, 1998]. Erstmals soll mittels isothermer Titrationskalorimetrie getestet werden, ob GDP als möglicher Inhibitor der Dpm1-Reaktion ausgeschlossen werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Sämtliche verwendete Chemikalien sind in der Tab. 2.1 in alphabetischer Reihenfolge zusammengestellt.

Tab. 2.1 Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Lieferant	Best. Nr.	Lot. Nr.	Reinheit
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt	1.00014.1011	K31611014301	≥ 99,5 %
Acrylamid/ Bisacrylamid (30 % Lösung)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz	A3574	21679242	k.A.
Agar-Agar	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	5210.2	13193654	k.A.
Ammoniumchlorid	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	K298.1	214210179	≥ 99,7 %
APS	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	9592.3	16675673	≥ 98 %
BCIP/NBT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz	SLBH1944V	B5655-25TAB	k.A.
Bromphenolblau				
BSA	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	8076.1	050103288	≥ 98 %
Calciumchlorid- dihydrat	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	5239.1	32681039	≥ 99 %
Cer(IV)sulfat	VEB Laborchemie Apolda	60717	k.A.	k.A.
CHCl ₃	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz	34854	7165M	HPLC Grade
Coomassie- Brillantblau G-250	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	9598.2	03462798	k.A.

Fortsetzung Tab. 2.1 Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Lieferant	Best. Nr.	Lot. Nr.	Reinheit
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt	1.05099. 0250	A514299403	k.A.
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	4984.1	456249359	≥ 99,5 %
Dolichylphosphat	C. Bensing, AG Pietzsch	Synthese	-	k.A.
DTT	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	6908.3	273200181	k.A.
EDTA	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	8043.2	24897160	≥ 99 %
Essigsäure	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	3738.5	186242074	≥ 99,8 %
Ethanol	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	9065.2	021166227	≥ 99,8 %
GDPM ¹⁴ C markiert	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig	ARC1217	160923	>97 %
Glucose	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	6887.1	24897379	k.A.
Glutathion, reduziert	Merck KGaA, Darmstadt	1.04090.0050	K37556390 808	≥ 98 %
Glycerin	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	3783.2	500165583	≥ 99,5 %
Glycin	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	3908.2	09894636	≥ 99 %
HCl	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	4625.2	25465386	37 %
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	2363.2	05569868	k.A.
IGEPAL® CA-630	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz	9002-93-1	MKBX3662V	k.A.
Imidazol	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe	X998.4	040152292	≥ 99 %

Fortsetzung Tab. 2.1 Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Lieferant	Best. Nr.	Lot. Nr.	Reinheit
IPTG	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	CN08.4	180155329	≥ 99 %
Kaliumdihydrogen- phosphat	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	P749.3	239106978	≥ 99 %
Kaliumhydroxid	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	6751.1	32255051	> 85 %
Kanamycin	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	T832.1	25389-94-0	k.A.
Kobaltchlorid	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	T889.1	26897580	≥ 99 %
Kupferchlorid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz	61174	363415/1	≥ 99 %
Magnesiumchlorid- hexahydrat	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	2189.1	41316311	≥ 99 %
Magnesiumsulfat- heptahydrat	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	P749.3	499151054	≥ 99 %
Manganchlorid	Merck KGaA, Darmstadt	1.05934.010	A475834328	≥ 99 %
MeOH	Merck KGaA, Darmstadt	1.06035.1000	185435449	HPLC Grade
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	4227.2	28625	k.A.
Molybdatophosphor- säure	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	4440.2	k.A.	≥ 99 %
Natriumazid	AppliChem, Darmstadt	A1430,0100	8M005993	≥ 99 %
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	3957.2	379109064	≥ 99,5 %
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	6771.1	200156651	≥ 99 %
Natriumthioglykolat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz	T0632-25G	126K0780	k.A.

Fortsetzung Tab. 2.1 Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Lieferant	Best. Nr.	Lot. Nr.	Reinheit
Nickel(II)chlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz	22.338-7	61106 U20066	≥ 99 %
Phosphorsäure	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	2608.2	277258810	85-88 %
pH-Puffer (techn.)	Wissenschaftlich- technische Werkstätten GmbH Weilheim	108 800 108 802 108 804	10.13.-3 05.13.-4 05.12.-1	k.A.
Phytanylphosphat	ChiroBlock, Wolfen	Synthese	MLU 3621	95 %
2-Propanol (Isopropanol)	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	T910.1	4146/4CR	UV/IR Grade
Schwefelsäure	Grüssing GmbH, Filsum, Deutschland	13072	2340	95-97 %
SDS	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	1057.1	294216717	k.A.
TBAHP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz	268100	1393445 44908265	k. A.
TEMED	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	2367	11250517	k.A.
Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	3744.2	330156587	≥ 99 %
Trifluoressigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.08262.0100	S113262439	>99,8 %
TRIS	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	4855.3	120155193	≥ 99,9 %
Triton X-100	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	3051.4	195227705	k.A.

Fortsetzung Tab. 2.1 Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Lieferant	Best. Nr.	Lot. Nr.	Reinheit
Trypton/Pepton	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	8952.4	060152484	k.A.
TWEEN®-20	Carl Roth GmbH &Co. KG Karlsruhe	9127.1	13357019	k.A.

2.1.2 Stammlösungen und Puffer

Sämtliche verwendete Stammlösungen und Puffer sind in der in der Tab. 2.2 in alphabetischer Reihenfolge zusammengestellt.

Tab. 2.2 Übersicht über die verwendeten Stammlösungen

Stammlösung	Lösungsmittel	Konzentration
Blocklösung	dH ₂ O	3 % BSA (w/v) in TBS
CER-Reagenz	dH ₂ O	10,6 g Cer(IV)sulfat 26,6 g Molybdato-phosphorsäure, 51 mL konzentrierte Schwefelsäure auf 1 L mit dH ₂ O auffüllen
Coomassie-Farbreagens	dH ₂ O	~117 nM Coomassie-Brillantblau G-250 5 % (v/v) EtOH 10 % (v/v) 85 %-ige Phosphorsäure 10 % (v/v) Glycerin
Echtblausalz B	dH ₂ O	4,21 mM
IPTG	dH ₂ O	0,1-1,0 M
Kanamycin	dH ₂ O	50 µg µL ⁻¹
Kathodenpuffer	dH ₂ O	0,25 mM Tris 1,9 M Glycin ~34,7 mM SDS ~1,5 mM NaN ₃
Laufmittel A	dH ₂ O	125 mM KH ₂ PO ₄ 53 mM KOH 10 mM TBAHP
Laufmittel B	dH ₂ O	125 mM KH ₂ PO ₄ 53 mM KOH 10 mM TBAHP 20 % (v/v) MeOH

Fortsetzung Tab. 2.2 Übersicht über die verwendeten Stammlösungen

Stammlösung	Lösungsmittel	Konzentration
Laufmittel C	dH ₂ O	0,1 % (v/v) TFA
Laufmittel D	MeOH	0,1 % (v/v) TFA
Probenpuffer	dH ₂ O	0,22 mM Tris-HCl pH 6,8 17,3 mM SDS 7,46 µM Bromphenolblau 540 mM Glycerin ~100 mM β-Mercaptoethanol
Puffer A	dH ₂ O	25 mM Na ₂ HPO ₄ pH 8 5 mM MgCl ₂
Puffer B	dH ₂ O	25 mM Na ₂ HPO ₄ pH 8 10 % Glycerin 0,1 % IGEPAL [®] CA 630
Puffer C	dH ₂ O	10 mM Na ₂ HPO ₄ pH 8 10 % Glycerin 0,1 % IGEPAL [®] CA-630 5 mM EDTA 10 mM DTT
Reaktionspuffer	dH ₂ O	80 mM Tris-HCl pH 7,5 200 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 1 % IGEPAL [®] CA-630
Sammelgelpuffer	dH ₂ O	0,5 M Tris 13,9 mM SDS ~1,54 mM NaN ₃
TBS	dH ₂ O	10 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl
TBS-TT	dH ₂ O	20 mM Tris-HCl pH 7,5 500 mM NaCl 0,05 % (v/v) TWEEN [®] -20 0,2 % (v/v) Triton X-100

Fortsetzung Tab. 2.2 Übersicht über die verwendeten Stammlösungen

Stammlösung	Lösungsmittel	Konzentration
Transfer-Puffer	dH ₂ O	20 % (v/v) MeOH 25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Trenngelbuffer	dH ₂ O	1,5 M Tris 13,9 mM SDS ~1,54 mM NaN ₃

2.1.3 Organismus

Der verwendete Organismus wird in der Tab. 2.3 dargestellt.

Tab. 2.3 Übersicht über den verwendeten Organismus

Stamm	Genotyp	Bezeichnung
<i>Escherichia coli</i> BL21-Gold (DE3)	B F- <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) dcm ⁺ Tet ^r gal λ(DE3) <i>endA</i> Hte [Agilent, 2015]	BL21

2.1.4 Vektor

Der verwendete Vektor wird in der Tab. 2.4 dargestellt. Die Vektorkarte wird in 10.2 (Abb. 10.1) dargestellt.

Tab. 2.4 Übersicht über den verwendeten Vektor.

Vektor	Quelle	Größe [kb]	Resistenz
pETSUMOadapt	Invitrogen [Bosse-Doenecke <i>et al.</i> , 2010]	5,68	Kan ^R

2.1.5 Marker und Antikörper

Die verwendeten Marker und Antikörper sind in der Tab. 2.5 in alphabetischer Reihenfolge zusammengestellt.

Tab. 2.5 Übersicht über die verwendeten Marker und Antikörper

Bezeichnung	Name	Hersteller
primärer Antikörper	anti-poly-His aus Maus	Sigma Aldrich
Proteinmarker	EZ-Run™ Protein Marker	Thermo Scientific
Proteinmarker vorgefärbt	PageRuler Prestained	Thermo Scientific
sekundärer Antikörper	anti-Maus IgG AP aus Ziege	Sigma Aldrich

2.1.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Alle eingesetzten Geräte sind in der Tab. 2.6 in alphabetischer Reihenfolge zusammengestellt.

Tab. 2.6 Übersicht über die verwendeten Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller (Name, Ort, Land)
Autoklav	Varioklav Dampfsterilisator	H&P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland
<i>Blot</i> -Apparatur	V10-SDB	biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland
Chromatographiesäule	Grom-Sil 120 mm ODS-5 ST, 5 µM, C 18 reverse Phase Säule	Macherey & Nagel, Schkeuditz, Deutschland
Chromatographie- säulenmaterial	Nickel Sepharose 6 FastFlow STREAMLINE Chelating	GE, Hamburg Deutschland GE, Hamburg Deutschland
Dialyseschlauch	Spectra/POR 30 kDa	Spectrum laboratories Inc., Ravensburg, Deutschland
Dünnschichtchromato- graphiematerial	PLC Silica Gel 60 F254, 1 mm mit Konzentrierungszone, 20 × 4 cm, 1.13792.0001	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dünnschichtchromato- graphiematerial	TLC Silica Gel 60 F ₂₅₄	Merck KGaA, Darmstadt
Elektrophoresestrom- versorgung	EPS 301	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Feinwaage	BP 221S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Filterpapier	Whatman™ Papier	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe
Flowbox	Nu-440-400	NuAire Inc., Plymouth, USA
Gasbrenner	Fuego basic	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Geldokumentation	GenGenius Syngene	VWR, Darmstadt, Deutschland
Glasfritte		
Hochdruckhomogenisa- tor	Emulsiflex C5	Avestin Inc., Ottawa, Kanada

Fortsetzung: Tab. 2.6 Übersicht über die verwendeten Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller (Name, Ort, Land)
HPLC	Agilent 1260 Infinity	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
HPLC-MS	ASI-100 Autosampler, P-680 Pumpe, PDA- 100 Photodiodenarray Detektor, TCC-100 Säulenofen, Thermo Finnigan Surveyor MSQ Massenspektrometer mit ESI-Ionenquelle	Thermo Scientific Dionex™, Waltham, Massachusetts, USA
<i>kit</i>	GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Küvetten	105.202-QS	Hellma Analytics, Mühlheim, Deutschland
Massenspektrometer	Sciex 6500 QTRAP	Sciex, Toronto, Kanada
Membranfilter	Amicon Ultracentrifugal Filter Units	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Mikrokalorimeter	VP-ITC MicroCalorimeter	MicroCal LLC, Northampton, MA, USA
Mikrowelle	NN SD452 W	Panasonic, Kadoma, Japan
Nitrocellulosemembran	BioTrace™ NT Nitrozellulose Transfermembran	PALL Corporation, Portsmouth, Vereinigtes Königreich
pH-Meter	Fe20/EL20	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Bezeichnung	Typ	Hersteller (Name, Ort, Land)
Photometer	Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Pipetten	1-10 µL 10-100 µL 2-20 µL 100-1000 µL 500-5000 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Fortsetzung: Tab. 2.6 Übersicht über die verwendeten Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller (Name, Ort, Land)
Plattenlesegerät	BAS-1500	Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland
Rollermixer	SRT1	BIBBY Sterilin Ltd., Stone, Vereinigtes Königreich
Röntgenfilm	BAS-IIIIs 1000	Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland
Rotationsverdampfer	Heidolph 2	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Rührerplatte	Mono Power direct Mobil	Variomag, Daytona Beach, USA
Schüttler	Innova 4230	New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, USA
Schüttler	Multitron	Infors HT, Bottmingen, Schweiz
Schüttler	TH30/SM30	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
SDS-PAGE Anlage und Zubehör		Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Sterilfilter	0,2 µm	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Thermoblock	Thermostat plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermoschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Titrationsskalorimeter	VP-ITC MicroCalorimeter	MicroCal LLC, Northampton, MA, USA
Ultraschallbad	Sonorex Super 10 P	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Ultra-Turrax	Miccra R-T D-1	ART moderne Labortechnik, Mühlheim, Deutschland
Vakuumpumpe	Vacuubrand PC 511	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Vortexer	labDancer S40	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Waage	440-35 N	Kern, Balingen, Deutschland
Wärmeschrank	KP 196	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Wipptisch	60281-00	Hartenstein, Würzburg, Deutschland

Fortsetzung: Tab. 2.6 Übersicht über die verwendeten Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller (Name, Ort, Land)
Zentrifuge	5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	Mikrozentrifuge Model SD	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung und Stammhaltung von *Escherichia coli*-Stämmen

Alle verwendeten Medienbestandteile zur Kultivierung von *E. coli*-Stämmen wurden durch Autoklavieren bei 121 °C für 20 min sterilisiert. Kanamycin- (Kan) und Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid-Lösungen (IPTG) wurden steril filtriert. Bei der Herstellung von LB-Kan-Agarplatten oder Medium wurde Kan nach Abkühlung der Lösung auf < 50 °C zugesetzt. Für die Kultivierung von *E. coli* wurden 5 mL Medium in Kulturröhrchen (15 mL) und größere Ansätze (\geq 20 mL) in Erlenmeyerkolben mit Schikanen genutzt. Die Inokulation wurde durch steriles Animpfen mit einer Einzelkolonie im Fall von 5 mL Kulturen und durch Animpfen mit einer angewachsenen Vorkultur bei größeren Ansätzen vorgenommen. Es kam M9ZB-Medium [Schutzbach *et al.*, 1993] zum Einsatz.

Für eine längerfristige Aufbewahrung wurden *E. coli*-Kulturen in einem Glycerin-Medium-Gemisch gelagert. Dazu wurden 5 mL Kulturen angelegt und üN inkubiert. Am Folgetag wurden 5 mL frisches Medium mit 10 % (v/v) der Vorkultur inokuliert und für 2 h bei 37 °C und 180 rpm (Multitron II Schüttler) inkubiert. Anschließend wurden 800 μ L der Bakteriensuspension entnommen und mit 200 μ L Glycerin versetzt und gemischt. Die hergestellten Glycerinkulturen wurden bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Gensynthese

Die DNA-Sequenz des Dpm1-Gens aus *Saccharomyces cerevisiae* (Gen: YPR183W) wird im Anhang dargestellt (10.1). Diese Sequenz wurde von der Firma MWG Eurofins synthetisiert und unter Verwendung der Restriktionsenzyme *Bsa*I und *Bam*HI in den Expressionsvektor pETSUMOadapt [Bosse-Doenecke *et al.*, 2010] der Firma Invitrogen kloniert. Die Vektorkarte von pETSUMOadapt wird in Abb. 10.1 dargestellt.

Die Ergebnisse der Gensynthese und der Klonierung ergeben den finalen Expressionsvektor pETSUMOadapt-DPM1. Die richtige Basensequenz wurde mittels Sequenzierung (2.2.2.3) bestätigt.

2.2.2.2 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* BL21-Gold(DE3) mit dem Expressionsvektor pETSUMOadapt-DPM1 erfolgte nach der Standardprozedur [Sambrook und Russell, 2006]. Das Ergebnis ist der Expressionsstamm *E. coli* BL21-Gold(DE3) pETSUMOadapt-DPM1.

2.2.2.3 Isolierung und Quantifizierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden 5 mL LB-Kan Medium [Bertani, 1951] mit dem Expressionsstamm *E. coli* BL21-Gold(DE3) pETSUMOadapt-DPM1 steril inokuliert und üN bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Zellsuspension wurde am nächsten Tag bei ~11.000 × *g* zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit dem Zellpellet nach Herstellerangaben des GeneJET Plasmid Miniprep Kits (Thermo Scientific) verfahren. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde die Plasmid-DNA mit 60 °C warmem dH₂O statt mit dem vorgesehenen Puffer eluiert.

Die Quantifizierung der präparierten Plasmid-DNA erfolgte durch photospektrometrische Bestimmung der Absorption einer DNA enthaltenden Probe. Dazu wurde die Absorption der DNA-Probe in Wasser bei 260 nm Wellenlänge bestimmt. Das Ergebnis der quantitativen Plasmid-DNA-Konzentrationsbestimmung waren 410 ng µL⁻¹ (~20 µg). Die Sequenzierung der Plasmid-DNA erfolgte nach den Vorgaben der Firma Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland mit den Primern T7 und T7term.

2.2.3 Expression von Fusionsproteinen mit dem SUMO-System

E. coli BL21-Gold(DE3) pETSUMOadapt-DPM1 Zellen (2.2.2.2) wurden üN in M9ZB Medium [Schutzbach *et al.*, 1993] – supplementiert mit 50 µg mL⁻¹ Kanamycin – kultiviert. 250 bzw. 500 mL Medium in 1 bzw. 2 L Schüttelkolben mit Schikane wurden mit einer initialen optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,08 inokuliert und bei 37 °C und 100-150 rpm in einem Multitron II Schüttler inkubiert. Die Genexpression wurde bei einer optischen Dichte von 0,66 durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Zwei Stunden nach der IPTG-Zugabe wurden die Zellen mittels Zentrifugation bei 18.000 × *g* bei 4 °C pelletiert. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle weiteren Schritte auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Die Zellen wurden mit Wasser und Puffer A (25 mM Na₂HPO₄, 5 mM MgCl₂ pH 8) gewaschen und das Zellpellet bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

2.2.4 Proteinchemische Methoden

2.2.4.1 Isolierung der His₆-SUMO-Dpm1

Alle Schritte wurden – wenn nicht anders angegeben – bei ~4 °C durchgeführt und sind in Abb. 2.1 schematisch wiedergegeben. 4 g gefrorene *E. coli* BL21-Gold(DE3) pETSUMOadapt-DPM1 Zellen nach His₆-SUMO-DPM1-Genexpression wurden unter Rühren

in 20 mL Puffer A (2.1.2) aufgetaut und mit einem Ultra Turrax suspendiert. Durch Hochdruckhomogenisierung mit einem Emulsiflex C5 bei 1.000 bar wurden die Zellen aufgeschlossen. Im Anschluss wurde die Suspension bei $50.000 \times g$ für 20 min zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit Puffer A gewaschen und schließlich in 5 mL Puffer A suspendiert. 17,5 mL Puffer B und 2,5 mL 10 % (v/v) IGEPAL® CA 630-CA wurden hinzugegeben. Der Ansatz wurde 20 min auf einem Rollermixer inkubiert und erneut zentrifugiert.

Der Überstand wurde dekantiert und aufbewahrt. 20 mL Puffer B wurde zum verbliebenen Pellet gegeben und erneut auf dem Rollermixer für 20 min inkubiert. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt. Der Überstand wurde dekantiert und mit dem ersten Überstand vereinigt. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt.

Die vereinigten Überstände enthielten das solubilisierte Zielprotein. His₆-SUMO-Dpm1 wurde an STREAMLINE Chelating (GE) adsorbiert oder mittels Nickel Sepharose 6 FastFlow (GE) Säulen (Säulenvolumen: 1 mL) gereinigt. 1,7 mL solubilisierte Proteinlösung wurden zu 1 mL mit Puffer B prääquilibrierter Affinitätsmatrix gegeben und üN auf dem Rollermixer inkubiert. Derart mit His₆-SUMO-Dpm1 beladenes STREAMLINE Chelating Material wurde als Katalysator für die *Batch*- und kontinuierlichen Katalyseversuche eingesetzt. Die Proteinbeladung betrug $\sim 1 \text{ mg mL}^{-1}$ festes Material und die Konzentration an Protein im jeweiligen Reaktionsansatz $\sim 250 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

Nach der Inkubation wurden die mit Protein beladenen Matrizes von der Proteinlösung getrennt und dreimal mit Puffer B gewaschen. Die Elution des Zielproteins erfolgte immer durch die Zugabe von 1,7 mL Puffer B mit 500 mM Imidazol pro 1 mL Matrixvolumen. Die Elution der *Batch*-adsorbierten Proteine erfolgte durch Inkubation auf dem Rollermixer für 4 h und anschließender Abtrennung der Matrizes. Die jeweiligen Elutionsfraktionen enthielten das Zielprotein SUMO-Dpm1.

Mit Puffer B prääquilibrierte Amicon Zentrifugalfiltereinheiten (Sigma-Aldrich) wurden nach Herstellerangaben verwendet um die theoretische Imidazolkonzentration der Proteinlösung durch Zugabe von Imidazol-freiem Puffer B auf unter 1 mM zu senken. 500 μL gereinigtes Protein wurden im Anschluss mit 400 μL Glycerin und 100 μL Puffer C versetzt. Die erhaltene Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford zu $0,47 \text{ mg mL}^{-1}$ bestimmt [Bradford, 1976]. Die Lagerung des Proteins erfolgte bei $-20 \text{ } ^\circ\text{C}$. Ausgewählte Fraktionen dieser Proteinpräparation wurden mittels SDS-PAGE analysiert.



Abb. 2.1 Schematischer Ablauf der Isolierung von His₆-SUMO-Dpm1 und Immobilisierung an STREAMLINE Chelating (GE) von His₆-SUMO-Dpm1. Details im Text.

2.2.4.2 SDS-PAGE

Zur Herstellung von Trenn- und Sammelgel wurden die in Tab. 2.7 aufgelisteten Komponenten verwendet. Die Gelpuffer (2.1.2) wurden mit HCl auf pH 8,8 eingestellt [Laemmli, 1970]. Zur Herstellung der gesättigten APS-Lösung wurde Ammoniumperoxydisulfat (APS) in dH₂O gelöst, so dass ungelöstes APS am Boden verblieb.

Tab. 2.7 Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele

Substanz	2 Trenngele 12,5 %	2 Sammelgele 4,5 %
Gelpuffer [mL]	2,50	1,25
30 % Acrylamid/Bisacrylamid [mL]	4,20	0,75
deionisiertes Wasser [mL]	3,30	3,00
TEMED [μ L]	10,00	10,00
gesättigtes APS [μ L]	20,00	8,00

Zu trennende Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95 °C inkubiert. Der verwendete Kathodenpuffer war zehnfach konzentriert. Die Elektrophorese erfolgte 2-stufig: in der ersten Stufe 6 min bei 80 mA und 300 V und in der zweiten Stufe 30 min bei 60 mA und 300 V.

Zur Probenaufbereitung von sogenannten $1/OD_{600}$ -Proben wurde 1 mL Zellsuspension der OD_{600} von 1,0 der Kultur entnommen und bei 14.000 rpm für 12 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Das Zellpellet wurde in 100 μ L Probenpuffer pro Probenvolumen resuspendiert. Alle SDS-PAGE-Proben wurden nach dem Versetzen mit Probenpuffer für 10 min bei 99 °C inkubiert. Volumen von 5 μ L Marker und 10-40 μ L Probe wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

Das Polyacrylamid (PA)-Gel wurde in filtrierter Färbelösung (1,2 mM Coomassie Brilliantblau G-250, 4,23 mM Isopropanol und 1,6 mM Eisessig) für 1 h auf dem Wipptisch geschüttelt. Nach der Färbung wurde das Gel mit dH_2O abgespült und mit Entfärbelösung (4,02 mM Isopropanol und 1,6 mM Eisessig) entfärbt.

2.2.4.3 Western-Blot-Analyse von SDS-PA-Gelen

Zur *Western-Blot*-Analyse wurden SDS-PA-Gele eingesetzt, die nach 2.2.4.2 angefertigt, aber nicht gefärbt wurden. Es wurde ein vorgefärbter Molmassenstandard (2.1.5) verwendet, um den Erfolg des *Blot*-Verfahrens zu überprüfen. Alle Schritte wurden bei RT durchgeführt. Die verwendete Nitrozellulosemembran und das Whatman-Filterpapier wurden 15 min in Transfer-Puffer (20 % (v/v) MeOH, 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) auf einem Wipptisch äquilibriert. Das *Blotten* erfolgte bei 250 mA bei 20 V für 1 h. Im Anschluss wurden das Whatman-Filterpapier und das PA-Gel entfernt. Alle weiteren Schritte wurden – wenn nicht anders angegeben – auf einem Wipptisch durchgeführt. Die Nitrozellulosemembran wurde nacheinander zweimal mit je 15 mL TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl) für 10 min gewaschen, 1 h in 10 mL Blocklösung (3 % bovines Serumalbumin (BSA) (w/v) in TBS) inkubiert, zweimal mit je 15 mL TBS-TT (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,05 % (v/v) TWEEN®-20, 0,2 % (v/v) Triton X-100) und einmal mit 15 mL TBS für 10 min gewaschen. Es folgte die Bindung des primären Antikörpers (Anti-polyHistidin Antikörper (2.1.5), 1:3.000 in 10 mL Blocklösung) für 1 h. Nach zweimaligem Waschen mit je 15 mL

TBS-TT und einmal 15 mL TBS für je 10 min wurde die Nitrozellulosemembran mit dem sekundären Antikörper (Anti-Maus Antikörper gekoppelt an alkalische Phosphatase (2.1.5), 1:10.000 in 10 mL Blocklösung) 1 h inkubiert. Die Nitrozellulosemembran wurde viermal mit je 15 mL TBS-TT 10 min gewaschen. Das Anfärben der Antikörper-gebundenen Proteine erfolgte durch Zugabe von 10 mL alkalischer Phosphatase-Substratlösung (eine BCIP/NBT-Tablette gelöst in 10 mL dH₂O) für ~5 min ohne Schwenken. Die Farbreaktion wurde durch zweimaliges Waschen mit je 20 mL dH₂O gestoppt und die Nitrozellulosemembran zum Digitalisieren des Ergebnisses eingescannt.

2.2.5 Analytik

2.2.5.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mit dem Test nach Bradford bestimmt [Bradford, 1976]. Der lineare Bereich dieses Tests liegt zwischen 5 und 500 µg Protein pro 1 mL. Das Coomassie-Farbreagens (~117 nM Coomassie-Brillantblau G-250, 5 % (v/v) EtOH und 10 % (v/v) 85 %-ige Phosphorsäure) wurde filtriert und mit 10 % (v/v) Glycerin versetzt. Nach 24 h konnte das Reagens verwendet werden. Für den Test wurden 25 µL Proteinlösung und 975 µL Coomassie-Farbreagens für 2 min inkubiert und anschließend die Extinktion bei 595 nm gegen einen Blindwert ermittelt. Als Kalibrierprotein wurde BSA in Puffer A eingesetzt.

2.2.5.2 UV/VIS-Spektroskopie

Alle UV/VIS-DNA- und Proteinkonzentrationsbestimmungen wurden mit dem Ultrospec 2100 pro (Amersham Biosciences) unter Verwendung von Hellma Analytics-Küvetten durchgeführt.

2.2.5.3 Standard His₆-SUMO-Dpm1 Aktivitätstest

Der Reaktionspuffer (RB) bestand aus 80 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ und 1 % IGEPAL[®] CA-630 pH 7,5. Die Prozentangaben sind – wenn nicht anders beschrieben – in (v/v) angegeben. Der Standard His₆-SUMO-Dpm1 Aktivitätstest wird schematisch zur Verdeutlichung in Abb. 2.2 dargestellt.

Zunächst wurden Substratemulsionen von DoIP und PhytP mit einer jeweils theoretischen Endkonzentration von 200 µM in RB hergestellt. DoIP war in CHCl₃, PhytP in MeOH gelöst. Zu emulgierendes DoIP- oder PhytP-Substrat wurde gelöst vorgelegt und unter N₂-Gasstrom das Lösungsmittel verdampft. Dann wurde der RB (mit oder ohne MgCl₂) vorgelegt und der Ansatz kräftig mit Hilfe eines Vortex gemischt (60 s, maximale Geschwindigkeit). Nach einer Ultraschallbehandlung (60 s auf höchster Stufe) im Wasserbad (Sonorex Super 10 P) wurde der Ansatz üN bei 55 °C unter Rühren inkubiert. 25 µL der entstandenen Substratemulsion mit DoIP bzw. PhytP wurden in die jeweilige Reaktion eingesetzt.

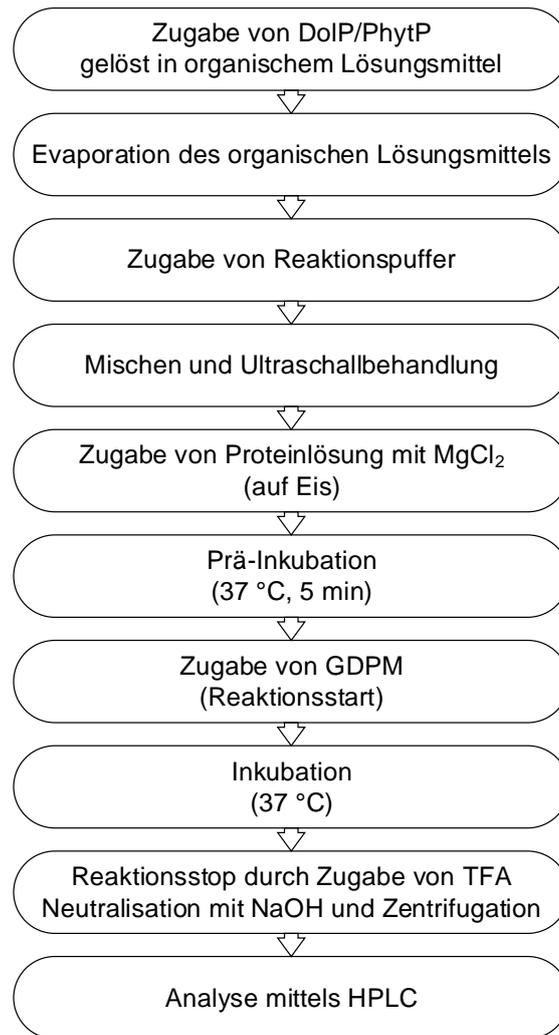


Abb. 2.2 Schematischer Ablauf des Standard His₆-SUMO-Dpm1-Aktivitätstest. Details im Text.

