

**Untersuchungen zur Synthese von Biopolymeren unter Einsatz
von Biokatalysatoren in parallelen
Multienzym-Multisubstrat-Reaktionen**

Dissertation

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

der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften -

der
Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Dipl.-Biol. Anna Schildbach
geb. am 30.09.1976 in Luckenwalde

Halle (Saale), 2019

1. Gutachter: Prof. Dr. Markus Pietzsch
2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Groth
3. Gutachter: Prof. Dr. Christoph Syldatk

Tag der Verteidigung: 29.06.2020

„Es ist viel sicherer, zu wenig als zu viel zu wissen“

Samuel Butler, britischer Philosoph

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Anna Schildbach, dass ich die vorliegende Arbeit - mit Ausnahme der aufgeführten Unterlagen bzw. wörtlich oder inhaltlich übernommenen gekennzeichneten Literaturstellen - selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Dienstleistungen sind als solche benannt. Die Arbeit wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität zur Dissertation eingereicht.

Halle, Datum

(Anna Schildbach)

Vorveröffentlichungen aus dieser Dissertation

Aus dieser Arbeit wurden Teilergebnisse mit Genehmigung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät I, vertreten durch den Doktorvater dieser Arbeit, Herrn Prof. Dr. Markus Pietzsch, an folgenden Stellen veröffentlicht:

Posterbeiträge:

1. Schildbach, A.; Schomberg, M.; Rapp, E.; Reichl, U.; Pietzsch, M. (2015) „*In vitro* synthesis of lipid linked (GlcNAc)₂-Man by β 1,4-Mannosyltransferase (Alg1) and activity assay based on CGE-LIF measurements”, Gordon Research Conference (GRC) on Glycobiology, Lucca, Italy.
2. Rexer, T.F.T.; Schildbach, A.; Bergmann, C.; Klapproth, J.; Pietzsch, M.; Rapp, E.; Reichl, U. (2016) „Development of a platform for *in vitro* N-glycosylation of proteins with continuous regeneration of nucleotide sugars by cascades of isolated enzymes”, Dechema - Himmelfahrtstagung: New Frontiers for Biotech.Processes, Koblenz, Germany.
3. Bergmann, C.; Rexer, T.F.T.; Schildbach, A.; Rapp, E.; Reichl, U.; Pietzsch, M. (2016) „Development of a Platform for *in vitro* N-glycosylation of Therapeutic Proteins by a Cascade of Isolated Enzymes”, GlycoT - International Symposium on Glycosyltransferases, Toronto, Canada.
4. Bergmann, C.; Schildbach, A.; Rexer, T.F.T.; Malešević, M.; Rapp, E.; Reichl, U.; Pietzsch, M. (2017) „*In vitro* Synthesis of Phytanyl-Pyrophosphat-Linked Oligosaccharides by a Cascade of the Bifunctional α 1,3-/ α 1,6-Mannosyltransferase Alg2 and α 1,2-Mannosyltransferase Alg11”, GlycoBioTec – Glycobiotechnology Symposium, Berlin, Germany.

Tagungsbeiträge:

1. Schildbach, A. and Rexer, T.F.T. (2017) „*In vitro* Synthesis of Lipid-Linked Oligosaccharides by Cascades of Glycosyltransferases as Basic Platform of N-glycosylation of Therapeutic Proteins”, GlycoBioTec – Glycobiotechnology Symposium, Berlin, Germany.

Wissenschaftliche Artikel:

1. Schildbach, A.; Rexer, T.F.T.; Klapproth, J.; Schierhorn, A.; Mahour, R.; Pietzsch, M.; Rapp, E.; Reichl, U. (2018) “One pot synthesis of GDP-mannose by multi-enzyme cascade for enzymatic assembly of lipid-linked oligosaccharides”, *Biotechnology and Bioengineering*, 115, 192-205
2. Klapproth, J.; Mahour, R.; Rexer, T.F.T.; Schildbach, A.; Klamt, S.; Pietzsch, M.; Rapp, E.; Reichl, U. (2018) “Establishment of a five-enzyme cell-free cascade for the synthesis of uridine diphosphate N-acetylglucosamine”, *J. of Biotechnology*, 283, 120-129

Inhaltsverzeichnis

Veröffentlichungen	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	V
Anmerkungen	VII
1 Einleitung	1
1.1 Glykosyltransferasen	2
1.2 N-Glykosylierung	3
1.3 Biologische Funktionen von Glykosylierungen.....	9
1.3.1 Krankheiten	13
1.3.2 N-Glykane als diagnostische Marker, Vaccine und Therapeutika	16
1.4 Stand des Wissens – N-Glykosylierung als Forschungsfeld	20
1.4.1 Glyko-Engineering <i>in vivo</i>	20
1.4.2 Chemische Synthese von Glykosylstrukturen <i>in vitro</i>	22
1.4.3 Enzymatische Synthese von Glykosylstrukturen	23
2 Ziel dieser Arbeit	26
3 Material und Methoden	27
3.1 Materialien	27
3.1.1 Chemikalien, Standards und Kits	27
3.1.2 Puffer	27
3.1.3 Bakterienstämme, Medien und Antibiotika	27
3.1.4 Vektoren, Konstrukte und Enzyme	28
3.2 Molekularbiologische Arbeiten	28
3.2.1 Oligodesoxyribonukleotide.....	29
3.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	29
3.3 Proteinbiochemische Methoden	30
3.3.1 Expression der Proteine.....	30
3.3.2 Fermentation zur Produktion von His ₆ -Alg1ΔTM	30
3.3.3 Zellaufschluss, Reinigung und Dialyse	31
3.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	32
3.3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	33
3.3.6 Enzymatische Assays	33
3.3.7 Synthese, Extraktion und Reinigung von Phytanyl-PP-Chitobiose	35

3.4	Analytische Methoden	36
3.4.1	IP-HPLC – Methode 1	36
3.4.2	IP-UPLC – Methode 2	38
3.4.3	ESI-MS/MS	40
4	Ergebnisse	44
4.1	Enzymatische Synthese von GDP-Mannose	44
4.1.1	Produktion und Reinigung der Enzyme Glk, ManB und ManC	45
4.1.2	Nachweis der Einzelreaktionen von His ₆ -Glk und ManCB-His ₆	47
4.1.3	Untersuchungen zur Eintopf-Synthese von GDP-Mannose aus ATP, Mannose und GTP	53
4.1.4	Produktion und Reinigung der Enzyme His ₆ -1D-Ppk2 und His ₆ -Ppk3	54
4.1.5	Nachweis der Einzelreaktionen der Enzyme 1D-Ppk2 und Ppk3	55
4.1.6	Eintopf-Synthese von GDP-Mannose aus ADP, Mannose, PolyP und GTP	60
4.2	Enzymatische Synthese von Phytanyl-PP-Mannosylchitobiose	62
4.2.1	Produktion und Reinigung des Enzyms Alg1ΔTM	63
4.2.2	Nachweis der Einzelreaktion von His ₆ -Alg1ΔTM	65
4.2.3	Untersuchungen zur Mannosyltransferase-Aktivität der Alg1ΔTM	68
4.2.4	Bestimmung enzymkinetischer Parameter der Alg1ΔTM	71
4.3	Eintopf-Synthese von Phytanyl-PP-Mannosylchitobiose	76
4.3.1	Gekoppelte Reaktion von Alg1ΔTM, ManCB, Glk, PmPpA und Ppk3	76
4.4	Präparative Synthese und Aufreinigung von Phytanyl-PP-Mannosylchitobiose	79
5	Diskussion	81
5.1	Enzymatische Synthese von GDP-Mannose	81
5.1.1	Synthese von Mannose-6-P durch die Hexokinase Glk	83
5.1.2	Co-Expression von ManC und ManB zur Synthese von GDP-Mannose	85
5.1.3	Beseitigung der Hemmung von ManCB-His ₆ durch die Pyrophosphatase PmPpA	86
5.1.4	ATP/GTP-Regenerierung durch die Kinasen 1D-Ppk2 und Ppk3	87
5.1.5	Eintopf-Reaktion zur Bildung von GDP-Mannose	91
5.2	Alg1-katalysierte Synthese von Phytanyl-PP-Mannosylchitobiose	94
5.2.1	Bestimmung enzymkinetischer Parameter der Alg1ΔTM	97
5.3	Multi-Enzym-Eintopf-Synthese von Phytanyl-PP-Mannosylchitobiose	103
5.4	Aufreinigung von Phytanyl-PP-Mannosylchitobiose	105
6	Zusammenfassung	107
7	Ausblick	110
	Literaturverzeichnis	VIII
	Anhang	XXI

DanksagungXXX

Curriculum Vitae..... XXXI

I

Abkürzungsverzeichnis

ABO	Blutgruppensystem	G2	GlcNAc-GlcNAc
Abb.	Abbildung	G2M	GlcNAc-GlcNAc-Man
ACN	Acetonitril	Gal	Galaktose
AMP(D,T)	Adenosinmono(di, tri)-Phosphat	Glc	Glukose
Alg	<i>Asparagine linked glycosylation</i>	Glc-1.6-bisP	Glukose-1,6-bisPhosphat
AS	Aminosäure	GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
A _{spez}	Spezifische Aktivität	GMP (D,T)	Guanosinmono(di, tri)-Phosphat
AXP	Adenosintetraphosphat	ges	gesamt
BFM	Biofeuchtmasse	GT	Glykosyltransferase
BSA	Bovines Serumalbumin	h	Stunde
CD	<i>Circular Dichroism</i>	HCl	Salzsäure
CD58	lymphocyte function-associated antigen 3	His ₆	Hexahistidin-Fusion
CDG	<i>Congenital Disorders of Glycosylation</i>	Hsp	<i>Heat shock protein</i>
CGE-LIF	Kapillargelelektrophorese mit Laser-induzierter Fluoreszenz	H(U)PLC	<i>High (Ultra) Performance Liquid Chromatography</i>
CHCl ₃	Chloroform	IgG	Immunglobulin G
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>	IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie
CV	<i>Column Volume</i>	IPC	Ionenpaar-Chromatographie
3D	dreidimensional	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Da	Dalton (g* mol^{-1})	kb	Kilobasen
DNA	Desoxyribonukleinsäure	kDa	Kilodalton
DTT	Dithiothreitol	K _i	Inhibitionskonstante
Dol	Dolichol	$k_{\text{cat}}, k_{\text{obs}}, k_x$	Geschwindigkeitskonstanten
EC	<i>Enzyme Commission</i>	K _M	Michaelis-Konstante
EPI	<i>Enhanced Product Ion</i>	konst	konstant
ER	Endoplasmatisches Retikulum	L	Liter
ESI	<i>Electro Spray Ionisation</i>	LB	<i>Lysogeny Broth</i>
F _{ab}	<i>Fragment antigen binding</i>	LLO	<i>Lipid linked oligosaccharide</i>
F _c	<i>Fragment crystallisable</i>	M	molar
Fuc	Fukose	mAb	<i>Monoclonal antibody</i>
g	Gramm	Man	Mannose

MeOH	Methanol	rpm	<i>Rounds per minute</i>
mg (µg)	Milli(mikro)gramm	s	Sekunde
min	Minute	[S]	Substratkonzentration
mL (µL)	Milli(mikro)liter	SDS	Natriumdodecylsulfat
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>	Strep	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys
MS	Massenspektrometrie	Tab.	Tabelle
MurNAc	<i>N-Acetylmuraminsäure</i>	TB	<i>Teriffic Broth</i>
MW	<i>Molecular Weight</i>	TBAHP	Tetrabutylammoniumdihydrogenphosphat
m/z	Masse pro Ladung	TCEP	Tris(2-carboxyethyl)-Phosphin
NDP	Nukleosiddiphosphat	TM	Transmembran-Anker
Ni	Nickel	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
nm	Nanometer	U	Units (µmol*min ⁻¹)
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm	UDP	Uridindiphosphat
opt	optimiert	UV	Ultraviolett
OST	Oligosaccharyltransferase	V	Volt/ Volumen
[P]	Produktkonzentration	var	variabel
P _(i)	Phosphat-Rest	V _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
PP	Pyrophosphat	Vs	Version
PAGE	<i>Polyacrylamidegelelectrophoresis</i>	v/v	volume per volume
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	w/v	Weight per volume
PDB	Proteinstruktur-Datenbank		
Phyt	Phytanol		
pks	Säurekonstante		
RNA	Ribonukleinsäure		
RP	<i>Reversed Phase</i>		

Aminosäuren und ihre Abkürzungen

Alanin	Ala	A	Glutamat	Glu	E	Leucin	Leu	L	Serin	Ser	S
Arginin	Arg	R	Glutamin	Gln	Q	Lysin	Lys	K	Threonin	Thr	T
Asparagin	Asn	N	Glycin	Gly	G	Methionin	Met	M	Tryptophan	Trp	W
Aspartat	Asp	D	Histidin	His	H	Phenylalanin	Phe	F	Tyrosin	Tyr	Y
Cystein	Cys	C	Isoleucin	Ile	I	Prolin	Pro	P	Valin	Val	V

Anmerkungen

Englische Fachausdrücke, die keine adäquate deutsche Übersetzung zulassen, sind in dieser Arbeit kursiv geschrieben. Diese werden unter Umständen auch dann benutzt, wenn ein deutsches Äquivalent existiert.

Dezimalstellen sind im laufenden Text sowie in den Abbildungen und Tabellen durch einen Punkt getrennt.

Für biochemische Fachausdrücke werden die international üblichen Abkürzungen verwendet.

Der Begriff Expression beschreibt im Allgemeinen die Transkription und Translation eines Gens. Der Terminus Proteinexpression steht für die Produktion von Proteinen in der Zelle und wird im Text dieser Arbeit teilweise verkürzt mit dem Terminus Expression bezeichnet.

1 Einleitung

Das Humangenomprojekt (*human genome project*) [1] wurde 1990 als internationales Forschungsprojekt ins Leben gerufen. Ziel war es, die gesamte DNA des menschlichen Genoms zu entschlüsseln. Das Projekt konnte 2003 erfolgreich abgeschlossen werden. Aus den Ergebnissen erhoffte man sich tiefere Einblicke in grundsätzliche Fragen der Genomik: Wie viele Gene besitzt der menschliche Organismus? Was ist die Rolle der verschiedenen Gene und in welche zellulären Abläufe sind sie involviert? Wie sind Gene reguliert und wie interagieren sie mit ihren Genprodukten? Wie hoch ist der Einfluss verschiedener Expressionsraten in verschiedenen Zelltypen, -stadien und bei Krankheiten? Zur Erforschung solcher Fragen sind weitere Forschungszweige interessant. Die Transkriptomik beschäftigt sich mit der Übersetzung der DNA in sogenannte Boten-RNA (*messenger-RNA*). Dabei werden nur etwa 5 % der DNA transkribiert. Dies gibt Einblicke in die Regulation der Gene. Die Proteomik beschäftigt sich nachfolgend mit dem Translationsprodukt der Boten-RNA, den Proteinen. Darunter versteht man die Erforschung der Strukturen und die Funktionen der gesamten Palette an Proteinen in einem Organismus. 99 % der etwa 3.3 Billionen Nukleotide, die das humane Genom ausmachen, kodieren nicht für Proteine [2]. Von den etwa 19.000 Gen-codierten Proteinen werden interessanterweise nur etwa 10 % intensiv beforscht [3]. Einer der Gründe für Schwierigkeiten mit der funktionellen Zuordnung und Erforschung von Genprodukten bzw. Proteinen scheinen co- und posttranslationale Veränderungen dieser Proteine zu sein. In Eukaryoten führen diese Modifikationen meist erst zu einem vollständig aktiven Produkt. Modifikationen treten in Form von z. B. Phosphorylierungen [4, 5], Acetylierungen [6] oder Prozessierungen durch Signalsequenzdeletionen auf. Zu den wichtigsten Modifikationen gehört die Glykosylierung [7]. Daraus erschließt sich das Feld der Glykomik. Die Tiefe des vorhandenen Wissens in den einzelnen Omik-Richtungen ist abhängig vom Beginn des Zeitpunktes der Erforschung. Bei jüngeren Forschungsfeldern wie der Glykomik gibt es noch viele unverstandene Grundlagen und Mechanismen. In der folgenden Grafik (Abb. 1-1) sind die Forschungsfelder hinsichtlich Evolution, Informationsgehalt und grundlegendem Wissen eingeordnet.

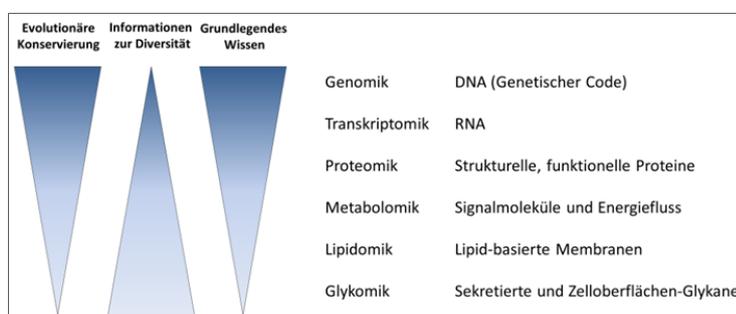


Abb. 1-1: Einordnung der Omik-Forschungsfelder in Bezug auf die Konserviertheit im Verlaufe der Evolution, die informationsgebende Vielfalt und den Wissensstand. Abbildung in Anlehnung an Varki 2011[8]

Zuckermoleküle lassen sich in allen drei Reichen des Lebens, bei Bakterien, Archaeen und Eukaryoten finden. Durch das Vorhandensein mehrerer chiraler Zentren in den Kohlenhydraten und die Bildung von Oligo- und Polysacchariden verschiedenen Verzweigungsgrades ist eine nahezu unendliche Menge an Glykosylstrukturen denkbar. Das große Sortiment dieser Glykosylstrukturen bildet einen vorteilhaften Mechanismus, das Potential des Genoms zu erweitern. Im Menschen sind mehr als die Hälfte aller Proteine glykosyliert, man spricht dann von Glykoproteinen oder Proteoglykanen. Diese Modifikationen (*sugar code*) haben keine vorherrschende Hauptfunktion, vielmehr haben sie, unter anderem Einfluss auf die Faltung [9], die Lebensdauer [9-11], die Aktivität und den Bestimmungsort [12, 13] von Proteinen. Weiter beeinflussen Glykosylstrukturen die Kommunikation zwischen Zellen (Bindung an Lektine – Proteinrezeptoren) [14] und steuern Entwicklungsprozesse, Infektions- und Immunreaktionen (CD2 CD58) (siehe Abschnitt 1.3) [15]. Das Forschungsfeld der Glykomik untersucht die Abfolge und räumliche Anordnung der Zuckerstrukturen mit dem Ziel, deren Biosynthese und ihre biologischen Funktionen zu definieren, die durch das Anhängen von Zuckerstrukturen an Proteine und Membranlipide bestimmt werden [16].

1.1 Glykosyltransferasen

Werden Zuckerstrukturen (Glykane) mit Proteinen oder Lipiden verknüpft, spricht man von Glykoproteinen oder Glykolipiden (allgemein Glykokonjugate genannt). In Eukaryoten findet man Glykokonjugate intra- und extrazellulär. Auf der Oberfläche von Plasmamembranen und im Serum bilden sie die extrazelluläre Matrix, die die Zellen umgibt. Intrazellulär kommen Glykokonjugate sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus vor. Bevor Glykoproteine am Ort ihrer Bestimmung wirksam werden, müssen die Glykanstrukturen innerhalb der Zelle gebildet werden. Die Synthese findet am und im Endoplasmatischen Retikulum (ER) sowie im Golgi-Apparat statt. Im ER geschieht zunächst die Verbindung der einzelnen Monosaccharide miteinander. Dies ist ein energetisch ungünstiger Prozess. Daher wird die hierfür benötigte Energie aus der Hydrolyse von Phosphorsäure-Anhydrid-Bindungen zweier Phosphatgruppen aus Nukleosidtriphosphaten genutzt, um Nukleotid-Zucker-Donoren (aktivierte Zucker) zu bilden. Diese liefern schließlich die Energie für die Reaktion mit einem Zuckerakzeptor. Diese Reaktion wird von Glykosyltransferasen katalysiert. Die Regiospezifität der Glykosyltransferasen determiniert dabei die Art der glykosidischen Bindung. Zusammen mit einer sehr stringenten Substratspezifität besitzen Glykosyltransferasen eine hohe Regio- und Stereoselektivität. Daher kann jede Glykosyltransferase in der Regel nur einen bestimmten aktivierten Zucker mit einem anderen bestimmten Zucker in vorgegebener Konfiguration miteinander verknüpfen. Die durch die Glykosyltransferasen synthetisierten Glykanstrukturen, die auf Proteine übertragen werden, können *O*-glykosidisch oder *N*-glykosidisch verknüpft werden. Im Falle der *O*-Glykosylierung, die ausschließlich im Golgi-Apparat stattfindet, werden die Zuckermoleküle mit der Hydroxygruppe von Threonin, Serin, Hydroxylysin oder Hydroxyprolin in einer Polypeptidkette unter Ausbildung einer glykosidischen Bindung (*O*-Fukosylierung, *O*-Mannosylierung, Bsp.: Mucine) verbunden

[17, 18]. Weitere Glykosylierungsformen stellen die C-Glykosylierung [19], die Glypiation und die Phosphoglykosylierung dar, ihr Anteil an posttranslationalen Modifikationen von Proteinen ist aber recht gering. Auf die N-Glykosylierung, welche mit 90 % den häufigsten Glykosylierungstyp darstellt, soll im nächsten Abschnitt genauer eingegangen werden.

1.2 N-Glykosylierung

Bei der N-Glykosylierung, welche die häufigste Form der Proteinglykosylierung darstellt, erfolgt in Eukaryoten die Bindung einer endständigen N-Acetylglucosamin-(GlcNAc)-Einheit eines Polysaccharides an den Amid-Stickstoff einer Asparaginseitenkette (Asn). In Eukaryoten geschieht dies im Lumen des ER in β -Konfiguration (GlcNAc β 1-Asn). Aus der Bindung des Seitenketten-Stickstoffs (N) des Asparagins leitet sich auch die Bezeichnung „N-Glykosylierung“ ab [20]. Es werden etwa 90 % aller Asparaginseitenketten in einer proteinogenen Polypeptidkette glykosyliert [21]. Potentielle Anhaftungsstellen für Glykane müssen minimal die Aminosäure-Sequenz Asn-X-Ser/Thr (*sequon*) in ausreichender Zugänglichkeit aufweisen, wobei X mit jeder Aminosäure außer Prolin besetzt werden kann [22]. Bei der Assemblierung des 14meren Polysaccharides (Glc₃Man₉GlcNAc₂; Glc=Glukose, Man=Mannose, GlcNAc=N-Acetylglucosamin) werden die Zuckerbausteine in aktivierter Form (Nukleotidzucker) durch die sequentielle Aktion mehrerer Glykosyltransferasen übertragen. In Hefe wird zunächst ein Polyisopren-Anker, das Dolichol (Abb. 1-2 obere Struktur), bereitgestellt, welcher aus sich wiederholenden C₅-Bausteinen aufgebaut ist [23].

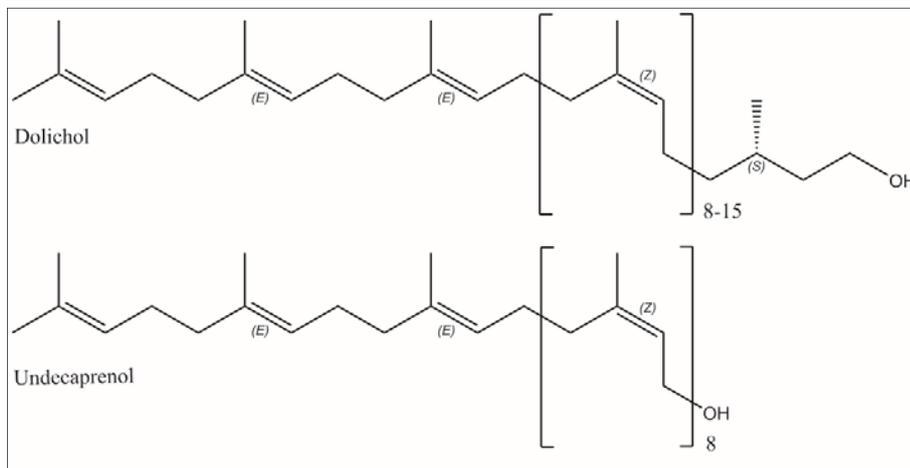


Abb. 1-2: Vergleich der Strukturen von eukaryotischen und bakteriellen Polyisoprenen, die Pyrophosphat-verknüpft die Zucker als Anker-moleküle in den Membranen halten.

Zwei *trans*-Isopreneinheiten folgen mehrere *cis*-Isopreneinheiten und das alkoholische Ende ist α -gesättigt mit einem Stereozentrum. Dolichol besitzt eine Kettenlängenverteilung von 16-23 Isopreneinheiten, wobei Dolichol mit einer Kettenlänge von 95 C-Atomen am häufigsten vorkommt [24, 25]. Auf Undecaprenol (Abb. 1-2, untere Struktur), das bakterielle „Dolichol“,

wird später in diesem Kapitel eingegangen. Dolichol wird in die Lipiddoppelschicht des endoplasmatischen Retikulums (ER) so eingebaut, dass er auf zytoplasmatischer Seite mit Hilfe des Enzyms Sec59 und des Phosphatdonors CTP (Cytosintriphosphat) phosphoryliert werden kann. Alle folgenden Reaktionen (Abb. 1-3) auf zytoplasmatischer Seite des ER werden durch Enzyme mit der Bezeichnung „Alg“ im Namen katalysiert, dabei steht diese Abkürzung für *asparagine linked glycosylation*.

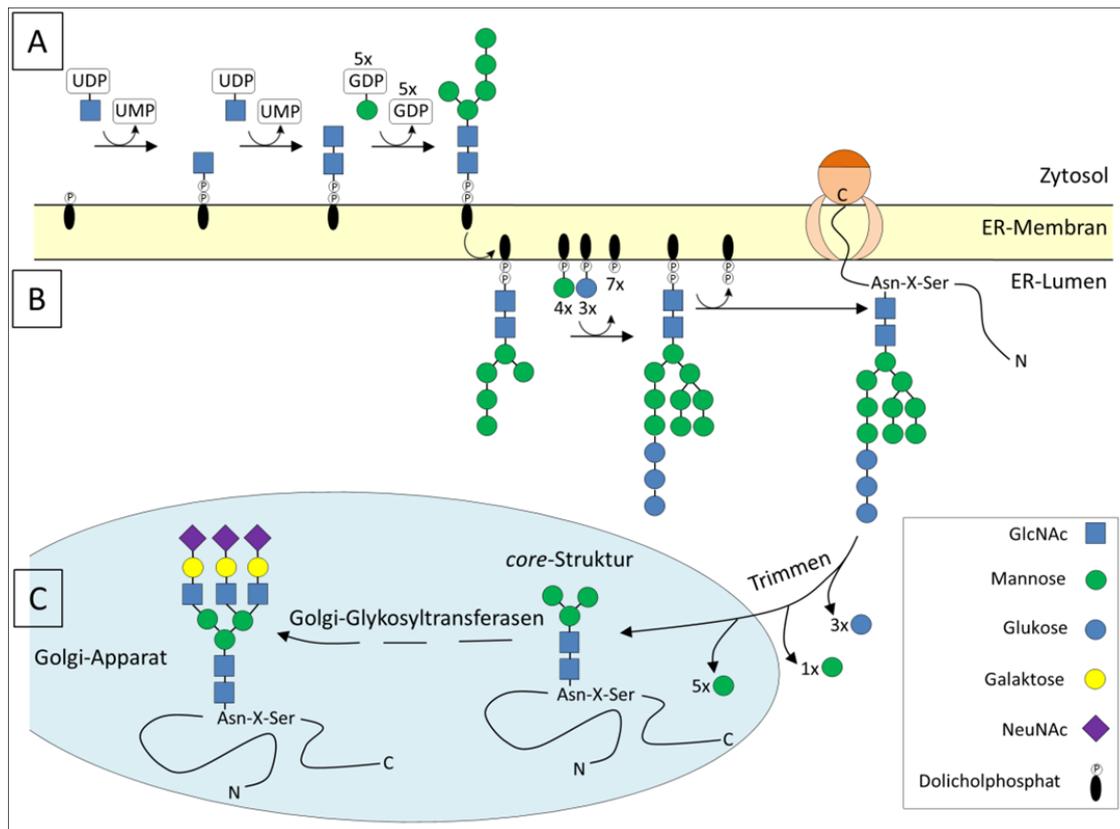


Abb. 1-3: N-Glykosylierungskaskade in Eukaryoten in Anlehnung an Rassow et al. [26] **A)** Enzymatischer Aufbau der Struktur Dolichyl-PP-(GlcNAc)₂-Man₅ auf der zytoplasmatischen Seite der ER, **B)** Fortsetzung der enzymatischen Katalyse zur Struktur Dolichyl-PP-(GlcNAc)₂-Man₉-Glc₃ mit Übertrag auf eine naszierende Polypeptidkette im Lumen des ER und Beginn des Trimmens zur Kontrolle der korrekten Faltung des Glykoproteins, **C)** Trimmen der N-Glykane auf die core-Struktur Dolichyl-PP-(GlcNAc)₂-Man₃ und Aufbau zu komplexeren N-Glykanen im Golgi-Apparat; GlcNAc - N-Acetylglucosamin, NeuNAc – Sialinsäure

Zuckerdonoren für die Reaktionen im Zytoplasma sind aktivierte Zucker in Form von Nukleosiddiphosphat-Konjugaten. Dolichylphosphat und UDP-GlcNAc dienen als Substrate für die Synthese von Dolichyl-PP-GlcNAc, die durch das Enzym Alg7 katalysiert wird. Im nächsten Schritt wird durch den Komplex der Enzyme Alg13 und Alg14 ein weiteres GlcNAc-Molekül von UDP-GlcNAc übertragen. Es entsteht Dolichyl-PP-(GlcNAc)₂ [27]. Bei den folgenden Reaktionen fungiert GDP-Mannose als Zuckerdonor. Alg1 katalysiert die erste Mannosylierungsreaktion hin zum Dolichyl-PP-(GlcNAc)₂Man₁, Alg2 und Alg11 beschleunigen jeweils zwei Mannosylierungsschritte hin zu dem Produkt Dolichyl-PP-(GlcNAc)₂Man₅ [28]. Dieses

Intermediat erfährt anschließend eine mechanistisch unaufgeklärte membranständige Delokalisation vom Zytosol ins Lumen des ER mit Hilfe einer Flippase [29]. Im Lumen des ER dienen schließlich Dolichyl-Phosphat-gebundene Zucker als Donoren. In den Reaktionen, katalysiert durch die Enzyme Alg3, Alg9 und Alg12, wird Dolichyl-P-Mannose als Substrat genutzt. In den drei abschließenden Glykosylierungsreaktionen, katalysiert durch die Alg6, Alg8 und Alg10, kommt Dolichyl-P-Glukose als Substrat zum Einsatz. Das finale Produkt ist Dolichyl-PP-(GlcNAc)₂Man₉Glc₃, dessen Bildung als Vorläuferglykan-Assemblierung (*precursor glycan assembly*) bezeichnet wird [30].

Anders als bei der O-Glykosylierung, bei der häufig einzelne Monosaccharide übertragen werden, findet bei der N-Glykosylierung ein *en bloc*-Transfer des definierten 14meren Polysaccharides auf die naszierende Polypeptidkette statt. Dass nicht alle Asparaginseitenketten innerhalb eines N-Glykosylierungssequons einen „Zuckerguss“ bekommen, kann mit der *co*-translationalen Übertragung erklärt werden. Proteinbiosynthese findet vom N- zum C-Terminus statt. Noch während dieser Proteinbiosynthese fängt die entstehende Polypeptidkette an, sich zu falten. Mit zunehmender Faltung nimmt die Erreichbarkeit des Sequons für den Glykantransfer ab. Daher sind Asparaginseitenketten am N-Terminus häufiger glykosyliert als solche, welche am C-Terminus lokalisiert sind [31]. Die Übertragung des Vorläuferglykans auf eine entstehende Polypeptidkette (*glycan attachment*) wird in Eukaryoten durch die Oligosaccharyltransferase (OST) katalysiert. Die OST aus *Saccharomyces cerevisiae* ist ein heteromerer Komplex, bestehend aus neun membrangebundenen Untereinheiten. Dabei sind die Untereinheiten Wbp1, Swp1, Stt3, Ost1 und Ost2 essentiell für die Lebensfähigkeit der Zellen. Weitere Untereinheiten bilden Ost4, Ost5, Ost3 und Ost6. Die genauen Funktionen der einzelnen Untereinheiten sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Für den Transfer des Oligosaccharides ist die katalytische Untereinheit Stt3 verantwortlich. In vielen Organismen wurden Homologe dieses Proteins gefunden [30, 32, 33].

Da das ER der Ort der Translation und der Prozessierung der meisten membrangebundenen und sekretierten Proteine ist, ist es nicht verwunderlich, dass die meisten von ihnen N-glykosylierte Proteine sind. Dabei besitzen sie oft vielfach verzweigte Zuckerstrukturen, die durch Prozessierungsschritte nach dem Übertragen der Zucker auf das Protein entstehen [34]. Noch im ER beginnt das Zurückbauen (*glycan trimming*) der Vorläufer-Zuckerstruktur. Exoglykosidasen katalysieren die Abspaltung von endständigen Monosacchariden am nicht-reduzierenden Ende und somit den energetisch favorisierten Bruch der glykosidischen Bindung durch Hydrolyse. Glukosidase I wird benötigt, um das endständige Glukosemolekül (siehe Abb. 1-3), welches α 1,2-verknüpft ist, zu entfernen. Glukosidase II entfernt danach die beiden verbleibenden α 1,3-verknüpften Glukosereste und markiert das neue Glykoprotein so in erster Instanz als „fertig zum Transport aus dem ER“ [35].

Der Calnexin-Calretikulin-Zyklus im ER fungiert als Qualitätskontrolle der Proteinfaltung und Signal zur Schleusung zum *cis*-Golgi. Dabei kommt den Zuckern die Rolle der „Eintrittskarte“ in diesen Zyklus zu. Calnexin (CNX), ein membrangebundenes und Calretikulin (CRT), ein lösliches

Lektin, sind homologe, zuckerbindende Proteine. Beide haben ähnliche Funktionen, interagieren aber mit unterschiedlichen sekretorischen oder membrangebundenen Glykoproteinen. Sie interagieren dabei mit dem Zucker eines Glykoproteins im ER nach erfolgtem Trimmen der Glykosylstruktur durch Glukosidase I und II ((GlcNAc)₂Man₉Glc₁). Als Chaperon-ähnliche Faltungshelfer sind Calnexin-Calretikulin mit der Disulfid-Isomerase ERp57 assoziiert. Die Katalysezeit der unterstützten Proteinfaltung durch diese und weitere Faktoren wird durch das Vorhandensein des letzten Glukoserestes determiniert. Nach Abspaltung dieser Glukose durch Glukosidase II wird das Glykoprotein in den Golgi-Apparat transloziert. Ist die Polypeptidkette jedoch nicht richtig oder nur teilweise gefaltet, wird sie durch eine luminal Glykosyltransferase (UGGT), welche hydrophobe, normalerweise im Inneren des Proteins liegende Regionen erkennt, erneut glykosyliert und durch Calnexin-Calretikulin gebunden [11, 36, 37]. In einem neuen Faltungszyklus kann dann die richtige Struktur des entsprechenden Proteins erreicht werden. Deglykosylierte gefaltete Proteine sind ein Substrat für die ER-Mannosidase I (ERManI). Diese entfernt die mittelständige (B-Verzweigung) α1,2-verknüpfte Mannose der Glykosylstruktur. ERManI stellt somit einen weiteren Kontrollpunkt dar. Falsch gefaltete Proteine, die der ersten Qualitätskontrolle entgangen sind, werden hier erkannt und dem Abbau durch ERAD (*endoplasmatic reticulum associated degradation*) zugeführt [37, 38]. Glykoproteine ohne den Mannoserest und mit korrekter Faltung gelangen in den Golgi-Apparat. Hierfür wurde ein Kompartiment ERGIC (*endoplasmatic reticulum-Golgi intermediate compartment*) beschrieben, definiert durch das Auffinden von ER-Proteinen, die vermehrt zwischen ER und Golgi zu finden sind [39]. ERGIC-53, ein gut charakterisiertes membranständiges Lektin (Homologe sind in vielen Eukaryoten bekannt), bindet Mannosestrukturen, wie sie nach ERManI-Trimmen vorkommen und geleitet die Glykoproteine in Vesikeln zum ERGIC. Dort übernimmt das Lektin VIP36 (*vesicular integral membrane protein of 36 kDa*) den Transport zum *cis*-Golgi. Im *cis*-Golgi agieren drei α1,2-Mannosidasen (IA, IB und IC), resultierend in der Glykanstruktur (GlcNAc)₂Man₅ [40]. Je nach weiterer Prozessierung (*glycan maturation*) und je nach Organismus können nun verschiedene N-Glykanstrukturen entstehen. Diese werden drei Typen zugeordnet [41], dem *High-Mannose*-, dem *Complex*- und dem *Hybrid*-Typ (Abb. 1-4).

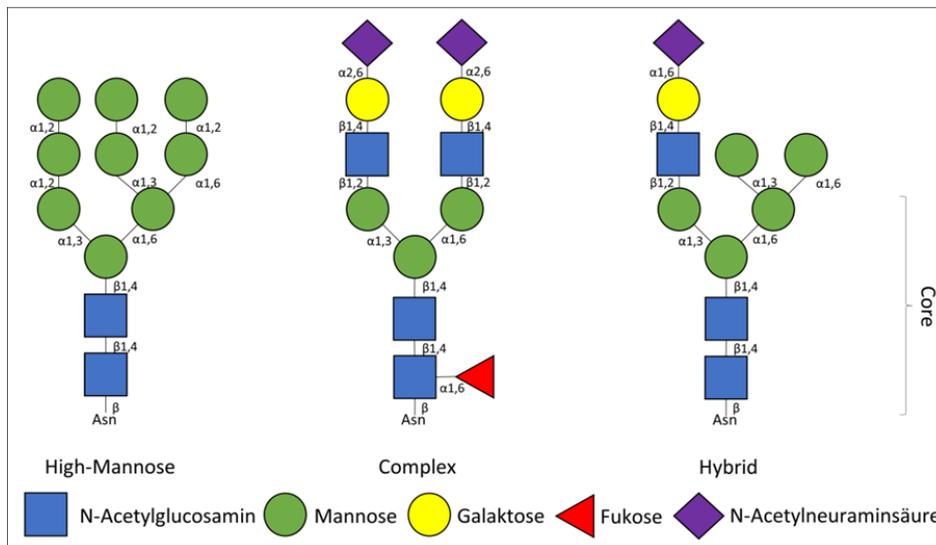


Abb. 1-4: Die drei Grundtypen der N-Glykosylierung. Die drei verschiedenen Glykosylierungstypen sind die des *High-Mannose*-Typs (links), des *Complex*-Typs (Mitte) und des *Hybrid*-Typs (rechts). Die untere Pentasaccharid-Struktur (ohne Fukose) ist in allen N-Glykanen enthalten und wird als *core*-Struktur bezeichnet. Die zusätzlichen Zuckerbausteine sind variabel (*N*-Acetylneuraminsäure = Sialinsäure).

Allen drei Typen ist eine einheitliche Kern-Struktur (*core*) $(\text{GlcNAc})_2\text{Man}_3$ gegeben. Beim *High-Mannose*-Typ sind ausschließlich Mannose-Einheiten mit der Kern-Struktur verknüpft. Diese Struktur entspricht dem Glykan nach Deglykosylierung im ER. Den *Complex*-Typ zeichnet eine biantennäre Struktur mit parallelem Aufbau von je zwei Glykanen *N*-Acetylglucosamin, Galaktose und *N*-Acetylneuraminsäure (=Sialinsäure) aus. An seinen terminalen Enden werden zudem zahlreiche Variationen, wie $\beta 1,4$ verknüpftes GlcNAc (*bisecting* GlcNAc) an der *core*-Mannose oder Polylactosaminabschnitte gefunden [42, 43]. Zusätzlich kann Fukose am ersten GlcNAc der Kern-Struktur vorkommen. Der *Hybrid*-Typ besitzt am $\alpha 1,6$ -Arm nur Mannose-Reste, der $\alpha 1,3$ -Arm entspricht dem des *Complex*-Typs [44].

N-Glykosylierung beginnt höchst geordnet und identisch für alle Glykoproteine im rauen endoplasmatischen Retikulum, während sich die Diversität durch das Trimmen und den unterschiedlichen Aufbau der Glykane manifestiert [45]. Ein wichtiger und interessanter Aspekt dabei ist, dass ein und dieselbe Asparaginseitenkette in verschiedenen Kopien eines Proteins mit unterschiedlichen Zuckern modifiziert sein kann [46]. Hier spricht man dann von verschiedenen Glykoformen. Es ist denkbar, dass diese Heterogenität keinen Einfluss auf biologische Funktionen hat, entweder, weil dem Glykan keine weitere Funktion zukommt oder weil dessen Funktion den übereinstimmenden oder konservierten Zuckern zugrunde liegt. Ribonuklease B aus Rinderpankreas weist zum Beispiel an seiner einzigen Glykosylierungsstelle (Asn34) in der Polypeptidkette Zucker des *High-Mannose*-Typs auf, wobei die Anzahl der Mannosereste zwischen fünf und neun variieren kann [46]. Verglichen mit seinem nicht glykosylierten Homolog Ribonuklease A weist Ribonuklease B eine erhöhte thermische Stabilität auf, welche der Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen dem Amidproton des Lysin37 und einem Sauerstoffatom des ersten GlcNAc zugeschrieben wird [47, 48]. Ribonuklease A weist

allerdings gegenüber Ribonuklease B eine dreifach höhere spezifische Aktivität auf, die spezifischen Aktivitäten der verschiedenen Glykoformen sind ähnlich [46]. Der gegenteilige Effekt, also ein eindeutig positiver Einfluss der Glykoformen auf die spezifische Aktivität, konnte allerdings auch gezeigt werden. So hat schon eine minimale Veränderung der Glykane am Fc-Teil des IgG einen signifikanten Einfluss auf die Rezeptorbindefähigkeit und dessen Effektorfunktion. Auch kann das Vorhandensein von endständiger Sialinsäure den IgG-vermittelten Effekt von entzündungsfördernd zu entzündungshemmend umkehren [49]. Ein weiteres Beispiel ist das Glykoprotein Glykodelin, welches bei der Fortpflanzung von Primaten eine Rolle spielt. Glykodelin zeigt als Glykoprotein in der männlichen Samenflüssigkeit und der weiblichen Gebärmutter Schleimhaut unterschiedliche Glykoformen [50].

Das Vorkommen der Heterogenität von Glykanen wird zudem auf Grundlage der Evolution diskutiert. Die Vielfalt der verschiedenen Glykoformen spiegelt einen neutralen, nicht selektiven, evolutionären Prozess hin zu größerer funktioneller Vielfalt identischer Proteine wider [51]. Im Zuge der Anheftungen von Viren, anderen Parasiten oder auch Symbionten und Toxinen an Zelloberflächen-Glykane könnten variable Zielstrukturen (Glykoformen) so Bindungen abwehren bzw. umgekehrt auch veränderte Pathogen-Glykanstrukturen zu unerkannten Infektionen führen [52-54].

Neben den verschiedenen Typen von Glykanstrukturen und der Heterogenität der Glykane können die Zuckereinheiten zur weiteren Erhöhung der Diversität des Proteoms weiter modifiziert werden (*post-glycosylation modifications*). Während der Produktion von Glykosaminoglykanen (GAGs), Komponenten von Proteoglykanen in der extrazellulären Matrix, werden Glukosamin- und *N*-Acetylglucosaminreste zur Beeinflussung von extrazellulären Signalen wie Zell-Zell-Interaktionen sulfatiert [55]. Die Acetylierung von Sialinsäuren, die auf der Oberfläche von Zellen und Geweben präsentiert werden, kann Pathogen-Wirt-Interaktionen beeinflussen [56]. Lysosomale Vorläufer-Enzyme werden am C₆-Atom der *core*-Mannosen ihrer *N*-Glykane phosphoryliert, um sie von sekretorischen Glykoproteinen zu unterscheiden und sie zu den Lysosomen zu dirigieren [57].

Die Diversität der Glykane wird weiter durch das Vorkommen unterschiedlicher Zuckermonomere und deren unterschiedliche Verknüpfungsmöglichkeiten bei verschiedenem Verzweigungsgrad bestimmt. Einige auffällige Unterschiede gibt es hier auch zwischen eukaryotischen und nicht-eukaryotischen *N*-Glykanen. Während in Archäen die Anzahl der aufzufindenden Zuckerbausteine am höchsten ist, sinkt diese Diversität bei Bakterien und weiter hin zu Eukaryoten. Gleichzeitig findet man im Reich der Archäen und Bakterien hauptsächlich lineare Verknüpfungen der Zuckerbausteine, während Eukaryoten einen zunehmenden Verzweigungsgrad aufweisen [58]. Prokaryoten besitzen kein vergleichbares Kompartiment zum Golgi-Apparat, daher gibt es keinen Hinweis und keinen Grund zur Annahme, dass auch Prokaryoten ihre *N*-Glykane nach erfolgtem Aufbau hin zu größerer Diversität erneut umbauen. Auch die Aglykon-Einheit (die Nicht-Zucker-Komponente), auf die die Zucker übertragen werden, weist Unterschiede auf. In Eukaryoten und Archäen ist dieses Lipid das bereits

erwähnte Dolichol, ein Polymer bestehend aus unterschiedlicher Anzahl an C₅-Isopren-Einheiten. In Archäen werden etwa 12 Isopren-Einheiten gefunden, in Hefen 14 und in Säugern bis zu 19. In Bakterien besteht das Aglykon aus genau 11 Isopren-Einheiten (Undecaprenol) (Abb. 1-2). Es unterscheidet sich von Dolicholen gleicher Länge durch die Reduktion der endständigen Isopentenyl-Gruppe. Die Anwesenheit der endständigen Doppelbindung führt zu einer verminderten Rotationsfreiheit der Lipid-verknüpften Oligosaccharide [59]. In Bakterien werden die Zuckereinheiten an der Zytoplasmamembran und im Periplasma übertragen, bei Archäen an der Zytoplasmamembran und der Zelloberfläche und bei Eukaryoten am und im rauen Endoplasmatischen Retikulum. Weiter besteht die Konsensussequenz für *N*-Glykosylierungen bei Bakterien aus der Sequenz Asp/GluXaa₋₁AsnXaa₊₁Ser/Thr (Xaa ≠ Pro), bei Eukaryoten ist es die kürzere, schon erwähnte Sequenz AsnXaaSer/Thr [60]. Das Vorkommen bakterieller *N*-Glykosylierung scheint daher stärker kontrolliert zu sein. In *C. jejuni* wird zusätzlich zur eukaryotischen Konsensussequenz *N*-terminal ein Glutaminsäure- oder Asparagin-Rest benötigt [32], zum anderen werden prokaryotische Oligosaccharide auf schon fertig gefaltete Proteine im Periplasma bzw. auf der Zelloberfläche übertragen. Konsensussequenzen, die im Inneren eines gefalteten Proteins vorliegen, sind nicht zugänglich [59]. Eine Analyse des *N*-Glykoms ergab einen weiteren interessanten Zusammenhang: es gibt deutlich weniger *N*-Glykoproteine in einzelligen als in mehrzelligen Lebewesen [61, 62]. Neben diesen offensichtlichen Unterschieden in den drei Domänen des Lebens gibt es aber auch eine grundlegende Gemeinsamkeit: Bei der *N*-Glykosylierung muss am reduzierenden Ende mindestens ein Zucker mit Acetamido-Gruppe (NAc) vorkommen. Bei Eukaryoten ist dies eine Chitobiose-Einheit (GlcNAc-GlcNAc), bei Bakterien entweder die 2,4-Diacetamido-2,4,6-Trideoxyglucopyranose (= Bacillosamin; z. B. *Camphylobacter* und *Wolinella*) oder eine HexNAC (z. B. in *H. pullorum*), wobei „Hex“ für eine beliebige Hexose steht [59].

1.3 Biologische Funktionen von Glykosylierungen

N-Glykosylierung ist eine verbreitete *co*- bzw. *post*-translationale Modifikation an Proteinen und spielt eine wichtige Rolle bei der Erhöhung der Diversität der Proteinstrukturen und deren Funktion [54, 63, 64]. Mehr als die Hälfte aller humanen Proteine sind glykosyliert, davon sind etwa 90 % *N*-Glykoproteine [65], darunter sind Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren, Zelloberflächenproteine und sekretierte Proteine [66]. Sie übernehmen eine Vielzahl von biologischen Funktionen. Sie bestimmen, neben anderen funktionellen Gruppen, die individuellen Eigenschaften wie zum Beispiel Ladung und den isoelektrischen Punkt (z. B. durch den Sialinsäureanteil (siehe Abb. 1-4) oder durch Phosphorylierungen des Zuckers) der extrazellulären und Membran-assoziierten Proteine. Naszierende Polypeptidketten präsentieren hydrophobe Regionen, die von Proteinen der Hsp70- und der Hsp40-Familien (*chaperons*) erkannt und gebunden werden. Diese Aktion verhindert unkontrollierte Aggregationen und begünstigt somit die native Proteinfaltung [37]. Auch die *en bloc*-Übertragung von verzweigten *N*-Glykanstrukturen mit Hilfe der Oligosaccharyltransferase auf naszierende Polypeptidketten

verhindert die Aggregation von Polypeptid-Intermediaten, da diese hochflexiblen, hydrophilen Strukturen hydrophobe Regionen maskieren können [10, 62]. Die Größe von Oligosaccharid-Molekülen kann sich begünstigend oder verhindernd auf Protein-Protein-Wechselwirkungen auswirken. Auch im Zuge des Trimmens der Zuckerstruktur im ER und Golgi-Apparat (Abschnitt 1.2) können die Zucker in direkten Zusammenhang mit dem Aussortieren von falsch gefalteten Proteinen gesetzt werden [67]. Zuckereinheiten tragen weiter zu einer erhöhten Löslichkeit der zu transportierenden Proteine bei [68] und stabilisieren sie bzw. schützen sie vor Degradation durch Proteasen. Ribonuklease B weist, wie bereits erwähnt, eine erhöhte thermische Stabilität auf [47, 48]. Dihydrofolat-Reduktase aus *E. coli* ist natürlicherweise nicht glykosyliert. Chemisches Anheften von Glykanen führte zu einer thermischen Stabilisierung bei gleichbleibender Aktivität [69]. Am Beispiel von Subtilisin aus *Bacillus lentus*, einer Serin-Endopeptidase mit autohydrolytischer Aktivität, konnte gezeigt werden, dass infolge der chemischen Kopplung entsprechender Glykosylthiole von GlcNAc, Glu oder Glu₃ (über Disulfidbrücken an einem eingefügten Cystein) die Degradation sowohl durch Autoproteolyse als auch durch die Proteolyse durch externe Proteasen deutlich gesenkt wurde. Dabei wurde die Enzymaktivität nicht signifikant beeinflusst. Die Stabilisierung ist auf eine sterische Hinderung der potentiellen Proteaseschnittstellen durch die eingefügten Funktionalitäten zurückzuführen [70]. Interessanterweise können Zucker aber auch ohne direkte *N*-Glykanbindung einen Einfluss auf Proteine haben. In zahlreichen Studien mit nicht-glykosylierten Proteinen wird in Anwesenheit von hohen Konzentrationen an Glukose, Saccharose, Galaktose oder Trehalose ein Protein-stabilisierender Effekt beobachtet [69]. Stabilisierende Effekte regulieren somit indirekt die Proteinkonzentration. Neben stabilisierenden Effekten von Glykanstrukturen ist auch ein direkter Einfluss auf die katalytische Aktivität beschrieben. Cellobiohydrolasen (Cellulasen) binden Cellulose typischerweise über ein *carbohydrate binding module* (CBM – Proteindomäne mit Kohlenhydrat-bindender Eigenschaft, ohne eigenständige Aktivität) und präsentieren dem CBM-enthaltenden Enzym die Cellulose zur Hydrolyse in Cellobiose-Einheiten (Disaccharide). Das Entfernen aller 3 *N*-Glykane von CBM-enthaltender Cellulase rCel7A aus *Penicillium funiculosum* (exprimiert in *Aspergillus niger*) führte zu einer um 35 % gesteigerten enzymatischen Aktivität. Hingegen führte die Expression eines bakteriellen CBM-Proteins in *Pichia pastoris* zu 3 zusätzlichen *High-Mannose N*-Glykanen und dies zu dramatisch reduzierter Cellulose-Bindungsaffinität. Diskutiert werden sowohl der direkte sterische Einfluss der Zuckereinheiten auf die Zugänglichkeit der Substrate zum aktiven Zentrum als auch der indirekte Einfluss in Bezug auf die konformationelle Stabilität [63]. Humane Sphingomyelin-Phosphodiesterase acid-like 3A (SMPDL3A) ist ein sekretiertes *N*-Glykoprotein. Nach rekombinanter Expression in THP-1 Makrophagen oder CHO-Zellen wurde das gereinigte Produkt enzymatisch deglykosyliert. Es konnte ein signifikanter Verlust der Phosphodiesterase-Aktivität festgestellt werden. Behandlung der Zellen mit Tunicamycin resultierte in der Expression einer nicht-glykosylierten, falsch gefalteten Variante, die rasch abgebaut wurde [71]. Es gibt aber auch genügend Beispiele, in denen die An- oder Abwesenheit der Zucker keinen

Einfluss auf die Aktivität hat. So zeigen *N*-glykosylierte Elastase aus *Pseudomonas* und ihre dreifach deglykosylierte Mutante dieselbe enzymatische Aktivität, wohingegen die Sekretierbarkeit in der nicht glykosylierten Form deutlich reduziert ist [72]. *N*-Glykane sind Strukturen, durch deren Bindung zahlreiche Interaktionen und Wechselwirkungen erzielt werden. Es gibt eine große Anzahl an Glykan-Bindeproteinen (GBP), die in zwei Hauptklassen eingeteilt werden können: in Lektine und Glukosaminoglykan-bindende Proteine. Lektine haben eine relativ geringe Affinität zu ihren Zuckersubstraten (höherer mikromolarer bis niedriger millimolarer Bereich), weshalb sie oft mehrere Bindestellen besitzen (Multivalenz) [73]. Lektine sind ebenfalls ubiquitär in der Natur verbreitet und ihre Interaktionen mit Glykanen vermitteln zahllose biologische und physikalische Funktionen. Humaner Faktor VIII (FVIII) ist ein Sialoglykoprotein im Blutplasma, welches eine Rolle bei der Blutstillung spielt. Auf Basis seiner Aminosäuresequenz besitzt FVIII 21 *N*- und 7 *O*-Glykosylierungsstellen, deren Zuckerstrukturen von bi- über tri- nach tetraantennär des *Complex*-Typs bis hin zum *High-Mannose*-Typ reichen. Die Lektine Galektin-1 und Galektin-3 sind Bindepartner von Zuckerstrukturen auf humanem FVIII. Durch Bindung von Galektin-1 konnte die prokoagulierende Aktivität von FVIII negativ beeinflusst werden [74]. In den letzten Jahren wurden zudem Mikroarrays mit Lektinen entwickelt, ein vielversprechendes Werkzeug zur Analyse von Glykosylierungsmustern von Proteinen [75, 76]. Glukosaminoglykane (GAG) sind lineare und heterogene Sulfatzucker, welche kovalent mit Proteinen verknüpft sind und deren sich wiederholende Grundeinheiten Disaccharide aus Uronsäure und Hexosen bilden [77]. GAG kommen beim Menschen unter anderem in der extrazellulären Matrix der Haut, der Nerven und des Gelenkgewebes vor. Diese GAG spielen bei der Infektion mit Borellien eine entscheidende Rolle, da sie von Spirochäten-eigenen GAG-Bindeproteinen (Bgp) erkannt und gebunden werden. Bgp sind Virulenzfaktoren [78]. Weitere Wechselwirkungen mit Pathogenen über wirtseigene Zuckerstrukturen sind bekannt. Das Influenza-A-Virus (IAV) ist ein umhülltes segmentiertes einzelsträngiges RNA-Virus. Humane IAV binden vorrangig an Neu5Acα2-6Gal-Rezeptoren, während Vogel-infizierende IAV bevorzugt an Neu5Acα2-3Gal-Rezeptoren binden [79]. Das HIV-1 (*human immunodeficiency virus*) besitzt ein vielfach glykosyliertes Hüllprotein gp120, welches mit der Wirtszell-Rezeptorbindung und somit dem Eintritt in die Wirtszelle assoziiert ist. Es besitzt über 20 *N*- und *O*-Glykosylierungsstellen. Die Glykane machen etwa 50 % seines Molekulargewichts aus. Diese Zuckerstrukturen umschließen das Virus und verhindern so dessen Erkennung durch das humane Immunsystem. Die konservierten Bindeepitope vom *High-Mannose*-Typ sind biotechnologische Ziele zur Inhibierung des Infektionsweges. Glykan-bindende Lektine, wie Vertreter der Cyanovirin-N-(CVN)-Familie, Antikörper wie 2G12 oder das Antigen-Bindefragment PGT wurden als effektive Inhibitoren zur Verhinderung des Zell-Eintrittes identifiziert [80]. Der Erreger *Streptococcus pneumoniae* verursacht Lungenentzündung, Blutvergiftung und Meningitis. Sein Genom kodiert für mindestens 40 Glykosidhydrolasen und Polysaccharidlyasen, welche glykosidische Bindungen hydrolysieren können. NanA, BgaA, StrH und EndoD, Glykosidasen aus *S. pneumoniae*, deglykosylieren humane *N*-verknüpfte Glykoproteine nach

einer Infektion, um die Zucker als Nährstoffquelle zu nutzen [81]. Zucker binden auch als Liganden an Rezeptoren auf der Zelloberfläche, um Signaltransduktionswege zu stimulieren [82]. Im Zuge der Immunantwort spielen glykosylierte Antigen-Rezeptoren auf T-Zellen (TCR), B-Zellen (BCR) und dem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) eine Rolle. T-Zell-Aktivierung über T-Zell-Rezeptorsignale induziert eine gesteigerte Bildung von β 1,6-*N*-Acetylglucosaminyl-Transferase (Gen *MGAT5*), welche wiederum die T-Zell-Rezeptoren glykosyliert. Mäuse, defizient im *MGAT5*-Gen, zeigen eine erhöhte Anfälligkeit für Autoimmunerkrankungen. Auch der Verzweigungsgrad von *N*-Glykanen hat einen Einfluss auf die Entwicklung der T-Zellen. Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen weisen einen Defekt in der Verzweigung von *N*-Glykanen auf intestinalen T-Zellen auf, einhergehend mit einer signifikanten Reduktion an *MGAT5*-Transkription [83]. Antikörper des Types IgG haben neben den Glykanen in der C_H2-Domäne des F_c-Teiles auch Glykane in der variablen Region (F_{ab}). Diese Glykane erhöhen die Stabilität der Antikörper [84]. Neutralisierende Antikörper erkennen Epitope am Hüllprotein E des Zika-Virus. Dieses Hüllprotein besteht aus drei Domänen und einer helikalen Verbindungs-Domäne zur Transmembran-Domäne. In der ersten Domäne befindet sich eine *N*-Glykosylierungsstelle, deren Zuckerstruktur antigene Erkennungsepitope maskieren kann und so der Immunantwort entgegenwirkt [85]. Durch die Maskierungsfunktion der Zucker können Proteine auch vor Modifikationen durch freie Radikale geschützt werden. Dies konnte an Ribonuklease B mit freien Radikalen, erhalten aus toxischen Xenobiotika, im Vergleich zur nicht glykosylierten Ribonuklease A gezeigt werden [86]. Zuckerstrukturen können aber auch selbst antigene Wirkung erzielen. Am bekanntesten ist dieser Effekt wohl beim humanen Blutgruppen-ABO-Antigen-System. ABO-Glykane werden auf roten Blutkörperchen, in extrazellulären Säften wie Speichel, Tränenflüssigkeit oder Muttermilch und auf oralen Epithelzellen gefunden. Das Vorläufer-Antigen H besteht aus Glc β 1-4Gal β 1-3GlcNAc β 1-4Gal α 1-2Fuc und entspricht der Blutgruppe O. Bei Blutgruppe A erweitert eine *N*-Acetylgalaktosaminyl-Transferase das Antigen auf diese Zuckerfunktionalität: Glc β 1-4Gal β 1-3GlcNAc β 1-4Gal(α 1-2Fuc) α 1-3GalNAc, bei Blutgruppe B eine Galaktosyltransferase auf Glc β 1-4Gal β 1-3GlcNAc β 1-4Gal(α 1-2Fuc) α 1-3Gal. Im körpereigenen Blutsystem werden im ersten Lebensjahr Antikörper gegen die nicht vorhandenen Antigene gebildet. Dementsprechend besitzt Blutgruppe A Anti-B-Antikörper, Blutgruppe B Anti-A-Antikörper, Blutgruppe O Anti-A- und Anti-B-Antikörper und Blutgruppe AB keine Antikörper. Bei Bluttransfusionen darf daher nur Blut fusioniert werden, welches keine Antigene für die eigenen Blutgruppen-Antikörper besitzt [87].

Zusammengenommen folgt der Einfluss der Glykane keinem einheitlichen Muster, so dass ihre biologische Rolle nur schwer klar definiert werden kann. Die vollständige Aufzählung der funktionellen Vielfalt der Glykane würde an dieser Stelle den Rahmen sprengen. Es gibt hierzu umfangreiche Literatur [88]. Es sei aber angemerkt, dass die Frage „Welche biologischen Funktionen werden von Glykanen beeinflusst?“ vielmehr Sinn ergibt, wenn man sie etwas ändert. Wenn sogar Prozesse wie die Umwandlung von Larven zu adulten Tieren des rotbraunen

Reismehlkäfers *Tribolium castaneum* durch die Anreicherung von beträchtlich veränderten *N*-Glykanen beeinflusst werden [89], sollte die Frage viel mehr heißen: „Welche biologischen Funktionen werden nicht durch Glykane beeinflusst?“!

1.3.1 Krankheiten

Ob der mannigfaltigen Funktionen von Zuckerstrukturen in biologischen Systemen ist es nicht verwunderlich, dass eine Störung oder Veränderung der Glykanmatrix zu mannigfaltigen Krankheitsbildern führen kann. Auch der Fakt, dass glykosylierte Asparaginseitenketten in menschlichen Proteinen bevorzugt in *loop*-Strukturen (78 %), verglichen mit dem Vorhandensein in β -Faltblatt-Strukturen (12 %) und α -Helices (10 %), vorkommen, verdeutlicht die Wichtigkeit ihrer korrekten Position. Ähnliche Lokalisationsergebnisse wurden in Mäusen, Insekten, Pflanzen und Hefen gefunden [90].

