

GLYCOSIDASE-KATALYSIERTE SYNTHESE
und Charakterisierung

von

Nucleotid-Di- und
Oligosacchariden

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Veronika Nieder

aus Solingen

Jülich 2001

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referentin:	Frau Prof. Dr. M.-R. Kula
1. Korreferent:	Herr Prof. Dr. H. Weiß
2. Korreferent:	Herr Priv.-Doz. Dr. L. Elling

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Mai 2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1997 bis März 2001 am Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich unter der Leitung von Frau Prof. Dr. M.-R. Kula angefertigt.

Gefördert wurde die Arbeit mit finanziellen Mitteln der EU im Rahmen des „4th Framework Biotechnology 1994-1998“, Projekt: "Engineering protein O-glycosylation for the production of receptor blockers (Contract No. BIO4-CT95-0138) und der DFG (Projekt EL 135/4-1).

Diese Dissertation wird u.a. in elektronischer Form auf dem WWW-Server der Universitäts- und Landesbibliothek Düsseldorf veröffentlicht:

<http://www.ulb.uni-duesseldorf.de/diss/mathnat/2001/nieder.html>

Mein besonderer Dank gilt:

Frau Prof. Dr. Kula für die Übernahme des Hauptreferates, ihre stete Diskussionsbereitschaft und die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut für Enzymtechnologie.

Herrn Prof. Dr. Weiß, Institut für Biochemie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn PD Dr. Elling für die freundliche Übernahme des Korreferates, für die interessante Themenstellung und seine unerschöpfliche Diskussionsbereitschaft

Herrn Prof. Dr. H. Kamerling für die freundliche Aufnahme in seinem Institut während der Arbeitsaufenthalte in Utrecht. Mein besonderer Dank gilt hierbei Herrn Ricardo Gutiérrez-Gallego für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Anfertigung und Interpretation der NMR- und MS-Spektren.

Dr. S. Marx (RWTH Aachen), Prof. Dr. Kren (Academy of Sciences of the Czech Republic, Prag), Prof. Dr. Berger (Universität Zürich, Schweiz) und Prof. Dr. Schachter (Hospital for Sick Children, Toronto, Canada) für die zur Verfügung gestellten Enzyme.

Herrn Dipl. Chem. Michael Kutzer für die tatkräftige Unterstützung während seiner Diplomarbeit.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Ulrike Römer und Herrn Stefan Weidner für ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft bei allen kleinen und großen Problemen und für die schnelle und kritische Durchsicht der Arbeit.

Den Mitarbeitern des IET's, besonders der Zuckergruppe, für eine sehr freundschaftliche und produktive Zusammenarbeit. Dies gilt sowohl für naturwissenschaftliche Fragestellungen als auch für die Freizeitgestaltung in Jülich.

Meinen Eltern und nicht zuletzt meinem Freund Peter Iwan.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Bedeutung von Kohlenhydraten und Glycoconjugaten.....	1
1.2	Eucaryontische Glykokonjugate	2
1.2.1	<i>N</i>-Glycane	2
1.2.2	<i>O</i>-Glycane	7
1.2.2.1	Entzündungsprozesse und PSGL-1	9
1.2.3	Terminale Strukturen, Poly-LacNAc und LacDiNAc.....	12
1.3	Synthese von Oligosacchariden <i>in vitro</i>.....	13
1.3.1	Chemische Synthese	13
1.3.2	Enzymatische Synthese.....	14
1.3.2.1	Glycosidasen in der Synthese von glycosidischen Bindungen	15
1.3.2.1.1	Reverse Hydrolyse.....	15
1.3.2.1.2	Transglycosylierung	16
1.3.2.1.3	Einfluß der Enzymquelle	19
1.3.2.1.4	Einfluß der Reaktionsbedingungen	20
1.3.2.1.5	Einfluß des Akzeptorsubstrates	23
1.3.2.2	Glycosyltransferasen.....	24
1.4	Nucleotidaktivierte Oligosaccharide	26
1.4.1	Vorkommen in Milch.....	26
1.4.2	Vorkommen in Bakterien	29
1.4.3	Vorkommen in Hefe	31
1.4.4	Vorkommen in Pflanzen	32
1.4.5	Enzymatische Synthese.....	32
2	ZIELSETZUNG	38

3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	41
3.1	<i>β</i>-D-Galactosidase aus <i>Bacillus circulans</i>	41
3.1.1	Akzeptorsubstratspektrum.....	41
3.1.2	Präparative Synthese von Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP und Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP	42
3.1.3	Präparative Synthese von Gal(β 1-4)Glc(α 1-UDP und Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)Glc(α 1-UDP	42
3.1.4	Präparative Synthese von Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP	43
3.1.5	Zusammenfassende Diskussion	43
3.2	<i>β</i>-D-Galactosidase aus Stierhoden	44
3.2.1	<i>β</i>-D-Galactosidase aus Stierhoden (kommerzielles Präparat)	45
3.2.1.1	Akzeptorsubstratspektrum.....	45
3.2.2	Partielle Aufreinigung der <i>β</i>-D-Galactosidase aus Stierhoden	47
3.2.3	Charakterisierung der <i>β</i>-D-Galactosidase aus Stierhoden (Eigenisolat) ...	48
3.2.3.1	pH-Optimum	48
3.2.3.2	pH-Stabilität	49
3.2.3.3	Optimierung der Donorsubstratkonzentration.....	50
3.2.3.4	Inhibition durch Galactose	52
3.2.3.5	Produktinhibition.....	53
3.2.3.6	Akzeptorsubstratspektrum.....	55
3.2.3.7	Zeit-Umsatz Kurven bei 30°C und –5°C; Akzeptor: UDP-Glc	56
3.2.3.8	Zeit-Umsatz Kurven bei 30°C; Akzeptor: UDP-GalNAc und UDP-GlcNAc.....	58
3.2.4	Präparative Synthese von Gal(β 1-X)GlcNAc(α 1-UDP	60
3.2.4.1	Produktisolierung	60
3.2.5	Präparative Synthese von Gal(β 1-X)Glc(α 1-UDP.....	61
3.2.5.1	Produktisolierung	61
3.2.6	Kombination von Glycosidasen mit Glycosyltransferasen.....	62
3.2.6.1	Kombination der <i>β</i> -D-Galactosidase aus Stierhoden mit <i>α</i> 2,3-O-Sialyltransferase [EC 2.4.99.4]	63
3.2.6.2	Kombination der <i>β</i> -D-Galactosidase aus Stierhoden mit der <i>α</i> 1,3Fucosyltransferase V	67

3.2.7	Zusammenfassende Diskussion.....	69
3.3	b-D-Galactosidase aus <i>Diplococcus pneumoniae</i>	71
3.3.1	Substratspektrum	71
3.3.2	Zeit-Umsatz Kurve	72
3.4	b-D-Galactosidase aus <i>E. coli</i>	74
3.5	b-D-Galactosidase aus <i>Aspergillus oryzae</i>	74
3.6	a-D-Galactosidase aus <i>Bifidobacterium adoslescentis</i>	75
3.6.1	Reaktionen mit Gal(a 1-pNP als Donorsubstrat bei 30°C und -5°C	75
3.6.2	Reaktionen mit Melibiose als Donorsubstrat bei 30°C und -5°C.....	75
3.6.3	Optimierung der Enzymkonzentration.....	76
3.6.4	Optimierung der Donorsubstratkonzentration.....	77
3.6.5	Akzeptorsubstratspektrum.....	78
3.6.6	Präparative Synthese von Gal(a 1-X)Glc(a 1-UDP	78
3.6.6.1	Produktisolierung	79
3.6.7	Präparative Synthese von Gal(a 1-X)Gal(a 1-UDP	79
3.6.7.1	Produktisolierung	79
3.7	a-D-Galactosidase aus grünen Kaffeebohnen	80
3.8	b-N-Acetylhexosaminidasen [EC 3.2.1.30]	81
3.8.1	Optimierung der Reaktionsbedingungen.....	82
3.8.1.1	Löslichkeit von GlcNAc(β 1-pNP und GalNAc(β 1-pNP in organischen Lösungsmitteln.....	82
3.8.1.2	Löslichkeit von GlcNAc(β 1-pNP und GalNAc(β 1-pNP mit Cyclodextrinen als Löslichkeitsvermittlern.....	83
3.8.1.3	Aktivität der β-N-Acetylhexosaminidasen in Heptakis(2,6-Di-O-Methyl)- Cyclodextrin-haltigen Lösungen.....	85
3.8.1.4	Enzymstabilität	86
3.8.2	Substratscreening	87
3.8.3	b-N-Acetylhexosaminidase aus <i>Trichoderma harzianum</i>	90

3.8.3.1	pH-Optimum	90
3.8.3.2	Michaelis-Menten Kinetik	91
3.8.3.3	Inhibition durch GalNAc.....	92
3.8.3.4	Erweiterung des Substratspektrums	93
3.8.4	Synthese von GalNAc(β 1-X)GlcNAc(α 1-UDP	94
3.8.4.1	Produktisolierung	94
3.9	Nucleotidaktivierte Disaccharide als Substrate und Inhibitoren für Glycosyltransferasen	95
3.9.1	GlcNAc-Transferasen der N-Glycan Biosynthese: Rekombinante GlcNAc-Transferase I aus Kaninchen und rekombinante humane GlcNAc-Transferase II	98
3.9.1.1	UDP-LacNAc als Donorsubstrat	99
3.9.2	GlcNAc-Transferasen der O-Glycan Biosynthese: Rekombinante murine Core2 β 1-6GlcNAc-Transferase (Typ M) aus Maus	100
3.9.2.1	UDP-LacNAc als Donorsubstrat mit Core1-Bz als Akzeptor	101
3.9.2.2	UDP-LacNAc als Donorsubstrat mit GalNAc(α1-OCH ₂ Ph als Akzeptor...	102
3.9.2.3	Hydrolytische Nebenaktivität der Core2 β1-6 GlcNAc-Transferase.....	103
3.9.2.4	UDP-LacNAc als Inhibitor.....	104
3.9.2.5	GalNAc(β1-4)GlcNAc(α1-UDP, Gal(β1-4)Gal(β1-4)GlcNAc(α1-UDP und UMP als Inhibitoren.....	108
3.9.3	Rekombinante Saccharose Synthase 1 aus Kartoffel	112
3.9.3.1	UDP-Lac als Donorsubstrat	112
3.9.3.2	UDP-Lac als Donorsubstrat mit kleinerem Akzeptor	113
3.9.3.3	UDP-Lac als Inhibitor	113
3.9.3.4	Gal(β1-4)Gal(β1-4)Glc(α1-UDP als Inhibitor	114
3.9.4	Rekombinante humane β 1-4Galactosyltransferase 1	114
3.9.5	Rekombinante α 1-3-Galactosyltransferase aus Maus	115
3.9.5.1	Gal(β1-4)Gal(α1-UDP + Gal(α1-3)Gal(α1-UDP als Inhibitoren.....	117
3.9.6	Zusammenfassende Diskussion	117

4	ZUSAMMENFASSUNG	119
5	MS und NMR	122
5.1	Massenspektren	122
6.1.1	UDP-LacNAc, b -Galactosidase <i>B. circulans</i>	123
5.1.2	Gal(b 1-4)Gal(b 1-4)GlcNAc(a 1-UDP, b -Galactosidase <i>B. circulans</i>	123
5.1.3	UDP-Lac, b -Galactosidase <i>B. circulans</i>	124
5.1.4	Gal(b 1-4)Gal(b 1-4)Glc(a 1-UDP, b -Galactosidase <i>B. circulans</i>	125
5.1.5	Gal(b 1-4)Gal(a 1-UDP, b -Galactosidase <i>B. circulans</i>	126
5.1.6	Gal(b 1-3/4)GlcNAc(a 1-UDP, b -Galactosidase Stierhoden.....	127
5.1.7	Gal(b 1-3/4)Glc(a 1-UDP, b -Galactosidase Stierhoden	128
5.1.8	Gal(a 1-3)Glc(a 1-UDP, a -Galactosidase <i>B. adolescentis</i>	129
5.1.9	GalNAc(b 1-4)GlcNAc(a 1-UDP, b -N-Acetylhexosaminidase.....	130
5.1.10	Core2-Bz, Core2 b 1-6GlcNAc Transferase.....	131
5.1.11	Core6-Bz, Core2 b 1-6GlcNAc Transferase.....	131
5.2	NMR-Spektroskopie	132
5.2.1	UDP-LacNAc, b -Galactosidase <i>B. circulans</i>	133
5.2.2	Gal(b 1-4)Gal(b 1-4)GlcNAc(a 1-UDP, b -Galactosidase <i>B. circulans</i>	138
5.2.3	UDP-Lac, b -Galactosidase <i>B. circulans</i>	142
5.2.4	Gal(b 1-4)Gal(b 1-4)Glc(a 1-UDP, b -Galactosidase <i>B. circulans</i>	146
5.2.5	Gal(b 1-4)Gal(a 1-UDP, b -Galactosidase <i>B. circulans</i>	150
5.2.6	Gal(b 1-3/4)GlcNAc(a 1-UDP, b -Galactosidase Stierhoden.....	157
5.2.7	Gal(b 1-3/4)Glc(a 1-UDP, b -Galactosidase Stierhoden	162
5.2.8	Gal(a 1-3)Glc(a 1-UDP, a -Galactosidase <i>B. adolescentis</i>	168
5.2.9	GalNAc(b 1-4)GlcNAc(a 1-UDP, b -N-Acetylhexosaminidase.....	175
5.2.10	Core2-Bz, Core2 b 1-6GlcNAc Transferase.....	180
5.2.11	Core6-Bz, Core2 b 1-6GlcNAc Transferase.....	185

6	METHODEN	188
6.1	b-D-Galactosidase aus <i>Bacillus circulans</i>	188
6.1.1	Akzeptorsubstratspektrum.....	188
6.1.2	Präparative Synthese von Gal(b 1-4)GlcNAc(a 1-UDP und Gal(b 1-4)Gal(b 1-4)GlcNAc(a 1-UDP	189
6.1.3	Präparative Synthese von Gal(b 1-4)Glc(a 1-UDP und Gal(b 1-4)Gal(b 1-4)Glc(a 1-UDP	190
6.1.4	Präparative Synthese von Gal(b 1-4)Gal(a 1-UDP	190
6.2	b-D-Galactosidase aus Stierhoden	191
6.2.1	b-D-Galactosidase aus Stierhoden (kommerzielles Präparat)	191
6.2.1.1	Akzeptorsubstratspektrum.....	191
6.2.2	Partielle Aufreinigung der b -D-Galactosidase aus Stierhoden.....	191
6.2.3	Charakterisierung der b -D-Galactosidase aus Stierhoden (Eigenisolat)	192
6.2.3.1	pH-Optimum	192
6.2.3.2	pH-Stabilität	192
6.2.3.3	Optimierung der Donorsubstratkonzentration.....	193
6.2.3.4	Inhibition durch Galactose	193
6.2.3.5	Produktinhibition.....	194
6.2.3.6	Akzeptorsubstratspektrum.....	194
6.2.3.7	Zeit-Umsatz Kurven bei 30°C und –5°C; Akzeptor: UDP-Glc	194
6.2.3.8	Zeit-Umsatz Kurven bei 30°C; Akzeptor: UDP-GalNAc und UDP-GlcNAc.....	195
6.2.4	Präparative Synthese von Gal(b 1-X)GlcNAc(a 1-UDP	195
6.2.4.1	Produktisolierung	196
6.2.5	Präparative Synthese von Gal(b 1-X)Glc(a 1-UDP.....	196
6.2.5.1	Produktisolierung	196
6.2.6	Kombination von Glycosidasen mit Glycosyltransferasen.....	197
6.2.6.1	Kombination der β -D-Galactosidase aus Stierhoden mit der α 2,3-O-Sialyltransferase [EC 2.4.99.4.....	197
6.2.6.2	Kombination der β -D-Galactosidase aus Stierhoden mit der α 1,3Fucosyltransferase V	198

6.3	b-D-Galactosidase aus <i>Diplococcus pneumoniae</i>	200
6.3.1	Substratspektrum	200
6.4	b-D-Galactosidase aus <i>E. coli</i>	200
6.5	b-D-Galactosidase aus <i>Aspergillus oryzae</i>	201
6.6	a-D-Galactosidase aus <i>Bifidobacterium adoslescentis</i>	201
6.6.1	Reaktionen mit Gal(a 1-pNP als Donorsubstrat bei 30°C und -5°C	201
6.6.2	Reaktionen mit Melibiose als Donorsubstrat bei 30°C und -5°C.....	202
6.6.3	Optimierung der Enzymkonzentration.....	202
6.6.4	Optimierung der Donorsubstratkonzentration.....	203
6.6.5	Akzeptorsubstratspektrum.....	203
6.6.6	Präparative Synthese von Gal(a 1-X)Glc(a 1-UDP	203
6.6.6.1	Produktisolierung	204
6.6.7	Präparative Synthese von Gal(a 1-X)Gal(a 1-UDP	204
6.6.7.1	Produktisolierung	204
6.7	a-D-Galactosidase aus grünen Kaffeebohnen	204
6.8	b-N-Acetylhexosaminidasen [EC 3.2.1.30]	205
6.8.1	Optimierung der Reaktionsbedingungen.....	205
6.8.1.1	Löslichkeit von GlcNAc(β 1-pNP und GalNAc(β 1-pNP in organischen Lösungsmitteln.....	205
6.8.1.2	Löslichkeit von GlcNAc(β 1-pNP und GalNAc(β 1-pNP mit Cyclodextrinen als Löslichkeitsvermittlern.....	207
6.8.1.3	Aktivität der β-N-Acetylhexosaminidasen in Heptakis(2,6-Di-O-Methyl)- Cyclodextrin-haltigen Lösungen.....	207
6.8.1.4	Enzymstabilität	208
6.8.2	Substratscreening	208
6.8.3	b-N-Acetylhexosaminidase aus <i>Trichoderma harzianum</i>	209
6.8.3.1	pH-Optimum	209
6.8.3.2	Michaelis-Menten Kinetik	210

6.8.3.3	Inhibition durch GalNAc.....	211
6.8.3.4	Erweiterung des Substratspektrums	211
6.8.4	Synthese von GalNAc(β 1-X)GlcNAc(α 1-UDP	211
6.8.4.1	Produktisolierung	211
6.9	Nucleotidaktivierte Disaccharide als Substrate und Inhibitoren für Glycosyltransferasen	212
6.9.1	GlcNAc-Transferasen der N-Glycan Biosynthese: Rekombinante GlcNAc-Transferase I aus Kaninchen und rekombinante humane GlcNAc-Transferase II	212
6.9.1.1	UDP-LacNAc als Donorsubstrat	212
6.9.2	GlcNAc-Transferasen der O-Glycan Biosynthese: Rekombinante murine Core2 β1-6GlcNAc-Transferase (Typ M) aus Maus	213
6.9.2.1	UDP-LacNAc als Donorsubstrat mit Core1-Bz als Akzeptor	213
6.9.2.2	UDP-LacNAc als Donorsubstrat mit GalNAc(α1-OCH ₂ Ph als Akzeptor...214	
6.9.2.3	Hydrolytische Nebenaktivität der Core2 β1-6 GlcNAc-Transferase.....214	
6.9.2.4	UDP-LacNAc als Inhibitor.....215	
6.9.2.5	GalNAc(β1-4)GlcNAc(α1-UDP, Gal(β1-4)Gal(β1-4)GlcNAc(α1-UDP und UMP als Inhibitoren.....217	
6.9.3	Rekombinante Saccharose Synthase 1 aus Kartoffel218	
6.9.3.1	UDP-Lac als Donorsubstrat	218
6.9.3.2	UDP-Lac als Donorsubstrat mit kleinerem Akzeptor	218
6.9.3.3	UDP-Lac als Inhibitor	219
6.9.3.4	Gal(β1-4)Gal(β1-4)Glc(α1-UDP als Inhibitor	221
6.9.4	Rekombinante humane β1-4Galactosyltransferase 1222	
6.9.4.1	Gal(β1-4)Gal(α1-UDP als Donorsubstrat	222
6.9.4.2	Gal(β1-4)Gal(α1-UDP als Inhibitor	222
6.9.4.3	Gal(α1-3)Gal(α1-UDP als Inhibitor	223
6.9.5	Rekombinante α 1-3-Galactosyltransferase aus Maus	224
6.9.5.1	Gal(β1-4)Gal(α1-UDP als Inhibitor	225
6.9.5.2	Gal(α1-3)Gal(α1-UDP als Inhibitor	226
6.10	Enzymtests	227

6.10.1	b -D-Galactosidase aus Stierhoden (Eigenisolat)	227
6.10.2	a -D-Galactosidase.....	229
6.10.3	b -N-Acetylhexosaminidasen.....	229
6.10.4	a 2,3-O-Sialyltransferase	230
6.10.5	Rekombinante murine <i>Core2</i> b 1-6GlcNAc-Transferase aus Maus	231
6.10.6	Rekombinante Saccharose Synthase 1 aus Kartoffel.....	231
6.10.7	Rekombinante humane b 1-4-Galactosyltransferase 1	232
6.10.8	Rekombinante a 1-3Galactosyltransferase aus Maus.....	233
6.11	Produktisolierung	233
6.11.1	Anionenaustauschchromatographie	233
6.11.2	Ethanol-fällung	234
6.11.3	Gelfiltration.....	234
6.12	Analytik	235
6.12.1	HPLC-Methoden zur Trennung von Nucleotiden, Nucleotidzuckern und Nucleotidoligosacchariden	235
6.12.1.1	HPLC ①	235
6.12.1.2	HPLC ②	236
6.12.1.3	HPLC ③	238
6.12.2	HPLC-Methoden zur Trennung von Oligosacchariden	239
6.12.2.1	HPLC ④	239
6.12.2.2	HPLC ⑤	240
6.12.2.3	HPLC ⑥	241
6.12.2.4	HPLC ⑦	242
6.12.3	Dünnschichtchromatographie	242
7	ANHANG	243
7.1	Chemikalien	243
7.2	Enzyme	244
7.3	Geräte	245
8	LITERATUR	247

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Funktion von Kohlenhydraten an der Oberfläche von eukaryontischen Zellen.....	1
Abb. 2:	Verschiedene Typen der <i>N</i> -Glycane.....	3
Abb. 3:	Biosyntheschema der <i>N</i> -Glycane	5
Abb. 4:	Synthese der O-glycosidischen <i>Core</i> -Strukturen	7
Abb. 5:	Anhaftung der Leukozyten an das Endothel	9
Abb. 6:	Biologisch aktiver <i>N</i> -Terminus des PSGL-1.....	11
Abb. 7:	<i>N</i> - und <i>O</i> -geknüpfte Polylactosaminoglycane mit Sialyl-LewisX.	12
Abb. 8:	Blocksynthese in der chemischen Oligosaccharidsynthese	14
Abb. 9:	Reverse Hydrolyse	15
Abb. 10:	Kinetisch kontrollierte Transglycosylierung.....	16
Abb. 11:	Mechanismus der enzymatischen Glycosidhydrolyse.....	18
Abb. 12:	Produktkonzentrationen bei reverser Hydrolyse und Transglycosylierung	19
Abb. 13:	Arrhenius-Gleichung und Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten einer Enzymreaktion	21
Abb. 14:	Synthese von <i>N</i> -Acetyllactosamin mit einer β 1-4-Galactosyltransferase	25
Abb. 15:	Die Saccharidsynthese am Beispiel der Saccharose-Phosphorylase.....	25
Abb. 16:	Ausschnitt aus der Struktur des Pseudomureins	29
Abb. 17:	Synthese von aktivierten Di- und Trisacchariden mit der β -Galactosidase aus <i>B.circulans</i>	33
Abb. 18:	Synthese von UDP-LacNAc mit der β 1-4-Galactosyltransferase.....	34
Abb. 19:	Effekt von α -Lactalbumin auf die Synthese von UDP-LacNAc mit der β 4GalT aus Kuhmilch.....	36
Abb. 20:	Zeitlicher Verlauf der Produktbildung mit der β -Galactosidase aus Stierhoden...46	
Abb. 21:	Aktivität der β -Galactosidase aus Stierhoden (Eigenisolat) in Abhängigkeit vom pH-Wert.....	49
Abb. 22:	Aktivität der β -Galactosidase aus Stierhoden (Eigenisolat) in Abhängigkeit von der Zeit.	50
Abb. 23:	Zeit-Ausbeute Kurven für die β -Galactosidase aus Stierhoden (Eigenisolat) bei verschiedenen Lactosekonzentrationen	51
Abb. 24:	Inhibition der Hydrolysereaktion der β -Galactosidase aus Stierhoden durch Galactose	52

Abb. 25:	Inhibierung der Hydrolysereaktion der β -Galactosidase aus Stierhoden durch Gal(β 1-X)GlcNAc-UDP	54
Abb. 26:	Inhibierung der Hydrolyse-reaktion der β -Galactosidase aus Stierhoden durch Gal(β 1-X)Glc-UDP	54
Abb. 27:	HPLC-Chromatogramm der Reaktionsprodukte mit der β -Galactosidase aus Stierhoden (Eigenisolat) mit UDP-GlcNAc als Akzeptor.....	55
Abb. 28:	Zeit-Ausbeute Kurven für die Bildung des UDP-Di- und Trisaccharides	57
Abb. 29:	Zeit-Ausbeute Kurven für die Bildung des UDP-Di- und Trisaccharides bei -5°C	58
Abb. 30:	Zeit-Ausbeute Kurven mit UDP-GalNAc als Akzeptor.....	59
Abb. 31:	Zeit-Ausbeute Kurven mit UDP-GlcNAc als Akzeptor.....	59
Abb. 32:	Kombination von β -Galactosidase aus Stierhoden (kommerzielles Präparat) mit rekombinanter humaner α 2,3-O-Sialyltransferase (E.C. 2.4.99.4) zur Synthese von, Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-3)GalNAc (α 1-UDP.....	63
Abb. 33:	Bildung von Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-3)GalNAc(α 1-UDP.....	64
Abb. 34:	HPLC-Chromatogramm der Sialyltransferasereaktion.	65
Abb. 35:	Kombination von β -Galactosidase aus Stierhoden (Eigenisolat) mit rekombinanter humaner α 1,3Fucosyltransferase V zur Synthese von Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc (α 1-UDP.	67
Abb. 36:	HPLC-Chromatogramm des kombinierten Ansatzes von β -Galactosidase aus Stierhoden (Eigenisolat) und der α 1,3Fucosyltransferase V.	68
Abb. 37:	Zeit-Ausbeute Kurven für die β -Galactosidase aus <i>D. pneumoniae</i>	72
Abb. 38:	Zeit-Ausbeute Kurven für die β -Galactosidase aus <i>D. pneumoniae</i>	73
Abb. 39:	Bildung von Gal(α 1-3)Glc(α 1-UDP mit α -Galactosidase aus <i>B. adolescentis</i>	76
Abb. 40:	Donorsubstratabhängigkeit der Ausbeute von Gal(α 1-X)Glc(α 1-UDP	77
Abb. 41:	Löslichkeit von pNP- β -GlcNAc in cyclodextrinhaltigen Lösungen.....	84
Abb. 42:	Löslichkeit von pNP- β -GalNAc in cyclodextrinhaltigen Lösungen.....	84
Abb. 43:	Zeitlicher Verlauf der Bildung von GalNAc(β 1-X)GlcNAc(α 1-UDP	88
Abb. 44:	Zeitlicher Verlauf der Bildung von GlcNAc(β 1-X)GlcNAc(α 1-UDP	89
Abb. 45:	pH-Optimum der β -N-Acetylhexosaminidase aus <i>T. harzianum</i>	90
Abb. 46:	Michaelis-Menten Kinetik der β -N-Acetylhexosaminidase aus <i>T. harzianum</i>	92
Abb. 47:	Inhibierung der β -N-Acetylhexosaminidase aus <i>T. harzianum</i> mit GalNAc.	93
Abb. 48:	Mechanismus der Golgi- Antiporter	96

Abb. 49:	Reaktionen der GlcNAcT I und II	98
Abb. 50:	Bildung von <i>Core2</i> -Bz mit der <i>Core2</i> GlcNAc-Transferase.	101
Abb. 51:	Reaktion von UDP-LacNAc und GalNAc-Bz zu <i>Core2</i> -Bz.	102
Abb. 52:	Nicht-lineare und lineare Darstellung der kompetitiven Inhibition der <i>Core2</i> GlcNAc-T mit UDP-LacNAc in Bezug auf den Donor (UDP-GlcNAc).....	105
Abb. 53:	Nicht-lineare und lineare Darstellung der nicht-kompetitiven Inhibition der <i>Core2</i> GlcNAc-T mit UDP-LacNAc in Bezug auf den Akzeptor (<i>Core1</i> -Bz)	107
Abb. 54:	Kompetitive Inhibition der <i>Core2</i> GlcNAc-Transferase in Bezug auf den Donor mit Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP	109
Abb. 55:	Kompetitive Inhibition der <i>Core2</i> GlcNAc-Transferase in Bezug auf den Donor mit UDP-LacDiNAc	110
Abb. 56:	Inhibition der <i>Core2</i> GlcNAc-Transferase mit UMP.....	111
Abb. 57:	Reaktion der Saccharose Synthase 1 mit ihren natürlichen Substraten.	112
Abb. 58:	Kompetitive Inhibition der Saccharose Synthase 1 in Bezug auf UDP-Glc mit UDP-Lactose.....	113
Abb. 59:	Bisubstrat-Analoga als Inhibitoren für die humane rekombinate β 1,4GalT 1 und 2 und die rekombinante α 1,3GalT aus Schwein	114
Abb. 60:	Bestimmung des K_M -Wertes für UDP-Gal	116
Abb. 61:	Bestimmung des K_M -Wertes für LacNAc	116
Abb. 62:	FAB-MS Spektrum von UDP-LacNAc.....	123
Abb. 63:	FAB-MS Spektrum von Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1- UDP	124
Abb. 64:	FAB-MS Spektrum von UDP-Lac	124
Abb. 65:	FAB-MS Spektrum von Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)Glc(α 1-UDP	125
Abb. 66:	FAB-MS Spektrum von Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP	126
Abb. 67:	FAB-MS Spektrum von Gal(β 1-3/4)GlcNAc(α 1-UDP	127
Abb. 68:	FAB-MS Spektrum von Gal(b1-3/4)Glc(a1-UDP	128
Abb. 69:	FAB-MS Spektrum von Gal(a1-3)Glc(α 1-UDP	129
Abb. 70:	FAB-MS Spektrum von GalNAc(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP	130
Abb. 71:	FAB-MS Spektrum von GlcNAc(β 1-6)GalNAc(α 1-OBz.....	131
Abb. 72:	1D 1H NMR-Spektrum von UDP-LacNAc	135
Abb. 73:	1D ^{13}C NMR-Spektrum von UDP-LacNAc	136
Abb. 74:	2D ROESY Spektrum von UDP-LacNAc	137
Abb. 75:	1D 1H NMR-Spektrum von Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP.....	139

Abb. 76:	1D ¹³ C NMR-Spektrum von Gal(β1-4)Gal(β1-4)GlcNAc(α1-UDP	140
Abb. 77:	2D ROESY NMR-Spektrum von Gal(β1-4)Gal(β1-4)GlcNAc(α1-UDP	141
Abb. 78:	1D ¹ H NMR-Spektrum von UDP-Lac.....	144
Abb. 79:	1D ¹³ C NMR-Spektrum von UDP-Lac	144
Abb. 80:	2D ROESY NMR-Spektrum von UDP-Lac.....	145
Abb. 81:	1D ¹ H NMR-Spektrum von Gal(β1-4)Gal(β1-4)Glc(α1-UDP	147
Abb. 82:	1D ¹³ C NMR-Spektrum von Gal(β1-4)Gal(β1-4)Glc(α1-UDP	148
Abb. 83:	2D ROESY NMR-Spektrum von Gal(β1-4)Gal(β1-4)Glc(α1-UDP	149
Abb. 84:	1D ¹ H NMR-Spektrum von Gal(β1-4)Gal(α1-UDP	152
Abb. 85:	2D TOCSY NMR-Spektrum von Gal(β1-4)Gal(α1-UDP	153
Abb. 86:	2D TOCSY NMR-Spektrum von Gal(β1-4)Gal(α1-UDP	154
Abb. 87:	2D ROESY NMR-Spektrum von Gal(β1-4)Gal(α1-UDP.....	155
Abb. 88:	2D HMBC NMR-Spektrum von Gal(β1-4)Gal(α1-UDP	156
Abb. 89:	1D ¹ H NMR-Spektrum von Gal(β1-3/4)GlcNAc(α1-UDP	159
Abb. 90:	2D TOCSY NMR-Spektrum von Gal(β1-3/4)GlcNAc(α1-UDP	160
Abb. 91:	2D ROESY NMR-Spektrum von Gal(β1-3/4)GlcNAc(α1-UDP	161
Abb. 92:	1D ¹ H NMR-Spektrum von Gal(β1-3/4)Glc(α1-UDP	164
Abb. 93:	2D TOCSY NMR-Spektrum Gal(β1-3/4)Glc(α1-UDP	165
Abb. 94:	2D TOCSY NMR-Spektrum von Gal(β1-3/4)Glc(α1-UDP	166
Abb. 95:	2D ROESY NMR-Spektrum von Gal(β1-3/4)Glc(α1-UDP	167
Abb. 96:	1D ¹ H NMR-Spektrum von Gal(β1-3)Glc(α1-UDP.....	170
Abb. 97:	2D TOCSY NMR-Spektrum von Gal(α1-3)Glc(α1-UDP.....	171
Abb. 98:	2D TOCSY NMR-Spektrum von Gal(α1-3)Glc(α1-UDP.....	172
Abb. 99:	2D ROESY NMR-Spektrum von Gal(α1-3)Glc(α1-UDP.....	173
Abb. 100:	2D HMBC NMR-Spektrum von Gal(α1-3)Glc(α1-UDP.....	174
Abb. 101:	1D ¹ H NMR-Spektrum von GalNAc(β1-4)GlcNAc(α1-UDP	177
Abb. 102:	2D TOCSY NMR-Spektrum von GalNAc(β1-4)GlcNAc(α1-UDP	178
Abb. 103:	2D ROESY NMR-Spektrum von GalNAc(β1-4)GlcNAc(α1-UDP	179
Abb. 104:	1D ¹ H NMR-Spektrum von <i>Core2</i> -Bz.	181
Abb. 105:	2D TOCSY NMR-Spektrum <i>Core2</i> -Bz.	181
Abb. 106:	2D ROESY NMR-Spektrum <i>Core2</i> -Bz.	182
Abb. 107:	Kombination von TOCSY und ROESY Spektren für <i>Core2</i> -Bz.	183
Abb. 108:	1D ¹ H NMR-Spektrum von <i>Core6</i> -Bz.	186

Abb. 109: 2D TOCSY NMR-Spektrum <i>Core6</i> -Bz.	187
Abb. 110: Eichgerade zur Bestimmung der Saccharosekonzentration.	220
Abb. 111: Eichgerade <i>p</i> -Nitrophenol.	227
Abb. 112: Eichgerade zur Bestimmung der UDP-Glc Konzentration mit HPLC	232
Abb. 113: Beispielchromatogramm zu HPLC-Methode ①	236
Abb. 114: Beispielchromatogramm zu HPLC-Methode ②.	237
Abb. 115: Beispielchromatogramm zu HPLC-Methode ③	238
Abb. 116: Beispielchromatogramm zu HPLC-Methode ④	239
Abb. 117: Beispielchromatogramm zu HPLC-Methode ⑤	240
Abb. 118: Beispielchromatogramm zu HPLC-Methode ⑥	241

Verzeichnis der Symbole und Abkürzungen

A.	<i>Aspergillus</i>
Ac	Acetyl
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
ADP-Glc	Adenosin-5'-Diphospho- α -D-Glucose
AP	alkalische Phosphatase
B.	<i>Bacillus</i>
Bn	Benzyl
BSA	Bovine Serum Albumin
Bz	Benzoyl
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Cyclodextrin
CDP	Cytidin-5'-Diphosphat
CMP	Cytidin-5'-Monophosphat
CMP-Neu5Ac	Cytidin-5'-Monophospho- β -D-N-Acetylneuraminsäure
Core2 GlcNAcT	Core2 β 1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
dTDP-Glc	2'-Desoxythymidin-5'-Diphosphat- α -D-Glucose
E	Extinktion
EC	<i>enzyme class</i>
FAB	<i>fast atom bombardement</i>
ff	<i>fast flow</i>
Fru	D-Fructose
Fuc	L-Fucose
g	Gramm
Gal	D-Galactose
GalNAc	N-Acetyl-D-Galactosamin
GDP-Fuc	Guanosin-5'-Diphospho- β -L-Fucose
GDP-Man	Guanosin-5'-Diphospho- β -D-Mannose
Glc	D-Glucose
GlcNAc	N-Acetyl-D-Glucosamin
h	Stunde
HAc	Essigsäure
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
Hz	Hertz
J	Kopplungskonstante
KAc	Kaliumacetat
Kap.	Kapitel
L	Liter
Lac	Lactose
LacNAc	N-Acetylglucosamin
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MgCl	Magnesiumchlorid

min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MnCl ₂	Manganchlorid
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
n.b.	nicht bestimmt
n.g.	nicht getestet
NDP	Nucleotid-5'-Diphosphat
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
<i>p</i> NP	<i>para</i> -Nitrophenyl
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
R _f -Wert	Retentionsfaktor
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SuSy	Saccharose Synthase
t	Zeit
<i>T.</i>	<i>Trichoderma</i>
U	<i>units</i>
UV	Ultraviolett
UDP	Uridin-5'-Diphosphat
UDP-Gal	Uridin-5'-Diphospho- α -D-Galactose
UDP-GalNAc	Uridin-5'-Diphospho- <i>N</i> -Acetyl- α -D-Galactosamin
UDP-Glc	Uridin-5'-Diphospho- α -D-Glucose
UDP-GlcNAc	Uridin-5'-Diphospho- <i>N</i> -Acetyl- α -D-Glucosamin
UDP-Lac	Uridin-5'-Diphospho- α -Lactose
UDP-LacNAc	Uridin-5'-Diphospho- α - <i>N</i> -Acetyllactosamin
z.B.	zum Beispiel

1 EINLEITUNG

1.1 Bedeutung von Kohlenhydraten und Glykokonjugaten

Das zelluläre Geschehen wird nicht nur von den Nucleinsäuren und Proteinen gesteuert, sondern auch von den Zuckern. Da die einzelnen Zuckerbausteine auf vielfache Weise miteinander verknüpft sein können, ist der Informationsgehalt dieser Stoffklasse besonders groß (Sharon und Lis 1993). Zuckermoleküle stellen damit ein eigenständiges „Alphabet“ des Lebens dar. Will man die Lebensvorgänge vollständig erfassen, muß man auch diesen Code entschlüsseln (Gagneux und Varki 1999). Das scheint in der allgemeinen Euphorie über die entgültige Entzifferung des menschlichen Erbgutes in Vergessenheit geraten zu sein.

Komplexe Kohlenhydrate sind multifunktionelle Informationsträger und spielen als Bestandteile von Glykokonjugaten wie z.B. Glycoproteinen, Glycolipiden, Hormonen und Antikörpern eine aktive Rolle in inter- und intrazellulärer Kommunikation (Huges 1976, Montreuil 1980, Paulsen 1982, Nilsson 1988, Sharon und Lis 1993, Wong 1995, Gagneux und Varki 1999).

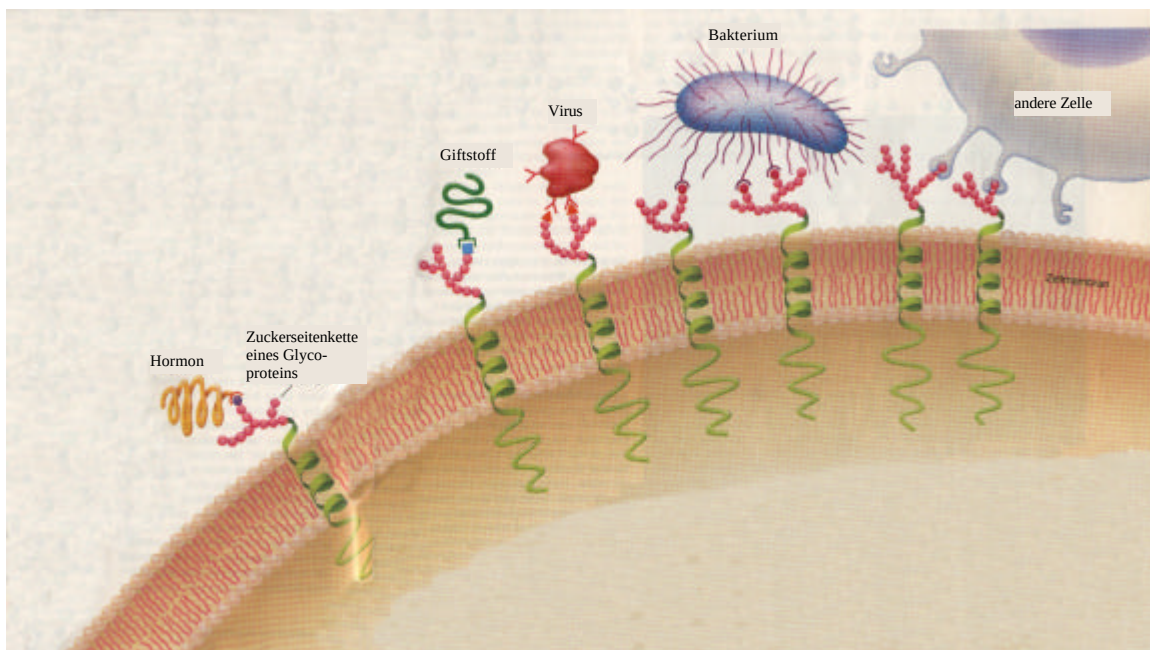


Abb. 1: Funktion von Kohlenhydraten an der Oberfläche von eukaryontischen Zellen (Sharon und Lis 1993).

Wie in **Abb. 1** dargestellt können Kohlenhydrate als spezifische Rezeptoren für Viren (z.B. für Influenza oder HIV), Bakterien, Toxine, blutgruppen- und tumorspezifische Antikörper, Enzyme, Hormone und eine Anzahl von Lectinen dienen (Varki 1993, Greenwell 1997, Brockhausen *et al.* 1998, Greene 1991).

Ein Verständnis der Veränderungen der Glycosylierung von Proteinen und Glycolipiden in der Embryogenese, der Differenzierung von Geweben und Abweichungen innerhalb von pathologischen Prozessen (z.B. Entzündung, Tumorgenese und Metastasierung) ist von Bedeutung um, grundlegende biologische und anwendungsorientierte Fragestellungen zu bearbeiten und Lösungen aufzuzeigen.

1.2 Eucaryontische Glycokonjugate

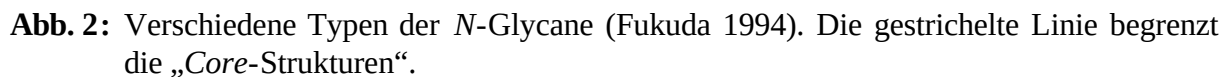
Zuckerstrukturen an Proteinen können in zwei Gruppen unterteilt werden. Die Zuckerreste können *via* *N*-Acetylglucosamin an den Amidstickstoff von Asparagin gebunden sein (***N*-Glycane**). Man unterscheidet hierbei drei Untergruppen, welche jeweils auf einer gemeinsamen *Core*-Struktur aufbauen (vgl. Kapitel 1.2.1, **Abb. 2**).

Von ***O*-Glycanen** spricht man hingegen, wenn die Saccharideinheiten mit der Hydroxylfunktion von Serin oder Threonin verknüpft sind. Die Strukturvielfalt ist größer als bei den *N*-Glycanen, man unterscheidet acht *Core*-Strukturen (vgl. Kapitel 1.2.2, **Abb. 4**).

1.2.1 *N*-Glycane

Viele membrangebundene und lösliche Glycoproteine besitzen, häufig auch in Verbindung mit *O*-Glycanen, Asn-gebundene Oligosaccharide. Glycoproteine mit *N*-Glycanen wurden in Zellsekreten, Serum und als membrangebundene Bestandteile der Plasmamembran, des Golgi-Apparates, der Lysosomen oder des endoplasmatischen Reticulums gefunden.

N-Glycane können in drei Hauptklassen, die biosynthetisch verwandt sind, unterteilt werden (Cummings 1992). Die drei Klassen beinhalten den **High-Mannose-Typ**, den **Hybrid-Typ** und den **Komplex-Typ** (**Abb. 2**). Komplexe *N*-Glycane werden weiterhin nach der Anzahl der „Antennen“ unterschieden, die zwei bis fünf betragen kann, sowie durch charakteristische Substitutionen an der *Core*-Struktur (Unverzagt 1997).



c: High-Mannose-Typ

Im Gegensatz zur O-Glycosylierung, findet der erste Schritt der N-Glycanbiosynthese cotranslational im rauen Endoplasmatischen Reticulum (RER) statt. Hier wird zunächst eine Vorläuferstruktur auf einem Lipidanker, dem Dolicholphosphat gebildet. Auf der cytoplasmatischen Seite wird zuerst GlcNAc von UDP-GlcNAc auf Dolicholphosphat übertragen. Dieser Schritt kann durch das Antibiotikum Tunicamycin inhibiert werden, was zu einem kompletten Abbruch der N-Glycanbiosynthese führen kann (Cummings 1992).

Darauffolgend wird eine weitere GlcNAc- und fünf Mannose-Einheiten übertragen, dann erfolgt die Translokation dieser Oligosaccharidstruktur durch die Membran des RER in das Lumen. Hier werden weitere vier Mannose- und drei Glucoseeinheiten angeknüpft (Lennarz 1987, Hirschberg und Schneider 1987). Die resultierende dolicholgebundene $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Vorläuferstruktur wird durch eine multimere Oligosaccharyltransferase *en bloc* auf ein Asparagin eines Polipeptides übertragen (Schritt 1, **Abb. 3**) (Silberstein 1993, Sears und Wong 1998).

Die drei Glucoseeinheiten werden nun nacheinander durch zwei membrangebundene Glucosidasen (α -1,2-Glucosidase I und α -1,3-Glucosidase II) abgespalten (Schritte 2 und 3, **Abb. 3**). Es wird angenommen, daß die drei Glucosen als ein Signal dienen, welches den Abbau des Oligosaccharides vor seiner Übertragung auf das Protein verhindert. Nachdem die Glucoseeinheiten entfernt wurden, wird eine Mannose vom $\text{Man}(\alpha 1-6)$ -Zweig durch eine ER- α -1,2-Mannosidase hydrolysiert (Schritt 4, **Abb. 3**) (Sears und Wong 1998).

Das Glycoprotein mit der $\text{Man}_8\text{-GlcNAc}_2$ -Kette (**High-Mannose Typ, Abb. 2**) wird im Anschluß an diese Prozessierung vom rauhen endoplasmatischen Retikulum durch Vesikel zum *cis*-Golgiapparat transportiert. Im Golgi erfolgt, in Abhängigkeit von seiner späteren Bestimmung, die weitere Prozessierung des Glycoproteins, wobei die Golgi- α -1,2-Mannosidase I drei Mannosen vom $\text{Man}(\alpha 1,3)$ -Zweig abspaltet (Schritt 5, **Abb. 3**). Das Produkt dieser Prozessierung ist $[\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\alpha 1-6](\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta\text{-Asn}(\text{Man}_5\text{-GlcNAc}_2\text{-R})$, welches den Anfang für die Synthese aller komplexen und hybriden *N*-Glycane darstellt (Weng und Spiro 1996).

Die weitere Prozessierung der *N*-Glycane erfolgt durch die sukzessive Aktivität einer Reihe von *N*-Acetylglucosaminyltransferasen (GNT) und Mannosidasen, die über den *cis*-, *medial*- und *trans*-Golgi Apparat verteilt sind. Während dieser Prozesse bewegt sich das Glycoprotein durch die Kompartimente des Golgi-Apparates bis hin zum *trans*-Kompartiment von wo aus es sekretiert wird (Dennis *et al.* 1999).

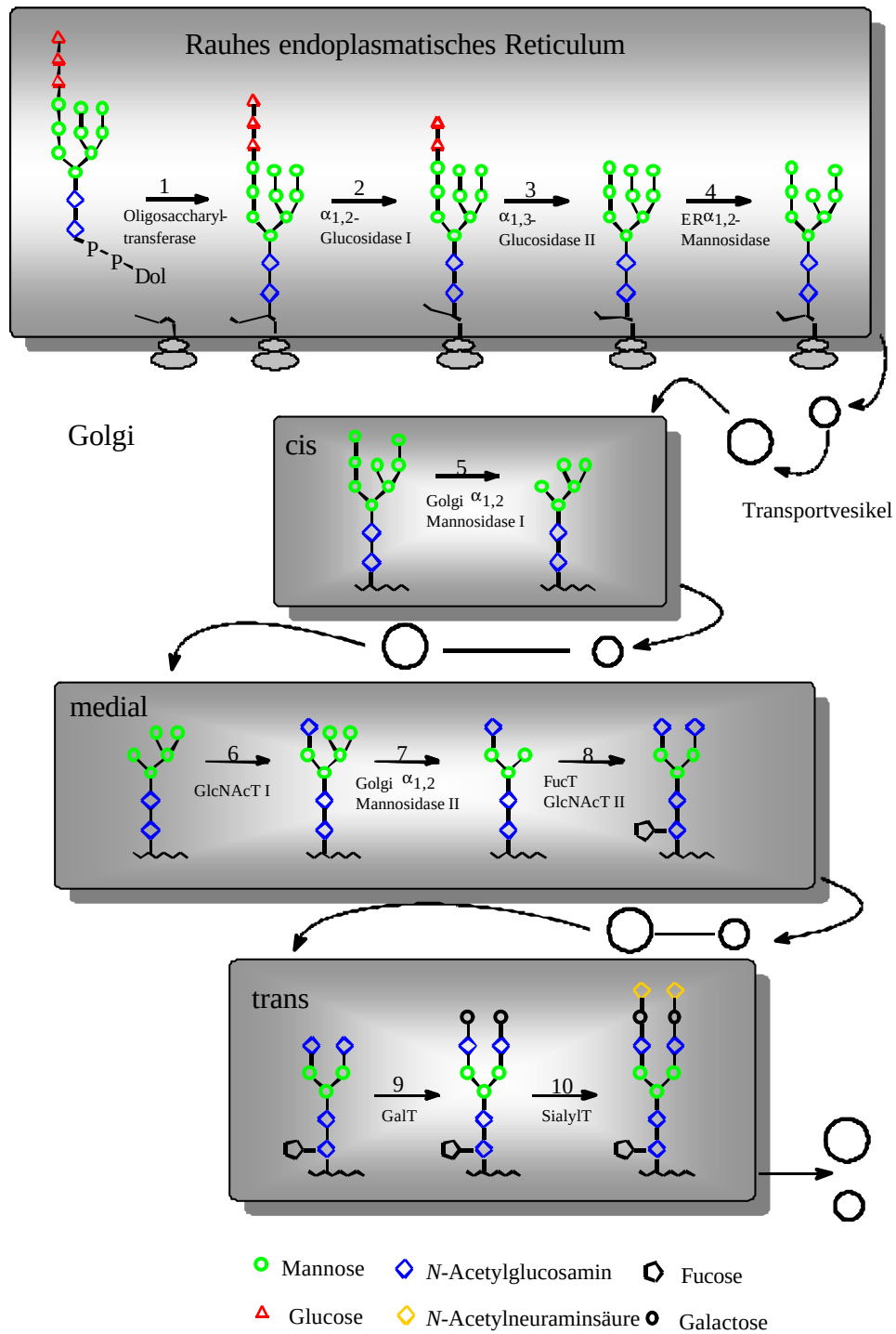


Abb. 3: Biosyntheschema der N-Glycane (nach Oxford GlycoSystems 1994).

Viele der Modifikationen sind voneinander abhängig: die GNT III, IV und V können nur agieren, wenn zuvor GNT I einen GlcNAc-Rest übertragen hat. Die resultierende Struktur der GNT III-Aktivität hemmt hingegen die Transferasen IV, V und die Mannosidase II (Schachter 1985).

Als Beispiele für die weitere Prozessierung seien die *N*-Acetylglucosaminyltransferasen I, II und III, sowie die α -Mannosidase II genannt:

Die *N*-Acetylglucosaminyltransferase I ist das Schlüsselenzym in der Biosynthese aller komplexen *N*-Glycane. Sie knüpft GlcNAc in α -1,2-Stellung an die terminale Mannose des Man(α 1,3)-Zweiges und bildet somit GlcNAcMan₅GlcNAc₂ (Schritt 6, **Abb. 3**). Die Anwesenheit dieses GlcNAc-Restes ist essentiell für die nun folgenden Reaktionen von verschiedenen Enzymen im Biosyntheseweg (Schachter 1987, Schachter 1991, Kornfeld und Kornfeld 1985).

Golgi- α -Mannosidase II: (Schritt 7, **Abb. 3**) entfernt zwei Mannosen vom Man(α 1,6)-Zweig und liefert somit GlcNAcMan₃GlcNAc₂ (Herscovics 1999). Falls ein GlcNAc-Rest auf den Man(α 1,2)-Zweig durch die *N*-Acetylglucosaminyltransferase III übertragen wird, bevor die α -Mannosidase II die Mannosen entfernt, kann dieses Enzym die oben genannten Mannose-Reste nicht mehr hydrolysieren, was in der Bildung der **Hybrid-Typ** (**Abb. 2**) Seitenketten resultiert. Ausgehend von dieser GlcNAcMan₅GlcNAc₂-Struktur kann kein weiterer Abbau des Mannose-Motivs zum **Komplex-Typ** (**Abb. 2**) erfolgen.

Die *N*-Acetylglucosaminyltransferase II (Schritt 8, **Abb. 3**) ist das zweite Enzym, das in der Primärphase der Biosynthese innerhalb des Elongation der *N*-Glycane wirksam ist und bindet GlcNAc β -1,2 an den nun freien Man(α 1,6)-Zweig und liefert die Vorläuferstruktur für den biantennären **Komplex-Typ** (Paulsen 1995, Bendiak und Schachter 1987).

Im *trans*-Golgi findet schließlich vor der Sekretion der Glycoproteine noch eine weitere Verlängerung und Terminierung der Strukturen durch Galactosyl-, Sialyl- und Fucosyltransferasen statt (Schritte 8, 9 und 10, **Abb. 3**).

1.2.2 O-Glycane

GalNAc-Ser oder GalNAc-Thr-gebundene O-Glycane treten auf löslichen sekretierten und membrangebundenen Glycoproteinen und auf Proteoglycanen in Krebszellen auf.

Per definitionem haben O-Glycane des Mucin-Typs einen GalNAc-Rest¹ am reduzierenden Ende. Sie werden am häufigsten in Mucinen², aber auch auf anderen sekretierten und membrangebundenen Glycoproteinen höherer Eukarionten gefunden (Van den Steen 1998). Die Funktionen von Kohlenhydraten sind ebenso vielfältig wie ihre Strukturen. O-Glycane schützen Proteine und die Oberflächen von Epithelzellen, erhalten die Proteinkonformation, sind an Zell-Zell Wechselwirkungen beteiligt, können in der Wachstumsregulation, der Blutgerinnung, Embryogenese, Wachstum und Zelltod involviert sein. Bei Krebs spielen sie eine wichtige Rolle in der Anhaftung und Invasion von Krebszellen und deren Überleben im Blutstrom (Varki 1993, Brockhausen 1999).

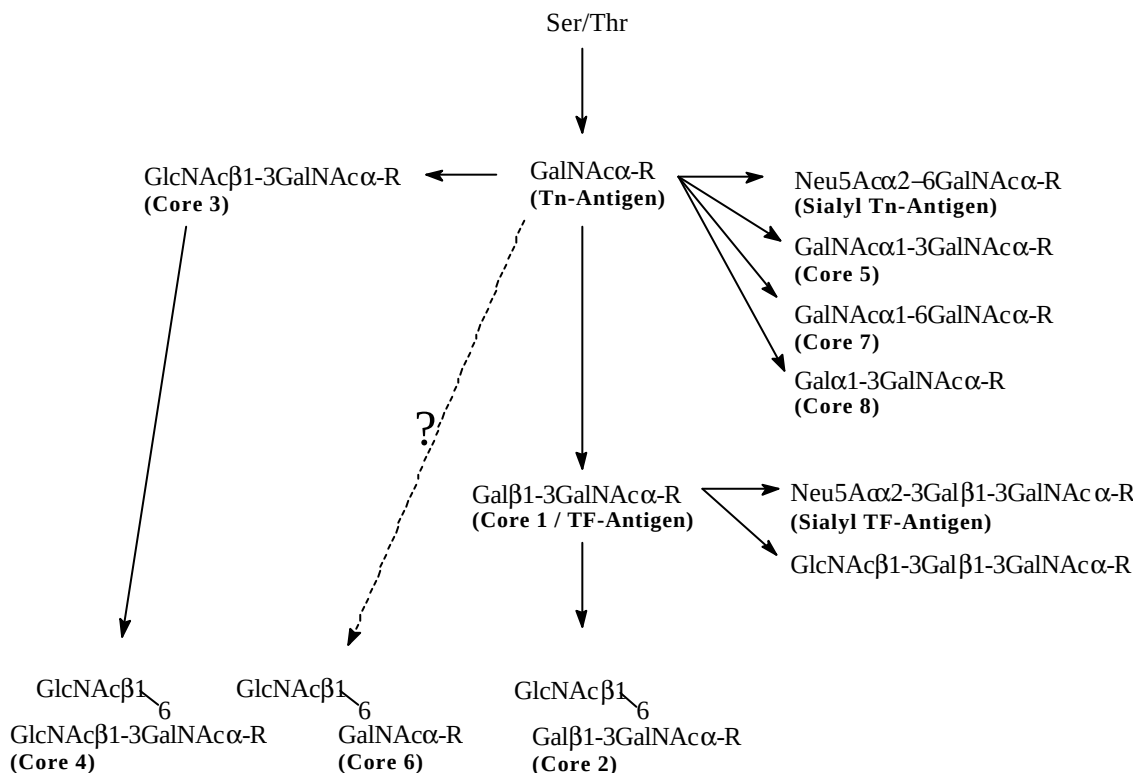


Abb. 4: Synthese der O-glycosidischen Core-Strukturen; R = Polypeptid mit Ser/Thr.

¹ Tn-Antigen

² *mucus* (griechisch): Schleim

Im Gegensatz zu den *N*-Glycanen, beginnt die *O*-Glycanbiosynthese im *cis*-Golgi direkt auf dem Protein. Der Aufbau erfolgt sequentiell, eine Prozessierung durch Glycosidasen, wie es bei der Biosynthese der *N*-Glycane beschrieben wird, wurde nicht beobachtet. Die *O*-Glycosylierung findet posttranslational und nach der Faltung der Proteine statt, so daß nur exponierte Serine und Threonine glycosyliert werden können.

Der erste Schritt in der Biosynthese von *O*-Glycanan vom Mucin-Typ ist die Anknüpfung eines GalNAc-Restes an Ser oder Thr durch eine UDP-GalNAc:Polypeptid-*N*-Acetylgalactosaminyltransferase (PPGalNAc-T) im *cis*-Golgi. Es gibt mehr als zehn verschiedene PPGalNAc-T, die ein unterschiedliches gewebespezifisches Expressionsmuster haben und überlappende aber dennoch unterschiedlichen Spezifitäten besitzen (Hagen *et al.* 1997, Homa *et al.* 1993, Clausen und Bennet 1996, Hagen und Nehrke 1998).

Die Klonierung von Glycosyltransferasegenen hat gezeigt, daß viele der Proteine eine spezifische Enzymaktivität vermitteln. So kann eine bestimmte Bindung durch eine oder mehrere Mitglieder einer Glycosyltransferasefamilie geknüpft werden. Die einzelnen Mitglieder einer Familie können geringe Unterschiede in ihrer Spezifität aufweisen (Wandall *et al.* 1998) und ihre Gene können unterschiedlich reguliert sein. Die zelltypspezifische Expression dieser Enzyme kann die feinen Unterschiede in Glycanstrukturen in verschiedenen Zelltypen erklären (Brockhausen 1999).

Im Gegensatz zur *N*-Glycanbiosynthese, bei der eine bestimmte Aminosäuresequenz für den Initialschritt erkannt wird, konnte bisher keine einheitliche Peptidstruktur als Akzeptorsubstrat für die PPGalNAc-T identifiziert werden. Allerdings wurde festgestellt, daß Ser/Thr/Pro-reiche Regionen bevorzugt werden und die schon bestehende Glycosylierung eine Rolle spielt (Brockhausen 1999, Van den Steen 1998, Sears und Wong 1998).

Nach der Anknüpfung des ersten GalNAc-Restes findet die weitere Elongation und Terminierung (z.B. durch Sialylierung) statt und führt zu einer großen Vielfalt an Strukturen. Es wurden bereits acht *Core*-Strukturen identifiziert (**Abb. 4**), die auf der GalNAc-Thr/Ser-Struktur basieren und weiter verlängert werden können. Es wird angenommen, daß die Enzyme wie an einem Fließband im Golgi-Apparat angeordnet sind, wobei sich früh agierende Enzyme im *cis*-Golgi befinden und diejenigen, die terminale Strukturen anknüpfen, im *trans*-Golgi (Brockhausen 1999).

1.2.2.1 Entzündungsprozesse und PSGL-1

Ein prominentes Beispiel für die Bedeutung spezifischer Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen für die Zelladhäsion ist ihre Rolle bei Entzündungsprozessen. Eine Entzündung ist die Reaktion des Körpers auf einen Reiz, wie etwa das Eindringen eines infektiösen Erregers in das Körpergewebe (Lindhorst 2000). Heute ist bekannt, daß eine überschießende Entzündungsreaktion mitverantwortlich für die Entstehung verschiedener Krankheiten, wie z.B. Rheuma/Arthritis, Bronchialasthma und Multiple Sklerose, ist. Daher besteht ein medizinisches Interesse daran, die Mechanismen der Leukozyten-Migration zu erforschen und Medikamente zu entwickeln, mit denen diese beeinflusst werden kann.

Die wichtigsten Abwehrzellen im Körper stellt die Gruppe der weißen Blutkörperchen mit den Lymphozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten dar. Alle diese Zellen zirkulieren im Blut; ihre Hauptaufgabe erfüllen sie jedoch außerhalb des Blutgefäßsystems, was bedeutet, daß sie die Gefäßwände passieren können müssen (Sharon und Lis 1993).

Während einer Entzündung verlassen Leukozyten den Blutstrom und wandern durch die Endothelzellen³ zu dem entzündeten Gewebe. Die Migration wird durch mehrere Prozesse vermittelt: Anhaftung, „Rolling“, feste Adhäsion und schließlich die Migration in das Gewebe (Diapedese) (Abb. 5).

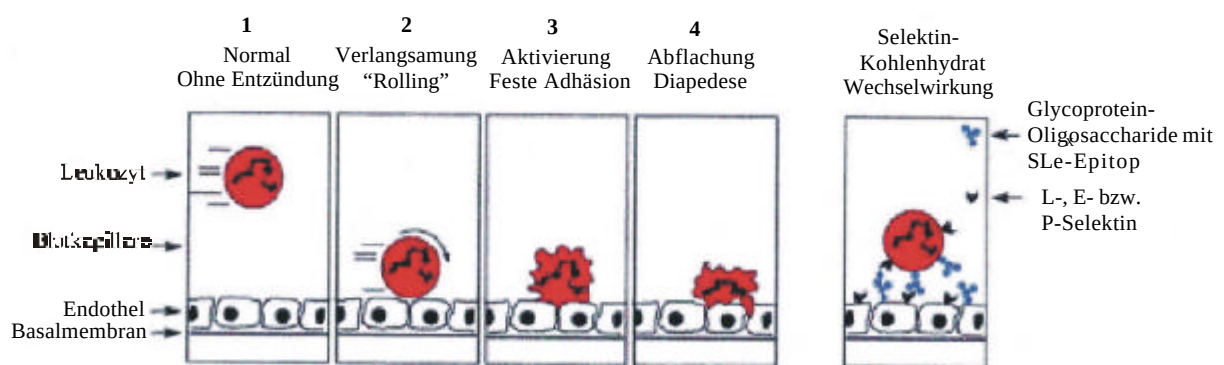


Abb. 5: Anhaftung der Leukozyten an das Endothel (Lindhorst 2000).

³ Endothelzellen kleiden die Innenfläche von Lymph- und Blutgefäßen aus

Die Antwort auf eine Verletzung wird durch eine Reihe von chemischen Botenstoffen, die nach der Verletzung freigesetzt werden, initiiert. Diese Substanzen (z.B. Interleukin-1 und Tumor-Nekrose-Faktor) bewirken eine höhere Viskosität des Blutplasmas, so daß der Leukozytenstrom verlangsamt wird. Cytokine werden ausgeschüttet und animieren die Zellen der Hochendothel-Venolen⁴ zur vermehrten Präsentation von P- und E-Selektinen auf dem Endothel. Die Selektine gehören zu der Familie der Ca^{2+} -abhängigen Lectine, die zu den kohlenhydratbindenden Proteinen gehören.

Wechselwirkungen von P- und E-Selektinen mit Kohlenhydraten auf dem Leukozyten, sowie von L-Selektin⁵ mit Kohlenhydraten auf dem Endothel führen zu einer schwachen Adhäsion des Leukozyten an das Endothel und der Verlangsamung seiner Bewegung, dem „Rolling“, auf der Endotheloberfläche. Dadurch werden Zelladhäsionsproteine (Integrine) auf der Leukozytenoberfläche aktiviert und bewirken eine feste Anhaftung des Leukozyten, der nun stoppt, abflacht und nach Durchtritt durch das Endothel in das infizierte Gewebe einwandern kann (Extravasation) (Lindhorst 2000, Kaltner und Stierstorfer 1998).

Lymphozyten verlassen das Blutgefäßsystem und durchwandern periphere lymphatische Organe wie die Mandeln, die Peyerschen Plaques am Ende des Dünndarms oder die Lymphknoten. Verschiedene Lymphozyten suchen dabei selektiv verschiedene Organe auf. Die L-Selektine legen dabei fest, an welchen Endothelzellen ein Lymphozyt hängenbleibt (Sharon und Lis 1993).

Obwohl alle drei Selektine benötigt werden, um die Adhäsion eines Leukozyten zu bewirken, wird der allererste Kontakt zum Endothel durch das P-Selektin bewirkt. Die beiden endothelialen Selektine erscheinen zu verschiedenen Zeiten und rekrutieren auch verschiedene Arten weißer Blutkörperchen. P-Selektin ist in den Endothelzellen stets vorrätig und ist damit innerhalb von Minuten nach der Infektion auf der Zelloberfläche verfügbar. Es kann also Leukozyten anziehen, die an den ersten Phasen der Abwehrreaktion beteiligt sind.

Ein Ligand auf der Leukozytenoberfläche ist der **P-Selektin Glycoprotein Ligand-1** (PSGL-1) (**Abb. 6**), der auf den Microvilli⁶ gebildet wird (Lawrence und Springer 1991, Koeller 2000, Ramachandran 1999, Sharon und Lis 1993, Moore 1998).

⁴ Spielen in den Lymphknoten eine Rolle beim *Homing* von Lymphozyten

⁵ Das L-Selektin befindet sich auf der Lymphocytenoberfläche und wird auch als *Homing-Rezeptor* bezeichnet.

⁶ Zotten zur Vergrößerung der Oberfläche.

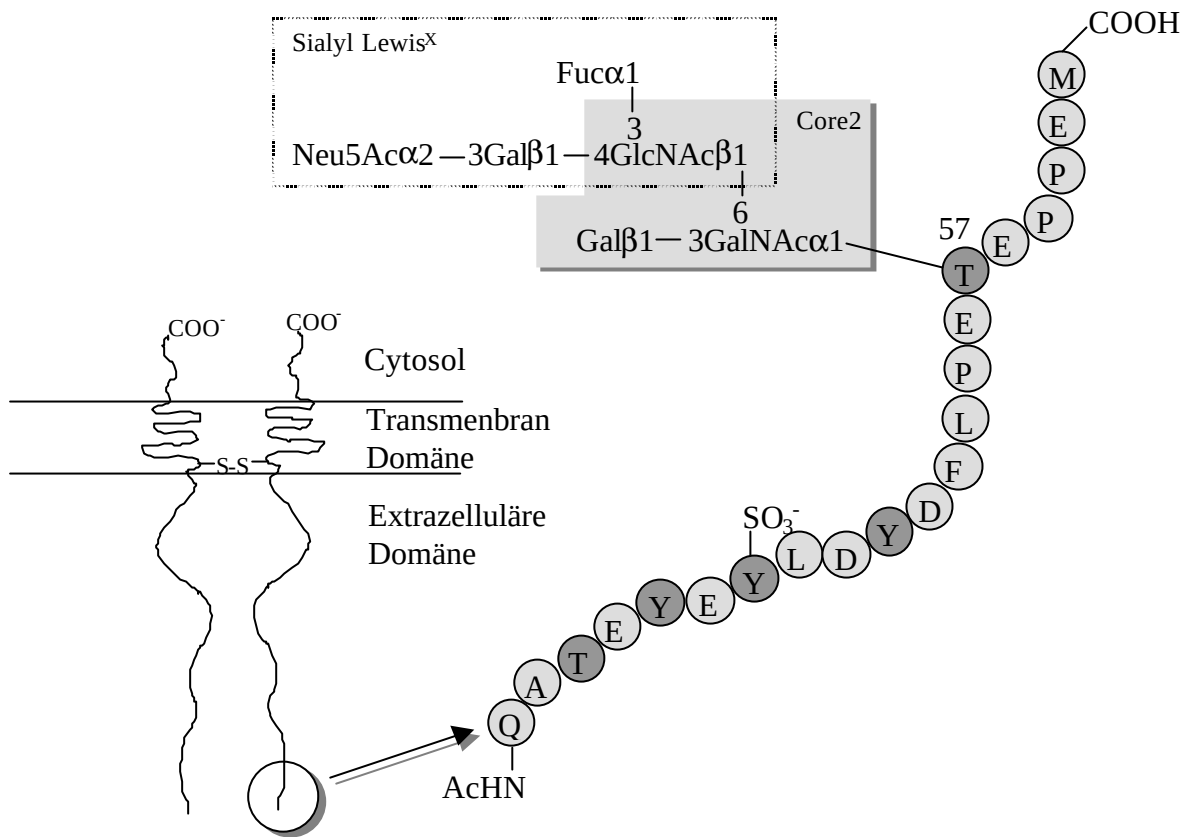


Abb. 6: Biologisch aktiver N-Terminus des PSGL-1.

PSGL-1 ist ein membranständiges Protein, das als Homodimer vorliegt (~250 kDa) und über Disulfidbrücken miteinander verknüpft ist. Der N-Terminus bindet an P-Selektin; die zwischen N-Terminus und Membrandomäne liegenden *tandem repeat units*⁷ dienen wahrscheinlich zur Positionierung des Rezeptors im richtigen Abstand zur Membran. Das Threonin 57 ist durch Core2-ständige Sialyl Lewis^X-Strukturen glycosyliert. Zumindest ein Tyrosin (Y) muß sulfatiert sein (Moore et al. 1992, Wilkins et al. 1996, Ramachandran 1999, Cummings 2000).

⁷ *tandem repeat units* sind kurze sich wiederholende Aminosäuresequenzen

1.2.3 Terminale Strukturen, Poly-LacNAc und LacDiNAc

Protein- und lipidverknüpfte komplexe Oligosaccharidketten basieren häufig auf LacNAc-Einheiten (Typ2: Gal(β 1-4)GlcNAc, oder Typ1: Gal(β 1-3)GlcNAc), welche als eine Art Rückgrat dienen und auf den Core-Strukturen aufbauen. Diese LacNAc-Einheiten können sich mehrmals wiederholen und bilden sogenannte Polylactosaminoglycan-Ketten (Poly-LacNAc). Diese Ketten sind wiederum Träger von terminalen, aktiven Zuckerepitopen (**Abb. 7**), wie z.B. das Lewis^x und Sialyl-Lewis^x, die dem Protein spezifische biologische Eigenschaften (e.g. Blutgruppenaktivität, Zelladhäsion) verleihen. Die Biosynthese der LacNAc-Einheiten wird durch die UDP-Gal:GlcNAc β -R β (1-4)Galactosyltransferase 1 kontrolliert, welche Galactose auf fast alle terminalen β -geknüpften GlcNAc-Einheiten übertragen kann. Alternativ zu LacNAc-Einheiten kann auch LacDiNAc (GalNAc(β 1-4)GlcNAc) das Rückgrat bilden (Van den Eijnden *et al.* 1994; Van den Eijnden *et al.* 1997; Ujita *et al.* 1998; Ujita *et al.* 2000).

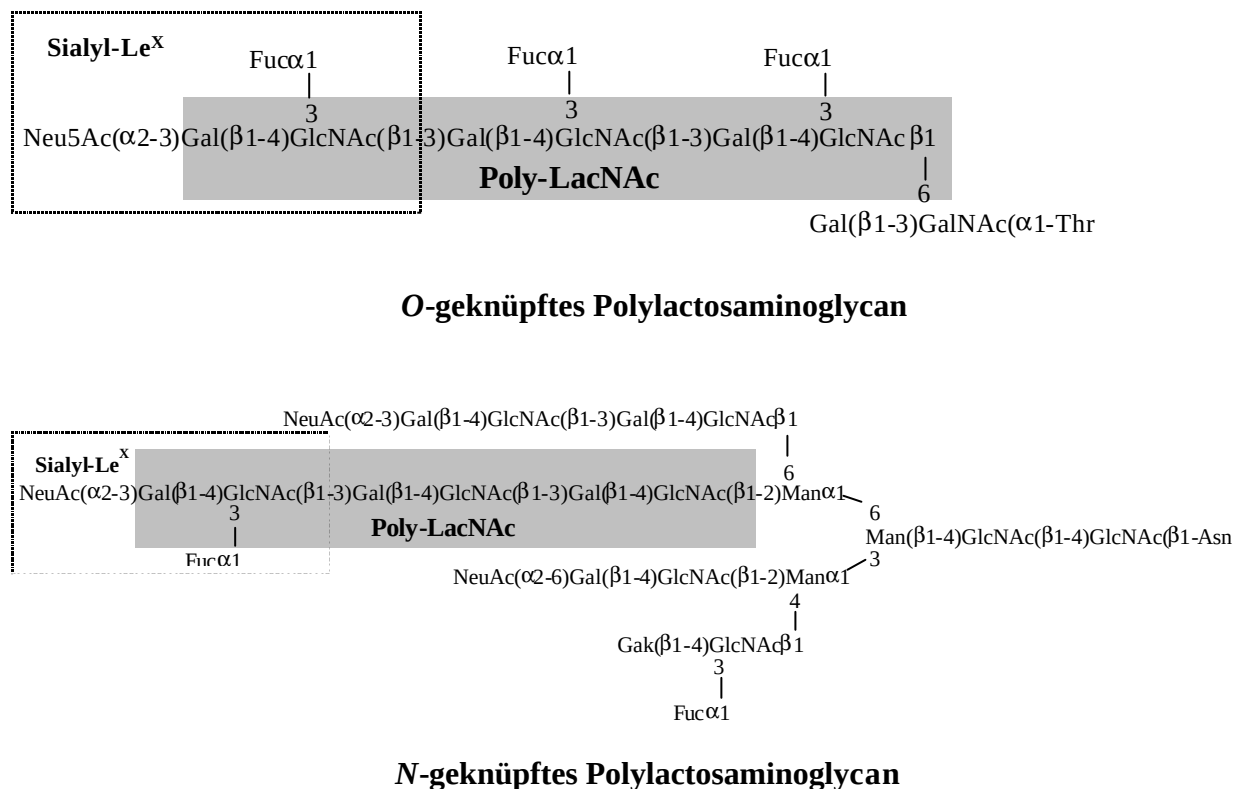


Abb. 7: N- und O-geknüpfte Polylactosaminoglycane mit Sialyl-Lewis^X.

1.3 Synthese von Oligosacchariden *in vitro*

Zur Untersuchung und Manipulation von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen und den damit verbundenen biologischen Prozessen, werden Kohlenhydratstrukturen in größeren Mengen benötigt. Es gibt zwei Möglichkeiten derartige Verbindungen zu erhalten: entweder man isoliert sie, oder man stellt sie synthetisch dar.

Die **Isolierung** komplexer Oligosaccharide aus natürlichem Material ist nur eingeschränkt sinnvoll, da das Glycosylierungsmuster von Zellen Strukturschwankungen unterliegt, auch wenn es sich um Zellen des gleichen Typs handelt (Lindhorst 2000).

1.3.1 Chemische Synthese

Es gibt vielfältige gut entwickelte Methoden Oligosaccharide chemisch herzustellen. Allerdings besitzen Kohlenhydrate eine große Anzahl an Hydroxylgruppen mit ähnlicher Reaktivität und die chemischen Methoden zum Schutz oder zur Aktivierung dieser Gruppen sind kompliziert (Nilsson 1988), zudem muß für den Aufbau jeder Oligosaccharidstruktur ein individueller Syntheseweg ausgearbeitet werden. Die chemische Synthese komplexer Oligosaccharide läßt weitere Abwandlungen der natürlichen Vorbildstrukturen zu, so daß sich der hohe Syntheseaufwand oft auszahlt, da Modifikationen auf enzymatischem Weg häufig nicht zugänglich sind.

Die Synthese von Oligosacchariden mit mehr als zwei Zuckereinheiten kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Entweder wird sie schrittweise durchgeführt, wobei die jeweiligen Zwischenprodukte jedoch weitere chemische Manipulationen (z.B. Schutzgruppen) zulassen müssen, oder sie wird in Form einer Blocksynthese durchgeführt (**Abb. 8**) (Schmidt 1986). Beide Synthesewege wurden erfolgreich durchgeführt (Kanie und Hindsgaul 1992, Paulsen *et al.* 1990).

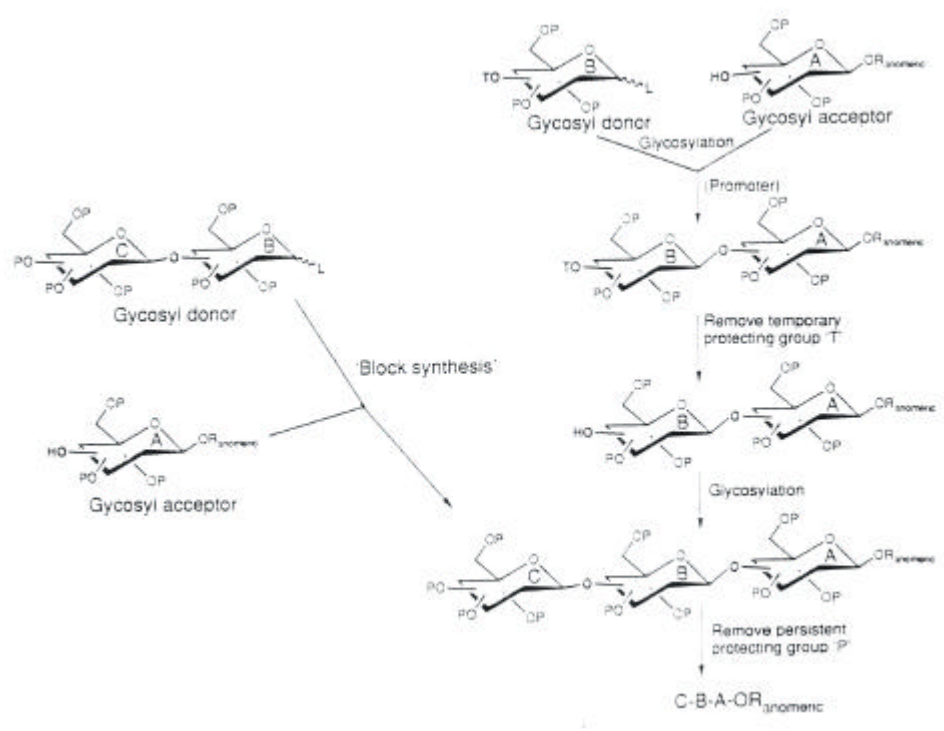


Abb. 8: Blocksynthese in der chemischen Oligosaccharidsynthese (Schmidt 1986).

1.3.2 Enzymatische Synthese

Im Vergleich zur chemischen Oligosaccharidsynthese liefert die enzymatische Synthese eine Reihe von Vorteilen. Eine große Anzahl von regio- und stereospezifischen Reaktionen kann ohne aufwendige Schutzgruppenchemie durchgeführt werden. Die Reaktionsbedingungen sind meistens sehr mild und die Reaktionen können oft bei Raumtemperatur und im Gegensatz zur chemischen Synthese in wässriger Lösung bei fast neutralem pH-Wert stattfinden.

Nachteile bei dieser Methode bestehen in der oft nicht ausreichenden Verfügbarkeit und Stabilität der Enzyme, sowie in teuren Substraten und Cofaktoren.

Zwei Arten von Enzymen werden in der Synthese von komplexen Oligosacchariden verwendet, Glycosidasen (EC 3.2) und Glycosyltransferasen (EC 2.4) (Nilsson 1988).

1.3.2.1 Glycosidasen in der Synthese von glycosidischen Bindungen

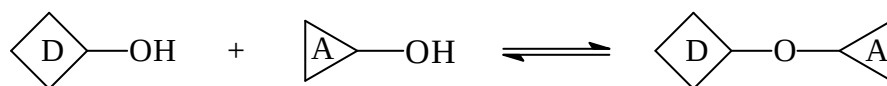
Glycosidasen gehören zu der Klasse der Hydrolasen, welche unter physiologischen Bedingungen die Hydrolyse von glycosidischen Bindungen katalysieren. Unter bestimmten Bedingungen können sie allerdings auch als effektive Katalysatoren für die Bildung von glycosidischen Bindungen fungieren.

Glycosidasen haben einige Eigenschaften, die sie sehr attraktiv für einen Einsatz in der präparativen Oligosaccharidsynthese machen. Da sie leicht aus natürlichen Quellen aufgereinigt werden können, sind sie gut verfügbar. Weiterhin sind sie leicht zu handhaben und benötigen keine teuren Cofaktoren und Substrate.

Trotz aller Vorteile haben Glycosidasen die Nachteile, daß sie häufig nur niedrige Produktausbeuten liefern und eine geringe Regioselektivität aufweisen (Fernández-Mayoralas 1997).

1.3.2.1.1 Reverse Hydrolyse

Die Synthese von Di- oder Trisacchariden durch die Umkehrreaktion der Hydrolyse (**Abb. 9**), also der Kondensation von Mono- oder Disacchariden, ist aufgrund der ungünstigen Lage des Gleichgewichtes schwierig und es werden nur niedrige Produktausbeuten erhalten. Um das Gleichgewicht der Reaktion auf die Seite der Kondensation zu verlagern, werden üblicherweise sehr hohe Substratkonzentrationen und Systeme mit verminderter Wasserkonzentration (z.B. durch Zugabe von organischen Lösungsmitteln) eingesetzt (Nilsson 1988).



D = Donorsubstrat (Monosaccharid)

A = Akzeptorsubstrat mit Hydroxylgruppe

Abb. 9: Reverse Hydrolyse (Nilsson 1988).

Obwohl bei einer Reaktion mit einer α -Mannosidase in 85%iger Mannoselösung eine Gesamtausbeute an Disacchariden von 37% erzielt wurde (Johansson 1989), bleiben die Ausbeuten bei der thermodynamisch kontrollierten Reaktion im Normalfall weit unter 20% (Wong 1995) (**Abb. 10**).

1.3.2.1.2 Transglycosylierung

Die Oligosaccharidsynthese *via* Transglycosylierung ist kinetisch kontrolliert. Es wird ein anomer verknüpfter Zucker als Glycosyldonor verwendet. Dabei wurden gute Erfolge mit Aryl- oder Alkyl-Aglyconen als Donorsubstrate mit guten Abgangsgruppen erzielt, aber auch preiswertere Disaccharide (z.B. Lactose) können als Donorsubstrate eingesetzt werden (Wallenfels 1972, Flowers 1979, Nilsson 1988).

Wie in **Abb. 10** schematisch dargestellt, wird das reaktive Intermediat des Donor-Enzym-Komplexes (E:D) entweder mit Wasser oder einem anderen Akzeptorsubstrat (A) abgefangen. Durch hohe Substratkonzentrationen wird das Wasser aus dem aktiven Zentrum des Enzyms verdrängt und somit eine hohe Transglycosylierungsrate gewährleistet. Durch Hydrolyse des enzymgebundenen Donorsubstrates und des Endproduktes müssen jedoch Ausbeuteverluste in Kauf genommen werden (Nilsson 1996).

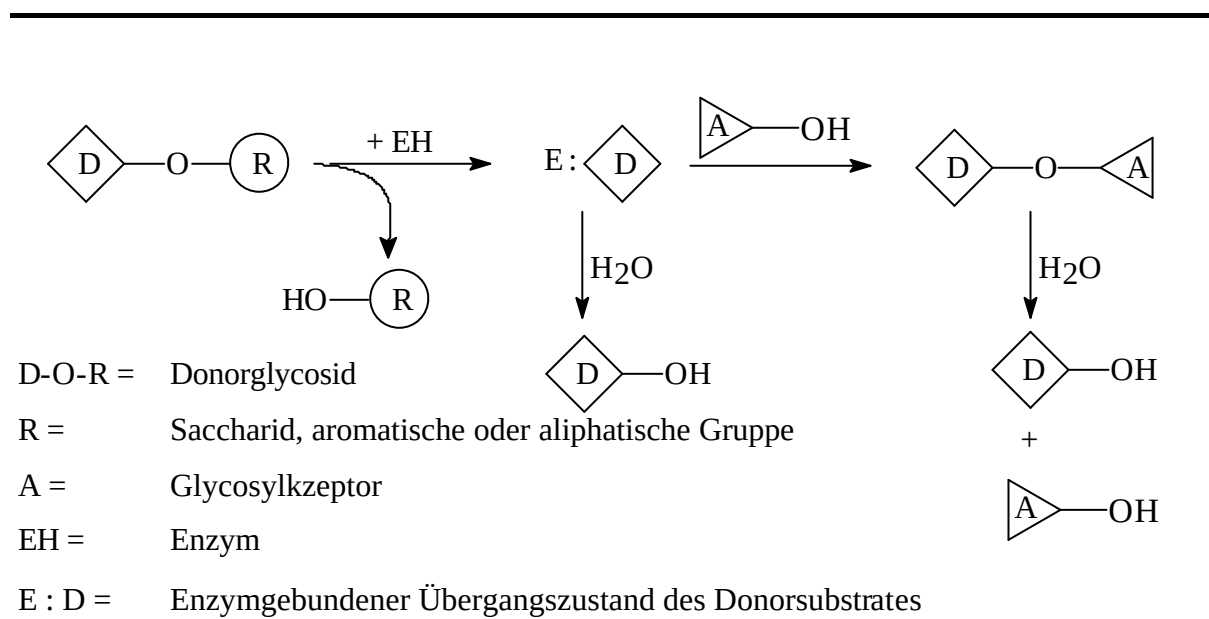


Abb. 10: Kinetisch kontrollierte Transglycosylierung (Nilsson 1996).

Die Spaltung oder Bildung von glycosidischen Bindungen mit Glycosidasen erfolgt unter Freisetzung eines Zuckers, der entweder die gleiche Konfiguration wie das Substrat aufweist (Retention) oder die entgegengesetzte Konfiguration (Inversion). Den Mechanismus für die enzymatische Glycosidhydrolyse mit konfigurationserhaltenen Glycosidasen beschreibt **Abb. 11**.

Eine katalytisch wirksame Carbonsäurefunktion (**HA**) im Enzym protoniert im ersten Schritt den glycosidischen Sauerstoff. Dieser zyklische, oxocarboniumartige Übergangszustand wird durch eine Carboxylatgruppe (**B⁻**) von der anderen Seite des Pyranoseringes stabilisiert. Ein mehr oder weniger konzentrierter nucleophiler Angriff führt zunächst zur Bildung eines Glycosylesters unter Inversion der anomeren Konfiguration am C-Atom. Es ist nicht klar, in welchem Ausmaß Bindungsbruch und Bindungsbildung am anomeren Zentrum konzentriert ablaufen, obschon die Extremfälle eines reinen S_N1- oder S_N2-Mechanismus kaum in Frage kommen (Heightman und Vasella 1999). Das Aglycon diffundiert nun vom aktiven Zentrum weg und wird von einem Wassermolekül (Hydrolyse) ersetzt, das unter Deprotonierung durch die korrespondierende Base der katalytischen Säure nucleophil am anomeren Zentrum angreift und die eben gebildete Esterbindung spaltet. Diese Substitutionen laufen beide unter Konfigurationsumkehr ab und führen insgesamt zur Erhaltung der Konfiguration (Sinnot 1990, Mackenzie 1998, Heightman 1999, Zechel 2000).

Bei invertierenden Glycosidasen sind die katalytisch wirksamen Carbonsäuren im aktiven Zentrum vergleichsweise weit auseinander positioniert. Somit ist es möglich, daß das Substrat- und ein Wassermolekül gleichzeitig aufgenommen werden können. Die Reaktion erfolgt somit nur über eine invertierende Substitution, so daß sich die Konfiguration des Produktes umkehrt.

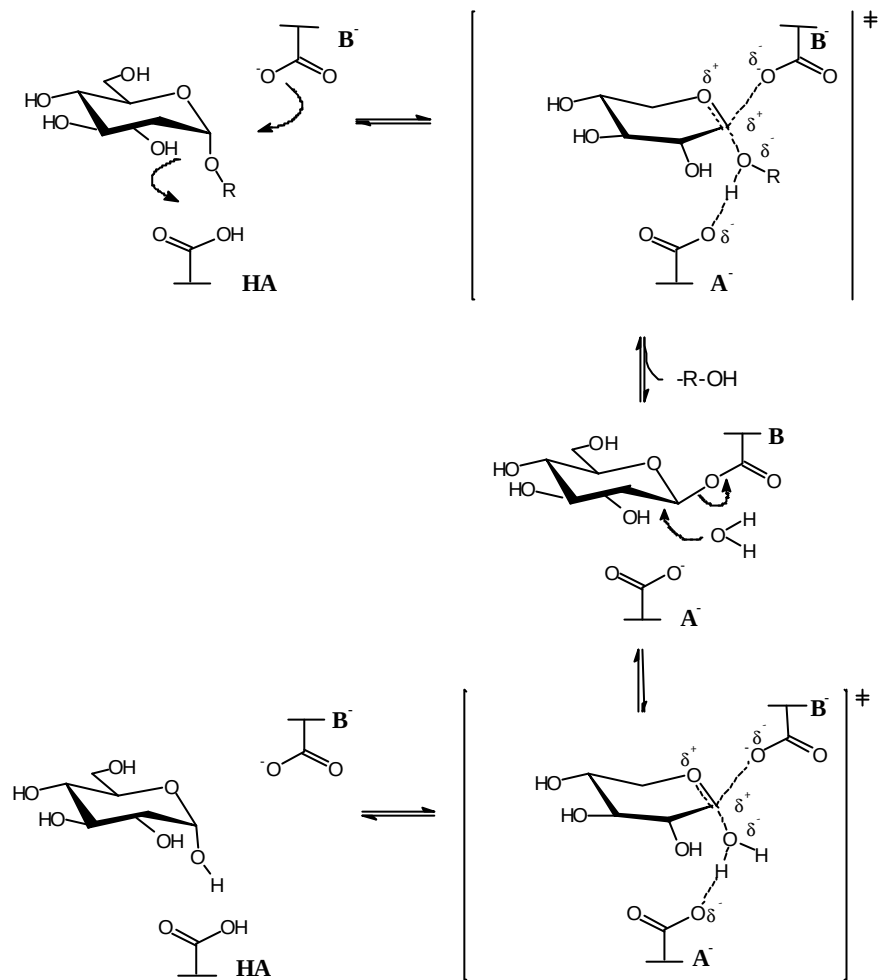


Abb. 11: Mechanismus der enzymatischen Glycosidhydrolyse (Stütz 1996).