Die jeweilige Enzymlösung bestand – wenn nicht anders angegeben – aus präparierter Enzymlösung (2.2.4.1) und MgCl₂-Lösung (c₀ = 100 mM) und wurde auf Eis gemischt. Die Enzymlösung wurde zur Pufferemulsion in das Reaktionsgefäß gegeben und für 5 min bei der jeweiligen Reaktionstemperatur vorinkubiert. Mannosyltransferasereaktionen (Endvolumen: 100 µL) wurden durch den Zusatz von GDPM (c₀ = 2 mM) gestartet. Die zugegebenen Enzym-, MgCl₂- und GDPM-Lösungsvolumina waren von der jeweiligen Konzentration der Enzympräparation, der gewählten MgCl₂- bzw. GDPM-Endkonzentration im Experiment abhängig. Die verwendeten Konzentrationen im Reaktionsansatz sind in der Bildunterschrift des Experiments aufgeführt.

Enzymreaktionen wurden durch die Zugabe von 3 µL 50 %-iger Trichloressigsäure und Mischen für 5-10 s mit einem Vortex gestoppt. Die Proben wurden auf Eis gelagert, mit 4,5 µL 2 M NaOH neutralisiert und bei 13.000 × g für 10 min zentrifugiert, um präzipitiertes Protein zu pelletieren. Der Überstand wurde mittels HPLC (2.2.5.4) auf die enthaltenen GDP/GDPM-Mengen hin analysiert.

Unter den beschriebenen Bedingungen des Standardaktivitätstests und der Probenbehandlung konnte keine spontane Hydrolyse von GDPM zu GDP festgestellt werden. Die verwendete kommerzielle GDPM war mit bis zu 1 % GDP kontaminiert. Dieses Erkenntnis wurde bei der Erstellung von Kalibrierkurven (10.5) berücksichtigt. Im Text erwähnte enzymatische Umsatzgeschwindigkeiten (3.3) wurden an die Michaelis-Menten-Gleichung angepasst um K_m und V_{max} -Werte zu berechnen [Michaelis *et al.*, 2011].

2.2.5.4 High performance liquid chromatography (HPLC) und Massenspektrometrie

GDPM und GDP wurden chromatographisch getrennt. Zu diesem Zweck kam eine Agilent 1260 Infinity HPLC-Anlage zum Einsatz, die mit einer Grom-Sil 120 mm ODS-5 ST, 5 μ M, C 18 reverse Phase Säule ausgestattet war. 10 μ L wässrige Proben (2.2.5.3) wurden in Laufmittel A (125 mM KH_2PO_4 , 53 mM KOH, 10 mM TBAHP) injiziert. Der Anteil an Laufmittel B (125 mM KH_2PO_4 , 53 mM KOH, 10 mM TBAHP, 20 % (v/v) MeOH) wurde 8 min lang bei 0 % (v/v) gehalten und dann zu 100 % (v/v) erhöht. Bis zur Minute 21,5 wurde diese Bedingung aufrechterhalten, bevor wieder 0 % Laufmittel B für weitere 3,5 min genutzt wurden. Die Flussrate betrug 0,5 mL min^{-1} . Das UV-Signal wurde bei 254 nm verfolgt. Mit der Software OpenLAB CDS ChemStation Edition Rev. C.0107 [27] wurden die Daten aufgezeichnet und prozessiert.

PhytP und PhytPM wurden mittels HPLC-MS analysiert. Die HPLC-Dionex Chromatographieanlage bestand aus einem ASI-100 Autosampler, einer P-680 Pumpe, einem PDA-100 Photodiodenarray-Detektor, einem TCC-100 thermostatisiertem Säulenofen. Als weiterer Detektor wurde ein Thermo Finnigan Surveyor MSQ Massenspektrometer mit ESI-Quelle verwendet. Zur chromatographischen Trennung der Proben wurde eine Kinetex[®] C8 reverse Phase, 2,6 μ m, 4,6 x 50 mm Säule verwendet. Die Datenaufnahme und die -analyse wurden mit der Chromeleon Software (Version 6.6) durchgeführt. Laufmittel C bestand aus 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) in dH_2O und Laufmittel D aus 0,1 % (v/v) TFA in MeOH. Der Anteil an Laufmittel D wurde von 50 nach 100 % (v/v) innerhalb von 15 min variiert und dann 5 min isokratisch bei 100 % (v/v) gehalten. Die chromatographische Trennung wurde bei einer Flussrate von 1 mL min^{-1} und 40 °C durchgeführt. Das Probenvolumen betrug 10 μ L.

2.2.5.5 Dünnschichtchromatographie und Autoradiographie

Als alternative und unabhängige Methode für den Aktivitätsnachweis der His₆-SUMO-Dpm1 wurde auf ein Verfahren mittels radioaktiver Isotope zurückgegriffen. Nach 2.2.4.1 präpariertes His₆-SUMO-Dpm1 Protein wurde nach Standardaktivitätstestbedingungen (2.2.5.3) unter Zusatz von ¹⁴C-enthaltender GDPM inkubiert. Es wurden 0,5 nCi mL⁻¹ ¹⁴C-enthaltende GDPM pro Reaktion (Reaktionsvolumen 100 μ L) eingesetzt. Es galten die in 10.6 beschriebenen Reaktionsbedingungen. Die Reaktionen wurden durch den Zusatz von 500 μ L CHCl_3 :MeOH 1:1 (v/v) und kräftiges Mischen mit einem Vortex für 10 s gestoppt. Die

Proben wurden in einem Luftstrom getrocknet und das getrocknete DoIPM in 20 μL $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 1:1 (v/v) gelöst. Die Analyse der Proben erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (Laufmittelzusammensetzung: $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 60:25:4 (v/v/v)) und anschließender Autoradiographie.

Nach Abschluss der Dünnschichtchromatographie wurde die Dünnschichtchromatographieplatte getrocknet und ein Röntgenfilm (BAS-III 1000) auf die Platte gelegt. Die Belichtung des Röntgenfilms erfolgte für 16 h. Der Röntgenfilm wurde im Anschluss mit einem BAS-1500 Plattenlesegerät entwickelt und mit der BASReader Software bearbeitet.

2.2.5.6 DoIPM Aufarbeitung und Nachweis

Die kontinuierliche DoIPM-Produktion wird im Text beschrieben (3.6.1). Das Lösungsmittel der vereinigten Fraktionen der kontinuierlichen DoIPM-Produktion (~ 30 mL) wurde mit Hilfe eines Rotationsverdampfers auf ~ 3 mL reduziert (s. Abb. 2.3).

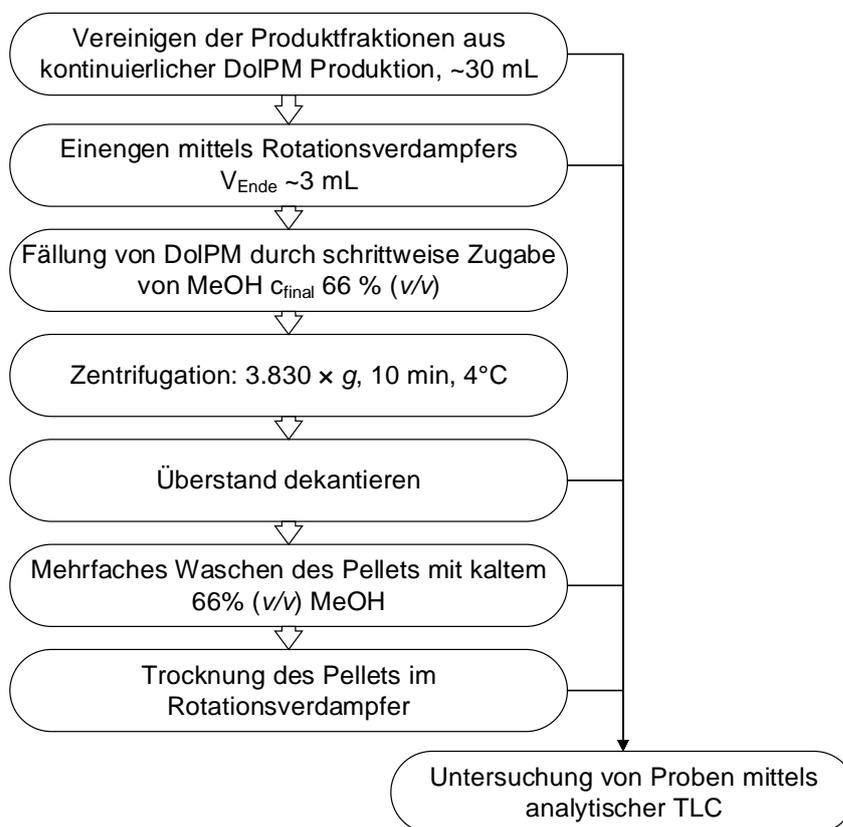


Abb. 2.3 Schema Aufarbeitung von DoIPM aus kontinuierlicher Produktion.

DoIPM wurde durch die schrittweise Zugabe von MeOH (final 66 % (v/v)) präzipitiert und mittels Zentrifugation bei $3.830 \times g$ für 10 min bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet mehrfach mit 66 % (v/v) MeOH gewaschen und schließlich im Rotationsverdampfer getrocknet. Der getrocknete Feststoff wurde in 1 mL CHCl_3 gelöst und sukzessive auf eine präparative Dünnschichtchromatographieplatte mit Konzentrierungszone aufgebracht. Nach dem vollständigen Trocknen der Probe wurden ihre Einzelbestandteile

chromatographisch mit einem Lösungsmittelgemisch ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 65:25:4 (v/v/v)) getrennt. Nach dem Trocknen der Dünnschichtchromatographieplatte wurde ein kleiner Teil der Platte mit CER-Reagenz (10,6 g Cer(IV)sulfat, 26,6 g Molybdätophosphorsäure, 51 mL konzentrierte Schwefelsäure, mit dH_2O bis 1 L auffüllen) und Hitze behandelt. DoIPM-enthaltene Matrixbestandteile der unbehandelten Bereiche der Dünnschichtchromatographieplatte wurden mit einem Spatel entfernt und in eine Glasritze überführt. DoIPM wurde durch schrittweise Zugabe von 100 mL $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 65:25:4 (v/v/v), 100 mL $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 1:1 (v/v) und 100 mL reinem MeOH von der Matrix eluiert. Elutionsfraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer entfernt. DoIPM wurde gewogen, in CHCl_3 gelöst ($\sim 1 \text{ mg mL}^{-1}$) und mittels ESI-MS analysiert.

Massenspektren von DoIP und DoIPM wurden im Negativ-Modus aufgenommen. Beide Substanzen wurden mit einer Flussgeschwindigkeit von $10 \mu\text{L min}^{-1}$ direkt in eine kalte duale ESI-MS Quelle eines Sciex 6500 QTRAP Massenspektrometers eingebracht. Das Schutzgas hatte einen Druck von 40 psi, das Ionenquellen-Gas GS1 hatte einen Druck von 20 psi und das Ionenquellen-Gas GS2 hatte einen Druck von 0 psi. Die Ionisierungsspannung betrug -4.500 V. Das Eingangspotenzial betrug -10 V und das *Declustering*-Potenzial betrug -50 V. Durch die Analyst 1.7 Software wurde das Instrument kontrolliert, die Daten aufgezeichnet und prozessiert.

2.2.5.7 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Bevor das nach 2.2.4.1 präparierte His₆-SUMO-Dpm1 Protein in der ITC eingesetzt werden konnte, wurde es zweimal mit Hilfe eines Dialyseschlauchs mit einer molekularen Ausschlussgröße von 30 kDa gegen 1 L Puffer B dialysiert. Eine „Puffer-Probe“ wurde parallel zur Proteinpräparation nach dem Zellaufschluss auf die gleiche Weise behandelt. Dieses Verfahren wurde gewählt, um Pufferunterschiede aufgrund der nicht gegebenen Dialysierbarkeit von IGEPAL[®] CA-630 und den damit verbundenen Unterschieden in der Zusammensetzung der Proteinpräparation und dem eingesetzten Puffer als Lösungsmittel des Liganden zu vermeiden. Pufferunterschiede können während der Messung zu Signalartefakten aufgrund von Verdünnungseffekten führen. Die Liganden GDP und GDPM wurden in der Puffer-Probe gelöst.

Die ITC-Probenzelle enthielt $72 \mu\text{M}$ His₆-SUMO-Dpm1 Protein und die Probenspritze war mit 2 mM GDPM oder GDP gefüllt. Die Messung erfolgte bei $10 \text{ }^\circ\text{C}$, einer Referenzzelleleistung von $15 \mu\text{Cal s}^{-1}$ und einer Rührgeschwindigkeit von 307 rpm. Nach einer Prääquilibrierungszeit von 5 min wurde die Messung gestartet. In 5 min-Intervallen wurden insgesamt 60 Injektionen GDP oder GDPM mit einem Injektionsvolumen von jeweils $2 \mu\text{L}$ in die ITC-Probenzelle injiziert. Die Daten wurden mit der Origin 7 Software analysiert. Ein Experiment, bei dem Puffer als Probe unter identischen Bedingungen in die ITC-Probenzelle injiziert wurde, diente als Kontrolle. Die gemessenen Signale wurden von den GDP/GDPM-

Messungen subtrahiert. Die auf diese Weise korrigierten Daten wurden an das *one set of sites* Modell angepasst.

3 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung, ob die enzymatische Synthese von Dolichylphosphatmannose (DolPM) mittels immobilisierten His₆-SUMO-Dpm1-Enzyms möglich ist. Bei der bisher beschriebenen, rekombinanten Herstellung des Wildtyp (WT) Dpm1-Enzyms aus *Saccharomyces cerevisiae* in *Escherichia coli*, wurde auf die Präparation mittels Ionenaustauschchromatographie gesetzt [Banerjee *et al.*, 2005; Lamani *et al.*, 2006; Schutzbach *et al.*, 1993; Xing *et al.*, 2000]. Alternativ wurden Mikrosomen aus *S. cerevisiae* als Proteinquelle verwendet [Sprung *et al.*, 2003; Sprung *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 1993]. Die gerichtete Immobilisierung eines WT-Proteins ist nur möglich, wenn detaillierte Kenntnisse zur Struktur des Proteins vorliegen. Bei der Dpm1 aus *S. cerevisiae* ist dies nicht der Fall. Aus diesem Grund sollte durch die Einführung eines Hexahistidin-tags die Möglichkeit zur gerichteten Einpunkt-Immobilisierung des Enzyms untersucht werden. Die Immobilisierung kann dann an komplexierte Nickel-Ionen erfolgen.

Zusätzlich wurde der SUMO-tag zwischen Hexahistidin-tag und Dpm1 eingeführt. Durch Verwendung des SUMO-tags könnte die Proteinlöslichkeit und die -produktion erhöht werden [Marblestone *et al.*, 2006]. Alle Ergebnisse (3.1 bis 3.7) beziehen sich daher auf die Untersuchung des Proteinfusionskonstrukts His₆-SUMO-Dpm1.

Zunächst sollte die Proteinherstellung mittels rekombinanter Proteinproduktion in *Escherichia coli* sowie die Reinigung mittels Affinitätschromatographie untersucht werden (3.1). Zudem sollen ein Aktivitätsnachweis entwickelt (3.2) und geeignete Parameter für die *in vitro* DolPM-Synthese mit gereinigtem Enzym zunächst in Lösung bestimmt werden (3.3-3.4). Anschließend sollten die Immobilisierung des His₆-SUMO-Dpm1-Enzyms (3.5), die kontinuierliche DolPM-Synthese (3.6) und der Produktnachweis für DolPM erfolgen (3.7).

3.1 His₆-SUMO-Dpm1 Proteinproduktion

Im ersten Schritt dieser Arbeit sollten die heterologe Proteinproduktion der His₆-SUMO-Dpm1 in *E. coli* und die Reinigung mittels Affinitätschromatographie durchgeführt werden. Auf diese Weise sollte sichergestellt werden, dass für die anschließenden Untersuchungen lösliches, gereinigtes Protein zur Verfügung stand. Die Reinigung des Enzyms ist eine Voraussetzung für kinetische Analysen. Andere Enzyme aus dem Produktionsstamm, die den aktivierten Zucker GDP-Mannose (Abb. 1.1) verwenden, könnten die Messung der His₆-SUMO-Dpm1 Aktivität verfälschen. Die Einstellung definierter Salzkonzentrationen im Reaktionsansatz ist beispielsweise mit Rohzellextrakten nicht möglich.

Die His₆-SUMO-Dpm1-Produktion wurde in *E. coli* BL21-Gold(DE3) Zellen durchgeführt. Dieser Zellstamm ist nach Herstellerangaben aufgrund der Auslegung auf das T7-Promotorsystem in Kombination mit der genomischen Deletion zweier Proteasen für hohe

Expressionslevel ausgelegt [Agilent, 2015] und wird in der Literatur oft verwendet (z.B. [Aschenbrenner *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019]).

Der Expressionsvektor pETSUMOadapt-DPM1 wurde, wie in 2.2.2.1 beschrieben, mittels Gensynthese durch die Firma MWG Eurofins synthetisiert. Die Transformation des Expressionsvektors und die Kultivierung der Zellen erfolgte wie in 2.2.2.2 und 2.2.3 beschrieben. In Schüttelkolben konnten 4,7 g Biofeuchtmasse (BFM) pro 1 L Zellkultur erhalten werden. Mittels Fermentation (Daten nicht gezeigt) konnte die BFM-Ausbeute auf 20,3 g pro 1 L Zellkultur gesteigert werden [Groen, 2017].

Die Aufarbeitung der Biomasse und die Solubilisierung der His₆-SUMO-Dpm1 werden in 2.2.4.1 beschrieben. Der Einsatz einer Affinitätschromatographie zur selektiven Reinigung der His₆-SUMO-Dpm1 wurde in dieser Arbeit erstmals verwendet. In Abb. 3.1 werden ausgewählte Proben einer exemplarischen Proteinpräparation ausgehend von 4 g *E. coli* BL21-Gold(DE3) pETSUMOadapt-DPM1 BFM nach Analyse mittels SDS-PAGE dargestellt.

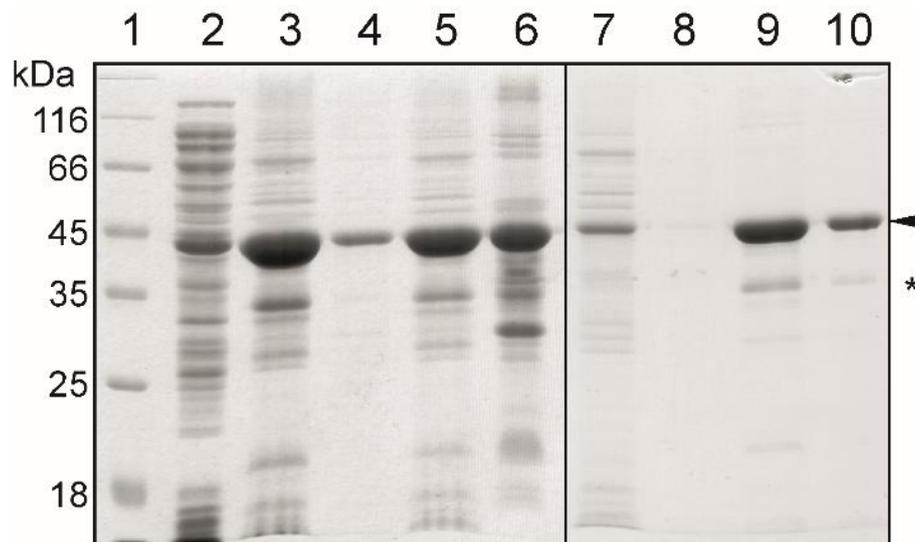


Abb. 3.1 His₆-SUMO-Dpm1-Reinigung mittels Affinitätschromatographie. SDS-PA-Gel nach SDS-PAGE-Analyse und Coomassie-Färbung von ausgewählten Proben einer exemplarischen Proteinpräparation. 4 g BFM wurden anfangs verwendet. Säulenvolumen: 1 mL. Probenvolumen: 1,7 mL vereinigte Überstände wurden nach Solubilisierung des Zielproteins aufgetragen. Säulenmaterial: Nickel Sepharose 6 FastFlow (GE). Laufspurenuordnung: 1 - Molekulargewichtsmarker, 2 - Überstand nach Zellaufschluss (lösliche Proteine), 3 - erste solubilisierbare Fraktion, 4 - zweite solubilisierbare Fraktion, 5 - vereinigte solubilisierbare Fraktionen, 6 - verbliebenes Membranpellet nach Solubilisierung, 7 - Überstand nach *Batch* Adsorption, 8 - Waschfraktion, 9 - Elutionsfraktion, 10 - Chromatographiematerialprobe nach Elution. Details s. 2.2.4.1. Das schwarze Dreieck markiert die His₆-SUMO-Dpm1 Proteinbande. Das Sternchen markiert eine proteinogene Verunreinigung. Analyse und Probenvorbereitung nach 2.2.4.2.

Die Proteinaufarbeitung begann mit einem Hochdruckhomogenisierungsschritt (2.2.4.1) für den Zellaufschluss und einem anschließenden Zentrifugationsschritt. Eine Probe des Überstandes wurde in Abb. 3.1 in Laufspur 2 neben dem Molekulargewichtsmarker in Laufspur 1 aufgetragen. Zu erkennen sind hauptsächlich lösliche Proteine des Produktionsorganismus *E. coli*. Ein Teil des Zielproteins His₆-SUMO-Dpm1 mit einem theoretischen Molekulargewicht von 43,8 kDa kann etwas unterhalb der 45 kDa

Proteinbande des Molekulargewichtsmarkers erkannt werden. Das bei der Zentrifugation entstandene Pellet wurde – nach Abnahme des Überstands – in frischem Puffer dispergiert und zur Solubilisierung von His₆-SUMO-Dpm1 mit 1 % (v/v) IGEPAL® CA-630 behandelt. Anschließend erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Eine Probe des Überstands wurde in Laufspur 3 untersucht. Hauptsächlich wurde His₆-SUMO-Dpm1 solubilisiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt und die Überstände vereinigt (Abb. 3.1, Laufspur 5). In den Laufspuren 3 und 5 wurden, neben dem Zielprotein, auch andere *E. coli* eigene Proteine, die mit solubilisiert wurden, nachgewiesen. Zu erkennen ist, dass nach zwei Solubilisierungsschritten die His₆-SUMO-Dpm1 nicht vollständig in den Überstand überführt wurde (Laufspur 6). Signifikante His₆-SUMO-Dpm1-Mengen blieben im Pellet zurück.

Die vereinigten Überstände wurden mit Nickel Sepharose 6 FastFlow (GE) Chromatographiematerial versetzt und wie in 2.2.4.1 behandelt. Durch die *Batch*-Adsorption sollten hohe, lokale Enzymkonzentrationen vermieden werden. Das Zielprotein His₆-SUMO-Dpm1 wurde dabei nicht-kovalent an das Chromatographiematerial gebunden. Im Überstand nach der *Batch*-Adsorption ist ungebundenes His₆-SUMO-Dpm1 Zielprotein erkennbar (Laufspur 7). Das mit Zielprotein beladene Chromatographiematerial wurde mit Puffer gewaschen. Eine Probe der Waschfraktion wurde in Laufspur 8 analysiert. In der Waschfraktion lassen sich kaum Proteinsignale erkennen. Die Elution des Zielproteins erfolgte durch Zugabe Imidazol-haltigen Puffers. In der Probe der Elutionsfraktion (Laufspur 9) kann ein signifikantes Zielproteinsignal erkannt werden. Eine Probe des Chromatographiematerials selbst wurde nach der Elution ebenfalls mittels SDS-PAGE untersucht (Laufspur 10). Auffällig ist die unvollständige Elution des Zielproteins vom Säulenmaterial, da ein deutliches Zielproteinsignal nach der Elution in der Chromatographiematerialprobe erkannt werden kann.

Die Ausbeute an His₆-SUMO-Dpm1 nach Elution betrug 5,4 mg Protein pro g BFM. Auf der Höhe der 35 kDa Protein-Markerbande kann eine Proteinverunreinigung erkannt werden (Laufspur 9). Mittels Western Blot (WB) Analytik (2.2.4.3) von Proben, die während der Kultivierung der *E. coli* BL21-Gold(DE3) pETSUMOadapt-DPM1 Zellen entnommen wurden, konnte durch die Verwendung eines anti-poly-Histidin-Antikörpers ein Signal mit dem gleichem Molekulargewicht wie in der Analyse der Proben aus der Proteinreinigung detektiert werden (vgl. Abb. 3.1 und Abb. 10.2, S. 86). Unterhalb des Zielproteinsignals können weitere weniger abundante Signale erkannt werden, die mit Abbaubanden des Zielproteins erklärt werden könnten. SDS-PAGE- und WB-Signale zusammen deuten auf die Produktion des 43,8 kDa großen Zielproteins His₆-SUMO-Dpm1 hin.

Durch Fermentation im Bioreaktor (V = 10 L) konnte die erhaltene BFM pro 1 L Zellkultur um mehr als das Vierfache (4,7 g im 500 mL Maßstab im 2 L Schüttelkolben bzw. 20,3 g im 10 L Bioreaktor) gesteigert werden [Groen, 2017].

Die His₆-SUMO-Dpm1 konnte in einem Schritt mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden. Die theoretische Ausbeute betrug 5,4 mg Protein pro 1 g BFM ausgehend von 4 g aufgearbeiteter BFM aus der Bioreaktorfermentation. Die Ausbeute an Zielprotein entspricht rechnerisch – bezogen auf das Zellkulturvolumen im 10 L Bioreaktor – 110 mg Protein pro 1 L Zellkultur (bzw. pro 20,3 g BFM).

3.2 Entwicklung eines nicht-radioaktiven Aktivitätstests

Bevor der nicht-radioaktive Aktivitätstest eingeführt werden soll, werden kurz die bisherigen Ansätze zur Messung der Dpm1-Aktivität aus der Literatur zusammengefasst. Basierend auf den Daten der Enzymdatenbank BRENDA [Jeske *et al.*, 2019] wurden Aktivitätsmessungen mit der Dpm1 aus verschiedenen Organismen durchgeführt (Stand: 04.07.2019). Die Dpm1-Aktivität wurde in mikrosomalen Fraktionen von *Sporothrix schenckii* [Ruiz-Baca *et al.*, 2005], chinesischen Hamsterovarienszellen (CHO) [Banerjee *et al.*, 2004], *Candida albicans* [Arroyo-Flores *et al.*, 1995], embryonalen Hühnerzellen [McDowell und Schwarz, 1989], Maisendospermzellen [Riedell und Miernyk, 1988] und *Acanthamoeba castellanii* [Carlo und Villemez, 1979] bestimmt. Solubilisierete ER-Membranfraktionen und gereinigte Proteinfractionen aus *Entamoeba histolytica* [Villagomez-Castro *et al.*, 1998], *Thermoplasma acidophilum* [Zhu und Laine, 1996], zudem aus Mitochondrien aus Mausleber [Gasnier *et al.*, 1992], Rattenleber [Jensen und Schutzbach, 1985] und aus humanen kapillaren Endothelzellen [Baksi *et al.*, 2008] wurden auf Dpm1-Aktivität untersucht. Bereits einleitend benannt (s. 1.1.2) wurden funktionelle Komplementationassays mit der Dpm1 aus *S. cerevisiae* in den Arbeiten von Colussi, Perlińska, Zembek und Kollegen beschrieben [Colussi *et al.*, 1997; Perlińska-Lenart *et al.*, 2006; Zembek *et al.*, 2011]. Das DPM1-Gen aus *Pyrococcus horikoshii* konnte in *S. cerevisiae* exprimiert und die Dpm1-Aktivität in zellfreien Extrakten bestimmt werden [Urushibata *et al.*, 2008]. Die Grundlage für die Arbeit mit nativer, gereinigter Dpm1 aus *S. cerevisiae*, war die heterologe Expression des DPM1-Gens in *E. coli* [Schutzbach *et al.*, 1993]. Alle weiteren Arbeiten bezogen sich auf diese Herangehensweise [Banerjee *et al.*, 2005; Lamani *et al.*, 2006; Schutzbach *et al.*, 1993; Xing *et al.*, 2000].

In allen zuvor beschriebenen Arbeiten wurde auf die Verwendung radioaktiver Isotope zurückgegriffen. Radioaktiv-markierte Mannose in GDP-Mannose (GDPM) wird im Dpm1-Reaktionsassay auf unmarkiertes Dolichylphosphat (DoIP) übertragen (s. Abb. 1.2, S. 6). Die Reaktion wird durch den Zusatz organischer Lösungsmittel zum Reaktionsansatz gestoppt. Es bilden sich eine organische und eine wässrige Phase im Reaktionsgefäß, die voneinander getrennt werden. In der organischen Phase werden nach der enzymatischen Reaktion aufgrund der hohen Hydrophobizität die radioaktiv-markierte Dolichylphosphatmannose (DoIPM) und das nicht umgesetzte, nicht-markierte DoIP wiedergefunden. Die organische Phase wird mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und die

Radioaktivität der organischen Phase im Szintillationsmessgerät bestimmt. Die Zunahme der Radioaktivität in der organischen Phase entspricht der enzymatischen Aktivität der Dpm1 im Reaktionsansatz.

In der vorliegenden Arbeit sollte ein Aktivitätsassay verwendet werden, der ohne radioaktive Isotope oder aufwendige Probenvorbereitung genutzt werden kann. Das genutzte Verfahren zur Aktivitätsmessung der His₆-SUMO-Dpm1 basiert auf der chromatographischen Trennung von GDP und GDPM [Neubauer *et al.*, 1995] mittels *high performance liquid chromatography* (HPLC, 2.2.5.4). Ein repräsentatives Chromatogramm wird in Abb. 3.2 A dargestellt.