In Krebszellen unterliegen Zuckerstrukturen auf der Oberfläche von Glykoproteinen und Glykolipiden ebenfalls weitgehenden Veränderungen. Tumorzellen haben, verglichen mit gesunden Zellen, nachweislich eine veränderte Zusammensetzung von Zuckermolekülen auf ihrer Zelloberfläche. Krebszellen nutzen dabei Glykane ähnlich wie Pathogene, sie tarnen sich selbst durch Maskierung mit wirtsfreundlichen Zuckerstrukturen oder exprimieren Zuckerstrukturen auf ihrer Zelloberfläche, die das Immunsystem zu ihrem eigenen Nutzen missbrauchen [91]. Zu solchen Zuckerstrukturen gehören ein oder mehrere endständige negativ geladene Sialinsäure-Moleküle, Einzelmoleküle an *O*-glykosyliertem *N*-Acetylgalaktosamin (Tn-Antigen, wobei T für Tumor oder den Entdecker Thomson-Friedensreich und n für *nouvelle* steht) und Fukose-enhaltende Lewis X-, Y-, A- und B-Glykane. Diese Tumor-assoziierten Glykane sind in der Lage, bestimmte Lektine (SIGLECs = *sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins*, MGL = *macrophage galactose-type lectin*) und Integrine (DC-SIGN = *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin*) auf Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs) und natürlichen Killerzellen zu binden. Diese Bindung führt dann im Ergebnis zu einer erhöhten Produktion von anti-entzündlichen Zytokinen, zur Absenkung der Produktion entzündlicher Zytokine, einer verminderten Aktivität von natürlichen Killerzellen oder der Induktion von T-Helferzellen (T_H2) und regulatorischen T-Zellen (T_{reg}). Bösartige Veränderungen von Zellen können auch einhergehen mit einem veränderten Expressionsmuster von Genen, die zur Produktion von Glykosyltransferasen und Glukosidasen führen [91]. In Tumorzellen induziert so zum Beispiel der Sauerstoffmangel-induzierte Transkriptions-Faktor 1 α (HIF1 α) die Expression von Glykosyltransferasen, die zur Bildung von Lewis-Antigenen X und A führen [92]. Veränderte Glykosylierungsmuster können wahrscheinlich auch das Metastasierungsverhalten beeinflussen, eine α 2,8-Polysialysierung auf der Oberfläche von Brustkrebszellen führte zu verringerter Zell-Zell-Adhäsion, welche wiederum zu erhöhter Aufnahme der Krebszellen in das umgebende Gewebe führte [93]. Im Falle von Wachstumsfaktor-Rezeptoren (*growth factor receptor*) können Glykane teilweise für die veränderte Aktivität und deren Krebszell-Phänotyp

verantwortlich sein. Dabei gibt es drei grundlegende Mechanismen: Die Zuckerstrukturen können a) einen direkten Effekt auf den intrazellulären Transport, die Ligandenbindung oder die Signalweiterleitung von Rezeptoren haben, b) durch das Vorhandensein von β 1,6 verzweigten Polylaktosaminketten von extrazellulären Galektinen gebunden werden, die durch daraus resultierende Zuckergitterbildung Rezeptoren auf Zellmembranen stabilisieren und c) durch Interaktion mit Gangliosiden (Sialinsäure-enhaltende Glykolipide) zusammen mit anderen Membran-ständigen Komponenten für eine potenzierte Weiterleitung von Signalen von der Zellmembran zum Nukleus sorgen [94]. Veränderte Strukturen von Glykolipiden oder deren Bindeepitope sind oft mit Krebserkrankungen oder Autoimmunerkrankungen assoziiert. Bei der IgA-Nephropathie lagern sich IgA-Antikörper-Immunkomplexe in den Nierenkörperchen ab, im ungünstigsten Fall kommt es zu einem Dialyse-erfordernden Nierenversagen. Die Autoimmunerkrankung kommt durch Auto-IgG-Antikörper zum Tragen, die gegen die fehlende *O*-Galaktosylierung an der *hing*e-Region der IgA-Antikörper gerichtet sind [95]. Lysosomale Speicherkrankheiten (LSD) entstehen durch Mutationen bei Hydrolasen in Lysosomen, deren Aufgabe es ist, intra- und extrazelluläre Moleküle wie Glykoproteine, Glykolipide, Zucker oder Nukleinsäuren zu degradieren. Fehlen Hydrolasen wie Galaktosidasen, Hexosaminidasen oder Mannosidasen, kommt es zur Akkumulation derer Substrate in verschiedenen Geweben, wie z. B. dem Herzen, dem zentralen Nervensystem, der Leber oder der Niere. Klinisch zu beobachtende Auswirkungen dieser Abbaufehlfunktion sind unter anderem Entwicklungsstörungen, Epilepsie, Lernschwierigkeiten oder Erkrankungen des peripheren Nervensystems [96]. Beispiele für bekannte LSD sind Morbus Gaucher, Morbus Pompe oder Morbus Fabry.

Krankheiten, die mit einem Defekt in der *N*-Glykanbiosynthese einhergehen, werden *Congenital disorders of glycosylation* (CDG) genannt. Sie umfassen sowohl mutierte Enzyme, die Nukleotid-Zucker als Substrate der *N*-Glykanbiosynthese bereitstellen, Enzyme, die am direkten Zusammen- und Umbau der *N*-Glykane am ER und im Golgi-Apparat beteiligt sind, als auch Enzyme des Glykoproteintransportsystems [67, 97]. Die ersten CDG-Patienten, zweijährige Zwillinge, wurden 1980 von dem belgischen Kinderarzt Prof. J. Jaeken beschrieben [98]. Ihr Krankheitsbild zählt heute zu der häufigsten Form (CDG-1a oder PMM2-CDG) dieser Stoffwechselkrankheit, die bei dieser Form autosomal (nicht Geschlechtschromosomen-besetzt) rezessiv vererbt wird. Weltweit gibt es über 700 Patienten mit dem CDG-1a-Syndrom [99]. Die Sterblichkeit beträgt im ersten Lebensjahr 20 % [100]. Phänotypisch charakteristisch sind Schielen, große Ohren, eine dünne Unterlippe, invertierte Brustwarzen, eine abnormale Körperfettverteilung und Entwicklungsverzögerungen im Intellekt. Einige Patienten entwickeln außerdem Gerinnungsstörungen, Thrombosen, Schlaganfall-ähnliche Episoden, Lebererkrankungen und endokrine Absonderungsstörungen. Weit verbreitet sind auch Störungen der Keimdrüsen und Minderentwicklung des Kleinhirns schon bei Neugeborenen. Die meisten Patienten erholen sich jedoch von kritischen lebensbedrohlichen Phasen. Manche Kinder zeigen gar keine lebensbedrohlichen Symptome oder nur schwach ausgeprägt und

erreichen das Erwachsenenalter. Die Störungen sind Folge eines Defekts der zytosolischen Phosphomannomutase [101]. Sie katalysiert die Umwandlung von Mannose-6-Phosphat zu Mannose-1-Phosphat, einem wichtigen Vorläufer zur Bildung von GDP-Mannose. Durch die Unterdrückung dieser Reaktion ist die Bildung von Lipid-verknüpften Oligosacchariden (LLO) zur Assemblierung von *N*-Glykanstrukturen stark verringert. *In vitro* konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Akkumulation von Mannose-6-Phosphat zur Spaltung von LLOs führen kann [102]. Allein für PMM2-CDG werden bei verschiedenen Suchbegriffeingaben in der Literaturdatenbank PubMed 165 Veröffentlichungen gefunden, die insgesamt 561 Patienten mit diesem Syndrom beschreiben [101]. Die beschriebenen veröffentlichten CDG-Typen sind in zwei Hauptgruppen einzuteilen. Defekte im Zusammenbau der Lipid-verknüpften Oligosaccharide bzw. deren Übertrag auf Proteine gehören Typ 1 an, wohingegen Defekte beim Trimmen oder der Prozessierung der Glykane im ER und Golgi-Apparat dem Typ 2 zugeordnet werden. Nicht klassifizierte Defekte werden mit CDG-x bezeichnet. Die Eingruppierung erfolgt demnach entsprechend der Lokalisation des jeweiligen Defekts und nicht nach klinischen Gesichtspunkten. Eine neue Klassifikation beruht auf der Bezeichnung des bekannten Gens, gefolgt von „-CDG“; z. B. PMM2-CDG anstelle von CDG-1a. Alle bisher veröffentlichten Subtypen des CDG-Syndroms, etwa 130 an der Zahl, sind in Ferreira *et al.* 2018 aufgeführt. Das CDG-Syndrom gehört mit etwa 1200 dokumentierten Patienten weltweit zu den seltenen Krankheiten [103]. Neben diesen Hypoglykosylierungs-Krankheiten gibt es auch Krankheiten, die mit einer Hyperglykosylierung, also einem erhöhten Vorkommen der Zuckerstrukturen einhergehen. Die Hyperglykosylierung entsteht, weil *N*-Glykosylierungsstellen, welche normalerweise durch sterische Gegebenheiten nicht zugänglich sind, glykosyliert werden. Dieses Phänomen könnte seine Ursache bei Alzheimer-Patienten in abnormaler Membrananordnung oder in Fehlfunktionen von Faltungshelferproteinen (*chaperons*) haben. Dabei lagern sich pathologisch Proteine als Amyloid-Plaques und Neurofibrillenbündel im Gehirn ab. Das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau bindet zunächst an paarige helikale Filamente (PHF), im späteren Verlauf der Krankheit an Neurofibrillenbündel, die das Innere der Zelle verstopfen. Tau ist dabei hyperphosphoryliert und hyperglykosyliert [104].

Allgemein bedingen akute Infektionen häufig eine Reduktion, chronische Infektionen hingegen eine Vermehrung der Verzweigungen proteingebundener Oligosaccharide [105].

Anhand der Effekte von Glykosylierungsdefekten wird deutlich, dass diese nicht unbedingt direkte primäre Effekte sein müssen. Demgegenüber stehen sekundäre Glykosylierungsstörungen, beispielsweise bei den Stoffwechselerkrankungen Galaktosämie (Defekt der Galaktose-1-P-Uridyltransferase) und Fruktoseintoleranz (gestörte Synthese von Mannose-6-Phosphat) [106, 107]. Auch Alkoholmissbrauch zeigt sekundäre Glykosylierungsdefekte, da das beim Abbau von Alkohol entstehende Acetaldehyd Glykosyltransferasen hemmt. Deglykosylierte Isoformen des Serumtransferrins dienen daher als Kontrollmarker für chronischen Alkoholkonsum [108].

1.3.2 N-Glykane als diagnostische Marker, Vaccine und Therapeutika

Ein aktuelles Review von Ajit Varki [109] mit 1095 Literaturangaben zeigt deutlich, wie groß der Zweig oder besser Ast des Gebietes der Glykomik ist. Ein umfassendes Wissen über alle Untergebiete aufzubauen, scheint aus Gründen des sich schnell und stetig entwickelnden Forschungsfeldes mit zahlreichen publizierten Neuinformationen fast unmöglich, eine Spezialisierung unumgänglich. Die N-Glykosylierung spielt, wie bereits in den vergangenen Abschnitten ausführlich beschrieben, beim fehlerfreien Ablauf verschiedenster Vorgänge im Menschen multiple Rollen und Störungen dieses Vorganges führen zum Auftreten mannigfaltiger pathogener Effekte. Die Aufgabe der Forschung ist es, solche Defekte mit innovativen diagnostischen Methoden zu identifizieren, *in vivo* und *in vitro* biochemisch zu charakterisieren und Ansätze für behandelnde Therapien zu entwickeln.

Auf der Oberfläche aller lebenden Zellen - dies schließt auch pathogene Mikroorganismen ein - sind eine Vielzahl von Glykanstrukturen lokalisiert. Diese Glykane spielen oft bei Infektionsprozessen durch Interaktion mit ihren Bindungspartnern auf der Wirtszelloberfläche eine entscheidende Rolle und stellen somit wichtige Angriffspunkte (*drug targets*) für die Entwicklung neuer Impfstoffe und Medikamente dar [110]. Für CDG-Formen, welche durch Defekte an Enzymen hervorgerufen werden, die an der Synthese des Vorläuferglykans (GlcNAc)₂-Man₉-Glc₃ am ER beteiligt sind, wurden folgende Überlegungen zu den Auswirkungen der inaktiven Glykosyltransferasen gemacht: Es ist bekannt, dass auch verkürzte hypoglykosylierte Zuckerstrukturen auf naszierende Proteinketten übertragen werden können, wenn auch mit geringerer Effektivität [111]. Diese verkürzten Glykane könnten, verlinkt mit Glykoproteinen, direkten Einfluss auf die Krankheiten haben. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die akkumulierenden Glykane selbst oder Modifikationen dieser Glykane noch vor dem Übertrag auf Proteine eine toxische Wirkung ausüben könnten [101]. Die Akkumulation von Substraten und deren Toxizität bei erhöhter Konzentration bei defekten Enzymen stellt ein bisher ungelöstes Problem dar. Eine weitere Schwierigkeit: Für viele N-Glykoproteine konnte die physiologische Rolle ihrer N-Glykane noch nicht nachvollzogen werden, was es erschwert, diese Fehlfunktionen zu verstehen [97]. Bei einigen CDG-Krankheiten können Gaben von fehlenden Zuckern wie Galaktose, Mn²⁺ bzw. Mannose als Nahrungsergänzung die pathogenen Effekte teilweise beheben [112]. Da die Therapieform mit Gaben von Zuckern nicht bei allen Betroffenen anschlägt [112], ist die Manipulation des Stoffwechsels durch z. B. Gaben von rekombinanten Enzymen eine mögliche und realistische Option.

Bei lysosomalen Speicherkrankheiten (LSD) gibt es zwei Ansätze zur Therapie: Die Enzym-Ersatz-Therapie (ERT = *enzyme replacement therapy*) und die Chaperon-Therapie (*pharmacological chaperone therapy*). Bei Enzym-Ersatz-Therapien werden rekombinante Enzyme intravenös verabreicht, um die Funktion defekter Enzyme zu ersetzen. Im Falle von α -Mannosidosis konnte in Patientenstudien gezeigt werden, dass das Medikament „Lamzed“ die Konzentration an akkumulierenden Oligosacchariden normalisiert, das Fortschreiten der Krankheit verhindert und

das Wohlbefinden der Patienten erhöht [113]. Ein Nachteil dieser Methode sind Immunreaktionen auf die verabreichten Enzyme wie die Bildung von IgG-Antikörpern [114]. Die Chaperon-Therapie ist ein neuartiger Ansatz [115, 116], bei dem niedermolekulare Liganden oral mit dem Ziel verabreicht werden, mutierte Enzyme selektiv zu binden und sie zu stabilisieren. Durch Erhöhung der zellulären Konzentration der mutierten Enzyme sollen der lysosomale Transport und die „Aktivität“ der Enzyme gesteigert werden. Das Medikament „Migalastat“ konnte in Studien erfolgreich zur Behandlung von α -Galaktosidase-Defekten eingesetzt werden. Ein Vorteil dieser Methode ist die sehr gute Verträglichkeit [115, 116].

Auf verschiedenen Arten von Tumorzellen können veränderte Glykanstrukturen oft schon in sehr frühen Stadien der Krankheit detektiert werden, was sie zu aussagekräftigen diagnostischen Markern macht. Nachgewiesen werden diese Veränderungen mit Hilfe von spezifischen monoklonalen Antikörpern oder Galektinen gegen definierte Zuckerstrukturen. Die Tumor-assoziierten Glykane bestimmen über Glykan-Lektin-Interaktionen die Immunsystem-hemmenden Eigenschaften und können Ziele von Tumor-Immuntherapien sein. Theratope Vaccine verstärkten in Studien (Klinische Phase II) die wenig reaktiven sTn-Selbstantigene (Ser/Thr-GalNAc- α 2,6-Neu5Ac), sialysierte Tn-Antigene, auf Brustkrebszellen. Dafür werden die Selbstantigene nachsynthetisiert und an Immunocyanin (Untereinheit des Hämoglobin-Homologs Hämocyanin aus *Megathura crenulata*) als *carrier* gekoppelt. So induzierten sie eine verstärkte sTn-spezifische Immunität. Die Immunantwort ging einher mit einem signifikanten Anstieg der Überlebensrate bei Patienten mit bereits metastasierendem Brustkrebs. In Klinische-Phase-III-Studien konnten diese positiven Ergebnisse leider nicht reproduziert werden, der Hauptgrund könnte in der später verifizierten Heterogenität der Expression der sTn-Antigene der Patienten liegen [91]. Die Zucker werden auch als Tumormarker herangezogen. Verschiedene Krebsarten zeigen eine erhöhte Expression an Galektin-1 und -3 im Blut, diese binden Galaktosereste auf der Zelloberfläche und beeinflussen so Zellproliferation, Migrationsverhalten und Tumorprogression. Werden diese Galektin-bindenden Zucker auf einer funktionalisierten Glasoberfläche angeheftet, kann anschließend der Galektin-Gehalt einer Blutprobe über Fluoreszenz-markierte Anti-Galektin-Antikörper darauf bestimmt werden [117]. Allgemein werden bei der Bekämpfung von invasiven Krankheiten gerne Polymer-Wirkstoff-Konjugate eingesetzt. Diese bestehen aus fünf Komponenten: einem polymeren Rückgrat, dem Wirkstoff, einem Linker, einer *targeting*-Gruppe und einem Solubilisierungsmittel. Das Rückgrat kann zum Beispiel von PEG (Polyethylenglycol) gebildet werden, es ist nicht toxisch, nicht immunogen und in hohem Maße wasserlöslich. Nachteil: es akkumuliert in Leber oder Niere [118, 119] und besitzt nur zwei reaktive Gruppen, an welche Wirkstoffmoleküle gekoppelt werden können. *targeting*-Moleküle könnten z. B. Rezeptor-affine Peptide, Lektine oder Antikörper sein. Der Linker hat die Funktion, den Wirkstoff bis zu seiner gezielten Entlassung zu binden. Die Freisetzung kann pH-gesteuert oder enzymatisch am Zielort erfolgen [120]. Wirkstoffmoleküle sind Synthetika und Naturstoffe mit Struktur-Wirkungs-Beziehung, wie Hormone, Wachstumsfaktoren, Gerinnungsfaktoren, Zytokine wie Erythropoietin,

therapeutische Enzyme oder Antikörper. Mehr als 70 % dieser Biopharmaka sind *N*-glykosyliert [121, 122].

Die Herstellung pharmakologisch wirksamer *N*-glykosylierter Proteine erfolgt ausschließlich *in vivo* unter Verwendung verschiedener Expressionssysteme. Co- und post-translationale Modifikationen spielen dabei eine entscheidende Rolle für die korrekte Faltung, die Funktionalität, Stabilität und Immunogenität der Biopharmaka [88]. Dabei haben mehrere produktionsbedingte Faktoren einen Einfluss auf das Glykosylierungsmuster. Verschiedene Produktionsstämme exprimieren verschiedene Sets an glykosylierenden und deglykosylierenden Enzymen sowie Rezeptoren und Transportern. Je nach Anwendung müssen die Stämme ausgewählt werden. Für eine erhöhte therapeutische Wirksamkeit von Pharmazeutika zur Behandlung der Gaucher-Krankheit (lysosomale Speicherkrankheit) muss bei der Enzymersatztherapie die Glykosylstruktur der rekombinanten Glucocerebrosidase vom *High-Mannose* Typ sein. Daher bieten sich hier Expressionsstämme wie *Arabidopsis thaliana* oder *Nicotiana benthamiana* an [123, 124]. Allerdings müssen die Glykosylstrukturen anschließend auf das Vorhandensein der pflanzentypischen Zucker β 1,2-Xylose und α 1,3-Fukose getestet werden (auch wenn eine immunogene Wirkung bisher nicht gezeigt werden konnte), da diese Zucker in menschlichen Glykanen nicht vorkommen [125]. Bakterielle Expressionssysteme eignen sich eher zur Herstellung von nicht glykosylierten therapeutischen Proteinen, wie für einige Antikörper-Fragmente, Zytokine, Hormone und Enzyme gezeigt werden konnte. Zur Herstellung von humanem, nicht-glykosyliertem IFN α wurde ein mutierter *E. coli*-Stamm verwendet, der zu erhöhter Produktion von IFN α führte [126], aber nicht die vor Protease-Abbau schützenden *human-like* Glykane enthielt [127]. Eine detaillierte Zusammenstellung zugelassener therapeutischer Proteine unter Angabe der Expressionssysteme findet sich in Dumont 2016 [128]. Während Hefe-, Pflanzen- und Insektenzellen selten Anwendung bei der Herstellung von glykosylierten Biopharmaka finden, werden für humane Anwendungen häufig Säugerzelllinien wie *Human Embryonic Kidney*- (HEK293) und *Chinese Hamster Ovary*- (CHO) Zelllinien (bei etwa 70 % der Biopharmaka) eingesetzt, deren Glykane denen des menschlichen Organismus sehr stark ähneln oder vollständig kompatibel sind [129]. Abb. 1-5 (in Anlehnung an Jones 2017 [121]) fasst Organismen-spezifische Veränderungen humaner Glykosylstrukturen und deren immunologische Einflüsse bei therapeutischen Proteinen zusammen:

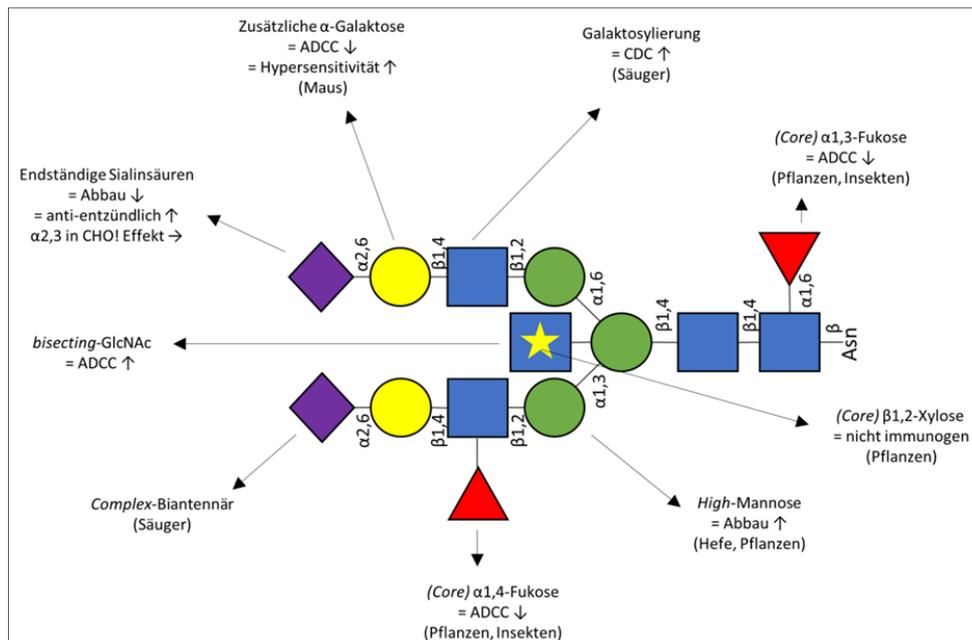


Abb. 1-5: Einfluss des Produktionsorganismus auf die Zusammensetzung von N-Glykanen und deren immunologische Folgereaktionen. [114] ADCC = antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (Antikörper-abhängige zellvermittelte Toxizität), CDC = complement dependent cytotoxicity (Komplementsystem-abhängige Toxizität), CHO = Chinese Hamster Ovary (Eizellen des chinesischen Zwerghamsters (*Cricetulus griseus*))

Farbcode-Legende: ● N-Acetylglucosamin, ● Fucose, ● Mannose, ● Galaktose, ★ Xylose, ● Sialinsäure

Bei der Produktion therapeutischer Proteine können Änderungen in den Parametern pH-Wert, Temperatur, Kultivierungsmethode, Nährstoffversorgung oder Sauerstoffversorgung ebenfalls zu Heterogenitäten der Glykosylstrukturen und zu unerwünschten Ansatz-zu-Ansatz-Variationen führen und sollten nach Etablierung der Prozessbedingungen daher vermieden werden [130-132]. Auch Codon-usage-Optimierungen können Einfluss auf das Produktionsergebnis von therapeutischen Proteinen haben. So können die Sekundärstruktur der mRNA durch alternative Basen-Triplets und deren Stabilität verändert werden, die Translation und die Proteinfaltung beeinflusst sein. Dies bedingt wiederum eine Veränderung in *post*-translationalen Modifikationen, wie den Glykosylierungen [133]. Glykosylstrukturen können sowohl die Pharmakodynamik (Wirkung), als auch die Pharmakokinetik (Verteilung und Verstoffwechslung im Körper) beeinflussen. Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Medikamenten unterliegen zudem abweichenden Parametern bei älteren Patienten, hervorgerufen durch körperliche Alterserscheinungen wie veränderte Organaktivitäten, reduzierte Sauerstoffversorgung, veränderte Genexpressionen oder Hochregulation des programmierten Zelltodes [134]. Untersuchungen zu kommerziellen Aspekten der Kosten und des Nutzens (besonders bei seltenen Anwendungsgebieten oder Eigenmedikationen) der Biopharmaka zeigen einen dringenden Bedarf an mechanistischen Bewertungen der Charakteristika

Aufnahme, Verteilung, Stoffwechselreaktionen und Ausscheidung (*absorption, distribution, metabolism, excretion* = ADME) der Stoffe sowie an der Aufklärungen von Struktur-Wirkungs-Beziehungen (*structure activity relationships* = SAR), um benötigte therapeutische Proteine effektiver konstruieren zu können [135]. Vor diesem Hintergrund ist eine optimierte homogene *N*-Glykosylierung für die Produktion der nächsten Generation von therapeutischen Proteinen von großer Bedeutung.

1.4 Stand des Wissens – *N*-Glykosylierung als Forschungsfeld

Die mannigfaltigen Einflüsse der Glykosylstrukturen an Proteinen bedingen, dass Glykosylierungen im Produktionsprozess kritische Qualitätsmerkmale (*critical quality attribute* = CQA) erfüllen müssen. Dies macht die Charakterisierung der *N*-Glykanstrukturen zu einem essentiellen Teil beim Entwicklungsprozess von Biotherapeutika [121]. Um der vorherrschenden Makro- (An- oder Abwesenheit von Glykanen an einem Protein) und Mikroheterogenität (verschiedene Glykoformen an einer definierten Glykosylierungsstelle) von Glykosylstrukturen Herr zu werden, gibt es verschiedene Ansätze.

1.4.1 Glyko-Engineering in vivo

Glyko-Engineering ist eine Methode, bei der die Zuckerkomponente an Glykoproteinen, die in nicht-humanen Zellen produziert wurden, humanisiert wird, d. h. die Glykanstruktur am Ende der humanen Struktur gleicht, um toxische oder immunogene Effekte zu verhindern. Dies kann zum Beispiel eine verbesserte Antikörper-Effektor-Funktion oder Rezeptor-Bindung sowie eine verlängerte Zirkulationszeit im Blut bewirken, was wiederum zu einer verringerten Dosisgabe führt [132]. Bei der Herstellung von *N*-Glykoproteinen können verschiedene Abschnitte unterschieden werden: die eigentliche Glykanbiosynthese, in Eukaryoten die Translokation der Glykane von der zytoplasmatischen Seite des ER zum Lumen und der Übertrag der Glykanstruktur auf einen Polypeptid-Akzeptor. Bei allen Abschnitten können genetische Veränderungen, die die Expressionsraten der entsprechenden Enzyme und den Metabolismus des Produktionsstammes beeinflussen, vorgenommen werden [136]. Ein Forschungsprojekt beschäftigte sich mit der Produktion von Glykoproteinen (rekombinantes Maltose-bindendes Protein (MBP) und ein Antikörper-Fragment) in *E. coli* mit Übertrag des Glykans (GlcNAc)₂Man₃, der *core*-Struktur aller humanen *N*-Glykane. Unter Ausnutzung des *E. coli*-eigenen Lipidankers Undecaprenol (Und = C₅₅) und der Enzyme WecA (*N*-Acetylglucosaminy-Transferase) und der Flippase Wzx wurden die Enzyme Alg13, Alg14, Alg1 und Alg2 aus *S. cerevisiae* exprimiert. Der Übertrag der Glykaneinheit wurde durch Expression der Oligosaccharyltransferase PglB aus *C. jejuni* realisiert. Die Ausbeute an glykosyliertem Protein war mit 50 µg/L (< 1 % der exprimierten Testproteine Maltosebindeprotein und ein Antikörper-Fragment) extrem gering und die Produkte ohne abschließende starke Aufkonzentrierung nicht detektierbar [60]. Die

Produktivität wurde später weiter optimiert. Hierzu wurde die Expressionsrate der Hefeenzyme reduziert und zusätzlich zwei weitere Enzyme zur Bildung des Substrates GDP-Mannose exprimiert. Auf diese Weise konnte die Ausbeute an (GlcNAc)₂Man₃-glykosyliertem MBP und Antikörper-Fragment, welches auf der Zelloberfläche präsentiert wurde, vervierfacht werden. Dies korrelierte mit einem etwa 50-fachen Anstieg an intrazellulärem Und-PP-verknüpften (GlcNAc)₂Man₃. Die Detektion der Glykane erfolgte mittels AlexaFluor-488-konjugiertem Concanavalin A [136]. Der Einsatz von Hefezelllinien ist für nicht glykosylierte Produkte attraktiv, da diese Zellen hohe Ausbeuten liefern (Pro-Insulin 3 g/L in *P. pastoris*) [137], kostengünstig produziert und die Produkte sekretiert werden können, was eine Aufreinigung der Produkte erheblich erleichtert. Für Insulin (kein Glykoprotein) wurden für 2018 Einnahmen von über 32 Billionen US-Dollar erwartet [138]. Daher gibt es intensive Bemühungen, Hefen durch Glyko-*Engineering* als Produktionsorganismus für Glykoproteine zu etablieren. In der Hefe *P. pastoris* hergestellte IgG-Antikörper zeigen nach Expression verschiedener Glykosyltransferasen galaktosylierte Glykane des *Complex*-Typs. Auf dieser Basis führten die Wirkstoffe zum Antikörper-vermittelten Abbau von B-Zellen. Den Glykanen fehlen aber Sialinsäure-Moleküle, die für eine erhöhte Halbwertszeit nötig sind [139]. In einem weiteren Ansatz wurde ein *P. pastoris* Stamm mit gezielten Deletionen von Glykosyltransferasen entwickelt, der infolgedessen Antikörper mit verkürzten Glykosyl-Strukturen ((GlcNAc)₂-Man₅) bildete [140]. Für einfache Glykoproteine und Antikörper mag Hefe als Expressionssystem zur Verfügung stehen, es wird aber vermutet, dass die native Sekretionsmaschinerie einer Produktion von großen Mengen an glykosyliertem Protein nicht gerecht wird. In einer Studie mit *P. pastoris* wurden Stoffwechselmodelle des Hefegenoms herangezogen, um die Auswirkungen des Glykosylierungsvorgangs auf die Proteinausbeute zu simulieren. Dabei verringerten das genetische *engineering* und die *N*-Glykosylierung selbst die Ausbeute an Protein, hervorgerufen durch die konkurrierende Nutzung von Kohlenstoff durch die Aminosäure-Synthese. Zusätzlich wurde der erhöhte, nicht zu bedienende Bedarf an Vorläufer-Substraten und ihrer Enzyme zur Produktion dieser hervorgehoben [141, 142]. Auch das Produktionssystem Pflanze wurde mittels Glyko-*Engineering* zur Herstellung von Glykoproteinen eingesetzt. Die entstehenden Glykanstrukturen sind komplex, aber einfacher aufgebaut, als die humanen Glykane. Die Diversität der Glykane ist geringer, 90 % der Glykoformen haben eine von zwei Strukturen: GnGnXF besteht aus α 1,3-Fukose und β 1,2-Xylose verlinkt mit (GlcNAc)₂Man₃(GlcNAc)₂, MMXF ist identisch, es fehlen nur die endständigen GlcNAc-Moleküle. Werden therapeutische Proteine mit pflanzlichen Glykanstrukturen ins menschliche Serum verabreicht, führt dies zur Antikörperbildung. Unerwarteterweise wurden keine Antikörper-vermittelten pathogenen Reaktionen beschrieben. Das immunogene Potential pflanzlicher Glykanepitope wird als gering eingeschätzt, da eine konstante Exposition mit Pflanzenglykanen beim Menschen gegeben ist [143, 144]. Werden dennoch authentische humane Glykosylstrukturen etwa für bessere Wirksamkeit benötigt, können Enzyme zur Produktion nicht-humaner α 1,3-Fukose und β 1,2-Xylose mutiert und humane Gene zur Generierung von multi-antennären Glykanen wie α 1,6-

Fukose, β 1,4-Galaktose und endständige Sialinsäure (siehe Abb. 1-4) eingeführt werden [145-147].

Interessant ist auch der Ansatz der Co-Expression mehrerer Therapeutika in einer Zelle. Diese könnte für, in der Praxis angewandte Cocktails antiretroviraler, glykosylierter Medikamente bei HIV-Infektionen, dem Anti-Ebola-Medikament ZMapp (bestehend aus 3 mAb's) oder akutem Bedarf mehrerer Medikamente Anwendung finden [148].

Es gibt bereits eine Menge vielversprechender Ansätze des Glykoengineerings in verschiedenen Organismen. Die industrielle Anwendung findet aber immer noch hauptsächlich in Säugerzellen statt, da alternative *N*-Glykoprotein-Expressionsplattformen heterogene Produkte produzieren, welche nicht-humane Glykoformen aufweisen [149, 150].

Neben der direkten Produktion der Glykoproteine *in vivo* gibt es auch zellfreie Produktionssysteme, die aber sowohl in Bezug auf die Ausbeuten als auch in Bezug auf die anfallenden Kosten nicht für industrielle Anwendungen praktikabel sind [151]. Die separate Produktion der Glykanstrukturen mit nachträglicher Übertragung auf die Zielproteine stellt eine geeignete Alternative dar. Die Glykosylstrukturen können dabei auf dem Weg der chemischen oder der enzymatischen Synthese entstehen.

1.4.2 Chemische Synthese von Glykosylstrukturen *in vitro*

Auf chemischem Wege ist es möglich, natürlich vorkommende *N*-Glykane mittels Festphasen- und Flüssigphasen-Synthesen herzustellen. Die chemische Synthese von Kohlenhydraten ist allerdings, verglichen mit der Synthese von Nukleinsäuren und Peptiden, eine große Herausforderung, da viele gleichwertige Hydroxyl-Gruppen vorhanden sind und die Anzahl ansprechbarer funktioneller Gruppen für Modifikationen niedrig ist [152]. Die erste Mannose-Einheit des *core*-Zuckers ist β 1,4-verknüpft, thermodynamisch ist aber das α -Isomer favorisiert. Für eine hohe β -Selektivität (Stereoselektivität) muss die Reaktion bei niedrigen Temperaturen ablaufen. Aufgrund der Schwierigkeit dieses Reaktionsschrittes wird bei chemischen Synthesen von *N*-Glykanen oft auf eine kombinierte chemisch-enzymatische Reaktionsführung zurückgegriffen [153]. Bei der Herstellung eines fukosylierten, Asparagin-verknüpften Dodekazzuckers konnte ein weiterer problematischer Schritt aufgezeigt werden, die α -Sialysierung. Hier ist die β -Konformation thermodynamisch begünstigt. Auch hier ist die α -Sialysierung durch direkten Entzug der Reaktionswärme bei -78°C möglich. Bei mehreren Sialinsäuremolekülen treten zusätzliche Probleme auf, weil intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen die Reaktivität in der Glykosylierungsreaktion verringern [154]. Neben diesen reaktionsspezifischen Problemen und aufgrund ihrer chemischen Beschaffenheit, also dem Vorhandensein zahlreicher identischer Hydroxylgruppen, stellt die chemische Synthese komplexer Kohlenhydratmoleküle nach wie vor eine Herausforderung dar. Voraussetzung für eine regioselektive Verknüpfung der einzelnen Zuckerbausteine sind orthogonal geschützte

Monosaccharid-Bausteine. Eine gute Schutzgruppenstrategie hat ebenfalls Einfluss auf die Stereoselektivität, die Gesamtladung des Moleküls, auf die Modifikation funktioneller Hydroxyl- und Aminogruppen und das Entschützen [155].

Natürliche Quellen von Glykoproteinen bieten immer eine Mischung aus verschiedenen Glykoformen, und das Erhalten von reinen Glykanen ist schwierig. Die chemische Synthese von Glykanstrukturen bietet den klaren Vorteil, die Glykane in reiner Form ohne Mikroheterogenitäten zu erhalten. Die Syntheseprodukte können eingesetzt werden, um Organismen-spezifische Reaktionen und Einflüsse (Struktur-Funktions-Beziehung) der definierten Glykane zu untersuchen, speziell auch da, wo Enzyme noch nicht zugeordnet werden konnten [156]. Bei der chemischen Synthese stehen auch Strategien zur Übertragung der Zucker auf Peptide zur Verfügung. Die Zuckereinheit kann entweder durch Einsatz von glykosylierten Aminosäuren oder durch konvergentes Koppeln zwischen Glykosylamin und freien Asparaginseitenketten in ein geschütztes Polypeptid eingebaut werden [157]. Die synthetischen Glykane können auch durch Kombination mit enzymatischen Systemen übertragen werden. Mit Hilfe einer mutierten Form der Endo- β -*N*-Acetylglucosaminidase aus *Mucor hiemalis* (EndoM) konnte zum Beispiel der enzymatische Übertrag synthetischer Oxazolin-geschützter Zucker auf ein GlcNAc-Saposin C gezeigt werden [158]. Für die Synthese von therapeutischen Glykoproteinen ist die chemische Synthese wegen der Größe und Komplexität der Biomoleküle und fehlender automatisierbarer Synthesestrategien nicht geeignet [159, 160]. Der größte Vorteil gegenüber der enzymatischen Synthese ist die Verwendbarkeit nicht-natürlicher Zucker und die Synthese nicht-natürlicher Saccharid-Sequenzen [161], die mit Enzymen *in vivo* nicht möglich sind.

1.4.3 Enzymatische Synthese von Glykosylstrukturen

Eine Möglichkeit, *N*-Glykane homogen, in größerem Maßstab und kostengünstig herzustellen, ist die *in vitro*-Synthese mit rekombinanten Enzymen. Es wurde gezeigt, dass mit *P. pastoris* hergestellte Antikörper (0.5 g/ L) anschließend an ihrer Glykaneinheit verändert werden konnten (*glycan remodeling*). So wurden die Glykane vom *High-Mannose*-Typ zunächst durch den Einsatz verschiedener Endoglykosidasen auf die Struktur Asn-GlcNAc verkürzt, um anschließend die humane Glykosylstruktur des *Complex*-Typen durch eine Variante der Endo- β -Glykosidase mit Transglykosylierungs-Aktivität aufzubauen. Als Glykosyl-Donoren wurden Sialylglykopeptide verwendet. Die Ausbeute der glykosylierten IgG's betrug 80 % [140].

Für den Aufbau der *core*-Struktur von *N*-Glykanen an pharmazeutischen Proteinen werden in Hefe die zytosolisch lokalisierten Glykosyltransferasen Alg7, Alg13, Alg14, Alg1 und Alg2 benötigt. Die Golgi-Glykosyltransferasen GnT1, GnT2, B4GalT1 und ST6Gal1 katalysieren dann aus (GlcNAc)₂Man₃ den *Complex*-Typ (GlcNAc)₂Man₃(GlcNAc)₂Gal₂Sia₂ (Abb. 1-4). Eine große Herausforderung stellt dabei die Bereitstellung der Enzyme dar. Für die Golgi-Glykosyltransferasen GnT1 [162], GnT2 [163], B4GalT1 [164] und ST6Gal1 [165] konnten

rekombinante Expressionssysteme etabliert werden, die zu aktiven Enzymen bzw. Enzymvarianten führten. Viele der Glykosyltransferasen sind Proteine mit multiplen Transmembranhelices. Enzyme mit wenigen Transmembran-Regionen, wie die Alg1, Alg2 und Alg11 können als Membran-deletierte Varianten in aktiver Form rekombinant hergestellt werden [166-169]. Enzyme mit vielen Transmembranregionen oder Untereinheiten können manchmal durch weniger hydrophobe oder weniger komplexe Homologe aus anderen Organismen ersetzt werden. So stellen PglB aus *Campylobacter jejuni*, ein Homolog der aus acht Untereinheiten bestehenden Oligosaccharyltransferase (OST) aus Hefe [170], sowie WecA, ein bakterielles Homolog der Alg7 mit sieben Transmembran-Regionen [171], entsprechende Alternativen dar. Da der schrittweise Aufbau der N-Glykane an der Membran des endoplasmatischen Retikulums stattfindet, geschieht der Übertrag der Zucker auf einen, über Pyrophosphat verknüpften, in der Membran integrierten Lipidanker (Bakterien - Undecaprenol-Anker (C₅₅), Archäen und Eukaryoten - Dolichol (Abb. 1-2) [172]. Bei der Verwendung homologer Glykosyltransferasen, speziell in Kombination mit verschiedenen Produktionsorganismen, spielt die Akzeptanz des Lipid-Ankers eine wesentliche Rolle. Für einige Glykosyltransferasen (Alg7, Alg13/14, Alg2, Alg11, Alg3, Dpm1) konnte die Akzeptanz verschiedener Lipidanker (Citronellyl C₁₀, Farnesyl C₁₅, Phytanyl C₂₀, Nerylcitronellyl C₂₀, Farnesylcitronellyl C₂₅, Undecaprenyl C₅₅) gezeigt werden [60, 153, 173-175]. Für die erste Mannosyltransferase Alg1 auf zytosolischer Seite konnte als Transmembran-deletierte Variante eine Akzeptanz für Kettenlängen von C₁₀ bis C₉₅ gezeigt werden [60, 153, 176].

Ein Problem bei Untersuchungen und der Etablierung Glykan-aufbauender Systeme stellt die schlechte Verfügbarkeit der Substrate dar. Durch die hohe Substrat-Spezifität der Glykosyltransferasen können in der Regel auch keine alternativen Substrate genutzt werden. Dies stellt aber auch gleichzeitig einen wesentlichen Vorteil dieses Ansatzes dar. Die zu verwendenden Glykosyltransferasen arbeiten hoch regio- und stereoselektiv, so dass durch den Einsatz definierter Glykosyltransferasen definierte Glykanstrukturen entstehen. Glykan-Donatoren in Form von aktivierten Nukleotid-Zuckern sind verfügbar, aber sehr teuer (100 mg GDP-Mannose ca. 800 EUR). Glykan-Akzeptoren sind weder kommerziell erhältlich noch in ausreichender Menge aus natürlichen Quellen zu gewinnen und müssen daher zu Forschungszwecken chemisch synthetisiert oder enzymatisch hergestellt werden.

Ein weiterer Vorteil der *in vitro*-Synthese ist, dass Enzyme aus allen bekannten Organismen, soweit es die Akzeptanz der Substrate zulässt, kombiniert werden können. Durch den Einsatz rekombinanter gereinigter Enzyme *in vitro* werden Probleme umgangen, mit denen *in vivo*-Produktionssysteme zu kämpfen haben. Dazu zählt zum Beispiel die Suszeptibilität gegenüber humanpathogenen Kontaminationen, wie sie bei Säugerzellsystemen wie CHO-Zellen oder Fibroblasten vorkommen können [177].

In den letzten Jahren hat sich der Bedarf an Biopharmazeutika drastisch erhöht, dementsprechend werden hundert- bis tausendfach größere Mengen, als mittels

herkömmlicher Methoden zur Verfügung gestellt werden können, benötigt [178]. Um neue Wirkstoffe mit neuen Methoden zu entwickeln und die Funktion von *N*-Glykanen sowohl bei gesunder Physiologie als auch in Krankheitszuständen untersuchen zu können, ist ein ausgeprägtes Wissen über den molekularen Aufbau und die enzymatischen Schritte zu ihrer Synthese notwendig [97].

2 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, das Glykokonjugat Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂Man₁ unter Verwendung einer β 1,4-Mannosyltransferase enzymatisch im präparativen Maßstab herzustellen.

Wie in der Einleitung beschrieben, weisen enzymatische *in vitro*-Methoden zur Herstellung von Glykanstrukturen einige Vorteile gegenüber *in vivo*-Methoden auf. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit *in vitro*-Methoden zum Einsatz kommen.

Bei der Produktion der Glykanstrukturen ist die β 1,4-Mannosyltransferase ein Schlüsselenzym, welches die Übertragung der ersten Mannose-Einheit, ausgehend von GDP-Mannose, auf Dolichyl-PP-(GlcNAc)₂ mit dem Zielprodukt Dolichyl-PP-(GlcNAc)₂Man₁ katalysiert. Die Zielproduktstruktur wurde ausgewählt, da sie mehrere Kriterien erfüllt: Erstens ist sie die Grundlage der *core*-Struktur, die allen humanen *N*-Glykosylierungen gemeinsam ist. Zweitens ist sie die Grundlage der vorherrschenden *N*-Glykosylierung in z. B. CHO-Zellen, Baculovirus-Insektenzell-Systemen, Karottenwurzelzellen und in *Tetrahymena thermophila*, deren Glykane die Ansprüche für klinische Studien und Produkte erfüllen [60]. Drittens können auf ihr aufbauend Glykane des humanen *Complex*-Typs gebildet werden. Demzufolge sollte eine β 1,4-Mannosyltransferase in rekombinanter, gereinigter Form bereitgestellt und Untersuchungen zum Reaktionsverhalten *in vitro* angestellt werden.

Das Akzeptorsubstrat Lipid-PP-(GlcNAc)₂ sollte von einem Dienstleister chemisch synthetisiert werden. Für die Bereitstellung des kostenintensiven Donorsubstrates GDP-Mannose sollten geeignete Enzyme ausgewählt werden, die das Nukleotid aus günstigen Ausgangsstoffen herstellen und anfallende Nebenprodukte regenerieren können. Alle Enzyme sollten in *E. coli* rekombinant produziert und chromatografisch gereinigt werden. Nach Untersuchungen der Einzelreaktionen sollten Bedingungen für eine Eintopf-Reaktion unter optimalen Voraussetzungen definiert werden. Zur Bestimmung der Reaktionsverläufe und Produktausbeuten jeder enzymatischen Einzelreaktion sollten analytische Testverfahren etabliert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien, Standards und Kits

Folgende Kits und Standards wurden eingesetzt: MSB[®] Spin PCRapace Kit (Initek GmbH, Berlin), Taq PCR Master Mix Kit (QIAGEN GmbH, Hilden), GeneRuler™1kb DNA Ladder, Protein Molecular Weight Standard 14-116 kDa, GeneJET Gel Extraction Kit, GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Dreieich).

3.1.2 Puffer

Sämtliche verwendete Puffer sind in den jeweiligen Methodenabschnitten aufgeführt. Soweit nicht anders vermerkt, wurde der pH-Wert nach vollständigem Lösen aller Feststoffe im Lösungsmittel mit 1 M HCl eingestellt. Die Abweichung betrug jeweils maximal +/- 0.1 pH Einheit.

3.1.3 Bakterienstämme, Medien und Antibiotika

Zur Amplifikation von Genen wurde die *E. coli*-Zelllinie W3110 (K12, lambda- F- mcrA mcrB IN (rrnD-rrnE)1) (DSM5911, DSMZ, Braunschweig, Germany) verwendet.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Enzyme wurden rekombinant in *E. coli* BL21 Gold (DE3) (Stratagene: Amsterdam, Niederlande) (Genotyp F- ompT hsdSB (rBmB) gal λ (DE3)) produziert.

Die folgenden Anzuchtmedien und Zusätze wurden für die angegebenen Organismen verwendet:

Tabelle 3-1: Anzuchtmedien und Antibiotikum

Medien und Zusätze	<i>E. coli</i> BL21 Gold (DE3)/ W3110
LB-Medium	5 g/ L Hefeextrakt, 10 g/ L Pepton, 10 g/ L NaCl
TB-Medium [179]	24 g Hefeextrakt, 12 g Pepton, 5 g Glycerin = 0.9 L + 2.31 g KH ₂ PO ₄ , 12.54 g K ₂ HPO ₄ = 0.1 L
Antibiotikum	Kanamycin 50 mg/ L
Temperatur	37°C
Induktion	1 mM IPTG
Expression nach Induktion	4h

Zur Stammhaltung wurden 0.5 mL einer Übernachtskultur in 5 mL frisches Medium überführt. Nach 1 h Kultivierung bei 37°C wurden 0.7 mL Kultur mit 0.3 mL Glycerin versetzt, durchmischt und anschließend bei -80°C gelagert.

3.1.4 Vektoren, Konstrukte und Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte wurden im Vektor pET-28a (+) (Novagen, Darmstadt, Deutschland) erstellt. Restriktionsenzyme wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Deutschland) bezogen. Da alle Enzyme in *E. coli* exprimiert werden sollten, einige Gen-Sequenzen aber aus anderen Ursprungs-Organismen stammten, konnten erwartungsgemäß Codons identifiziert werden, die bei einer Expression in *E. coli* zu Limitierungen während der Translation führen könnten. Daher wurden diese DNA-Sequenzen mit Hilfe der Software Gene Designer 2.0 (Menlo Park, Kalifornien) der Codon-usage von *E. coli* angepasst und anschließend *de novo* durch die Firma GENEART (Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH, Regensburg, Deutschland) synthetisiert.

Tabelle 3-2: Verwendete Vektor-Konstrukte

Enzym	Ursprungsorganismus	Restriktions-schnittstellen	Lokalisation des His ₆ -tag	Codon-usage optimiert
Glk	<i>Escherichia coli</i> W3110	<i>Nde</i> I / <i>Xho</i> I	N-terminal	Nein
ManB	<i>Escherichia coli</i> W3110	<i>Nco</i> I / <i>Sac</i> I	C-terminal	Nein
ManC	<i>Escherichia coli</i> W3110	<i>Nco</i> I / <i>Xho</i> I	Kein His-tag	Nein
1D-Ppk2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Nde</i> I / <i>Sac</i> I	N-terminal	Ja
Ppk3	<i>Ruegeria pomeroyi</i>	<i>Nde</i> I / <i>Xho</i> I	N-terminal	Ja
PmPpA	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Nco</i> I / <i>Xho</i> I	C-terminal	Ja
Alg1ΔTM	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Nde</i> I / <i>Xho</i> I	N-terminal	Ja

3.2 Molekularbiologische Arbeiten

Die Amplifizierung von Sequenzen aus *E. coli* W3110 erfolgte mittels PCR mit Hilfe der unter Abschnitt 3.2.1 angegebenen Oligodesoxyribonukleotiden (*Primer*) und der *Pfu*-Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) unter Standardbedingungen [180]. Gereinigte PCR-Produkte wurden mittels Restriktionsverdau auf die anschließende Insertion in den Ziel-Vektor (Ligation) vorbereitet. Danach erfolgte die Transformation in chemisch kompetente BL21-Zellen. Restriktionsverdaue, Ligationen und Transformationen wurden nach Standard-Protokollen durchgeführt [181]. Von selektiv gewachsenen Kolonien wurden 5 mL-Flüssigkulturen in LB-Medium angelegt und deren Plasmide mittels Plasmid-Präparations-Kit isoliert. Der Erfolg der Klonierungen wurde durch DNA-Sequenzierungen (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland) bestätigt. *De novo* synthetisierte DNA-Sequenzen wurden nach Erhalt zur Kontrolle ebenfalls sequenziert und anschließend in *E. coli* BL21 transformiert.

3.2.1 Oligodesoxyribonukleotide

Die Synthese der Oligodesoxyribonukleotide erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon in Ebersberg, Deutschland. Die Sequenzen sind in 5'-3'-Leserichtung dargestellt, Restriktionsschnittstellen unterstrichen und Schmelztemperaturen nachgestellt.

glk - Glukokinase (EC 2.7.1.2)

		T_m
Glk-for	5' - GGAATTCC <u>CATATG</u> ACAAAGTATGCATTAGTCGGTG - 3'	61.2°C
Glk-rev	5' - <u>CCTCGAG</u> CGG-ACGCAGGTCGACCTTGT - 3'	68.2°C

manC - Mannose-1-Phosphat-Guanyltransferase (EC 2.7.7.22)

manB - Phosphomannomutase (EC 5.4.2.8)

manC/B-for	5' - CATG <u>CCATGG</u> CGCAGTCGAAACTCTATCC - 3'	64.7°C
manC/B-rev	5' - <u>CCTCGAG</u> CGG-CTCGTTCAGCAACGTCAG - 3'	68°C

Für Kontroll-Sequenzierungen im Vektor pET-28a (+) dienten folgende Oligodesoxyribonukleotide:

T7-for	5' - TAATACGACTCACTATAGGG - 3'	53.2°C
T7-term	5' - CTAGTTATTGCTCAGCGGT - 3'	54.5°C

3.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Das Standard-PCR-Programm ist in Tabelle 3-3 angegeben, die *Annealing*-Temperatur wurde jeweils 1.5°C unter die geringere Schmelztemperatur des jeweiligen Primerpaares gesetzt.

Tabelle 3-3: Standard-PCR-Programm

Schritt	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Bemerkungen
1. Denaturierung	5	95	
2. Denaturierung	1	95	Schritt 2 bis 4 werden
3. Annealing	1	1.5°C kleiner T_m	in 35 Zyklen
4. Elongation	2*	72	wiederholt
5. Elongation	5	72	
6. Pause	-	4	

*2 min Elongationszeit/ kb mit *Pfu*-Polymerase

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Expression der Proteine

Erste Expressionstests wurden stets im 5 mL-Maßstab durchgeführt und dienten der Optimierung der Expression in Bezug auf das Anzuchtmedium, den Induktionszeitpunkt, die Konzentration des Induktors Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG), die Expressions-Temperatur und die Expressions-Zeit. Dem Anzucht-Medium wurde zur Selektion 50 μ g/ mL Kanamycin (finale Konzentration) zugesetzt. Die Kulturen wurden während der Anzucht kontinuierlich geschüttelt. Die jeweils optimalen Bedingungen wurden anschließend auf 500 mL Anzuchtvolumina im Schüttelkolben übertragen.

Tabelle 3-4: Standardbedingungen der Expression der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme

Enzym	Medium	Induktion OD ₆₀₀	Induktion IPTG [mM]	Expressions- Temperatur	Expressions- Zeit [h]	Lokalisation der His ₆ -Fusion
Glk	LB	0.6	1	37°C	4	N-terminal
ManB	LB	0.7	1	37°C	4	C-terminal
ManC	LB	0.7	1	37°C	4	Keine Fusion
1D-Ppk2	LB	0.5	0.5	24°C	4	N-terminal
Ppk3	LB	0.6	0.5	37°C	4	N-terminal
PmPpA	LB	1.4	1	37°C	4	C-terminal
Alg1 Δ TM	LB	0.6	1	37°C	4	N-terminal

Nach Beendigung der Expressionszeit wurde die Biomasse durch Zentrifugation (Avanti™ J-30I, Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) bei 6.000 x g für 10 min vom Anzucht-Medium getrennt. Die erhaltene Biofeuchtmasse (BFM) wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.2 Fermentation zur Produktion von His₆-Alg1 Δ TM

Für die Fermentation wurden zunächst Zellen aus Glycerinkulturen, die bei -80°C gelagert wurden, in 5 mL LB und 50 μ g/ mL Kanamycin kultiviert (Vorkultur 1, VK1) und über Nacht bei 37°C inkubiert. Alle Folgekulturen wurden auf demselben Medium mit Antibiotikum kultiviert. Vorkultur 1 erreichte nach 16 h eine OD₆₀₀ von 3,9. Mit 2.6 mL der 1. Vorkultur wurden 2x 100 mL als 2. Vorkultur mit einer Start-OD₆₀₀ von 0.1 angeimpft. Die 2. Vorkultur erreichte nach 11 h bei 37°C eine OD₆₀₀ von 5.0. Mit jeweils 5 mL VK2 wurden 4x 500 mL VK3 mit einer Start-OD von 0.05 angeimpft und bei 30°C 13 h inkubiert. VK3 erreichte eine OD₆₀₀ von 3.4. Diese Kulturen dienten als Inokulum für die Fermentation. 10 L LB-Medium mit 20 g/ L Glukose wurden mit 2.0 L der 3. Vorkultur angeimpft. Die Start-OD betrug 0.6. Während der Fermentation wurde die Kultivierungstemperatur auf 37°C gehalten. Die Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 7.6 bei 37°C angezogen und anschließend mit 1 mM IPTG induziert. Bei einer

OD₆₀₀ von 11 wurde die Fermentation beendet und die Biomasse mit Hilfe einer Durchflusszentrifuge (CEPA Z41G, Padberg, Lahr, Deutschland) bei 10.000 x g geerntet. Die gewonnene Biofeuchtmasse betrug 182 g. Die Biomasse wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C aufbewahrt.

Alle Arbeitsschritte wurden mit sterilen Arbeitsmaterialien bzw. Medien und Kulturen durchgeführt. Während der Fermentation wurden der Sauerstoffgehalt und pH-Wert (automatische Zugabe von NaOH (100 g/ L) und 20 % H₃PO₄ (v/v)) dokumentiert und reguliert. Bei Schaumbildung wurde zur Reduktion Antischaum-Lösung (Struktol J673) manuell zugeführt.

3.3.3 Zellaufschluss, Reinigung und Dialyse

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Enzyme wurden mit den im Folgenden beschriebenen Methoden aufgereinigt:

Zellaufschluss: 1 g BFM/ 10 mL Puffer (50 mM Tris/ HCl, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 7.5)
3 Passagen mittels Hochdruck-Homogenisator bei 1000 bar
Emulsiflex C5, Avestin Inc., Ottawa, Kanada

Zentrifugation: Avanti™ J-30I, Rotor JA-30.50 (Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland)
45 min, 17.000 x g, 4°C

Der resultierende Überstand aus der Zentrifugation war Ausgangspunkt für die folgende chromatographische Reinigung.

System: Äkta Explorer (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden)
Software: Unicorn 4.1
Affinitäts-Chromatografie: Streamline Chelating + Ni²⁺ (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden)
Säule: XK 16, CV 11.5 mL

Reinigung: Äquilibriumspuffer (A): 50 mM Tris/ HCl, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 7.5
Elutionspuffer (B): 50 mM Tris/ HCl, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7.5
Waschen: 4 CV Puffer A
Probenauftrag: Überstand aus Zentrifugation (ca. 30 mL)
Waschen: 3 CV Puffer A
Elution: 4 CV Puffer B
Flussrate: 1 mL/ min
Absorptionsdetektion: 280 nm

Dialyse: Spectra/ Por Dialysis Membrane MWCO 50.000 (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland)
2 x 1.5 h gegen je 3 L 20mM Tris/ HCl, 50 mM NaCl, 10 mM, MgCl₂, pH 7.5)

Konzentrieren: Amicon® Ultra-15, 50 kDa *cut-off* (Merck Millipore Ltd., Cork, Irland)
Zentrifugation bei 3000 x g, 4°C
(Zentrifuge 5810R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
Die Konzentrierung erfolgte ausgehend vom jeweiligen Elutionsvolumen auf 1 mL Restvolumen.

Zur Stabilisierung während der Lagerung bei -20°C wurde allen Enzymlösungen Glycerin in einer Endkonzentration von 50 % hinzugefügt.

3.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Der lineare Bereich für den Test nach Bradford [182] liegt zwischen 5 und 500 µg Protein/ mL. Für das Farbreagens wurden 100 mg Coomassie-Brillantblau G-250 in 50 ml 95 %-igem Ethanol gelöst, 100 ml 85 %-ige Phosphorsäure zugesetzt und mit deionisiertem Wasser auf 600 ml aufgefüllt. Anschließend wurde die Lösung filtriert, 100 mL Glycerin dazugegeben und mit deionisiertem Wasser auf 1 L aufgefüllt. Nach 24 h konnte das Reagens verwendet werden. Für den Test wurden 50 µl Proteinlösung mit 2 ml Farbreagens versetzt, gut gemischt und bei 595 nm die Extinktion gegen einen Blindwert ermittelt. Als Kalibrierprotein wurde BSA eingesetzt.

Tabelle 3-5: Verwendete Enzyme

Enzym	EC-Nummer	Ursprungsorganismus	c _{End} [mg/ mL]*
His ₆ -Glk	2.7.1.2	<i>Escherichia coli</i> W3110	70.0
ManCB-His ₆	2.7.7.13/ 5.4.2.8	<i>Escherichia coli</i> W3110	22.8
His ₆ -1D-Ppk2	2.7.4.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.6
His ₆ -Ppk3	2.7.4.1	<i>Ruegeria pomeroyi</i>	3.7
PmPpA-His ₆	3.6.1.1	<i>Pasteurella multocida</i>	2.0
His ₆ -Alg1ΔTM	2.4.1.142	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.5

*Endkonzentration in 50% Glycerin, wie gelagert bei -20°C

3.3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Trennung der Proteine basiert auf dem Protokoll nach Laemmli [183]. Alle Trenn-Gele waren 12.5 %-ig und wurden zur Analyse mit Coomassie-Lösung gefärbt.

SDS-PAGE-Kammer: Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden

Molekulargewichtsstandard: 14 – 116 kDa (PageRuler™ Unstained Low Range Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland)

Elektrophorese: Stufe 1: 300 V, 80 mA, 6 min, Stufe 2: 300 V, 60 mA, 45 min

3.3.6 Enzymatische Assays

Für die enzymatischen Assays wurden die Lagerkonzentrationen der Enzyme (-20°C, in 50 % Glycerin) wie in Tabelle 3-5 angegeben eingesetzt. Von allen Substraten wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 10 mM in Reaktionspuffer angelegt und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert. Für GTP wurde beim Anlegen der Stammkultur der geringe Reinheitsgrad der Substanz bedacht und entsprechend mehr Substrat zum Erhalt einer 10 mM Lösung eingewogen. Daher sind in den Messungen, welche mit GTP durchgeführt wurden (Bsp. Abb. 4-5, Abb. 4-6), etwa 10 % Verunreinigung an GDP enthalten. Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ wurde in chemischer Synthese hergestellt (1 g, 20.000 €) und bei -20°C gelagert. Von dieser Substanz wurde für jeden Reaktionsansatz eine neue 10 mM Stammlösung hergestellt. PolyPhosphat (NaPO₃)_n*H₂O (PolyP₁₄, Natriumhexametaphosphat 68) wurde als Gratisprobe vom Hersteller ThermPhos International B.V. (Wittenberg, Deutschland) erhalten und in gleicher Konzentration hergestellt und bei -20°C gelagert.

Substanz	Reinheit [%]	Bestellnummer	Hersteller
AMP	99	1930	Sigma
ADP	95	A2754	Sigma
ATP	98	HN35.1	Roth
GMP	99	G8377	Sigma
GDP	97	G7127	Sigma
GTP	90	K056.1	Roth
GDP-Mannose	97	G5131	Sigma
Glc-1.6-bisPhosphat	99	SC362011A	Santa Cruz
Mannose-6-P	98	M6876	Sigma
Mannose-1-P	Sigma grade	M1755	Sigma
PolyP ₁₄	68	-	ThermPhos Int. B.V.

Alle Hersteller aus Deutschland: Sigma, Taufkirchen; Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Reaktionspuffer: 20 mM Tris/ HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.25 % Triton X-100, 10 mM MgCl₂

Für Einfach- und Mehrfach-Reaktionen wurden alle Komponenten auf eine Reaktionstemperatur von 30°C vorinkubiert. Zum Starten der enzymatischen Reaktionen wurden jeweils 100 µL Substrat-Mastermix (alle Substrate in Reaktionspuffer) mit 100 µL Enzym-Mastermix (alle Enzyme in Reaktionspuffer) gemischt. Als Kontrolle wurden Ansätze ohne Enzym mitgeführt. Die Reaktionen wurden nach 0, 5, 10, 30, 60 und 120 Minuten beprobt. Zum Abstoppen der Enzymaktivität durch Denaturierung des Proteins wurden dem 200 µL-Ansatz 6 µL einer 50 %-igen TCA-Lösung zugesetzt und gemischt. Nach Neutralisation mit 4.5 µL 4 M NaOH wurde der Ansatz 5 min bei 16.100 x g zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5450 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde mittels IPC (Abschnitt 3.4.1) analysiert. Bei der graphischen Darstellung der Reaktionsverläufe wurden, der besseren Übersichtlichkeit wegen, die Substrat- und Produktkonzentrationen als relative Konzentration in Prozent dargestellt. Die molaren Startkonzentrationen sind jeweils in der Legende angegeben.

Untersuchungen zum Einfluss des pH-Wertes im Reaktionsverlauf der His₆-Alg1ΔTM

Der Einfluss des pH-Wertes wurde sowohl in Reaktionspuffer als auch in Bis-Tris-Propan-Puffer (20 mM Bis-Tris-Propan, 50 mM NaCl, 0.25 % Triton X-100, 10 mM MgCl₂) untersucht, um eine Beeinflussung der Puffer-Substanzen auszuschließen. Der Bis-Tris-Propan-Puffer bietet einen breiten Bereich von pH 6.8 bis 10 ($pK_{s1}=6.8$ $pK_{s2}=9.0$ bei 20 mM und 25°C) ohne Änderung in der Ionenstärke. Es wurden vergleichend zwei verschiedene Reaktionszeiten (1 min, 5 min) betrachtet, um den Einfluss des pH-Wertes in der *steady state*-Phase und darüber hinaus beurteilen zu können. Die Tests wurden unter gesättigten (apparenten) Bedingungen aller Substrate bei folgenden pH-Werten durchgeführt: pH 6.0, 6.5, 6.9, 7.2, 7.5, 7.8, 8.1, 8.5 und 9.0.

Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur im Reaktionsverlauf der His₆-Alg1ΔTM

Der Einfluss der Temperatur auf den Reaktionsverlauf katalysiert durch die His₆-Alg1ΔTM wurde in Reaktionspuffer bei folgenden Temperaturen untersucht: 20, 25, 27, 29, 30, 31, 33, 35, 40, 50°C. Auch hier wurden die Auswirkungen vergleichend für zwei verschiedene Reaktionszeiträume (1 min, 5 min) betrachtet. Die Tests wurden unter gesättigten (apparenten) Bedingungen aller Substrate durchgeführt.

Bestimmung kinetischer Parameter der His₆-Alg1ΔTM

Im Assay zur Bestimmung kinetischer Parameter wurden zunächst verschiedene Enzymkonzentrationen getestet, um Daten im linearen Anfangsbereich der Reaktionsgeschwindigkeit ausreichend gut darstellen zu können. Hierfür erwiesen sich 30 nM His₆-Alg1ΔTM als passend.

Zur Bestimmung der K_M - und V_{max} -Werte wurde jeweils ein Substrat in Sättigungskonzentration eingesetzt, während das andere Substrat bei variierenden Konzentrationen untersucht wurde.

Tabelle 3-6: Eingesetzte Substratkonzentrationen zur Bestimmung kinetischer Parameter der His₆-Alg1ΔTM 30 nM (1.57 mg/ L)

Phytanyl-PP-G2_{konst}	GDP-Mannose_{var}	GDP-Mannose_{konst}	Phytanyl-PP-G2_{var}
[μM]	[μM]	[μM]	[μM]
10	1, 5, 10, 20, 40, 80	80	1, 2.5, 5, 10, 40, 80
25	1, 5, 10, 20, 40, 80	120	1, 2.5, 5, 10, 40, 80
40	1, 2.5, 5, 10, 40, 80	450	1, 2.5, 5, 10, 40, 80
125	1, 2.5, 5, 10, 40, 80		
250	1, 5, 10, 20, 40, 80		

Reaktionsvolumen betrug 200 μL, die Reaktionstemperatur 30°C. Die Reaktionszeiten bis zum Abstoppen des Ansatzes betragen: 0 s, 15 s, 30 s, 45 s, 1 min, 1.5 min, 2 min.

Es wurden jeweils drei unabhängige Versuche (Triplikate) durchgeführt und die Proben mittels IP-HPLC nach Abschnitt 3.4.1 analysiert. Die erhaltenen Absorptionswerte wurden graphisch gegen die jeweils eingesetzte Substratkonzentration aufgetragen. Aus den erhaltenen Daten wurden v/[S]-Charakteristika erstellt, aus deren Anpassung anschließend die K_M - und V_{max} -Werte berechnet werden konnten.

3.3.7 Synthese, Extraktion und Reinigung von Phytanyl-PP-Chitobiose

In einem 100 mL-Reaktionsansatz wurden 100 mg Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ (940 μM) und 61 mg GDP-Mannose (940 μM) eingesetzt. Der Reaktionspuffer enthielt 20 mM Tris/ HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.25 % Triton X-100, 10 mM MgCl₂. Die Proteinkonzentration der His₆-Alg1ΔTM betrug 0.049 mg/ mL (940 nM). Die Reaktion wurde in einer 250 mL-Glasflasche in einem Inkubationsschrank bei 30°C ohne Schütteln durchgeführt, wobei die größeren Volumina an Puffer zunächst vortemperiert wurden. Die Reaktionszeit betrug zwei Stunden. Nach 30 min Inkubation war die Reaktion bereits beendet (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Analytik erfolgte nach Abschnitt 3.4.1. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Reaktionsansatzes zu fünffachem Volumen an Chloroform/Methanol (CHCl₃/ MeOH, 2:1 = 500 mL) und Inkubation unter Schütteln für zwei Minuten abgestoppt. Die Phasentrennung der unteren organischen Phase und der oberen wässrigen Phase wurde nach etwa einer Stunde Ruhe im Scheidetrichter erreicht. Beide Phasen wurden im Scheidetrichter voneinander getrennt und die wässrige Präzipitat-freie Phase am Rotationsverdampfer in zuvor abgewogenem 500 mL-Rundkolben eingetrocknet. Verbleibende Substanz wurde mit 5 mL Methanol von der Gefäßwand gelöst und anschließend als HPLC-Probe zur präparativen Reinigung (Säule: RP Jupiter C₁₈ 250x21mm, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) injiziert. Es wurde ein HPLC-MS-System der Dionex Softron GmbH (Germering, Deutschland) mit folgender Ausstattung genutzt: ASI-100 Autosampler, P-680 Pumpe, PDA-100 Photodiodenarray-Detektor; die Komponenten wurden mit einem Single Quadrupol Massenspektrometer Surveyor MSQ mit ESI Ionisierungsquelle gekoppelt. Der

Gradient des Laufmittels betrug 30-70 % Laufmittel B (A – 90 % Wasser, 10 % ACN; B – 10 % Wasser, 90 % ACN; der wässrige Anteil enthielt je 1.2 g Ammoniumacetat – $\text{CH}_3\text{COONH}_4$). Im Folgenden ist das Ablaufschema von der enzymatischen Reaktion bis zur Gewinnung des Produktes dargestellt:

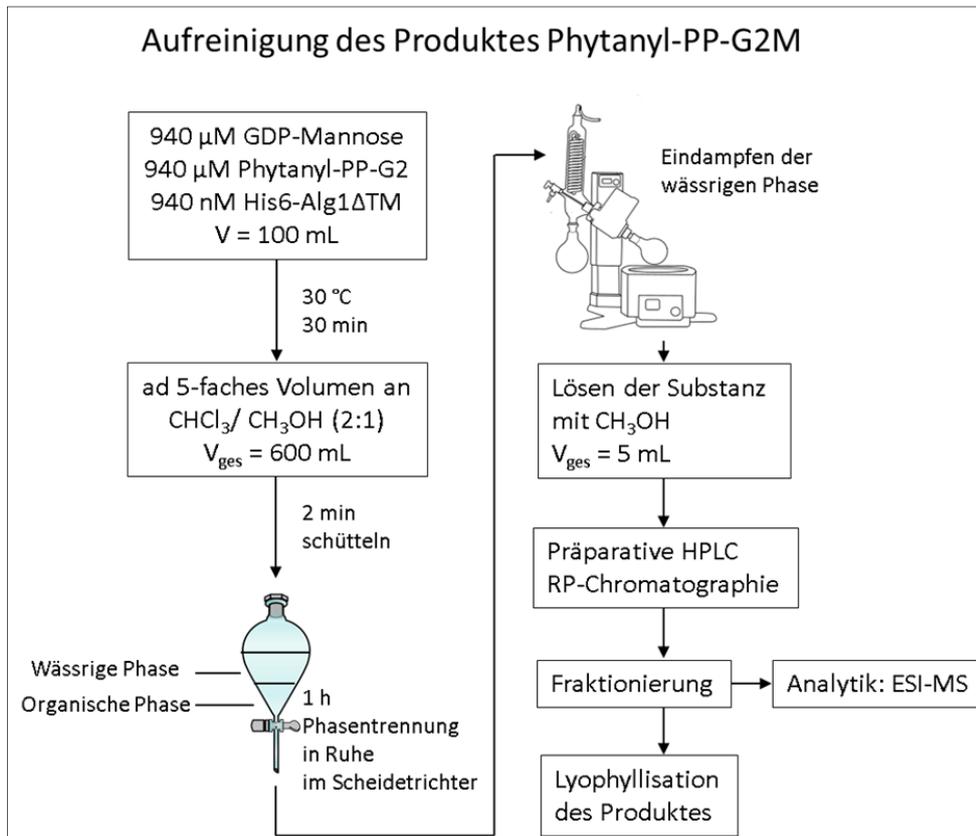


Abb. 3-1: Fließschema zur Gewinnung des Produktes Phytanyl-PP-G2M

3.4 Analytische Methoden

3.4.1 IP-HPLC – Methode 1

Für die Analyse von GMP, GDP, GTP, AMP, ADP, ATP und GDP-Mannose wurde das Verfahren der Ionenpaar-Chromatografie (IPC) gewählt. Die Trennung der Analyten erfolgte dabei wie bei der RP (*reversed phase*)-Chromatografie, hier mit einem Phosphatpuffer/ Methanol-Laufmittel, nur unter Zusatz eines volatilen tertiären Amins (Tributylamin). Letzteres bildet mit hydrophilen phosphorylierten (und anderen anionischen) Substanzen sogenannte Ionenpaare durch elektrostatische Maskierung der Phosphat- oder Carboxylatgruppen (Anionen). Voraussetzung hierfür ist ein schwach saures Milieu zum Erhalt der Tributylammonium-Form, in welchem die zu retardierenden Verbindungen nicht vollständig protoniert sind. Dies wird durch den Puffer-pH-Wert im Laufmittel von 6.5 gewährleistet. Die auf der Trennsäule gebildeten Ionenpaare

bilden so neutrale Analyten und können hydrophobe Interaktionen mit RP-Materialien eingehen. Das Ergebnis ist eine erhöhte Retention von eigentlich hydrophilen Analyten an hydrophobem RP-Chromatografie-Material.

Gerät:	Agilent-Anlage 1290 Infinity mit Standard automatischem Probengeber, binärer Pumpe, Säulenthermostat, variablem Wellenlängendetektor 1260 Infinity (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)
Software:	OpenLab CDS ChemStation LC A.02.10; Steuerung der Anlage, Datenaufzeichnung, Auswertung der Chromatogramme
Trennsäule:	Grom-Sil 120 ODS-5 ST 5 μm , 150 x 4 mm (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch, Deutschland)
Flussrate:	0.5 mL/ min bei Raumtemperatur
Probenvolumen:	5 μL (<i>partial loop injection</i>)
Autosampler:	4°C
Detektion:	UV, Wellenlänge 254 nm
Laufmittel A:	125 mM KH_2PO_4 , 53 mM KOH, 10 mM TBAHP pH 6.5
Laufmittel B:	Laufmittel A + 12 % Methanol

Tabelle 3-7: Methode zur optimalen Trennung von Nukleotiden und GDP-Mannose

Die Methode wurde auf Grundlage der Analytik nach Neubauer [184] etabliert (Diplomarbeit Wolfram, 2010).

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
00:00	100	0
08:00	100	0
08:01	0	100
21:00	0	100
21:01	100	0
25:00	100	0

Probenvolumen:	10 μL
Reaktionspuffer:	20 mM Tris/ HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.25 % Triton X-100, 10 mM MgCl_2

Zur Kalibrierung des Gerätes wurden Stammlösungen (500 μM) der Analyten GMP, GDP, GTP, AMP, ADP, ATP und GDP-Mannose hergestellt. Die Zielkonzentrationen der Verdünnungsreihe betragen jeweils 10, 100 und 500 μM . Die Ansätze (200 μL) wurden 5 min bei 30°C inkubiert und

anschließend mit 6 µL einer 50 %-igen TCA-Lösung versetzt, um das spätere Abstoppen der Reaktionsansätze zu simulieren. Anschließend wurde für 5 min bei 16.100 x g zentrifugiert. Nach HPLC-Analytik wurden aus den erhaltenen Chromatogrammen über die Software OpenLab die Retentionszeiten (Tabelle 3-8) bestimmt. Die berechneten Flächen der Substanzen wurden anschließend über lineare Regression mit den eingesetzten Konzentrationen korreliert. Aufgrund unterschiedlicher Extinktionskoeffizienten der einzelnen Substanzen ergeben sich daher bei gleicher Konzentration unterschiedliche Peakflächen, die sich nicht direkt in Beziehung setzen lassen. Deshalb wurden bei jedem Messzyklus zusätzlich Kalibrierstandards vermessen und die erhaltenen Messdaten mit diesen korreliert. Die ermittelten Bestimmtheitsmaße im Bereich von $R^2 > 0.97$ zeigen eine gute Übereinstimmung der Messwerte mit der Kalibriergeraden, welche der Bestimmung der Konzentrationen der Substrate und Produkte aus den Reaktionsproben diene. Ein Chromatogramm der Analyten ist in Abbildung 4-3 zu sehen. AXP ist dort nicht abgebildet, da es erst im Zuge der Experimente in einer Nebenreaktion detektiert wurde. An dieser Stelle soll AXP aber dennoch zur Vollständigkeit erwähnt werden.

Tabelle 3-8: Retentionszeiten der mittels IPC analysierten Substanzen

Substanz	Retentionszeit [min]
GMP	10.5
GDP-Mannose	12.3
GDP	13.4
GTP	14.8
AMP	13.8
ADP	16.1
ATP	17.3
AXP	19.1

3.4.2 IP-UPLC – Methode 2

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Analysen mittels *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC) und Tandem-Massenspektrometrie wurden freundlicherweise durch Herrn Dr. habil. G. U. Balcke am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle (Saale) durchgeführt.

Die IP-Chromatografie wurde neben den schon erwähnten Analyten ebenfalls zur Trennung der Analyten AXP, Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ (G2) und Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂Man₁ (G2M) angewandt. Trotz intensiver Vorversuche mit RP und *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) erwies sich die IPC als die am besten geeignete Methode zur Bestimmung von G2 und G2M. Sie führte zu scharfen Elutions-Peaks für die Zucker-Lipide. Wie bei der im vorigen Abschnitt beschriebenen Methode ist das grundsätzliche Trennprinzip der IPC das der RP-Chromatografie.

Die Trennung der Analyten resultierte hier durch einen Wasser/ Acetonitril-Gradienten, ebenfalls unter Zusatz von Tributylamin. Das Ansäuern des Amins (Tributylammonium-Form) zur Anregung der Ionenpaar-Bildung erfolgte durch Essigsäure auf einen pH-Wert von 6.2 [185]. Phytanyl-PP-G₂ und Phytanyl-PP-G₂M weisen einen amphiphilen Charakter auf, da sie einerseits über hydrophobe C₂₀-Isoprenketten verfügen, ebenso aber auch über hydrophile Pyrophosphatbrücken verestert sind. Darüber hinaus enthalten G2 zwei und G2M drei ebenfalls hydrophile Zuckereinheiten.

Gerät:	Acquity UPLC-System (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland)
Software:	Analyst® 1.7.1 (Sciex Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland); Steuerung der Anlage, Datenaufzeichnung, Auswertung der Chromatogramme
Trennsäule:	RP18-Nucleoshell 150 mm x 2.1 mm x 2,7 um, (Macherey & Nagel, Düren, Deutschland)
Flussrate:	0.4 mL/ min bei einer Säulentemperatur von 40°C
Probenvolumen:	5 µL (<i>partial loop injection</i>)
Autosampler:	4°C
Methoden:	MRM, MS/MS (EPI)
Laufmittel A:	10 mM Tributylammonium-Acetat in Wasser, angesäuert mit Eisessig auf pH 6.2
Laufmittel B:	10 mM Tributylammonium-Acetat in 50 % Acetonitril/ 50 % Wasser

Tabelle 3-9: Methode zur Trennung von Phytanyl-PP-G₂ und Phytanyl-PP-G₂M
Die Methode wurde auf Grundlage der Analytik nach Balcke et al. [185] angewandt.

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
00:00	98	2
02:00	98	2
18:00	64	36
21:00	5	95
22:50	5	95
22:51	98	2
24:00	98	2

3.4.3 ESI-MS/MS

Bei Elution des Ionenpaars vom Chromatografie-Material in den Raum der Elektrospray-Ionisation (450°C) wird das Ionenpaar wieder in TBA-Kationen und Anionen aufgespalten. Bei Verwendung von Massenspektrometrie im negativen Ionisationsmodus führt dies zur Messbarkeit des betreffenden Anions als [M-H]-Mutter-Ion. Folgende Quellparameter wurden für die duale ESI-Quelle (*Dual Source*) eingestellt:

Gerät:	QTrap 6500 (Sciex, Toronto, Kalifornien)
<i>Curtain gas</i> :	40 psi
Gas1	60 psi
Gas2	70 psi
Temperatur:	450°C
Quellgas:	Druckluft
Kollisionsgas:	mittel
Ionisierungsspannung:	-4500 V

Die MRM-Methode im Triple Quadrupol Modus (*Multiple Reaction Monitoring*) analysiert hochspezifisch und selektiv. Im Vorfeld der Messung wurden spezifische Fragment-Ionenpaare, sogenannte Massenübergänge, definiert. Dazu wurden zunächst die definierten Mutter-Ionen (erster Quadrupol Q1) nach den Masse-Ladungs-Verhältnissen selektiert. Im zweiten Quadrupol (Q2) erfolgte die Fragmentierung der Mutter-Ionen durch Kollision mit einem Stoßgas (Stickstoff). Im dritten Quadrupol (Q3) wurde das vorher definierte Fragmention gefiltert und gelangte anschließend in den Detektor, welcher die spezifischen Signale an den Computer weiterleitete.

Für jede Substanz wurden spezifische MRM-Massenübergänge (aus Mutter- zu Tochterion) durch Infusions-Experimente bestimmt und deren Signal-Intensitäten optimiert (Tabelle 3-10). Für AMP, ADP, ATP, GMP, GDP, GTP und Guanosin wurden bereits bekannte Massenübergänge verwendet.

Tabelle 3-10: Verwendete MS/MS-Spuren zur Detektion der Analyten aus den Enzym-Assays im MRM-Modus

Substanz	MS1	MS3	Retentionszeit	Declustering Poteintial	Entrance Potential	Collision Energy	Cell Exit Potential
	[m/z]	[m/z]	[min]	[V]	[V]	[V]	[V]
AMP	346.2	78.82	8.9	-70	-10	-52	-3
ADP	426.2	78.85	13.2	-75	-10	-66	-3
ATP	506.2	158.78	15.6	-80	-10	-38	-9
GMP	362.2	78.92	7.8	-65	-10	-66	-5
GDP	442.2	78.85	12.9	-85	-10	-70	-3
GTP	522.2	158.79	15.4	-90	-10	-48	-9
Guanosin	282.2	149.93	2.1	-80	-10	-26	-7
G2-1	863.214	439	19	-260	-10	-60	-27
G2-2	863.214	484.9	19	-260	-10	-56	-23
G2-3	863.214	78.9	19	-260	-10	-122	-35
G2-4	863.214	281.9	19	-260	-10	-70	-15
G2M-1	1025.225	439.2	19	-25	-10	-72	-23
G2M-2	1025.225	646.8	19	-25	-10	-68	-33
G2M-3	1025.225	456.9	19	-25	-10	-60	-29
G2M-4	1025.225	281.9	19	-25	-10	-80	-15
GDP-Man1	603.772	424	9.8	-45	-10	-40	-25
GDP-Man2	603.772	543.4	9.8	-45	-10	-10	-31
GDP-Man3	603.772	78.8	9.8	-45	-10	-120	-13
GDP-Man4	603.772	132.2	9.8	-45	-10	-28	-9
AXP-01	585.95	158.7	17.2	-80	-10	-38	-9
AXP-02	585.95	79	17.2	-80	-10	-38	-5
AXP-03	585.95	408.01	17.2	-80	-10	-20	-5

Die Bestimmung der Retentionszeiten und die Optimierung der MS-Parameter erfolgte mittels analytischer Standards in hoher Reinheit (Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland; ChiroBlock GmbH, Bitterfeld, Deutschland).

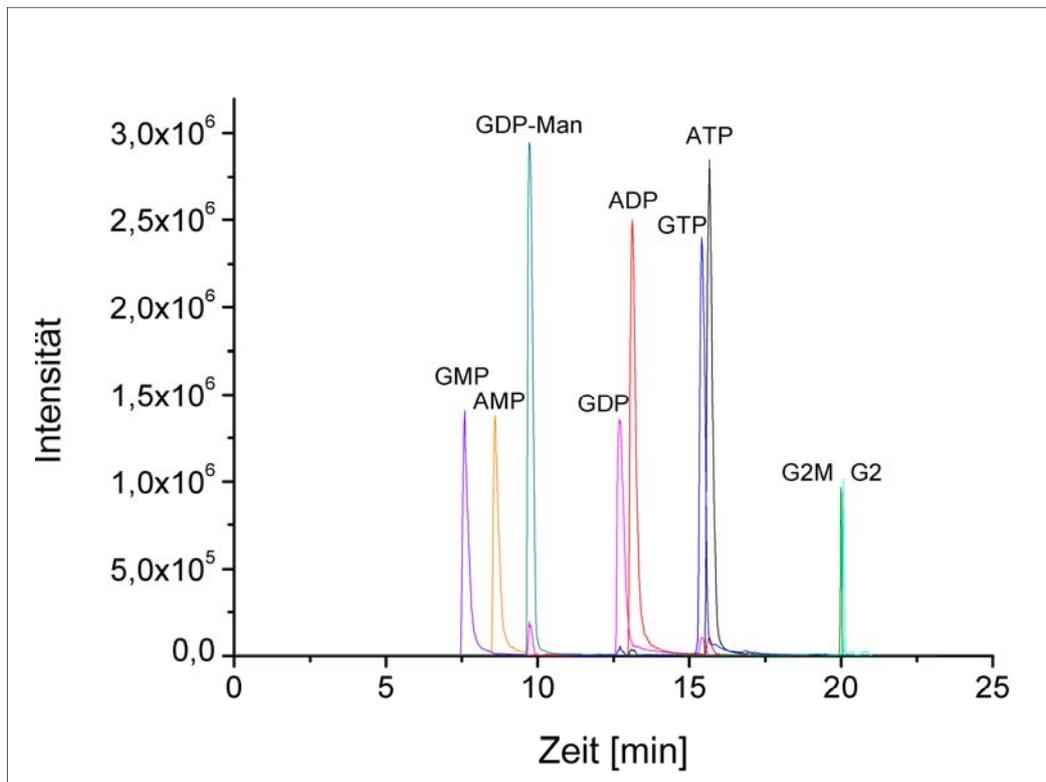


Abb. 3-2: Chromatogramm selektierter Massen-Spuren (TIC – total ion chromatogram) der Analyten aus den enzymatischen Assays

Massenspektrometrie stellt bei der Analyse komplexer Gemische neben der Retentionszeit einen weiteren Freiheitsgrad (bei Verwendung von MS/MS sogar zwei) dar, der eine eindeutige Zuordnung des Messsignals zu einer Verbindung gestattet. Aus diesem Grund ist es nicht nötig, alle Verbindungen basisliniengetrennt zu chromatografieren.

Ein weiterer interessanter Messmodus ist der *Enhanced Product-Ion Scan* (EPI), der zur eindeutigen Identifizierung eines Analyten anhand eines MS^2 -Spektrums benutzt wird. Dazu werden die im Quadrupol Q2 gebildeten Fragment-Ionen eines im Q1 selektierten Mutterions sequenziell, unter Ausnutzung der Ionenfallen-Funktion des Q3 (im sogenannten QTrap-Modus), nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis zum Detektor geleitet. Diese Funktion führt zu einer erhöhten Empfindlichkeit bei der Aufnahme von Produkt-Ionen-Spektren. Das Spektrum ist charakteristisch für die betreffende Substanz [186]. Die Quellparameter entsprachen denen der MRM-Methode. Weitere Einstellungen waren wie folgt:

Scan Rate:	10.000 Da/ s
Kollisionsenergie:	[V]
AXP	-10,-35,-50
G2	-10,-45,-70
G2M	-10,-45,-70

Durch die Kollision mit dem Stoßgas werden definierte Bindungsbrüche hervorgerufen. Abb. 4-8 und Abb. 4-15 zeigen die erhaltenen EPI-Spektren für AXP, G2 und G2M mit ihren spezifischen Fragmentierungsmustern. Durch die Auswahl abweichender Kollisionsenergien sind aber auch andere Fragmentierungsstellen möglich. Die Übereinstimmungen des Fragmentierungsmusters des Produktes G2M bestätigen dessen Entstehung aus dem Substrat G2. Die Fragmente von ATP gleichen denen von AXP (nicht gezeigt).

Alle verwendeten Lösungsmittel wurden in hoch reiner Form bezogen (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland).

Gerät:	HPLC System mit Autosampler AS-100, Pumpe P-680, Photodiodenarray-Detektor PDA-100 (Dionex Softron GmbH, Germering, Deutschland)
Massenspektrometer:	Surveyor MSQ (Single Quadrupol) mit ESI Ionisierungsquelle
Trennsäule:	RP Jupiter C18 250x21mm, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland
Laufmittel:	A: 90 % Wasser + 1.2 g C ₂ H ₇ NO ₂ , 10 % ACN B: 10 % Wasser + 1.2 g C ₂ H ₇ NO ₂ , 90 % CAN
Gradient:	30-70 % Laufmittel B
Flussrate:	0.5 mL/ min
Lyophilie:	ALPHA 2-4 LD-2 (Christ GmbH, Osterode, Deutschland)

4 Ergebnisse

4.1 Enzymatische Synthese von GDP-Mannose

Zur Synthese von Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂-Man₁ durch das Enzym β 1,4-Mannosyltransferase Alg1 (EC 2.4.1.142) werden die Substrate Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ und α -D-GDP-Mannose benötigt. Das Donor-Substrat α -D-GDP-Mannose ist bei verschiedenen Anbietern kommerziell erhältlich. GDP-Mannose ist mit 900 €/ 100 mg ein vergleichsweise teures Substrat. Daher sollte diese Verbindung enzymatisch aus kostengünstigen Vorstufen hergestellt werden. Ausgehend von ATP, Mannose und GTP kann GDP-Mannose in drei enzymatisch katalysierten Schritten produziert werden. Im ersten Schritt liefert die Umsetzung von ATP und Mannose durch das Enzym Glukokinase (Glc) ADP und Mannose-6-Phosphat (Abb. 4-4 A). Mannose-6-Phosphat wird dann durch die Phosphomannomutase (ManB) in Mannose-1-Phosphat überführt. Mannose-1-Phosphat und GTP werden anschließend durch die Mannose-1-Phosphat-Guanyltransferase (ManC) zu GDP-Mannose und Pyrophosphat umgewandelt (Abb. 4-5 A). Bei der Umsetzung von entstandener GDP-Mannose durch die Alg1 wird GDP als Nebenprodukt gebildet. Zwei Kinasen, die 1D-Ppk2 und die Ppk3, können die, während dieser Reaktionen gebildeten, Nucleosiddiphosphate ADP und GDP mit Polyphosphat als Phosphatdonor wieder in ATP und GTP überführen. Somit entsteht ein Regenerationszyklus für das hochpreisige Donorsubstrat GDP-Mannose.

Die Aktivitäten der benötigten gereinigten Enzyme wurden zunächst in Einzelreaktionen betrachtet und anschließend miteinander kombiniert. Solche Multi-Enzym-Reaktionen werden in einem gemeinsamen Ansatz unter gleichen Bedingungen durchgeführt, wobei die Bedingungen nicht immer den optimalen Ansprüchen der einzelnen Enzyme entsprechen. In Tabelle 4-1 sind publizierte pH- und Temperatur-Werte, bei denen die Enzyme eingesetzt wurden, zusammengefasst.

Tabelle 4-1: Zusammenstellung publizierter pH-Werte und Temperaturen relevant für den Multi-Enzym-Ansatz

Enzym	Bemerkungen	pH-Wert	Temperatur	Puffersubstanz	Quelle
Glc	Aus <i>E. coli</i> MC4100 In <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	7.6*	25°C*	300 mM Tris/ HCl	[187]
ManB	Aus <i>E. coli</i> K12 In <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	8.0	37°C*	20 mM Tris/ HCl	[188]
ManC	Aus <i>H. pylori</i> In <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	7.0	37°C*	50 mM Tris/ HCl	[189]
1D-Ppk2	Aus <i>P. aeruginosa</i> In <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	8.0	-	50 mM Tris/ HCl	[190]
Ppk3	Aus <i>R. pomeroyi</i> In <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	8.0	30°C*	50 mM Tris/ HCl	[191]
Alg1	Homolog <i>Sus scrofa</i>	7.0	37°C*	20 mM Tris/ HCl	[192]

*Werte stellen keine Optima, sondern Bedingungen aus publizierten Aktivitäts-Assays dar

Bei der Wahl von geeigneten Reaktionsbedingungen für den Multi-Enzym-Ansatz konnten pH-Optima für die ausgewählten Enzyme herangezogen werden. Da für diese Enzyme keine Temperatur-Optima publiziert sind, wurden hier Temperaturen betrachtet, bei denen die Enzyme katalytisch aktiv waren.

Für die zu verwendenden Enzyme ergeben sich aus den publizierten pH-Werten und Temperaturen ein mittlerer pH-Wert von etwa 7.5 und eine mittlere Temperatur von etwa 30°C. Als geeignetes Puffersystem bei pH 7.5 wurde TRIS-Puffer (pK_s -Wert von 8.2) gewählt. Zur Stabilisierung der Enzyme und zur Erhöhung der Löslichkeit sollte weiterhin NaCl enthalten sein [193]. Da für alle aufgeführten Enzyme eine Abhängigkeit von zweiwertigen Ionen beschrieben wurde (siehe Literaturhinweise in Tabelle 4-1), wurde dem Puffersystem zusätzlich $MgCl_2$ zugesetzt. Weiterhin sollte der Puffer 0.25 % Triton X-100 enthalten, da dieses Detergenz als Lösungsvermittler bei der Aufreinigung der Alg1 unverzichtbar ist [194]. Sämtliche Reaktionen sollten demnach in Reaktionspuffer 20 mM Tris/ HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 0.25 % Triton X-100 bei 30°C durchgeführt werden.

4.1.1 Produktion und Reinigung der Enzyme Glk, ManB und ManC

Die Glukokinase (EC 2.7.1.2) Glk aus *E. coli* DSM 5911 (Synonym W3110) katalysiert die Umsetzung von ATP und Glukose zu ADP und Glukose-6-Phosphat. Nach Untersuchungen zur Substratspezifität der Glk zeigte sich, dass auch Mannose als Substrat akzeptiert wird [195, 196]. Die Gensequenz zur Expression der Glk wurde nach Abschnitt 3.2 aus *E. coli* DSM 5911 amplifiziert, in den Vektor pET-28a (+) kloniert und anschließend in *E. coli* BL21 Gold (DE3) transformiert. Die Klonierungsstrategie wurde so gewählt, dass die Glk mit einer sechsfachen *N*-terminalen Hexahistidin-Fusion produziert wurde (Abb. S-0-1). Dem 3'-Ende der Gensequenz folgt ein sogenannter *stem loop*, der bei der Termination der Transkription eine Rolle spielt [195]. Die Anzucht erfolgte unter Standardbedingungen nach Abschnitt 3.3.1. Vier Stunden nach Induktion konnte eine zytoplasmatische Proteinbande detektiert werden. Die Höhe der Bande entsprach dem theoretisch erwarteten Molekulargewicht der Glk. Es wurden 2.6 g/ L BFM geerntet. Zur Reinigung des Enzyms wurden 2 g BFM aus Lagerung bei -20°C aufgetaut und die Zellen aufgeschlossen. Der abzentrifugierte Rohenzymextrakt wurde anschließend mittels Nickel-Affinitätschromatografie nach Abschnitt 3.3.3 aufgearbeitet. Die vereinigten Glk-enthaltenden Fraktionen wurden zum Entfernen der hohen Imidazol-Konzentrationen gegen Reaktionspuffer dialysiert. Nach Konzentrierung betrug die Proteinkonzentration der Glk 70 mg/ mL.

E. coli produziert wie viele Enterobakterien extrazelluläre Polysaccharide (EPS). Diese bestehen aus sich wiederholenden Einheiten von Glukose, Fruktose, Glucuronsäure und Galaktose, auch als Colonsäure oder M-Antigen bezeichnet. Das *wca*-Gen-*cluster* zur Produktion der Colonsäure enthält 19 Gene, unter anderem die Phosphomannomutase (*manB*) und die Mannose-1-Phosphat-Guanyltransferase (*ManC*) zur Bildung von GDP-Fruktose [197, 198]. Die Phosphomannomutase (EC 5.4.2.8) *ManB* aus *E. coli* DSM 5911 katalysiert die reversible

Umlagerung von Mannose-6-Phosphat zu Mannose-1-Phosphat. Dabei benötigt das Enzym den Co-Faktor Glukose-1,6-bis-Phosphat. Mit Hilfe des Co-Faktors wechselt die ManB zwischen einer phosphorylierten und einer nicht-phosphorylierten Form. Auf diese Weise wird die Umlagerung der Phosphatgruppe vom C₆ zum C₁ katalysiert [199]. Die Mannose-1-Phosphat-Guanyltransferase (EC 2.7.7.13) ManC katalysiert die reversible Phosphorylierung von Mannose-1-Phosphat mit Hilfe von GTP zu GDP-Mannose und Pyrophosphat. Die Gene zur Herstellung der beiden eben benannten Enzyme liegen im *wca*-Gen-*cluster* nebeneinander. Koizumi und Kollegen klonierten 2000 beide Gene zusammen in ein Konstrukt [200]. In Anlehnung an diese Arbeit wurden die Sequenzen der, für die ManB und ManC kodierenden Gene, aus *E. coli* DSM 5911 nach Abschnitt 3.2.2 amplifiziert und in den Vektor pET-28a (+) kloniert. Das Konstrukt führt zur Produktion der ManC (Abb. S-0-3) zusammen mit einer C-terminalen sechs-fachen Hexahistidin-Fusion der ManB (Abb. S-0-2). Vier Stunden nach Induktion war eine starke Zunahme zweier Banden auf der Höhe des theoretischen Molekulargewichts von ManB-His₆ und ManC zu verzeichnen. Nach der Anzucht nach Abschnitt 3.3.1 wurden 2.1 g/ L BFM geerntet. Zur Reinigung des Enzyms wurden 2 g BFM verwendet und der zentrifugierte Rohenzymextrakt anschließend mittels Nickel-Affinitätschromatografie nach Abschnitt 3.3.3 aufgearbeitet. Das Ergebnis der Reinigungen ist in Abb. 4-1 dargestellt.

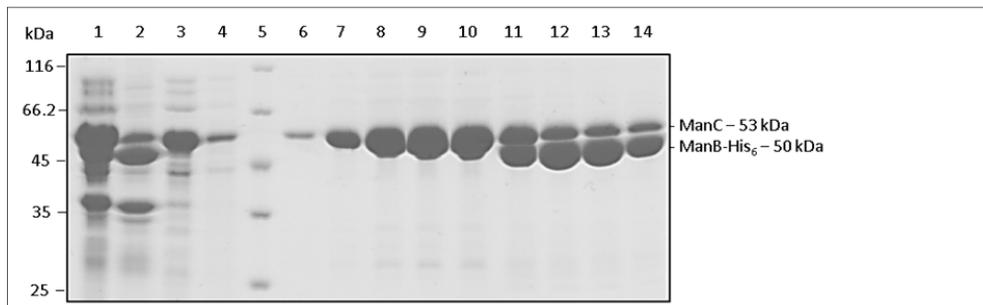


Abb. 4-1: SDS-PAGE mittels IMAC gereinigter ManC und ManB-His₆ Aufgetragen wurden: Spur 1 - Rohenzymextrakt nach Zentrifugation der aufgeschlossenen Zellen, Spur 2 - Unlösliche Fraktion nach Zentrifugation, Spur 3 - Durchlauf, Spur 4 - Waschfraktion, Spur 5 - Molekulargewichtsstandard, Spur 6 bis 14 - Elutionsfraktionen. Äquilibrierpuffer: 50 mM Tris/ HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, Elutionspuffer: 50 mM Tris/ HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, SDS-PAGE 12.5 %-ig, Coomassiefärbung.

Es zeigt sich, dass sowohl die mit der C-terminalen Histidin-Fusion versehene ManB, als auch die nicht mit einem Affinitäts-*tag* versehene ManC von der Nickel(II)-beladenen Agarose eluiert werden konnten. Die vereinigten ManCB-His₆-enthaltenden Fraktionen wurden zum Entfernen der hohen Imidazol-Konzentrationen gegen Reaktionspuffer nach Abschnitt 3.3.3 dialysiert. Zur Konzentrierung der Enzymlösung wurde diese in Amicon-Konzentratoren mit einem MWCO (*molecular weight cut-off*) von 50 kDa bei 3000 x g und 4°C zentrifugiert. Die finale Proteinkonzentration, bestimmt nach Abschnitt 3.3.4, der ManCB-His₆ betrug unter der Annahme, dass beide Proteine zu gleichen Teilen in der Lösung enthalten seien (siehe Abb. 4-2), 22.8 mg/ mL.

Der Reinheitsgrad aller Enzymlösungen wurde mittels SDS-PAGE (Abschnitt 3.3.5) überprüft. Dies ist in Abb. 4-2 dargestellt.

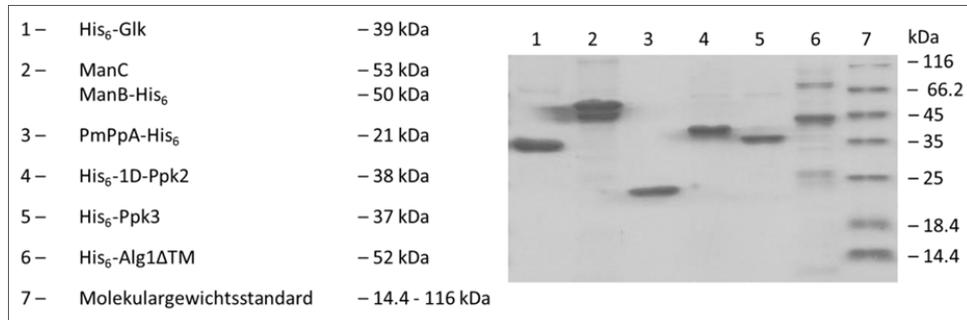


Abb. 4-2: Analyse des Reinheitsgrades von Enzymen zur GDP-Man-Synthese (SDS-PAGE, Coomassie-Färbung)
Die Konzentrationen der mittels Affinitätschromatografie aufgereinigten Enzyme betragen 0.4 – 0.7 mg/ mL. Die Auftragungen sind der Abbildung zu entnehmen.

Abbildung 4-2 zeigt neben dem Reinheitsgrad der Enzyme His₆-Glk, ManC und ManB-His₆ alle weiteren in dieser Arbeit verwendeten, im nachfolgenden beschriebenen, Enzyme. Die Reinheit der Enzyme wurde als ausreichend eingestuft. Anschließend wurden die Enzyme in Aktivitätstests eingesetzt.

4.1.2 Nachweis der Einzelreaktionen von His₆-Glk und ManCB-His₆

Die Reaktionsverläufe wurden, wie unter Abschnitt 3.4.1 beschrieben, mittels IP-HPLC analysiert. Dabei wurden die Nukleotide ATP, ADP, AMP, GTP, GDP und GMP sowie der Nukleotidzucker GDP-Mannose betrachtet. Die Analytikmethode beinhaltet einen Ein-Stufen-Elutionsschritt, bei dem nach 8 von 25 Minuten von 100 % Laufmittel A zu 100 % Laufmittel B umgeschaltet wird. Durch Zugabe von Methanol im Laufmittel B verkürzen sich die Retentionszeiten von ADP, ATP und GTP drastisch, so dass die ursprüngliche Methode [184] mit 80 Minuten Laufzeit auf 25 Minuten verkürzt werden konnte. Die einzelnen Analyten, die auch der Kalibrierung der Substanzen dienten, konnten mit dieser Methode isoliert voneinander (Abb. 4-3) bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert werden.

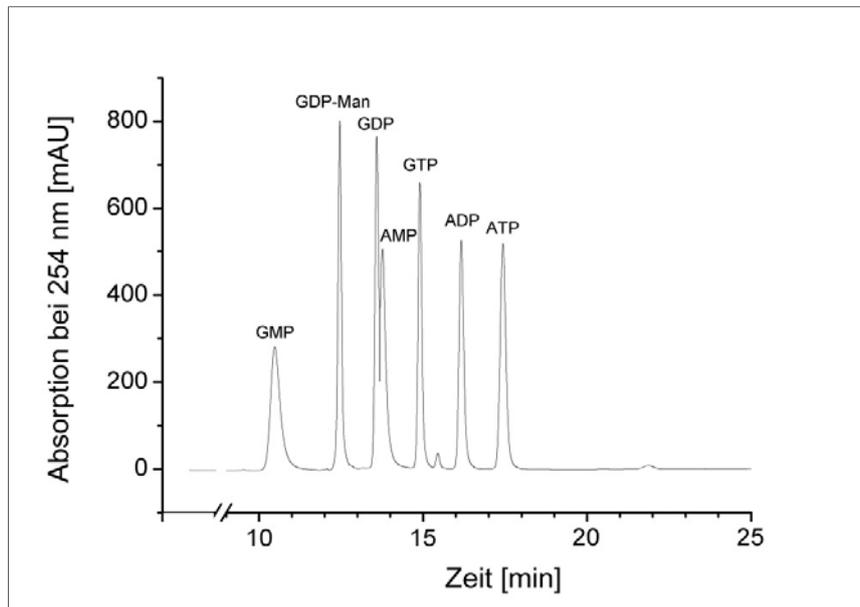


Abb. 4-3: Chromatogramm nach IPC von GDP-Mannose, GMP, GDP, GTP, AMP, ADP und ATP. Analyten jeweils 500 μM in Reaktionspuffer, Laufmittel A - 125 mM KH_2PO_4 , 53 mM KOH, 10 mM TBAHP, Laufmittel B - Laufmittel A + 12 % Methanol (v/v), Flussrate 0.5 mL/ min, Injektionsvolumen 10 μL , Säule: Grom-Sil 120 ODS-5 ST 5 μm (150 x 4 mm), Detektion Wellenlänge: 254 nm

Die Retentionszeiten der Peaks der Analyten können aus Abbildung 4-3 wie folgt angegeben werden: GMP 10.5 min, GDP-Mannose 12.3 min, GDP 13.4 min, AMP 13.8 min, GTP 14.8 min, ADP 16.1 min und ATP 17.3 min. Dabei überlagert sich die Basis der Peaks von GDP mit der von AMP. Da AMP in den Reaktionen aber nicht entstehen sollte, wurde die Basislinien-Trennung beider Substanzen nicht weiterverfolgt. Die bei einer Retentionszeit von 15.4 min eluierende Substanz ist eine Verunreinigung von GTP, diese konnte nicht weiter spezifiziert werden.

Nach Etablierung der Analytikmethode sollte zunächst festgestellt werden, bei welcher Proteinkonzentration und Reaktionszeit an His₆-Glc die Substrate ATP und Mannose (jeweils 500 μM) weitestgehend verbraucht werden. Da für Mannose und Mannose-6-P keine geeignete Analytik zur Verfügung stand, wurde der Umsatz aus dem Verbrauch von ATP und der Bildung von ADP berechnet. Um den Reaktionsverlauf der durch die His₆-Glc katalysierten Reaktion beschreiben zu können, wurden dem Reaktionsansatz zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und wie unter Abschnitt 3.3.6 beschrieben abgestoppt und analysiert. Zunächst wurden zwei verschiedene Konzentrationen an His₆-Glc getestet. Bis zu einer Konzentration von 102 μM (4 mg/ mL) über 120 min wurde kein quantitativer Umsatz erzielt (Abb. 4-4 B). ATP konnte hier maximal zu 78 % verbraucht werden.

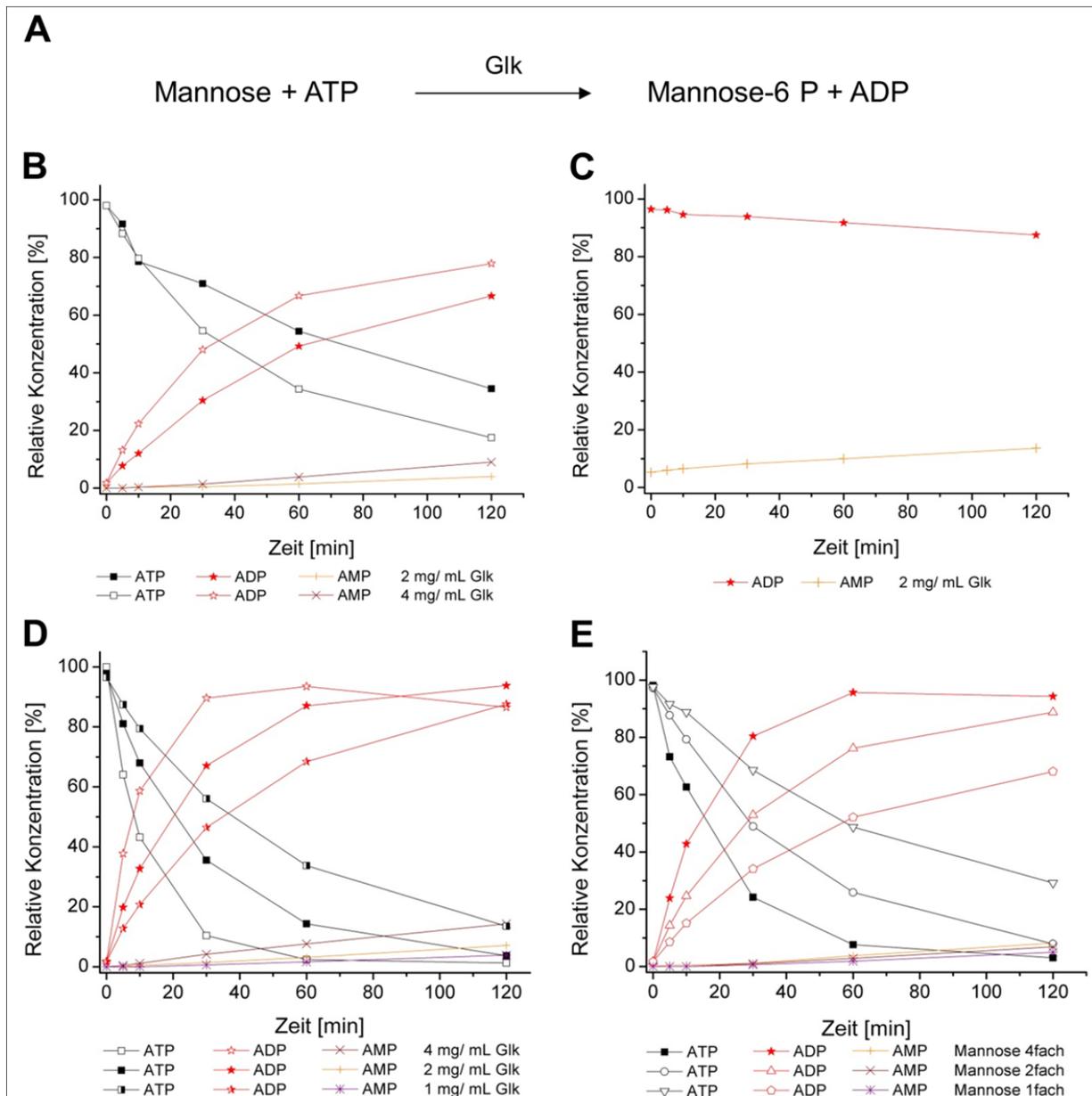


Abb. 4-4: His₆-Glc katalysierte Reaktion in Gegenwart ausgewählter Substratkonzentrationen. (A) Schematische Darstellung der Reaktionen, **(B)** Zeitliche Abhängigkeit des Reaktionsverlaufes bei verschiedenen Proteinkonzentrationen an Glk (2 und 4 mg/ mL), **(C)** Reaktionsverlauf mit ADP als Substrat, **(D)** Verschiedene Konzentrationen an Glk (1, 2 und 4 mg/ mL, entspricht 25,5, 51 und 102 μ M) bei vierfach erhöhter Mannosekonzentration, **(E)** Proteinkonzentration 2 mg/ mL bei verschiedenen Konzentrationen an Mannose (einfach - 0,5, zweifach - 1, vierfach - 2 mM); Reaktionsbedingungen: 0,5 mM Mannose (B+C), 2 mM Mannose (D), 0,5 - 2 mM Mannose (E), 500 μ M ATP, Proteinkonzentrationen wie jeweils angegeben, Puffer: 20 mM Tris/ HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0,25 % Triton X-100, T=30°C. Analytik: IP-HPLC nach Abschnitt 3.4.1, Detektion bei 254 nm, Einfachmessungen (n=1).

Aus der Umsatzkurve in Abb. 4-4 B wird weiter deutlich, dass ein geringer Anteil an AMP gebildet wird. AMP ist zum einen zu 5 % als Verunreinigung in ADP enthalten, wird aber zum anderen durch Umsetzung von ADP (als konkurrierendes Substrat) gebildet, wie aus dem

Kontrollversuch (Abb. 4-4 C) deutlich wird. ADP ist dabei ein relativ schlechtes Substrat, welches bei geringen Konzentrationen an ATP akzeptiert wird.

Glk bildet Dimere, nach Bindung von Glukose rücken die beiden Monomere noch näher zueinander und ermöglichen so die Bindung von ATP. Durch die Bindung des ATP kommt es zu einer kleinen, aber wesentlichen Konformationsänderung, die zu einer katalytisch aktiveren Form des Enzyms führt [201]. Diese Information führte zum Anheben der Zuckerkonzentration im Folgeexperiment. Es wurden 2 mM Mannose (zum Vergleich: der K_M -Wert der *E. coli* Glk für Glukose = 0.15 [196] - 0.78 mM [195]), verschiedene Konzentrationen an His₆-Glk (1, 2 und 4 mg/ mL) und unverändert 500 μ M ATP eingesetzt. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird durch diese Änderung im Reaktionsansatz deutlich erhöht (Abb. 4-4 D). Im Ansatz mit 2 mg/ mL His₆-Glk konnten bereits nach 60 min 94 % entstehendes Produkt ADP verzeichnet werden. Bei höheren Proteinkonzentrationen führte der schnellere Verbrauch von ATP durch Verwendung des alternativen Substrates ADP zu höherer, nicht erwünschter AMP-Bildung. Dies wird in der Abnahme von ADP im Reaktionsansatz mit 4 mg/ mL His₆-Glk nach etwa 60 min Reaktionszeit sichtbar. Daher wurden in nachfolgenden Ansätzen 2 mg/ mL His₆-Glk eingesetzt. Für die Glk-Reaktion sollte abschließend geklärt werden, wie hoch der Überschuss an Mannose sein muss, um einen nahezu vollständigen Umsatz der eingesetzten Substrate zu erreichen. Hierzu wurde Mannose in einfacher Konzentration bzw. zweifachem und vierfachem Überschuss bezogen auf das Substrat ATP eingesetzt (Abb. 4-4 E). Dabei zeigte sich, dass ein vierfacher Überschuss des Substrates Mannose die höchsten Umsätze unter den gewählten Bedingungen erzielte. Nach 60 min ist der Umsatz der eingesetzten Substrate bei einer Proteinkonzentration von 2 mg/ mL und vierfachem Mannoseüberschuss, bezogen auf das Substrat ATP, nahezu vollständig. Folgende Bedingungen werden für nachfolgende Reaktionen, in denen die His₆-Glk zum Einsatz zur gekoppelten Synthese von GDP-Mannose kommt, festgehalten: 500 μ M ATP, 2 mM Mannose, 2 mg/ mL His₆-Glk.

Zur Ermittlung einer geeigneten Proteinkonzentration (zum quantitativen Umsatz der Substrate) an ManCB-His₆ wurden erneut verschiedene Enzymmengen (0.25, 0.5 und 1.0 mg/ mL) eingesetzt (Abb. 4-5 B). Die Konzentrationen der eingesetzten Substrate ADP und Mannose-6-Phosphat (Reaktion ManB) sowie GTP (Reaktion ManC) betragen 500 μ M. Der Co-Faktor Glukose-1,6-bis-Phosphat wurde dem Ansatz mit einer Konzentration von 100 μ M zugesetzt. Um den Verlauf der Doppelreaktion, katalysiert durch ManCB-His₆, beschreiben zu können, wurden dem Reaktionsansatz zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und wie unter Abschnitt 3.4.1 beschrieben abgestoppt und analysiert.

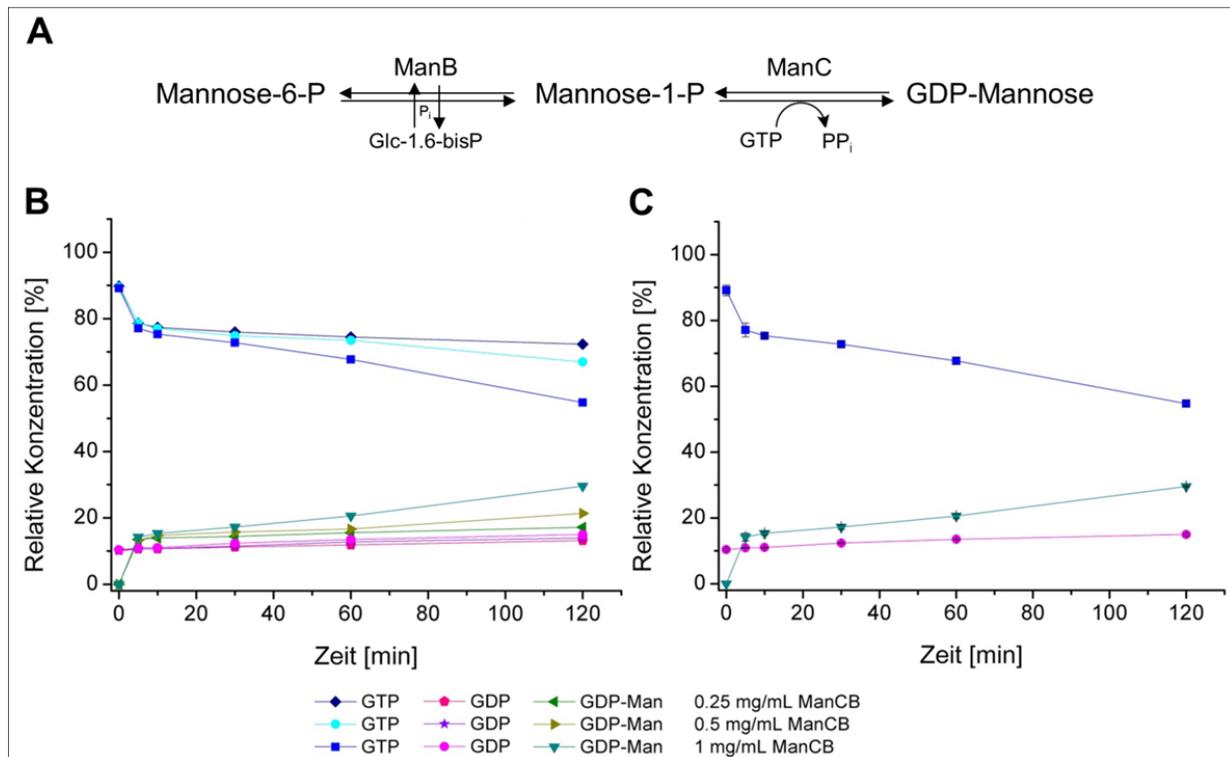


Abb. 4-5: Verlauf der durch ManCB-His₆ katalysierten Reaktion

(A) Schematische Darstellung der Reaktionen, (B) Zeitliche Abhängigkeit des Reaktionsverlaufes bei verschiedenen Proteinkonzentrationen an ManCB-His₆ (0.25, 0.5 und 1.0 mg/ mL), Einzelmessungen (n=1) (C) Zeitliche Abhängigkeit des Reaktionsverlaufes bei einer ManCB-Konzentration von 1.0 mg/ mL als technisches Triplikat (n=3), Fehler < 3 %. Reaktionsbedingungen: 500 μ M Mannose-6-P, 500 μ M GTP, 100 μ M Glc-1.6-bisP, 20 mM Tris/ HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.25 % Triton X-100, T=30°C. Analytik: IP-HPLC nach Abschnitt 3.4.1, Detektion bei 254 nm.

Ein vollständiger Umsatz der Substrate ist bei keiner der gewählten Proteinkonzentrationen gegeben. Der prozentual höchste Umsatz ist nach 120 min bei der höchsten Proteinkonzentration von 1 mg/ mL zu verzeichnen. Die Ergebnisse zum Reaktionsverlauf mit 1 mg/ mL wurden als technisches Dreifachreplikat bestätigt (Abb. 4-5 C). Neben der angestrebten Reaktion wird ersichtlich, dass GDP in geringen Konzentrationen gebildet wird. GDP ist zum einen zu 10 % als Verunreinigung in der verwendeten GTP-Produktionseinheit enthalten (vergleiche Abschnitt 3.3.6), wird aber auch im Laufe der Reaktion zu 4 % gebildet. Auf die Produktbildung hat die Verunreinigung keinen Einfluss, was durch Ansätze ohne Enzym anhand konstanter Peakflächen nachgewiesen werden konnte (Ergebnisse nicht gezeigt). Für das gebildete Nebenprodukt Pyrophosphat ist ein Entzug der Substanz nötig, um das Reaktionsgleichgewicht der reversiblen Reaktion auf Seiten von GDP-Mannose zu verschieben [202, 203]. Pyrophosphat sollte deshalb durch Einsatz einer Phosphatase gespalten werden. Zum Einsatz kam eine anorganische Pyrophosphatase (EC 3.6.1.1) PmPpA aus *Pasteurella multocida* (Abb. S-0-4), welche diese katalytischen Eigenschaften besitzt [204, 205].

Das Konstrukt im Vektor pET-28a (+) zur Expression der Pyrophosphatase kodiert für die PmPpA mit einer Hexahistidin-Fusion am C-Terminus. Die Expression unter Standardbedingungen (Abschnitt 3.3.1) erzielte 3.3 g/L BFM. Nach Reinigung über Nickel-Affinitätschromatografie unter Standardbedingungen (Abschnitt 3.3.3) wurde eine Enzymlösung mit einer Konzentration von 2 mg/mL erhalten. Die Reaktion mit konstant 1 mg/mL ManCB-His₆ wurde unter Zugabe verschiedener PmPpA-Konzentrationen durchgeführt. Im untersuchten Konzentrationsbereich von 0.025 bis 0.25 mg/mL PmPpA konnte für alle Reaktionsverläufe eine gleich starke Steigerung der Umsetzung der Substrate erreicht werden. In Abb. 4-6 ist der Reaktionsverlauf mit ManCB-His₆ und PmPpA-His₆ gezeigt.

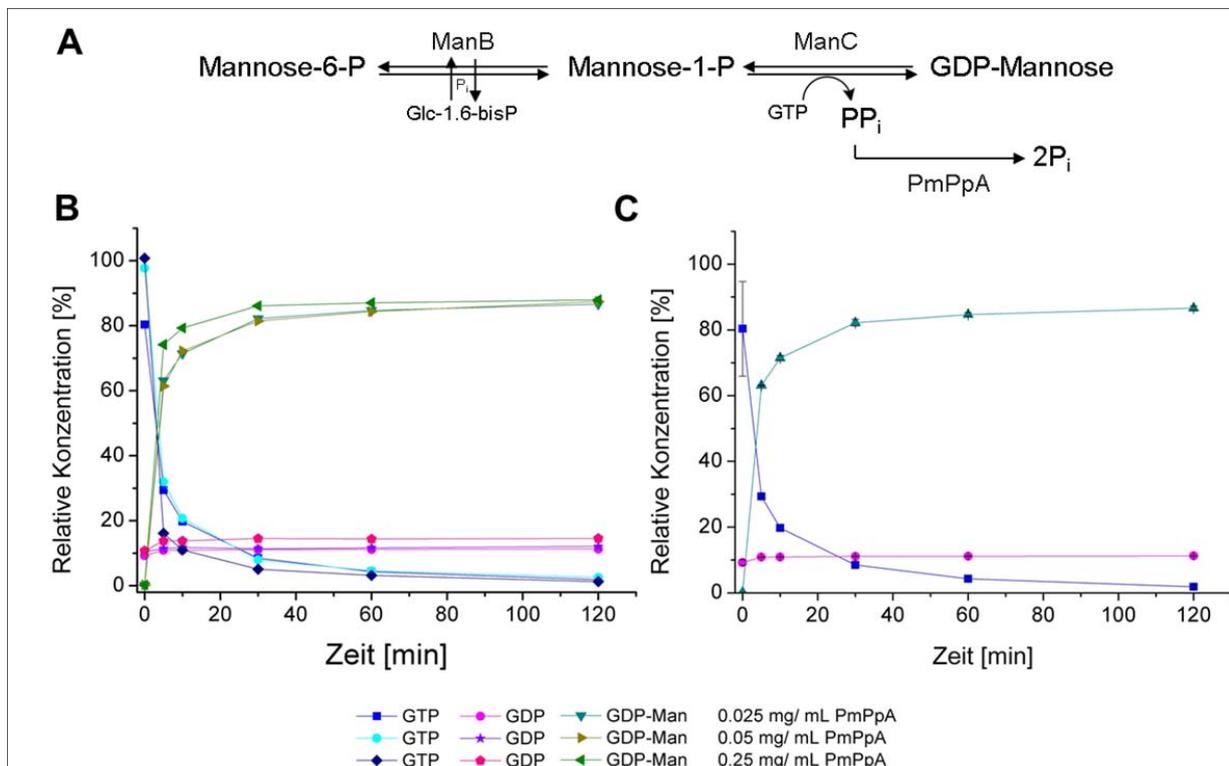


Abb. 4-6: Verlauf der durch ManCB-His₆ katalysierten Reaktion unter Zugabe der Pyrophosphatase PmPpA-His₆
(A) Schematische Darstellung der Reaktionen, **(B)** Zeitliche Abhängigkeit des Reaktionsverlaufes bei konstanter Proteinkonzentration von 1 mg/mL an ManCB-His₆ und verschiedenen Proteinkonzentrationen an PmPpA-His₆ (0.025, 0.05 und 0.25 mg/mL), Einfachmessungen (n=1) **(C)** Zeitliche Abhängigkeit des Reaktionsverlaufes bei einer ManCB-Konzentration von 1.0 mg/mL und 0.025 mg/mL PmPpA-His₆ als technisches Dreifachreplikate (n=3), Fehler < 5 %. Reaktionsbedingungen: 500 μM Mannose-6-P, 500 μM GTP, 100 μM Glc-1.6-bisP, 20 mM Tris/ HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.25 % Triton X-100, T=30°C. Analytik: IP-HPLC nach Abschnitt 3.4.1, Detektion bei 254 nm.

Durch Zugabe von PmPpA-His₆ und somit der Spaltung des inhibitorischen Pyrophosphates konnte die Umsetzung der Substrate komplettiert werden. Unabhängig von der eingesetzten Konzentration der Pyrophosphatase PmPpA-His₆ im untersuchten Konzentrationsbereich zeigten alle Reaktionen einen ähnlichen Verlauf. Die Bilanzierung der gemessenen Produkte ergab mit 2 % GTP, 11 % GDP und 87 % GDP-Man 100 %. Die in diesem Abschnitt eruierten

optimalen Bedingungen für die ManCB-His₆ und PmPpA-His₆ Reaktion zu Bildung von GDP-Mannose werden festgehalten mit 500 µM Man-6-Phosphat, 500 µM GTP, 100 µM Glukose-1,6-bis-Phosphat, 1 mg/ mL ManCB-His₆ und 0.025 mg/ mL PmPpA-His₆.

4.1.3 Untersuchungen zur Eintopf-Synthese von GDP-Mannose aus ATP, Mannose und GTP

Die in den Einzelreaktionen definierten Bedingungen für eine maximale Produktbildung wurden im folgenden Abschnitt zusammengeführt. Dabei wurden jeweils 500 µM der Substrate ATP und GTP, sowie 2 mM Mannose eingesetzt werden. Die Konzentrationen der einzusetzenden Enzyme betragen für His₆-Glk 2 mg/ mL, ManCB-His₆ 1 mg/ mL und PmPpA-His₆ 0.025 mg/ mL. Glukose-1,6-bisPhosphat wurde mit 100 µM eingesetzt. Das Ergebnis des multienzymatischen Ansatzes ist in Abb. 4-7 zu sehen.