Der einzige Anspruch, den man an den Glycosyldonor stellen muß, ist, daß er schneller hydrolysiert werden muß als die gebildeten Produkte, also ein höheres k_{kat}/K_M -Verhältnis aufweist (Nilsson 1996, Fernández-Mayoralas 1997). Die Sekundärhydrolyse der Produkte wird auf diese Art und Weise minimiert, allerdings muß die Reaktion um hohe Ausbeuten (20-40%; Wong *et al.* 1995) zu erreichen rechtzeitig abgebrochen werden (**Abb. 12**).

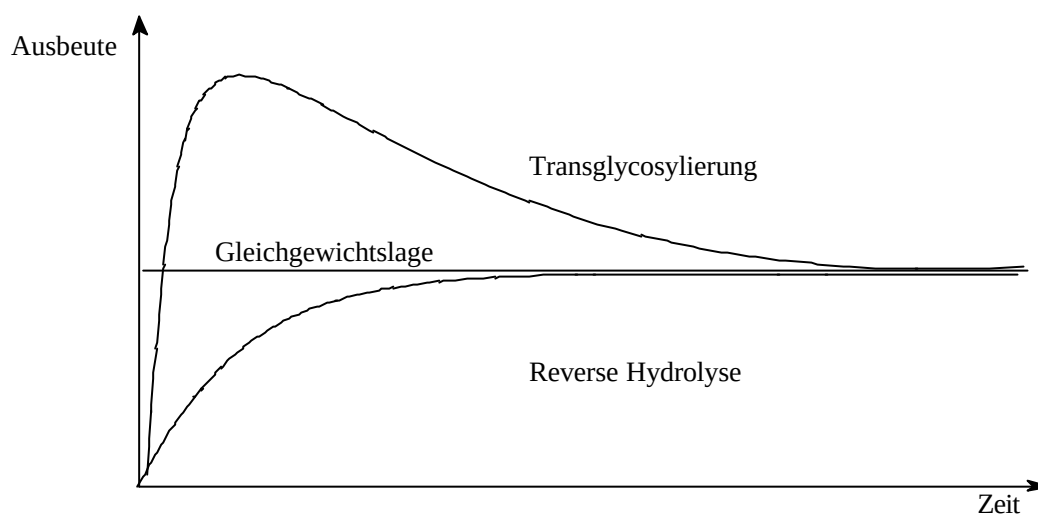


Abb. 12: Produktkonzentrationen bei reverser Hydrolyse und Transglycosylierung (Nilsson 1988).

1.3.2.1.3 Einfluß der Enzymquelle

Obwohl Glycosidasen keine hohe Spezifität gegenüber dem Akzeptorsubstrat aufweisen, zeigen sie doch eine gewisse Regioselektivität, die von der Enzymquelle abhängen kann. Die Wahl der Enzymquelle kann somit die Menge und Reinheit eines bestimmten Regioisomers in einer Reaktionsmischung beeinflussen (Boon *et al.* 2000).

β -Galactosidasen (β -D-Galactosid-Galactohydrolasen; EC 3.2.1.23) sind aus vielen Quellen verfügbar. Neben mikrobiellen Quellen (*E. coli*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus circulans*, u.a.) werden β -Galactosidasen auch aus tierischen Geweben (z.B. aus Stierhoden und Leber) isoliert. **Tabelle 1** zeigt, daß die Enzyme aus verschiedenen Quellen eine unterschiedliche Regiospezifität aufweisen und eine unterschiedliche Aktivität bei der Hydrolyse von Regioisomeren zeigen.

Tabelle 1: Relative Hydrolyserate von β -verknüpften Gal-GlcNAc-Isomeren mit β -Galactosidasen aus verschiedenen Quellen (Nilsson 1996).

Substrat	Enzymquelle		
	<i>E. coli</i>	<i>D. pneumoniae</i>	Stierhoden
Gal(β 1-3)GlcNAc-	0,2	0	100
Gal(β 1-4)GlcNAc-	45	100	80
Gal(β 1-6)GlcNAc-	100	4	4

Anhand der Hydrolyserate von isomeren Oligosacchariden kann man Vorhersagen über die Regioselektivität der Transglycosylierung treffen. Im Fall der β -Galactosidase aus *E. coli* wurde die Hydrolyserate von Gal-Glc-Isomeren in der Reihenfolge (β 1-6) > (β 1-4) > (β 1-3) beobachtet, die Syntheserate hingegen steigt in der gleichen Reihenfolge. Für die β -Galactosidase aus Stierhoden wurde genau die umgekehrte Folge von Hydrolyse und Transglycosylierung gefunden (Nilsson 1996).

1.3.2.1.4 Einfluß der Reaktionsbedingungen

Nicht nur die Enzymquelle, sondern auch die Reaktionsbedingungen regulieren die Art und Menge der synthetisierten Oligosaccharide. Normalerweise werden bei enzymkatalysierten Oligosaccharidsynthesen die Substrate und Enzyme in wäßrigen Pufferlösungen gelöst, die Reaktionen finden dann üblicherweise bei Temperaturen zwischen 25 und 37°C statt.

Durch Modifikation der Reaktionsbedingungen wurde bereits in mehreren Tests versucht die Hydrolyseaktivität des Wassers in den jeweiligen Reaktionsansätzen herabzusetzen.

Bei Glycosid- und Peptidsynthesen durch kinetisch kontrollierte Reaktionen werden die Ausbeuten erheblich durch die Hydrolyse des Enzym-Substrat Intermediates und des Produktes limitiert. Eine Möglichkeit diese Hydrolyse herabzusetzen besteht darin, die Wasserkonzentration im Reaktionsansatz durch Einfrieren und Inkubation bei Temperaturen unterhalb des Gefrierpunktes zu reduzieren (Jakubke 1996).

Der Einfluß des Einfrierens auf enzymkatalysierte Reaktionen wurde von Fennema 1975 zusammengefaßt: Unterhalb des Gefrierpunktes einer Reaktionsmischung kann die Reaktionsrate den Arrhenius-Kurven höherer Temperaturen folgen oder in beide Richtungen (positiv oder negativ) abweichen (Arrhenius-Effekt, **Abb. 13**).

$$k = A \cdot e^{-E_a/RT}$$

k = Geschwindigkeitskonstante

A = Arrheniuskonstante

E_a = Aktivierungsenergie

R = ideale Gaskonstante

T = absolute Temperatur

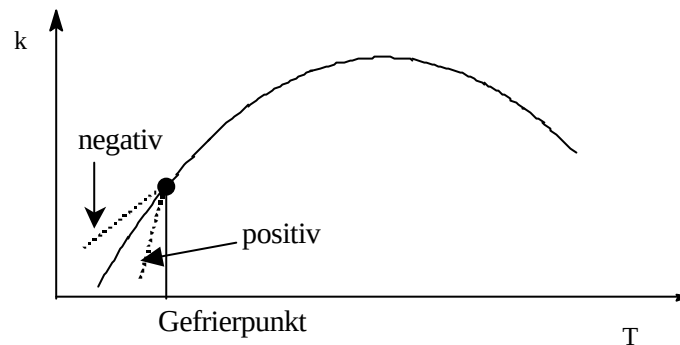


Abb. 13: Arrhenius-Gleichung und Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten einer Enzymreaktion (Wedler 1987).

Die Bildung oder Stabilisierung von intramolekularen Wasserstoffbrücken im Enzym, die Assoziierung des Enzyms zu polymeren Einheiten oder verstärkte Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Substrat und Enzym (Dozou 1971) können negative Abweichungen verursachen. Andererseits kann das Einfrieren eine Beschleunigung der Reaktion bewirken (**Abb. 13**).

Pincock und Kivosky (1966) schrieben diese Beschleunigung den Reaktandenkonzentrationen im Reaktionsansatz zu. In wäßrigen Lösungen wachsen Eiskristalle von relativ großer Reinheit, wodurch sich die Reaktanden in einer reduzierten flüssigen Phase konzentrieren.

Diese flüssige Phase kann 0,1% des ursprünglichen Volumens betragen (Franks 1985) und steht im Gleichgewicht mit dem festen Lösungsmittel (Eis). Alle nichtwässrigen Komponenten der Lösung beeinflussen, auch wenn sie nicht an der Reaktion beteiligt sind, das Volumen der flüssigen Phase. Durch dieses „Aufkonzentrieren“ der Reaktanden in gefrorenen Systemen kann der Arrhenius-Effekt, besonders in Lösungen mit anfänglich geringen Reaktandenkonzentrationen, überkompensiert werden.

Faktoren, die die Enzymaktivität hauptsächlich beeinflussen (pH-Wert, Ionenstärke, Viskosität), können durch die erhöhte Stoffkonzentration während des Einfrierens beeinflusst werden. Die Kristallisation von Salzen ruft beachtliche Veränderungen des pH-Wertes hervor, der allerdings in gefrorenen Lösungen nicht bestimmt werden kann. Auch die Art des Einfrierens und die Natur des Enzyms können die Enzymaktivität in gefrorenen Reaktionsansätzen beeinflussen.

Die außerordentlich hohe Protonenmobilität in Eis, das dielektrische Verhalten von Eis (die Dielektrizitätskonstante ist niedriger als bei Wasser; Alburn und Grant 1965), die Beteiligung der Eisoberfläche an der Reaktion als Verweilort für den Katalysator (Bruice und Butler 1964) und die Abtrennung von Ionen in gefrorenen wässrigen Systemen sind als weitere Faktoren, die Reaktionen in Eis beeinflussen, diskutiert worden.

Tabelle 2 zeigt einige von Schuster *et al.* (1990) untersuchte Reaktionen zur Bildung von Peptidbindungen mit α -Chymotrypsin.

Tabelle 2: α -Chymotrypsin katalysierte Synthesen von Peptiden bei 25°C und bei -25°C.

Acyldonor	Peptid	Peptidausbeute [%] 25°C	Peptidausbeute [%] -25°C
Mal-Tyr-OMe	Mal-Tyr-Arg-OH	< 2	33
	Mal-Tyr-Ala-Ala-OH	10	73
	Mal-Tyr-Gly-Ala-OH	6	95

Um den Effekt des Einfrierens auf β -Galactosidase katalysierte Reaktionen zu bestimmen, untersuchten Hänsler und Jakubke (1996) die Synthese von Gal(β 1-6)GlcNAc mit der β -Galactosidase aus *E. coli* bei 25°C und bei -5°C. Die Ausbeuten des Disaccharides waren bei -5°C mit 53% höher als bei 25°C (35%), der ausbeutesteigernde Effekt war aber weniger gravierend als bei Protease-katalysierten Peptidsynthesen.

Auch bei eigenen Untersuchungen konnte bei der Synthese von UDP-Lactose und UDP-LacNAc mit der β -Galactosidase aus *B. circulans* gezeigt werden, daß höhere Ausbeuten bei Tieftemperatursynthesen erzielt werden können. Bei einer Reaktionsführung bei -5°C wurden mit 31% Ausbeute an UDP-LacNAc und 29% an UDP-Lac (bezogen auf den Akzeptor), deutlich höhere Ausbeuten erzielt, als bei 30°C (UDP-LacNAc: 22%; UDP-Lac: 23 %; Zervosen *et al.* 2000).

Eine weitere interessante Variante der Glycosidase-katalysierten Disaccharidsynthese wurde kürzlich veröffentlicht. Das Dotieren⁸ von Monosacchariden mit Alkylglycosiden führt zu Gläsern mit verringerten Glasübergangstemperaturen und enorm hohen Hydrophobien. Die Gläser können durch Alkohole verflüssigt (plastifiziert) werden und sind in der Lage eine Vielfalt hydrophober Verbindungen unter der Bildung homogener und heterogener Flüssigphasen zu lösen. Plastifizierte Gläser beinhalten also sowohl Akzeptor-, als auch Donor-Substrate für Glycosidasen in hohen Konzentrationen. Glycosidasen sind in diesen Medien aktiv und katalysieren in guten Ausbeuten die Glycosylierung einer großen Auswahl an Akzeptoren. Mit β -Galactosidasen aus verschiedenen Quellen (z. B. *E. coli* und *A. oryzae*) konnten in Transglycosylierungsreaktionen Ausbeuten von bis zu 70% erzielt werden (Gill und Valivety 2000a; Gill und Valivety 2000b).

1.3.2.1.5 **Einfluß des Akzeptorsubstrates**

Untersuchungen, bei denen das Akzeptorsubstrat einen großen Einfluß auf die Regioselektivität von Glycosidasen ausübt, wurden bereits von Nilsson. (1987) und Murata *et al.* (1997) durchgeführt. Nicht nur die Struktur des Aglycons, sondern auch die Konfiguration der glycosidischen Bindung übt einen großen Einfluß auf die Regioselektivität der Disaccharidbildung aus.

⁸ Begriff aus der Halbleitertechnik, urspr.: gezielte Verunreinigung von Halbleitern, um elektrische Eigenschaften zu verändern.

Nilsson (1987) beschreibt in diesem Zusammenhang, daß bei einer β -Galactosidase katalysierten Reaktion mit Gal(α 1-OMe als Akzeptorsubstrat hauptsächlich die β (1-6)-Isomere entstehen, während Gal(β 1-OMe bevorzugt in β (1-3)-Position dirigiert (**Tabelle 3**).

Tabelle 3: Einfluß des Akzeptorsubstrates auf die Regiospezifität von Glycosidasen (Nilsson 1987).

Donor	Akzeptor	Produktisomere	Ausbeute [%]
α-D-Galactosidase aus grünen Kaffeebohnen			
Gal(α 1-O- <i>p</i> NP	Gal(α 1-OMe	(α 1-3) (α 1-6)	27 <2
Gal(α 1-O- <i>p</i> NP	Gal(β 1-OMe	(α 1-3) (α 1-6)	9 18
Gal(α 1-O- <i>p</i> NP	Gal(α 1-O- <i>p</i> NP	(α 1-2) (α 1-3)	2 16
Gal(α 1-O- <i>o</i> NP	Gal(α 1-O- <i>o</i> NP	(α 1-2) (α 1-3)	6 <1
β-D-Galactosidase aus <i>E. coli</i>			
Gal(β 1-O- <i>o</i> NP	Gal(α 1-OMe	(β 1-6) + Andere	14 <1
Gal(β 1-O- <i>o</i> NP	Gal(β 1-OMe	(β 1-6) (β 1-3)	3 22
α-D-Mannosidase aus <i>Jack Beans</i>			
Man(α 1-O- <i>p</i> NP	Man(α 1-OMe	(α 1-2) (α 1-6)	18 4
Man(α 1-O- <i>p</i> NP	Man(α 1-O- <i>p</i> NP	(α 1-2) (α 1-6) + Andere	8 <0,1 0,4

1.3.2.2 Glycosyltransferasen

Im Vergleich zu Glycosidase-katalysierten Reaktionen zeichnen sich die Glycosyltransferase-katalysierten Reaktionen durch hohe Ausbeuten und exzellente Regioselektivitäten aus. Diesem großen Vorteil der Glycosyltransferasen steht allerdings eine beträchtliche Einschränkung des Substratspektrums gegenüber.

Generell werden die Glycosyltransferasen in Nicht-Leloir- und Leloir-Glycosyltransferasen unterteilt (Wong und Whitesides 1995). Die Enzyme des Leloir-Weges übertragen den Glycosylrest eines Zuckernucleotids auf einen Glycosylakzeptor unter Freisetzung des Nucleotids (NMP oder NDP) (Toone *et al.* 1998) (**Abb. 14**).

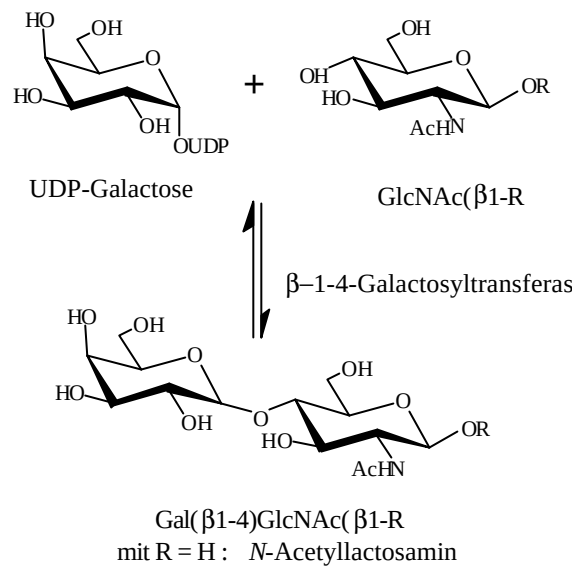


Abb. 14: Synthese von *N*-Acetyllactosamin mit einer β 1-4-Galactosyltransferase (Toone *et al.* 1989, Palcic und Hindsgaul 1996).

Nicht-Leloir-Glycosyltransferasen benötigen als Donorsubstrat ein Zuckerphosphat. Verdeutlicht wird dies in **Abb. 15** anhand der Saccharose-Phosphorylase-Reaktion. Das Enzym katalysiert die Spaltung von Saccharose mit Phosphat zu Glucose-1-Phosphat und D-Fructose. Die Reaktion ist reversibel, die Saccharose-Phosphorylase kann somit auch in Syntheserichtung eingesetzt werden.

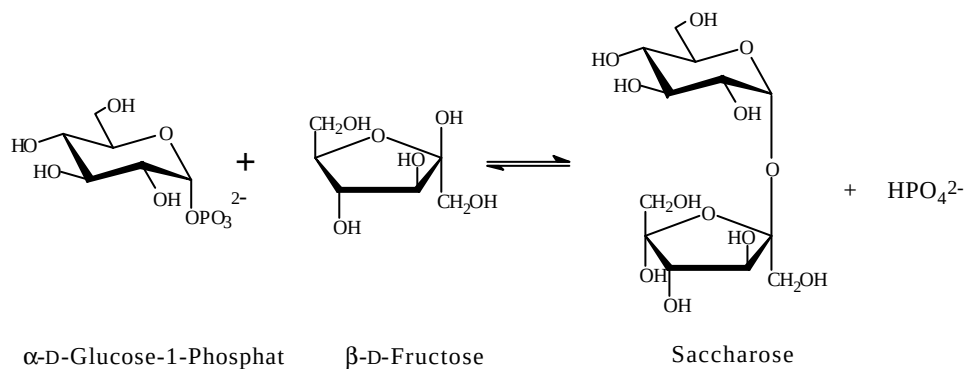


Abb. 15: Die Saccharidsynthese am Beispiel der Saccharose-Phosphorylase (Wong *et al.* 1995).

1.4 Nucleotidaktivierte Oligosaccharide

1.4.1 Vorkommen in Milch

Säuglinge, die mit Muttermilch gefüttert werden scheinen während des ersten Lebensjahres seltener und weniger schwerwiegend an Erkrankungen der Atemwege und des Verdauungstraktes zu leiden, als Kinder die mit Fertignahrung ernährt werden. Verglichen mit der Milch von anderen Säugetieren, ist die Zusammensetzung der Humanmilch einzigartig bezüglich ihres Gehaltes an komplexen Oligosacchariden. Lange dachte man diese Komponenten hätten alleine einen Einfluß auf die Bildung einer spezifischen Darmflora der Säuglinge. Heute geht man davon aus, daß die freien Oligosaccharide und auch Glycoproteine starke Inhibitoren der Bakterienanhaftung an die Epitheloberflächen sind (Kunz und Rudloff 1993).

Die Zusammensetzung der Milch bleibt über den Zeitraum der gesamten Lactation nicht konstant. Die Menge der höheren Oligosaccharide, die im Kolostrum am höchsten ist, sinkt im Laufe der Lactation ab, während die Menge an Lactose ansteigt (Montreuil 1959; Coppa 1999).

Als Grundbausteine der Oligosaccharide in der Milch wurden D-Glucose (Glc), D-Galactose (Gal), N-Acetylglucosamin (GlcNAc), L-Fucose, und N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) gefunden. Aus der großen Vielfalt der Verknüpfungsmöglichkeiten dieser einzelnen Monosaccharidbausteine sind offenbar ganz bestimmte bevorzugt (**Tabelle 4**). Ein Vergleich läßt folgende Aufbauprinzipien erkennen:

- Glucose steht immer nur terminal am reduzierenden Ende der freien Oligosaccharide.
- Die meisten Oligosaccharide sind durch lineare Verknüpfung der Grundbausteine aufgebaut. Verzweigungen treten durch Anheftung von Fucose und N-Acetylneuraminsäure auf.
- Die überwiegende Anzahl der Milch-Oligosaccharide leitet sich von der Lactose ab.

Tabelle 4: Vergleich des Oligosaccharidgehaltes von Human- und Kuhmilch (Kunz und Rudloff 1993).

Zucker	Humanmilch [g/L]	Kuhmilch [g/L]
Gal(β1-4)Glc	55 - 70	40 - 50
Oligosaccharide		
Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc	0,5 - 1,5	Spuren
Fuc(α1-2)Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc	1,0 - 1,5	-----
Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc Fucα1 ⁴	0,5 - 1,0	-----
Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)Glc	0,3 - 0,5	0,03 - 0,06
Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)Glc	0,1 - 0,3	Spuren
Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc	0,03 - 0,2	Spuren
Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc	0,1 - 0,6	Spuren
Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc Neu5Ac α2 ⁶	0,2 - 0,6	Spuren
Gesamtoligosaccharide	3,0 - 6,0	Spuren

Wie bereits erwähnt tragen fast alle bisher isolierten Milcholigosaccharide Lactose (in **Tabelle 5** grün hinterlegt) an ihrem reduzierenden Ende. Eine weitere Verlängerung dieser Struktur kann durch die Anknüpfung eines GlcNAc-Restes in (β1-3)- oder (β1-6)-Stellung erreicht werden. Daraufhin folgt eine weitere Verlängerung durch Galactose in (β1-3)- oder (β1-4)-Stellung auf GlcNAc. Auf diese Art und Weise kann eine große Anzahl von verschiedenen durch Typ I⁹ oder Typ II LacNAc (in **Tabelle 5** rot hinterlegt) verlängerte Core-Strukturen erreicht werden, welche durch Anheftung von Fucose oder Neuraminsäure an verschiedenen Positionen weiter modifiziert werden können. Die in der Milch vorkommenden Oligosaccharide können in individuellen Proben entsprechend der Blutgruppe des Spenders unterschiedlich sein. Am deutlichsten wurden die Zusammenhänge für die L-Fucose-haltigen Zucker aufgeklärt. 80% der Bevölkerung (Sekretoren) bilden lösliche A, B bzw. O blutgruppenaktive Substanzen entsprechend ihrer speziellen Blutgruppenzugehörigkeit.

⁹ Typ I LacNAc = Gal(β1-3)GlcNAc
Typ II LacNAc = Gal(β1-4)GlcNAc

Die Sekretionsfähigkeit von Fuc(α 1-2)Gal(β 1-4)Glc (Fucosyllactose) ist somit von einer α 1,2FucT abhängig. Etwa 20% der Bevölkerung (Non-Sekretoren) bilden stattdessen nur Le^a-Kohlenhydrate aus.

Bereits in den 60er Jahren berichteten mehrere Arbeitsgruppen über die Isolierung und Charakterisierung von Nucleotidoligosacchariden aus Milch von verschiedenen Säugetieren (**Tabelle 5**). Die biologische Rolle und die Biosynthese dieser Verbindungen ist bis heute noch nicht geklärt. Hervorzuheben ist jedoch, daß die Nucleotidoligosaccharide in relativ hohen Konzentrationen in der Milch vorkommen (**Tabelle 5**), so daß ihre Bildung nicht „zufällig“ sein kann.

Einen weiteren interessanten Aspekt liefern die Strukturen der Nucleotidoligosaccharide. Im Vergleich zu den nicht-aktivierten Oligosacchariden in Humanmilch, welche hauptsächlich auf Lactose aufbauen, basieren die aktivierten Oligosaccharide überwiegend auf Derivaten von UDP-GlcNAc. Durch Elongation mit Galactose wird auch hier LacNAc als markante Struktur gebildet, welches wiederum häufig durch Fucose oder Neuraminsäure weiter modifiziert wird. Damit ergeben sich Analogien zu den nicht-aktivierten Milcholigosacchariden. Auch hier wurden mit Sialinsäure oder Fucose terminierte Strukturen wie z.B. die antigenen Determinanten der Blutgruppe 0 wiederfinden.

Tabelle 5: Übersicht der aus Milch isolierten Nucleotidoligosaccharide.

Struktur	Ursprung	Konzentration	Literatur
Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP Fuc(α 1-2/4)Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP	Humanmilch Kolostrum	0,5 mg/L 1,5 mg/L	Kobata 1962 Kobata 1963 Kobata 1966
Neu5Ac-Gal(β 1-6)GlcNAc(α 1-UDP Neu5Ac-Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP NGNA-Gal(β 1-6)GlcNAc(α 1-UDP NGNA-Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP	Ziegen- Kolostrum	15 μ mol/L 4 μ mol/L	Jourdian 1961 Jourdan 1973
Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP	Schweine- Milch und -Kolostrum	58,6mg/L 44,7mg/L	Kobata 1965
Neu5Ac(2-6)Gal(1-4)GlcNAc(α 1-UDP NGNA ¹⁰ (2-6)Gal(1-4)GlcNAc(α 1-UDP Neu5Ac(2-6)Gal(1-3)GalNAc(α 1-UDP NGNA(2-6)Gal(1-3)GalNAc(α 1-UDP	Schafs-Milch und -Kolostrum		Denamur 1971

¹⁰ NGNA = N-Glycolyl-Neuraminsäure

1.4.2 Vorkommen in Bakterien

Normalerweise besteht die Zellwand von Eubakterien aus dem Peptidoglycan Murein, einem Zellwandpolymer, welches der Bakterienzelle die äußere Form und Stabilität verleiht.

Bei den Archaeobakterien verfügen die methanogenen Bakterien über ein Zellwandpolymer, welches dem Murein sehr ähnlich ist und aus diesem Grund als **Pseudomurein** bezeichnet wird (König 1987; König 1989). Das zweite Zellwandpolymer Gram-positiver Methanbakterien, das **Methanochondroitin**, ist ein Heteropolysaccharid, welches in Struktur und Zusammensetzung den Glycanketten der Glycosaminoglycane des eukaryontischen Bindegewebes ähnelt (Kreisl und Kandler 1986). Bei einigen Gram-positiven Methanbakterien, wie z.B. bei *Methanothermus fervidus*, tritt ein zusätzlicher **S-Layer**¹¹ aus Glycoproteinuntereinheiten auf.

Das **Pseudomurein** setzt sich aus einem Glycananteil sowie aus einem kurzkettigen Peptid bestehend aus drei Aminosäuren (Glu, Ala, Lys) zusammen. Der Glycananteil besteht aus alternierenden Monomeren der Aminosucker *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) und/oder *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc) und *N*-Acetylalosaminuronsäure (TalNAcA) (**Abb. 16**).

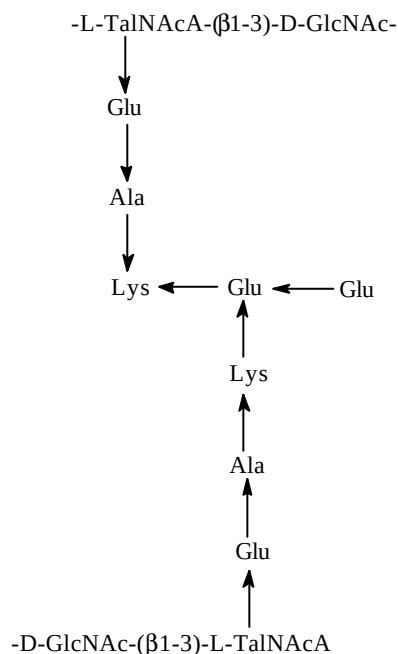


Abb. 16: Ausschnitt aus der Struktur des Pseudomureins (Hartmann und König 1993).

¹¹ *Surface-Layer*: Äußere Hülle vieler Archae- und Eubakterien

Auf der Basis isolierter Vorstufen konnte ein Biosyntheseweg für das Pseudomurein vorgeschlagen, der erheblich vom Biosyntheseweg des Mureins abweicht (Hartmann und König 1990). Es wurde festgestellt, daß im Gegensatz zum Mureinbiosynthese nucleotidaktivierte Oligosaccharide auftreten. Das Pseudomurein ist das erste Beispiel dafür, daß nucleotidaktivierte Oligosaccharide als biosynthetische Zwischenstufen eine Rolle spielen (Hartmann und König 1990; Hartmann und König 1993). In Zellwandextrakten wurden UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc und ein aktiviertes Disaccharid (N-Acetyltalosaminuronsäure(β 1-3)GlcNAc-UDP) nachgewiesen.

Zur Aufklärung der Biosynthese des **Methanochondroitins** konnten aus Partialhydrolysaten der Zellen das aktivierte Disaccharid GlcA(1-3)GalNAc-UDP¹² (UDP-N-Acetylchondrosin) und ein Trisaccharid (GlcA(1-3)GalNAc(1-4)GalNAc-UDP) als Strukturelemente isoliert werden. Das Trisaccharid konnte als repetetiver Glycanbaustein identifiziert werden (Hartmann und König 1991).

Aus Zellextrakten des **S-Layer-Glycoproteins** von *Methanothermus fervidus* konnten zwei Typen von aktivierten Oligosacchariden isoliert werden (Hartmann und König 1993):

- [(GalNAc)₁, (Glc)₂, (Gal)₁, (Man)₂]-GlcNAc-UDP
- und
- [(3-O-MeMan)₂, (Man)₆, (Gal)₁]Gal-UDP

Vergleicht man also die Biosynthese der drei genannten methanobakteriellen Zellwandpolymere, so stellt man fest, daß in allen drei Fällen nucleotid-aktivierte Oligosaccharide anscheinend als typische und allgemeine Zwischenprodukte der Zellwandglycane auftreten. Im Gegensatz dazu konnten GDP-aktivierte Oligosaccharide bei der eubakteriellen Glycoprotein-Biosynthese (S-Layer) nur als Vorstufen in Form von GlcNAc-Gal-ManNAc-GDP und GlcNAc-Gal-[Glc-ManNAc]-UDP nachgewiesen werden (Hartmann *et al.* 1993).

Die genaue Rolle, der nucleotidaktivierte Oligosaccharide in der Biosynthese der bakteriellen Zellwände und die Enzyme, die an deren Aufbau beteiligt sind, sind bis heute noch nicht bekannt.

¹² GlcA = Glucuronsäure

Etwa zur gleichen Zeit der Entdeckung von nucleotidaktivierten Oligosacchariden als Zwischenprodukte bei der Biosynthese von Proteoglycanen, wurde UDP-Disacchariden eine essentielle Rolle in der Methanogenese zugeschrieben. Keltjens *et al.* (1989) und Marsden *et al.* (1989) berichteten unabhängig voneinander von der stimulierenden Wirkung eines aktivierten Disaccharides (ManNAc(α 1-4)GlcNAc-UDP) auf die enzymkatalysierte wasserstoffabhängige Reduktion von Methylthioetansulfonsäure¹³ zu Methan und 2-Mercaptoethansulfonsäure.

In zellfreien Extrakten von *Methanobacterium thermoautotrophicum* wurden 1,3 mM des aktivierten Disaccharides gefunden (Keltjens 1989). Dessen Funktion in der Methanogenese ist noch nicht geklärt. Tests bewiesen aber, daß das UDP-Derivat nicht spezifisch in seiner Reaktion ist: andere UDP-Zucker beeinflussen die Methylcoenzym M-Reduktion im gleichen Maße wie das UDP-Disaccharid.

1.4.3 Vorkommen in Hefe

Erst kürzlich wurde über die Isolierung und partielle Charakterisierung von nucleotidaktivierten Oligosacchariden aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* berichtet (Sprenger und König 2000). In Zellextrakten konnten sie die folgenden vier aktivierten Di- und Oligosaccharide nachweisen:

- Glc-Glc-UDP
- Glc(1-4)Glc-Glc-UDP
- Glc(β 1-4)Glc(β 1-4)Glc β -Glc(β 1-dTDP
- Glc(1-4)GlcNAc(1-6)GlcNAc-UDP

Über die Biosynthese und Funktion dieser aktivierten Zucker kann bisher noch keine Aussage gemacht werden.

¹³ Methylcoenzym M

1.4.4 Vorkommen in Pflanzen

Nicht nur in Säugetieren, Pro- und Eukaryonten konnten nucleotidaktivierte Oligosaccharide nachgewiesen werden, sondern auch in Pflanzen. Im jungen Xylem von Lärchen (*Larix dedida* Mill) wurden Glc(β 1-4)Glc(α 1-UDP, Glc-Ara-UDP und Man-Glc-GDP gefunden.

Auch hier ist wieder die Biosynthese und Funktion der aktivierten Oligosaccharide unbekannt, man ging aber davon aus, daß sie an der Biosynthese von Polysacchariden beteiligt sind (Cumming 1970).

1.4.5 Enzymatische Synthese

1.4.5.1 Enzymatische Synthese mit Glycosidasen

Für die Biosynthese von Nucleotiddi- und Oligosacchariden stehen generell Glycosidasen und Glycosyltransferasen zur Verfügung. Die enzymatische Synthese von nucleotidaktivierten Disacchariden in einer Transglycosylierungsreaktion mit der β -Galactosidase aus Stierhoden wurde erstmals 1973 von Jourdian und Distler beschrieben. Mit UDP-GlcNAc als Akzeptorsubstrat und *p*NP- β -Gal als Donor konnten sie die Bildung von Gal(β 1-6,4 und 3)-Isomeren im Verhältnis 1:9:8 beobachten. Durch den gekoppelten Einsatz einer Sialyltransferase aus Ziegenkolostrum gelang es *N*-Acetylneuraminsäure auf die aktivierten Disaccharide zu übertragen, was in der Bildung von Neu5Ac-Gal(β 1-6, 4 und 3)GlcNAc-UDP resultierte. Das Enzym aus Stierhoden zeigte eine sehr gute Akzeptanz für UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc und UDP-Glc. Im Gegensatz dazu waren UDP-Xyl, UDP-Gal und GDP-Man nur sehr schlechte Akzeptoren, während UDP-GlcA gar nicht umgesetzt wurde.

Jourdian und Distler postulierten anhand ihrer Ergebnisse einen möglichen Biosyntheseweg für Nucleotiddi- und Oligosaccharide *via* Transglycosylierung. Zieht man jedoch die für eine erfolgreiche Transglycosylierungsreaktion hohen Substratkonzentrationen in Betracht, scheint eine *in vivo*-Funktion dieser Reaktion als sehr unwahrscheinlich. Für *in vitro*-Synthesen hingegen ist dies ein relativ preiswerter Weg, um sich Zugang zu diesen Strukturen zu verschaffen.

Im Arbeitskreis Elling (Institut für Enzymtechnologie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf) gelang es erstmals die Nucleotidzucker UDP-Glc und UDP-GlcNAc als Akzeptorsubstrate der β -Galactosidase aus *Bacillus circulans* in der Synthese von Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP und Gal(β 1-4)Glc(α 1-UDP zu nutzen (Zervosen *et al.* 2001).

In einer Folgereaktion konnten durch Übertragung eines weiteren Galactose-Restes auf die aktivierten Disaccharide die entsprechenden Trisaccharide gebildet werden. **Abb. 17** beschreibt die Synthese der aktivierten Oligosaccharide in einer Transglycosylierungsreaktion mit Lactose als Donorsubstrat.

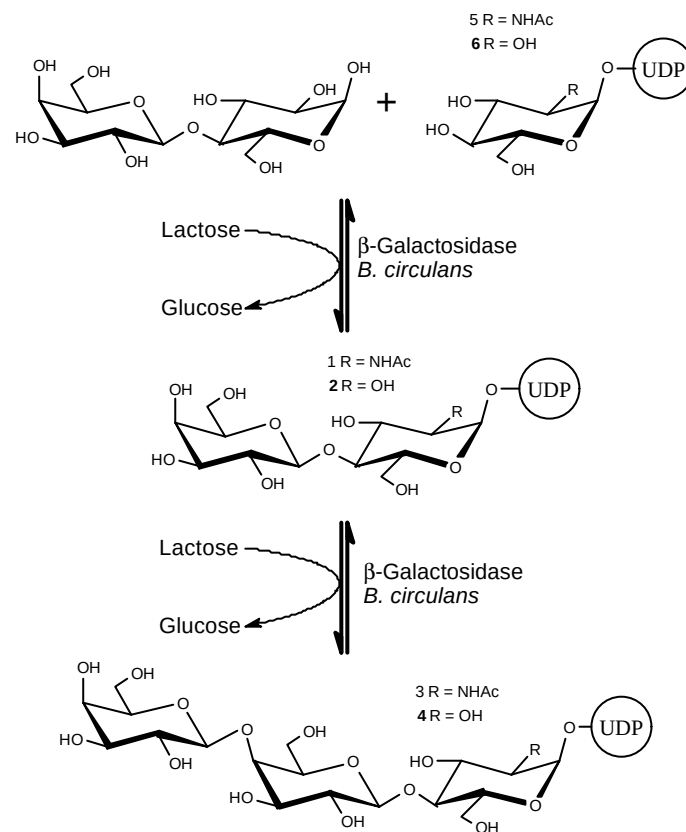


Abb. 17: Synthese von aktivierten Di- und Trisacchariden mit der β -Galactosidase aus *B. circulans*.

Durch Glycosidase-katalysierte Reaktionen ist es somit möglich einen synthetischen Zugang zu Nucleotiddi- und Oligosacchariden zu schaffen. Eine Vielfalt von Strukturen ist theoretisch durch die unterschiedlichen Spezifitäten der Glycosidasen synthetisch zugänglich. Zudem können durch eine geeignete Reaktionsführung (z.B. bei Tieftemperaturen) relativ hohe Ausbeuten erzielt werden, so daß diese Enzymklasse attraktive Katalysatoren für eine gezielte enzymatische Synthese von Nucleotiddi- und Oligosacchariden bietet. Eine Relevanz für die Synthese *in vivo* haben diese Reaktionen allerdings wahrscheinlich nicht.

1.4.5.2 Enzymatische Synthese mit Galactosyltransferasen

Nach dem heutigen Stand der Forschung sollen Leloir-Glycosyltransferasen für die Biosynthese *in vivo* verantwortlich sein, indem sie Nucleotidzucker als Akzeptorsubstrate verwenden. Der Versuch zur Synthese von UDP-LacNAc mit der β 4GalT1 ausgehend von UDP-Gal und UDP-GlcNAc schlug fehl (Distler und Jourdian 1973). Diese Reaktion galt lange Zeit auch als nicht durchführbar, da die Übertragung von Galactose von UDP-Gal auf α -geknapfte *N*-Acetylglucosaminide noch nie beobachtet wurde (Wong *et al.* 1991; Takayama *et al.* 1996).

Im Arbeitskreis Elling gelang es jedoch erstmals mit den β 4Galactosyltransferasen aus Human- und Kuhmilch und der in *Saccharomyces cerevisiae* exprimierten, rekombinanten humanen β 4GalT1, UDP-GlcNAc als Akzeptorsubstrat zur *in vitro* Synthese von UDP-LacNAc zu nutzen (Elling *et al.* 1999, **Abb. 18**). Für die Bereitstellung von UDP-LacNAc in größeren Mengen ist dieser Syntheseweg allerdings nicht geeignet, da man nach Inkubationszeiten von 6 Tagen relativ geringe Ausbeuten von ca. 17 % erhält. Vor dem Hintergrund einer Biosyntheseroute, liefert die β 4GalT1 jedoch das erste Beispiel einer Glycosyltransferase, die in der Lage ist ein Nucleotiddisaccharid zu synthetisieren.

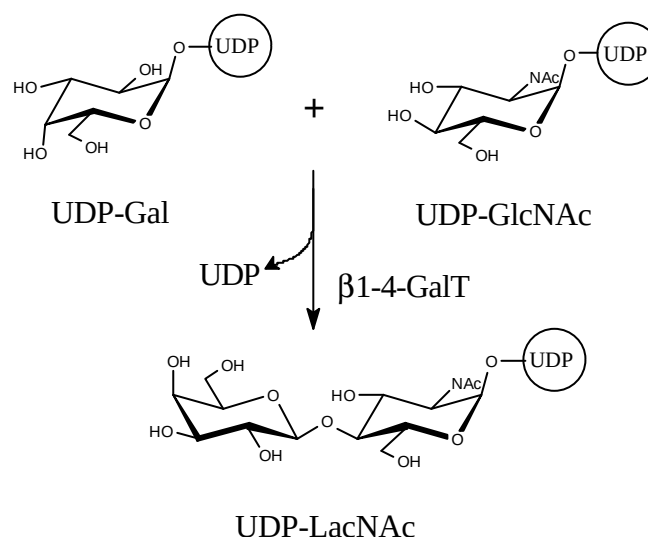


Abb. 18: Synthese von UDP-LacNAc mit der β 1-4-Galactosyltransferase.

Bezüglich der *in vitro* Oligosaccharidsynthese ist die β 4GalT1 (EC 2.4.1.38) die am besten charakterisierte Leloir-Glycosyltransferase. Sie ist kommerziell erhältlich und kann leicht aus Kuh- oder Humanmilch isoliert werden (Trayer und Hill 1971; Andrews 1970; Ferber *et al.* 1979). Die β 4GalT1 ist eine Typ II Glycosyltransferase¹⁴, welche in Anwesenheit von Mn^{2+} als Cofaktor die Übertragung von Galactose auf *N*-Acetylglucosamin katalysiert. Glucose ist auch ein Akzeptorsubstrat, aber da der K_M -Wert für Glucose über 1 M liegt, wird der Transfer auf dieses Substrat unter physiologischen Bedingungen nicht stattfinden. Lactose (Gal(β 1-4)Gal) wird allerdings bei Säugetieren während der Lactationsphase in den Milchdrüsen synthetisiert, da in diesem Gewebe α -Lactalbumin produziert wird (Bell *et al.* 1976). In Verbindung mit α -Lactalbumin bildet die β 4GalT1 den Lactose-Synthase Komplex. Der Effekt von α -Lactalbumin auf die GalT ist hierbei die Erniedrigung des K_M -Wertes für Glucose um das 1000fache (Brodbeck und Ebner 1966; Bell *et al.* 1973; Ebner 1977; Hill und Brew 1975).

4.5.2.1 α -Lactalbuminabhängigkeit der UDP-LacNAc Synthese

Der Effekt von α -Lactalbumin auf die β 4GalT1-Aktivität hängt sowohl von der Art, als auch von der Konzentration des Akzeptorsubstrates ab. Bei geringen Akzeptorkonzentrationen aktiviert α -Lactalbumin die Synthese von Lactose und *N*-Acetyllactosamin. Bei Konzentrationen, die nahe dem K_M -Wert von GlcNAc (5,8 mM; Ebner 1971; Morrison und Ebner 1971) liegen, ist α -Lactalbumin ein Inhibitor. Das gleiche gilt für Glucose-Konzentrationen über 100 mM (Bell *et al.* 1971).

Der Einfluß von α -Lactalbumin auf die Synthese von UDP-LacNAc mit der β 4GalT1 aus Kuhmilch ist in **Abb. 19** dargestellt. Die Ausbeute an UDP-LacNAc sinkt bis zu einer α -Lactalbuminkonzentration von 1 mg/mL (70 μ M) um das vierfache auf 5% ab, und die Synthese wird bei einer Konzentration von 8 mg/mL (560 μ M) schließlich vollständig inhibiert (Elling *et al.* 1999).

¹⁴ Glycosyltransferasen aus Säugetieren sind membranständige Proteine vom Typ2. Sie bestehen aus einer kurzen *N*-terminalen, cytoplasmatischen Sequenz, einer Transmembran-Domäne, einer kurzen Stamm-Region und einer großen C-terminalen, luminalen katalytischen Domäne.

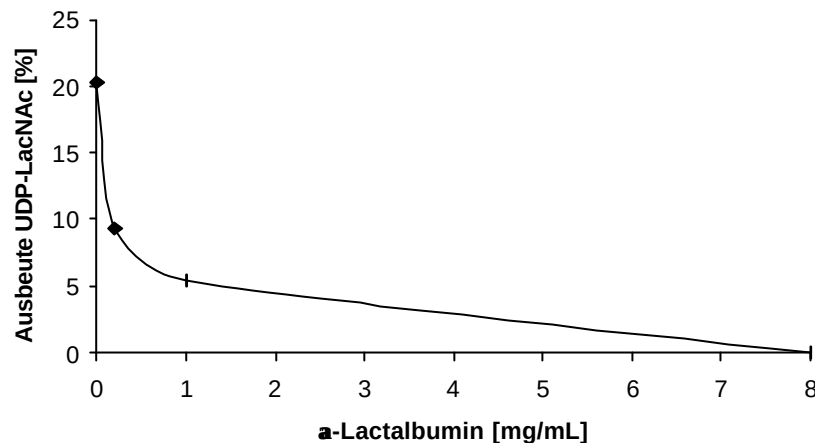


Abb. 19: Effekt von α -Lactalbumin auf die Synthese von UDP-LacNAc mit der β 4GalT aus Kuhmilch (10 mM UDP-Gal, 10 mM UDP-GlcNAc, 1 mM MnCl_2 , 0,01% NaN_3 , 0,4 U/mL β 4GalT; 200 mM HEPES/NaOH pH 7,0, 30°C, Inkubation: 6 Tage).

Diese starke α -Lactalbuminabhängigkeit weist darauf hin, daß die β 4GalT1 bei der Biosynthese von UDP-LacNAc in der Milch keine Rolle spielt. Erste Versuche mit der rekombinanten humanen β 4GalT2¹⁵ zeigten, daß dieses Enzym keine α -Lactalbuminabhängigkeit bezüglich der UDP-LacNAc Synthese besitzt. Das ist damit ein erster Hinweis auf eine β 4GalT, die bezüglich der UDP-LacNAc Synthese unabhängig von α -Lactalbumin ist und somit eine Unterstützung der Vermutung, daß Galactosyltransferasen an der Synthese von UDP-aktivierten Oligosacchariden in der Milch beteiligt sein könnten (Nieder und Elling, unveröffentlichte Ergebnisse).

Bezüglich der UDP-LacNAc Synthese haben die β 4GalT1 und β 4GalT2 sehr unterschiedliche Präferenzen. Interessanterweise zeigen sie jedoch gegenüber Glucose und *N*-Acetyllactosamin ein ähnliches Verhalten. Glucose ist ohne α -Lactalbumin kein Substrat für beide Enzyme, bei steigenden Konzentrationen dieses Milchproteins sind allerdings für beide Enzyme ungefähr die gleichen Bildungsraten für Lactose detektiert worden.

¹⁵ Das Enzym wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. H. Clausen (School of Dentistry, University of Copenhagen, Dänemark) kloniert und in löslicher Form in Sf9-Zellen exprimiert.

Allerdings benötigt die humane β 4GalT2 eine viermal so hohe α -Lactalbuminkonzentration zum Erreichen der maximalen Aktivität mit Glc wie das bovine Enzym. Mit GlcNAc als Akzeptorsubstrat wurden beide Enzyme mit α -Lactalbumin inhibiert (Almeida *et al.* 1997).

Versuche mit Mäusen, welche keine β 4GalT1 ausbilden konnten zeigten, daß diese Tiere nicht dazu in der Lage waren Lactose zu synthetisieren (Asano *et al.* 1997). Daher geht man davon aus, daß die β 4GalT2, obwohl sie große Ähnlichkeiten mit der β 4GalT1 besitzt, nicht in den Milchdrüsen exprimiert wird und somit nicht für die Synthese von UDP-LacNAc in der Milch verantwortlich sein kann.

Somit bleibt immer noch die Frage der Biosynthese und biologischen Funktion von UDP-LacNAc und anderen aktivierten Di- und Oligosacchariden offen. Antworten dazu können jedoch nur gefunden werden, wenn ein synthetischer Zugang zu diesen Strukturen für eine biochemische Charakterisierung ermöglicht wird.

2 ZIELSETZUNG

Wie in den Kapiteln 1.4.1 – 1.4.4 ausgeführt wird, konnten nucleotidaktivierte Di- und Oligosacchariden aus verschiedenen Quellen isoliert und charakterisiert werden. Über die Biosynthese und Funktion dieser natürlich vorkommenden Glykokonjugate ist allerdings bis heute noch nichts bekannt. Voraussetzung für Untersuchungen hinsichtlich Biosynthese und Funktion ist ein geeigneter synthetischer Zugang zu diesen Strukturen. Für die β -Galactosidase aus *B. circulans* konnte bereits im Rahmen einer vorangegangenen Diplomarbeit gezeigt werden, daß die präparative enzymatische Synthese von UDP-LacNAc und UDP-Lac möglich ist. Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, das Spektrum an interessanten Strukturen von Nucleotiddi- und Oligosacchariden durch Glycosidase-katalysierte Synthesen zu erweitern.

Nucleotidzucker als Akzeptorsubstrate für Glycosidasen

Nucleotidaktivierte Oligosaccharide sollten mit verschiedenen verfügbaren Glycosidasen synthetisiert und im präparativen Maßstab zu Verfügung gestellt werden. Das Interesse galt dabei besonders den in **Tabelle 6** und **Tabelle 7** aufgeführten, auf UDP-GlcNAc und UDP-Gal basierenden Strukturen.

Tabelle 6: Enzymscreening mit UDP-GlcNAc als Glycosylakzeptor

Position des GlcNAc substituiert mit	Glycanstruktur in Glykokonjugaten ¹	Angestrebtes UDP-Disaccharid	Enzymscreening mit
3-OH Gal β 1- Fuc α 1-	Typ1 LacNAc Le ^x	Gal(β 1-3)GlcNAc-UDP Fuc(α 1-3)GlcNAc-UDP	β -Galactosidasen α -Fucosidasen
4-OH Gal β 1- Fuc α 1- GlcNAc β 1- GalNAc β 1- Man β 1-	Typ2 LacNAc Le ^a <i>N</i> -Glycan "Core" LacdiNAc <i>N</i> -Glycan "Core"	Gal(β 1-4)GlcNAc-UDP Fuc(α 1-4)GlcNAc-UDP GlcNAc(β 1-4)GlcNAc-UDP GalNAc(β 1-4)GlcNAc-UDP Man(β 1-4)GlcNAc-UDP	β -Galactosidasen α -Fucosidasen β - <i>N</i> -HexNAc-asen ² β - <i>N</i> -HexNAc-asen ² β -Mannosidasen
6-OH Fuc α -	<i>N</i> -Glycane	Fuc(α 1-6)GlcNAc-UDP	α -Fucosidasen

¹ Gal ist in diesen Glycanstrukturen β -geknüpft

² β -*N*-Acetylhexosaminidasen

Tabelle 7: Enzymscreening mit UDP-Gal als Glycosylakzeptor.

Position der Gal substituiert mit	Glycanstruktur in Glykokonjugaten ¹	Angestrebtes UDP-Disaccharid	Enzymscreening mit
2-OH Fuc α 1-	Blutgruppe H(0)	Fuc(α 1-2)Gal-UDP	α -Fucosidasen
3-OH Gal α 1-	Galili-Epitop Globobioso ²	Gal(α 1-3)Gal-UDP	α -Galactosidasen
GlcNAc β 1-	Poly-LacNAc Lacto-, Lactoneo- ²	GlcNAc(β 1-3)Gal-UDP	β -N-HexNAc-asen ³
Neu5Ac α 2-	Sialyl-Le ^a , -Le ^x Gangliosid G _{M3}	Neu5Ac(α 2-3)Gal-UDP	α -Sialidasen
4-OH Gal β 1-	Muco- ²	Gal(β 1-4)Gal-UDP	β -Galactosidasen
Gal α 1-	Globo- ²	Gal(α 1-4)Gal-UDP	α -Galactosidasen
GalNAc β 1-	Ganglio- ²	GalNAc(β 1-4)Gal-UDP	β -N-HexNAc-asen ³
6-OH GlcNAc β 1-	Poly-LacNAc	GlcNAc(β 1-6)Gal-UDP	β -N-HexNAc-asen ⁴
	Sialyl-LacNAc	Neu5Ac(α 2-6)Gal-UDP	α -Sialidasen

¹ Gal ist in diesen Glycanstrukturen β -geknüpft

² Core-Strukturen der Glycosphingolipide

³ β -N-Acetylhexosaminidasen

Mit der β -Galactosidase aus *Bacillus circulans* konnte gezeigt werden, daß eine Reaktionsführung bei Tieftemperaturen einen positiven Einfluß auf die Reaktion hinsichtlich Ausbeuten und Unterdrückung der Produkthydrolyse hat (Zervosen *et al.* 2001). In Anlehnung an diese Ergebnisse sollte für die Synthesen der oben aufgeführten aktivierten Disaccharide eine Optimierung der Reaktionsbedingungen, besonders im Hinblick auf eine mögliche Tieftemperatursynthese, durchgeführt werden.

Eine präparative Synthese und Isolierung der nucleotidaktivierten Disaccharide schloß sich an. Die strukturelle Aufklärung der isolierten Produkte mittels NMR und MS wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J.P. Kamerling (Bijvoet Center, Department of Bioorganic Chemistry, Universität Utrecht, Niederlande) durchgeführt.

Nucleotidaktivierte Disaccharide als Donorsubstrate und Inhibitoren für Glycosyltransferasen

Nucleotiddi- und Oligosaccharide könnten interessante Donorsubstrate für *in vitro* Synthesen von Glycokonjugaten mit Glycosyltransferasen sein. Durch den enzymatischen Zugang zu diesen Strukturen, könnten sie in Übertragungsversuche *en bloc* mit ausgewählten Glycosyltransferasen eingesetzt werden.

Ein zweiter Schwerpunkt bei den Glycosyltransferase-katalysierten Reaktionen sollte bei Inhibitionsstudien liegen. Zum einen könnten Nucleotiddi- und oligosaccharide effektive *in vitro* Inhibitoren sein. Zum anderen wäre eine Inhibition ein Hinweis auf eine mögliche *in vivo* Funktion dieser Strukturen als Regulatoren für Glycosyltransferasen. Aus diesen Gründen wurde das Hauptinteresse auf die Schlüsselenzyme der *N*- und *O*-Glycanbiosynthesen (GlcNAc-Transferasen I und II und murine *Core2* β 1-6GlcNAc-Transferase) gelegt. Des weiteren wurden Galactosyltransferasen (β 4GalT1 und rekombinante α 1-3GalT aus Maus) und die rekombinante Saccharose Synthase 1 aus Kartoffel getestet.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Das Spektrum der zugänglichen Strukturen von Nucleotiddi- und oligosacchariden sollte mit Hilfe weiterer Glycosidasereaktionen erweitert werden. Nach der präparativen Synthese und Produktisolierung ausgesuchter Strukturen wurden diese Produkte als Donorsubstrate oder Inhibitoren von Glycosyltransferasen getestet.

3.1 **β -Galactosidase aus *Bacillus circulans***

3.1.1 Akzeptorsubstratspektrum

Das Substratspektrum der β -Galactosidase aus *B. circulans* zeigt, daß neben UDP-Glc und UDP-GlcNAc auch andere Nucleotidzucker akzeptiert werden (**Tabelle 8**). Generell fällt auf, daß UDP-Glc und UDP-GlcNAc ihren C4-Epimeren gegenüber bevorzugt werden. Das Fehlen der C6 Hydroxymethylgruppe (UDP-Xyl) bzw. die Anwesenheit einer C6 Carboxylgruppe (UDP-GlcA) führt zu einer erniedrigten Ausbeute bzw. fehlenden Akzeptanz. Der Nucleotidanteil hat kaum Auswirkungen auf die Ausbeute. Bei der aktivierten Glucose kann UDP durch CDP oder dTDP ausgetauscht werden, während GDP-Glc eine schlechtere Ausbeute als ADP-Glc liefert. Diese Tendenz setzt sich mit GDP-Man fort, die kein Substrat dieser β -Galactosidase ist.

Tabelle 8: Nucleotidzucker als Akzeptoren von β -Galactosidase aus *Bacillus circulans*. Ergebnisse der HPLC ③-Analyse. Reaktionsansätze: 500 mM Lactose, 100 mM Nucleotidzucker, 10 U/mL β -Galactosidase, Inkubation 1,5 h bei 30°C.

Nucleotidzucker	Ausbeute % (Retentionszeit in Min)	
	Nucleotiddisaccharid	Nucleotidtrisaccharid
UDP-GlcNAc	29.4 (16.2)	5.7 (20.4)
UDP-Glc	23.3 (14.7)	4.9 (18.2)
UDP-Gal	15.6 (15.4)	1.1 (20.2)
UDP-GalNAc	12.8 (16.1)	0.9 (20.4)
UDP-GlcA	n.d. ^a	n.d. ^a
UDP-Xyl	5.7 (12.2)	n.d. ^a
dTDP-Glc	14.8 (13.9)	1.0 (17.5)
CDP-Glc	10.8 (21.5)	n.d. ^a
ADP-Glc	14.9 (20.8)	0.7 (27.1)
GDP-Glc	7.2 (18.8)	n.d. ^a
GDP-Man	n.d. ^a	n.d. ^a
CMP-Neu5Ac	n.d. ^a	n.d. ^a

^a n.d. keine Produktbildung

3.1.2 Präparative Synthese von Gal(**β** 1-4)GlcNAc(**α** 1-UDP und Gal(**β** 1-4)Gal(**β** 1-4)GlcNAc(**α** 1-UDP

Anknüpfend an diese Ergebnisse wurde eine Synthese der Produkte im präparativen Maßstab bei -5°C unter optimierten Bedingungen durchgeführt. Die Optimierung der Reaktion fand im Rahmen der eigenen Diplomarbeit statt. Diese und die beschriebenen präparativen Synthesen mit UDP-GlcNAc und UDP-Glc als Akzeptorsubstraten sind in Zervosen *et al.* (2001) publiziert. Die HPLC ①-Analyse des Reaktionsansatzes ergab eine Syntheseausbeute von 31% für UDP-LacNAc und 11% für das aktivierte Trisaccharid (Ausbeuten bezogen auf das Akzeptorsubstrat). Es konnten 62,8 mg UDP-LacNAc (Gesamtausbeute 7,3%, 73 µmol) isoliert werden. In einer Folgereaktion entstehen bei der Transglycosylierung aus den UDP-aktivierten Disacchariden UDP-aktivierte Trisaccharide. Es konnten 35 mg Gal(β1-4)Gal(β1-4)GlcNAc(α-1UDP (Gesamtausbeute: 3,4%, 34 µmol) isoliert werden.

Die FAB-MS (negative ion mode) Analysen der sauberen Produkte bestätigten die erwarteten Massen der Produkte. Durch die Strukturanalyse mittels 1D ¹H, ¹³C und 2D TOCSY, ROESY und HBMC Experimenten konnte gezeigt werden, daß eine stereo- und regioselektive Glycosylierung der 4-OH Gruppe der Akzeptorsubstrate stattfand.

3.1.3 Präparative Synthese von Gal(**β** 1-4)Glc(**α** 1-UDP und Gal(**β** 1-4)Gal(**β** 1-4)Glc(**α** 1-UDP

Ebenso konnte UDP-Lactose im präparativen Maßstab hergestellt werden. Nach Synthese unter optimierten Bedingungen konnte mittels HPLC ①-Analyse eine Syntheseausbeute von 31% für UDP-LacNAc und 8,4% für das aktivierte Trisaccharid (Ausbeuten bezogen auf das Akzeptorsubstrat). Es wurden 32,3 mg UDP-Lac (Gesamtausbeute 4,8%, 39,5 µmol) und 12,2 mg Gal(β1-4)Gal(β1-4)Glc(α1-UDP (Gesamtausbeute: 1,5%, 12,6 µmol) isoliert.

Die FAB-MS (negative ion mode) Analysen der Produkte bestätigten die erwarteten Massen der Produkte. Durch die Strukturanalyse mittels 1D ¹H, ¹³C und 2D TOCSY, ROESY und HBMC Experimenten konnte wie schon bei UDP-LacNAc gezeigt werden, daß eine stereo- und regioselektive Glycosylierung der 4-OH Gruppe der Akzeptorsubstrate stattfand

3.1.4 Präparative Synthese von Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP

Die HPLC ②-Analyse ergab eine Ausbeute von 25% für Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP und 4,3% für das entsprechende aktivierte Trisaccharid Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP (Ausbeuten bezogen auf das Akzeptorsubstrat. Es konnten 6,7 mg Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP (Gesamtausbeute 6,7%, 8,7 μ mol) isoliert werden.

FAB-MS-Analyse lieferte die erwartete Molmasse des Produktes. Durch NMR-Experimente konnte ebenfalls gezeigt werden, daß eine stereo- und regioselektive Glycosylierung der 4-OH Gruppe des Akzeptorsubstrates stattfand.

3.1.5 Zusammenfassende Diskussion

Die Nucleotidzucker UDP-GlcNAc, UDP-Glc und UDP-Gal wurden zur präparativen Synthese der entsprechenden aktivierten Di- und Trisaccharide als Akzeptorsubstrate der β -Galactosidase aus *B. circulans* eingesetzt. Die isolierten Produkte wurden durch FAB-MS und 1D und 2D NMR charakterisiert. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Regioselektivität der Transglycosylierungsreaktion gelegt. Die NMR-Experimente (Daten dazu in Kap. 5.2) ergaben, daß bei allen analysierten Produkten ausschließlich die 4-OH Positionen der Akzeptorsubstrate regioselektiv transglycosyliert wurden. Signale anderer Regioisomere konnten nicht festgestellt werden.

Eine ausschließliche Regioselektivität für Transglycosylierungen der β -Galactosidase aus *B. circulans* wurde bisher nur in Anwesenheit hoher Acetonitrilkonzentrationen festgestellt (Usui *et al.* 1993). Ohne den Zusatz von Lösungsmitteln erhielten Murata *et al.* mit Lactose als Donor und Glc(β 1-*p*NP als Akzeptor, eine Mischung aus (β 1-3)-, (β 1-4)- und (β 1-6)-Regioisomeren (Murata *et al.* 1997). Der Einfluß der Struktur und Konfiguration des Akzeptorsubstrates auf die Regioselektivität wurde von Nilsson untersucht (Nilsson 1987). Bei der Transglycosylierungsreaktion der β -Galactosidase aus *E. coli* entstand mit Gal(α 1-OMe als Akzeptorsubstrat hauptsächlich das (β 1-6)-Isomer, während Gal(β 1-OMe bevorzugt die Bildung des (β 1-3)-Isomeren bestimmt.

Eine dirigierende Rolle der *N*-Acetylgruppe des GlcNAc und des *N*-Acetylkanosamins (Glc3NAc) wurde für die Bildung von Regioisomeren mit der β -Galactosidase aus *B. circulans* festgestellt (Usui *et al.* 1996). Mit GlcNAc wurden (β 1-4)- und (β 1-6)-Isomere, mit Glc3NAc (β 1- β 1)- und (β 1-6)-Isomere erhalten.

Im Falle der Nucleotidzucker scheint der α -geknüpfte Nucleotidrest der Akzeptorsubstrate (UDP-Glc, UDP-GlcNAc und UDP-Gal) eine ausschließliche Glycosylierung der 4-OH Gruppen der Zucker zu dirigieren. Die fehlende Bildung von (β 1-6)-Isomeren läßt sich auch aus aktuellen Untersuchungen zur Konformation von Nucleotidzuckern ableiten (Petrová *et al.* 1999). Alle energieminierten Konformere von UDP-Glc zeigten eine Abschirmung der Hydroxymethylgruppe an C-6 durch das Nucleotid. Das läßt den Schluß zu, daß aufgrund der sterischen Hinderung dieser Position durch das Nucleotid eine Glycosylierung an 6-OH Gruppe nicht möglich ist.

Diese Annahme wird durch die vorliegenden Untersuchungen unterstützt, in denen Transglycosilierungsprodukte mit Glycosidasen, die bevorzugt auf die 6-OH Position übertragen (z. B. β -Galactosidase aus *E. coli* und *Aspergillus oryzae*, α -Galactosidase aus Kaffeebohnen), nicht detektiert werden konnten.

3.2 β -D-Galactosidase aus Stierhoden

In Synthesen von Glycokonjugaten mit der β -Galactosidase aus Stierhoden wurde die Bildung von (β 1-3), (β 1-4) und (β 1-6) Regioisomeren in Abhängigkeit vom eingesetzten Akzeptorglycosid beschrieben. Ausschließlich (β 1-3) Produkte wurden bei der Synthese von folgenden Produkten gebildet:

- Gal(β 1-3)GalNAc(α 1-OR (R = Ser/Thr, T-Antigen) (Gambert 1997b)
- Gal(β 1-3)GalNAc (α 1-OR (R= -CH₂CH=CH₂; -CH₂-C₆H₅) (Gambert 1997a)
- Gal(β 1-3Gal(2-desoxy)(α 1-OR (R= -CH₂CH=CH₂; -CH₂-C₆H₅) (Gambert 1997a)
- Gal(β 1-3)GlcNAc(α 1-OR (R= -CH₂CH=CH₂; -CH₂-C₆H₅) (Gambert 1997a)

Mit GlcNAc(β 1-OMe als Akzeptor wurde eine Mischung aus den Regioisomeren Gal(β 1-3/4)GlcNAc (β 1-OMe gefunden (Nilsson, 1989). GlcNAc und GlcNAc β -SEt ergaben mit Lactose als Donorsubstrat Mischungen aus den β (1-3,4 und 6)-Isomeren (Hedbys *et al.* 1989). Die β -Galactosidase aus Stierhoden wurde auch schon zur Synthese von nucleotidaktivierten Oligosacchariden eingesetzt. Mit UDP-GlcNAc als Akzeptor und *p*NP- β -Gal als Donor wurde eine Mischung aus (β 1-6), (β 1-3) und (β 1-4) Isomeren im Verhältnis von 1:8:9 erhalten. Das Enzym zeigte eine sehr gute Akzeptanz für UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc und UDP-Glc. UDP-Xyl, UDP-Gal und GDP-Man waren nur sehr schlechte Akzeptoren, während UDP-GlcA gar nicht umgesetzt wurde (Jourdian 1973).

3.2.1 **β -D-Galactosidase aus Stierhoden (kommerzielles Präparat)**

3.2.1.1 Akzeptorsubstratspektrum

Zunächst wurde das Akzeptorsubstratspektrum der kommerziell erhältlichen β -Galactosidase aus Stierhoden (Sigma, Deisenhofen) mit verschiedenen Nucleotidzuckern getestet und anschließend mit HPLC ③ analysiert. Die Ergebnisse dazu sind in **Tabelle 9** zusammengefaßt. Es fällt auf, daß in den HPLC-Chromatogrammen zwei Signale im Bereich der aktivierten Disaccharide erscheinen, die nur sehr schlecht, bzw. nicht voneinander getrennt sind. Die hier verwendete HPLC-Methode ③ ist dazu in der Lage Nucleotidzucker aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes zu trennen. Die Trennung von Regioisomeren ist nicht möglich. Im Bereich der aktivierten Trisaccharide konnten keine Signale beobachtet werden. **Abb. 20** zeigt die HPLC ③ Chromatogramme von der Synthese mit UDP-GalNAc als Akzeptorsubstrat nach verschiedenen Inkubationszeiten. Es ist deutlich zu erkennen, daß nach 4 Stunden Inkubationszeit ein einzelner Peak im Disaccharidbereich erscheint. Nach 32 Stunden Inkubationszeit konnte ein weiterer Peak im Disaccharidbereich detektiert werden, der allerdings kaum von dem ersten Peak getrennt ist. Im Trisaccharidbereich konnten keine Signale nachgewiesen werden. Das weist darauf hin, daß es sich bei den Produkten (1 und 2) um Regioisomere handelt, von denen das eine schnell gebildet wird, während das andere erst nach längeren Inkubationszeiten sein Maximum erreicht.

Im Vergleich zu Jourdian und Distler (1973) ergeben sich damit Übereinstimmungen. In ihren Arbeiten berichteten sie von der Bildung von (β 1-3, 4 und 6)-Isomeren.

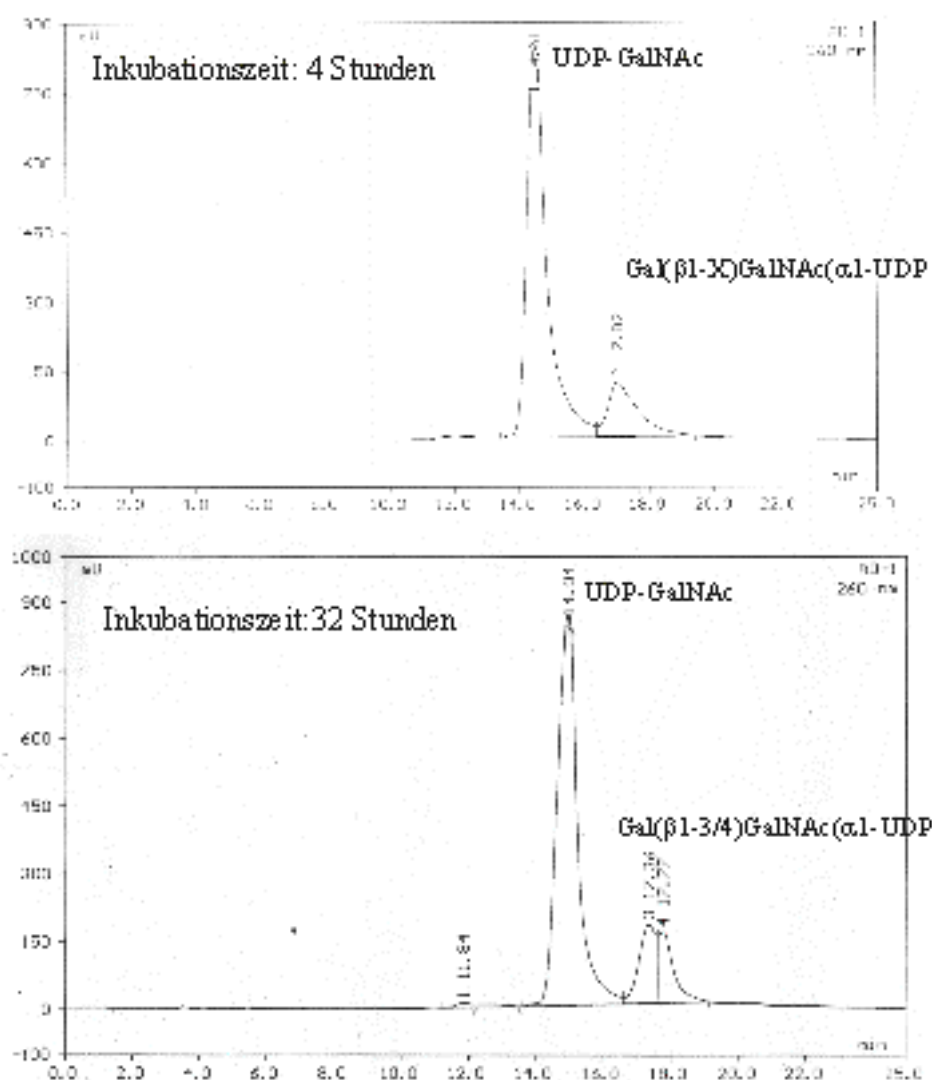


Abb. 20: Zeitlicher Verlauf der Produktbildung mit der β -Galactosidase aus Stierhoden (Sigma, Deisenhofen).

Bei den getesteten Akzeptornucleotiden zeigte sich, daß außer UDP-GlcA und CMP-NeuAc, alle Nucleotidzucker Substrate der β -Galactosidase aus Stierhoden sind. Die höchsten Ausbeuten werden mit UDP-GalNAc, UDP-Gal, UDP-GlcNAc und UDP-Glc erzielt mit einer leichten Präferenz für die ersten beiden Nucleotidzucker (**Tabelle 9**). Auch Jourdian und Distler (1973) konnten eine höhere Akzeptanz gegenüber UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc und UDP-Glc beobachten, während UDP-GlcA kein Substrat war.

Tabelle 9: Nucleotidzucker als Akzeptoren der β -Galactosidase aus Stierhoden (Sigma). Ergebnisse der HPLC ③-Analyse. Reaktionsansätze: 500 mM Lactose, 100 mM Nucleotidmonosaccharid, 0,32 U/mL β -Galactosidase, 1 mg/mL BSA, 50 mM Citrat/Phosphat Puffer (pH 4,3); Inkubation 24 h bei 30°C.

Nucleotidzucker	Ausbeute Produkt 1 [%]	Ausbeute Produkt 2 [%]
UDP-GlcNAc	10,8	7,0
UDP-Glc	11,8	ng ^b
UDP-Gal	14,5	ng ^b
UDP-GalNAc	12,5	10,3
UDP-GlcA	nd ^a	nd ^a
UDP-Xyl	5,2	4,5
dTDP-Glc	10,6	ng ^b
CDP-Glc	11,5	4,9
ADP-Glc	2,7	nd ^a
GDP-Glc	14,1	1,0
GDP-Man	ng ^b	ng ^b
CMP-Neu5Ac	nd ^a	nd ^a

^a Produktbildung wurde nicht detektiert

^b Peaks nicht getrennt

3.2.2 Partielle Aufreinigung der β -D-Galactosidase aus Stierhoden

Da die β -Galactosidase leicht aus Stierhoden isoliert werden kann und das käufliche Enzym einen relativ hohen Preis hat (0,2 U = 140,70 DM; Katalogpreis Sigma 2000), wurde das Enzym aus Stierhoden aufgereinigt.

Die β -Galactosidase wurde aus 1,3 kg frischen Stierhoden nach der Vorschrift von Distler und Jourdian (1978), isoliert. Nach Zerkleinerung in einem Blender, Zentrifugation, Fällung mit 75% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, anschließender Dialyse und Lyophilisation wurden 7 g Protein mit einer spezifischen Aktivität von 11 mU/mg Protein erhalten (**Tabelle 10**). Das entspricht einer Gesamtaktivität von 77 U. Das erhaltene Lyophilisat ist bei -20°C über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr stabil.

Tabelle 10: Aufreinigung der β -Galactosidase aus Stierhoden.

	Schritt	V [mL]	A _v [U/mL]	Protein [mg /mL]	A _s [mU/mg]	U _{gesamt}	[%]	A _s [mU/mg]*
1	Rohextrakt	2300	0,15			330	100	14 (100%)
2	(NH ₄) ₂ SO ₄ - Fällung	615	0,27	28,0	9,6	165	50	23 (94%)
3	nach Dialyse	615	0,18	14,1	13,0	111	34	
4	nach Gefriertrock- nung	7 g			11,0	77	23	

* = Literaturwerte Distler und Jourdian 1978

Wie sich anhand der spezifischen Aktivität ablesen läßt, ist die Aufreinigung nicht sehr erfolgreich. Vielmehr verliert man während der einzelnen Aufreinigungsschritte insgesamt 77 % der Gesamtaktivität. Da in den Präzipitaten bzw. Überständen der jeweiligen Fällungsschritte keine Aktivität gefunden wurde, was den Aktivitätsverlust erklären würde, muß davon ausgegangen werden, daß das Enzym während der Aufreinigung desaktiviert wird. Da aber die Aktivität von 11 mU/mg für eine weitere Charakterisierung und Synthese ausreichend ist, wurde auf eine Feinreinigung des Proteins verzichtet.

3.2.3 Charakterisierung der **b**-D-Galactosidase aus Stierhoden (Eigenisolat)

Zur weiteren Optimierung der Synthesen mit der β -Galactosidase aus Stierhoden hinsichtlich Donorsubstratkonzentration, Temperatur und Reaktionszeit wurde das Enzym des Eigenisolats und UDP-Glc als Akzeptorsubstrat verwendet.

3.2.3.1 pH-Optimum

Zunächst wurde das pH-Optimum des Lyophilisates in einem pH-Bereich von 3 bis 6 ermittelt. Das pH-Optimum für die Hydrolysereaktion liegt zwischen pH 4 und 4,5 (**Abb. 21**). Für weitere Reaktionen wurde daher ein pH-Wert von 4,3 gewählt. Dieser Wert stimmt mit Literaturdaten überein, in denen ebenfalls ein pH-Optimum von 4,3 ermittelt wurde (Distler und Jourdian 1973).

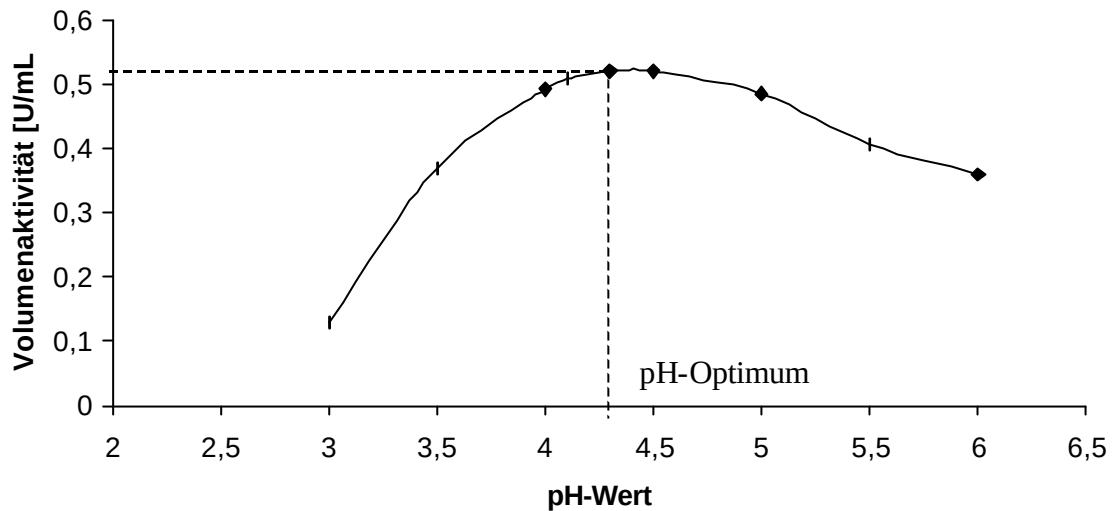


Abb. 21: Aktivität der β -Galactosidase aus Stierhoden (Eigenisolat) in Abhängigkeit vom pH-Wert (30°C, Aktivitätstest siehe 3.8.1, 30 mg/mL β -Galactosidase, 50 mM Citrat/Phosphat-Puffer pH 3-6).

3.2.3.2. pH-Stabilität

Um die Stabilität der β -Galactosidase aus Stierhoden bei langen Inkubationszeiten in dem gewählten Puffersystem bei pH 4,3 zu testen wurden das Lyophilisat mit einer Konzentration von 30 mg/mL über einen Zeitraum von 24 Stunden inkubiert. Aktivitätstests innerhalb dieses Zeitraumes zeigten, daß die Aktivität des Enzyms um 25% abnahm (**Abb. 22**). Die Stabilität des Enzyms in dem gewählten Puffersystem ist dennoch für lange Inkubationszeiten ausreichend.

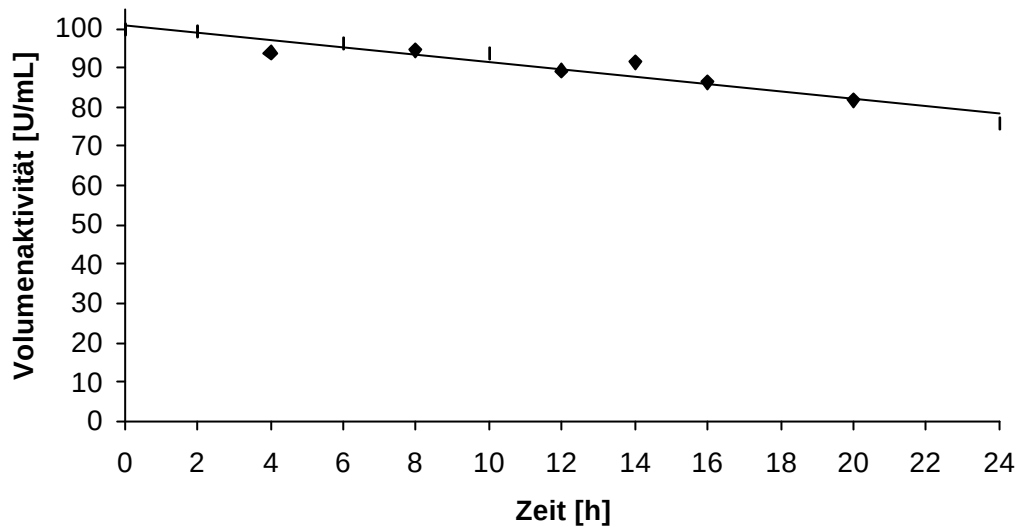


Abb. 22: Aktivität der β -Galactosidase aus Stierhoden (Eigenisolat) in Abhängigkeit von der Zeit; 100% entsprechen 0,33 U/mL (30°C, 30 mg/mL β -Galactosidase, 50 mM Citrat/Phosphat-Puffer pH 3-6).

3.2.3.3 Optimierung der Donorsubstratkonzentration

Um eine maximale Produktausbeute zu erzielen, wurde die Synthese hinsichtlich der Donorsubstratkonzentration (Lactose) optimiert. In der Reaktion mit UDP-Glucose als Akzeptorsubstrat wurden die Lactosekonzentrationen zwischen 100 und 500 mM variiert. Die Bildung von aktivierten Di- und Trisacchariden wurde über einen Zeitraum von 12 Stunden verfolgt.

Es konnte festgestellt werden, daß eine Erhöhung der Lactosekonzentration von 100 auf 500 mM auch eine Erhöhung der Ausbeuten um mehr als das Doppelte bewirkt, so daß mit ca. 7% die höchste Produktausbeute (bezogen auf den Akzeptor) bei einer Donorsubstratkonzentration von 500 mM erreicht wurde (**Abb. 23**). Das gleiche gilt für das bei der Reaktion ebenfalls gebildete UDP-Trisaccharid. Dessen Syntheseausbeute (im Diagramm nicht aufgeführt) betrug bei Abbruch der Reaktion 3%. Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Variation des Donorsubstrates (Lactose) bei der enzymatischen Synthese von UDP-Lac und UDP-LacNAc mit der β -Galactosidase aus *B. circulans* gemacht. Hier bewirkte eine Erhöhung der Lactosekonzentration von 50 auf 500 mM eine Ausbeuteerhöhung um das dreifache (Zervosen *et al.* 2001).

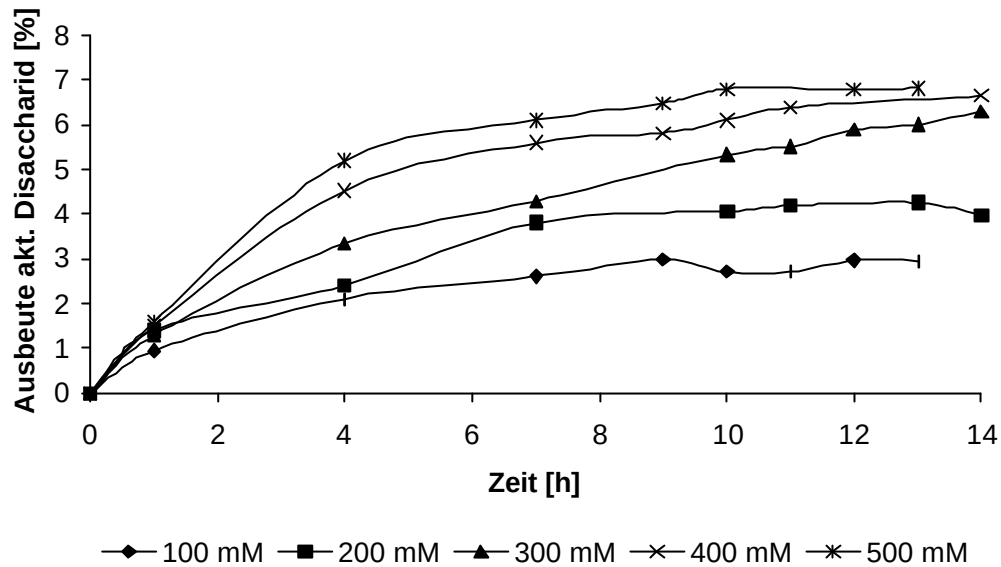


Abb. 23: Zeit-Ausbeute Kurven für die β -Galactosidase aus Stierhoden (Eigenisolat) bei verschiedenen Lactosekonzentrationen. 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM Lactose mit jeweils 100 mM UDP-Glc, 0,32 U/mL β -Galactosidase, 50 mM Citrat-Phosphat Puffer pH 4,3, 30°C.

Es fällt auf, daß im untersuchten Zeitrum von 14 Stunden keine Produkthydrolyse eintritt. Bei der Bildung von UDP-Lac mit der β -Galactosidase aus *B. circulans* setzte bei 30°C die Produkthydrolyse bereits nach ca. 2 Stunden, also unmittelbar nach Erreichen des Synthesemaximums ein (Zervosen *et al.* 2001). Im Vergleich zu dem Enzym aus Stierhoden wurde hierbei allerdings eine um den Faktor 30 höhere Enzymkonzentration eingesetzt. Auch Jourdian und Distler (1973) berichteten von einer schnellen Hydrolyse der Produkte bei Erhöhung um den Faktor 20. Aufgrund der relativ geringen spezifischen Aktivität des Eigenisolats (11 mU/mg) war es nicht möglich die Aktivität so weit zu erhöhen, das diese Beobachtung überprüft werden konnte. In Tests mit 1 U/mL konnte allerdings in dem untersuchten Zeitraum keine Produkthydrolyse beobachtet werden.

Weiterhin ist es denkbar, daß das Enzym aus Stierhoden durch die Reaktionsprodukte Galactose (Hydrolyseprodukt) oder die aktivierten Disaccharide inhibiert wird (Kap. 3.2.3.4 und 3.2.3.5) und die Hydrolyse somit unterdrückt wird.

3.2.3.4 Inhibition durch Galactose

Neben der Transglycosylierung ist die Hydrolyse die Hauptreaktion, welche in einer Reaktion mit Glycosidasen auftritt. Mit Lactose als Donorsubstrat können also neben den gewünschten Transglycosylierungsprodukten auch Glucose und Galactose in der Reaktionslösung auftreten. Distler und Jourdian (1973 und 1978) berichten von Galactose als starken Inhibitor für die β -Galactosidase, Angaben über eine Inhibitionskonstante wurden allerdings nicht gemacht.

In Inhibitionsstudien mit Galactose konnte eine Inhibierung der β -Galactosidase aus Stierhoden durch Galactose festgestellt werden. Die Meßwerte wurden nach dem Modell der kompetitiven Inhibition angepaßt. Mit einem K_I -Wert von 2,6 mM wird das Enzym durch Galactose relativ stark inhibiert (**Abb. 24**).

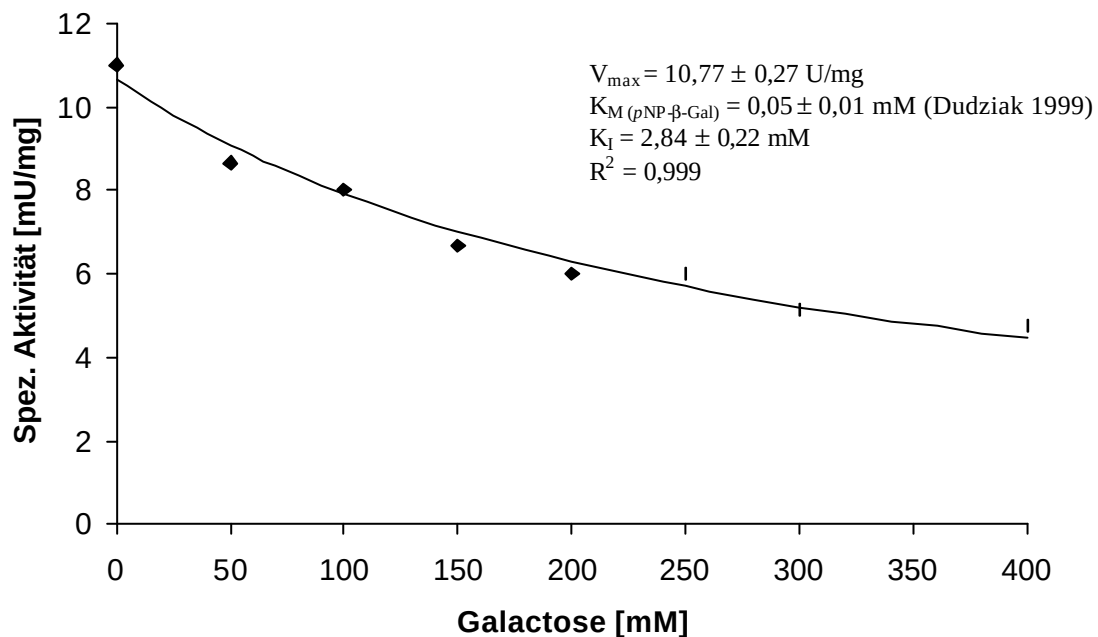


Abb. 24: Inhibition der Hydrolysereaktion der β -Galactosidase aus Stierhoden durch Galactose (30°C; 0,33 U/mL 50 mM Citrat/Phosphat-Puffer).

3.2.3.5 Produktinhibition

Weiterhin wurde untersucht, ob die β -Galactosidase aus Stierhoden durch die gebildeten UDP-Disaccharide inhibiert wird (**Abb. 25** und **Abb. 26**). Eine starke Inhibition würde bedeuten, daß die UDP-Disaccharide sehr gute Substrate für die β -Galactosidase wären und somit auch effizient hydrolysiert werden könnten. Für gute Ausbeuten in Transglycosylierungsreaktionen ist es jedoch notwendig, daß die gebildeten Produkte ein niedrigeres $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Verhältnis aufweisen als der Glycosyldonor (siehe Kap. 1.3.2.1.2).

In **Abb. 25** und **Abb. 26** ist der Einfluß von verschiedenen Konzentrationen an Gal(β 1-X)GlcNAc-UDP, bzw. Gal(β 1-X)Glc-UDP auf die Aktivität der β -Galactosidase aufgeführt. Die Inhibitionskonstanten für die beiden aktivierten Disaccharide sind mit 1,7 mM (Gal(β 1-X)GlcNAc(α 1-UDP) und 0,7 mM (Gal(β 1-X)Glc(α 1-UDP) relativ klein. Eine Hydrolyse dieser Produkte findet dennoch nicht statt (**Abb. 28**, **Abb. 31**).

Die Inhibition durch die Nucleotiddisaccharide wirkt sich demnach auf die Hydrolyseaktivität des Enzyms für den Donor *p*NP- β -Gal aus. Nucleotiddisaccharide und Donorsubstrat (Lactose oder *p*NP- β -Gal) sind also konkurrierende Substrate. Entscheidend für das Auftreten von Produkthydrolyse ist jedoch auch das Verhältnis dieser Substrate zueinander. In diesem Fall ist das Verhältnis von Lactose zu Nucleotiddisaccharid sehr groß, daher ist anzunehmen, daß die Inhibition durch Hydrolyseprodukte der Lactose (Gal, Glc) eher für die erniedrigte Aktivität und Produktausbeute verantwortlich ist als eine Inhibition durch die Nucleotiddisaccharide.