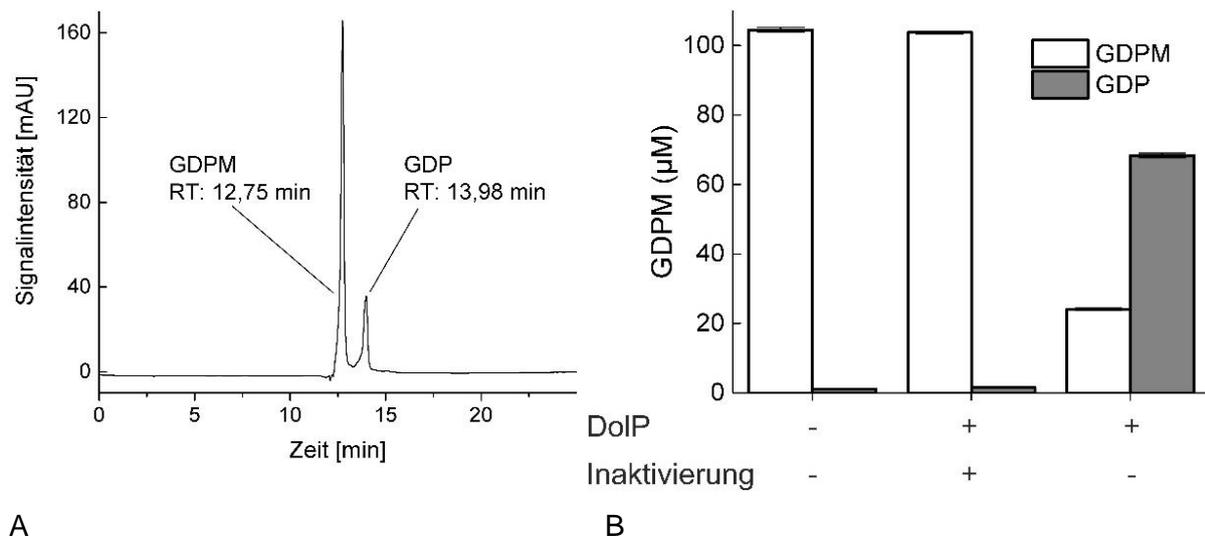


Abb. 3.2 Nicht-radioaktiver His₆-SUMO-Dpm1-Aktivitätsassay. A - Repräsentatives Chromatogramm der Trennung einer Probe mit GDPM (187 µM) und GDP (37 µM). B - Enzymatischer Assay mit der Glycosyltransferase His₆-SUMO-Dpm1. Der Assay wurde nach Standardreaktionsbedingungen durchgeführt (2.2.5.3). Die Proteinkonzentration betrug 12 µg mL⁻¹. Die DolP-Konzentration betrug 200 µM, die GDPM-Konzentration 100 µM, die MgCl₂-Konzentration 2,5 mM und die Reaktionszeit 10 min. Die Enzyminaktivierung wurde durch die Inkubation bei 95 °C für 5 min und anschließender Inkubation auf Eis vor dem Präinkubationsschritt des Aktivitätsassays erreicht. Fehlerbalken sind aufgrund geringer Abweichung von höchstens 0,69 % kaum erkennbar. Die Trennung von GDPM und GDP erfolgte nach 2.2.5.4. n ≥ 2.

Die Quantifizierung von Substrat- und Produktmengen wurde durch Integration der jeweiligen Substanzpeaks (Abb. 3.2 A) bekannter Konzentration und der Verwendung von Kalibrierkurven (Abb. 10.3, S. 87) erreicht. Der GDPM-Verbrauch und die GDP-Bildung während der enzymatischen Reaktion der His₆-SUMO-Dpm1 werden in Abb. 3.2 B unter den jeweils genannten Bedingungen dargestellt. Nach 10 min Reaktionszeit wurden ~40 µM GDP gebildet. In den Kontrollen mit hitzeinaktiviertem Enzym und ohne DolP-Substratzusatz wurde kein GDP gebildet.

Als unabhängige Kontrolle wurden vergleichbare Reaktionen unter Verwendung von GDP-[¹⁴C]M durchgeführt und mittels Dünnschichtchromatographie (DC), gefolgt von Autoradiographie analysiert (10.6, S. 88). In Laufspur 1 kann ein Signal mit einem R_F-Wert von ~0,37 (graues Dreieck) detektiert werden. Hierbei handelte es sich um ¹⁴C-markiertes DolPM, das nur bei Zusatz von DolP-Substrat, MgCl₂ und intaktem Enzym entsteht. Der

abschließende Nachweis für die DoIPM-Bildung wird in 3.7 erbracht. Die Korrelation zwischen den beiden unabhängigen Experimenten (GDP- bzw. DoIPM-Bildung) bei vergleichbaren Versuchsparametern weist auf His₆-SUMO-Dpm1-Aktivität hin.

Der Nachweis der His₆-SUMO-Dpm1-Aktivität über die GDP-Nebenproduktbildung ist nachteilig, da nicht wie in der Literatur direkt das Zielprodukt DoIPM nachgewiesen wird. Die Sensitivität der radioaktiven Methode ist im nano-molaren Produktkonzentrationsbereich einzuordnen [Jensen und Schutzbach, 1985; Jensen und Schutzbach, 1986; Schutzbach *et al.*, 1993]. Durch das hier vorgestellte HPLC-gestützte Verfahren konnte GDP- und GDPM-Konzentrationen im niedrigen mikromolaren Konzentrationsbereich nachgewiesen werden. Der größte Vorteil der neuen, indirekten Methode ist der Verzicht auf Radionuklide und damit die mögliche Verwendung in Standardlaboratorien. Ein weiterer Vorteil des HPLC-Verfahrens ist die zügige Probenaufarbeitung vor der Vermessung. Das bisher verwendete Verfahren mittels Szintillationsmessung setzt ein organisch-wässriges Extraktions- und Phasentrennungsverfahren mit vielen Schritten voraus. Dies erhöht den technischen Fehler durch mehrfache Probenüberführungen und unvollständige Phasentrennungen. In der Literatur werden keine absoluten - oder relativen Werte für die empirischen Standardabweichungen der untersuchten Proben angegeben (vgl. [Baksi *et al.*, 2008]). Es werden lediglich Angaben über das Bestimmtheitsmaß von Sekundärauftragungen aufgeführt, sodass ein direkter Vergleich zu den in Abb. 3.2 B erzielten Standardabweichungswerten von höchstens 0,69 % nicht möglich ist.

Der eingesetzte enzymatische Assay mittels HPLC-Analyse führte zum Nachweis von GDP und somit zur Bestimmung der His₆-SUMO-Dpm1-Aktivität. In einem unabhängigen Kontrollexperiment wurde unter Verwendung radioaktiv markierter GDP-[¹⁴C]M das zweite Produkt DoIPM identifiziert. Der bestimmte R_f-Wert von DoIPM (~0,37) ist in guter Übereinstimmung mit publizierten Werten von ~0,31-0,49 [Wedgwood *et al.*, 1974].

3.3 Kinetische Charakterisierung der His₆-SUMO-Dpm1

Mit den in 3.1 produzierten Enzymmengen und dem in 3.2 eingeführten Aktivitätstest sollten enzymkinetische Untersuchungen der His₆-SUMO-Dpm1 erfolgen. Kinetische Untersuchungen können zum Verständnis der Funktion eines Enzyms beitragen, die Bedingungen der höchsten Produktbildungsrate – und im konkreten Fall – die Spanne des möglichen Einsatzbereiches definieren. Zu diesem Zweck sollten die enzymatische Aktivität der His₆-SUMO-Dpm1 mit verschiedenen zweiwertigen Metallionen, die Temperaturabhängigkeit und der Vergleich verschiedener Lipidphosphat-Substrate untersucht werden.

3.3.1 Abhängigkeit von zweiwertigen Metallionen

Da strukturelle Informationen zur Dpm1 aus *S. cerevisiae* fehlen, ist der Katalysemechanismus nicht endgültig geklärt. Neben den bereits beschriebenen Mg²⁺- und

Mn²⁺-Ionen [Babczinski *et al.*, 1980] sollten auch Cu²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ und Ca²⁺ getestet werden. Es wurden Konzentrationen von 2,5 und 10 mM des jeweiligen Ions in Form ihrer Chloridsalze (Abb. 3.3 A) eingesetzt.

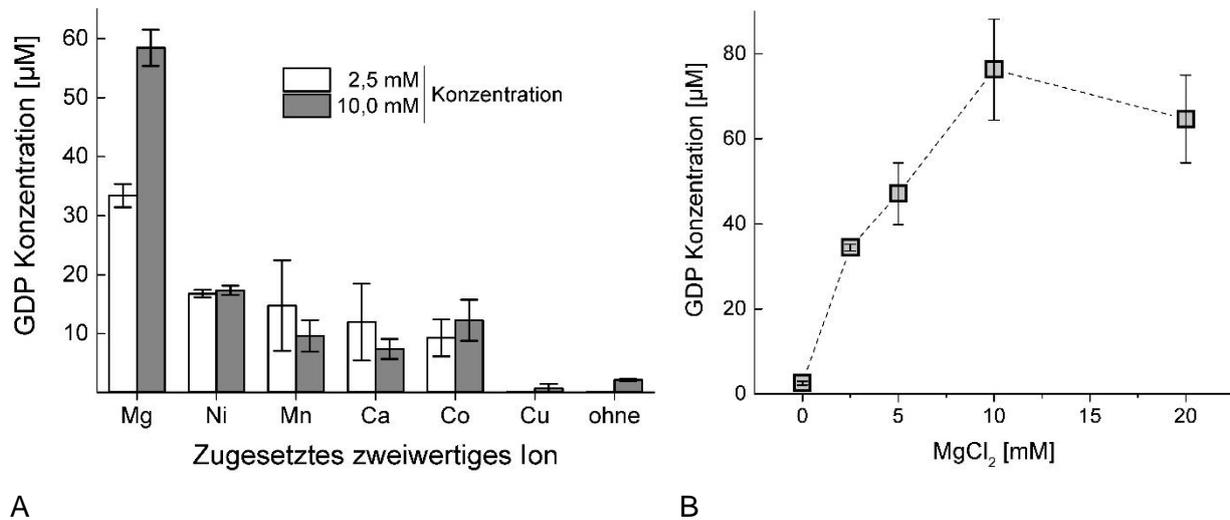


Abb. 3.3 Kinetische Untersuchung der His₆-SUMO-Dpm1 in Abhängigkeit von zweiwertigen Metallionen. Der Assay wurde nach Standardreaktionsbedingungen durchgeführt (2.2.5.3). Die Proteinkonzentration betrug 12 µg mL⁻¹, die DolP-Konzentration 200 µM, die GDPM-Konzentration 100 µM und die Reaktionszeit 10 min. A - Vergleich des Einflusses von 2,5 und 10 mM Zusatz verschiedener zweiwertiger Metallionen auf die His₆-SUMO-Dpm1-Aktivität. Die Ionen wurden in Form von Metallchlorid-Lösungen zugesetzt. B - Vergleich des Einflusses von 0, 2,5, 5, 10 und 20 mM Mg²⁺-Ionen auf die His₆-SUMO-Dpm1-Aktivität. Die Trennung von GDPM und GDP erfolgte nach 2.2.5.4. n ≥ 2.

Die höchste GDP-Konzentration von 59 µM nach 10 min wurde durch Zusatz von 10 mM Mg²⁺-Ionen gemessen (Abb. 3.3 A). In der Reihenfolge Ni²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺ Co²⁺ wurde eine sich verringernde Aktivität beim Zusatz von 2,5 mM des jeweiligen Metallions festgestellt. Ohne den Zusatz zweiwertiger Metallionen oder in Gegenwart von Kupferionen konnte keine GDP-Bildung und damit keine His₆-SUMO-Dpm1-Aktivität gemessen werden. Der Einfluss der Mg²⁺-Ionen wurde detaillierter untersucht (Abb. 3.3 B). Die Mg²⁺-Ionen-Konzentration wurde zwischen 0 und 20 mM variiert. Mit zunehmender Mg²⁺-Ionen-Konzentration (2,5-10 mM) steigt die Konzentration gebildeten GDPs an. Bei 20 mM ist die GDP-Konzentration 15 % geringer als die höchste bei 10 mM erreichte GDP-Konzentration. Der Unterschied von 59 µM zu 76 µM gebildetem GDPs nach 10 min in Abb. 3.3 A und B bei gleicher Mg²⁺-Ionenkonzentration lässt sich auf die Verwendung unterschiedlicher His₆-SUMO-Dpm1-Präparationen mit variierender spezifischer Aktivität zurückführen.

3.3.2 Abhängigkeit von der Temperatur

Die enzymatische Katalyse ist temperaturabhängig [Peterson *et al.*, 2007]. Der optimale Temperaturbereich für die Dpm1 aus *S. cerevisiae* ist in der Literatur nicht exakt beschrieben. Im Bereich von 20-50 °C sollte die Produktbildungsgeschwindigkeit ermittelt werden. Aus dem Experiment 3.3.1 ist bekannt, dass der Zusatz von 10 mM MgCl₂ zu den

höchsten gemessenen Aktivitäten führte. Die nachfolgenden Experimente wurden aus diesem Grund mit 10 mM MgCl₂ im Reaktionspuffer (RB) durchgeführt (2.2.5.3).

Für die präzise Bestimmung des enzymatischen Umsatzes wurde, anstatt auf Endpunktbestimmungen zurückzugreifen, die Ermittlung von Geschwindigkeitskonstanten durchgeführt. In Abb. 3.4 A sind die Progresskurven bei der jeweils verwendeten Temperatur dargestellt. Die dem Anstieg der Progresskurven entsprechende Geschwindigkeit wurde in Abb. 3.4 B gegen die Temperatur aufgetragen.

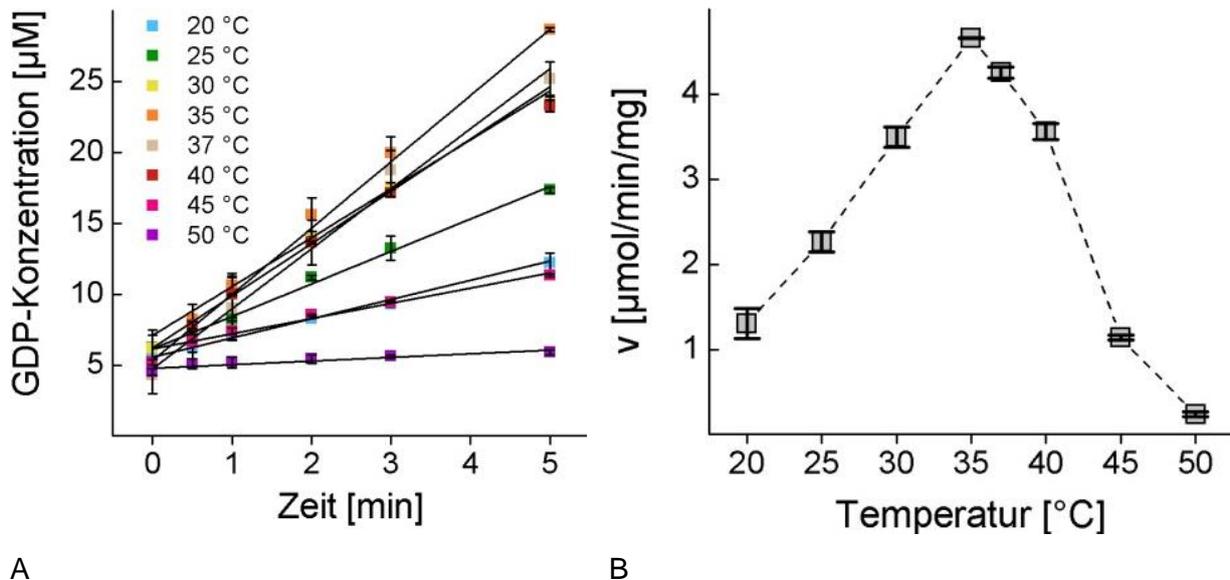


Abb. 3.4 Kinetische Untersuchung der His₆-SUMO-Dpm1 in Abhängigkeit von der Temperatur. Der Assay wurde nach Standardreaktionsbedingungen durchgeführt (2.2.5.3). Die Proteinkonzentration betrug 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$, die DoIP-Konzentration 200 μM und die GDPM-Konzentration 100 μM . Es wurden folgende Reaktionstemperaturen getestet: 20, 25, 30, 35, 37, 40, 45 und 50 $^{\circ}\text{C}$. Die Reaktionszeit für jede getestete Temperatur betrug 0, 0,5, 1, 2, 3 und 5 min. A - Auftragung der GDP-Konzentration in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. Die Datensätze einer zugehörigen Temperatur wurden mittels linearer Regression interpoliert. B - Auftragung der initialen Geschwindigkeiten aus A gegen die jeweilige Temperatur. Die chromatographische Trennung von GDPM und GDP erfolgte nach 2.2.5.4. $n \geq 2$.

Der höchste Wert von $\sim 4,7 \mu\text{mol} (\text{min mg Protein})^{-1}$ wurde bei 35 $^{\circ}\text{C}$ erreicht. Zwischen 20 und 45 $^{\circ}\text{C}$ ließ sich eine spezifische Aktivität größer $1,1 \mu\text{mol} (\text{min mg Protein})^{-1}$ nachweisen. Innerhalb eines Temperaturbereiches von 25 $^{\circ}\text{C}$ liegt die Restaktivität des Enzyms danach bei $\geq 23 \%$.

3.3.3 Abhängigkeit von der Art des Lipid-Phosphats

Wilson und Kollegen testeten 1993 mikrosomale Fraktionen aus *S. cerevisiae* auf die enzymatische Aktivität der Dpm1 [Wilson *et al.*, 1993]. Um die strukturellen Voraussetzungen der Wechselwirkung zwischen Dpm1-Enzym und dem Lipidanker zu untersuchen, verwendeten sie neben dem natürlichen Substrat DoIP auch Phytanylphosphat (PhytP). PhytP entsteht als Abbauprodukt von Chlorophyll in Wiederkäuern und wird über Fleisch- und Milchprodukte vom Menschen aufgenommen [Reininger, 2012]. DoIP und PhytP bestehen beide aus einer einzelnen anorganischen Phosphatgruppe, einer mehrfach

methylverzweigten Kohlenwasserstoffkette und einer α -gesättigten Kopfgruppe (Abb. 3.5). DoIP besitzt eine mehrfach-ungesättigte Struktur (di-*trans*, poly-*cis* Konfiguration [Cantagrel und Lefeber, 2011]), wohingegen PhytP vollständig gesättigt ist. Der Hauptunterschied zwischen PhytP und DoIP liegt in der Länge der Kohlenwasserstoffketten. PhytP ist ein sogenanntes Isoprenoid und besteht formal aus vier Isopreneinheiten (MW = 479,73 g mol⁻¹). Die Längenverteilung von Dolicholen variiert artspezifisch [Meinschein, 1995] und Physiologie-bedingt [Wen *et al.*, 2013]. Im tierischen Gewebe können Dolichole mit 12-24 Isopreneinheiten gefunden werden [Meinschein, 1995].

Wilson und Kollegen stellten fest, dass die Verzweigung des Lipidankers für den Mannosyltransfer der Dpm1 essentiell ist. Unbeantwortet blieb die Frage nach den genauen kinetischen Parametern, da lediglich ein 60-70 %-iger Umsatz von PhytP im Vergleich zu DoIP festgestellt wurde [Wilson *et al.*, 1993]. Zur Beantwortung dieser Frage wurde in der vorliegenden Arbeit die GDPM-Konzentration zwischen 25 und 2000 μ M variiert und der Einfluss der Substrate DoIP und PhytP auf den Mannosyltransfer untersucht (2.2.5.3). Die Progresskurven dieses Experiments sind in Abb. 10.5 A und B (S. 89) dargestellt. Die Auftragung der initialen Geschwindigkeiten gegen die eingesetzte GDPM-Konzentration ergab die V/S-Charakteristiken in Abb. 3.5.

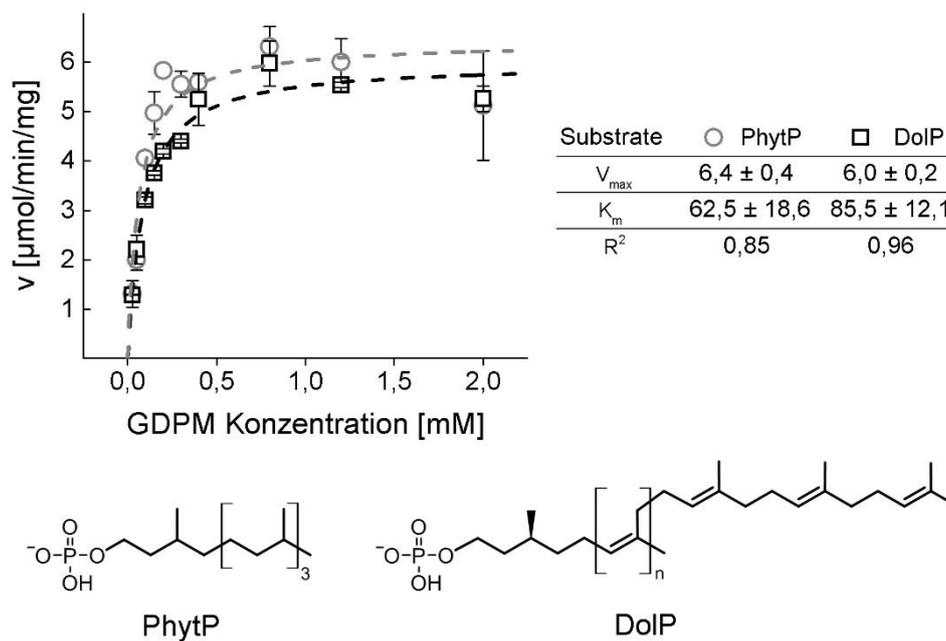


Abb. 3.5 Kinetische Untersuchung der His₆-SUMO-Dpm1 in Abhängigkeit vom Lipidphosphatanker. Der Assay wurde nach Standardreaktionsbedingungen durchgeführt (2.2.5.3). Die Proteinkonzentration betrug 12 μ g mL⁻¹, die DoIP- bzw. PhytP-Konzentration 200 μ M. Die GDPM-Konzentration wurde zwischen 25 und 2000 μ M variiert. Die zugehörigen Progresskurven sind in Abb. 10.5 A und B (S. 89) abgebildet. Die initialen Geschwindigkeiten dieser Progresskurven wurden durch lineare Regression ermittelt und gegen die jeweilige GDPM-Substrat-Konzentration aufgetragen. V_{max} in μ mol (min mg)⁻¹. K_m in μ M. $n = 2$. Die Strukturen von PhytP und DoIP werden unten in der Abbildung dargestellt.

Der Nachweis von PhytP und PhytPM erfolgte mittels LC-ESI-MS (2.2.5.4) und wird in Abb. 10.6 (S. 90) dargestellt. Nach Anpassung der kinetischen Daten (Abb. 3.5) an die

Michaelis-Menten-Gleichung [Michaelis *et al.*, 2011] konnten die zugehörigen K_m - und V_{max} -Werte für GDPM ermittelt werden. Die K_m -Werte für GDPM betragen 86 μM mit DoIP als Lipidanker bzw. 63 μM mit PhytP. Die entsprechenden V_{max} -Werte für GDPM wurden zu 6,0 (DoIP) und 6,4 $\mu\text{mol} (\text{min mg})^{-1}$ (PhytP) bestimmt und in Tab. 4.1 (S. 63) den Literaturwerten gegenübergestellt.

Mit dem in 3.2 eingeführten His₆-SUMO-Dpm1-Aktivitätstest konnten in 3.3 detaillierte Daten zur Temperaturabhängigkeit, der Akzeptanz zweiwertiger Metallionen als Cofaktoren und zur Substratspezifität in Bezug auf den verwendeten Lipidanker erhalten werden. Der hier erstmals beschriebene, nicht-radioaktive His₆-SUMO-Dpm1-Aktivitätstest mittels HPLC stellte sich als verlässlich heraus und brachte Messwerte mit einer durchschnittlichen Standardabweichung von 5,4 % (3.2-3.3) hervor.

3.4 Untersuchung der His₆-SUMO-Dpm1 Wechselwirkung mit GDP und GDPM

Wie einleitend erwähnt ist unklar, ob das Nebenprodukt GDP inhibitorisch auf die Dpm1 aus *S. cerevisiae* wirkt. Dieser Effekt wurde für die Dpm1 aus verschiedenen Organismen beschrieben (s. 1.1.2). Die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen GDP bzw. GDPM und der His₆-SUMO-Dpm1 könnte erste Ansätze zur Beantwortung dieser Frage liefern.

Eine Methode zur Untersuchung solcher Protein-Ligand-Wechselwirkungen ist die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC). Die ITC kommt ohne die Verwendung von Markierungen aus. Innerhalb eines einzelnen Experiments können Daten zu Stöchiometrie, Bindungskonstante K_D , Enthalpie und Entropie einer nicht-kovalenten, intermolekularen Wechselwirkung ermittelt werden.

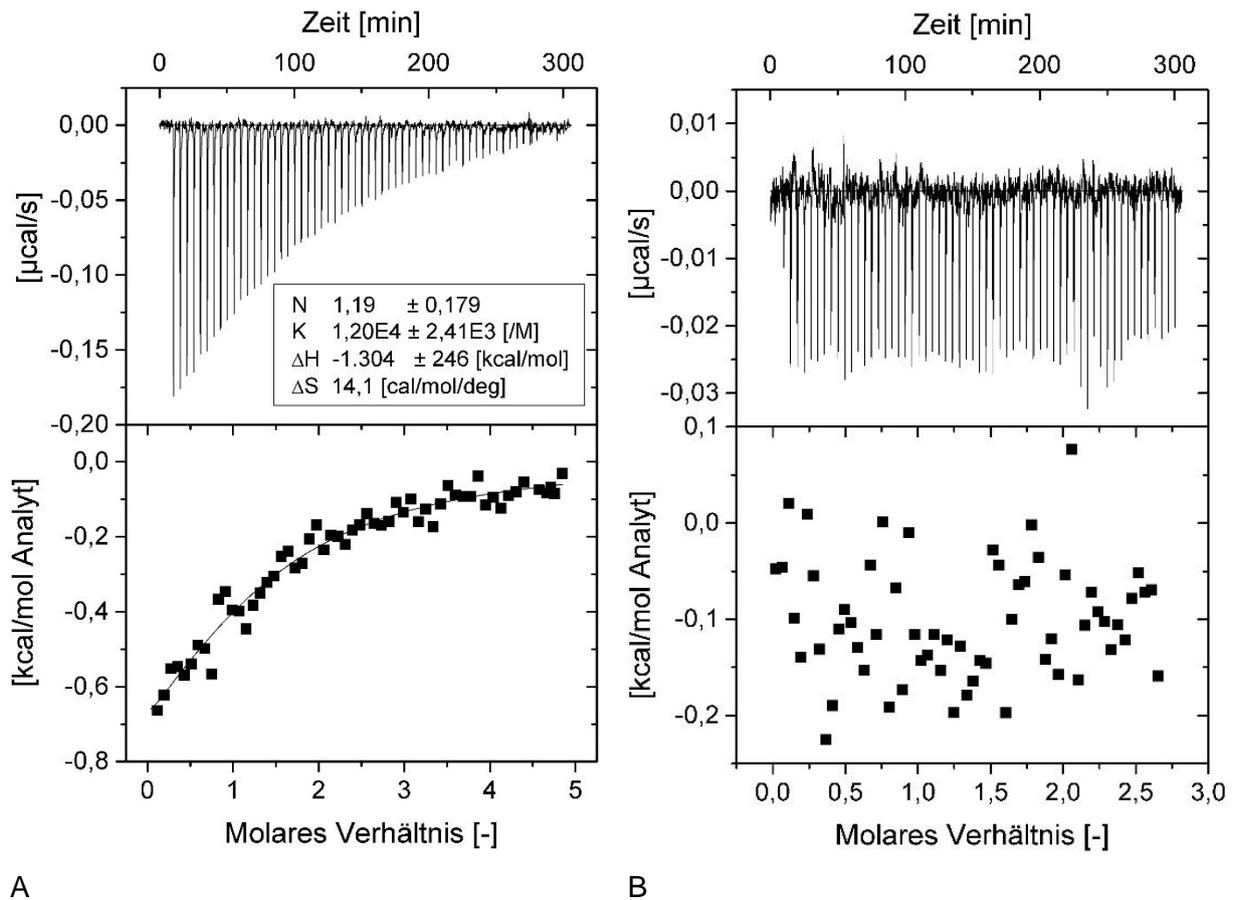


Abb. 3.6 Untersuchung der GDP bzw. GDPM-Wechselwirkung mit der His₆-SUMO-Dpm1 mittels ITC. Die Proteinkonzentration in der Messzelle betrug 72 μM . Die Ligandenkonzentration von GDPM bzw. GDP betrug jeweils 2 mM in der Titrationspritze. In A wurde GDPM als Ligand eingesetzt und in B GDP. Der obere Teil der Grafiken A und B beinhaltet die Rohdaten der ITC-Messung (Änderung der Energie über die Zeit). Im unteren Teil der Grafiken sind die integrierten Energiemengen der Rohdaten gegen das jeweilige molare Ligand-Protein-Verhältnis aufgetragen (Sekundärauftragung). Die durchgehende Linie in der Sekundärauftragung von A repräsentiert die Isotherme nach Anpassung der Daten an das *one set of sites* Modell der MicroCal Origin Software. Die Probenvorbereitung, die Durchführung der Messung und die Auswertung werden in 2.2.5.7 beschrieben.

Mit diesem Versuch sollte die Wechselwirkung von GDPM und GDP mit der His₆-SUMO-Dpm1 erstmals mittels ITC untersucht werden. In Abb. 3.6 A und B werden die ITC-Daten der GDPM- bzw. GDP-Titration gegenübergestellt. Die negativen Energiewerte der Rohdaten in A weisen auf eine exotherme Wechselwirkung hin, bei der Wärme freigesetzt wird. Es wird eine Bindung von einem GDPM-Molekül pro His₆-SUMO-Dpm1-Protein angenommen. Nach der Sekundärauftragung der integrierten Energiemengen gegen das molare Ligand-Protein-Verhältnis, wurden die Daten an das Modell *one set of sites* angepasst (2.2.5.7). Aus dieser Anpassung konnte für die Stöchiometrie von gebundenen GDPM-Molekülen pro His₆-SUMO-Dpm1 Protein ein Wert von $\sim 1,2 \pm 0,2$ ermittelt werden. Die Enthalpie ΔH wurde mit einem Wert von $1.304 \pm 246 \text{ kcal mol}^{-1}$ und die Entropie ΔS mit einem Wert von $14 \text{ cal (mol } ^\circ)^{-1}$ bestimmt. Die Bindung kann mit einer Bindungskonstante K_D von $83 \pm 17 \mu\text{M}$ beschrieben werden.

Im Gegensatz zu den GDPM-Daten wurden für GDP keine Daten im Primärplot erhalten, die einem klassischen Bindungsereignis zwischen Ligand und Protein zuzuordnen sind (Abb. 3.6 B). Eine zu erwartende deutliche Änderung der Peakflächen in Abhängigkeit von der Zeit ist nicht zu erkennen. Der Sekundärplot lässt aufgrund der Streuung der Daten die Anpassung an ein klassisches Bindungsmodell nicht zu.