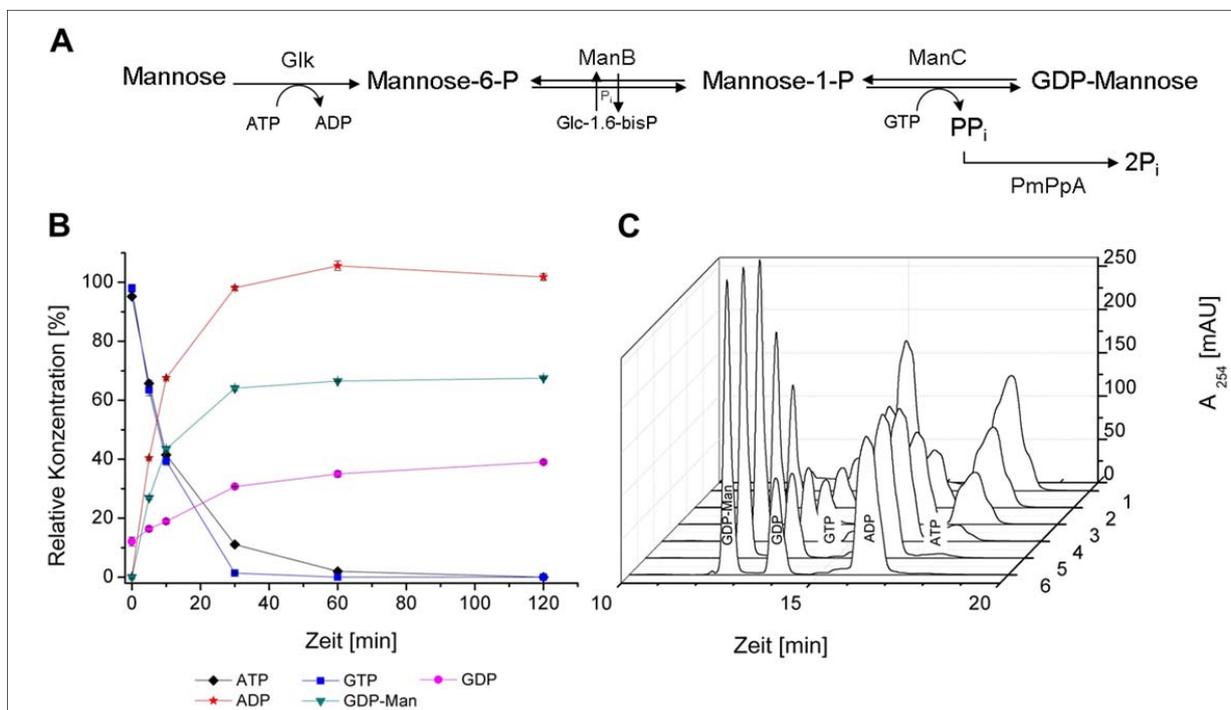


Abb. 4-7: Verlauf der Eintopf-Synthese zur Bildung von GDP-Mannose ausgehend von Mannose.

(A) Schematische Darstellung der gekoppelten Reaktionen, (B) Zeitliche Abhängigkeit des Reaktionsverlaufes bei konstanten Proteinkonzentrationen von His₆-Glk 2 mg/ mL, ManCB-His₆ 1 mg/ mL und PmPpA-His₆ 0.025 mg/mL, technisches Dreifachreplikate (n=3), Fehler < 3 %. Reaktionsbedingungen: 2 mM Mannose, 500 µM GTP, 500 µM ATP und 100 µM Glc-1,6-bisP, 20 mM Tris/ HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.25 % Triton X-100, T=30°C. Analytik: IP-HPLC nach Abschnitt 3.4.1, Detektion bei 254 nm. (C) Wasserfalldiagramm zur Verdeutlichung der Zu- und Abnahmen der Substrate und Produkte im Verlaufe der Eintopf-Synthese, Spur 1 – Reaktionszeit 0 min, Spur 2 – 5 min, Spur 3 – 10 min, Spur 4 – 30 min, Spur 5 – 60 min und Spur 6 – 120 min. Gezeigt ist nur der zeitliche Ausschnitt, in dem die Analyten eluieren.

Nach 60 min Reaktionszeit ist die Umsetzung der Substrate Mannose und GTP nahezu abgeschlossen. Der komplette Verbrauch von ATP führt simultan zur Bildung der gleichen Menge an ADP. Die Reaktion, katalysiert durch die His₆-Glk, kann als quantitativ bezeichnet werden. Auch der Verbrauch an GTP ist vollständig, führte jedoch nur zur Bildung von 68 % an

GDP-Mannose. Dies geht einher mit einer verstärkten Bildung von GDP, die in den Einzelreaktionen so nicht beobachtet werden konnte. Dies spricht eher für eine Akzeptanz von GTP als Substrat der His₆-Glk, als für eine dephosphorylierende Nebenreaktion der ManCB-His₆. In der Bilanzierung der Produkte werden mit GDP-Man (68 %) und GDP (39 %) 107 % erreicht, was auf analytische Ungenauigkeiten hinweist. Es ist denkbar, dass durch Entzug des Produktes GDP-Mannose durch Verwendung in einer Folgereaktion eine weitere Steigerung erreicht werden kann. Das gekoppelte System ist geeignet zur Herstellung von GDP-Mannose als Donorsubstrat der Alg1.

4.1.4 Produktion und Reinigung der Enzyme His₆-1D-Ppk2 und His₆-Ppk3

Die Ein-Domänen-Polyphosphatkinase (EC 2.7.4.1) 1D-Ppk2 aus *Pseudomonas aeruginosa* katalysiert die Umsetzung von ADP und Polyphosphat zu ATP und Polyphosphat_{n-1}. Alternativ kann das Enzym auch GDP als Substrat zur Generierung von GTP akzeptieren. Anorganisches Polyphosphat (PolyP) ist ein lineares Polymer aus 10 bis mehreren hundert Orthophosphat-Resten (P_i), welche durch energiereiche Phosphorsäureanhydrid-Bindungen miteinander verknüpft sind. PolyP wird in allen Prokaryoten und Eukaryoten gefunden und besitzt vielfältige biologische Funktionen. Die wohl wichtigste Funktion wird in der Reservierung von Energie, in Form von Speicherung von Orthophosphat (P_i), gesehen. Polyphosphat kann dann für Substitutionen zu ATP in Kinasereaktionen als Phosphatdonor dienen. Der zelluläre Gehalt an PolyP wird durch zwei Polyphosphat-Kinase-Familien reguliert. Ppk1-Enzyme sind dabei am Aufbau der PolyP-Polymere beteiligt, während Ppk2-Enzyme PolyP als Substrat abbauen. Mitglieder der Ppk2-Familie werden weiter in zwei Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe besitzt nur eine Ppk2-Domäne und katalysiert die Polyphosphat-abhängige Phosphorylierung von Nucleosiddiphosphaten (ADP, GDP) zu Nucleosidtriphosphaten (ATP, GTP). Die zweite Gruppe besitzt zwei Domänen der Ppk2 und katalysiert die Phosphorylierung von Nucleosidmonophosphaten (AMP, GMP) zu Nucleosiddiphosphaten [190, 206].

Die Gensequenz *ppk2* (Abb. S-0-7) wurde der Datenbank KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) unter dem Eintrag PA2428 entnommen. Die Expression des resultierenden Proteins, der 1D-Ppk2_{opt} (Sequenz siehe Abb. S-0-6), beinhaltete eine N-terminale Hexahistidin-Fusion. Die Anzucht der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen nach Abschnitt 3.3.1. Die Kultivierungstemperatur nach Induktion wurde nach ersten Vorversuchen von 37°C auf 24°C herabgesenkt. Unter diesen Bedingungen konnte der Anteil der löslich produzierten His₆-1D-Ppk2 deutlich erhöht werden. Die erhaltene Biofeuchtmasse (3.3 g/L) wurde bis zur Nutzung bei -20°C gelagert.

In *Ruegeria* (ehemals *Silicibacter*) *pomeroyi* wurde eine weitere Polyphosphat-abhängige Kinase, die Ppk3 entdeckt. Sie gehört ebenfalls zu den Enzymen, welche Polyphosphat als Phosphatdonor nutzen, unterscheidet sich aber durch ihre Substratspezifität. Während Ppk2-Enzyme vornehmlich Purin-Nucleosiddiphosphate (GDP, ADP) als Substrat verwenden, bevorzugen Ppk3-Enzyme Pyrimidin-Nucleosiddiphosphate (CDP, UDP). Da die Ppk3 prinzipiell

alle Nukleosiddiphosphate phosphorylieren kann (CDP > UDP > GDP > ADP) und die Aktivität gegenüber GDP verglichen mit CDP immer noch 50 % beträgt, könnte die Ppk3 ein alternatives Enzym zur Ppk2 darstellen [207, 208]. Die Gensequenz *ppk3* wurde der Datenbank KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) unter dem Eintrag SPO1727 entnommen. Auch die DNA-Sequenz der *ppk3* (Abb. S-0-8) wurde aus den oben genannten Gründen der Codon-usage von *E. coli* angepasst (Software GeneDesigner 2.0, Menlo Park, Kalifornien). Die Ppk3_{opt} (Sequenz siehe Abb. S-0-9) wurde mit einer N-terminalen Hexahistidin-Fusion produziert. Dass N-terminale Affinitäts-Fusionen bei der Ppk3 zur Isolierung aktiver Enzymspezies führen können, wurde bereits gezeigt [207]. Die Anzucht der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen nach Abschnitt 3.3.1. Die erhaltene Biofeuchtmasse (4.5 g/ L) wurde bis zur Nutzung bei -20°C gelagert.

Für die Reinigung wurden 2.7 g gefrorene Biomasse der His₆-1D-Ppk2 und 4 g His₆-Ppk3 in 30 mL bzw. 40 mL Äquilibrierpuffer unter Rühren bei 4°C gelöst. Nach Zellaufschluss und Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile durch Zentrifugation wurden die Enzyme unter Standardbedingungen gereinigt (Abschnitt 3.3.3). Für die Reinigung der His₆-1D-Ppk2 enthielten die Puffer in Anlehnung an die Literatur zur Stabilisierung des Enzyms 0.5 % Glycerin [209], HEPES wurde durch Tris ersetzt. Durch die Zugabe von 10 mM Imidazol für His₆-1D-Ppk2 und 5 mM Imidazol bei der His₆-Ppk3 im Äquilibrierpuffer konnte eine höhere Reinheit erzielt werden. Die gereinigten Enzyme wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abschnitt 3.3.5). Das theoretisch erwartete Molekulargewicht der His₆-1D-Ppk2 lag bei 38 kDa, das der His₆-Ppk3 bei 36.9 kDa (Abb. 4-2). Nach der Reinigung mittels Affinitäts-Chromatographie folgte eine Dialyse, um enthaltenes Imidazol zu entfernen. Beide Enzyme präzipitierten während dieses Schrittes. Daher wurden die Enzyme nicht-dialysiert in die enzymatischen Assays eingesetzt. His₆-Ppk3 konnte nach der Reinigung in einer Konzentration von 7.4 mg/ mL erhalten werden. Dies entspricht 100 mg His₆-Ppk3 pro 1 L Zellkultur. Bei der His₆-1D-Ppk2 wurde eine maximale Konzentration von 1.2 mg/ mL erreicht. Dies entspricht 15 mg His₆-1D-Ppk2 pro 1 L Zellkultur. Eine Erhöhung der Konzentration des Enzyms His₆-1D-Ppk2 durch Konzentrieren mittels Amicon-Konzentratoren war, wegen der auftretenden Präzipitation nicht erfolgreich. Die Enzyme wurden bis zur weiteren Verwendung in 50 % (w/v) Glycerin bei -20°C gelagert.

4.1.5 Nachweis der Einzelreaktionen der Enzyme 1D-Ppk2 und Ppk3

Zunächst sollte auch für die Enzyme His₆-1D-Ppk2 und His₆-Ppk3 festgestellt werden, bei welcher Proteinkonzentration die Substrate ADP bzw. GDP und PolyP (jeweils 500 µM) weitestgehend umgesetzt werden. Eine schematische Darstellung der Reaktion findet sich in Abb. 4-8 A. Um den Reaktionsverlauf beschreiben zu können, wurden dem Reaktionsansatz zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 5, 10, 30, 60 und 120 Minuten) Proben entnommen und wie unter Abschnitt 3.4.1 beschrieben abgestoppt und analysiert. Zunächst wurden verschiedene Konzentrationen an His₆-1D-Ppk2 (0.01, 0.05 und 0.1 mg/ mL) gewählt. Da die Konzentration der His₆-1D-Ppk2 in 50 % Glycerin zur Lagerung nur 0.67 mg/ mL betrug und das Konzentrieren nicht

erfolgreich war, konnten den Reaktionsansätzen nur vergleichsweise geringe Proteinmengen zugegeben werden. Die His₆-Ppk3 hatte in Glycerin-haltigem Puffer eine Proteinkonzentration von 3.7 mg/ mL und könnte somit in höherer Molarität im Reaktionsansatz eingesetzt werden. Zum besseren Vergleich beider Enzyme wurden aber gleiche Konzentrationen verwendet.

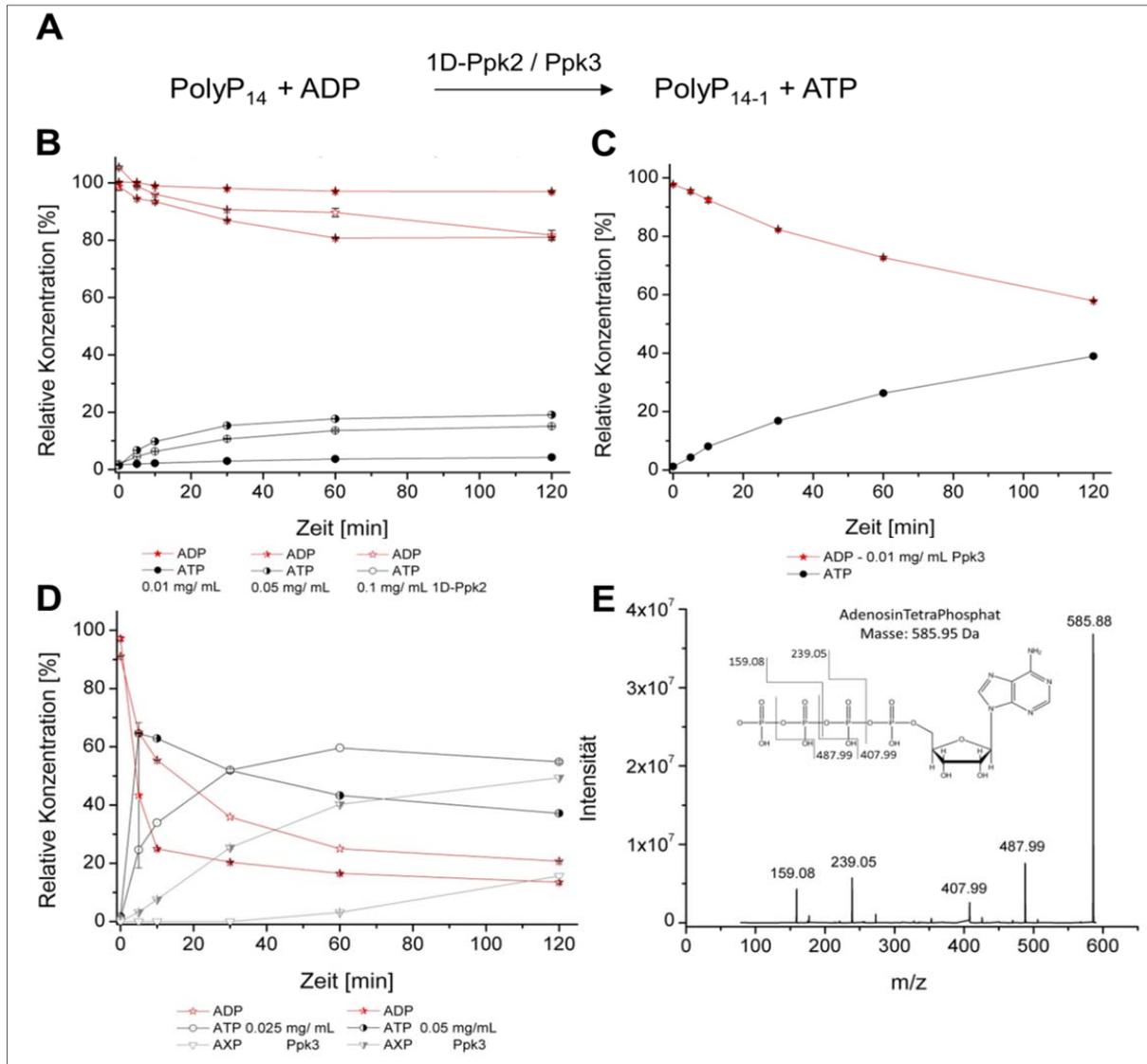


Abb. 4-8: Verlauf der Polyphosphat-Kinase vermittelten Reaktion zur Bildung von ATP ausgehend von ADP und Polyphosphat. (A) Schematische Darstellung der Ppk-Reaktionen. **(B)** Zeitliche Abhängigkeit des Reaktionsverlaufes bei verschiedenen Proteinkonzentrationen von His₆-1D-Ppk und **(C+D)** His₆-Ppk3. Reaktionsbedingungen: 500 μ M PolyP₁₄, 500 μ M ADP, Reaktionspuffer: 20 mM Tris/ HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.25 % Triton X-100, T=30°C. Analytik: IP-HPLC nach Abschnitt 3.4.1, Detektion bei 254 nm, technisches Dreifachreplikat (n=3), Fehler > 5 % **(E)** ESI-MS/MS-Spektrum (EPI, Negativ-Modus) von AXP nach Abschnitt 3.4.3, m/z theoretisch = 585.95, gefunden 585.88 m/z, das Fragmentierungsmuster identifiziert die Substanz AXP als Adenosintetraphosphat aus.

In dem Konzentrationsbereich 0.01 mg/ mL (261 nM) bis 0.1 mg/ mL (2.6 μ M) an His₆-1D-Ppk2 und Substratkonzentrationen von 500 μ M unter Standardbedingungen konnten nach erfolgter Analytik mittels IP-HPLC maximal 20 % Umsatz detektiert werden (Abb. 4-8 B). Im Vergleich konnten bei 0.01 mg/ mL (271 nM) an His₆-Ppk3 bei gleichen Reaktionsbedingungen 40 % Umsatz erreicht werden (Abb. 4-8 C). Wird die Proteinkonzentration von His₆-Ppk3 weiter erhöht, können sogar 80 % ADP umgesetzt werden (Abb. 4-8 D). Es zeigte sich allerdings ab einer Proteinkonzentration von 0.025 mg/ mL (677 nM), dass, in der Reaktion gebildetes, ATP weiter prozessiert wird. Es bildet sich eine neue Substanz, die hier mit AXP bezeichnet wurde. Je weiter die Proteinkonzentration angehoben wurde, desto mehr AXP wurde gebildet. Bei 0.1 mg/ mL an His₆-Ppk3 konnten 90 % ADP umgesetzt werden, allerdings entstanden 55 % AXP neben 33 % ATP (Ergebnisse nicht gezeigt). AXP eluierte während der HPLC-Analytik kurz nach ATP, während ADP vor ATP eluierte. Aufgrund des Elutionsverhaltens von AXP und der Verknüpfungsmöglichkeiten, gegeben durch die Substrate und die Enzymspezifität, wurde vermutet, dass hier ein Nukleosidtetraphosphat gebildet wurde. Daher wurde die Probe anschließend mittels ESI-MS/MS untersucht (Abb. 4-8 E). Aufgrund des gefundenen Masse-Ladungs-Verhältnisses von 585.88 m/z (m/z theoretisch = 585.95) und des Fraktionierungsmusters konnte die neu gebildete Substanz AXP tatsächlich dem Nukleosidtetraphosphat zugeordnet werden. Nukleosidtetraphosphat wird im Folgenden weiter mit AXP bezeichnet. Durch das Auftreten von AXP ergab sich die Fragestellung, ob das Enzym His₆-Glk in einer Eintopf-Reaktion das gebildete AXP als Substrat akzeptiert. Dazu wurde eine bei -20°C gelagerte Probe aus der His₆-Ppk3 Reaktion nach 120 min mit His₆-Glk versetzt und bei Standardreaktionsbedingungen inkubiert. Entgegen den Erwartungen konnte in keiner dieser Proben AXP detektiert werden, auch nicht in der Probe ohne His₆-Glk. Dies deutet darauf hin, dass AXP bei Gefrier-Tau-Zyklen nicht stabil ist. Da aus diesem Grund nicht abschließend geklärt wurde, ob AXP als Substrat der His₆-Glk anerkannt wird, sollte neben dem Einsatz der His₆-Ppk3 auch die Optimierung der His₆-1D-Ppk2 untersucht werden. Für die 1D-Ppk2 aus *P. aeruginosa* wurde eine Aktivierung bei steigenden Polyphosphat-Konzentrationen beschrieben. Allerdings konnte auch eine Inhibierung bei zu hohen PolyP-Konzentrationen gezeigt werden [194]. Daher wurde nachfolgend, sowohl für die His₆-1D-Ppk2 als auch für die His₆-Ppk3, der Reaktionsverlauf bei verschiedenen PolyP-Konzentrationen in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen an MgCl₂ untersucht. Um die Auswirkungen des Einflusses durch verschiedene PolyP-Konzentrationen gut nachverfolgen zu können, wurde mit der geringsten der bisher untersuchten Konzentrationen, mit 0.01 mg/ mL, gearbeitet. Die Ergebnisse sind in Abb. 4-9 dargestellt.

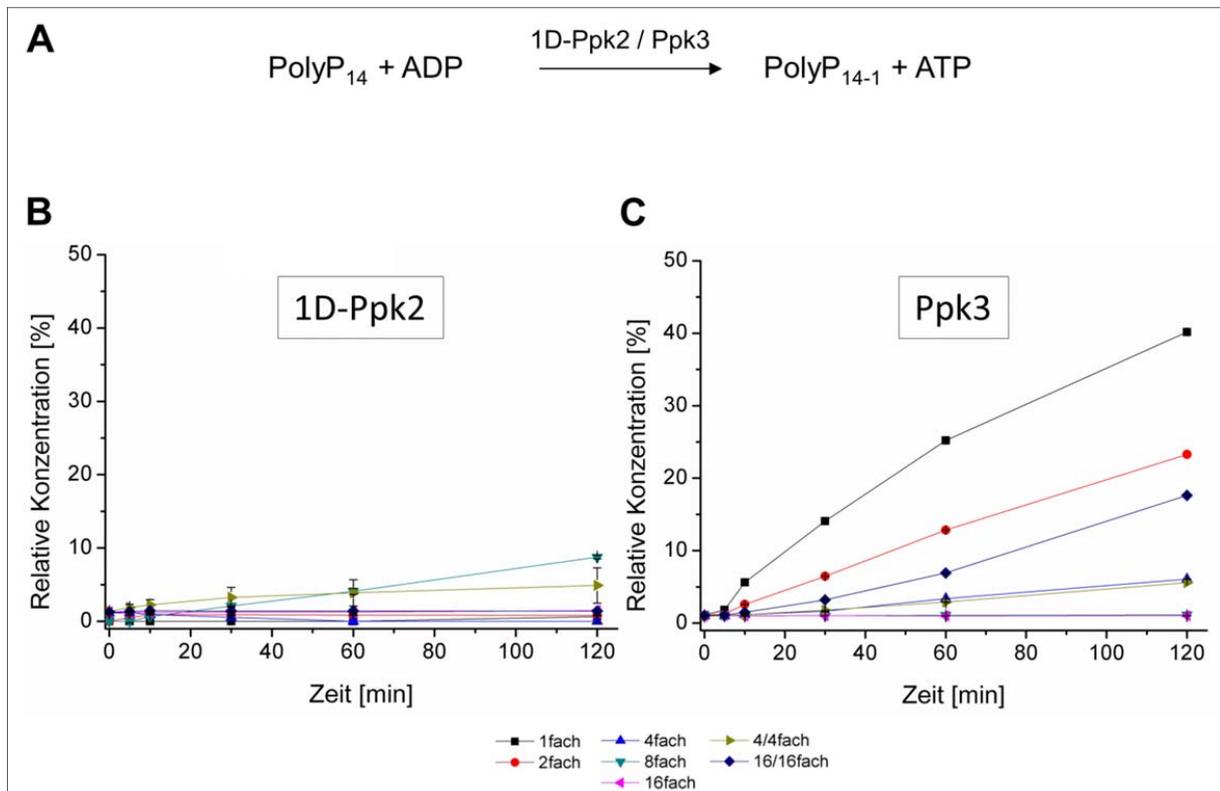


Abb. 4-9: Verlauf der His₆-1D-Ppk2 und His₆-Ppk3 katalysierten Reaktion unter Variation der PolyP-Konzentration. PolyP-Konzentrationen in Bezug auf das zweite Substrat ein-, zwei-, vier-, 8- und 16-fach, die vier- und 16-fach, Reaktionen wurden ebenfalls mit äquimolar-erhöhtem MgCl₂-Gehalt untersucht. Reaktionsbedingungen: 500 μM ADP, Puffer: 20 mM Tris/ HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.25 % Triton X-100, T=30°C. Analytik: IP-HPLC nach Abschnitt 3.4.1, Detektion von ATP bei 254 nm. **(A)** Schematische Darstellung der Reaktionen, **(B)** Zeitliche Abhängigkeit des Reaktionsverlaufes bei 0.01 mg/ mL (261 nM) His₆-1D-Ppk2, **(C)** Reaktionsverlauf bei 0.01 mg/ mL (271 nM) His₆-Ppk3. Technische Dreifachreplikate (n=3), Fehler < 5 %

Abb. 4-9 B zeigt den Einfluss der Erhöhung der PolyP-Konzentration bis zum 16-fachen (bezogen auf die ADP-Konzentration) auf die His₆-1D-Ppk2. Die einfache Konzentration an PolyP entspricht der aus Abb. 4-8 A und B. Unter den gewählten Bedingungen konnte keine signifikante Erhöhung der Aktivität der His₆-1D-Ppk2 durch Erhöhung der PolyP-Konzentration beobachtet werden. Die variierenden Konzentrationen an PolyP entsprachen: einfach (0,5 mM), zweifach (1 mM), vierfach (2 mM), 8-fach (4 mM) und 16-fach (8 mM). Auch eine gleichzeitige, äquimolare Erhöhung der Magnesiumchlorid-Konzentration (vierfach bzw. 16-fach Polyphosphat und Magnesiumchlorid) hatte nur geringe Effekt. Um die minimalen Effekte sichtbar zu machen, wurde für die Y-Achse eine Skalierung von 50 % relativer Aktivität gewählt. Für die His₆-Ppk3 (Abb. 4-9 C) wurde eine gegenteilige Auswirkung beobachtet. Zunehmende PolyP-Konzentrationen hatten einen hemmenden Einfluss auf die Aktivität des Enzyms. Schon die doppelte Menge an PolyP (1 mM) reduzierte die Aktivität nach 120 min auf 58 %, bezogen auf die Produktzunahme unter Standardbedingungen bei gleicher Enzymkonzentration, wie in Abb. 4-8. Vierfache Mengen führten zu einer Restausbeute von 15 %, bei 8- und 16-fachem Überschuss an PolyP war die His₆-Ppk3 komplett inaktiv. Bei höheren PolyP-Konzentrationen

hatte hier allerdings, im Gegensatz zur His₆-1D-Ppk2, eine äquimolare Erhöhung der MgCl₂-Konzentration einen Einfluss auf die Aktivität.

Das Ziel dieser Arbeit lag in der Entwicklung der Multi-Enzym-Kaskade zur Synthese von Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂-Man₁. Bei der Regeneration des Substrates GDP-Mannose fallen sowohl GDP als auch ADP an, welche anschließend wieder zu Nucleosidtriphosphaten aufgebaut werden müssen. Da sowohl für die 1D-Ppk2 als auch für die Ppk3 beschrieben ist, dass sie neben ADP auch GDP als Substrat akzeptieren [190, 207], wurden Experimente zur Substratspezifität der Enzyme hinsichtlich der Präferenz der Substrate durchgeführt (Abschnitt 3.3.6). Die Ergebnisse sind in Abb. 4-10 dargestellt.

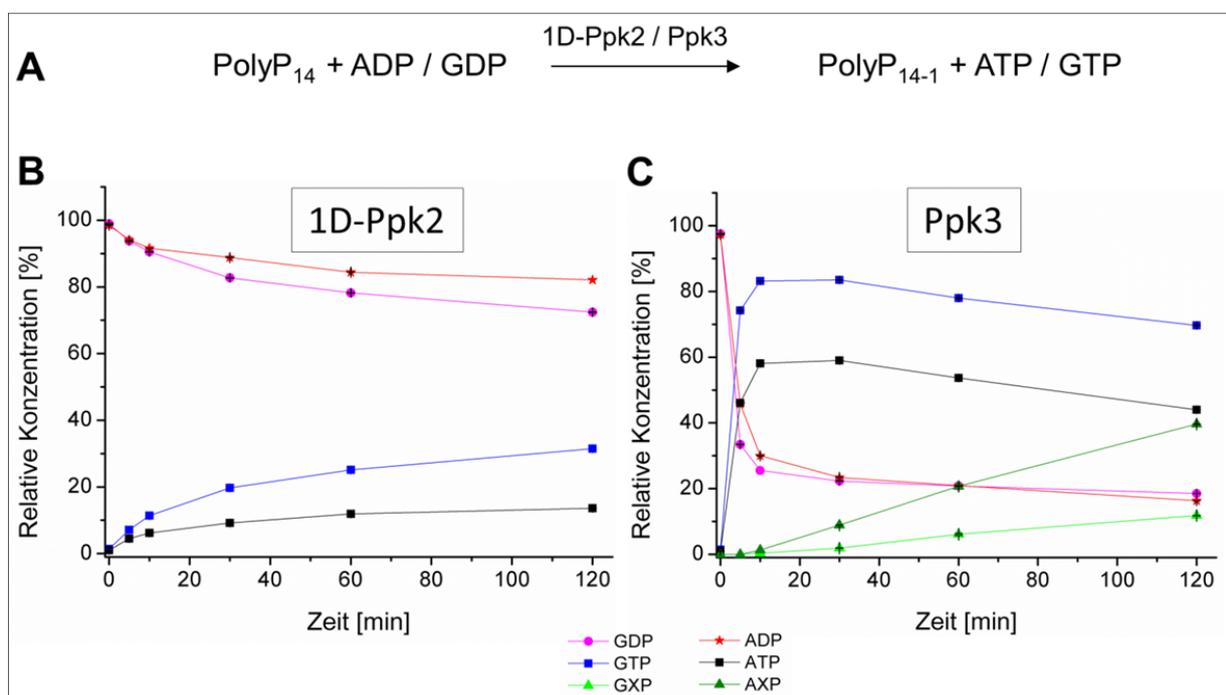


Abb. 4-10: Substratspezifität der His₆-1D-Ppk2 und His₆-Ppk3 gegenüber ADP und GDP. Reaktionsbedingungen: 500 µM ADP bzw. GDP, 500 µM PolyP, Puffer: 20 mM Tris/ HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.25 % Triton X-100, T= 30°C. Analytik: IP-HPLC nach Abschnitt 3.4.1, Detektion bei 254 nm. **(A)** Schematische Darstellung der Reaktionen, **(B)** Zeitliche Abhängigkeit des Reaktionsverlaufes bei 0.05 mg/mL (1,3 µM) His₆-1D-Ppk2, **(C)** Reaktionsverlauf bei 0.05 mg/mL (1,4 µM) His₆-Ppk3. Alle Meßpunkte entsprechen technischen Dreifachreplikaten (n=3), Fehler < 1 %

Die Meßergebnisse in Abb. 4-10 B verdeutlichen, dass die His₆-1D-Ppk2 bei den betrachteten Bedingungen GDP als Substrat leicht vor ADP bevorzugt. Eine Umsetzung der Substrate ADP und GDP mit 18 bzw. 28 % nach 120 min ist allerdings für einen Einsatz in Multi-Enzym-Reaktionen unzureichend. Für die His₆-Ppk3 zeigte sich, dass das Enzym GDP und ADP gleich gut umsetzt (Abb. 4-10 C). Dies wird an den nahezu übereinander liegenden Kurven der Substratabnahme über die Zeit deutlich. Hinsichtlich der Produktzunahme an GTP und ATP traten jedoch deutliche Unterschiede hervor. Im Laufe der enzymatischen Reaktion wird wesentlich mehr GTP als ATP gebildet. Eine Ursache liegt sicher in der schon für das Substrat ADP beobachteten

Zweitreaktion der His₆-Ppk3, bei der das Produkt ATP weiter zu Adenosintetraphosphat phosphoryliert wird. Auch für GTP findet eine Folgereaktion, vermutlich zu Guanosintetraphosphat statt, jedoch in geringerem Maße. Für das Guanosin-Substrat wurden 70 % GTP mit einem unerwünschten Anteil von 12 % GXP gebildet. Bei dem Adenosin-Substrat konnten 44 % ATP gebildet werden, der Anteil an AXP betrug 40 %.

4.1.6 Eintopf-Synthese von GDP-Mannose aus ADP, Mannose, PolyP und GTP

Die His₆-Ppk3 ist wegen höheren Enzymkonzentrationen nach Reinigung und größeren Umsatzraten, verglichen mit der His₆-1D-Ppk2, die geeignetere Kinase für den Einsatz in Multi-Enzym-Reaktion. Da jedoch nicht abschließend geklärt werden konnte, ob AXP bzw. GXP als Substrat in der GDP-Mannose Regenerations-Reaktion akzeptiert wird, sollte die Proteinkonzentration der His₆-Ppk3 so gewählt werden, dass möglichst kein Tetraphosphat gebildet wird. Bei einer Konzentration von 0.01 mg/ mL wurde kein AXP im Reaktionsverlauf detektiert, bei 0.025 mg/ mL 16 % AXP neben 55 % ATP gebildet (Abb. 4-8). Für die Mehrfach-Reaktion wurden daher 0.02 mg/ mL His₆-Ppk3 eingesetzt. Da das Enzym in der Mehrfach-Reaktion mit Alg1 später sowohl für die Phosphorylierung von ADP (aus Glk-Reaktion) als auch von GDP (aus Alg1-Reaktion) eingesetzt wurde (Abb. 4-21 A), betrug die Konzentration des Polyphosphates 2x 500 µM. Eine Verzögerung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Inhibierung des Enzyms durch erhöhte PolyP-Konzentration wurde in Kauf genommen (Abb. 4-9). Die folgende Abbildung zeigt die Eintopf-Synthese zur Bildung von GDP-Mannose mit His₆-Ppk3. Abb. 4-11 C zeigt die Synthese noch einmal vergleichend ohne His₆-Ppk₃, sie entspricht Abb. 4-7 B.

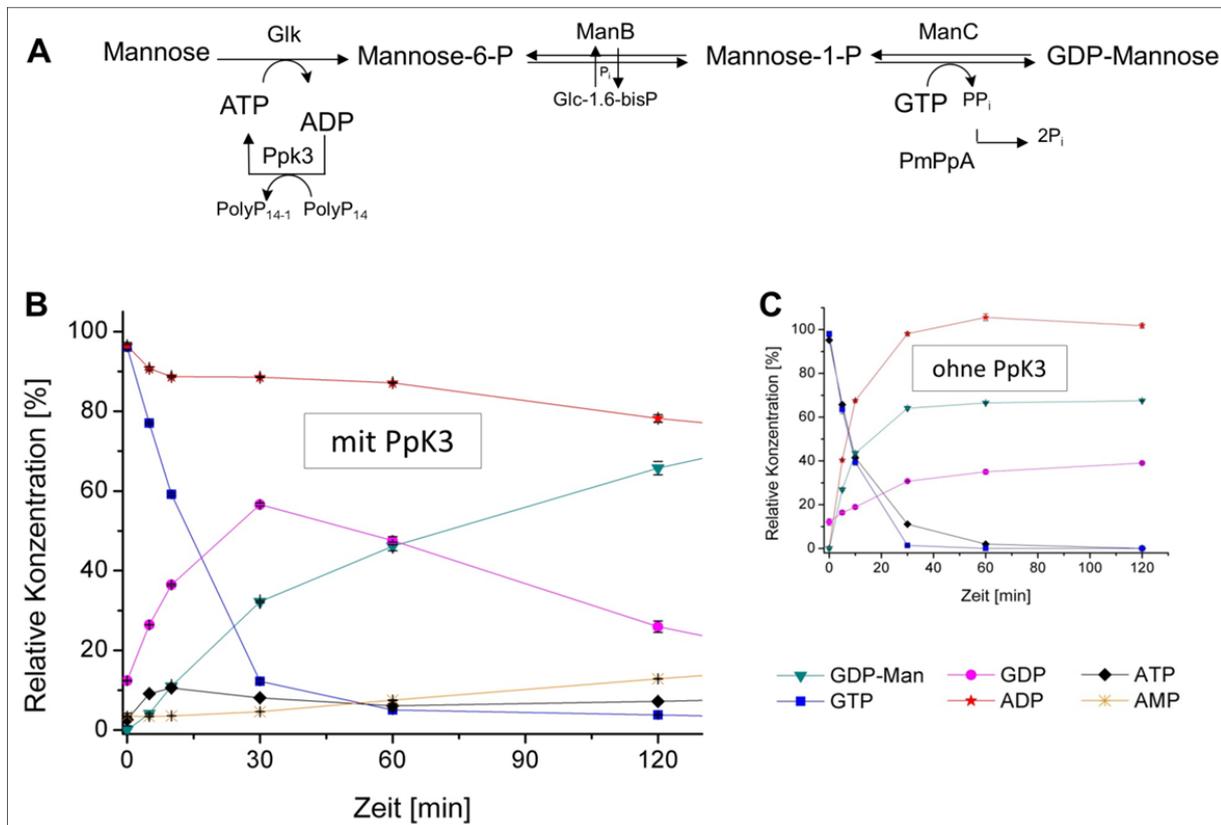


Abb. 4-11: Verlauf der Eintopf-Synthese zur Bildung von GDP-Mannose ausgehend von Mannose, ADP, PolyP und GTP. Reaktionsbedingungen: 2 mM Mannose, 500 μ M GTP, 500 μ M ADP, 1 mM PolyP und 100 μ M Glc-1,6-bisP, Reaktionspuffer: 20 mM Tris/ HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0,25 % Triton X-100, T=30°C. **(A)** Schematische Darstellung der gekoppelten Reaktionen **(B)** Zeitliche Abhängigkeit des Reaktionsverlaufes bei konstanten Proteinkonzentrationen von His₆-Glk 2 mg/ mL (51 μ M), ManCB-His₆ 1 mg/ mL, PmPpA-His₆ 0,025 mg/ mL und His₆-Ppk3 0,02 mg/mL, biologisches Dreifachreplikat (n=3), Fehler < 3 %. Analytik: IP-HPLC nach Abschnitt 3.4.1, Detektion bei 254 nm. **(C)** zum Vergleich – Eintopf-Synthese ohne His₆-Ppk3 aus Abb. 4-7 B

Die Multi-Enzym-Reaktion zur Bildung von GDP-Mannose ausgehend von ADP, Polyphosphat, Mannose und GTP wurde nach Abschnitt 3.3.6 durchgeführt. Die Bedingungen der Reaktion aus Abschnitt 4.1.3 wurden mit denen der His₆-Ppk3 aus Abschnitt 4.1.5 kombiniert. Daher wurden jeweils 500 μ M der Substrate ADP und GTP, 2 mM Mannose sowie 1 mM PolyP eingesetzt. Der Co-Faktor Glukose-1,6-bisPhosphat wurde mit einer Konzentration von 100 μ M eingesetzt. Die Konzentrationen der einzusetzenden Enzyme betragen: His₆-Glk 2 mg/ mL, ManCB-His₆ 1 mg/ mL, PmPpA-His₆ 0,025 mg/ mL und 0,02 mg/ mL His₆-Ppk3. Vergleicht man die Ergebnisse zur Eintopf-Synthese von GDP-Mannose mit His₆-Ppk3 (Abb. 4-11 B) und ohne His₆-Ppk3 (Abb. 4-11 C), ist die Bildung von GDP-Mannose in der Reaktion ohne His₆-Ppk3 nach 30 min Reaktionszeit abgeschlossen und die Konzentration bleibt anschließend konstant. Der Grund dafür liegt vermutlich in der Zugabe der His₆-Ppk3 bzw. der erhöhten Konzentration an PolyP. In der Eintopf-Synthese ohne His₆-Ppk3 wurde ATP zu 100 % verbraucht. Somit läuft die His₆-Glk-Reaktion vollständig ab. Da auch der Verbrauch an GTP vollständig ist, aber nur 68 % an GDP-Mannose gebildet werden, muss GTP noch in einer anderen Reaktion verbraucht werden. Dies

wird sichtbar durch die verstärkte Bildung von GDP, welches in dieser Reaktion nicht gebildet werden sollte. Es wird vermutet, dass auch GTP als Substrat der His₆-Glc akzeptiert wird. Untersuchungen hierzu waren im Rahmen der Arbeit leider nicht mehr möglich. In der Eintopf-Reaktion mit His₆-Ppk3 sind der Verbrauch von ATP durch die His₆-Glc unter Bildung von ADP und die Regeneration von ADP zu ATP durch die enzymatische Aktivität der His₆-Ppk3 vergleichbar schnelle Reaktionen. Dies wird in der sich ergebenden Konstanz der Signale für ADP und ATP sichtbar. Die Regeneration des ADP ist dabei abhängig von der Menge des vorhandenen PolyP (Inhibierung der His₆-Ppk3 bei steigenden Konzentrationen, Abb. 4-9) und des GDP, welches als Substrat gegenüber dem ADP leicht bevorzugt wird (Abb. 4-10). Im Zeitraum ab 30 min ist der Verbrauch des GDP schneller als dessen Regeneration, welches durch den zusätzlichen Verbrauch des GTP durch die ManC erklärt werden kann. Die Menge und Geschwindigkeit der gebildeten GDP-Mannose ist somit direkt abhängig vom Reaktionsverhalten der His₆-Ppk3. In dieser Multi-Enzym-Reaktion wurden nach 120 min Reaktionszeit ebenfalls 66 % GDP-Mannose gebildet, der Anteil an GDP ist mit 25 % geringer als in der Reaktion ohne His₆-Ppk3. Zusätzlich wurde hier die Bildung eines kleinen Anteils an AMP, nicht aber an GMP beobachtet. Diese Nebentätigkeit konnte bereits der His₆-Glc zugeordnet werden. Die stetige Zunahme an AMP bei einer kontinuierlichen Regenerationsreaktion könnte ein limitierender Faktor sein. Unter den verwendeten Reaktionsbedingungen und Proteinkonzentrationen, besonders mit den 0.02 mg/ mL für die His₆-Ppk3, konnten allerdings keine Nucleosidtetraphosphate (AXP, GXP) wie unter Abschnitt 4.1.5 detektiert werden. Dies bedeutet, dass bei der gewählten His₆-Ppk3-Konzentration entweder keine Nucleosidtetraphosphate gebildet werden oder diese von dem Enzym His₆-Glc als Substrat akzeptiert werden. Da die hier gezeigte 5-Enzym-Reaktion noch keinen Abschluss in Bezug auf die Bildung der GDP-Mannose aufweist, wurden weitere 60 Minuten Reaktionszeit analysiert. Nach 180 min Reaktionszeit können 80 % GDP-Mannose, 12 % GDP und 17 % AMP detektiert werden (Abb. 4-21 C). Die Konzentrationen an ADP und GDP sinken weiter, was darauf hindeutet, dass PolyP noch nicht in limitierenden Konzentrationen vorhanden ist. Dieses Multi-Enzym-Regenerationsystem sollte anschließend zusammen mit der GDP-Mannose-verbrauchenden Glykosyltransferase Alg1 getestet werden.

4.2 Enzymatische Synthese von Phytanyl-PP-Mannosylchitobiose

Phytanyl-Pyrophosphoryl-Mannosylchitobiose (Phyt-PP-G₂M₁) kann enzymatisch durch die katalytische Wirkung der Alg1 (EC 2.4.1.142) durch Übertragung der Mannose von GDP-Mannose (GDP-Man) auf Phytanyl-Pyrophosphoryl-Chitobiose (Phyt-PP-G₂) gebildet werden. Flitsch und Kollegen [153] zeigten, dass eine Transmembrananker-deletierte Variante der Mannosyltransferase Alg1 (Alg1ΔTM) neben dem natürlichen C₉₅-Lipid Dolichol auch das C₂₀-Lipid Phytanol als Akzeptorsubstrat zulässt. Die Strukturen der beiden Lipidanker sind zum Vergleich in Abb. 4-12 dargestellt.

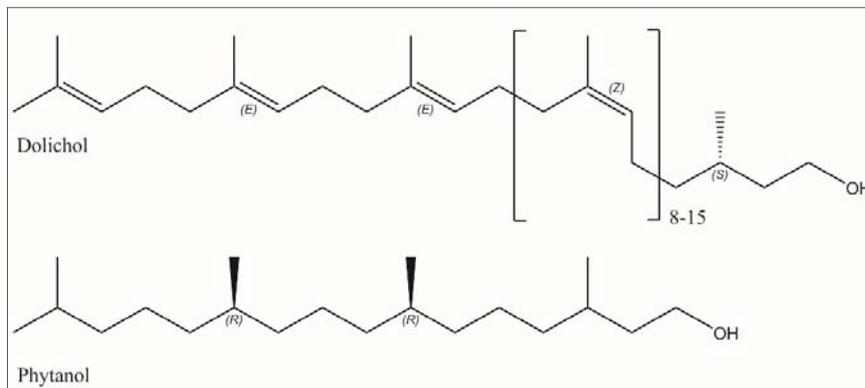


Abb. 4-12: Strukturen der Lipidanker Dolichol (C₉₅) und Phytanol (C₂₀)

Phytanol besitzt 20 C-Atome und ist α -gesättigt mit zwei Stereozentren. Trotz der Akzeptanz des Phytanyl-Akzeptorsubstrates zeigt die Mannosyltransferase Alg1 bei hoher Stereo- und Regioselektivität eine strikte Substratspezifität für das Donorsubstrat GDP-Mannose [192]. Dies gilt auch für die Transmembran-Anker-deletierte Variante Alg1 Δ TM. Da Vollängen-Alg1 nicht stabil exprimiert werden kann [169] und es keine bekannten exprimierbaren Homologe gibt, wurde für diese Arbeit die Alg1 Δ TM aus *Saccharomyces cerevisiae* verwendet. Das Enzym wurde zunächst in *E. coli* löslich produziert und anschließend chromatografisch aufgereinigt.

4.2.1 Produktion und Reinigung des Enzyms Alg1 Δ TM

Die Gensequenz *ALG1* wurde der Datenbank KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) unter dem Eintrag YBR110W entnommen. Da die Sequenz aus *S. cerevisiae* stammt, konnten erwartungsgemäß Codons identifiziert werden, die bei einer Expression in *E. coli* zu Limitierungen während der Translation führen könnten. Aus diesem Grund wurde die DNA-Sequenz der Codon-usage von *E. coli* angepasst (Software GeneDesigner 2.0, Menlo Park, Kalifornien). Die optimierte DNA-Sequenz (Abb. S-0-11) war Grundlage für die *de novo* Gensynthese und anschließenden Subklonierung der Alg1 Δ TM_{opt} in den Vektor pET-28a (+) durch die Firma GeneArt (Thermo Fisher Scientific, Regensburg, Deutschland). Dabei wurde das Konstrukt so geplant, dass die Basen 5-104 der *ALG1* Gensequenz (Bereich des Transmembran-Ankers) ausgelassen wurden [166]. Die His₆-Alg1 Δ TM_{opt} wurde mit einer N-terminalen Hexahistidin-Fusion produziert. Die erhaltene Biofeuchtmasse (2.7 g/ L) wurde bis zur Nutzung bei -20°C gelagert. Wegen erhöhten Biomassebedarfs wurde anschließend eine Fermentation in 12 L LB-Medium wie unter Abschnitt 3.3.2 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden 182 g Biofeuchtmasse gewonnen, dies entspricht 15 g/ L. Die Biomasse wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C aufbewahrt.

Für eine Reinigung wurden 3 g gefrorene Biomasse in 30 mL Äquilibriumspuffer unter Rühren bei 4°C gelöst. Nach Zellaufschluss und Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile durch Zentrifugation wurde die His₆-Alg1 Δ TM in Anlehnung an [169] und wie unter Abschnitt 3.3.3 beschrieben gereinigt. Eine Bindung von His₆-Alg1 Δ TM an die stationäre Phase des

Affinitätsmaterials ohne Triton X-100 war nicht erfolgreich. Die Zugabe von 0.25 % Triton X-100 als Stabilisator und Lösungsvermittler stellte sich als unerlässlich heraus. Das gereinigte Enzym wurde mittels SDS-PAGE (Abschnitt 3.3.5) analysiert (Abb. 4-13). Das theoretisch erwartete Molekulargewicht des Zielproteins His₆-Alg1ΔTM lag bei 52.6 kDa.

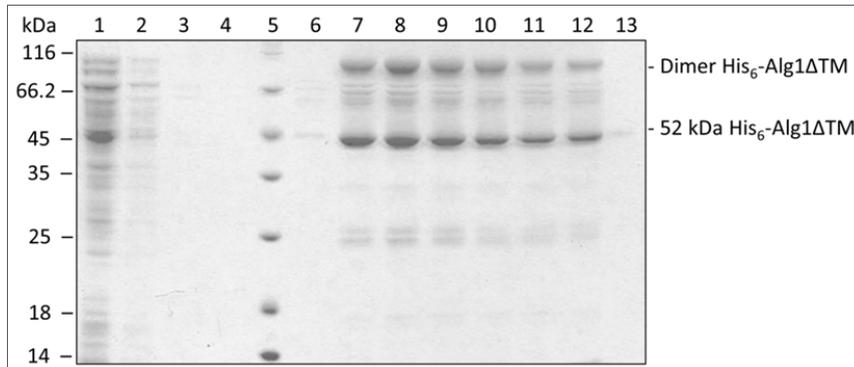


Abb. 4-13: SDS-PAGE – Proben aus der Reinigung von His₆-Alg1ΔTM_{opt} mittels IMAC.

Aufgetragen wurden: Spur 1 – Rohenzymextrakt nach Zentrifugation der geöffneten Zellen, Spur 2 – Durchlauf, Spur 3 und 4 – Waschfraktionen, Spur 5 – Molekulargewichtsstandard (PageRuler™ Unstained Low Range Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland), Spur 6 bis 13 – Elutionsfraktionen. Äquilibriumspuffer: 50 mM Tris/ HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, Elutionspuffer: 50 mM Tris/ HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, Säulenvolumen 10.5 mL, Gel 12.5 %-ig, Coomassiefärbung.

Im Rohenzymextrakt (Spur 1) war eine Bande bei 45 kDa mit erhöhter Expression ersichtlich. Diese Bande konnte in den Elutionsfraktionen angereichert werden. Zusätzlich zeigte sich die Akkumulation einer Bande auf Höhe von etwa 100 kDa. Um die Identität beider angereicherter Banden eindeutig zu klären, wurden diese aus dem Gel ausgeschnitten und nach tryptischem Verdau mittels LC-ESI-MS analysiert. Beide Banden sind demnach der His₆-Alg1ΔTM zuzuordnen, wobei die 100 kDa Bande im Gel ein nicht komplett reduziertes Dimer repräsentiert (Abb. S-0-13, Anhang).

Revers *et al.* setzten das Enzym an der Affinitätsmatrix immobilisiert in den Aktivitäts-Assay ein, da es bei der Dialyse der Elutionsfraktionen inaktiviert wurde. Die Aminosäure-Sequenz von His₆-Alg1ΔTM besitzt sieben Cysteine. Laut Vorhersage der Wahrscheinlichkeit zur Verbrückung der Cystein-Reste (Programm DISULFIND, Abb. S-0-14, Anhang) [210] werden hier keine Disulfidbrücken gebildet. Dennoch ist eine intermolekulare Bildung von Disulfidbrücken zwischen den His₆-Alg1ΔTM-Molekülen denkbar. Durch Zugabe von 1 mM DTT bzw. TCEP zum Dialysepuffer konnte eine Präzipitation und damit einhergehende Inaktivierung vermieden werden. Es konnten 18 mg gereinigtes Enzym His₆-Alg1ΔTM pro 1 L Zellkultur gewonnen werden. Das Enzym wurde bis zur weiteren Verwendung in 50 % (w/v) Glycerin bei -20°C gelagert.

4.2.2 Nachweis der Einzelreaktion von His₆-Alg1ΔTM

Die β -1,4-Mannosyltransferase Alg1 (EC 2.4.1.142) aus *S. cerevisiae* katalysiert am Endoplasmatischen Retikulum (ER) die Übertragung von Mannose ausgehend von α -D-GDP-Mannose auf Dolichyl-Pyrophosphoryl-Chitobiose (Dol-PP-G₂). Diese Reaktion stellt den ersten Mannosylierungsschritt bei der Assemblierung der Glykaneinheit für die *co*-translationale *N*-Glykosylierung modifizierter Proteine dar. Die Möglichkeit, *N*-Glykosylierungen *in vitro* durchführen zu können, eröffnet neue Produktionswege für pharmazeutisch wirksame Proteine, so können diese zunächst in einfach zu handhabenden Wirtsstämmen wie *E. coli* oder *S. cerevisiae* hergestellt und nachträglich glykosyliert werden. Für die Entwicklung und Produktion neuer Wirkstoff-Proteine sind allerdings detaillierte Informationen über die Struktur und die Funktionsweise notwendig.

Wie unter Abschnitt 4.2 beschrieben, akzeptiert die Transmembran-deletierte Variante Alg1ΔTM als Lipidanker auch Phytanol statt Dolichol. Die durch die His₆-Alg1ΔTM katalysierte Reaktion ist in Abb. 4-14 zu sehen. Die Analyse des Alg1-katalysierten Substratumsatzes sowie die Produktbildung können mit verschiedenen Analytik-Methoden gezeigt werden. Wird die Zuckerkomponente mit Hilfe von milder saurer Hydrolyse vom Aglykan getrennt [192] und anschließend mit dem Fluorophor Aminopyrene Trisulfonat (APTS) markiert, können die Zuckerverbindungen mittels Kapillargelelektrophorese mit Laser-induzierter Fluoreszenz (CGE-LIF) hinsichtlich ihrer Monomer-Zusammensetzung und glykosidischen Verknüpfung getrennt und zugeordnet werden [194, 211]. Vorteile dieser Methode sind die hohe Sensitivität und Trennschärfe selbst von sehr ähnlichen Zuckern. Eine Quantifizierung war mit dieser Methode allerdings nicht möglich (Ergebnisse nicht gezeigt). Zur Quantifizierung wurde daher eine Auftrennung der Nebenprodukte GDP-Mannose und GDP nach Abschnitt 3.4.1 über eine C18-Säule mittels IP-HPLC angewandt. In Abb. 4-14 sind die Ergebnisse der angewandten IP-HPLC Analytik für Reaktionsansätze mit verschiedenen Konzentrationen an His₆-Alg1ΔTM dargestellt.

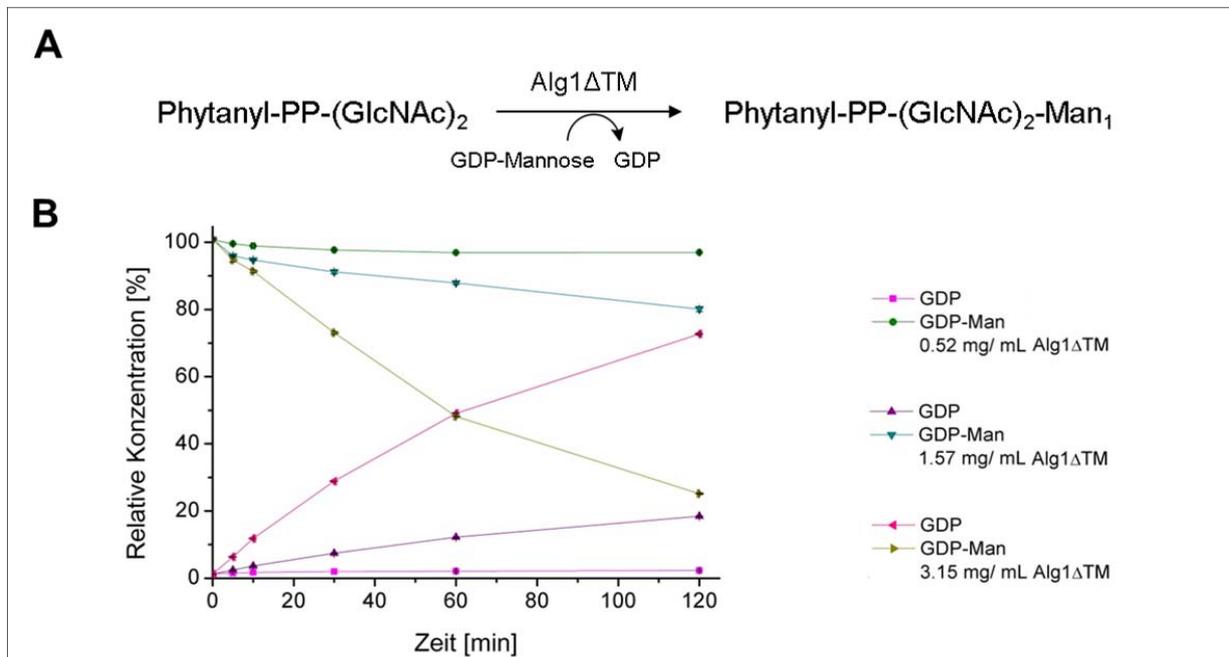


Abb. 4-14: Alg1-katalysierte Reaktion bei verschiedenen Proteinkonzentrationen, Analytik: IP-HPLC mit Detektion von GDP-Mannose und GDP bei 254 nm **(A)** Schematische Darstellung der Reaktionen **(B)** Zeitliche Abhängigkeit des Reaktionsverlaufes bei Proteinkonzentrationen von 0.52 mg/ mL (10 nM), 1.57 mg/ mL (30 nM) und 3.15 mg/ mL (60nM) an His₆-Alg1ΔTM. Alle Messpunkte sind Dreifachreplikate (n=3), Fehler < 2%. Reaktionsbedingungen: 500 μM Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂, 500 μM GDP-Mannose, Reaktionspuffer 20 mM Tris/ HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.25 % Triton X-100, T=30°C, Reaktionsvolumen 200 μL, Probenahme nach 0, 5, 10, 30, 60 und 120 Minuten.

Unter den gewählten Bedingungen konnten mit 3.15 mg/ mL (60 nM) His₆-Alg1ΔTM etwa 75 % der eingesetzten GDP-Mannose zu GDP umgesetzt werden, mit 1.57 mg/ mL (30 nM) 20 % und mit 0.52 mg/ mL (10 nM) 3 %. Mit höheren Proteinkonzentrationen können die Reaktionszeit beschleunigt und höhere Umsätze erzielt werden. Ein Einsatzgebiet mit hohen Proteinkonzentrationen sind Umsatz-orientierte Reaktionen in der Produktion. Zur Charakterisierung des Enzyms bietet sich eine geringe Proteinkonzentration an, um den linearen Bereich der *steady state* Phase ausreichend betrachten zu können.

Das Akzeptor-Substrat Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ (G2) und das mannosylierte Produkt Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂Man₁ (G2M), sowie GDP-Mannose und GDP konnten aus dem Reaktionsansatz mit 3.15 mg/ mL (60 nM) an His₆-Alg1ΔTM nach Auftrennung mittels IPC und den nach ESI-MS (Abschnitte 3.4.2 und 3.4.3) erhaltenen Massen-zu-Ladungs-Verhältnissen (m/z) den erwarteten Substanzen zugeordnet werden (Abb. 4-15).

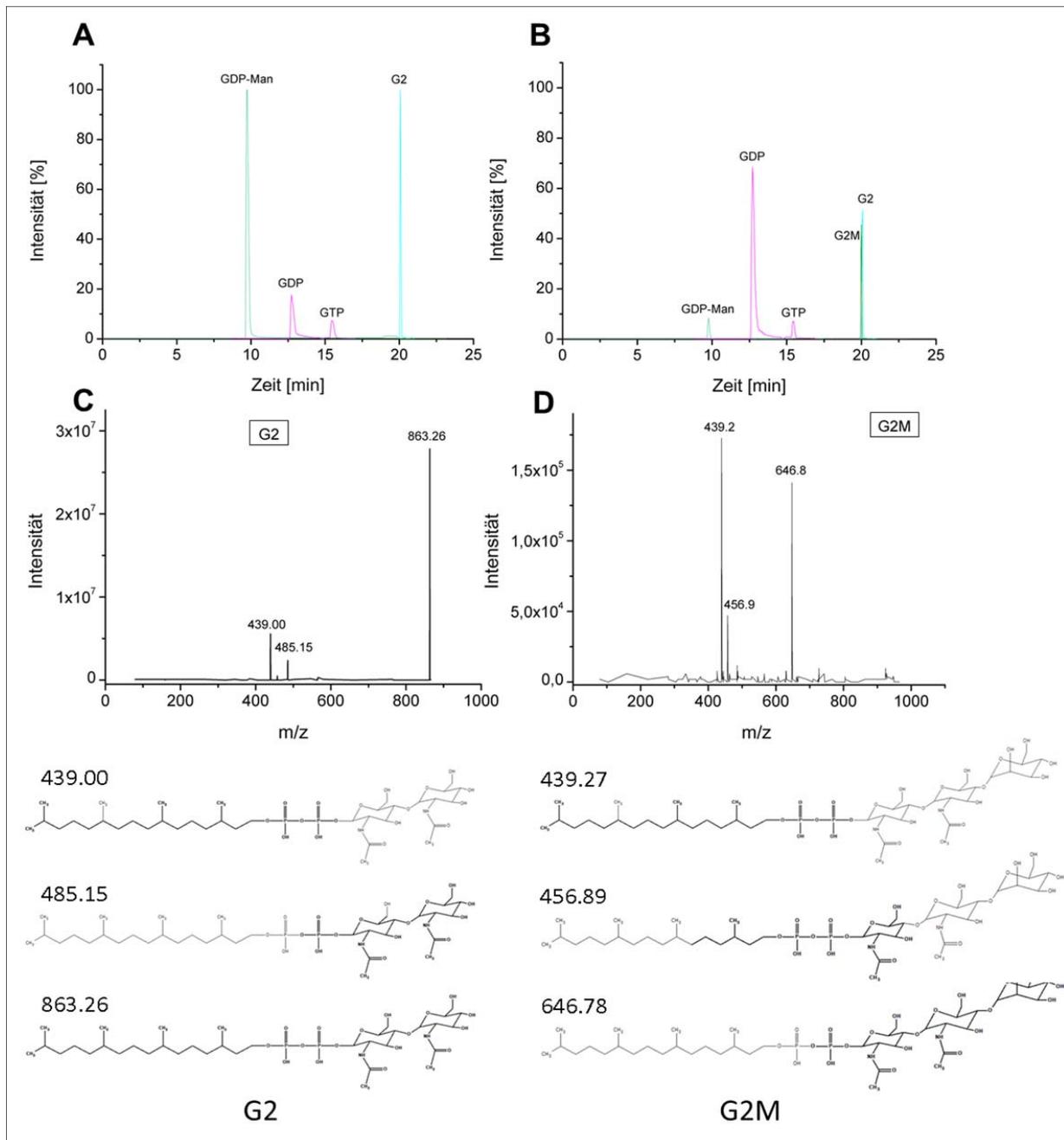


Abb. 4-15: Nachweis der Substrate und Produkte aus Alg1-katalysierter Reaktion mittels IP-UPLC und ESI-MS/MS (A+B) TIC (total ion chromatogram) der Substanzen GDP, GDP-Mannose, Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ (G2) und Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂Man₁ (G2M), 3.15 mg/mL (60 nM) an His₆-Alg1ΔTM, Analytik: IP-UPLC (Abschnitt 3.4.2), MRM-Methode, ESI-MS, Reaktionszeit 0 min (A) und 120 min (B) (C) ESI-MS/MS-Spektrum (EPI, Negativ-Modus) von G2 nach Abschnitt 3.4.3, m/z theoretisch = 864.90, gefunden 863.42 m/z (D) ESI-MS/MS-Spektrum (EPI, Negativ-Modus) von G2M, m/z theoretisch = 1027.04, gefunden 646.78 m/z, Mutter-Ion 1027.04 m/z in diesem Scan bis 1000 m/z nicht sichtbar. Unten: Mögliche Strukturvorschläge der Massenfragmente für die Substanzen Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ (G2) und Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂Man₁ (G2M) erstellt mittels *Fragments Pane*, einem Unterprogramm der Software Analyst 1.7.1 (Sciex, Toronto, Kanada).