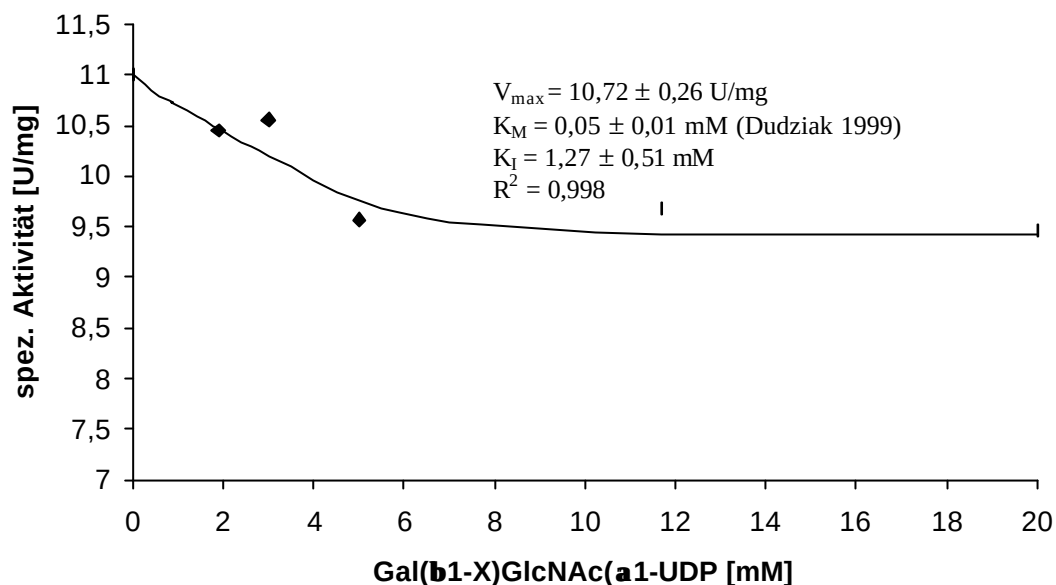


Abb. 25: Inhibierung der Hydrolysereaktion der β -Galactosidase aus Stierhoden durch Gal(β 1-X)GlcNAc-UDP (30°C, 0,33U/mL β -Galactosidase, 50 mM Citrat/Phosphat-Puffer pH 4,3).

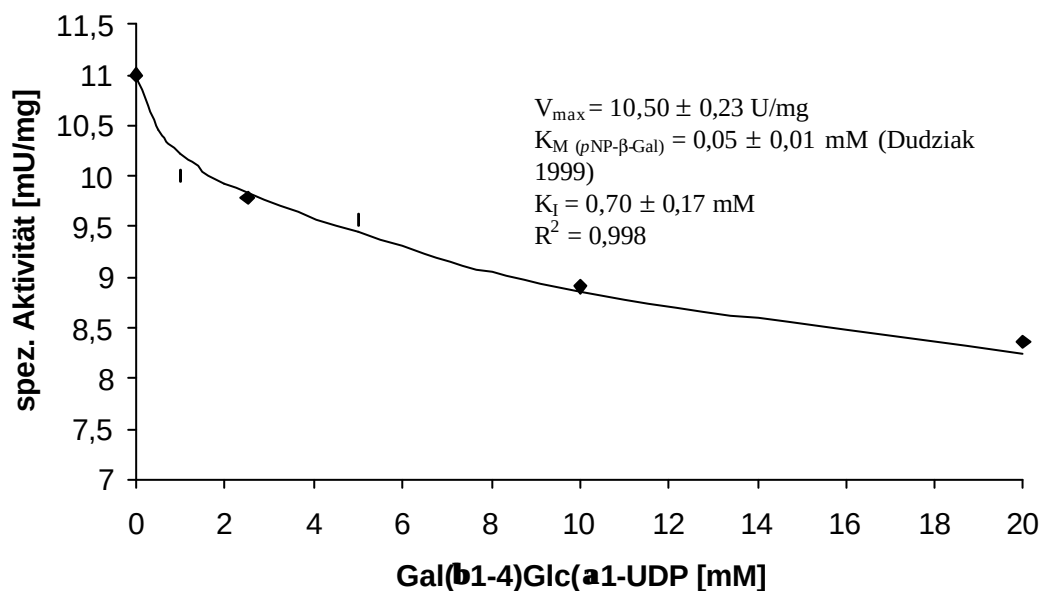


Abb. 26: Inhibierung der Hydrolysereaktion der β -Galactosidase aus Stierhoden durch Gal(β 1-X)Glc-UDP (30°C, 0,33U/mL β -Galactosidase, 50 mM Citrat/Phosphat-Puffer pH 4,3).

3.2.3.6 Akzeptorsubstratspektrum

Zur Überprüfung des Akzeptorsubstratspektrums des Eigenisolates wurden jeweils 100 mM der zu testenden Nucleotidzucker mit 500 mM Lactose 24 Stunden bei 30°C inkubiert und anschließend mit HPLC ② analysiert. Diese HPLC-Methode ist dazu in der Lage Nucleotidzucker aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes zu trennen. Regioisomere können auf diese Art und Weise nicht voneinander getrennt werden. Im Falle des Eigenisolates konnten, im Gegensatz zu den Enzym von Sigma, eindeutig Signale im Nucleotid-Trisaccharidbereich zugeordnet werden (Abb. 27).

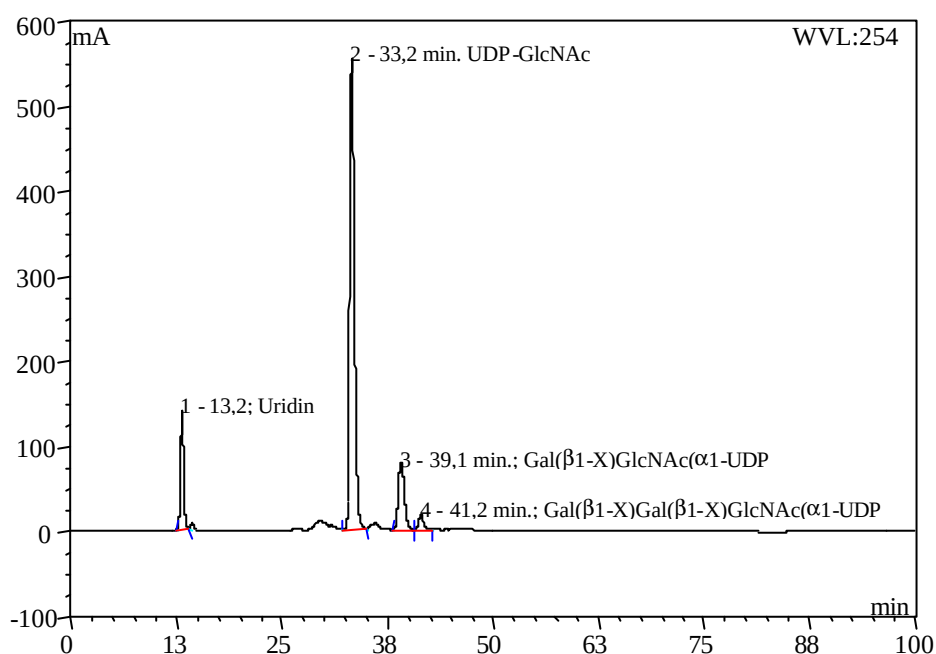


Abb. 27: HPLC ②-Chromatogramm der Reaktionsprodukte mit der β -Galactosidase aus Stierhoden (Eigenisolat) mit UDP-GlcNAc als Akzeptor.

CMP-NeuAc und UDP-GlcA waren keine Substrate für das Eigenisolat (**Tabelle 11**). UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc erwiesen sich als gute Akzeptorsubstrate (14,9%), während UDP-Glc und UDP-Gal relativ geringe Ausbeuten an (6,9 bzw. 2,8%) lieferten.

Tabelle 11: Nucleotidzucker als Akzeptoren von β -Galactosidase aus Stierhoden (Eigenisolat). Ergebnisse der HPLC®-Analyse. Reaktionsansätze: 500 mM Lactose, 100 mM Nucleotidmonosaccharid, 0,33 U/mL β -Galactosidase, 50 mM Citrat/Phosphat Puffer (pH 4,3), Inkubation 14h bei 30°C.

Nucleotidzucker	Ausbeute NDP-Disaccharid [%]	Ausbeute NDP-Trisaccharid [%]
UDP-GlcNAc	14,9	2,2
UDP-Glc	6,9	1,6
UDP-Gal	3,8	4,6
UDP-GalNAc	14,9	1,8
UDP-GlcA	nd ^a	nd ^a
UDP-Xyl	1,9	nd ^a
ADP-Glc	7,7	1,6
GDP-Glc	14,1	3,5
GDP-Man	4,3	0,8
CMP-Neu5Ac	nd ^a	nd ^a

^a Produktbildung wurde nicht detektiert

3.2.3.7 Zeit-Umsatz Kurve bei 30°C und -5°C, Akzeptor: UDP-Glc

Im Hinblick auf eine präparative Synthese wurde die Bildung des aktivierten Disaccharides bei 30°C mit UDP-Glc als Akzeptor über einen längeren Zeitraum hinweg beobachtet. Hierbei sollte auch die Frage geklärt werden, ob eine Produkthydrolyse bei längeren Inkubationszeiten eintritt. **Abb. 28** zeigt den zeitlichen Verlauf der Produktbildung. Die höchsten Ausbeuten an Gal(β 1-X)Glc-UDP (8% Ausbeute bezogen auf den Akzeptor) wurden, wie schon in Kap. 4.2.3.3 beobachtet, nach 14 Stunden erreicht. Nach insgesamt 16 Stunden Inkubationszeit ist eine leichte Abnahme des aktivierten Disaccharides zu beobachten, was einerseits die Hydrolyse des Produktes bedeuten kann, andererseits kann aber auch die Folgereaktion zum aktivierten Trisaccharid beobachtet werden. Nach 26 Stunden Inkubationszeit nähert sich die Ausbeute an aktiviertem Trisaccharid langsam ihrem Maximalwert von 3%.

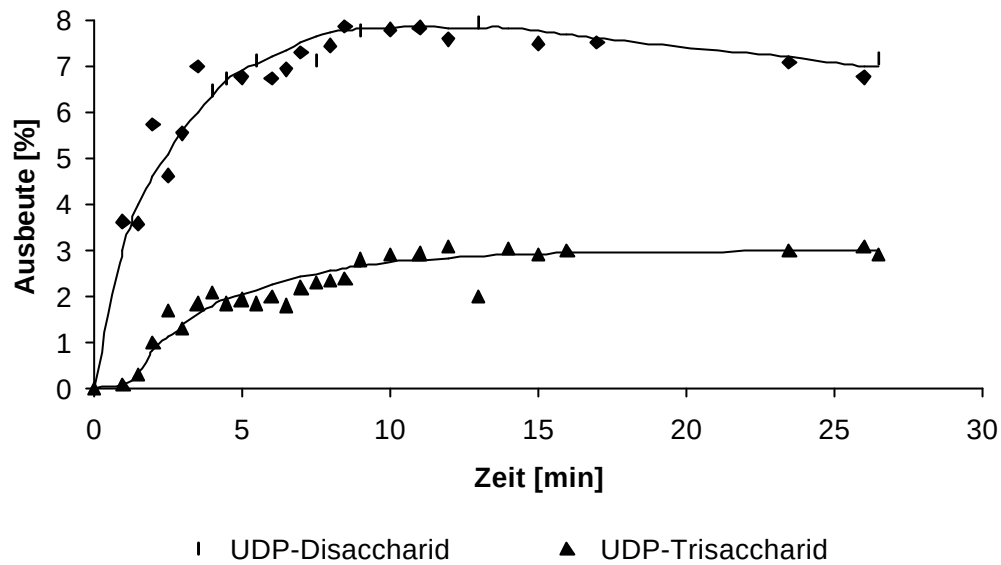


Abb. 28: Zeit-Ausbeute Kurven für die Bildung des UDP-Di- und Trisaccharides (100 mM UDP-Glc, 500 mM Lactose, 0,33 U/mL β -Galactosidase, 50 mM Citrat/Phosphat-Puffer pH 4,3, 30°C).

Bei der Synthese von UDP-LacNAc und UDP-Lac mit der β -Galactosidase aus *B. circulans* konnte eine Steigerung der Ausbeute durch Reaktionsführung bei -5°C erreicht werden (Zervosen *et al.* 2001). Dies wurde auf eine Unterdrückung der Hydrolyse und Erhöhung der Reaktandenkonzentrationen in gefrorenen Lösungen zurückgeführt. Die β -Galactosidase aus Stierhoden vermag zwar auch bei Reaktionen in gefrorenen Lösungen die Synthese von aktivierten Disacchariden zu katalysieren, eine Erhöhung der Ausbeute im Versuchszeitraum konnte jedoch nicht beobachtet werden. Nach 600 Stunden (= 25 Tage) Inkubationszeit wurde die gleiche Ausbeute wie bei 30°C erreicht (**Abb. 29**). Die Ausbeute an aktiviertem Trisaccharid war jedoch im Vergleich zu der Synthese bei 30°C um die Hälfte geringer. Der Effekt des Einfrierens auf die Produktausbeute wird wahrscheinlich erst bei sehr viel höheren Enzymkonzentrationen bemerkbar, wenn die Hydrolyse der Produkte eine Rolle spielt und bei Tieftemperaturen unterdrückt werden kann.

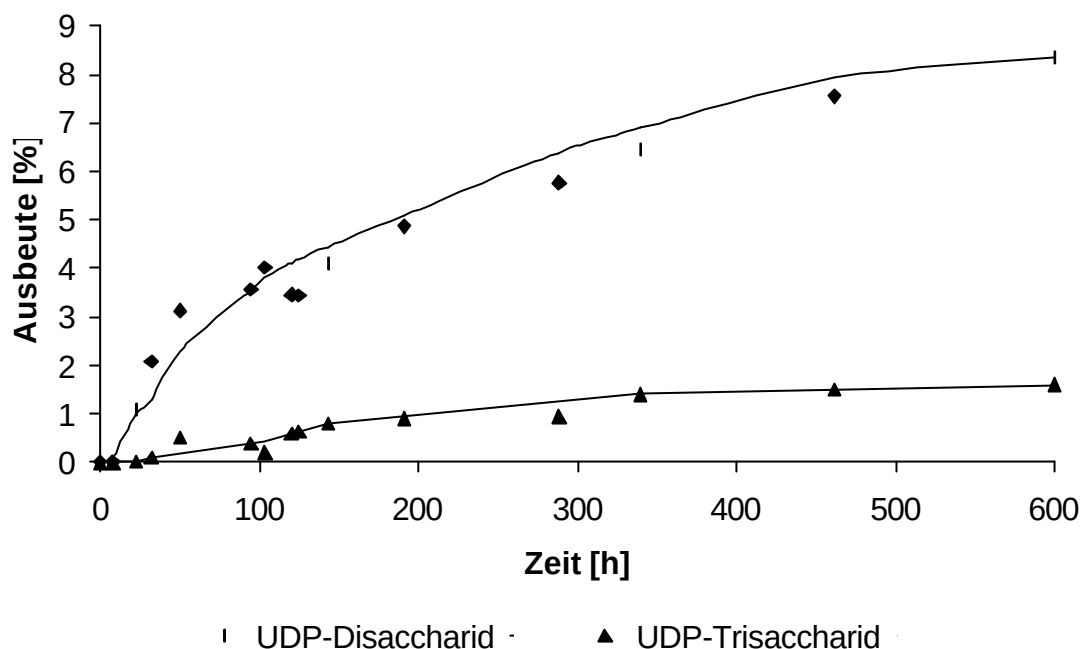


Abb. 29: Zeit-Ausbeute Kurven für die Bildung des UDP-Di- und Trisaccharides bei -5°C (100 mM UDP-Glc, 500 mM Lactose, 0,33 U/mL β -Galactosidase, 50 mM Citrat/Phosphat-Puffer pH 4,3, -5°C).

3.2.3.8 Zeit-Umsatz Kurven bei 30°C , Akzeptor: UDP-GalNAc und UDP-GlcNAc

Im Hinblick auf eine präparative Synthese wurden Zeit-Ausbeute Kurven für UDP-GalNAc und UDP-GlcNAc als Akzeptorsubstrate aufgenommen (**Abb. 30** und **Abb. 31**). Die Ausbeuten liegen mit ca. 15 % im Vergleich zur Reaktion mit UDP-Glc als Akzeptorsubstrat um etwa 7% höher (vgl. **Abb. 28**). Bei beiden Reaktionen wurde das Ausbeutemaximum nach 10 Stunden erreicht, auch hier wurde keine Hydrolyse der Produkte beobachtet.

UDP-Trisaccharide werden mit UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc als Akzeptorsubstraten nur in sehr geringem Ausmaß gebildet (0,5 %). Da in der Reaktion mit UDP-Glc als Akzeptor mit 3 % eine wesentlich höhere Ausbeute an aktiviertem Trisaccharid erreicht wird, kann man davon ausgehen, daß die *N*-Acetylgruppe eine Bildung der Trisaccharide hemmt.

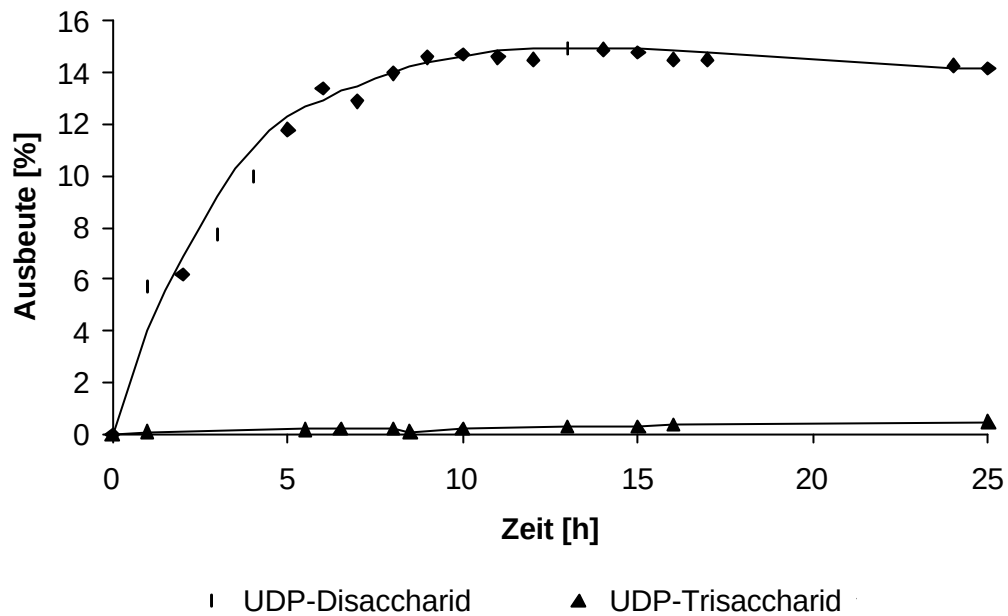


Abb. 30: Zeit-Ausbeute Kurven mit UDP-GalNAc als Akzeptor (100 mM UDP-GalNAc, 500 mM Lactose, 0,33 U/mL β -Galactosidase, 50 mM Citrat/Phosphat-Puffer pH 4,3, 30°C).

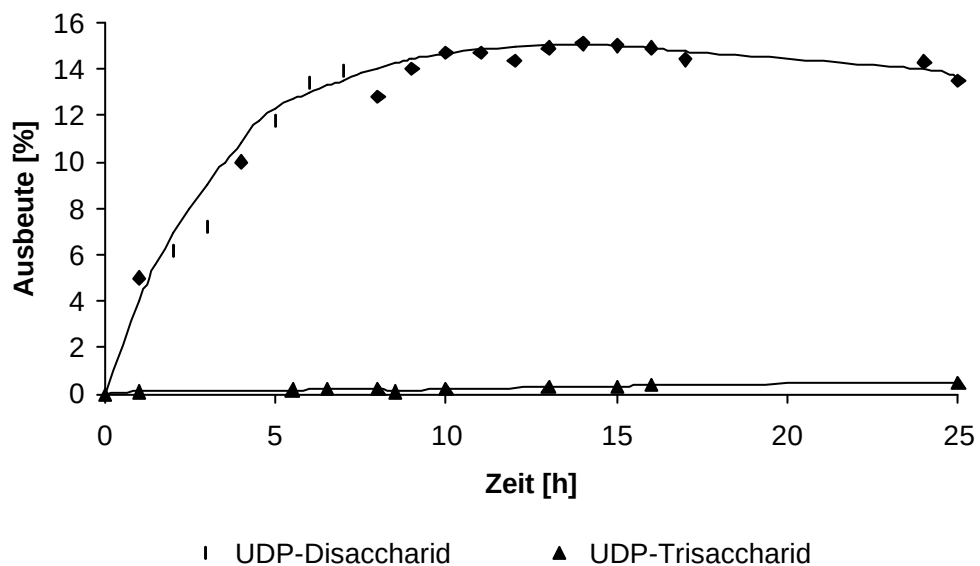


Abb. 31: Zeit-Ausbeute Kurven mit UDP-GlcNAc als Akzeptor (100 mM UDP-GlcNAc, 500 mM Lactose, 0,33 U/mL β -Galactosidase, 50 mM Citrat/Phosphat-Puffer pH 4,3, 30°C).

3.2.4 Präparative Synthese von Gal(**β** 1-X)GlcNAc(**α** 1-UDP

Zur Bereitstellung von Substraten für GlcNAc-Transferasen wurde in einer präparativen Synthese UDP-GlcNAc als Akzeptorsubstrat eingesetzt. Die Synthese erfolgte bei 30°C. Die mit HPLC ② bestimmte Syntheserausbeute an Gal(β 1-X)GlcNAc(α 1-UDP betrug 14,9 % (= 74,5 μ mol).

3.2.4.1 Produktisolierung

Nach Anionenaustauschchromatographie und Gelfiltration konnten 16,8 mg eines aktivierten Disaccharides mit einer Gesamtausbeute von 4,1 % isoliert werden. Die Reinheit des Produktes betrug laut HPLC 90%.

Die Strukturanalyse des Produktes erfolgte mittels MS und NMR. Hierbei sollte vor allen Dingen die Frage der Regioselektivität der Transglycosylierungsreaktion geklärt werden. Das FAB-MS Spektrum (*negative ion mode*) zeigte einen intensiven Peak in der Hochmassenregion bei m/z 767,9, welcher dem $[M-H]^-$ pseudomolekularen Ion der Hex-HexNAc-UDP Struktur entspricht. Die NMR-Daten konnten durch Vergleich mit den Daten von UDP-LacNAc teilweise ausgewertet werden. Somit konnte die Struktur des Hauptproduktes als Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP (UDP-LacNAc) identifiziert werden. Neben der Resonanzen für das (β 1-4) Isomer konnten sowohl im 1D 1H -Spektrum, als auch im TOCSY Spektrum zusätzliche Signale detektiert werden, welche auf die Bildung eines Regioisomers des UDP-LacNAc hinweisen. Über die Art und Menge des Regioisomers können anhand der NMR-Daten jedoch keine Aussagen gemacht werden. Genauere Informationen hierüber könnten Versuche mit Transferasen liefern, welche ausschließlich ein Regioisomer als Akzeptorsubstrat verwenden.

Das Enzym aus Stierhoden wurde bereits in verschiedenen Synthesen eingesetzt, wobei jeweils die (β 1-3)-Isomere bevorzugt gebildet wurden (Gambert 1997a, Gambert 1997b). Ein besonders interessantes Substrat ist hierbei GlcNAc(α 1-OR, welches ein Analogon zu UDP-GlcNAc darstellt.

Auch mit GlcNAc(α 1-OR wurden ausschließlich die (β 1-3)-Isomere gebildet (Gambert 1997a), das Aglycon (R = Allyl, Benzoyl) ist jedoch unterschiedlich zu UDP-GlcNAc.

Anhand der bisherigen Daten für UDP-GlcNAc als Akzeptor kann man davon ausgehen, daß das (β1-4)-Isomer im Vergleich zum (β1-3)-Isomer bevorzugt gebildet wird. Das läßt den Schluß zu, daß nicht nur die anomere Konfiguration des Akzeptors, sondern auch das Nucleotid einen wesentlichen Einfluß auf die Bildung von Regioisomeren hat. Ähnliche Beobachtungen machten Jourdian und Distler (1973). Sie fanden mit UDP-GlcNAc als Akzeptor und pNP-β-Gal als Donor eine Mischung aus (β1-6), (β1-3) und (β1-4) Isomeren im Verhältnis von 1:8:9. Die Bildung des (β1-6)-Isomers kann nicht nachvollzogen werden, da auch hier davon ausgegangen wird, daß das Nucleotid die 6-OH Position des Akzeptors abschirmt und somit eine Übertragung verhindert. Entscheidend ist bei den Ergebnissen von Jourdian und Distler (1973) Ergebnissen aber die Bildung von (β1-3) und (β1-4)-Isomeren mit einer leichten Präferenz für das (β1-4)-Isomer. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, daß das Nucleotid einen Einfluß auf das Regioisomerenverhältnis hat.

3.2.5 Präparative Synthese von Gal(β1-X)Glc(α1-UDP)

Zur Bereitstellung von Substraten für Glucosyl-Transferasen wurde in einer präparativen Synthese UDP-Glc als Akzeptorsubstrat eingesetzt. Die Synthese erfolgte bei 30°C. Die mit HPLC ② bestimmte Syntheseausbeute an Gal(β1-X)Glc(α1-UDP betrug 7,9 % (= 7,9 µmol).

3.2.5.1 Produktisolierung

Nach Anionenaustauschchromatographie und Gelfiltration konnten 18,5 mg eines aktivierten Disaccharides mit einer Gesamtausbeute von 2,4 % isoliert werden. Die Reinheit des Produktes betrug laut HPLC 96%. Durch die Strukturanalyse des Produktes sollte, wie bei der Synthese von Gal(β1-4)Glc(α1-UDP, vor allen Dingen die Frage der Regioselektivität der Transglycosylierungsreaktion geklärt werden.

Das FAB-MS Spektrum (*negative ion mode*) zeigte einen intensiven Peak in der Hochmassenregion bei m/z 727,0, welcher dem $[M-H]^-$ pseudomolekularen Ion der Hex-Hex-UDP entspricht. Die NMR-Daten konnten teilweise durch Vergleich mit den Daten von UDP-Lac ausgewertet werden. Wie bei der Synthese mit UDP-GlcNAc als Akzeptorsubstrat konnte auch bei der Synthese mit UDP-Glc die Bildung der (β1-4)-Isomere detektiert werden.

Neben der Resonanzen für das (β 1-4) Isomer konnten im TOCSY Spektrum (100 ms, Kap. 6.2.7) zusätzliche Signale detektiert werden, welche auf die Bildung eines Regioisomers der UDP-Lac hinweisen. Die Art der Bindung und Menge des Regioisomers konnte jedoch nicht bestimmt werden.

Distler und Jourdian (1973) berichteten von Transglycosylierungsreaktionen mit Glucose als Akzeptor, bei denen das (β 1-4)-Isomer (Lactose) nur einen sehr geringen Anteil der gebildeten Disaccharide ausmachte. Das (β 1-3)-Isomer wurde also bei dem nicht-aktivierten Substrat fast ausschließlich gebildet. Im Vergleich dazu zeigen die hier vorliegenden Ergebnisse, daß mit UDP-Glc als Akzeptor anscheinend die dirigierende Wirkung des Nucleotids ausschlaggebend für die Glycosylierung der 4-OH-Position ist.

3.2.6 Kombination von Glycosidasen mit Glycosyltransferasen

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit der β -Galactosidase aus Stierhoden zeigen, daß bei der Synthese von Nucleotiddisacchariden mit diesem Enzym Regioisomere entstehen. Durch ihre strukturelle Ähnlichkeit ist es sehr schwierig die Regioisomere durch chromatographische Methoden voneinander zu trennen, da sowohl Ladung als auch Molekulargewicht identisch sind. Eine Möglichkeit die beiden Strukturen voneinander zu trennen besteht darin die Glycosidasereaktion mit der Reaktion einer Glycosyltransferase zu koppeln. Dabei macht man sich zu nutze, daß einige Glycosyltransferasen spezifisch für bestimmte Akzeptorstrukturen sind. Bei geeigneter Wahl der Glycosyltransferase ließe sich somit eines der beiden Regioisomere in dem Reaktionsgemisch selektiv glycosylieren. Durch diese Weiterreaktion zum aktivierten Trisaccharid wäre es zum einen möglich das Verhältnis von eventuell gebildeten Regioisomeren zu bestimmen, zum anderen können die Regioisomere aufgrund des unterschiedlichen Molekulargewichts voneinander getrennt werden.

3.2.6.1 Kombination der β -D-Galactosidase aus Stierhoden mit α 2,3-O-Sialyltransferase [EC 2.4.99.4]

Durch die Kombination der β -Galactosidase mit der α 2,3-O-Sialyltransferase wird das (β 1-3) Regioisomer (Gal(β 1-3)GalNAc) selektiv sialyliert (**Abb. 32**). Das (β 1-4)-Isomer dient nicht als Akzeptor und wird somit nicht umgesetzt. Das (β 1-3)-Isomer könnte dann dadurch zurückgewonnen werden, indem die Neuraminsäure durch eine Sialidase abgespalten wird.

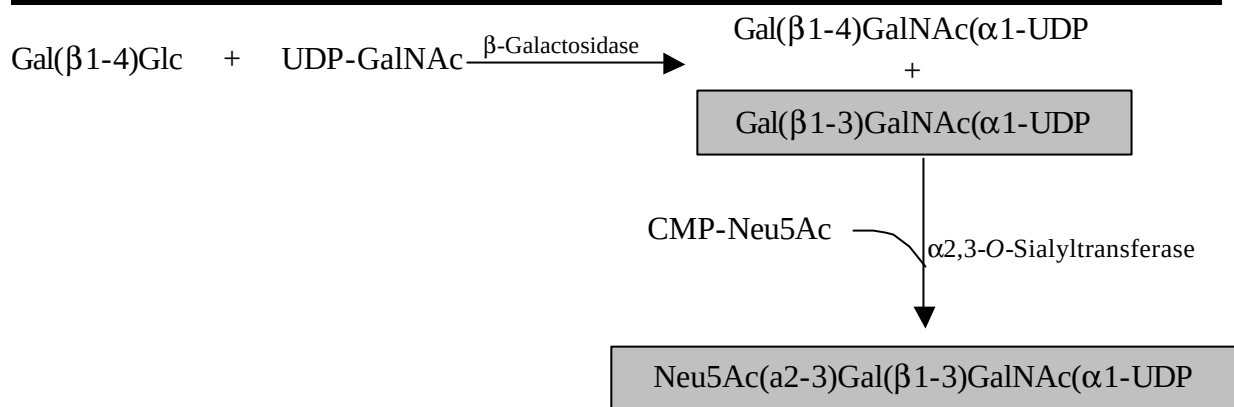


Abb. 32: Kombination von β -Galactosidase aus Stierhoden (kommerzielles Präparat) mit rekombinanter humaner α 2,3-O-Sialyltransferase (E.C. 2.4.99.4) zur Synthese von Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-3)GalNAc (α 1-UDP).

Für diese Versuche wurde eine rekombinante humane α 2,3-O-Sialyltransferase (E.C. 2.4.99.4) von Prof. Clausen, Universität Kopenhagen, zur Verfügung gestellt. Mit UDP-GalNAc als Akzeptorsubstrat der β -Galactosidase (kommerzielles Präparat) wurde in einem Eintopfverfahren Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-3)GalNAc(α 1-UDP mit 27% Ausbeute (bezogen auf das Akzeptorsubstrat UDP-GalNAc) gebildet (**Abb. 33**). Das entstandene Produkt ist ein Analogon des sialylierten Thomsen-Friedenreich-Antigens¹⁶ (Sialyl-TF-Antigen).

Im Bereich der aktivierten Disaccharide konnte ein Peak mit 2,4 % Ausbeute (nach 48 h, bezogen auf UDP-GalNAc) detektiert werden, der dem (β 1-4)-Isomer zugeordnet wurde. Es entstanden somit (β 1-3/ β 1-4)-Regioisomere im Verhältnis 11:1.

¹⁶ T-Antigen: Tumorassoziiertes Antigen, welches mit den Blutgruppen-Antigenen verwandt ist und in Epitheltumoren gebildet wird. Die Herstellung des sialylierten Epitops ist besonders für immunologische Untersuchungen und Gewinnung von künstlichen Antitumor-Impfstoffen von Bedeutung.

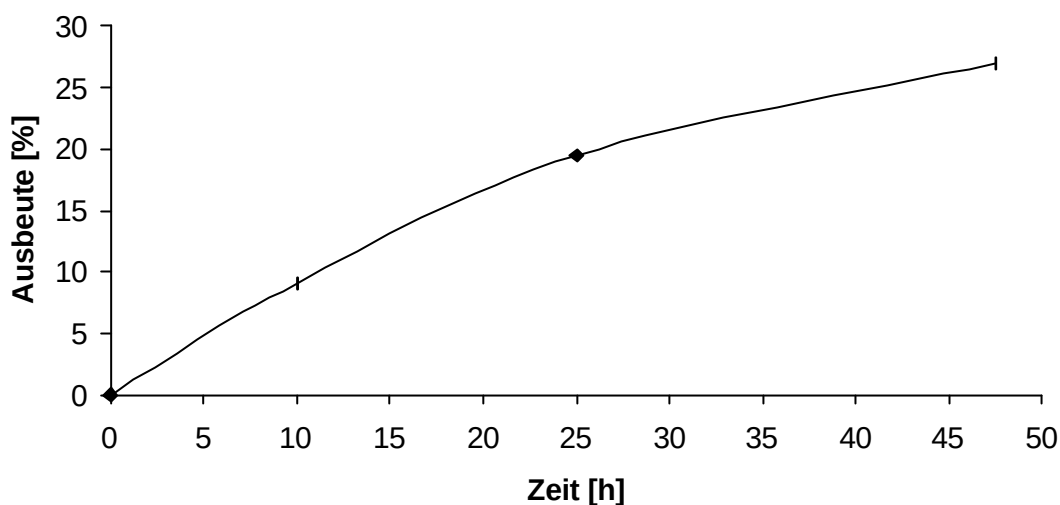


Abb. 33: Bildung von Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-3)GalNAc(α 1-UDP. 500 mM Lactose, 20 mM UDP-GalNAc, 30 mM CMP-Neu5Ac, 0,5 U/mL β -Galactosidase (Sigma), 0,1 U/mL Sialyltransferase, 10 U/mL alkalische Phosphatase, 0,5 mg/mL BSA, MES-Puffer (50 mM, pH 6), 37°C.

Anhand der Ergebnisse der Bestimmung des Akzeptorsubstratspektrums für das kommerzielle Enzym wurde festgestellt, daß mit UDP-GalNAc als Akzeptorsubstrat wahrscheinlich Regioisomere etwa im gleichen Verhältnis entstehen. Die Ergebnisse der Sialyltransferasereaktion scheinen zunächst im Widerspruch zu diesen Beobachtungen zu stehen. Ein Vergleich des zeitlichen Verlaufs der Bildung dieser Regioisomere (**Abb. 30**) mit den Ergebnissen der Sialyltransferasereaktion unterstützt jedoch die Vermutung, daß zunächst nur ein Regioisomer gebildet wird. Das andere Isomer, in diesem Falle das (β 1-4)-Isomer wird zeitversetzt gebildet. Man könnte sich vorstellen, daß in der Eintopfsynthese das zuerst gebildete (β 1-3)-Isomer sofort abgefangen wird. Das Gleichgewicht der Reaktion wird dadurch verschoben und die Bildung des (β 1-4)-Isomers unterdrückt.

Zur weiteren Optimierung der Synthese standen die Sialyltransferase aus Ratte (Calbiochem) und das Eigenisolat der β -Galactosidase aus Stierhoden zur Verfügung. Da CMP-Neu5Ac durch Nebenaktivitäten in der Enzympräparation hydrolysiert wurde, mußte die Synthese in zwei Teile unterteilt werden. Im ersten Schritt (β -Galactosidasereaktion) wurden die aktivierten Disaccharide synthetisiert.

HPLC ②-Analyse ergab eine Ausbeute an aktivierten Disacchariden von 14,6 % bezogen auf den Akzeptor UDP-GalNAc nach 7 Stunden Inkubation. Die Reaktion wurde abgestoppt (95°C, 5 min.) und nach Zugabe von 68 mU/mL Sialyltransferase und 30 mM CMP-Neu5Ac wurde die Reaktionslösung nach 24 Stunden Inkubationszeit mit HPLC ② analysiert (**Abb. 34**). Es konnte eine Syntheseausbeute von 10,2% für das aktivierte Trisaccharid bestimmt werden.

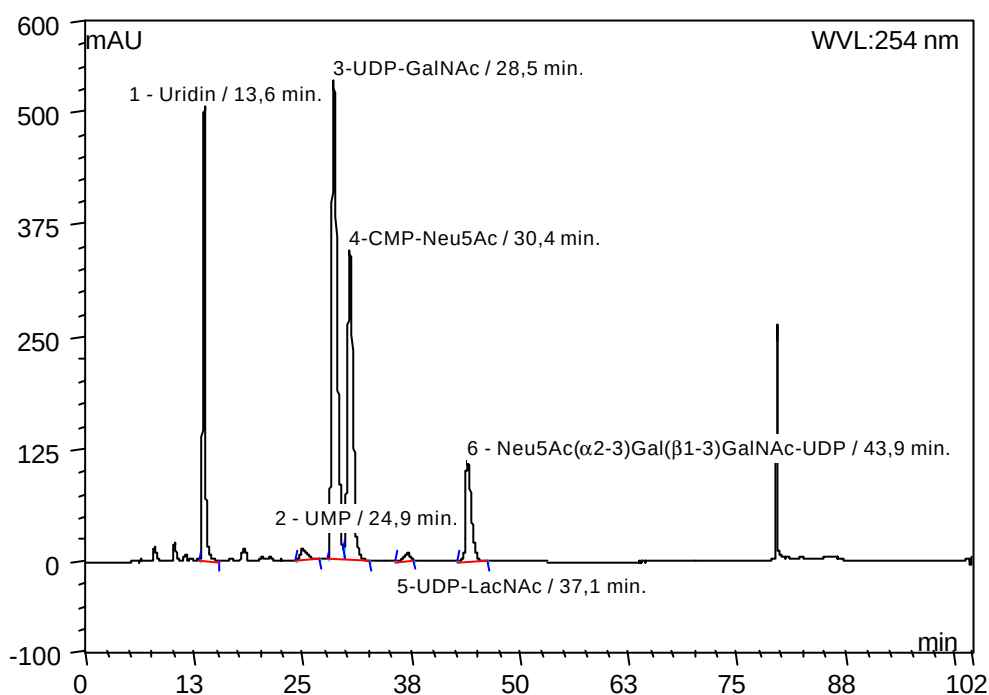


Abb. 34: HPLC ② Chromatogramm der Sialyltransferasereaktion.

Im Disaccharidbereich wurde ein Peak detektiert (4,4% Ausbeute), der sehr wahrscheinlich das (β1-4)-Isomer der aktivierten Disaccharide darstellt und von der Sialyltransferase nicht als Substrat akzeptiert wird. Um diese Vermutung zu bestätigen wurde eine Reaktion mit doppelter Sialyltransferasekonzentration (136 mU/mL) durchgeführt.

In der β-Galactosidasereaktion wurden zunächst 18,7 % aktivierte Disaccharide detektiert. In der darauffolgenden Sialyltransferasereaktion konnten nach 24 Stunden Inkubationszeit 15,6% des Produktes Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-3)GalNAc(α1-UDP festgestellt werden, während das aktivierte Disaccharid Gal(β1-4)GalNAc(α1-UDP zu 5,1 % zurück blieb.

Das (β 1-3)-Isomer liegt somit in einem Überschuß im Verhältnis 3:1 vor. Eine Erhöhung der Trisaccharidausbeute durch Verlängerung der Inkubationszeit um weitere 24 Stunden konnte nicht erreicht werden, vielmehr sank die Ausbeute um ca. 1%, wahrscheinlich durch Zerfall des Produktes.

Mit UDP-GalNAc als Akzeptorsubstrat werden folglich in der β -Galactosidase (Eigenisolat) katalysierten Transglycosylierungsreaktion (β 1-3)/(β 1-4)-Regioisomere im Verhältnis 3:1 gebildet. Im Vergleich zu der Eintopfsynthese mit der β -Galactosidase von Sigma, ist die Ausbeute an dem aktivierten Trisaccharid um fast 50 % niedriger. Ein Grund für die höhere Ausbeute bei der Reaktion mit dem Enzym von Sigma ist die gekoppelte Sialyltransferase-reaktion, durch die das Gleichgewicht der Reaktion auf die Seite der Produkte verschoben wird.

Von einem ähnlichen Reaktionsansatz berichten Køn und Thiem (1995). In einer Eintopfsynthese mit GalNAc als Akzeptorsubstrat der β -Galactosidase aus Stierhoden gelang die Synthese des Sialyl-T-Antigens mit einer Ausbeute von 45% (analytische Ausbeute bezogen auf Neu5Ac). Dabei wurden mit der β -Galactosidase aus Stierhoden ausschließlich die (β 1-3)-Isomere gebildet. Dudziak (1999) konnte ebenso erfolgreich diese Reaktion zur Sialylierung von Gal(β 1-3)GalNAc-Bz einsetzen und beschreibt die kinetische Charakterisierung der α 2,3-O-Sialyltransferase.

Auch Jourdian und Distler (1973) konnten den Einsatz der β -Galactosidase aus Stierhoden mit einer Sialyltransferasereaktion (Ziegen-Kolostrum) koppeln, die mit UDP-GlcNAc als Akzeptor, allerdings unabhängig von (β 1-3)- und (β 1-4)-Isomeren, (α 2-6)-sialylierte Produkte lieferte.

3.2.6.2 Kombination der β -D-Galactosidase aus Stierhoden mit der α 1,3Fucosyltransferase V

Durch die Kombination der β -Galactosidase mit der humanen rekombinanten α 1,3Fucosyltransferase V (α 1,3FucT) aus *Spodoptera frugiperda* könnte das $(\beta$ 1-4)-Isomer (UDP-LacNAc) selektiv fucosyliert werden. Durch diese Weiterreaktion zum aktivierten Trisaccharid wäre es, wie schon bei der Reaktion mit der Sialyltransferase, möglich ein Verhältnis der gebildeten Regioisomere zu bestimmen.

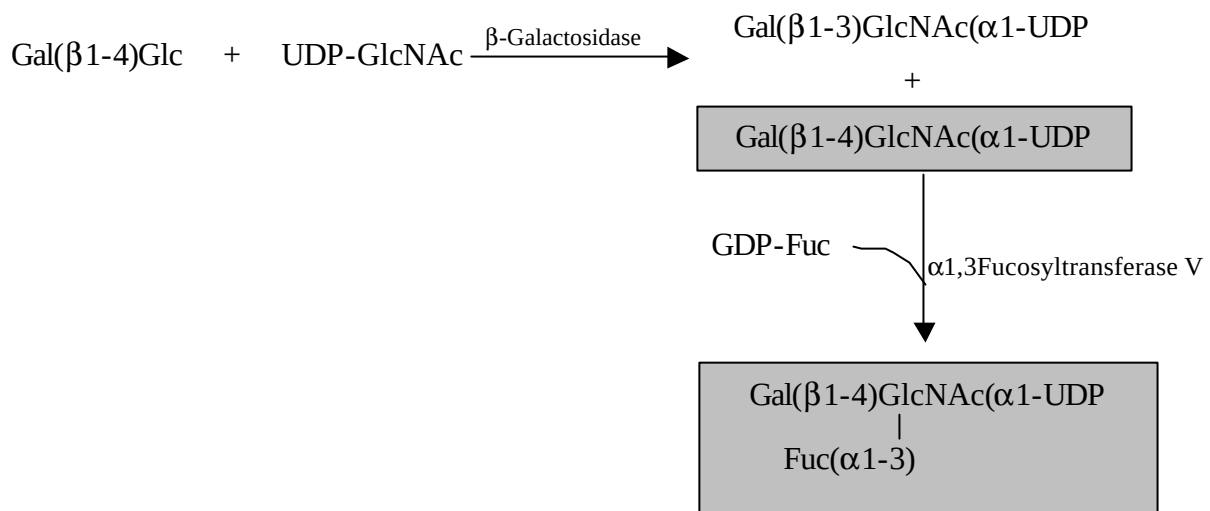


Abb. 35: Kombination von β -Galactosidase aus Stierhoden (Eigenisolat) mit rekombinanter humaner α 1,3Fucosyltransferase V zur Synthese von, Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc (α 1-UDP).

Zunächst wurde getestet, ob die α 1,3FucT UDP-LacNAc als Substrat akzeptiert. Dazu wurde gereinigtes Produkt aus der Reaktion mit der β -Galactosidase aus *B. circulans* eingesetzt. Durch Analyse mit HPLC ② (Kap. 3.12.1.2) konnte nach 6 Stunden Inkubationszeit ein Peak im Trisaccharidbereich detektiert werden. Nach insgesamt 24 Stunden Reaktionszeit war UDP-LacNAc (Ausgangskonzentration: 10 mM) quantitativ zu dem aktivierten Trisaccharid umgesetzt worden. Die α 1,3FucT ist also dazu in der Lage UDP-LacNAc zu fucosylieren. Das somit gebildete Produkt ist ein Analogon des Le^y.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Um zu testen in welchem Verhältnis die Regioisomere bei der Reaktion mit der β -Galactosidase aus Stierhoden mit UDP-GlcNAc als Akzeptor entstehen, wurde zunächst die Reaktion der β -Galactosidase aus Stierhoden (Eigenisolat) durchgeführt. Nach 10 Stunden Inkubationszeit konnten 26,1 % (bezogen auf den Akzeptor UDP-GlcNAc) aktiviertes Disaccharid (HPLC ②) detektiert werden. Von dem entsprechenden aktivierten Trisaccharid konnten 3,5 % (bezogen auf UDP-GlcNAc) nachgewiesen werden.

Der Reaktionsansatz mit der β -Galactosidase aus Stierhoden wurde abgestoppt und die Fucosyltransferase-Reaktion durchgeführt. Nach 10 und 24 Stunden Reaktionszeit konnte ein Peak im Bereich des fucosylierten Trisaccharides festgestellt werden (**Abb. 36**).

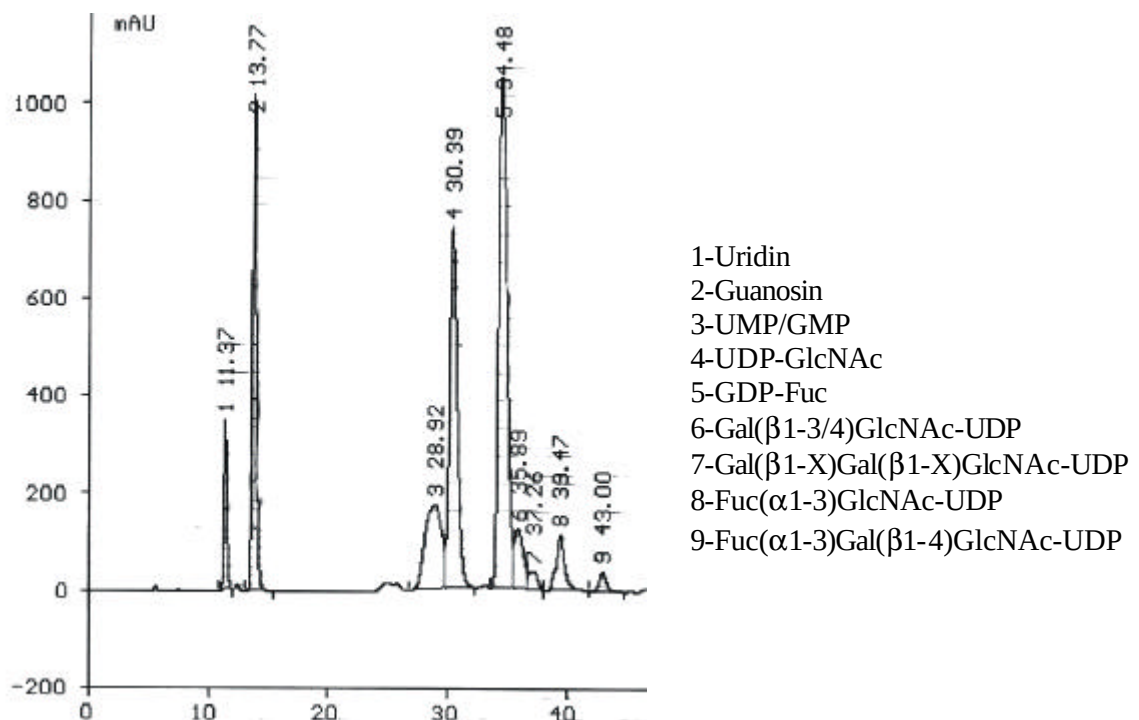


Abb. 36: HPLC ② Chromatogramm des kombinierten Ansatzes von β -Galactosidase aus Stierhoden (Eigenisolat) und der α 1,3Fucosyltransferase V.

Mit 4,8 % Ausbeute (bezogen auf UDP-GlcNAc) wurde laut HPLC-Analysen von dem (β 1-4)-Isomer etwa 2,5 mal weniger gebildet als von dem (β 1-3)-Isomer (16,1% bezogen auf UDP-GlcNAc).

Diese Werte stehen im Widerspruch zu den NMR-Analysen, bei denen für die Synthese mit UDP-GlcNAc als Akzeptor ein Überschuß an (β 1-4)-Isomer festgestellt wurde.

In Anbetracht dieses Ergebnisses stellt sich die Frage, ob die Reaktion der Fucosyltransferase für dieses System überhaupt geeignet ist. Durch die Vielzahl der Reaktanden in der Reaktionslösung können Nebenreaktionen nicht ausgeschlossen werden. So wies u.a. ein *Peak* (vgl. **Abb. 36**) im Bereich eines fucosylierten Disaccharides darauf hin, daß die Fucosyltransferase auch auf UDP-GlcNAc überträgt. Das daraus resultierende aktivierte Disaccharid wurde mit einer Ausbeute von 13 % (bezogen auf UDP-GlcNAc) gebildet. Probleme bei der Durchführung dieser Tests ergaben sich außerdem durch die Hydrolyse von GDP-Fuc und der Inhibition des Enzyms durch das Donorsubstrat ($K_I = 6,2 \mu\text{M}$ mit LacNAc als Akzeptor; Murray *et al.* 1996).

Ähnlich der Reaktion mit UDP-GalNAc als Akzeptor ist auch mit UDP-GlcNAc wahrscheinlich die Reaktionszeit ein wichtiger Faktor bei der Bildung der Regioisomeren. Es wird angenommen, daß der Anteil an (β 1-4)-Isomer bei längeren Inkubationszeiten zunimmt.

3.2.7 Zusammenfassende Diskussion

Es konnte gezeigt werden, daß mit der β -Galactosidase aus Stierhoden (Sigma) die Synthese von nucleotidaktivierten Disacchariden möglich ist. Das Substratspektrum des käuflichen Enzyms wurde getestet. Bei allen getesteten Akzeptorsubstraten außer mit UDP-GlcA, GDP-Man und CMP-Neu5Ac, konnte die Bildung von nucleotidaktivierten Disacchariden detektiert werden. Produktbildung im Bereich der aktivierten Trisaccharide konnte nicht beobachtet werden. Aufgrund der Peakform konnte davon ausgegangen werden, daß bei den Synthesen Regioisomere in etwa gleichem Verhältnis entstanden waren.

Aus wirtschaftlichen Gründen wurde die β -Galactosidase aus Stierhoden aufgereinigt. Es konnten 77 U des Enzyms mit einer spezifischen Aktivität von 11 mU/mg aus Stierhoden isoliert werden. Das entspricht einem Marktwert von ca. 54000,-DM (nach Sigma-Katalog 2000).

Das Eigenisolat wurde auf die Synthese von aktivierten Disacchariden hin getestet. In HPLC-Analysen konnte jeweils mit UDP-GlcNAc, UDP-Glc, UDP-GalNAc, UDP-Gal, UDP-Xyl, ADP-Glc, GDP-Glc und GDP-Man als Akzeptorsubstraten die Bildung von aktivierten Disacchariden nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu dem käuflichen Enzym von Sigma, wurde mit dem Eigenisolat auch die Bildung von aktivierten Trisacchariden detektiert. Das Isolat wurde nach Optimierung der Synthese hinsichtlich pH-Wert, Substratkonzentration, Temperatur und Reaktionszeit zur präparativen Synthese von aktivierten Disacchariden eingesetzt. Als Akzeptorsubstrate dienten dabei UDP-GlcNAc und UDP-Glc. Durch NMR-Analyse der Produkte konnte keine regiospezifische Glycosylierung des Akzeptorsubstrates nachgewiesen werden. Vielmehr konnte die Bildung des (β 1-4)-Isomers bestätigt werden, die Knüpfungsart des zweiten Isomers bleibt unklar, ist aber wahrscheinlich (β 1-3). Hervorzuheben ist aber, daß bei beiden Produkten das (β 1-4)-Isomer bevorzugt gebildet wurde.

UDP-GalNAc wurde in einer gekoppelten Reaktion mit einer α 2,3-O-Sialyltransferase als Akzeptorsubstrat für die β -Galactosidase aus Stierhoden eingesetzt. Die Sialyltransferase überträgt Sialinsäure selektiv auf das (β 1-3)-Isomer, welches somit von dem (β 1-4)-Isomer abgetrennt werden kann. In einer getrennten Synthese mit dem Eigenisolat der β -Galactosidase aus Stierhoden konnte ein Regioisomerenverhältnis von 3:1 mit einem Überschuß des (β 1-3)-Isomeren festgestellt werden. Dieses Isomerenverhältnis steht im Gegensatz zu den Ergebnissen mit UDP-GlcNAc und UDP-Glc als Akzeptoren. Hier wurde laut NMR-Daten das (β 1-4)-Isomer vermehrt gebildet.

Ähnlich dem Ansatz mit UDP-GalNAc wurde UDP-GlcNAc in einer gekoppelten Reaktion mit einer α 1,3Fucosyltransferase als Akzeptorsubstrat für die β -Galactosidase aus Stierhoden eingesetzt. Die Fucosyltransferase überträgt Fucose auf das (β 1-4)-Isomer, welches somit von dem (β 1-3)-Isomer abgetrennt werden kann. Bei diesen Untersuchungen ergab sich ein Überschuß des (β 1-3)-Isomers von 2,5 : 1. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den NMR-Daten, bei denen ein Überschuß an (β 1-4)-Isomer gefunden wurde, so daß es fraglich ist, ob in diesem Fall das gekoppelte Fucosyltransferase-System für die Bestimmung des Regioisomerenverhältnisses geeignet ist.

Generell zeigen sich im Vergleich von käuflichem Enzym (Sigma) und dem Eigenisolat Unterschiede in der Bildung der Produkte. Für das käufliche Enzym wurde keine Bildung von aktivierten Trisacchariden detektiert, während in Synthesen mit dem Eigenisolat diese Folgeprodukte nachgewiesen werden konnten.

Die aktivierten Disaccharide wurden mit dem käuflichen Enzym laut HPLC-Analyse in einem Regioisomerenverhältnis von ca. 1:1 gebildet. Die Produktbildung mit dem Eigenisolat steht im starken Gegensatz dazu. Hier wird in Abhängigkeit vom Akzeptorsubstrat vermehrt (β 1-3) oder (β 1-4)-Isomer gebildet. Möglicherweise werden diese Unterschiede durch die verschiedenen Enzympräparationen hervorgerufen. Hier könnten sich durch unterschiedliche Reinheiten der Enzyme oder auch durch die unterschiedliche Herkunft des Gewebematerials Differenzen ergeben.

3.3 **β -D-Galactosidase aus *Diplococcus pneumoniae***

Die β -Galactosidase aus *Diplococcus pneumoniae* wurde bereits zur Synthese von LacNAc mit pNP- β -Gal als Donorsubstrat eingesetzt. Dabei zeigte das Enzym eine ausgesprochene Spezifität für das (β 1-4)-Isomer (Ajisaka *et al.* 1994).

3.3.1 Substratscreening

In einem ersten Test wurden UDP-Glc, UDP-GlcNAc und UDP-Gal als Akzeptorsubstrate eingesetzt und über einen Zeitraum von 3 Stunden inkubiert. **Abb. 37** zeigt die Ergebnisse der HPLC ②-Analyse. Die drei getesteten Nucleotidzucker konnten als Akzeptorsubstrate eingesetzt werden, wobei die Ausbeute mit UDP-Glc nach drei Stunden Inkubationszeit mit 12% etwa doppelt so hoch war wie mit UDP-Gal (5,9%). Die Ausbeute mit UDP-GlcNAc lag mit maximal 9,6% Ausbeute nach drei Stunden genau zwischen den Ausbeuten der anderen Substrate.

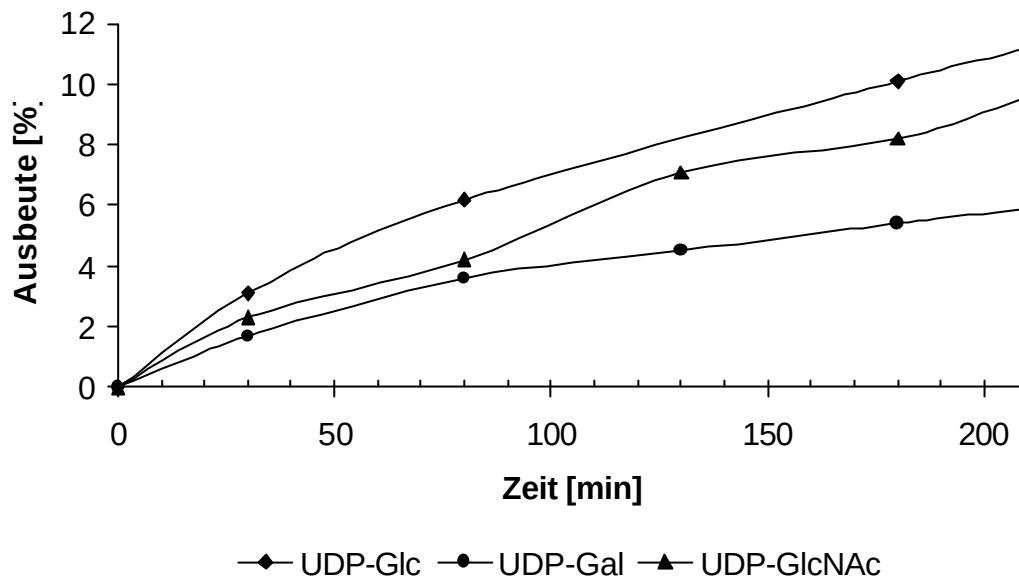


Abb. 37: Zeit-Ausbeute Kurven für die β -Galactosidase aus *Diplococcus pneumoniae* (jeweils 100 mM UDP-Zucker, 500 mM Lactose, 0,7 U/mL β -Galactosidase, 20 mM Na Cacolydat-Puffer pH 6,0, 30°C).

3.3.2 Zeit-Umsatz Kurve

Um die maximale Ausbeute an aktiviertem Disaccharid zu bestimmen wurde UDP-Glc gewählt und eine Zeit-Ausbeute Kurve über einen längeren Zeitraum aufgenommen. **Abb. 38** zeigt die Ergebnisse der HPLC ②-Analyse. Nach ca. 18 Stunden wird die maximale Produktausbeute von 36 % erreicht. Eine Hydrolyse des gebildeten Produktes wurde im untersuchten Zeitraum nicht beobachtet. Die Bildung eines aktivierten Trisaccharids konnte auch detektiert werden, allerdings war die Ausbeute mit 1,8 % nach 24 Stunden sehr gering. Im Vergleich zur β -Galactosidase aus *B. circulans* wurden mit dem Enzym aus *D. pneumoniae* ähnlich hohe Ausbeuten an aktiviertem Disaccharid erhalten, allerdings wurde nicht in gefrorenen Lösungen gearbeitet und es wurde eine um den Faktor 14 niedrigere Enzymkonzentration eingesetzt.

Bei den Reaktionen mit dem Enzym aus Stierhoden wurden vergleichsweise bei einer um die Hälfte niedrigeren Enzymkonzentration (0,3 U/mL) Ausbeuten erzielt, die mit maximal 8% weit unter dem Ausbeutemaximum der β -Galactosidase aus *D. pneumoniae* liegen.

Im Vergleich zu den Reaktionen mit der β -Galactosidase aus *B. circulans* tritt hier innerhalb des untersuchten Zeitraums keine Produkthydrolyse ein. Das kann zum einen daran liegen, daß das Enzym nach so langen Inkubationszeiten an Aktivität verliert oder zum anderen daran, daß das Donorsubstrat/Produktverhältnis so hoch ist, das eine Hydrolyse der Produkte unwahrscheinlich ist.

Die β -Galactosidase aus *D. pneumoniae* katalysiert somit sehr effektiv die Synthese von nucleotidaktivierten Disacchariden. Die nur sehr geringe Bildung von aktivierten Trisacchariden und die ausbleibende Produkthydrolyse sind weiterhin Faktoren, die die hohen Ausbeuten begünstigen.

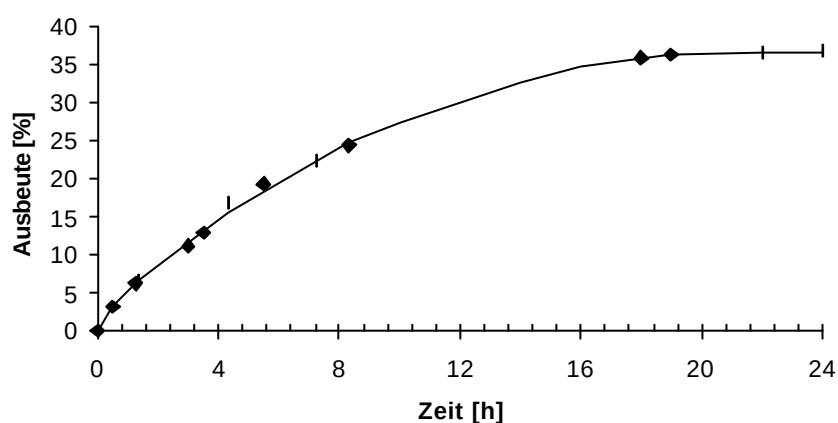


Abb. 38: Zeit-Ausbeute Kurven für die β -Galactosidase aus *Diplococcus pneumoniae* (100 mM UDP-Glc, 500 mM Lactose, 0,7 U/mL β -Galactosidase, 20 mM Na Cacolydat-Puffer pH 6,0, 30°C).

3.4 **β -D-Galactosidase aus *E. coli***

In Synthesen mit der β -Galactosidase aus *E. coli* wurden (β 1-3), (β 1-4) und (β 1-6)- Isomere in Abhängigkeit vom Akzeptorsubstrat beobachtet. Mit GalNAc als Akzeptorsubstrat wurden ausschließlich (β 1-6)-Produkte gebildet (Larsson *et al.* 1987). Mit Gal(β 1-OCH₂CH=CH₂, Gal(β 1-OBn und Gal(β 1-OCH₂CH₂SiMe₃ wurden Mischungen aus (β 1-6) und (β 1-3)-Isomeren gefunden (Nilsson 1988b). Mit GlcNAc als Akzeptorsubstrat hingegen wurden hauptsächlich die (β 1-6)-Isomere gebildet, während die (β 1-3)-Verbindungen mit nur sehr geringen Ausbeuten (<1%) gebildet wurden (Reuter *et al.* 1999).

Die β -Galactosidase aus *E. coli* weist also eine relativ große Spezifität gegenüber (β 1-6)-glycosidischen Bindungen auf. Mit nucleotidaktivierten Zuckern als Akzeptorsubstraten konnte allerdings keine Produktbildung nachgewiesen werden.

Bei den Reaktionen mit der β -Galactosidase aus *B. circulans* wurden ausschließlich (β 1-4)-Isomere gebildet, obwohl bei dem Enzym auch schon die Bildung von (β 1-6)-Bindungen beobachtet wurde. Die Vermutung liegt hier nahe, daß das Nucleotid die 6-OH Position abschirmt und somit eine Glycosylierung dieser Position sterisch nicht möglich ist. Diese Erklärung könnte auch auf die β -Galactosidase aus *E. coli* zutreffen. Das Enzym katalysiert bevorzugt die Glycosylierung der 6-OH Position. Da diese aber vom Nucleotid abgeschirmt ist, kann eine Produktbildung nicht stattfinden.

3.5 **β -D-Galactosidase aus *Aspergillus oryzae***

Ähnlich der β -Galactosidase aus *E. coli* zeigt das Enzym aus *A. oryzae* eine relativ große Spezifität gegenüber (β 1-6)-glycosidischen Bindungen. Mit GalNAc als Akzeptor wurde hauptsächlich das (β 1-6)-Isomer gefunden, während die (β 1-3) und (β 1-4)-Isomere nur im geringen Maße gebildet wurden (Yoon und Ajisaka 1996). Auch mit GlcNAc als Akzeptor konnte hauptsächlich das (β 1-6)-Isomer detektiert werden, andere Isomere wurden gar nicht oder nur in sehr geringen Mengen (<1%) nachgewiesen (Reuter *et al.* 1999).

Mit aktivierten Monosacchariden als Akzeptorsubstraten konnte wie auch schon bei dem Enzym aus *E. coli* keine Bildung von aktivierten Disacchariden nachgewiesen werden. Das ist damit ein weiteres Beispiel für eine β -Galactosidase, die eine hohe Spezifität für die 6-OH Gruppen der Akzeptorsubstrate aufweist, Nucleotidzucker aber nicht glycosylieren kann.

3.6 α -D-Galactosidase aus *Bifidobacterium adolescentis*

Eine gereinigte α -Galactosidase aus *Bifidobacterium adolescentis* (Leder 1999) wurde von Dr. Stefan Marx (Institut für Biotechnologie, RWTH Aachen) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Glycosidase hydrolysiert bevorzugt Gal(α 1-3)Gal-R im Vergleich zu Gal(α 1-6)Gal-R (Leder 1999). In Versuchen zur Transglycosylierung mit Melibiose als Donor und Akzeptor wurden ausschließlich Gal(α 1-6)Gal-R Produkte identifiziert (Van Laere 1999). Mit Raffinose (Gal(α 1-6)Glc(α 1- β 2)Fru) als Substrat wurde Stachyose (Gal(α 1-6)Gal(α 1-6)Glc(α 1- β 2)Fru) und mit Stachyose wurde Verbascose (Gal(α 1-6)Gal(α 1-6)Gal(α 1-6)Glc(α 1- β 2)Fru) gebildet.

3.6.1 Reaktionen mit Gal(α 1-pNP als Donorsubstrat bei 30°C und -5°C

Die Versuche zur Synthese von aktivierten Disacchariden mit Gal(α 1-pNP als Donorsubstrat der α -D-Galactosidase aus *Bifidobacterium adolescentis* schlugen zunächst fehl. Sowohl bei 30°C als auch bei -5°C konnte mit verschiedenen Donorsubstratkonzentrationen keine Bildung von aktivierten Disacchariden nachgewiesen werden.

Da das Enzym mit einer sehr guten Akzeptanz gegenüber Melibiose (Gal(α 1-6)Glc) als Substrat aufweist (Leder *et al.* 1999), wurde dieses Disaccharid als Donorsubstrat getestet.

3.6.2 Reaktionen mit Melibiose als Donorsubstrat bei 30°C und -5°C

In Reaktionen bei 30°C mit verschiedenen Melibiosekonzentrationen konnte die Bildung von Nucleotiddisacchariden nicht nachgewiesen werden. Eine Reaktionsführung bei -5°C hingegen war erfolgreich. Mit 300 mM Melibiose und einer Enzymkonzentration von 0,5 U/mL konnte die Bildung von nucleotidaktivierten Disacchariden mit Ausbeuten von 2,5% (bezogen auf UDP-Glc nach 14 Tagen) und 3,5% (bezogen auf UDP-Gal nach 20 Tagen) festgestellt werden (**Abb. 39**).

Eine Reaktionsführung bei -5°C scheint also in diesem Fall eine Hydrolyse der Produkte zu verhindern und somit eine Synthese von aktivierten α -glycosydisch geknüpften Disacchariden zu ermöglichen.

3.6.3 Optimierung der Enzymkonzentration

Mit einer Erhöhung der Enzymkonzentration auf das 12fache auf 6 U/mL konnte die Ausbeute mit UDP-Glc als Akzeptor auf 11,5% nach 22 Tagen gesteigert werden. Bei beiden getesteten Enzymkonzentrationen trat eine Hydrolyse der Produkte innerhalb des untersuchten Zeitraumes nicht ein (**Abb. 39**). Auch eine Bildung von aktivierten Trisacchariden konnte nicht beobachtet werden.

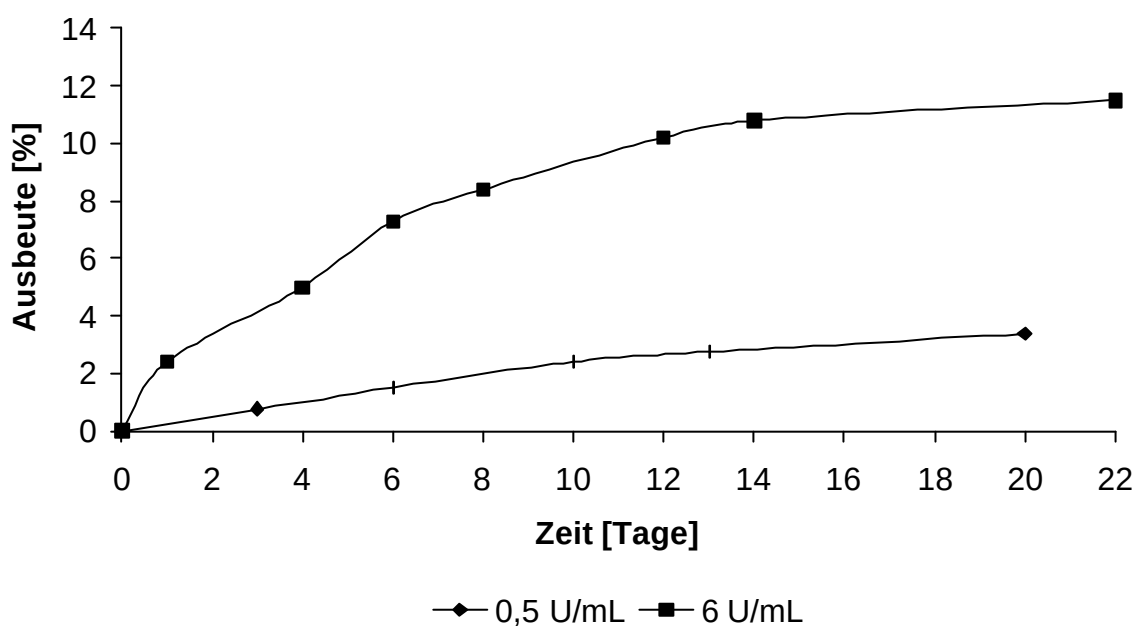


Abb. 39: Bildung von Gal(α 1-3)Glc(α 1-UDP mit α -Galactosidase aus *B. adolescentis*. 100 mM UDP-Glc, 300 mM Melibiose, 50 mM Citrat-Phosphat Puffer pH 6,0; 0,5 und 6 U/mL α -Galactosidase, -5°C.

3.6.4 Optimierung der Donorsubstratkonzentration

Der Einfluß der Donorsubstratkonzentration auf die Ausbeute an Gal(α 1-X)Glc(α 1-UDP bei -5°C wurde untersucht. Dazu wurden 100, 300 und 500 mM Melibiose eingesetzt. Wie in **Abb. 40** gezeigt, hat eine hohe Donorsubstratkonzentration einen negativen Einfluß auf die Produktbildung. Im Vergleich zu Untersuchungen mit den β -Galactosidasen aus *B. circulans* und aus Stierhoden, bei denen eine Erhöhung der Donorkonzentration eine Erhöhung der Ausbeuten bewirkte, sind bei der α -Galactosidase die Ausbeuten bei 500 mM um die Hälfte geringer (3,3 % nach 34 Tagen) als bei 100 mM Melibiose (6,8% nach 34 Tagen).

Melibiose stellt ein sehr gutes Akzeptorsubstrat für die α -Galactosidase aus *B. adolescentis* dar. Bei hohen Konzentrationen findet daher eine bevorzugte Transglycosylierung auf das Donorsubstrat statt. Bei niedrigen Donorkonzentrationen (100 mM) ist hingegen die Wahrscheinlichkeit größer, daß auch eine Übertragung auf den aktivierten Akzeptor stattfindet, da hier das Donor/Akzeptor-Verhältnis bei 1:1 liegt.

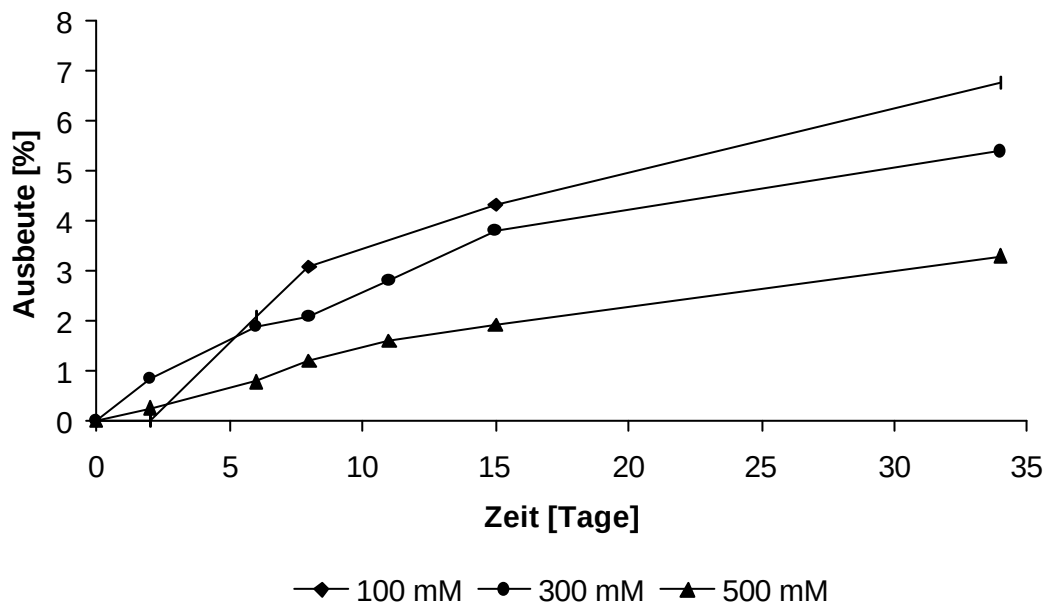


Abb. 40: Donorsubstratabhängigkeit der Ausbeute von Gal(α 1-X)Glc(α 1-UDP (100 mM UDP-Glc, 300 mM Melibiose, 50 mM Citrat-Phosphat Puffer pH 6,0, 0,5 und 6 U/mL α -Galactosidase, -5°C).

3.6.5 Akzeptorsubstratspektrum

Das Substratspektrum der α -Galactosidase aus *B. adolescentis* wurde parallel getestet. Dazu wurden jeweils 100 mM der getesteten Nucleotidzucker mit 500 mM Melibiose und 0,5 U/mL α -Galactosidase *B. adolescentis* 21 Tage bei -5°C inkubiert und anschließend mit HPLC ② analysiert. **Tabelle 12** faßt die Ergebnisse des Screenings zusammen.

Tabelle 12: Nucleotidzucker als Akzeptoren der α -Galactosidase aus *B. adolescentis* (500 mM Melibiose, 100 mM Nucleotidmonosaccharid, 0,5 U/mL α -Galactosidase, 50 mM Citrat/Phosphat Puffer pH 6, 21 Tage bei -5°C).

Donorsubstrat	Ausbeute [%]
UDP-GlcNAc	--
UDP-Glc	2,7
UDP-Gal	2,6
UDP-GalNAc	--
UDP-GlcA	--
UDP-Xyl	--
ADP-Glc	2,4
GDP-Man	--
CMP-Neu5Ac	--

Die α -Galactosidase aus *B. adolescentis* zeigte eine sehr geringe Akzeptanz gegenüber Nucleotidzuckern als Akzeptorsubstraten. Nur UDP-Glc, UDP-Gal und ADP-Glc konnten als Substrate nachgewiesen werden, dabei scheint das Nucleotid keinen signifikanten Einfluß auf die Akzeptanz auszuüben. Eine *N*-Acetylierung an der C-2 Position der Glucose oder Galactose hat hingegen zur Folge, daß diese Substrate nicht mehr umgesetzt werden können.

3.6.6 Präparative Synthese von Gal(α 1-X)Glc(α 1-UDP)

Eine präparative Synthese von Gal(α 1-X)Glc(α 1-UDP wurde bei -5°C durchgeführt. Nach 21 Tagen Reaktionszeit wurde die Reaktion abgestoppt. Die Analyse mit der HPLC-Methode ② ergab eine Ausbeute von 5,5 % (Ausbeute bezogen auf das Akzeptorsubstrat).

3.6.6.1 Produktisolierung

Nach Abtrennung der Nucleotidzucker von den ungeladenen Zuckern durch Anionenaustauschchromatographie und anschließender Gelfiltration konnten 7,3 mg (9,4 μ mol) des aktivierten Disaccharids mit einer Gesamtausbeute von 4,7% isoliert werden. Die Reinheit des Produktes laut HPLC ②-Analyse betrug 100%. MS- und NMR-Analysen ergaben, daß eine Übertragung von Galactose ausschließlich auf die 3-OH Gruppe der UDP-Glucose stattgefunden hat, das Produkt konnte also eindeutig als Gal(α 1-3)Glc(α -UDP identifiziert werden.

Die α -Galactosidase aus *B. adolescentis* zieht hinsichtlich ihrer Hydrolyseaktivität die (α 1-3)-Isomere den (α 1-6)-Isomeren vor, mit Melibiose als Substrat wurden aber ausschließlich (α 1-6)-Produkte identifiziert (Van Laere 1999). Die 6-OH Position des Akzeptorsubstrates ist wie schon in Kap. 4.1.5, 4.4 und 4.6 diskutiert durch die Abschirmung durch das Nucleotid wahrscheinlich sterisch so gehindert, daß eine Übertragung nicht stattfinden kann. Somit findet eine regioselektive Transglycosylierung auf die 3-OH-Position der UDP-Glc statt.

3.6.7 Präparative Synthese von Gal(α 1-X)Gal(α 1-UDP

Eine präparative Synthese von Gal(α 1-X)Gal(α 1-UDP wurde bei -5°C durchgeführt. Nach 12 Tagen Reaktionszeit wurde die Reaktion abgestoppt. Die Analyse mit der HPLC-Methode ② ergab eine Ausbeute von 5,8 % (Ausbeute bezogen auf das Akzeptorsubstrat).

3.6.7.1 Produktisolierung

Nach Abtrennung der Nucleotidzucker von den ungeladenen Zuckern durch Anionenaustauschchromatographie und anschließender Gelfiltration konnten 4,1 mg (5,3 μ mol) des aktivierten Disaccharids mit einer Gesamtausbeute von 3,3% isoliert werden. Die Reinheit des Produktes laut HPLC ②-Analyse betrug 100%. Die strukturelle Charakterisierung des Produktes konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Da aber das Enzym eine Präferenz für die 3-OH-Position zeigt, und eine selektive Übertragung auf diese Position im Falle der UDP-Glc gezeigt werden konnte, wird davon ausgegangen, daß auch im Falle von UDP-Gal die OH-3-Position glycosyliert wurde.

3.7 **α -D-Galactosidase aus grünen Kaffeebohnen**

In Transglycosylierungsversuchen mit der α -Galactosidase aus grünen Kaffeebohnen wurde festgestellt, daß dieses Enzym eine Knüpfung von (α 1-6)-Bindungen bevorzugt katalysiert. Mit Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1-SEt als Akzeptor wurde neben dem (α 1-3)-Isomer hauptsächlich das (α 1-6)-Produkt gebildet (Vic *et al.* 1996).

In Versuchen mit Nucleotidzuckern als Akzeptorsubstraten konnten keine Transglycosylierungsprodukte nachgewiesen werden. Wie bereits für die β -Galactosidasen aus *E. coli* und *A. oryzae* ausgeführt, ist dies auf eine sterische Hinderung der 6-OH Position zurückzuführen. Somit konnten nicht nur für verschiedene β -Galactosidasen, sondern auch für α -Galactosidasen Beispiele gefunden werden, bei denen das Nucleotid des Akzeptorsubstrates eine essentielle Rolle bei der Regioselektivität der Transglycosylierungsreaktion zu spielen scheint. Mit dem Enzym aus *B. adolescentis* wurden wegen der postulierten sterischen Hinderung der 6-OH Position ausschließlich (α 1-3)-Isomere gebildet, während in Reaktionen mit der α -Galactosidase aus grünen Kaffeebohnen keine Reaktionsprodukte nachgewiesen werden konnten.

3.8 ***b*-N-Acetylhexosaminidasen [EC 3.2.1.30]**

In Synthesen von Glykokonjugaten mit *β*-N-Acetylhexosaminidasen aus verschiedenen Quellen (*Aspergillus oryzae*, *Chamelea gallina*, *Nocardia orientalis*, *jack beans* und *Bacillus circulans*) wurde die Bildung von (β1-2), (β1-3), (β1-4) und (β1-6) Regioisomeren beschrieben. Wie auch bei den *β*-Galactosidasen hängt es von der Art und der anomeren Konfiguration des eingesetzten Akzeptorglycosids ab, welches der Produkte überwiegend oder auch ausschließlich gebildet wird.

Ausschließlich (β1-4) Produkte wurden mit dem Enzym aus *Aspergillus oryzae* bei der Synthese von GalNAc(β1-4)Glc(α1-4)Glc(β1-SEt (Singh *et al.* 1998) und mit 90%igem Überschuß bei der Synthese von GalNAc(β1-4)GlcNAc(α1-OMe (Crout *et al.* 1992) gebildet.

Das (β1-6)-Isomer hingegen erhielten sowohl Singh *et al.* (1996) bei der Synthese von GlcNAc (β1-6)GalNAc und GalNAc (β1-6)GalNAc, als auch Nilsson (1990) mit dem Enzym aus *Chamelea gallina* mit Gal(α1-OMe als Akzeptor. Das Enzym aus *Aspergillus oryzae* ist weiterhin in der Lage in einer thermodynamisch kontrollierten Reaktion die Bildung von GlcNAc(β1-6)GlcNAc zu katalysieren (Rajanochová *et al.* 1997).

Eine Mischung aus (β1-3/4)-Isomeren konnte mit den Enzym aus *Aspergillus oryzae* mit Glc (β1-4)Glc(β1-SEt und Glc (β1-6)Glc(β1-SEt (Singh *et al.* 1998) als Akzeptorsubstraten erhalten werden. Nilsson (1990) erhielt (β1-3/6)-Isomere mit Gal(β1-OMe als Akzeptor. Mit dem Enzym aus *Nocardia orientalis* wurden die Regioisomere GlcNAc(β1-3/4/6)Gal(β1-4)Glc(β1-OMe erhalten (Matahira *et al.* 1995). Mit dem gleichen Enzym wurden die Regioisomere Gal(β1-3)[GlcNAc (β1-6)]GalNAc(β1-OpNP und GlcNAc(β1-3/6)Gal(β1-4)GalNAc(β1-OpNP synthetisiert (Murata *et al.* 1997, Murata *et al.* 1998).

Die Hexosaminidasen aus *jack beans* und *Bacillus circulans* liefern durch reverse Hydrolyse Mischungen aus GlcNAc (β1-2)Man GlcNAc (β1-6)Man (Fujimoto *et al.* 1997).

Vom Arbeitskreis von Prof. Dr. Kæn (Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prag) wurden gereinigte *β*-N-Acetylhexosaminidasen aus *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus tamaraii*, *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium oxalicum* und *Aspergillus oryzae* für ein Screening zur Verfügung gestellt. Diese Enzyme wurden im Rahmen einer Diplomarbeit von Herrn Michael Kutzer untersucht.

3.8.1 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Die geringe Löslichkeit der Donorsubstrate in wässrigen Puffersystemen erwies sich als großes Problem bei den kinetisch kontrollierten Reaktionen. Die maximale Löslichkeit von *p*NP- β -GlcNAc bei Raumtemperatur beträgt 15 mM (Fluka-Katalog 1999/2000 und eigene Untersuchungen), während die von *p*NP- β -GalNAc nur 11 mM beträgt (eigene Untersuchungen).

Die Bildung von aktivierten Disacchariden, sowohl bei 30°C als auch bei -5°C, konnte mit diesen geringen Donorsubstratkonzentrationen nicht beobachtet werden. Es wurde daher versucht die Löslichkeit der Substrate zu verbessern.

3.8.1.1 Löslichkeit von GlcNAc- β -*p*NP und GalNAc- β -*p*NP in organischen Lösungsmitteln

Als Lösungsvermittler in enzymkatalysierten Reaktionen können organische Lösungsmittel dienen. Die β -Galactosidase aus *E. coli* wurde zum Beispiel erfolgreich in einem Wasser/Acetonitril-Gemisch eingesetzt (Usui *et al.* 1993). Weiterhin wurde eine *endo*- β -*N*-acetylglucosaminidase aus *Arthrobacter protophormiae* erfolgreich in Lösungsmitteln (30% Aceton, 30% DMSO, 20 % DMF) eingesetzt (Fan *et al.* 1995).

Der Zusatz von organischen Lösungsmitteln, wie z.B. 20% Aceton, 20% Acetonitril oder 40% tert.-Butanol konnte die Löslichkeit der *p*NP-Substrate steigern (60 mM *p*NP-GlcNAc , 15 mM *p*NP-GalNAc in 30% tert-Butanol). Die Enzyme behielten ihre hydrolytische Aktivität bei den angegebenen Lösungsmittelkonzentrationen, jedoch konnte in Vorversuchen mit kommerziellen β -*N*-Acetylhexosaminidasen aus *Aspergillus oryzae* und *jack beans* eine Bildung von aktivierten Disacchariden nicht beobachtet werden.

Die Löslichkeit von *p*NP- β -GlcNAc in 40% tert.-Butanol betrug 70 mM. Sowohl bei einer Reaktionsführung bei 30°C, als auch bei -5°C konnte eine Bildung von aktivierten Disacchariden nicht nachgewiesen werden.

3.8.1.2 Löslichkeit von GlcNAc(β 1-*p*NP und GalNAc(β 1-*p*NP mit Cyclodextrinen als Löslichkeitsvermittlern

Alternativ wurde der Einsatz von Cyclodextrinen als Lösungsvermittler untersucht. Cyclodextrine und ihre methylierten Derivate bilden Einschlußverbindungen und spielen damit eine wichtige Rolle als Carrier-Moleküle für instabile oder schlecht wasserlösliche Substanzen (Aree *et al.* 1999). Anfang der 90er Jahre wurden erstmals enzymatische Synthesen mit Cyclodextrinen als Lösungsvermittler publiziert (Otero *et al.* 1991; Woerdenbag *et al.* 1990).

Unter dem Begriff Cyclodextrine¹⁷ versteht man ringförmige Oligosaccharide, die aus 6 bis 12 (α 1-4)-verknüpften Glucoseeinheiten zusammengesetzt sind. Die häufigsten Cyclodextrine besitzen 6, 7 bzw. 8 Glucoseeinheiten und werden als α -, β - bzw. γ -Cyclodextrine bezeichnet (Saenger 1980). Die primären und sekundären Hydroxylgruppen der Cyclodextrine lassen sich durch eine Vielzahl funktioneller Gruppen ersetzen. Derivatisierungen werden vorgenommen, um die Löslichkeit oder das Komplexiervermögen der Cyclodextrine zu verändern (Wenz 1994). Durch ihre Fähigkeit wasserlösliche Einschlußverbindungen zu bilden sind Cyclodextrine dazu in der Lage ansonsten wasserunlösliche Stoffe in Lösung zu bringen. Die einzige Bedingung scheint zu sein, daß die Gastmoleküle ganz oder teilweise in den Hohlraum der Cyclodextrine passen müssen.

Von uns wurden vier verschiedene Cyclodextrine getestet. Da die methylierten Derivate der Cyclodextrine in der Regel stärker komplexieren als ihre unsubstituierten Analoga (Casu *et al.* 1979), wurde neben β -Cyclodextrin ein 2,6-dimethyliertes Cyclodextrin (Heptakis-(2,6-di-*O*-methyl)- β -cyclodextrin) verwendet. Weiterhin stand ein Hydroxypropylderivat des β -Cyclodextrins zur Verfügung, und mit γ -Cyclodextrin wurde eine größere Kavität angeboten. Die Löslichkeit von *p*NP- β -GlcNAc konnte in 200 mM Dimethyl- β -Cyclodextrin um den Faktor 6,5 (90 mM) gesteigert werden, während die Löslichkeit von *p*NP- β -GalNAc um den Faktor 6 (63 mM) gesteigert wurde. Das β -Cyclodextrin und Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin konnten die Löslichkeit der *p*NP-Substrate nur leicht steigern, während das γ -Cyclodextrin keine Verbesserung brachte.

¹⁷ Cyclodextrine sind auch unter der Bezeichnung „Schardinger-Dextrine“ bekannt.

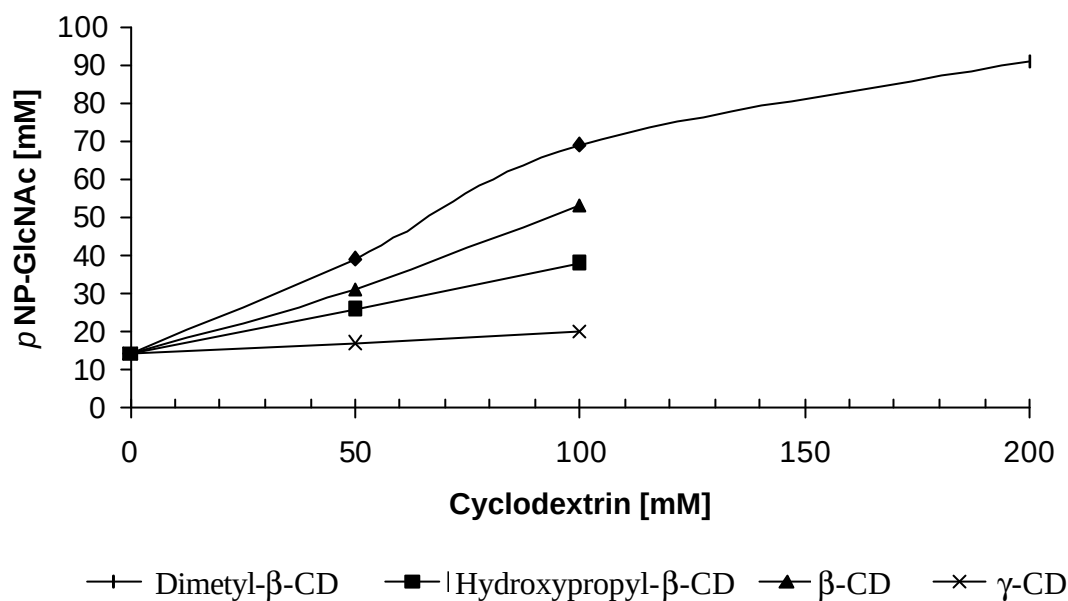


Abb. 41: Löslichkeit von *p*NP-β-GlcNAc in verschiedenen cyclodextrinhaltigen Lösungen (50 mM NaH₂PO₄/NaOH-Puffer pH 6,5, Raumtemperatur).