Im durchgeführten ITC-Experiment konnte erstmals die nicht-kovalente Bindung von GDPM an die His₆-SUMO-Dpm1 biophysikalisch charakterisiert werden. Das Nebenprodukt GDP wird dieser Analyse nach nicht gebunden. Die His₆-SUMO-Dpm1 ist – basierend auf diesem Ergebnis – für ITC-Messungen zugänglich.

3.5 Immobilisierung und Reaktion im *Batch*

Biotechnologisch eingesetzte Enzyme als industrielle Katalysatoren sind im Vergleich zu rein chemischen Katalysatoren relativ teuer. Der industrielle Nutzen von Enzymen kann durch die mehrfache Verwendung gesteigert werden [Mohamad *et al.*, 2015]. Neben der Wiederverwendbarkeit des Katalysators können die Kosten zur Produktaufarbeitung durch Immobilisierung des Enzyms verringert werden. Das in dieser Arbeit verwendete His₆-SUMO-Dpm1-Konstrukt konnte in 3.1 mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden. Um den Einsatz immobilisierter His₆-SUMO-Dpm1 (2.2.4.1) zur DoIPM-Produktion zu testen, wurde zunächst ein Experiment mit an STREAMLINE Chelating (GE) adsorbierter His₆-SUMO-Dpm1 durchgeführt.

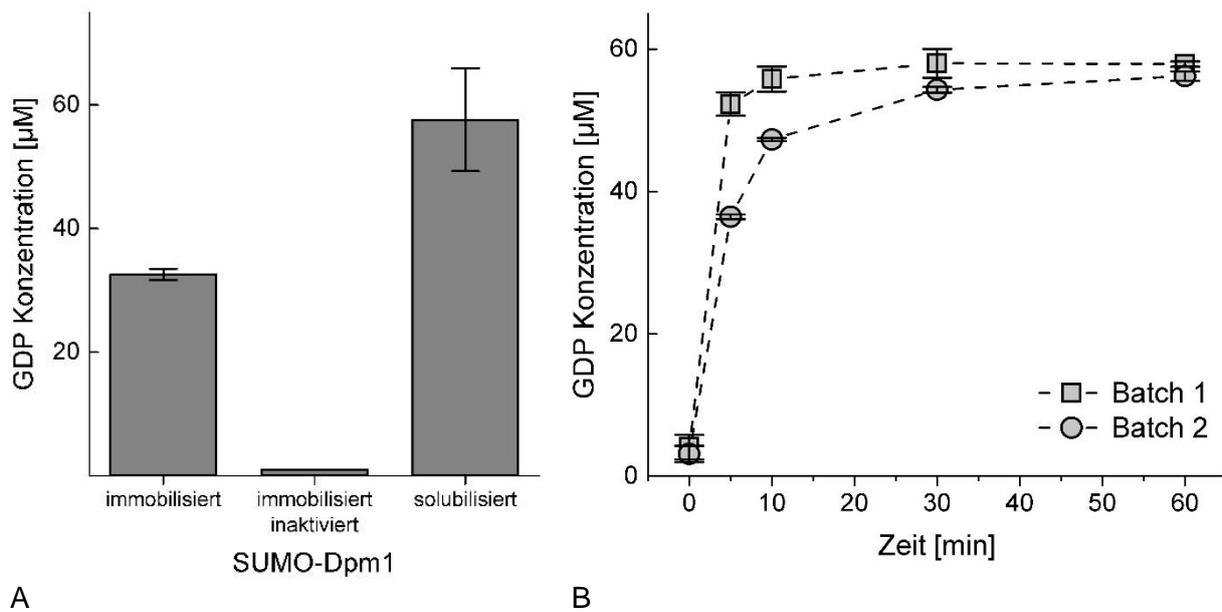


Abb. 3.7 Untersuchung der His₆-SUMO-Dpm1-Aktivität adsorbiert an STREAMLINE Chelating Affinitätschromatographiematerial. A - Vergleich der Aktivität von immobilisierter- und solubilisierter His₆-SUMO-Dpm1. Die Proteinkonzentration betrug jeweils ~12 µg mL⁻¹ im Reaktionsansatz. Die gebundene Proteinmenge des Affinitätschromatographiematerials betrug ~1 mg mL⁻¹ festes Material (2.2.4.1). ~25 µL Affinitätschromatographiematerial mit daran adsorbierter His₆-SUMO-Dpm1 wurden in einem Gesamtvolumen von 2 mL Reaktionsansatz eingesetzt. Die DolP- und GDP-Konzentration betragen jeweils 200 µM. Der Ansatz wurde regelmäßig invertiert. Die übrigen Reaktionsparameter entsprachen den Standardreaktionsbedingungen (2.2.5.3). Die Enzyminaktivierung wurde durch Inkubation bei 95 °C für 5 min und anschließender Inkubation auf Eis vor der Präinkubation zum Aktivitätsassay erreicht. Die Reaktionen wurden nach 10 min gestoppt. n = 2. B - Untersuchung der Reaktion von *Batch*-adsorbierter His₆-SUMO-Dpm1 in Abhängigkeit von der Zeit. Die Bedingungen für diesen Test sind identisch zu denen in A für immobilisierte His₆-SUMO-Dpm1. Vor der Probenentnahme wurde das STREAMLINE Chelating Affinitätschromatographiematerial durch Zentrifugation (10 s, Mikro-Zentrifuge, Roth) sedimentiert. Nach 1 h Reaktionszeit (Batch 1) wurde das STREAMLINE Chelating Affinitätschromatographiematerial mit Reaktionspuffer gewaschen und der Versuch wiederholt (Batch 2). 50 µL-Proben wurden dem Reaktionsansatz jeweils nach 0, 5, 10, 30 und 60 min entnommen und die Reaktion gestoppt. Die Trennung von GDP und GDP erfolgte nach 2.2.5.4.

Gleiche Proteinkonzentrationen immobilisierter - und nicht immobilisierter His₆-SUMO-Dpm1 wurden vergleichend auf Glycosyltransferaseaktivität untersucht (Abb. 3.7 A). Mit immobilisierter His₆-SUMO-Dpm1 wurden ~57 % der GDP-Konzentration im Vergleich zu solubilisierter His₆-SUMO-Dpm1 innerhalb von 10 min gebildet. Hitzeinaktiviertes Material zeigte nahezu keine nachweisbare GDP-Bildung. Nachdem die Dpm1-Aktivität für immobilisierte His₆-SUMO-Dpm1 gezeigt werden konnte, sollte nun versucht werden, die GDP-Bildung über die Zeit zu untersuchen (Abb. 3.7 B). Die Bildung von GDP scheint zwischen 0 und 60 min einem hyperbolischen Trend zu folgen (Batch 1 und 2). Der Versuch aus Abb. 3.7 B konnte nach dem Waschen des STREAMLINE Chelating Affinitätschromatographiematerials mit Reaktionspuffer wiederholt werden und zeigte einen geringfügig langsameren Verlauf der Produktbildung. Die Endkonzentration an GDP nach einer Stunde betrug in Batch 1 58 µM und in Batch 2 56 µM.

Auffallend im Vergleich der Experimente in A und B ist, dass die GDP-Konzentration bei gleichen Versuchsbedingungen in A nach 10 min rund 41 % (Batch 1) bzw. 31 % (Batch 2) geringer war als in B. Dies ist vermutlich mit der Handhabung des verwendeten STREAMLINE

Chelating Materials zu erklären. Es handelt sich hierbei um eine Suspension, die im verwendeten Maßstab von 25 μL nur bedingt volumetrisch exakt überführbar ist.

His₆-SUMO-Dpm1-Aktivität konnte im durchgeführten Experiment erstmals in immobilisierter Form nachgewiesen werden. Zwischen 0 und 60 min konnte eine Zunahme des Produktes GDP nachgewiesen werden, die einem hyperbolen Trend folgte. Die Reaktion im *Batch* konnte mit ähnlicher Produktkonzentration (ΔGDP -Konzentration $<3\%$) wiederholt werden.

3.6 Kontinuierliche DoIPM-Produktion und -Aufarbeitung

Katalysatoren gehen definitionsgemäß unverändert aus einer Reaktion hervor. Dennoch müssen sie vor dem nächsten Einsatz vom Reaktionsprodukt abgetrennt werden. Die in 3.5 gezeigte Immobilisierung der His₆-SUMO-Dpm1 an STREAMLINE Chelating Affinitätschromatographiematerial ermöglicht die einfache Trennung des Katalysators vom Reaktionsprodukt, z.B. mittels Zentrifugation und Abnahme des Überstands. DoIPM ist, wie eingangs (s. 1.1.2) beschrieben, der Mannosedonor in vier verschiedenen Stoffwechselwegen. Die Bereitstellung von Substrat ist die Grundlage für die kinetische Untersuchung der bislang nur wenig untersuchten DoIPM-abhängigen Enzyme.

Der bisherige Fokus der His₆-SUMO-Dpm1-Untersuchungen in dieser Arbeit lag auf dem GDP-Nachweis. Daher sollten in diesem Abschnitt die kontinuierliche DoIPM-Synthese und die Produktaufarbeitung (2.2.5.6) untersucht werden.

3.6.1 Kontinuierliche His₆-SUMO-Dpm1-Reaktion

Die Katalyse im *Batch*-Verfahren (3.5) führte zur Bildung eines heterogenen Gemisches von Katalysator, Produkt und nicht umgesetztem Edukt. Produkte der His₆-SUMO-Dpm1-Reaktion könnten die Produktbildungsrate durch Inhibition der Glycosyltransferaseaktivität verringern. Für GDP ist dies unwahrscheinlich, da GDP nicht an die His₆-SUMO-Dpm1 bindet (s. 3.4). Für das Hauptprodukt DoIPM kann eine Inhibition der His₆-SUMO-Dpm1 dagegen nicht ausgeschlossen werden.

In einem kontinuierlichen Katalyseverfahren strömt Substrat am Katalysator vorbei, und gleichzeitig wird gebildetes Produkt kontinuierlich entfernt. Vorteil dieses Verfahrens ist, dass der Prozess nicht mehr durch den Trennungsschritt von Katalysator und Produkt unterbrochen werden muss. Neben der höheren Wirtschaftlichkeit bietet das Verfahren auch die Möglichkeit, beispielsweise artifizielle Substrate analytisch in kurzer Zeit ohne Abtrennung bzw. Verlust des Katalysators testen zu können. STREAMLINE Chelating adsorbierte His₆-SUMO-Dpm1 (2.2.4.1) soll im folgenden Versuch zur kontinuierlichen DoIPM-Synthese eingesetzt werden. Zu diesem Zweck wurden 0,5 mL an STREAMLINE Chelating adsorbierte His₆-SUMO-Dpm1 (~ 1 mg Protein mL^{-1} Affinitätsmaterial) in eine Spritze mit Fritte gegeben. Substratlösung wurde kontinuierlich aus einem Reservoir

zugeführt und Fraktionen nach dem Passieren des Katalysators auf GDP-Bildung überprüft (Abb. 3.8).

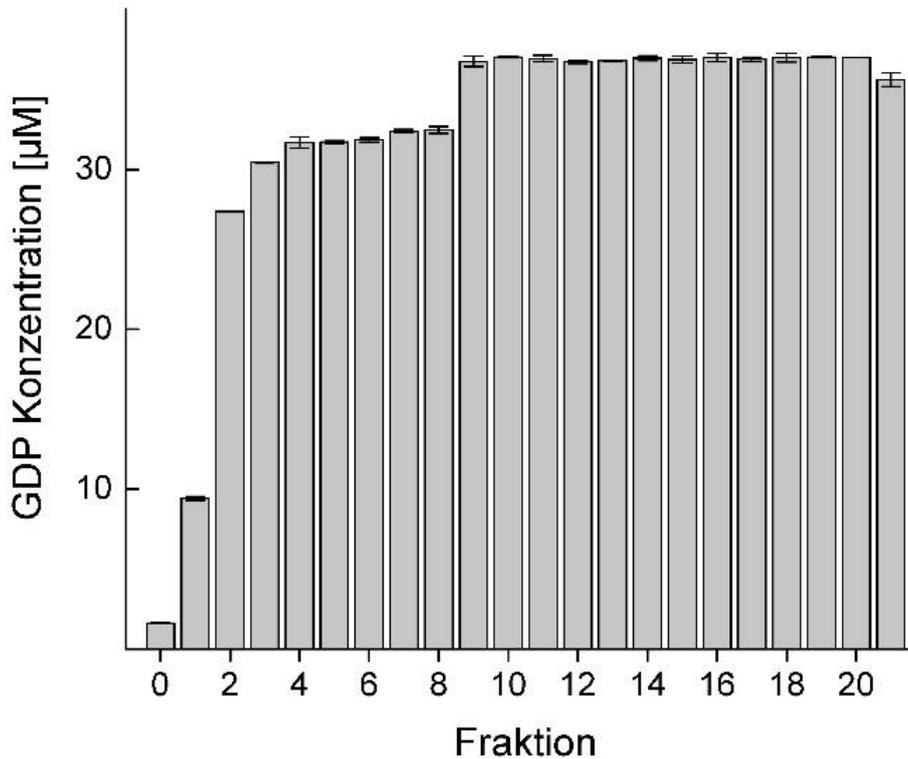


Abb. 3.8 Kontinuierliche His₆-SUMO-Dpm1-Reaktion. Repräsentative Analyse von Produktfraktionen nach Passage von an STREAMLINE Chelating Affinitätschromatographiematerial adsorbierter His₆-SUMO-Dpm1. Die Proteinkonzentration betrug $\sim 1 \text{ mg mL}^{-1}$ Affinitätschromatographiematerial. 500 μL Affinitätschromatographiematerial wurden eingesetzt. Die DolP-Konzentration betrug 200 μM und die GDPM-Konzentration der Substratlösung ($V = 21 \text{ mL}$) betrug 400 μM . Die Flussgeschwindigkeit betrug $0,1 \text{ mL min}^{-1}$. Die Reaktion wurde bei RT durchgeführt. 1 mL Fraktionen wurden aufgefangen, jeweils 50 μL Probe entnommen und mittels HPLC (2.2.5.4) auf GDPM- und GDP-Gehalt untersucht. Die bestimmte GDP-Konzentration wurde gegen die Fraktionsnummer aufgetragen. $n = 2$.

Mit Hilfe der beschriebenen HPLC-Methode konnte GDP in den getesteten 1 mL Produktfraktionen nachgewiesen werden (Abb. 3.8). In der ersten getesteten Fraktion („0“) befand sich überwiegend Substrat-freier Puffer vom Äquilibrieren der Säule mit Reaktionspuffer. In den anschließend analysierten Fraktionen kann eine signifikante Zunahme der GDP-Konzentration bis zur Einstellung einer gleichbleibenden Konzentration von $\sim 38 \mu\text{M}$ ab Fraktion 9 beobachtet werden. Dieses Ergebnis legt den Schluss nah, dass die His₆-SUMO-Dpm1 auch im kontinuierlichen Katalyseprozess funktioniert. Die Kontrollreaktion, mit STREAMLINE Chelating Material ohne immobilisiertes Enzym, führte zu keiner GDP-Bildung. Das Experiment wurde auch mit einer Flussrate von $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ (statt $0,1 \text{ mL min}^{-1}$) und unterschiedlichen Mengen an Substratlösung (10-61 mL) durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

Mittels SDS-PAGE-Analyse ausgewählter Produktfraktionen sowohl des *Batch*- (s. 3.5) als auch des kontinuierlichen Reaktionsverfahrens konnten keine proteinogenen Verunreinigungen nach Abtrennung des Katalysators nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Unter

den gewählten Reaktionsbedingungen wird die His₆-SUMO-Dpm1 nicht vom Affinitätschromatographiematerial ausgewaschen.

Mit dem vorgestellten Verfahren zur kontinuierlichen His₆-SUMO-Dpm1-Reaktion stellte sich nach initialer GDP-Konzentrationszunahme in den getesteten Fraktionen eine gleichbleibende GDP-Konzentration ein. Es konnten keine proteinogenen Verunreinigungen der Produktfraktionen nachgewiesen werden.

3.6.2 Produkt-Aufarbeitung

Die kontinuierliche Anwendung immobilisierter His₆-SUMO-Dpm1 konnte in 3.6.1 erstmals gezeigt werden. Bis zu 61 mL Reaktionsvolumen mit durchschnittlich ~38 μM GDP-Produktkonzentration wurden hergestellt. Unter der Annahme einer 1:1 Stöchiometrie von Edukten zu Produkten wie in Abb. 1.2 (S. 6) gezeigt, lägen im Reaktionsansatz entsprechend ~38 μM DolPM-Produkt vor. Das Reaktionsprodukt DolPM sollte im Reaktionsansatz direkt nachgewiesen werden.

Ein initialer Versuch zum DolPM-Nachweis mittels ESI-MS schlug nach vorheriger Konzentrierung der Probe mittels Rotationsverdampfers fehl (Daten nicht gezeigt). Die Analyse wurde maßgeblich durch das enthaltene Detergenz IGEPAL[®] CA-630 gestört. IGEPAL[®] CA-630 unterliegt, ebenso wie Dolichol, einer Kettenlängenverteilung, die sich in der unterschiedlichen Anzahl an Ethoxygruppen (ΔMW 44 Da, s. 10.9, S. 91) zeigt. Das massenspektrometrische Signal des Produktes DolPM wurde durch das IGEPAL[®] CA-630 Signal überlagert. Mit 0,25 % (v/v) bzw. ~4,4 mM (Annahmen: MW 603 g mol⁻¹, ρ 1,06 g mL⁻¹ nach Herstellerangaben für IGEPAL[®] CA-630) liegt das Detergenz im Vergleich zu möglichen ~38 μM DolPM in 116-fachem Überschuss vor und besitzt andere Ionisierungseigenschaften.

Die Abtrennung des Detergenz vor der massenspektrometrischen Untersuchung sollte die DolPM-Detektion ermöglichen (2.2.5.6 und Abb. 2.3, S. 37). Zu diesem Zweck sollte eine von Wilson und Kollegen 1993 beschriebene Chromatographie verwendet werden, die auf MeOH als Laufmittel basiert [Wilson *et al.*, 1993]. Bei der sukzessiven Zugabe von MeOH zum konzentrierten, wässrigen Reaktionsansatz (66 % (v/v) MeOH), konnte eine Präzipitation von DolPM beobachtet werden (Details s. Abb. 10.8, S. 91). Das Präzipitat konnte mittels Zentrifugation und anschließender Entnahme des Überstandes abgetrennt werden. Das Präzipitat wurde mit MeOH gewaschen und anschließend getrocknet. Mittels analytischer TLC konnte kein IGEPAL[®] CA-630 in der Produktfraktion erkannt werden (Abb. 10.8).

Der R_F-Wert von DolPM ist aus der Kontrollreaktion bei der Etablierung des His₆-SUMO-Dpm1-Aktivitätstest mittels TLC und anschließender Autoradiographie (Abb. 10.4, S. 88) bekannt. Aus diesem Grund wurde zur vollständigen Abtrennung des Detergenz vor der massenspektrometrischen Untersuchung eine präparative TLC durchgeführt (Abb. 3.9).

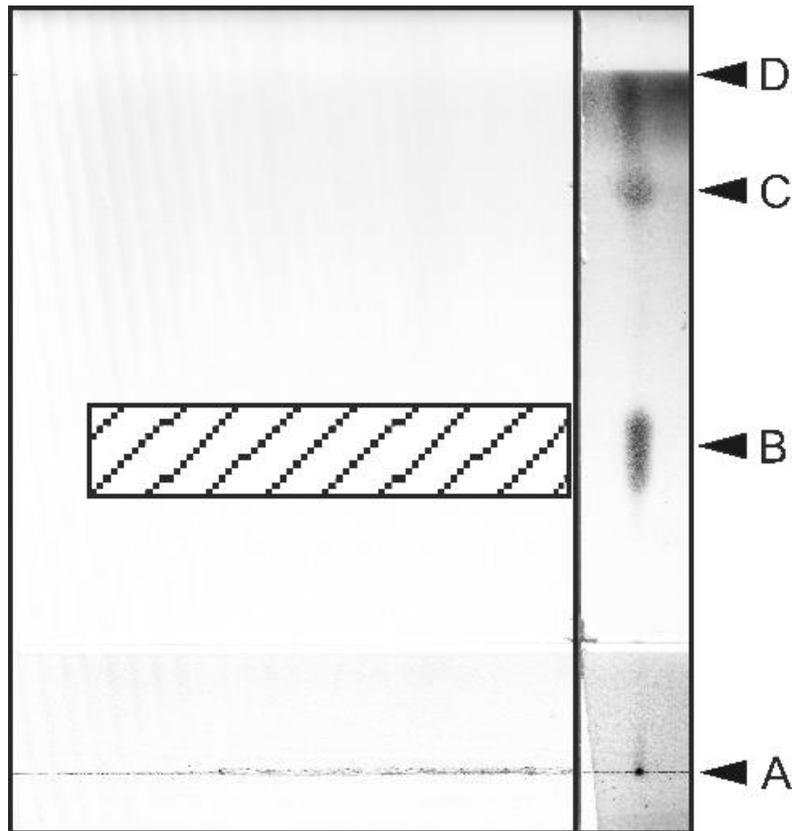


Abb. 3.9 His₆-SUMO-Dpm1-Produktaufarbeitung. Mit MeOH-gewaschenes, getrocknetes und in CHCl₃ gelöstes Präzipitat nach kontinuierlicher His₆-SUMO-Dpm1-Reaktion wurde mittels präparativer Dünnschichtchromatographie (TLC) gereinigt (2.2.5.6). Der rechte Teil der TLC-Platte wurde nach der Trennung und Trocknung der Platte abgetrennt und mit CER-Reagenz gefärbt. Das Silikamaterial im Inneren des schraffierten Bereichs wurde entfernt und die enthaltene Substanz mit verschiedenen Lösungsmitteln über eine Fritte eluiert. Markierungszuordnung: A - TLC-Laufstreckenstart, B - DoIPM (R_f-Wert ~0,46), C - IGEPAL[®] CA-630 (R_f-Wert ~0,83), D - TLC-Laufstreckenende.

Das Produktsignal (DoIPM, Markierung B) und das Signal von IGEPAL[®] CA-630 (Markierung C) unterschieden sich ausreichend, um eine klare Abtrennung der beiden Substanzen voneinander zu gewährleisten (Referenzen s. Abb. 10.8, S. 91). Der markierte Bereich in Abb. 3.9 wurde von der TLC-Platte entfernt, das Kieselgelmaterial zerkleinert und die enthaltene Substanz mit verschiedenen Lösungsmittelgemischen (2.2.5.6) eluiert. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingengt und stand nun für die weitere Analyse frei von Detergenz zur Verfügung.

Das verwendete Detergenz IGEPAL[®] CA-630 stellte sich als Störfaktor bei der massenspektrometrischen Analyse des His₆-SUMO-Dpm1-Reaktionsprodukts heraus. DoIPM ließ sich mittels MeOH-Zugabe präzipitieren. Die Abtrennung des Detergenz konnte durch das Waschen des Präzipitats mit 66 % (v/v) kaltem MeOH und präparative TLC erreicht werden.

3.7 DoIPM-Produktnachweis

Der indirekte Nachweis der His₆-SUMO-Dpm1-Aktivität über das Nebenprodukt GDP wurde in den Experimenten 3.2, 3.3, 3.5 und 3.6 verwendet. Gebildetes DoIPM konnte mittels Autoradiographie (Abb. 10.4, S. 88) nachgewiesen werden. Für den Lipidanker PhytP und das His₆-SUMO-Dpm1-Produkt PhytPM konnten LC-ESI-MS-Daten erhalten werden. Die abschließende DoIPM-Produktion konnte mangels DoIPM-Referenz mittels TLC nicht eindeutig erbracht werden. In diesem Kapitel sollte nun gereinigtes DoIPM (3.6.2) und DoIP-Referenz mittels ESI-MS und parallel indirekt nach milder saurer Hydrolyse mittels TLC nachgewiesen werden.

3.7.1 Nachweis von DoIPM mittels ESI-MS

Die molekulare Masse einer Substanz mit bekannter Molekülstruktur kann *in silico* berechnet werden. Eine Substanz kann anhand ihrer Molekularmasse massenspektrometrisch in einem Substanzgemisch identifiziert werden. Diese Herangehensweise bietet sich an, wenn die Zusammensetzung des Stoffgemisches wie im vorliegenden Fall bekannt ist. Nach 3.6.2 aufgearbeitetes Reaktionsprodukt DoIPM und DoIP-Referenzsubstanz wurden nach Abtrennung von IGEPAL[®] CA-630 mittels ESI-MS analysiert. Die erhaltenen Massenspektren sind in Abb. 3.10 wiedergegeben.

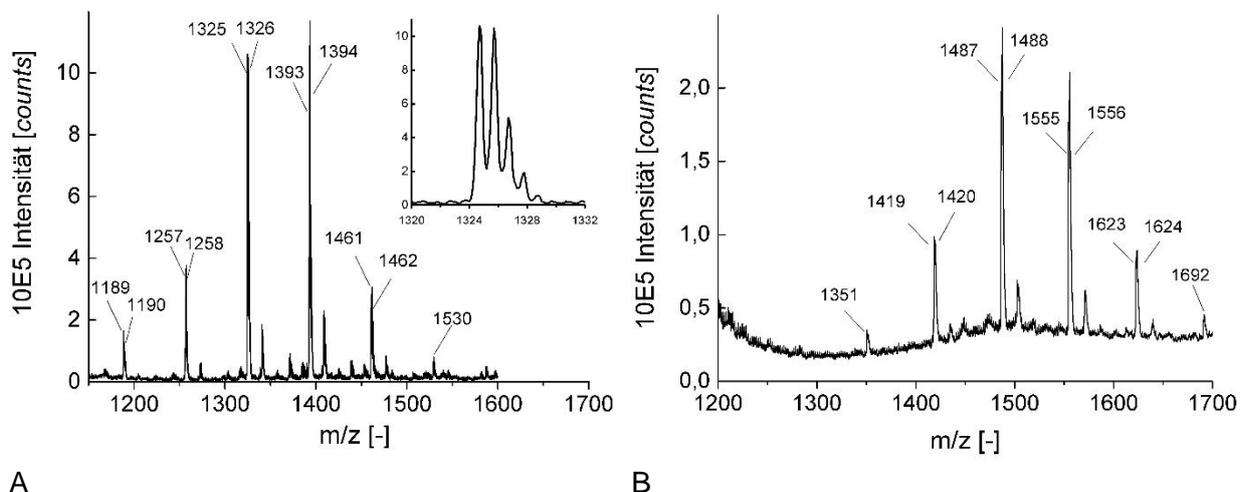


Abb. 3.10 ESI-MS Analyse von DoIP und DoIPM. A - DoIP-Referenzmassenspektrum. Einschub: Repräsentativer Ausschnitt des Spektrums von C₉₀ DoIP zwischen m/z 1320 und 1332. B - DoIPM-Spektrum nach Aufarbeitung und Detergenz-Abtrennung (3.6.2). ESI-MS-Daten wurden wie in 2.2.5.6 beschrieben erhalten. Die Spektren wurden durch PD Dr. Gerd Balcke aufgenommen.

Das DoIP-Referenzspektrum ist in Abb. 3.10 A dargestellt. Die Zuordnung der Massensignale zu den jeweiligen Molekülspezies erfolgt in Tab. 3.1. Es wurden Moleküle mit einer Dolichylkettenlänge von 16-21 Isopreneinheiten (monoisotopisch m/z 1188-1528) erkannt. Die höchsten Intensitäten wurden für die Molekülspezies mit 18 und 19 Isopreneinheiten erhalten.

Das Spektrum für das gereinigte His₆-SUMO-Dpm1-Reaktionsprodukt DoIPM ist in Abb. 3.10 B gezeigt. Es ist zu erkennen, dass durch die Massenaddition von 162 Da zu der jeweiligen DoIP-Molekülspezies, die zugehörige DoIPM-Molekülspezies erhalten wird. Dies entspricht der Kondensationsreaktion eines Mannosemoleküls an die Phosphatgruppe von DoIP. Mit dieser Analyse kann die DoIPM-Bildung eindeutig nachgewiesen werden.

Eine wichtige Beobachtung kann im Vergleich der Spektren von DoIP und DoIPM gemacht werden. Es können keine DoIP-spezifischen Massensignale im DoIPM-Spektrum erkannt werden. Dies kann die unvollständige Umsetzung von GDPM zu GDP (s. Abb. 3.7 B bzw. Abb. 3.8) erklären, da die Reaktion in Bezug auf die DoIP-Umsetzung scheinbar vollständig abläuft. Die DoIPM-Präparation zeigt wenige abundante, nicht zuordenbare Massensignale was für eine hohe Reinheit der Substanz spricht. An dieser Stelle soll darauf verwiesen werden, dass die monoisotopischen Molekülspezies (nur ¹²C) nicht nachgewiesen wurden und stattdessen die Isotopomere mit einem oder zwei ¹³C-Atomen gefunden wurden. Verdeutlicht wird dies im vergrößerten Ausschnitt der Abb. 3.10 A zwischen m/z 1320 und 1332.

Tab. 3.1 DoIP- und DoIPM-Molekülmassen. Alle gefundenen Massen wurden als [M-H⁺]⁻ Ionenspezies detektiert. n - Anzahl der Isopreneinheiten des Moleküls. In Klammern gesetzte Molekülmassen konnten im Spektrum nicht signifikant erkannt werden.

Substanz	Summenformel	n	mono-isotopische Masse	1 × ¹³ C Isotopomer	2 × ¹³ C Isotopomer
DoIP	C ₈₀ H ₁₃₃ O ₄ P ₁	16	(1188)	1189	1190
	C ₈₅ H ₁₄₁ O ₄ P ₁	17	(1256)	1257	1258
	C ₉₀ H ₁₄₉ O ₄ P ₁	18	(1324)	1325	1326
	C ₉₅ H ₁₅₇ O ₄ P ₁	19	(1392)	1393	1394
	C ₁₀₀ H ₁₆₅ O ₄ P ₁	20	(1460)	1461	1462
	C ₁₀₅ H ₁₇₃ O ₄ P ₁	21	(1528)	(1529)	1530
DoIPM	C ₈₆ H ₁₄₃ O ₉ P ₁	16	(1350)	1351	1352
	C ₉₁ H ₁₅₁ O ₉ P ₁	17	(1418)	1419	1420
	C ₉₆ H ₁₅₉ O ₉ P ₁	18	(1486)	1487	1488
	C ₁₀₁ H ₁₆₇ O ₉ P ₁	19	(1554)	1555	1556
	C ₁₀₆ H ₁₇₅ O ₉ P ₁	20	(1622)	1623	1624
	C ₁₁₁ H ₁₈₃ O ₉ P ₁	21	(1690)	(1691)	1692

Gravimetrisch konnte eine Masse von 4,2 mg gereinigten DoIPM ausgehend von 10 mg eingesetztem DoIP erhalten werden. Dies entspricht – bezogen auf eine Dolicholspezies mit 18 Isopreneinheiten (DoIP₁₈P: [M-H⁺]⁻ 1325 bzw. DoIP₁₈PM: [M-H⁺]⁻ 1486) – einer molaren Ausbeute von 37 %. Ausgehend von Flussgeschwindigkeiten von 0,1-0,3 mL min⁻¹ konnten ~0,8-2,5 mg DoIPM pro h und mg His₆-SUMO-Dpm1 erzielt werden.