Mit den Methoden IP-UPLC und ESI-MS/MS konnten alle Substrate und Produkte aus der His₆-Alg1ΔTM-katalysierten Reaktion detektiert werden. Dabei eluierten Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ und das mannosylierte Produkt Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂Man₁ nach 20 min, GDP-Mannose nach 9.8 min und GDP nach 12.7 min. Nachgewiesen werden konnte auch ein zeitlicher Verlauf der Reaktion, hier gezeigt durch die Zu- bzw. Abnahme der integrierten Flächen im Chromatogramm (A: 0 min, B: 120 min). Auch hier war, wie bei der Analytik mittels CGE-LIF, eine Quantifizierung nicht erfolgreich. Vorteil dieser Methode ist allerdings der direkte Nachweis des vollständigen Zuckersubstrates und des entstehenden Zielproduktes. In Abb. 4-15 C und D sind die MS/MS-Spektren für das Zuckersubstrat und das glykosylierte Produkt zu sehen. Das theoretische Molekulargewicht von G2 und G2M von 864.90 g/mol und 1027.04 g/mol konnte nach Zuordnung der gefundenen Masse-Ladungs-Verhältnisse von [M-H] 863.42 m/z und [M-H] 1026.48 m/z die Identität der Substanzen bestätigen. Da der maximale Scanbereich in Abb. 4-15 D nur bei 1000 m/z lag, ist das Mutter-Ion von G2M hier nicht darstellbar. Mit Hilfe des Werkzeugs *Fragments Pane (in silico)* Fragmenter) der Software Analyst 1.7.1 (Sciex, Toronto, Kanada) konnten Zuordnungen der Massenfragmente zu den Strukturen vorgeschlagen werden (Abb. 4-15 unterer Teil). Die erhaltenen Fragmente entstehen in Abhängigkeit von den Strukturen und den jeweils angewendeten Kollisionsenergien (siehe Abschnitt 3.4.3) der zu untersuchenden Substanzen. Das Vorkommen des Fragmentes 439 m/z in G2M bestätigt dessen Entstehung aus G2.

4.2.3 Untersuchungen zur Mannosyltransferase-Aktivität der Alg1ΔTM

Da die Aktivität der His₆-Alg1ΔTM gegenüber dem Phytanyl-Substrat zum Zeitpunkt der Analysen weder mit dem freien gereinigten noch mit dem optimierten Enzym gezeigt und untersucht war, wurden weitere Parameter bestimmt.

Einfluss der Temperatur und des pH-Wertes auf die Aktivität der His₆-Alg1ΔTM

Der Einfluss von Temperatur und pH-Wert auf die Aktivität von Alg1 wurde bisher nur für die Homologen aus *Sus scrofa* (Wildschwein) und *Glycine max* (Sojabohne) untersucht. Dabei wurde für die Alg1 aus Wildschwein ein pH-Optimum von 7.0 und ein Temperatur-Optimum von 37°C ermittelt. Auch in Sojabohne arbeitet das Enzym bei pH 7.0 optimal [192, 212]. Für die His₆-Alg1ΔTM wurde ein Temperaturbereich von 20 bis 50°C untersucht (Abschnitt 3.3.6). Die Reaktionszeit betrug eine bzw. fünf Minuten bei einer Proteinkonzentration von 100 nM. Die genaue Durchführung des Versuchs ist in Abschnitt 3.3.6 einzusehen. Die Ergebnisse der Untersuchung wurden mittels IP-HPLC (Abschnitt 3.4.1) und Detektion des Produktes GDP bei 254 nm analysiert und sind in Abb. 4-16 dargestellt.

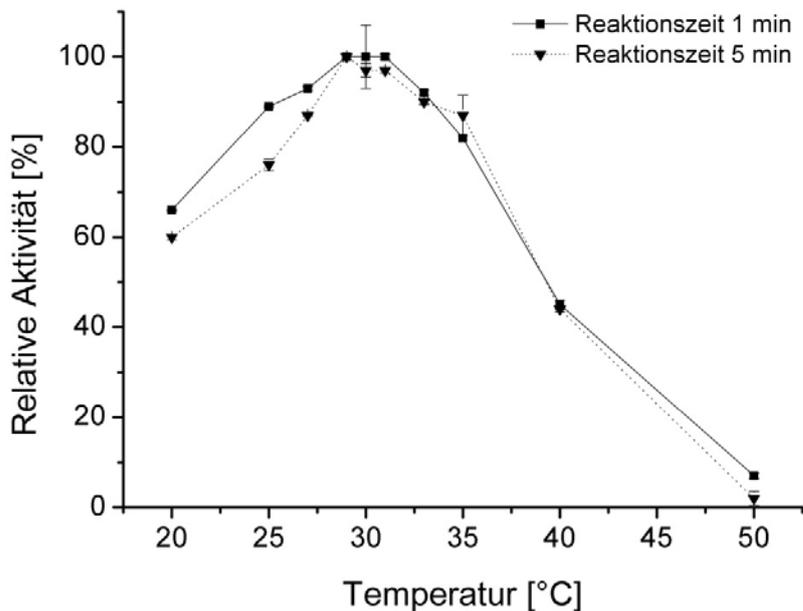


Abb. 4-16: Relative Aktivität der His₆-Alg1ΔTM bei ausgewählten Temperaturen. Analytik: IP-HPLC, Detektion von GDP bei 254 nm. Initiale Reaktionsgeschwindigkeiten bei T = 20, 25, 27, 29, 30, 31, 33, 35, 40 und 50°C. Die Reaktion wurde unter Standardbedingungen durchgeführt: Reaktionspuffer 20 mM Tris/ HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0,25 % Triton X-100; Reaktionsvolumen 200 μL, Konzentrationen im Reaktionsansatz: 500 μM GDP-Mannose, 500 μM Phytanyl-PP-G2, 100 nM (5.2 μg/ mL) His₆-Alg1ΔTM. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus 3 Messungen (n=3), Fehler < 8 %.

Das Temperatur-Optimum des Enzyms wurde in Relation zur höchsten Aktivität (100 %) vergleichend für die Reaktionszeiträume von einer und fünf Minuten dargestellt. Dabei entsprechen 100 % relativer Aktivität einer Aktivität von 1.95 U/ mg. His₆-Alg1ΔTM aus *S. cerevisiae* wurde Codon-usage optimiert für und rekombinant hergestellt in *E. coli* BL21 Gold (DE3) und besitzt ein Temperaturoptimum im Bereich von 30±1°C. Dieses Ergebnis konnte für zwei verschiedene Reaktionszeiten und somit für zwei verschiedene Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktion übereinstimmend gezeigt werden. Eine sehr gute Übertragung der Mannose auf das vorliegende Lipidsubstrat fand ebenfalls im untersuchten Temperaturbereich von 25-35°C statt. Bei einer Abweichung von ±10°C vom Temperatur-Optimum verringert sich die Aktivität auf 40-60 %, wobei das Enzym eine höhere Sensitivität gegenüber steigenden Temperaturen aufweist.

Für Untersuchungen zum optimalen pH-Wert der His₆-Alg1ΔTM (Abschnitt 3.3.6) wurde Bis-Tris-Propan als Puffersubstanz ausgewählt, um den gesamten Untersuchungsbereich mit dem gleichen Puffer durchführen und somit Einflüsse verschiedener Puffersubstanzen ausschließen zu können. Bis-Tris-Propan besitzt bei einer Konzentration von 20 mM und bei 25°C einen sehr breiten Pufferbereich von etwa pH 6.0 bis pH 9.5. Dies ist auf seine zwei pK_s-Werte bei pH 6.8 und pH 9.0 zurückzuführen. Zusätzlich wurde die Aktivität der His₆-Alg1ΔTM in Reaktionspuffer (20 mM Tris/ HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ und 0.25 % Triton X-100) getestet, der zur

Eintopf-Synthese verwendet wurde. Der pK_s -Wert von 20 mM Tris bei 25°C liegt bei pH 8.1. Die Durchführung des Versuchs ist in Abschnitt 3.3.6 einzusehen. Die Ergebnisse der Untersuchung wurden mittels IP-HPLC (Abschnitt 3.4.1) und Detektion des Produktes GDP bei 254 nm analysiert und sind in Abb. 4-16 dargestellt.

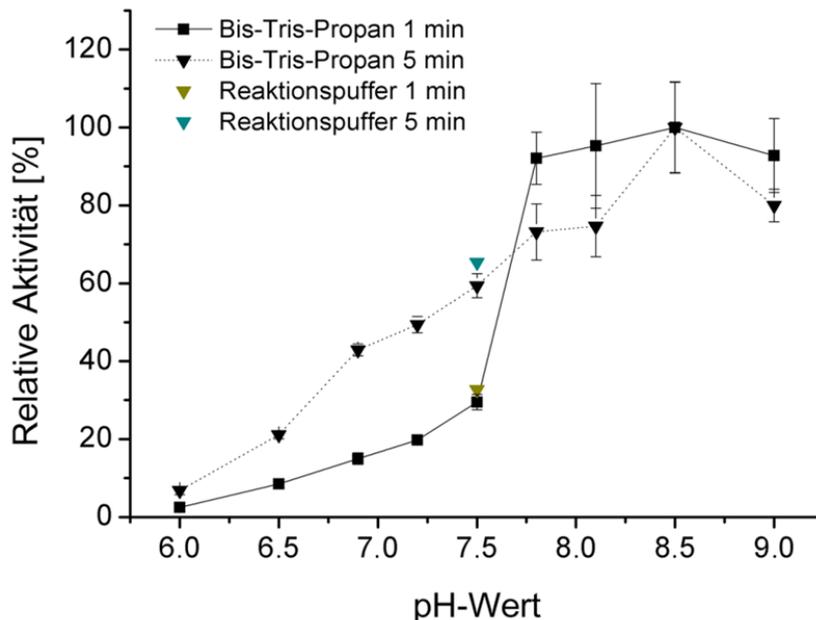


Abb. 4-17: Relative Aktivität der His₆-Alg1ΔTM bei ausgewählten pH-Werten. Initiale Reaktionsgeschwindigkeiten von einer und fünf Minuten bei pH = 6.0, 6.5, 6.9, 7.2, 7.5, 7.8, 8.1, 8.5 und 9.0. Die Reaktion wurde mit 20 mM Bis-Tris-Propan bzw. Reaktionspuffer (20 mM Tris/ HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ und 0.25 % Triton X-100) bei 30°C durchgeführt; Reaktionsvolumen 200 μL, Konzentrationen im Reaktionsansatz: 500 μM GDP-Mannose, 500 μM Phytanyl-PP-G₂, 100 nM (5.2 μg/ mL) His₆-Alg1ΔTM. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus 3 Messungen (n=3), Fehler <13 %.

Das pH-Optimum der His₆-Alg1ΔTM-Aktivität wurde in Relation zur höchsten Aktivität (100 %) vergleichend für die Reaktionszeiträume von einer und fünf Minuten dargestellt. Dabei entsprechen 100 % relativer Aktivität einer Aktivität von 22.97 U/ mg. Der Wert bei pH 7.5 müsste somit etwa 30 % der Aktivität betragen, also 6.9 U/ mg. Da diese Untersuchungen bei 30°C durchgeführt wurden, müsste diese Aktivität der der Untersuchungen zum Temperatur-Optimum bei 100 % entsprechen. Die Diskrepanz könnte mit der Nutzung unterschiedlicher Enzym-Chargen erklärt werden. Die verwendete His₆-Alg1ΔTM besitzt einen Bereich des pH-Optimums von 7.8 bis mindestens 9.0. Dieses Ergebnis konnte für zwei verschiedene Reaktionszeiten und somit für zwei verschiedene Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktion übereinstimmend gezeigt werden. Die relative Aktivität zeigt in Abhängigkeit vom pH-Wert ein Maximum bei pH 8.5. Bei pH-Werten unter 7.5 verringert sich die Aktivität auf 20-50 %. Die gemessenen Aktivitäten in Eintopf-Reaktionspuffer zeigen, dass die Puffersubstanz Bis-Tris-Propan verglichen mit Tris-Puffer keinen Einfluss auf die Aktivität unter den gewählten Bedingungen hat. Die Aktivitäten in Tris-Puffer liefern sehr ähnliche Ergebnisse.

Da das Temperatur-Optimum der His₆-Alg1ΔTM mit 30°C im Mittel der publizierten Temperatur-Optima liegt und die Einzelreaktionen bei 30°C überzeugende Umsätze lieferten, sollte die Multi-Enzym-Reaktion ebenfalls bei 30°C durchgeführt werden. Hingegen konnte die Aktivität der zuvor untersuchten Enzyme beim optimalen pH-Wert von 8.5 für die His₆-Alg1ΔTM nicht abgeschätzt werden. Daher wurden die Temperatur- und pH-Bedingungen der bisherigen Multi-Enzym-Reaktionen (30°C bei pH 7.5) auch für die Folgereaktionen übernommen. Es sei aber darauf hingewiesen, dass unter Einsatz von 100 nM His₆-Alg1ΔTM ein nahezu vollständiger Umsatz von 96 % erzielt werden konnte (Ergebnisse nicht gezeigt).

4.2.4 Bestimmung enzymkinetischer Parameter der Alg1ΔTM

Untersuchungen zu kommerziellen Aspekten und des Nutzens (besonders bei seltenen Anwendungsgebieten oder Präparaten zur Eigenmedikation) von Biopharmaka zeigen einen dringenden Bedarf an mechanistischen Bewertungen. Diese erhält man durch Untersuchungen der Charakteristika: Aufnahme, Verteilung, Stoffwechselreaktionen und Ausscheidung (*absorption, distribution, metabolism, excretion* = ADME) der Stoffe sowie die Aufklärung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen (*structure activity relationships* = SAR). Mithilfe solcher Daten können benötigte therapeutische Proteine effektiver konstruiert werden [135]. Vor diesem Hintergrund ist eine optimierte und vor allem homogene *N*-Glykosylierung für die Produktion der nächsten Generation von therapeutischen Proteinen von großer Bedeutung und wirtschaftlichem Interesse. Um darüber hinaus ein ideales Zusammenspiel involvierter Glykosyltransferasen *in vitro* zum Aufbau von *N*-Glykanen gewährleisten zu können, ist es von Vorteil, diese hierzu kinetisch zu charakterisieren.

Für Glykosyltransferasen des B-Faltungstyps werden zwei unterschiedliche Bindestellen im aktiven Zentrum für die Substrate beschrieben [213]. Die Enzyme katalysieren Reaktionen mit einem sequenziellen geordneten (*ordered Bi-Bi*) Reaktions-Mechanismus, bei dem es nach Bindung des Donor-Substrates zu einer Konformationsänderung (*induced fit*) kommt, welche die Bindung des Akzeptor-Substrates begünstigt [213]. Für diese Glykosyltransferasen gilt entweder der erhaltende (*retaining*) Reaktions-Mechanismus (α -NDP-Zucker \rightarrow α -Verknüpfung) oder der Invertierende (*invertig*) (α -NDP-Zucker \rightarrow β -Verknüpfung) [213]. Die Mannosyltransferase Alg1 wurde den invertierenden Glykosyltransferasen des B-Faltungstyps (*Carbohydrate Active enZYme* (CAZy) Datenbank (<http://www.cazy.org>)) zugeordnet. Ihr Reaktions-Mechanismus, basierend auf der Hypothese von Liang [213] wurde zum besseren Verständnis schematisch in einer eigenen Abbildung (Abb. 4-18) dargestellt:

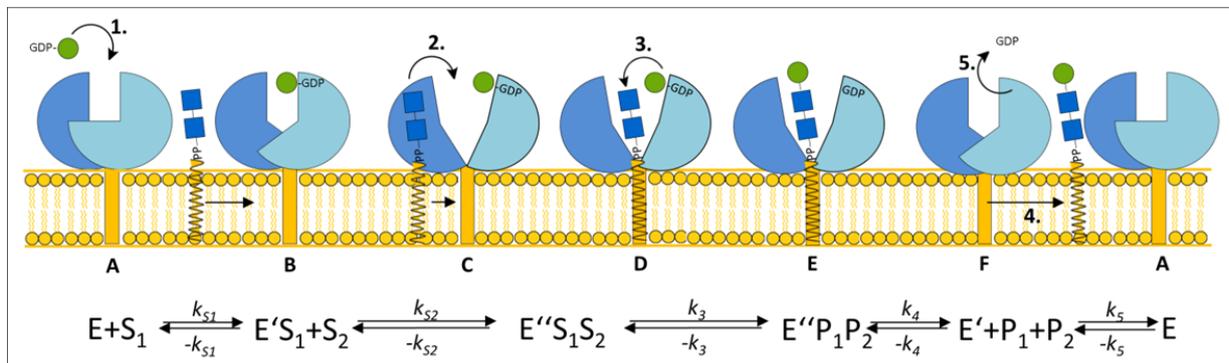


Abb. 4-18: Schema des Reaktionsmechanismus der Alg1, eingebettet in die Lipid-Doppelschicht: Alg1 mit N-terminaler Domäne (dunkelblau), C-terminaler Domäne (hellblau), Membrananker (gelb); Donor-Substrat GDP-Mannose (grüner Kreis); Akzeptor-Substrat Lipid-PP-(GlcNAc)₂ mit GlcNAc (blaues Viereck) und Lipid-Anker (Zickzack-Linie), E – Enzym, S – Substrat, P – Produkt, k – Geschwindigkeitskonstanten

Bei der Übertragung der Substrate auf die Alg1, bindet nach dieser Hypothese das Donor-Substrat GDP-Mannose als Erstes (Abb. 4-18 A-B). Durch die Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung (B, C), die eine Bindung des Akzeptor-Substrates Dolichol-PP-(GlcNAc)₂ begünstigt und die Reaktanden in räumliche Nähe (D) bringt. Nach Übertragung der Mannose auf den Akzeptor (E) wird zunächst das Zwischenprodukt der N-Glykosylierung Dolichol-PP-(GlcNAc)₂Man₁ frei, bevor verbleibendes GDP entlassen wird (F) und das freie Enzym (A) bereit für den nächsten Katalyseschritt ist.

Werden Enzyme als Katalysatoren für biotechnologische Anwendungen eingesetzt, sollten sie folgende Eigenschaften aufweisen: hohe strukturelle Stabilität, hohe Umsatzraten und lange Einsatzzeiten. Dies sichert *in vitro* eine ausreichende Reaktionsgeschwindigkeit über einen längeren Zeitraum. Einflüsse auf die Enzymaktivitäten im Produktionssystem, in Bezug auf Aktivierungs- und Inhibierungsverhalten der Enzyme, sollten ebenfalls betrachtet werden.

Für Alg1-Homologe aus Sojabohne und Schweine-Aorta Mikrosomen wurden ausführliche Charakterisierungen publiziert. Diese basieren auf enzymatischen Assays unter Verwendung von radioaktiv-markierten Substraten. Für die Alg1 aus Soja werden für die Substrate Dolichol-PP-(GlcNAc)₂ bzw. GDP-Mannose apparente K_M -Werte von 9.0 bzw. 1.7 μM angegeben [212], für das Enzym aus Schwein 1.0 bzw. 0.5 μM [192]. Für eine auch in dieser Arbeit verwendete Alg1 ΔTM aus Hefe, rekombinant hergestellt in *E. coli*, wurden mit Hilfe des immobilisierten Enzyms apparente K_M -Werte von 14.0 bzw. 4.8 μM für die Substrate Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ und GDP-Mannose bestimmt [169]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es erstmals, die His₆-Alg1 ΔTM aus Hefe in aktiver Form löslich herzustellen (Abb. 4-14). Da die kinetische Charakterisierung bisher nur mit dem immobilisierten Enzym gezeigt wurde, wurde das Reaktionsverhalten des freien Enzyms näher untersucht. Ein wesentliches Ziel dabei war es, eine Methode anzuwenden, die auf den Einsatz von radioaktiv-markierten Materialien verzichtet. Für die Untersuchungen wurde ein diskontinuierlicher Test (Abschnitt 3.3.6) mit Nachweis der nicht-markierten Substrate und Produkte mittels IP-Chromatografie (Abschnitt 3.4.1) etabliert. Zunächst wurde die katalytische Aktivität der His₆-Alg1 ΔTM bei unterschiedlichen, aber im

jeweiligen Ansatz konstanten Konzentrationen an Phytanyl-Substrat und variabler Konzentration an GDP-Mannose untersucht (Abb. 4-19).

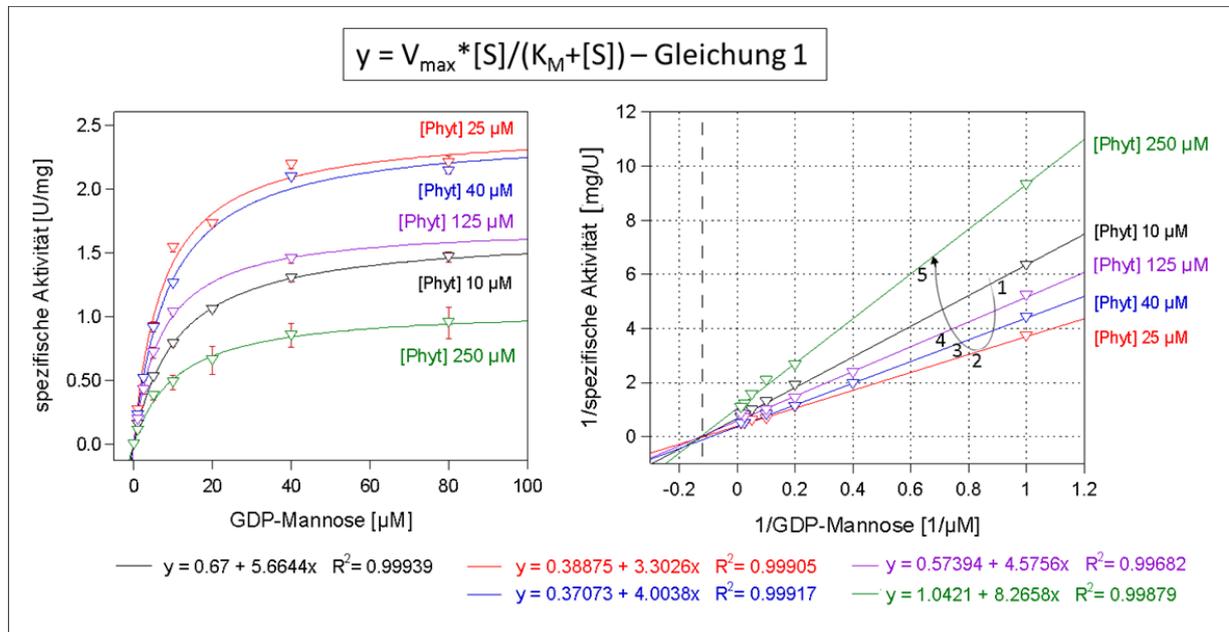


Abb. 4-19: Donorkinetik - Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der His₆-Alg1ΔTM bei variablen Konzentrationen an GDP-Mannose und verschiedenen jeweils konstanten Konzentrationen an Phytanyl-PP-G₂. Für alle Reaktionen gilt: His₆-Alg1ΔTM 30 nM (1.57 mg/ L), MW = 52434 Da; Reaktionsbedingungen: Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ konstant bei 10, 25, 40, 125 bzw. 250 μM, GDP-Mannose variabel jeweils 1, 2.5, 5, 10, 40, 80 μM, Reaktionspuffer 20 mM Tris/ HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.25 % Triton X-100, T=30°C, Reaktionsvolumen 200 μL, Probenahme nach 0s, 15s, 30s, 45s, 60s, 90s und 120s. **Links:** Anpassung der Daten an die Michaelis-Menten-Gleichung (direkte Auftragung). Alle Messpunkte sind Dreifachreplikate (n=3). **Rechts:** Anpassung der Daten im Lineweaver-Burk-Plot, gestrichelte Linie: Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse; Gleichung: V_{\max} – maximale Reaktionsgeschwindigkeit [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$], K_M – Michalis-Konstante [μM], $[S]$ – Donor-Substratkonzentration [μM].

Aus beiden Auftragungen lassen sich folgende kinetische Parameter berechnen:

Tabelle 4-2 Kinetische Daten aus direkter Auftragung für das Donor-Substrat GDP-Mannose, His₆-Alg1ΔTM 30 nM (1.57 mg/ L), Reaktionsbedingungen wie in Abb. 4-14.

Phytanyl-PP-G ₂ _{konst} [μM]	GDP-Mannose _{var} [μM]	V_{\max} [U/ mg]	K_M [μM]
10	1, 5, 10, 20, 40, 80	1.66 ± 0.02*	10.97 ± 0.37*
25	1, 5, 10, 20, 40, 80	2.48 ± 0.09*	7.41 ± 1.07*
40	1, 2.5, 5, 10, 40, 80	2.45 ± 0.06*	8.92 ± 0.75*
125	1, 2.5, 5, 10, 40, 80	1.72 ± 0.03*	7.10 ± 0.38*
250	1, 5, 10, 20, 40, 80	1.07 ± 0.04*	10.92 ± 1.28*
Mittelwert:			9.06 ± 1.85 ⁺

* Fehler der kleinsten Quadrate aus der Datenanpassung, ⁺ Standardabweichung der Daten aller K_M -Werte

Tabelle 4-3: Kinetische Daten nach Linearisierung mittels Lineweaver-Burk für das Donor-Substrat GDP-Mannose, His₆-Alg1ΔTM 30 nM (1.57 mg/ L), Reaktionsbedingungen: Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ konstant bei 10, 25, 40, 125 bzw. 250 μM, GDP-Mannose variabel jeweils 1, 2.5, 5, 10, 40, 80 μM, Reaktionspuffer 20 mM Tris/ HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.25 % Triton X-100, T=30°C, Reaktionsvolumen 200 μL, Probenahme nach 0s, 15s, 30s, 45s, 60s, 90s und 120s. Die Steigung der Geraden beträgt K_M/V_{max} .

Phytanyl-PP-G2 _{konst} [μM]	GDP-Mannose _{var} [μM]	V_{max} [U/ mg]	K_M [μM]
10	1, 5, 10, 20, 40, 80	1.49	8.45
25	1, 5, 10, 20, 40, 80	2.57	8.50
40	1, 2.5, 5, 10, 40, 80	2.70	10.80
125	1, 2.5, 5, 10, 40, 80	1.74	7.97
250	1, 5, 10, 20, 40, 80	0.96	7.93
Mittelwert:			$8.73 \pm 1.19^+$

⁺ Standardabweichung der Daten aller K_M -Werte

Die erhaltenen Werte aus der Sekundärauftragung nach Lineweaver-Burk sind in guter Übereinstimmung mit den Werten aus der direkten Auftragung (Tabelle 4-2 und Tabelle 4-3). Bei direkter Auftragung zeigt die katalytische Aktivität der His₆-Alg1ΔTM eine hyperbole Abhängigkeit von der GDP-Mannose-Konzentration. Die Datenpunkte konnten mit der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 1 aus Abb. 4-19) angepasst werden, sodass der K_M -Wert und V_{max} für das variierte Substrat ermittelt werden konnten. Auffallend ist, dass die Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) im untersuchten Konzentrations-Bereich mit steigenden Konzentrationen an Phytanyl-Substrat zunächst wie erwartet ansteigt und dann ab einer Substratkonzentration von 40 μM wieder abnimmt. Dabei bleibt der K_M -Wert für GDP-Mannose (Durchschnitt K_M aus direkter Auftragung 9.1 μM, Durchschnitt K_M aus der Auftragung nach Lineweaver-Burk 8.7 μM) unbeeinflusst. Die Größe der Fehler liegt in der diskontinuierlichen Testmethode (Abschnitt 3.3.6) begründet. Im Rahmen des Fehlers erlauben die Daten die Schlussfolgerung, dass der K_M -Wert nicht beeinflusst ist. Dieses Verhalten, also der abnehmende V_{max} -Wert bei ansteigender Substrat-Konzentration des konstanten Substrates und gleichbleibender K_M -Wert, spricht bei einem sequentiellen Reaktions-Mechanismus für einen inhibitorischen Effekt. Eine Inhibition wurde bisher nicht beschrieben. Der inhibitorische Effekt könnte in einer Substratüberschuss-Hemmung für das Akzeptor-Substrat Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ begründet sein. Um diesen Effekt des Phytanyl-Substrates *in vitro* analysieren zu können, wurden Bedingungen gewählt, die einen Einfluss des Substrates GDP-Mannose ausschließen. Daher wurde der Reaktionsverlauf für die His₆-Alg1ΔTM katalysierte Reaktion bei GDP-Mannose-Konzentrationen in Sättigung (mind. 10-fach K_M) und variierenden Konzentrationen des Phytanyl-Substrates untersucht (Abb. 4-20). Zur Absicherung wurden drei Experimente mit verschiedenen Sättigungskonzentrationen an GDP-Mannose (K_M x10, x13 und x50) durchgeführt. Unter diesen Bedingungen sollten die Maximalgeschwindigkeiten in allen drei Versuchen ähnlich hoch sein.

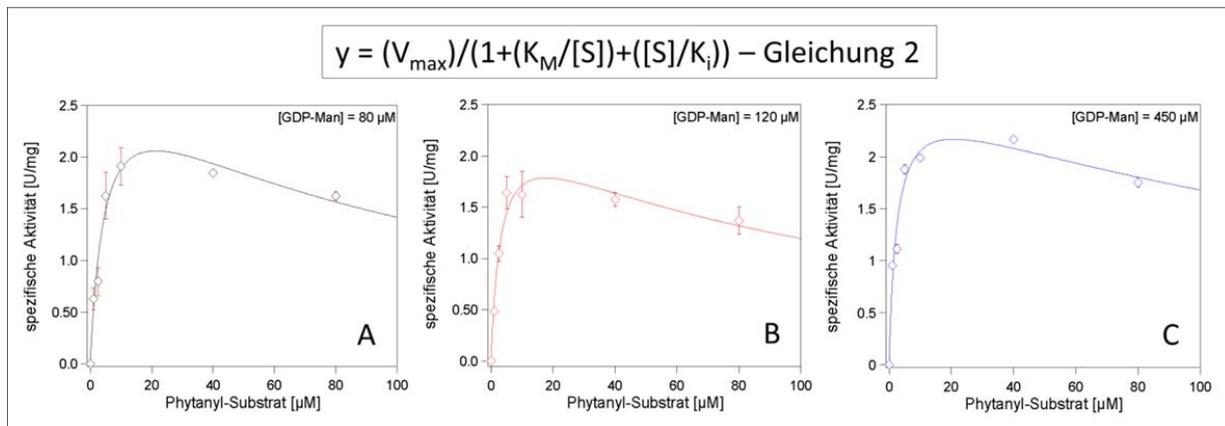


Abb. 4-20: Akzeptorkinetik - Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der His₆-Alg1ΔTM von der Phytanyl-PP-G2-Konzentration bei konstanten Konzentrationen an GDP-Mannose. Für alle Reaktionen gilt: His₆-Alg1ΔTM 30 nM (1.57 mg/ L), MW = 52434 Da; Reaktionsbedingungen: GDP-Mannose konstant bei 80 (A), 120 (B) bzw. 450 µM (C), Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ variabel jeweils 1, 2.5, 5, 10, 40, 80 µM, Reaktionspuffer 20 mM Tris/ HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.25 % Triton X-100, T=30°C, Reaktionsvolumen 200 µL, Probenahme nach 0s, 15s, 30s, 45s, 60s, 90s und 120s. Alle Messpunkte sind Zweifachreplikate (n=2). Gleichung: V_{\max} – maximale Reaktionsgeschwindigkeit [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$], K_M – Michalis-Konstante [μM], $[S]$ – Akzeptor-Substratkonzentration [μM], K_i – Inhibitions-Konstante

Aus der Auftragung der Daten wird deutlich, dass oberhalb von Phytanyl-Konzentrationen von etwa 20 µM die Reaktionsgeschwindigkeit abnimmt. Deshalb wurde für die Akzeptorkinetik eine Kurvenanpassung mit Substratüberschuss-Anpassung (Gleichung 2 aus Abb. 4-20) angewandt. Die Kurvenanpassung konnte die Messwerte mit einem R^2 von 0,97 gut beschreiben. Aus den Auftragungen lassen sich folgende kinetische Parameter berechnen:

Tabelle 4-4: Kinetische Daten aus direkter Auftragung für das Akzeptor-Substrat Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂, His₆-Alg1ΔTM 30 nM (1.57 mg/ L), Reaktionsbedingungen wie in Abb. 4-20.

GDP-Mannose _{konst}	Phytanyl-PP-G2 _{var}	V_{\max}	K_M	K_i
[µM]	[µM]	[U/ mg]	[µM]	[µM]
80	1, 2.5, 5, 10, 40, 80	$2.98 \pm 0.6^*$	$4.76 \pm 1.9^*$	$94.62 \pm 51^*$
120	1, 2.5, 5, 10, 40, 80	$2.40 \pm 0.4^*$	$3.04 \pm 1.1^*$	$102.12 \pm 46^*$
450	1, 2.5, 5, 10, 40, 80	$2.68 \pm 0.4^*$	$2.47 \pm 0.9^*$	$174.71 \pm 105^*$
Mittelwert:		$2.69 \pm 0.3^+$	$3.42 \pm 1.2^+$	$123.82 \pm 44^+$

* Fehler der kleinsten Quadrate aus der Datenanpassung, ⁺ Standardabweichung der Daten aller K_M - und V_{\max} -Werte

Bei konstanten Konzentrationen an GDP-Mannose in Sättigung lässt sich für das Phytanyl-Substrat ein mittlerer apparenter K_M -Wert von 3.4 µM und ein mittlerer apparenter V_{\max} -Wert von 2.7 U/ mg errechnen. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wird jedoch aufgrund von Inhibierungsprozessen nicht erreicht. Wie schon die Daten aus dem vorangegangenen Experiment vermuten ließen, zeigt sich hier mit zunehmender Konzentration an Phytanyl-Substrat eine deutliche Substratüberschuss-Hemmung.

Unter den gewählten Bedingungen ergibt sich eine gemittelte Inhibierungs-Konstante K_i von 123 μM . Da die Datendichte für diese Versuche relativ gering ist und die Anpassung auf drei unbekanntenen Konstanten durchgeführt wird, sind die hohen Abweichungen nicht ungewöhnlich. Dennoch lässt sich die Größenordnung für die K_M -, K_i - bzw. V_{max} -Werte gut abschätzen. Auf die Bestimmung der katalytischen Effizienzen wird in der Diskussion (Abschnitt 5.2.1) eingegangen.

4.3 Eintopf-Synthese von Phytanyl-PP-Mannosylchitobiose

In diesem Abschnitt wurde das Multi-Enzym-Regenerationssystem aus Abschnitt 4.1.6 mit der GDP-Mannose-verbrauchenden Glykosyltransferase His₆-Alg1 Δ TM kombiniert. Die Synthese von Phytanyl-Pyrophosphoryl-Mannosylchitobiose (Man1) ging von ADP, Polyphosphat, GTP, Mannose und Phytanyl-Pyrophosphoryl-Chitobiose aus. Der Reaktionsverlauf wurde zum einen über HPLC-Messungen von ADP, ATP, GDP, GTP und GDP-Mannose und zum anderen über massenspektrometrische Analysen von Phytanyl-Pyrophosphoryl-Chitobiose und Phytanyl-Pyrophosphoryl-Mannosylchitobiose quantifiziert.

4.3.1 Gekoppelte Reaktion von Alg1 Δ TM, ManCB, Glk, PmPpA und Ppk3

Für die Multi-Enzym-Reaktion zur Bildung von Phytanyl-Pyrophosphoryl-Mannosylchitobiose wurden die optimalen Konzentrationen der Reaktanden übernommen (Abschnitt 4.1.6). Für die His₆-Alg1 Δ TM katalysierte Reaktion wurde das Phytanyl-Substrat in Sättigung eingesetzt, da in Abschnitt 4.2.4 gezeigt wurde, dass die Substratüberschusshemmung bei hohen Phytanyl-PP-Chitobiose-Konzentrationen keinen Einfluss auf den K_M -Wert hat. Da der Fokus der Gesamtreaktion auf einer präparativen Synthese mit hoher Ausbeute an Man1 lag, wurde eine verzögerte (aber anpassbare) Reaktionsgeschwindigkeit in Kauf genommen. Daher wurden jeweils 500 μM der Substrate ADP, GTP und Phytanyl-PP-Chitobiose, 2 mM Mannose sowie 1 mM PolyP nach Abschnitt 3.3.6 in den Assay eingesetzt. Der Co-Faktor Glukose-1,6-bisPhosphat wurde mit einer Konzentration von 100 μM eingesetzt. Die Konzentrationen der einzusetzenden Enzyme betragen: His₆-Glk 2 mg/ mL, ManCB-His₆ 1 mg/ mL, PmPpA-His₆ 0.025 mg/ mL und 0.02 mg/ mL His₆-Ppk3. Die Konzentration der His₆-Alg1 Δ TM betrug 0.005 mg/ mL (100 nM). Die Ergebnisse zu diesem Versuchskomplex sind in der folgenden Abbildung (Abb. 4-21) dargestellt.

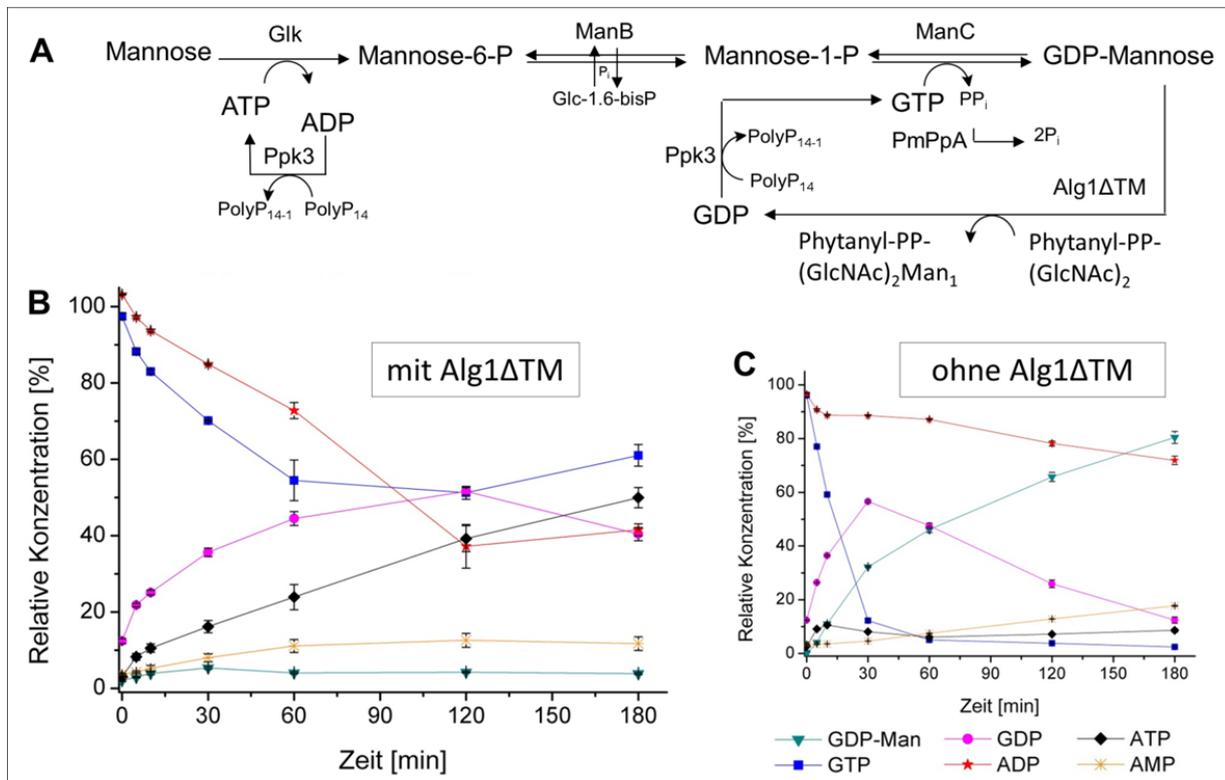


Abb. 4-21: HPLC-Analytik - Verlauf der Eintopf-Synthese zur Bildung von Phytanyl-PP-Mannosylchitobiose ausgehend von Mannose, ADP, PolyP, GTP und Phytanyl-PP-Chitobiose. Reaktionsbedingungen: 2 mM Mannose, 500 μM GTP, 500 μM ADP, 1 mM PolyP, 500 μM Phytanyl-PP-Chitobiose und 100 μM Glc-1,6-bisP, Reaktionspuffer: 20 mM Tris/ HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 0,25 % Triton X-100, $T=30^\circ\text{C}$. Analytik: IP-HPLC nach Abschnitt 3.4.1, Detektion bei 254 nm. **(A)** Schematische Darstellung der gekoppelten Reaktionen **(B)** Zeitliche Abhängigkeit des Reaktionsverlaufes bei konstanten Proteinkonzentrationen von His₆-Glk 2 mg/ mL, ManCB-His₆ 1 mg/ mL, PmPpA-His₆ 0,025 mg/ mL, His₆-Ppk3 0,02 mg/ mL und 0,005 mg/ mL His₆-Alg1ΔTM, biologisches Dreifachreplikat ($n=3$), Fehler < 6 %. **(C)** zum Vergleich – Eintopf-Synthese ohne His₆-Alg1ΔTM aus Abb. 4-11.

Im Vergleich der Eintopf-Synthese von GDP-Mannose ohne His₆-Alg1ΔTM (Abb. 4-21 C) wird in der Eintopf-Synthese von Phytanyl-PP-Mannosylchitobiose mit His₆-Alg1ΔTM (Abb. 4-21 B) wesentlich mehr Substrat ADP umgesetzt und mehr ATP gebildet. Eine leichte Zunahme der Konzentration an ADP ist erst nach 120 min Reaktionszeit zu verzeichnen. Der Anteil an gebildetem ATP beträgt nach 180 min etwa 50 %. Der Anteil an gebildetem AMP ist dabei in beiden Reaktionsansätzen mit 10 % vergleichbar. Gleichzeitig kann aber eine Abnahme von 50 % an GTP beobachtet werden (nach 120 min). Die Bildung von GDP kann durch die Aktivität der His₆-Alg1ΔTM und der His₆-Glk (Abschnitt 4.1.6) erfolgen. Da sich die Substratumsatz- und Produktbildungskurven von GTP und GDP in den beiden Reaktionsansätzen B und C deutlich unterscheiden, muss dies auf den Einfluss der His₆-Alg1ΔTM oder sein Phytanyl-Substrat zurückzuführen sein. Bei der Eintopf-Synthese von GDP-Mannose ohne His₆-Alg1ΔTM (Abb. 4-21 C) wurden nach 180 min Reaktionszeit 80 % GDP-Mannose (bezogen auf die Anfangskonzentrationen von 500 μM für die Substrate ADP, GTP und Phytanyl-PP-Chitobiose) gebildet. Da in der Eintopf-Synthese von Phytanyl-PP-Mannosylchitobiose mit His₆-Alg1ΔTM

(Abb. 4-21 B) nach 180 min Reaktionszeit nur etwa 5 % GDP-Mannose nachweisbar sind, kann von einem Verbrauch der GDP-Mannose zur Bildung von Phytanyl-PP-Mannosylchitobiose ausgegangen werden. Zur Absicherung dieser Aussage wurden die hier verwendeten Reaktionsansätze massenspektrometrisch analysiert (Abschnitt 3.4.2). Die Konzentrationsverläufe für die Analyten GDP, GDP-Mannose, GTP, ADP, ATP, AMP, Phytanyl-PP-Mannosylchitobiose und Phytanyl-PP-Chitobiose sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

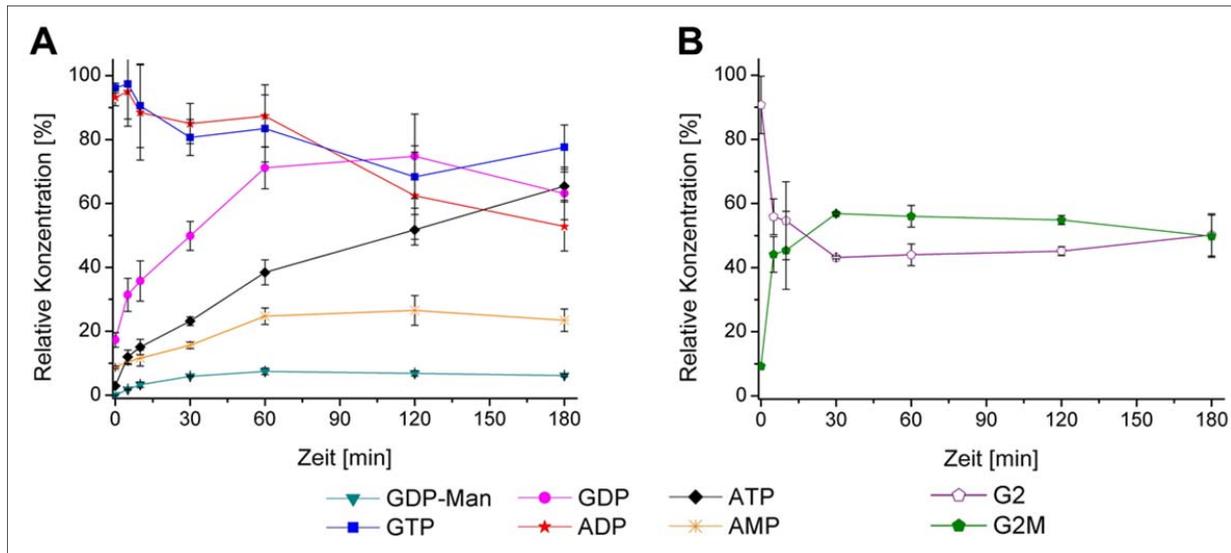


Abb. 4-22: MS-Analytik (MRM) - Verlauf der Eintopf-Synthese zur Bildung von Phytanyl-PP-Mannosylchitobiose (G₂M) ausgehend von Mannose, ADP, PolyP, GTP und Phytanyl-PP-Chitobiose (G₂). Reaktionsbedingungen: 2 mM Mannose, 500 μ M GTP, 500 μ M ADP, 1 mM PolyP, 500 μ M Phytanyl-PP-Chitobiose und 100 μ M Glc-1.6-bisP, Proteinkonzentrationen: His₆-Glc 2 mg/ mL, ManCB-His₆ 1 mg/ mL, PmPpA-His₆ 0.025 mg/ mL, His₆-Ppk3 0.02 mg/ mL und 0.005 mg/ mL His₆-Alg1 Δ TM, biologisches Dreifachreplikat (n=3), Fehler < 15 %. Reaktionspuffer: 20 mM Tris/ HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.25 % Triton X-100, T=30°C. Analytik: IP-UPLC nach Abschnitt 3.4.2 gekoppelt mit ESI-MS. **(A)** Zeitliche Abhängigkeit des Reaktionsverlaufes für GDP-Man, GTP, GDP, ATP, ADP und AMP **(B)** Zeitliche Abhängigkeit des Reaktionsverlaufes für Phytanyl-PP-G₂ und Phytanyl-PP-G₂M

Mit der gewählten massenspektrometrischen Methode (MRM) nach Abschnitt 3.4.3 konnten sämtliche Substrate und Produkte der Eintopf-Synthese nachgewiesen werden. Die MS-basierten Daten weisen allerdings eine recht hohe Fehleranfälligkeit von 15 % im Mittelwert dreier Messungen auf. Auch war die Abweichung der einzelnen Messpunkte der Kalibriergeraden mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2=0.79$ im gewählten Konzentrationsbereich sehr hoch (nicht gezeigt). Daher wurden diese Daten nicht zur quantitativen Auswertung des Experimentes herangezogen. Der Anspruch dieser Methode lag im Nachweis des Syntheseproduktes Phytanyl-PP-G₂M und dessen Vorläufer Phytanyl-PP-G₂. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Bildung von G₂M bereits nach 30 min abgeschlossen ist (Abb. 4-22 B). Unter Berücksichtigung des nicht-quantitativen Messergebnisses kann nur eine Vermutung über die tatsächliche Menge des gebildeten Zielproduktes gemacht werden. Es werden mindestens 55 % des Zielproduktes im Laufe der Eintopf-Synthese ausgehend von ADP, Polyphosphat, Mannose, GTP und Phytanyl-Pyrophosphoryl-Chitobiose gebildet. Das Ergebnis

wurde nach präparativer Synthese von G2M und der Isolierung des Produktes im folgenden Abschnitt verifiziert (Abschnitt 4.4). Auf eine Optimierung der Ausbeute wird in Kapitel 5.3 näher eingegangen.

4.4 Präparative Synthese und Aufreinigung von Phytanyl-PP-Mannosylchitobiose

Ziel dieses Versuches war es, Phytanyl-PP-Mannosylchitobiose herzustellen, welche als Substrat für weitere Glykosyltransferase-Reaktionen (Alg2, OST) zur Verfügung gestellt werden sollten. In einem 100 mL-Reaktionsansatz nach Abschnitt 3.3.7 wurden 100 mg Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ (940 µM) und 61 mg GDP-Mannose (940 µM) eingesetzt. Die Proteinkonzentration der His₆-Alg1ΔTM betrug 0.049 mg/ mL (940 nM). Die Reaktionszeit betrug zwei Stunden. Nach 30 min war die Reaktion beendet, wie bereits in Abschnitt 4.3.1 gezeigt werden konnte. Nach Extraktion der Reaktionsprodukte wurden diese präparativ mittels RP-HPLC gereinigt (Abschnitt 3.3.7). Bei 50-54 % Laufmittel B eluierte Fraktion 1 (siehe Abb. 4-23), in welcher nach massenspektrometrischer Analyse mittels ESI-MS lediglich die Masse des Produktes Phytanyl-PP-Mannosylchitobiose (theoretisch $m/z = 1026.5$, gefunden $m/z = 1027.77$ $[M+H]^+$ und $m/z = 514.33$ $[M+2H]^{2+}$) detektiert werden konnte. Folgefraction 2 eluierte bei 54-57 % Laufmittel B. Hier konnte sowohl die Molmasse von Phytanyl-PP-Mannosylchitobiose als auch die Molmasse von Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ ($m/z = 864.4$) nachgewiesen werden. Weitere Fraktionen enthielten kein Produkt mehr.

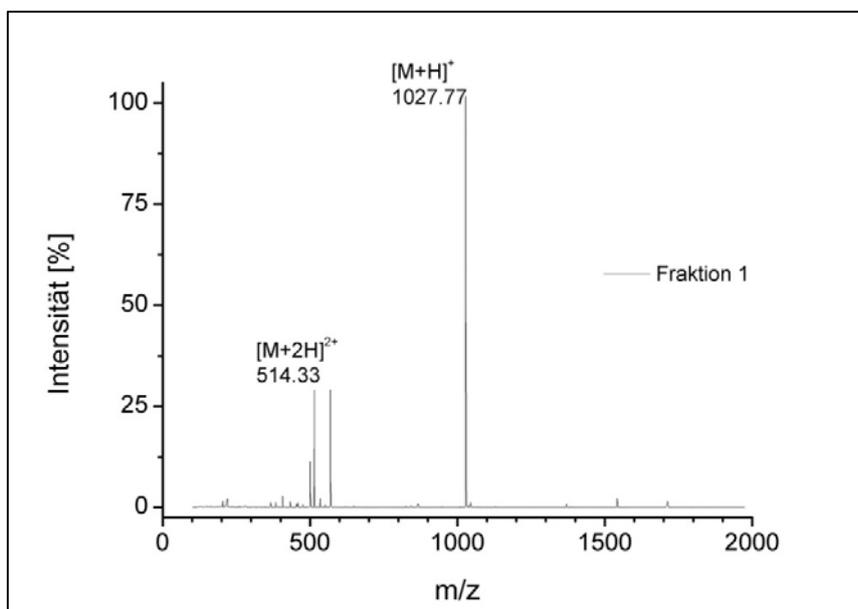


Abb. 4-23: Massenspektrometrische Analyse von Fraktion 1 nach präparativer HPLC des extrahierten His₆-Alg1ΔTM-Reaktionsansatzes. Detektion des Reaktionsproduktes Phytanyl-PP-Mannosylchitobiose, Masse berechnet: $m/z = 1026.5$, gefunden $m/z = 514.33$ und $m/z = 1027.77$ im positiven Ionisationsmodus. Analytik: HPLC-MS System (Dionex Softron GmbH, Germering, Deutschland) mit ASI-100 Autosampler, P-680 Pumpe, PDA-100 Photodiodenarray-Detektor, Single Quadrupol Massenspektrometer Surveyor MSQ mit ESI Ionisierungsquelle. Auswertung der Daten mittels Chromeleon Software (Version 6.6).

Nach Lyophilisation von Fraktion 1 konnten 61 mg Produkt gewonnen werden. Dies entspricht nach Einberechnung des Massenzuwachses einer Ausbeute von 51.3 %. Die Masse an Lyophilisat der Fraktion 2 betrug 27 mg. Die prozentuale Verteilung an Substrat und Produkt in Fraktion 2 wurde nicht weiter untersucht. Die isolierte, reine Substanz Phytanyl-PP-G₂M stellt den essentiellen Ausgangspunkt für den Aufbau der *core*-Einheit von *N*-Glykanen dar.

5 Diskussion

Im Zuge dieser Arbeit wurden Teile der Ergebnisse bereits vorveröffentlicht [194]. Speziell die Betrachtungen im Kapitel 5.1, über die *in vitro*-Synthese von GDP-Mannose, führten zu großen Teilen zu dieser Publikation. In Kapitel 5.2 wird anschließend die Synthese von Phyt-PP-G₂M und die enzymkinetische Charakterisierung der Alg1ΔTM diskutiert. Im Kapitel 5.3 folgt die Erörterung zur Eintopfsynthese von Phyt-PP-G₂M und in Kapitel 5.4 wird schließlich näher auf dessen Aufreinigung eingegangen.

5.1 Enzymatische Synthese von GDP-Mannose

Der Aufbau jeglicher Glykanstrukturen des Säugerstoffwechsels *in vivo* wird durch die Bereitstellung von neun Nukleotidzuckern gewährleistet. Diese Substrate der Leloir-Glykosyltransferasen sind Uridin 5'-diphospho- α -D-glucose (UDP-Glc), Uridin 5'-diphospho- α -D-glucuronsäure (UDP-GlcA), Uridin 5'-diphospho- α -D-galactose (UDP-Gal), Uridin 5'-diphospho-N-acetyl- α -D-galactosamin (UDP-GalNAc), Uridin 5'-diphospho-N-acetyl- α -D-glucosamin (UDP-GlcNAc), Guanosin 5'-diphospho- β -L-fucose (GDP-Fuc), Uridin 5'-diphospho- α -D-xylose (UDP-Xyl), Cytidin 5'-monophospho-N-acetyl- α -D-neuraminsäure (CMP-NeuAc) und Guanosin 5'-diphospho- α -D-mannose (GDP-Man). GDP-Mannose wird *in vivo* über die Biosynthesewege ausgehend von Mannose oder Fruktose-6-Phosphat (Abb. 5-1) gebildet [214].

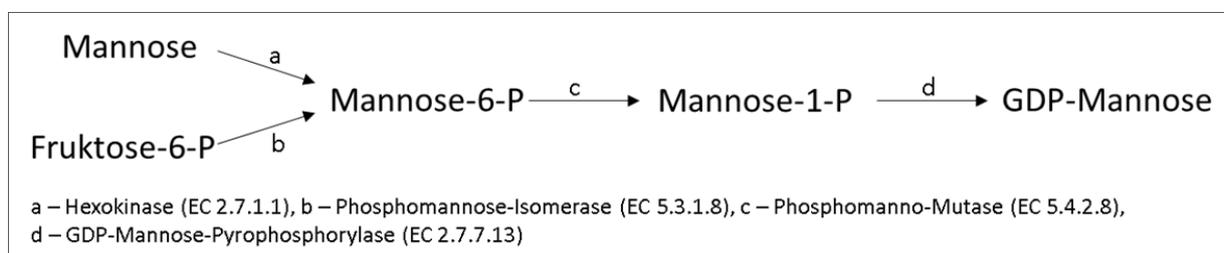


Abb. 5-1: Mögliche Biosynthesewege zur Bildung von GDP-Mannose

Zur enzymatischen Herstellung der GDP-Mannose sind in den letzten 50 Jahren verschiedene Verfahren entwickelt worden, einzelne Beispiele aus drei verschiedenen Dekaden sind in Tabelle 5-1 gezeigt. Anfängliche Bemühungen hatten die Bereitstellung des kommerziell nicht verfügbaren Nukleotidzuckers zum Ziel. GDP-Mannose wurde aufwendig in mutierten Mikroorganismen gebildet und aus deren Rohenzymextrakten in kleinen Ansätzen (0.5 μ mol) gewonnen. Durch Nutzung des Substrates [¹⁴C]Mannose konnte das Produkt GDP-[¹⁴C]Mannose mit einer Produktzunahme von 40 % nachgewiesen werden [215].

In einer Eintopf-Synthese mit drei Enzymen bestehend aus der Kinase NahK (*Bifidobacterium infantis*), GDP-Mannose-Pyrophosphorylase (*Pyrococcus furiosus*) und anorganischer Pyrophosphatase (*Escherichia coli*) konnten ausgehend von Mannose und GTP 94 % der Substrate umgesetzt werden [216]. Da NahK sowohl ATP als auch GTP als Substrat akzeptierte, wurde auf die zusätzliche Verwendung des Substrates ATP verzichtet, ungeachtet dessen, dass

ATP (Sigma Aldrich, A26209, 100 mg, 2.30 Euro) verglichen mit GTP weitaus günstiger kommerziell erhältlich ist. Die Kosten zum Erwerb von 100 mg GTP (Sigma Aldrich, G9002) liegen derzeit bei begrenzter Verfügbarkeit bei 175-280 Euro, was das beschriebene Produktionssystem in dieser Zusammensetzung recht teuer macht.

Aufbauend auf der Arbeit von Ritter zur enzymatischen Synthese von GDP- α -D-Mannose [202] veröffentlichten Pfeiffer und Kollegen [203] ein Kinase-unabhängiges System. Die Grundlage bilden vier rekombinant in *E. coli* hergestellte Enzyme. Das erste Enzym stammt aus *Leuconostoc mesenteroides*, alle anderen aus *E. coli*. Ausgehend von Saccharose und Phosphat werden durch die Sucrose-Phosphorylase Fruktose und Glukose-1-Phosphat gebildet. Glukose-1-Phosphat wird dann durch die katalytische Wirkung der Glukose-1-Phosphat-Phosphatase zusammen mit Mannose in Glukose und Mannose-1-Phosphat überführt. Aus Mannose-1-Phosphat und GTP entsteht mithilfe der GDP-Mannose-Pyrophosphorylase schließlich GDP-Mannose. Das Reaktionsgleichgewicht wird abschließend durch enzymatische Spaltung des inhibitorischen Nebenproduktes Pyrophosphat auf die Seite von GDP-Mannose verschoben. Im Reaktionsansatz von 4 mL wurden 70 % Umsatz bezogen auf die Startkonzentrationen von Saccharose und Phosphat gewonnen. Der Umsatz und die Reaktionsgeschwindigkeit sind abhängig von der eingesetzten GTP-Konzentration, dessen Startkonzentration durch einen 40-fachen Überschuss von Mannose minimiert werden kann. Im Reaktionsansatz wurde Glukose-6-P als unerwünschtes Nebenprodukt detektiert. Auch diese Synthese wurde durch den direkten Einsatz von GTP kostenaufwendig. Vorgeschlagene ATP-Regenerationssysteme mit Hilfe des hochpreisigen Phosphoenolpyruvates erscheinen ebenso wenig vielversprechend.

Tabelle 5-1: Mögliche Verfahren zur enzymatischen Synthese von GDP-Mannose (eine Auswahl)

Anzahl Enzyme ^c	Substrate	Ansatz Substrat	Reaktionszeit	Umsatz[%] ^{a,b}	Referenz
3 (crude extract)	[¹⁴ C]Mannose ATP, GTP	0.5 μ mol je 2 μ mol	2-3 Tage	60	[215]
5	GTP, ATP Mannose, PEP	5 mM, 2 mM 5 mM, 7.5 mM	72 h	80	[202]
2	Man-1-P GTP	1.2 mM 2.4 mM	10-50 h	60-95	[217]
3	Mannose GTP	15 mM 35 mM	24 h	94	[216]
4	Mannose, GTP Pi, Sucrose	400 mM, 100 mM je 140 mM	20 h	70	[203]
5	Mannose, PolyP ADP, GTP	2 mM, 1 mM je 500 μ M	3 h	80	Vorliegende Arbeit

^a Synthese-Umsatz ohne Aufreinigung des Produktes

^b Gesamtumsatz bezogen auf die Menge des ersten angegebenen Substrates

^c Gereinigte Enzyme, wenn nicht anders angegeben

Für einen wirtschaftlich rentablen Ansatz zur Synthese von GDP-Mannose sollten folgende Faktoren berücksichtigt werden: kostengünstige Ausgangsmaterialien, substratspezifische Enzyme ohne unerwünschte Nebenreaktionen sowie ein einfacher Systemaufbau, der es ermöglicht, das Produkt mit möglichst geringem Aufwand zu gewinnen. Als kostengünstiger Phosphatdonor bietet sich Polyphosphat an. Polyphosphate sind Polymere aus einer variablen Anzahl von Phosphatresten, die über energiereiche Phosphoanhydrid-Bindungen verknüpft sind. Amorphes Natrium-Polyphosphat wird industriell zur Vermeidung der Bildung ungewollter Kalziumsalze eingesetzt und ist bekannt als „Calgon“, was sich von *calcium gone* ableitet [191]. Polyphosphatkinasen (Ppk) katalysieren den reversiblen Transfer der γ -Phosphatgruppe von ATP auf anorganisches Polyphosphat (PolyP). Ppk1 Enzyme favorisieren die Synthese von PolyP. Bei Ppk2 Enzymen ist die NTP-Synthese begünstigt, wobei GDP als Substrat oft bevorzugt wird. Ppk2 Enzyme können zudem in Klasse eins, zwei und drei eingeteilt werden, woraus sich weitere Differenzierungen hinsichtlich der bevorzugten Substrate ergeben. Ppk-Enzyme aus Klasse eins bevorzugen Nukleosiddiphosphate, Klasse-zwei-Enzyme Nukleosidmonophosphate, von Klasse drei werden beide Substrate akzeptiert [218]. Die Enzyme eignen sich sowohl für Adenosin-, als auch für Guanosin-basierte Akzeptoren.

Grundlage für das hier aufgebaute System zur enzymatischen Synthese von GDP-Mannose ist die Arbeit von Koizumi und Kollegen aus dem Jahre 2000 [200]. Bei der Umsetzung von entstandener GDP-Mannose durch die katalytische Aktivität der Alg1 wird GDP als Nebenprodukt gebildet. Zwei Kinasen, die 1D-Ppk2 und die Ppk3, können die während der Reaktionen gebildeten Nukleosiddiphosphate ADP und GDP mit Polyphosphat als Phosphatdonor wieder in ATP und GTP überführen. Somit müssen Nukleotide nur in katalytischen Mengen eingesetzt werden. Es entsteht ein kostengünstiger Regenerationszyklus für das hochpreisige Donorsubstrat GDP-Mannose. Nach meiner Kenntnis ist dies der erste Ansatz, bei dem PolyP in ein Mehr-Enzym-Reaktionssystem mit Regeneration von GDP-Mannose eingesetzt wird.

5.1.1 Synthese von Mannose-6-P durch die Hexokinase Glk

Die Hexokinase His₆-Glk wurde wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben produziert und gereinigt [195, 201]. Aus 2 g BFM wurden 164 mg hochreines Enzym gewonnen, was im Vergleich mit bisherigen Produktionsmethoden einer 27-fach höheren Menge an Biofeuchtmasse entspricht [201]. Möglicherweise ist diese Erhöhung auf eine höhere Expressionsrate, bedingt durch eine höhere Konzentration des Induktors IPTG (1 mM statt 0.1 mM), zurückzuführen.