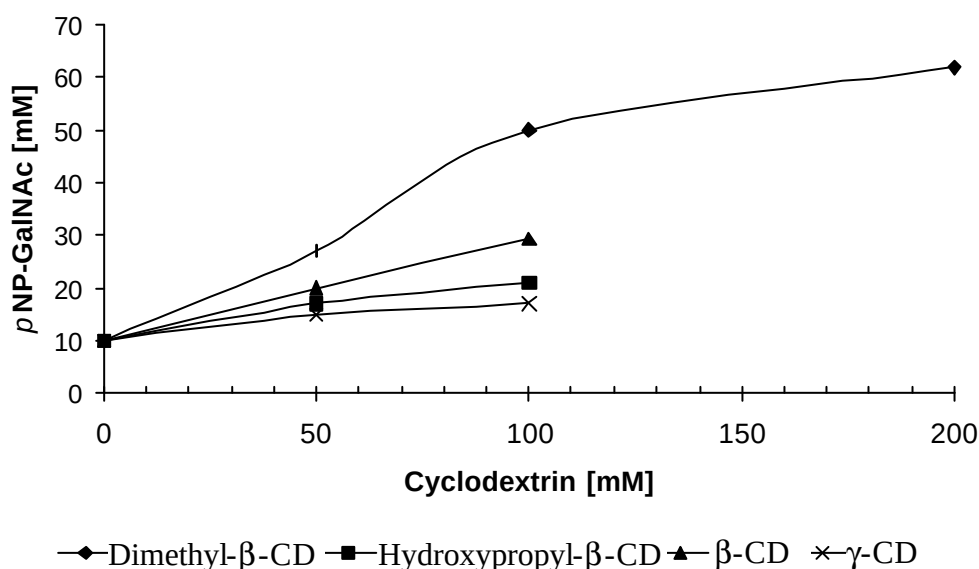


Abb. 42: Löslichkeit von *p*NP-β-GalNAc in verschiedenen cyclodextrinhaltigen Lösungen (50 mM NaH₂PO₄/NaOH-Puffer pH 6,5, Raumtemperatur).

Im weiteren Verlauf wurde daher mit 200 mM Dimethyl- β -Cyclodextrin als Lösungsvermittler gearbeitet. Aktivitätstests der β -*N*-Acetylhexosaminidasen in Anwesenheit von Dimethyl- β -Cyclodextrin zeigten, daß die Substrate auch in Gegenwart des Cyclodextrins für die Enzyme zugänglich waren.

3.8.1.3 Aktivität der β -*N*-Acetylhexosaminidasen in Heptakis-(2,6-Di-*O*-Methyl)- β -Cyclodextrin-haltigen Lösungen

Der Einfluß von 200 mM Dimethyl-Cyclodextrin auf die Aktivitäten der β -*N*-Acetylhexosaminidasen wurde getestet. Aus **Tabelle 13** läßt sich entnehmen, daß der Zusatz von 200 mM Cyclodextrin bei Substratkonzentrationen, die im Sättigungsbereich der Enzyme liegen, deren Aktivität steigert. Diese Aktivitätssteigerung könnte darin begründet sein, daß das Cyclodextrin nicht nur das Donorsubstrat einlagert und damit solubilisiert, sondern auch mögliche Inhibitoren und sie damit für die Enzyme unzugänglich macht.

Tabelle 13: Aktivitäten der β -*N*-Acetylhexosaminidasen bei verschiedenen Substratkonzentrationen mit und ohne Zugabe von Heptakis-(2,6-Di-*O*-Methyl)- β -Cyclodextrin (0,5; 14 und 90 mM *p*NP- β -GlcNAc; 0 und 200 mM Heptakis(2,6-Di-*O*-Methyl)- β -Cyclodextrin; 50 mM Na₂HPO₄/NaOH-Puffer pH 6,5; 30°C 10 min.).

Enzymquelle	Volumenaktivität [U/mL]		
	14 mM		90 mM
	0 M CD	0,2 M CD	0,2 M CD
<i>Trichoderma harzianum</i>	0,12	0,13	0,23
<i>Aspergillus flavus</i>	0,14	0,16	0,27
<i>Aspergillus tamaraii</i>	0,32	0,37	0,38
<i>Aspergillus flavipes</i>	0,23	0,34	0,36
<i>Aspergillus parasiticus</i>	0,47	0,61	0,64
<i>Penicillium oxalicum</i>	0,21	0,21	0,29
<i>Aspergillus oryzae</i>	0,68	0,86	0,90

* CD = Heptakis(2,6-Di-*O*-Methyl)- β -Cyclodextrin

3.8.1.4 Enzymstabilität

Die Stabilität der β -N-Acetylhexosaminidasen in dem gewählten Puffersystem wurde überprüft. **Tabelle 14** zeigt, daß die Aktivität der Enzyme um maximal 26 % (*A. tamaraii*) nach 24 Stunden abgenommen hat. Das System ist also für lange Inkubationszeiten geeignet.

Tabelle 14: Restaktivitäten der β -N-Acetylhexosaminidasen bei pH 6,5 nach 24 Stunden Inkubationszeit (200 mM Dimethyl-Cyclodextrin, 50 mM Na₂HPO₄-Puffer pH 6,5, 30°C, Aktivitätstest Kap. 3.10.3).

Enzymquelle	relative Aktivität [%]	
	0 Stunden	24 Stunden
<i>Trichoderma harzianum</i>	100	90
<i>Aspergillus flavus</i>	100	88
<i>Aspergillus tamaraii</i>	100	74
<i>Aspergillus flavipes</i>	100	88
<i>Aspergillus parasiticus</i>	100	91
<i>Penicillium oxalicum</i>	100	92
<i>Aspergillus oryzae</i>	100	92

3.8.2 Substratscreening

Das Substratscreening wurde in 200 mM Dimethyl-Cyclodextrin mit 90 mM *p*NP- β -GlcNAc, bzw. 63 mM *p*NP- β -GalNAc als Donorsubstraten und jeweils UDP-Glc, UDP-GlcNAc und UDP-Gal als Akzeptorsubstraten durchgeführt.

Tabelle 15: Ausbeuten an aktivierten Disacchariden bei dem Enzymscreening mit β -*N*-Acetylhexosaminidasen (100 mM Akzeptor, 200 mM Dimethyl- β -Cyclodextrin, 90 mM *p*NP- β -GlcNAc bzw. 63 mM *p*NP- β -GalNAc, 50 mM NaH₂PO₄/NaOH Puffer pH 6,5, 30°C, 14 h; *Aspergillus parasiticus*: 0,64 U/mL, *Aspergillus flavus*: 0,27 U/mL, *Penicillium oxalicum*: 0,29 U/mL, *Trichoderma harzianum*: 0,23 U/mL, *Aspergillus flavipes*: 0,36 U/mL, *Aspergillus tamarii*: 0,38 U/mL, *Aspergillus oryzae*: 0,90 U/mL) Ausbeuten bezogen auf das Akzeptorsubstrat.

Akzeptor	<i>p</i> NP- b -GlcNAc	<i>p</i> NP- b -GalNAc
<i>Aspergillus parasiticus</i>		
UDP-Glc	--	--
UDP-GlcNAc	2,0%	4,0%
UDP-Gal	--	--
<i>Aspergillus flavus</i>		
UDP-Glc	--	--
UDP-GlcNAc	nicht getestet	nicht getestet
UDP-Gal	nicht getestet	nicht getestet
<i>Penicillium oxalicum</i>		
UDP-Glc	--	--
UDP-GlcNAc	0,7%	7,0%
UDP-Gal	--	--
<i>Trichoderma harzianum</i>		
UDP-Glc	--	0,4%
UDP-GlcNAc	1,9%	22,0%
UDP-Gal	--	1,0%
<i>Aspergillus flavipes</i>		
UDP-Glc	--	1,4%
UDP-GlcNAc	0,9%	1,9%
UDP-Gal	--	--
<i>Aspergillus tamarii</i>		
UDP-Glc	--	--
UDP-GlcNAc	2,0%	1,9%
UDP-Gal	--	--
<i>Aspergillus oryzae</i>		
UDP-Glc	--	--
UDP-GlcNAc	--	--
UDP-Gal	--	--

-- = keine Produktbildung

Tabelle 15 zeigt, daß es mit fünf der getesteten Hexosaminidasen (*Aspergillus parasiticus*, *Penicillium oxalicum*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus flavus* und *Aspergillus tamarii*) gelang nucleotidaktivierte Disaccharide durch eine Transglycosylierungsreaktion zu synthetisieren. Dabei waren *p*NP- β -GalNAc und UDP-GlcNAc die bevorzugten Substrate.

Da in diesem ersten Test die Enzyme aus *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium oxalicum* und *Trichoderma harzianum* die höchsten Ausbeuten lieferten, wurden sie für Aufnahme von Ausbeute-Zeit Kurven ausgewählt. Also Donorsubstrate dienten dabei sowohl *p*NP- β -GalNAc als auch *p*NP- β -GlcNAc, als Akzeptor wurde UDP-GlcNAc eingesetzt. Über einen Zeitraum von 8 Stunden wurden den Ansätzen Proben entnommen und mit HPLC ① analysiert. **Abb. 43** und **Abb. 44** zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchungen. Mit beiden Donorsubstraten wurden die höchsten Ausbeuten mit dem Enzym aus *Trichoderma harzianum* erreicht. Mit *p*NP- β -GalNAc wurde GalNAc(β 1-X)GlcNAc(α 1-UDP (22% nach 8 Stunden) erzielt. Bei der Bildung von GlcNAc(β 1-X)GlcNAc(α 1-UDP erreichte man mit allen drei Enzymen ungefähr die gleichen Ausbeuten (1,3 – 1,9 % nach 5 Stunden), wobei auch hier der höhere Wert mit dem Enzym aus *Trichoderma harzianum* gebildet wird.

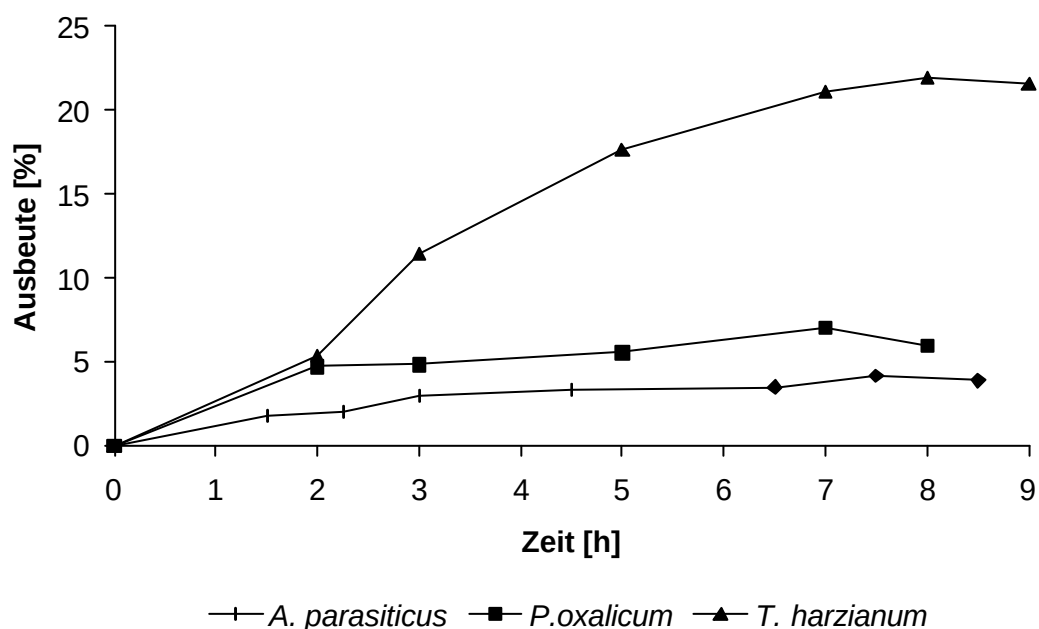


Abb. 43: Zeitlicher Verlauf der Bildung von GalNAc(β 1-X)GlcNAc(α 1-UDP (63 mM *p*NP-GalNAc, 100 mM UDP-GlcNAc, 200 mM Dimethyl-Cyclodextrin, *A. parasiticus* : 0,64 U/mL, *P. oxalicum*: 0,29 U/mL, *T. harzianum*: 0,23 U/mL 50 mM NaH₂PO₄/NaOH-Puffer pH 6,5, 30°C, Ausbeuten bezogen auf Akzeptor-substrat).

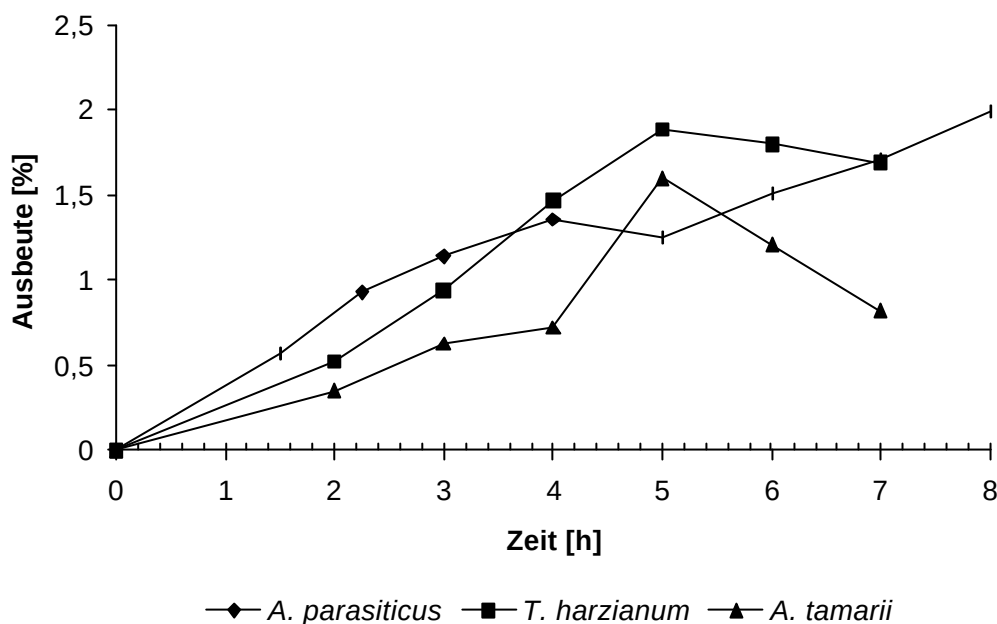


Abb. 44: Zeitlicher Verlauf der Bildung von GlcNAc(β 1-X)GlcNAc(α 1-UDP (90 mM *p*NP-GlcNAc, 100 mM UDP-GlcNAc, 200 mM Dimethyl-Cyclodextrin, *A. parasiticus* : 0,64 U/mL, *A. tamarii*: 0,38 U/mL, *T. harzianum*: 0,23 U/mL 50 mM NaH₂PO₄/NaOH-Puffer pH 6,5, 30°C, Ausbeuten bezogen auf Akzeptor-substrat).

Eine schnell einsetzende Produkthydrolyse war nicht zu beobachten, was wahrscheinlich auf die relativ geringen Enzymkonzentrationen im Reaktionsansatz zurückzuführen ist.

Eine Reaktionsführung bei Tieftemperaturen gelang nicht, da der Reaktionsansatz bei -5°C und -10°C aufgrund der hohen Dimethyl-Cyclodextrinkonzentration nicht gefrieren konnte. Bei -20°C war der Reaktionsansatz zwar vollständig gefroren, jedoch betrug die Ausbeute an aktiviertem Disaccharid nach 10 Tagen Inkubationszeit weniger als 1%. Für eine weitere Untersuchung der Tieftemperaturreaktion waren diese Inkubationszeiten zu lang, daher wurde der Ansatz nicht weiter verfolgt.

3.8.3 β -D-N-Acetylhexosaminidase aus *Trichoderma harzianum*

Für weitere Untersuchungen wurde die β -N-Acetylhexosaminidase aus *Trichoderma harzianum* herangezogen, da mit diesem Enzym in den Vorversuchen die höchsten Ausbeuten erhalten werden konnten.

3.8.3.1 pH-Optimum

Das pH-Optimum der β -D-N-Acetylhexosaminidase aus *Trichoderma harzianum* wurde bestimmt. Dazu wurde in einem pH-Bereich von 3-7 gearbeitet. Das pH-Optimum des Enzyms liegt, wie sich aus **Abb. 45** entnehmen lässt, zwischen 4 und 5,5. In den vorangegangenen Versuchen wurde in Anlehnung an Literaturdaten für die β -N-Acetylhexosaminidase aus *Aspergillus oryzae* ein pH-Wert von 6,5 gewählt (Singh *et al.* 1996). Bei diesem pH-Wert ist die Aktivität des Enzyms allerdings im Vergleich zum pH-Optimum um 15% geringer. In weiteren Versuchen wurde daher ein pH-Wert von 5 gewählt.

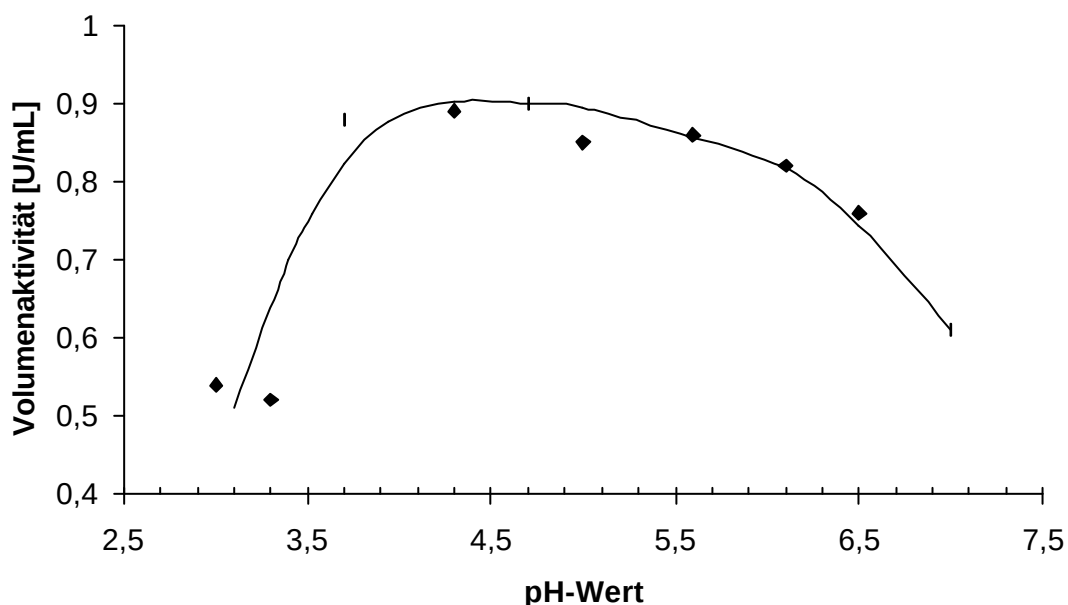


Abb. 45: pH-Optimum der β -N-Acetylhexosaminidase aus *Trichoderma harzianum* (Aktivitätstest siehe Kap 3.10.3, 50 mM Na₂HPO₄/NaOH-Puffer pH 3-7, 30°C).

3.8.3.2 Michaelis-Menten Kinetik

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurde eine Michaelis-Menten Kinetik mit pNP- β -GalNAc als Substrat mit 0 und 200 mM Dimethyl-Cyclodextrin bei pH 5,0 aufgenommen.

Die K_M -Werte, die bei den Messungen mit und ohne Zugabe von 200 mM Dimethyl-Cyclodextrin mit dem Programm „Scientist“ bestimmt wurden, kann man im Rahmen der Meßungenauigkeit als gleich ansehen ($K_M = 3,4$ bzw. $3,2$ mM; **Abb. 46**). Die Affinität des Substrates zum Enzym wird folglich durch Dimethyl-Cyclodextrin nicht beeinflusst. Unterschiede hingegen lassen sich bei den V_{max} -Werten feststellen. Der V_{max} -Wert für die Reaktion ohne Zugabe von 200 mM Cyclodextrin liegt mit $0,17$ U/mL um ca. 40 % niedriger als der Wert mit Cyclodextrin ($0,27$ U/mL; **Abb. 46**). Dieses Ergebnis bestätigt die Werte, welche für den Einfluß von Cyclodextrin auf die Aktivität der β -*N*-Acetylhexosaminidasen (Kap. 4.8.1.3) gemessen wurden. Auch hier konnte beobachtet werden, daß die Enzymaktivität bei Zusatz von Dimethyl-Cyclodextrin höher ist. Ein direkter Vergleich der Meßreihen ist allerdings nur bis zu einer Substratkonzentration von ca. 10 mM möglich, da das Substrat darüber hinaus ohne den Zusatz von Löslichkeitsvermittlern in wäßrigen Systemen nicht löslich ist. Die bei dieser Konzentration höhere Enzymaktivität könnte durch die Komplexbildung von Inhibitoren hervorgerufen werden. Als Inhibitoren in Glycosidase-katalysierten Reaktionen kommen generell Hydrolyseprodukte, in diesem Fall GalNAc, oder auch Transglycosylierungsprodukte in Frage. Dies wurde im Folgenden überprüft.

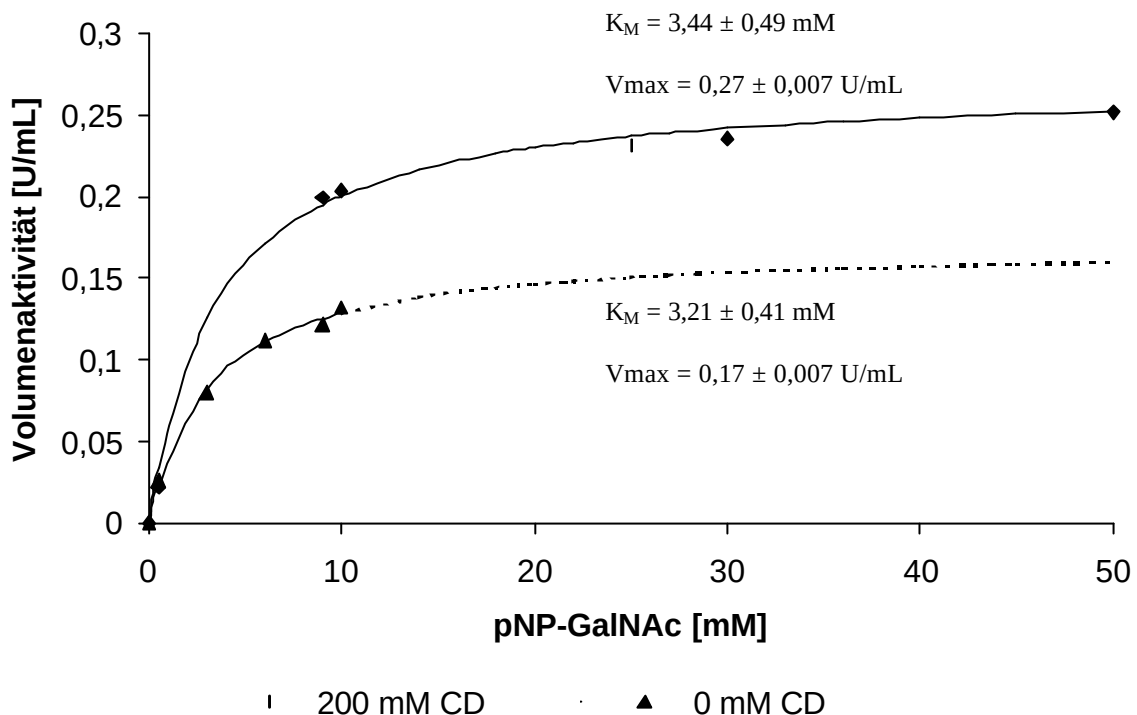


Abb. 46: Michaelis-Menten Kinetik der β -N-Acetylhexosaminidase aus *Trichoderma harzianum* (pNP- β -GalNAc 0-50 mM, 0,23 U/mL β -N-Acetylhexosaminidase, 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaOH}$ -Puffer pH 5, 30°C).

3.8.3.3 Inhibition durch GalNAc

GlcNAc wurde bereits als Inhibitor für die β -N-Acetylhexosaminidase aus *A. oryzae* identifiziert ($K_I = 1,6 \text{ mM}$; Rajnochová *et al.* 1997).

Bei der Reaktion mit pNP- β -GalNAc als Donorsubstrat entstehen nicht nur Transglycosylierungsprodukte, sondern es wird auch durch Hydrolyse des Substrates GalNAc freigesetzt. Der Effekt von GalNAc auf die hydrolytische Aktivität der β -N-Acetylhexosaminidase aus *Trichoderma harzianum* wurde aus diesem Grund getestet.

Dabei wurden zwei Testansätze, jeweils mit und ohne Zusatz von 200 mM Cyclodextrin, angesetzt. Aus **Abb. 47** kann man entnehmen, daß GalNAc ein Inhibitor für die Hexosaminidase ist. Im Testansatz ohne Zusatz von Dimethyl-Cyclodextrin konnte eine starke Inhibition des Enzyms mit einem K_I von 0,21 mM festgestellt werden.

Im Vergleich dazu ist die Inhibition im Testansatz mit 200 mM Cyclodextrin mit einer Inhibitionskonstanten von 1,19 um den Faktor 5,7 geringer als in dem Ansatz ohne Zugabe von Cyclodextrin. Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, daß durch den Zusatz von Cyclodextrinen Inhibitoren, in diesem Falle GalNAc, in der Reaktionslösung abgefangen werden, das Enzym somit nicht mehr inhibiert wird und die Aktivität höher ist.

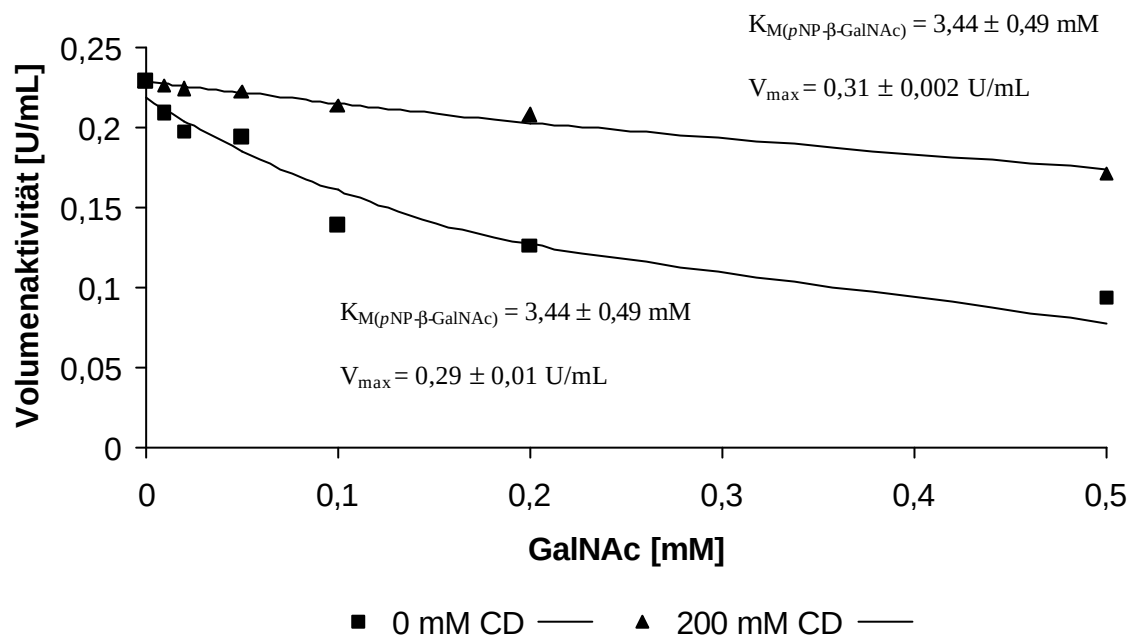


Abb. 47: Inhibition der β -N-Acetylhexosaminidase aus *Trichoderma harzianum* mit GalNAc (GalNAc: 0-5 mM, 10 mM pNP - β -GalNAc, 50 mM $NaH_2PO_4/NaOH$ -Puffer pH 6,5, 30°C) 100% entsprechen 0,23 U/mL.

3.8.3.4 Erweiterung des Substratspektrums

In weiteren Versuchen wurde das Akzeptorsubstratspektrum der β -N-Acetylhexosaminidase aus *Trichoderma harzianum* untersucht (**Tabelle 16**). Die Analyse mit HPLC-Methode ② zeigte nur eine geringe Umsetzung mit UDP-Glc, UDP-Gal und UDP-GalNAc von 0,4, 1,0 und 0,8% nach 8 h Reaktionszeit. Alle anderen Substrate wurden von dem Enzym nicht akzeptiert. Das Enzym aus *Trichoderma harzianum* scheint somit eine hohe Spezifität gegenüber UDP-GlcNAc als Akzeptor zu haben.

Tabelle 16: Akzeptorsubstratspektrum der β -*N*-Acetylhexosaminidase aus *Trichoderma harzianum* (100 mM Akzeptor, 90 mM *p*NP- β -GalNAc, 200 mM Dimethyl-Cyclodextrin, β -*N*-Acetylhexosaminidase: 0,23 U/mL, 50 mM NaH₂PO₄/NaOH-Puffer pH 6,5, 30°C, 8 h, Ausbeuten bezogen auf das Akzeptorsubstrat).

Akzeptor	Ausbeute [%]	
	NDP-Disaccharid	NDP-Trisaccharid
UDP-Glc	0,4	--
UDP-GlcNAc	22,0	5,3
UDP-Gal	1,0	nd
UDP-GalNAc	0,8	nd
UDP-GlcA	nd	nd
CMP-Neu5Ac	nd	nd
CMP-Glc	nd	nd
GDP-Man	nd	nd
ADP-Glc	nd	nd

nd = nicht detektiert

3.8.4 Synthese von GalNAc(**b** 1-X)GlcNAc(**a** 1-UDP)

Für eine präparative Synthese wurde das System mit den höchsten Ausbeuten gewählt, also in diesem Fall die β -*N*-Acetylhexosaminidase aus *Trichoderma harzianum* mit UDP-GlcNAc als Akzeptor- und *p*NP- β -GalNAc als Donorsubstrat. Die HPLC-Analyse mit Methode ① ergab eine Ausbeute von 22,1% für GalNAc(β 1-X)GlcNAc(α 1-UDP).

3.8.4.1 Produktisolierung

Nach Anionenaustauschchromatographie und Gelfiltration konnten 15,1 mg (17,7 μ mol) des aktivierten Disaccharides mit einer Gesamtausbeute von 3,5 % isoliert werden. Die Reinheit des Produktes laut HPLC ①-Analyse betrug 91%. MS- und NMR-Analysen ergaben, daß eine regioselektive Übertragung von GalNAc ausschließlich auf die 4OH Gruppe des UDP-GlcNAc stattgefunden hat; das Produkt konnte also eindeutig als GalNAc(β 1-4)GlcNAc(α -UDP)¹⁸ identifiziert werden.

¹⁸ *N,N'*-Diacetyllactosamin-UDP oder LacDiNAc-UDP

Mit β -*N*-Acetylhexosaminidasen aus verschiedenen Quellen konnten bereits unterschiedliche Regioisomere und Regioisomerengemische synthetisiert werden. Wie hier gezeigt werden konnte, überträgt das Enzym aus *Trichoderma harzianum* GalNAc regioselektiv auf UDP-GlcNAc. Eine Glycosylierung der 6-OH wurde wegen der sterischen Hinderung dieser Position durch das Nucleotid ausgeschlossen.

Damit ist der Zugang zu der nucleotidaktivierten Form des LacDiNAc (GalNAc(β 1-4)GlcNAc) gewonnen worden. LacDiNAc dient neben LacNAc als wichtiges Strukturelement in *N*- oder *O*-geknüpften Oligosaccharidketten. Glycoproteine tragen auf die *Core*-Strukturen aufbauende, sich wiederholende LacNAc¹⁹-Einheiten oder eine LacDiNAc Einheit, welche Träger von terminalen, Zuckerepitopen, wie z.B. das Sialyl-Lewis^x sind (Van den Eijnden 1994).

3.9 Nucleotidaktivierte Disaccharide als Substrate und Inhibitoren für Glycosyltransferasen

Die biochemische und physiologische Rolle von Nucleotid-Oligosacchariden ist bislang noch nicht bekannt. Durch die enzymatische Synthese ist nun jedoch ein präparativer Zugang zu diesen Strukturen geschaffen worden.

Nucleotiddi- und oligosaccharide sind interessante Donorsubstrate für *in vitro* Synthesen von Glycokonjugaten mit Glycosyltransferasen. In Arbeiten von Hindsgaul *et al.* wurden verschiedene modifizierte Di-, Tri und Oligosaccharide chemisch bzw. chemoenzymatisch hergestellt und als Donorsubstrate für die α 1-3/4Fucosyltransferase aus Humanmilch eingesetzt (Crawley und Palcic 1996; Hällgren und Hindsgaul 1995; Srivastava *et al.* 1992). Es konnte gezeigt werden, daß der Transfer von einer GDP-aktivierten Fucose, welche an C6 mit größeren Resten, wie z.B. Biotin oder Trisaccharide der Blutgruppen A und B, modifiziert ist, auf LacNAc möglich ist. In diesen chemisch hergestellten Fucose-Derivaten sind die Reste an C6 allerdings durch einen längeren Spacer an Fucose gebunden. Der *en bloc*-Transfer eines aktivierten Disaccharides wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben.

¹⁹ Poly-LacNAc

Die Fragestellung, ob Nucleotiddi- und oligosaccharide als Inhibitoren für Glycosyltransferasen oder Nucleotidzuckertransporter fungieren können, blieb bisher unbeachtet. *In vitro* könnte dies bedeuten, daß Nucleotiddisaccharide als Bisubstrat-Analoga spezifische Inhibitoren von Glycosyltransferasen sind. Eine Inhibition *in vivo* könnte eine regulatorische Wirkung auf die an der Biosynthese der Glycane beteiligten Transferasen oder Transporter bedeuten.

Die Biosynthese der *N*- und *O*-Glycane findet vor allem im Golgi-Apparat statt, wo die Schlüsselenzyme der Biosynthesewege lokalisiert sind. Nucleotidzucker, die Substrate für die Biosynthese der Glycane sind, müssen durch die Membranen des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates transportiert werden, bevor sie von den Glycosyltransferasen umgesetzt werden können. Die Translokalisierung der Nucleotidzucker wird durch spezifische Transporter vermittelt, welche als Antiporter mit dem entsprechenden Nucleosidmonophosphat agieren. **Abb. 48** zeigt den Antiport-Mechanismus am Beispiel des UDP-GlcNAc. Nach dem Transport in das Lumen des Golgi-Apparates wird GlcNAc von UDP-GlcNAc durch spezifische GlcNAc-Transferasen auf Proteine und Proteoglycane übertragen.

Das dabei freiwerdende UDP wird sofort durch eine Phosphatase zu UMP und anorganischem Phosphat (P_i) gespalten. UMP ist der Antiporter, welcher mit dem Eintritt von weiterem UDP-GlcNAc gekoppelt ist. Das anorganische Phosphat verläßt den Golgi-Apparat wahrscheinlich durch einen spezifischen Carrier (Hirschberg 1996, Hirschberg 1997, Kawakita *et al.* 1998).

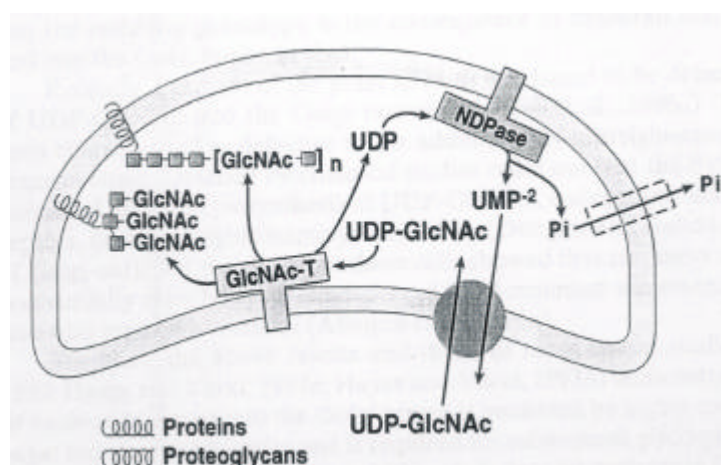


Abb. 48: Mechanismus der Golgi-Antiporter (Hirschberg 1996).

Nucleotizuckertransporter und Glycosyltransferasen stellen zwei Gruppen von funktionellen Proteinen dar, welche unentbehrlich für die Glycokonjugat-Synthese sind. Über die Regulation der Aktivität von beiden ist bisher jedoch sehr wenig bekannt. Wird die Glycosyltransferaseaktivität von einem eigenen Regulationsmechanismus bestimmt, oder ist die Nucleotidzucker-Konzentration und somit die Aktivität der Nucleotidzuckertransporter der limitierende Faktor in der Biosynthese der Glycokonjugate?

Nucleotiddi- und Oligosaccharide sind zwar bisher noch nicht im endoplasmatischen Reticulum oder Golgi-Apparat nachgewiesen worden. Diese bisher aber wenig erforschten Zuckerderivate könnten dennoch als stabile Inhibitoren die Regulation von Nucleotizuckertransportern und Glycosyltransferasen beeinflussen. Die Frage zur Regulation der Nucleotidzuckertransporter kann mangels Verfügbarkeit dieser Proteine im Rahmen dieser Arbeit nicht bearbeitet werden, weist aber dennoch einen interessanten Aspekt für zukünftige Arbeiten auf.

Eine *in vivo* Inhibition der Glycosyltransferasen durch UDP oder UMP, die *in vitro* sehr gute Inhibitoren darstellen, ist unwahrscheinlich, da UDP mit Phosphatasen zu UMP gespalten wird (s.o.), welches wiederum im Austausch mit einem UDP-Zucker aus dem Golgi-Apparat heraustransportiert wird. Durch molekulargenetische Strategien ist mittlerweile der Zugang zu einer Reihe von Glycosyltransferasen geschaffen worden (Elling 1997; Mallisard *et al.* 1999; Mallisard *et al.* 2000), so daß es möglich ist Nucleotiddi- oder Oligosaccharide in Übertragungs- und Inhibitionsstudien von ausgewählten rekombinanten Glycosyltransferasen einzusetzen. Besonderes Interesse gilt dabei den GlcNAc-Transferasen der N- und O-Glycan Biosynthese und den Galactosyltransferasen. Da es Hinweise auf die Existenz von Nucleotidoligosacchariden in Pflanzen gibt (Cumming 1970), wurde auch der Effekt auf die rekombinante Saccharose Synthase aus Kartoffel getestet.

3.9.1 GlcNAc-Transferasen der N-Glycan Biosynthese: Rekombinante GlcNAc-Transferase I aus Kaninchen und rekombinante humane GlcNAc-Transferase II

Die GlcNAc-Transferasen I und II spielen eine essentielle Rolle in der Biosynthese von hybriden und komplexen N-Glycanen (siehe auch Kap. 1.2.1). Die GlcNAcT I ist das Schlüsselenzym dieser Synthese und überträgt GlcNAc von UDP-GlcNAc in β -Stellung auf die 2-Position des Man(α 1-3)Man-Armes der *High-Mannose* N-Glycane. Die Präsenz dieses GlcNAc-Restes ist essentiell für die nun folgende Prozessierung der N-Glycane. Die GlcNAcT II ist das zweite Enzym, welches innerhalb des Trimming-Prozesses wirksam ist und überträgt β -D-GlcNAc auf die 2-OH Gruppe des Man (α 1-6)-Zweigs und liefert die Vorläuferstruktur für den biantennären Komplex-Typ (**Abb. 49**).

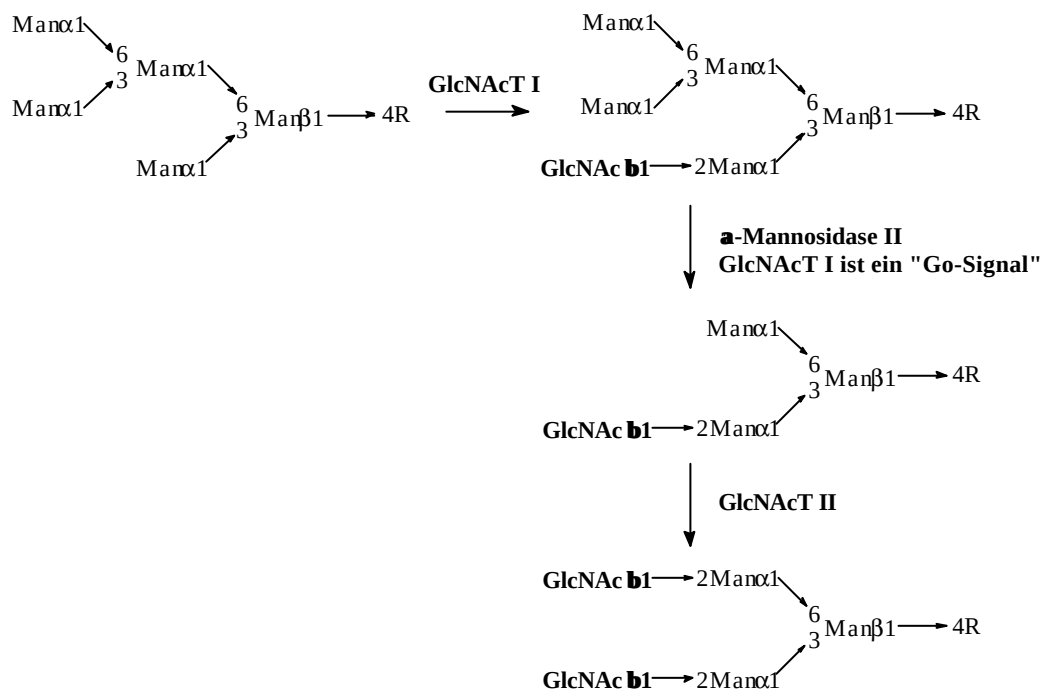


Abb. 49: Reaktionen der GlcNAcT I und II (Schachter 1995).

Für Übertragungs- und Inhibitionsstudien wurden die gereinigten GlcNAc-Transferasen I und II von Prof. Dr. H. Schachter (Dept. of Biochemistry Research, Hospital for Sick Children, Toronto, Canada) zur Verfügung gestellt.

3.9.1.1 UDP-LacNAc als Donorsubstrat

Die Übertragungsversuche wurden mit UDP-LacNAc als Donorsubstrat und $\text{Man}(\alpha 1-3)[\text{Man}(\alpha 1-6)\text{Man}(\beta 1-\text{O}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ bzw. $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ als Akzeptorsubstrate für GlcNAc-T I durchgeführt. Als Akzeptorsubstrat für die GlcNAc-T II stand $\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Man}(\alpha 1-3)[\text{Man}(\alpha 1-6)\text{Man}(\beta 1-\text{O}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ zur Verfügung.

Die Analyse mit HPLC-Methode ⑦ gab keine Hinweise auf eine Übertragung von LacNAc, so daß davon ausgegangen werden muß, daß UDP-LacNAc kein Donorsubstrat für die GlcNAc-T I und II ist.

Kürzlich ist die Kristallstruktur der GlcNAc-T I aus Kaninchen veröffentlicht worden (Ünlügil *et al.* 2000). In Strukturanalysen mit dem gebundenen Donor ($\text{UDP-GlcNAc/Mn}^{2+}$) kann man erkennen, daß das Uracil und die Ribose über Wasserstoffbrückenbindungen und durch van der Waals-Wechselwirkungen an Aminosäurereste des Proteins gebunden sind. Das Mn^{2+} weist eine oktahedrale Geometrie auf und wird durch insgesamt sechs Sauerstoffatome, die u.a. von den Phosphaten des UDP zur Verfügung gestellt werden, koordiniert. Interessanterweise findet nur ein direkter Kontakt zum Protein statt, was darauf schließen läßt, daß es keine unabhängige Mn^{2+} -Bindungsstelle gibt. Das GlcNAc ist über Wasserstoffbrückenbindungen des O3, O4 und O6 Hydroxylgruppen an das Protein koordiniert, während der Stickstoff der *N*-Acetylgruppe eine Wasserstoffbindung mit dem Phosphat bildet.

Anhand der Strukturanalysen konnte ein Vorschlag für den Reaktionsmechanismus gemacht werden. Demnach erfolgt ein geordneter sequentieller Bi-Bi-Mechanismus, bei dem $\text{Mn}^{2+}/\text{GlcNAc}$ zuerst gebunden werden muß, um eine Tasche für den sterisch sehr anspruchsvollen Akzeptor auszubilden. Eine basische Aminosäure im katalytischen Zentrum deprotoniert die nucleophile Hydroxylgruppe des Akzeptors, welche dann am C1 des Nucleotidzuckers angreifen kann. Der weitere Reaktionsmechanismus verläuft dann ähnlich wie bei glycosidasekatalysierten Reaktionen über einen oxocarbeniumähnlichen Übergangszustand zum Produkt.

Zieht man nun in Betracht, wie eng GlcNAc (über drei OH-Gruppen, davon eine an C4, zudem ist die 4-OH Gruppe an einer Wasserstoffbrückenbindung involviert) an das Protein koordiniert wird, erscheint es als unwahrscheinlich, daß das viel sperrigere UDP-LacNAc gebunden und übertragen wird.

Wegen der nur beschränkt zur Verfügung stehenden Akzeptorsubstrate konnten keine weiteren Tests und Inhibitionsstudien durchgeführt werden, so daß letztendlich die Frage immer noch offen bleibt, ob UDP-LacNAc ein Inhibitor dieser wichtigen Enzyme in der N-Glycanbiosynthese ist.

3.9.2 GlcNAc-Transferasen der O-Glycan Biosynthese:

Rekombinante murine Core2 β 1-6GlcNAc-Transferase (Typ M) aus Maus

Die rekombinante murine Core2 β 1-6GlcNAc-Transferase (Typ M) aus Maus (Core2-GlcNAcT) wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Berger (Physiologisches Institut, Universität Zürich, Schweiz) als Protein A-Fusionsprotein in löslicher Form in CHO-Zellen exprimiert (Zeng *et al.* 1997), in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Wandrey am Institut für Biotechnologie (Forschungszentrum Jülich GmbH) produziert und mit Affinitätschromatographie an IgG-Sepharose gereinigt (Dudziak 1999).

Das Enzym überträgt *in vitro* seinen natürlichen Donor, UDP-GlcNAc, auf Gal(β 1-3)GalNAc(α 1-OCH₂Ph (Core1-Bz) unter der Bildung von Gal(β 1-3)[GlcNAc(β 1-6)]GalNAc(α 1-OCH₂Ph (Core2-Bz; **Abb. 50**).

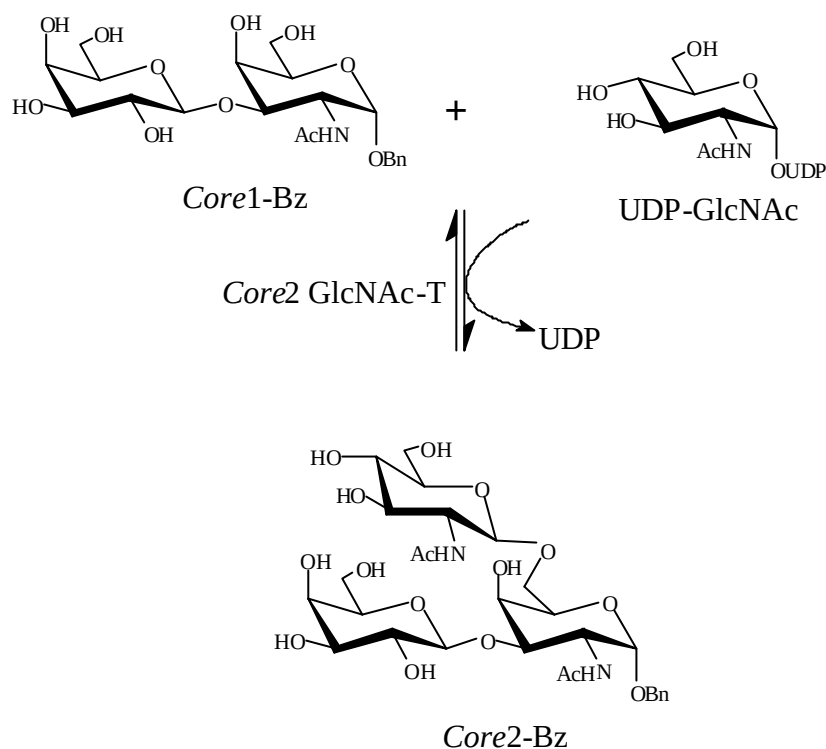


Abb. 50: Bildung von *Core2-Bz* mit der *Core2 GlcNAc-Transferase*.

3.9.2.1 UDP-LacNAc als Donorsubstrat mit *Core1-Bz* als Akzeptor

In einem ersten Test wurde UDP-LacNAc als Donorsubstrat mit *Core1-Bz* als Akzeptorsubstrat eingesetzt. Nach sechs Tagen Inkubationszeit wurde der Ansatz mittels HPLC ⑤ analysiert. Ein Hinweis auf ein im Falle eines Transfers gebildeten Tetrasaccharides konnte nicht gefunden werden.

Es ist jedoch denkbar, daß UDP-LacNAc sterisch zu anspruchsvoll ist, um zusammen mit dem *Core1*-Disaccharid in das aktive Zentrum des Enzyms zu gelangen. Daher wurde GalNAc-Bz als kleinerer Akzeptor gewählt.

3.9.2.2 UDP-LacNAc als Donorsubstrat mit GalNAc(α 1-OCH₂Ph als Akzeptor

In weiteren Versuchen wurde getestet, ob der Transfer von LacNAc auf einen kleineren Akzeptor, GalNAc(α 1-OCH₂Ph (GalNAc-Bz) gelingt. Das dabei entstehende Trisaccharid wäre ein unnatürliches Produkt, wäre aber *in vitro* allerdings der erste Nachweis für die *en bloc* Synthese mit einer Glycosyltransferase.

Dem Reaktionsansatz mit GalNAc-Bz und UDP-LacNAc wurden über sechs Tage verteilt Proben entnommen und mittels HPLC ⑤ analysiert. Ein neuer Peak im Trisaccharidbereich der HPLC-Methode konnte detektiert werden (Umsatz 1,5%, bezogen auf das Akzeptorsubstrat). Das Produkt wurde mittels semipräparativer HPLC ⑤ isoliert mit NMR und MS charakterisiert.

Die Strukturanalyse zeigte, daß es sich bei dem isolierten Produkt um *Core2-Bz* handelt. Diese Struktur war vollkommen unerwartet, da für deren Entstehen Galactose auf die 3-Position des GalNAc übertragen werden muß. Möglicherweise wird Galactose von UDP-LacNAc abgespalten und in einer Transglycosylierungsreaktion übertragen. Für einen solchen Transfer muß das Enzym entweder eine β -Galactosidase-Nebenaktivität besitzen, oder die Enzympräparation verunreinigt sein. Da die GlcNAc-T über Affinitätschromatographie aufgereinigt wurde ist eine geringfügige Verunreinigung zwar sehr unwahrscheinlich, ist aber dennoch nicht auszuschließen. Das bei der Transglycosylierung entstehende *Core1-Bz* steht dann für die GlcNAc-T als natürliches Substrat zusammen mit UDP-GlcNAc, welches in der Hydrolysereaktion entsteht, zur Verfügung (**Abb. 51**).

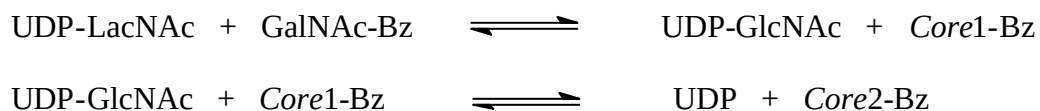


Abb. 51: Reaktion von UDP-LacNAc und GalNAc-Bz zu *Core2-Bz*.

Um diese Vermutung zu bestätigen wurden im Folgenden Tests auf eine β -Galactosidaseaktivität durchgeführt.

3.9.2.3 Hydrolytische Nebenaktivität der *Core2* β 1-6GlcNAc-Transferase

Hydrolyse von *pNP-b*-Galactose

Im Falle einer β -Galactosidaseaktivität müßte *pNP*- β -Galactose hydrolysiert werden. Das dabei entstehende gelbe Phenolat kann leicht quantifiziert werden. Nach sechs Tagen Inkubationszeit konnte die Bildung von 0,44 mM *pNP* (1,8%) beobachtet werden. Das ist ein erster Hinweis auf eine β -Galactosidaseaktivität. Da in dem Reaktionsansatz aber UDP-LacNAc als „Donor“ für die Transglycosylierung diente, wurde getestet, ob auch UDP-LacNAc hydrolysiert wird.

Hydrolyse von UDP-LacNAc

Bei der Hydrolysereaktion von UDP-LacNAc konnte entstandene Galactose mittels HPLC ⑥ durch ein Refraktometer detektiert werden, UDP-GlcNAc wurde mit HPLC ② bestimmt. Nach sechs Tagen Inkubationszeit konnte die Bildung von 0,3% Galactose und 1,8% UDP-GlcNAc detektiert werden. Bei einem Kontrollansatz ohne Enzym konnte keine Hydrolyse festgestellt werden, UDP-LacNAc ist in Lösung sehr stabil. Die Diskrepanz zwischen der gebildeten Menge an Galactose und UDP-GlcNAc ist durch die Detektion der Galactose über ein Refraktometer zu erklären, diese Methode ist sehr unempfindlich und bei diesen geringen Mengen mit einem großen Fehler behaftet. Dennoch liefern die Ergebnisse qualitativ einen sehr guten Hinweis für eine β -Galactosidaseaktivität. Eine Transglycosylierung ist zwar in Anbetracht der geringen Substratkonzentrationen (jeweils 20 mM UDP-LacNAc und GalNAc-Bz) immer noch sehr erstaunlich, bei derart langen Inkubationszeiten können aber Transglycosylierungsprodukte durch die gekoppelte Transferasereaktion direkt abgefangen werden.

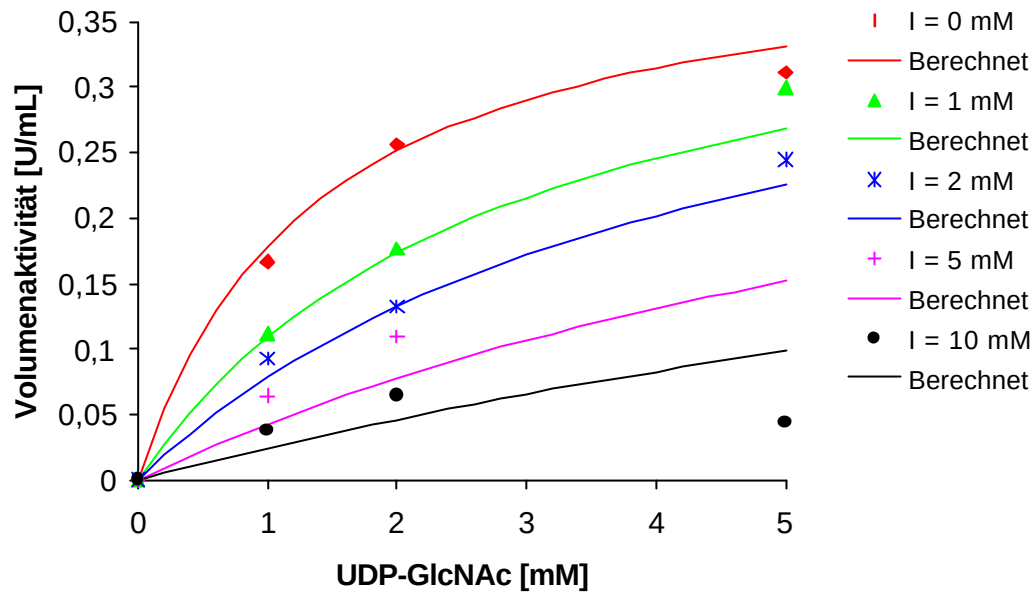
Ein Transfer von UDP-LacNAc mit der rekombinanten murinen *Core2* β 1-6GlcNAc-Transferase ist somit nicht möglich. Inhibitionsstudien sollen nun zeigen, ob Nucleotiddisaccharide einen regulatorischen Effekt haben können.

3.9.2.4 UDP-LacNAc als Inhibitor

Mit *Core1*-Bz und UDP-GlcNAc als natürlichen Substraten wurde die Inhibition der *Core2* GlcNAc-T in einer kinetischen Analyse überprüft. Den Berechnungen mit Variation des Donorsubstrates UDP-GlcNAc wurde das Modell einer Doppelsubstratkinetik mit kompetitiver Inhibition in Bezug auf UDP-GlcNAc zugrundegelegt. Die kinetischen Parameter wurden mit dem Computerprogramm Scientist (Micromath, Salt Lake City, USA) für den Datensatz angepaßt.

Abb. 52 zeigt die gemessenen Aktivitäten der *Core2* GlcNAcT und die dazugehörigen mathematisch angepaßten Werte bei verschiedenen UDP-LacNAc-Konzentrationen (0-10 mM).

Man kann erkennen, daß bei steigender UDP-LacNAc-Konzentration, bei Variation des Donorsubstrates, eine kompetitive Inhibition vorliegt. Eine kompetitive Inhibition bezüglich des Donorsubstrates bedeutet, daß der Inhibitor (UDP-LacNAc) aufgrund der Struktur analogie mit dem Substrat um dessen Bindungsstelle am aktiven Zentrum des Enzyms konkurriert (Kompetition). Es kann entweder Substrat oder Hemmstoff gebunden werden, eine gleichzeitige Bindung beider ist ausgeschlossen. Das ist damit das erste Beispiel für ein aktiviertes Disaccharid, das eine Glycosyltransferase kompetitiv inhibiert. Es konnte eine Inhibitionskonstante von 0,90 mM festgestellt werden. Der K_i -Wert liegt damit etwas niedriger als der gemessene K_M -Wert für UDP-GlcNAc von 1,35 mM (Literaturwert: 1,0 mM Dudziak 1999a). Der K_M -Wert für das Donorsubstrat ist erstaunlich hoch, K_M -Werte für andere Glycosyltransferasen liegen in der Regel im mikromolaren Bereich.



$$\begin{aligned}
 V_{\max} &= 0,55 \pm 0,06 \text{ U/mL} \\
 K_I &= 0,90 \pm 0,24 \text{ mM} \\
 K_{M(\text{UDP-GlcNAc})} &= 1,35 \pm 0,43 \text{ mM} \\
 K_{M(\text{Core1-Bz})} &= 0,30 \pm 0,03 \text{ mM} \\
 R^2 &= 0,98
 \end{aligned}$$

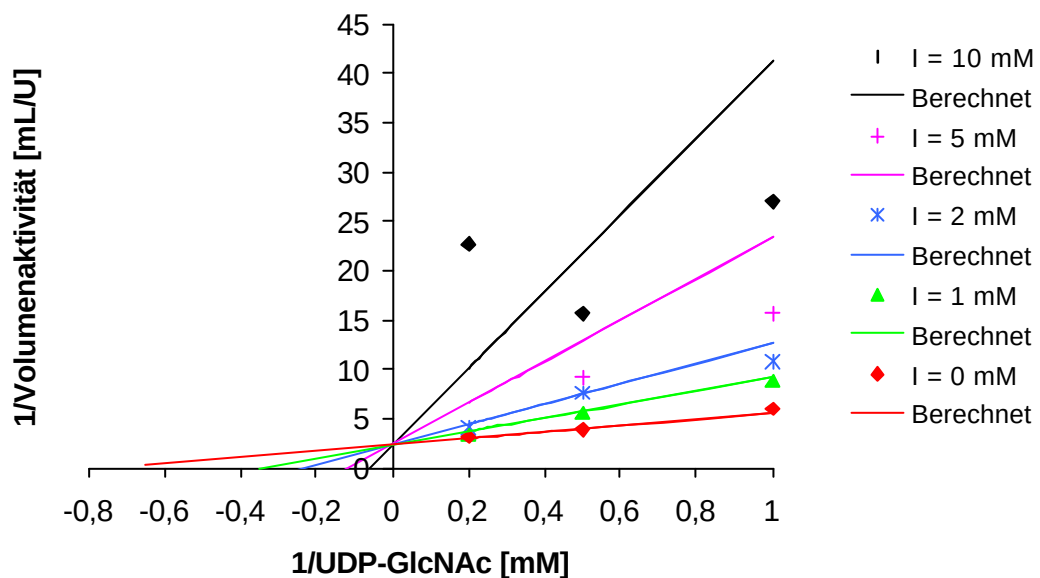
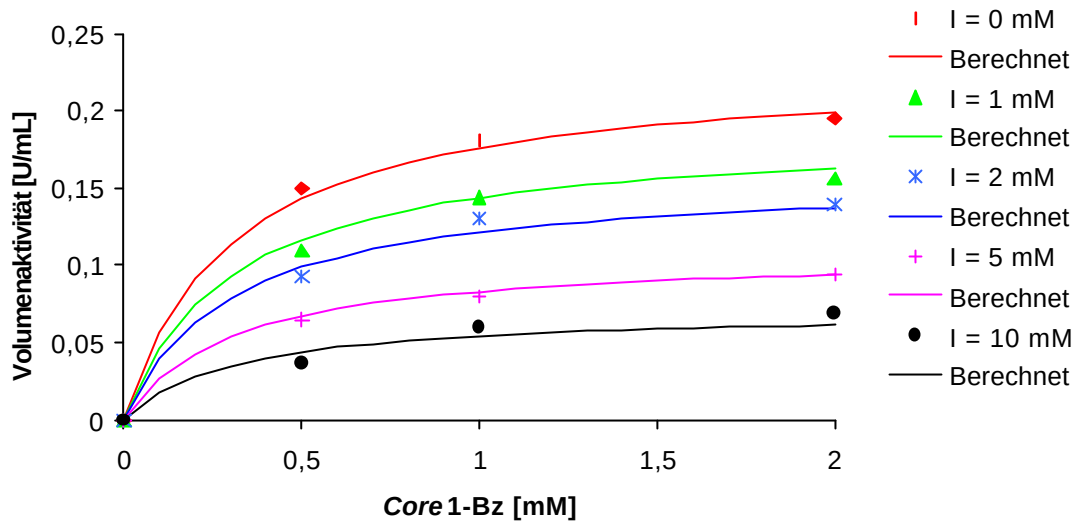


Abb. 52: Nicht-lineare und lineare Darstellung der kompetitiven Inhibition der *Core2* GlcNAc-T mit UDP-LacNAc in Bezug auf den Donor (UDP-GlcNAc).
Variation UDP-GlcNAc: 1 mM *Core1-Bz*, 1, 2 und 5 mM UDP-GlcNAc, 0, 1, 2, 5 und 10 mM UDP-LacNAc, 10 mM MgCl_2 , GlcNAcT 0,2 U/mL, 50 mM MES/NaOH-Puffer pH 6,5, 30°C, 10 min.

Den Berechnungen folgten die Bestimmung der kinetischen Parameter bezüglich des Akzeptorsubstrates. Hier wurde zunächst eine kompetitive Inhibition bezüglich *Core1*-Bz angenommen. Die mathematische Anpassung zeigte jedoch sehr hohe Standardabweichungen (ca. 50 %). Die doppelt reziproke Auftragung der berechneten Werte und Meßwerte wies zudem auf eine nicht-kompetitive Inhibition bezüglich *Core1*-Bz hin. Den Berechnungen mit Variation des Akzeptorsubstrates wurde daher das Modell einer Doppelsubstratkinetik mit nicht-kompetitiver Inhibition in Bezug auf *Core1*-Bz zugrundegelegt. **Abb. 53** zeigt die gemessenen Aktivitäten der *Core2* GlcNAcT und die dazugehörigen mathematisch angepaßten Werte bei verschiedenen UDP-LacNAc-Konzentrationen (0-10 mM).

Auch in diesem Fall wird das Enzym durch Erhöhung der UDP-LacNAc Konzentration inhibiert. Im Gegensatz zu den Beobachtungen mit dem Donorsubstrat konnte in Bezug auf *Core1*-Bz eine nicht-kompetitive Inhibition festgestellt werden. Das bedeutet, daß die Affinität des Akzeptorsubstrates durch UDP-LacNAc nicht beeinträchtigt wird. Der K_M für *Core1*-Bz (0,30 mM; Literaturwert: 0,23 mM (Dudziak 1999a) bleibt gleich, eine Umsetzung zum Produkt kann aber nicht stattfinden (V_{max} sinkt). Es wurde eine Inhibitionskonstante von 4,47 mM berechnet. Die Inhibition in Bezug auf das Akzeptorsubstrat ist also wesentlich schwächer als die bezüglich des Donors UDP-GlcNAc.



$$\begin{aligned}
 V_{\max} &= 0,38 \pm 0,01 \text{ U/mL} \\
 K_I &= 4,47 \pm 0,22 \text{ mM} \\
 K_{M(\text{UDP-GlcNAc})} &= 1,35 \pm 0,43 \text{ mM} \\
 K_{M(\text{Core1-Bz})} &= 0,30 \pm 0,03 \text{ mM} \\
 R^2 &= 0,99
 \end{aligned}$$

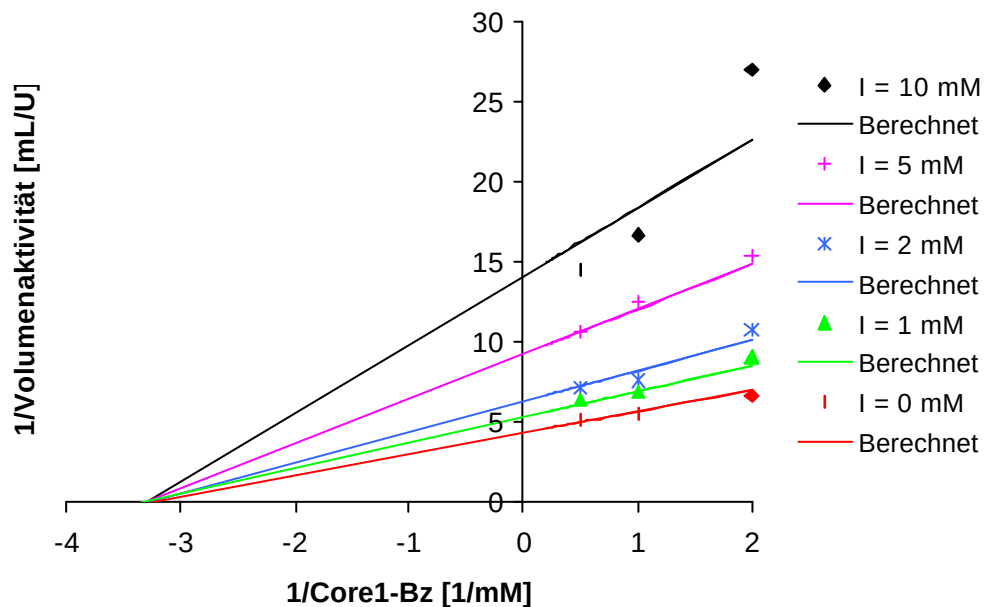


Abb. 53: Nicht-lineare und lineare Darstellung der nicht-kompetitiven Inhibition der Core2 GlcNAc-T mit UDP-LacNAc in Bezug auf den Akzeptor (Core1-Bz). Variation Core1-Bz: 0,5, 1 und 2 mM Core1-Bz, 2 mM UDP-GlcNAc, 0, 1, 2, 5 und 10 mM UDP-LacNAc, 10 mM MgCl_2 , GlcNAcT 0,2 U/mL, 50 mM MES/NaOH-Puffer pH 6,5, 30°C, 10 min.

UDP-LacNAc ist bezüglich des Donorsubstrates ein guter Inhibitor für die *Core2* GlcNAc-Transferase. Im Vergleich mit UDP als Inhibitor ($K_I = 0,05$ mM, Dudziak 1999a), scheint die Inhibition *in vitro* zwar kaum Bedeutung zu haben, vor dem Hintergrund der Regulation der *Core2* GlcNAcT *in vivo* ist aber ein K_I , der nahe dem K_M -Wert des natürlichen Substrates liegt ein vielversprechendes Ergebnis. Wie bereits ausgeführt wurde, wird UDP im Golgi-Apparat direkt zu UMP abgebaut, welches dann durch spezifische Transporter im Austausch mit Nucleotidzuckern aus dem Golgi heraustransportiert wird. UDP steht als Regulator der Glycosyltransferasen also nicht zur Verfügung. UDP-LacNAc ist in Lösung stabil und wird von Phosphatasen nicht abgebaut, könnte also tatsächlich in den Regulationsmechanismus eingreifen, insbesondere da hier gezeigt werden konnte, daß auch seine Affinität zum Enzym gleich der von UDP-GlcNAc ist.

3.9.2.5 GalNAc(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP, Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP und UMP als Inhibitoren

Als weitere Inhibitoren für die *Core2* GlcNAcT standen die aktivierten Oligosaccharide Gal(β 1-4)Gal(β 1-)-GlcNAc(α 1-UDP (**Abb. 54**) und GalNAc(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP (UDP-LacDiNAc; **Abb. 55**) zur Verfügung. In einer weiteren kinetischen Analyse wurde UMP (**Abb. 56**) als Inhibitor getestet. Den Berechnungen wurde das Modell einer Doppelsubstratkinetik mit kompetitiver Inhibition in Bezug auf auf das Donorsubstrat zugrundegelegt. Die kinetischen Parameter wurden mit dem Computerprogramm Scientist (Micromath, Salt Lake City, USA) für den gesamten Datensatz angepaßt.

Die Berechnungen für die kompetitive Inhibition der *Core2*-GlcNAc T mit dem aktivierten Trisaccharid (**Abb. 54**) zeigten, daß die Inhibitionskonstante mit 2,15 mM etwa doppelt so hoch ist wie die für die Messungen mit UDP-LacNAc ermittelte. Die relativ geringe Erhöhung des K_I -Wertes im Vergleich zu dem entsprechenden aktivierten Disaccharid UDP-LacNAc ($K_I = 0,90$ mM) läßt darauf schließen, daß das katalytische Zentrum des Enzyms auch für große, sterisch anspruchsvolle Strukturen zugänglich ist.

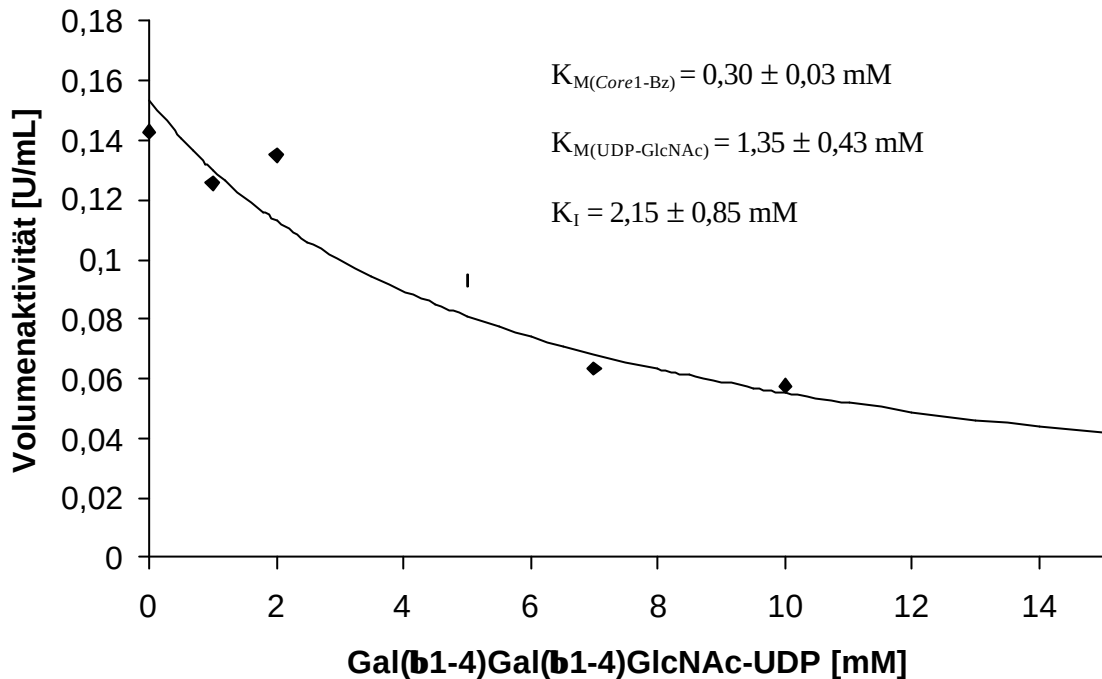


Abb. 54: Kompetitive Inhibition der *Core2* GlcNAc-Transferase in Bezug auf den Donor mit Gal(β1-4)Gal(β1-4)GlcNAc(α1-UDP (1 mM *Core1-Bz*, 2 mM UDP-GlcNAc, 0-15 mM Inhibitor, 1 mM MnCl_2 , 30°C, 10 min.).

In **Abb. 55** ist die Inhibition der *Core2* GlcNAcT mit UDP-LacDiNAc graphisch dargestellt. Dieses aktivierte Disaccharid unterscheidet sich nur in der *N*-Acetylgruppe der Galactose von UDP-LacNAc. Umso erstaunlicher ist es, daß der K_I -Wert mit 3,62 mM etwa viermal höher ist als der von UDP-LacNAc. Das weist darauf hin, daß die 2-OH Gruppe der Galactose an der Bindung von UDP-LacNAc im Enzym beteiligt ist. Im Falle von UDP-LacDiNAc ist die Galactose an der 2-OH Position *N*-acetyliert und kann somit nicht mehr fest gebunden werden. LacDiNAc-UDP ist damit ein schlechterer Inhibitor als UDP-LacNAc.

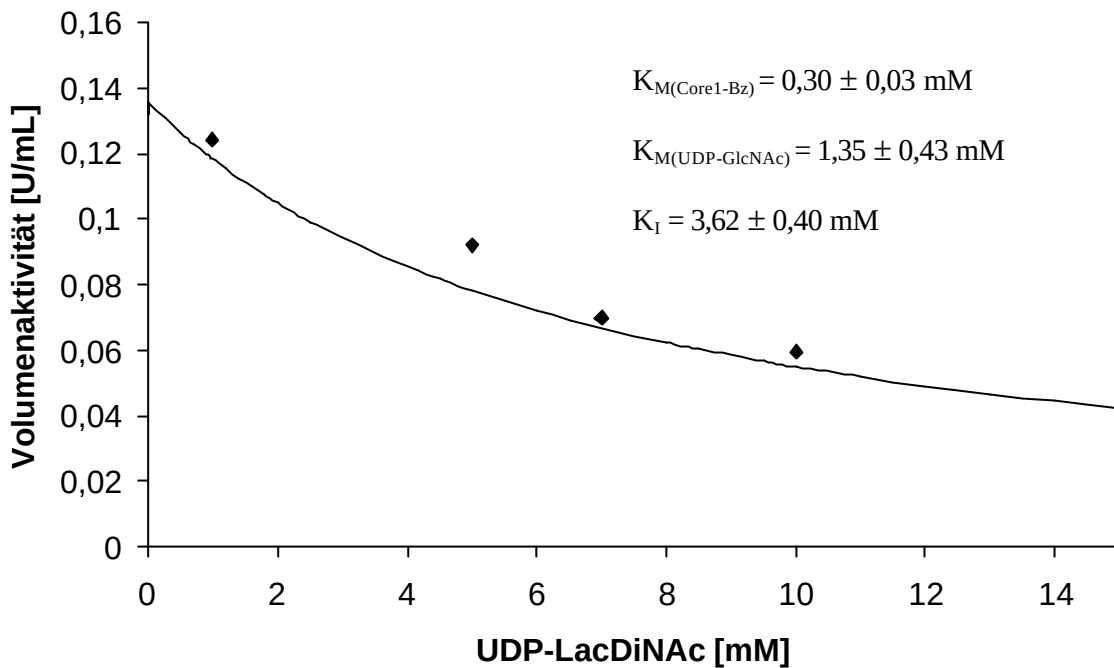


Abb. 55: Kompetitive Inhibition der *Core2* GlcNAc-Transferase in Bezug auf den Donor mit UDP-LacDiNAc (1 mM *Core1-Bz*, 2 mM UDP-GlcNAc, 0-10 mM Inhibitor, 1 mM MnCl_2 , 30°C, 10 min.)

UMP wurde als Inhibitor der *Core2* GlcNAcT getestet. Die Inhibitionskonstante wurde zu 0,19 mM berechnet. UMP ist damit ein schlechterer Inhibitor als UDP ($K_I = 0,05 \text{ mM}$; Dudziak 1999a), aber immer noch ein wesentlich besserer als die getesteten aktivierten Di- und Tri-saccharide.

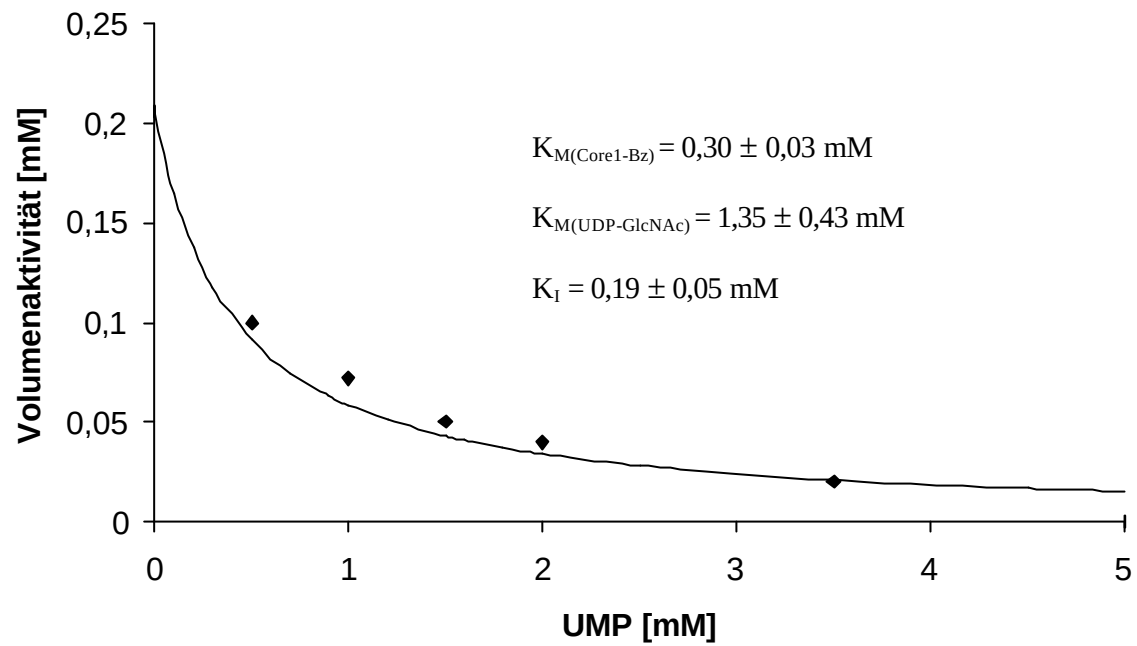


Abb. 56: Inhibition der *Core2* GlcNAc-Transferase mit UMP (1 mM *Core1-Bz*, 2 mM UDP-GlcNAc, 0-5 mM Inhibitor, 1 mM MnCl_2 , 30°C, 10 min.).

3.9.3 Rekombinante Saccharose Synthase 1 aus Kartoffel

Die Saccharose Synthase (SuSy, UDP- α -D-glucose:D-fructose-2-glucosyltransferase, EC 2.4.1.13) gehört zu der Gruppe der Leloir-Glycosyltransferasen. Sie ist der einzige Vertreter dieser Gruppe, der *in vitro* in Abhängigkeit vom pH-Wert, sowohl die Spalt-, als auch die Synthesereaktion zu Saccharose katalysieren kann. (**Abb. 57**).

Das Substratspektrum des rekombinanten Enzyms aus Kartoffel (SuSy1; Schrader 1998) wurde eingehend untersucht. Als nicht natürliche Akzeptorsubstrate konnten bisher D-Allose, L-Arabinose, D-Galactose, D-Lyxose, D- und L-Mannose, D-Psicose, L-Rhamnose, D-Ribose, L-Sorbose, D-Tagatose und D-Xylulose eingesetzt (Römer, unveröffentlichte Ergebnisse).

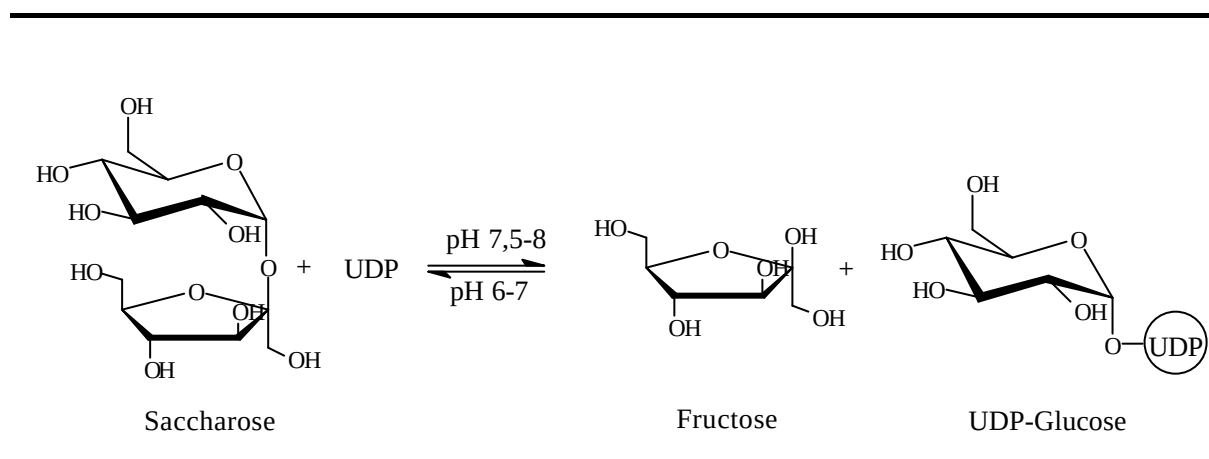


Abb. 57: Reaktion der Saccharose Synthase 1 mit ihren natürlichen Substraten.

Im Folgenden wurden UDP-Lactose und Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)Glc(α 1-UDP als Substrate bzw. Inhibitoren für die SuSy1-katalysierte Reaktion in Syntheserichtung (Saccharose) eingesetzt.

3.9.3.1 UDP-Lac als Donorsubstrat

Mit UDP-Lactose wurde geprüft, ob ein *en bloc*-Transfer auf D-Fructose möglich ist. Nach einem Zeitraum von 7 Tagen wurde die Reaktion abgebrochen, eine Produktbildung konnte durch HPLC-Analyse nicht nachgewiesen werden.

3.9.3.2 UDP-Lac als Donorsubstrat mit kleinerem Akzeptorsubstrat

Die Übertragung von UDP-Lac auf einen sterisch weniger anspruchsvolle Akzeptorsubstrate (D-Lyxose, D-Ribose und D-Desoxyribose) als Fructose gelang nicht.

3.9.3.3 UDP-Lactose als Inhibitor

UDP-Lactose wurde als Inhibitor für die Reaktion in Syntheserichtung eingesetzt. Die Inhibition wurde anhand der gebildeten Saccharose gemessen. Den Berechnungen wurde das Modell einer Doppelsubstratkinetik mit kompetitiver Inhibition in Bezug auf UDP-Glc zugrundegelegt. **Abb. 58** stellt die Inhibition der SuSy 1 graphisch dar. Es konnte ein K_I -Wert von 16,17 mM berechnet werden. UDP-Lactose ist somit ein kompetitiver Inhibitor zum Donor UDP-Glc. Allerdings ist das aktivierte Disaccharid wahrscheinlich aufgrund seiner Größe, kein guter Inhibitor für die SuSy 1.

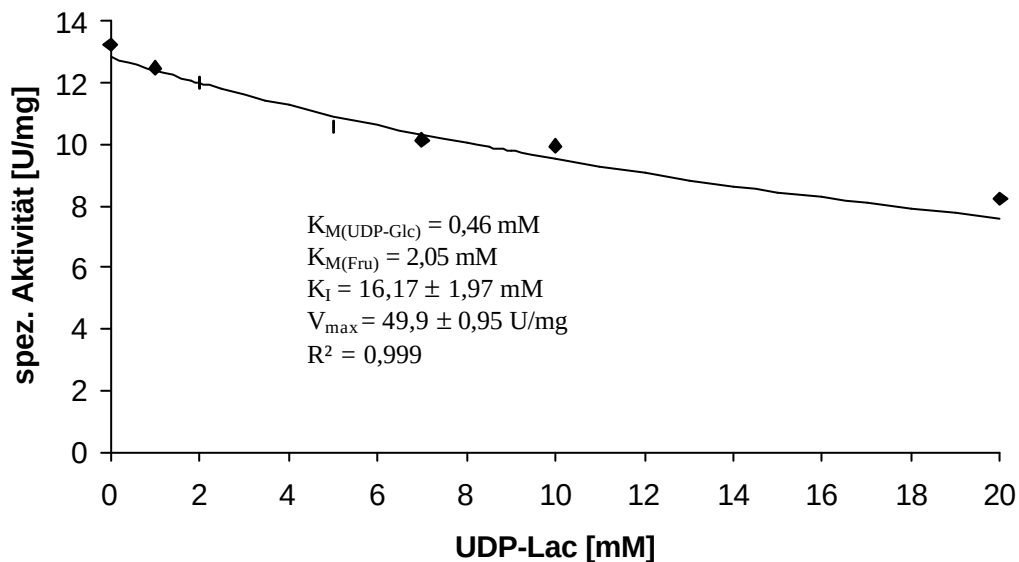


Abb. 58: Kompetitive Inhibition der Saccharose Synthase 1 in Bezug auf UDP-Glc mit UDP-Lactose (0,5 mM UDP-Glc, 2 mM Fru, 10 mU/mL SuSy, 50 mM HEPES/NaOH pH 8,0, 30°C, 5min.).

3.9.3.4 Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)Glc(α 1-UDP als Inhibitor

Mit Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)Glc(α 1-UDP konnte keine Inhibition der SuSy 1-Reaktion festgestellt werden. Es ist anzunehmen, daß das aktivierte Trisaccharid zu groß ist, um in das aktive Zentrum des Enzyms zu gelangen. Das unterstützt die Vermutung, daß UDP-Lactose eine relativ hohe Inhibitionskonstante aufweist, da es eine sterisch sehr anspruchsvolle Verbindung ist.

3.9.4 Rekombinate humane β 1-4Galactosyltransferase 1

Die humane β 4GalT1 wurde in der Arbeitsgruppe Elling in *E. coli* als lösliches Enzym exprimiert und aufgereinigt. Die aktivierten Disaccharide Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP und Gal(α 1-3)Gal(α 1-UDP wurden als Substrate bzw. Inhibitoren getestet. Mit keinem der beiden aktivierten Disaccharide konnte eine Inhibition oder Übertragung festgestellt werden. Der fehlende inhibitorische Effekt könnte darin begründet sein, daß die aktivierten Disaccharide zu sperrig sind, um in das aktive Zentrum des Enzyms zu gelangen.

Starke Inhibitionen wurden in diesem Zusammenhang mit flexiblen Inhibitoren erreicht. Strukturen, in denen das Zuckernucleotid mit einem weiteren Zucker (ähnlich dem Akzeptorzucker) über einen Methylene- oder Ethylene-*Spacer* miteinander verknüpft sind, wurden synthetisiert (Endo *et al.* 2000). Durch den *Spacer* sind diese sog. Bisubstratanaloga im Vergleich zu den aktivierten Disacchariden weitaus flexibler (**Abb. 59**). Die Inhibition der humanen rekombinanten β 4GalT 1 und 2 mit einem Bisubstratanalogen wurde kürzlich beschrieben. Der inhibitorische Effekt der Bisubstrat-Analoga auf verschiedene Galactosyltransferasen wurde getestet. Die β 4GalT 1 und 2 wurden mit einem K_i -Wert von 1 mM relativ stark inhibiert (Endo *et al.* 2000).

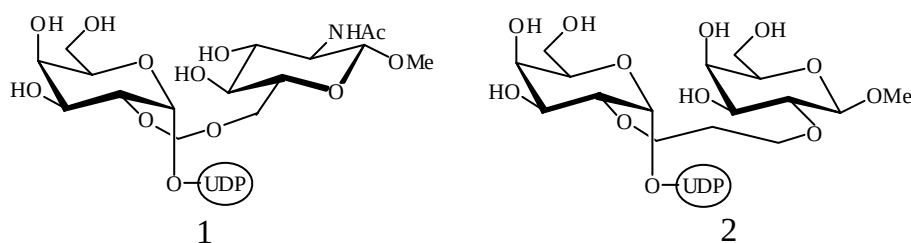


Abb. 59: Bisubstrat-Analoga als Inhibitoren für die humane rekombinate β 1,4GalT 1 und 2 (1) und die rekombinante α 1,3GalT aus Schwein (2) (Endo *et al.* 2000).

Die hier getesteten aktivierten Disaccharide sind jedoch nicht sehr flexibel und sie entsprechen nicht einem Bisubstrat-Analogon. Ein dem Akzeptor ähnlicher Zuckerrest fehlt, so daß maximal die Donor-Bindungsstelle besetzt werden könnte, eine Inhibition also nicht möglich ist. Um aktivierte Di- oder Oligosaccharide als Inhibitoren für Galactosyltransferasen nutzen zu können, müssen diese Strukturen offensichtlich flexibler, entsprechend einem Bisubstrat-Analogon konstruiert werden

3.9.5 Rekombinante α 1-3-Galactosyltransferase aus Maus

Die α 1,3GalT katalysiert den Transfer von Galactose auf Akzeptoren, die LacNAc als terminales Disaccharid tragen. Damit katalysiert das Enzym die Synthese einer Reihe von Glykonjugaten, die das Gal(α 1-3)Gal-Epitop (Galili-Epitop; Galili 1989), welches von dem humanen Antikörper anti-Gal erkannt wird, tragen. Die Interaktion von anti-Gal und Gal(α 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc-R Epitopen führt z.B. zu einer akuten Abstoßung von Geweben bei Xenotransplantationen (Galili 1993).

Die kinetischen Parameter und das Akzeptorsubstratspektrum für die gereinigte rekombinante α 1-3-Galactosyltransferase wurden bereits von Stults *et al.* (1999) beschrieben. Die K_M -Werte für UDP-Gal und LacNAc-C₈ lagen bei 0,71 bzw. 0,19 mM. Auf der Akzeptorsubstratseite wurden eine Reihe von LacNAc-Derivaten getestet. Generell konnte festgestellt werden, daß verschiedene funktionelle Substituenten (z.B. NH₃, OH, NHCHO, NHCOC₂H₅, etc.) am C2 des GlcNAc toleriert werden, während Substituenten am C3 des GlcNAc und C6 der Galactose nicht akzeptiert werden.

Da ein Rohextrakt des Enzyms zur Verfügung stand, wurden für Inhibitionsstudien zunächst über eine Michaelis-Menten Kinetik die K_M -Werte für LacNAc und UDP-Galactose bestimmt (**Abb. 60** und **Abb. 61**). Für UDP-Galactose wurde ein K_M -Wert von 2,8 mM und für LacNAc von 0,5 mM gefunden. Abweichungen von den Literaturdaten (s.o.) können sich hierbei durch die Verwendung unterschiedlicher Akzeptorsubstrate und durch etwas andere Reaktionsbedingungen ergeben.