3.7.2 Nachweis von DoIP nach milder saurer Hydrolyse von DoIPM

Glykane werden zur Identifizierung häufig durch milde saure Hydrolyse von Phosphaten abgespalten, um sie anschließend mit fluoreszierenden Markern kovalent zu markieren. Der Nachweis erfolgt dann mittels Kapillargelelektrophorese oder (LC)-MS. Durch die milde

saure Hydrolyse von DoIPM würde man DoIP zurückerhalten. Als unabhängige Methode zum ESI-MS Verfahren soll DoIPM indirekt im Vergleich mit der existierenden DoIP-Referenz nachgewiesen werden (Abb. 3.11).

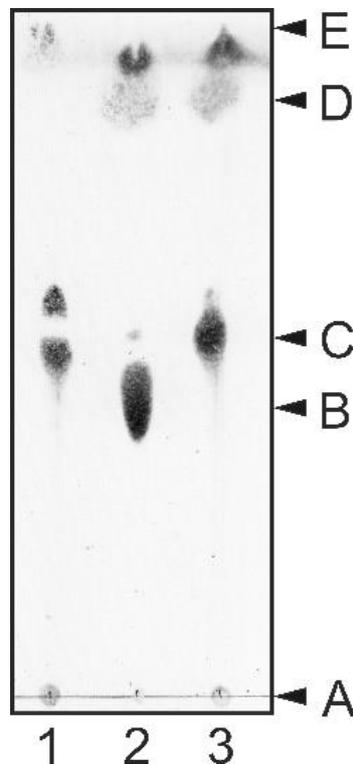


Abb. 3.11 Milde saure Hydrolyse von DoIPM. Laufspur 1: DoIP-Referenz (R_f -Wert $\sim 0,54$), Laufspur 2: DoIPM (R_f -Wert $\sim 0,43$) nach kontinuierlicher Produktion (3.6.1). Laufspur 3: DoIPM-Probe nach milder saurer Hydrolyse. Markierungszuordnung: A - TLC-Laufstreckenstart, B - DoIPM, C - DoIP, D - IGEPAL[®] CA-630 (R_f -Wert $\sim 0,89$) und E - TLC-Laufstreckenende. Die milde saure Hydrolyse erfolgte nach Zusatz von 20 mM HCl und einer Inkubation bei 100 °C für 0,5 h. Nach dem Abkühlen des Ansatzes auf RT erfolgte die Neutralisierung des Ansatzes durch Einstellung einer 20 mM NaOH-Konzentration. Die TLC-Analyse wurde wie beschrieben durchgeführt (2.2.5.5).

Das Dreieck B in Abb. 3.11 zeigt das Reaktionsprodukt DoIPM mit einem R_f -Wert von $\sim 0,43$ in Laufspur 2. Die in Laufspur 1 aufgetragene DoIP-Referenz besitzt einen R_f -Wert von $\sim 0,54$ (Dreieck C) und migriert somit weiter als DoIP. DoIPM ist aufgrund der zusätzlichen Mannose hydrophiler als DoIP. Nach der milden sauren Hydrolyse der Mannosegruppe kann in Laufspur 3 der Ausgangsstoff DoIP identifiziert werden. Die DoIP-Referenz in Laufspur 1 zeigt voneinander getrennte Signale. Diese Beobachtung ist vermutlich mit den auftretenden Oxidationsprozessen während der langen Lagerung zu erklären.

Mittels milder saurer Hydrolyse von DoIPM wird das Edukt DoIP erhalten. Diese Beobachtung bestätigt indirekt die DoIPM-Bildung bei der His₆-SUMO-Dpm1-Reaktion.

4 Diskussion

Die Versuche in 3.1-3.4 haben sich mit der Untersuchung der His₆-SUMO-Dpm1 auseinandergesetzt. Die Abschnitte 3.5-3.7 behandeln die Produktion und den Nachweis von Dolichylphosphat-Mannose (DoIPM). Im folgenden Abschnitt sollen die experimentellen Ergebnisse und verwendeten Methoden bewertet und in den Kontext veröffentlichter Literaturdaten eingeordnet werden.

4.1 His₆-SUMO-Dpm1 Proteinproduktion

Eine der gängigsten Methoden zur Steigerung der Ausbeute rekombinanter Membranproteine [Su *et al.*, 2013] und zur Verringerung der benötigten Präparationszeit [Asher und Bren, 2014] ist die Proteinfusion. In dieser Arbeit wurde der SUMO-*tag* als Fusionspartner der Dpm1 gewählt. Der SUMO-*tag* kann durch die SUMO-Protease überhanglos entfernt werden und die Proteinproduktion erhöhen [Marblestone *et al.*, 2006]. In Kombination mit dem *N*-terminalen Hexahistidin-*tag* wird die Möglichkeit zur Affinitätsreinigung des Fusionskonstruktes gegeben.

Die Reinigung von Membranproteinen ist in den meisten Fällen an den Einsatz von Detergenzien zur Solubilisierung gebunden. Die bisher zur Reinigung der Dpm1 aus *S. cerevisiae* verwendeten Hydroxylapatit-Chromatographiematerialien [Banerjee *et al.*, 2005; Lamani *et al.*, 2006; Schutzbach *et al.*, 1993; Xing *et al.*, 2000] können nicht in Gegenwart ionischer Detergenzien genutzt werden [Hunte *et al.*, 2003]. Viele Affinitätsmatrizes dagegen sind gegenüber ionischen und nicht-ionischen Detergenzien bis zu 2 % (v/v) stabil.

Da Membranproteine zur Aggregation neigen, wird die Leistungsfähigkeit aller Reinigungstechniken reduziert. Die Aggregation kann durch die Verwendung eines geeigneten solubilisierenden, nicht denaturierenden Agens verringert werden [Hunte *et al.*, 2003]. Während der His₆-SUMO-Dpm1-Solubilisierung konnte festgestellt werden, dass durch das verwendete nicht-ionische Detergenz IGEPAL[®] CA-630 (vorher: Nonidet P-40 [Schutzbach *et al.*, 1993]) nach einmaliger Wiederholung des Solubilisierungsvorgangs keine vollständige Überführung des Proteins in den Überstand erreicht werden konnte (Abb. 3.1, S. 41, Laufspur 6).

Der Test ionischer Detergenzien wie SDS, CHAPS oder CTAB mit hoher Solubilisierungseffizienz erhöht möglicherweise die Ausbeute an Zielprotein. Mit dem verwendeten Fusionskonstrukt wurde zum einen die affinitätschromatographische Reinigung des Zielproteins ermöglicht. Zum anderen können nun auch ionische Detergenzien zur Solubilisierung eingesetzt werden.

Der Einsatz von nativer Dpm1 bzw. die Verwendung mikrosomaler Fraktionen [Sprung *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 1993] haben gegenüber der Verwendung von Fusionskonstrukten den Vorteil, dass kein Einfluss eines eingebrachten *tags* beachtet werden muss. Die Präparation der Wildtyp (WT) Dpm1 mittels Ionenaustauschchromatographie oder Gelfiltration kann im Gegensatz zur Affinitätschromatographie zwischen korrekt gefalteten und aufgrund unvollständiger Translation unterschiedlich großer Zielproteine diskriminieren [Aschenbrenner *et al.*, 2019]. Dies ist bei der Affinitätschromatographie mittels *N*-terminalem Hexahistidin-*tags* nicht zwangsläufig der Fall, sodass nicht monodisperse Proteinpräparationen auftreten können.

Als alternatives - oder zusätzliches (Tandem-)Affinitätsepitop könnte der 1D4 *tag* aus dem C-Terminus des bovinen Rhodopsins in Betracht gezogen werden. Dieser zeichnet sich bei der Membranproteinreinigung in Gegenwart milder Detergenzien durch die stabile Bindung des 1D4-Epitops an den zur Reinigung eingesetzten Rho 1D4 Antikörper aus. Die Elution des Zielproteins kann unter nicht-denaturierenden Bedingungen erfolgen [Molday und Molday, 2014]. Wild und Kollegen konnten beispielsweise mit dem 1D4-System die Oligosaccharyltransferase (8 Untereinheiten) aus *S. cerevisiae* reinigen und strukturell charakterisieren [Wild *et al.*, 2018].

Mit der beschriebenen His₆-SUMO-Dpm1-Präparation konnten spezifische Aktivitäten von ~6,0 $\mu\text{mol (min mg)}^{-1}$ Protein mit Dolichylphosphat (DoIP) und 6,4 $\mu\text{mol (min mg)}^{-1}$ Protein mit Phytanylphosphat (PhytP) erhalten werden. Schutzbach und Kollegen haben eine 37 % höhere spezifische Aktivität ihrer WT Dpm1-Präparation mit DoIP bei einer 22 % geringeren Gesamtausbeute an Protein als die hier erzielten 13,9 mg L⁻¹ Zellkultur in Schüttelkolbenkultivierung erreicht [Schutzbach *et al.*, 1993]. Mittels *Batch*-Fermentation konnte die Biomasseproduktion auf 20,3 g BFM L⁻¹ Zellkultur und die entsprechende Proteinausbeute auf 110 mg reine His₆-SUMO-Dpm1 L⁻¹ Zellkultur gesteigert werden. Dieser Wert liegt über den für eukaryotische Membranproteine üblichen Proteinausbeuten von 0,8 (AtPTR1 [Parker und Newstead, 2014]), 1-10 (hAQP1 [Su *et al.*, 2013]) oder 90 mg L⁻¹ Zellkultur (hAQP1 [Nyblom *et al.*, 2007]).

Es konnte erstmalig die erfolgreiche Reinigung eines Fusionskonstruktes der His₆-SUMO-Dpm1 aus *S. cerevisiae* mittels Affinitätschromatographie gezeigt und mit diesem Verfahren ausreichende Proteinmengen für die weitere Untersuchung bereitgestellt werden.

4.2 Assay-Entwicklung und Enzymkinetik

Die in 3.1 beschriebene Proteinproduktion stellt die Grundlage für die DoIPM-Synthese *in vitro* und für die intensive Untersuchung der kinetischen Eigenschaften des His₆-SUMO-Dpm1-Proteins aus *S. cerevisiae* dar. Laut CAZY Datenbank [Lombard *et al.*, 2014] gehören die Dpm1 aus dem Menschen, *Pyrococcus horikoshii* OT3 und *S. cerevisiae* zur Glycosyltransferase-Familie 2 (GT-A 3D Strukturstatus, EC 2.4.1.83). Die Übertragung der

gewonnen kinetischen Erkenntnisse des His₆-SUMO-Dpm1-Modellproteins könnten daher einen Beitrag zum Verständnis der humanen - und der bakteriellen Dpm1 Homologe leisten. Bei Untersuchungen im Krankheitsbild der *congenital disorders of glycosylation 1e* wurden veränderte kinetische Parameter für die humane Dpm1 nachgewiesen [Kim *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2013b]. Diese Veränderungen sind auf Mutationen innerhalb des Enzyms zurückgeführt worden. Mit Hilfe der His₆-SUMO-Dpm1 könnten kinetische *in vitro* Assays mit den gleichen Mutationen durchgeführt werden.

Ein Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien sind Lipopolysaccharide. Die Monomere dieser Lipopolysaccharide werden durch Glycosyltransferasen bereitgestellt. Sprung *et al.* haben postuliert, dass die grundlegende Untersuchung Polyisoprenoid-abhängiger Glycosyltransferasen zur Identifikation neuartiger, antibiotisch wirkender Agenzien führen könnte [Sprung *et al.*, 2002]. Die Grundlage für all diese Untersuchungen ist ein verlässlicher Aktivitätstest.

Der in dieser Arbeit entwickelte Assay (3.2) zur Messung der His₆-SUMO-Dpm1-Aktivität basiert auf der chromatographischen Trennung von GDP-Mannose (GDPM) und GDP mittels *high performance liquid chromatography* (HPLC). Dieser Aktivitätstest ist – wie die in der Literatur beschriebenen Methoden – diskontinuierlich. Ein Vorteil der hier entwickelten Methode besteht darin, dass keine radioaktiven Markierungen verwendet werden müssen. Ein potenzielles Verfahren zur markierungsfreien und kontinuierlichen Messung der His₆-SUMO-Dpm1-Aktivität wird in 4.3 diskutiert.

Die Aktivität der Dpm1 aus *S. cerevisiae* ist absolut abhängig von der Anwesenheit zweiwertiger Metallionen [Babczinski *et al.*, 1980]. In Gegenwart von 5 mM Mn²⁺ Ionen wurde in Mikrosomen aus Rattenlebergewebe die höchste Dpm1-Aktivität nachgewiesen. Der Zusatz von Mg²⁺ oder Co²⁺ gleicher Konzentration führte zu einer Verringerung der Aktivität um 10 bzw. 30 % [Jensen und Schutzbach, 1986]. Ein ähnlicher Trend wurde in *Acanthamoeba castellanii* Homogenaten (Dpm1-Aktivität: 100 % mit Mn²⁺, 70 % mit Co²⁺ und 15 % mit Mg²⁺, jeweils 1 mM) gefunden [Carlo und VILLEMEZ, 1979]. Für die Dpm1 aus *S. cerevisiae* ist lediglich bekannt, dass der Zusatz von Mg²⁺ oder Mn²⁺ (jeweils 5 mM) zu gleichen Aktivitäten führt [Babczinski *et al.*, 1980]. In der vorliegenden Untersuchung wurde mit 10 mM Mg²⁺ (Abb. 3.3 A und B, S. 46) für die verwendete His₆-SUMO-Dpm1 Variante die höchste Aktivität bestimmt.

Das schnellste initiale Wachstum von *S. cerevisiae* wurde zwischen T_{opt} 30 und 35 °C bestimmt [Walsh und Martin, 1977]. Schutzbach und Kollegen haben die optimale Aktivität der rekombinanten Dpm1 bei 25 °C bestimmt [Schutzbach *et al.*, 1993]. Die höchste spezifische Aktivität von ~4,7 µmol (min mg Protein)⁻¹ bei einer GDPM-Substratkonzentration von 100 µM wurde in der vorliegenden Arbeit bei 35 °C ermittelt und liegt somit im Temperaturbereich des schnellsten initialen Wachstums von *S. cerevisiae*. Der Unterschied

zur von Schutzbach bestimmten optimalen Temperatur von 25 °C kann möglicherweise mit stabilisierenden Effekten des SUMO-tags oder unterschiedlichen Substratpräparationen erklärt werden.

Neben dem Nukleotid-Substrat GDPM akzeptiert die Dpm1 aus *S. cerevisiae* keine anderen Nukleotidzucker. Die Spezifität für die Art und Struktur des Lipidankers ist dagegen geringer. Die Mannoseakzeptoren Phytanylphosphat (PhytP, 60-70 %), 3-Methyloctadecanylphosphat (~21 %) und S-Dihydrocitronellylphosphat (~2 %) wurden *in vitro* positiv auf Dpm1-Aktivität mit der jeweils angegebene Aktivität im Vergleich zu DoIP (100 %) getestet [Wilson *et al.*, 1993]. Bei Wilson und Kollegen wurden lediglich der Gesamtumsatz nach 1 h und nicht die kinetischen Parameter bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurden das natürliche Substrat DoIP und das artifizielle Substrat PhytP als Lipidanker untersucht. Die kinetischen Parameter werden in Tab. 4.1 den Literaturwerten gegenübergestellt. Mit PhytP als Lipidanker konnte ein V_{\max} -Wert von $6,4 \mu\text{mol} (\text{min mg})^{-1}$ bestimmt werden. Dieser Maximalumsatz ist 6,7 % größer als der für DoIP (Abb. 3.5, S. 48). Der K_m -Wert für GDPM in Gegenwart von DoIP beträgt $86 \mu\text{M}$. Mit einem 37 % kleineren K_m -Wert wird GDPM bei der Reaktion mit PhytP geringfügig fester gebunden.

Tab. 4.1 Kinetische Parameter der Dpm1 aus *S. cerevisiae*. ^a - aus *S. cerevisiae* Rohzelleextrakt solubilisiertes, partiell gereinigtes WT-Enzym. ^b - in *E. coli* rekombinant produziertes, gereinigtes WT-Enzym. ^c - apparenter K_m . ^d - nicht aufgelistet und graphisch aus Publikation bestimmt. DPM Δ 3: um 27 Aminosäuren C-terminal verkürzte Dpm1 Variante. His₆-SUMO-Dpm1: Dpm1-Variante aus der vorliegenden Arbeit. n - Anzahl der Isopreneinheiten. n.b. - nicht bestimmt. Datenursprung BRENDA (03.07.2019). In Spalte zwei wird das jeweilige Substrat der Zweisubstrat-Reaktion benannt, dessen Konzentration zur K_m -Wert-Bestimmung in Spalte drei variiert wurde.

Dpm1 Variante	Substrat	K_m [μM]	V_{\max} [$\mu\text{mol} (\text{min mg})^{-1}$]	Lipidphosphat	Ursprung
WT ^a	GDPM	7,0	n.b.	DoIP	[Babczinski <i>et al.</i> , 1980]
WT ^b	GDPM	1,2	n.b.	DoIP	[Banerjee <i>et al.</i> , 2005]
WT ^b	GDPM	1,5	n.b.	DoIP	[Schutzbach <i>et al.</i> , 1993]
DPM Δ 3 ^b	GDPM	30	n.b.	DoIP	[Schutzbach <i>et al.</i> , 1993]
His ₆ -SUMO-Dpm1 ^b	GDPM	$85,5 \pm 12,2$	$6,0 \pm 0,2$	DoIP n: 16-21	vorliegende Arbeit
	GDPM	$62,5 \pm 18,6$	$6,4 \pm 0,4$	PhytP	
WT ^b	DoIP	10,6	^d ~6	DoIP	[Schutzbach <i>et al.</i> , 1993]
DPM Δ 3 ^b	DoIP	45	n.b.	DoIP	[Schutzbach <i>et al.</i> , 1993]
WT ^b	DoIP	^c 75,1	n.b.	DoIP	[Lamani <i>et al.</i> , 2006]

Der Dpm1 K_m -Wert für DoIP wird in der Literatur zwischen ~10 und $75 \mu\text{M}$ angegeben (Tab. 4.1). Der K_m -Wert des Wildtyps (WT) für GDPM variiert in Abhängigkeit von der Enzympräparation und des verwendeten Lipidankers zwischen 1 und $7 \mu\text{M}$. Unklar ist, ob der Einfluss des verwendeten N-terminalen tags zur Verringerung der GDPM-Substrataffinität der His₆-SUMO-Dpm1 gegenüber dem WT führte. V_{\max} mit DoIP und PhytP wurde im Vergleich zum WT nicht beeinflusst.

Bei einer Dpm1-Variante (DPM Δ 3) aus *S. cerevisiae*, deren C-terminaler hydrophober Bereich im Vergleich zum WT deletiert ist (27 Aminosäuren verkürzt), wurde ein ähnlicher Effekt beobachtet. Der K_m -Wert des WTs für GDPM von 1,5 μ M war in der DPM Δ 3-Variante um das 20-fache erhöht (K_m für DolP um das >Vierfache, Tab. 4.1). Die spezifische Aktivität der DPM Δ 3-Variante war deutlich verringert [Schutzbach *et al.*, 1993]. Die verringerte GDPM-Affinität der DPM Δ 3-Variante wurde mit einer postulierten Proteinkonformationsänderung der Nukleotidzucker-Bindestelle erklärt.

An dieser Stelle muss auf die Kettenlängenverteilung von natürlichem Dolichol hingewiesen werden (Abb. 3.10, S. 57), das in dieser Arbeit verwendet wurde. Es handelt sich demnach nicht um eine einzelne Molekülspezies, sondern um eine Molekülmischung, die als Substrat eingesetzt wurde. Palamarczyk und Kollegen haben für solubilisierte und partiell (18,2-fach) gereinigte Dpm1 aus *S. cerevisiae* neben der Präferenz für eine α -gesättigte Isopreneinheit auch den DolP-Umsatz mit 7, 11 und 20 Isopreneinheiten untersucht [Palamarczyk *et al.*, 1980]. Alle getesteten Kettenlängen wurden akzeptiert. Während die K_m -Werte für die drei DolP-Substrate ähnlich waren (1-2 μ M), variierten die beobachteten Umsatzgeschwindigkeiten um einen Faktor >10. DolP mit 11 Isopreneinheiten wurde deutlich schneller umgesetzt als DolP mit 20 und 7 Isopreneinheiten. In den hier vorgestellten Ergebnissen ließ sich keine Kettenlängenpräferenz erkennen, da es entweder zum Vollumsatz des DolP-Substrates kam (Abb. 3.10 B, S. 57) oder die Zusammensetzung des DolPM-Produktes nicht untersucht wurde (Abb. 3.3-Abb. 3.5).

Die Substitution von Dolichol mit Phytanol konnte auch für die Alg1 aus der N-Glykosylierungskaskade der Hefe *S. cerevisiae* gezeigt werden [Wilson *et al.*, 1995]. Daraus wurde gefolgert, dass Dolichol *in vitro* als Substrat nicht essentiell ist.

Die Flexibilität der Dpm1 für unterschiedliche Lipidsubstrate und die enzymatische Aktivität in heterogener Katalyse mit auf der Oberfläche fester Phasen gebundener Substrate konnten mit mikrosomalen Präparationen aus *S. cerevisiae* gezeigt werden. Getestet wurden bifunktionale, an ω -3,7-Dimethyleicosylphosphat-Lipide gebundene und Disulfid-verbundene Substrate. Alle Substrate wurden – wenn auch mit unterschiedlichen Umsatzraten – von der Dpm1 als Substrat erkannt [Sprung *et al.*, 2002].

In 3.3 aufgetretene Unterschiede zu Literaturwerten könnten mit abweichenden Enzym- oder Substratpräparationen und unterschiedlichen, genetischen Konstrukten erklärt werden. In dieser Arbeit wurde die höchste Aktivität der rekombinanten His₆-SUMO-Dpm1 bei 35 °C bzw. in Gegenwart von 10 mM MgCl₂ gemessen. DolP und PhytP wurden als Lipidsubstrate mit einem V_{max} von 6 bzw. 6,4 μ mol (min mg Protein)⁻¹ umgesetzt. Die GDPM-Affinität des Enzyms in Abhängigkeit vom Lipidsubstrat war in Gegenwart von PhytP 37 % höher als in Gegenwart von DolP. Die in 3.3 erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass der verwendete HPLC-

Assay für die Substitution radioaktiver Assays geeignet ist. Die Standardabweichung für Messdaten in Mehrfachbestimmung lag im Mittel bei 5,4 %.

4.3 Untersuchung der Wechselwirkung von GDP und GDPM mit der His₆-SUMO-Dpm1 mittels isothermer Titrationskalorimetrie

Der Proteingehalt einer charakteristischen, eukaryotischen Plasmamembran beträgt ~50 % (*w/w*). Die inneren Membranen von Mitochondrien und Chloroplasten können bis zu ~75 % aus Protein bestehen [Alberts *et al.*, 2004]. Bei den in Membranfraktionen enthaltenen Proteinen handelt es sich hauptsächlich um integrale Membranproteine oder Membran-assoziierte Proteine. Das humane Genom soll für 10.000 Membranproteine kodieren. Die physiologischen Funktionen von Membranproteinen reichen von der Übertragung von Nervenimpulsen bis zu Aufgaben der Regulation und Adhäsion. Zwei Membranproteinhauptklassen sind Ionenkanäle und Transporter für gelöste Stoffe [Domene *et al.*, 2003]. Sie erlauben den Stofftransport zwischen den, durch Biomembranen voneinander getrennten, Kompartimenten in der Zelle.

50 % aller zukünftigen Wirkstoffziele könnten Membranproteine sein [Terstappen und Reggiani, 2001]. Trotz ihrer vielseitigen Funktionen und dem Forschungspotenzial zur Entwicklung neuer Wirkstoffe ist wenig über das biochemische Bindungsverhalten von Membranproteinen bekannt [Rajaratnam und Rosgen, 2014]. Das rationale Wirkstoffdesign ist auf diese Informationen angewiesen [Jayanthi *et al.*, 2015].

Für das Membranprotein Dpm1 aus *Acanthamoeba castellanii* [Carlo und Villemez, 1979], *Entamoeba histolytica* [Villagomez-Castro *et al.*, 1998], *Gallus gallus* [McDowell und Schwarz, 1989], *Mus musculus* [Gasnier *et al.*, 1987], *Rattus norvegicus* [Jensen und Schutzbach, 1986] und *Zea mays* [Riedell und Miernyk, 1988] wurde das Reaktionsprodukt GDP als Inhibitor der enzymatischen Reaktion identifiziert. Für die Dpm1 aus *S. cerevisiae* ist dies nicht publiziert.

Zur Untersuchung von Bindungsereignissen zwischen Biomolekülen – wie einem Inhibitor und einem Enzym – kann die isotherme Kalorimetrie (ITC) eingesetzt werden. Es zeigte sich, dass die His₆-SUMO-Dpm1 der Untersuchung mittels ITC erstmals zugänglich war und das Substrat GDPM mit einer Dissoziationskonstante K_D von $83 \pm 17 \mu\text{M}$ gebunden wurde (Abb. 3.6 A, S. 50).

Der C-Wert ist der Quotient aus der Proteinkonzentration und dem ermittelten K_D -Wert [Damian, 2013] und wurde zu 0,7 bestimmt. Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit intermolekularen Wechselwirkungen im Größenordnungsbereich von K_D -Werten zwischen 10-100 μM [Rajaratnam und Rosgen, 2014]. Die Stöchiometrie der Bindung lag bei ungefähr einem gebundenen GDPM-Molekül pro His₆-SUMO-Dpm1-Molekül. Die Bindung eines weiteren GDPM-Moleküls an ein potenzielles allosterisches Zentrum des Enzyms ist daher unwahrscheinlich. GDP wurde nicht gebunden (Abb. 3.6 B, S. 50). Dies bestätigt die

vorhandenen Ergebnisse für die Dpm1 aus *S. cerevisiae*, nach denen GDP nicht als Dpm1-Inhibitor beschrieben wurde. Durch das Nebenprodukt GDP sind daher keine negativen Auswirkungen auf die DolPM-Synthese zu erwarten.

ITC-Messungen für lösliche Proteine sind gut etabliert, wohingegen die Messung von Membranproteinen meist schwierig ist. Membranproteine besitzen eine geringe Abundanz in biologischem Gewebe und zu ihrer Solubilisierung werden Detergenzien verwendet. Letztere können aufgrund der fehlenden Dialysierbarkeit oberhalb der kritischen Mizell-Konzentration zu Unterschieden in den verwendeten Puffern in der Probenzelle und der ITC-Titrationsspritze führen [Rajaratnam und Rosgen, 2014]. Eine Kontrollmessung, bei der die Signale der Puffertitration detektiert und von den eigentlichen Messdaten subtrahiert werden, ist daher essentiell. Das Ergebnis könnte ansonsten eine artifizielle Signalbildung während der Messung aufgrund von Verdünnungseffekten sein.

Gegen eine artifizielle Signalbildung im vorliegenden Experiment spricht die Vergleichbarkeit der erhaltenen Primär- und Sekundärauftragungen zu publizierten ITC-Daten. Mit einem ähnlichen zu dem in Abb. 3.6 eingesetzten Instrument wurde bereits die Bindung von Monoubiquitin an die E3 Ubiquitinligase Cbl-b untersucht [Peschard *et al.*, 2007]. Bei diesem Experiment wurde mit einem K_D von 57 μM ein Wert gleicher Größenordnung ermittelt.

Nachteile der ITC-Methode sind die benötigte Proteinmenge (~ 100 nmol pro Messung), die bei geringen Bindungsaffinitäten zur besseren Signalbildung sogar erhöht werden müsste, und der geringe Probandurchsatz (~ 3 Messungen pro Tag). Diesen Problemen könnte mit dem Einsatz von Instrumenten mit kleineren Probenzellen ($< 1,4$ mL) und der Verwendung automatischer Probenapplikatoren begegnet werden.

GDPM und GDP bzw. DolP und DolPM besitzen ähnliche spektrophotometrische Eigenschaften, die sie im Reaktionsansatz ununterscheidbar machen. Davon unabhängig ist die Messung der frei werdenden bzw. aufgenommenen Wärmeenergie während der Biomolekülbindung im Reaktionsansatz. Da mittels ITC die Wärmeenergie gemessen werden kann, war es beispielsweise möglich, die Reaktion der Oxalatoxidase aus *Ceriporiopsis subvermispota* kontinuierlich zu messen [Rana *et al.*, 2016]. Die Glycosyltransferaseaktivität der Dpm1 wurde bislang – wie auch in der vorliegenden Arbeit – ausschließlich diskontinuierlich bestimmt [Gandini *et al.*, 2017; Schutzbach *et al.*, 1993]. Die unter 3.4 gezeigten Ergebnisse könnten daher die Grundlage für die erstmalige kontinuierliche und markierungsfreie Aktivitätsmessung der Dpm1 mittels ITC sein.

Die ITC kann auch für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt werden. Anzeichen für eine solche Wechselwirkung wurden für die Glycosyltransferasen Alg1, Alg2 und Alg11 [Gao *et al.*, 2004] bzw. Alg7, Alg13 und Alg14 [Gao *et al.*, 2008] mittels Co-Immunopräzipitation nachgewiesen. Eine mögliche Protein-Proteininteraktion der Dpm1

beispielsweise mit den Glycosyltransferasen Alg3, Alg9 und Alg12 oder Flippasen *in vivo* könnte ebenfalls *in vitro* mittels ITC aufgeklärt werden.

Insbesondere der C-terminale, hydrophobe Bereich der Dpm1 könnte zur Wechselwirkung mit anderen Proteinen dienen. Schutzbach und Kollegen stellten fest, dass die Dpm1 aus *S. cerevisiae* auch ohne diesen Transmembranbereich katalytische Aktivität besitzt (s. Tab. 4.1, DPM Δ 3) [Schutzbach *et al.*, 1993]. Daher postulierten sie, dass diese Domäne die Aufgabe der Verankerung des Enzyms in der Membran und/oder der Interaktion mit anderen Enzymen hat.

4.4 His₆-SUMO-Dpm1-Immobilisierung, DolPM-Produktion und -Nachweis

In der vorliegenden Arbeit konnte DolPM nach Abtrennung von IGEPAL[®] CA-630 durch MeOH-Fällung erstmals in hoher Reinheit und im mg-Maßstab produziert werden. Mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,3 mL min⁻¹ konnte DolPM mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 2,5 mg (h mg His₆-SUMO-Dpm1)⁻¹ produziert werden. Aus 10 mg eingesetztem DolP wurden 4,2 mg gereinigtes DolPM hergestellt. Dies entspricht – bezogen auf eine Dolicholspezies mit 18 Isopreneinheiten (Dol₁₈P: 1325 bzw. Dol₁₈PM: 1487 g mol⁻¹) – einer molaren Ausbeute von 37 %.