Glk katalysiert die Reaktion von Glukose und ATP hin zu Glukose-6-P und ADP. Neben Glukose akzeptiert das Enzym auch Mannose als Substrat. Es wird mehrfach beschrieben, dass die Umsatzrate für Mannose, verglichen mit Glukose, reduziert ist [195, 201]. Für die Glk aus *E. coli* beträgt die relative Umsatzrate für Mannose, verglichen mit Glukose, 7.6 % [196]. Die spezifische Aktivität für die Umsetzung von Mannose als Substrat wird für das Enzym abhängig vom entstammenden Organismus zwischen 0.9 und 35.7 U/ mg angegeben [219, 220, 221]. Aus

der vorliegenden Arbeit ergibt sich für die rekombinante, gereinigte His₆-Glc aus *E. coli* eine spezifische Aktivität von 0.018 U/ mg. Dieser Wert liegt deutlich unter den publizierten Werten für Homologe, Vergleichswerte für das *E. coli*-Enzym mit Mannose als Substrat sind aber nicht publiziert.

Humane Glukokinase zeigt eine positive Kooperativität bei steigenden Glukosekonzentrationen. Mechanistisch gesehen rotiert, nach Bindung von Glukose an eine zweite Bindestelle, der C-terminale Teil der Glukokinase um 99° hin zur N-terminalen Domäne des Enzyms. So entsteht ein kompakteres katalytisches Zentrum [222]. Die daraus resultierende erhöhte Aktivität kann durch erhöhte Affinität der Substrate (K_M) oder durch eine Beschleunigung der Reaktion (k_{cat}) hervorgerufen sein. Solche Mechanismen erlauben biologisch relevante, schnelle Antworten auf verschiedene Substratkonzentrationen im Körper. Die in dieser Arbeit in Abschnitt 4.1.2 beschriebenen Ergebnisse zeigen eine Abhängigkeit der Enzymaktivität der His₆-Glc aus *E. coli* von der Konzentration an Mannose im Ansatz. Für einen vollständigen Umsatz von ATP ist ein vierfacher Überschuss an Mannose notwendig. Dies könnte auf eine positive Kooperativität für das Enzym His₆-Glc aus *E. coli* mit Mannose hindeuten. Auch wenn die Sequenzidentität zwischen der *E. coli* Glc und humaner Hexokinase nur 18 % beträgt, so zeigt eine Überlagerung der dreidimensionalen Struktur der Enzyme, vor allem in der katalytischen Domäne, strukturelle Ähnlichkeit [201]. In der gleichen Publikation wird außerdem ein *induced fit* des Enzyms nach Bindung des Zuckerakzeptors beschrieben. Der recht hohe Bedarf an Enzym (2 mg/ mL) in der vorliegenden Arbeit lässt sich mit der geringen spezifischen Aktivität von 0.018 U/ mg begründen. Desweiteren liegt die optimale Reaktionstemperatur der *E. coli* Glukokinase von 30°C etwa 278 K (5°C) über dem Temperatur-Optimum, welches ebenfalls einen Einfluss auf die Umsatzrate hat. Da es Ziel der Reaktionen mit der His₆-Glc war, möglichst viel Mannose-6-P zu produzieren und die gewählten Bedingungen zu einem quantitativen Umsatz führten, wurden keine weiteren Optimierungen durchgeführt.

Zur späteren Prozessoptimierung könnte nach Bestätigung von positiver Kooperativität für die *E. coli* Glukokinase ein Surrogat eingesetzt werden. Surrogate sind strukturell ähnliche Verbindungen, die aber nicht als Substrat akzeptiert werden. Es sollte zu dauerhafter Bindung führen und das Enzym daher konstitutiv aktivieren. Vorstellbar wäre L-Mannose, welche nicht in biologischen Systemen und im Mannosemetabolismus vorkommt [223]. Voraussetzung hierfür wäre allerdings, dass L-Mannose nicht im aktiven Zentrum bindet. Ein weiterer Ansatz wäre eine Mutation an der Kooperativitäts-Bindestelle, um eine dauerhafte Aktivitätssteigerung zu bewirken.

Aus den vorliegenden Ergebnissen nach Katalyse durch die His₆-Glc wird weiter ersichtlich, dass das Reaktionsprodukt ADP ebenfalls, allerdings als weniger affines Substrat für die His₆-Glc fungiert. Dies äußert sich in einer schwachen Bildung von AMP. Eine solche Beobachtung wurde bisher nicht beschrieben. Da die Bildung von AMP bis zum quantitativen Umsatz von ATP nur etwa 5 % betrug, wurde dieser Aspekt nicht weiterverfolgt.

5.1.2 Co-Expression von ManC und ManB zur Synthese von GDP-Mannose

Die Phosphomannomutase ManB-His₆ und die Mannose-1-Phosphat-Guanyltransferase ManC wurden, wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben, *co*-exprimiert [200, 224]. In bisherigen Studien wurden beide Enzyme nur als Rohenzymextrakt zur Katalyse eingesetzt. Um Nebenreaktionen anderer Wirtsproteine zu umgehen, wurde eine Reinigungsstrategie basierend auf IMAC entwickelt. ManB-His₆ adsorbierte wie erwartet an dem Säulenmaterial und konnte anschließend durch Zugabe von Imidazol eluiert werden. Die nicht mit einer Affinitätsfusion versehene ManC *co*-eluierte mit der adsorbierten ManB-His₆. Diese Tatsache kann entweder durch intermolekulare Interaktionen (nichtkovalente Wechselwirkungen) beider Enzyme oder mit dem Vorkommen von 14 Histidinresten in der Aminosäure-Sequenz von ManC (siehe Anhang Abb. S-0-3) erklärt werden. Acht der Histidine liegen ungeachtet der dreidimensionalen Struktur im C-terminalen Bereich des Enzyms sehr nahe beieinander. Die zweite Erklärung scheint wahrscheinlicher, da die weniger spezifische Bindung der ManC an das Chromatografie-Material zu einer früheren Elution verglichen mit ManB-His₆ führt. Da beide Enzyme in der Eintopf-Synthese eingesetzt werden sollten, bestand für den katalytischen Reaktionseinsatz keine Notwendigkeit, die optisch reinen Enzyme zunächst zu separieren. Aus 3 g BFM konnten 74 mg ManCB-His₆ isoliert werden. Unter der Annahme, dass beide Enzyme zu gleichen Teilen in der Präparation vorkommen, betrug die Proteinkonzentration nach Zugabe von 50 % Glycerin 22.8 mg/ mL. Die Annahme basierte hierbei auf einer optischen Einschätzung nach SDS-Gelelektrophorese.

ManB katalysiert die Umlagerung von Mannose-6-Phosphat zu Mannose-1-Phosphat. ManC katalysiert die Reaktion von Mannose-1-Phosphat und GTP zu GDP-Mannose und Pyrophosphat. Der Verlauf der gekoppelten Reaktion zeigte zunächst bei allen gewählten Proteinkonzentrationen einen geringen Umsatz. Da Substrat und Produkt der Phosphomannomutase ManB mit dem gewählten Analytiksystem nicht detektiert werden konnten, kann über den Verlauf dieser Reaktion hier keine Aussage gemacht werden. Das Produkt Mannose-1-Phosphat wird aber der reversiblen ManB-Reaktion durch die ManC-Folgereaktion entzogen. Studien zur ManB aus *P. aeruginosa* kamen zu dem Ergebnis, dass das Enzym Glukose-1,6-bisPhosphat und Mg²⁺-Ionen als *co*-Faktoren benötigt, um den Transfer der Phosphatgruppe zwischen C₆ und C₁ des Zuckers zu realisieren [199, 225]. Die Reaktion von Mannose-6-Phosphat zu Mannose-1-Phosphat, katalysiert durch den verwendeten ManCB-His₆-Komplex, konnte ohne Zugabe von GTP unabhängig von der GDP-Mannose-Synthese-Reaktion untersucht werden. Dabei wurde festgestellt, dass ManB-His₆ kein exogenes Glukose-1,6-bisPhosphat benötigte, die Reaktion mit *co*-Faktor aber schneller verlief [194]. In Vorarbeiten zu dieser Publikation konnte zudem gezeigt werden, dass katalytische Mengen des *co*-Faktors Glukose-1,6-bisPhosphat als Phosphat-Donor/ -Akzeptor genügen. Im Konzentrationsbereich 50 µM bis 1 mM konnten keine wesentlichen Unterschiede in der Umsatzrate festgestellt werden.

Die gemessenen Reaktionsverläufe der ManCB-His₆ können beeinflusst sein durch die Reversibilität beider Reaktionen oder die literaturbekannte Produktinhibition von Pyrophosphat [217]. Die Rückreaktionen können durch Entzug des Produktes GDP-Mannose als Substrat für die Folgereaktion einer Glykosyltransferase im gekoppelten System verlangsamt oder gestoppt werden. Daher sollte auf diesen Einfluss nicht weiter eingegangen werden. Die Produktinhibition betreffend: ManB and ManC aus *Salmonella enterica* wurden in *E. coli* produziert und gereinigt [202, 217]. Dabei konnte eine kompetitive Inhibition der rekombinanten GDP-Man Pyrophosphorylase für GTP durch GDP-Mannose und eine unkompetitive Inhibition für Mannose-1-Phosphat durch GDP-Mannose gezeigt werden [226]. Um den Einfluss von Inhibitionen unter den gewählten Bedingungen beurteilen zu können, wurde die anorganische Pyrophosphatase PmPpA zur Spaltung des Nebenproduktes Pyrophosphat eingesetzt.

5.1.3 Beseitigung der Hemmung von ManCB-His₆ durch die Pyrophosphatase PmPpA

PmPpA-His₆ wurde in Anlehnung zur Literatur [204] produziert. Das Enzym wurde ausgewählt, da es in vorangegangener Studie bereits in einem Multi-Enzym-Ansatz mit einer Glykosyltransferase (β 1,4-Galaktosyltransferase) erfolgreich eingesetzt wurde [204]. In der vorliegenden Arbeit präzipitierte die PmPpA-His₆ während der Dialyse nach Reinigung und wurde daher in nicht-dialysierter Form in die Enzym-Assays eingesetzt. Aus 2 g BFM konnten 53 mg gereinigtes Enzym gewonnen werden. Die Endkonzentration nach Zugabe von 50 % Glycerin betrug 2.0 mg/ mL. PmPpA katalysiert die Hydrolyse von Pyrophosphat zu zwei Phosphat-Resten. Orthophosphat kann mittels eines colorimetrischen Tests, bei dem Ammonium-Molybdat anorganisches Phosphat komplexiert, nachgewiesen werden [227]. Das Enzym aus *P. multocida* wurde bisher nicht kinetisch charakterisiert. Initiale Studien bei 37°C, Pyrophosphat-Konzentrationen zwischen 15 und 225 μ M und einer Proteinkonzentration von 0.45 μ g/ mL (21 nM) der PmPpA-His₆ bestätigten die katalytische Wirksamkeit des Enzyms. Für die PmPpA ergibt sich aus den Einzeluntersuchungen eine spezifische Aktivität von 33.3 U/ mg. Dieses Ergebnis ist Teil der eigenen Publikation zur Synthese von GDP-Mannose [194]. Pyrophosphatasen (PPasen) sind obligate Komponenten aller lebenden Zellen. Pyrophosphat ist das Nebenprodukt vieler biochemischer Stoffwechselwege [228]. Da sich enzymatische Aktivitäten von homologen Enzymen aus unterschiedlichen Reichen des Lebens häufig unterscheiden, ist es nicht verwunderlich, dass die Aktivitäten für die PmPpA's von 0.0002 U/ mg bis 8000 U/ mg variieren (Brenda Datenbank Eintrag für EC 3.6.1.1). Membran-integrierte PPasen zeigen niedrige k_{cat} -Werte ($k_{\text{cat}} \approx 10 \text{ s}^{-1}$), die Aktivität der Familie 1 PPasen liegt etwa eine Größenordnung höher ($k_{\text{cat}} \approx 200 \text{ s}^{-1}$) und die der Familie 2 PPasen noch einmal eine Größenordnung höher ($k_{\text{cat}} \approx 2000 \text{ s}^{-1}$). Die Zuordnung zu den einzelnen Familien geschieht über den Grad der Inhibition gegenüber Fluorid und Aminomethylen-Diphosphonat (AMDP) [229]. Für die PmPpA aus *P. multocida* sind keine Inhibitionen durch Fluorid oder AMDP beschrieben und sie wurde bisher keiner der Familien zugeordnet. PmPpA-His₆ zeigt aber eine

Substratinhibierung durch Pyrophosphat mit einem K_i von 89.1 μM [194]. Für andere PPasen ist eine Substratüberschusshemmung nach eigenen Recherchen nicht beschrieben. Für die später relevante Eintopf-Synthese von GDP-Mannose mit gekoppelter Glykosyltransferase sollte die Inhibierung durch Pyrophosphat eine untergeordnete Rolle spielen, da gebildetes Pyrophosphat direkt hydrolysiert werden sollte. Es konnte weiter gezeigt werden, dass PmPpA Polyphosphat nicht hydrolysiert [230], was ebenfalls wichtig für die gekoppelten Synthese ist.

Durch Zugabe der PmPpA-His₆ zur Reaktion, katalysiert durch ManCB-His₆, wurden 87 % GDP-Mannose bezogen auf die eingesetzte Menge an GTP (500 μM = 100 %) gebildet (Abb. 4-6). Bei etwa 11 % Verunreinigung an GDP des verwendeten GTP und 2 % verbleibendem GTP nach der Reaktion zeigt diese Untersuchung eine Bilanzierung von 100 %. Die GDP-Mannose-Synthese ist somit direkt abhängig von der Umwandlung von entstehendem Pyrophosphat zu Orthophosphat. Eine Inhibierung durch GDP-Mannose, wie sie für *S. enterica* beschrieben wurde [226], scheint für die *E. coli* Enzyme ManCB-His₆ demnach nicht zuzutreffen. Die PmPpA aus *P. multocida* wurde auch bei der enzymatischen Synthese von UDP-Glukose eingesetzt. Leider fehlt hier jedoch der Vergleich der Umsätze mit und ohne Enzym, um den Einfluss des inhibitorischen Pyrophosphates zu zeigen [204]. Für den ManCB-His₆ Komplex war die Reaktionsgeschwindigkeit mit PmPpA vierfach erhöht, verglichen mit der Reaktion ohne PmPpA (unter der Annahme, beide Enzyme liegen zu gleichen Teilen in der Präparation vor, würden „spezifische Aktivitäten“ von 14.6 U/ mg für die Reaktionen ohne PmPpA und 55.9 U/ mg für die Reaktionen mit PmPpA resultieren). Ein Vergleich mit anderen Aktivitätsdaten zur ManB und ManC ist aufgrund des hier vorliegenden Enzymgemisches nicht möglich.

5.1.4 ATP/GTP-Regenerierung durch die Kinasen 1D-Ppk2 und Ppk3

Für die vorliegende Arbeit wurde His₆-1D-Ppk2 nach Literaturangaben [190] produziert. Während der Expression der His₆-1D-Ppk2 bei 37°C konnte die Bildung von bisher nicht beschriebenen unlöslichen *inclusion bodies* beobachtet werden. Durch Absenken der Anzuchttemperatur auf 24°C nach Induktion konnte der Anteil an löslichem Enzym erhöht werden. Für die Reinigung der His₆-1D-Ppk2 wurden dem Puffer in Anlehnung an die Literatur zur Stabilisierung des Enzyms 0.5 % Glycerin zugesetzt [209]. HEPES wurde durch Tris ersetzt, da dies auch das Puffersystem während der enzymatischen Reaktionen darstellte. Durch Zugabe von 10 mM Imidazol in den Äquilibrierpuffer der IMAC konnte durch Vermeidung unspezifischer Bindungen eine höhere Reinheit erzielt werden. Nach Affinitäts-Reinigung und Konzentration wurde eine His₆-1D-Ppk2 Konzentration von 0.6 mg/ mL in Anwesenheit von 50 % Glycerin erhalten. Oberhalb dieser Konzentration präzipitierte das Enzym. Es wurde beschrieben, dass 2 mM Polyphosphat die Ppk2 stabilisieren ([231]). Polyphosphat scheint sich demzufolge auf die Thermostabilität im untersuchten Bereich bis 50°C auszuwirken. Die Ursache dessen liegt in der Konformation. Ppk2 bildet Tetramere und in Anwesenheit von PolyP Oktamere. PolyP wurde in der erwähnten Publikation auch während der Reinigung zugegeben. Es ist wahrscheinlich, dass die Zugabe von PolyP das Enzym vor Präzipitation schützt, da eine Präzipitation hier nicht

erwähnt wird [231]. Diese Überlegung sollte in zukünftigen Präparationen mit einbezogen werden. Aus 2.7 g BFM wurden 48 mg gereinigtes Enzym gewonnen.

His₆-Ppk3 wurde in Anlehnung an die Literatur [207] wie unter Abschnitt 4.1.4 angegeben produziert. Die Zugabe von 5 mM Imidazol zum Äquibrierpuffer der IMAC während der Affinitätsreinigung konnte, wie zuvor für die His₆-1D-Ppk2 beschrieben, den Reinheitsgrad des Enzyms erhöhen. Die His₆-Ppk3 wurde, wie die His₆-1D-Ppk2, aufgrund massiver Präzipitationen als nicht-dialysiertes Enzym eingesetzt. In der Literatur und in der vorliegenden Arbeit zeigt sich das Protein in der SDS-PAGE nach Affinitäts-Reinigung als Monomer [191], über seine 3D-Struktur gibt es keine Daten. Aus 4 g BFM konnten 89 mg Enzym gereinigt werden. Die finale Proteinkonzentration der His₆-Ppk3 betrug 3.7 mg/ mL in 50 % Glycerin.

Die His₆-1D-Ppk2 aus *P. aeruginosa* und die His₆-Ppk3 aus *R. pomeroyi* katalysieren die Synthese von ATP und GTP ausgehend von ADP bzw. GDP und Polyphosphat als zweitem Substrat. Das Enzym 1D-Ppk2 ist kinetisch gut charakterisiert [206, 231]. Die Phosphorylierungsreaktionen von ADP und GDP durch die His₆-1D-Ppk2 sind Gleichgewichtsreaktionen [194]. Bereits frühere Untersuchungen konnten eine Reversibilität feststellen, für die Ppk2 ist die Nutzung von PolyP als Substrat 75x schneller, als die Synthese von PolyP [206]. In andere Arbeiten konnten keine Dephosphorylierung von ADP oder ATP als Phosphatdonor in Anwesenheit von PolyP beobachten werden [190]. Für die Ppk3 wird keine Reversibilität gezeigt, da das Enzym einen Umsatz von 100 % zeigt [207]. Die Ppk3 wurde sowohl in aktiven *inclusion bodies* als auch als StreptII-Ppk3 kinetisch charakterisiert [191, 207]. Aktive *inclusion bodies* bedeutet: Expression der Ppk3 mit einem Cellulose Binding Domain (CBD_{clos}) - tag aus *Clostridium cellulovorans*. Der CBD_{clos} - tag führt unter den gewählten Expressionsbedingungen zur Selbstaggregation, während die nativ gefaltete Ppk3 weiterhin enzymatische Aktivität zeigt [207].

In Vorbereitung auf die enzymatischen Assays waren auch Informationen zur bevorzugten Kettenlänge an Polyphosphat als Substrat der beiden Enzyme von Interesse. Polyphosphate sind lineare Polymere, die mehrere hundert Phosphatreste, verknüpft über energiereiche Phosphorsäureanhydrid-Bindungen (wie bei ATP), umfassen können [232]. Ppk2 akzeptiert Polyphosphate mit mittleren Kettenlängen von 15-750 Phosphatresten, für die Richtung der PolyP-verbrauchenden Reaktion werden aber kürzere Kettenlängen (PolyP₁₅) bevorzugt. Nach enzymatischer Katalyse konnten keine verschiedenen Zwischenlängen der jeweiligen PolyP-Substrate detektiert werden, was eine hoch prozessive Reaktion vermuten lässt [206, 231]. Prozessive Enzyme assoziieren nur einmal mit ihrem Substrat und katalysieren danach eine Reihe von Reaktionen. Diese effiziente Katalyse ist sehr typisch für polymere Substrate [233]. Auch für die Ppk3 wird die Katalyse mit PolyP₁₅ als Substrat gezeigt [207]. In der vorliegenden Arbeit wurde PolyP mit einer mittleren Kettenlängenverteilung von 9-18 Phosphatresten verwendet.

Beim Vergleich der beiden Polyphosphatkinasen His₆-1D-Ppk2 und His₆-Ppk3 in Bezug auf die Bildung an ATP zeigt sich, dass die His₆-Ppk3 im Konzentrationsbereich 0.01-0.05 mg/ mL einen mindestens dreifach höheren Umsatz (etwa 60 %) als die His₆-1D-Ppk2 erreicht (Abb. 4-8). Bei

der Analyse der His₆-Ppk3-Reaktion konnte allerdings ab einer Proteinkonzentration von 0.025 mg/ mL ein zusätzliches Produkt, welches mit AXP bezeichnet wurde, detektiert werden. AXP eluierte während der HPLC-Analytik kurz nach ATP, während ADP vor ATP eluierte. Die Substanz verhält sich also hydrophiler als ADP und ATP. Demnach entspräche die Reihenfolge der Elution von ADP, ATP und AXP der Anzahl Ionenpaar-bindender Phosphat-Gruppen bei der IPC, wenn AXP ein Tetra-Phosphat wäre. Aufgrund des Elutionsverhaltens von AXP und der Möglichkeiten, gegeben durch die Substrate und die Enzymspezifität, wurde vermutet, dass hier ein Nucleosidtetraphosphat gebildet wurde. Diese Vermutung wurde durch massenspektrometische Analyse bestätigt (Abb. 4-8 E). Da für die His₆-Ppk3 bisher keine Reversibilität der Reaktion gezeigt wurde [207], würde demnach eine Bildung von Tetraphosphat mit diesem Enzym ausscheiden. Die physiologische Rolle der Tetraphosphate ist nicht abschließend geklärt. Nucleosidtetraphosphate kommen zum Beispiel in Hefen vor, hier bilden Phosphoglycerat-Kinasen aus 1,3-bisPhosphoglycerat und ATP oder GTP Adenosin-Tetraphosphate bzw. ppppG [232]. In Prokaryonten kommen Tetraphosphate zum Beispiel in Form von ppGpp vor. Es wird in verschiedenen Stresssituationen gebildet und daher auch als „Alarmon“ bezeichnet. Es spielt zum Beispiel eine Rolle bei der Inhibierung der RNA-Synthese unter Aminosäurelimitation [234, 235]. Beim menschlichen Herzmuskel konnte Adenosintetraphosphat *in vitro* Gefäßverengungen (Vasokonstriktion) dosisabhängig induzieren. Es wird als endogener extrazellulärer Vermittler für die Regulation der Durchblutung der Herzkranzgefäße diskutiert [236].

In der vorliegenden Arbeit zeigte aus *E. coli* gereinigte His₆-Ppk3 neben der Dephosphorylierung von PolyP ebenfalls einen Transfer von Pyrophosphatgruppen auf GDP, wobei lineares Guanosin-Tetraphosphat gebildet wurde. PpppG wurde dabei nicht aus GTP, sondern nur aus GDP gebildet. Somit ist theoretisch auch die Bildung eines ppGpp möglich. Die vorrangige Reaktion von PolyP und GDP zu GTP unter Transfer eines Orthophosphat-Restes betrug etwa 90 %, die Produktion von ppppG 10 %. Beim Einsatz einer geringeren Proteinkonzentration von 0.01 mg/ mL His₆-Ppk3 konnte keine NXP-Bildung detektiert werden (Abb. 4-8 C). Der Umsatz an ADP betrug hier etwa 40 %.

Für die 1D-Ppk2 aus *P. aeruginosa* wurde eine Aktivierung/ Stabilisierung des Enzyms bei steigenden Polyphosphat-Konzentrationen beschrieben [231]. Allerdings konnte auch eine Inhibierung bei Konzentrationen größer als 6 mM PolyP gezeigt werden [194]. Bei den Veröffentlichungen zur Ppk3 wird konsequent mit einem Überschuss an PolyP gearbeitet, zur Begründung heißt es: „5 mM PolyP und 1 mM NDP entsprechen den physiologischen Bedingungen des Enzyms“ [191, 207]. Unter Verwendung von verschiedenen erhöhten Startkonzentrationen an PolyP₁₄ konnte unter den gewählten Bedingungen für die eigene His₆-1D-Ppk2 eine leichte Aktivierung der Katalyse beobachtet werden. Bei weiterer Erhöhung der Konzentration an PolyP₁₄ trat eine Inhibierung ein, die durch Zugabe von Magnesiumsalz teilweise aufgehoben werden konnte (Abb. 4-9). Für die His₆-Ppk3 zeigte sich ein gegenteiliger Effekt. Durch Zugabe erhöhter Konzentrationen von PolyP₁₄ zum Reaktionsansatz wurde die

Aktivität drastisch herabgesetzt. Die zusätzliche Erhöhung der Magnesiumionen-Konzentration konnte diesen Effekt teilweise ausgleichen.

Nachfolgend werden Untersuchungen zur Substratspezifität der beiden Kinasen vorgestellt. Um den Reaktionsverlauf, speziell der His₆-1D-Ppk2, besser verfolgen zu können, wurde eine Proteinkonzentration von 0.5 mg/mL gewählt. Da bei der Regeneration des Glykosyltransferase-Substrates GDP-Mannose sowohl GDP als auch ADP entstehen, welche anschließend wieder zu Nucleosidtriphosphaten aufgebaut werden müssen, wurden nur ADP und GDP als Substrate der Kinasen getestet. Die His₆-1D-Ppk2 akzeptiert ADP und GDP als Substrat, dabei wird GDP etwa doppelt so schnell umgesetzt (Abb. 4-10 B). Dieses Ergebnis entspricht den Aussagen früherer Beobachtungen zur 1D-Ppk2 aus *P. aeruginosa*. Ishige *et al.* 2002 [231] geben eine 1.1x erhöhte Substratbevorzugung von GDP gegenüber ADP an. Dies spiegeln auch die erhaltenen Aktivitäten von 500 U/ mg für GDP und 460 U/ mg für ADP wider. Die Reaktionsbedingungen (50 mM HEPES-KOH pH 8.0, 80 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM MgCl₂, 0.1 % CHAPS, 1 mM GDP und 3 mM PolyP₁₅) unterscheiden sich allerdings von denen der eigenen Ansätze [231]. Für die His₆-Ppk3 konnte gezeigt werden, dass das Enzym GDP und ADP gleichermaßen schnell umsetzt (Abb. 4-10 C), allerdings wird wesentlich mehr GTP als ATP an Produkt gebildet. Dies liegt an der unterschiedlichen Menge an gebildeten Nucleosid-Tetraphosphaten. Es konnte eine 4-fach höhere Menge an AXP bezogen auf GXP detektiert werden. Vergleichswerte lassen sich in der Literatur nicht finden. Unter ähnlichen Reaktionsbedingungen, jedoch bei höheren Substratkonzentrationen und mit 15-fachem Überschuss an PolyP wird keine Bildung von Tetraphosphaten beschrieben [207]. Die verschiedenen Aktivitäten des Enzyms für die unterschiedlichen Substrate (ADP 3.8 U/ mg, GDP 4.6 U/ mg, CDP 9.5 U/ mg, UDP 9.2 U/ mg) weisen aber ebenfalls auf eine Bevorzugung von GDP gegenüber ADP hin [207]. In den eigenen Messungen wurden folgende Aktivitäten bestimmt: für die His₆-1D-Ppk2 für ADP 0.09 U/ mg und für GDP 0.10 U/ mg sowie für die His₆-Ppk3 für ADP 1.04 U/ mg und für GDP 1.31 U/ mg. Auch hier wird von beiden Enzymen GDP gegenüber ADP als Substrat leicht bevorzugt. Im Vergleich mit den publizierten Aktivitäten zur 1D-Ppk2 (s. o.) sind die Aktivitäten der eigenen 1D-Ppk2-Präparationen gering. Dies kann zum einen an den bestehenden Problemen der Präzipitation mit Aktivitätsverlust während der Reinigung des Enzyms liegen, aber auch das enthaltene Imidazol kommt als Einflussfaktor in Frage. Zudem wurden mit 20 mM Tris/ HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.25 % Triton X-100 bei T= 30°C andere Reaktionsbedingungen gewählt, die speziell an die Multi-Enzym-Reaktionen angepasst wurden und nicht geändert werden sollten. Für die His₆-Ppk3 wurden ähnliche Aktivitäten wie in der Literatur angegeben erhalten, auch wenn unter nicht physiologischen Bedingungen die gemessenen Werte variieren können. Für StreptII-Ppk3 wird weiter angegeben, dass Ca²⁺-Ionen die Aktivität des Enzyms weiter steigern können [207].

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wurde die His₆-Ppk3 als die geeignetere Kinase für den Einsatz in der Multi-Enzym-Reaktion eingeschätzt. Da nicht abschließend geklärt werden konnte, ob AXP bzw. GXP als Substrat in der GDP-Mannose Regenerations-Reaktion akzeptiert wird,

wurde die Proteinkonzentration der His₆-Ppk3 so gewählt, dass möglichst kein Tetraphosphat gebildet wird. Bei einer Konzentration von 0.01 mg/ mL wurde kein AXP im Reaktionsverlauf detektiert, bei 0.025 mg/ mL wurden 16 % AXP neben 55 % ATP gebildet. Für die Mehrfach-Reaktion wurden daher 0.02 mg/ mL His₆-Ppk3 eingesetzt.

5.1.5 Eintopf-Reaktion zur Bildung von GDP-Mannose

Gekoppelte Enzymsysteme haben drei Vorteile: Durch nachfolgende Reaktionen werden höhere Umsatzraten bei reversiblen Reaktionen erreicht, da ein Reaktionsprodukt dem Gleichgewicht entzogen wird. Inhibierungen durch erhöhte Substrat- oder intermediäre Produktkonzentrationen werden durch Folgereaktionen vermieden und es entfällt die oft mit Verlusten verbundene Isolation der involvierten Zwischenprodukte. Im Fall der vorliegenden Arbeit wäre dies der Nukleotidzucker GDP-Mannose. Durch Optimierung der Einzelreaktionen entstand, nach Kombination der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme, ein Regenerationszyklus für das hochpreisige Produkt GDP-Mannose.

Zunächst wurde eine Eintopf-Reaktion ausgehend von Mannose, ATP und GTP unter Einsatz der Enzyme His₆-Glk, ManCB-His₆ und His₆-PmPpA durchgeführt (Abschnitt 4.1.3). Dabei konnte ein Umsatz durch die His₆-Glk unter vollständigem Substratverbrauch detektiert werden. Für die Folgereaktion der ManB-His₆ konnten mit der gewählten Detektionsmethode weder Substrat noch Produkt identifiziert werden. Da aber in der dritten Reaktion die Katalyse der ManC zum gesamten Verbrauch des Substrates GTP führte, kann davon ausgegangen werden, dass auch die zweite Reaktion (ManB) quantitativ verlief. Nach Beendigung der Eintopf-Synthese zeigte sich neben einer Produktzunahme von 68 % an GDP-Mannose auch die unerwartete Bildung von 39 % an GDP. Da diese in der einzelnen Reaktion der ManCB-His₆ so nicht beobachtet werden konnte, sollte es sich hier nicht um eine dephosphorylierende Nebenreaktion der ManCB-His₆ handeln. Die Ergebnisse sprechen eher für eine Akzeptanz von GTP als Substrat der His₆-Glk. Für Glukokinasen aus *E. coli* sind in der Literatur Hinweise auf die Nutzung von GTP als Substrat zu finden [237]. Rekombinante Glk aus *T. maritima*, produziert in *E. coli*, zeigt eine 8-fach erniedrigte Umsatzgeschwindigkeit (bezogen auf V_{max}) von GTP verglichen mit ATP [238] und Glk aus *Bacillus stearothermophilus* eine 3-fache Verminderung [239]. Die quantitative Umsetzung von ATP in dem hier beschriebenen Versuch zeigt ebenfalls eine klare Bevorzugung von ATP gegenüber GTP. Da im folgenden Versuch die Eintopf-Reaktion zusätzlich mit der Kinase His₆-Ppk3 zur Regeneration von ADP und GDP kombiniert werden sollte, wurde an dieser Stelle die Nebenreaktion nicht weiter untersucht. Eine separate Betrachtung der Substratspezifität der hier verwendeten Glk aus *E. coli* W3110 sollte den Neuheitswert der gemachten Beobachtung besser beschreiben. In Bezug auf erste Vorarbeiten zu dieser Eintopf-Synthese konnte eine Steigerung der Produktzunahme an GDP-Mannose durch Optimierung der Einzelreaktionen von 22 % auf 68 % erreicht werden.

Für die Multi-Enzym-Reaktion zur Bildung von GDP-Mannose ausgehend von ADP, Polyphosphat, Mannose und GTP wurden die als optimal ermittelten Bedingungen der

Reaktionen aus Abschnitt 4.1.2 bis 4.1.3 mit denen der His₆-Ppk3 aus Abschnitt 4.1.5 kombiniert. Es wurden jeweils 500 µM der Substrate ADP und GTP, 2 mM Mannose sowie 1 mM PolyP eingesetzt. Da PolyP für die Phosphorylierung von ADP und GDP Einsatz fand, wurde die Konzentration von Polyphosphat im Vergleich zu den Substraten ADP und GDP erhöht. Eine Verzögerung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Inhibierung des Enzyms His₆-Ppk3 durch die erhöhte PolyP-Konzentration wurde in Kauf genommen. Der *co*-Faktor Glukose-1,6-bisPhosphat wurde mit einer Konzentration von 100 µM eingesetzt. Die Konzentrationen der einzusetzenden Enzyme betragen: His₆-Glc 2 mg/ mL, ManCB-His₆ 1 mg/ mL, PmPpA-His₆ 0.025 mg/ mL und 0.02 mg/ mL His₆-Ppk3. Den theoretischen Startpunkt der Eintopf-Reaktion beschreibt die Reaktion der His₆-Ppk3. Zunächst muss dabei ADP mit Hilfe von PolyP zu ATP phosphoryliert werden, um das *co*-Substrat der Zweitreaktion bereitzustellen. Das Chromatogramm in Abb. 4-11 B zeigt in den ersten zehn Minuten der Reaktion sowohl eine Abnahme an ADP als auch eine Zunahme an ATP. Die darauffolgende Konstanz der Werte ist wahrscheinlich auf die einsetzende kontinuierliche Regeneration des Adenosindinukleotids zurückzuführen. Wie beabsichtigt ist bei der gewählten Proteinkonzentration von 0.02 mg/ mL an His₆-Ppk3 keine Bildung von Adenosin- bzw. Guanosintetraphosphat zu verzeichnen. Werden die Daten für den Anfangsbereich der Reaktionsverläufe für GTP und GDP betrachtet, fällt auf, dass bereits zu Beginn der Multi-Enzym-Reaktion GTP verbraucht und GDP generiert wird. Dies kann nur auf eine enzymatische Aktivität der His₆-Glc zurückzuführen sein, was die Annahmen aus der vorhergehenden Reaktion bestätigt. Die Bildung an GDP ist in dieser Reaktion sogar noch gesteigert, da das Konkurrenzsubstrat ATP erst gebildet werden muss. GDP, welches auch als 10 %-ige Verunreinigung in GTP enthalten ist, wird zunächst gebildet und anschließend als bevorzugtes Substrat (ADP 1.04 U/ mg, GDP 1.31 U/ mg, siehe Abschnitt 5.1.4) der His₆-Ppk3 wieder phosphoryliert, was den Abfall der Gesamtmenge an GDP im Zeitraum 30 min bis 120 min erklärt. Ein Einsatz von GDP statt GTP zu Reaktionsbeginn wäre zu überlegen, um eine verzögerte Bereitstellung von GTP zu erhalten. So würde die His₆-Glc zunächst wie gewünscht gebildetes ATP zur Bildung von Mannose-6-P nutzen. Alternativ könnte das spätere Zuführen von GTP zum Reaktionsansatz zu einem bevorzugten Umsatz von ATP durch die Glk führen. Da GTP weder das natürliche, noch das bevorzugte Substrat der Glk ist, sollte ATP bereits als Substrat im Reaktionsansatz vorliegen bzw. gebildet worden sein, bevor GTP als Substrat zur Verfügung steht. Auf diese Weise kann GTP direkt in der gewünschten ManC-katalysierten Reaktion umgesetzt werden. Auch sukzessive Zugaben von Enzymen oder Substraten können den Umsatz deutlich steigern [216]. Durch Erniedrigung der Start-Konzentration an UDP im Falle der UDP-GlcA Regeneration bei der Produktion von HA-Polymer (Hyaluronsäure) konnte die Länge des Polymers bei zusätzlich kürzerer Reaktionszeit erhöht werden. [240]. Weiter zeigt sich ein direkter Einfluss des Verhältnisses der Substrate auf die Produktlänge. Für weiterführende Arbeiten zu dem eigenen Regenerationssystem könnten kinetische Modelle und Simulationen verschiedener Verhältnisse an GTP/ GDP und ATP/ ADP in den Reaktionen zu besseren Ergebnissen führen. Suboptimale Substratkonzentrationen führen ebenfalls zu niedrigen

Enzymaktivitäten. Multi-Enzym-Reaktionen können also auf zwei verschiedene Weisen kontrolliert werden: 1. durch Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit durch die Mengen an eingesetztem Enzym (Proteinkonzentration) und 2. durch Variation der Konzentrationen der Substrate und *co*-Faktoren. Bei der Eintopf-Synthese von UDP-Galaktose, ebenfalls einem System aus 5 Enzymen, konnte durch die Erhöhung der Konzentration des ATP-regenerierenden Enzyms Acetatkinase eine Ausbeute von 95 % nach 7 h Reaktionszeit erreicht werden [241]. Eine Erhöhung der Ppk3- (welche zwei Nukleotide regenerieren soll) und der Glukokinase-Konzentration im vorliegenden Reaktionssystem wären weitere Optionen. Das Anheben der Glukokinase-Konzentration würde zudem einer, hier nicht überprüften, Inhibierung entgegenwirken. Für die Hexokinase aus *Rhipicephalus microplus* (Zecke) wurde eine Inhibierung des Enzyms durch Polyphosphate beschrieben [242]. Aufgrund der mannigfaltigen beobachteten Einflüsse der Glk aus *E. coli* W3110 in der beschriebenen Eintopf-Reaktion wäre ein Austausch des Enzyms durch eine Hexokinase, welche nachweislich nicht GTP als Substrat akzeptiert, ratsam. Hexokinasen (EC 2.7.1.1) zeigen eine weniger stringente Substratspezifität [243, 244] und wären daher eher ungeeignet. Nach ersten Recherchen zeigt sich allerdings auch, dass Glukokinasen (EC 2.7.1.2), welche GTP nicht akzeptieren, in der Regel auch Mannose nicht als Substrat umsetzen [245, 246] und umgekehrt akzeptieren Glukokinasen, welche Mannose akzeptieren, auch GTP [247]. Die Glukokinase aus *Lycopersicon esculentum* setzt Mannose effektiv als Substrat um und zeigt nur eine geringe Aktivität in Anwesenheit von GTP, leider zeigt sie aber eine ausgeprägte Produktinhibierung ($K_i=36 \mu\text{M}$) gegenüber ADP [248]. Eventuell könnte mit einer Mannose-GTP-akzeptierenden Glukokinase auch der enzymatisch katalysierte Schritt mit ATP komplett ausgelassen und durch GTP-Nutzung ersetzt werden. Eine interessante Alternative bietet sich mit der Polyphosphat-abhängigen Glukokinasen All1371. Die PP-Glk aus dem Cyanobakterium *Anabaena spec.* nutzt ausschließlich PolyP (hier PolyP₄₅) als Phosphatdonor und phosphoryliert auch Mannose [249]. Durch Zuhilfenahme der PP-Glk würde auch die hier beobachtete leichte Nebenproduktbildung an AMP umgangen werden.

Für die in dieser Arbeit verwendete Ppk3 aus *R. pomeroyi* ist die Akzeptanz von AMP als Substrat nicht beschrieben, auch das Chromatogramm aus Abb. 4-11 B lässt vermuten, dass AMP nicht phosphoryliert wird. Motomura *et al.* teilen Polyphosphatkinasen in drei Klassen ein. In dieser Einteilung phosphorylieren Klasse I Ppk2 Nukleosiddiphosphate und Klasse II Ppk2 Nukleosidmonophosphate, während Klasse III Ppk2 beide Aktivitäten aus Klasse I und II besitzen. Nach dieser Klassifizierung wird die Ppk3 aus *R. pomeroyi* zu Klasse I zugeordnet und besitzt somit keine Nukleosidmonophosphat-katalytischen Eigenschaften. Beispiele für Enzyme aus Klasse III sind die Ppk2 aus *M. ruber*, *M. silvanus*, *D. geothermalis*, *D. radiodurans* und *T. elongatus* [250].

Für die ManC (aus *P. furiosus*) katalysierte Reaktion wurde von Mizanur und Kollegen neben GTP auch ein Nukleotidyltransfer von ATP auf Mannose-1-P, resultierend in ADP-Mannose, beobachtet [251]. Dieses Nebenprodukt wurde in der hier analysierten Eintopf-Reaktion nicht detektiert. Die meisten bakteriellen Mannose-1-P-Guanyltransferasen zeigen eine höhere

Affinität zu Mannose-1-P als zu GTP, daher könnte die Bindung von GTP den limitierenden Schritt in dieser Reaktion aufzeigen [252].

Die Multi-Enzym-Reaktion zeigte nach 120 min Reaktionszeit 66 % GDP-Mannosebildung. Der Anteil an durch die Glk gebildetem GDP ist zunächst nach 30 min mit etwa 60 % sehr hoch. Nach 120 min Reaktionszeit mit Regeneration von GDP zu GTP durch die Ppk3 verbleiben nur noch 25 % GDP. Dies ist etwas geringer als in der Reaktion ohne His₆-Ppk3. Da die hier gezeigte Fünf-Enzym-Reaktion noch keinen Abschluss der Bildung an GDP-Mannose aufwies, wurden weitere 60 Minuten Reaktionszeit analysiert (Abb. 4-21 C). Nach 180 min Reaktionszeit können 80 % GDP-Mannose (bezogen auf die eingesetzte Mannose), 12 % GDP und 17 % AMP detektiert werden. Die Konzentrationen an ADP und GDP sinken weiter, was darauf hindeutet, dass PolyP noch nicht in limitierenden Konzentrationen vorhanden ist. Dies weist darauf hin, dass sowohl das ATP- als auch das GTP-regenerierende-System effektiv nebeneinander unter den gewählten Bedingungen arbeiten.

Andere Multi-Enzym-Systeme zur Bildung von Nukleosiddiphosphaten zeigen Umsätze bis zu 95 % [202, 203, 216, 241], allerdings benötigen diese Reaktionssysteme mehrere Stunden, um das Ergebnis zu erreichen. Unter diesem Aspekt kann das hier entwickelte Eintopf-System zur Bildung von GDP-Mannose als überaus erfolgreich eingestuft werden.

5.2 Alg1-katalysierte Synthese von Phytanyl-PP-Mannosylchitobiose

His₆-Alg1ΔTM_{opt} wurde in Anlehnung zur Literatur [166, 169] mit der Sequenz aus *S.cerevisiae* in *E. coli* rekombinant produziert. Die His₆-Alg1ΔTM_{opt} besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 52 kDa. Während der Reinigung des Enzyms mittels Affinitäts-Chromatografie war eine strikte Anwesenheit des Detergenz Triton X-100 erforderlich, um eine Bindung an das Chromatografie-Material zu gewährleisten. Wie aus Abb. 4-13 ersichtlich ist, konnten während der Reinigung zwei Banden erhalten werden, die nach Trennung mittels SDS-PAGE eine Größe von ca. 45 und 100 kDa aufwiesen. Nach Analyse der Proteine aus den SDS-Gel-Banden mittels LC-ESI-MS konnten diese eindeutig der Alg1 zugeordnet werden, wobei die größere Bande dem Dimer entspricht (Abb. S-0-13, Anhang). Dimere können nach SDS-Gelelektrophorese sichtbar werden, wenn die Reduktionskraft des Reduktionsmittels nicht ausreicht, um Disulfidbrücken zu trennen. Außerdem wurde beschrieben, dass Reoxidationsprozesse während der SDS-PAGE zu artifiziellen Dimeren führen können [253, 254]. Frühere Untersuchungen mittels co-Immunopräzipitation zu diesem Enzym konnten zeigen, dass die Alg1 mit sich selbst Oligomere bildet [28]. Die Bildung von Dimeren findet sich auch bei anderen Glykosyltransferasen [213, 255]. Auch Alg13 und 14, die Enzyme welche bei der N-Glykosylierungskaskade im ER von *S. cerevisiae* die Reaktion zur Bildung des Akzeptor-Substrates der Alg1 katalysieren, bilden ein Dimer [27]. In früheren Arbeiten wurde die Alg1ΔTM als immobilisiertes Enzym zum Aktivitätsnachweis eingesetzt, da es nach Dialyse seine Aktivität verlor [169]. In der vorliegenden Arbeit gelang es durch Zugabe von 1 mM DTT bzw. TCEP zum Dialysepuffer aktive Alg1 zu erhalten. Das Reduktionsmittel verhindert wahrscheinlich intermolekulare

Verbrückungen zwischen den sieben in der Aminosäuresequenz der Alg1 vorkommenden Cysteinen (Programm DISULFIND [210], Abb. S-0-14, Anhang), welche mit Präzipitation und Inaktivierung einhergehen. Es konnten 18 mg gereinigtes Enzym His₆-Alg1ΔTM pro 1 L Zellkultur erhalten werden. Die Endkonzentration des gereinigten Enzyms nach Zugabe von 50 % Glycerin betrug 1.5 mg/ mL.

Zu Beginn der Arbeiten war die Charakterisierung (Divalente Kationen, pH-Wert und Temperatur-Optima, Inhibierung, Detergenzkonzentration, Einfluss Phospholipide, K_M-Werte, inhibitorische Effekte durch Nukleotide und Nukleotid-Zucker) des Enzyms Alg1 isoliert aus Schweineaorta und Sojabohne bekannt [192, 212]. Da in der vorliegenden Arbeit eine Transmembrananker-deletierten Variante der Alg1 aus *S. cerevisiae* und ein alternativer Substratanker (Phytanol statt Dolichol) eingesetzt wurden, sollten ausgewählte Charakteristika erneut bestimmt werden.

His₆-Alg1ΔTM katalysiert die Übertragung einer Mannose-Einheit von GDP-Mannose auf das endständige GlcNAc am Phyt-PP-(GlcNAc)₂ unter Freigabe von GDP. Mittels IP-HPLC konnten GDP-Mannose und GDP aus den Reaktionsansätzen voneinander getrennt und mittels UV-Detektion bei 254 nm quantifiziert werden (Abb. 4-14). Für erste Untersuchungen wurden unter Nutzung von jeweils 500 μM der Substrate, Proteinkonzentrationen von 10, 30 und 60 nM His₆-Alg1ΔTM eingesetzt und dabei Umsätze von 3-75 % nach 120 Minuten Reaktionszeit erhalten (Abb. 4-14). Aus dem gleichen Reaktionsansatz konnten das Akzeptor-Substrat Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂, das mannosylierte Produkt Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂-Man₁, GDP-Mannose und GDP massenspektrometrisch analysiert werden (Abb. 4-15). Eine Quantifizierung der Reaktanden war mittels Massenspektrometrie nicht möglich.

Im Anschluss wurde das pH- und das Temperatur-Optimum für die His₆-Alg1ΔTM bestimmt. Es wurden Reaktionen mit 100 nM Enzym zwischen 20 und 50°C nach einer und fünf Minuten Reaktionszeit untersucht (Abb. 4-16). Der Reaktionspuffer enthielt 20 mM Tris/ HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ und 0.25 % Triton X-100. Die höchste Aktivität von 100 % entspricht 1.95 U/ mg (Abb. 4-16). His₆-Alg1ΔTM besitzt ein Temperatur-Optimum von 30±1°C. Dies entspricht der bevorzugten Wachstumstemperatur von *S. cerevisiae* [256, 257]. Eine sehr gute Übertragung der Mannose auf das vorliegende Lipidsubstrat fand ebenfalls im untersuchten Temperaturbereich von 25 – 35°C statt. Bei einer Entfernung vom Temperatur-Optimum um ±10°C verbleibt eine Restaktivität von 40 – 60 %, wobei das Enzym eine höhere Sensitivität gegenüber steigenden Temperaturen aufweist. Bei erhöhten Temperaturen muss allerdings nicht nur der Verlust der Aktivität, sondern auch der Verlust der Stabilität des Enzyms bedacht werden. Nach einer Minute Inkubation bei 50°C ist das Enzym nahezu vollständig inaktiv. Für das Homolog aus Wildschwein wurde ein Temperatur-Optimum von 37°C beschrieben [192], dies entspricht in etwa der Körpertemperatur der Tiere [258]. Da die Temperatur die Konformation von Enzymen und somit ihr aktives Zentrum beeinflussen kann, bedingt dies wiederum die Substratbindungsfähigkeit und Aktivität. In Veröffentlichungen zu enzymatischen Katalysen durch verschiedene Alg1-Homologe wurden verschiedene Reaktionstemperaturen

verwendet: 36°C [259], 30°C [260], 37°C [192, 261]. Leider kann mit diesen Angaben kein Bezug zu den vorhandenen Aktivitäten gezogen werden, da die spezifischen Aktivitäten sich auf die ¹⁴C-markierten Substrate und deren Inkorporation beziehen oder keine Aktivitätsdaten erfasst wurden.

Zur Bestimmung der Aktivität bei verschiedenen pH-Werten von 6.0 bis 9.0 wurden Reaktionen mit 100 nM Enzym untersucht (Abb. 4-17). Als Puffersystem kam Bis-Tris-Propan zum Einsatz. Bis-Tris-Propan besitzt wegen seiner zwei pK_s-Werte einen breiten Pufferbereich von etwa pH 6.0 bis pH 9.5. Vergleichend wurde die Aktivität der His₆-Alg1ΔTM in Reaktionspuffer (20 mM Tris/HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ und 0.25 % Triton X-100) getestet. Die Reaktionstemperatur von 30°C entsprach dem Temperatur-Optimum des Enzyms. Das pH-Optimum der His₆-Alg1ΔTM-Aktivität wurde in Relation zur höchsten Aktivität (100 %) vergleichend für die Reaktionszeiträume von einer und fünf Minuten dargestellt (Abb. 4-17). Dabei entsprechen 100 % relativer Aktivität einer spezifischen Aktivität von 22.97 U/ mg. Die verwendete His₆-Alg1ΔTM ist über einen breiten Bereich von pH 7.8 bis mindestens 9.0 aktiv, dies entspricht vielmehr einem Plateau als einer klassischen Optimumskurve. Dieses Ergebnis konnte für zwei verschiedene Reaktionszeiten und somit für zwei verschiedene Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktion übereinstimmend gezeigt werden. Die relative Aktivität zeigt in Abhängigkeit vom pH-Wert ein Maximum bei pH 8.5. Dies ist erstaunlich, da der pH-Wert des Zytosols in *S. cerevisiae* bei etwa 7.0 liegt [262]. Bei pH-Werten unter 7.5 verringert sich die Aktivität auf 20-50 %. Die Aktivitäten in Tris-Puffer liefern sehr ähnliche Ergebnisse zu den Ergebnissen in Bis-Tris-Propan und schließen daher einen Einfluss der Puffersubstanzen auf die Aktivität aus. Für die Alg1 aus Wildschwein und Sojabohne wurde jeweils ein pH-Optimum von 7.0 ermittelt [192, 212]. Das pH-Optimum wurde sowohl in HEPES- als auch in Tris-Acetat-Puffer bestimmt. Es wird als sehr deutlich beschrieben, mit einem drastischen Abfall der Aktivität bei höheren und tieferen pH-Werten. Sämtliche in der Literatur bestimmten Aktivitäten zur Alg1 wurden in Tris-Puffersystemen mit pH-Werten zwischen 7.0 und 7.5 ermittelt (pH 7.4 [259], pH 7.2 [192], pH 7.5 [261]) und können den Unterschied zu den hier ermittelten Ergebnissen nicht erklären. Das Enzym Invertase zeigt aus verschiedenen Organismen diverse pH-Optima, welche von pH 2.9 bis 8.0 reichen. Dies wird anhand der Ladungsunterschiede im aktiven Zentrum erklärt, wobei negative Ladungen zu höherer Aktivität im sauren und positive Ladungen zu Aktivitätssteigerung im basischen Milieu führen [263]. His₆-Alg1ΔTM besitzt N-terminal, bedingt durch die Klonierungsstrategie, ein Peptid aus 21 Aminosäuren, welches die Hexahistidin-Fusion beinhaltet. Dieses Peptid hat einen isoelektrischen Punkt von 9.61, welcher sich im Konstrukt His₆-Alg1ΔTM auf einen isoelektrischen Punkt von 9.02 auswirkt. Alg1 aus natürlichen Quellen besitzt N-terminal eine Transmembrandomäne aus 34 Aminosäuren. Durch das Vorkommen der Aminosäure Glutaminsäure (Gln, E) in diesem Peptid besitzt diese Sequenz einen theoretischen isoelektrischen Punkt von 5.75, welcher sich bei der Vollängen-Alg1 auf einen isoelektrischen Punkt von 8.93 auswirkt. Die unterschiedlichen N-Termini könnten einen Einfluss auf das

pH-Optimum haben. Die transmembrane Domäne der wt-Alg1 führt zudem vermutlich zu einer anderen Einbettung des Enzyms in Triton-Mizellen, als es bei der His₆-Alg1ΔTM der Fall ist. Auch die Beteiligung natürlicher Membranbestandteile, wie sie bei der Isolation von Enzymen aus ihrer natürlichen Umgebung vorkommt, könnte die Zugänglichkeit des Enzyms beeinflussen. Dies gilt besonders für Membranproteine, deren Funktion häufig auf Konformationsänderungen beruht. Auch für Glykosyltransferasen des GT-B Faltungstypes, dem die Alg1 zugeordnet wird, ist eine *induced fit*-Konformationsänderung beschrieben [213].

Auch Hexosaminidasen aus Insekten und *C. elegans* zeigen unterschiedliche pH-Toleranzen. Am Beispiel von Hexosaminidasen aus Insekten konnte gezeigt werden, dass die Enzyme in Bezug auf natürliche Substrate und kleinere künstliche Substrate unterschiedliche pH-Optima aufweisen [264]. Ein Grund für das abweichende pH-Optimum in der vorliegenden Arbeit könnte also auch in der Substratvarianz von Dolichol und Phytanol liegen.

Während der Bearbeitung der Aufgabenstellung erschien eine Publikation zum Thema Alg1, erstaunlicherweise mit einem Konstrukt in genau dem gleichen Plasmid pET-28a (unter Nutzung der Restriktions-Schnittstellen *NheI* und *XhoI* statt *NdeI* und *XhoI*, wobei *NheI* direkt neben *NdeI* liegt), ebenfalls mit Deletion der Transmembrandomäne. In den Aktivitäts-Assays wurde desgleichen das alternative Substrat Phyt-PP-G₂ eingesetzt, welches chemisch synthetisiert wurde [260]. In dieser Arbeit wird für die His₆-Alg1ΔTM ein Temperatur-Optimum von 30°C und ein pH-Optimum von 9.0 ermittelt, was mit den eigenen Daten sehr gut korreliert. Die in dieser Arbeit generierten Daten und ein Vergleich mit Literaturdaten legen nahe, dass durch Nutzung von Enzymen aus unterschiedlichen Quellen und unter Einsatz alternativer Substrate Unterschiede in der Toleranz von pH-Werten entstehen können. Die gewonnenen Erkenntnisse zum pH-Optimum geben daher einen weiteren Einblick auf optimale Bedingungen für den enzymatischen Einsatz der rekombinanten His₆-Alg1ΔTM.

5.2.1 Bestimmung enzymkinetischer Parameter der Alg1ΔTM

Die meisten Daten zur Charakterisierung der Mannosyltransferase Alg1 stammen von isolierten Enzymen aus Schweine-Aorta [192] und Sojabohne [212]. Hier wurden Einflüsse durch divalente Kationen, Detergenz-Konzentrationen und Phospholipiden auf die Enzymaktivität, sowie K_M-Werte und inhibitorische Effekte in Gegenwart ausgewählter Nukleotide und Nukleotid-Zucker untersucht. Für die Mannosyltransferase Alg1 konnte ein kompetitiver, inhibitorischer Effekt von GDP und GDP-Glukose gezeigt werden [169, 192]. Die wesentlichen Unterschiede zwischen diesen und den eigenen Arbeiten bestehen im Ursprungsorganismus des Enzyms, dessen Gesamtlänge und der Nutzung des natürlichen Akzeptor-Substrates Dolichol-PP-(GlcNAc)₂. Zwar konnten für das immobilisierte Hefe-Enzym Alg1ΔTM, rekombinant hergestellt in *E. coli*, apparente K_M-Werte von 14.0 und 4.8 μM für die Substrate Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ und GDP-Mannose experimentell bestimmt werden [169], für das freie Enzym lagen aber zum Zeitpunkt der durchgeführten Arbeiten noch keine Daten vor. Diese zu ermitteln, war jedoch für den *in vitro* Einsatz zur zielgerichteten Herstellung von *N*-Glykosylierungen notwendig.

In der vorliegenden Arbeit konnte für die gereinigte His₆-Alg1ΔTM für das Donor-Substrat GDP-Mannose ein K_M-Wert von 9.1 μM und für das Akzeptor-Substrat Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ ein K_M-Wert von 3.4 μM nach Abschnitt 4.2.4 bestimmt werden. Nach Beendigung der Arbeiten erschien eine Publikation mit Untersuchungen zur eben hier verwendeten His₆-Alg1ΔTM. Vergleicht man die selbst erhaltenen K_M-Werte mit denen aus der Literatur (Tabelle 5-2), fällt auf, dass bei den eigenen Werten der K_M-Wert für das Akzeptorsubstrat kleiner ist, als der für das Donor-Substrat.

Tabelle 5-2: Vergleich der K_M-Werte für die Substrate von Alg1-Enzymen, Reaktionsbedingungen bei den eigenen Messungen: His₆-Alg1ΔTM 30 nM (1.57 mg/ L), MW = 52434 Da, Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ konstant 10 - 250 μM bzw. variabel 1 - 80 μM, GDP-Mannose konstant 80 - 450 μM bzw. variabel 1 - 80 μM, Reaktionspuffer 20 mM Tris/ HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.25 % Triton X-100, T=30°C, Reaktionsvolumen 200 μL, Probenahme nach 0s, 15s, 30s, 45s, 60s, 90s und 120s.

Enzym	K _M Akzeptor [μM]	Ungleichung	K _M Donor [μM]	Referenz
Alg1 (Soja)	9.0*	>	1.7	[212]
Alg1 (Schwein)	1.0*	>	0.5	[192]
Alg1ΔTM	14.0*	>	4.8	[169]
His ₆ -Alg1ΔTM	38.3 [†]		k.A.	[260]
His ₆ -Alg1ΔTM	3.4 [†]	<	9.1	Vorliegende Arbeit

Akzeptoren: *Dolichol-PP-(GlcNAc)₂, [†]Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂, Donor: GDP-Mannose

Kaushal und Kollegen bestimmten die K_M-Werte von Alg1 in extrahierten Membranfraktionen. Die enzymatischen Reaktionen wurden mittels GDP-[¹⁴C]-Mannose gestartet und mit organischem Lösungsmittel gestoppt. Nach Extraktion des Produktes wurden die Glykane durch milde saure Hydrolyse abgespalten. Die freien Glykane wurden mittels Säulenchromatografie getrennt, mit Hilfe von Standards zugewiesen und deren Radioaktivität ausgemessen [192, 212]. Auch bei der immobilisierten Alg1ΔTM wurde radioaktiv-markiertes Substrat, GDP-[2-³H]-Mannose, eingesetzt [169]. In der neueren Publikation zur His₆-Alg1ΔTM [260] wurden nicht-markierte Substrate verwendet und die hydrolysierten Glykane mittels HPLC und ESI-MS analysiert. Auch in der vorliegenden Arbeit lag der Anspruch der Analyse der Reaktanden darin, auf radioaktiv-markierte Substanzen zu verzichten. Daher wurden GDP und GDP-Mannose direkt mittels IP-HPLC und UV-Detektion bei 254 nm (Abschnitt 3.4.1) analysiert, während Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ und Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂Man₁ nach IP-UPLC mittels ESI-MS (Abschnitt 3.4.3) ohne vorherige milde saure Hydrolyse detektiert wurden.

Für den Reaktionsmechanismus für invertierende Glykosyltransferasen ist bekannt, dass zunächst das Donorsubstrat bindet, bevor das Akzeptorsubstrat binden kann [213]. Daher war es unerwartet, dass für das eigene Akzeptor-Substrat ein geringerer K_M-Wert bestimmt wurde als für den Zucker-Donor GDP-Mannose. Zusätzlich wurde die katalytische Effizienz gegenüber beiden Substraten betrachtet. Für GDP-Mannose wurde die Geschwindigkeitskonstante k_{obs} für

die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei 25 μM Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ berechnet, für das Phytanyl-Substrat der k_{cat} .

$$k_{\text{obs}} = \frac{A_{\text{spez}}}{[E]_0}; \quad k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{max}}}{[E]_0}$$

Dabei sind k_{cat} und k_{obs} Geschwindigkeitskonstanten in s^{-1} , für k_{obs} unter definierten Bedingungen (25 μM Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂), A_{spez} die spezifische Aktivität in $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, gleichbedeutend mit V_{max} , V_{max} die maximale Reaktionsgeschwindigkeit in $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ und $[E]_0$ die Stoffmenge des Enzyms in mol. Die molekulare Masse der His₆-Alg1 Δ TM beträgt 52434 Da. Daraus ergeben sich die Geschwindigkeitskonstanten und Umsatzraten aus Tabelle 5-3:

Tabelle 5-3: Geschwindigkeitskonstanten und Umsatzraten für die Substrate GDP-Mannose und Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ der His₆-Alg1 Δ TM aus *S. cerevisiae*, Membran-Anker deletiert, Codon-usage optimiert, rekombinant exprimiert in *E. coli* und gereinigt mittels IMAC.

Konstanten	GDP-Mannose	Phytanyl-PP-G2
$k_{\text{obs}} [\text{s}^{-1}]$	2.18	
$k_{\text{cat}} [\text{s}^{-1}]$		2.36
$k_{\text{obs}}/K_{\text{M}} [\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$	0.29	
$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} [\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$		0.69

Für die His₆-Alg1 Δ TM aus *S. cerevisiae* (Membran-Anker deletiert, Codon-usage optimiert, rekombinant exprimiert in *E. coli* und gereinigt mittels IMAC) konnten erstmals Werte für die katalytische Effizienz des Enzyms gemessen werden. Aus den Daten (52.6 kDa, 0.01 U/ mg, K_{M} Phyt = 14 μM) von Revers und Kollegen [169] und den Daten (46 kDa, 6.25 U/ mg, K_{M} Phyt = 38.3 μM) von Li *et al.*, 2017 [260] lassen sich die katalytischen Effizienzen für das Phytanyl-Substrat berechnen. Für die immobilisierte Alg1 Δ TM ergibt sich ein $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ von $0.00062 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, dieser Wert liegt etwa drei Größenordnungen unter dem in dieser Arbeit bestimmten Wert und könnte seine Ursache in der Immobilisierung des verwendeten Enzyms haben. Der $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ nach Li *et al.* ergibt sich mit $0.12 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Dieser Wert liegt in guter Übereinstimmung mit dem eigenen Wert der katalytischen Effizienz für Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂.