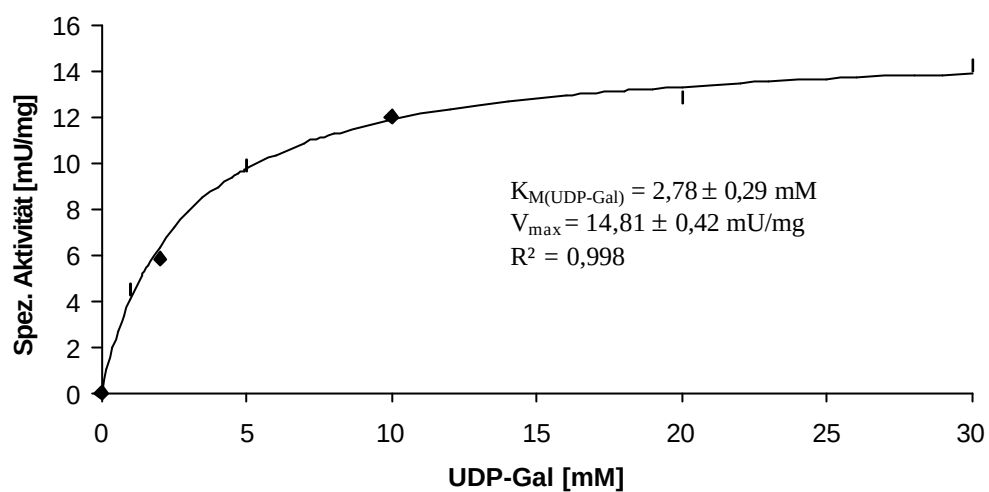


Abb. 60: Bestimmung des K_M -Wertes für UDP-Gal (0-30 mM UDP-Gal, 10 mM LacNAc, 1 mM MnCl_2 , 80 mM Na Cacolydat/HCl pH 6,0, 30°C, 15 min.).

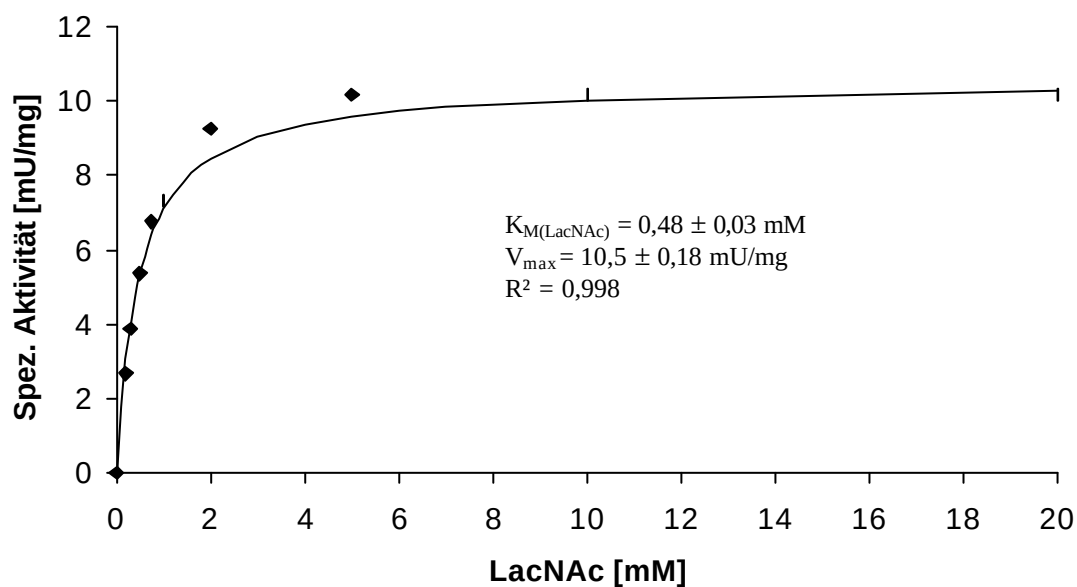


Abb. 61: Bestimmung des K_M -Wertes für LacNAc (5 mM UDP-Gal, 0-20 mM LacNAc, 1 mM MnCl_2 , 80 mM Na Cacolydat/HCl pH 6,0, 30°C, 15 min.)

3.9.5.1 Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP und Gal(α 1-3)Gal(α 1-UDP als Inhibitoren

Die aktivierten Disaccharide Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP und Gal(α 1-3)Gal(α 1-UDP wurden als Inhibitoren für die rekombinante α 1-3GalT aus Maus getestet. Mit keinem der beiden getesteten Nucleotiddisaccharide im Bereich von 0-20 mM eine Inhibition nachgewiesen werden. Anhand der fehlenden Inhibition kann abgeleitet werden, daß diese aktivierten Disaccharide nicht an das Enzym gebunden werden. Daher wurden weitere Versuche zur Übertragung nicht durchgeführt.

3.9.6 Zusammenfassende Diskussion

Nucleotidaktivierte Di- und Oligosaccharide wurden als Donorsubstrate und Inhibitoren für verschiedene Glycosyltransferasen getestet. **Tabelle 17** faßt die Ergebnisse zusammen. Eine Übertragung der Zucker konnte mit keiner der getesteten Glycosyltransferasen detektiert werden. Eine Inhibition konnte für die Core2 GlcNAc-Transferase der O-Glycanbiosynthese und für die Saccharose Synthase festgestellt werden. Das sind damit die ersten Beispiele für eine Inhibition von Glycosyltransferasen mit aktivierten Disacchariden. Dabei ist die Inhibition der GlcNAcT mit UDP-LacNAc von besonderem Interesse, da hier der K_I -Wert im Bereich des K_M -Wertes des Donorsubstrates liegt. Eine *in vivo* Funktion von aktivierten Di- und Oligosacchariden als Regulatoren von Glycosyltransferasen ist somit nicht auszuschließen.

Tabelle 17: Nucleotidaktivierte Di- und Trisaccharide als Substrate oder Inhibitoren für Glycosyltransferasen.

Glycosyltransferase	Substrat	Übertragung	Inhibition (K_I)
GlcNAcT der N-Glycanbiosynthese	UDP-LacNAc	keine	keine
Core2 GlcNAcT	UDP-LacNAc	keine	$0,9 \pm 0,20 \text{ mM}^1$ $4,5 \pm 0,2 \text{ mM}^2$
	Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP	keine	$2,2 \pm 0,8 \text{ mM}^1$
	UDP-LacDiNAc	keine	$3,6 \pm 0,4 \text{ mM}^1$
	UDP-Lac	keine	$16,2 \pm 1,9 \text{ mM}^1$
Saccharose Synthase	Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)Glc(α 1-UDP	ng	keine
	Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP	keine	keine
β 4GalT	Gal(α 1-3)Gal(α 1-UDP	ng	keine
	Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP	keine	keine
α 3GalT	Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP	keine	keine
	Gal(α 1-3)Gal(α 1-UDP	keine	keine

¹ = kompetitiv im Bezug auf den Donor; ² = nicht-kompetitiv im Bezug auf den Akzeptor

ng = nicht getestet

Die Hypothese, daß es sich bei Nucleotidoligosacchariden um *in vivo* Donorsubstrate von Glycosyltransferasen handelt, ist nach dem heutigen Kenntnisstand über die Biosynthesewege von Glycoproteinen und Glycolipiden unwahrscheinlich. Diese Frage sollte aber dennoch nicht vergessen werden, da für viele Glycostrukturen die Biosynthese noch nicht geklärt ist. Von besonderem Interesse ist hierbei z.B. die Biosynthese von Poly-LacNAc Strukturen in Säugern und Parasiten. In diesem Zusammenhang wurde dem Arbeitskreis von Dr. C.H. Hokke (Universität Leiden, Niederlande) UDP-LacNAc zur Verfügung gestellt.

In ersten Tests wurde versucht, UDP-LacNAc mit den β 3GlcNAc-T aus Human- und Rinder-serum auf den Akzeptor Gal(β 1-4)GlcNAc-APTS (APTS ist ein Fluoreszenz-Label) zu übertragen. Dieser Versuch verlief negativ, Inhibitionsversuche und Tests mit anderen Transferasen aus Schistosomen werden folgen.

Für die funktionelle Charakterisierung von Nucleotidoligosacchariden mit Glycosyltransferasen eröffnet sich mit der Identifikation von ganzen Glycosyltransferase-Familien (Almeida *et al.* 1999; Schwientek *et al.* 1999) ein enormes Potential für Inhibitions- und Übertragungsversuche. Der etablierte synthetische Zugang zu Nucleitidoligosacchariden mit Glycosidasen macht es in Zukunft auch möglich, eine noch größere Strukturvielfalt für biochemische Untersuchungen von neugewonnenen Glycosyltransferasen bereitzustellen.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Nucleotidzucker als Akzeptorsubstrate für Glycosidasen

In der vorliegenden Arbeit wurde das Spektrum der Glycosidasen, mit denen die Synthese von nucleotidaktivierten Di- und Oligosacchariden möglich ist, erweitert. Bei allen getesteten Glycosidasen wurde der Effekt einer Reaktionsführung bei Tieftemperaturen untersucht.

Die β -Galactosidasen aus *Bacillus circulans*, *Diplococcus pneumoniae* und Stierhoden konnten erfolgreich für die Synthese von aktivierten Di- und Oligosacchariden eingesetzt werden. Für das Enzym aus *B. circulans* konnte dabei durch eine Reaktionsführung bei -5°C eine erhöhte Produktbildung erreicht werden. Der Ansatz der Tieftemperatursynthese konnte auch mit der α -Galactosidase aus *Bifidobacterium adolescentis* angewendet werden. Hier wurden ausschließlich bei -5°C aktivierte Disaccharide erhalten. Mit Cyclodextrinen als Löslichkeitsvermittlern für *pNP*- β -GlcNAc und *pNP*- β -GalNAc wurde mit den β -*N*-Acetylhexosaminidasen aus *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium oxalicum*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus flavipes* und *Aspergillus tamaraii* der Zugang zu aktivierten Disacchariden geschaffen. Tieftemperatursynthesen waren mit diesen Ansätzen aufgrund der hohen Cyclodextrinkonzentrationen nicht möglich.

Mit der β -Galactosidase aus *B. circulans* wurden UDP-LacNAc, UDP-Lac, Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP, Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)Glc(α 1-UDP und Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP im präparativen Maßstab hergestellt. Die Strukturanalyse der Produkte ergab in allen fünf Fällen eine stereo- und regioselektive Glycosylierung der 4-OH Position des jeweiligen Akzeptorsubstrates (**Tabelle 18**).

Die Synthese von nucleotidaktivierten Disacchariden mit der β -Galactosidase aus Stierhoden wurde für das Eigenisolat hinsichtlich Substratspektrum, Substratkonzentration, pH-Wert und Temperatur untersucht und optimiert. Eine präparative Synthese, Isolierung und Charakterisierung der Produkte mit UDP-Glc und UDP-GlcNAc als Akzeptoren schloß sich an (**Tabelle 18**). Die Synthesen verliefen nicht regioselektiv, in NMR-Analysen konnten neben dem (β 1-4)-Isomer auch Signale eines anderen Isomers festgestellt werden. Eine genaue Charakterisierung war nicht möglich, wahrscheinlich handelt es sich aber um das (β 1-3)-Isomer.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß die Kopplung der β -Galactosidasereaktion mit einer α 2,3-Sialyltransferasereaktion durchgeführt werden kann, wodurch es möglich ist, ein Analogon des sialylierten Thomsen-Friedenreich-Antigens zu synthetisieren.

Die Reaktionen der α -Galactosidase aus *Bifidobacterium adolescentis* wurden ebenfalls hinsichtlich Enzym-, Substratkonzentration und Reaktionstemperatur optimiert. Durch eine Reaktionsführung bei -5°C konnte die Bildung von aktivierten Disacchariden erreicht werden. Eine Synthese, Isolierung und Charakterisierung der Produkte mit UDP-Glc und UDP-Gal als Akzeptorsubstraten schloß sich an (**Tabelle 18**).

Für eine Synthese von aktivierten Disacchariden mit β -N-Acetylhexosaminidasen wurde das Enzym aus *Trichoderma harzianum* hinsichtlich pH-Wert, Reaktionszeiten und kinetischen Daten untersucht. Für eine präparative Synthese wurden pNP- β -GalNAc und UDP-GlcNAc als Substrate eingesetzt (**Tabelle 18**).

Tabelle 18: Präparative Synthesen von Nucleotiddi- und Oligosacchariden.

Akzeptor	Produkt	Ausbeute
b-Galactosidase <i>Bacillus circulans</i>		
UDP-Glc	Gal(β 1-4)Glc(α 1-UDP	32,3 mg (4,8%)
	Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)Glc(α 1-UDP	12,2 mg (1,5%)
UDP-GlcNAc	Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP	62,8 mg (7,3%)
	Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP	35 mg (3,4 %)
UDP-Gal	Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP	6,7 mg (6,7%)
b-Galactosidase aus Stierhoden		
UDP-Glc	Gal(β 1-3/4)Glc(α 1-UDP	18,5 mg (2,4%)
UDP-GlcNAc	Gal(β 1-3/4)GlcNAc(α 1-UDP	16,8 mg (4,1%)
a-Galactosidase aus <i>Bifidobacterium adolescentis</i>		
UDP-Glc	Gal(α 1-3)Glc(α 1-UDP	7,3 mg (4,7%)
UDP-Gal	Gal(α 1-3)Gal(α 1-UDP	4,1 mg (3,3%)
b-N-Acetylhexosaminidase aus <i>Trichoderma harzianum</i>		
UDP-GlcNAc	GalNAc(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP	31,3 mg (3,6%)

Durch die Etablierung der präparativen enzymatischen Synthese von Nucleotiddi- und Oligosacchariden konnten zehn verschiedene Produkte synthetisiert werden, die in Inhibitions- und Übertragungsstudien mit Glycosyltransferasen eingesetzt wurden.

Nucleotiddi- und Oligosaccharide als Donorsubstrate und Inhibitoren für Glycosyltransferasen

Nucleotiddi- und Oligosaccharide könnten interessante Donorsubstrate für *in vitro* Synthesen von Glycokonjugaten mit Glycosyltransferasen sein. Eine *en bloc* Übertragung von Nucleotiddi- und Oligosacchariden mit den hier getesteten Glycosyltransferasen konnte jedoch nicht gezeigt werden.

Die Funktion von Nucleotiddi- und Oligosacchariden als *in vitro* Inhibitoren wurde für verschiedene Glycosyltransferasen getestet. Die Inhibitionen der rekombinanten murinen β 1-6GlcNAc-Transferase und rekombinanten Saccharose Synthase 1 aus Kartoffel konnten gezeigt werden (**Tabelle 19**). Besonders hervorzuheben ist hierbei die Inhibition der rekombinanten murinen GlcNAc-Transferase, dem Schlüsselenzym der O-Glycan-Biosynthese. Mit UDP-LacNAc als Inhibitor konnte eine kompetitive Inhibition zum Donorsubstrat mit einer Inhibitionskonstanten von 0,9 mM gemessen werden. Dieser K_i -Wert liegt damit im Bereich des K_M -Wertes für das Donorsubstrat. Dieses Ergebnis ist ein vielversprechender Hinweis auf eine mögliche regulatorische Rolle von Nucleotiddi- und Oligosacchariden *in vivo*.

Tabelle 19: Nucleotidaktivierte Di- und Trisaccharide als Substrate für Glycosyltransferasen.

Glycosyltransferase	Substrat	Übertragung	Inhibition (K_i)
GlcNAcT der N-Glycanbiosynthese	UDP-LacNAc	keine	ng
Core2 GlcNAcT	UDP-LacNAc	keine	$0,9 \pm 0,2 \text{ mM}^1$ $4,5 \pm 0,2 \text{ mM}^2$
	Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP	keine	$2,2 \pm 0,8 \text{ mM}^1$
	UDP-LacDiNAc	ng	$3,6 \pm 0,4 \text{ mM}^1$
Saccharose Synthase	UDP-Lac	keine	$16,2 \pm 1,9 \text{ mM}^1$
	Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)Glc(α 1-UDP	ng	keine
β 4GalT	Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP	keine	keine
	Gal(α 1-3)Gal(α 1-UDP	ng	keine
α 3GalT	Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP	keine	keine
	Gal(α 1-3)Gal(α 1-UDP	keine	keine

¹ = kompetitiv im Bezug auf den Donor; ² = nicht-kompetitiv im Bezug auf den Akzeptor

ng = nicht getestet

5 MS und NMR

5.1 Massenspektren

Die Bestimmung der Molmassen der Produkte wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Kamerling (Institute of Bio-Organic Chemistry, Universität Utrecht, Niederlande) durchgeführt. Die Molmassen der Produkte wurden mittels *Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry* (FAB MS) im Negativ Ionen Modus an einem JEOL JMS-SX/SX 102A Viersektoreninstrument bei einer Beschleunigungsspannung von 6 KeV durchgeführt. Das Gerät war mit einer JEOL MS-FAB 10D FAB *gun* ausgerüstet, welche mit einem 10 mA Emissionsstrom arbeitet und einen Strahl von 4 keV Xenon Atome erzeugt. 1,0 μ L der Probe (10 μ g in 0,1 mL 5% Essigsäure) wurde gelöst, in 1,0 μ L Glycerin oder Thioglycerinmatrix dispergiert und lineare Massenabtastungen über 1000 Dalton aufgezeichnet. Die aufgezeichneten Daten wurden mit der JOEL Komplement Software ausgewertet.

Mittels FAB-MS (Negativ Ionen Modus) Spektrometry wurde die molekulare Masse der gereinigten Produkte bestimmt. In allen Fällen konnte ein typisches Glycerol-Spektrum (m/z $[91 + n \cdot 92]$, mit $n=0, 1, 2 \dots 9$) mit einem zusätzlichen intensiven *Peak* in der Hochmassenregion beobachtet werden, welcher dem pseudomolekularen Ion $[M-H]^-$ entspricht. Zusätzlich konnten die mit Natrium substituierten pseudomolekularen Ionen detektiert werden. Das Auftreten der freien Säure als Hauptprodukt ist auf die Salzpräzipitation während der Aufreinigung zurückzuführen. Bei der Isolierung von UDP-LacNAc ohne Salzpräzipitation (Elling *et al.* 1999) wurde das Mononatrium-Produkt als Hauptprodukt detektiert.

5.1.1 UDP-LacNAc, **β**-Galactosidase aus *B. circulans*

Für UDP-LacNAc (**Abb. 62**) wurden pseudomolekulare Ionen bei m/z 767,9 ($[M-H]^-$, Hex-HexNAc-UDP) detektiert. Zusätzlich konnten die pseudomolekularen Ionen mit Natrium bei m/z 789,9 nachgewiesen werden.

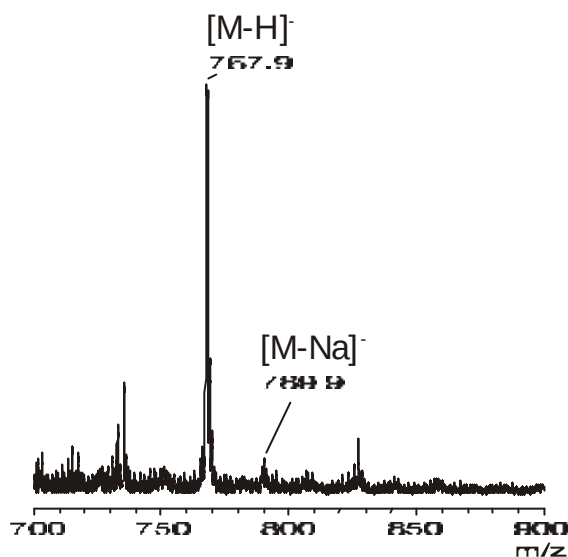


Abb. 62: FAB-MS (Negativ-Ionen Modus) Spektrum von UDP-LacNAc (β -Galactosidase *B. circulans*).

5.1.2 Gal(**β**1-4)Gal(**β**1-4)GlcNAc(**α**1-UDP, **β**-Galactosidase *B. circulans*)

Für Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP (**Abb. 63**) wurden pseudomolekulare Ionen bei m/z 930,8 ($[M-H]^-$, Hex₂-HexNAc-UDP) detektiert. Zusätzlich konnten die pseudomolekularen Ionen mit Natrium bei m/z 952,8 nachgewiesen werden.

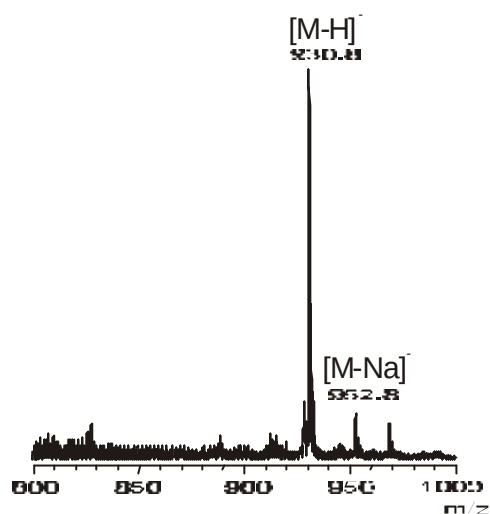


Abb. 63: FAB-MS (Negativ-Ionen Modus) Spektrum von Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP (β -Galactosidase *B. circulans*).

5.1.3 UDP-Lac, β -Galactosidase *B. circulans*

Für UDP-Lac (**Abb. 64**) wurden pseudomolekulare Ionen bei m/z 727,0 ($[M-H]^-$, Hex₂-UDP) detektiert. Zusätzlich konnten die pseudomolekularen Ionen mit Natrium bei m/z 749,0 nachgewiesen werden.

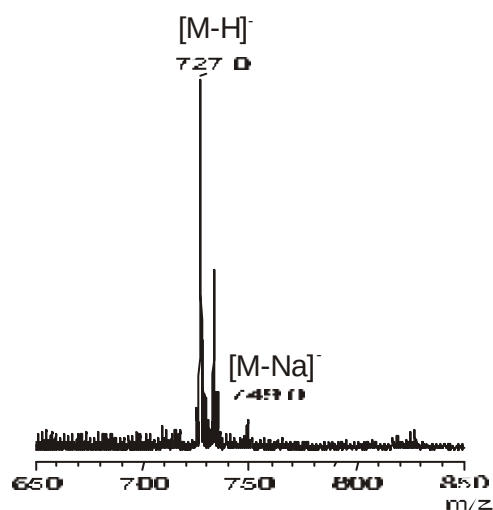


Abb. 64: FAB-MS (Negativ-Ionen Modus) Spektrum von UDP-Lac (β -Galactosidase *B. circulans*).

5.1.4 Gal(**β** 1-4)Gal(**β** 1-4)Glc(**α** 1-UDP, **β**-Galactosidase *B. circulans*)

Für Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)Glc(α 1-UDP (**Abb. 65**) wurden pseudomolekulare Ionen bei m/z 889,7 ($[M-H]^-$, Hex₃-UDP) detektiert. Zusätzlich konnten die pseudomolekularen Ionen mit Natrium bei m/z 911,6 nachgewiesen werden.

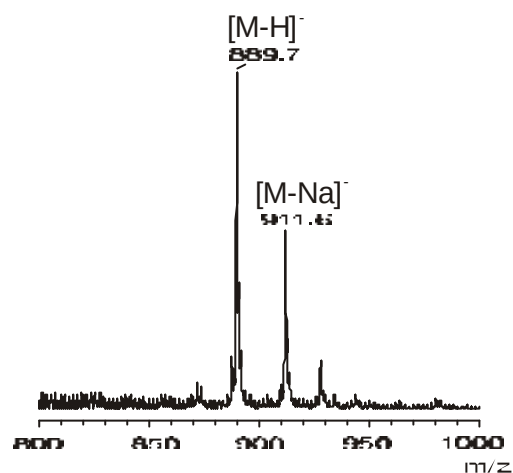


Abb. 65: FAB-MS (Negativ-Ionen Modus) Spektrum von Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)Glc(α 1-UDP (β -Galactosidase *B. circulans*).

5.1.5 Gal(b** 1-4)Gal(**a** 1-UDP, **b**-Galactosidase *B. circulans***

Für Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP (**Abb. 64**) wurden pseudomolekulare Ionen bei m/z 727,0 ($[M-H]^-$ Hex₂-UDP) detektiert.

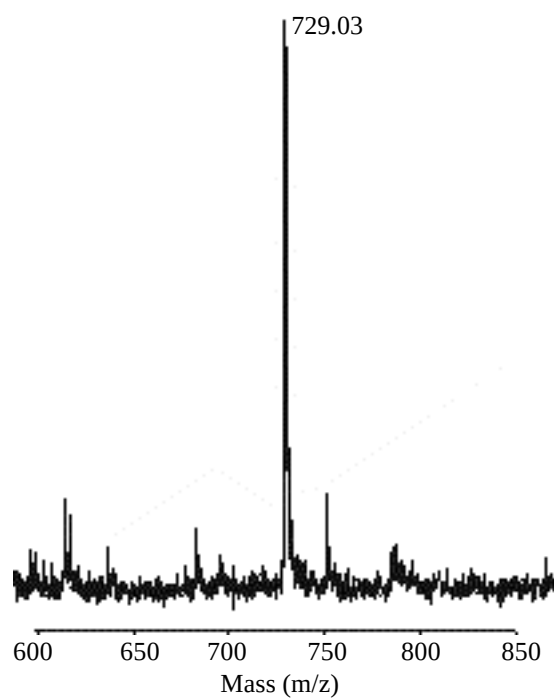


Abb. 66: FAB-MS (Negativ-Ionen Modus) Spektrum von Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP (β -Galactosidase *B. circulans*).

5.1.6 Gal(**b** 1-3/4)GlcNAc(**a** 1-UDP, **b**-Galactosidase Stierhoden

Für Gal(β 1-3/4)GlcNAc(α 1-UDP (**Abb. 67**) wurden pseudomolekulare Ionen bei m/z 769,32 ($[M-H]^-$, Hex-HexNAc-UDP) detektiert. Zusätzlich konnten die pseudomolekularen Ionen mit Natrium bei m/z 791,34 nachgewiesen werden.

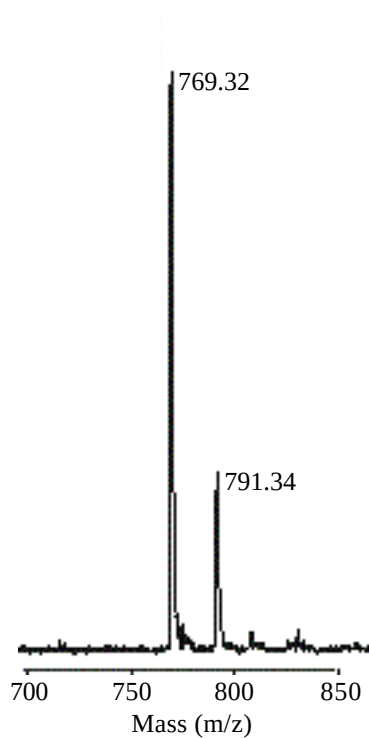


Abb. 67: FAB-MS (Negativ-Ionen Modus) Spektrum von Gal(β 1-3/4)GlcNAc(α 1-UDP (β -Galactosidase Stierhoden).

5.1.7 Gal(b** 1-3/4)Glc(**a** 1-UDP, **b**-Galactosidase Stierhoden)**

Für Gal(β 1-3/4)Glc(α 1-UDP (**Abb. 68**) wurden pseudomolekulare Ionen bei m/z 728,88 ($[M-H]^-$, Hex₂-UDP) detektiert. Zusätzlich konnten die pseudomolekularen Ionen mit Natrium bei m/z 750,90 nachgewiesen werden.

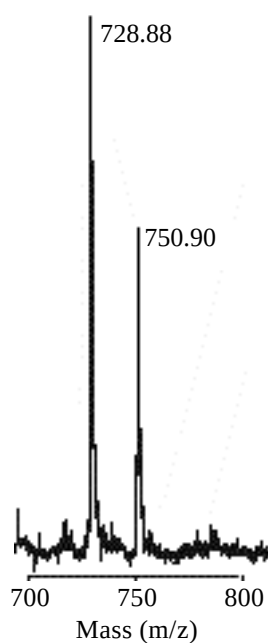


Abb. 68: FAB-MS (Negativ-Ionen Modus) Spektrum von Gal(β 1-3/4)Glc(α 1-UDP (β -Galactosidase Stierhoden).

5.1.8 Gal(α 1-3)Glc(α 1-UDP, α -Galactosidase *B. adolescentis*)

Für Gal(α 1-3)Glc(α 1-UDP (**Abb. 69**) wurden pseudomolekulare Ionen bei m/z 728,62 ($[M-H]^-$, Hex₂-UDP) detektiert.

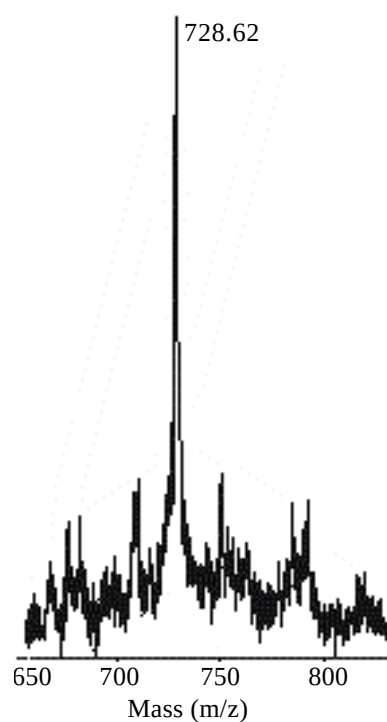


Abb. 69: FAB-MS (Negativ-Ionen Modus) Spektrum von Gal(α 1-3)Glc(α 1-UDP (α -Galactosidase *B. adolescentis*).

5.1.9 GalNAc(b** 1-4)GlcNAc(**a** 1-UDP, **b**-N-Acetylhexosaminidase, *T. harzianum*)**

Für GalNAc(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP (**Abb. 70**) wurden pseudomolekulare Ionen bei m/z 811,12 ($[M-H]^-$, HexNAc-HexNAc-UDP) detektiert. Zusätzlich konnten die pseudomolekularen Ionen mit Natrium bei m/z 833,20 nachgewiesen werden.

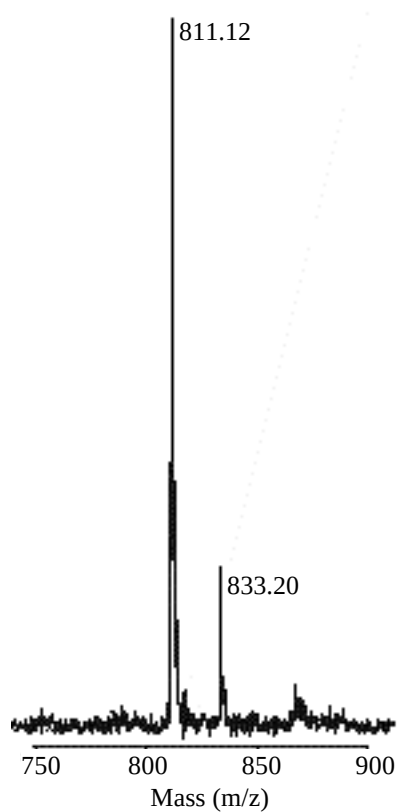


Abb. 70: FAB-MS (Negativ-Ionen Modus) Spektrum von GalNAc(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP (β -N-Acetylhexosaminidase *T. harzianum*).

5.1.10 Core2-Bz, Core2 **b** 1-6GlcNAc-Transferase

Für Gal(β 1-3)[GlcNAc(β 1-6)]GalNAc(α 1-OBz (Core2-Bz) (Daten hier nicht aufgeführt) wurden pseudomolekulare Ionen bei m/z 677,2 ($[M-H]^-$, Hex-HexNAc₂-Bz) detektiert. Zusätzlich konnten die pseudomolekularen Ionen mit Natrium bei m/z 699,2 nachgewiesen werden.

5.1.11 Core6-Bz, Core2 **b** 1-6GlcNAc-Transferase

Für GlcNAc(β 1-6)GalNAc(α 1-OBz (Core6-Bz) (**Abb. 71**) wurden pseudomolekulare Ionen bei m/z 537,53 ($[M-Na]^-$, Hex-HexNAc-Bz) detektiert. Zusätzlich konnten die pseudomolekularen Ionen mit Kalium bei m/z 553,48 nachgewiesen werden

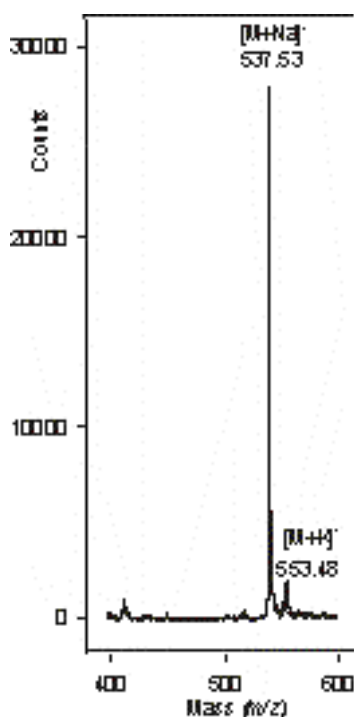


Abb. 71: FAB-MS (Negativ-Ionen Modus) Spektrum von GlcNAc(β 1-6)GalNAc(α 1-OBz (Core2 β 1-6GlcNAc-Transferase).

5.2 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Experimente zur Strukturaufklärung der Produkte wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. Kamerling (Institute of Bio-Organic Chemistry, Universität Utrecht, Niederlande) durchgeführt.

Die Reaktionsprodukte wurden vor der Analyse wiederholt in D₂O (99,9% D; Isotec) aufgenommen und gefriergetrocknet und schließlich in 450 µL D₂O gelöst. Protonenentkoppelte 75,469 MHz ¹³C-Spektren wurden an einem Bruker AC-300 Spektrometer bei Proben Temperaturen von 300 K aufgezeichnet. Chemische Verschiebungen (δ) beziehen sich auf externes Aceton (δ 31,08). Auflösungsverstärkte ¹H 1D und 2D NMR Spektren wurden an Bruker AMX-500 oder Bruker AMX-600 Instrumenten bei Proben Temperaturen von 300 K aufgenommen. Chemische Verschiebungen wurden in ppm, bezogen auf internes Acetyl (δ 1,908) ausgedrückt. HOD Signalunterdrückung wurde durch Anwendung einer WERFT Pulssequenz (Hard *et al.* 1992) in 1D ¹H Experimenten und durch Vorsättigung für 1 s in 2D Experimenten erreicht.

2D TOCSY Spektren wurden mit Hilfe von MLEV-17 Mischungssequenzen mit effektiven Spin-Lock Zeiten zwischen 20 und 100 ms aufgezeichnet. 2D ROESY Spektren wurden mit einer Mischungszeit von 250 ms aufgezeichnet. Die Spin-Lock Feldstärke entsprach einem 90° Puls von ca. 115 µs. Protonen ermittelnde ¹³C-¹H 2D HMBC Experimente wurden bei einer ¹H-Frequenz von 500,139 und 600,140 MHz (125,769 und 150,916 MHz für ¹³C) mit einer von Summers *et al.* (1997) beschriebenen Pulssequenz durchgeführt. Die Verzögerungszeit für die Ermittlung der *long-range* ¹³C-¹H Kopplungen wurde auf 60 ms festgesetzt. Die ¹H 1D und 2D Spektren wurden an Silicon Graphics IRIS Workstations (Indigo 2 und O2) mit Bruker UXNMR Software ausgewertet. ¹³C 1D Spektren wurden an Silicon Graphics Workstations (Indigo 2 und O2) mit TRITON Software bearbeitet.

5.2.1 UDP-*N*-Acetyllactosamin, **b**-Galactosidase *B. circulans*

Die Interpretation der ^1H und ^{13}C 1D und 2D (homo und heteronuclear) NMR Spektren von UDP-LacNAC erfolgte wie bei Elling *et al.* (1999) beschrieben. Das 1D ^1H NMR Spektrum von UDP-LacNAC (**Abb. 72**) zeigte vier Signale im Tieffeld vom HOD Signal (δ 4,751). Zwei dieser Signale, bei δ 7,988 ($^3J_{6,5}$ 8,4 Hz, U_6) und δ 5,962 ($^3J_{5,6}$ 8,4 Hz, U_5), wurden den Protonen des Uracilrings an Hand von Literaturdaten zugeordnet (Köplin *et al.* 1997; Yoon *et al.* 1996).

Das anomere Signal bei δ 5,952 ($^3J_{1,2}$ 3,6 Hz) wurde der Ribose R (β Konfiguration, Furanoseringform) zugeordnet, wohingegen das verbleibende anomere Signal bei δ 5,510 ($^3J_{1,2}$ 3,0 Hz, $^3J_{1,P}$ 7,2 Hz) dem GlcNAC-Rest A (α -Konfiguration, Pyranoseringform), welcher mit der Phosphatgruppe verbunden ist, zugeordnet wurde.

Weiterhin konnten zwei chemische Verschiebungen im Hochfeld der HOD Reasonanz zugeordnet werden: das Singulett bei δ 2,071, welches von den *N*-Acetyl Protonen des GlcNAC-Restes A stammt, sowie des anomere Dublett bei δ 4,458 ($^3J_{1,2}$ 7,8 Hz), das den Gal-Rest B reflektiert (β -Konfiguration, Pyranoseringform).

Das ^{13}C -Spektrum (**Abb. 73**) zeigte vier Signale in der anomeren Region bei δ 108,0 (B_1), 103,21 (U_5), 95,04 (A_1) und 89,58 (R_1). Weiterhin wurden vier Signale in der Tieffeldregion bei δ 175,41 ($\text{A}_{\text{C=O}}$), 166,92 (U_2), 152,10 (U_4) und 142,02 (U_6) beobachtet. Typische GlcNAC-Resonanzen wurden bei δ 22,77 (NAC-CH_3) und δ 53,81 (A_2) gefunden. Die Signale bei δ 60,29, 61,68 und 65,39 spiegeln die Anwesenheit von drei Hydroxymethylgruppen wider, von denen die letztere substituiert ist.

Durch 2D TOCSY, ROESY (**Abb. 74**) und HMBC Experimente konnten alle ^{13}C und ^1H Resonanzen in den 1D Spektren zugeordnet werden. Die anomere Konfiguration zwischen den Resten A und B wurde anhand der 2D ROESY und HMBC Experimente bestimmt. Im ROESY Spektrum zeigte die anomere Spur von B einige *Cross-Peaks* bei δ 3,998, 3,79, 3,737, 3,659 und 3,573. Der *Cross Peak* bei δ 3,573 wurde auf einen TOCSY-Transfer auf das H-2 des gleichen Restes zurückgeführt. Die *Cross-Peaks* bei δ 3,737 und 3,659 wurden als intramolekulare Wechselwirkungen zwischen H-5 und H-3 des B-Restes identifiziert. Die verbleibenden *Cross-Peaks* bei δ 3,998 und 3,79 wurden den intramolekularen Wechselwirkungen zu H-5 und H-4/3 des A-Restes zugeschrieben.

Im ^{13}C - ^1H HMBC Spektrum konnte durch die Kopplung zwischen $\text{A}_{\text{C-4}}$ und $\text{B}_{\text{H-1}}$ (δ 79,12 und 4,436) und zwischen $\text{B}_{\text{C-1}}$ und $\text{A}_{\text{H-4}}$ (δ 103,70 und 3,767) die Bindung zwischen den zwei Zuckerresten unzweifelhaft als (β 1-4)-Bindung identifiziert werden.

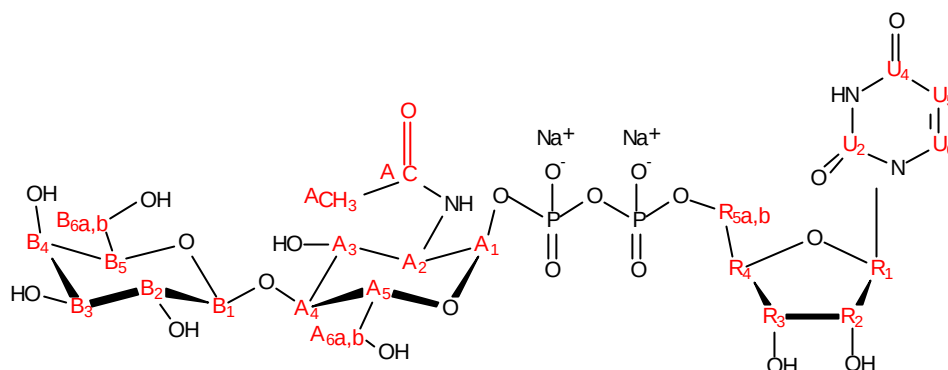


Tabelle 20: ^1H und ^{13}C chemische Verschiebungen von UDP-LacNAc (β -Galactosidase *B.circulans*).

Rest	$^1\text{H}^{\text{a}}$	$^{13}\text{C}^{\text{b}}$
A1	5,510 (3,0, 7,2)	95,04
A2	4,039	53,81
A3	3,813	70,41
A4	3,786	78,98
A5	4,013	72,41
A6a	3,779 ^c	60,29
A6b	3,906 ^c	
A CH ₃	2,071	22,77
A C=O	--	175,41
B1	4,458 (7,8)	103,80
B2	3,566	71,57
B3	3,658	73,25
B4	3,925	69,34
B5	3,722	76,04
B6a	3,850 ^c	61,68
B6b	3,791 ^c	--
R1	5,952 (3,6)	89,58
R2	4,358	74,75
R3	4,358	69,82
R4	4,296	83,65
R5a	4,261	65,39
R5b	4,210	--
U2	--	166,92
U4	--	152,10

Rest	$^1\text{H}^{\text{a}}$	$^{13}\text{C}^{\text{b}}$
U5	5,962 (8,4)	103,21
U6	7,998 (84)	142,02

^aIn ppm relativ zum Signal von internem Acetat

^bIn ppm relativ zum Signal von externem Aceton

^cDie Zuordnung könnte innerhalb eines Restes untereinander ausgetauscht werden

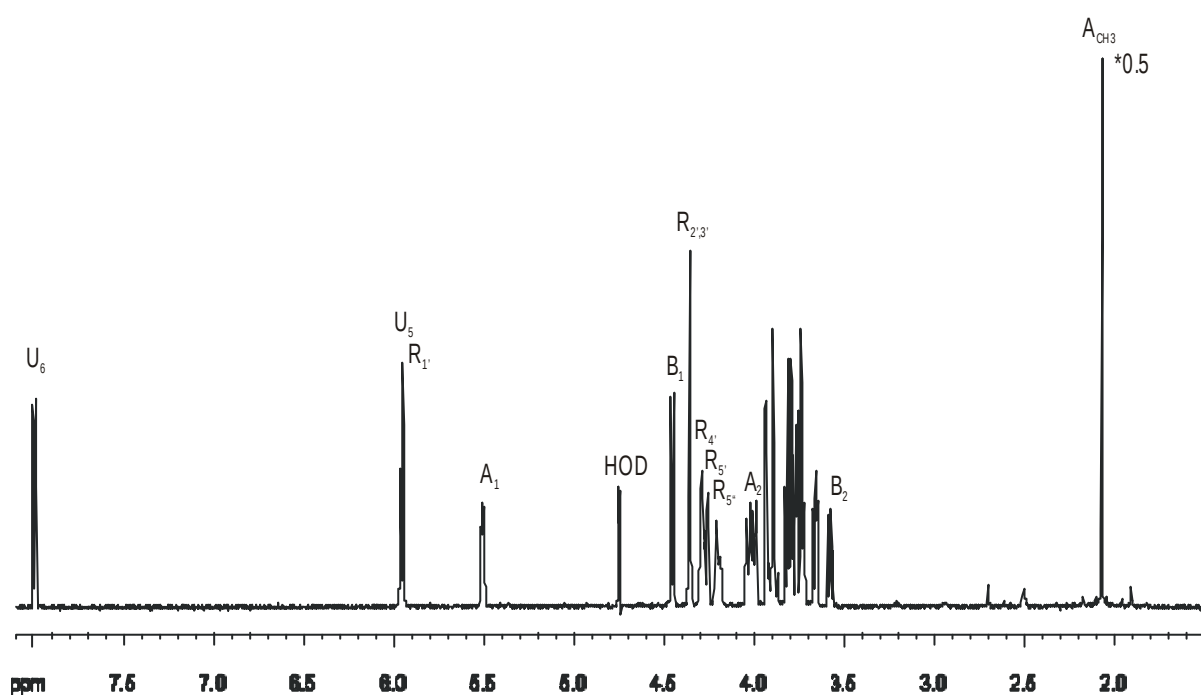


Abb. 72: 1D ^1H NMR-Spektrum (500 MHz, 300 K) von UDP-LacNAc (β -Galactosidase *B. circulans*).

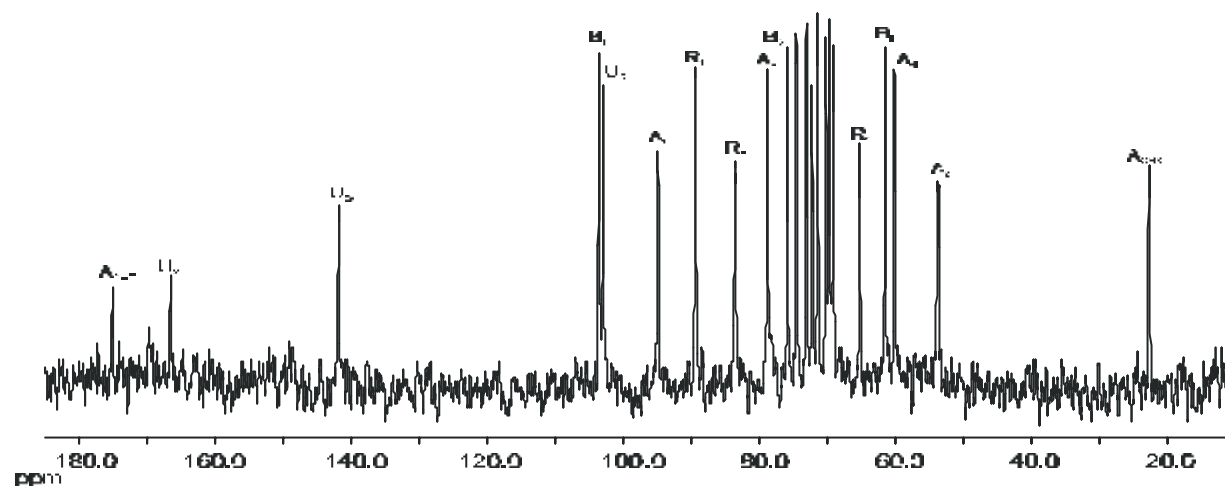


Abb. 73: 1D ^{13}C NMR-Spektrum (600 MHz, 300 K) von UDP-LacNAc (β -Galactosidase *B. circulans*)

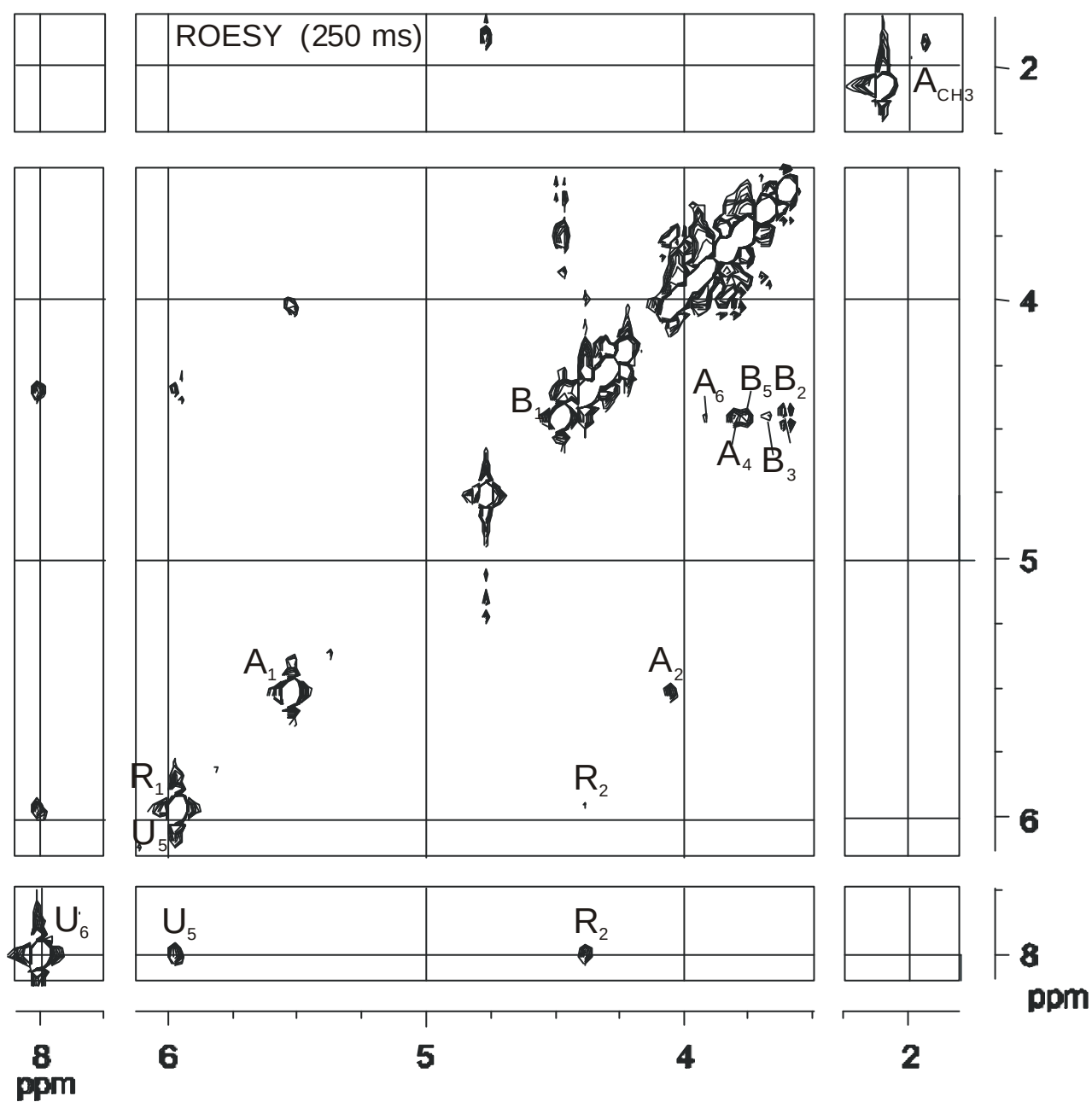


Abb. 74: 2D ROESY Spektrum (250 ms, 300 K) von UDP-LacNAc (β -Galactosidase *B. circulans*).

5.2.2 Gal(**b** 1-4)Gal(**b** 1-4)GlcNAc(**a** 1-UDP, **b**-Galactosidase aus *B.circulans*)

Im Vergleich zu dem 1D ^1H Spektrum von UDP-LacNAc indiziert ein zusätzliches β -anomeres Signal bei δ 4,614 ($\text{C}_{\text{H}-1}$) das nucleotidaktivierte Trisaccharid (**Abb. 75**). Das entsprechende anomere Signal im 2D TOCSY (100 ms) zeigte, daß es sich bei dem zusätzlichen Zuckerrest (C) um Galactose handelt. Die Art der glycosidischen Bindung wurde aus dem ROESY Spektrum (250 ms) (**Abb. 77**) abgeleitet. *Cross peaks* zwischen $\text{C}_{\text{H}-1}$ und $\text{B}_{\text{H}-4}$ (δ 4,614, 4,205) und zwischen $\text{B}_{\text{H}-1}$ und $\text{A}_{\text{H}-4}$ (δ 4,481, 3,791) indizieren eine ausschließliche (1-4)-Bindung.

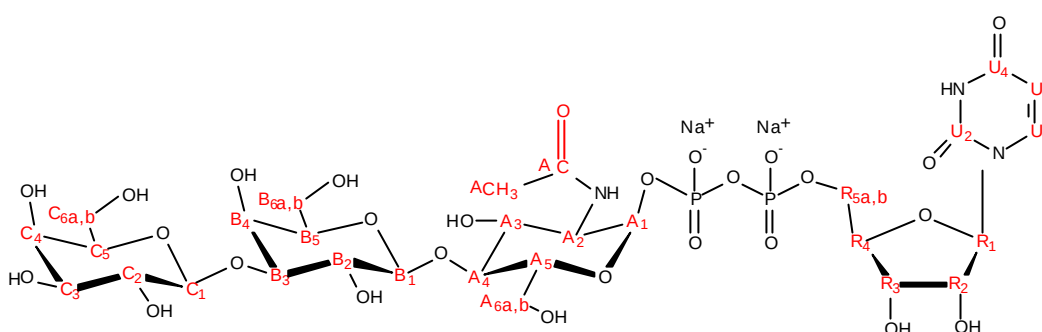


Tabelle 21: ^1H und ^{13}C chemische Verschiebungen von Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP (β -Galactosidase *B.circulans*)).

Rest	$^1\text{H}^{\text{a}}$	$^{13}\text{C}^{\text{b}}$
A1	5,5101 (3,0, 7,0)	94,65
A2	4,034	53,42
A3	3,810	70,01
A4	3,791	78,90
A5	4,006	71,52
A6a	3,773 ^c	59,88
A6b	3,901 ^c	--
A CH ₃	2,072	22,36
A C=O	--	n.d.
B1	4,481 (8,0)	103,45
B2	3,651	71,52
B3	3,780	73,22
B4	4,205	77,30
B5	3,931	75,49
B6a	n.d	61,28
B6b	n.d.	--
C1	4,614 (8,0)	104,54
C2	3,624	71,97

Rest	$^1\text{H}^a$	$^{13}\text{C}^b$
C3	6,617	73,06
C4	3,914	68,96
C5	n.d.	74,88
C6a	n.d.	60,93
C6b	n.d.	--
R1	5,951 (3,5)	89,23
R2	4,354	74,37
R3	4,354	69,36
R4	4,295	83,27
R5a	4,262	64,97
R5b	4,207	--
U2	--	n.d.
U4	--	n.d.
U5	5,962 (8,4)	102,83
U6	8,007 (8,4)	n.d.

^aIn ppm relativ zum Signal von internem Acetat

^bIn ppm relativ zum Signal von externem Aceton

^cDie Zuordnung könnte innerhalb eines Restes untereinander ausgetauscht werden

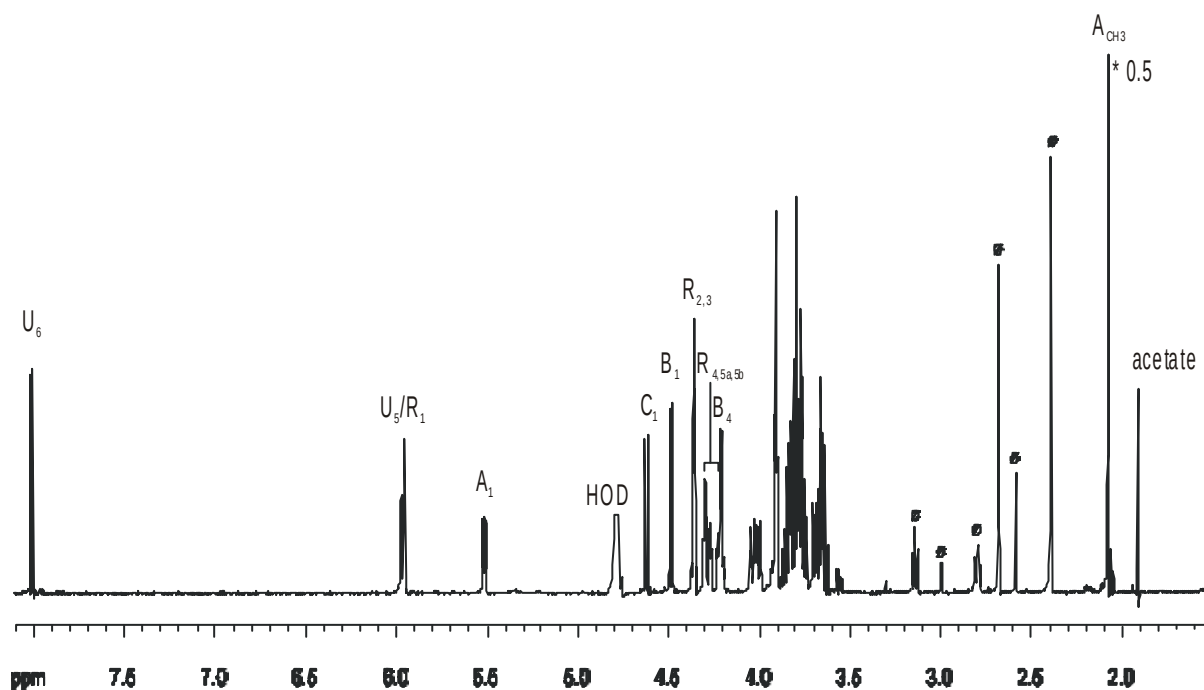


Abb. 75: 1D ^1H NMR-Spektrum (500 MHz, 300 K) von Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP (β -Galactosidase *B. circulans*)

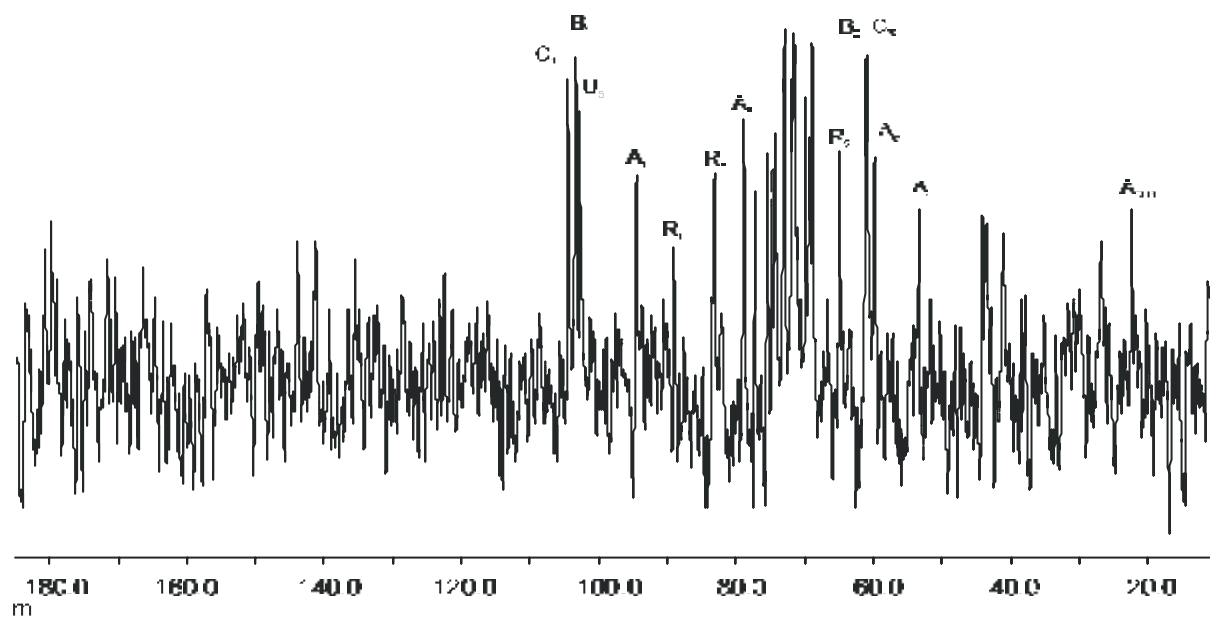


Abb. 76: 1D ^{13}C NMR-Spektrum (600 MHz, 300 K) von Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP (β -Galactosidase *B. circulans*).

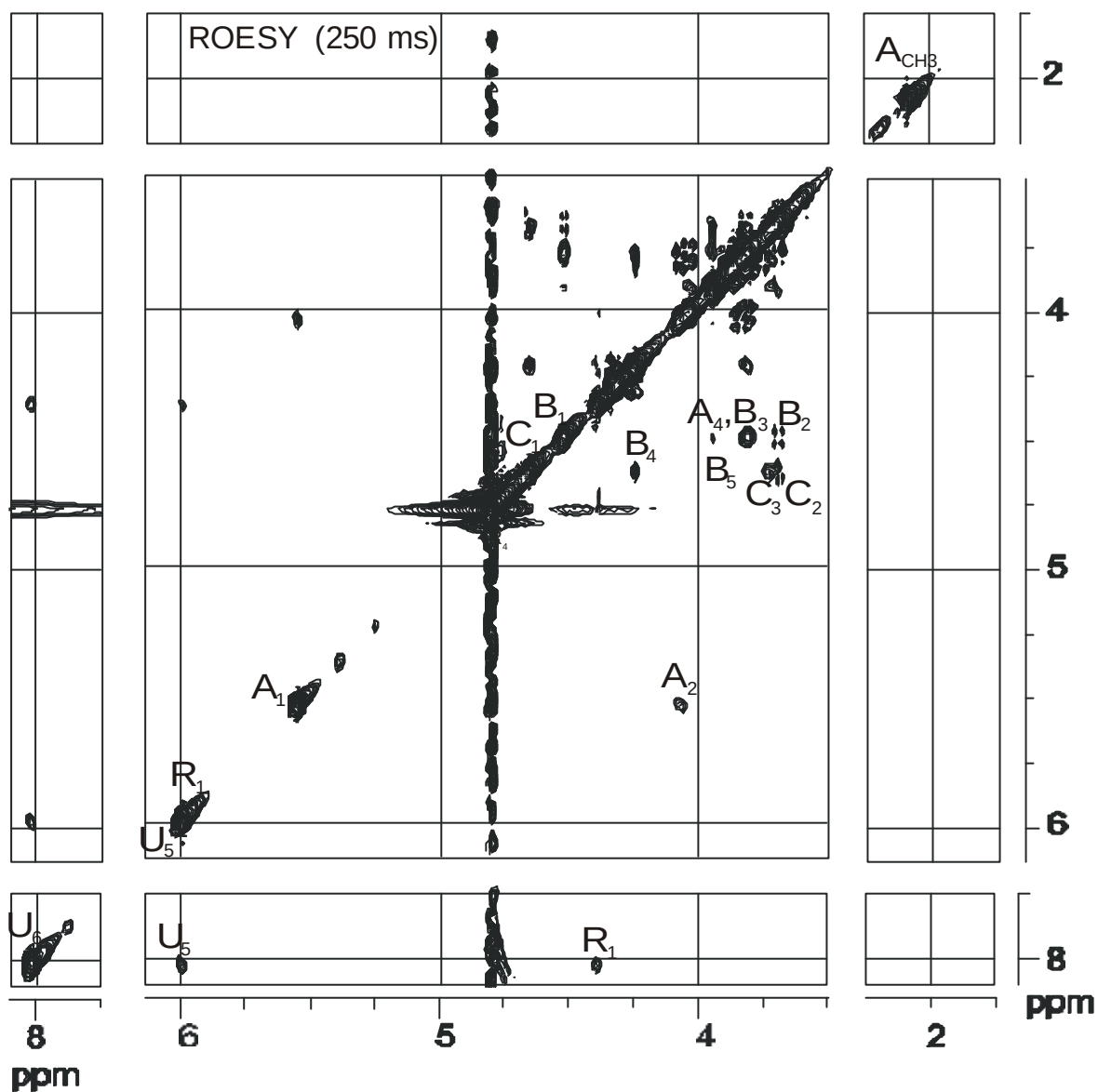


Abb. 77: 2D ROESY Spektrum (250 ms, 300 K) von Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP (β -Galactosidase *B. circulans*)).

5.2.3 UDP-Lactose, **b**-Galactosidase *B.circulans*

Das 1D ^1H NMR Spektrum (**Abb. 78**) von UDP-Lac zeigte vier Signale im Tieffeld vom HOD Signal (δ 4,751). Zwei dieser Signale, bei δ 7,998 ($^3J_{6,5}$ 8,4 Hz, U_6) und δ 5,977 ($^3J_{5,6}$ 8,4 Hz, U_5), wurden den Protonen des Uracilrings an Hand von Literaturdaten zugeordnet (Koplin *et al.* 1997; Yoon *et al.* 1996).

Das anomere Signal bei δ 5,958 ($^3J_{1,2}$ 3,5 Hz) wurde der Ribose R (β Konfiguration, Furanoseringform) zugeordnet, wohingegen das verbleibende anomere Signal bei δ 5,596 ($^3J_{1,2}$ 3,0 Hz, $^3J_{1,p}$ 7,2 Hz) dem Glc-Rest A (α -Konfiguration, Pyranoseringform), welcher mit der Phosphatgruppe verbunden ist, zugeordnet wurde.

Das anomere Dublett im Hochfeld der HOD Resonanz bei δ 4,455 ($^3J_{1,2}$ 7,5 Hz) konnte dem Gal-Rest B zugeordnet werden (β -Konfiguration, Pyranoseringform).

Das ^{13}C -Spektrum (**Abb. 79**) zeigte vier Signale in der anomeren Region bei δ 104,12 (B_1), 103,31 (U_5), 96,53 (A_1) und 89,67 (R_1). Weiterhin wurden vier Signale in der Tieffeldregion bei δ 166,40 (U_2), 152,75 (U_4) und 141,93 (U_6) beobachtet. Die Signale bei δ 60,26, 61,68 und 65,38 spiegeln die Anwesenheit von drei Hydroxymethylgruppen wider, von denen die letztere substituiert ist.

Durch 2D TOCSY, ROESY (**Abb. 80**) und HMBC Experimente konnten alle ^{13}C und ^1H Resonanzen in den 1D Spektren zugeordnet werden. Die 2D ROESY und ^1H - ^{13}C HMBC Spektren ermöglichten die Bestimmung des Bindungstyps. Im TOCSY Spektrum zeigte die anomere Spur von A_{H-1} bei δ 5,596 vier *Cross-Peaks* bei δ 3,565 (A_{H-2}), 3,795 (A_{H-3}), 3,687 (A_{H-4}) und 3,980 (A_{H-5}).

Die (β 1-4)-Bindung zwischen den Resten A und B konnte im ROESY Spektrum anhand von Wechselwirkungen zwischen B_{H-1} (δ 4,455) und A_{H-4} (δ 3,687) bestimmt und im HMBC Spektrum durch die Kopplungen über drei Bindungen zwischen B_{H-1} und A_{C-4} (δ 4,455, 78,92) und zwischen B_{C-1} und A_{H-4} (δ 104,1, 3,687) bestätigt werden.

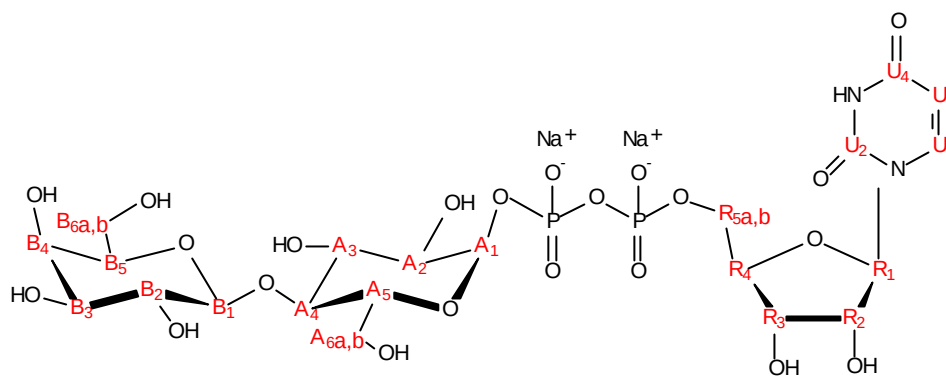


Tabelle 22: ^1H und ^{13}C chemische Verschiebungen von UDP-Lac (β -Galactosidase *B.circulans*).

Rest	$^1\text{H}^a$	$^{13}\text{C}^b$
A1	5,596 (3,5, 7,1)	96,53
A2	3,565	72,45
A3	3,795	72,56
A4	3,687	78,92
A5	4,980	72,14
A6a	3,885 ^c	60,26
A6b	3,906 ^c	--
B1	4,455 (7,5)	104,12
B2	3,576	71,88
B3	3,665	73,31
B4	3,933	69,17
B5	3,722	76,33
B6a	3,845	61,68
B6b	3,799	--
R1	5,958 (3,5)	89,67
R2	4,358	74,85
R3	4,370	69,92
R4	4,299	84,13
R5a	4,281	65,38
R5b	4,266	--
U2	--	166,40
U4	--	152,75
U5	5,977 (8,4)	103,31
U6	7,988 (8,4)	141,93

^aIn ppm relativ zum Signal von internem Acetat

^bIn ppm relativ zum Signal von externem Aceton

^cDie Zuordnung könnte innerhalb eines Restes untereinander ausgetauscht werden

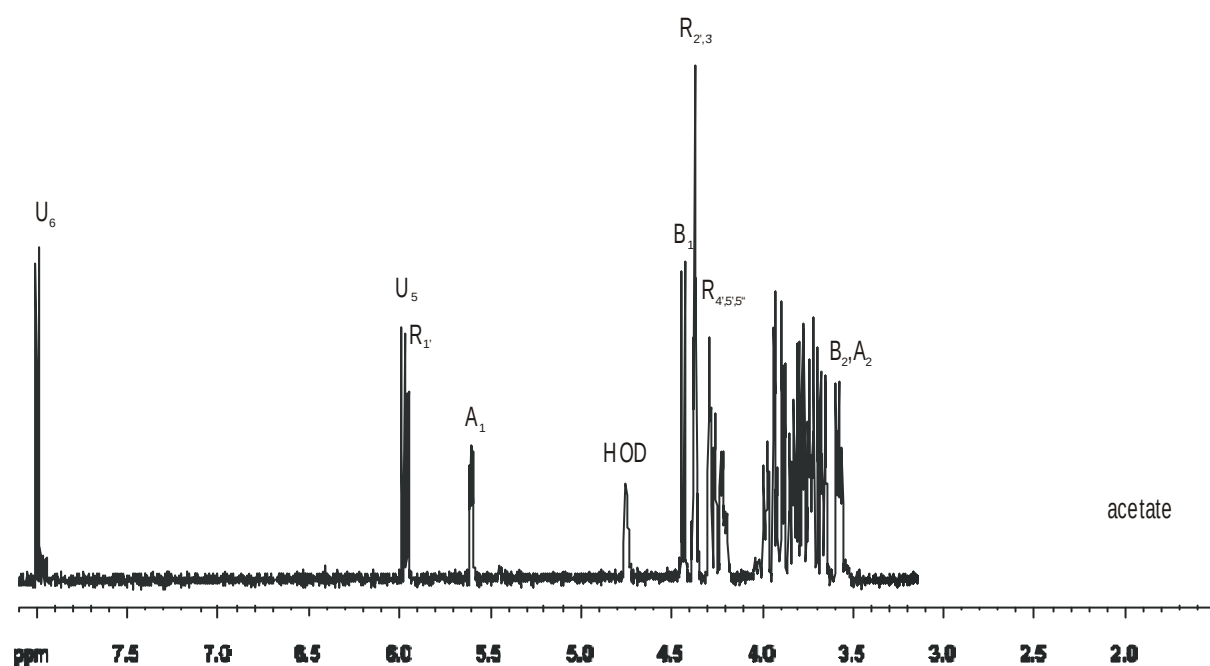


Abb. 78: 1D ^1H NMR-Spektrum (500 MHz, 300 K) von UDP-Lac (β -Galactosidase *B. circulans*).

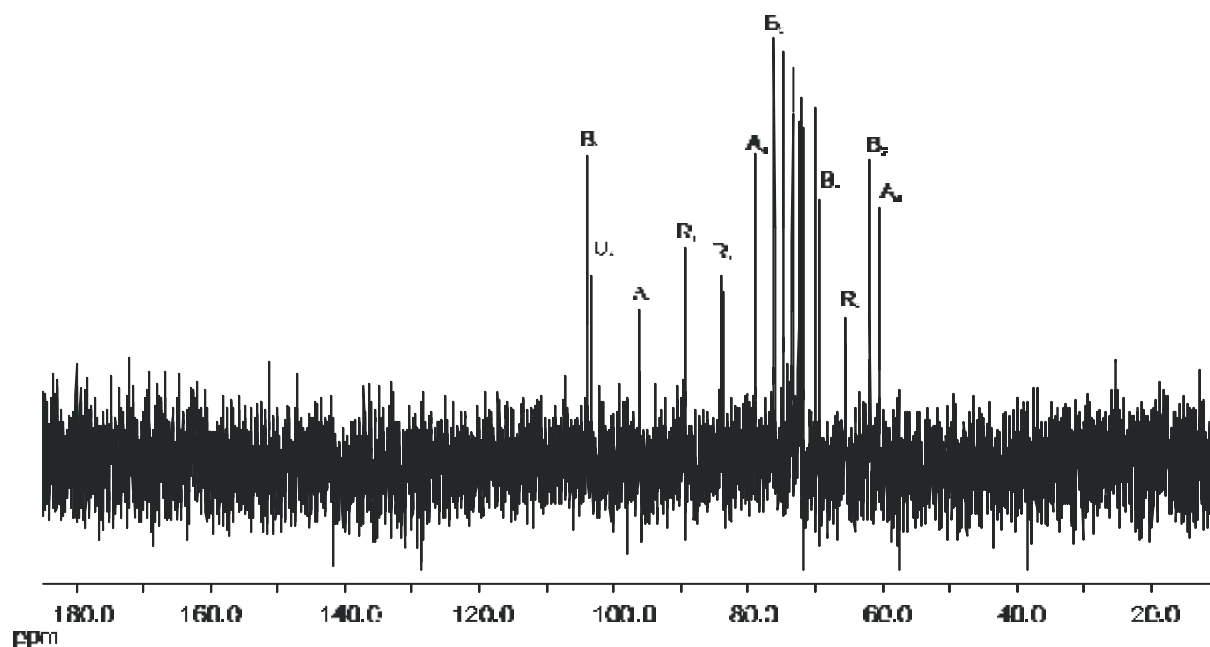


Abb. 79: 1D ^{13}C NMR-Spektrum (600 MHz, 300 K) von UDP-Lac (β -Galactosidase *B. circulans*).

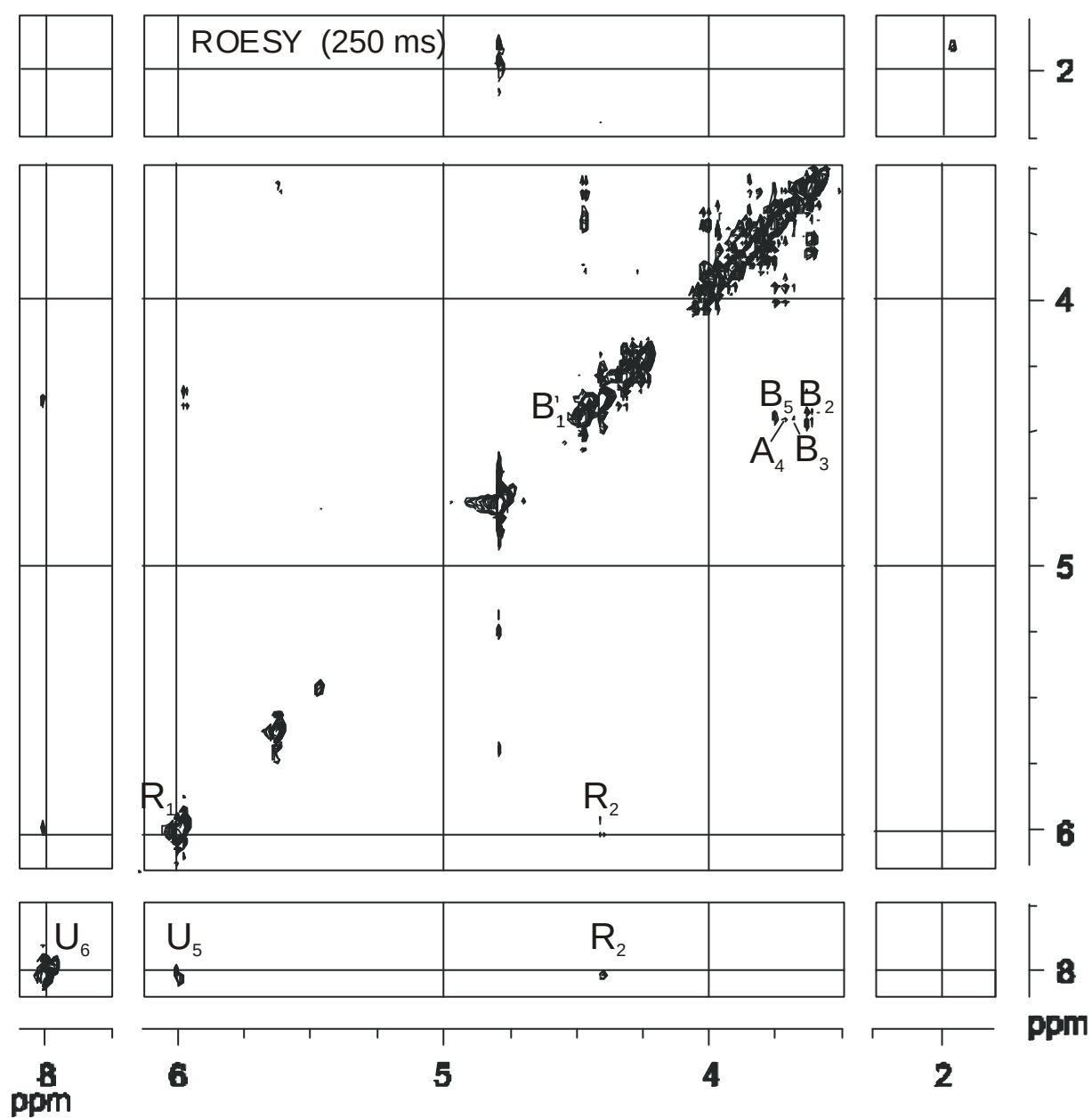


Abb. 80: 2D ROESY Spektrum (250 ms, 300 K) von UDP-Lac (β -Galactosidase *B. circulans*).

5.2.4 Gal(**b** 1-4)Gal(**b** 1-4)Glc(**a** 1-UDP, **b**-Galactosidase aus *B.circulans*)

Im Vergleich zu dem 1D ^1H Spektrum von UDP-Lac indiziert ein zusätzliches β -anomeres Signal bei δ 4,613 ($\text{C}_{\text{H}-1}$) das nucleotidaktivierte Trisaccharid (**Abb. 81**). Das entsprechende anomere Signal im 2D TOCSY (100 ms) zeigte, daß es sich bei dem zusätzlichen Zuckerrest (C) um Galactose handelt. Die Art der glycosidischen Bindung wurde aus dem ROESY Spektrum (250 ms) abgeleitet (**Abb. 83**). *Cross peaks* zwischen $\text{C}_{\text{H}-1}$ und $\text{B}_{\text{H}-4}$ (δ 4,613, 4,203) und zwischen $\text{B}_{\text{H}-1}$ und $\text{A}_{\text{H}-4}$ (δ 4,457, 3,683) indizieren eine ausschließliche (1-4)-Bindung.

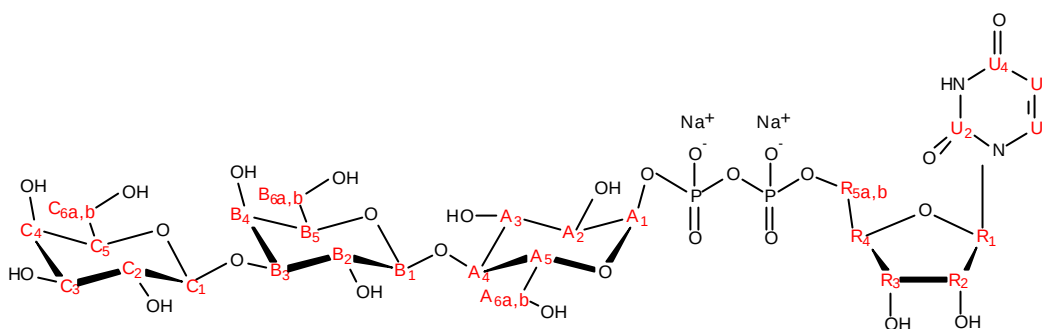


Tabelle 23: ^1H und ^{13}C chemische Verschiebungen von Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP (β -Galactosidase *B.circulans*)).

Rest	$^1\text{H}^{\text{a}}$	$^{13}\text{C}^{\text{b}}$
A1	5,603 (3,0, 7,2)	95,64
A2	3',565	71,95
A3	3,778	70,59
A4	3,683	78,48
A5	3,977	71,59
A6a	3,885 ^c	59,82
A6b	3,906 ^c	--
B1	4,475 (7,9)	103,30
B2	3,647	71,59
B3	3,775	74,28
B4	4,203	77,30
B5	3,924	75,77
B6a	n.d	61,22
B6b	n.d.	--
C1	4,613 (87,5)	104,49
C2	3,625	73,04
C3	6,665	73,22
C4	3,905	68,88
C5	n.d.	75,41

C6a	n.d.	60,90
C6b	n.d.	--
R1	5,954 (3,5)	89,05
R2	4,357	74,73
R3	4,377	69,39
R4	4,291	83,31
R5a	4,261	63,70
R5b	4,216	--
U2	--	n.d.
U4	--	n.d.
U5	5,977 (8,4)	102,88
U6	7,999 (8,4)	n.d.

^aIn ppm relativ zum Signal von internem Acetat

^bIn ppm relativ zum Signal von externem Aceton

^cDie Zuordnung könnte innerhalb eines Restes untereinander ausgetauscht werden

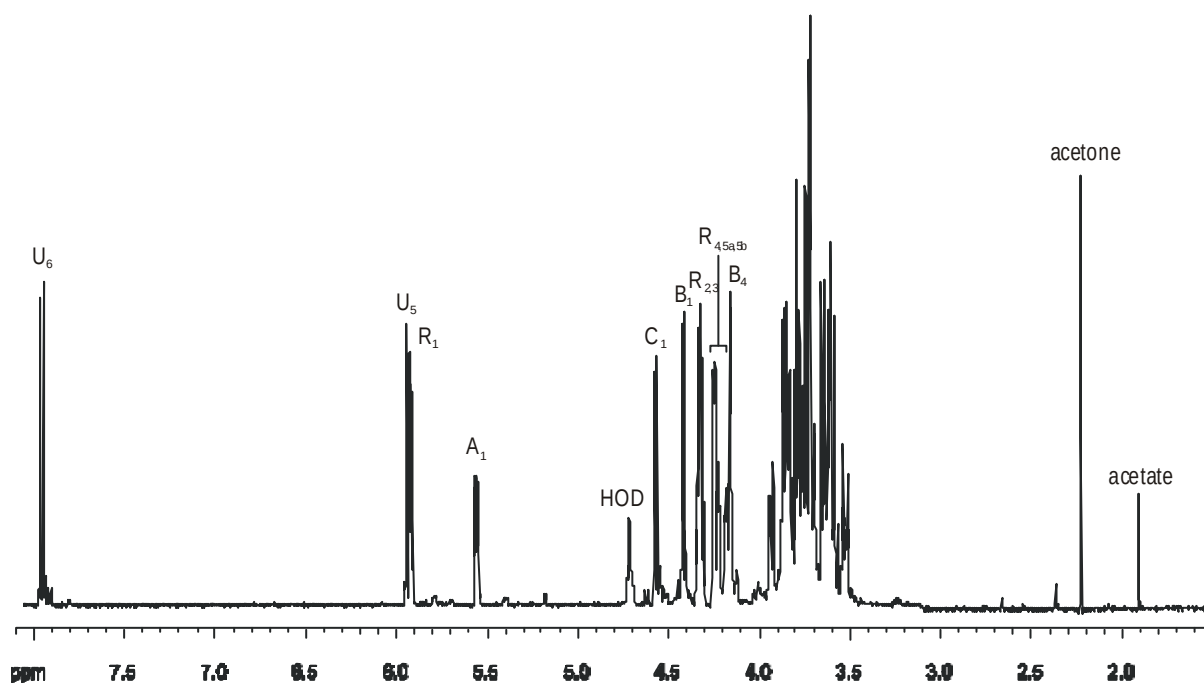


Abb. 81: 1D ¹H NMR-Spektrum (500 MHz, 300 K) von Gal(β1-4)Gal(β1-4)Glc(α1-UDP) (β-Galactosidase *B. circulans*).

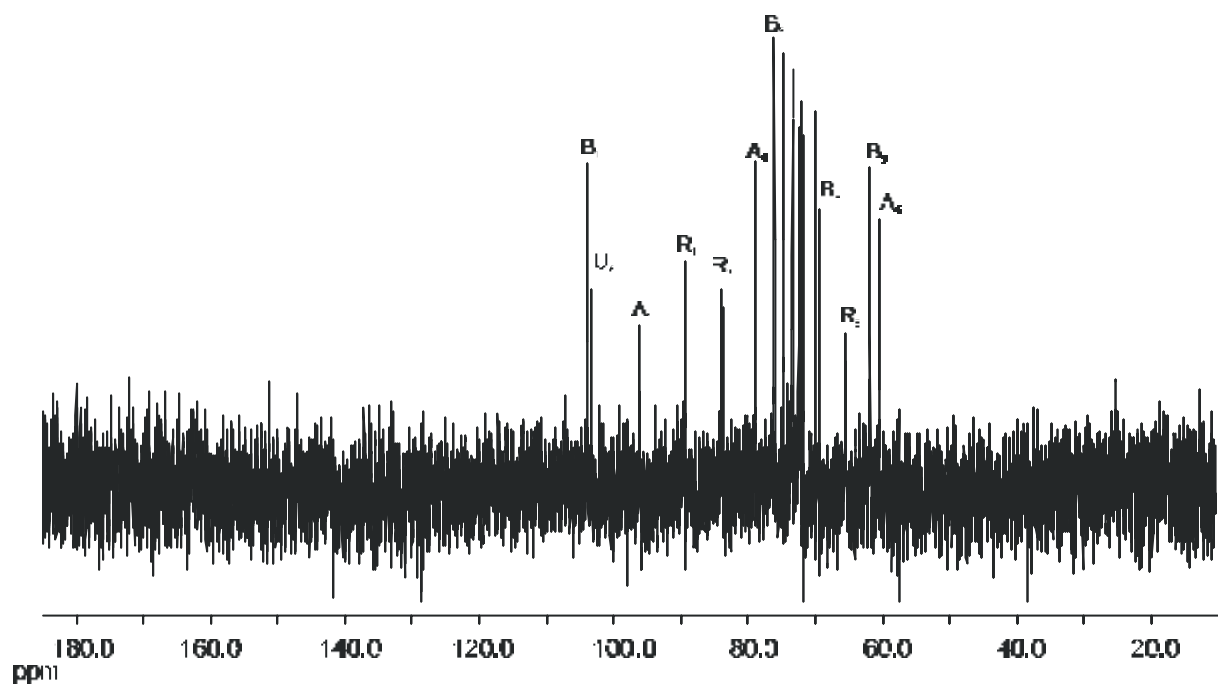


Abb. 82: 1D ^{13}C NMR-Spektrum (600 MHz, 300 K) von Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)Glc(α 1-UDP (β -Galactosidase *B. circulans*).

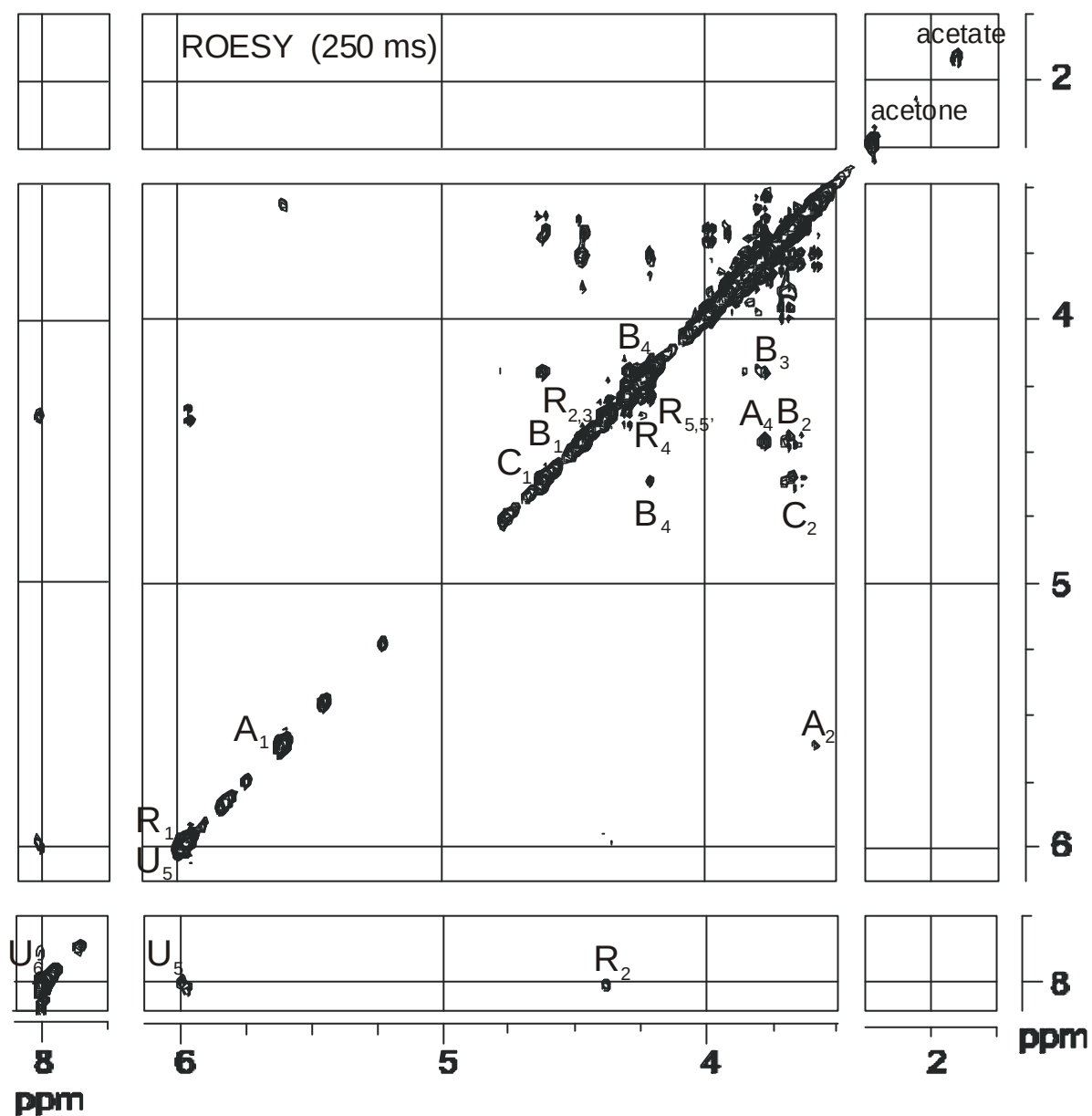


Abb. 83: 2D ROESY Spektrum (250 ms) von Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)Glc(α 1-UDP (β -Ga-lactosidase *B. circulans*).

5.2.5 Gal(**b** 1-4)Gal(**a** 1-UDP, **b**-Galactosidase aus *B.circulans*)

Das 1D ^1H NMR Spektrum (**Abb. 84**) von Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP zeigte vier Signale im Tieffeld vom HOD Signal (δ 4,751). Zwei dieser Signale, bei δ 7,951 ($^3J_{6,5}$ 8,4 Hz, U_6) und δ 5,975 ($^3J_{5,6}$ 8,4 Hz, U_5), wurden den Protonen des Uracilrings an Hand von Literaturdaten zugeordnet (Koplin *et al.* 1997; Yoon *et al.* 1996).

Das anomere Signal bei δ 5,986 wurde der Ribose R (β Konfiguration, Furanoseringform) zugeordnet, wohingegen das verbleibende anomere Signal bei δ 5,363 dem Gal-Rest A (α -Konfiguration, Pyranoseringform), welcher mit der Phosphatgruppe verbunden ist, zugeordnet wurde.

Das anomere Dublett im Hochfeld der HOD Resonanz bei δ 4,600 konnte dem Gal-Rest B zugeordnet werden (β -Konfiguration, Pyranoseringform).