DolPM ist im Prozess der *N*-Glykosylierung der Mannosendonator für die Enzyme Alg3, Alg9 und Alg12. In der BRENDA Datenbank sind keine detaillierten kinetischen Daten zu diesen Enzymen aus *S. cerevisiae* vorhanden und die Aufklärung ihrer *in vivo* Funktion erfolgte mit markierter [³H]-Mannose (Alg3: [Aebi *et al.*, 1996; Cipollo und Trimble, 2000; Sharma *et al.*, 2001; Verostek *et al.*, 1991], Alg9: [Frank und Aebi, 2005], Alg12: [Cipollo und Trimble, 2002]). Insbesondere der duale Mechanismus der Alg9 und analog der Alg2, die unterschiedliche Substrate erkennen und mannosylieren, ist unverstanden. Die Bereitstellung ausreichender DolPM-Substratmengen könnte zur Aufklärung dieses Mechanismus beitragen [Ramirez *et al.*, 2017].

Ziel war es, DolPM mit Hilfe der His₆-SUMO-Dpm1 zu synthetisieren. Die Aktivität immobilisierter His₆-SUMO-Dpm1 konnte sowohl im *Batch*- (3.5) als auch in einem kontinuierlichen Verfahren (3.6) mittels HPLC-Analytik nachgewiesen werden. Der DolPM-Produktnachweis konnte mittels ESI-MS erbracht werden (Abb. 3.10).

Der Vollumsatz von GDPM zu GDP konnte trotz des Überschusses an zugesetztem DolP-Substrat nicht beobachtet werden (Abb. 3.7 B und Abb. 3.8). In der DolPM-Präparation konnte kein DolP identifiziert werden. Entweder wurde nicht umgesetztes DolP während der DolPM-Aufarbeitung entfernt, oder es kam zum Vollumsatz und die effektiv verfügbare DolP-Konzentration im Ansatz ist geringer als die kalkulierte Konzentration von 200 µM. Der erste Erklärungsansatz ist unwahrscheinlich, da während der DolPM-Aufarbeitung kein DolP mittels TLC erkannt wurde (Abb. 10.8, S. 91). Aufgrund der 1:1 Stöchiometrie des GDPM:DolP-Umsatzes ist davon auszugehen, dass die effektive Konzentration an

emulgiertem DoIP im Reaktionsansatz bei 45-50 μM liegt. DoIP besitzt aufgrund der langen hydrophoben Kohlenwasserstoffkette eine geringe Löslichkeit in wässrigen Medien. Bei der Herstellung der Substratlösung wird DoIP wahrscheinlich nicht vollständig durch den Detergenzzusatz emulgiert. Die genaue DoIP-Konzentrationsbestimmung könnte mittels LC oder über einen enzymatischen Phosphatase-Test erfolgen. Die Freisetzung anorganischen Phosphats durch die Phosphatase lässt sich sensitiv über einen kolorimetrischen Test quantifizieren [Fisher und Higgins, 1994].

Das in den Proben enthaltene Detergenz IGEAL[®] CA-630 stellte sich als das Hauptproblem während der massenspektrometrischen DoIPM-Analyse heraus. IGEAL[®] CA-630 lag in einem theoretischen Konzentrationsüberschuss von einem Faktor über 100 im Vergleich zu DoIP bzw. DoIPM in den Proben vor und unterliegt wie auch Dolichol einer Kettenlängenverteilung ($\Delta 44$ kDa, s. Abb. 10.7, S. 91). Da die Detergenzsignale das DoIPM-Produktsignal überlagerten, musste IGEAL[®] CA-630 vor der Analyse entfernt werden. Die Zugabe von MeOH zu wässrigen, DoIPM-haltigen Lösungen führte zur selektiven Präzipitation von DoIP und konnte reproduzierbar zur einfachen und nahezu vollständigen Entfernung des Detergenz genutzt werden (Abb. 10.8, S. 91).

LC-MS Daten zu DoIPM sind im Vergleich zu Dolicholen [Jozwiak *et al.*, 2017] und DoIP [Guan und Eichler, 2011; Haeuptle *et al.*, 2010] aufgrund fehlender Referenzsubstanzen nur in geringer Anzahl vorhanden. DoIPM ist kommerziell nicht erhältlich. Dieser Referenzsubstanzmangel in Kombination mit der großen strukturellen Ähnlichkeit des Eduktes DoIP und des Produktes DoIPM stellten Gandini und Kollegen bei der Untersuchung der Dpm1 aus *Pyrococcus furiosus* vor das Problem der eindeutigen Substanzidentifizierung [Gandini *et al.*, 2017]. DoIP und DoIPM co-migrieren in der TLC mit nur leicht unterschiedlichen R_f -Werten (Abb. 3.11, S. 59, ΔR_f -Wert $\sim 0,11$). DoIPM konnte durch milde saure Hydrolyse in DoIP zurücküberführt werden. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit publizierten Daten [Gandini *et al.*, 2017]. Der von Wedgwood und Kollegen bestimmte R_f -Wert für DoIPM von $\sim 0,31$ - $0,49$ deckt sich mit dem in dieser Arbeit bestimmten Wert von $\sim 0,37$ [Wedgwood *et al.*, 1974].

Die Dpm1 aus *S. cerevisiae* wurde bislang noch nie in immobilisierter Form zur DoIPM-Synthese eingesetzt. Der inverse Ansatz mit immobilisierten Substraten und der Dpm1-Aktivität aus Hefemikrosomen wurden 2002 erstmals getestet [Sprung *et al.*, 2003; Sprung *et al.*, 2002] und wurde als Indiz für eine erhöhte Flexibilität des Enzyms in der Anwendung heterogener Katalysen erachtet.

Mit einer His₁₀-getaggten Enzymvariante der Alg1-Mannosyltransferase aus der *N*-Glykosylierungskaskade konnten in immobilisierter Form und in Lösung nahezu identische spezifische Aktivitäten erzielt werden [Revers *et al.*, 1999]. Dies stellt klar, dass der *N*-Terminus der Mannosyltransferasen Dpm1 und Alg1 aus *S. cerevisiae* mit einem

Polyhistidin-*tag* erweitert werden kann. Die Enzymaktivität in Lösung und in immobilisierter Form bleibt dabei erhalten und die spezifische Aktivität muss sich durch die Immobilisierung nicht zwangsläufig ändern.

Der in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigte kontinuierliche und wiederholte Einsatz der His₆-SUMO-Dpm1 (Abb. 3.7 B, S. 52) macht die Abtrennung proteinogener Bestandteile in der Produktlösung überflüssig. Da keine proteinogenen Bestandteile in der Produktpräparation nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt), verringert sich auch die Proteinmenge auf der Affinitätsmatrix nicht. Die beschriebene Methodik bietet den Vorteil des einfachen Tests verschiedener Reaktionsbedingungen und artifizierlicher Substrate wie Dihydrocitronellylphosphat, 3-Methyloctadecanylphosphat oder Tetradecanylphosphat [Sprung *et al.*, 2003] ohne Katalysatorverlust.

Die Immobilisierung von Enzymen kann darüber hinaus ihre Stabilität gegenüber Temperatur, Lösungsmittel, pH-Wert und Kontaminationen erhöhen [Mohamad *et al.*, 2015] und so wiederum zur Kostenreduktion führen. Eine Kostenreduktion ist wichtig für die kommerzielle Realisierbarkeit industrieller Biotransformationen, basierend auf enzymatischen Produkten [Lorenzoni *et al.*, 2015].

5 Zusammenfassung

Primäres Ziel dieser Arbeit war die Produktion von Dolichylphosphat-Mannose (DoIPM) mithilfe des Enzyms Dolichylphosphatmannosensynthase 1 (Dpm1) aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Zu diesem Zweck wurde das Protein in ausreichender Menge hergestellt, biochemisch und biophysikalisch charakterisiert und anschließend immobilisiert. In dieser Arbeit konnte erstmals der Einsatz immobilisierter His₆-SUMO-Dpm1 zur Produktion von DoIPM gezeigt werden. Auf diese Weise konnten 4,2 mg DoIPM (molare Ausbeute: 37 %) mit einer maximalen Raum-Zeit-Ausbeute von 2,5 mg DoIPM pro h und mg His₆-SUMO-Dpm1 produziert werden. Das Produkt DoIPM wurde mittels Methanolfällung und präparativer Dünnschichtchromatographie gereinigt. Die Identifikation des synthetisierten DoIPM erfolgte unabhängig voneinander mittels ESI-MS Analyse (DoIP₁₈M: [M-H]⁻ 1486 m/z) und indirekt mittels analytischer TLC nach milder saurer Hydrolyse von DoIPM (Nachweis des Eduktes DoIP, R_f-Wert ~0,54).

Vor der Immobilisierung und der Reinigung der Glycosyltransferase Dpm1 aus *S. cerevisiae*, wurde eine N-terminal mit einem SUMO-tag versehene Variante des Enzyms rekombinant in *Escherichia coli* produziert. Der verwendete tag war N-terminal mit sechs Histidinen versehen. Dadurch wurde erstmals die Reinigung der His₆-SUMO-Dpm1 mittels Affinitätschromatographie (IMAC) erreicht. Die Produktion gereinigten Enzyms (13,9 mg Protein pro L Zellkultur in 500 mL-Schüttelkolbenkultivierung bzw. 108 mg Protein pro L Zellkultur in 10 L-Batch-Fermentation) ermöglichte die detaillierte Untersuchung der kinetischen und biophysikalischen Eigenschaften. Die in der Literatur genutzte, radioaktive Methode zur Messung des Umsatzes des Enzyms, konnte durch ein HPLC-gestütztes, markierungsfreies Verfahren ersetzt werden. Diese Methode kann auch in biochemischen Standardlaboratorien genutzt werden. Das auf der chromatographischen Trennung von GDP und GDPM basierende Verfahren lieferte qualitative und quantitative Daten zur enzymatischen Aktivität der His₆-SUMO-Dpm1. Bei der Mehrfachbestimmung von Messdaten mit diesem Verfahren lag die Standardabweichung im Mittel bei 5,4 %.

Die untersuchte His₆-SUMO-Dpm1 akzeptierte – neben den in der Literatur beschriebenen Metallionen Mg²⁺ und Mn²⁺ – auch Ni²⁺, Co²⁺ und Ca²⁺, nicht aber Cu²⁺, als Cofaktoren. Mit dem natürlichen Cofaktor Mg²⁺ zeigte das Enzym bei einer Konzentration von 10 mM die höchste gemessene Aktivität. Die Temperatur, bei der die höchste enzymatische Aktivität ermittelt wurde, betrug 35 °C. Der Aktivitätsbereich des Enzyms von 20-50 °C wurde erstmals bestimmt. Neben dem natürlichen, hydrophoben Dolichylphosphat (DoIP) Lipidanker wurde auch der hydrophilere Lipidanker Phytanylphosphat (PhytP) getestet. PhytP hat im Gegensatz zu DoIP eine definierte Kettenlänge von 20 Kohlenstoffatomen (MW = 479,73 g mol⁻¹), ist kommerziell leichter erhältlich und deutlich günstiger. PhytP hat

mit $6,4 \mu\text{mol (min mg)}^{-1}$ Protein einen um 6,7 % größeren V_{max} als DoIP, wobei zu beachten ist, dass DoIP eine Kettenlängenverteilung von 16-21 Isopreneinheiten aufweist und daher keine einheitliche Substratspezies bildet. PhytP wird von der His₆-SUMO-Dpm1 mit einem K_m -Wert von $63 \mu\text{M}$ mit einer leicht höheren Affinität im Vergleich zu DoIP ($86 \mu\text{M}$) gebunden. Die biophysikalische Untersuchung der GDP-Mannose (GDPM) Substratbindung an die His₆-SUMO-Dpm1 wurde erstmals mittels isothermer Titrationskalorimetrie untersucht. GDPM wurde mit einem K_D von $83 \pm 17 \mu\text{M}$ von der His₆-SUMO-Dpm1 gebunden, wohingegen GDP nicht gebunden wurde. Die His₆-SUMO-Dpm1 aus *S. cerevisiae* wird daher nicht durch GDP inhibiert. In dieser Hinsicht unterscheidet sich die Dpm1 aus *S. cerevisiae* von den in der Literatur beschriebenen Enzymen aus *Acanthamoeba castellanii*, *Entamoeba histolytica*, *Gallus gallus*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* und *Zea mays*.

6 Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Dpm1 beziehen sich ausnahmslos auf das genetische Konstrukt His₆-SUMO-Dpm1. Durch die Abspaltung des SUMO-tags mit Hilfe der SUMO-Protease kann die native *S. cerevisiae* Dpm1 erhalten werden. Die Wiederholung der Experimente in Lösung mit der Wildtyp-Proteinvariante könnten die *in vivo* Bedingungen eventuell besser abbilden als die Ergebnisse mit der N-terminal verlängerten Variante.

Sowohl die genetische Modifizierung des Enzyms als auch die Immobilisierung könnten Auswirkungen auf die kinetischen Eigenschaften haben. Das Enzym Alg1 wurde als His₁₀MycAlg1ΔTM-Variante sowohl in Lösung als auch in immobilisierter Form untersucht. Dabei wurden nahezu gleiche spezifische Aktivitäten bestimmt [Revers *et al.*, 1999]. Die Bestimmung der kinetischen Eigenschaften der His₆-SUMO-Dpm1 in immobilisierter Form könnte darüber Aufschluss geben, ob sich eine generelle Tendenz für den Einfluss der Immobilisierung auf ER-Glycosyltransferasen aus *S. cerevisiae* ableiten lässt.

Die zur Untersuchung der His₆-SUMO-Dpm1 als aktivierter Zuckerdonor eingesetzte GDP-Mannose (GDPM) wurde kommerziell bezogen. Der Preis für GDPM ist in den letzten 5 Jahren stark gestiegen. Rexer *et al.* konnten 2018 ein Verfahren etablieren, bei dem die durch die Alg1 verbrauchte GDPM durch ein *in vitro* Verfahren aus mehreren Enzymen in einer *one-pot* Synthese regeneriert werden konnte [Rexer *et al.*, 2018]. Ein vergleichbarer Ansatz ist für die His₆-SUMO-Dpm1 ebenfalls denkbar, um die Kosten der Lipid-verknüpften Mannose-Bereitstellung zu verringern

Durch die Verwendung eines DolP-Substratgemisches (Dol₈₀₋₁₀₅-P) kann keine Aussage über die Bevorzugung einzelner Kettenlängen durch die His₆-SUMO-Dpm1 getroffen werden. Eine Kettenlängen-Präferenz wurde für die Dpm1 aus *Pyrococcus furiosus* gefunden. Dol₉₅-P hatte einen 37 % höheren Umsatz als Dol₅₅-P [Gandini *et al.*, 2017]. Durch eine chromatographische Trennung der unterschiedlichen DolP-Moleküle und dem anschließenden Test der einzelnen Substanzen als His₆-SUMO-Dpm1-Substrate, könnte eine mögliche Kettenlängenpräferenz für die His₆-SUMO-Dpm1 bestimmt werden.

Dihydrocitronellylphosphat, 3-Methyloctadecanylphosphat oder Tetradecanylphosphat wurden als Substrate der Dpm1 aus *S. cerevisiae* beschrieben [Sprung *et al.*, 2003]. Über den in der Arbeit gezeigten Versuchsaufbau zur Produktion von Dolichylphosphatmannose (DolPM) mittels Durchflusskatalyse könnten auch diese Substratanaloga präparativ zu X-P-Mannose umgesetzt werden.

Ein interessantes Experiment wäre der direkte Einsatz des produzierten DolPM als aktivierter Mannosedonor *in vitro*. Die Untersuchung DolPM-abhängiger Enzyme könnte – über die N-

Glykosylierung hinaus – weiteren Aufschluss über den größtenteils unverstandenen Einfluss der Lipidkettenlänge auf die Regulation enzymatischer Prozesse geben.

7 Literatur

- Aebi, M. (2013). "N-linked protein glycosylation in the ER." *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.*, **1833**, 2430-2437.
- Aebi, M., Gassenhuber, J., Domdey, H. und te Heesen, S. (1996). "Cloning and characterization of the ALG3 gene of *Saccharomyces cerevisiae*." *Glycobiology*, **6**, 439-444.
- Agard, N. J. und Bertozzi, C. R. (2009). "Chemical Approaches To Perturb, Profile, and Perceive Glycans." *Acc. Chem. Res.*, **42**, 788-797.
- Agilent. (2015). "BL21-Gold(DE3) Competent Cells Instruction Manual."
- Alberts, B., Alexander, J., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Walter, P. (2004). "Molecular Biology of the Cell, 4th Edition." Garland Science, 2000 pp.
- Albright, C. F., Orlean, P. und Robbins, P. W. (1989). "A 13-amino acid peptide in three yeast glycosyltransferases may be involved in dolichol recognition." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**, 7366-9.
- Apweiler, R., Hermjakob, H. und Sharon, N. (1999). "On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database." *Biochim. Biophys. Acta*, **1473**.
- Arroyo-Flores, B. L., Calvo-Mendez, C., Flores-Carreón, A. und Lopez-Romero, E. (1995). "Biosynthesis of glycoproteins in *Candida albicans*: activity of dolichol phosphate mannose synthase and protein mannosylation in a mixed membrane fraction." *Microbiology*, **141 (Pt 9)**, 2289-94.
- Aschenbrenner, J., Marx, P., Pietruszka, J. und Marienhagen, J. (2019). "Microbial Production of Natural and Unnatural Monolignols with *Escherichia coli*." *ChemBioChem*, **20**, 949-954.
- Asher, W. B. und Bren, K. L. (2014). "Affinity Purification of Heme-Tagged Proteins." *Methods Mol. Biol.*, **1177**.
- Babczinski, P., Haselbeck, A. und Tanner, W. (1980). "Yeast mannosyl transferases requiring dolichyl phosphate and dolichyl phosphate mannose as substrate. Partial purification and characterization of the solubilized enzyme." *Eur. J. Biochem.*, **105**, 509-15.
- Baksi, K., Tavaréz-Pagan, J. J., Martínez, J. A. und Banerjee, D. K. (2008). "Unique structural motif supports mannosylphospho dolichol synthase: an important angiogenesis regulator." *Curr. Drug Targets*, **9**, 262-271.
- Banerjee, D. K., Aponte, E. und DaSilva, J. J. (2004). "Low expression of lipid-linked oligosaccharide due to a functionally altered Dol-P-Man synthase reduces protein glycosylation in cAMP-dependent protein kinase deficient Chinese hamster ovary cells." *Glycoconjugate J.*, **21**, 479-486.
- Banerjee, D. K., Carrasquillo, E. A., Hughey, P., Schutzbach, J. S., Martínez, J. A. und Baksi, K. (2005). "In Vitro Phosphorylation by cAMP-dependent Protein Kinase Up-regulates Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Mannosylphosphodolichol Synthase." *J. Biol. Chem.*, **280**, 4174-4181.
- Banerjee, D. K., Zhang, Z., Baksi, K. und Serrano-Negrón, J. E. (2017). "Dolichol phosphate mannose synthase: a Glycosyltransferase with Unity in molecular diversities." *Glycoconjugate J.*, **34**, 467-479.
- Bause, E. (1983). "Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes." *Biochem. J.*, **209**, 331-6.
- Beck, A. und Reichert, J. M. (2012). "Marketing approval of mogamulizumab: a triumph for glyco-engineering." *MAbs*, **4**, 419-25.
- Bertani, G. (1951). "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*." *J Bacteriol*, **62**, 293-300.
- BMBF. (2011). "Richtlinien zur Förderung von Basistechnologien für eine nächste Generation biotechnologischer Verfahren." BMBF bmbf.de/foerderungen/bekanntmachung-655.html.

- Borgese, N. und Fasana, E. (2011). "Targeting pathways of C-tail-anchored proteins." *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, **1808**, 937-946.
- Bosse-Doenecke, E., Weininger, U., Gopalswamy, M., Balbach, J., Knudsen, S. M. und Rudolph, R. (2010). "High yield production of recombinant native and modified peptides exemplified by ligands for G-protein coupled receptors. [Erratum to document cited in CA148:401358]." *Protein Expression Purif.*, **70**, 298.
- Braakman, I. und Hebert, D. N. (2013). "Protein folding in the endoplasmic reticulum." *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.*, **5**.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Burda, P. und Aebi, M. (1998). "The ALG10 locus of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the α -1,2 glucosyltransferase of the endoplasmic reticulum: the terminal glucose of the lipid-linked oligosaccharide is required for efficient N-linked glycosylation." *Glycobiology*, **8**, 455-462.
- Bursle, C., Brown, D., Cardinal, J., Connor, F., Calvert, S. und Coman, D. (2017). "DMP1-CDG (CDG1e) with Significant Gastrointestinal Manifestations; Phenotype and Genotype Expansion." In: *JIMD Reports* (Morava, E., Baumgartner, M., Patterson, M., Rahman, S., Zschocke, J. und Peters, V., eds.), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 27-32, 34.
- Cantagrel, V. und Lefeber, D. J. (2011). "From glycosylation disorders to dolichol biosynthesis defects: a new class of metabolic diseases." *Journal of Inherited Metabolic Disease*, **34**, 859-867.
- Carlo, P. L. und Villemez, C. L. (1979). "Solubilization and properties of polyprenyl phosphate: GDP-D-mannose mannosyl transferase." *Arch. Biochem. Biophys.*, **198**, 117-23.
- Castilho, A. (2015). "Glyco-Engineering." Humana Press, New York, 439.
- Cipollo, J. F. und Trimble, R. B. (2000). "The accumulation of Man(6)GlcNAc(2)-PP-dolichol in the *Saccharomyces cerevisiae* Deltaalg9 mutant reveals a regulatory role for the Alg3p α 1,3-Man middle-arm addition in downstream oligosaccharide-lipid and glycoprotein glycan processing." *J Biol Chem*, **275**, 4267-77.
- Cipollo, J. F. und Trimble, R. B. (2002). "The *Saccharomyces cerevisiae* alg12delta mutant reveals a role for the middle-arm α 1,2Man- and upper-arm α 1,2Man α 1,6Man- residues of Glc3Man9GlcNAc2-PP-Dol in regulating glycoprotein glycan processing in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus."
- Colussi, P. A., Taron, C. H., Mack, J. C. und Orlean, P. (1997). "Human and *Saccharomyces cerevisiae* dolichol phosphate mannose synthases represent two classes of the enzyme, but both function in *Schizosaccharomyces pombe*." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 7873-8.
- Costa, A. R., Rodrigues, M. E., Henriques, M., Oliveira, R. und Azeredo, J. (2014). "Glycosylation: impact, control and improvement during therapeutic protein production." *Crit. Rev. Biotechnol.*, **34**, 281-299.
- Damian, L. (2013). "Isothermal titration calorimetry for studying protein-ligand interactions." *Methods Mol. Biol.*, **1008**, 103-118.
- Dancourt, J., Vuillaumier-Barrot, S., De Baulny, H. O., Sfaello, I., Barnier, A., Le Bizec, C., Dupre, T., Durand, G., Seta, N. und Moore, S. E. H. (2006). "A New Intronic Mutation in the DPM1 Gene Is Associated With a Milder Form of CDG 1e in Two French Siblings." *Pediatr. Res.*, **59**, 835-839.
- Denic, V. (2012). "A portrait of the GET pathway as a surprisingly complicated young man." *Trends Biochem. Sci.*, **37**, 411-417.
- Dicker, M. und Strasser, R. (2015). "Using glyco-engineering to produce therapeutic proteins." *Expert Opin. Biol. Ther.*
- Domene, C., Bond, P. J. und Sansom, M. S. P. (2003). "Membrane protein simulations: ion channels and bacterial outer membrane proteins." *Adv. Protein Chem.*, **66**, 159-193.
- Endo, T. und Koizumi, S. (2000). "Large-scale production of oligosaccharides using engineered bacteria." *Current Opinion in Structural Biology*, **10**, 536-541.

- Fairbanks, A. J. (2017). "The ENGases: versatile biocatalysts for the production of homogeneous N-linked glycopeptides and glycoproteins." *Chem. Soc. Rev.*, **46**, 5128-5146.
- Ferguson, M. A. J., Hart, G. W. und Kinoshita, T. (2017). "Glycosylphosphatidylinositol Anchors Chapter 12." (Varki A, C. R., Esko JD, et al., ed.), 3rd edition ed., Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017.
- Ferrara, C., Brunker, P., Suter, T., Moser, S., Puntener, U. und Umana, P. (2006). "Modulation of therapeutic antibody effector functions by glycosylation engineering: influence of Golgi enzyme localization domain and co-expression of heterologous beta1, 4-N-acetylglucosaminyltransferase III and Golgi alpha-mannosidase II." *Biotechnol Bioeng*, **93**, 851-61.
- Fisher, D. K. und Higgins, T. J. (1994). "A sensitive, high-volume, colorimetric assay for protein phosphatases." *Pharm. Res.*, **11**, 759-63.
- Frank, C. G. und Aebi, M. (2005). "ALG9 mannosyltransferase is involved in two different steps of lipid-linked oligosaccharide biosynthesis." *Glycobiology*, **15**, 1156-1163.
- Freeze, H., Hart, G. und Schnaar, R. (2017). "Glycosylation Precursors." In: *Essentials of Glycobiology*, 3rd edition ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press 2015-2017, Cold Spring Harbor (NY).
- Gandini, R., Reichenbach, T., Tan, T.-C. und Divne, C. (2017). "Structural basis for dolichylphosphate mannose biosynthesis." *Nat. Commun.*, **8**, 1-12.
- Gao, X.-D., Moriyama, S., Miura, N., Dean, N. und Nishimura, S.-I. (2008). "Interaction between the C Termini of Alg13 and Alg14 Mediates Formation of the Active UDP-N-acetylglucosamine Transferase Complex." *J. Biol. Chem.*, **283**, 32534-32541.
- Gao, X.-D., Nishikawa, A. und Dean, N. (2004). "Physical interactions between the Alg1, Alg2, and Alg11 mannosyltransferases of the endoplasmic reticulum." *Glycobiology*, **14**, 559-570.
- Garcia-Silva, M. T., Matthijs, G., Schollen, E., Cabrera, J. C., Sanchez Del Pozo, J., Herreros, M. M., Simon, R., Maties, M., Hernandez, E. M., Frank, C. G., Grubenmann, C. E., Hennet, T. und Briones, P. (2005). "Congenital disorder of glycosylation (CDG) type 1e. A new patient. [Erratum to document cited in CA142:091417]." *J. Inherited Metab. Dis.*, **28**, 34.
- Gasnier, F., Morelis, R., Louisot, P. und Gateau, O. (1987). "Purification and properties of a mannosyltransferase solubilized from mitochondrial outer membranes." *Biochim Biophys Acta*, **925**, 297-304.
- Gasnier, F., Rousson, R., Lerme, F., Vaganay, E., Louisot, P. und Gateau-Roesch, O. (1992). "Mitochondrial dolichyl-phosphate mannose synthase. Purification and immunogold localization by electron microscopy." *Eur. J. Biochem.*, **206**, 853-8.
- Ghaderi, D., Taylor, R. E., Padler-Karavani, V., Diaz, S. und Varki, A. (2010). "Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins." *Nat. Biotechnol.*, **28**, 863-867.
- Ghods, R. und Kheirouri, S. (2018). "Carnosine and advanced glycation end products: a systematic review." *Amino Acids*, **50**, 1177-1186.
- Goede, V., Fischer, K., Busch, R., Engelke, A., Eichhorst, B., Wendtner, C. M., Chagorova, T., de la Serna, J., Dilhuydy, M. S., Illmer, T., Opat, S., Owen, C. J., Samoylova, O., Kreuzer, K. A., Stilgenbauer, S., Dohner, H., Langerak, A. W., Ritgen, M., Kneba, M., Asikanius, E., Humphrey, K., Wenger, M. und Hallek, M. (2014). "Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions." *N Engl J Med*, **370**, 1101-10.
- Groen, J. (2017). "Untersuchungen zur in-vitro-Synthese von Dolichylphosphat-Mannose mit Dpm1," Master Thesis, Naturwissenschaftliche Fakultät I Institut für Pharmazie Arbeitsgruppe Aufarbeitung biotechnischer Produkte, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germany.
- Guan, Z. und Eichler, J. (2011). "Liquid chromatography/tandem mass spectrometry of dolichols and polyprenols, lipid sugar carriers across evolution." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1811**, 800-806.