Aus der Donorkinetik zeigt sich, dass *in vitro* die Reaktion durch steigende Konzentrationen an Phytanyl-Substrat gehemmt wird. Dieses Verhalten der Substratüberschuss-Hemmung wurde so nicht erwartet, entsprechende Hinweise lassen sich auch nicht in publizierten Artikeln zur Alg1 oder anderen Glykosyltransferasen der N-Glykosylierungs-Kaskade finden. In vergangenen Untersuchungen zur Alg1 wurden aber auch keine hohen Akzeptor-Konzentrationen eingesetzt, bei denen die Hemmung hätte detektiert werden können [166, 169, 260, 265]. Innerhalb der Arbeitsgruppe wurden allerdings für die Enzyme Alg2 und Dpm1 ähnliche Beobachtungen zum Inhibierungsverhalten beobachtet (Ergebnisse nicht gezeigt). Für die durch die His₆-Alg1 Δ TM (30 nM) katalysierte Reaktion gilt: Ab einer Konzentration von etwa 30 μM an Phytanyl-Substrat,

was einem Verhältnis von 1:1000 an Enzym zu Substrat entspricht, wird die Reaktionsgeschwindigkeit durch den Akzeptor verlangsamt. Anhand der V_{\max} -Werte für GDP-Mannose lässt sich weiter erkennen, dass bis zu einer Konzentration von 25 μM an Phytanyl-Substrat die Reaktionsgeschwindigkeit steigt. Bei höheren Phytanyl-Konzentrationen wird V_{\max} für den Umsatz von GDP-Mannose reduziert und die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion nimmt ab. Auch in der Sekundärauftragung der Donorkinetik zeigt die Phytanyl-Konzentration Einfluss auf den Anstieg der Geraden (K_M/V_{\max}), nicht aber auf den Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse ($-1/K_M$). Der gemeinsame Schnittpunkt der Geraden bei $(-x; 0)$, gleichbedeutend mit einem gleichbleibendem K_M -Wert für GDP-Mannose, spricht für eine nicht-kompetitive Hemmung (Abb. 4-19). Bei Mehrsubstratreaktionen [266] tritt eine nicht-kompetitive Hemmung eher in Form einer Produkthemmung auf. Im Laufe des Substratumsatzes bleibt Produkt im aktiven Zentrum gebunden, dies hemmt die enzymatische Reaktion auf der Ebene der Neubildung des Enzym-Substrates-Komplexes. Allgemein bindet der Inhibitor bei einer nicht-kompetitiven Hemmung nicht an derselben Stelle wie das Substrat. Daher hat die Hemmung selbst bei sehr hohen Konzentrationen an Substrat keinen Einfluss auf die Michaelis-Konstante K_M , die Affinität zum Substrat bleibt erhalten. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{\max} verringert sich aber, da der Inhibitor einen Einfluss auf den Substrat-Umsatz hat. Der Hemmstoff kann dabei an das Enzym und/ oder an den Enzym-Substrat-Komplex binden. Die korrespondierenden Geschwindigkeitskonstanten können mit k_i und k_{ii} (Abb. 5-2 bezeichnet werden. Liegt in der Sekundärauftragung der Schnittpunkt der Geraden auf der x-Achse (Abb. 4-19), so ist $k_i = k_{ii}$. Das bedeutet, dass die Substratbindung die Affinität des Enzymes für den Inhibitor nicht verändert und folglich die Bindung des Inhibitors die Affinität des Enzymes für das Substrat nicht ändert und damit $k_{S1} = k_{S1i}$ bzw. $k_i/ k_{ii} = k_{S1}/ k_{S1i}$ ist. Wegen des Zusammenhangs zwischen k_{S1} und K_M ändert die Bindung des Inhibitors also auch die Michaelis-Konstante nicht [267], wie anhand der erhaltenen Daten gezeigt werden konnte. Das folgende Reaktions-Schema (Abb. 5-2) soll die aus den kinetischen Daten abgeleiteten Erkenntnisse als Hypothese noch einmal verbildlichen:

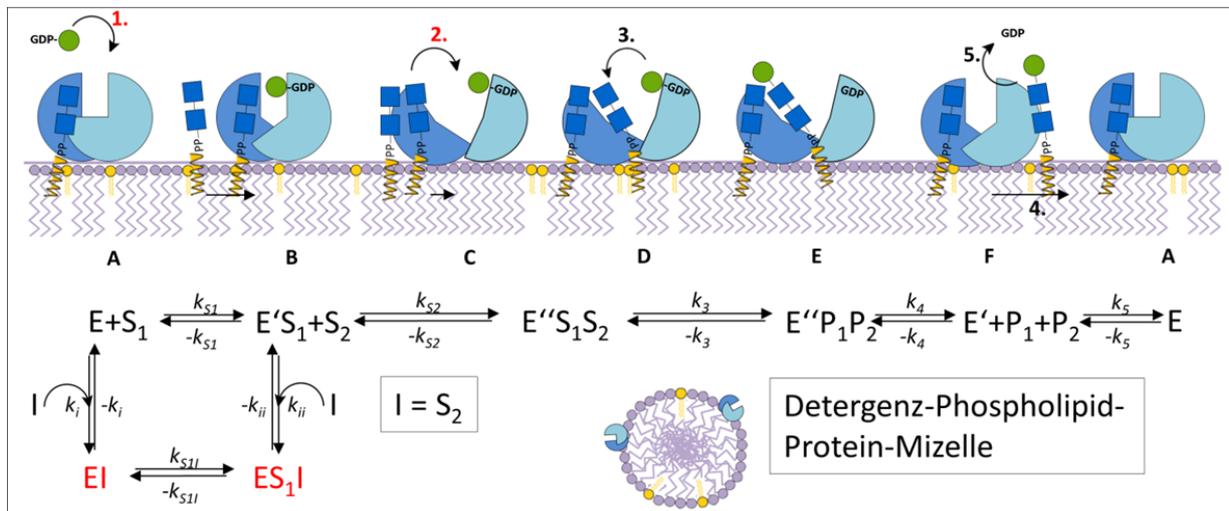


Abb. 5-2: Schema des Reaktionsmechanismus der His₆-Alg1ΔTM, eingebettet in Detergenz-Phospholipid-Mizellen: Alg1: N-Terminus (dunkelblau), C-Terminus (hellblau), Membran-Anker deletiert; Donor-Substrat GDP-Mannose (grüner Kreis); Akzeptor-Substrat Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ mit GlcNAc (blaues Viereck) und Lipid-Anker (Zickzack-Linie), Lipide aus dem Expressionsorganismus (gelb). In rot hervorgehoben sind die Stellen eines wahrscheinlichen Einflusses der Inhibierung durch Substratüberschuss in nicht-natürlicher Umgebung des Enzyms.

Bei Substratüberschuss an Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ kann die Bindereihenfolge (Abb. 5-2 A-D) und/oder die induzierte Konformationsänderung (Abb. 5-2 C-E) zur verbesserten Bindung des Akzeptor-Substrates gestört sein. Dies führt bei *in vitro*-Katalyse zu einem Erscheinungsbild bei der Datenauftragung (Abb. 4-19), das einer nicht-kompetitiven Hemmung gleicht. Da für Glykosyltransferasen des B-Faltungstypes ein Konformationswechsel des Enzyms nach Bindung des ersten Substrates (Abb. 5-2 B) konstatiert wurde [213] und der Inhibitor das zweite Substrat ist, müssten k_i und k_{ij} unterschiedlich groß sein, es sei denn die mechanistische Konformationsänderung ist gestört. Dies könnte durchaus der Fall sein. Da sich das gereinigte Enzym nicht in seiner natürlichen Membrenumgebung befindet, ist eine veränderte Flexibilität der Struktur denkbar. So können eingesetzte Detergenzien die Proteinstabilität beeinflussen und durch ihre Affinität zu hydrophoben Bereichen des Proteins zu partieller Entfaltung führen. Dies wiederum kann die Aktivität des Enzyms beeinflussen [267] und dessen natürliche, mechanistische Dynamik (*induced fit*) stören. Daraus könnte ein Spezialfall der nicht-kompetitiven Hemmung, die allosterische Hemmung, resultieren. Im vorliegenden Fall würde eine Änderung der Affinität des allosterischen Zentrums des Enzyms für das Akzeptor- und/oder Donor-Substrat auf einer veränderten Struktur *in vitro* bei Substratüberschuss beruhen. Man würde von negativer Kooperativität sprechen, wenn die Bindung des Substrates (Phytanyl-PP-G2) die Konformation oder Bindung eines weiteren Substratmoleküls und damit die Aktivität negativ beeinflusst [267]. Die meisten Substratinhibierungen resultieren aus einer Kombination von einem Substrat mit einer "falschen Enzymform", sind nur bei hohen Substratkonzentrationen apparent und/oder unter nicht physiologischen Reaktionsbedingungen zu beobachten [267]. Substrate von Glykosyltransferasen, die in einem sequentiellen geordneten Reaktions-Mechanismus als zweites Substrat binden, zeigen häufig

eine Substrat-Inhibierung, da dieses Akzeptor-Substrat bei hohen Konzentrationen einen nicht-produktiven Komplex bildet [268]. Es kann ausgeschlossen werden, dass der Inhibitionseffekt durch einen inaktiven Enzym-Substrat-(Inhibitor)-Komplex (*dead end*) entsteht, da bei der hier eingesetzten maximalen, konstanten Konzentration an Phytanyl-Substrat von 250 μM nach 2.5 min 5 % und nach 25 min 49 % Umsatz erzielt werden konnten. Es könnte aber eine Inhibierung des Enzyms im Ruhezustand durch bindendes Akzeptor-Substrat vorliegen (Abb. 5-2 A). Substrat-Inhibierungen, bei welchen das Substrat, welches normalerweise als zweites bindet, nun in Folge hoher Konzentrationen als erstes binden kann und somit die enzymatische Reaktion beeinflusst, wurden für Enzyme mit sequentiell, geordneten Reaktions-Mechanismus gezeigt. Diese beinhalten zum Beispiel die Cellobiose-Phosphorylase, die 4-Hydroxyphenyl-Pyruvat-Dioxygenase und die KpnI DNA-Methyltransferase [269].

Um diesen, durch hohe Phytanyl-Konzentrationen verursachten Effekt weiter zu untersuchen bzw. zu bestätigen, wurden Untersuchungen unter gesättigten GDP-Mannose Konzentrationen bei variablen Phytanyl-Konzentrationen durchgeführt (Abb. 4-20). Zur Absicherung der Daten wurden drei Sättigungskonzentrationen an GDP-Mannose (10-, 13- und 50-facher K_M) gewählt. Die kinetischen Studien belegten in der Akzeptorkinetik den inhibitorischen Einfluss des hydrophoben Substrates zur eingesetzten His₆-Alg1 Δ TM. Unter den gewählten Bedingungen ergibt sich eine gemittelte Inhibitions-Konstante K_i von 124 μM . Im pharmazeutischen/biochemischen Kontext ist dieser Wert als relativ hoch anzusehen. Die K_i -Wert-Bestimmung ist aufgrund der geringen Datendichte fehlerbehaftet, sie zeigt aber einen Trend. In anschließenden Experimenten ist geplant, die Phytanyl-Substrat-Konzentration weiter zu erhöhen und zusätzliche Datenpunkte aufzunehmen, um die Aussagekraft des inhibitorischen Effektes zu erhöhen.

Einen eindeutigen Beweis für die aus den Ergebnissen resultierenden Annahmen könnten Bindungsstudien des Enzyms ohne GDP-Mannose, durch isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) oder die Betrachtungen von thermischen Übergängen bei der Enzym-Substrat-Bindung (Fluoreszenz-Spektroskopie unter 330/ 350 nm über die Zeit) erbringen. Diese konnten allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Für alle Überlegungen zu Ursachen der Hemmung der His₆-Alg1 Δ TM gilt folgende Aussage: Die natürliche Reaktionsumgebung der Alg1 aus Hefe ist die Membran des Endoplasmatischen Retikulums. Es ist anzunehmen, dass sich dort die Verfügbarkeit beider Substrate nach dem Bedarf regelt. Ein Überschuss an Lipid-Substrat in seinem ursprünglichen Reaktionsraum ist unwahrscheinlich. Die generierten Daten legen daher nahe, die Ergebnisse als *in vitro*-Phänomen zu werten.

Mit den hier durchgeführten Untersuchungen konnte ein noch nicht beschriebenes Phänomen unter nicht-natürlichen Bedingungen mit dem nicht-natürlichen Substrat Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ und der Membrananker-deletierten Variante der Alg1 beschrieben werden. Die Ergebnisse sind vermutlich für *in vivo*-Prozesse wenig relevant. Für einen optimierten Einsatz der His₆-Alg1 Δ TM *in vitro* sind sie jedoch von großer Bedeutung, da so die Konzentrationen der Substrate für einen maximalen Umsatz (Raum-Zeit-Ausbeute) berechnet werden können. In den Folgeexperimenten

zur Eintopf-Synthese von Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂Man₁ mit Regeneration der GDP-Mannose führte dies zum Anheben der Proteinkonzentration der His₆-Alg1ΔTM von 30 auf 100 nM.

Da das Akzeptor-Substrat Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ eine Substratüberschuss-Inhibierung aufweist, könnte die diskontinuierliche/ sequentielle Zugabe des Phytanyl-Substrates für die *in vitro*-Synthese von Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂Man₁ im großen Maßstab eine erfolgreiche Strategie sein.

5.3 Multi-Enzym-Eintopf-Synthese von Phytanyl-PP-Mannosylchitobiose

Durch die Kopplung der Einzel-Reaktionen zur Regeneration der Nukleotid-Zucker (Abschnitte 4.1.2 bis 4.1.5) mit der Mannosyltransferase-Reaktion (Abschnitt 4.2.2) in einer Eintopf-Reaktion können die Gesamtkosten zur Produktion von Phytanyl-PP-Mannosylchitobiose enorm verringert werden, da einzelne Aufarbeitungsschritte entfallen.

Daher wurden für die Eintopf-Reaktion jeweils 500 μM der Substrate ADP, GTP und Phytanyl-PP-Chitobiose, 2 mM Mannose sowie 1 mM PolyP eingesetzt. Der *co*-Faktor Glukose-1,6-bisPhosphat wurde mit einer Konzentration von 100 μM eingesetzt. Die Konzentrationen der Enzyme betragen: His₆-Glc 2 mg/ mL, ManCB-His₆ 1 mg/ mL, PmPpA-His₆ 0.025 mg/ mL, 0.02 mg/ mL His₆-Ppk3 und His₆-Alg1ΔTM 0.005 mg/ mL (100 nM). Vergleicht man die Reaktionen in Gegenwart und in Abwesenheit von His₆-Alg1ΔTM (Abb. 4-21) zeigt sich eine auffällige, stärkere Abnahme des Startsubstrates ADP in der Reaktion mit His₆-Alg1ΔTM, welche mit einer Zunahme von ATP korreliert. Da die ADP-Abnahme größer als die ATP-Zunahme war, wies dies auf die enzymatische Aktivität des Folgeenzym His₆-Glc hin. Bei der Betrachtung der Konzentrationen von GTP und GDP im Reaktionsverlauf ohne His₆-Alg1ΔTM konnte eine nahezu vollständige Abnahme an GTP bei halbmaximaler Zunahme an GDP gezeigt werden. Die GTP-Abnahme wurde, neben der ManC-Reaktion, ebenfalls der Aktivität der His₆-Glc zugeschrieben (Abschnitt 5.1.5). In der Reaktion mit His₆-Alg1ΔTM ist der Verbrauch an GTP wesentlich geringer und entspricht einem Gleichgewicht in Bezug auf die GDP-Bildung. Dies kann mehrere Ursachen haben: i) Das Gleichgewicht der GTP-umsetzenden ManC-Reaktion wird durch Entzug der Produktes GDP-Mannose „scheinbar verschoben“, ii) durch die Folgeraktionen der His₆-Alg1ΔTM und der His₆-Ppk3 (welche GDP gegenüber ADP leicht bevorzugt, siehe Abschnitt 5.1.4), wird mehr GTP regeneriert, iii) höhere GTP-Konzentrationen können einen direkten Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit der ManC-katalysierten Reaktion haben (keine K_M-Werte publiziert), iv) ManC könnte GTP vor His₆-Glc umsetzen, da GTP nicht das natürliche Substrat der His₆-Glc ist. Die beobachtete AMP-Bildung der His₆-Glc stagniert nach 1h Reaktionszeit bei etwa 10 % und nimmt im weiteren Reaktionsverlauf nicht erneut zu. Da das gebildete AMP in der Eintopf-Reaktion entsteht und nicht wieder phosphoryliert wird, stellt es einen Verlust an einkalkuliertem Startsubstrat dar. Die in Abschnitt 5.1.5 gemachte Überlegung, die His₆-Glc durch die PP-Glc aus *Anabena spec.* zu ersetzen, welche Polyphosphat zur Phosphorylierung von Mannose verwendet [249], soll hier erneut als Alternative erwähnt werden. Damit würde sich die Eintopf-Reaktion wie nachfolgend gezeigt vereinfachen:

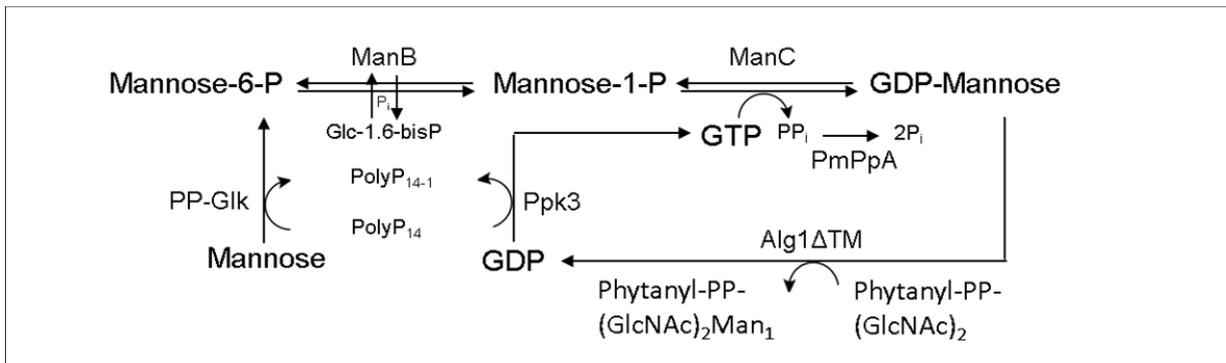


Abb. 5-3: Optimierte Eintopf-Reaktion zur Bildung von Phytanyl-PP-Mannosylchitobiose

Durch diese Optimierung würde ATP als konkurrierendes Regenerations-Substrat zu GTP entfallen. Auch die Bildung von AMP in einer Nebenreaktion wäre unterbunden. Sollten erhöhte Konzentrationen an PolyP eingesetzt werden, müssten folgende Aspekte bedacht werden: PolyP kann Metallionen chelieren [207] und ist bei Konzentrationen $> [ADP]$ inhibitorisch gegenüber der His₆-Ppk3 (Abb. 4-9). Zielführend wäre eine geeignete Zugabe-Strategie für PolyP, um inhibitorische Konzentrationen im Reaktionsansatz zu vermeiden. Zusätzlich würden Veränderungen des Reaktionsaufbaus auch zu einer angepassten Analytik führen, da die Substrate und Produkte Mannose, Mannose-6-P, Mannose-1-P und PolyP der PP-Glk- und ManB-Reaktion nicht photometrisch detektiert werden können. Hierfür böte sich die Leitfähigkeitsdetektion an, bei welcher phosphorylierte Zucker und Nukleotide quantifiziert werden können [194].

Nachfolgend soll auf die Bildung von GDP-Mannose in den Multi-Enzym-Reaktionen eingegangen werden. Bei der Synthese von GDP-Mannose ohne His₆-Alg1ΔTM wurden nach 180 min Reaktionszeit 80 % Produkt gebildet. Da in der Eintopf-Synthese mit His₆-Alg1ΔTM nach 180 min Reaktionszeit nur etwa 5 % GDP-Mannose gemessen wurden, konnte von einem Verbrauch der GDP-Mannose zur Bildung von Phytanyl-PP-Mannosylchitobiose ausgegangen werden. Mittels LC-ESI-MS-Analytik konnten sämtliche Analyten des 6-Enzym-Systems eindeutig identifiziert werden, darunter auch das Zielprodukt Phytanyl-PP-Mannosylchitobiose. Die MS/MS-Spektren bestätigen das Vorhandensein von Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ mit einem theoretischen Molekulargewicht von 864.90 g/mol (gefunden M⁻H 863.42 m/z) und Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂Man₁ mit einem theoretischen Molekulargewicht von 1027.04 g/mol (gefunden M⁻H 1026.48 m/z). Beim Vergleich der HPLC-basierenden Daten mit den Daten aus massenspektrometrischer Analyse zeigt sich, dass die MS-Analytik großen Schwankungen unterlag (Fehler bis zu 15 % bei n = 3, keine Linearität der Kalibriersubstanzen im angewandten Konzentrationsbereich). Daher konnten die erhaltenen Daten der MS nicht zur quantitativen Auswertung der Ergebnisse herangezogen werden. Tendenziell zeigen aber beide Analytikmethoden den gleichen Trend im Reaktionsverlauf. Aufgrund des zu verzeichnenden Verbrauches von 50 % GTP und der Bildung von GDP können ca. 50 % an Zielprodukt gebildet worden sein. Die nachfolgende Isolierung des Produktes ergab 61 mg Phytanyl-PP-G2M, dies entspricht 51.3 % Ausbeute. Beim Einsatz von 100 nM His₆-Alg1ΔTM konnte nach 120 min

Reaktionszeit ein nahezu vollständiger Umsatz von 96 % erzielt werden (Abschnitt 4.2.3). Das Multi-Enzym-System zur Bildung von GDP-Mannose zeigte nach 180 min Reaktionszeit einen Umsatz von 80 % (Abb. 4-21). Durch Kombination beider Systeme unter Einhaltung der jeweiligen Reaktionsbedingungen und Konzentrationen können daher maximal 80 % an Phytanyl-PP-Mannosylchitobiose synthetisiert werden. Da sich beide Analytiksysteme (CGE-LIF und MS) zum direkten Nachweis des Zielproduktes nach Anwendung als nicht quantitativ erwiesen und im HPLC-basierten Analytiksystem die Mengen an Zwischenprodukten im enthaltenen Regenerationssystem keinen Aufschluss über die Endproduktkonzentration zulassen, kann abschließend keine genaue Aussage über die Ausbeute an Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂Man₁ gemacht werden. Dennoch geben die gewonnenen Ergebnisse aufschlussreiche Einblicke in die Machbarkeit der enzymatischen Produktion von Lipid-verknüpften Zuckern in Multi-Enzym-Reaktionen. Durch Anwendung des oben gezeigten, optimierten Eintopf-Systems mit Nachweis der Analyten über Leitfähigkeits-Detektion könnten die Reaktionsverläufe der Einzelreaktionen besser betrachtet werden und eine genaue Aussage über die Produktbildung gemacht werden.

Weitere Optimierungsmöglichkeiten ergeben sich nach Literaturrecherche zu ähnlichen Multi-Enzym-Ansätzen. Die Anwendung als sequentielles oder Zwei-Stufen-System bei der enzymatischen Synthese kann die Produktausbeute beeinflussen [270]. Weiter kann die Immobilisierung der Enzyme an entsprechende Chromatografie-Materialien das Enzym stabilisieren und erleichtert die Isolation des Produktes [271-273]. Die Immobilisierung aller in dieser Arbeit verwendeten Enzyme konnte während der jeweiligen Reinigungen mittels IMAC gezeigt werden. In der Natur weisen Multi-Enzym-Komplexe (MEC's) hoch effiziente katalytische Mechanismen in Reaktionskaskaden auf. Um die katalytische Effizienz in Multi-Enzym-Reaktionen zu erhöhen, könnte die Struktur von MEC's nachgeahmt werden, indem die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme gemeinsam *co*-immobilisiert werden würden [274].

5.4 Aufreinigung von Phytanyl-PP-Mannosylchitobiose

Zur Gewinnung des Zielproduktes wurde schließlich eine *in vitro*-Methode zur Herstellung von Phytanyl-Pyrophosphoryl-Mannosylchitobiose entwickelt, mit der Milligramm- bis Grammengen produziert werden können. Nach präparativer Chromatographie wurden 61 mg an reiner Phytanyl-Pyrophosphoryl-Mannosylchitobiose im 100 mL-Maßstab erhalten. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von 51.3 % bezogen auf die eingesetzte Phytanyl-Pyrophosphoryl-Chitobiose. Zusätzlich wurde eine Mischfraktion aus Substrat und Produkt mit einer Masse von 27 mg erhalten. Durch Optimierung der Trennbedingungen für Substrat und Produkt kann die Ausbeute daher weiter erhöht werden.

Im Vergleich ist die Produktion von Glykanen in chemischer Synthese sehr aufwendig, da die Produkte erst nach mehrstufigen Aufarbeitungsschritten (Schützen und Entschützen, Kupplungsreaktionen) erhalten werden [275]. So liefert das chemisch hergestellte Gerinnungshemmer-Medikament Arixtra (einem Heparin-ähnlichen Pentasaccharid) nach 50

Herstellungsschritten ein Produkt mit einer Gesamtausbeute von weniger als einem Prozent [161].

Natürliche Quellen sind reich an Glykanen (z. B. Eigelb), aber ihre Aufreinigung (Isolation, Chromatografie, Filtration, Konzentration) ist zeitaufwendig und teuer und die Trennung von sich ähnelnden Strukturen schwierig. Die Ausbeuten sind in der Regel gering [276]. Bei der Extraktion kompletter biantennärer Sialyl-Glykane können aus einem Eigelb (19 g) etwa 8 mg Sialyl-Glykan gewonnen werden [277]. Dies entspricht einer Ausbeute von 0.04 %.

Bei der Produktion von 2'-Fukosyllaktose (in Muttermilch zu finden) aus GDP-Fukose und Laktose durch die katalytische Wirkung der His₆PropWgbl (rekombinante α 1,2-Fukosyltransferase aus *E. coli*) konnten 8 mg Produkt im 10 mL-Maßstab isoliert werden, was einer Ausbeute von 44 % entsprach [270].

Die *in vitro*-Produktion von Globotriose (Gal-Gal-Glc) mit permeabilisierten Zellen, welche drei Biokatalysatoren exprimierten, zeigte nach Isolation des Trisaccharides eine Ausbeute von 22 % (11 g) in 500 mL-Maßstab [278].

Es gibt auch Beispiele für höhere Produktmengen mit ausgezeichneten Ausbeuten, allerdings ist hier der Einsatz von großen Mengen an Biomasse erforderlich [273, 279].

Letztendlich ist eine sorgfältige Ausbalancierung zwischen Produktausbeute und den Gesamtkosten der Produktion entscheidend über die Wirtschaftlichkeit des Produktionssystems [278]. Eine Einordnung des eigenen Produktionssystems in die Wirtschaftlichkeit ist schwierig, da weder der Bedarf des Produktes bekannt ist, noch Vergleichsprodukte vorhanden sind. Man kann aber anführen, dass eine beliebige DNA-Sequenz heutzutage für < 0.17 €/ Base in Auftrag gegeben werden kann, benötigte Glykan-Sequenzen (Strukturen) aber kaum erhältlich sind und wenn, dann nur zu einem sehr hohen Preis von mehreren hundert Euro pro Milligramm [280]. Durch die Aufreinigung des Produktes Phytanyl-Pyrophosphoryl-Mannosylchitobiose wurde ein kommerziell nicht verfügbares Produkt bereitgestellt, welches Anwendung als Standard für Analysen finden und als Ausgangssubstrat für weitere enzymatische Reaktionen (Alg2, OST) dienen kann. Es kann zudem in Glykan-Arrays für ein (Fluoreszenz-basiertes) Screening von Glykan-bindenden Proteinen, Mikroorganismen oder Antikörpern zur Identifizierung von Krankheiten, Bindungs-Spezifitäten oder Interaktionen eingesetzt werden.

6 Zusammenfassung

Glykosyltransferasen sind entsprechend ihrer Spezifität essentielle Enzyme zur Bildung von strukturell klar definierten Oligosacchariden und Glykokonjugaten. Sie bieten der Glykobiologie vielfältige Möglichkeiten unter anderem in den Materialwissenschaften, im Kosmetikbereich oder im Gesundheitssektor. Um Untersuchungen zu Oligosaccharid-Wechselwirkungen anstellen zu können, werden diese Strukturen in möglichst reiner Form, d. h. ohne Mikroheterogenitäten, benötigt. Eine Möglichkeit zum Erreichen dieses Zieles ist die Bereitstellung und Verwendung von geeigneten Glykosyltransferasen und deren Substraten in ausreichenden Mengen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, geeignete Enzyme zur Regeneration für das hochpreisige Donor-Substrat GDP-Mannose und die Glykosyltransferase Alg1 bereitzustellen, enzymatische Assays zu etablieren und das Glykokonjugat Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂Man₁ *in vitro* in enzymatischer Synthese herzustellen. Die Ergebnisse dieser Arbeiten sind im Folgenden zusammengefasst:

- Zur Synthese von GDP-Mannose, ausgehend von ATP, Mannose und GTP, wurden die Gene *glk*, *manB* und *manC*, die für die Biosynthese-Enzyme Glukokinase (EC 2.7.1.2), Phosphomannomutase (EC 5.4.2.8) und Mannose-1-P-Guanyltransferase (EC 2.7.7.22) kodieren, aus *E. coli* W3110 ausgewählt, amplifiziert, in den Vektor pET-28a (+) kloniert und in *E. coli* BL21 Gold (DE3) transformiert. Die rekombinanten Enzyme wurden anschließend in *E. coli* BL21 Gold (DE3) produziert und chromatografisch gereinigt.
- Zur Regeneration der Nukleotide ADP und GDP wurden die Genesequenzen der *ppk2* und *ppk3*, welche für die Kinasen 1D-Ppk2 (EC 2.7.4.1) in *P. aeruginosa* und die Ppk3 (EC 2.7.4.1) in *R. pomeroyi* kodieren, Codon-usage optimiert und *de novo* von einem Dienstleister synthetisiert. Die rekombinanten Enzyme wurden ebenfalls in *E. coli* BL21 Gold (DE3) produziert und chromatografisch gereinigt.
- Das Gen *ppa* aus *P. multocida* kodiert für die anorganische Pyrophosphatase PmPpA (EC 3.6.1.1). Seine Sequenz wurde ebenfalls Codon-usage optimiert und *de novo* synthetisiert. Die Reinigung des Enzyms erfolgte nach Produktion in *E. coli* BL21 Gold (DE3) mittels IMAC.
- Die Gensequenz *ALG1* aus *S. cerevisiae* trägt die Informationen zur Bildung der β 1,4-Mannosyltransferase (EC 2.4.1.142). Die Sequenz wurde an die Ansprüche zur Produktion in *E. coli* durch Codon-usage-Optimierung angepasst und nach erfolgter Produktion mittels Affinitäts-Chromatografie gereinigt.
- Die Anzucht- und Aktivitätsdaten für die rekombinanten Enzyme sind nachfolgend zusammengefasst:

Tabelle 6-1: Zusammenfassung der Anzuchts- und Aktivitätsdaten der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme

Enzym	Maßstab [L]	Biomasse [g/ L]	Konzentration [mg/ L]	Spez. Aktivität [U/ mg]
His ₆ -Glk	3	3	248	0.018 (ATP)
ManB-His ₆ / ManC	3	3.5	80	14.6 (GDP-Man) ^{*1} 55.9 (GDP-Man) ^{*2}
PmPpA-His ₆	3	3.6	86	33.3 (PPi)
His ₆ -1D-Ppk2	3	3.5	60	0.09 (ADP) 0.1 (GDP)
His ₆ -Ppk3	3	4.5	100	1.04 (ADP) 1.31 (GDP)
His ₆ -Alg1ΔTM	12	15	13	23 (GDP)

*1 Reaktion ohne PmPpA-His₆, *2 Reaktion mit PmPpA-His₆

- Die Glukokinase His₆-Glk wurde in sehr hoher Konzentration gereinigt und gewonnen. Das Enzym benötigt für optimale Aktivität einen vierfachen Überschuss an Mannose im Vergleich zu ATP. Für die His₆-Glk wurde außerdem eine noch nicht beschriebene Phosphorylierungs-Aktivität mit Nutzung von ADP und GTP als Substrat gezeigt.
- Die *co*-exprimierten Enzyme ManB-His₆ und ManC konnten erstmals in einem Schritt Affinitäts-chromatografisch gereinigt werden. Dabei interagierte ManC mit der Affinitätsmatrix wahrscheinlich über natürliche Histidin-Reste im C-Terminus. Die gereinigten Enzyme wurden als Enzymgemisch erfolgreich in der enzymatischen Synthese von GDP-Mannose eingesetzt. Für einen optimalen Umsatz der Substrate musste das inhibitorische Nebenprodukt Pyrophosphat enzymatisch durch die Pyrophosphatase PmPpA gespalten werden.
- Nach Zugabe des Biokatalysators PmPpA-His₆ zu der von ManCB-His₆ katalysierten Reaktion konnten 98 % Umsatz zur Bildung von GDP-Mannose erzielt werden.
- Die spezifische Aktivität der gereinigten His₆-1D-Ppk2 liegt um Faktor 5000 unter veröffentlichten Werten. His₆-1D-Ppk2 nutzt PolyP₁₅ als Substrat und führte zu maximalen Umsätzen von 20 %.
- His₆-Ppk3 zeigt im Vergleich zur His₆-1D-Ppk2 einen dreifach höheren Umsatz bei gleicher Proteinkonzentration. Für die His₆-Ppk3 konnte erstmals eine bisher nicht beschriebene Nebenreaktion, die zur Bildung von Tetraphosphaten führte, nachgewiesen werden. Das Enzym zeigte weiter eine Inhibierung gegenüber erhöhten Polyphosphat-Konzentrationen.
- Für die Transmembrananker-deletierte Glykosyltransferase His₆-Alg1ΔTM konnte erstmalig eine Reinigungsstrategie entwickelt werden, die die Aktivität des Enzyms bewahrte. Durch den Einsatz des Reduktionsmittels TCEP werden wahrscheinlich intermolekulare Verbrückungen zwischen Cystein-Resten vermieden. Weiter konnte eine

noch nicht gezeigte Bildung von Alg1-Dimeren nachgewiesen werden. Die Katalyse der His₆-Alg1ΔTM führte zu einem nahezu vollständigen Substratumsatz unter Bildung des gewünschten Produktes Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂-Man₁. Die His₆-Alg1ΔTM besitzt unter den gewählten Bedingungen ein Temperatur-Optimum von 30°C und eine pH-Optimum von 8.5 mit einer spezifischen Aktivität von 23 U/ mg.

- Bei der Untersuchung der enzymkinetischen Parameter der His₆-Alg1ΔTM konnten apparente K_M-Werte von 9.1 μM für das Donor-Substrat GDP-Mannose und von 3.4 μM für das Akzeptor-Substrat Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ bestimmt werden. Es wurden katalytische Effizienzen von 0.29 μM⁻¹*s⁻¹ für GDP-Mannose und 0.69 μM⁻¹*s⁻¹ für Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ bestimmt.
- Erstmals konnte eine Substrat-Überschusshemmung der His₆-Alg1ΔTM für das nicht-natürliche Substrat Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ mit einem K_i von 124 μM gezeigt werden.
- Bei der Multi-Enzym-Reaktion zur Bildung von GDP-Mannose unter Ausnutzung der katalytischen Aktivität der Enzyme His₆-Glc, ManCB-His₆, His₆-PmPpA und His₆-Ppk3 konnten unter optimierten Bedingungen 80 % Umsatz an synthetisierter GDP-Mannose erzielt werden. Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit ein neues, effektives und kostengünstiges Regenerations-System, erstmals durch Nutzung von PolyP, für das Glykosyltransferase-Substrat GDP-Mannose erfolgreich entwickelt werden.
- Abschließend wurde die Synthese und Isolation des Produktes Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂Man₁ nach enzymatischer Synthese im 100 mL-Maßstab (100 mg an Substrat Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂) erfolgreich durchgeführt. Nach Extraktion mit organischen Lösungsmitteln und präparativer HPLC betrug die Ausbeute an Produkt 51.3 %.

Insgesamt ist es gelungen mit der Bereitstellung der rekombinanten Glykosyltransferase His₆-Alg1ΔTM und der vorgestellten entwickelten Synthese mit Regeneration des preisintensiven Substrates GDP-Mannose, eine kostengünstige Strategie für die hochselektive Bildung von Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂-Man₁ zur Verfügung zu stellen. Die gewonnen Erkenntnisse geben anwendungsorientierte Einblicke im *in vitro*-Umgang mit den gewählten Enzymen und mit nicht-natürlichen Substraten. Die vorliegende Arbeit bildet eine Grundlage für die präparative Synthese von Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂Man₁ durch Einsatz rekombinanter Biokatalysatoren in Multienzym-Multisubstrat-Reaktionen.

7 Ausblick

Glykokonjugate stehen im Fokus der pharmazeutischen Industrie. Das in dieser Arbeit etablierte System zur enzymatischen Synthese von Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂Man₁ bildet daher eine wichtige Grundlage für weiterführende Arbeiten. Das GDP-Mannose-Regenerationssystem zeigt besonders in Bezug auf die Glukokinase Limitationen, da diese neben ATP auch GTP und Nukleosiddiphosphate als Substrat akzeptiert. Weiterführende Studien zum Einfluss der Verhältnisse an GDP/ GTP und ADP/ ATP auf die Gesamtausbeute erscheinen vielversprechend. Auch ein Ersatz des Startsubstrates GTP gegen GDP bzw. ein späteres Zuführen des Guanosinnukleotids könnten zur Steigerung der Produktausbeute führen [216, 240]. Auch eine Optimierung durch Austausch des Enzyms Glk durch die PP-Glk aus *Anabena spec.* scheint vielversprechend [249], da einerseits so auf den Einsatz von Adenosinnukleotiden ganz verzichtet werden könnte und GTP nicht in Nebenreaktionen umgesetzt werden kann. Hier müsste allerdings zunächst geklärt werden, welche Kettenlängen an PolyP die PP-Glk bevorzugt. In Bezug auf die Ppk3 werden Optimierungsmöglichkeiten durch den zusätzlichen Einsatz von Kalzium-Ionen gesehen, welche die Aktivität des Enzyms steigern [207]. Da die His₆-Alg1ΔTM ein pH-Optimum bei 8.5 zeigt, sollte auch die Produktzunahme der Eintopf-Reaktion bei diesem pH-Wert untersucht werden. Nach Isolation des Produktes Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂Man₁ wird neben einer reinen Produktfraktion auch eine Fraktion aus Substrat und Produkt gefunden. Da das Akzeptor-Substrat Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂ eine Substratüberschuss-Inhibierung aufweist, könnte die diskontinuierliche/ sequentielle Zugabe des Phytanyl-Substrates für die *in vitro*-Synthese von Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂Man₁ im großen Maßstab (*large scale*) eine erfolgreiche Strategie sein. Prinzipiell sollten Variationen der Enzym- und Substratkonzentration auch im Eintopf-Ansatz selbst untersucht werden, da die Auswirkungen in den Einzelreaktionen nicht unbedingt denen in den Mehr-Enzym-Reaktionen entsprechen müssen.

Zur Analyse der Substanzen, welche in der Eintopf-Synthese als Substrat eingesetzt oder als Produkt gebildet wurden, kamen IP-UPLC mit UV-Detektion und LC-ESI-MS zum Einsatz. Mittels UV-Detektion konnten nicht alle Substrate und Produkte detektiert werden und die LC-ESI-MS Methode erwies sich als nicht quantitativ. Durch Anwendung einer alternativen Detektionsmethode mittels Leitfähigkeitsmessung könnten auch die enzymatischen Umsatzraten bisher nicht detektierbarer Substrate und Produkte, namentlich Mannose-6-P und Mannose-1-P, nachvollzogen werden.

Nach diesen Optimierungen und Vertiefungen des Verständnisses zur Eintopf-Synthese von Phytanyl-PP-(GlcNAc)₂Man₁ könnten ermittelte Informationen zu geeigneten Proteinkonzentrationen zum Beispiel zur Immobilisierung an Nickel-Affinitätschromatografie-Material genutzt werden. Im Idealfall führt dieses Verfahren zur Stabilisierung und mehrfachen Wiederverwendung (*recycling*) der Enzyme, einer eleganten Lösung um kostenrelevante Probleme bei industriellen Anwendungen zu umgehen. Des Weiteren erleichtert diese Prozesstechnik der Immobilisierung die Isolation des Produktes [273]. Zur Herstellung von Phytanyl-Pyrophosphoryl-Mannosylchitobiose sollte ein kontinuierlicher Prozess mit

Abscheidung des Produktes angestrebt werden. Zur Produktabscheidung böte sich Lektin-gekoppeltes Chromatografie-Material an, welches terminale Mannoseeinheiten bindet. Es gibt eine Vielzahl an Mannose-bindenden Lektinen, die genutzt werden könnten [281-284]. Um wirtschaftlichen Produktions-Ansprüchen zu genügen, wäre es weiter von großem Interesse, Reaktionen in größerem Maßstab (*scale up*) zu etablieren.

Um weitere Einblicke in den Reaktionsmechanismus der Mannosyltransferase Alg1 zu erlangen, könnten Software-gestützte Modellierungen der 3D-Struktur des Enzyms und *docking*-Studien erfolgen. Ein anstrebenswertes Ziel wäre ferner, mit Hilfe von sauberen Proteinlösungen Röntgenstrukturanalysen zur Aufklärung der Proteinstruktur von Glykosyltransferasen, wie der Alg1 Δ TM durchzuführen. Mit Hilfe neuer Erkenntnisse zur räumlichen Struktur der Alg1 können Untersuchungen zu alternativen Lipid-Anker-Akzeptanzen oder gezielten Mutationen zur Manipulation von Substrat-Spezifitäten (*rational protein design*) gemacht werden. Dem gegenüber steht eine weitere interessante Variante auf der Suche nach Proteinvarianten mit veränderter Substratspezifität – die Optimierung mittels gerichteter Evolution (*directed evolution*). Hier gehen zufallsbasierte Mutagenesen den möglichen Weg der Evolution *in vitro*, in dessen Verlauf Kandidaten mit verbesserten Eigenschaften für industrielle Anwendungen gefunden werden können [273].

Literaturverzeichnis

1. Consortium, I.H.G.S., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. 409(6822): p. 860-921.
2. Kellis, M., et al., *Defining functional DNA elements in the human genome*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014: p. 201318948.
3. Stoeger, T., et al., *Large-scale investigation of the reasons why potentially important genes are ignored*. PLoS Biol, 2018. 16(9): p. e2006643.
4. Cozzone, A.J., *Post-translational modification of proteins by reversible phosphorylation in prokaryotes*. Biochimie, 1998. 80(1): p. 43-8.
5. Manning, G., et al., *Evolution of protein kinase signaling from yeast to man*. Trends in Biochemical Sciences, 2002. 27(10): p. 514-20.
6. Polevoda, B. and F. Sherman, *The diversity of acetylated proteins*. Genome Biol, 2002. 3(5): p. reviews0006-reviews0006.
7. Spiro, R.G., *Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds*. Glycobiology, 2002. 12(4): p. 43R-56R.
8. Varki, A., *Evolutionary forces shaping the Golgi glycosylation machinery: why cell surface glycans are universal to living cells*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. 3(6).
9. Wormald, M.R. and R.A. Dwek, *Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability*. Structure, 1999. 7(7): p. R155-60.
10. Imperiali, B. and S.E. O'Connor, *Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure*. Curr Opin Chem Biol, 1999. 3(6): p. 643-9.
11. Helenius, A. and M. Aebi, *Intracellular functions of N-linked glycans*. Science, 2001. 291(5512): p. 2364-9.
12. Lehle, L. and W. Tanner, 475–509. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands., in *Glycoproteins*, J. Montreuil, Vliegenthart, J.F.G. & Schachter, H., Editor 1995.
13. Flintegaard, T.V., et al., *N-glycosylation increases the circulatory half-life of human growth hormone*. Endocrinology, 2010. 151(11): p. 5326-36.
14. Gabius, H.-J. and J. Roth, *An introduction to the sugar code*. Histochemistry and Cell Biology, 2017. 147(2): p. 111-117.
15. Wang, X., C.G. Ji, and J.Z. Zhang, *Glycosylation Modulates Human CD2-CD58 Adhesion via Conformational Adjustment*. J Phys Chem B, 2015. 119(22): p. 6493-501.
16. Taylor, M.E. and K. Drickamer, *Introduction to Glycobiology* 2011: OUP Oxford.
17. Brockhausen, I., *Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells*. Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj., 1999. 1473: p. 67-95.
18. Brockhausen, I., *Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells*. Biochim Biophys Acta, 1999. 1473(1): p. 67-95.
19. Doucey, M.A., et al., *Protein C-mannosylation is enzyme-catalysed and uses dolichyl-phosphate-mannose as a precursor*. Molecular Biology of the Cell, 1998. 9(2): p. 291-300.
20. Aebi, M., *N-linked protein glycosylation in the ER*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2013. 1833(11): p. 2430-2437.
21. Gavel, Y. and G. von Heijne, *Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering*. Protein Engineering, 1990. 3(5): p. 433-42.
22. Imperiali, B. and K.W. Rickert, *Conformational implications of asparagine-linked glycosylation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1995. 92(1): p. 97-101.
23. Burda, P. and M. Aebi, *The dolichol pathway of N-linked glycosylation*. Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects, 1999. 1426(2): p. 239-257.

24. Wilson, I.B.H., et al., *Dolichol is not a necessary moiety for lipid-linked oligosaccharide substrates of the mannosyltransferases involved in in vitro N-linked-oligosaccharide assembly*. 1995. 310(3): p. 909-16.
25. Grabinska, K. and G. Palamarczyk, *Dolichol biosynthesis in the yeast Saccharomyces cerevisiae: an insight into the regulatory role of farnesyl diphosphate synthase*. FEMS Yeast Res, 2002. 2(3): p. 259-65.
26. Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., Deutzmann, R., *Duale Reihe Biochemie*. Vol. 3.Auflage. 2012, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
27. Lu, J., et al., *Alg14 organizes the formation of a multiglycosyltransferase complex involved in initiation of lipid-linked oligosaccharide biosynthesis*. Glycobiology, 2012. 22(4): p. 504-16.
28. Gao, X.D., A. Nishikawa, and N. Dean, *Physical interactions between the Alg1, Alg2, and Alg11 mannosyltransferases of the endoplasmic reticulum*. Glycobiology, 2004. 14(6): p. 559-570.
29. Perez, C., et al., *Structure and mechanism of an active lipid-linked oligosaccharide flippase*. Nature, 2015. 524(7566): p. 433-8.
30. Larkin, A. and B. Imperiali, *The expanding horizons of asparagine-linked glycosylation*. Biochemistry, 2011. 50(21): p. 4411-26.
31. Bano-Polo, M., et al., *N-glycosylation efficiency is determined by the distance to the C-terminus and the amino acid preceding an Asn-Ser-Thr sequon*. Protein Science, 2011. 20(1): p. 179-86.
32. Ruiz-Canada, C., D.J. Kelleher, and R. Gilmore, *Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of polypeptides by distinct mammalian OST isoforms*. Cell, 2009. 136(2): p. 272-83.
33. Mohorko, E., R. Glockshuber, and M. Aebi, *Oligosaccharyltransferase: the central enzyme of N-linked protein glycosylation*. Journal of Inherited Metabolic Disease, 2011. 34(4): p. 869-78.
34. Liu, Y., et al., *Enhancing the secretion of recombinant proteins by engineering N-glycosylation sites*. Biotechnology Progress, 2009. 25(5): p. 1468-75.
35. Satoh, T., et al., *Structural basis for two-step glucose trimming by glucosidase II involved in ER glycoprotein quality control*. Sci Rep, 2016. 6: p. 20575.
36. Huang, Y., et al., *Two endoplasmic reticulum proteins (calnexin and calreticulin) are involved in innate immunity in Chinese mitten crab (Eriocheir sinensis)*. Sci Rep, 2016. 6: p. 27578.
37. Ellgaard, L. and E.M. Frickel, *Calnexin, calreticulin, and ERp57: teammates in glycoprotein folding*. Cell Biochemistry and Biophysics, 2003. 39(3): p. 223-47.
38. Molinari, M., *N-glycan structure dictates extension of protein folding or onset of disposal*. Nat Chem Biol, 2007. 3(6): p. 313-20.
39. Appenzeller-Herzog, C. and H.P. Hauri, *The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function*. Journal of Cell Science, 2006. 119(Pt 11): p. 2173-83.
40. Tulsiani, D.R. and O. Touster, *The purification and characterization of mannosidase IA from rat liver Golgi membranes*. Journal of Biological Chemistry, 1988. 263(11): p. 5408-17.
41. Higel, F., et al., *N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2016. 100: p. 94-100.
42. Nishima, W., et al., *Effect of bisecting GlcNAc and core fucosylation on conformational properties of biantennary complex-type N-glycans in solution*. J Phys Chem B, 2012. 116(29): p. 8504-12.
43. Zhou, D., *Why are glycoproteins modified by poly-N-acetyllactosamine glyco-conjugates?* Curr Protein Pept Sci, 2003. 4(1): p. 1-9.
44. Nairn, A.V., et al., *Regulation of glycan structures in murine embryonic stem cells: combined transcript profiling of glycan-related genes and glycan structural analysis*. Journal of Biological Chemistry, 2012. 287(45): p. 37835-56.
45. Trombetta, E.S., *The contribution of N-glycans and their processing in the endoplasmic reticulum to glycoprotein biosynthesis*. Glycobiology, 2003. 13(9): p. 7.

46. Rudd, P.M., et al., *Glycoforms modify the dynamic stability and functional activity of an enzyme*. *Biochemistry*, 1994. 33(1): p. 17-22.
47. Ahmad, I., et al., *Recognition of Protease Binding Site in Bovine Pancreatic RNase B: Role of Thr45 Modification by O-GlcNAc, Phosphate and their Interplay*. *Pakistan J. Zool.*, 2005. 37(2): p. 81-86.
48. Xu, G., M. Narayan, and H.A. Scheraga, *The oxidative folding rate of bovine pancreatic ribonuclease is enhanced by a covalently attached oligosaccharide*. *Biochemistry*, 2005. 44(28): p. 9817-23.
49. Shade, K.-T. and R. Anthony, *Antibody Glycosylation and Inflammation*. *Antibodies*, 2013. 2(3): p. 392.
50. Lapid, K. and N. Sharon, *Meet the multifunctional and sexy glycoforms of glycodelin*. *Glycobiology*, 2006. 16(3): p. 39R-45R.
51. Gao, L., et al., *N-glycoform diversity of cellobiohydrolase I from *Penicillium decumbens* and synergism of nonhydrolytic glycoform in cellulose degradation*. *Journal of Biological Chemistry*, 2012. 287(19): p. 15906-15.
52. Varki, A., *Nothing in glycobiology makes sense, except in the light of evolution*. *Cell*, 2006. 126(5): p. 841-5.
53. Bishop, J.R. and P. Gagneux, *Evolution of carbohydrate antigens--microbial forces shaping host glycomes?* *Glycobiology*, 2007. 17(5): p. 23R-34R.
54. Springer, S.A. and P. Gagneux, *Glycan evolution in response to collaboration, conflict, and constraint*. *Journal of Biological Chemistry*, 2013. 288(10): p. 6904-11.
55. Soares da Costa, D., R.L. Reis, and I. Pashkuleva, *Sulfation of Glycosaminoglycans and Its Implications in Human Health and Disorders*. *Annu Rev Biomed Eng*, 2017. 19: p. 1-26.
56. Khedri, Z., et al., *A Chemical Biology Solution to Problems with Studying Biologically Important but Unstable 9-O-Acetyl Sialic Acids*. *ACS Chem Biol*, 2017. 12(1): p. 214-224.
57. Bohnsack, R.N., et al., *Cation-independent mannose 6-phosphate receptor: a composite of distinct phosphomannosyl binding sites*. *J. of Biological Chemistry*, 2009. 284(50): p. 35215-26.
58. Schwarz, F. and M. Aebi, *Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation*. *Current Opinion in Structural Biology*, 2011. 21(5): p. 576-582.
59. Dell, A., et al., *Similarities and differences in the glycosylation mechanisms in prokaryotes and eukaryotes*. *Int J Microbiol*, 2010. 2010: p. 148178.
60. Valderrama-Rincon, J.D., et al., *An engineered eukaryotic protein glycosylation pathway in *Escherichia coli**. *Nature Chemical Biology*, 2012. 8(5): p. 434-436.
61. Gagneux, P., M. Aebi, and A. Varki, *Evolution of Glycan Diversity.*, in *Essentials of Glycobiology [Internet]. 3rd edition*, A. Varki, Cummings, R.D., Esko, J.D., Editor 2017, Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
62. Mitra, N., et al., *N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function*. *Trends in Biochemical Sciences*, 2006. 31(3): p. 156-63.
63. Beckham, G.T., et al., *Harnessing glycosylation to improve cellulase activity*. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012. 23(3): p. 338-45.
64. Shental-Bechor, D. and Y. Levy, *Effect of glycosylation on protein folding: a close look at thermodynamic stabilization*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008. 105(24): p. 8256-61.
65. Apweiler, R., H. Hermjakob, and N. Sharon, *On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999. 6(1): p. 4-8.
66. Manwar Hussain, M.R., et al., *Charge and Polarity Preferences for N-Glycosylation: A Genome-Wide In Silico Study and Its Implications Regarding Constitutive Proliferation and Adhesion of Carcinoma Cells*. *Frontiers in Oncology*, 2018. 8(29).
67. Ferris, S.P., V.K. Kodali, and R.J. Kaufman, *Glycoprotein folding and quality-control mechanisms in protein-folding diseases*. *Dis Model Mech*, 2014. 7(3): p. 331-41.

-
68. Rudd, P.M. and R.A. Dwek, *Glycosylation: heterogeneity and the 3D structure of proteins*. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 1997. 32(1): p. 1-100.
 69. Swanwick, R.S., et al., *Increased thermal stability of site-selectively glycosylated dihydrofolate reductase*. ChemBioChem, 2005. 6(8): p. 1338-40.
 70. Russell, D., N.J. Oldham, and B.G. Davis, *Site-selective chemical protein glycosylation protects from autolysis and proteolytic degradation*. Carbohydrate Research, 2009. 344(12): p. 1508-14.
 71. Traini, M., et al., *N-glycosylation of human sphingomyelin phosphodiesterase acid-like 3A (SMPDL3A) is essential for stability, secretion and activity*. Biochemical Journal, 2017. 474(7): p. 1071-1092.
 72. Goettig, P., *Effects of Glycosylation on the Enzymatic Activity and Mechanisms of Proteases*. Int J Mol Sci, 2016. 17(12).
 73. Varki, A., et al., *Essentials of glycobiology*. 2nd ed. Vol. EUR 98,90, full text available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=glyco2>. 2009, New York: CSH Lab Press.
 74. O'Sullivan, J.M., et al., *Galectin-1 and Galectin-3 Constitute Novel-Binding Partners for Factor VIII*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2016. 36(5): p. 855-63.
 75. Dan, X., W. Liu, and T.B. Ng, *Development and Applications of Lectins as Biological Tools in Biomedical Research*. Medicinal Research Reviews, 2016. 36(2): p. 221-47.
 76. Roucka, M., et al., *Glycosylation Pattern of Biotechnologically Produced Proteins - Lectin Array Technology as a Versatile Tool for Screening?* Medical Research Archives, 2018. 6(3).
 77. Pomin, V.H. and B. Mulloy, *Glycosaminoglycans and Proteoglycans*. Pharmaceuticals (Basel), 2018. 11(1).
 78. Schlachter, S., et al., *The Borrelia burgdorferi Glycosaminoglycan Binding Protein Bgp in the B31 Strain Is Not Essential for Infectivity despite Facilitating Adherence and Tissue Colonization*. Infection and Immunity, 2018. 86(2).
 79. Sun, H., et al., *Pathogenicity and transmission of a swine influenza A(H6N6) virus*. Emerg Microbes Infect, 2017. 6(4): p. e17.
 80. Parajuli, B., et al., *Restricted HIV-1 Env glycan engagement by lectin-reengineered DAVE1 protein chimera is sufficient for lytic inactivation of the virus*. Biochem Journal, 2018. 475(5): p. 931-957.
 81. Hobbs, J.K., et al., *Glycan-metabolizing enzymes in microbe-host interactions: the Streptococcus pneumoniae paradigm*. FEBS Letters, 2018. 592(23): p. 3865-3897.
 82. Wormald, M.R., et al., *Conformational studies of oligosaccharides and glycopeptides: complementarity of NMR, X-ray crystallography, and molecular modelling*. Chemical Reviews, 2002. 102(2): p. 371-86.
 83. Dias, A.M., et al., *Metabolic control of T cell immune response through glycans in inflammatory bowel disease*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018. 115(20): p. E4651-E4660.
 84. van de Bovenkamp, F.S., et al., *Adaptive antibody diversification through N-linked glycosylation of the immunoglobulin variable region*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018. 115(8): p. 1901-1906.
 85. Goo, L., et al., *The Zika virus envelope protein glycan loop regulates virion antigenicity*. Virology, 2018. 515: p. 191-202.
 86. Martinek, V., et al., *Glycosylation protects proteins against free radicals generated from toxic xenobiotics*. Toxicological Sciences, 2010. 117(2): p. 359-74.
 87. De Oliveira, D.M., et al., *Blood Group Antigen Recognition via the Group A Streptococcal M Protein Mediates Host Colonization*. MBio, 2017. 8(1).
 88. Kuriakose, A., N. Chirmule, and P. Nair, *Immunogenicity of Biotherapeutics: Causes and Association with Posttranslational Modifications*. J Immunol Res, 2016. 2016: p. 1298473.
 89. Walski, T., et al., *Protein N-glycosylation and N-glycan trimming are required for postembryonic development of the pest beetle Tribolium castaneum*. Sci Rep, 2016. 6: p. 35151.

-
90. Lam, P.V., et al., *Structure-based comparative analysis and prediction of N-linked glycosylation sites in evolutionarily distant eukaryotes*. Genomics Proteomics Bioinfo, 2013. 11(2): p. 96-104.
 91. Rodriguez, E., S.T.T. Schettters, and Y. van Kooyk, *The tumour glyco-code as a novel immune checkpoint for immunotherapy*. Nat Rev Immunol, 2018. 18(3): p. 204-211.
 92. Koike, T., et al., *Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells: A missing link between Warburg effect and induction of selectin-ligand carbohydrates*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. 101(21): p. 8132-7.
 93. Martersteck, C.M., et al., *Unique alpha 2, 8-polysialylated glycoproteins in breast cancer and leukemia cells*. Glycobiology, 1996. 6(3): p. 289-301.
 94. Ferreira, I., et al., *Glycosylation as a Main Regulator of Growth and Death Factor Receptors Signaling*. international Journal of Molecular Sciences, 2018. 19: p. 580.
 95. Rodrigues, J.C., et al., *IgA Nephropathy*. Clin J Am Soc Nephrol, 2017. 12(4): p. 677-686.
 96. Sarbu, M., C. Cozma, and A.D. Zamfir, *Structure-to-function Relationship of Carbohydrates in the Mechanism of Lysosomal Storage Disorders (LSDs)*. Current Organic Chemistry, 2017. 21: p. 2719.
 97. Bieberich, E., *Synthesis, Processing, and Function of N-glycans in N-glycoproteins*. Adv Neurobiol, 2014. 9: p. 47-70.
 98. Jaeken, J., *Familial psychomotor retardation with markedly fluctuating serum prolactin, FSH and GH levels, partial TBG-deficiency, increased serum arylsulphatase A and increased CSF protein: a new syndrome?* Pediatric Research Volume 14, page 179, 90. 1980.
 99. Marques-da-Silva, D., et al., *Liver involvement in congenital disorders of glycosylation (CDG). A systematic review of the literature*. J of Inherited Metabolic Disease, 2017. 40(2): p. 195-207.
 100. Grünewald, S., *The clinical spectrum of phosphomannomutase 2 deficiency (CDG-Ia)*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2009. 1792(9): p. 827-834.
 101. Ferreira, C.R., et al., *Recognizable phenotypes in CDG*. Journal of Inherited Metabolic Disease, 2018. 41(3): p. 541-553.
 102. Cline, A., et al., *A zebrafish model of PMM2-CDG reveals altered neurogenesis and a substrate-accumulation mechanism for N-linked glycosylation deficiency*. Molecular Biology of the Cell, 2012. 23(21): p. 4175-87.
 103. Schollen, E., et al., *Increased recurrence risk in congenital disorders of glycosylation type Ia (CDG-Ia) due to a transmission ratio distortion*. Journal of Medical Genetics, 2004. 41(11): p. 877-80.
 104. Wang, J.Z., et al., *Glycosylation of microtubule-associated protein tau: an abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease*. Nature Medicine, 1996. 2(8): p. 871-5.
 105. Durand, G. and N. Seta, *Protein glycosylation and diseases: blood and urinary oligosaccharides as markers for diagnosis and therapeutic monitoring*. Clin Chemistry, 2000. 46(6 Pt 1): p. 795-805.
 106. Berry, G.T., *Classic Galactosemia and Clinical Variant Galactosemia*, in GeneReviews((R)), M.P. Adam, et al., Editors. 2000: Seattle (WA).
 107. Jaeken, J., et al., *Inhibition of phosphomannose isomerase by fructose 1-phosphate: an explanation for defective N-glycosylation in hereditary fructose intolerance*. Pediatric Research, 1996. 40(5): p. 764-6.
 108. Bilen, O., et al., *The effect of malnutrition on protein glycosylation in children*. Iranian journal of pediatrics, 2014. 24(3): p. 273-279.
 109. Varki, A., *Biological roles of glycans*. Glycobiology, 2017. 27(1): p. 3-49.
 110. Seeberger, P.H., et al., *Automated chemical synthesis of carbohydrates*, in Max-Planck-Gesellschaft Jahrbuch 2009/20102010.
 111. Krasnewich, D.M., et al., *Abnormal synthesis of dolichol-linked oligosaccharides in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome*. Glycobiology, 1995. 5(5): p. 503-10.
 112. Brasil, S., et al., *CDG Therapies: From Bench to Bedside*. Int J Mol Sci, 2018. 19(5).
 113. Ceccarini, M.R., et al., *Alpha-Mannosidosis: Therapeutic Strategies*. international Journal of Molecular Sciences, 2018. 19(5): p. 1500.

114. Kukacka, Z., et al., *Antibody Epitope of Human alpha-Galactosidase A Revealed by Affinity Mass Spectrometry: A Basis for Reversing Immunoreactivity in Enzyme Replacement Therapy of Fabry Disease*. ChemMedChem, 2018. 13(9): p. 909-915.
115. Parenti, G., G. Andria, and K.J. Valenzano, *Pharmacological Chaperone Therapy: Preclinical Development, Clinical Translation, and Prospects for the Treatment of Lysosomal Storage Disorders*. Mol Ther, 2015. 23(7): p. 1138-1148.
116. Hughes, D.A., et al., *Oral pharmacological chaperone migalastat compared with enzyme replacement therapy in Fabry disease: 18-month results from the randomised phase III ATTRACT study*. Journal of Medical Genetics, 2017. 54(4): p. 288-296.
117. Seibel, J., et al., *Mit Zucker gegen Bösartiges*. Nachrichten aus der Chemie, 2018. 66(1): p. 30-31.
118. Verhoef, J.J. and T.J. Anchordoquy, *Questioning the Use of PEGylation for Drug Delivery*. Drug Deliv Transl Res, 2013. 3(6): p. 499-503.
119. Zhang, F., M.R. Liu, and H.T. Wan, *Discussion about several potential drawbacks of PEGylated therapeutic proteins*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2014. 37(3): p. 335-9.
120. Agrawal, N., *Polymeric Prodrugs: Recent Achievements and General Strategies*. Journal of Antivirals and Antiretrovirals, 2013. 15: p. 1-12.
121. Jones, A., *N-Glycan Analysis of Biotherapeutic Proteins*. BioPharm Int, 2017. 30(6): p. 20-25.
122. Zitzmann, J., et al., *Process Optimization for Recombinant Protein Expression in Insect Cells*, in New Insights into Cell Culture Technology 2017.
123. He, X., et al., *Production of active human glucocerebrosidase in seeds of Arabidopsis thaliana complex-glycan-deficient (cgl) plants*. Glycobiology, 2012. 22(4): p. 492-503.
124. Limkul, J., et al., *The production of human glucocerebrosidase in glyco-engineered Nicotiana benthamiana plants*. Plant Biotechnol J, 2016. 14(8): p. 1682-94.
125. Hanania, U., et al., *Establishment of a tobacco BY2 cell line devoid of plant-specific xylose and fucose as a platform for the production of biotherapeutic proteins*. Plant Biotechnol J, 2017. 15(9): p. 1120-1129.
126. Pandey, R., et al., *Re-engineering of an Escherichia coli K-12 strain for the efficient production of recombinant human Interferon Gamma*. Enzyme and Microbial Technology, 2018. 117: p. 23-31.
127. Sareneva, T., et al., *N-glycosylation of human interferon-gamma: glycans at Asn-25 are critical for protease resistance*. Biochemical Journal, 1995. 308 (Pt 1): p. 9-14.
128. Dumont, J., et al., *Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives*. Critical Reviews in Biotechnology, 2016. 36(6): p. 1110-1122.
129. Wells, E. and A.S. Robinson, *Cellular engineering for therapeutic protein production: product quality, host modification, and process improvement*. Biotechnol J, 2017. 12(1).
130. Li, M.Y., et al., *Real-time monitoring of antibody glycosylation site occupancy by in situ Raman spectroscopy during bioreactor CHO cell cultures*. Biotechnol Progress, 2018. 34(2): p. 486-493.
131. Restelli, V. and M. Butler, *The Effect of Cell Culture Parameters on Protein Glycosylation*, 2006. p. 61-92.
132. Werner, R.G., K. Kopp, and M. Schlueter, *Glycosylation of therapeutic proteins in different production systems*. Acta Paediatrica, 2007. 96(455): p. 17-22.
133. Mauro, V.P., *Codon Optimization in the Production of Recombinant Biotherapeutics: Potential Risks and Considerations*. BioDrugs, 2018. 32(1): p. 69-81.
134. Sera, L.C. and M.L. McPherson, *Pharmacokinetics and pharmacodynamic changes associated with aging and implications for drug therapy*. Clinics in Geriatric Med, 2012. 28(2): p. 273-86.
135. Vugmeyer, Y., et al., *Pharmacokinetics and toxicology of therapeutic proteins: Advances and challenges*. World J Biol Chem, 2012. 3(4): p. 73-92.
136. Glasscock, C.J., et al., *A flow cytometric approach to engineering Escherichia coli for improved eukaryotic protein glycosylation*. Metab Eng, 2018. 47: p. 488-495.