Das ^{13}C -Spektrum zeigte vier Signale in der anomeren Region bei δ 105,22 (B_1), 103,50 (U_5) und 92,65 (R_1). Weiterhin wurden vier Signale in der Tieffeldregion bei δ 167,20 (U_2), 152,70 (U_4) und 142,46 (U_6) beobachtet. Durch 2D TOCSY, ROESY und HMBC Experimente konnten alle ^1H und einige ^{13}C Resonanzen zugeordnet werden.

Im TOCSY Spektrum (**Abb. 85, Abb. 86**) zeigte die anomere Spur von A_{H-1} bei δ 5,363 vier *Cross-Peaks* bei δ 3,892 (A_{H-2}), 4,011 (A_{H-3}), 4,262 (A_{H-4}) und 3,813 (A_{H-5}).

Die 2D ROESY (**Abb. 87**) und ^1H - ^{13}C HMBC (**Abb. 88**) Spektren ermöglichten die Bestimmung des Bindungstyps. Die (β 1-4)-Bindung zwischen den Resten A und B konnte im ROESY Spektrum anhand von Wechselwirkungen zwischen B_{H-1} (δ 4,600) und A_{H-4} (δ 4,262) bestimmt und im HMBC Spektrum durch die Kopplungen über drei Bindungen zwischen B_{H-1} und A_{C-4} (δ 4,600, 78,74) und zwischen B_{C-1} und A_{H-4} (δ 105,22, 4,262) bestätigt werden.

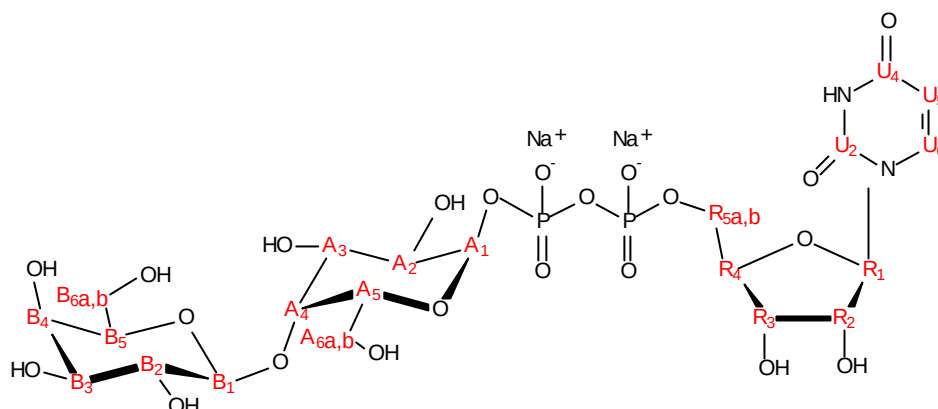


Tabelle 24: ^1H und ^{13}C chemische Verschiebungen von Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP
(β -Galactosidase *B.circulans*).

Rest	$^1\text{H}^a$	$^{13}\text{C}^b$
A1	5,363	
A2	3,892	
A3	4,011	70,42
A4	4,262	78,74
A5	3,813	
A6a	--	
A6b	--	
B1	4,600	105,22
B2	3,580	72,09
B3	3,659	73,45
B4	3,905	
B5	3,924	
B6a	n.d	
B6b	n.d.	--
R1	5,986	92,65
R2	4,371	
R3	4,371	69,42
R4	4,284	
R5a	4,223	
R5b	4,197	
U2	--	167,20
U4	--	152,57
U5	5,975	103,50
U6	7,951	142,46

^aIn ppm relativ zum Signal von internem Acetat

^bIn ppm relativ zum Signal von externem Aceton

^cDie Zuordnung könnte innerhalb eines Restes untereinander ausgetauscht werden

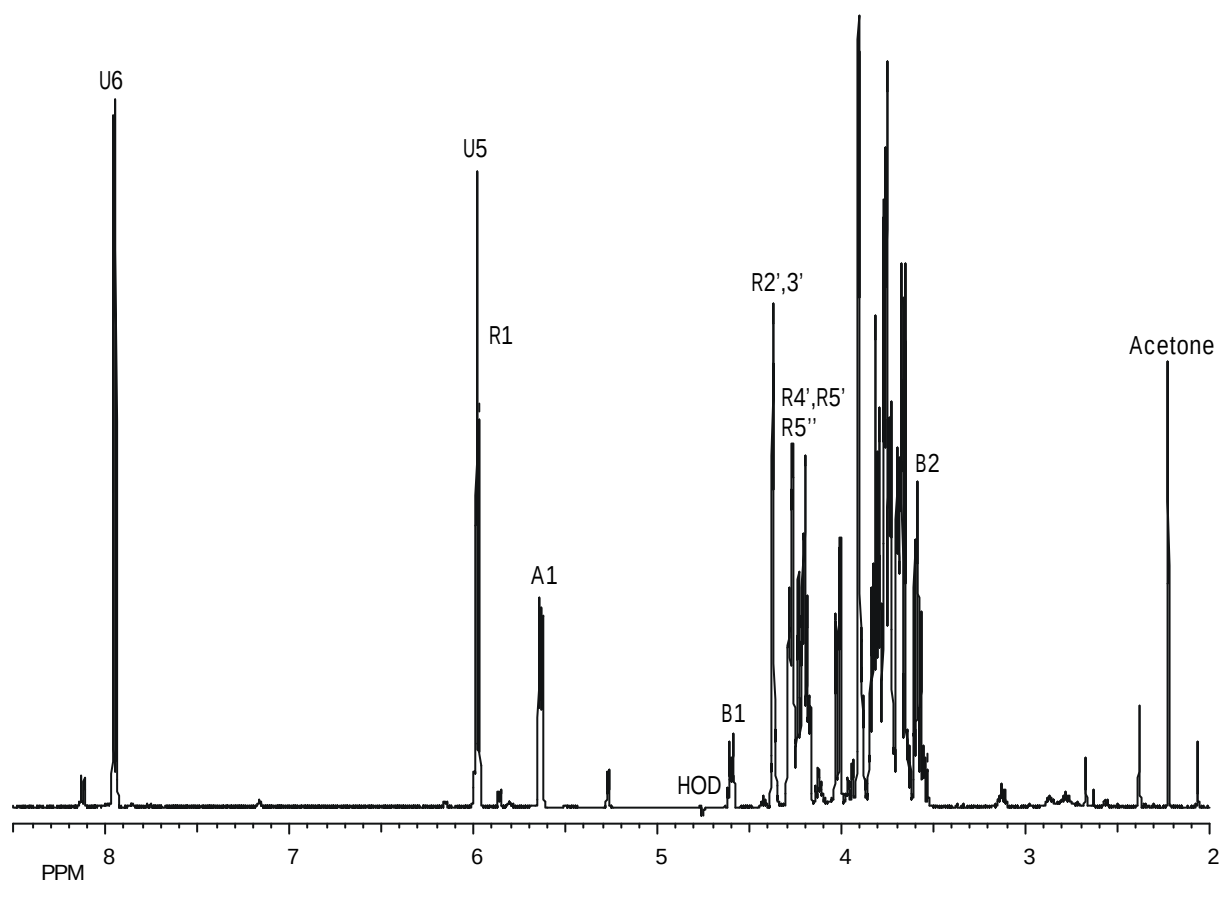


Abb. 84: 1D ^1H NMR-Spektrum (500 MHz, 300 K) von Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP) (β -Galactosidase *B. circulans*).

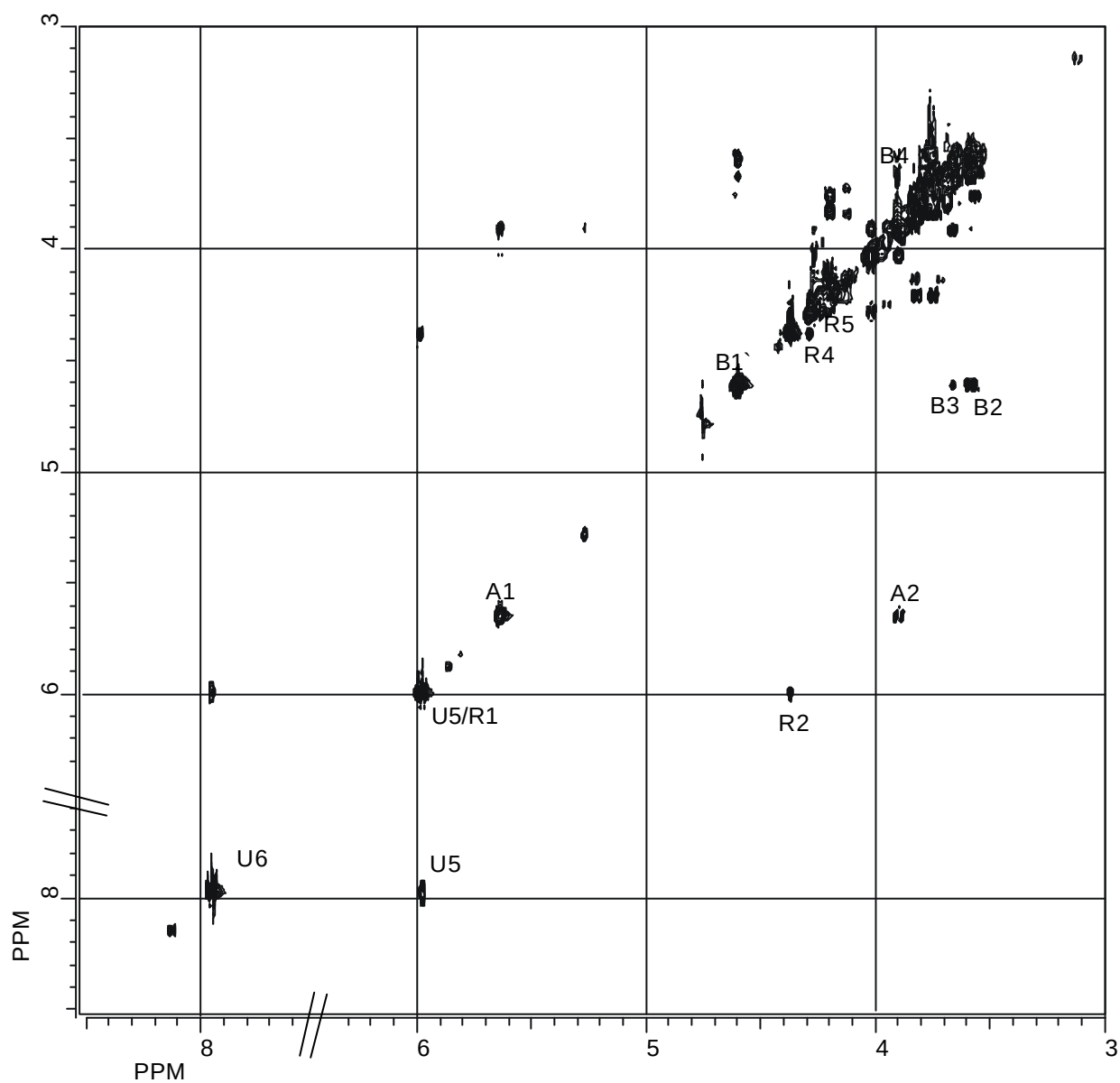


Abb. 85: 2D TOCSY NMR-Spektrum (10 ms, 300 K) von Gal(β1-4)Gal(α1-UDP (β-Galactosidase *B. circulans*)).

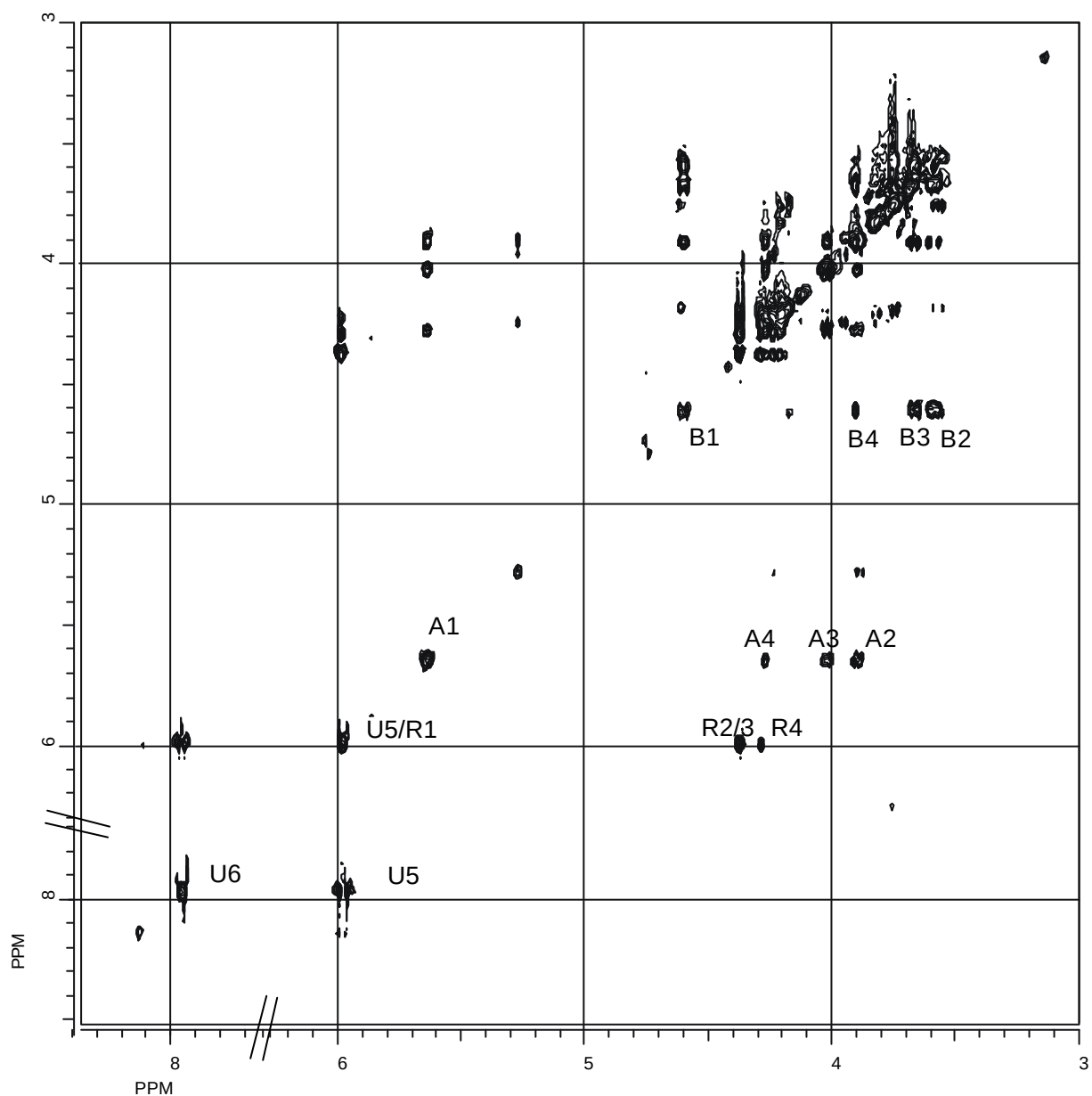


Abb. 86: 2D TOCSY NMR-Spektrum (100 ms, 300 K) von Gal(β1-4)Gal(α1-UDP (β-Galactosidase *B. circulans*).

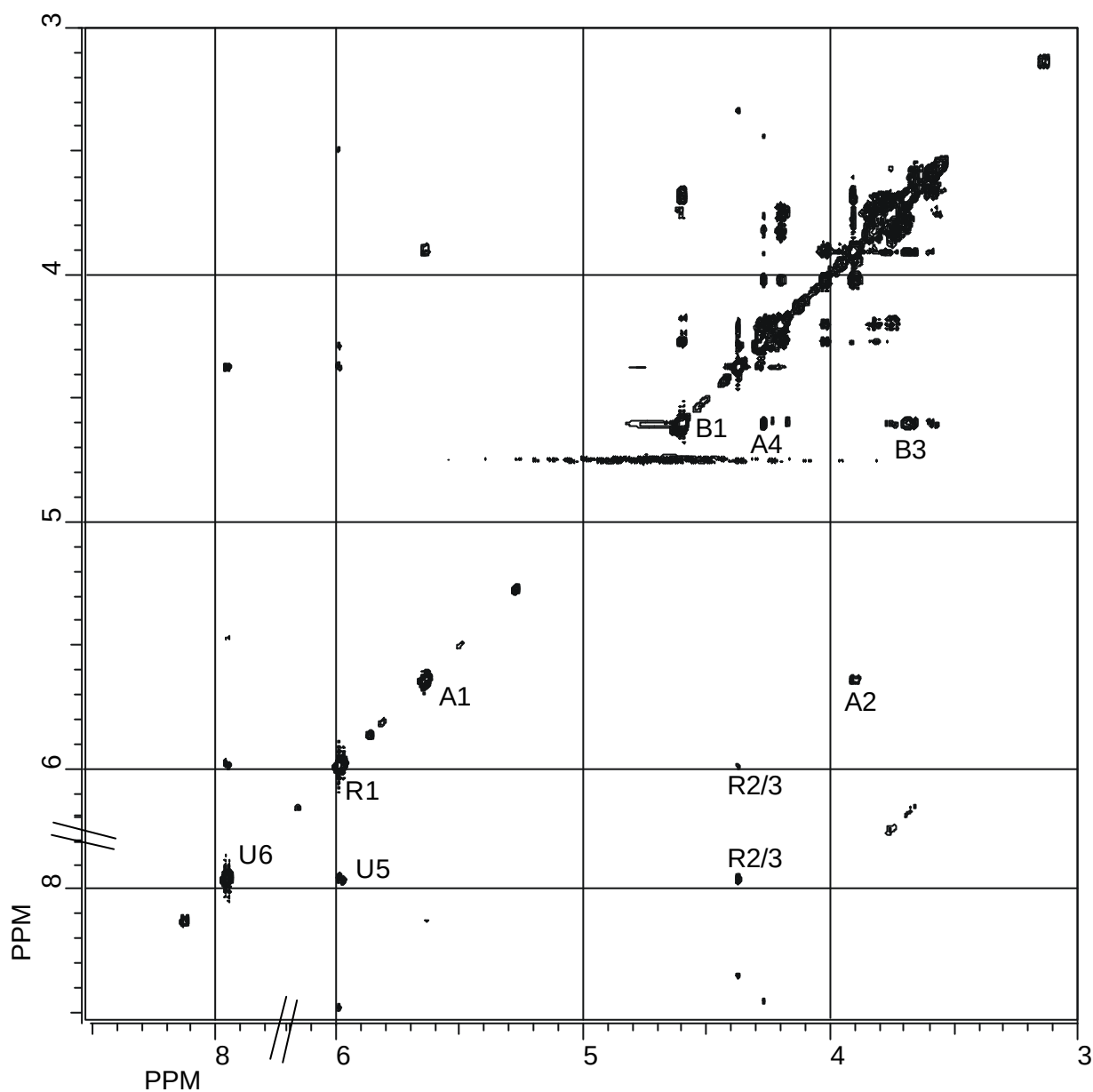


Abb. 87: 2D ROESY Spektrum (250 ms, 300 K) von Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP) (β -Galactosidase *B. circulans*).

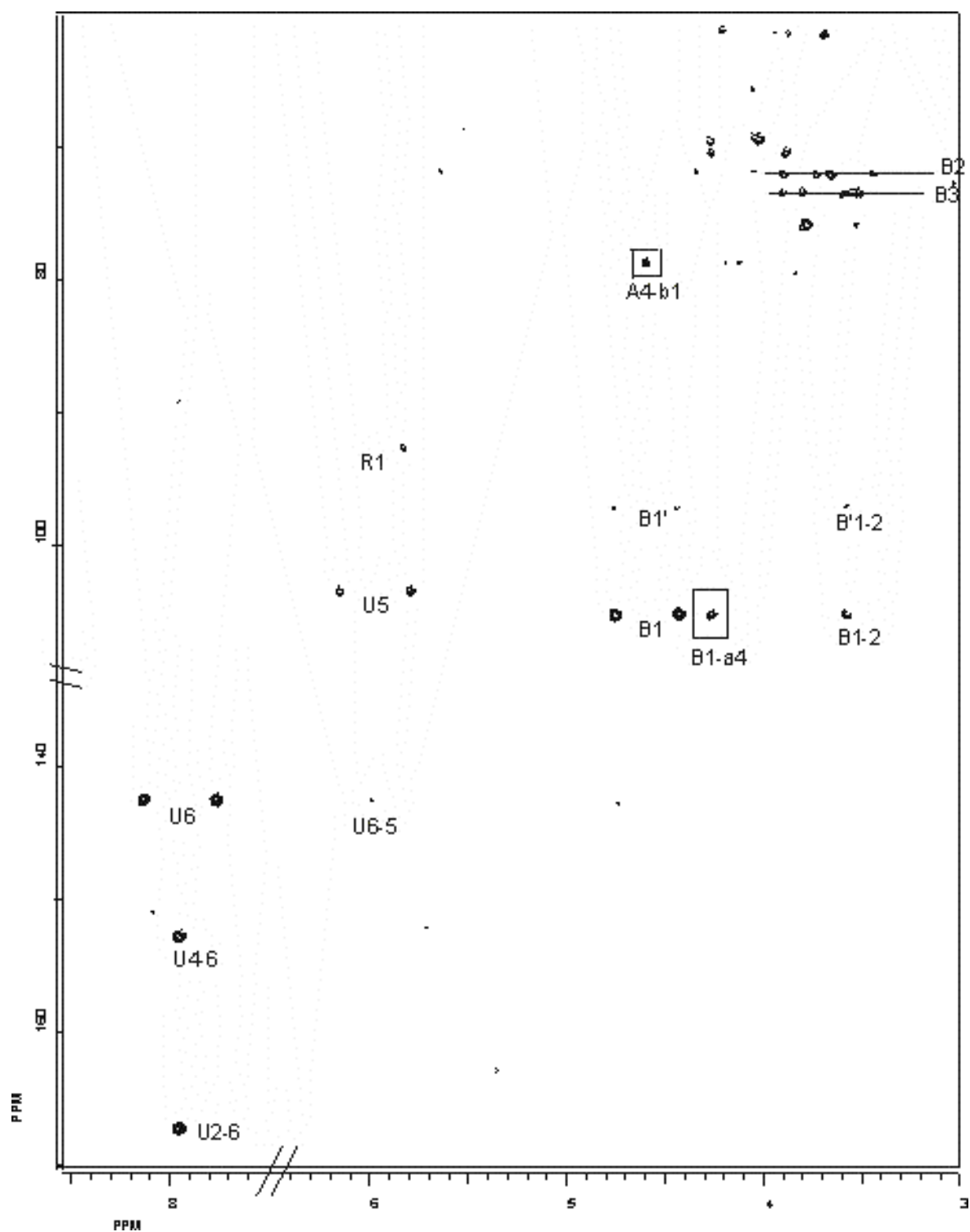


Abb. 88: 2D HMBC Spektrum (300 K) von Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP (β -Galactosidase *B. circulans*)).

5.2.6 Gal(**b** 1-3/4)GlcNAc(**a** 1-UDP, **b**-Galactosidase aus Stierhoden

Die Interpretation der ^1H und ^{13}C 1D und 2D (homo und heteronuclear) NMR Spektren von UDP-LacNAc konnte im Vergleich mit den Spektren von UDP-LacNAc (β -Galactosidase aus *B. circulans*) erfolgen. Das 1D ^1H NMR Spektrum des Produktes (**Abb. 89**) zeigte vier Signale im Tieffeld vom HOD Signal (δ 4,751). Zwei dieser Signale, bei δ 7,991 ($^3J_{6,5}$ 8,4 Hz, U_6) und δ 5,954 ($^3J_{5,6}$ 8,4 Hz, U_5), wurden den Protonen des Uracilrings an Hand von Literaturdaten zugeordnet (Koplin *et al.* 1997; Yoon *et al.* 1996).

Das anomere Signal bei δ 5,944 ($^3J_{1,2}$ 3,6 Hz) wurde der Ribose R (β Konfiguration, Furanoseringform) zugeordnet, wohingegen das verbleibende anomere Signal bei δ 5,503 ($^3J_{1,2}$ 3,0 Hz, $^3J_{1,P}$ 7,2 Hz) dem GlcNAc-Rest A (α -Konfiguration, Pyranoseringform), welcher mit der Phosphatgruppe verbunden ist, zugeordnet wurde.

Weiterhin konnten zwei chemische Verschiebungen im Hochfeld der HOD Resonanz zugeordnet werden: das Singulett bei δ 2,003, welches von den *N*-Acetyl Protonen des GlcNAc-Restes A stammt, sowie das anomere Dublett bei δ 4,450 ($^3J_{1,2}$ 7,8 Hz), das den Gal-Rest B reflektiert (β -Konfiguration, Pyranoseringform).

Das ^{13}C -Spektrum (Daten hier nicht aufgeführt) zeigte vier Signale in der anomeren Region bei δ 103,91 (B_1), 103,50 (U_5), 95,01 (A_1) und 89,64 (R_1). Weiterhin wurden Signale in der Tieffeldregion bei 167,20 (U_2), 152,70 (U_4) und 142,40 (U_6) beobachtet. Typische GlcNAc-Resonanzen wurden bei δ 22,71 (NAc-CH₃) und δ 53,80 (A_2) gefunden. Die Signale bei δ 60,37, 61,59 und 65,50 spiegeln die Anwesenheit von drei Hydroxymethylgruppen wieder, von denen die letztere substituiert ist.

Durch 2D TOCSY (**Abb. 90**), ROESY (**Abb. 91**) und HMBC Experimente konnten alle ^{13}C und ^1H Resonanzen in den 1D Spektren zugeordnet werden.

Die anomere Konfiguration zwischen den Resten A und B wurde anhand der 2D ROESY und HMBC Experimente bestimmt. Im ROESY Spektrum zeigte die anomere Spur von B einige *Cross-Peaks* bei δ 3,890, 3,755, 3,724, 3,656 und 3,573. Der *Cross Peak* bei δ 3,573 wurde auf einen TOCSY-Transfer auf das H2 des gleichen Restes (B) zurückgeführt. Die *Cross-Peaks* bei δ 3,724 und 3,656 wurden als intramolekulare Wechselwirkungen zwischen H5 und H3 des B-Restes identifiziert. Die verbleibenden *Cross-Peaks* bei δ 3,890 und 3,755 wurden den intramolekularen Wechselwirkungen zu H5 und H-4/3 des A-Restes zugeschrieben.

Im ^{13}C - ^1H HMBC Spektrum konnte durch die Kopplung zwischen $\text{A}_{\text{C-4}}$ und $\text{B}_{\text{H-1}}$ (δ 79,04 und 4,450) und zwischen $\text{B}_{\text{C-1}}$ und $\text{A}_{\text{H-4}}$ (δ 103,91 und 3,740) die Bindung zwischen den Zuckerresten des einen Regioisomers als (β 1-4)-Bindung identifiziert werden.

Im TOCSY Spektrum konnte jedoch neben den oben beschriebenen Signalen des Restes B zusätzliche Signale (B^*) beobachtet werden (**Abb. 90**). Diese Resonanzen weisen auf die Anwesenheit eines Regioisomers des UDP-LacNAc hin. Die genaue Bindung konnte allerdings nicht bestimmt werden.

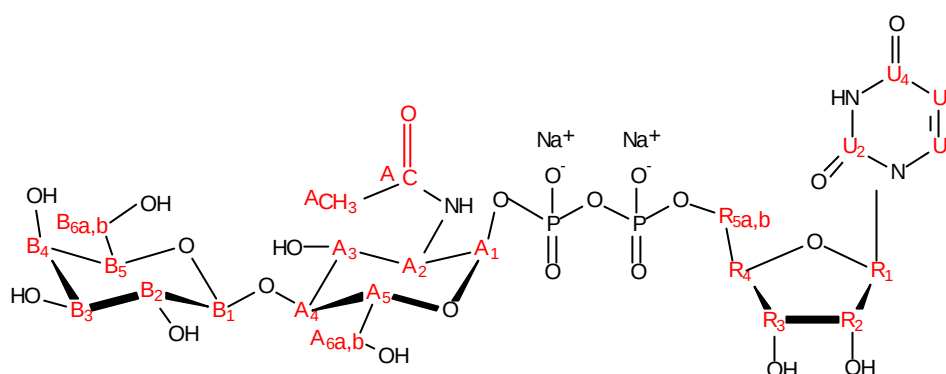


Tabelle 25: ^1H und ^{13}C chemische Verschiebungen von $\text{Gal}(\beta 1\text{-}3/4)\text{GlcNAc}(\alpha 1\text{-UDP})$ (β -Galactosidase Stierhoden).

Rest	$^1\text{H}^{\text{a}}$	$^{13}\text{C}^{\text{b}}$
A1	5,503	95,01
A2	4,027	53,80
A3	3,807	70,42
A4	3,740	79,04
A5	3,882	72,32
A6a	3,777 ^c	60,37
A6b	--	
A CH ₃	2,003	22,73
A C=O	--	175,41
A1*	5,503	
A2*	3,995	
A3*	3,067	
A4*	3,893	
B1	4,450	103,91
B2	3,372	71,62
B3	3,651	73,33
B4	3,828	69,29
B5	3,732	75,97
B6a	3,752 ^c	61,59
B6b	3,826 ^c	--

Rest	$^1\text{H}^{\text{a}}$	$^{13}\text{C}^{\text{b}}$
B1*	4,430	
B2*	3,573	
B3*	3,641	
B4*	3,912	
R1	5,944	89,64
R2	4,353	
R3	4,353	69,85
R4	4,288	83,69
R5a	4,249	65,50
R5b	4,263	--
U2	--	167,20
U4	--	152,70
U5	5,944	103,50
U6	7,991	142,40

^aIn ppm relativ zum Signal von internem Acetat

^bIn ppm relativ zum Signal von externem Aceton

^cDie Zuordnung könnte innerhalb eines Restes untereinander ausgetauscht werden

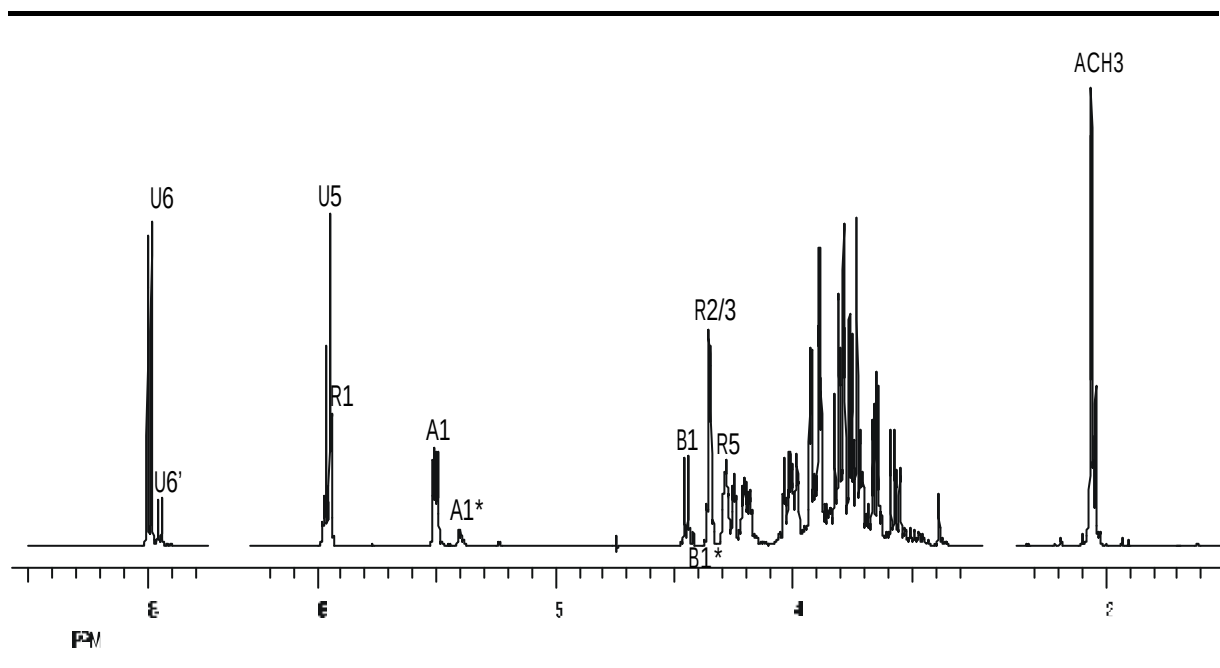


Abb. 89: 1D ^1H NMR-Spektrum (500 MHz, 300 K) von Gal(β 1-3/4)GlcNAc(α 1-UDP (β -Galactosidase Stierhoden).

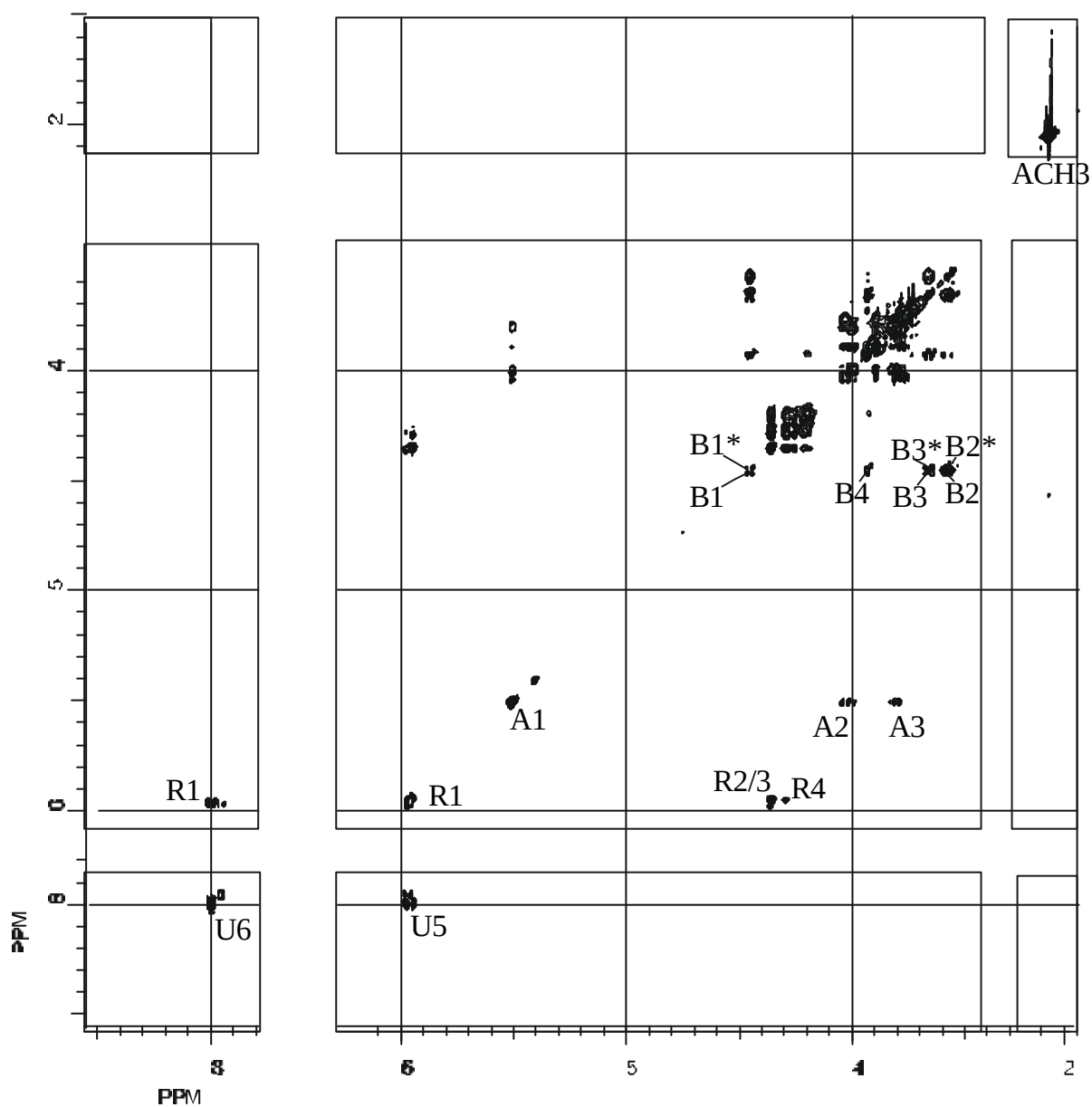


Abb. 90: 2D TOCSY NMR-Spektrum (100 ms, 300 K) von Gal(β 1-3/4)GlcNAc(α 1-UDP (β -Galactosidase Stierhoden).

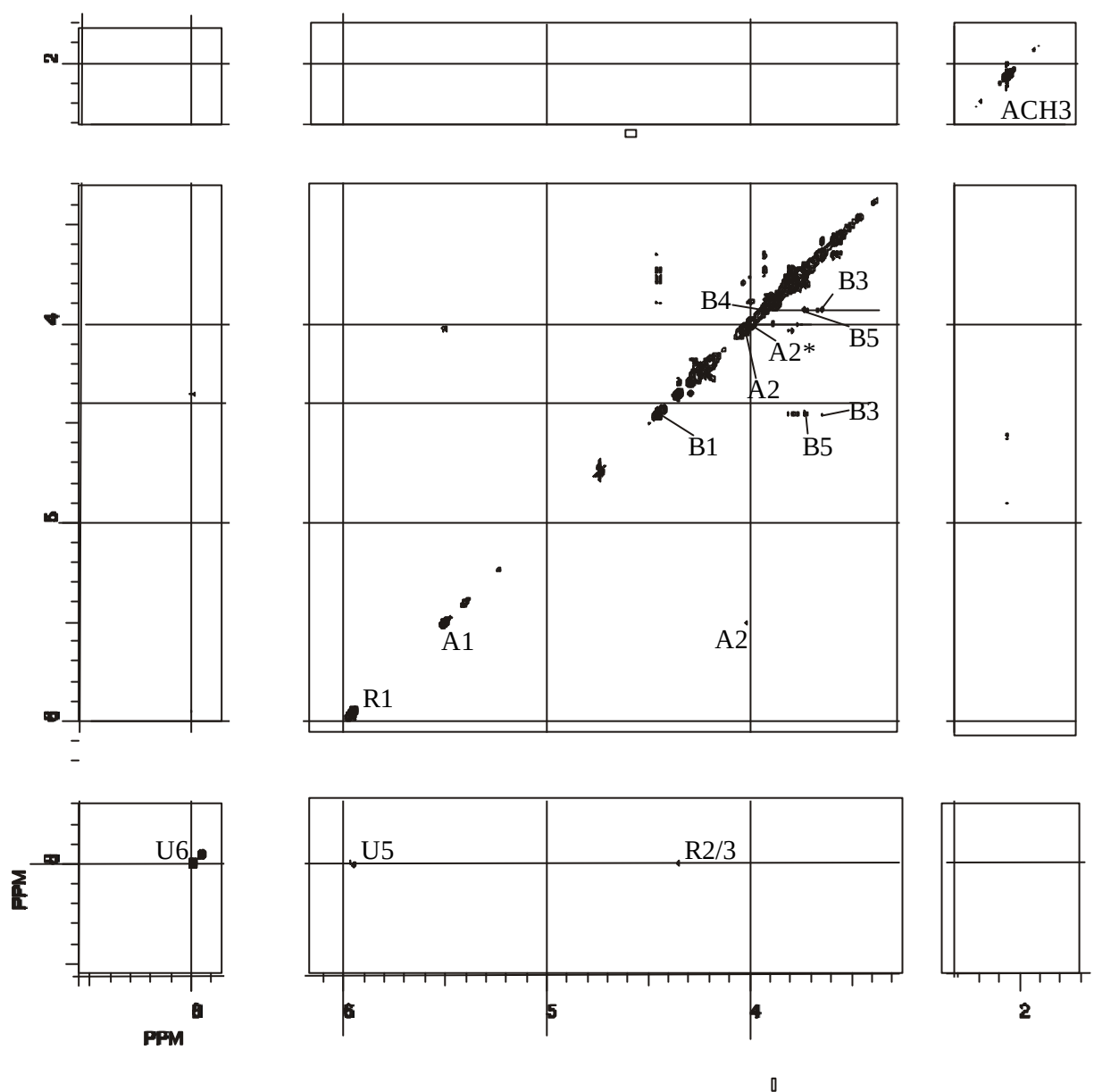


Abb. 91: 2D ROESY Spektrum (250 ms, 300 K) von Gal(β1-3/4)GlcNAc(α1-UDP) (β-Galactosidase Stierhoden).

5.2.7 Gal(**b** 1-3/4)Glc(**a** 1-UDP, **b**-Galactosidase Stierhoden

Das 1D ^1H NMR Spektrum von Gal(β 1-3/4)Glc(α 1-UDP (**Abb. 92**) zeigte vier Signale im Tieffeld vom HOD Signal (δ 4,751). Zwei dieser Signale, bei δ 5,989 ($^3J_{6,5}$ 8,4 Hz, U_6) und δ 5,975 ($^3J_{5,6}$ 8,4 Hz, U_5), wurden den Protonen des Uracilrings an Hand von Literaturdaten zugeordnet (Koplin *et al.* 1997; Yoon *et al.* 1996).

Das anomere Signal bei δ 5,958 ($^3J_{1,2}$ 3,5 Hz) wurde der Ribose R (β Konfiguration, Furanoseringform) zugeordnet, wohingegen das verbleibende anomere Signal bei δ 5,602 ($^3J_{1,2}$ 3,0 Hz, $^3J_{1,p}$ 7,2 Hz) dem Glc-Rest A (α -Konfiguration, Pyranoseringform), welcher mit der Phosphatgruppe verbunden ist, zugeordnet wurde.

Das anomere Dublett im Hochfeld der HOD Resonanz bei δ 4,438 ($^3J_{1,2}$ 7,5 Hz) konnte dem Gal-Rest B zugeordnet werden (β -Konfiguration, Pyranoseringform).

Durch 2D TOCSY (**Abb. 93** und **Abb. 94**) und ROESY (**Abb. 95**) Experimente konnten alle ^1H Resonanzen in dem 1D Spektren zugeordnet werden. Durch Vergleich mit den Spektren von UDP-Lac (β -Galactosidase *B. circulans*) wurde die Bestimmung des Bindungstyps ermöglicht. Im ROESY-Spektrum konnten Wechselwirkungen zwischen B_{H-1} (δ 4,438) und A_{H-4} (δ 3,688) detektiert werden, so daß die Verknüpfung der Reste A und B eines Regioisomers als (β 1-4)-Bindung identifiziert werden konnte.

Im TOCSY Spektrum (100 ms, **Abb. 94**) konnte jedoch neben den oben beschriebenen Signalen der Reste A und B zusätzliche Signale (B^*) beobachtet werden. Diese Resonanzen weisen auf die Anwesenheit eines Regioisomers des UDP-LacNAc hin. Die genaue Bindung konnte allerdings nicht bestimmt werden.

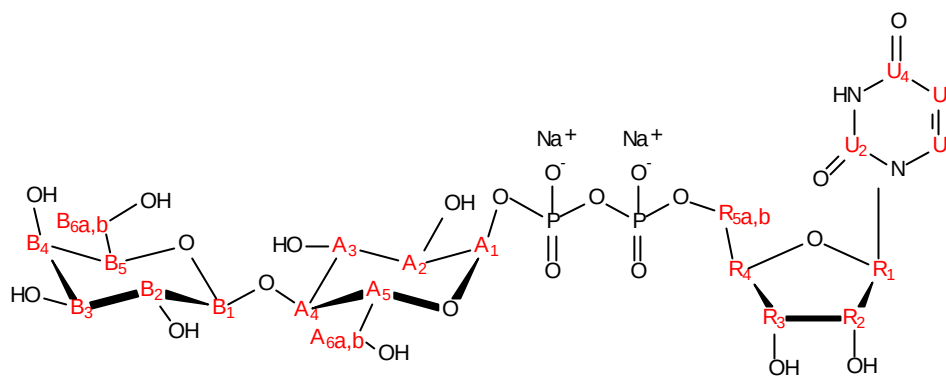


Tabelle 26: ^1H chemische Verschiebungen von Gal(β 1-3/4)Glc(α 1-UDP (β-Galactosidase Stierhoden).

Rest	$^1\text{H}^a$
A1	5,602
A2	3,576
A3	3,798
A4	3,688
A5	4,983
A6a	3,883 ^c
A6b	3,906 ^c
B1	4,438
B2	3,577
B3	3,668
B4	3,930
B5	3,727
B6a	--
B6b	--
R1	5,958
R2	4,376
R3	4,376
R4	4,288
R5a	4,249 ^c
R5b	4,222 ^c
U2	--
U4	--
U5	5,975
U6	7,989

^aIn ppm relativ zum Signal von internem Acetat

^bIn ppm relativ zum Signal von externem Aceton

^cDie Zuordnung könnte innerhalb eines Restes untereinander ausgetauscht werden

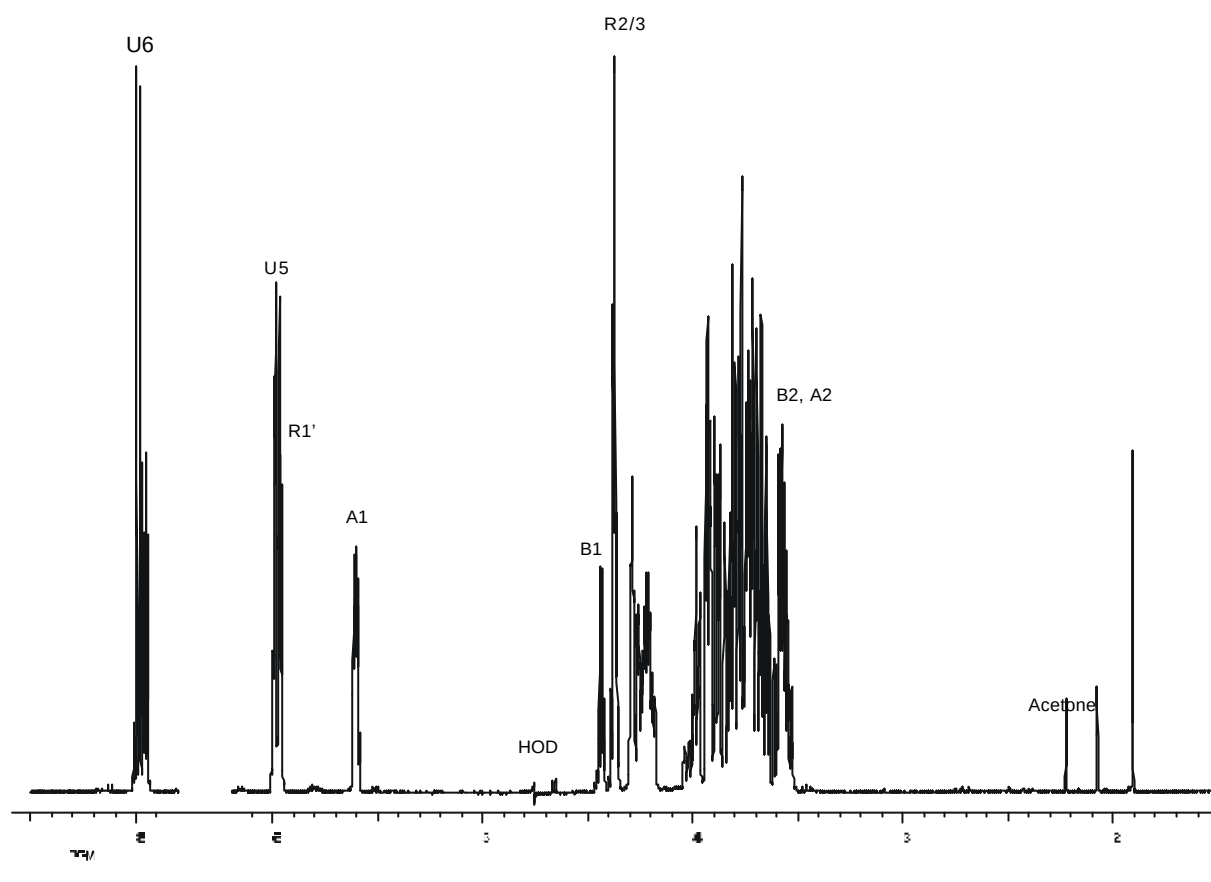


Abb. 92: 1D ^1H NMR-Spektrum (500 MHz, 300 K) von Gal(β1-3/4)Glc(α1-UDP (β-Galactosidase Stierhoden).

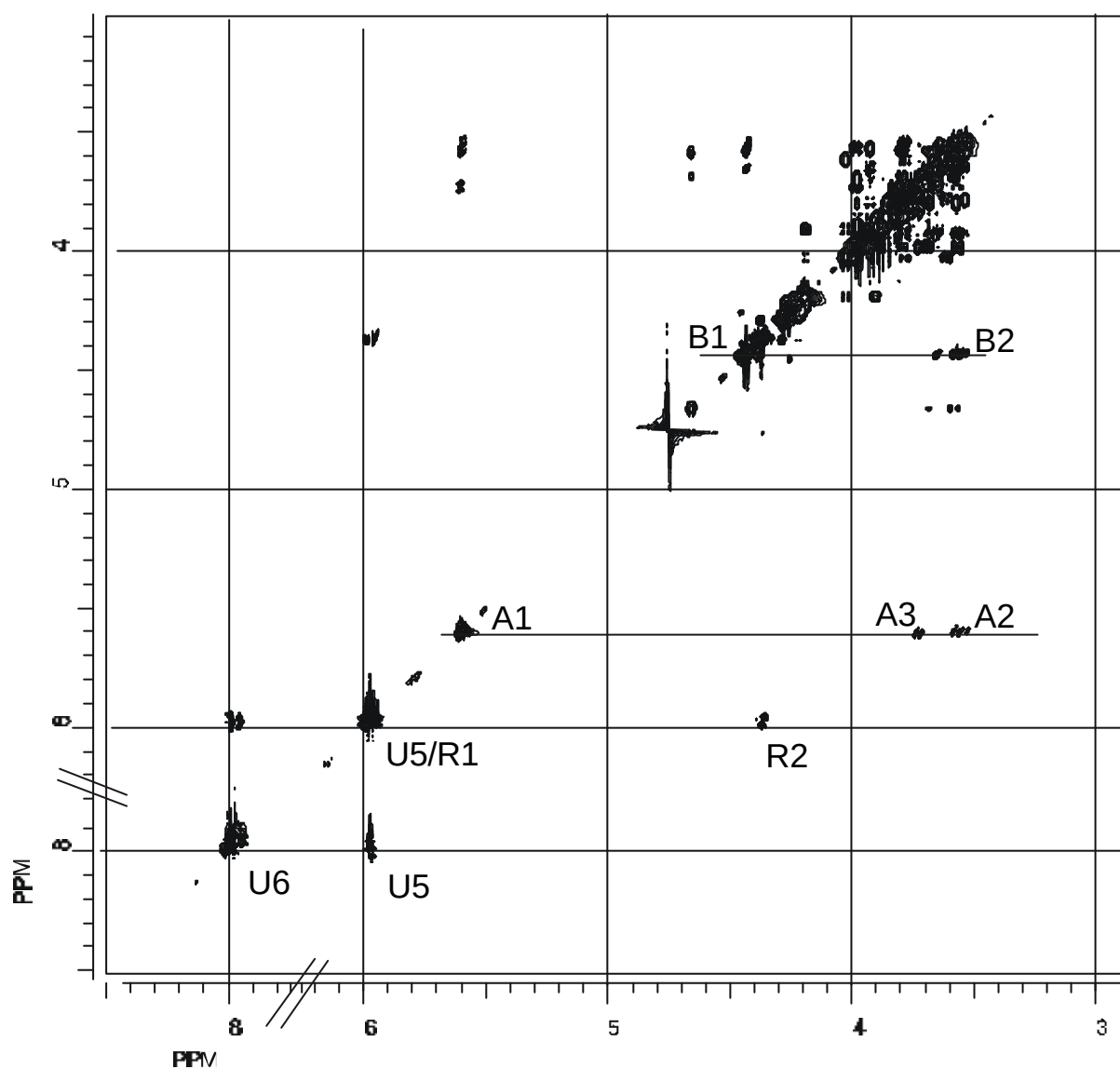


Abb. 93: 2D TOCSY NMR-Spektrum (10 ms, 300 K) von Gal(β1-3/4)Glc(α1-UDP) (β-Galactosidase Stierhoden).

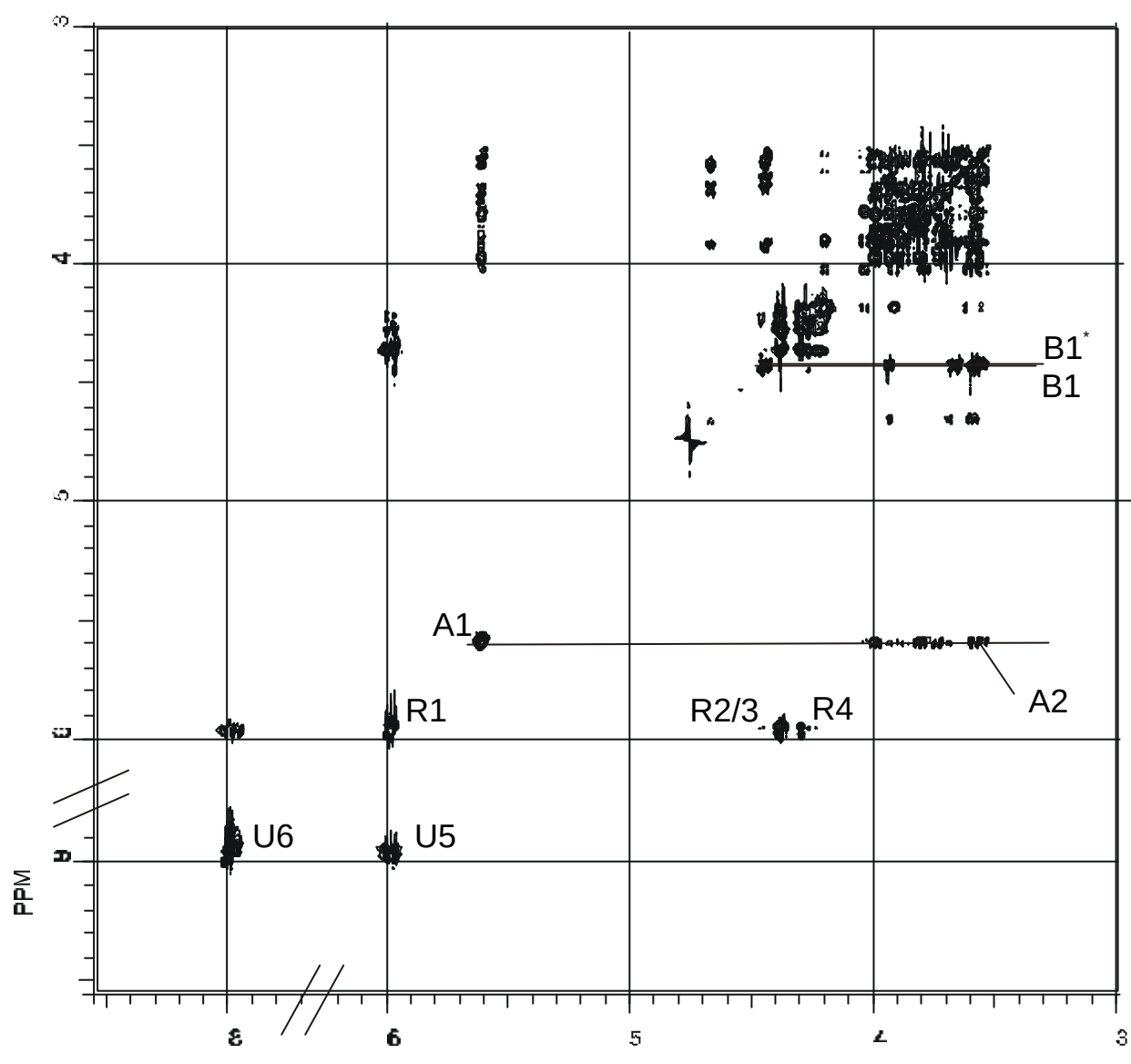


Abb. 94: 2D TOCSY NMR-Spektrum (100 ms, 300 K) von Gal(β1-3/4)Glc(α1-UDP) (β-Galactosidase Stierhoden).

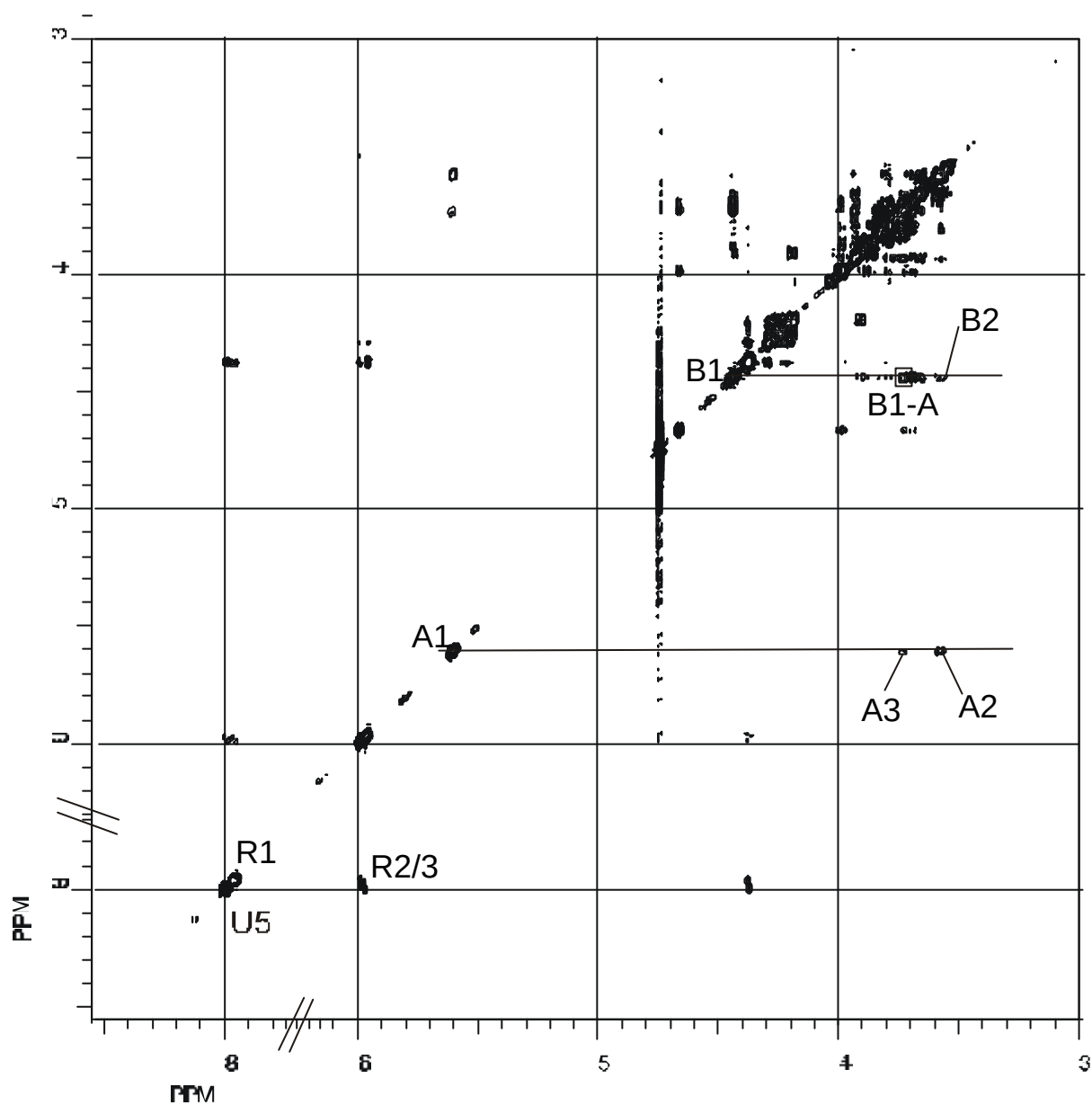


Abb. 95: 2D ROESY Spektrum (250 ms, 300 K) von Gal(β 1-3/4)Glc(α 1-UDP
(β -Galactosidase Stierhoden).

5.2.8 Gal(**a** 1-3)Glc(**a** 1-UDP, **a**-Galactosidase aus *Bifidobacterium adolescentis*)

Das 1D ^1H NMR Spektrum (**Abb. 96**) von Gal(α 1-3)Glc(α 1-UDP zeigte fünf Signale im Tieffeld vom HOD Signal (δ 4,751). Zwei dieser Signale, bei δ 7,968 (U_6) und δ 5,985 (U_5), wurden den Protonen des Uracilrings an Hand von Literaturdaten zugeordnet (Koplin *et al.* 1997; Yoon *et al.* 1996).

Das anomere Signal bei δ 5,988 wurde der Ribose R (β Konfiguration, Furanoseringform) zugeordnet, wohingegen das anomere Dublett bei δ 5,606 dem Glc-Rest A (α -Konfiguration, Pyranoseringform), welcher mit der Phosphatgruppe verbunden ist, zugeordnet wurde. Das verbleibende anomere Signal bei δ 4,985 wurde hingegen der Galactose B (α -Konfiguration, Pyranoseringform) zugeordnet.

Das ^{13}C -Spektrum zeigte vier Signale in der anomeren Region bei δ 98,29 (B_1), 102,97 (U_5), 94,56 (A_1) und 88,45 (R_1).

Durch 2D TOCSY (**Abb. 97** und **Abb. 98**), ROESY (**Abb. 99**) und HMBC (**Abb. 100**) Experimente konnten alle ^1H und fast alle ^{13}C Resonanzen in den 1D Spektren zugeordnet werden. Die 2D ROESY und ^1H - ^{13}C HMBC Spektren ermöglichten die Bestimmung des Bindungstyps. Im TOCSY Spektrum zeigte die anomere Spur von $\text{A}_{\text{H}-1}$ bei δ 5,606 vier *Cross-Peaks* bei δ 3,548 ($\text{A}_{\text{H}-2}$), 3,776 ($\text{A}_{\text{H}-3}$), 4,074 ($\text{A}_{\text{H}-4}$) und 4,019 ($\text{A}_{\text{H}-5}$).

Die (α 1-3)-Bindung zwischen den Resten A und B konnte im ROESY Spektrum anhand von Wechselwirkungen zwischen $\text{B}_{\text{H}-1}$ (δ 4,985) und $\text{A}_{\text{H}-3}$ (δ 3,776) bestimmt und im HMBC Spektrum durch die Kopplungen über drei Bindungen zwischen $\text{B}_{\text{H}-1}$ und $\text{A}_{\text{C}-3}$ (δ 4,985, 73,18) und zwischen $\text{B}_{\text{C}-1}$ und $\text{A}_{\text{H}-3}$ (δ 98,29, 3,776) bestätigt werden.

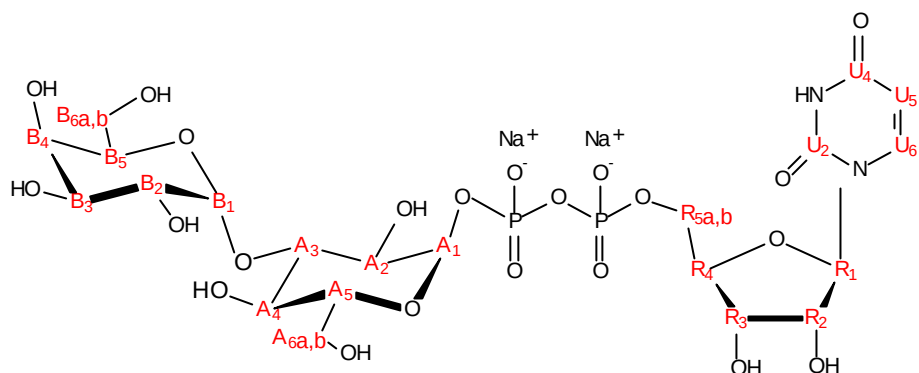


Tabelle 27: ^1H und ^{13}C chemische Verschiebungen von Gal(α 1-3)Glc(α 1-UDP)
(α -Galactosidase *Bifidobacterium adolescentis*).

Rest	$^1\text{H}^{\text{a}}$	$^{13}\text{C}^{\text{b}}$
A1	5,606	94,56
A2	3,548	71,69
A3	3,776	73,18
A4	4,074	
A5	4,019	72,43
A6a	3,763	61,07
A6b		--
B1	4,985	98,29
B2	3,799	69,47
B3	3,896	70,96
B4	4,001	69,17
B5	3,722	76,33
B6a	3,845	61,68
B6b	3,799	--
R1	5,988	88,45
R2	4,375	
R3	4,375	71,69
R4	4,292	83,24
R5a	4,238	64,94
R5b	4,207	--
U2	--	166,56
U4	--	152,13
U5	5,985	102,97
U6	7,968	141,92

^aIn ppm relativ zum Signal von internem Acetat

^bIn ppm relativ zum Signal von externem Aceton

^cDie Zuordnung könnte innerhalb eines Restes untereinander ausgetauscht werden

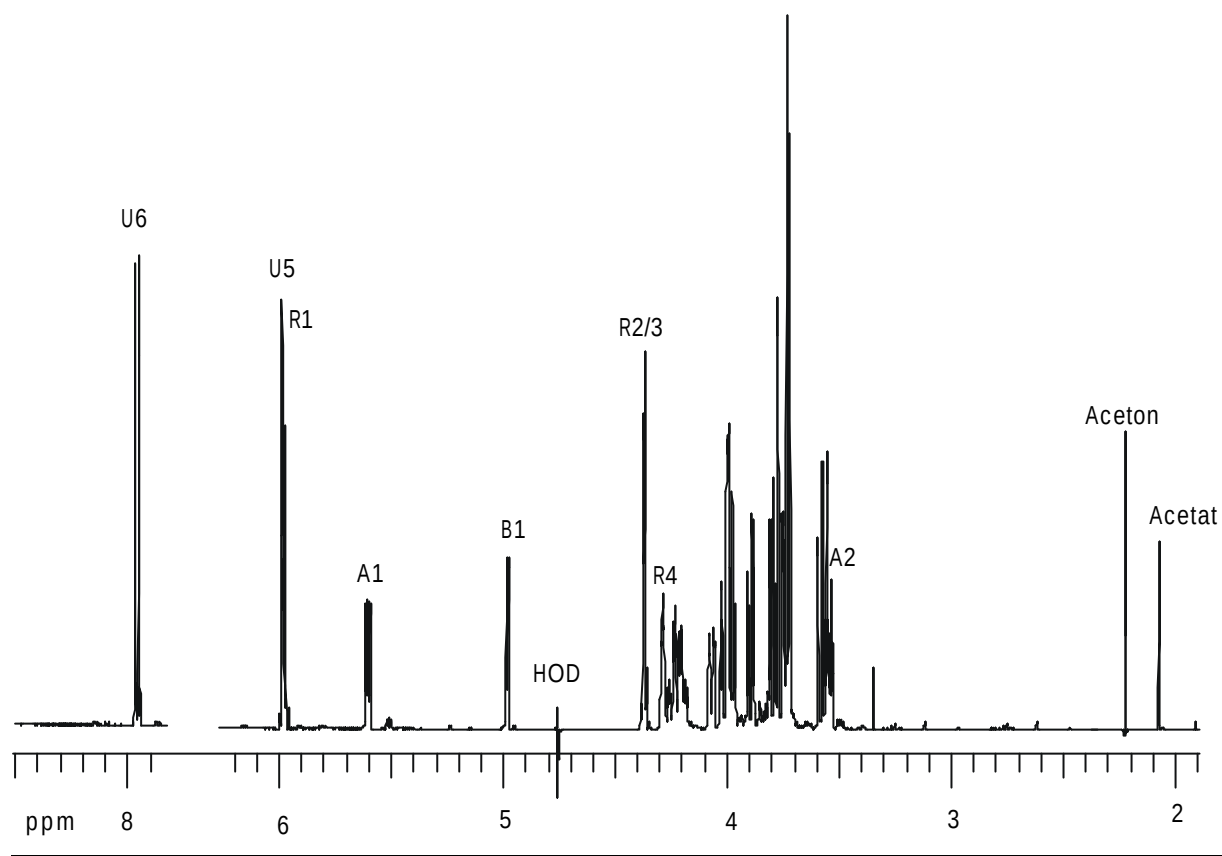


Abb. 96: 1D ^1H NMR-Spektrum (500 MHz, 300 K) von Gal(β 1-3)Glc(α 1-UDP (α -Galactosidase *B. adolescentis*).

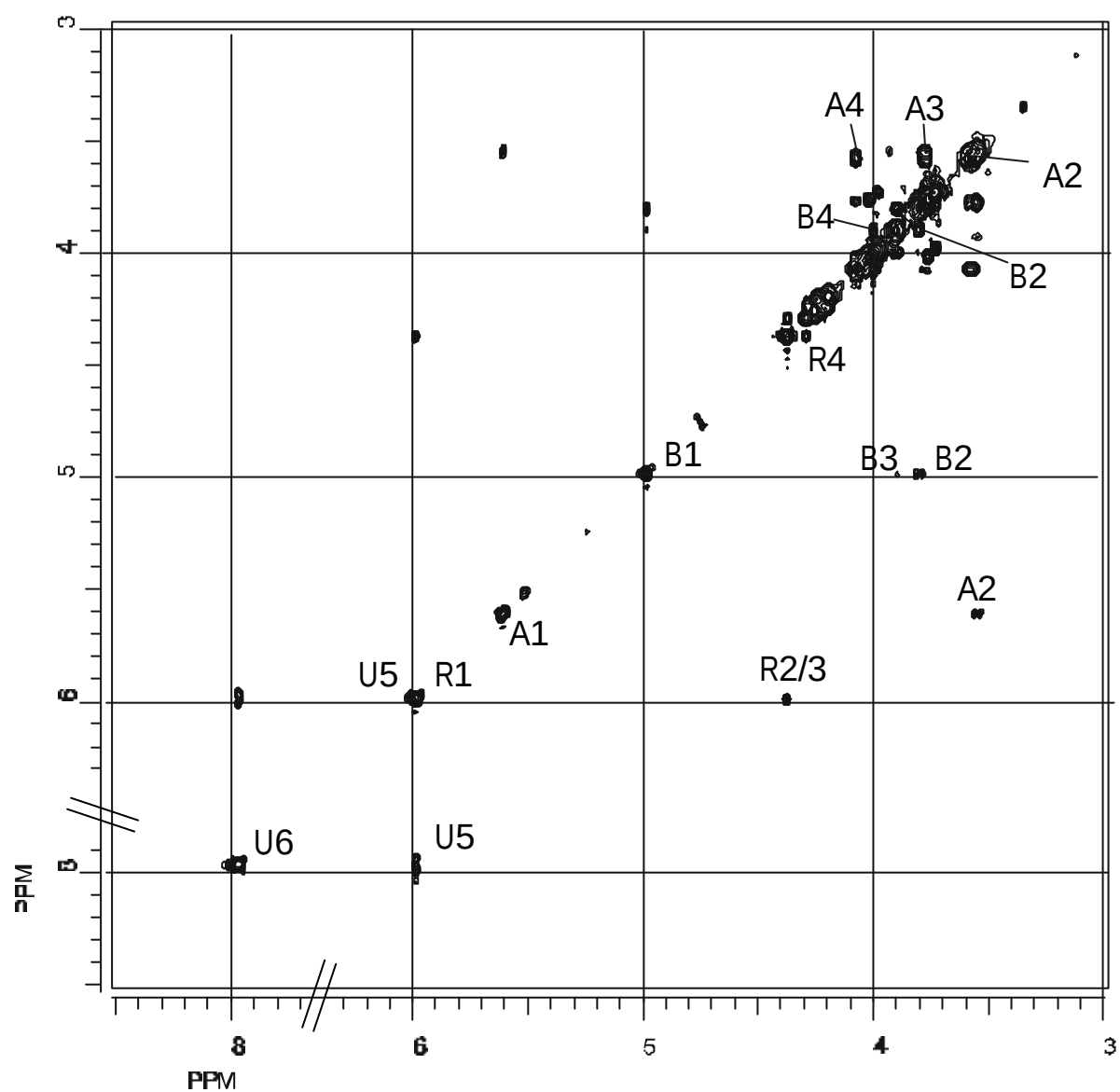


Abb. 97: 2D TOCSY NMR-Spektrum (10 ms, 300 K) von Gal(α 1-3)Glc(α 1-UDP (α -Galactosidase *B.adolescentis*).

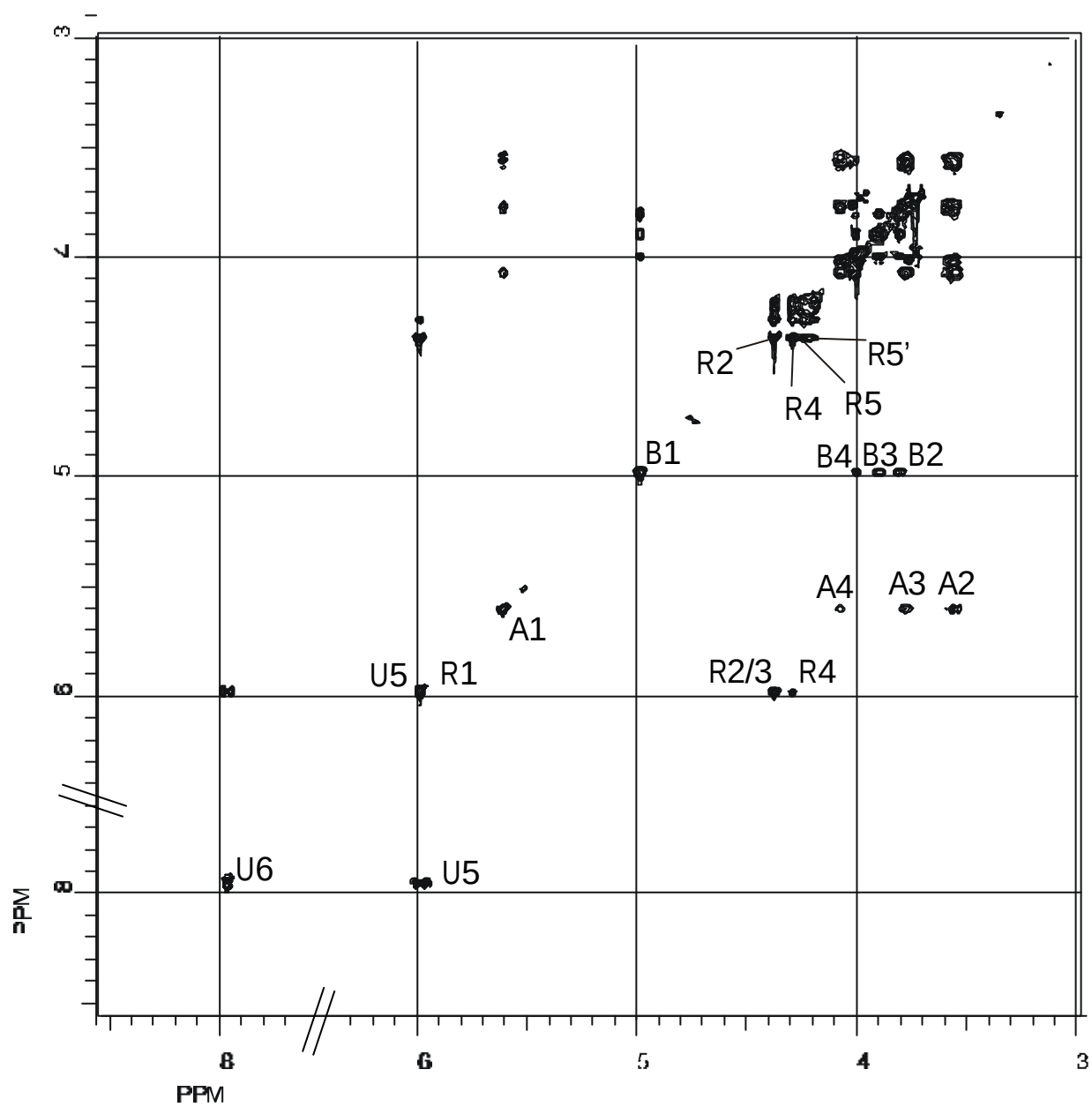


Abb. 98: 2D TOCSY NMR-Spektrum (100 ms, 300 K) von Gal(α1-3)Glc(α1-UDP) (α-Galactosidase *B.adolescentis*).

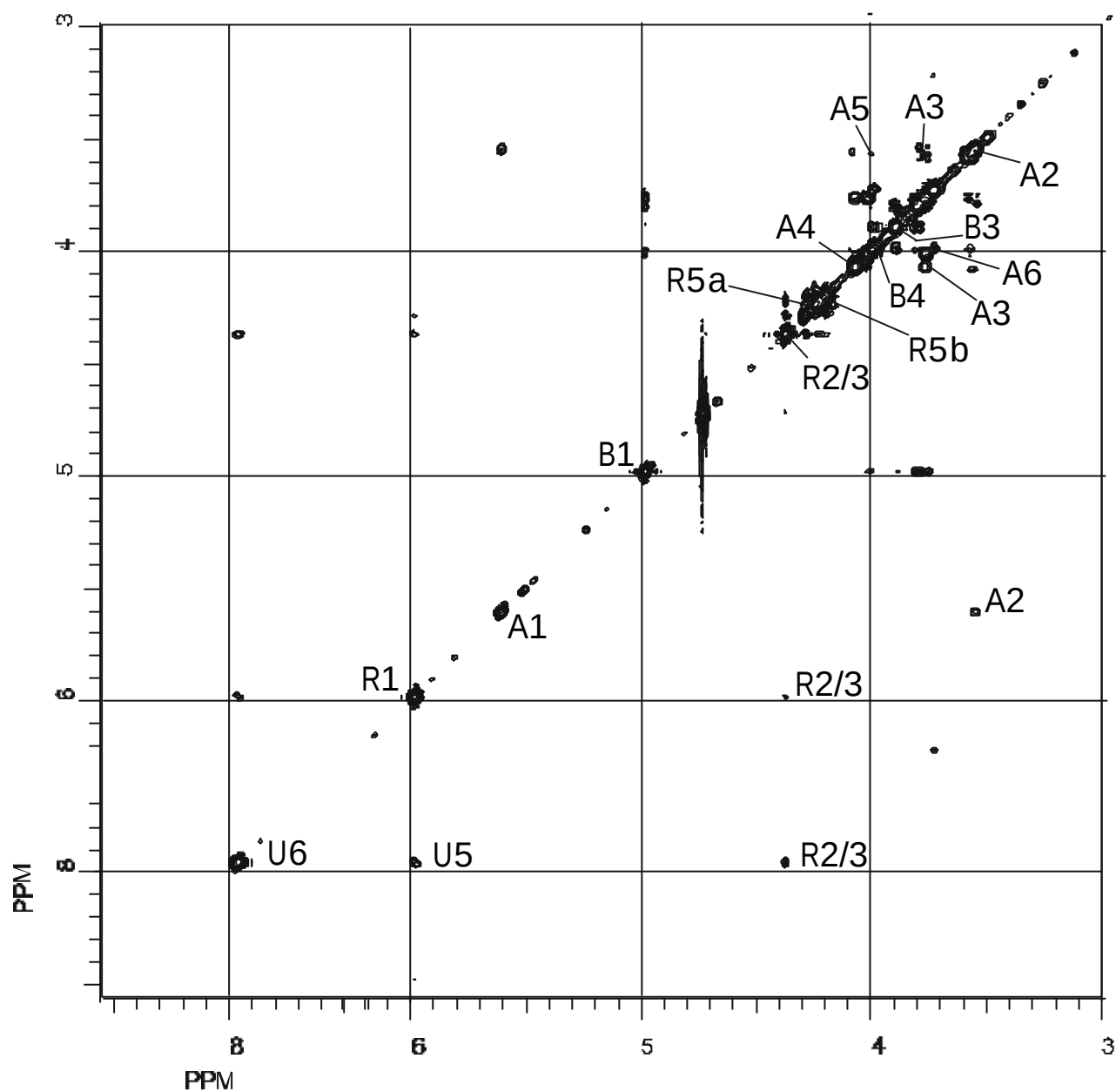


Abb. 99: 2D ROESY NMR-Spektrum (250 ms, 300 K) von Gal(α 1-3)Glc(α 1-UDP) (α -Galactosidase *B.adolescentis*).

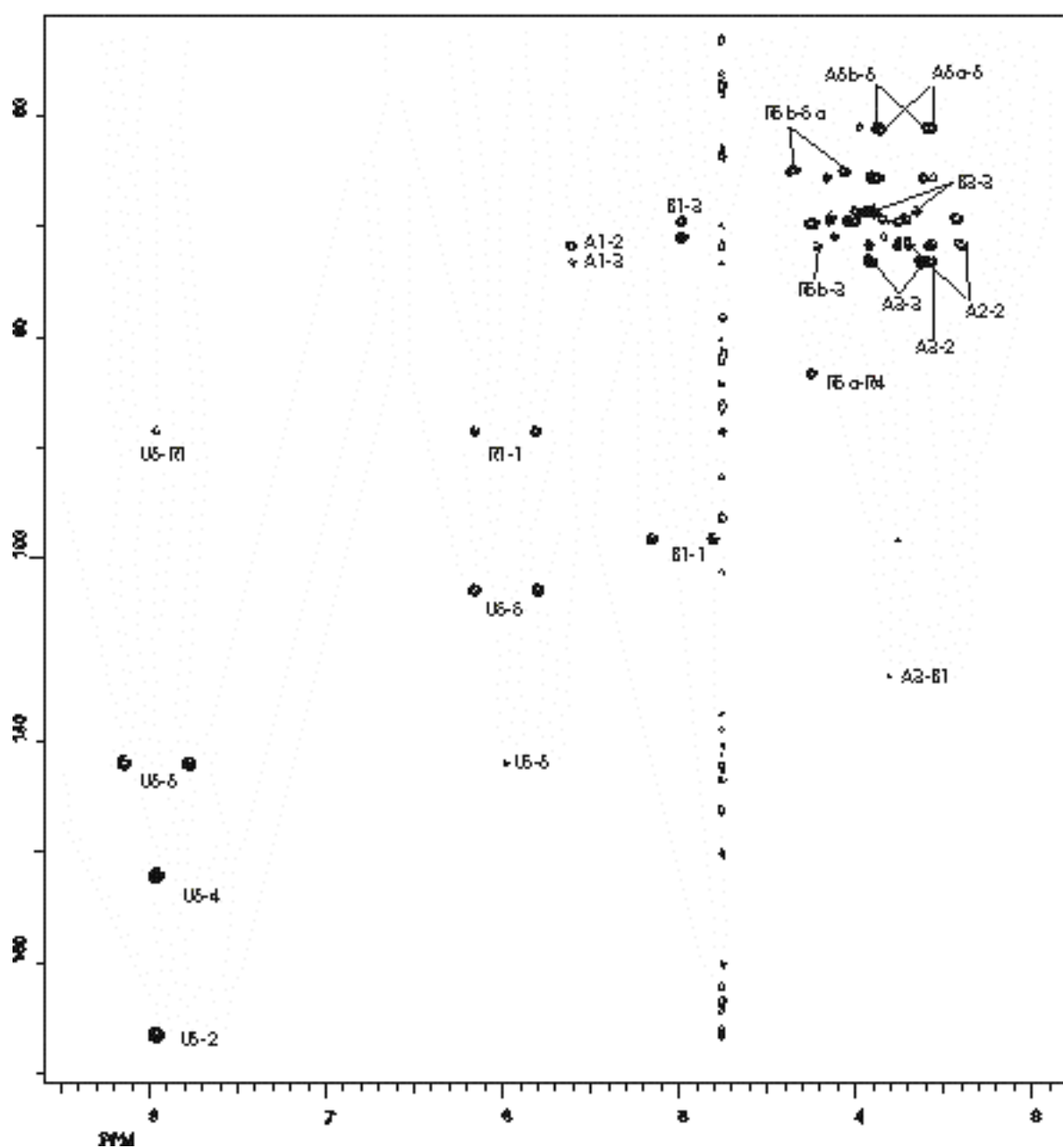


Abb. 100: 2D HMBC NMR-Spektrum (300 K) von Gal(α 1-3)Glc(α 1-UDP (α -Galactosidase *B.adolescentis*).

5.2.9 GalNAc(**b** 1-4)GlcNAc(**a** 1-UDP, **b**-N-Acetylhexosaminidase

Trichoderma harzianum

Das 1D ^1H NMR Spektrum (**Abb. 101**) von GalNAc(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP (LacDiNAc-UDP) zeigte vier Signale im Tieffeld vom HOD Signal (δ 4,751). Zwei dieser Signale, bei δ 7,993 (U_6) und δ 5,963 (U_5), wurden den Protonen des Uracilrings an Hand von Literaturdaten zugeordnet (Koplin *et al.* 1997; Yoon *et al.* 1996).

Das anomere Signal bei δ 5,960 wurde der Ribose R (β Konfiguration, Furanoseringform) zugeordnet, wohingegen das verbleibende anomere Signal bei δ 5,499 dem GlcNAc-Rest A (α -Konfiguration, Pyranoseringform), welcher mit der Phosphatgruppe verbunden ist, zugeordnet wurde.

Weiterhin konnten zwei chemische Verschiebungen im Hochfeld der HOD Resonanz zugeordnet werden: das Singulett bei δ 2,064, welches von den N-Acetyl Protonen des GlcNAc-Restes A und GalNAc Restes B stammt, sowie des anomere Dublett bei δ 4,462, das den GalNAc-Rest B reflektiert (β -Konfiguration, Pyranoseringform).

Das ^{13}C -Spektrum zeigte drei Signale in der anomeren Region bei δ 102,47 (B_1), 103,42 (U_5) und 89,49 (R_1). Weiterhin wurden Signale in der Tieffeldregion 167,29 (U_2), 152,57 (U_4) und 142,51 (U_6) beobachtet. Typische GlcNAc-Resonanzen wurden bei δ 22,77 (NAc-CH₃) und δ 53,74 (A_2) gefunden.

Durch 2D TOCSY (**Abb. 102**), ROESY (**Abb. 103**) und HMBC Experimente konnten alle ^{13}C und ^1H Resonanzen in den 1D Spektren zugeordnet werden.

Im ^{13}C - ^1H HMBC Spektrum konnte durch die Kopplung zwischen $\text{A}_{\text{C}-4}$ und $\text{B}_{\text{H}-1}$ (δ 79,54 und 4,562) und zwischen $\text{B}_{\text{C}-1}$ und $\text{A}_{\text{H}-4}$ (δ 102,47 und 3,709) die Bindung zwischen den zwei Zuckerresten unzweifelhaft als (β 1-4)-Bindung identifiziert werden.

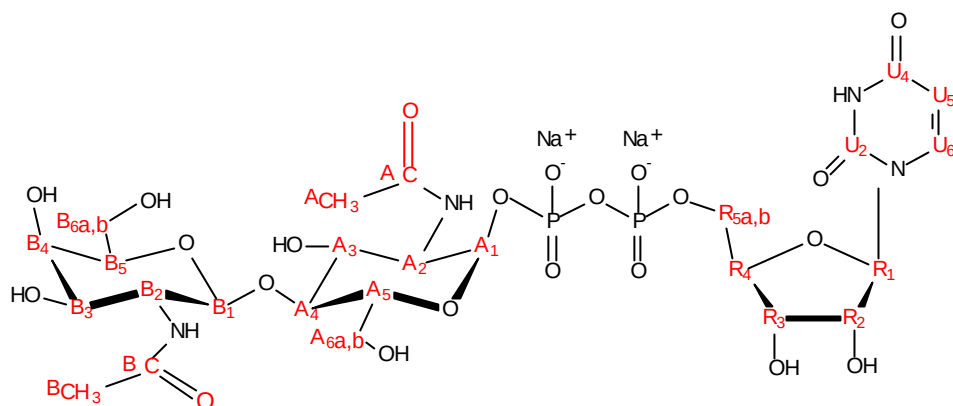


Tabelle 28: ^1H und ^{13}C chemische Verschiebungen von GalNAc(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP (β -N-Acetylhexosaminidase, *T. harzianum*).

Rest	$^1\text{H}^{\text{a}}$	$^{13}\text{C}^{\text{b}}$
A1	5,499	
A2	4,019	53,74
A3	3,849	70,41
A4	3,709	79,54
A5	3,930	72,12
A6a	3,838 ^c	60,41
A6b	3,669 ^c	60,41
A CH ₃	2,064	22,77
B1	4,562	103,47
B2	3,927	53,29
B3	3,771	71,44
B4	3,947	
B5	3,489	76,03
B6a	3,833 ^c	61,50
B6b	3,762 ^c	--
B CH ₃	2,064	22,7
R1	5,960	89,49
R2	4,366	
R3	4,366	69,86
R4	4,288	83,81
R5a	4,241	65,38
R5b	4,201	--
U2	--	167,20
U4	--	152,57
U5	5,963	103,42
U6	7,993	142,51

^aIn ppm relativ zum Signal von internem Acetat

^bIn ppm relativ zum Signal von externem Aceton

^cDie Zuordnung könnte innerhalb eines Restes untereinander ausgetauscht werden

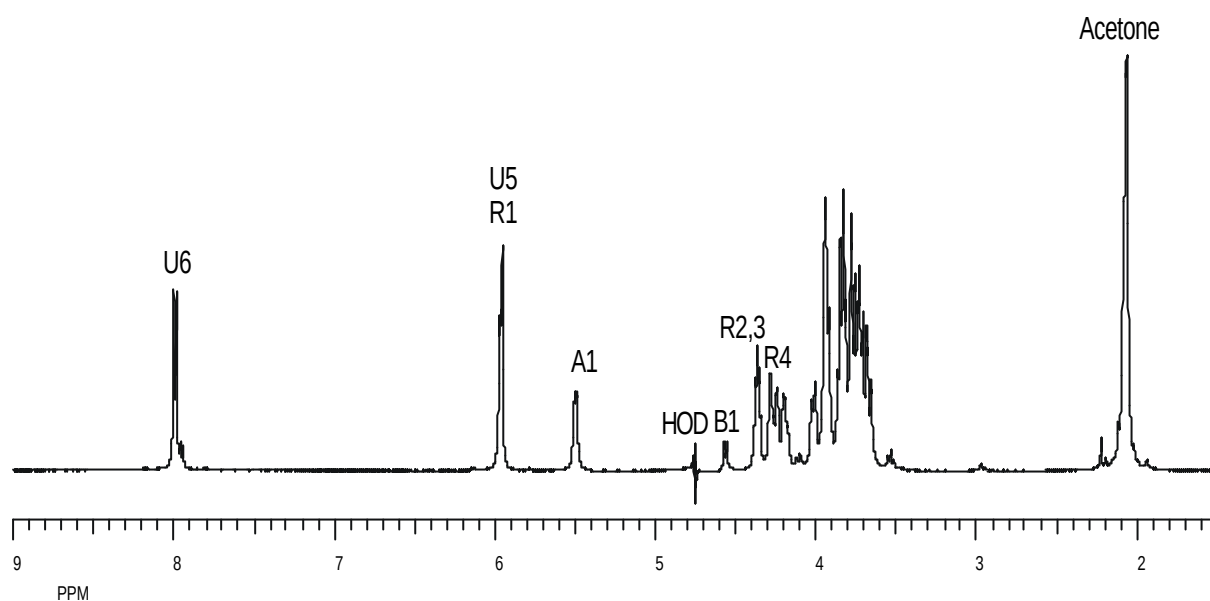


Abb. 101: 1D ^1H NMR-Spektrum (500 MHz, 300 K) von GalNAc(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP β -N-Acetylhexosaminidase, *T. harzianum*).