- Gupta, S. K. und Shukla, P. (2018). "Glycosylation control technologies for recombinant therapeutic proteins." *Appl Microbiol Biotechnol*, **102**, 10457-10468.
- Hauptle, M. A., Hulsmeier, A. J. und Hennet, T. (2010). "HPLC and mass spectrometry analysis of dolichol-phosphates at the cell culture scale." *Analytical Biochemistry*, **396**, 133-138.
- Haynes, P. A. (1998). "Phosphoglycosylation: a new structural class of glycosylation?" *Glycobiology*, **8**, 1-5.
- Helenius, J., Ng, D. T. W., Marolda, C. L., Walter, P., Valvano, M. A. und Aebl, M. (2002). "Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein." *Nature (London, U. K.)*, **415**, 447-450.
- Herscovics, A. und Orlean, P. (1993). "Glycoprotein biosynthesis in yeast." *The FASEB Journal*, **7**, 540-550.
- Higel, F., Seidl, A., Sorgel, F. und Friess, W. (2016). "N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins." *Eur J Pharm Biopharm*, **100**, 94-100.
- Hofsteenge, J., Loeffler, A., Mueller, D. R., Richter, W. J., de Beer, T. und Vliegenthart, J. F. G. (1996). "Protein C-glycosylation." *TECHNIQUES IN PROTEIN CHEMISTRY*, 163-171.
- Hofsteenge, J., Mueller, D. R., de Beer, T., Loeffler, A., Richter, W. J. und Vliegenthart, J. F. G. (1994). "New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase Us." *Biochemistry*, **33**, 13524-30.
- Hunte, C., Von Jagow, G. und Schagger, H. (2003). "Membrane Protein Purification and Crystallization: Second Edition: A practical Guide." Academic Press, 316 pp.
- Ibata, K., Mizuno, M., Tanaka, Y. und Kageyu, A. (1984). "Long-chain polyprenols in the family Pinaceae." *Phytochemistry*, **23**, 783-6.
- Imbach, T., Schenk, B., Schollen, E., Burda, P., Stutz, A., Grünewald, S., Bailie, N. M., King, M. D., Jaeken, J., Matthijs, G., Berger, E. G., Aebi, M. und Hennet, T. (2000). "Deficiency of dolichol-phosphate-mannose synthase-1 causes congenital disorder of glycosylation type Ie." *Journal of Clinical Investigation*, **105**, 233-239.
- IUPAC, I. (2006). "IUPAC Gold Book." *Compendium of Chemical Terminology*.
- Jarrell, K. F., Ding, Y., Meyer, B. H., Albers, S.-V., Kaminski, L. und Eichler, J. (2014). "N-linked glycosylation in Archaea: a structural, functional, and genetic analysis." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **78**, 304-341, 39 pp.
- Jayanthi, S., Morris, J., Kachel, B., Al-Ameer, M., Henderson, R., Adams, P. und Krishnaswamy Suresh Kumar, T. (2015). "The Versatility of Isothermal Titration Calorimetry in Modern Biology." 6.
- Jensen, J. W. und Schutzbach, J. S. (1985). "Activation of dolichyl-phospho-mannose synthase by phospholipids." *Eur. J. Biochem.*, **153**, 41-8.
- Jensen, J. W. und Schutzbach, J. S. (1986). "Characterization of mannosyl-transfer reactions catalyzed by dolichyl-mannosyl-phosphate-synthase." *Carbohydr. Res.*, **149**, 199-208.
- Jeske, L., Placzek, S., Schomburg, I., Chang, A. und Schomburg, D. (2019). "BRENDA in 2019: a European ELIXIR core data resource." *Nucleic Acids Res*, **47**, D542-D549.
- Jozwiak, A., Lipko, A., Kania, M., Danikiewicz, W., Surmacz, L., Witek, A., Wojcik, J., Zdanowski, K., Pączkowski, C., Chojnacki, T., Poznanski, J. und Swiezewska, E. (2017). "Modeling of Dolichol Mass Spectra Isotopic Envelopes as a Tool to Monitor Isoprenoid Biosynthesis." *Plant Physiology*, **174**, 857-874.
- Jung, P. und Tanner, W. (1973). "Identification of the lipid intermediate in yeast mannan biosynthesis." *Eur. J. Biochem.*, **37**, 1-6.
- Kennedy, J. F. und Yuyun, E. (2010). "Carbohydrates: The Essential Molecules of Life by R.V. Stick, S.J. Williams, 2nd Edition." *Carbohydr. Polym.*, **82**, 1325-1326.
- Kim, S., Westphal, V., Srikrishna, G., Mehta, D. P., Peterson, S., Filiano, J., Karnes, P. S., Patterson, M. C. und Freeze, H. H. (2000). "Dolichol phosphate mannose synthase (DPM1) mutations define congenital disorder of glycosylation Ie (CDG-Ie)." *J. Clin. Invest.*, **105**, 191-198.

- Kinoshita, T. und Fujita, M. (2016). "Biosynthesis of GPI-anchored proteins: special emphasis on GPI lipid remodeling." *J. Lipid Res.*, **57**, 6-24.
- Klein, C., Bacac, M., Umana, P. und Wenger, M. "Obinutuzumab (Gazyva), a novel glycoengineered type II CD20 antibody for the treatment of chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma." 1695-1732.
- Krasnova, L. und Wong, C.-H. (2016). "Understanding the Chemistry and Biology of Glycosylation with Glycan Synthesis." *Annu. Rev. Biochem.*, **85**, 599-630.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature*, **227**, 680-5.
- Lagasse, H. A., Alexaki, A., Simhadri, V. L., Katagiri, N. H., Jankowski, W., Sauna, Z. E. und Kimchi-Sarfaty, C. (2017). "Recent advances in (therapeutic protein) drug development." *F1000Res*, **6**, 113.
- Lamani, E., Mewbourne, R. B., Fletcher, D. S., Maltsev, S. D., Danilov, L. L., Veselovsky, V. V., Lozanova, A. V., Grigorieva, N. Y., Pinsker, O. A., Xing, J., Forsee, W. T., Cheung, H. C., Schutzbach, J. S., Shibaev, V. N. und Jedrzejewski, M. J. (2006). "Structural studies and mechanism of *Saccharomyces cerevisiae* dolichyl-phosphate-mannose synthase: insights into the initial step of synthesis of dolichyl-phosphate-linked oligosaccharide chains in membranes of endoplasmic reticulum." *Glycobiology*, **16**, 666-678.
- Larkin, A. und Imperiali, B. (2011). "The expanding horizons of asparagine-linked glycosylation." *Biochemistry*, **50**, 4411-4426.
- Lehle, L., Strahl, S. und Tanner, W. (2006). "Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases." *Angew. Chem., Int. Ed.*, **45**, 6802-6818.
- Liu, C.-P., Tsai, T.-I., Cheng, T., Shivatare, V. S., Wu, C.-Y. und Wong, C.-H. (2018). "Glycoengineering of antibody (Herceptin) through yeast expression and in vitro enzymatic glycosylation." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **115**, 720-725.
- Loibl, M. und Strahl, S. (2013). "Protein O-mannosylation: What we have learned from baker's yeast." *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.*, **1833**, 2438-2446.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M. und Henriksat, B. (2014). "The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013." *Nucleic Acids Res.*, **42**, D490-D495.
- Lorenzoni, A. S. G., Aydos, L. F., Klein, M. P., Ayub, M. A. Z., Rodrigues, R. C. und Hertz, P. F. (2015). "Continuous production of fructooligosaccharides and invert sugar by chitosan immobilized enzymes: Comparison between in fluidized and packed bed reactors." *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **111**, 51-55.
- Manabe, S., Marui, Y. und Ito, Y. (2003). "Total synthesis of mannosyl tryptophan and its derivatives." *Chemistry*, **9**, 1435-47.
- Marblestone, J. G., Edavettal, S. C., Lim, Y., Lim, P., Zuo, X. und Butt, T. R. (2006). "Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: Enhanced expression and solubility with SUMO." *Protein Sci.*, **15**, 182-189.
- McDowell, W. und Schwarz, R. T. (1989). "Specificity of GDP-Man:dolichyl-phosphate mannosyltransferase for the guanosine diphosphate esters of mannose analogs containing deoxy and deoxyfluoro substituents." *FEBS Lett.*, **243**, 413-16.
- Meinschein, W. G. (1995). "Organic Geochemistry: Principles and Applications edited by Michael H. Engel and Stephen A. Macko." *Geochim. Cosmochim. Acta*, **59**, 4785.
- Mescher, M. F. und Strominger, J. L. (1976). "Purification and characterization of a prokaryotic glycoprotein from the cell envelope of *Halobacterium salinarium*." *J. Biol. Chem.*, **251**, 2005-14.
- Michaelis, L., Menten, M. L., Johnson, K. A. und Goody, R. S. (2011). "The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper." *Biochemistry*, **50**, 8264-9.
- Mitra, N., Sharon, N. und Surolia, A. (2003). "Role of N-Linked Glycan in the Unfolding Pathway of *Erythrina corallodendron* Lectin." *Biochemistry*, **42**, 12208-12216.
- Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F. und Abdul Wahab, R. (2015). "An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes." *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, **29**, 205-220.

- Molday, L. L. und Molday, R. S. (2014). "1D4: a versatile epitope tag for the purification and characterization of expressed membrane and soluble proteins." *Methods Mol Biol*, **1177**, 1-15.
- Nakayama, K., Nagasu, T., Shimma, Y., Kuromitsu, J. und Jigami, Y. (1992). "OCH1 encodes a novel membrane bound mannosyltransferase: outer chain elongation of asparagine-linked oligosaccharides." *EMBO J.*, **11**, 2511-19.
- Neubauer, P., Åhman, M., Törnkvist, M., Larsson, G. und Enfors, S. O. (1995). "Response of guanosine tetraphosphate to glucose fluctuations in fed-batch cultivations of *Escherichia coli*." *Journal of Biotechnology*, **43**, 195-204.
- Nothaft, H. und Szymanski, C. M. (2010). "Protein glycosylation in bacteria: Sweeter than ever." *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**, 765-778.
- Orlean, P., Albright, C. und Robbins, P. W. (1988). "Cloning and sequencing of the yeast gene for dolichol phosphate mannose synthase, an essential protein." *J. Biol. Chem.*, **263**, 17499-507.
- Palamarczyk, G., Lehle, L., Mankowski, T., Chojnacki, T. und Tanner, W. (1980). "Specificity of solubilized yeast glycosyl transferases for polyprenyl derivatives." *Eur. J. Biochem.*, **105**, 517-23.
- Parker, J. L. und Newstead, S. (2014). "Method to increase the yield of eukaryotic membrane protein expression in *Saccharomyces cerevisiae* for structural and functional studies." *Protein Sci.*, **23**, 1309-1314.
- Perlińska-Lenart, U., Orłowski, J., Laudy, A. E., Zdebska, E., Palamarczyk, G. und Kruszewska, J. S. (2006). "Glycoprotein hypersecretion alters the cell wall in *Trichoderma reesei* strains expressing the *Saccharomyces cerevisiae* dolichylphosphate mannose synthase gene." *Appl Environ Microbiol*, **72**, 7778-7784.
- Peschard, P., Kozlov, G., Lin, T., Mirza, I. A., Berghuis, A. M., Lipkowitz, S., Park, M. und Gehring, K. (2007). "Structural Basis for Ubiquitin-Mediated Dimerization and Activation of the Ubiquitin Protein Ligase Cbl-b." *Molecular Cell*, **27**, 474-485.
- Peterson, Michelle E., Daniel, Roy M., Danson, Michael J. und Eisenthal, R. (2007). "The dependence of enzyme activity on temperature: determination and validation of parameters." *Biochemical Journal*, **402**, 331-337.
- Rajaratnam, K. und Rosgen, J. (2014). "Isothermal titration calorimetry of membrane proteins - Progress and challenges." *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, **1838**, 69-77.
- Ramirez, A. S., Boilevin, J., Lin, C. W., Ha Gan, B., Janser, D., Aebi, M., Darbre, T., Reymond, J. L. und Locher, K. P. (2017). "Chemo-enzymatic synthesis of lipid-linked GlcNAc2Man5 oligosaccharides using recombinant Alg1, Alg2 and Alg11 proteins." *Glycobiology*, **27**, 726-733.
- Rana, H., Moussatche, P., Rocha, L. S., Abdellaoui, S., Minter, S. D. und Moomaw, E. W. (2016). "Isothermal titration calorimetry uncovers substrate promiscuity of bicupin oxalate oxidase from *Ceriporiopsis subvermispora*." *Biochemistry and Biophysics Reports*, **5**, 396-400.
- Reininger, W. R. (2012). "Phytansäure, eine beinahe übersehene verzweigt-kettige Fettsäure in der menschlichen Ernährung," Ernährungswissenschaften, Universität Wien, Wien.
- Reiss, G., te Heesen, S., Zimmerman, J., Robbins, P. W. und Aebi, M. (1996). "Isolation of the ALG6 locus of *Saccharomyces cerevisiae* required for glucosylation in the N-linked glycosylation pathway." *Glycobiology*, **6**, 493-498.
- Revers, L., Bill, R. M., Wilson, I. B. H., Watt, G. M. und Flitsch, S. L. (1999). "Development of recombinant, immobilized β -1,4-mannosyltransferase for use as an efficient tool in the chemoenzymatic synthesis of N-linked oligosaccharides." *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, **1428**, 88-98.
- Rexer, T. F. T., Schildbach, A., Klapproth, J., Schierhorn, A., Mahour, R., Pietzsch, M., Rapp, E. und Reichl, U. (2018). "One pot synthesis of GDP-mannose by a multi-enzyme cascade for enzymatic assembly of lipid-linked oligosaccharides." *Biotechnol. Bioeng.*, **115**, 192-205.

- Riedell, W. E. und Miernyk, J. A. (1988). "Glycoprotein synthesis in maize endosperm cells: the nucleoside diphosphate-sugar: dolichol-phosphate glycosyltransferases." *Plant Physiol*, **87**, 420-6.
- Roche. (2016). "Take control of glycosylation - Discover in vitro glycoengineering." GmbH, R. D., ed., Roche Diagnostics GmbH, Mannheim.
- Ruiz-Baca, E., Villagomez-Castro, J. C., Leal-Morales, C. A., Sabanero-Lopez, M., Flores-Carreón, A. und Lopez-Romero, E. (2005). "Biosynthesis of glycoproteins in the human pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*: synthesis of dolichol phosphate mannose and mannoproteins by membrane-bound and solubilized mannosyl transferases." *Antonie van Leeuwenhoek*, **88**, 221-30.
- Rush, J. S. (2015). "Role of Flippases in Protein Glycosylation in the Endoplasmic Reticulum." *Lipid Insights*, **8**, 45-53.
- Rush, J. S. und Waechter, C. J. (1995). "Transmembrane movement of a water-soluble analog of mannosylphosphoryldolichol is mediated by an endoplasmic reticulum protein." *J. Cell Biol.*, **130**, 529-36.
- Sacks, D. L., Modi, G., Rowton, E., Spath, G., Epstein, L., Turco, S. J. und Beverley, S. M. (2000). "The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 406-411.
- Sambrook, J. und Russell, D. W. (2006). "Transformation of *E. coli* by Electroporation." *CSH Protoc*, **2006**.
- Samuelson, J., Banerjee, S., Magnelli, P., Cui, J., Kelleher, D. J., Gilmore, R. und Robbins, P. W. (2005). "The diversity of dolichol-linked precursors to Asn-linked glycans likely results from secondary loss of sets of glycosyltransferases." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 1548-1553.
- Santos, A. L. und Lindner, A. B. (2017). "Protein Posttranslational Modifications: Roles in Aging and Age-Related Disease." *Oxid Med Cell Longev*, **2017**, 5716409.
- Sanyal, S. und Menon, A. K. (2010). "Stereoselective transbilayer translocation of mannosyl phosphoryl dolichol by an endoplasmic reticulum flippase." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 11289-11294, S11289/1-S11289/4.
- Scheiffele, P. und Fullekrug, J. (2000). "Glycosylation and protein transport." *Essays Biochem*, **36**, 27-35.
- Schmaltz, R. M., Hanson, S. R. und Wong, C. H. (2011). "Enzymes in the synthesis of glycoconjugates." *Chemical Reviews*, **111**, 4259-307.
- Schuldiner, M., Metz, J., Schmid, V., Denic, V., Rakwalska, M., Schmitt, H. D., Schwappach, B. und Weissman, J. S. (2008). "The GET complex mediates insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane." *Cell (Cambridge, MA, U. S.)*, **134**, 634-645.
- Schutzbach, J. S., Zimmerman, J. W. und Forsee, W. T. (1993). "The purification and characterization of recombinant yeast dolichyl-phosphate-mannose synthase. Site-directed mutagenesis of the putative dolichol recognition sequence." *J Biol Chem*, **268**, 24190-6.
- Sethuraman, N. und Stadheim, T. A. (2006). "Challenges in therapeutic glycoprotein production." *Curr Opin Biotechnol*, **17**, 341-6.
- Sharma, C. B., Knauer, R. und Lehle, L. (2001). "Biosynthesis of lipid-linked oligosaccharides in yeast: the ALG3 gene encodes the Dol-P-Man:Man5GlcNAc2-PP-Dol mannosyltransferase." *Biol. Chem.*, **382**, 321-328.
- Shibaev, V. N., Veselovsky, V. V., Lozanova, A. V., Maltsev, S. D., Danilov, L. L., Forsee, W. T., Xing, J., Cheung, H. C. und Jedrzejewski, M. J. (2000). "Synthesis of dolichyl phosphate derivatives with fluorescent label at the ω -end of the chain, new tools to study protein glycosylation." *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, 189-192.
- Shrimal, S., Cherepanova, N. A. und Gilmore, R. (2015). "Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of proteins in the endoplasmic reticulum." *Semin. Cell Dev. Biol.*, **41**, 71-78.
- Snider, M. D. und Rogers, O. C. (1984). "Transmembrane movement of oligosaccharide-lipids during glycoprotein synthesis." *Cell (Cambridge, Mass.)*, **36**, 753-61.

- Sola, R. J. und Griebenow, K. (2010). "Glycosylation of therapeutic proteins: an effective strategy to optimize efficacy." *BioDrugs*, **24**, 9-21.
- Sprung, I., Carmes, L., Watt, G. M. und Flitsch, S. L. (2003). "Synthesis of novel acceptor substrates for the dolichyl phosphate mannose synthase from yeast." *ChemBioChem*, **4**, 319-332.
- Sprung, I., Ziegler, A. und Flitsch, S. L. (2002). "Enzymatic synthesis of [small beta]-mannosyl phosphates on solid support." *Chemical Communications*, 2676-2677.
- Stagljar, I., te Heesen, S. und Aebi, M. (1994). "New phenotype of mutations deficient in glucosylation of the lipid-linked oligosaccharide: cloning of the ALG8 locus." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 5977-81.
- Su, P.-C., Si, W., Baker, D. L. und Berger, B. W. (2013). "High-yield membrane protein expression from *E. coli* using an engineered outer membrane protein F fusion." *Protein Sci.*, **22**, 434-443.
- Szymanski, C. M., Yao, R., Ewing, C. P., Trust, T. J. und Guerry, P. (1999). "Evidence for a system of general protein glycosylation in *Campylobacter jejuni*." *Mol. Microbiol.*, **32**, 1022-1030.
- Terstappen, G. C. und Reggiani, A. (2001). "In silico research in drug discovery." *Trends Pharmacol. Sci.*, **22**, 23-26.
- Thomann, M., Reckermann, K., Reusch, D., Prasser, J. und Tejada, M. L. (2016). "Fc-galactosylation modulates antibody-dependent cellular cytotoxicity of therapeutic antibodies." *Mol. Immunol.*, **73**, 69-75.
- Umana, P., Jean-Mairet, J., Moudry, R., Amstutz, H. und Bailey, J. E. (1999). "Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity." *Nat. Biotechnol.*, **17**, 176-180.
- Urushibata, Y., Ebisu, S. und Matsui, I. (2008). "A thermostable dolichol phosphoryl mannose synthase responsible for glycoconjugate synthesis of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*." *Extremophiles*, **12**, 665-76.
- Usmani, S. S., Bedi, G., Samuel, J. S., Singh, S., Kalra, S., Kumar, P., Ahuja, A. A., Sharma, M., Gautam, A. und Raghava, G. P. S. (2017). "THPdb: database of FDA-approved peptide and protein therapeutics." *PLoS ONE*, **12**, e0181748/1-e0181748/12.
- Valderrama-Rincon, J. D., Fisher, A. C., Merritt, J. H., Fan, Y.-Y., Reading, C. A., Chhiba, K., Heiss, C., Azadi, P., Aebi, M. und DeLisa, M. P. (2012). "An engineered eukaryotic protein glycosylation pathway in *Escherichia coli*." *Nat Chem Biol*, **8**, 434-436.
- Van den Steen, P., Rudd, P. M., Dwek, R. A. und Opdenakker, G. (1998). "Concepts and principles of O-linked glycosylation." *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **33**, 151-208.
- Verostek, M. F., Atkinson, P. H. und Trimble, R. B. (1991). "Structure of *Saccharomyces cerevisiae* alg3,sec18 mutant oligosaccharides." *J. Biol. Chem.*, **266**, 5547-51.
- Villagomez-Castro, J. C., Calvo-Mendez, C., Vargas-Rodriguez, L., Flores-Carreón, A. und Lopez-Romero, E. (1998). "Entamoeba histolytica: solubilization and biochemical characterization of dolichol phosphate mannose synthase, an essential enzyme in glycoprotein biosynthesis." *Exp. Parasitol.*, **88**, 111-120.
- Wacker, C., Berger, C. N., Girard, P. und Meier, R. (2011). "Glycosylation profiles of therapeutic antibody pharmaceuticals." *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **79**, 503-507.
- Walsh, R. M. und Martin, P. A. (1977). "Growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in a temperature gradient incubator." *Journal of the Institute of Brewing*, **83**, 169-172.
- Wang, J., Suhre, M. H. und Scheibel, T. (2019). "A mussel polyphenol oxidase-like protein shows thiol-mediated antioxidant activity." *Eur. Polym. J.*, **113**, 305-312.
- Wang, L. W., Leonhard-Melief, C., Haltiwanger, R. S. und Apte, S. S. (2009). "Post-translational Modification of Thrombospondin Type-1 Repeats in ADAMTS-like 1/Punctin-1 by C-Mannosylation of Tryptophan." *J. Biol. Chem.*, **284**, 30004-30015.
- Wedgwood, J. F., Strominger, J. L. und Warren, C. D. (1974). "Transfer of sugars from nucleoside diphosphosugar compounds to endogenous and synthetic dolichyl phosphate in human lymphocytes." *J. Biol. Chem.*, **249**, 6316-24.

- Wei, Y., Li, C., Huang, W., Li, B., Strome, S. und Wang, L.-X. (2008). "Glycoengineering of Human IgG1-Fc through Combined Yeast Expression and in Vitro Chemoenzymatic Glycosylation." *Biochemistry*, **47**, 10294-10304.
- Wen, R., Lam, B. L. und Guan, Z. (2013). "Aberrant dolichol chain lengths as biomarkers for retinitis pigmentosa caused by impaired dolichol biosynthesis." *Journal of Lipid Research*, **54**, 3516-3522.
- Werner, A., Horstkorte, R., Glanz, D., Biskup, K., Blanchard, V., Berger, M. und Bork, K. (2012). "Glycoengineering the N-acyl side chain of sialic acid of human erythropoietin affects its resistance to sialidase." *Biol. Chem.*, **393**, 777-783.
- Wild, R., Kowal, J., Eyring, J., Ngwa, E. M., Aebi, M. und Locher, K. P. (2018). "Structure of the yeast oligosaccharyltransferase complex gives insight into eukaryotic N-glycosylation." *Science*, **359**, 545-550.
- Wilson, I. B., Taylor, J. P., Webberley, M. C., Turner, N. J. und Flitsch, S. L. (1993). "A novel mono-branched lipid phosphate acts as a substrate for dolichyl phosphate mannose synthetase." *Biochemical Journal*, **295**, 195-201.
- Wilson, I. B. H., Webberley, M. C., Revers, L. und Flitsch, S. L. (1995). "Dolichol is not a necessary moiety for lipid-linked oligosaccharide substrates of the mannosyltransferases involved in in vitro N-linked-oligosaccharide assembly." *Biochem. J.*, **310**, 909-16.
- Xing, J., Forsee, W. T., Lamani, E., Maltsev, S. D., Danilov, L. L., Shibaev, V. N., Schutzbach, J. S., Cheung, H. C. und Jedrzejewski, M. J. (2000). "Investigations of the Active Site of *Saccharomyces cerevisiae* Dolichyl-Phosphate-Mannose Synthase Using Fluorescent Labeled Dolichyl-Phosphate Derivatives." *Biochemistry*, **39**, 7886-7894.
- Xu, C. und Ng, D. T. W. (2015). "Glycosylation-directed quality control of protein folding." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **16**, 742.
- Yang, A. C., Ng, B. G., Moore, S. A., Rush, J., Waechter, C. J., Raymond, K. M., Willer, T., Campbell, K. P., Freeze, H. H. und Mehta, L. (2013a). "Congenital disorder of glycosylation due to DPM1 mutations presenting with dystroglycanopathy-type congenital muscular dystrophy." *Molecular Genetics and Metabolism*, **110**, 345-351.
- Yang, S., Matsen, J. B., Konopka, M., Green-Saxena, A., Clubb, J., Sadilek, M., Orphan, V. J., Beck, D. und Kalyuzhnaya, M. G. (2013b). "Global Molecular Analyses of Methane Metabolism in Methanotrophic Alphaproteobacterium, *Methylosinus trichosporium* OB3b. Part II. Metabolomics and ¹³C-Labeling Study." *Front Microbiol*, **4**, 70.
- Yu, X., Marshall, M. J. E., Cragg, M. S. und Crispin, M. (2017). "Improving Antibody-Based Cancer Therapeutics Through Glycan Engineering." *BioDrugs*, **31**, 151-166.
- Zembek, P., Perlinska-Lenart, U., Brunner, K., Reithner, B., Palamarczyk, G., Mach, R. L. und Kruszewska, J. S. (2011). "Elevated activity of dolichyl phosphate mannose synthase enhances biocontrol abilities of *Trichoderma atroviride*." *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **24**, 1522-1529.
- Zhu, B. C. R. und Laine, R. A. (1996). "Dolichyl-phosphomannose synthase from the Archae Thermoplasma acidophilum." *Glycobiology*, **6**, 811-816.
- Zielinska, D. F., Gnad, F., Schropp, K., Wisniewski, J. R. und Mann, M. (2012). "Mapping N-glycosylation sites across seven evolutionarily distant species reveals a divergent substrate proteome despite a common core machinery." *Mol Cell*, **46**, 542-8.
- Zimmerman, J. W. und Robbins, P. W. (1993). "The hydrophobic domain of dolichyl-phosphate-mannose synthase is not essential for enzyme activity or growth in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem*, **268**, 16746-53.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 N-Glykosylierung in Eukaryoten.	3
Abb. 1.2 Reaktionsschema der Dpm1 aus <i>S. cerevisiae</i>	6
Abb. 1.3 Hypothetischer Weg des Einbaus von TA-Proteinen in die ER-Membran.	7
Abb. 1.4 Biotechnologische Ansätze zur Produktion heterogener therapeutischer Proteine.	12
Abb. 2.1 Schematischer Ablauf der Isolierung von - und Immobilisierung an STREAMLINE Chelating (GE) von His ₆ -SUMO-Dpm1.	32
Abb. 2.2 Schematischer Ablauf des Standard His ₆ -SUMO-Dpm1-Aktivitätstest.	35
Abb. 2.3 Schema Aufarbeitung von DoIPM aus kontinuierlicher Produktion.	37
Abb. 3.1 His ₆ -SUMO-Dpm1-Reinigung mittels Affinitätschromatographie.	41
Abb. 3.2 Nicht-radioaktiver His ₆ -SUMO-Dpm1-Aktivitätsassay.	44
Abb. 3.3 Kinetische Untersuchung der His ₆ -SUMO-Dpm1 in Abhängigkeit von zweiwertigen Metallionen.	46
Abb. 3.4 Kinetische Untersuchung der His ₆ -SUMO-Dpm1 in Abhängigkeit von der Temperatur.	47
Abb. 3.5 Kinetische Untersuchung der His ₆ -SUMO-Dpm1 in Abhängigkeit vom Lipidphosphatanker.	48
Abb. 3.6 Untersuchung der GDP bzw. GDPM-Wechselwirkung mit der His ₆ -SUMO-Dpm1 mittels ITC.	50
Abb. 3.7 Untersuchung der His ₆ -SUMO-Dpm1-Aktivität adsorbiert an STREAMLINE Chelating Affinitätschromatographiematerial.	52
Abb. 3.8 Kontinuierliche His ₆ -SUMO-Dpm1-Reaktion.	54
Abb. 3.9 His ₆ -SUMO-Dpm1-Produktaufarbeitung.	56
Abb. 3.10 ESI-MS Analyse von DoIP und DoIPM.	57
Abb. 3.11 Milde saure Hydrolyse von DoIPM.	59
Abb. 10.1 Vektorkarte von pETSUMOadapt.	85
Abb. 10.2 WB-Analyse von Zellsuspensionsproben.	86
Abb. 10.3 Exemplarische GDPM- und GDP-Kalibriergeraden.	87
Abb. 10.4 Enzymatischer Aktivitätsassay mit GDP-[¹⁴ C]M mit der His ₆ -SUMO-Dpm1.	88
Abb. 10.5 Progresskurven der kinetischen His ₆ -SUMO-Dpm1 Untersuchung.	89
Abb. 10.6 LC-ESI-MS Analyse von PhytP und PhytPM.	90
Abb. 10.7 IGEPAL® CA-630 (Merck, Darmstadt) Struktur.	91
Abb. 10.8 Untersuchung der MeOH-Fällung von DoIPM.	91

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1 Übersicht über die verwendeten Chemikalien.....	19
Tab. 2.2 Übersicht über die verwendeten Stammlösungen.....	23
Tab. 2.3 Übersicht über den verwendeten Organismus.....	25
Tab. 2.4 Übersicht über den verwendeten Vektor.....	25
Tab. 2.5 Übersicht über die verwendeten Marker und Antikörper.....	25
Tab. 2.6 Übersicht über die verwendeten Geräte.....	26
Tab. 2.7 Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele.....	33
Tab. 3.1 DoIP- und DoIPM-Molekülmassen.....	58
Tab. 4.1 Kinetische Parameter der Dpm1 aus <i>S. cerevisiae</i>	63

10 Anhang

10.1 *S. cerevisiae* Wildtyp DPM1-Gen DNA-Sequenz (YPR183W, S000006387)

ATGAGCATCGAATACTCTGTTATCGTTCCTCCGCTTACCATGAAAAGCTGAACATCAAACCCCTTAACAAC
 CAGATTGTTTGCCGGCATGAGCCCTGAAATGGCCAAGAAGACCGAGTTGATCTTTGTTCGATGACAAC
 CACAGGATGGCTCCGTTGAGGAGGTGGACGCCCTAGCTCACCAAGGCTACAACGTCCTCGCATCATCGTC
 AGGACAAATGAACGTGGTCTATCCTCCGCCGTGCTTAAGGGTTTCTACGAGGCCAAGGGTCAGTACCT
 GGTATGCATGGACGCAGACCTACAACACCCTCCAGAGACCGTGCCTAAGTTGTTTCGAGTCTTTGCACG
 ATCACGCCTTTACTCTGGGCACCAGATATGCCCCAGGTGTCGGCATTGACAAGGACTGGCCTATGTAC
 AGACGCGTCATTTCTCCACTGCTAGAATGATGGCCAGACCTTTGACCATCGCCTCCGACCCCATGAG
 CGGGTTCTTCGGTCTACAAAAGAAGTACCTCGAAAAGTGAACCCCTAGGGACATCAACTCGCAAGGTT
 TCAAGATTGCCCTCGAGCTTCTCGCCAAGCTTCTTCCAAGAGACCCTAGAGTGGCGATCGGCGAA
 GTGCCATTCACTTTCGGCGTGAGAACGGAAGGTGAATCCAAACTGTCAGGTAAGTCAATTATCCAATA
 CTTGCAACAACCTTAAGGAGCTCTACGTCTTCAAGTTTGGCGCCAATAACCTTATCCTTTTCATTACTT
 TCTGGTCCATTCTGTTCTTCTACGTTTGCTACCAGCTATAACCATTTGGTCTTTTAA

10.2 pETSUMOadapt-Vektorkarte

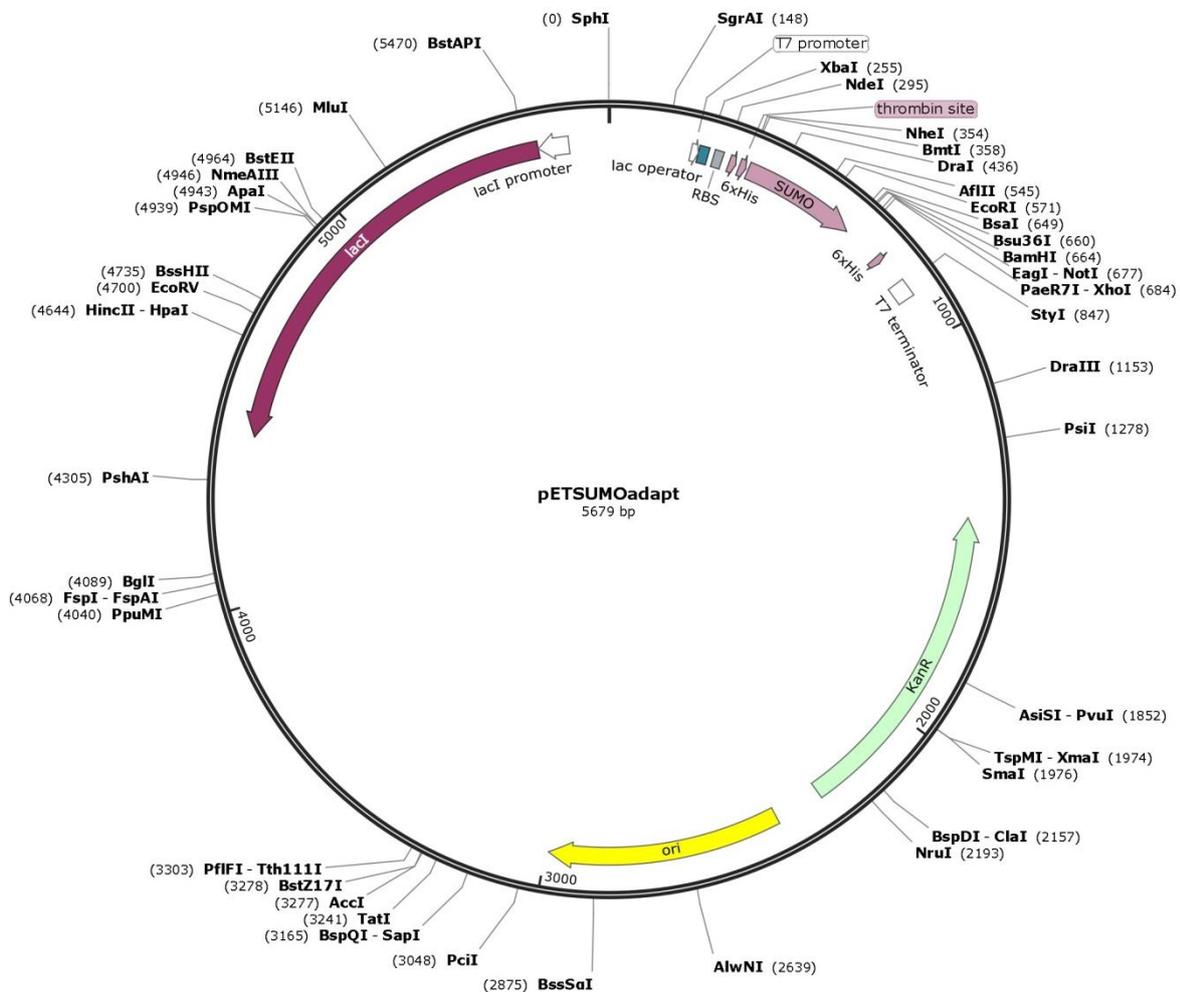


Abb. 10.1 Vektorkarte von pETSUMOadapt. Hersteller: Firma Invitrogen [Bosse-Doenecke *et al.*, 2010].