137. Vanz, A.L., M. Nimtz, and U. Rinas, *Decrease of UPR- and ERAD-related proteins in Pichia pastoris during methanol-induced secretory insulin precursor production in controlled fed-batch cultures*. Microb Cell Fact, 2014. 13(1): p. 23.
138. Nandy, S.K. and R.K. Srivastava, *A review on sustainable yeast biotechnological processes and applications*. Microbiological Research, 2018. 207: p. 83-90.
139. Li, H., et al., *Optimization of humanized IgGs in glycoengineered Pichia pastoris*. Nature Biotechnology, 2006. 24(2): p. 210-5.
140. Liu, C.P., et al., *Glycoengineering of antibody (Herceptin) through yeast expression and in vitro enzymatic glycosylation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018. 115(4): p. 720-725.
141. Irani, Z.A., et al., *Genome-scale metabolic model of Pichia pastoris with native and humanized glycosylation of recombinant proteins*. Biotechnology and Bioengineering, 2016. 113(5): p. 961-9.
142. Wang, G., M. Huang, and J. Nielsen, *Exploring the potential of Saccharomyces cerevisiae for biopharmaceutical protein production*. Current Opinion in Biotechnology, 2017. 48: p. 77-84.
143. Montero Morales, L. and H. Steinkellner, *Advanced Plant-Based Glycan Engineering*. Vol. 6. 2018.
144. Ko, K., et al., *Glyco-engineering of biotherapeutic proteins in plants*. Mol Cells, 2008. 25(4): p. 494-503.
145. Bakker, H., et al., *An antibody produced in tobacco expressing a hybrid beta-1,4-galactosyltransferase is essentially devoid of plant carbohydrate epitopes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. 103(20): p. 7577-82.
146. Strasser, R., et al., *Generation of glyco-engineered Nicotiana benthamiana for the production of monoclonal antibodies with a homogeneous human-like N-glycan structure*. Plant Biotechnol J, 2008. 6(4): p. 392-402.
147. Strasser, R., *Plant protein glycosylation*. Glycobiology, 2016. 26(9): p. 926-939.
148. Cao, J., et al., *Versatile and on-demand biologics co-production in yeast*. Nat Commun, 2018. 9(1): p. 77.
149. Mimura, Y., et al., *Glycosylation engineering of therapeutic IgG antibodies: challenges for the safety, functionality and efficacy*. Protein & cell, 2018. 9(1): p. 47-62.
150. Zhang, L., S. Luo, and B. Zhang, *Glycan analysis of therapeutic glycoproteins*. MAbs, 2016. 8(2): p. 205-15.
151. Schoborg, J.A., et al., *A cell-free platform for rapid synthesis and testing of active oligosaccharyltransferases*. Biotechnology and Bioengineering, 2018. 115(3): p. 739-750.
152. Weishaupt, M., et al., *Chapter Twenty-Two - Solid Phase Synthesis of Oligosaccharides*, in *Methods in Enzymology*, M. Fukuda, Editor 2010, Academic Press. p. 463-484.
153. Flitsch, S.L., et al., *The chemoenzymic synthesis of neoglycolipids and lipid-linked oligosaccharides using glycosyltransferases*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1994. 2(11): p. 1243-1250.
154. Nagasaki, M., et al., *Chemical Synthesis of a Complex-Type N-Glycan Containing a Core Fucose*. Journal of Organic Chemistry, 2016. 81(22): p. 10600-10616.
155. Wong, C.H., *Enzymatic and chemo-enzymatic synthesis of carbohydrates*, in *Pure and Applied Chemistry* 1995. p. 1609.
156. Kulkarni, S.S., in *Selective Glycosylations: Synthetic Methods and Catalysts*, C.S. Bennett, Editor 2017.
157. Seitz, O., *Glycopeptide Synthesis and the Effects of Glycosylation on Protein Structure and Activity*. ChemBioChem, 2000. 1(4): p. 214-246.
158. Hojo, H., et al., *Chemoenzymatic synthesis of hydrophobic glycoprotein: synthesis of saposin C carrying complex-type carbohydrate*. Journal of Organic Chemistry, 2012. 77(21): p. 9437-46.
159. Wang, L.X. and M.N. Amin, *Chemical and chemoenzymatic synthesis of glycoproteins for deciphering functions*. Chemistry and Biology, 2014. 21(1): p. 51-66.

-
160. Li, Y., et al., *Chapter Twelve - Chemical biology of glycoproteins: From chemical synthesis to biological impact*, in *Methods in Enzymology*, A.K. Shukla, Editor 2019, Academic Press. p. 213-229.
 161. Council, N.R., *Transforming Glycoscience: A Roadmap for the Future* 2012, Washington, DC: The National Academies Press. 208.
 162. Saribas, A.S., et al., *Refolding of human beta-1-2 GlcNAc transferase (GnT1) and the role of its unpaired Cys 121*. *Biochemical and Biophysical Research Comm*, 2007. 362(2): p. 381-6.
 163. Barb, A.W., *Intramolecular N-glycan/polypeptide interactions observed at multiple N-glycan remodeling steps through [(13)C,(15)N]-N-acetylglucosamine labeling of immunoglobulin G1*. *Biochemistry*, 2015. 54(2): p. 313-22.
 164. Endo, T., et al., *Cloning and expression of beta1,4-galactosyltransferase gene from Helicobacter pylori*. *Glycobiology*, 2000. 10(8): p. 809-13.
 165. Ortiz-Soto, M.E. and J. Seibel, *Expression of Functional Human Sialyltransferases ST3Gal1 and ST6Gal1 in Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 2016. 11(5): p. e0155410.
 166. Revers, L., et al., *The potential dolichol recognition sequence of beta-1,4-mannosyltransferase is not required for enzymic activity using phytanyl-pyrophosphoryl-alpha-N,N'- diacetylchitobioside as acceptor*. *Biochem J*, 1994. 299 (Pt 1): p. 23-7.
 167. O'Reilly, M.K., et al., *In vitro evidence for the dual function of Alg2 and Alg11: Essential mannosyltransferases in N-Linked glycoprotein biosynthesis*. *Biochem*, 2006. 45(31): p. 9593-603.
 168. Absmanner, B., et al., *Biochemical characterization, membrane association and identification of amino acids essential for the function of Alg11 from Saccharomyces cerevisiae, an alpha 1,2-mannosyltransferase catalysing two sequential glycosylation steps in the formation of the lipid-linked core oligosaccharide*. *Biochemical Journal*, 2010. 426: p. 205-217.
 169. Revers, L., et al., *Development of recombinant, immobilised beta-1,4-mannosyltransferase for use as an efficient tool in the chemoenzymatic synthesis of N-linked oligosaccharides*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. 1428(1): p. 88-98.
 170. Li, L., et al., *Overexpression and topology of bacterial oligosaccharyltransferase PglB*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010. 394(4): p. 1069-74.
 171. Al-Dabbagh, B., et al., *Preparative enzymatic synthesis of polyprenyl-pyrophosphoryl-N-acetylglucosamine, an essential lipid intermediate for the biosynthesis of various bacterial cell envelope polymers*. *Analytical Biochemistry*, 2009. 391(Copyright (C) 2013 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 163-165.
 172. Eichler, J. and Z. Guan, *Lipid sugar carriers at the extremes: The phosphodolichols Archaea use in N-glycosylation*. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2017. 1862(6): p. 589-599.
 173. Palamarczyk, G., et al., *Specificity of solubilized yeast glycosyl transferases for polyprenyl derivatives*. *European Journal of Biochemistry*, 1980. 105(3): p. 517-23.
 174. Rush, J.S., et al., *Mannosylphosphoryldolichol-mediated reactions in oligosaccharide-P-P-dolichol biosynthesis. Recognition of the saturated alpha-isoprene unit of the mannosyl donor by pig brain mannosyltransferases*. *Journal of Biological Chemistry*, 1993. 268(18): p. 13110-7.
 175. Wilson, I.B.H., et al., *A novel mono-branched lipid phosphate acts as a substrate for dolichyl phosphate mannose synthetase*. *Biochemical Journal*, 1993. 295(1): p. 195-201.
 176. Rush, J.S. and C.J. Waechter, *Assay for the transbilayer movement of polyisoprenoid-linked saccharides based on the transport of water-soluble analogues*. *Methods*, 2005. 35(4): p. 316-22.
 177. Kermode, A.R., *Seed Expression Systems for Molecular Farming*, in *Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects*, A. Wang and S. Ma, Editors. 2012, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 89-123.
 178. Research, G.V., *Biologics Market Analysis - Report Summary, Forecasts 2018 - 2025*, in *Industry Growth Report* 2017. p. 185.

-
179. Tartof, K.D.H., C. A., *Improved media for growing plasmid and cosmid clones*. Bethesda Res. Lab. Focus on AACN, 1987. 9: p. 12.
 180. Skerra, A., *Phosphorothioate primers improve the amplification of DNA sequences by DNA polymerases with proofreading activity*. Nucleic Acids Res, 1992. 20(14): p. 3551-4.
 181. Maniatis, T., J. Sambrook, and E.F. Fritsch, *Molecular cloning - A laboratory manual* 1989, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 182. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, 1976. 72: p. 248-54.
 183. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. 227(5259): p. 680-5.
 184. Neubauer, P., et al., *Response of guanosine tetraphosphate to glucose fluctuations in fed-batch cultivations of Escherichia coli*. Journal of Biotechnology, 1995. 43(3): p. 195-204.
 185. Balcke, G.U., et al., *Linking energy metabolism to dysfunctions in mitochondrial respiration-a metabolomics in vitro approach*. Toxicology Letters, 2011. 203(3): p. 200-9.
 186. Kromidas, S., *Das HPLC-MS-Buch für Anwender* 2017: Wiley VCH Verlag GmbH.
 187. Miller, B.G. and R.T. Raines, *Identifying latent enzyme activities: substrate ambiguity within modern bacterial sugar kinases*. Biochemistry, 2004. 43(21): p. 6387-92.
 188. Yang, Y.-H., et al., *One-pot enzymatic synthesis of deoxy-thymidine-diphosphate (TDP)-2-deoxy-alpha-D-glucose using phosphomannomutase*. J of Mol Catalysis B: Enzymatic, 2010. 62: p. 282-7.
 189. Wu, B., et al., *Bifunctional phosphomannose isomerase/GDP-D-mannose pyrophosphorylase is the point of control for GDP-D-mannose biosynthesis in Helicobacter pylori*. FEBS Letters, 2002. 519(1-3): p. 87-92.
 190. Nocek, B., et al., *Polyphosphate-dependent synthesis of ATP and ADP by the family-2 polyphosphate kinases in bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(46): p. 17730-5.
 191. Achbergerova, L. and J. Nahalka, *Degradation of polyphosphates by polyphosphate kinases from Ruegeria pomeroyi*. Biotechnol Lett, 2014. 36(10): p. 2029-35.
 192. Kaushal, G.P. and A.D. Elbein, *Purification and properties of beta-mannosyltransferase that synthesizes Man-beta-GlcNAc-GlcNAc-pyrophosphoryl-dolichol*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1986. 250(1): p. 38-47.
 193. Ballesteros, A., et al., *Stability and stabilization of biocatalysts*. Progress in Biotechnology. Vol. 15. 1998, Amsterdam: Elsevier.
 194. Schildbach, A., et al., *One pot synthesis of GDP-mannose by a multi-enzyme cascade for enzymatic assembly of lipid-linked oligosaccharides*. Biotechnology and Bioengineering, 2018. 115(1): p. 192-205.
 195. Meyer, D., et al., *Molecular characterization of glucokinase from Escherichia coli K-12*. Journal of Bacteriology, 1997. 179(4): p. 1298-306.
 196. Arora, K.K. and P.L. Pedersen, *Glucokinase of Escherichia coli: induction in response to the stress of overexpressing foreign proteins*. Archives of Biochem and Biophysics, 1995. 319(2): p. 574-8.
 197. Stevenson, G., et al., *Organization of the Escherichia coli K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid*. Journal of Bacteriology, 1996. 178(16): p. 4885-93.
 198. Meredith, T.C., et al., *Modification of lipopolysaccharide with colanic acid (M-antigen) repeats in Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry, 2007. 282(11): p. 7790-8.
 199. Naught, L.E. and P.A. Tipton, *Kinetic mechanism and pH dependence of the kinetic parameters of Pseudomonas aeruginosa phosphomannomutase/phosphoglucomutase*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2001. 396(1): p. 111-8.
 200. Koizumi, S., et al., *Large-scale production of GDP-fucose and Lewis X by bacterial coupling*. 2000. 25(4): p. 213-217.

-
201. Lunin, V.V., et al., *Crystal structures of Escherichia coli ATP-dependent glucokinase and its complex with glucose*. Journal of Bacteriology, 2004. 186(20): p. 6915-27.
 202. Elling, L., et al., *Expression, purification and characterization of recombinant phosphomannomutase and GDP-alpha-D-mannose pyrophosphorylase from S. enterica, group B, for the synthesis of GDP-alpha-D-mannose from D-mannose*. Glycobio, 1996. 6(6): p. 591-7.
 203. Pfeiffer, M., et al., *A Kinase-Independent One-Pot Multienzyme Cascade for an Expedient Synthesis of Guanosine 5'-Diphospho-d-mannose*. Advanced Synthesis & Catalysis, 2016. 358(23): p. 3809-3816.
 204. Lau, K., et al., *Highly efficient chemoenzymatic synthesis of beta1-4-linked galactosides with promiscuous bacterial beta1-4-galactosyltransferases*. Chem Commun, 2010. 46(33): p. 6066-8.
 205. Chen, Y., et al., *One-pot three-enzyme synthesis of UDP-GlcNAc derivatives*. Chem Commun (Camb), 2011. 47(38): p. 10815-7.
 206. Zhang, H., K. Ishige, and A. Kornberg, *A polyphosphate kinase (PPK2) widely conserved in bacteria*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. 99(26): p. 16678-83.
 207. Nahalka, J. and V. Patoprsty, *Enzymatic synthesis of sialylation substrates powered by a novel polyphosphate kinase (PPK3)*. Org Biomol Chem, 2009. 7(9): p. 1778-80.
 208. Achbergerova, L. and J. Nahalka, *Polyphosphate--an ancient energy source and active metabolic regulator*. Microb Cell Fact, 2011. 10: p. 63.
 209. Zhang, R.G., et al., *Structure of Thermotoga maritima stationary phase survival protein SurE: a novel acid phosphatase*. Structure, 2001. 9(11): p. 1095-106.
 210. Ceroni, A., et al., *DISULFIND: a disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction server*. Nucleic Acids Res, 2006. 34.
 211. Hennig, R., et al., *N-Glycosylation Fingerprinting of Viral Glycoproteins by xCGE-LIF*. Methods Mol Biol, 2015. 1331(Copyright (C) 2015 U.S. National Library of Medicine.): p. 123-43.
 212. Kaushal, G.P. and A.D. Elbein, *Partial purification and characterization of beta-mannosyltransferase from suspension-cultured soybean cells*. Biochemistry, 1987. 26(24): p. 7953-60.
 213. Liang, D.M., et al., *Glycosyltransferases: mechanisms and applications in natural product development*. Chem Soc Rev, 2015. 44(22): p. 8350-74.
 214. Bulter, T. and L. Elling, *Enzymatic synthesis of nucleotide sugars*. Glycoconjugate Journal, 1999. 16(2): p. 147-59.
 215. Rosen, S.M. and L.D. Zeleznick, [17] *Enzymatic synthesis of GDP-d-mannose-14C*, in *Methods in Enzymology* 1966, Academic Press. p. 145-147.
 216. Li, L., et al., *Efficient enzymatic synthesis of guanosine 5'-diphosphate-sugars and derivatives*. Org Lett, 2013. 15(21): p. 5528-30.
 217. Fey, S., L. Elling, and U. Kragl, *The cofactor Mg²⁺—a key switch for effective continuous enzymatic production of GDP-mannose using recombinant GDP-mannose pyrophosphorylase*. Carbohydrate Research, 1997. 305(3): p. 475-481.
 218. Andexer, J.N. and M. Richter, *Emerging enzymes for ATP regeneration in biocatalytic processes*. ChemBioChem, 2015. 16(3): p. 380-6.
 219. Sener, A. and W.J. Malaisse, *Kinetics and specificity of human B-cell glucokinase: relevance to hexose-induced insulin release*. Biochimica et Biophysica Acta, 1996. 1312(1): p. 73-8.
 220. Hansen, T., et al., *The first archaeal ATP-dependent glucokinase, from the hyperthermophilic crenarchaeon Aeropyrum pernix, represents a monomeric, extremely thermophilic ROK glucokinase with broad hexose specificity*. Journal of Bacteriology, 2002. 184(21): p. 5955-65.
 221. Han, B., et al., *Molecular characterization of a glucokinase with broad hexose specificity from Bacillus sphaericus strain C3-41*. Applied and Environmental Microbiol, 2007. 73(11): p. 3581-6.

-
222. Porter, C.M. and B.G. Miller, *Cooperativity in monomeric enzymes with single ligand-binding sites*. *Bioorg Chem*, 2012. 43: p. 44-50.
223. Sharma, V., M. Ichikawa, and H.H. Freeze, *Mannose metabolism: more than meets the eye*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014. 453(2): p. 220-8.
224. Lee, W.H., et al., *Modulation of guanosine 5'-diphosphate-D-mannose metabolism in recombinant Escherichia coli for production of guanosine 5'-diphosphate-L-fucose*. *Bioresour Technol*, 2009. 100(24): p. 6143-8.
225. Orvisky, E., et al., *Phosphomannomutase activity in congenital disorders of glycosylation type Ia determined by direct analysis of the interconversion of mannose-1-phosphate to mannose-6-phosphate by high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection*. *Analytical Biochemistry*, 2003. 317(1): p. 12-8.
226. Yang, Y.-H., et al., *Characterization of GDP-mannose pyrophosphorylase from Escherichia coli O157:H7 EDL933 and its broad substrate specificity*. Vol. 37. 2005. 1-8.
227. Tausky, H.H. and E. Shorr, *A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus*. *Journal of Biological Chemistry*, 1953. 202(2): p. 675-85.
228. Vorobyeva, N.N., et al., *Inhibition of Escherichia coli Inorganic Pyrophosphatase by Fructose-1-phosphate*. *Biochemistry*, 2017. 82(8): p. 953-956.
229. Kajander, T., J. Kellosalo, and A. Goldman, *Inorganic pyrophosphatases: one substrate, three mechanisms*. *FEBS Letters*, 2013. 587(13): p. 1863-9.
230. Klapproth, J., et al., *Establishment of a five-enzyme cell-free cascade for the synthesis of uridine diphosphate N-acetylglucosamine*. *Journal of Biotechnology*, 2018. 283: p. 120-129.
231. Ishige, K., H. Zhang, and A. Kornberg, *Polyphosphate kinase (PPK2), a potent, polyphosphate-driven generator of GTP*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(26): p. 16684-8.
232. Kuroda, A. and A. Kornberg, *Polyphosphate kinase as a nucleoside diphosphate kinase in Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997. 94(2): p. 439-42.
233. van Dongen, S.F.M., et al., *Prozessive Katalyse*. *Angew Chemie*, 2014. 126(43): p. 11604-11612.
234. Dalebroux, Z.D. and M.S. Swanson, *ppGpp: magic beyond RNA polymerase*. *Nat Rev Microbiol*, 2012. 10(3): p. 203-12.
235. Zhang, Y., et al., *Novel (p)ppGpp Binding and Metabolizing Proteins of Escherichia coli*. *MBio*, 2018. 9(2).
236. Westhoff, T., et al., *Identification and characterization of adenosine 5'-tetrakisphosphate in human myocardial tissue*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. 278(20): p. 17735-40.
237. Fukuda, Y., et al., *Purification and Characterization of Glucokinase in Escherichia coli*. *B. Agricultural and Biological Chemistry*, 1984. 48(10): p. 2541-2548.
238. Hansen, T. and P. Schönheit, *ATP-dependent glucokinase from the hyperthermophilic bacterium Thermotoga maritima represents an extremely thermophilic ROK glucokinase with high substrate specificity*. *FEMS Microbiology Letters*, 2003. 226(2): p. 405-11.
239. Hengartner, H. and H. Zuber, *Isolation and characterization of a thermophilic glucokinase from Bacillus stearothermophilus*. *FEBS Letters*, 1973. 37(2): p. 212-6.
240. Eisele, A., et al., *In Vitro One-Pot Enzymatic Synthesis of Hyaluronic Acid from Sucrose and N-Acetylglucosamine: Optimization of the Enzyme Module System and Nucleotide Sugar Regeneration*. *ChemCatChem*, 2018. 10(14): p. 2969-2981.
241. Lee, J.H., et al., *Optimization of the enzymatic one pot reaction for the synthesis of uridine 5'-diphosphogalactose*. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2010. 33(1): p. 71-8.
242. Fraga, A., et al., *Inorganic polyphosphates regulate hexokinase activity and reactive oxygen species generation in mitochondria of Rhipicephalus (Boophilus) microplus embryo*. *Int J Biol Sci*, 2013. 9(8): p. 842-52.

-
243. Cardenas, M.L., A. Cornish-Bowden, and T. Ureta, *Evolution and regulatory role of the hexokinases*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998. 1401(3): p. 242-64.
 244. Brigham, C.J. and M.H. Malamy, *Characterization of the RokA and HexA broad-substrate-specificity hexokinases from Bacteroides fragilis and their role in hexose and N-acetylglucosamine utilization*. *Journal of Bacteriology*, 2005. 187(3): p. 890-901.
 245. Sakuraba, H., et al., *Cloning, expression, and characterization of the first archaeal ATP-dependent glucokinase from aerobic hyperthermophilic archaeon Aeropyrum pernix*. *J Biochem*, 2003. 133(2): p. 219-24.
 246. Porter, E.V., et al., *Purification and kinetic characterization of a specific glucokinase from Streptococcus mutans OMZ70 cells*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1982. 709(2): p. 178-86.
 247. Qian, Z., et al., *Thermal stability of glucokinases in Thermoanaerobacter tengcongensis*. *Biomed Res Int*, 2013. 2013: p. 646539.
 248. Martinez-Barajas, E. and D.D. Randall, *Purification and characterization of a glucokinase from young tomato (Lycopersicon esculentum L. Mill.) fruit*. *Planta*, 1998. 205(4): p. 567-73.
 249. Klemke, F., et al., *All1371 is a polyphosphate-dependent glucokinase in Anabaena sp. PCC 7120*. *Microbiology*, 2014. 160(Pt 12): p. 2807-19.
 250. Motomura, K., et al., *A new subfamily of polyphosphate kinase 2 (class III PPK2) catalyzes both nucleoside monophosphate phosphorylation and nucleoside diphosphate phosphorylation*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014. 80(8): p. 2602-8.
 251. Mizanur, R.M. and N.L. Pohl, *Phosphomannose isomerase/GDP-mannose pyrophosphorylase from Pyrococcus furiosus: a thermostable biocatalyst for the synthesis of guanidinediphosphate-activated and mannose-containing sugar nucleotides*. *Org Biomol Chem*, 2009. 7(10): p. 2135-9.
 252. Pelissier, M.C., et al., *Structural insights into the catalytic mechanism of bacterial guanosine-diphospho-D-mannose pyrophosphorylase and its regulation by divalent ions*. *Journal of Biological Chemistry*, 2010. 285(35): p. 27468-76.
 253. Garcia-Ortega, L., et al., *Anomalous electrophoretic behavior of a very acidic protein: ribonuclease U2*. *Electrophoresis*, 2005. 26(18): p. 3407-13.
 254. Kumar, T.K.S., et al., *Multiple Bands on the Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis Gels of Proteins Due to Intermolecular Disulfide Cross-Linking*. *Analytical Biochemistry*, 1993. 213(2): p. 226-228.
 255. Tu, L. and D.K. Banfield, *Localization of Golgi-resident glycosyltransferases*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010. 67(1): p. 29-41.
 256. Chen, Y., *The Effect of Temperature on the Cell Density of Saccharomyces cerevisiae*. *The expedition*, 2013. Vol 02/2012.
 257. Arthur, H. and K. Watson, *Thermal adaptation in yeast: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts*. *Journal of Bacteriology*, 1976. 128(1): p. 56-68.
 258. Refinetti, R., *Circadian Physiology* 2016: CRC Press
 259. Couto, J.R., T.C. Huffaker, and P.W. Robbins, *Cloning and expression in Escherichia coli of a yeast mannosyltransferase from the asparagine-linked glycosylation pathway*. *Journal of Biological Chemistry*, 1984. 259(1): p. 378-382.
 260. Li, S.T., et al., *Quantitative study of yeast Alg1 beta-1, 4 mannosyltransferase activity, a key enzyme involved in protein N-glycosylation*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2017. 1861(1 Pt A): p. 2934-2941.
 261. Ramirez, A.S., et al., *Chemo-enzymatic synthesis of lipid-linked GlcNAc₂Man₅ oligosaccharides using recombinant Alg1, Alg2 and Alg11 proteins*. *Glycobiology*, 2017: p. 1-8.
 262. Valli, M., et al., *Intracellular pH distribution in Saccharomyces cerevisiae cell populations, analyzed by flow cytometry*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005. 71(3): p. 1515-21.

-
263. Zhou, J., et al., *Characterization of a novel low-temperature-active, alkaline and sucrose-tolerant invertase*. *Sci Rep*, 2016. 6: p. 32081.
264. Dragosits, M., et al., *Enzymatic properties and subtle differences in the substrate specificity of phylogenetically distinct invertebrate N-glycan processing hexosaminidases*. *Glycobiology*, 2015. 25(4): p. 448-64.
265. Sharma, C.B., L. Lehle, and W. Tanner, *Solubilization and characterization of the initial enzymes of the dolichol pathway from yeast*. *European Journal of Biochemistry*, 1982. 126(2): p. 319-25.
266. Blat, Y., *Non-Competitive Inhibition by Active Site Binders*. *Chemical Biology & Drug Design*, 2010. 75(6): p. 535-540.
267. Pesci, L., S. Kara, and A. Liese, *Kapitel 4 - Enzymkinetik (in "Einführung in die Enzymtechnologie", K. E. Jaeger, A. Liese, C. Syldatk)*, 2018.
268. Packer, N.H. and N.G. Karlsson, *Glycomics - Methods and Protocols* 2009: Humana Press.
269. Ercan, A. and C.M. West, *Kinetic analysis of a Golgi UDP-GlcNAc:polypeptide-Thr/Ser N-acetyl-alpha-glucosaminyltransferase from Dictyostelium*. *Glycobiology*, 2005. 15(5): p. 489-500.
270. Engels, L. and L. Elling, *WbgL: a novel bacterial alpha1,2-fucosyltransferase for the synthesis of 2'-fucosyllactose*. *Glycobiology*, 2014. 24(2): p. 170-8.
271. Liu, Z., et al., *Combined biosynthetic pathway for de novo production of UDP-galactose: catalysis with multiple enzymes immobilized on agarose beads*. *ChemBioChem*, 2002. 3(4): p. 348-55.
272. Nahalka, J., et al., *Superbeads: immobilization in "sweet" chemistry*. *Chemistry*, 2003. 9(2): p. 372-7.
273. Nidetzky, B., A. Gutmann, and C. Zhong, *Leloir Glycosyltransferases as Biocatalysts for Chemical Production*. *ACS Catalysis*, 2018. 8(7): p. 6283-6300.
274. Jia, F., S.K. Mallapragada, and B. Narasimhan, *Multienzyme Immobilization and Colocalization on Nanoparticles Enabled by DNA Hybridization*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2015. 54(42): p. 10212-10220.
275. Wen, L., et al., *Toward Automated Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides*. *Chemical Reviews*, 2018. 118(17): p. 8151-8187.
276. Hamilton, B.S., et al., *A library of chemically defined human N-glycans synthesized from microbial oligosaccharide precursors*. *Sci Rep*, 2017. 7(1): p. 15907.
277. Seko, A., et al., *Occurrence of a sialylglycopeptide and free sialylglycans in hen's egg yolk*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1997. 1335(1): p. 23-32.
278. Chen, X., et al., *Transferring a biosynthetic cycle into a productive Escherichia coli strain: large-scale synthesis of galactosides*. *J of the American Chemical Society*, 2001. 123(36): p. 8866-7.
279. Chen, R., *The sweet branch of metabolic engineering: cherry-picking the low-hanging sugary fruits*. *Microb Cell Fact*, 2015. 14(197): p. 015-0389.
280. Chen, R., *Enzyme and microbial technology for synthesis of bioactive oligosaccharides: an update*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018. 102(7): p. 3017-3026.
281. Osawa, T. and T. Tsuji, *Fractionation and structural assessment of oligosaccharides and glycopeptides by use of immobilized lectins*. *Annual Review of Biochemistry*, 1987. 56: p. 21-42.
282. Bewley, C.A., et al., *New carbohydrate specificity and HIV-1 fusion blocking activity of the cyanobacterial protein MVL: NMR, ITC and sedimentation equilibrium studies*. *Journal of Molecular Biology*, 2004. 339(4): p. 901-14.
283. Ravida, A., et al., *Fasciola hepatica Surface Tegument: Glycoproteins at the Interface of Parasite and Host*. *Mol Cell Proteomics*, 2016. 15(10): p. 3139-3153.
284. Azarkan, M., et al., *Biochemical and structural characterization of a mannose binding jacalin-related lectin with two-sugar binding sites from pineapple (Ananas comosus) stem*. *Sci Rep*, 2018. 8(1): p. 11508.

Anhang

Sequenzen:

10	20	30	40	50	60
MGSSHHHHHH	SSGLVPRGSH	MTKYALVGDV	GGTNARLALC	DIASGEISQA	KTYSGLDYPS
70	80	90	100	110	120
LEAVIRVYLE	EHKVEVKDGC	IAIACPITGD	WVAMTNHTWA	FSIAEMKKNL	GFSHLEIIND
130	140	150	160	170	180
FTAVSMAIPM	LKKEHLIQFG	GAEPVEGKPI	AVYGAGTGLG	VAHLVHVDKR	WVSLPGEGGH
190	200	210	220	230	240
VDFAPNSEEE	AIILEILRAE	IGHVSAERVL	SGPGLVNLYR	AIVKADNRLP	ENLKPDKITE
250	260	270	280	290	300
RALADSC TDC	RRALSLFCVI	MGRFGGNLAL	NLGTFGGVFI	AGGIVPRFLE	FFKASGFRAA
310	320	330	340		
FEDKGRFKEY	VHDIPVYLIV	HDNPGLLGSG	AHLRQTLGHI	L	

Abb. S-0-1: His₆-Glc₆ ECOLI (*Escherichia coli* – Stamm W3110) Aminosäure-Sequenz, 341 AS, Mw 36886 Da

10	20	30	40	50	60
MKKLTFCFKAY	DIRGKLGEEEL	NEDIAWRIGR	AYGEFLKPKT	IVLGGDVRLT	SETLKLALAK
70	80	90	100	110	120
GLQDAGVDVL	DIGMSGTEEI	YFATFHLGVD	GGIEVTASHN	PMDYNGMKLV	REGARPISGD
130	140	150	160	170	180
TGLRDVQRLA	EANDFPVDE	TKRGRYQQIN	LRDAYVDHLF	GYINVKNLTP	LKLVINSNGG
190	200	210	220	230	240
AAGPVVDAIE	ARFKALGAPV	ELIKVHNTPD	GNFPNGIPNP	LLPECRDDTR	NAVIKHGADM
250	260	270	280	290	300
GIAFDGDFDR	CFLFDEKGQF	IEGYYIVGLL	AEAFLEKNPG	AKIIHDPRLS	WNTVDVVTA
310	320	330	340	350	360
GGTPVMSKTG	HAFIKERM RK	EDAIYGGEMS	AHHYFRDFAY	CDSGMIPWLL	VAELVCLKDK
370	380	390	400	410	420
TLGELVRDRM	AAFASGEIN	SKLAQPVEAI	NRVEQHFSRE	ALAVDRTDGI	SMTFADWRFN
430	440	450			
LRTSNTEPVV	RLNVESRGDV	PLMEARTRTL	L TLLNEHHHH	HH	

Abb. S-0-2: ManB-His₆ ECOLI (*Escherichia coli* – Stamm W3110) Aminosäure-Sequenz, 456 AS, Mw 51285 Da

10	20	30	40	50	60
MAQSKLYPVV	MAGGSGSRLW	PLSRVLYPKQ	FLCLKGDLTM	LQTTICRLNG	VECESPVVIC
70	80	90	100	110	120
NEQHRFIVAE	QLRQLNKLTE	NIILEPAGRN	TAPAIALAAL	AAKRHSPESD	PLMLVLAADH
130	140	150	160	170	180
VIADEDAFRA	AVRNAMPYAE	AGKLVTFGIV	PDLPETGYGY	IRRGEVSAGE	QDMVAFEVAQ
190	200	210	220	230	240
FVEKPNLETA	QAYVASGEYY	WNSGMFLFRA	GRYLEELKKY	RPDILDACEK	AMSAVDPDLN
250	260	270	280	290	300
FIRVDEEAFI	ACPEESVDYA	VMERTADAVV	VPMDAGWSDV	GSWSSLWEIS	AHTAEGNVCH
310	320	330	340	350	360
GDVINHKTEN	SYVYAESGLV	TTVGVKDLVV	VQTKDAVLIA	DRNAVQDVKK	VVEQIKADGR
370	380	390	400	410	420
HEHRVHREVV	RPWGKYDSID	AGDRYQVKRI	TVKPGEGLSV	QMHHHRAEHW	VVVAGTAKVT
430	440	450	460	470	
IDGDIKLLGE	NESIYIPLGA	THCLENPGKI	PLDLIEVRSG	SYLEEDDVVR	FADRYGRV

Abb. S-0-3: ManC_ECOLI (*Escherichia coli* – Stamm W3110) Aminosäure-Sequenz, 478 AS, Mw 53016 Da, in orange sind die 14 (2.9 %) in der Sequenz vorkommenden Histidine hervorgehoben

10	20	30	40	50	60
CCATGGGCCT	GGAAACTGTT	CCTGCTGGTA	AAGCTCTGCC	TGATGATATC	TATGTAGTAA
70	80	90	100	110	120
TTGAAATCCC	AGCAAACCTCT	GATCCAATTA	AGTATGAAGT	GGACAAAGAG	TCTGGTGCGC
130	140	150	160	170	180
TGTTCTGTTGA	CCGCTTTATG	GCTACTGCTA	TGTTCTACCC	GGCGAACTAC	GGCTACGTTA
190	200	210	220	230	240
ACAACACTCT	GTCTCTGGAT	GGCGACCCGG	TGGATGTTCT	GGTTCCGACT	CCTTATCCGC
250	260	270	280	290	300
TGCAGCCAGG	TTCCGTAATC	CGTTGTCGCC	CTGTCGGCGT	TCTGAAAATG	ACGGACGAAG
310	320	330	340	350	360
CGGGTAGCGA	CGCGAAAAGTA	GTAGCAGTAC	CACACTCTAA	ACTGACCAAG	GAATACGACC
370	380	390	400	410	420
ATATCAAGGA	CGTTAACGAC	CTGCCGGCTC	TGCTGAAGGC	CCAGATCCAG	CACTTTTTTCG
430	440	450	460	470	480
AATCTTACAA	GGCTCTGGAG	GCGGGCAAAT	GGGTTAAAGT	TGACGGCTGG	GAGGGCGTTG
490	500	510	520	530	
ATGCTGCGCG	TCAGGAGATC	CTGGATTCTT	TCGAACGTGC	AAAAAAGCTC	GAG

Abb. S-0-4: ppa_PASMU (*Pasteurella multocida*– Stamm Pm70) DNA-Sequenz, 533 Basen, Codon-usage optimiert, Restriktions-Schnittstellen NcoI und XhoI

10	20	30	40	50	60
METGLETVPA	GKALPDDIYV	VIEIPANSDP	IKYEVDKESG	ALFVDRFMET	ATAMETFYPA
70	80	90	100	110	120
NYGYVNNTLS	LDGDPVDVLV	PTYPLQPGS	VIRCRPVGVL	KMETTDEAGS	DAKVVAVPHS
130	140	150	160	170	180
KLTKEYDHIK	DVNDLPALLK	AQIQHFFESY	KALEAGKWVK	VDGWEGVDA	RQEILDSFER
190					
AKKLEHHHHH	H				

Abb. S-0-5: PmPpA-His₆_PASMU (*Pasteurella multocida*– Stamm Pm70) Aminosäure-Sequenz, 191 AS, 21299 Da

10	20	30	40	50	60
MGSSHHHHHH	SSGLVPRGSH	MDSYGDTSGR	IGRDWLDHRD	EELEQELDD	ELNLDELFGP
70	80	90	100	110	120
EQEDAPGELS	RRRYFRELFR	LQRELVKLQN	WVHTGHKVV	ILFEGRDAAG	KGGVIKRITQ
130	140	150	160	170	180
RLNPRVCRVA	ALPAPNDREQ	TQWYFQRYVS	HLPAGGEIVL	FDRSWYNRAG	VERVMGFCND
190	200	210	220	230	240
EQYEEFFRSV	PEFEKMLARS	GIQLLKYWFS	ISDAEQHLRF	LSRIHDPLKQ	WKLSPMDLES
250	260	270	280	290	300
RRRWEAYTKA	KETMLERTHI	PEAPWVVQA	DDKKRARLNC	IHLLQOMPY	REVPQPPVHL
310	320				
PERLRHADYV	RHPTPGEIIV	PEVY			

Abb. S-0-6: His₆-1D-Ppk2_PSEAE (*Pseudomonas aeruginosa* – Stamm PAO1) Aminosäure-Sequenz, 324 AS, Mw 38359 Da

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
CATATGGATT	CTTATGGTGA	TACTTCTGGT	CGCATTGGTC	GTGATTGGCT	GGACCGCCAC
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
GACGAGGAAC	TGGAACAAGA	ACTGCTGGAC	GACGAACTGA	ACCTGGATGA	ACTGTTCCGGC
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
CCGGAACAAG	AAGACGCTCC	GGGTGAGCTG	TCTCGCCGTC	GCTACTTCCG	TGAACTGTTT
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
CGTCTGCAGC	GTGAACTGGT	TAAGCTGCAG	AACTGGGTAG	TCCACACTGG	TCACAAAGTC
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
GTCATTCTGT	TCGAAGGTCG	TGACGCGGCA	GGTAAAGGTG	GTGTGATCAA	ACGTATCACC
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
CAGCGTCTGA	ACCCGCGCGT	GTGCCGTGTA	GCTGCTCTGC	CAGCCCCGAA	CGACCGCGAG
<u>370</u>	<u>380</u>	<u>390</u>	<u>400</u>	<u>410</u>	<u>420</u>
CAGACTCAGT	GGTACTTCCA	GCGTTACGTG	TCCCATCTGC	CGGCTGGTGG	CGAAATTGTT
<u>430</u>	<u>440</u>	<u>450</u>	<u>460</u>	<u>470</u>	<u>480</u>
CTGTTTGATC	GTAGCTGGTA	CAACCGCGCA	GGCGTGGAGC	GTGTCATGGG	TTTTTGCAAC
<u>490</u>	<u>500</u>	<u>510</u>	<u>520</u>	<u>530</u>	<u>540</u>
GACGAGCAGT	ACGAAGAATT	CTTTCGTTCC	GTACCAGAAT	TTGAGAAAAT	GCTGGCTCGT
<u>550</u>	<u>560</u>	<u>570</u>	<u>580</u>	<u>590</u>	<u>600</u>
TCCGGTATTC	AGCTGCTGAA	GTATTGGTTC	TCCATCTCCG	ACGCGGAACA	GCATCTGCGT
<u>610</u>	<u>620</u>	<u>630</u>	<u>640</u>	<u>650</u>	<u>660</u>
TTTCTGTCCC	GCATCCACGA	CCCCTGAAA	CAGTGGA AAC	TGTCCCCGAT	GGATCTGGAG
<u>670</u>	<u>680</u>	<u>690</u>	<u>700</u>	<u>710</u>	<u>720</u>
TCTCGTCGCC	GTTGGAAGC	GTATACGAAG	GCAAAAGAAA	CGATGCTGGÄ	ACGTACTCAC
<u>730</u>	<u>740</u>	<u>750</u>	<u>760</u>	<u>770</u>	<u>780</u>
ATTCCGGAGG	CCCCATGGTG	GGTGGTACAG	GCAGACGATA	AGAAACGTGC	TCGTCTGAAC
<u>790</u>	<u>800</u>	<u>810</u>	<u>820</u>	<u>830</u>	<u>840</u>
TGCATCCATC	ACCTGCTGCA	ACAGATGCCG	TATCGTGAAG	TTCCGCAGCC	GCCGGTACAC
<u>850</u>	<u>860</u>	<u>870</u>	<u>880</u>	<u>890</u>	<u>900</u>
CTGCCGGAAC	GCCTGCGTCA	CGCCGACTAC	GTGCGTCACC	CGACCCCGGG	TGAAATCATC
<u>910</u>	<u>920</u>				
GTTCCGGAAG	TTACTAAGA	GCTC			

Abb. S-0-7: Ppk2_PSEAE (*Pseudomonas aeruginosa* – Stamm PAO1) DNA-Sequenz, 924 Basen, Codon-usage optimiert, Restriktions-Schnittstellen *NdeI* und *SacI*

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
CATATGAATC	GTAATGGTTC	TACTAAAGAT	CCGCGTCGTA	TGACTGGTGC	GGCAACCGGT
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
GAAATCTCCC	GTTACTTCAA	CGACAAAGCT	CCTAAAGACA	TTCGCCGCGC	GATTGAAAAA
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
GCGGACAAAG	ACGATATCCT	GTCTACCACT	TACCCATACG	ATGCCGAAAT	GACCGCGAAG
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
GATTACCGTG	CGCAGATGGA	AGCTCTGCAG	ATTGAACTGG	TTAAACTGCA	GGCATGGATT
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
AAACAGTCTG	GTGCTCGCGT	GGCGCTGCTG	TTCGAGGGTC	GTGATGCCGC	GGGTAAAGGC
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
GGTACCATCA	AACGTTTCCG	TGAAAACCTG	AATCCGCGTG	GTGCGCGTGT	TGTTGCACTG
<u>370</u>	<u>380</u>	<u>390</u>	<u>400</u>	<u>410</u>	<u>420</u>
TCTAAGCCGA	CTGAAGCGGA	ACGTTCCAG	TGGTATTTTC	AGCGCTACAT	CCAGCATCTG
<u>430</u>	<u>440</u>	<u>450</u>	<u>460</u>	<u>470</u>	<u>480</u>
CCATCCGCTG	GTGAACTGGT	ATTCTATGAC	CGTTCTTGGT	ATAACCGTGG	TGTTGTTGAA
<u>490</u>	<u>500</u>	<u>510</u>	<u>520</u>	<u>530</u>	<u>540</u>
CACGTATTCG	GCTGGTGTGA	CGAAGAGCAG	CGCGAACGCT	TTTTCCGTCA	AGTTATGCCG
<u>550</u>	<u>560</u>	<u>570</u>	<u>580</u>	<u>590</u>	<u>600</u>
TTCGAACACG	ATCTGGTTGA	TGATGGCATC	CATCTGTTTA	AATTCTGGCT	GAACGTCGGC
<u>610</u>	<u>620</u>	<u>630</u>	<u>640</u>	<u>650</u>	<u>660</u>
CGTGCAGAAC	AACTGCGCCG	TTTCCATGAT	CGTGAACGTG	ACCCGCTGAA	ACAGTGGAAG
<u>670</u>	<u>680</u>	<u>690</u>	<u>700</u>	<u>710</u>	<u>720</u>
CTGTCTCCGG	TTGACATCGC	GGGTCTGGAT	AAATGGGAAG	CTTATACCAC	GGCGATCTCC
<u>730</u>	<u>740</u>	<u>750</u>	<u>760</u>	<u>770</u>	<u>780</u>
CAGACCCTGA	CTCGTAGCCA	TTCCGATCGT	GCGCCGTGGA	CTGTTATTCG	TTCCGACGAT
<u>790</u>	<u>800</u>	<u>810</u>	<u>820</u>	<u>830</u>	<u>840</u>
AAAAAGCGTG	CGCGTCTGGC	CGCCATCCGT	ACCGTGCTGT	CTGGTATCGA	CTACGATAAC
<u>850</u>	<u>860</u>	<u>870</u>	<u>880</u>	<u>890</u>	<u>900</u>
AAAGACCGTG	CGGCGGTTGG	TCAGCCGGAC	GCAGCAATTT	GCGGCGGTCC	AGACATCTGG
<u>910</u>					
GATGCGTAAC	TCGAG				

Abb. S-0-8: Ppk3_RUEPO (*Ruegeria pomeroyi*– Stamm DSM 15171) DNA-Sequenz, 915 Basen, Codon-usage optimiert, Restriktions-Schnittstellen *Nde*I und *Xho*I

10	20	30	40	50	60
MGSSHHHHHH	SSGLVPRGSH	MNRNGSTKDP	RRMTGAATGE	ISRYFNDKAP	KDIRRAIEKA
70	80	90	100	110	120
DKDDILSTTY	PYDAEMTAKD	YRAQMEALQI	ELVKLQAWIK	QSGARVALLF	EGRDAAGKGG
130	140	150	160	170	180
TIKRFRENLM	PRGARVVALS	KPTEAERSQW	YFQRYIQHLP	SAGELVFYDR	SWYNRQVVEH
190	200	210	220	230	240
VFGWCDEEQR	ERFFRQVMPF	EHDLVDDGIH	LFKFWLNVGR	AEQLRRFHDR	ERDPLKQWKL
250	260	270	280	290	300
SPVDIAGLDK	WEAYTTAISQ	TLTRSHSDRA	PWTVIRSDDK	KRARLAAIRT	VLSGIDYDNK
310	320				
DRAAVGQPDÄ	AICGGPDIWD	A			

Abb. S-0-9: His₆-Ppk3_RUEPO (*Ruegeria pomeroyi*– Stamm DSM 15171) Aminosäure-Sequenz, 321 AS, Mw 36903 Da

10	20	30	40	50	60
MSGQGKRLMV	MAGGTGGHVF	PGLAVAHHLM	AQGWQVRWLG	TADRMEADLV	PKHGIEIDFI
70	80	90	100	110	120
RISGLRGKGI	KALIAAPLRI	FNAWRQARAI	MKAYKPDVVL	GMGGYVSGPG	GLAAWSLGIP
130	140	150	160	170	180
VVLHEQNGIA	GLTNKWLAKI	ATKVMQAFPG	AFPNAEVVGN	PVRTDVLALS	LPQQRLAGRE
190	200	210	220	230	240
GPVRVLVVGĠ	SQGARILNQT	MPQVAAKLGD	SVTIWHQSGK	GSQQSVEQAY	AEAGQPQHKV
250	260	270	280	290	300
TEFIDDMAAA	YAWADVVCRR	SGALTVSEIA	AAGLPALFVP	FQHKDRQQYW	NALPLEKAGA
310	320	330	340	350	
AKIIEQPQLS	VDAVANTLAG	WSRETLTMA	ERARAASIPD	ATERVANEVS	RVARA

Abb. S-0-10: MurG_ECOLI (*Escherichia coli*– Stamm HS) Aminosäure-Sequenz, 355 AS, Mw 37804 Da, UDP-N-acetylglucosamine-N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
CATATGAAAT	CTACTAAGAA	ACGCATTATT	ATCTTTGTCC	TGGGTGATGT	TGGCCACAGC
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
CCTCGTATTT	GCTACCATGC	AATTCCTTC	TCCAAACTGG	GCTGGCAAGT	GGAAGTGTGC
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
GGTTACGTGG	AAGACACCCT	GCCAAAAATC	ATCTCTTCCG	ATCCGAACAT	CACCGTTCAT
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
CACATGAGCA	ATCTGAAACG	TAAAGGTGGC	GGTACTTCCG	TTATCTTCAT	GGTGAAGAAA
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
GTGCTGTTC	AGGTCTGTGC	TATCTTTAAG	CTGCTGTGGG	AACTGCGTGG	TTCTGACTAT
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
ATTCTGGTTC	AGAACCCGCC	GTCTATCCCG	ATTCTGCCGA	TCGCGGTCCT	GTACAAACTG
<u>370</u>	<u>380</u>	<u>390</u>	<u>400</u>	<u>410</u>	<u>420</u>
ACTGGTTGCA	AACTGATCAT	CGACTGGCAT	AACCTGGCTT	ACTCTATCCT	GCAGCTGAAA
<u>430</u>	<u>440</u>	<u>450</u>	<u>460</u>	<u>470</u>	<u>480</u>
TTCAAAGGTA	ACTTTTACCA	CCCGCTGGTT	CTGATCAGCT	ATATGGTTGA	AATGATCTTT
<u>490</u>	<u>500</u>	<u>510</u>	<u>520</u>	<u>530</u>	<u>540</u>
TCTAAATTCG	CAGATTACAA	CCTGACTGTC	ACGGAAGCGA	TGCGCAAATA	TCTGATCCAG
<u>550</u>	<u>560</u>	<u>570</u>	<u>580</u>	<u>590</u>	<u>600</u>
TCCTTCCATC	TGAACCCGAA	ACGTTGTGCG	GTGCTGTATG	ATCGTCCGGC	TTCCAGTTC
<u>610</u>	<u>620</u>	<u>630</u>	<u>640</u>	<u>650</u>	<u>660</u>
CAACCGCTGG	CAGGTGACAT	CAGCCGCCAG	AAGGCCCTGA	CCACCAAAGC	GTTTATCAAA
<u>670</u>	<u>680</u>	<u>690</u>	<u>700</u>	<u>710</u>	<u>720</u>
AACTATATCC	GTGATGATTT	TGACACGGAA	AAAGGTGATA	AGATCATTGT	GACTTCCACC
<u>730</u>	<u>740</u>	<u>750</u>	<u>760</u>	<u>770</u>	<u>780</u>
AGCTTCACCC	CGGACGAGGA	CATCGCATT	CTGCTGGGTG	CACTGAAAAT	CTACGAAAAC
<u>790</u>	<u>800</u>	<u>810</u>	<u>820</u>	<u>830</u>	<u>840</u>
TCTTACGTTA	AATTCGACTC	CTCCCTGCCG	AAAATTCTGT	GCTTTATTAC	TGGCAAGGGC
<u>850</u>	<u>860</u>	<u>870</u>	<u>880</u>	<u>890</u>	<u>900</u>
CCGCTGAAGG	AAAAATACAT	GAAACAAGTA	GAAGAATATG	ACTGGAAGCG	TTGCCAGATT
<u>910</u>	<u>920</u>	<u>930</u>	<u>940</u>	<u>950</u>	<u>960</u>
GAATTCGTCT	GGCTGAGCGC	AGAGGATTAT	CCGAAACTGC	TGCAGCTGTG	CGACTACGGT
<u>970</u>	<u>980</u>	<u>990</u>	<u>1000</u>	<u>1010</u>	<u>1020</u>
GTATCTCTGC	ATACCTCTAG	CTCCGCCTG	GATCTGCCGA	TGAAAATCCT	GGACATGTTC
<u>1030</u>	<u>1040</u>	<u>1050</u>	<u>1060</u>	<u>1070</u>	<u>1080</u>
GGCAGCGGTC	TGCCAGTCAT	CGCTATGAAC	TACCCTGTTC	TGGATGAACT	GGTCCAGCAC
<u>1090</u>	<u>1100</u>	<u>1110</u>	<u>1120</u>	<u>1130</u>	<u>1140</u>
AACGTTAACG	GTCTGAAATT	CGTCGATCGT	CGTGAAGTGC	ATGAATCCCT	GATCTTCGCT
<u>1150</u>	<u>1160</u>	<u>1170</u>	<u>1180</u>	<u>1190</u>	<u>1200</u>
ATGAAAGATG	CCGACCTGTA	CCAAAAACTG	AAGAAAAACG	TAACCCAAGA	AGCAGAAAAC
<u>1210</u>	<u>1220</u>	<u>1230</u>	<u>1240</u>	<u>1250</u>	<u>1260</u>
CGCTGGCAAA	GCAACTGGGA	GCGCACCATG	CGTGACCTGA	AGCTGATCCA	CTAACTCGAG

Abb. S-0-11: ALG1_YEAST (*Saccharomyces cerevisiae* – Stamm YJM789) DNA-Sequenz, 1260 Basen, Codon-usage optimiert, Restriktions-Schnittstellen *NdeI* und *XhoI*

10	20	30	40	50	60
MGSSHHHHHH	SSGLVPRGSH	MKSTKKRIII	FVLGDVGHSP	RICYHAISFS	KLGWQVELCG
70	80	90	100	110	120
YVEDTLPKII	SSDPNITVHH	MSNLKRRKGGG	TSVIFMVKKV	LFQVLSIFKL	LWELRGSDYI
130	140	150	160	170	180
LVQNPPSIP	LPIAVLYKLT	GCKLIIDWHN	LAYSILQLKF	KGNFYHPLVL	ISYMVEMIFS
190	200	210	220	230	240
KFADYNLTVT	EAMRKYLIQS	FHLNPKRCAV	LYDRPASQFQ	PLAGDISRQK	ALTTKAFIKN
250	260	270	280	290	300
YIRDDFDTEK	GDKIIVTSTS	FTPDEDIGIL	LGALKIYENS	YVKFDSSLPK	IILCFITGKGP
310	320	330	340	350	360
LKEKYMKQVE	EYDWKRCQIE	FVWLSAEDYP	KLLQLCDYGV	SLHTSSSGLD	LPMKILDMFG
370	380	390	400	410	420
SGLPVIAMNY	PVLDELVQHN	VNGLKFVDRR	ELHESLIFAM	KDADLYQKLK	KNVTQEAENR
430					
WQSNWERTMR	DLKLIH				

Abb. S-0-12: His₆-Alg1ΔTM_YEAST (*Saccharomyces cerevisiae* – Stamm YJM789) Aminosäure-Sequenz, 436 AS, 52434 Da,

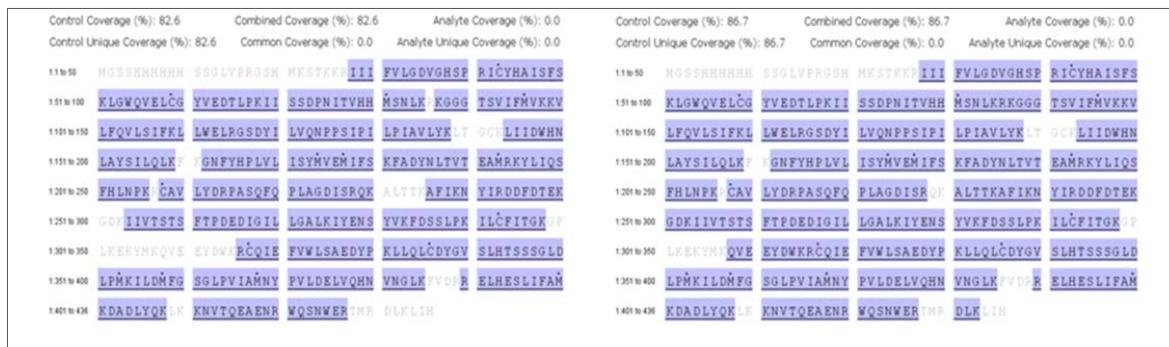


Abb. S-0-13: Sequenzübereinstimmungen nach tryptischem Verdau von SDS-PAGE Banden des Alg1ΔTM-Proteins und Analyse der erhaltenen Peptide mittels Nano-HPLC-ESI-MS/MS. links: Monomer-Bande, rechts: Dimer-Bande

AA10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....			
DB_state	KSTKKRIIIFVLGDVGHSPRICYHAISFSKLGWQVELCGYVEDTLPKIISSDPNITVHHMSNLKRKGGGTSVIFMVKKV	0	0	
DB_conf		8	9	
AA	80.....90.....100.....110.....120.....130.....140.....150.....			
DB_state	LFQVLSIFKLLWELRGSDYILVQNPPSIPILPIAVLYKLTGCKLIIDWHNLAYSILQLKFKGNFYHPLVLI SYM VEMIF	0		
DB_conf			9	
AA	.160.....170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....			
DB_state	SKFADYNLTVTEAMRKYLIQSFHLNPKRCVLYDRPASQFQPLAGDISRQKALTTKAFIKNYIRDDFDTEKGDKIIVTS	0		
DB_conf		9		
AA	..240.....250.....260.....270.....280.....290.....300.....310.....			
DB_state	TSFPTDEDIGILLGALKIYENSYVKFDSSLPKILCFITGKGPLKEKYMKQVEEYDWKRCQIEFVWLSAEDYPKLLQLCD	0	0	0
DB_conf		9	9	9
AA	...320.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....390...			
DB_state	YGVSLHTSSSGLDLPKILDMFGSGLPVIAMNYPVLDELVQHNVNGLKFDVDRRELHESLIFAMKDADLYQKLNKNTQE			
DB_conf				
AA400.....410...			
DB_state	AENRWQSNWERTMRDLKLIH			
DB_conf				

Abb. S-0-14: Online-Analyse der Wahrscheinlichkeit zur Disulfid-Verbrückung der Alg1ΔTM. AA-Aminosäuresequenz, DB-Status der vorgeschlagenen Disulfidbrückenbildung (1=Disulfid-verbrückt, 0=keine Verbrückung), DB-statistische Sicherheit der Vorhersage (0=gering, 9=hoch); Software: DISULFIND by A. Ceroni, A. Passerini, A. Vullo and P. Frasconi: a Disulfide Bonding State and Cysteine Connectivity Prediction Server, *Nucleic Acids Research*, 34(Web Server issue):W177-W181, 2006.

Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. M. Pietzsch. Ich bin froh, dass sein immerwährender Brunnen an Ideen das Glykosylierungsthema hervorgebracht hat und ich es als Neueinsteiger in seiner Arbeitsgruppe etablieren durfte und letztendlich die Ergebnisse in einer Dissertation verfassen konnte. Ich bin dankbar mit einem so offenen, tollen Chef arbeiten zu können, bei dem es möglich ist, Wissenschaft und Familie zu vereinen und zu leben!

Prof. Dr. T. Groth und Prof. Dr. C. Syltatk danke ich für die freundliche Übernahme der Gutachten.

Dem Agrochemischen Institut Piesteritz e.V. gilt mein Dank für die finanzielle Unterstützung innerhalb des „BIMAP“-Projektes. Für die finanzielle Förderung im Projekt „ForscherTANDEM zum Aufbau einer Plattform zur *in vitro* N-Glykosylierung“ mit dem Förderkennzeichen 031A156A danke ich dem BMBF.

Frau Dr. S. Liebscher oder einfach Sandra bin ich sehr dankbar für die Erstkorrektur, die vielen hilfreichen Tipps und für die fruchtbaren Diskussionen. Vielmehr noch bin ich aber dankbar für die vielen Stunden mit gutem Wein und teuren Gesprächen in Freundschaft.

Frau Dr. F. Seifert danke ich für die klasse Unterstützung bei allen enzymologischen Belangen. Du warst mir eine große Hilfe.

Herrn Dr. M. Malešević möchte ich für die hilfreiche Unterstützung bei der Isolierung des Zielproduktes nach präparativer Synthese danken. Bei Herrn Dr. G. U. Balcke bedanke ich mich für die Analysen des Zielproduktes mittels UPLC-MS. Frau Dr. A. Schierhorn danke ich für die ESI-MS-Analyse der Dimere der Glykosyltransferase.

Frau M. Anwand und Herrn Dr. M. Wolfram sei für die tatkräftige, unkomplizierte Unterstützung bei den Fermentationen herzlichst gedankt.

Allen Mitarbeitern des TANDEM-Projektes sowie allen involvierten Studenten danke ich für das fröhliche, angenehme Arbeitsklima und die stetige Bereitschaft, unseren Glykoexperimenten neue Informationen zu entlocken. Jan Klapproth danke ich zudem für die Bereitstellung der gereinigten PmPpA. Allen Mitstreitern der AG-Pietzsch danke ich für die vielen angenehmen Arbeitstage, die neben interessanten und informativen Diskussionen auch immer Überraschungen enthielten...

Katja war meine Rechtschreibkorrektur-Queen. Was Du alles noch gefunden hast...tststs! Vielen Dank dafür!

Ich danke meinen Eltern und meiner Schwester, Monika und Pascal, meinen lieben Kussi-Nachbarn, Robert, AKP, Sabine, Anita und noch einmal Sandra für die Unterstützung bis zum Erreichen meiner Ziele, für viele Stunden offenes Ohr und allem, was noch dazu gehört...

Mein größter Dank gilt meinen tollen Kindern Matilda und Adam, die so manche Laune, so manche Stressreaktion und so manche Schwäche bis zum Abschluss dieser Arbeit ertragen haben und mich immer wieder mit Ironie, Geduld und Liebe geerdet haben. Knutsch dafür!

Curriculum Vitae

Name:	Anna Schildbach
1995	allgemeine Hochschulreife „Südstadt-Gymnasium“, Halle
1995-1996	Au-Pair in Mulhouse, Frankreich
1997	Au-Pair in Dublin, Irland
1997-2004	Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Abschluss: Diplom-Biologin
2004	Diplomarbeit zum Thema „Charakterisierung des Hsp70-Chaperons Mortalin“ an der Max-Planck Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung in Halle
2005-2008	Wissenschaftlicher Mitarbeiter zum Thema „Der Einfluss der enzymatischen Aktivität von humanen Hsp70-Proteinen auf konformationelle Zustände von Proteinen“ an der Max-Planck Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung in Halle
2008-2017	Wissenschaftliche Mitarbeiterin mit Promotionsziel, Thema: „Untersuchungen zur Synthese von Biopolymeren mit Hilfe von Biokatalysatoren in parallelen Multienzym-Multisubstrat-Reaktionen“ MLU Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie, Abt. Aufarbeitung biotechnischer Produkte, AG Prof. M. Pietzsch
2012-2017	Projektleitung „Aufbau einer Plattform zur <i>in vitro</i> N-Glykosylierung“ MLU Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie, Abt. Aufarbeitung biotechnischer Produkte, AG Prof. M. Pietzsch
2018	Verfassen der Promotion