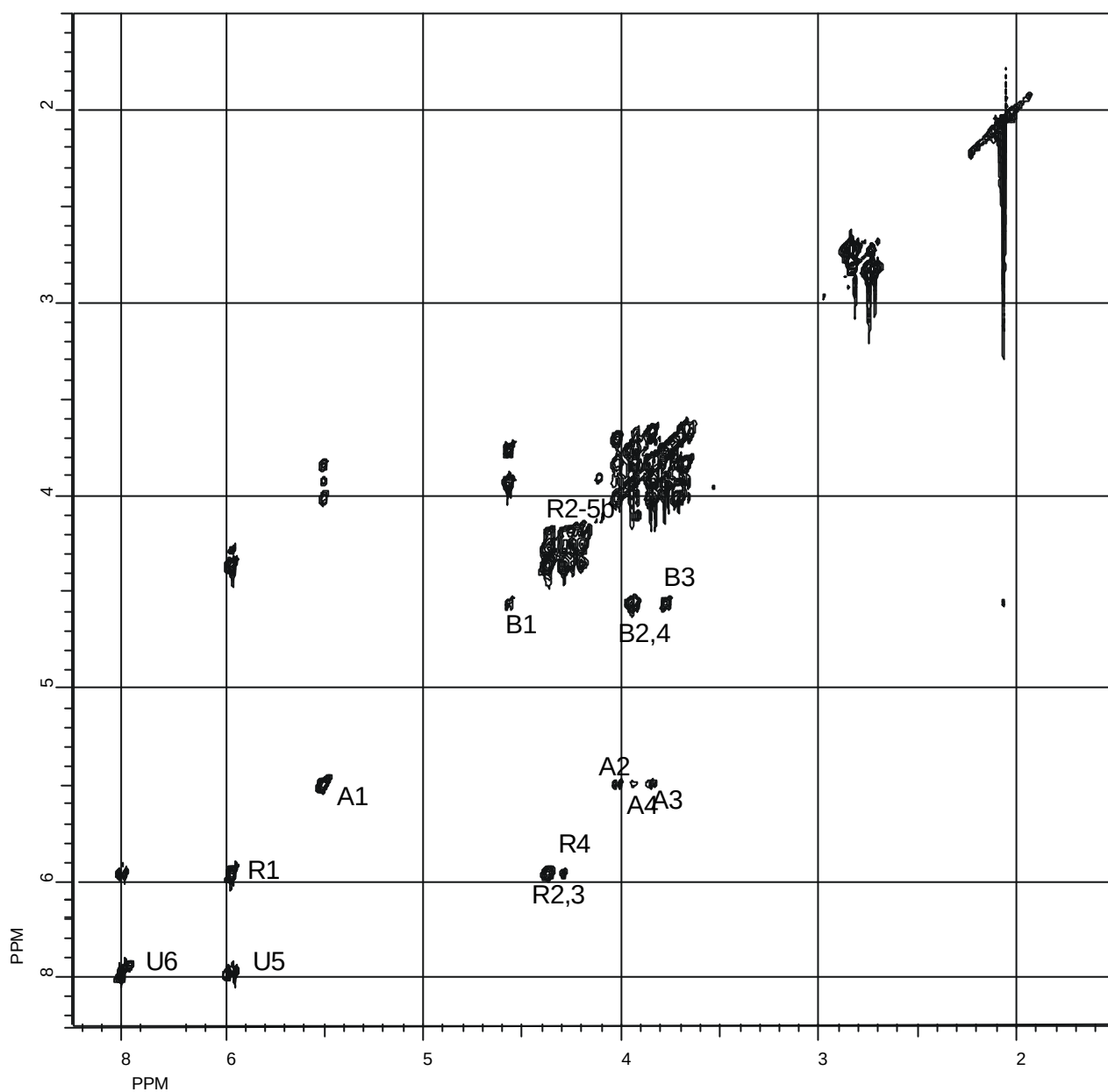


Abb. 102: 2D TOCSY Spektrum (100 ms, 300 K) von GalNAc(β 1-4)GlcNAc(α 1-UDP β -N-Acetylhexosaminidase, *T. harzianum*).

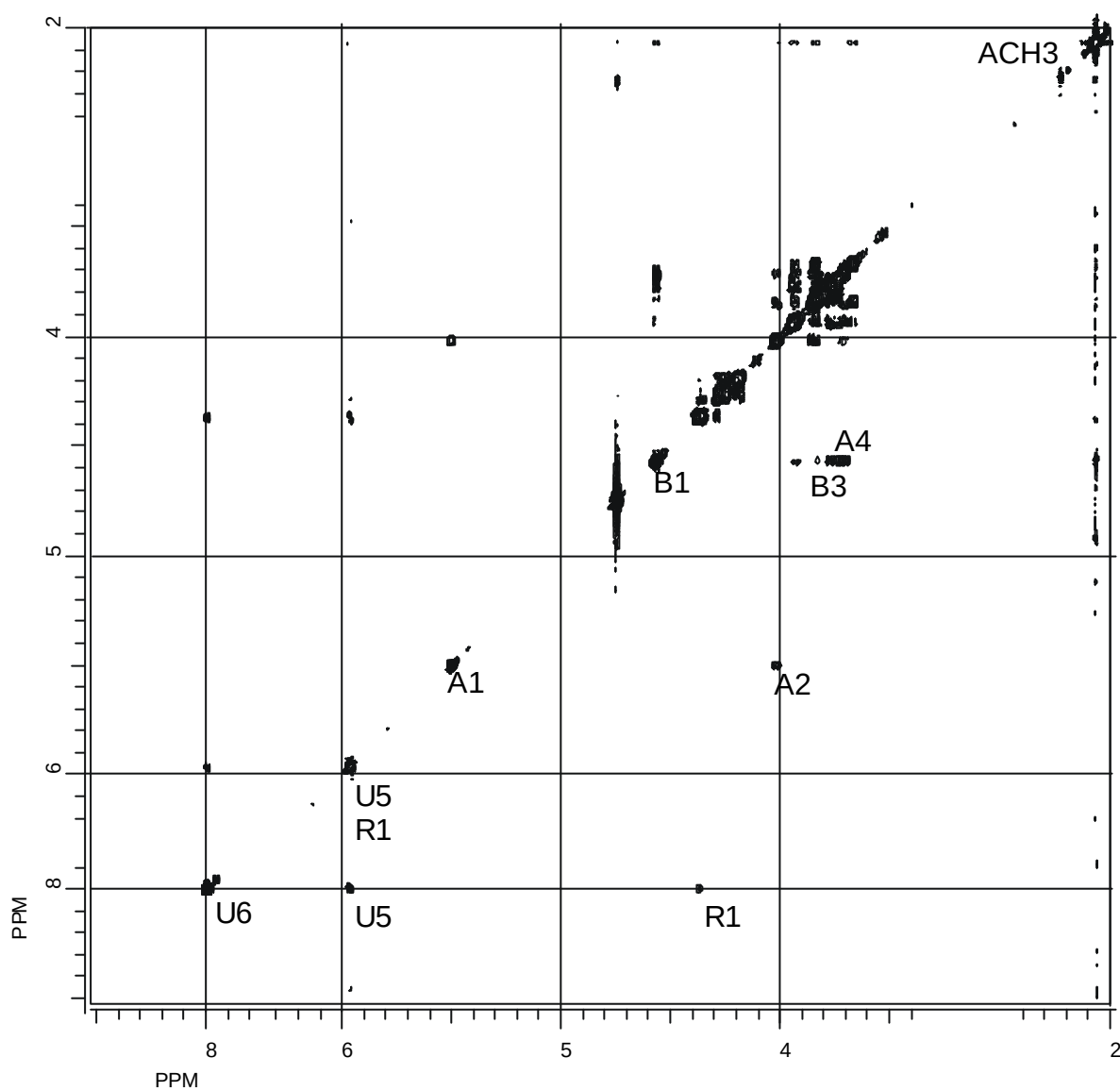


Abb. 103: 2D ROESY Spektrum (250 ms, 300 K) von GalNAc(β1-4)GlcNAc(α1-UDP) β-*N*-Acetylhexosaminidase, *T. harzianum*.

5.2.10 Core2-Bz mit der Core2 GlcNAc-Transferase

Es wurden sowohl 1D (**Abb. 104**), als auch 2D TOCSY (**Abb. 105**) und ROESY (**Abb. 106** und **Abb. 107**) Messungen durchgeführt. Die Auswertung der Spektren erfolgte durch Vergleich mit Literaturdaten (Dudziak 1999 und Pollex-Krüger *et al.* 1993). Das Produkt konnte somit eindeutig als Core2-Bz identifiziert werden.

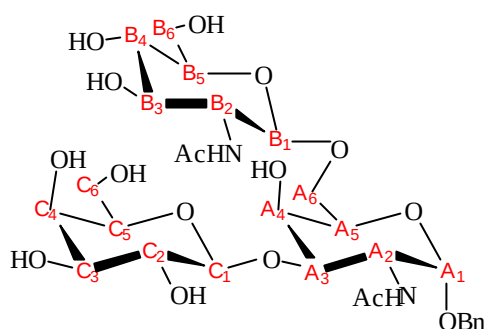


Tabelle 29: ^1H chemische Verschiebungen von Core2-Bz.

Rest	^1H
C ₆ H ₅	7,456
CH ₂	4,706
CH ₂ '	4,500
A1	4,974
A2	4,313
A3	4,021
A4	4,227
A5	4,148
A6a	4,703
A6b	4,069
A-CH ₃	1,959
B1	4,544
B2	3,738
B3	3,542
B4	3,449
B5	3,476
B6a	3,733
B6b	3,929
B-CH ₃	1,965
C1	4,431
C2	3,498
C3	3,596
C4	3,894
C5	n.d.
C6a	n.d.
C6b	n.d.

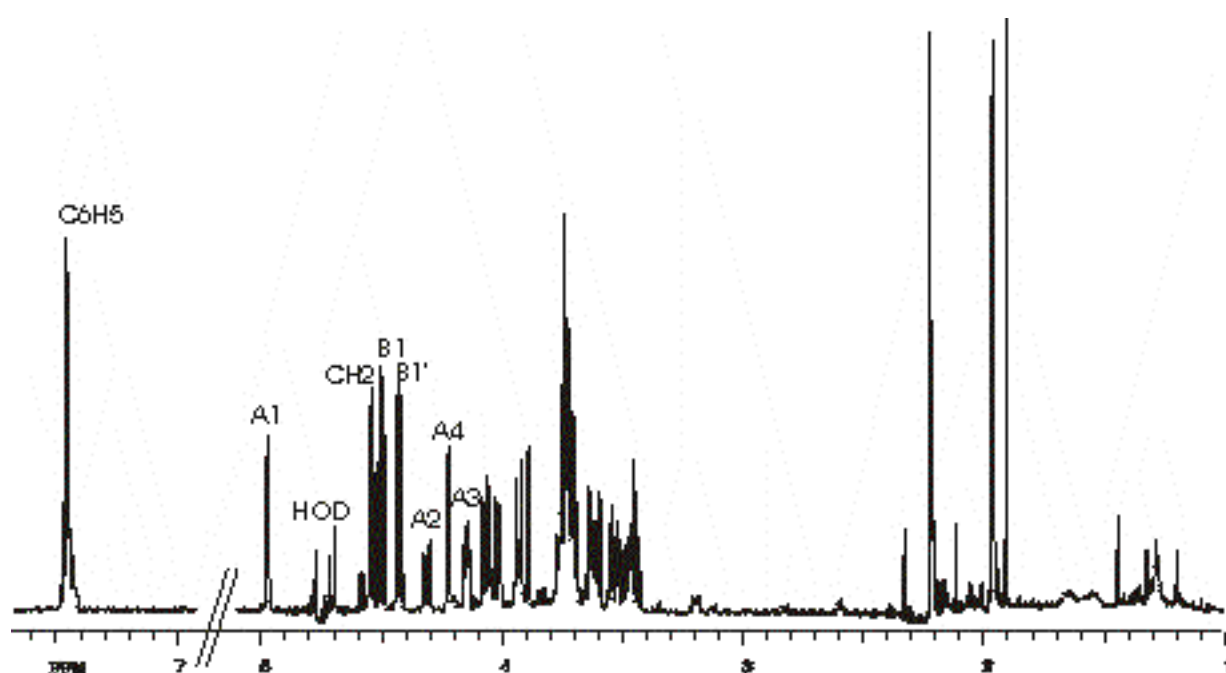


Abb. 104: 1D ^1H NMR-Spektrum (500 MHz, 300 K) von *Core2-Bz*.

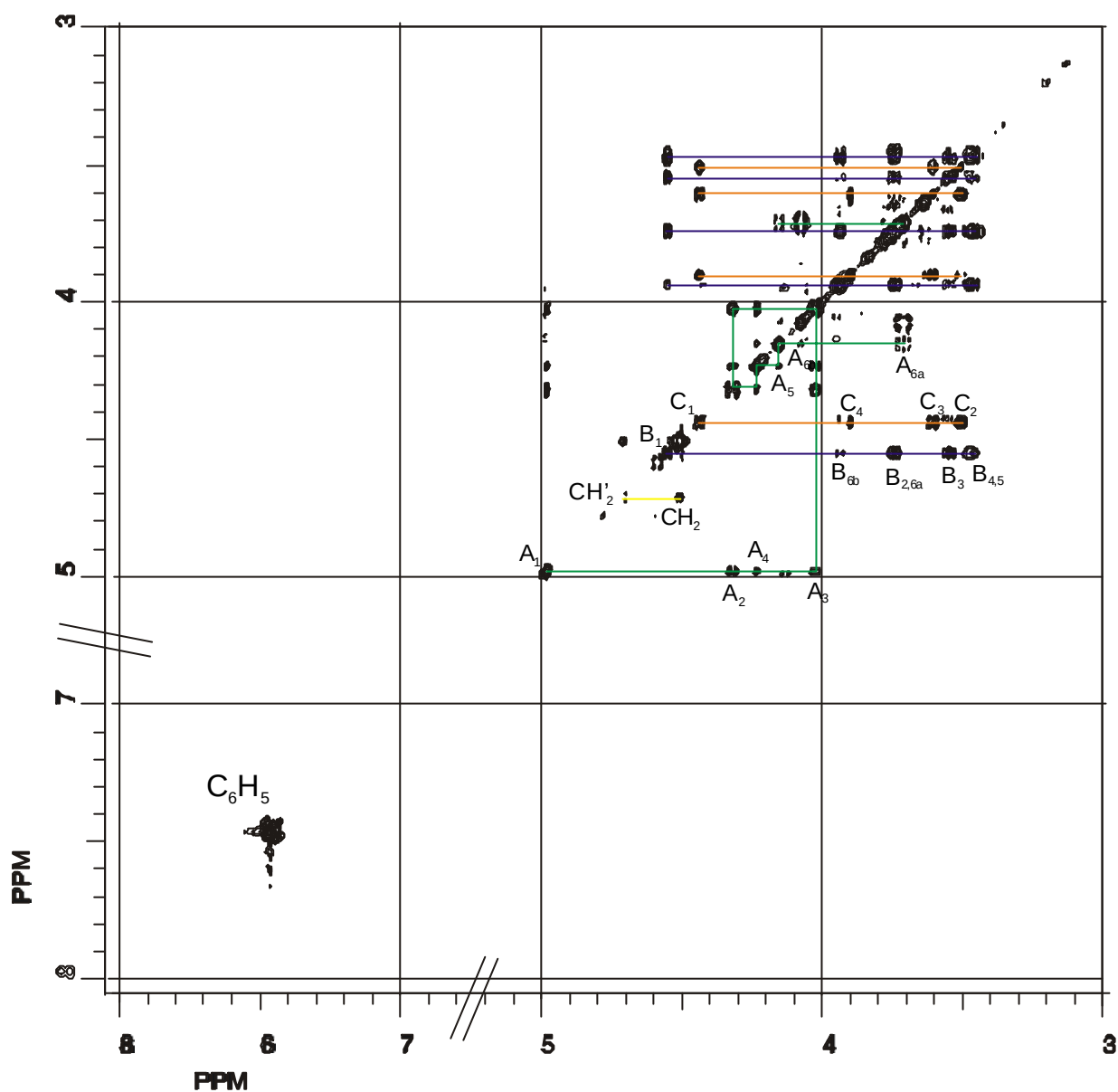


Abb. 105: 2D TOCSY Spektrum (100 ms, 300 K) *Core2-Bz*.

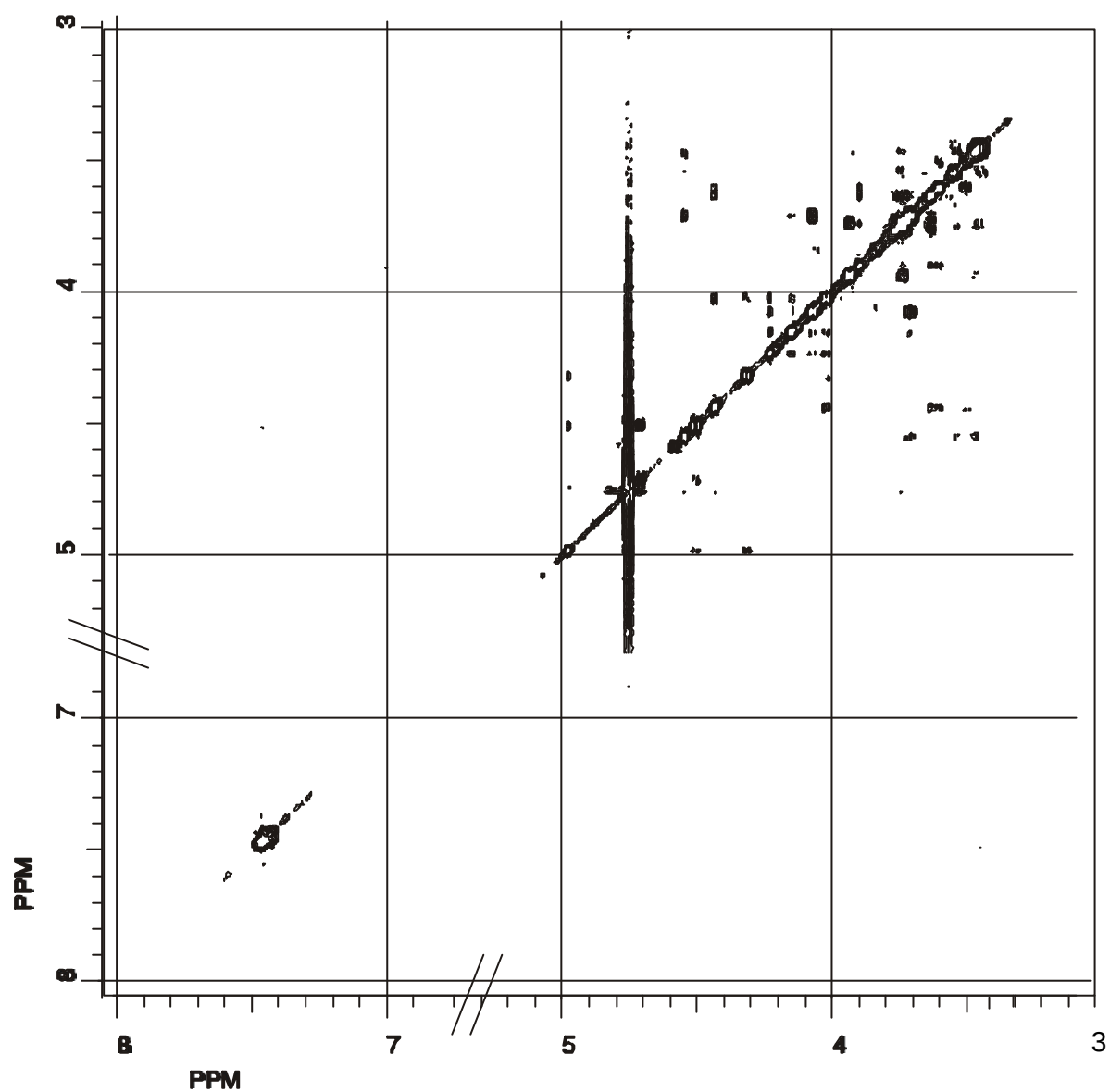


Abb. 106: 2D ROESY Spektrum (250 ms, 300 K) *Core2-Bz*.

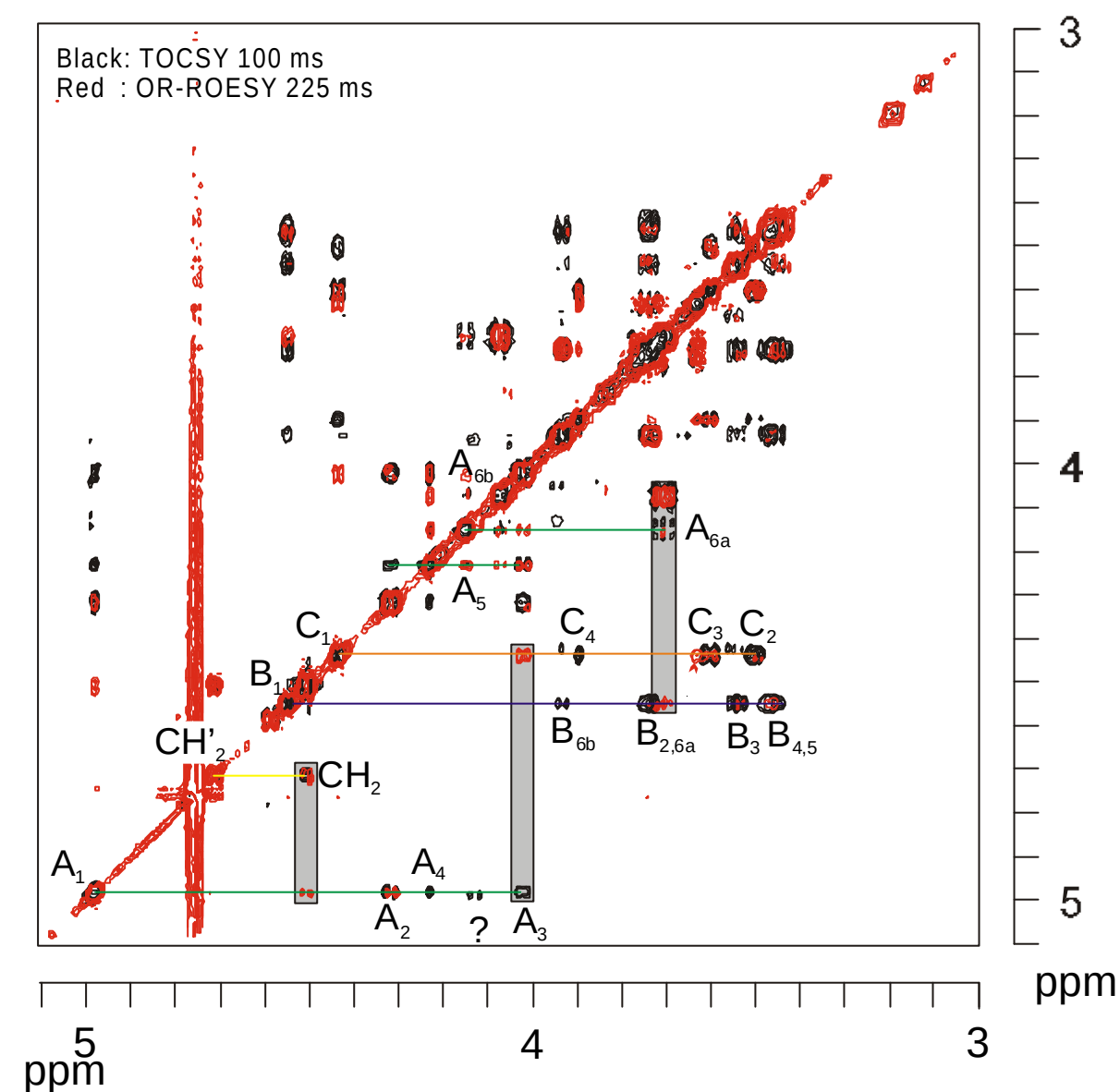


Abb. 107: Kombination von TOCSY und ROESY Spektren für *Core2-Bz*.

5.2.11 Core6-Bz mit der Core2 GlcNAc-Transferase

Es wurden sowohl 1D (**Abb. 108**), als auch 2D TOCSY (**Abb. 109**) und ROESY durchgeführt. Die Auswertung der Spektren erfolgte durch Vergleich mit Literaturdaten (Dudziak 1999 und Pollex-Krüger *et al.* 1993). Das Produkt konnte somit eindeutig als Core6-Bz identifiziert werden.

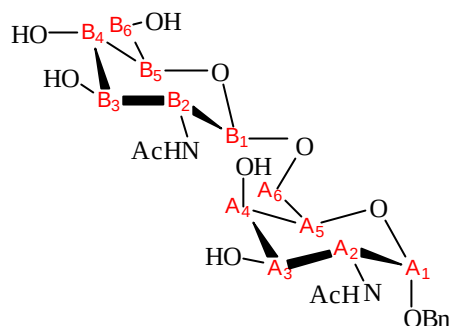


Tabelle 30: ^1H chemische Verschiebungen von Core6-Bz.

Rest	^1H
C_6H_5	7,433
CH_2	4,703
CH_2'	4,505
A1	4,976
A2	4,126
A3	3,896
A4	3,961
A5	4,082
A6a	3,692
A6b	4,050
A- CH_3	1,974
B1	4,525
B2	3,735
B3	3,546
B4	3,450
B5	3,472
B6a	3,749
B6b	3,956
B- CH_3	1,971

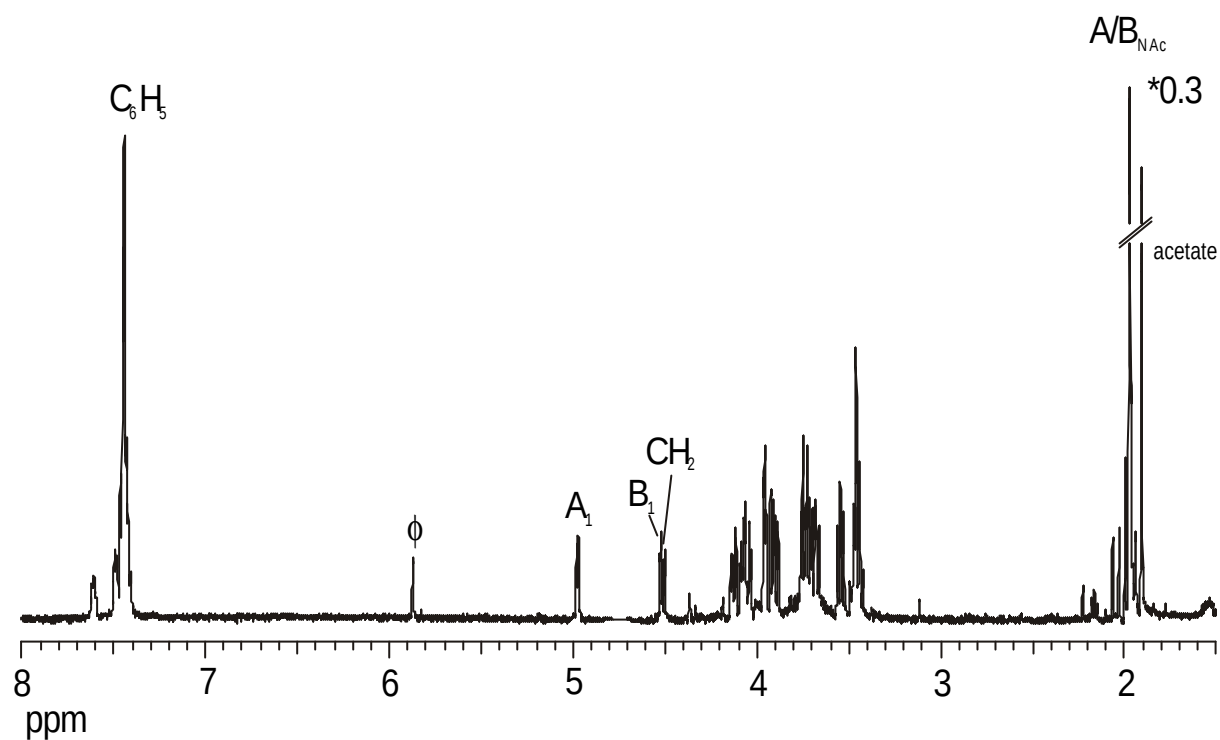


Abb. 108: 1D ^1H NMR-Spektrum (500 MHz, 300 K) von Core6-Bz.

187

6 METHODEN

- Die im Folgenden beschriebenen Reaktionen wurden, wenn nicht anders erwähnt, durch Inkubation bei 95°C (5 min.) abgestoppt. Für die HPLC-Analysen wurde das denaturierte Protein durch Zentrifugation (5 min., 13000 rpm) aus den Ansätzen entfernt.
- Für die Tieftemperatur-Synthesen wurden die Reaktionsansätze aliquotiert (max. 100 µL), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei der entsprechenden Temperatur inkubiert.

6.1 β -D-Galactosidase aus *Bacillus circulans*

Im Rahmen von eigenen Vorarbeiten gelang es erstmals, die Nucleotidzucker UDP-GlcNAc und UDP-Glc als Akzeptorsubstrate der β -Galactosidase aus *Bacillus circulans* zur Synthese von Gal(β 1-4)GlcNAc(α -UDP (UDP-LacNAc) und Gal(β 1-4)Glc(α -UDP (UDP-Lac) zu nutzen (**Abb. 17**) und die Synthese dieser Produkte hinsichtlich Substratkonzentrationen und Reaktionstemperatur zu optimieren. Die Ergebnisse zu diesen Untersuchungen wurden bereits veröffentlicht (Zervosen *et al.* 2001).

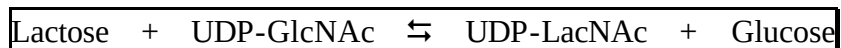
6.1.1 Akzeptorsubstratspektrum

Zur Bestimmung des Akzeptorsubstratspektrums der β -Galactosidase aus *B.circulans* (Daiwa Kasei KK, Osaka, Japan) wurde in Anlehnung an die oben erwähnten Vorarbeiten jeweils folgender optimierter Ansatz gewählt:

Volumen:	50 µL
NDP-Zucker:	100 mM
Lactose:	500 mM
β -Galactosidase:	10 U/mL
Puffer:	20 mM NaAc/HAc pH 4,5
Inkubation:	90 min
Temperatur:	30°C
HPLC ① und ③	(Kap. 6.12.1.1 und 6.12.1.3).

Als Nucleotidzucker wurden dabei jeweils UDP-GlcNAc, UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-GalNAc, UDP-GlcA, UDP-Xyl, dTDP-Glc, CDP-Glc, ADP-Glc, GDP-Glc, GDP-Man und CMP-Neu5Ac eingesetzt.

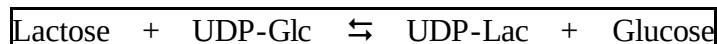
6.1.2 Präparative Synthese von Gal(**b** 1-4)GlcNAc(**a** 1-UDP und Gal(**b** 1-4)Gal(**b** 1-4)GlcNAc(**a** 1-UDP



Für eine präparative Synthese von UDP-LacNAc unter optimierten Bedingungen (Zervosen *et al.* 2001) wurde folgender Ansatz gewählt:

Volumen:	10 mL	
UDP-GlcNAc:	1 mmol	(697,5 mg)
Lactose:	5 mmol	(1710 mg)
β-Galactosidase:	100 U	
20 mM NaAc/HAc (pH 4.5)		
Temperatur:	-5°C	
Inkubationszeit:	2 Tage	
HPLC ① (Kap. 6.12.1.1)		

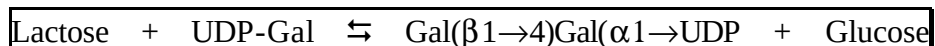
Die Isolierung der aktivierten Di- und Trisaccharide erfolgte durch Anionenaustauschchromatographie, Ethanolfällung und Gelfiltration (Kap. 6.11). Die Charakterisierung der aktivierten Di- und Trisaccharide mittels NMR und MS (Kap. 5).

6.1.3 Präparative Synthese von Gal(β** 1-4)Glc(**α** 1 - UDP und Gal(**β** 1-4)Gal(**β** 1-4)Glc(**α** 1-UDP**

Entsprechend des Syntheseansatzes für UDP-LacNAc wurde für die präparative Synthese von UDP-Lac folgender Syntheseansatz gewählt:

Volumen:	7,7 mL
UDP-Glc:	0,82 mmol (500 mg)
Lactose:	3,8 mmol (1318 mg)
β-Galactosidase:	77 U
20 mM NaAc/HAc-Puffer pH 4,5	
Temperatur:	-5°C
Inkubationszeit:	2 Tage
HPLC ① (Kap. 6.12.1.1)	

Die nun folgende Aufarbeitung der Produkte erfolgte über Anionenaustauscher, Ethanol-fällung und Gelfiltration, wie unter Kap. 6.11 beschrieben. Die aktivierten Di- und Trisaccharide wurden mittels NMR und MS (Kap. 5) charakterisiert.

6.1.4 Präparative Synthese von Gal(β** 1-4)Gal(**α** 1-UDP**

Entsprechend des Syntheseansatzes für UDP-LacNAc und UDP-Lac wurde für die präparative Synthese von Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP folgender Syntheseansatz gewählt:

Volumen:	1,2 mL
UDP-Gal	0,12 mmol (71 mg)
Lactose	0,6 mmol (205 mg)
β-Galactosidase	12 U
20 mM NaAc/HAc (pH 4.5)	
Temperatur:	-5°C
Inkubationszeit:	2 Tage
HPLC ② (Kap. 6.12.1.2)	

Die Aufarbeitung der Produkte erfolgte wie unter Kap. 6.11 beschrieben. Die Charakterisierung des aktivierten Disaccharides erfolgte mittels NMR und MS (Kap. 5).

6.2 **β -D-Galactosidase aus Stierhoden**

Für erste Tests mit der β -D-Galactosidase aus Stierhoden wurde zunächst das kommerziell erhältliche Präparat von Sigma (Deisenhofen) verwendet. Aus Kostengründen wurde für weitere Reaktionsansätze das Enzym aus Stierhoden isoliert und charakterisiert.

6.2.1 **β -D-Galactosidase aus Stierhoden (kommerzielles Präparat)**

6.2.1.1 Akzeptorsubstratspektrum

Zunächst wurde das Akzeptorsubstratspektrum der kommerziell erhältlichen β -Galactosidase aus Stierhoden (Sigma, Deisenhofen) mit verschiedenen Nucleotidzuckern getestet. Als Akzeptorsubstrate wurden dabei jeweils UDP-GlcNAc, UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-GalNAc, UDP-GlcA, UDP-Xyl, dTDP-Glc, CDP-Glc, ADP-Glc, GDP-Glc, GDP-Man und CMP-Neu5Ac eingesetzt. Dazu wurden jeweils 100 mM der zu testenden Nucleotidzucker mit 500 mM Lactose und 0,32 U/mL β -Galactosidase aus Stierhoden in 50 mM Citrat/Phosphat-Puffer pH 4,3 gelöst und 24 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden mit HPLC ③ (Kap.6.12.1.3) analysiert.

6.2.2 **Partielle Aufreinigung der β -D-Galactosidase aus Stierhoden**

Die β -Galactosidase wurde aus 1,3 kg frischen Stierhoden aus dem Schlachthof Jülich nach der Vorschrift von Distler und Jourdian (1978) isoliert. Die im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte fanden alle bei 4°C statt.

In einem ersten Schritt wurden die Stierhoden vom umliegenden Gewebe befreit und in einem Mixer zerkleinert. Das Homogenat wurde in 1300 mL 0,1 M Essigsäure aufgenommen und der pH-Wert wurde durch tropfenweise Zugabe von 2 M HCl auf 4,3 eingestellt. Nach 45 minütigem langsamen Rühren wurden die 2,3 L Homogenat mit 10000 U/min 15 min. zentrifugiert (Zentrifuge: Sorvall® RC-5B; Rotor: Sorvall® GSA) und das Präzipitat wurde verworfen. Der Überstand (1280 mL) wurde über einen Papierfilter abfiltriert und mit Ammoniumsulfat versetzt (609 g), so daß eine 75 %ige $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung entstand.

Nach 30 min. Rühren wurde 15 min. bei 10000 U/min zentrifugiert (Zentrifuge: Sorvall® RC-5B; Rotor: Sorvall® GSA). Das Präzipitat wurde in 400 mL Tris/HCl-Puffer (50 mM pH 7,5) gelöst, nicht gelöstes Protein wurde über einen Faltenfilter abfiltriert und das Filtrat (ca. 500 mL) wurde 24 Stunden gegen 5 L NaCl-Lösung (5mM) dialysiert. Die 5 mM NaCl-Lösung wurde nach ca. 10 Stunden durch frische ersetzt. Der bei der Dialyse entstandene Niederschlag wurde durch 15 minütige Zentrifugation bei 10000 U/min entfernt und der Überstand lyophilisiert. Das Lyophilisat ist bei -20°C über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr stabil (Distler 1978). Die Aktivität der β -Galactosidase wurde während der Aufreinigung durch einen geeigneten Enzymtest (Kap 6.10.1) überprüft. Die Proteinkonzentration des Lyophilisates wurde mit der Methode nach Bradford (1976) bestimmt

6.2.3 Charakterisierung der β -D-Galactosidase aus Stierhoden (Eigenisolat)

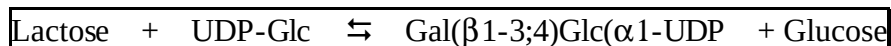
6.2.3.1 pH-Optimum

Zur Bestimmung des pH-Optimums der β -D-Galactosidase aus Stierhoden wurde eine Aktivitätsbestimmung des Enzyms bei pH-Werten zwischen pH 3 und 6 in 50 mM Citrat/Phosphat-Puffer vorgenommen. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte bei den jeweiligen pH-Werten wie in Kapitel 6.10.1 beschrieben.

6.2.3.2 pH-Stabilität

Um die Stabilität der β -Galactosidase bei dem gewählten pH-Wert von 4,3 zu ermitteln, wurden 15 mg des Enzyms in 500 μL 50 mM Citrat/Phosphat-Puffer (pH 4,3) gelöst (Volumenaktivität: 0,33 U/mL) und bei 30°C inkubiert. Über einen Zeitraum von 24 Stunden wurden dem Ansatz regelmäßig Proben (10 μL) entnommen und in einen Enzymtest (Kap. 6.10.1) eingesetzt.

6.2.3.3 Optimierung der Donorsubstratkonzentration



Zur Optimierung der Donorsubstratkonzentration wurden 100, 200, 300, 400 und 500 mM Lactose mit jeweils 100 mM UDP-Glc und 0,33 U/mL (18,3 mg/mL) β -Galactosidase aus Stierhoden (Eigenisolat) in 50 mM Citrat/Phosphat-Puffer (pH 4,3; 150 μ L) bei 30°C inkubiert. Über einen Zeitraum von 12 Stunden wurden dem Ansatz regelmäßig Proben entnommen. Die Proben wurden mittels HPLC ② (Kap. 6.12.1.2) analysiert.

6.2.3.4 Inhibition durch Galactose

Volumen:	100 μ L
Galactose:	0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 und 400 mM
<i>p</i> NP- β -D-Galactose:	5 mM
50 mM Citrat/Phosphat-Puffer	pH 4,3
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	10 min.

Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch den pH-Shift bei Zugabe von 900 μ L Glycin/NaOH-Puffer (250 mM, pH 10,0). Die Aktivitätsbestimmung wurde dann wie in Kap. 6.10.1 beschrieben durchgeführt. Die Meßwerte wurden nach dem Modell einer kompetitiven Inhibition mit Hilfe des Programms "Scientist" (Micromath, Salt Lake City, USA) angepaßt (**Formel 1**). Der K_M -Wert für *p*NP- β -Gal (0,005 mM) wurde für die Berechnungen aus Literaturdaten entnommen (Dudziak 1999).

$$V = V_{\max} \cdot \frac{c(pNP - Gal)}{K_M \cdot \left(1 + \frac{I}{K_I}\right) + S}$$

Formel 1: Modell zur Berechnung einer kompetitiven Inhibition.

6.2.3.5 Produktinhibition

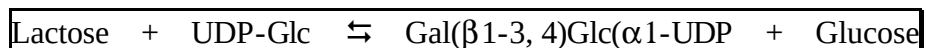
Volumen:	100 µL
UDP-Disaccharid:	0, 1, 5, 10, 20 mM
pNP-β-D-Galactose:	5 mM
50 mM Citrat/Phosphat-Puffer	pH 4,3
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	10 min.

Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 900 µL Glycin/NaOH-Puffer (250 mM, pH 10,0). Die Aktivitätsbestimmung wurde dann wie in Kap. 6.10.1 beschrieben durchgeführt. Die Anpassung der Daten erfolgte wie in Kap. 6.2.3.4 anhand des Modells für die kompetitive Inhibition (**Formel 1**) mit dem Programm "Scientist" (Micromath, Salt Lake City, USA).

6.2.3.6 Akzeptorsubstratspektrum

Für die Untersuchung des Akzeptorsubstratspektrums der β-Galactosidase aus Stierhoden (Eigenisolat) wurden UDP-GlcNAc, UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-GalNAc, UDP-GlcA, UDP-Xyl, ADP-Glc, GDP-Glc, GDP-Man und CMP-Neu5Ac eingesetzt. Es wurden pro Ansatz 100 mM Nucleotidmonosaccharid, 500 mM Lactose und 0,33 U/mL β-Galactosidase in 50 mM Citrat/Phosphat Puffer (pH 4,3) bei 30°C über einen Zeitraum von 14 Stunden inkubiert. Die Analyse erfolgte mit HPLC ② (Kap. 6.12.1.2).

6.2.3.7 Zeit-Umsatz Kurven bei 30°C und –5°C, Akzeptor: UDP-Glc



Die Inkubation erfolgte jeweils bei –5°C und 30°C inkubiert:

Volumen:	200 µL
UDP-Glc	100 mM
Lactose	500 mM
β-Galactosidase	0,33 U/mL (18,3 mg/mL)
50 mM Citrat/Phosphat	pH 4,3
Temperatur:	30°C und –5°C
HPLC ②	(Kap. 6.12.1.2)

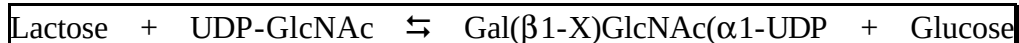
Dem Ansatz bei **30°C** wurden über einen Zeitraum von 25 Stunden regelmäßig Proben entnommen. Im Gegensatz dazu wurden die Proben aus dem Reaktionsansatz bei **-5°C** über einen Zeitraum von 30 Tagen verteilt entnommen.

6.2.3.8 Zeit-Umsatz Kurven bei 30°C, Akzeptor: UDP-GalNAc und UDP-GlcNAc

Um die optimale Reaktionszeit mit UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc als Akzeptorsubstrate zu bestimmen, wurden folgende Reaktionsansätze gewählt:

Volumen:	200 µL
UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc:	100 mM
Lactose:	500 mM
β-Galactosidase:	0,33 U/mL
50 mM Citrat/Phosphat-Puffer pH 4,3	
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	25 Stunden
HPLC ② (Kap. 6.12.1.2)	

6.2.4 Präparative Synthese von Gal(b1-X)GlcNAc(a1-UDP



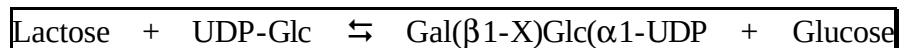
Für die Analyse der Produkte der β-Galactosidase mittels NMR und MS und zur Bereitstellung von Substraten für GlcNAc-Transferasen wurde eine präparative Synthese von Gal(β1-X)GlcNAc(α1-UDP durchgeführt.

Volumen:	5 mL
UDP-GlcNAc:	0,82 mmol (325,7 mg)
Lactose:	2,5 mmol (855 mg)
β -Galactosidase:	1,65 U (183 mg)
50 mM Citrat/Phosphat-Puffer (pH 4.3)	
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	14 Stunden

6.2.4.1 Produktisolierung

Die Produkte konnten mittels Anionenaustauschchromatographie (Kap. 6.11.1), Ethanolfällung (Kap. 6.11.2) und Gelfiltration (Kap. 6.11.3) isoliert werden.

6.2.5 Präparative Synthese von Gal(β 1-X)Glc(α 1-UDP



Eine präparative Synthese von Gal(β 1-X)Glc(α 1-UDP wurde durchgeführt:

Volumen:	10 mL
UDP-Glc	1 mmol (610,3 mg)
Lactose	5 mmol (1710 mg)
β -Galactosidase	3,3 U (183 mg)
50 mM Citrat/Phosphat-Puffer (pH 4.3)	
Temperatur	30°C
Inkubationszeit:	14 Stunden

6.2.5.1 Produktisolierung

Die Produkte konnten mittels Anionenaustauschchromatographie (Kap. 6.11.1), Ethanolfällung (Kap. 6.11.2) und Gelfiltration (Kap. 6.11.3) isoliert werden.

6.2.6 Kombination von Glycosidasen mit Glycosyltransferasen

6.2.6.1 Kombination der β -D-Galactosidase aus Stierhoden mit α 2,3-O-Sialyltransferase [EC 2.4.99.4]

Für diese Versuche wurde eine rekombinante humane α 2,3-O-Sialyltransferase (E.C. 2.4.99.4) von Prof. Clausen, Universität Copenhagen, zur Verfügung gestellt. Das Enzym wurde von der Copenhagener Arbeitsgruppe in Baculoviren cloniert und in Sf9-Zellen exprimiert (Dudziak 1999). Mit UDP-GalNAc als Akzeptorsubstrat der β -Galactosidase wurde getestet, ob in einem gekoppelten Einsatz mit der SiaT Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-3)GalNAc(α 1-UDP gebildet werden kann. Für erste Versuche wurde folgender Ansatz mit kommerziell erhältlicher β -Galactosidase gewählt:

Volumen:	50 μ L
UDP-GalNAc:	20 mM
CMP-Neu5Ac:	30 mM
Lactose:	500 mM
β -Galactosidase (Sigma):	0,5 U/mL
Sialyltransferase:	0,1 U/mL
alkalische Phosphatase:	10 U/mL
BSA:	0,5 mg/mL
50mM MES/NaOH-Puffer pH 6,5	
Temperatur:	RT
Inkubationszeit:	48 Stunden
HPLC © (Kap. 6.12.1.2)	

Für weitere Versuche stand die käufliche Sialyltransferase aus Ratte (rekombinant *Spodoptera frugiperda*, Calbiochem) und das Eigenisolat der β -Galactosidase aus Stierhoden zur Verfügung. In Vorversuchen wurde festgestellt, daß CMP-Neu5Ac durch das Eigenisolat der β -Galactosidase hydrolysiert. Deshalb wurde im folgenden die Synthese in zwei Teile unterteilt. Im ersten Schritt wurde die β -Galactosidasereaktion durchgeführt:

Volumen:	100 μ L
UDP-GalNAc:	100 mM
Lactose:	500 mM
β -Galactosidase:	0,33 U/mL
50 mM MES/NaOH-Puffer pH 6,5	
Temperatur:	RT
Inkubationszeit:	7 Stunden
HPLC © (Kap. 6.12.1.2)	

Für die Sialyltransferasereaktion wurden 40 µL des obigen Ansatzes wie folgt weiterverarbeitet:

Volumen:	50 µL
Reaktionsansatz β-Galactosidase:	40 µL (12 mM UDP-Disaccharid)
CMP-Neu5Ac:	30 mM
Sialyltransferase:	68 mU/mL
alkalische Phosphatase:	10 U/mL
BSA:	0,5 mg/mL
50 mM MES/NaOH-Puffer pH 6,5	
Temperatur:	RT
Inkubationszeit:	24 Stunden
HPLC ② (Kap. 6.12.1.2)	

Ein weiterer Test wurde mit einer höheren Sialyltransferasekonzentration durchgeführt:

Volumen:	50 µL
Reaktionsansatz β-Galactosidase:	30 µL (11 mM UDP-Disaccharid)
CMP-Neu5Ac:	30 mM
Sialyltransferase:	136 mU/mL
alkalische Phosphatase:	10 U/mL
BSA:	0,5 mg/mL
Temperatur:	RT
Inkubationszeit:	24 Stunden
HPLC ② (Kap. 6.12.1.2)	

6.2.6.2 Kombination der β-D-Galactosidase aus Stierhoden mit der α1,3Fucosyltransferase V [EC 2.4.1.65]

Das hier verwendete Enzym war das rekombinante humane Enzym aus *Spodoptera frugiperda* (Calbiochem). Es sollte getestet werden, ob die Übertragung von Fucose auch auf UDP-LacNAc stattfinden kann. Dazu wurde gereinigtes Substrat aus der Reaktion mit der β-Galactosidase aus *B. circulans* eingesetzt.

Folgender Ansatz wurde gewählt:

Volumen:	50 µL
UDP-LacNAc:	10 mM
GDP-Fuc:	10 mM
MnCl ₂ :	10 mM
α1,3FucT:	0,1 U/mL
alk. Phosphatase:	10 U/mL
50 mM NaCacodylat/HCl-Puffer pH 5,0	
Temperatur:	30°C
Reaktionszeit:	6 und 24 Stunden
Inkubationszeit:	24 Stunden
HPLC ② (Kap. 6.12.1.2)	

Um das Verhältnis der Regioisomeren bei der β-Galactosidasereaktion mit UDP-GlcNAc als Akzeptorsubstrat zu bestimmen, wurde zunächst die β-Galactosidasereaktion durchgeführt:

Volumen:	100 µL
UDP-GlcNAc:	100 mM
Lactose:	500 mM
β-Galactosidase:	0,33 U/mL
50 mM NaCacodylat/HCl-Puffer pH 5,0	
Temperatur:	30°C
Reaktionszeit:	10 Stunden
HPLC ② (Kap. 6.12.1.2)	

Für die Fucosyltransferasereaktion wurden 20 µL des obigen Ansatzes wie folgt weiterverarbeitet:

Volumen:	50 µL
Reaktionsansatz β-Galactosidase:	20 µL
	(≈ 6 mM UDP-Disaccharid)
GDP-Fuc:	10 mM
MgCl ₂ :	10 mM
alk. Phosphatase:	10 U/mL
α1,3FucT:	0,1 und 0,2 U/mL
50 mM NaCacodylat/HCl-Puffer pH 5,0	
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	10 und 24 Stunden
HPLC ② (Kap. 6.12.1.2)	

6.3 ***β*-D-Galactosidase aus *Diplococcus pneumoniae***

6.3.1 Substratspektrum

In Anlehnung an die eigenen Untersuchungen mit der *β*-Galactosidase aus *B. circulans* wurde folgender Reaktionsansatz gewählt:

Volumen:	50 μ L
UDP-Zucker:	100 mM
Lactose:	500 mM
<i>β</i> -Galactosidase:	0,7 U/mL
50 mM NaCacodylat/HCl-Puffer	pH 6,0
Temperatur:	30°C
Reaktionszeit:	210 min.
HPLC ② (Kap. 6.12.1.2) und DC	

Mit UDP-Glc als Akzeptosubstrat wurde der oben angegebene Reaktionsansatz wiederholt, die Inkubationsdauer wurde jedoch auf 25 Stunden erhöht.

6.4 ***β*-D-Galactosidase aus *E. coli***

Für Übertragungsversuche mit der *β*-D-Galactosidase aus *E. coli* wurde das Enzym der Firma Boehringer verwendet. Folgender Ansatz wurde gewählt:

Volumen:	100 μ L
UDP-Glc, UDP-GlcNAc:	100 mM
<i>p</i> NP- <i>β</i> -Gal:	100 mM
BSA:	5 mg/mL
50 mM Citrat/Phosphat-Puffer	pH 7,0
Temperatur:	30°C; -5°C
HPLC ① (Kap. 6.12.1.1) und DC	

Dem Reaktionsansatz bei 30°C wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden regelmäßig Proben entnommen. Die Versuche wurden bei -5°C wiederholt, dabei wurden über einen Zeitraum von einer Woche regelmäßig Proben entnommen.

6.5 ***b*-D-Galactosidase aus *Aspergillus oryzae***

Für Übertragungsversuche mit der β -D-Galactosidase aus *A. oryzae* wurde das Enzym der Firma Sigma (Deisenhofen) verwendet. Folgender Ansatz wurde gewählt:

Volumen:	100 μ L
UDP-Glc, UDP-GlcNAc:	100 mM
<i>p</i> NP- β -Gal:	100 mM
50 mM NaAc/HAc-Puffer pH 4,5	
Temperatur:	30°C; -5°C
HPLC ② (Kap. 6.12.1.2) und DC	

Dem Reaktionsansatz bei 30°C wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden regelmäßig Proben entnommen. Die Versuche wurden bei -5°C wiederholt. Über einen Zeitraum von einer Woche wurden regelmäßig Proben entnommen.

6.6 ***a*-D-Galactosidase aus *Bifidobacterium adolescentis***

Eine gereinigte α -Galactosidase aus *Bifidobacterium adolescentis* wurde von Dr. Stefan Marx (Institut für Biotechnologie, RWTH Aachen) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Reinigung erfolgte ausgehend vom Enzymrohextrakt über Anionenaustauschchromatographie (Q-Sepharose), Adsorptionschromatographie (BioGel HTP hydroxyapatite) und Gelfiltration (Sephacryl S-200) (Leder 1999).

6.6.1 **Reaktionen mit Gal(α 1-*p*NP als Donorsubstrat bei 30°C und -5°C**

Volumen:	100 μ L
UDP-Glc, bzw. UDP-Gal:	100 mM
Gal(α 1- <i>p</i> NP:	30, 70, 120 und 190 mM
α -Galactosidase:	0,7 U/mL
50 mM Citrat/Phosphat Puffer pH 6,0	
Temperatur:	30°C und -5°C
HPLC ② (Kap. 6.12.1.2) und DC	

Dem Ansatz bei 30°C wurden über einen Zeitraum von 240 Minuten regelmäßig Proben entnommen. Dem Reaktionsansatz bei -5°C wurden hingegen über einen Zeitraum von 7 Tagen verteilt Proben entnommen.

6.6.2 Reaktionen mit Melibiose als Donorsubstrat bei 30°C und -5°C

Da Melibiose (Gal(α 1-6)Glc) wurde als Donorsubstrat getestet.

Volumen:	100 μ L
UDP-Glc, UDP-Gal, und UDP-GlcNAc:	100, 300, 500 mM
Melibiose:	50, 100, 300, 500 mM
α -Galactosidase:	0,7 U/mL
50 mM Citrat/Phosphat Puffer pH 6,0	
Temperatur:	30°C
Reaktionszeit:	140 min.
HPLC © (Kap. 6.12.1.2) und DC	

Zur Unterdrückung einer eventuellen Produkthydrolyse wurden die Reaktion mit Melibiose bei -5°C wiederholt:

Volumen:	150 μ L
UDP-Glc, UDP-Gal:	100 mM
Melibiose:	300 mM
α -Galactosidase:	0,5 U/mL
50 mM Citrat-Phosphat Puffer pH 6,0	
Temperatur:	-5°C
Inkubationszeit:	22 Tage
HPLC © (Kap. 6.12.1.2)	

6.6.3 Optimierung der Enzymkonzentration

Um einer höhere Ausbeute an aktivierten Disacchariden durch Erhöhung der Enzymkonzentration zu erreichen wurde die α -Galactosidase durch Ultrafiltration (Microcon 10, Amicon, Witten) bei 4°C um das 12 fache aufkonzentriert und in folgenden Ansatz eingesetzt:

Volumen:	150 μ L
UDP-Glc:	100 mM
Melibiose:	300 mM
α -Galactosidase:	6 U/mL
50 mM Citrat/Phosphat Puffer pH 6,0	
Temperatur:	-5°C
Reaktionszeit:	22 Tage
HPLC © (Kap. 6.12.1.2)	

6.6.4 Optimierung der Donorsubstratkonzentration

Zur Optimierung der Donorsubstratkonzentration bei -5°C wurde Melibiose zwischen 100 und 500 mM variiert.

Volumen:	150 μL
UDP-Glc:	100 mM
Melibiose:	100, 300 500 mM
α -Galactosidase:	0,5 U/mL
50 mM Citrat/Phosphat Puffer pH 6,0	
Temperatur:	-5°C
Inkubationszeit:	15 Tage
HPLC © (Kap. 6.12.1.2)	

6.6.5 Akzeptorsubstratspektrum

Zur Bestimmung des Akzeptorsubstratspektrums dienten UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc, UDP-GlcA, UDP-Xyl, ADP-Glc, GDP-Glc, GDP-Man und CMP-Neu5Ac.

Volumen:	50 μL
NDP-Zucker:	100 mM
Melibiose:	500 mM
α -Galactosidase:	0,5 U/mL
50 mM Citrat/Phosphat Puffer pH 6,0	
Temperatur:	-5°C
Inkubationszeit:	21 Tage
HPLC © (Kap. 6.12.1.2)	

6.6.6 Präparative Synthese von Gal(α 1-X)Glc(α 1-UDP

Eine präparative Synthese des Gal(α 1-X)Glc-UDP wurde durchgeführt.

Volumen:	2 mL
UDP-Glc:	199 μmol (122 mg)
Melibiose:	251 μmol (86 mg)
α -Galactosidase:	1 U
50 mM Citrat/Phosphat Puffer pH 6,0	
Inkubationszeit:	21 Tage

6.6.6.1 Produktisolierung

Die Produkte konnten mittels Anionenaustauschchromatographie (Kap. 6.11.1), Ethanol-fällung (Kap. 6.11.2) und Gelfiltration (Kap. 6.11.3) isoliert werden. Die Charakterisierung der Produkte erfolgte mittels NMR und MS (Kap. 5).

6.6.7 Präparative Synthese von Gal(α 1-X)Gal(α 1-UDP)

Eine präparative Synthese des Gal(α 1-X)Gal-UDP wurde durchgeführt.

Volumen:	1,4 mL
UDP-Gal:	163 μ mol (100 mg)
Melibiose:	144 μ mol (86 mg)
α -Galactosidase:	0,4 U
50 mM Citrat-Phosphat Puffer pH 6,0	
Temperatur:	-5°C
Inkubationszeit:	21 Tage

6.6.7.1 Produktisolierung

Die Produkte konnten mittels Anionenaustauschchromatographie (Kap. 6.11.1), Ethanol-fällung (Kap. 6.11.2) und Gelfiltration (Kap. 6.11.3) isoliert werden. Die Charakterisierung der Produkte erfolgte mittels NMR und MS (Kap. 5).

6.7 α -D-Galactosidase aus grünen Kaffeebohnen

Für Übertragungsversuche mit α -D-Galactosidase aus grünen Kaffeebohnen wurde das Enzym der Firma Sigma (Deisenhofen) verwendet. Folgender Ansatz wurde gewählt:

Volumen:	100 μ L
UDP-Glc, UDP-GlcNAc, UDP-Gal:	100 mM
<i>p</i> NP- β -Gal:	200 mM
50 mM NaCitrat-Phosphat-Puffer pH 7,0	
Temperatur:	30°C; -5°C
HPLC ① (Kap. 6.12.1.1) und DC	

Dem Reaktionsansatz bei 30°C wurden über einen Zeitraum von 7 Stunden regelmäßig Proben entnommen. Dem Reaktionsansatz bei -5°C wurden über einen Zeitraum von 7 Tagen verteilt Proben entnommen.

6.8 ***β*-N-Acetylhexosaminidasen [EC 3.2.1.30]**

Vom Arbeitskreis von Prof. Dr. Kæn, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prag, wurden gereinigte *β*-N-Acetylhexosaminidasen aus *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus tamarai*, *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium oxalicum* und *Aspergillus oryzae* freundlicherweise für ein Screening zur Verfügung gestellt. Diese Enzyme wurden im Rahmen einer Diplomarbeit von Herrn Michael Kutzer untersucht.

Für die im Folgenden beschriebenen Aktivitätstests wurden die Reaktionen durch einen pH-Shift durch Zugabe von 950 μ L Glycin/NaOH-Puffer (250 mM pH 10,0) abgestoppt, 200 μ L der Probe wurden in eine Mikrotiterplatte pipettiert und die Extinktion des entstandenen Phenolats bei 405 nm gemessen (Kap. 6.10.3). Nach Quantifizierung anhand der Eichgeraden (**Abb. 111**) konnte die Volumenaktivität entsprechend der in Kap. 6.10.1 angegebenen Formel (**Formel 8**) berechnet werden.

6.8.1 **Optimierung der Reaktionsbedingungen**

Die geringe Löslichkeit der Donorsubstrate in wäßrigen Puffersystemen erwies sich als großes Problem bei den kinetisch kontrollierten Reaktionen. Die maximale Löslichkeit von *p*NP- β -GlcNAc bei Raumtemperatur beträgt 15 mM (Fluka-Katalog 1999/2000 und eigene Untersuchungen), während die von *p*NP- β -GalNAc nur 11 mM beträgt (eigene Untersuchungen).

6.8.1.1 **Löslichkeit von GlcNAc- β -*p*NP und GalNAc- β -*p*NP in organischen Lösungsmitteln**

Zur Erhöhung der Löslichkeit von *p*NP-Substraten wurden organische Lösungsmittel als Lösungsvermittler in glycosidasekatalysierten Reaktionen eingesetzt. Für die Reaktion mit den oben angegebenen *β*-N-Acetylhexosaminidasen, wurde die Löslichkeit von GlcNAc- β -*p*NP und GalNAc- β -*p*NP in 20% Aceton, 20% Acetonitril und 30% *tert.*-Butanol getestet.

Für weitere Tests wurde ein Lösungsmittelverhältnis von 30% tert.-Butanol gewählt, da das Lösungsmittel aufgrund seines Erstarrungspunktes, der bei ca. 20°C liegt, auch für Synthesen bei Tieftemperaturen geeignet ist. Durch einen Aktivitätstest wurde untersucht, ob die Enzyme unter diesen Bedingungen ihre hydrolytischen Aktivitäten behalten. Dazu wurde ein Teil der Enzymlösungen in 30% tert.-Butanol bei 30°C über einen Zeitraum von 1 Stunde inkubiert. Dem Ansatz wurden regelmäßig Proben entnommen und in einen Aktivitätstest (siehe Kap. 6.10.3) eingesetzt. Da eine Verminderung der Enzymaktivität innerhalb des untersuchten Zeitpunktes nicht beobachtet werden konnte, wurden die β -N-Acetylhexosaminidasen in Syntheseansätze bei 30°C und -5°C eingesetzt.

Volumen:	100 μ L
UDP-Gal, UDP-Glc, und UDP-GlcNAc:	100 mM
pNP-GlcNAc:	70 mM
tert.-Butanol:	40%
Puffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄ /NaOH pH 6,5
Temperatur:	30°C bzw. -5°C
HPLC © (Kap. 6.12.1.2)	

Die β -N-Acetylhexosaminidasen wurden mit jeweils folgenden volumenspezifischen Aktivitäten in den Reaktionsansätzen eingesetzt:

<i>Trichoderma harzianum</i> :	0,2 U/mL
<i>Aspergillus flavus</i> :	0,3 U/mL
<i>Aspergillus tamarii</i> :	0,4 U/mL
<i>Aspergillus flavipes</i> :	0,4 U/mL
<i>Aspergillus parasiticus</i> :	0,6 U/mL
<i>Penicillium oxalicum</i> :	0,3 U/mL
<i>Aspergillus oryzae</i> :	0,9 U/mL

Dem Ansatz bei 30°C wurden über einen Zeitraum von 1 Stunde regelmäßig Proben entnommen. Bei -5°C erfolgte die Inkubation über einen Zeitraum von 7 Tagen verteilt.

6.8.1.2 Löslichkeit von GlcNAc- β -pNP und GalNAc- β -pNP mit Cyclodextrinen als Löslichkeitsvermittlern

Alternativ wurde der Einsatz von Cyclodextrinen als Lösungsvermittler untersucht. Für Versuche standen β -Cyclodextrin, γ -Cyclodextrin, Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin und Heptakis(2,6-Di-O-Methyl)- β -Cyclodextrin²⁰ der Firma Sigma (Deisenhofen) zur Verfügung. Für Löslichkeitstests mit GlcNAc- β -pNP und GalNAc- β -pNP wurden jeweils 0, 50, 100 und 200 mM Lösungen der Cyclodextrine in einem 50 mM NaH₂PO₄/NaOH-Puffer pH 6,5 hergestellt. Definierte Mengen an GlcNAc- β -pNP und GalNAc- β -pNP wurden vorgelegt und jeweils eine der Cyclodextrinlösungen wurde langsam zugegeben, bis sich das gesamte Substrat gelöst hat.

6.8.1.3 Aktivität der β -N-Acetylhexosaminidasen in Heptakis(2,6-Di-O-Methyl)- β -Cyclodextrin²⁰-haltigen Lösungen

Der Einfluß von Dimethyl-Cyclodextrin auf die hydrolytische Aktivität der β -N-Acetylhexosaminidasen wurde untersucht. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen an GlcNAc- β -pNP (0,5, 14 und 90 mM) jeweils mit und ohne Zusatz von Dimethyl-Cyclodextrin in einen Aktivitätstest eingesetzt.

Volumen:	50 μ L
GlcNAc- β -pNP:	14 und 90 mM
Dimethyl-Cyclodextrin:	0 und 200 mM
50 mM Na ₂ HPO ₄ -Puffer pH 6,5	
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	10 min.

Die β -N-Acetylhexosaminidasen wurden mit jeweils folgenden volumenspezifischen Aktivitäten in den Reaktionsansätzen eingesetzt:

<i>Trichoderma harzianum</i> :	0,2 U/mL
<i>Aspergillus flavus</i> :	0,3 U/mL
<i>Aspergillus tamarii</i> :	0,4 U/mL
<i>Aspergillus flavipes</i> :	0,4 U/mL
<i>Aspergillus parasiticus</i> :	0,6 U/mL
<i>Penicillium oxalicum</i> :	0,3 U/mL
<i>Aspergillus oryzae</i> :	0,9 U/mL

²⁰ Heptakis(2,6-Di-O-Methyl)- β -Cyclodextrin wird im Folgenden als Dimethyl-Cyclodextrin abgekürzt.

6.8.1.4 Enzymstabilität

Die Stabilität der Enzyme in einem Zeitraum von 24 Stunden in dem gewählten Puffersystem wurde überprüft.

Volumen:	50 µL
Dimethyl-Cyclodextrin:	200 mM
50 mM Na ₂ HPO ₄ -Puffer pH 6,5	
Temperatur:	30°C

Die β -N-Acetylhexosaminidasen wurden mit folgenden volumenspezifischen Aktivitäten in dem Puffersystem bei 30°C inkubiert:

<i>Trichoderma harzianum</i> :	1,7 U/mL
<i>Aspergillus flavus</i> :	2,2 U/mL
<i>Aspergillus tamarii</i> :	2,6 U/mL
<i>Aspergillus flavipes</i> :	4,6 U/mL
<i>Aspergillus parasiticus</i> :	2,4 U/mL
<i>Penicillium oxalicum</i> :	2,7 U/mL
<i>Aspergillus oryzae</i> :	6,2 U/mL

Über einen Zeitraum von 24 Stunden wurden den Ansätzen regelmäßig Proben entnommen und die Aktivität des Enzyms bestimmt (Kap. 6.10.3).

6.8.2 Substratscreening

Um zu testen, ob in einer Transglycosylierungsreaktion mit den β -N-Acetylhexosaminidasen die Übertragung auf ein aktiviertes Akzeptorsubstrat möglich ist, wurden UDP-Glc, UDP-GlcNAc und UDP-Gal als Nucleotidzucker gewählt. Um eine möglichst hohe Donorsubstratkonzentration zu ermöglichen, wurden die Reaktionsansätze jeweils in einer 200 mM Dimethyl-Cyclodextrinlösung durchgeführt.

Volumen:	100 µL
UDP-Zucker:	100 mM
pNP- β -GlcNAc:	90 mM oder
pNP- β -GalNAc:	60 mM
Dimethyl-Cyclodextrin:	200 mM
50 mM Na ₂ HPO ₄ -Puffer pH 6,5	
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	8 Stunden
HPLC ① (Kap. 6.12.1.1)	

Die β -*N*-Acetylhexosaminidasen wurden jeweils mit folgender Volumenaktivität in den Reaktionsansätzen eingesetzt:

<i>Trichoderma harzianum</i> :	0,2 U/mL
<i>Aspergillus flavus</i> :	0,3 U/mL
<i>Aspergillus tamarii</i> :	0,2 U/mL
<i>Aspergillus flavipes</i> :	0,4 U/mL
<i>Aspergillus parasiticus</i> :	0,6 U/mL
<i>Penicillium oxalicum</i> :	0,3 U/mL
<i>Aspergillus oryzae</i> :	0,9 U/mL

6.8.3 **β -*N*-Acetylhexosaminidase aus *Trichoderma harzianum***

Da in ersten Tests mit der β -*N*-Acetylhexosaminidase aus *Trichoderma harzianum* die höchsten Ausbeuten an aktivierten Disacchariden detektiert werden konnten, wurde dieses Enzym zur weiteren Charakterisierung ausgewählt.

6.8.3.1 pH-Optimum

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurde bei pH-Werten zwischen 3 und 7,5 gemessen. Dazu wurde ein 50 mM Na₂HPO₄-Puffer auf den jeweiligen pH Wert eingestellt.

Volumen:	50 μ L
<i>p</i> NP- β -GalNAc:	10 mM
β - <i>N</i> -Acetylhexosaminidase:	0,7 U/mL
50 mM Na ₂ HPO ₄ -Puffer	pH 3 – 7,5
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	10 min.

6.8.3.2 Michaelis-Menten Kinetik

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter der β -*N*-Acetylhexosaminidase aus *T. harzianum* katalysierten Hydrolyse von *p*NP- β -GalNAc wurde das Substrat, jeweils mit und ohne Zusatz von 200 mM Dimethyl-Cyclodextrin, in Konzentrationen zwischen 0 und 50 mM variiert.

Volumen:	50 μ L
GalNAc- β - <i>p</i> NP:	0 – 50 mM
Dimethyl-Cyclodextrin:	0 und 200 mM
β - <i>N</i> -Acetylhexosaminidase:	0,2 U/mL
50 mM Na ₂ HPO ₄ -Puffer pH 5,0	
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	10 min.

Die Daten der Aktivitätsbestimmung wurden nach dem Modell der kompetitiven Inhibition angepaßt. Der K_M -Wert für *p*NP- β -GalNAc (3,44 mM) wurde aus der Michaelis -Menten Kinetik für dieses Substrat entnommen (Kap. 6.8.3.2).

6.8.3.3 Inhibition durch GalNAc

Da bei der Hydrolyse des Donorsubstrates (*p*NP- β -GalNAc) GalNAc freigesetzt wird, wurde der Effekt des freien Zuckers auf die Hydrolyseaktivität der β -*N*-Acetylhexosaminidase untersucht. Dabei wurden zwei Testansätze, mit und ohne Zusatz von 200 mM Cyclodextrin, durchgeführt.

Volumen:	50 μ L
GalNAc- β - <i>p</i> NP:	10 mM
GalNAc:	0 – 1,5 mM
β - <i>N</i> -Acetylhexosaminidase:	0,6 U/mL
50 mM Na ₂ HPO ₄ -Puffer pH 5,0	
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	10 min.

6.8.3.4 Erweiterung des Substratspektrums

Zur Erweiterung des Akzeptorsubstratspektrums wurden UDP-GalNAc, UDP-GlcA, CDP-Glc ADP-Glc, GDP-Man und CMP-Neu5Ac als Akzeptorsubstrate getestet.

Volumen:	50 μ L
NDP-Zucker:	100 mM
GalNAc- β -pNP:	60 mM
Dimethyl-Cyclodextrin:	200 mM
β -N-Acetylhexosaminidase:	0,6 U/mL
50 mM Na ₂ HPO ₄ -Puffer pH 6,5	
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	8 Stunden
HPLC ① (Kap. 6.12.1.1)	

6.8.4 Synthese von GalNAc(**b** 1-X)GlcNAc(**a** 1-UDP

Für eine Synthese von GalNAc(β 1-X)GlcNAc(α 1-UDP wurde die β -N-Acetylhexosaminidase aus *Trichoderma harzianum* ausgewählt, da mit diesem Enzym in den vorangegangenen Versuchen die höchsten Ausbeuten dedektiert werden konnten. Folgender optimierten Syntheseansatz wurde durchgeführt:

Volumen:	5 mL
UDP-GlcNAc:	0,5 mmol (326 mg)
pNP- β -GalNAc:	0,3 mmol (103 mg)
Dimethyl-Cyclodextrin:	200 mM
β -N-Acetylhexosaminidase:	3,2 U
50 mM Na ₂ HPO ₄ -Puffer pH 6,5	
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	8 Stunden
HPLC ① (Kap. 6.12.1.1)	

6.8.4.1 Produktisolierung

Die Nucleotidzucker konnten durch Anionenaustauschchromatographie, Ethanolfällung und Gelfiltration isoliert werden (Kap. 6.11). Die strukturelle Charakterisierung des aktivierten Disaccharides erfolgte mit NMR und MS.

6.9 Nucleotidaktivierte Disaccharide als Substrate und Inhibitoren für Glycosyltransferasen

6.9.1 GlcNAc-Transferasen der *N*-Glycan Biosynthese: Rekombinante GlcNAc-Transferase I aus Kaninchen und rekombinante humane GlcNAc-Transferase II

Die gereinigten GlcNAc-Transferasen I und II wurden von Prof. Dr. Harry Schachter (Department of Biochemistry Research, Hospital for Sick Children, Toronto, Canada) zur Verfügung gestellt. Die Versuche wurden in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Kamerling (Bijvoet Center, Department of Bio Organic Chemistry, Universität Utrecht) in Utrecht durchgeführt. Als Donorsubstrat wurde UDP-LacNAc eingesetzt. Folgende Oligosaccharide dienten als Akzeptorsubstrate:

I: Man(α 1-3)[Man(α 1-6]Man(β 1-O(CH₂)₇CH₃) für GlcNAc-TI

II: GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-3)[Man(α 1-6]Man(β 1-O(CH₂)₇CH₃) für GlcNAc-TII

III: Man₅GlcNAc für GlcNAc-TI

6.9.1.1 UDP-LacNAc als Donorsubstrat

Für Übertragungsversuche wurde folgender Ansatz gewählt:

Volumen:	250 μ L
Substrat I:	1,6 mM
UDP-LacNAc:	1 mM
BSA:	1 mg/mL
MnCl ₂ :	20 mM
NaCl:	100 mM
AMP:	10 mM
GlcNAc:	200 mM
Triton X-100:	0,1%
GlcNAc-T I:	1,6 mU
100 mM MES/NaOH-Puffer	pH 6,1
Temperatur:	37°C

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1,6 mU GlcNAc-T I gestartet und bei 37°C inkubiert. Da das Enzym bei 37°C leicht destabilisiert (Schachter, persönliche Mitteilung) wurden nach 60 und 120 min. Inkubationszeit dem Ansatz erneut jeweils 0,8 mU zugefügt. Nach insgesamt 5 Stunden Inkubationszeit wurde die Reaktion abgestoppt, indem das Enzym durch Ultrafiltration (Microcon 10, Amicon, Witten) aus dem Ansatz entfernt wurde.

Ein gleicher Ansatz wurde mit 1,4 mM Substrat III durchgeführt. Für Übertragungsversuche mit der GlcNAc-T II wurden 0,6 mM Substrat II eingesetzt. Hierbei wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 mU GlcNAc-T II gestartet, nach 60 und 120 min. wurden jeweils weitere 0,25 mU des Enzyms zugefügt. Die Reaktionsansätze wurde mittels HPLC ⑦ (Kap. 6.12.1.7) analysiert. Wegen der beschränkt zur Verfügung stehenden Akzeptorsubstrate konnten Inhibitionsstudien nicht durchgeführt werden.

6.9.2 GlcNAc-Transferasen der O-Glycan Biosynthese:

Rekombinante murine Core2 β 1-6GlcNAc-Transferase (Typ M) aus Maus

Die Core2-GlcNAc Transferase (GNT1) wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Berger (Physiologisches Institut, Universität Zürich) als Protein A-Fusionsprotein in löslicher Form in CHO-Zellen expremiert und mit Affinitätschromatographie an IgG-Sepharose gereinigt (Zeng 1997).

6.9.2.1 UDP-LacNAc als Donorsubstrat mit Core1-Bz als Akzeptor

Die rekombinante Core2 β 1-6GlcNAc-Transferase (GNT1) überträgt UDP-GlcNAc auf Core1 unter Bildung der Core2-Struktur. Als Akzeptorsubstrat wurde Gal(β 1-3)GalNAc(α 1-OCH₂Ph (Core1-Bz) gewählt, welches durch den Benzylrest leicht bei 205 nm detektiert werden kann. Um zu testen ob UDP-LacNAc als Donorsubstrat für die rekombinante Core2 β 1-6GlcNAc-Transferase dienen kann wurde folgender Ansatz gewählt:

Volumen:	50 μ L
UDP-LacNAc:	10 mM
Core1-Bz:	2 mM
MgCl ₂ :	10 mM
BSA:	0,1 mg/mL
NaN ₃ :	0,01%
GlcNAc T:	0,1 U/mL
50 mM MES/NaOH-Puffer pH 6,5	
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	6 Tage
HPLC ⑤ (Kap. 6.12.1.5)	

6.9.2.2 UDP-LacNAc als Donorsubstrat mit GalNAc(α 1-OCH₂Ph als Akzeptor

Da bei der Reaktion von UDP-LacNAc mit *Core*1-Bz kein Transferprodukt detektiert werden konnte, wurde GalNAc-Bz als sterisch weniger anspruchsvoller Akzeptor eingesetzt.

UDP-LacNAc:	20 mM
GalNAc-Bz:	20 mM
MgCl ₂ :	10 mM
BSA:	0,1 mg/mL
NaN ₃ :	0,01%
GlcNAcT:	0,5 U/mL
50 mM MES/NaOH-Puffer pH 6.5	
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	0, 2, 4 und 6 Tage
HPLC © (Kap. 6.12.1.5).	

Die entstandenen Produkte wurden durch semipräparative HPLC © (Kap. 6.12.1.5) isoliert und durch Gefriertrocknung vom Laufmittel der HPLC-Methode befreit. Die strukturelle Analyse der Produkte erfolgte mit NMR und MS.

6.9.2.3 Hydrolytische Nebenaktivität der *Core*2 β 1-6GlcNAc-Transferase

Bei dem Übertragungsversuch von UDP-LacNAc (Kap. 6.9.2.2) entstanden Produkte, die auf eine hydrolytische Nebenaktivität oder auch eine Verunreinigung der GlcNAc-Transferase schließen lassen. Um diese Vermutung zu unterstützen wurden genauere Untersuchungen auf die Anwesenheit einer β -Galactosidase-Aktivität durchgeführt.

Hydrolyse von *p*NP- β -Galactose

Zunächst wurde getestet, ob *p*NP- β -Galactose hydrolysiert wird.

Volumen:	100 μ L
<i>p</i> NP- β -Gal:	25 mM
MgCl ₂ :	10 mM
BSA:	0,1 mg/mL
NaN ₃ :	0,02%
GNT1:	0,2 U/mL
50 mM MES/NaOH-Puffer pH 6,5	
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	6 Tage

Parallel dazu wurde ein Ansatz ohne Enzym inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Hitze-denaturierung des Enzyms (5 min. bei 95°C) abgestoppt. Nach Zugabe von 900 µL 250 mM Glycin/NaOH-Puffer (pH 10,0) wurde das freigesetzte *p*-Nitrophenol anhand der Eichgeraden (**Abb. 111**) quantifiziert.

Hydrolyse von UDP-LacNAc

Es wurde getestet, ob UDP-LacNAc von der Nebenaktivität hydrolysiert werden kann.

Volumen:	50 µL
UDP-LacNAc:	20 mM
MgCl ₂ :	10 mM
BSA:	0,1 mg/mL
NaN ₃ :	0.02%
GlcNAc T:	0.9 U/mL
50 mM MES/NaOH-Puffer pH 6,5	
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	6 Tage

Parallel dazu wurde ein Ansatz ohne Enzym inkubiert. Entstandene Galactose wurde mit HPLC ⑥ (Kap. 6.12.1.6) nachgewiesen. Die Detektion erfolgte hierbei mittels eines Refraktometers, während entstandenes UDP-GlcNAc durch HPLC ② (Kap. 6.12.1.2) bei 254 nm nachgewiesen werden konnte.

6.9.2.4 UDP-LacNAc als Inhibitor

Mit Gal(β1-3)GalNAc(α1-OCH₂Ph (*Core1*-Bz) und UDP-GlcNAc als natürlichem Akzeptor- bzw. Donorsubstrat wurde die Inhibition der *Core2* GlcNAc-T durch UDP-LacNAc in einer kinetischen Analyse überprüft. Für Inhibitionsstudien mit Variation des Donorsubstrates wurde folgender Ansatz gewählt:

Volumen:	100 µL
<i>Core1</i> -Bz:	1 mM
UDP-GlcNAc:	1, 2 bzw. 5 mM
UDP-LacNAc:	0, 1, 2, 5, 7 und 10 mM
MgCl ₂ :	10 mM
GNT1:	0,2 U/mL
50 mM MES/NaOH-Puffer pH 6,5	
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	10 min.
HPLC ⑤ (Kap. 6.12.1.5)	

In parallelen Reaktionsansätzen wurde der Akzeptor (*Core1-Bz*) variiert:

Volumen:	100 µL
<i>Core1-Bz</i> :	0,5, 1 bzw. 2 mM
UDP-GlcNAc:	2 mM
UDP-LacNAc:	0, 1, 2, 5, 7 und 10 mM
MgCl ₂ :	10 mM
GlcNAc T:	0,2 U/mL
50 mM MES/NaOH-Puffer pH 6,5	
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	10 min.

Die Volumenaktivitäten der GNT1 bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen wurden anhand der HPLC ⑤-Daten berechnet (Kap. 6.12.1.5). Die Volumenaktivitäten wurden gegen die Substratkonzentrationen bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen aufgetragen. Die Inhibitionskonstante wurde mit Hilfe des Programmes "Scientist" (Micromath, Salt Lake City, USA) berechnet. Zunächst wurde der Datensatz mit Variation des Donorsubstrates UDP-GlcNAc betrachtet. Den Berechnungen wurde das Modell einer Doppelsubstratkinetik (**Formel 1**) mit kompetitiver Inhibition in Bezug auf das Donorsubstrat zugrundegelegt. Der K_M -Wert für *Core1-Bz* (0,23 mM) wurde für die Berechnungen Literaturdaten entnommen (Dudziak 1999).

$$V = V_{\max} \cdot \frac{c(\text{Core1} - \text{Bz})}{K_M^{\text{Core1-Bz}} + c(\text{Core1})} \cdot \frac{c(\text{UDP} - \text{GlcNAc})}{K_M^{\text{UDP-GlcNAc}} + c(\text{UDP} - \text{GlcNAc}) + K_M^{\text{UDP-GlcNAc}} \cdot \frac{c(\text{Inhibitor})}{K_I}}$$

Formel 2: Modell zur Berechnung einer Doppelsubstratkinetik mit kompetitiver Inhibition in Bezug auf das Donorsubstrat.

Für den zweiten Datensatz mit Variation des Akzeptorsubstrates (*Core1-Bz*) wurde zunächst auch die Formel für eine kompetitive Inhibition gewählt. Dieses Modell zur Berechnung der kinetischen Daten wurde aber nicht weiter verfolgt, da sich hohe Standardabweichungen ergaben. Darüberhinaus wies die Lineweaver-Burk Auftragung der Meßwerte und berechneten Daten auf eine nicht-kompetitive Inhibition hin.

Für die Anpassung des Datensatzes mit Variation von *Core1-Bz* wurde daher das Modell einer Doppelsubstratkinetik mit nicht-kompetitiver Inhibition bezüglich *Core1-Bz* (**Formel 3**) zugrunde gelegt. Der K_M -Wert für UDP-GlcNAc wurde aus der Berechnung der kompetitiven Inhibition entnommen.

$$V = V_{\max} \cdot \frac{c(\text{core1-Bz})}{\left(1 + \frac{C(\text{Inhibitor})}{K_I}\right) \cdot \left(K_M^{\text{Core1-Bz}} + c(\text{Core1-Bz})\right)} \cdot \frac{c(\text{UDP-GlcNAc})}{K_M^{\text{UDP-GlcNAc}} + c(\text{UDP-GlcNAc})}$$

Formel 3: Modell zur Berechnung einer Doppelsubstratkinetik mit nicht-kompetitiver Inhibition in Bezug auf das Akzeptorsubstrat.

6.9.2.5 GalNAc(β1-4)GlcNAc(α1-UDP, Gal(β1-4)Gal(β1-4)GlcNAc(α1-UDP und UMP als Inhibitoren

Die Inhibition der GlcNAc-Transferase durch die aktivierten Zucker GalNAc(β1-4)GlcNAc(α1-UDP und Gal(β1-4)Gal(β1-4)GlcNAc(α1-UDP wurde in einer kinetischen Analyse untersucht. Zusätzlich wurde die Inhibition durch UMP gemessen.

Volumen:	50 µL
<i>Core1-Bz</i> :	1 mM
UDP-GlcNAc:	2 mM
Inhibitor:	0, 1, 2, 5, 7, 10 und 20 mM
MgCl ₂ :	10 mM
GlcNAc T:	0,2 U/mL
50 mM MES/NaOH-Puffer pH 6,5	
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	10 min.
HPLC ©(Kap. 6.12.1.5)	

Die Volumenaktivitäten der GNT1 bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen wurden anhand der HPLC-Daten berechnet. Die Inhibitionskonstante wurde mit Hilfe des Programmes "Scientist" (Micromath, Salt Lake City, USA) berechnet. Den Berechnungen wurde das Modell einer Doppelsubstratkinetik mit kompetitiver Inhibition bezüglich des Donorsubstrates zugrunde gelegt (**Formel 2**).

6.9.3 Rekombinante Saccharose Synthase 1 aus Kartoffel

Die rekombinante Saccharose Synthase 1 (SuSy1) wird im Arbeitskreis Elling zur Synthese von Saccharose-Analoga genutzt. Als natürliche Substrate dienen *in vitro* UDP-Glucose und D-Fructose.

6.9.3.1 UDP-Lac als Donorsubstrat

Mit UDP-Lactose als Donorsubstrat wurde geprüft, ob ein „*en bloc*“-Transfer auf D-Fructose möglich ist.

Volumen:	100 µL
D-Fructose:	10 mM
UDP-Lac:	10 mM
SuSy1:	1 U/mL
alk. Phosphatase:	1 U/mL
200 mM HEPES/NaOH-Puffer	pH 8,0
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	7 Tage
HPLC ©	(Kap. 6.12.1.6)

6.9.3.2 UDP-Lac als Donor mit kleinerem Akzeptorsubstrat

Das Akzeptorsubstratspektrum der rekombinanten Saccharose Synthase 1 aus Kartoffel wurde im Arbeitskreis Elling eingehend untersucht. Nicht nur D-Fructose wird von dem Enzym akzeptiert, sondern auch sterisch weniger anspruchsvolle Substrate. Mit UDP-Lactose als Donorsubstrat wurden jeweils D-Lyxose, D-Ribose und D-Desoxyribose als Akzeptoren getestet.

Akzeptor:	100 mM
UDP-Lac:	10 mM
SuSy:	1 U/mL
alk. Phosphatase:	1 U/mL
NaN ₃ :	0,01%
200 mM HEPES/NaOH	pH 8,0
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	7 Tage
HPLC ① und ②	(Kap. 6.12.1.6)

6.9.3.3 UDP-Lac als Inhibitor

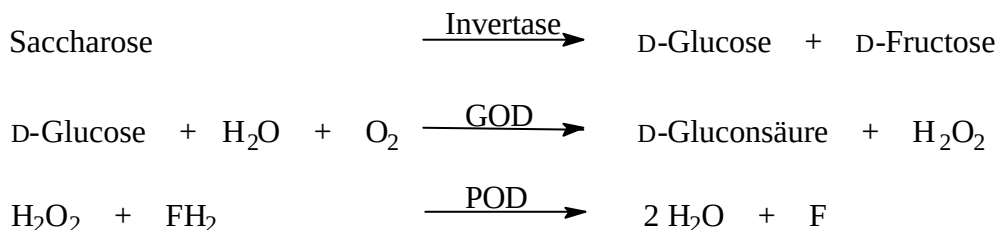
Der Einfluß von UDP-Lactose auf die Saccharose Synthase-Reaktion wurde in einer kinetischen Studie überprüft.

Volumen:	100µL
UDP-Glc:	0,5 mM
D-Fructose	2 mM
UDP-Lac:	0, 1, 2, 5, 7, 10 und 20 mM
SuSy:	10 mU/mL
50 mM HEPES/NaOH-Puffer pH 8,0	
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	5 min.

Die Reaktion wurde durch Hitzedenaturierung des Proteins (5min. bei 95°C) abgestoppt. Die Inhibition wurde anhand der gebildeten Saccharose im Photometer gemessen. Dazu wurde folgender Test eingesetzt:

Invertasetest

Das Enzym Invertase spaltet Saccharose zu Glucose und Fructose. Die aus der Invertasereaktion entstandene Glucose kann mit einer Farbreaktion bei 405 nm photometrisch nachgewiesen werden (Bergmeyer und Bernt 1974).



mit F = Farbreagenz (2.2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonat = ABTS)

GOD = Glucoseoxidase

POD = Peroxidase

Für den Testansatz wurden je 20 µL der Reaktionsansätze 1:5 mit Na₂HPO₄/NaH₂PO₄-Puffer (0,2 M, pH 5,0) verdünnt und mit 20 U/mL Invertase insgesamt 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden jeweils 100 µL Glucose-Reagenz, bestehend aus 0,2 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄-Puffer (pH 6,5), 3 U/mL POD, 18 U/mL GOD und 1 mg/mL ABTS[®] zugefügt und weitere 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Testlösungen wurden direkt in Mikrotiterplatten pipettiert und die Extinktion bei 405 nm in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Molecular Devices, Menlo Park, Ca, USA) gemessen. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen der Meßwerte durchgeführt.

Die Erstellung einer Eichgeraden (**Abb. 110**) zur Quantifizierung der gebildeten Saccharose erfolgte parallel zu den Inhibitionsansätzen. Es wurden Saccharosekonzentrationen zwischen 0 und 0,05 mM eingesetzt.

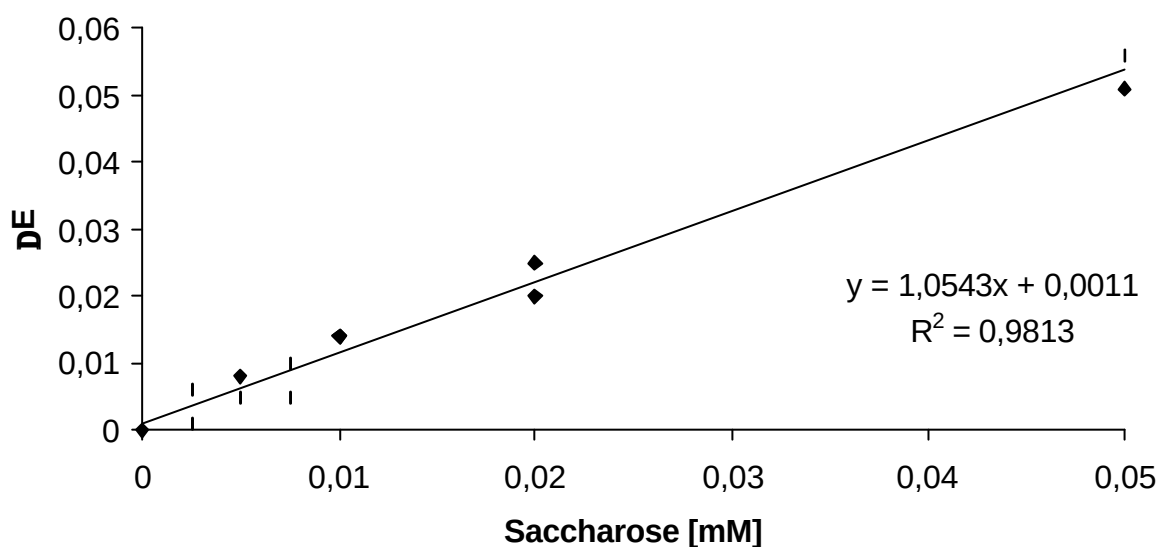


Abb. 110: Eichgerade zur Bestimmung der Saccharosekonzentration.