10.3 His₆-SUMO-Dpm1 Proteinsequenz

MGSSHHHHHSGSLVPRGSASMSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPLRR
 LMEAFAKRQ GKEMDSLRFLYDGIRIQADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQIGGMSIEYSVIVPAYHEKLN
 IKPLTTRLFAGMSPMAKKTIELIFVDDNSQDGSVEEVDALAHQGYNVRIIVRTNERGLSSAVLKGfYE
 AKGQYLVCMDADLQHPPEVTPKLFESLHDHAFTLGTRYAPGVGIDKDWPMYRRVISSTARMMARPLTI
 ASDPMSGFFGLQKKYLENCNPRDINSQGFKIALELLAKLPLPRDPRVAIGEVPFTFGVRTEGESKLSG
 KVIIQYLQQLKELYVFKFGANNLILFITFWSILFFYVCYQLYHLVF

10.4 WB-Nachweis der His₆-SUMO-Dpm1-Produktion

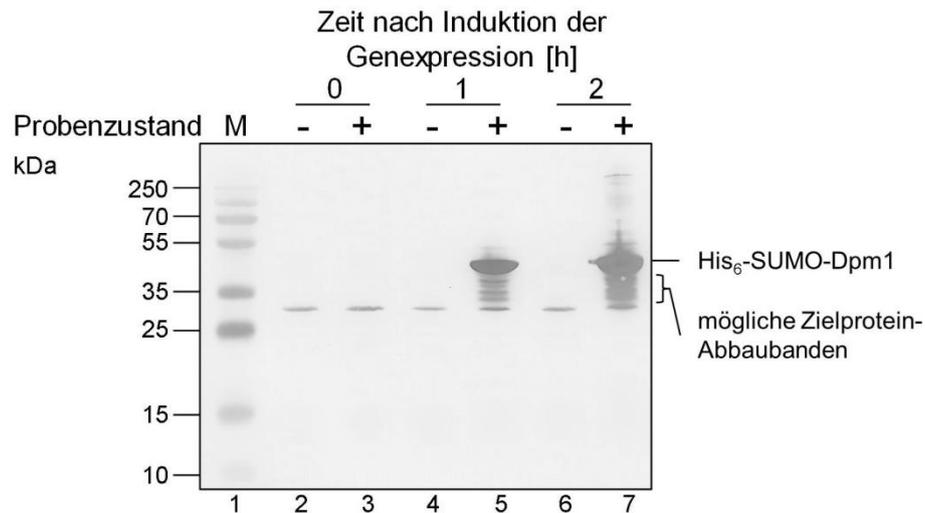


Abb. 10.2 WB-Analyse von Zellsuspensionsproben. $1/OD_{600}$ *E. coli* BL21-Gold(DE3) pETSUMO-DPM1 Zellsuspensionsproben zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Induktion der Genexpression mit IPTG. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE (2.2.4.2) getrennt und im Anschluss ein Elektrobplot zur Fixierung der Proteine durchgeführt (2.2.4.3). Primärer Antikörper: anti-Poly-His-Antikörper und Detektion mittels AP-Reaktion. M - Molekulargewichtsmarker [kDa], (+) - Induktion der Genexpression erfolgt, (-) - Induktion der Genexpression nicht erfolgt (mitgeführte Kontrollkultur). Potenzielle Proteinbande der His₆-SUMO-Dpm1 ist gekennzeichnet. Darunter befinden sich weitere, weniger abundante Proteinsignale, die auf Zielproteinabbau hindeuten könnten.

10.5 Exemplarische Kalibriergeraden für GDP und GDPM

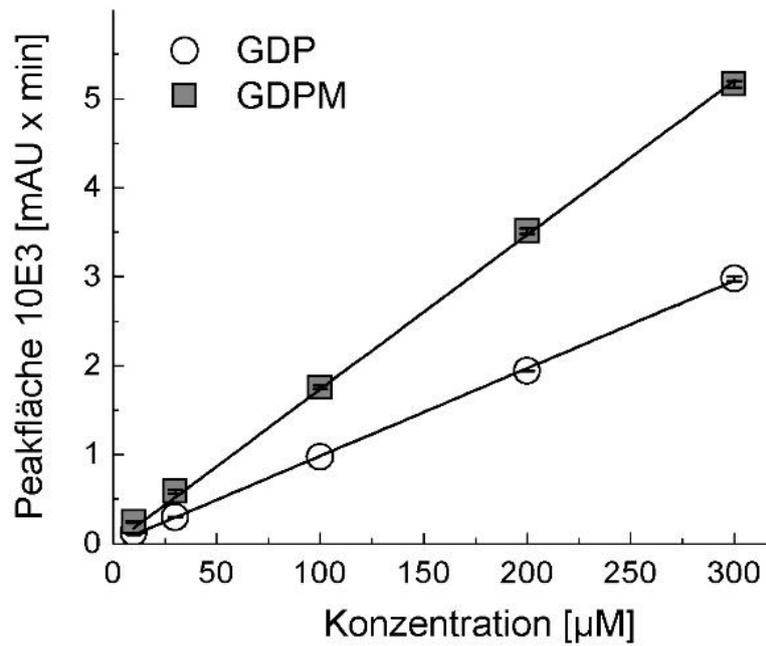


Abb. 10.3 Exemplarische GDPM- und GDP-Kalibriergeraden. Zu jeder experimentellen Einheit wurde eine Kalibriergerade erstellt, die den linearen Zusammenhang zwischen integrierten Peakflächen von GDP und GDPM im HPLC-Chromatogramm und der eingesetzten Konzentration des Analyten darstellt. Exemplarisch werden hier zwei Kalibriergeraden dargestellt. Für GDP: $Y = 9,85 \times c$, $R^2 = 0,99982$ bzw. $17,35$, $0,99962$. Die Proben der Kalibrierung wurden nach der gleichen Vorgehensweise wie die Reaktionsproben hergestellt (2.2.5.3). $n = 2$.

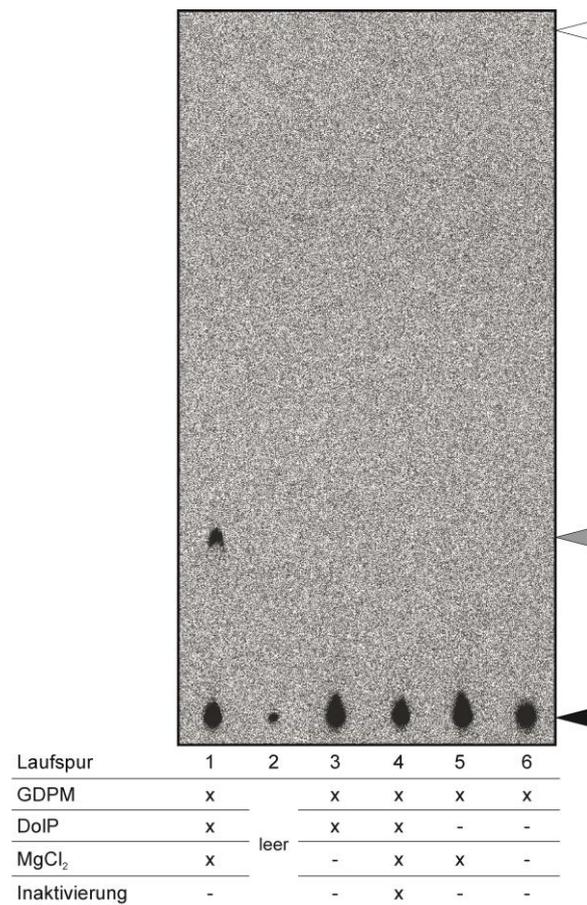
10.6 Radioaktiver His₆-SUMO-Dpm1-Kontrollassay mit GDP-[¹⁴C]M

Abb. 10.4 Enzymatischer Aktivitätsassay mit GDP-[¹⁴C]M mit der His₆-SUMO-Dpm1. Der Assay wurde nach Standardreaktionsbedingungen durchgeführt (2.2.5.3). Die Bedingungen der Autoradiographie werden in 2.2.5.5 beschrieben. Die Proteinkonzentration betrug 12 µg mL⁻¹. Die DoIP-Konzentration betrug 200 µM und die GDPM-Konzentration 100 µM. Die Enzyminaktivierung wurde durch die Inkubation bei 95 °C für 5 min und anschließender Inkubation auf Eis vor der Präinkubation zum Aktivitätsassay erreicht. GDPM (R_f-Wert 0,0, schwarzes Dreieck, Chromatographie-Startpunkt) und ein Signal, bei dem es sich um DoIP (R_f-Wert ~0,37, graues Dreieck) handeln könnte, kann in Laufspur 1 erkannt werden. In dieser Reaktion wurde das Protein nicht hitzeinaktiviert, DoIP und MgCl₂ wurden zugesetzt. In den Laufspuren 3-6 (Kontrollreaktionen) wurde entweder kein DoIP oder MgCl₂ zugesetzt oder das Protein vor der Reaktion hitzeinaktiviert. Das weiße Dreieck markiert das Ende der Chromatographie. Ein (x) bedeutet wurde zugesetzt bzw. wurde durchgeführt.

10.7 Progresskurven der kinetischen Untersuchung von DoIP und PhytP in Abhängigkeit von der GDPM-Konzentration

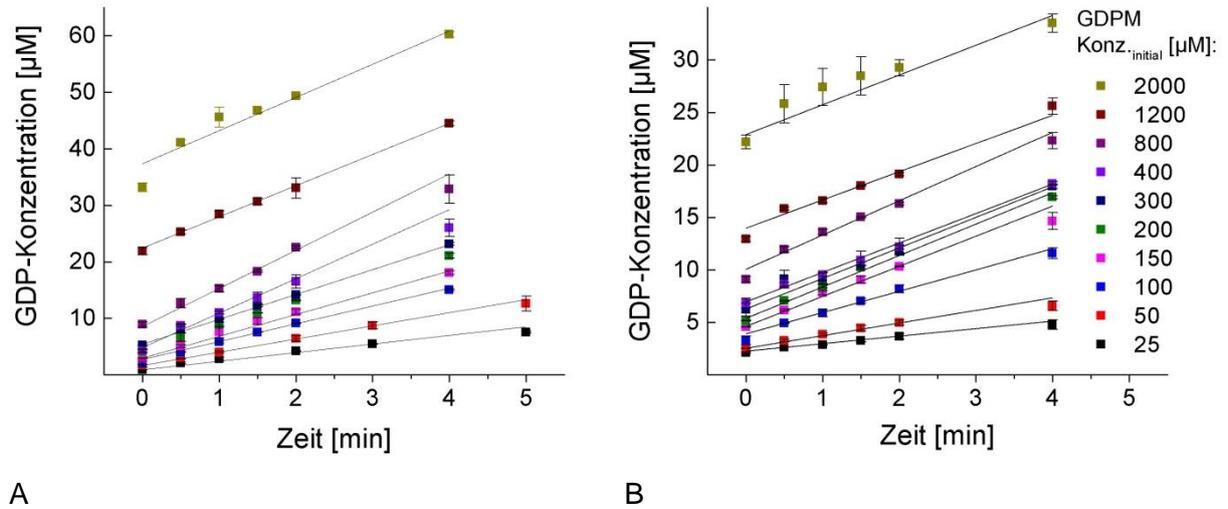


Abb. 10.5 Progresskurven der kinetischen His₆-SUMO-Dpm1 Untersuchung. Der enzymatische Assay wurde unter Standardaktivitätstestbedingungen in Reaktionspuffer in Gegenwart von 10 mM MgCl₂ durchgeführt (2.2.5.3). A - Progresskurven erstellt nach Reaktionen unter Verwendung des Substrates DoIP. Die Proteinkonzentration betrug 1,0 µg mL⁻¹. Die DoIP-Konzentration betrug 200 µM und die GDPM-Konzentration wurde zwischen 25 und 2.000 µM variiert. Die Reaktionszeit lag zwischen 0 und 4 min. B - Progresskurven erstellt nach Reaktionen unter Verwendung des Substrates PhytP. Die Proteinkonzentration betrug 0,5 µg mL⁻¹. Die PhytP-Konzentration betrug 200 µM und die GDPM-Konzentration wurde zwischen 25 und 2.000 µM variiert. Die Reaktionszeit lag zwischen 0 und 5 min. Die initialen Reaktionsgeschwindigkeiten wurden linear extrapoliert und die jeweiligen Steigungen in Abb. 3.5 gegen die verwendete GDPM-Konzentration aufgetragen. n = 2.

10.8 Massenspektrometrischer Nachweis von PhytP und PhytPM

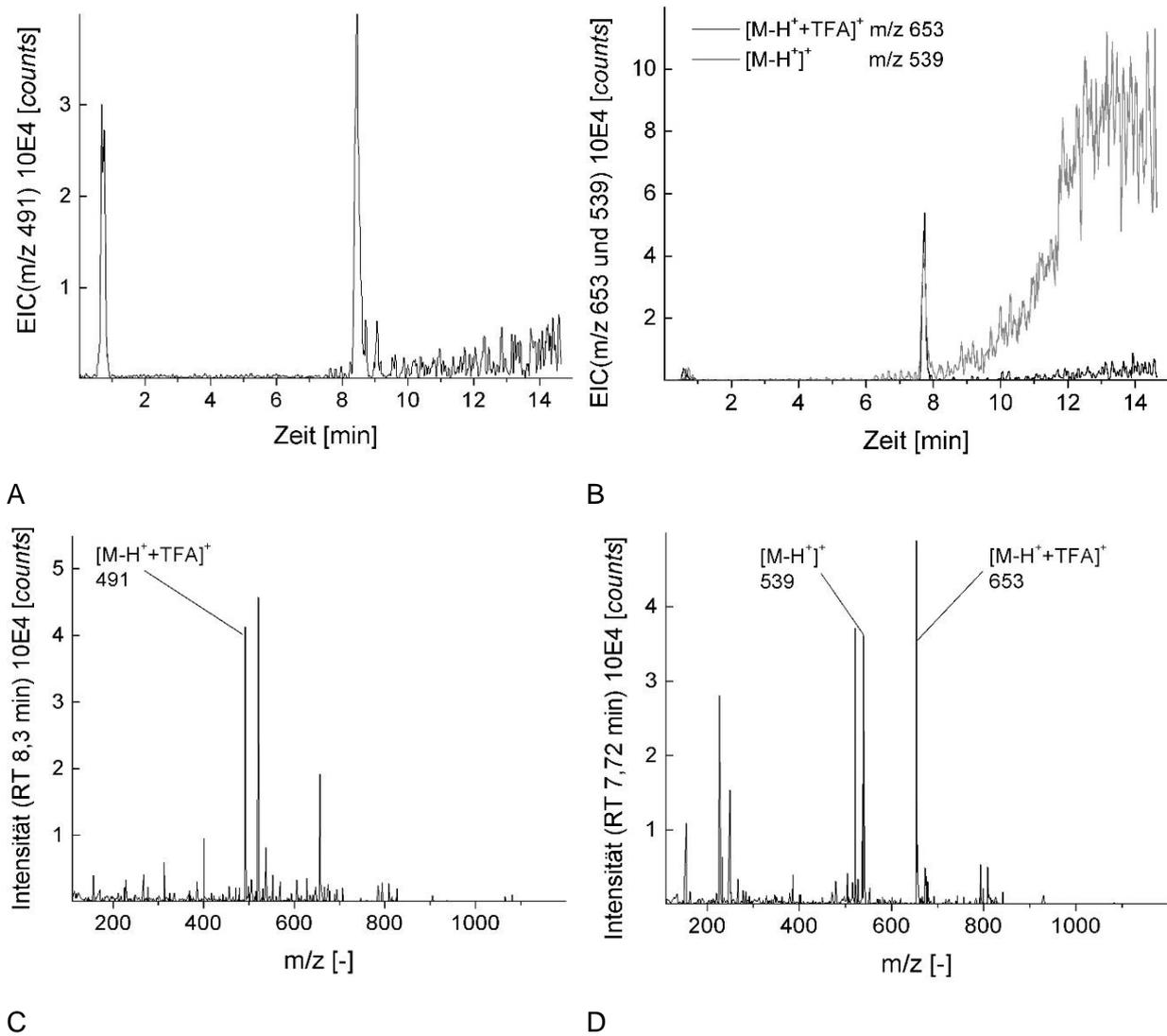


Abb. 10.6 LC-ESI-MS Analyse von PhytP und PhytPM. *Extracted ion chromatogram* (EIC) von einer PhytP enthaltenden Probe als Trifluoressigsäure (TFA) Addukt. Das Massenladungsverhältnis m/z beträgt 491. Ein signifikanter PhytP-Peak kann bei einer Rt von 8,3 min erkannt werden. B - EIC von einer PhytPM enthaltenden Probe mit und ohne TFA Addukt. Ein signifikante PhytPM- bzw. PhytPM+TFA-Peaks können bei einer Rt von 7,7 min erkannt werden. C - Massenspektrum bei Rt 8,3 min der PhytP-enthaltenden Probe aus A. D - Massenspektrum bei Rt 7,7 min der PhytPM-enthaltenden Probe aus B. Die LC-ESI-MS Analysen (2.2.5.4) wurden von Dr. Miro Malesević durchgeführt.

10.9 Struktur IGEPAL® CA-630

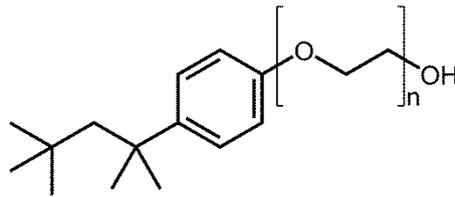


Abb. 10.7 IGEPAL® CA-630 (Merck, Darmstadt) Struktur. CAS: 9002-93-1, Halbstrukturformel: $(C_2H_4O)_n C_{14}H_{22}O$. Es handelt sich um ein Polymergemisch mit n Ethoxygruppen. Die einzelnen molekularen Spezies unterscheiden sich in ihrem Molekulargewicht um 44 Da voneinander.

10.10 Fällung von DoIPM mit Methanol

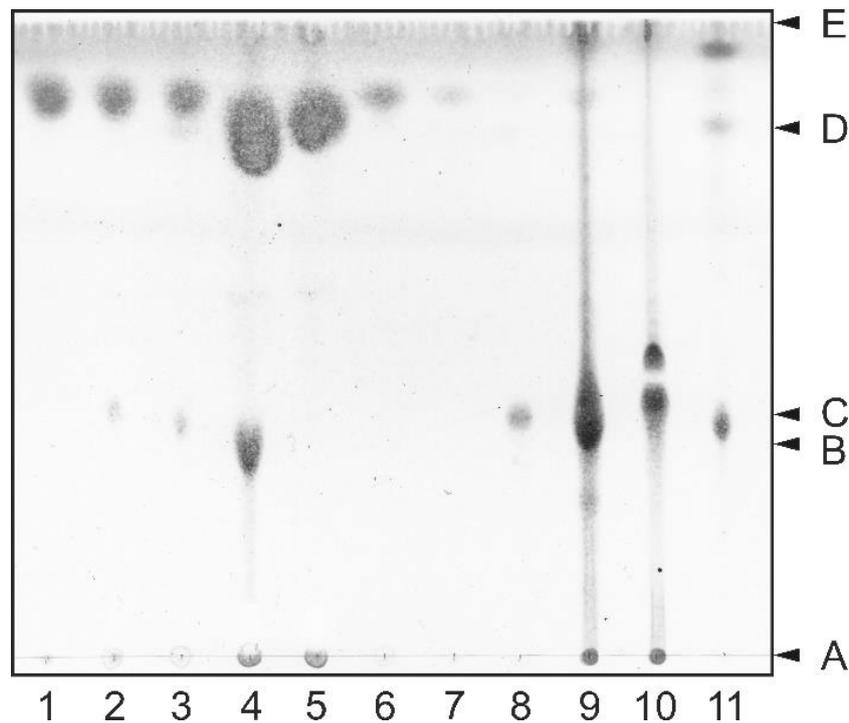


Abb. 10.8 Untersuchung der MeOH-Fällung von DoIPM. Ausgewählte Proben der DoIPM-Aufarbeitung (3.6.2 und Abb. 2.3) wurden ausgewählt und mittels analytischer Dünnschichtchromatographie (2.2.5.6) untersucht. Nach der chromatographischen Trennung der Probenbestandteile wurde die Dünnschichtchromatographieplatte getrocknet und mit CER-Reagenz gefärbt. Probenzusammensetzung: 1 - IGEPAL® CA-630, 1 μ L, 2 - RB mit DoIP und GDPM, 2 μ L, 3 - Vereinigte Fraktionen nach Passage des His₆-SUMO-Dpm1-Katalysators, 2 μ L, 4 - wie 3 in konzentrierter Form, 2 μ L, 5 - Überstand nach MeOH-Fällung, 4 μ L, 6 - Überstand nach dem ersten Waschen des Pellets, 4 μ L, 7 - Überstand nach dem zweiten Waschen des Pellets, 4 μ L, 8 - resuspendiertes Pellet, 4 μ L, 9 - eingetrocknetes Pellet in 1 mL CHCl₃ gelöst, 4 μ L, 10 - DoIP-Referenz, 4 μ L, 11 - DoIPMan-Referenz aus Vorversuch, 4 μ L. A - Start der Chromatographie. B - DoIPM. C - DoIP. D - IGEPAL® CA-630. E - Ende der Chromatographie.

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg am Lehrstuhl für die Aufarbeitung biotechnischer Produkte des Institutes für Pharmazie der Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften. Ich danke allen Personen, die an dieser Arbeit mitgewirkt haben.

In erster Linie danke ich Prof. Dr. Markus Pietzsch für das in mich gesetzte Vertrauen, die beständige Unterstützung während meiner Promotion und die Überlassung dieses herausfordernden Themas. Besonders möchte ich mich für die konstruktive Diskussion der Daten, die Freiheit in der methodischen Bearbeitung der Thematik und die Kontakteherstellung bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Groth und Herrn Prof. Dr. Sylđatk möchte ich mich für die Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Bei der AG von Prof. Dr. Edgar Peiter möchte ich mich für die Überlassung von Hefeprotokollen und -Vektoren sowie die schnelle, unkomplizierte Hilfe, insbesondere durch Tina Peiter-Volk bedanken. Bei Herrn PD Dr. Gerd Balcke (IPB, Abteilung Stoffwechsel- und Zellbiologie) möchte ich mich für die ESI-MS Untersuchung von DoIP und DoIPM bedanken.

Motivation, Vertrauen in - und ehrliches Interesse an der Person sind nur eine kleine Auswahl der Begriffe, die Dr. Franziska Seifert beschreiben. Für die Hilfe beim Experimentdesign, der Kinetikauswertung, der Diskussion von Daten und deine Korrekturen danke ich Dir.

Meine Eintrittskarte in die AG Pietzsch erhielt ich von Dr. Thomas Hertel durch die Betreuung während der *expanded bed* Chromatographie. Superschnelle Bestellungen, Tipps und Tricks im Labor sowie das Lehren praktischer Methoden im Abrissgewerbe runden sein Profil ab. Danke Thomas.

Noch nie zu mir *nein* oder *geht nicht* gesagt, hat Dr. Miro Malesėvić. Unersetzlich war seine Hilfe bei allen Fragen zur HPLC-MS und der Analyse von Proben – ohne das Wissen über deren Einfluss auf die Langlebigkeit des Analysengerätes.

Mein bester Masterstudent ist Jann Groen. Keiner hat einen größeren praktischen Fremdanteil an dieser Arbeit. *Bedankt.*

Allen Mitgliedern der AG Pietzsch und dem TANDEM-Team will ich für die immerwährende Unterstützung, Material und Chemikalien, konstruktive Kritik an Vorträgen, experimentellen Ansätzen und Optimierungsansätzen danken. Euer Verständnis, KüNeFrei, ein sehr gutes Arbeitsklima und Eure Aufwertung der Freizeitgestaltung waren Gold wert.

Bei PD Dr. Margret Köck möchte ich mich bedanken für die Einweisung und Unterstützung im Radiolabor. Mona Groß danke ich für die Hilfestellung im Umgang mit Hefen, listigen Membranproteinen und dem CLSM und Michael Jordan für seine Mitwirkung bei der WB-Analytik.

Freunde und allen, ohne deren Mithilfe diese Arbeit nicht beendet hätte werden können, möchte ich ebenfalls danken. Ganz besonders möchte ich meinen Eltern für die Unterstützung und Ermutigung während des Studiums und der Promotion danken.

Grenzenloser Rückhalt in Kombination mit meiner schärfsten Kritikerin zeichnet meine Freundin Sandra aus. Ich möchte Dir für Deine Unterstützung, Deine Ehrlichkeit und Deine Motivation danken.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name Matthias Schöpfer
 Geburtsort Wilhelmshaven
 Geburtsdatum 09.08.1988
 Nationalität Deutsch
 Akademischer Grad Master of Science

Schulischer und beruflicher Werdegang

03/2015 - Gegenwart **Promotion** Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 Institut für Pharmazie, Institutsbereich Pharmazeutische
 Technologie und Biopharmazie, AG Aufarbeitung biotechnischer
 Produkte

02/15 **Wissenschaftliche Hilfskraft** Institut für Pharmazie

10/12 - 11/14 **Studium** Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 Studium der Biochemie an der Naturwissenschaftlichen Fakultät I –
 Biowissenschaften
 Abschluss: Master of Science
 Master-Arbeit (AG Aufarbeitung biotechnischer Produkte, Prof.
 Pietzsch)
 Abschlussarbeit: „Untersuchungen zur Kultivierung von
Methylococcus capsulatus (Bath) und rekombinante Produktion der
 Reduktase MMOR aus *Methylosinus trichosporium* OB3b“

10/09 - 09/12 **Studium** Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 Studium der Biochemie an der Naturwissenschaftlichen Fakultät I
 (Biowissenschaften)
 Abschluss: Bachelor of Science.
 Bachelor-Arbeit (AG Enzymologie, Prof. Schutkowski)
 „Charakterisierung von NAD⁺-abhängigen Deacetylasen“

04/09 - 09/09 **Angestelltenverhältnis** gGmbH Rettungsdienst Friesland
 Einsatzbereich: Notfallrettung

07/08 - 03/09 **Zivildienst** gGmbH Rettungsdienst Friesland
 Einsatzbereich: Notfallrettung

07/01 - 06/08 **Schule** Käthe-Kollwitz-Gymnasium Wilhelmshaven
 Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife

Matthias Schöpfer

Halle (Saale), den 03.07.2019

Lehrtätigkeiten

Betreuung des Praktikums „Instrumentelle Analytik“, Betreuung eines Forschungsgruppenpraktikums, Betreuung einer Projektstudie, Betreuung einer Masterarbeit.

Publikationen

Schöpfer, M., Groen, J., Malesëvić, M., Balcke, G. U., Seifert, F., Marx, C. K., & Pietzsch, M. (2019): Preparative Synthesis of Dolichylphosphate Mannose by Immobilized Dpm1 from Yeast Expressed in *E. coli*. In Bearbeitung.

Schöpfer, M., Bergmann, C., Schildbach A., May, F., Malešević, M., Rexer, T., Rapp, E., Reichl, U. & Pietzsch, M. (2019): Preparative Synthesis of Phytanyl-Pyrophosphate-Linked (GlcNAc)₂-Man₃ and (GlcNAc)₂-Man₅ by Three yeast ER Glycosyltransferases Alg1, Alg2 and Alg11 *in vitro*. In Bearbeitung.

Poster

Schöpfer, M., Groen, J., Schildbach, A., Pietzsch, M.: Preparative Synthesis of Dolichol Phosphate Mannose by Immobilized Yeast Dpm1 Expressed in *E. coli*. VAAM, Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology, Wolfsburg, April 2018.