Die bei der Saccharose-Synthase Reaktion gebildete Saccharose konnte anhand der Eichgerade (**Abb. 110**) quantifiziert werden. Mit Hilfe folgender Formeln (**Formel 4**) konnten damit die Enzymaktivitäten berechnet werden:

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\text{Saccharosekonzentration [mM]}}{\text{Reaktionszeit [min]}} \cdot \text{Verdünnungsfaktor } F$$

$$\frac{U}{\text{mg}} = \frac{\text{Volumenaktivität } \left[\frac{U}{\text{mL}} \right]}{\text{Proteinkonzentration } \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right]}$$

Formel 4: Formel zur Berechnung der Enzymaktivitäten.

Die spezifischen Aktivitäten wurden gegen die Inhibitorkonzentrationen aufgetragen und die Inhibitionskonstanten konnten mit Hilfe des Programmes „Scientist“ (Micromath, Salt Lake City, USA) berechnet werden. Den Berechnungen wurde das Modell einer Doppelsubstratkinetik mit kompetitiver Inhibition bezüglich des Donorsubstrates (**Formel 5**) zugrunde gelegt. Die K_M -Werte ($K_{M(\text{UDP-Glc})} = 0,46 \text{ mM}$; $K_{M(\text{Fru})} = 2,05 \text{ mM}$) wurden für die Berechnung aus Literaturdaten entnommen (Römer unveröffentlichte Ergebnisse).

$$V = V_{\max} \cdot \frac{c(\text{Fructose})}{K_M^{\text{Fructose}} + c(\text{Fructose})} \cdot \frac{c(\text{UDP-Glc})}{K_M^{\text{UDP-Glc}} + c(\text{UDP-Glc}) + K_M^{\text{UDP-Glc}} \cdot \frac{c(\text{Inhibitor})}{K_I}}$$

Formel 5: Modell zur Berechnung einer Doppelsubstratkinetik mit kompetitiver Inhibition bezüglich der Donorsubstrates.

6.9.3.4 Gal(β1-4)Gal(β1-4)Glc(α1-UDP als Inhibitor

Der Einfluß von Gal(β1-4)Gal(β1-4)Glc(α1-UDP auf die Saccharose Synthase-Reaktion wurde überprüft.

Volumen:	100µL
UDP-Glc:	0,5 mM
D-Fructose:	2 mM
Inhibitor:	0, 1, 2, 5, 7, 10 und 20 mM
SuSy:	10 mU/mL
50 mM HEPES/NaOH-Puffer pH 8,0	
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	5 min.

Die Proben wurden im Folgenden wie in Kap 6.9.3.3 für die Inhibition mit UDP-Lac beschrieben behandelt.

6.9.4 Rekombinate humane β 1-4Galactosyltransferase 1

Die rekombinate humane β 1-4-Galactosyltransferase 1 (β 4GalT 1) wurde im Arbeitskreis Elling in *E. coli* als lösliches Enzym expremiert und aufgereinigt. Als natürliche Substrate dienen *in vitro* UDP-Galactose und Chitobiose. Alternativ kann als Akzeptorsubstrat auch GlcNAc eingesetzt werden.

6.9.4.1 Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP als Donorsubstrat

Es wurde getestet, ob das Disaccharid Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP als Donorsubstrat für die rekombinate humane β 4GalT 1 dienen kann. Als Akzeptorsubstrate wurden jeweils Chitobiose und GlcNAc gewählt:

Volumen:	50 μ L
GlcNAc:	25 mM oder
Chitobiose:	5 mM
Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP:	20 mM
MnCl ₂ :	1 mM
alk. Phosphatase:	1 U/mL
β 4GalT 1:	80 mU/mL
NaN ₃ :	0,01%
100 mM HEPES/NaOH-Puffer pH 8,0	
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	7 Tage
HPLC ④ (Kap. 6.12.1.4)	

6.9.4.2 Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP als Inhibitor

In einem weiteren Test wurde Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP als Inhibitor für die rekombinate humane β 4GalT 1 eingesetzt. Als Akzeptorsubstrat wurde Chitobiose verwendet. Für Inhibitionsstudien mit Variation des Donorsubstrates wurde folgender Ansatz gewählt:

Volumen:	50 μ L
UDP-Gal:	1, 1,5 und 3 mM
Chitobiose:	5 mM
Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP:	0, 1, 5 und 10 mM
MnCl ₂ :	1 mM
β 4GalT1:	80 mU/mL
100 mM HEPES/NaOH-Puffer pH 8,0	
Temperatur:	37°C
Inkubationszeit:	10 min.
HPLC ④ (Kap. 6.12.1.4)	

Für Inhibitionsstudien mit Variation des Akzeptorsubstrates wurde folgender Ansatz gewählt:

Volumen:	50 μ L
UDP-Gal:	16 mM
Chitobiose:	2, 3 und 5 mM
Gal(β 1-4)Gal(α 1-UDP:	0, 1, 5 und 10 mM
MnCl ₂ :	1 mM
β 4GalT1:	80 mU/mL
100 mM HEPES/NaOH-Puffer pH 8,0	
Temperatur:	37°C
Inkubationszeit:	10 min.
HPLC ④ (Kap. 6.12.1.4)	

6.9.4.3 Gal(α 1-3)Gal(α 1-UDP als Inhibitor

Gal(α 1-3)Gal(α 1-UDP wurde als Inhibitor für die β 4GalT1 getestet

Volumen:	50 μ L
UDP-Gal:	16 mM
Chitobiose:	2, 3 und 5 mM
Gal(α 1-3)Gal(α 1-UDP:	0, 1, 5, 7 und 10 mM
MnCl ₂ :	1 mM
β 4GalT1:	80 mU/mL
100 mM HEPES/NaOH-Puffer pH 8,0	
Temperatur:	37°C
HPLC ④ (Kap. 6.12.1.4)	

6.9.5 Rekombinante α 1-3-Galactosyltransferase aus Maus

Die rekombinante α 1-3-Galactosyltransferase aus Maus wurde freundlicherweise von Dr. Wohlgemuth (Fa. Fluka) zur Verfügung gestellt. Die Proteinkonzentration der Enzymsuspension wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Als natürliche Substrate dienen *in vitro* UDP-Gal und Gal(β 1-4)GlcNAc (LacNAc). Zunächst wurden in einer kinetischen Analyse die K_M -Werte für die beiden Substrate bestimmt. Die Enzymkonzentration wurde so gewählt, daß die Umsätze zwischen 5 und 10 % lagen.

Volumen:	50 μ L
UDP-Gal:	5 mM
LacNAc:	2, 5, 7, 10, 20 und 30 mM
MnCl ₂ :	1 mM
80 mM Cacodylat/HCl-Puffer pH 6,0	
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	10 min.
HPLC $\oplus$ (Kap. 6.12.1.4)	

Für die Bestimmung des K_M -Wertes für UDP-Gal wurden folgende Ansätze gewählt:

Volumen:	50 μ L
UDP-Gal:	1, 2, 5, 10, 20 und 30 mM
LacNAc:	10 mM
MnCl ₂ :	1 mM
80 mM Cacodylat/HCl-Puffer pH 6,0	
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	10 min.
HPLC $\oplus$ (Kap. 6.12.1.4)	

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte mit Hilfe der HPLC-Daten unter der Annahme, daß die Adsorption von Produkt und Akzeptorsubstrat gleich ist. Der Umsatz (U) läßt sich somit anhand der relativen Peakflächen (A) berechnen:

$$U = \frac{A(\text{Pr odukt})}{A(\text{Pr odukt}) + A(\text{Akzeptor})}$$

Die volumenspezifische Enzymaktivität A_v lässt sich mit dem Umsatz U anhand folgender Formel berechnen:

$$A_v = \frac{U \cdot C_{(Akzeptor)} [mM]}{\text{Inkubationszeit [min]}} \cdot \frac{V_{\text{Assaylösung}}}{V_{\text{Enzymlösung}}} = \left[\frac{U}{mL} \right]$$

Formel 6: Formel zur Berechnung der Enzymaktivität.

Die kinetischen Daten wurden aus den Ergebnissen der HPLC-Analyse mit Hilfe des Programmes „Scientist“ (Micromath, Salt Lake City, USA) berechnet. Den Berechnungen wurde das Modell der Michaelis-Menten Kinetik zugrunde gelegt.

$$V = V_{\max} \cdot \frac{S}{K_M + S}$$

S = Substratkonzentration [mM]

K_M = Michaeliskonstante [mM]

$V_{\max}$ = maximale Reaktionsgeschw. [U/mg]

Formel 7: Michaelis-Menten Gleichung.

6.9.5.1 Gal(β1-4)Gal(α1-UDP als Inhibitor

Für Inhibitionsstudien mit Gal(β1-4)Gal(α1-UDP wurde folgender Ansatz gewählt:

Volumen:	50 µL
UDP-Gal:	3 mM
LacNAc:	1 mM
Gal(β1-4)Gal(α1-UDP:	0, 1, 2, 5, 7 und 10 mM
MnCl ₂ :	1 mM
80 mM Cacodylat/HCl-Puffer	pH 6,0
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	10 min.
HPLC ④ (Kap. 6.12.1.4)	

6.9.5.2 Gal(α 1-3)Gal(α 1-UDP als Inhibitor

Gal(α 1-3)Gal(α 1-UDP wurde als Inhibitor für die α 1,3GalT eingesetzt.

Volumen:	50 μ L
UDP-Gal:	3 mM
LacNAc:	1 mM
Gal(α 1-3)Gal(α 1-UDP:	0, 1, 2, 5, 7 und 10 mM
MnCl ₂ :	1 mM
80 mM Cacodylat/HCl-Puffer pH 6,0	
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	10 min.
HPLC ④ (Kap. 6.12.1.4)	

6.10 Enzymtests

Die Aktivitäten der Glycosidasen können im allgemeinen durch eine Farbreaktion bestimmt werden. Das bei der Hydrolyse der entsprechenden *p*NP-Glycoside freigesetzte *p*-Nitrophenol kann bei 405 nm bei pH 10 als gelbes Phenolat anhand einer Eichgeraden quantifiziert werden. Zur Erstellung der Eichgeraden (**Abb. 111**) wurden definierte Mengen an *p*-Nitrophenol in 250 mM Glycin/NaOH-Puffer pH 10 gelöst. Je 200 μ L dieser Lösungen wurden in Mikrotiterplatten pipettiert und die Extinktion bei 405 nm in einem Mikrotiterplattenlesegerät der Firma MWG Biotech gemessen.

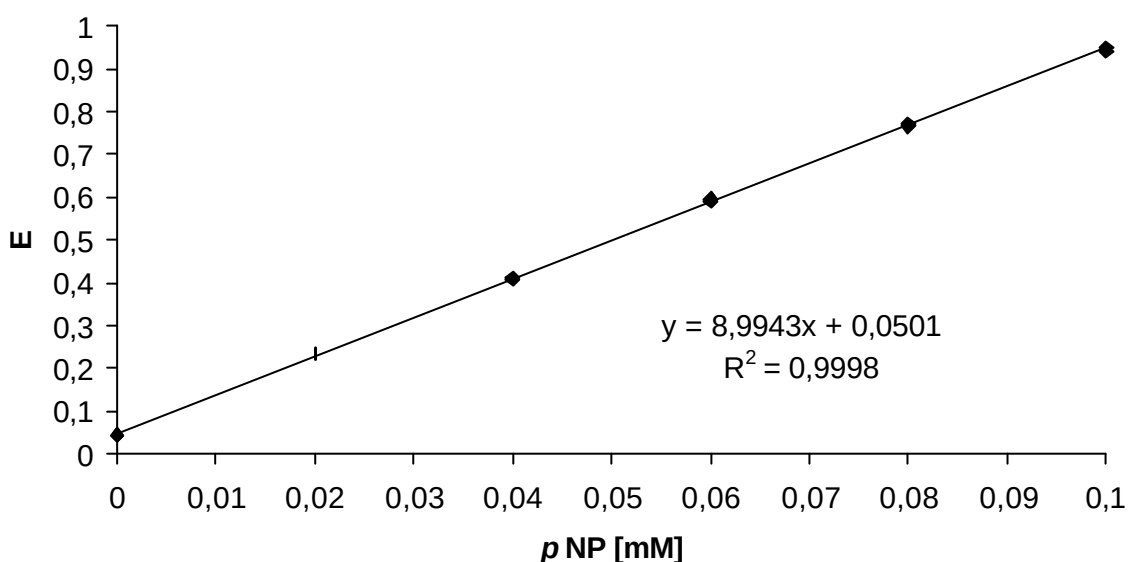


Abb. 111: Eichgerade *p*-Nitrophenol (250 mM Glycin/NaOH-Puffer pH 10,0).

6.10.1 β -D-Galactosidase aus Stierhoden (Eigenisolat)

Testbedingungen:

Volumen:	100 μ L
<i>p</i> NP- β -D-Galactose:	5 mM
β -Galactosidase:	30 mg/mL
50 mM Citrat/Phosphat-Puffer	pH 4,3
Temperatur:	30°C

Die Inkubationszeiten wurden so gewählt, daß die Umsätze in einem Bereich von 2-5% lagen. Die Reaktion wurde durch einen pH-Shift durch Zugabe von 900 µL Glycin/NaOH-Puffer (250 mM pH 10,0) abgestoppt, 200 µL der Probe wurden in eine Mikrotiterplatte pipettiert und die Extinktion des entstandenen Phenolats bei 405 nm gemessen. Nach Quantifizierung anhand der Eichgeraden (**Abb. 111**) konnte die Volumenaktivität mit folgender Formel (**Formel 8**) berechnet werden:

$$Av = \frac{C_{pNP} [mM]}{Inkubationszeit [min]} \cdot \frac{V_{Assaylösung} [mL]}{V_{Enzymlösung} [mL]} = \left[\frac{mmol}{min \cdot mL} \right] = \left[\frac{U}{mL} \right]$$

Formel 8: Formel zur Berechnung der Volumenaktivität.

Ein U entspricht dabei der Enzymmenge, die die Freisetzung von 1 µmol pNP pro Minute bei 30°C und dem jeweiligen pH-Wert katalysiert.

Die spezifische Aktivität der β-Galactosidase ergibt sich durch die Bildung des Quotienten aus der Volumenaktivität [U/mL] und der eingesetzten Proteinmenge [mg/mL] (**Formel 9**):

$$As = \frac{Volumenaktivität [U / mL]}{Proteinmenge [mg / mL]} = \left[\frac{U}{mg} \right]$$

Formel 9: Formel zur Berechnung der spezifischen Aktivität.

Unter den angegebenen Bedingungen ergaben sich damit für die β-Galactosidase aus Stierhoden (Eigenisolat) eine spezifische Aktivität von **11 mU/mg**.

6.10.2 **α -D-Galactosidase**

Zur Bestimmung der Aktivität der α -Galactosidase wurde die Hydrolyse von *p*NP- α -D-Galactose beobachtet:

Volumen:	100 μ L
<i>p</i> NP- α -D-Galactose:	5 mM
50 mM Citrat/Phosphat-Puffer pH 6,0	
Temperatur:	30°C

Die Inkubationszeiten wurden so gewählt, daß die Umsätze in einem Bereich von 2-5% lagen. Die Reaktion wurde durch einen pH-Shift durch Zugabe von 900 μ L Glycin/NaOH-Puffer (250 mM pH 10,0) abgestoppt, 200 μ L der Probe wurden in eine Mikrotiterplatte pipettiert und die Extinktion des entstandenen Phenolats bei 405 nm gemessen. Nach Quantifizierung anhand der Eichgeraden (**Abb. 111**) konnte die Volumenaktivität, wie in Kap. 6.10.1 beschrieben, bestimmt werden.

6.10.3 **β -D-N-Acetylhexosaminidasen**

Zur Bestimmung der Aktivität der β -N-Acetylhexosaminidasen wurde die Hydrolyse von *p*NP- β -D-GlcNAc beobachtet:

Volumen:	50 μ L
<i>p</i> NP- β -D-GlcNAc:	45 mM
Dimethyl-Cyclodextrin:	200 mM
50 mM Na ₂ HPO ₄ /NaOH-Puffer pH 6,5	
Temperatur:	30°C

Die Inkubationszeiten wurden so gewählt, daß die Umsätze in einem Bereich von 2-5% lagen. Die Reaktion wurde durch einen pH-Shift durch Zugabe von 900 μ L Glycin/NaOH-Puffer (250 mM pH 10,0) abgestoppt, 200 μ L der Probe wurden in eine Mikrotiterplatte pipettiert und die Extinktion des entstandenen Phenolats bei 405 nm gemessen. Nach Quantifizierung anhand der Eichgeraden (**Abb. 111**) konnte die Volumenaktivität, wie in Kap. 6.10.1 beschrieben, bestimmt werden.

6.10.4 α2,3-O-Sialyltransferase

Zur Bestimmung der α2,3-O-Sialyltransferase-Aktivität wurde die Übertragung von Neu5Ac auf Core1-Bz gemessen:

Volumen:	100 µL
Core1-Bz:	1 mM
CMP-Neu5Ac:	1 mM
50 mM MES/NaOH-Puffer pH 6,5	
Temperatur:	37°C

Die Reaktion wurde durch 5 minütiges abkochen bei 95°C abgestoppt. Die Reaktionszeiten wurden so gewählt, daß die Umsätze um 5% lagen. Substrat und Produkt wurden mittels HPLC ⑤ (Kap. 6.12.1.5) bei 205 nm detektiert. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte unter der Annahme, daß die Adsorption von Produkt und Akzeptorsubstrat gleich ist. Der Umsatz (U) läßt sich somit anhand der relativen Peakflächen (A) berechnen (**Formel 10**):

$$U = \frac{A(\text{Pr odukt})}{A(\text{Pr odukt}) + A(\text{Akzeptor})}$$

Formel 10: Formel zur Berechnung des Umsatzes anhand der HPLC-Daten.

Die volumenspezifische Enzymaktivität A_v läßt sich damit mit folgender Formel berechnen:

$$A_v = \frac{U \cdot C_{(\text{Akzeptor})} [\text{mM}]}{\text{Inkubationszeit} [\text{min}]} \cdot \frac{V_{\text{Assaylösung}}}{V_{\text{Enzymlösung}}} = \left[\frac{U}{\text{mL}} \right]$$

Formel 11: Formel zur Berechnung der Volumenaktivität.

6.10.5 Rekombinante murine Core2 β 1-6GlcNAc-Transferase aus Maus

Zur Bestimmung der Enzymaktivität der Core2 GlcNAc-Transferase wurde die Bildung von Core2-Bz beobachtet.

Volumen:	100 μ L
Core1-Bz:	1 mM
UDP-GlcNAc:	2 mM
MgCl ₂ :	10 mM
50 mM MES/NaOH-Puffer pH 6,5	
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	10 min.

Die Reaktion wurde durch 5 minütiges Abkochen bei 95°C abgestoppt. Die Reaktionszeiten wurden so gewählt, daß die Umsätze um 5% lagen. Substrat und Produkt wurden mittels HPLC ⑤ (Kap. 6.12.1.5) bei 205 nm detektiert. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte wie in Kap. 6.10.4 unter der Annahme, daß die Adsorption von Produkt und Akzeptorsubstrat gleich ist. Der Umsatz (U) (**Formel 10**) und daraus die Volumenaktivität (**Formel 11**) lassen sich somit anhand der relativen Peakflächen (A) berechnen.

6.10.6 Rekombinante Saccharose Synthase 1 aus Kartoffel

Zur Bestimmung der Aktivität der rekombinanten SuSy 1 aus Kartoffel wurde die Reaktion zu UDP-Glc betrachtet. Folgender Ansatz wurde gewählt:

Volumen:	1000 μ L
Saccharose:	500 mM
UDP:	2 mM
200 mM HEPES/NaOH Puffer pH 7,6	
Temperatur:	30°C
Inkubationszeit:	10 min.

Die Reaktion wurde 5 min bei 95°C abgestoppt. Die gebildete UDP-Glucose wurde anhand einer Eichgeraden (**Abb. 112**) quantifiziert (HPLC ②, Kap. 6.12.1.2).

Die volumenspezifische Aktivität wurde dann mit $\frac{U}{mL} = \frac{C_{UDP-Glc} [mM]}{t [min]} \cdot F$ berechnet.

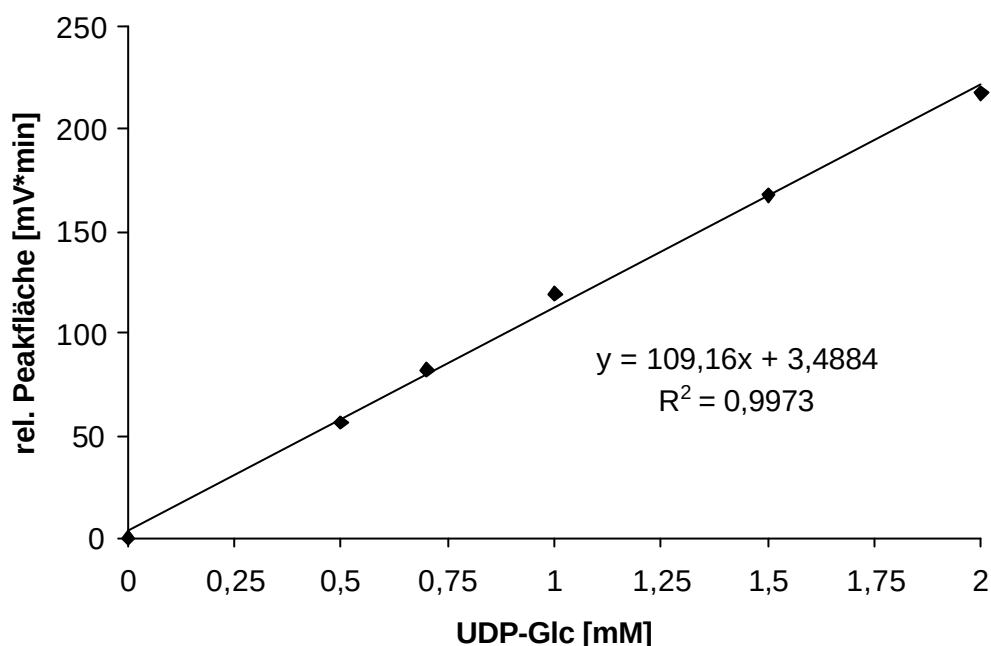


Abb. 112: Eichgerade zur Bestimmung der UDP-Glc Konzentration mit HPLC ②.

6.10.7 Rekombinante humane **β**1-4-Galactosyltransferase 1

Zur Bestimmung der Aktivität wurde folgender Ansatz gewählt:

Volumen:	100 µL
UDP-Gal:	2,5 mM
GlcNAc:	25 mM
MnCl ₂ :	1 mM
100 mM HEPES/NaOH-Puffer pH 8,0	
Temperatur:	37°C
Inkubationszeit:	10 min.

Die Reaktion wurde durch 5 minütiges Abkochen bei 95°C abgestoppt. Die Reaktionszeiten wurden so gewählt, daß die Umsätze um 5% lagen. Substrat und Produkt wurden mittels HPLC ⑤ (Kap. 6.12.1.5) bei 205 nm detektiert.

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte wie in Kap. 6.10.4 unter der Annahme, daß die Adsorption von Produkt und Akzeptorsubstrat gleich ist. Der Umsatz (U) (**Formel 10**) und daraus die Volumenaktivität (**Formel 11**) lassen sich somit anhand der relativen Peakflächen (A) berechnen.

6.10.8 Rekombinante α 1-3Galactosyltransferase aus Maus

Für Aktivitätstests wurde folgender Ansatz gewählt:

Volumen:	100 μ L
UDP-Gal:	5 mM
LacNAc:	2 mM
80 mM Na Cacodylat/HCl-Puffer pH 6,0	
Temperatur:	30°C

Die Reaktion wurde durch 5 minütiges abkochen bei 95°C abgestoppt. Die Reaktionszeiten wurden so gewählt, daß die Umsätze um 5% lagen. Substrat und Produkt wurden mittels HPLC ④ (Kap. 6.12.1.4) bei 205 nm detektiert. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte wie in Kap. 6.10.4 unter der Annahme, daß die Adsorption von Produkt und Akzeptorsubstrat gleich ist. Der Umsatz (U) (**Formel 10**) und daraus die Volumenaktivität (**Formel 11**) lassen sich somit anhand der relativen Peakflächen (A) berechnen.

6.11 Produktisolierung

6.11.1 Anionenaustauschchromatographie

Die Anlage zur Durchführung der präparativen Anionenaustauschchromatographie bestand aus einer Säule (XK 26-30) von Pharmacia, Freiburg (Innendurchmesser 2,6 cm, Betthöhe 16,5 cm) mit 87,6 mL Sepharose Q FF (Pharmacia), einer P-1 Pumpe (Pharmacia), einem UV-Detektor (UV-1) mit einer S-2 UV-Durchflußzelle (254 nm), einem Fraktionssammler und einem Schreiber. Die Säule wurde durchgehend mit einem Fluß von 4 mL/min (lineare Flußrate: 0,75 cm/min.) betrieben.

Zunächst wurde die Säule mit dem dreifachen Säulenvolumen (260 mL) entionisierten Wasser (mit HCl auf pH 2 eingestellt) equilibriert. Nach dem Auftragen der Probe wurden die ungeladenen Bestandteile der Reaktionslösung durch Waschen mit dem 3fachen Säulenvolumen entionisierten Wasser (pH 2) entfernt. Die Elution der Nucleotidzucker erfolgte mit einer 0,4 M NaCl-Lösung (pH 2). Die Fraktionen mit Nucleotidzuckern wurden vereinigt und die Lösung mit NaOH auf pH 7 eingestellt.

Zur Regeneration wurde die Säule mit dem dreifachen Säulenvolumen (260 mL) 1 M NaCl-Lösung und anschließend mit dem dreifachen Säulenvolumen entionisierten Wasser gewaschen. Die Säule wurde daraufhin in 20%iger Etahnollösung bei 4°C gelagert.

6.11.2 Ethanolfällung

Der Pool der Anionenaustauschchromatographie wird im Ölpumpenvakuum (5-20 mbar) bei 30°C eingeeengt bis das NaCl der Lösung ausfällt. Durch vorsichtige Zugabe von Wasser wird das Salz wieder in Lösung gebracht. Bei Zugabe von dem gleichen Volumen an Ethanol (bei Raumtemperatur) fällt ein Teil des Salzes im Ansatz aus und kann durch Zentrifugation entfernt werden. Das Ethanol kann nun im Ölpumpenvakuum entfernt werden. Die Ethanolfällung wird pro Ansatz zweimal durchgeführt.

6.11.3 Gelfiltration

Die Anlage zur Durchführung der präparativen Gelfiltration bestand aus einer Säule von Pharmacia, Freiburg (XK 16-100; Innendurchmesser 1,6 cm, Betthöhe 84 cm) mit 169 mL Biogel P2 extra fine Material von Biorad (München), einer Pumpe P-1 von Pharmacia, einem UV-Detektor (UV-1) mit einer S-2 UV-Durchflußzelle (254 nm), einem Fraktionssammler und einem Schreiber. Die Säule wurde durchgehend mit einem Fluß von 0,1 mL/min (lineare Flußrate: 0,04 cm/min) betrieben. Die Elution der nucleotidaktivierten Zucker erfolgte mit entionisiertem entgastem Wasser. Es wurden Fraktionen von 0,5 mL gesammelt. Die Auftrennung des Reaktionsgemisches wurde mittels Dünnschichtchromatographie (Kap. 6.12.3) und HPLC ① oder ② (Kap. 6.12.1.1 und 6.12.1.2) verfolgt. Fraktionen mit gereinigtem Produkt wurden vereinigt und lyophilisiert. Randfraktionen mit Produktanteil wurden nach dem Lyophilisieren in wenig 0,1 M NaCl-Lösung gelöst und erneut auf die Säule aufgetragen.

6.12 Analytik

6.12.1 HPLC-Methoden zur Trennung von Nucleotiden, Nucleotidzuckern und Nucleotidoligosacchariden

6.12.1.1 HPLC ①

Diese Methode ist eine Ionenpaar-*reversed-phase* HPLC. Nach Elling und Kula (1993) ermöglicht diese HPLC-Methode die Trennung von Nucleosiden, deren Monophosphaten und den aktivierten Glucosen durch Ionenpaarchromatographie. Desweiteren kann diese Methode auch zur Trennung von Oligosacchariden eingesetzt werden. Besonders geeignet ist diese Methode zur Trennung der Reaktionsansätze der β -Galactosidase aus *B. circulans* mit UDP-Glc und UDP-GlcNAc (**Abb. 113**) als Akzeptorsubstraten. Mit UDP-Gal und UDP-GalNAc als Akzeptoren konnte keine Trennung der Reaktionsprodukte erreicht werden. Darüber hinaus konnten die Reaktionsprodukte der β -*N*-Acetylhexosaminidasen getrennt werden. Eine Trennung von Regioisomere konnte nicht beobachtet werden.

Säule:	ODS-Hypersil C18 100-5 (4,6 x 250 mM) Macherey&Nagel, Düren, Deutschland
Laufmittel:	0,1 M Kaliumacetat 5% (v/v) Methanol 0,013 % n-Octylamin pH 6,5 (Essigsäure)
Elution:	isokratisch
Temperatur:	RT
Fluß:	1 mL/min
Detektion:	254 nm

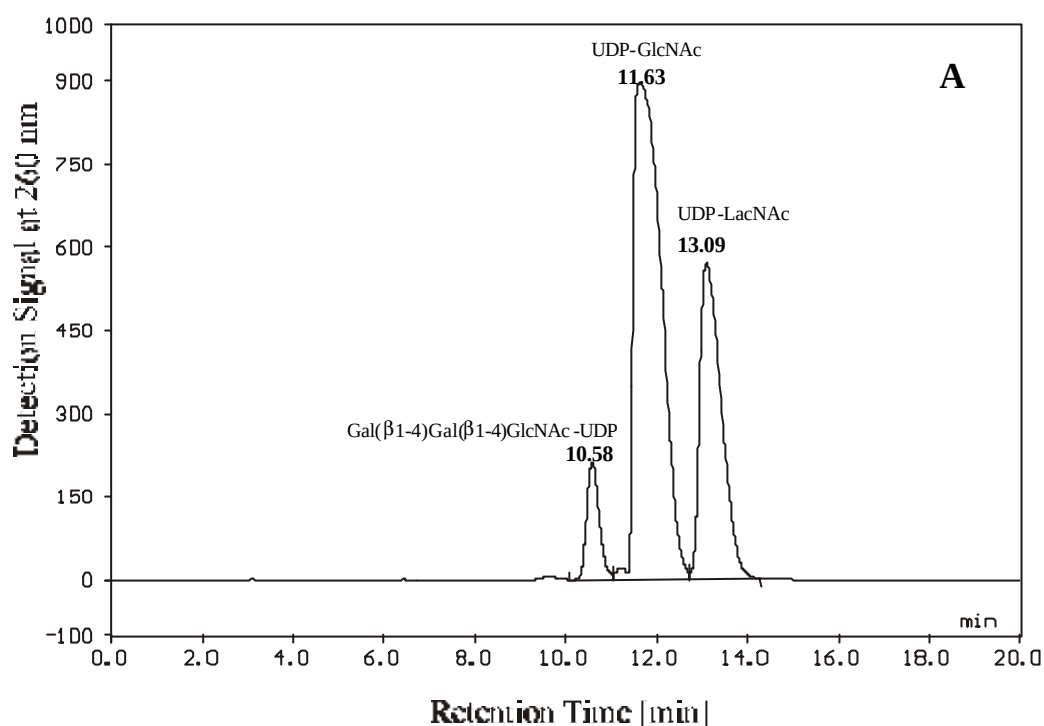


Abb. 113: Beispielchromatogramm HPLC-Methode ①.

6.12.1.2 HPLC ②

Bei dieser Methode handelt es sich um eine *normal-phase*-HPLC. Die verwendete Säule besitzt eine Silica-Matrix mit Amidfunktionen zur Trennung von Oligosacchariden. Die Trennung beruht auf unterschiedlichen Hydrophilieeigenschaften der einzelnen Oligosaccharide, die sich auf die Affinität zur Säulenmatrix auswirkt (Guile 1996). Generell werden Monosaccharide früher eluiert als größere Zuckerstrukturen. Im Falle der aktivierten Mono- Di und Trisaccharide konnten alle Trennprobleme mit dieser Methode gelöst werden (**Abb. 114**). Regioisomere werden allerdings nicht getrennt.

Säule: GlycoSepTMN (4,6 x 250 mm)
Oxford GlycoSciences, Oxford, England
Laufmittel: Acetonitril / 50 mM Natriumformiat (Ameisensäure pH 4,4)
Temperatur: RT
Fluß: 0,4 mL/min
Detektion: 254 nm
Elution: Gradient: A = Acetonitril / B = Na-Formiat
0 min.: A = 65 % B = 33 % Flußrate: 0,4 mL/min
72 min.: A = 47 % B = 53 % Flußrate: 0,4 mL/min
75 min.: A = 0 % B = 100 % Flußrate: 0,4 mL/min
77 min.: A = 0 % B = 100 % Flußrate: 1,0 mL/min
92 min.: A = 65 % B = 35 % Flußrate: 1,0 mL/min
100 min.: A = 65 % B = 35 % Flußrate: 0,4 mL/min

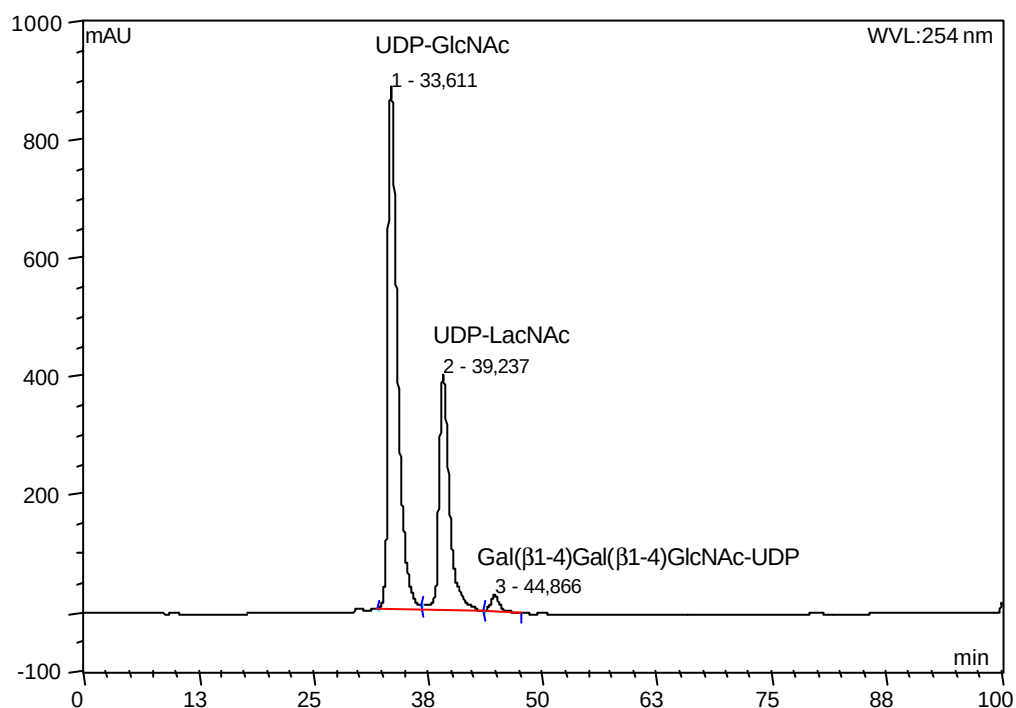


Abb. 114: Beispielchromatogramm HPLC-Methode ②.

6.12.1.3 HPLC ③

Bei dieser Methode wurde die DC-Methode (Kap. 6.12.3) auf eine HPLC-Methode übertragen. Bei der Säule handelt es sich um unmodifiziertes Kieselgel-Material. Die Auftrennung der nucleotidaktivierten Mono-, Di und Trisaccharide erfolgt nach ihrer Größe. Kleine Strukturen werden dabei zuerst eluiert. Diese Methode ist für alle Trennungen von aktivierten Mono- und Oligosacchariden geeignet (**Abb. 115**). Ein *Tailing* der Peaks konnte aber nicht verhindert werden, so daß die Methoden ① und ② dieser Methode vorgezogen wurden.

Säule:	Nucleosil 100-5 (4,6 x 250 mm) Macherey&Nagel, Düren, Deutschland
Laufmittel:	75 % Acetonitril 25 % NH ₄ Cl (0,1 M)
Elution:	isokratisch
Temperatur:	RT
Fluß:	0,75 mL/min
Detektion:	254 nm

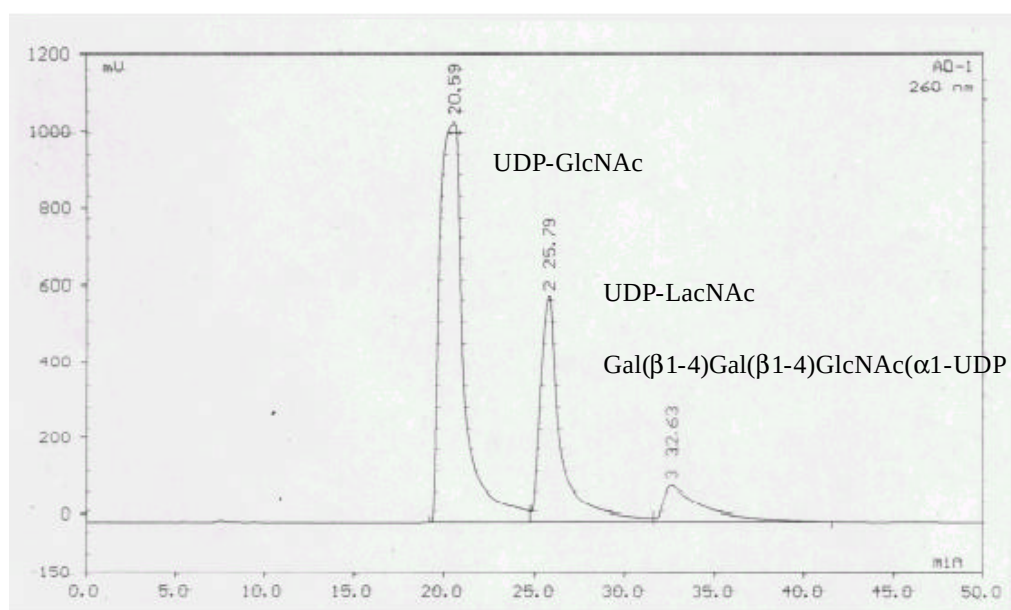


Abb. 115: Beispielchromatogramm HPLC-Methode ③.

6.12.2 HPLC-Methoden zur Trennung von Oligosacchariden

6.12.2.1 HPLC ④

Die Trennung von ungeladenen Mono-, Di- und Oligosacchariden beruht bei dieser Methode auf der Komplexierung von *cis*-ständigen OH-Gruppen durch H^+ . Dabei eluieren die stärker komplexierten Zucker später von der Säule als die weniger stark komplexierten. Diese Methode wurde hier dazu verwendet um GlcNAc, LacNAc, Gal(β 1-4)LacNAc und Chitobiose voneinander zu trennen. Außerdem kann diese Methode dazu verwendet werden Benzylglycoside, wie *Core*1-Bz, *Core*2-Bz und *Core*6-Bz voneinander zu trennen.

Säule: Aminex® Ion Exclusion HPX-87H (7,8 x 300 mm)
 Biorad, Richmond CA, USA
 Laufmittel: 4 mM H_2SO_4
 Elution: isokratisch
 Temperatur: 65°C
 Fluß: 0,6 mL/min
 Detektion: 254 nm

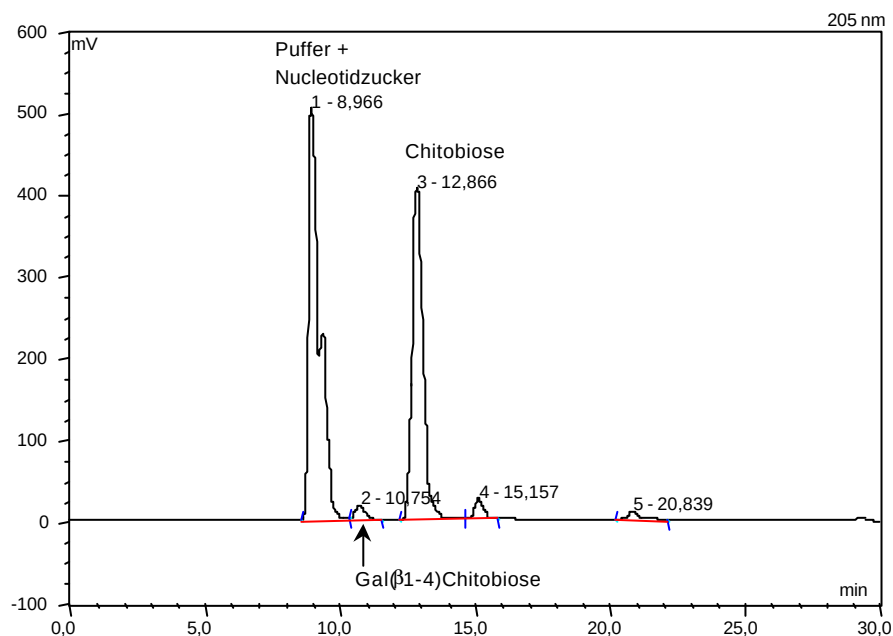


Abb. 116: Beispielchromatogramm zu HPLC-Methode ④.

6.12.2.2 HPLC ⑤

Diese *reversed phase*-Methode wurde zur Analytik von Benzylglycosiden eingesetzt (Dudziak 1999). Die Auftrennung der Zucker erfolgt dabei aufgrund ihrer Hydrophobizität. Hydrophile Substanzen wie Puffersalze oder Nucleotidzucker werden sofort eluiert. Hydrophobe Zucker wie z. B. *Core1-Bz* werden stark auf der Säule zurückgehalten (**Abb. 117**).

Säule:	LiChrospher RP-18e 5µm (4 x 250 mm)
	Merck, Darmstadt
Laufmittel:	11% Acetonitril/Wasser
Elution:	isokratisch
Temperatur:	RT
Fluß:	0,5 mL/min
Detektion:	205 nm

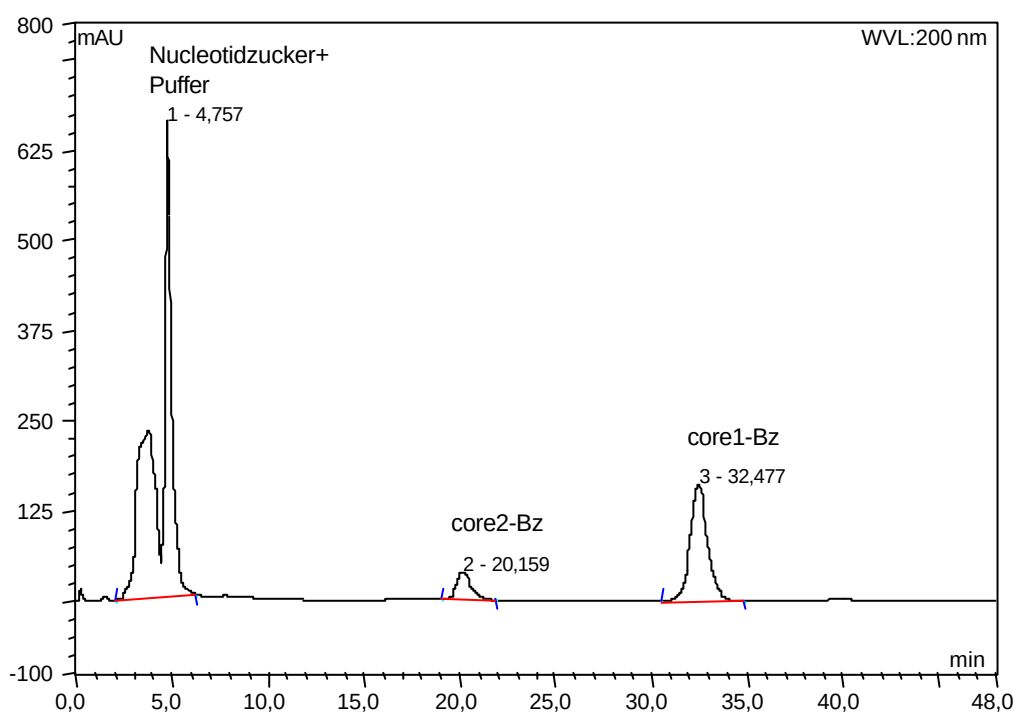


Abb. 117: Beispielchromatogramm zu HPLC-Methode ⑤.

6.12.2.3 HPLC ©

Die Trennung von ungeladenen Mono-, Di- und Oligosacchariden beruht bei dieser Methode auf der Komplexierung von *cis*-ständigen OH-Gruppen durch Ca^{+} . Dabei eluieren die stärker komplexierten Zucker später von der Säule als die weniger stark komplexierten. Diese Methode wurde hier dazu verwendet um Fructose, Saccharose und Glucose zu trennen (**Abb. 118**).

Säule:	Aminex [®] HPX-87C Carbohydrate Column (7,8x300 mm) Merck, Darmstadt
Laufmittel:	11% Acetonitril/Wasser
Elution:	isokratisch
Temperatur:	RT
Fluß:	0,5 mL/min
Detektion:	205 nm

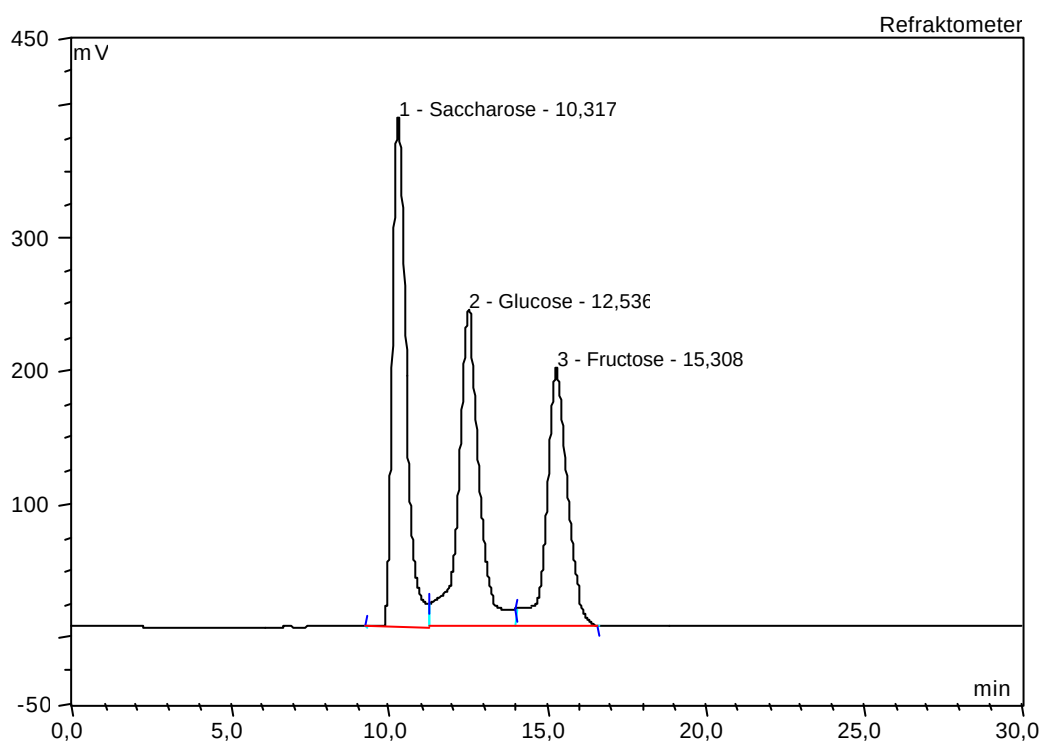


Abb. 118: Beispielchromatogramm zu HPLC-Methode ©.

6.12.2.4 HPLC ⑦

Bei dieser Methode handelt es sich um eine *normal-phase*-HPLC. Die verwendete Säule besitzt eine Silica-Matrix mit Amidfunktionen zur Trennung von Oligosacchariden. Diese Methode kann zur Trennung von *N*-Glycanstrukturen verwendet werden (Mulder *et al.* 1995).

Säule:	Lichrosorb-NH ₂ 5µm (4 x 250 mm) Merck, Darmstadt
Laufmittel:	Wasser/Acetonitril (25:75)
Elution:	isokratisch
Temperatur:	RT
Fluß:	1 mL/min
Detektion:	205 nm

6.12.3 Dünnschichtchromatographie

Zur qualitativen Analyse der Saccharide wurde eine dünnschichtchromatographische Methode eingesetzt. Jeweils 1 µL der zu bestimmenden Probe wurde auf eine Platte mit einer Kieselgel 60_{F254}-Beschichtung aufgetragen. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus 75% Acetonitril und 25% 0,1 M NH₄Cl-Lösung (Peters *et al.* 1993). Die Detektion der nucleotidaktivierten Oligosaccharide und Nucleotide erfolgte bei 254 nm und durch Anfärben der Platte. Zum Anfärben wurden die Platten mit einer Lösung aus 20 mg Naphtoresorcinol, 40 mg Diphenylamin und 400 µL H₂SO₄ in 10 mL Ethanol besprüht und für 15 min. bei 100°C inkubiert. **Tabelle 31** zeigt die R_f-Werte einiger getesteter Zucker.

Tabelle 31: R_f-Werte.

Zucker	R _f -Wert
UDP-GlcNAc	0,09
UDP-LacNAc	0,06
Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)GlcNAc-UDP	0,03
UDP-Glc	0,09
UDP-Lac	0,06
Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)Glc-UDP	0,03
D-Glucose	0,44
Lactose	0,27
Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)Glc	0,15

7 ANHANG

7.1 Chemikalien

Biorad, München

Gel-Material: Biogel P2 (super fine)

Fluka, Basel

Naphtoresorcinol, Schwefelsäure (98%)

Merck, Darmstadt

DC-Aluminiumfolien Kieselgel 60 _{F 245}; Ammoniumformiat; Ammoniumchlorid; Dinatriumhydrogenphosphat; Glycin; HCl; Magnesiumchlorid · 6 H₂O; Mangan (II)-chlorid · 4 H₂O; NaOH; MES; n-Octylamin

Pharmacia, Uppsala, Schweden

Anionenaustauscher: Sepharose Q Fast Flow

Riedel-de Häen, Seelze

Essigsäure

Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Acetonitril; BSA; Essigsäure; HEPES; Kaliumacetat; Methanol; Natriumacetat; Natriumazid; Natriumchlorid; Natriumcitrat; Phosphorsäure

Sigma, Deisenhofen

Na-Cacodylat; CDP-Glc (Di-Natriumsalz); Chitobiose; β -Cyclodextrin; γ -Cyclodextrin; Galactose; Gal(β 1-3)GalNAc(α 1-OBn; GalNAc(α 1-OBn; GDP-Glc (Di-Natriumsalz); GDP-Man (Di-Natriumsalz); GDP-Fuc; GlcNAc; Heptakis(2,6-Di-O-Methyl)- β -Cyclodextrin; Lactose; N-Acetyllactosamin; N-Acetylglucosamin; Melibiose; p-Nitrophenyl- β -D-N-Acetylgalactosamin; p-Nitrophenol; p-Nitrophenyl- β -D-N-cetylglucosamin; p-Nitrophenyl- β -D-Galactose; p-Nitrophenyl- α -D-Galactose; dTDP-Glc (Di-Natriumsalz); UDP (Di-Natriumsalz); UMP (Natriumsalz); UDP-Gal (Di-Natriumsalz); UDP-GalNAc (Di-Natriumsalz); UDP-Glc (Di-Natriumsalz); UDP-GlcA (Di-Natriumsalz); UDP-GlcNAc (Di-Natriumsalz); UDP-Xyl (Di-Natriumsalz);

7.2 Enzyme

Roche Diagnostics, Mannheim (ehemals Boehringer)

alkalische Phosphatase; β -Galactosidase aus *E. coli*

Calbiochem, USA

α 2,3-O-Sialyltransferase aus Ratte (rekombinant, *Spodoptera frugiperda*); humane

α 1,3-Fucosyltransferase V (rekombinant, *Spodoptera frugiperda*);

Sigma, Deisenhofen

α -Galactosidase aus grünen Kaffeebohnen; β -Galactosidase aus *Aspergillus oryzae*;

β -Galactosidase aus *Diplococcus pneumoniae*; β -Galactosidase aus Stierhoden;

Persönliche Gaben

Folgende Enzyme wurden freundlicherweise für die Versuche zur Verfügung gestellt:

a-Galactosidase aus *Bifidobacterium adolescentis*: Dr. S. Marx, Institut für Biotechnologie, RWTH Aachen

b-N-Acetylhexosaminidasen aus *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium oxalicum* und *Aspergillus oryzae*: Prof. Dr. Kren, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prag

Rekombinante murine Core2 b1-6GlcNAc-Transferase (Typ M) aus Maus: Prof. Dr. Berger, Physiologisches Institut, Universität Zürich, Schweiz

Rekombinante GlcNAc-Transferase I aus Kaninchen und die rekombinante humane GlcNAc-Transferase II: Prof. Dr. Schachter, Department of Biochemistry Research, Hospital for Sick Children, Toronto, Canada

Rekombinante Saccharose Synthase 1 aus Kartoffel:

Frau Dipl. Chem. U. Römer (Institut für Enzymtechnologie, HHU Düsseldorf)

Rekombinante humane β 1-4Galactosyltransferase 1:

Herr Dipl. Biol. T. Schumacher, (Institut für Enzymtechnologie, HHU Düsseldorf)

Rekombinante α 1-3Galactosyltransferase aus Maus:

Dr. Wohlgemuth, Fluka, Basel

7.3 Geräte**Amicon, Witten**

Tischzentrifuge Microfuge A; MicroconTM10

Biorad, München

Aminex Ion Exclusion HPX-87H (7,8 x 300 mm);

Aminex HPX-87C Carbohydrate Column (7,8 x 300 mm)

B. Braun AG, Melsungen

pH-Control Einheit Typ 88001020 mit pH-Meter und pH-Controller

Büchi GmbH, Göppingen

Rotationsverdampfer Rotavapor RE 111

DuPont, Bad Homburg

Zentrifuge Sorvall RC-SB mit Rotor GS3

Eppendorf, Hamburg

Eppendorf Mixern 5432; Eppendorf Thermostat 5320; Eppendorf-Pipetten Re
search; Eppendorf Reaktionsgefäße

Falcon, Lincoln Park, New York, USA

Microtiterplatten 96-well microtest III

Gyncotec, Germering

Probengeber GINA 160; HPLC Pumpe Modell 300 sowie Modell 480; UVD-160
S; UVD 320 S; SP-6; Säulenofen; Dagaser DG1310

Leybold Heraeus AG, Hanau

Gerfietrockner Lyovac GT3; Tischzentrifuge Biofuge A

Macherey & Nagel, Düren

ODS-Hypersil C18 100-5 (4,6 x 250 mm); Nucleosil 100-5 (4,6 x 250 mm)

Merck, Darmstadt

LiChrospher RP-183 5 µm (4 x 250 mm)

LiChrosorb-NH₂ 5 µm (4 x 250 mm)

Molecular Devices, Menlo Park, Kalifornien, USA

UVmax microplate reader

Oxford GlycoSciences, Oxford, England

GlycoSepTMN (4,6 x 250 mm)

Pharmacia, Freiburg

diverse Pharmacia Säulen; Gradi Frac System mit HiLoadPump P-50; UV-Monitor UV-1 mit Durchflußzelle, Fraktionssammler FRAC-100; P1 Peristaltikpumpe; Schreiber REC 102

Satorius, Göttingen

Waage MC 1 laboratory LC 6200; Celluloseacetat-Filter 0,2 µm

Schott, Mainz

pH-Elektrode

8 LITERATUR

Ajisaka, K.; Fujimoto, H. und Isomura, M. (1994)

Regioselective Transglycosylation in the Synthesis of Oligosaccharides:
Comparison of β -Galactosidases and Sialidases of Various Origins
Carbohydr. Res. **259**, 103-115

Alburn, H.E. und Grant, N.H. (1987)

Reactions in Frozen Systems. II .Enhanced Hydroxylaminolysis of Simple Amids.
J. Am. Chem. Soc. **87**; 4174-4177

Almeida, R.; Amado, M.; David, L.; Levery, S.B.; Holmes, E.H.; Merckx, G.; van Kessel, A.G.; Rygaard, E.; Hassan. H.; Bennet, E. und Clausen, H. (1997)

A Family of Human β 4-Galactosyltransferases – Cloning and Expression of Two Novel UDP-Galactose β -N-Acetylglucosamin β 1,4-Galactosyltransferases, β 4Gal-T2 and β 4Gal-T3
J. Biol. Chem. **272**; 31979-31991

Almeida, R.; Levery, S.B.; Mandel, U.; Kresse, H.; Schwientek, T. Bennet, E.P. und Clausen, H. (1999)

Cloning and Expression of a Proteoglycan UDP-Galactose β -Xylose β 1,4-Galactosyltransferase I - A Seventh Member of the Human β 4-Galactosyltransferase Gene Family
J. Biol. Chem **274**, 26165-26171

Amado, M.; Almeida, R.; Carneiro, F.; Levery, S.; Holmes, E.H.; Nomoto, M.; Hollingsworth, M.A.; Hassan, H.; Schwientek, T.; Nielsen, P.A.; Bennet, E.P. und Clausen H. (1998)

A Family of Human β 3-Galactosyltransferases
J. Biol. Chem. **273**, 12770-12778

Amado, M.; Almeida, R.; Schwientek, T. und Clausen, H. (1999)

Identification and Charakterisation of Large Galactosyltransferase Gene Families:
Galactosyltransferases for All Functions
Biochim. Biophys. Acta-General Subjects **1473**, 35-53

Andrews, P. (1970)

Purification of Lactose Synthase. A Protein from Human Milk and Demonstration
of its Interaction with α -Lactalbumin
FEBS Lett. **9**, 297-300

Aree, T.; Saenger, W.; Leibnitz, P.; Hoier, H. (1999)

Crystal Structure of Heptakis(2,6-di-*O*-Methyl)- β -Cyclodextrin Dihydrate: a
Water Molecule in an Apolar Cavity
Carbohydr. Res. **315**, 199-205

Asano, M.; Furukawa, K.; Kido, M.; Matsumoto, S.; Umesaki, Y.; Kochibe, N. und
Iwakura, Y. (1997)

Growth Retardation and Early Death of β -1,4-Galactosyltransferase Knockout
Mice with Augmented Proliferation and Abnormal Differentiation of Epithelial
Cells
EMBO J. **16**, 1850-1857

Bell, J.E.; Beyer, T.A. und Hill, R.L. (1976)

The Kinetic Mechanism of Bovine Milk Galactosyltransferase; The Role of α -
Lactalbumin
J. Biol. Chem. **251**, 3003-3013

Bendiak, B. und Schachter, H. (1987)

Control of Glycoprotein Synthesis. Kinetic Mechanism, Substrate Specificity, and
Inhibition Characteristics of UDP-*N*-Acetylglucosaminyltransferase II from Rat
Liver
J. Biol. Chem. **262**, 5784-5790

Bergmeyer, H.U. und Bernt, E. (1974)

Bestimmung mit Glucose-Oxidase und Peroxydase

In: Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U. Hrsg.; 3. Aufl., Bd. 2; S 1250-1259)

Berliner, L.J.; Davis, M.E.; Ebner, K.E.; Beyer, T.A. und Bell, J.E. (1984)

The Lactose Synthase Acceptor Site: A Structural Map Derived from Acceptor Studies

Mol. and Cell. Biochem. **62**, 37-42

Boon, M.A.; Janssen, A.E.M.; van 't Riet, K. (2000)

Effect of Temperature and Enzyme Origin on the Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides

Enzyme and Microbial Technology **26**, 271-281

Bradford, M.M. (1976)

A Rapid and Sensitive Method for the Qualification of Mikrogram Quantities of Protein Using the Principle of Protein-Binding Dye

Anal. Biochem. **72**, 248-254

Brockhausen, I. (1999)

Pathways of O-Glycan Biosynthesis in Cancer Cells

Biochim. Biophys. Acta **1473**, 67-95

Brockhausen, I.; Schutzbach, J.; Kuhns, W. (1998a)

Glycoproteins and their Relationship to Human Disease

Acta Anat. **161**, 36-78

Brodbeck, U. und Ebner, K.E. (1966)

Resolution of a Soluble Lactose Synthetase into two Protein Components and Solubilisation of Microsomal Lactose Synthetase

J. Biol. Chem. **241**, 762-764

Bruice, T.C. und Butler, A.R. (1964)

Catalysis in Water and Ice .II. The Reaction of Thiolactons with Morpholine in Frozen Systems.

J. Am. Chem. Soc. **86**, 4104-4108

Casu, B.; Reggiani, M. und Sanderson, G.R. (1979)

Methylated Cycloamyloses (Cyclodextrins) and their Inclusion Properties

Carbohydr. Res. **76**, 59-66

Clausen, H. und Bennet, E.P. (1996)

A Family of UDP-*N*-Acetyl-D-Galactosamine:Polypeptide

N-Acetylgalactosamyltransferases Control the Initiation of Mucin-Type

O-linked Glycosylation

Glycobiology **6**, 635-646

Coppa, G.V.; Pierani, P.; Zampini, L.; Carloni, I.; Carlucci, A. und Gabriellei, O. (1999)

Oligosaccharides in Human Milk During Different Phases of Lactation

Acta Paediatr. Suppl. **88** (430), 89-94

Crawley, S.C. und Palcic, M.M. (1996)

Use of Glycosyltransferases in the Synthesis of Unnatural Oligosaccharide Analogues

In: Modern Methods in Carbohydrate Synthesis, (S.H. Kahn und R.A. O'Neill, Hrsg), Vol. 1, pp. 492-517. Harwood Academic Publishers, Amsterdam

Crout, D.H.G.; Singh, S.; Swoboda, B.E.P.; Critchley, P. und Gibson, W.T. (1992)

Biotransformations in Carbohydrate Synthesis. *N*-Acetylglucosaminyl Transfer on to Methyl *N*-Acetyl- β -D-glucosaminide (Methyl 2-Acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside) Catalysed by a β -*N*-Acetylgalactosaminidase from *Aspergillus oryzae*

J. Chem. Soc., 704-705

Cumming, D.F. (1970)

Separation and Identification of Soluble Nucleotides in Cambial and Young Xylem Tissue of *Larix decidua* Mill.

Biochem. J. **116**, 189-198

Cummings, R.D. (1996)

Synthesis of Asparagine-Linked Oligosaccharides: Pathways, Genetics and Metabolic Regulation

in: Allen, H.J.; Kisalius, E.C., eds.; Glycoconjugates

Marcel Dekker, inc., New York

Cummings, R.D. (1999)

Structure and Function of the Selectin Ligand PSGL-1

Braz. J. Med. Biol. Res. **32**, 519-528

Crout, D.H.G.; Singh, S.; Swoboda, B.E.P.; Critchley, P.; Gibson, W.T. (1992)

Biotransformations in Carbohydrate Synthesis. *N*-Acetylglucosaminyl Transfer on to Methyl *N*-Acetyl- β -D-glucosaminide (Methyl 2-Acetamido-2-Deoxy- β -D-Glucopyranoside) and Methyl *N*-Acetyl- α -D-Glucosaminide (Methyl 2-Acetamido-2-deoxy- α -D-glucopyranoside) Catalysed by a β -*N*-Acetylgalactosaminidase from *Aspergillus oryzae*

J. Chem. Soc., 704-705

Davies, G.J.; Mackenzie, L.; Varrot, A.; Dauter, M.; Brzozowski, A.M.; Schülein, M. und Withers, S. (1998)

Snapshots Along an Enzymatic Reaction Coordinate: Analysis of a Retaining β -Glycoside Hydrolase

Biochemistry **37**, 11707-11713

Denamur, R.E. und Gaye, J.-B. (1971)

Isolement et identification de 4 UDP-trisaccharides dans la glande mammaire et le colostrum de bebris

Eur. J. Biochem. **19**, 23-35

- Dennis, J.W.; Granovsky, M. und Warren, C.E. (1999)
Protein Glycosylation in Development and Disease
BioEssays **21**, 412-421
- Distler, J.J. und Jourdian, G.W. (1973)
The Purification and Properties of β -Galactosidase from Bovine Testes
J. Biol. Chem. **248**, 6772-6780
- Distler, J.J. und Jourdian, G.W. (1978)
 β -Galactosidase from Bovine Testes
Methods in Enzymology, **50**, 514-520
- Dozou, P. (1971)
Aqueous-Organic Solutions of Enzymes at Subzero Temperatures
Biochimie **53**, 1135-1145
- Dudziak, G. (1999)
Reaktionstechnische Untersuchungen zur enzymatischen Glycosylierung von Peptiden
Dissertationsschrift, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Ebner, K.E. (1971)
Biosynthesis of Lactose
J. Dairy Sci. **54**, 1229-1233
- Elling, L. (1997)
Glycobiotechnology: Enzymes for the Synthesis of Nucleotide Sugars
In: New Enzymes for Organic Synthesis. Screening, Supply and Engineering.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 89-144

- Elling, L.; Zervosen, A.; Gutiérrez Gallego, R.; Nieder, V.; Malissard, M.; Berger, E.;
Vliegthart, J.F.G. und Kamerling, J.P. (1999)
UDP-*N*- α -D-Glucosamine as Acceptor Substrate of β -1,4-Galactosyltransferase.
Enzymatic Synthesis of UDP-*N*-Acetyllactosamin
Glycoconjugate J. **16**, 327-336
- Endo, T.; Hasegawa, H.; Kadota, Y.; Hashimoto, H.; Sato, T.; Furukawa, K.; Seko, A.;
Yamashita, K.; Sujino, K. und Palcic, M. (2000)
Synthesis and Behaviors of Alkylidene-Linked Bisubstrate Analogues of Some
Glycosyltransferases
Posterbeitrag, 20th International Carbohydrate Symposium, Hamburg
- Epperson, T.K.; Patel, K.D.; McEver, R.P. und Cummings, R.D. (2000)
Noncovalent Association of P-selectin Glycoprotein Ligand-1 and Minimal
Determinants for Binding to P-selectin
J. Biol. Chem. **275**, (11) 7839-7853
- Ernst, B. und Oehrlein, R. (1999)
Substrate and Donor Specificity of Glycosyl transferases
Glycoconjugate J. **16**, 161-170
- Fan, J.-Q.; Takegawa, K.; Iwahara, S.; Kondo, A.; Kato, I.; Abeygunawardana, C.
und Lee, Y.C. (1995)
Enhanced Transglycosylation Activity of *Arthrobacter protophormiae* Endo- β -*N*-
acetylglucosaminidase in Media Containing Organic Solvents
J: Biol. Chem. **270** (30), 17723-17729
- Fennema, O. (1975)
Activity of Enzymes in Partially Frozen Aqueous Systems
In: Duckworth, R.B. (ed); Water Relations of Food. Proceedings of the
International Workshop,
Glasgow, Academic Press, London, 397-412

- Fan, J.-Q.; Takegawa, K.; Iwahara, S.; Kondo, A.; Kato, I.; Abeygunawardana, C.;
Lee, Y.C. (1995)
Enhanced Transglycosylation Activity of *Arthrobacter protophormiae* Endo- β -N-
acetylglucosaminidase in Media Containing Organic Solvents
J. Biol. Chem. **270** (30), 17723-17729
- Fernández-Mayoralas, A. (1997)
Synthesis and Modification of Carbohydrates Using Glycosidase and Lipases
In: „Topics in Current Chemistry, Vol. 186“; Springer Verlag Berlin Heidelberg
- Franks, F. (1985)
Biophysics and Biochemistry at Low Temperatures
Cambridge University Press, Cambridge, 61
- Fukuda, M. (1994)
Cell Surface Carbohydrates: Cell-Specific Expression
in: Fukuda, M.; Hindsgaul, O. (Hrsg.): „Molecular glycobiology“ Oxford
University Press, Oxford, 1-52
- Fujimoto, H.; Isomura, M.; Miyazaki, T.; Matsuo, I.; Walton, R.; Sakakibara, T.
und Ajisaka, K. (1997)
Enzymatic Syntheses of GlcNAc β 1-2Man and Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man as
Components of Complex Type Sugar Chains
Glycoconjugate J. **14**, 75-80
- Gabriel, O. und Ashwell, G. (1962)
Isolation of Uridine Diphosphate N-Acetylglucosamine-6-phospho-1-galactose
from Hen Oviduct
J. Biol. Chem. **237**(5), 1400-1404
- Gagneux, P. und Varki, A. (1999)
Evolutionary Considerations in Relating Oligosaccharide Diversity to Biological
Function
Glycobiology **8**, 747-755

Galili, U. (1989)

Abnormal Expression of α -Galactosyl Epitopes in Man: a Trigger for Autoimmune Process?
Lancet. II, 358-361

Galili, U. (1993)

Interaction of the Natural anti-Gal Antibody with α -Galactosyl Epitopes: A Major Obstacle for Xenotransplantation in Humans
Immunol. Today **14**, 480-482

Gambert, U. und Thiem, J. (1997a)

Chemoenzymatic Synthesis of the Thomsen-Friedenreich Antigen Determinant
Carbohydr. Res. **299**, 85-89

Gambert, U.; Lio, R.G.; Farkas, E.; Thiem, J.; Bencomo, V. und Lipták, A. (1997b)

Galactosylation with β -Galactosidase from Bovine Testes Employing Modified Acceptor Substrates
Bioorg. Med. Chem. Lett. **5**, 1285-1291

Gastinel, L.N.; Cambillau, C. und Bourne, I. (1999)

Crystal Structures of the Bovine β 4Galactosyltransferase Catalytic Domain and its Complex with Uridine Diphosphogalactose
EMBO J. **18**, 3546-3577

Gerber, A.C.; Kozdrowski, I.; Wyss, S.; Berger, E.G. (1979)

The Charge Heterogeneity of Soluble Human Galactosyltransferases Isolated from Milk, Miliotic Fluid and Malignant Ascites
Eur. J. Biochem. **93**, 453-460

Gill, I. und Valivety, R. (2000a)

Monosaccharide-Alkyl Glycoside Glass Phases: Plasticization with Hydrophilic and Hydrophobic Molecules
Angew. Chem. **112**, 3959-3926

Gill, I. und Valivety, R. (2000b)

Enzymatic Glycosylation in Plasticized Glass Phases: A Novel and Efficient Route to *O*-Glycosides
Angew. Chem. **112**, 3962-3966

Greene, W.C. (1991)

The Molecular Biology of Human Immunodeficiency Virus Type I Infection
New Engl. J. Med. **324**, 308-317

Greenwell, P. (1997)

Blood Group Antigens: Molecules Seeking a Function?
Glycoconjugate J. **14**, 159-173

Guile, G.R.; Rudd, P.M.; Wing, D.R.; Prime, S.B. und Dwek, R.A. (1996)

A Rapid High-Resolution High-Performance Liquid Chromatographic Methode for Separating Glycan Mixtures and Analyzing Oligosaccharide Profiles
Anal. Biochem. **240**, 210-226

Hagen, F.K.; Ten Hagen, K.G.; Beres, T.M.; Balys, M.M.; VanWuyckhuysse, B.C.

und Tabak, L.A. (1997)

cDNA Cloning and Expression of a Novel UDP-*N*-Acetyl-D-Galactosamine:Polypeptide *N*-Acetylgalactosamiyltransferase
J. Biol. Chem. **272**, 13843-13848

Hagen, F.K. und Nehrke, K. (1998)

cDNA Cloning and Expression of a Family of UDP-*N*-acetyl-D-Galactosamine:Polypeptide *N*-Acetylgalactosamiyltransferase Sequence Homologs from *Caenorhabditis elegans*
J. Biol. Chem. **273**, 8268-8277

Hällgren, C. und Hindsgaul, O. (1995)

An Animated GDP-Fucose Analog Useful in the Fucosyl-Transferase Catalyzed Addition of Biological Probes Onto Oligosaccharide Chains
J. Carbohydr. Chem. **14**, 453-464

Hänsler, M. und Jakubke, H.-D. (1996)

Reverse Action of Hydrolases in Frozen Aqueous Solutions
Amino Acids **11**, 379-395

Halcomb, R.L. (1995)

Hydrolysis and Formation of C-O-bonds
Drauz, K.; Waldnam, H.
Enzyme catalysis in organic synthesis, VCH Weinheim, 303-306

Hård, K.; Van Zadelhoff, G.; Moonen, P.; Kamerling, J.P. und Vliegthart, J.F.G. (1992)

The Asn-linked Carbohydrate Chains of Human Tamm-Horsfall Glycoprotein of one Male. Novel Sulfated and Novel *N*-Acetylgalactosamine-Containing *N*-linked Carbohydrate Chains.
Eur. J. Biochem **209**, 895-919

Hartmann, E. und König, H. (1990)

Comparison of the Biosynthesis of Methano-Bacterial Pseudomurein and Eubacterial Murein
Naturwissenschaften, **77**, 472-475

Hartmann, E.; Kärcher, U. und König, H. (1993)

Ein neuer Weg der Biosynthese kohlenhydrathaltiger Zellwandpolymere
BioEngineering **9**, 37-43

Hartmann, E. und König, H. (1991)

Nucleotide-Activated Oligosaccharides are Intermediates of the Cell Wall Polysaccharide of *Methanosarcina barkeri*
Biol. Chem. Hoppe Seyler **372**, 971-974

Hartmann, E.; Messner, P.; Allmeier, G. und König, H. (1993)

Proposed Pathway for the Biosynthesis of the S-Layer Glycoprotein of *Bacillus alvei*

J. Bacteriol. 175, 4515-4519

Hedbys, L.; Johansson, E.; Mosbach, K.; Larsson, P.-O.; Gunnarsson, A.; Svensson, S. und Lönn, H. (1989)

Synthesis of Gal β 1-3GlcNAc β -SEt by an Enzymatic Method Comprising the Equential use of β -D-Galactosidases from Bovine Testes and *Escherichia coli* Glycoconjugate J. **6**, 161-168

Heightman, T.D. und Vasella, A.T. (1999)

Neue Erkenntnisse über Hemmung, Struktur und Mechanismus konfigurationserhaltender Glycosidasen

Angew. Chem **111**, 794-815

Herscovics, A. (1999)

Importance of Glycosidases in Mammalian Glycoprotein Biosynthesis

Biochim. Biophys. Acta **1473**, 96-107

Hill, R.L. und Brew, K. (1975)

Lactose Synthetase

Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. **43**, 411-490

Hirschberg, C.B. und Snider, M.D. (1987)

Topography of Glycosylation in the Rough Endoplasmatic Reticulum and Golgi Apparatus

Annu. Rev. Biochem. **56**, 63-87

Hirschberg, C.B. (1996)

Transporters of Nucleotides and Nucleotide Derivatives in the Endoplasmatic Reticulum und Golgi Apparatus

In: Organellar Ion Channels and Transporters (D.E. Clapham und B.E. Ehrlich, Hrsg.), Soc. of General Physiologists 49th Annual Symp1995, Rockefeller University Press, New York

Hirschberg, C.B. (1997)

Transporters of Nucleotide Sugars, Nucleotide Sulfate and ATP in the Golgi Apparatus Membrane: Where Next?

Glycobiology **7**, 169-171

Homa, F.L.; Hollaender, T.; Lehman, D.J.; Thomsen, D.R. und Elhammer, A.P. (1993)

Isolation and Expression of a cDNA UDP-*N*-Acetyl-Galactosamine:Polypeptide *N*-Acetylgalactosamiyltransferase

J. Biol. Chem. **273**, 58-65

Huges, R.C. (1976)

Membrane Glycoproteins

Butterworths, London

Jakubke, H.-D. (1994)

Protease-Catalyzed Peptide Synthesis: Basic Principles, new Synthesis Strategies and Medium Engineering

J. Chin. Chem. Soc. **41**, 355-370

Johansson, E.; Hedbys, L.; Mosbach, K. und Larsson, P.-O. (1989)

Enzyme Microb. Technol. **11**, 347-352

Jourdian, G.W.; Shimizu, F. und Roseman, S. (1961)

Isolation of Nucleotide-Oligosaccharides Containing Sialic Acid

Fed. Prod. **20**, 161

Jouradian, G.W. und Distler, J.J. (1973)

Formation *in Vitro* of Uridine-5'-(Oligosaccharide)-1-Pyrophosphates

J. Biol. Chem., **248** (19), 6781-6787

Kaltner, H. und Stierstorfer, B. (1998)

Animal Lectins as Cell Adhesion Molecules

Acta Anat. **161**, 162-179

Kanie, O. und Hindsgaul, O. (1992)

Synthesis of Oligosaccharides, Glycolipids and Glycopeptides

Curr. Opin. Struct. Biol. **2**, 674

Kawakita, M.; Ishida, N.; Miura, N.; Sun-Wada, G.-H. und Yoshioka, S. (1998)

Nucleotide Sugar Transporters: Elucidation of Their Molecular Identity and Its Implication for Future Studies

J. Biochem. **123**, 777-785

Keltjens, J.T.; Kraft, H.J.; Damen, W.G.; van der Drift, C. und Vogels, G.D. (1989)

Stimulation of the Methylcoenzyme M Reduction by Uridine-5'-Diphospho-Sugars in Cell-free Extracts of *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Strain ΔH)

Eur. J. Biochem. **184**, 395-403

Kharta, B.S.; Herries, D.G. und Brew, K. (1974)

Some Kinetik Properties of Human-Milk Galactosyl Transferase

Eur. J. Biochem. **44**, 537-560

Kobata, A. (1962)

Isolation and Identification of two Novel Uridine Nucleotide Oligosaccharide Conjugates from Human Milk

Biochem. Biophys. Res. Com. **7**, 346-350

Kobata, A. (1963)

The Acid-Soluble Nucleotides of Milk

J. of Biochem. **53**(3), 167-175

Kobata, A. und Zirô, S. (1965)

The Acid-Soluble Nucleotides of Milk

Biochim. Biophys. Acta **107**, 405-413

Kobata, A. (1966)

The Acid-Soluble Nucleotides of Milk

J. of Biochem. **59**(1), 63-66

König, H. (1987)

Zellhüllen bei Archaeobakterien

Forum Mikrobiologie **10**, 209-214

König, H., Kandler O. und Hammes W. (1989)

Biosynthesis of Pseudomurein: Isolation of Putative Precursors from
Methanobacterium thermoautotrophicum

Can. J. Microbiol. **35**, 176-181

Köplin, R.; Brisson, J.-R. und Whitfield, C. (1997)

J. Biol. Chem. **272**, 4121-4128

Kornfeld, R. und Kornfeld, S. (1985)

Assembly of Asparagine-linked Oligosaccharides

Annu. Rev. Biochem. **54**, 631-664

Kreisl, P. und Kandler, O. (1986)

Chemical Structure of the Cell Wall Polymer of *Methanosarcina*

Syst. Appl. Microbiol. **7**, 293-299

Kren, V.; Thiem, J. (1995)

Ein Multienzymsystem zur Eintopfsynthese des Sialyl-T-Antigens
Angew. Chem., **107**, 979-981

Kunz, C. und Rudloff, S. (1993)

Biological Functions of Oligosaccharides in Human Milk
Acta Paediatr. **82**, 903-912

Larsson, P.-O.; Hedbys, L.; Svensson, S. und Mosbach, K. (1987)

Disaccharide Synthesis with Immobilized β -Galactosidase
Methods in Enzymology **136**, 230-233

Leder, S.; Hartmeier, W.; Marx, S.P. (1999)

α -Galactosidase of *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083
Current Microbiology **38**, 101-106

Lennarz, W.J. (1987)

Proteinglycosylation in the Endoplasmatic Reticulum: Current Topological Issues
Biochemistry **26**, 7205-7210

Lindhorst, T. (2000)

Struktur und Funktion von Kohlenhydraten
Chemie in unserer Zeit **34**, 38-52

Lo, N.-W.; Sharper, J.H.; Pevsner, J. und Sharper N.L. (1998)

The Expanding β 4-Galactosyltransferase Gene Family: Messages from the
Databanks
Glycobiology **8**, 517-526

López, R.; Fernández-Mayoralas, A.; Martín-Lomas, M.; Guisán, J.M. (1991)

Enzymatic β -Galactosylation of β -Xylopyranosides
Biotechnol. Lett. **13**, 705

- Mackenzie, L.F.; Wang, Q.; Warren, R.A.; Withers, S. (1998)
Glycosynthases: Mutant Glycosidases for Oligosaccharide Synthesis
J. Am. Chem. Soc. **120**, 5583-5584
- Mallisard, M.; Zeng, S. und Berger, E.G. (1999)
The Yeast Expression System for Recombinant Glycosyltransferases
Glycoconjugate J. **16**, 125-139
- Mallisard, M.; Zeng, S. und Berger, E.G. (2000)
Expression of Functional Soluble Forms of Human β -1,4-Galactosyltransferase I, α -2,6-Sialyltransferase, and α -1,3-Fucosyltransferase VI in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*
Biochem. Biophys. Res. Commun. **267**, 169-173
- Marsden, B.J.; Sauer, F.D.; Blackwell, B.A. und Kramer, J.K.G. (1989)
Structure Determination of the UDP-Disaccharide Fragment of Cytoplasmic Cofactor Isolated from *Methanobacterium thermoautotrophicum*
Biochem. Biophys. Res. Commun. **159**, 1404-1410
- Matahira, Y.; Tashiro, A.; Sato, T.; Kawagishi, H.; Usui, T. (1995)
Enzymatic Synthesis of Lacto-N-Triose II and its Positional Analogues
Glycoconjugate J., **12** (5), 664-671
- Montreuil, J. und Mullet, S. (1959)
Constitution glucidique du lait de femme au cours de la lactation
C.R. Soc. Biol. **153**, 1364
- Montreuil, J. (1980)
Advanced Carbohydrate Chemistry
Biochem. **37**, 157

Moore, K.L. (1998)

Structure and Function of P-Selectin Glycoprotein Ligand 1
Leukemia & Lymphoma **29**, 1-15

Moore, K.L.; Stults, N.L.; Diaz, S.; Smith, D.F.; Cummings, R.C.; Varki, A.; McEver, R.P.
(1992)

Identification of a Specific Glycoprotein Ligand for P-Selectin (CD62) on
Myeloid Cells.
J. Cell Biol. **118**, 445-456

Morrison, J.F. und Ebner, K.E. (1971)

Studies on Galactosyltransferase
J. Biol. Chem. **246**, 3977-3984

Mulder, H.; Dideberg, F.; Schachter, H.; Spronk, B.A.; de Jong-Brink, M.; Kamerling, J.P.
und Vliegthart, J.F.G. (1995)

In the Biosynthesis of *N*-Glycans in Connective Tissue of Snail *Lymnaea stagnalis*
of Incorporation GlcNAc by β 2GlcNAc-Transferase I is an Essential Prerequisite
for the Action of β 2GlcNAc-Transferase II and β 2Xyl-Transferase
Eur. J. Biochem. **232**, 272-283

Murata, T.; Akimoto, S.; Horimoto, M.; Usui, T. (1997)

Galactosyl Transfer onto *p*-Nitrophenyl β -D-Glucoside Using β -D-
Galactosidase from *Bacillus circulans*
Biosci. Biotech. Bioeng. **61** (7), 1118-1120

Murata, T.; Itoh, T.; Usui, T. (1998)

Enzymatic Synthesis of β -D-Gal-(1-3)-[β -D-GlcNAc(1-6)]- α -D-GalNAc-
OC₆H₄NO₂-*p* as a Carbohydrate Unit of Mucin-Type 2 Core
Glycoconjugate J: **15** (6), 575-582

Murray, B.W.; Takayama, S.; Schultz, J. und Wong, C.-H. (1996)

Mechanism and Specificity of Human α -1,3-Fucosyltransferase V
Biochem. **35**, 11183-11195

Nakanishi, Y.; Shimizu, S.; Takahashi, N.; Sugiyama, M. und Suzuki, S. (1967)

Structure and Distribution of Disaccharide-Carrying Nucleotide and Related Nucleotides in Hen Oviduct

J. Biol. Chem. **242**(5), 967-976

Nilsson, K.G.I. (1987)

A Simple Strategy for Changing the Regioselectivity of Glycosidase-Catalysed Formation of Disaccharides

Carbohydr. Res. **167**, 95-103

Nilsson, K.G.I. (1988)

Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides

Trends in Biotechnol. **6**, 256-264

Nilsson, K.G.I. (1988b)

A Simple Strategy for Changing the Regioselectivity of Glycosidase-Catalysed Formation of Disaccharides: Part II. Enzymatic Synthesis *in situ* of Various Acceptor Glycosides

Carbohydr. Res. **180**, 53-59

Nilsson, K.G.I. (1989)

Enzymatic Synthesis of Di- and Tri-Saccharide Glycosides, Using Glycosidases and β -D-Galactoside-3- α -Sialyl-Transferase

Carbohydr. Res. **188**, 9-17

Nilsson, K.G.I. (1990)

Enzymatic Synthesis of HexNAc-Containing Disaccharide Glycosides

Carbohydr. Res. **204**, 79-83

Nilsson, K.G.J. (1996)

Synthesis with Glycosidases

In: Kahn, S.H. and O'Neill, R.A. eds.; Modern Methods in Carbohydrate Synthesis
Harwood Academic publishers Amsterdam; 518-547

- Nomura, T.; Aoki, J.; Arai, H.; Inoue, K.; Wakisaka, E.; Yoshisuka, N.; Imokawa, G.; Dohmae, N.; Takio, K.; Hattori, M. und Matsuo, N. (1998)
Purification, cDNA Cloning and Expression of UDP-Gal:Glucosylceramide β 1,4Galactosyltransferase from Rat Brain
J. Biol. Chem. **273**, 13570-13577
- Nunez, H.A. und Barker, R. (1976)
The Metal Ion Catalyzed Decomposition of Nucleoside Diphosphate Sugars
Biochem. 15, 3843-3847
- Otero, C.; Cruzado, C.; Ballesteros, A. (1998)
Use of Cyclodextrins in Enzymology to Enhance the Solubility of Hydrophobic Compounds
Appl. Biochem. Biotechnol. **27**, 185-194
- Oxford GlycoSystems (1997)
Katalog: Tools for Glycobiology
- Palcic, M.M. und Hindsgaul, O. (1996)
Glycosyltransferases in the Synthesis of Oligosaccharide Analogs
Trends in Glycoscience and Glycobiotechnology **8**, 37-49
- Paulsen, H. (1982)
Fortschritte bei der selektiven chemischen Synthese komplexer Oligosaccharide
Angew. Chem. **94**, 184-201
- Paulsen, H. Heume, M. und Nurnberger, H. (1990)
Synthese der verzweigten Monosaccharid-Sequenz der "bisected" Struktur von *N*-Glycoproteinen
Carbohydr. Res. **200**, 127

- Paulsen, H.; Springer, M.; Reck, F.; Brockhausen, I.; Schachter, H. (1995)
Synthese von modifizierten Tetrasacchariden als analoge Akzeptor-Inhibitoren
der *N*-Acetylglucosaminyltransferase II
Carbohydr. Res. **275**, 403-411
- Petrová, P.; Koca, J.; Imberty, A. (1999)
Potential Energy Hypersurfaces of Nucleotide Sugars: Ab Initio Calculations,
Force-Field Parametrization and Exploration of the Flexibility
J. Am. Chem. Soc. **121**, 5535-5547
- Peters, J.; Rudloff, S.; Oschkinat, H.; Mengele, R.; Sumper, M.; Kellermann, J.; Lottspeich, F.
und Baumeister, W. (1992)
Evidence for Tyrosine-linked Glucosaminoglycan in Bacterial Surface Protein
Biol. Chem. Hoppe Seyler **373**, 171-176
- Pincock, R.E. und Kivorsky, T.E. (1966)
Kinetics of Reactions in Frozen Solutions
J. Chem. Educ. **43**, 358-360
- Pollex-Krüger, A.; Meyer, B.; Stuike-Prill, R.; Sinnwell, V.; Matta, K.L. und Brockhausen, I.
(1993)
Preferred Conformations and Dynamics of five Core Structures of Mucin Type *O*-
Glycans Determined by NMR Spectroscopy and Force Field Calculations
Glycoconjugate J. **10**, 365-380
- Rajanochová, E.; Dvůráková, J.; Hunková, Z.; Kren, V. (1997)
Reverse Hydrolysis Catalysed by β -*N*-Acetylhexosaminidase from
Aspergillus oryzae
Biotechnol. Lett. **19**, 869-872

Ram B.P. und Munjal D.D. (1985)

Glycosyltransferases: Physical Chemical, and Biological Aspects

Crit. Rev. Biochem. **17**, 257-311

Ramachandran V.; Nollert, M.U.; Qiu, H.; Liu, W.-J.; Cummings, R.D.; Zhu, C.;

McEver, R.P. (1999)

Tyrosine Replacement in P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 Affects Distinct Kinetic and Mechanical Properties of Bonds with P- and L-Selectin

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **23**, 13771-13776

Reuter, S.; Nygaard, A.R. und Zimmermann, W. (1999)

β -Galactooligosaccharide Synthesis with β -Galactosidases from *Sulfolobus solfataricus*, *Aspergillus oryzae* and *Escherichia coli*

Enzyme and Microbial Technology 25, 509-516

Saenger, W. (1980)

Cyclodextrin-Einschlußverbindungen in Forschung und Industrie

Angew. Chem. **92**, 343-361

Schachter, H. (1986)

Biosynthetic Controls that Determine the Branching and Microheterogeneity of Protein-bound Oligosaccharides

Biochem. Cell. Biol. **64**, 163-181

Schachter, H. (1991)

The "Yellow Brick Road" to Branched Complex *N*-Glycans

Glycobiology **1**, 453-461

Schachter, H. (1995)

Glycosyltransferases Involved in the Synthesis of *N*-Glycan Antennae

In: Glycoproteins (J. Montreuil, H. Schachter und J.F.G. Vliegthart, Hrsg., Elsevier Science)

Schmidt, R.R. (1986)

Neue Methoden zur Glycosid- und Oligosaccharidsynthese-gibt es Alternativen zur Koenigs-Knorr Methode?
Angew. Chem. **98**, 213-236

Schrader (1998)

Expression des Gens *sus1* aus *Solanum tuberosum*, Aufreinigung seines Genprodukts Saccharose Synthase (EC 2.4.1.13) und dessen Charakterisierung
Dissertation Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Schuster, M. Aaviksaar, A. und Jakubke, H.D. (1990)

Enzyme-Catalysed Peptide Synthesis in Ice
Tetrahedron **46**, 8093-8102

Schwientek, T.; Nomoto, M.; Levery, S.B.; Merx, G.; vanKessel, A.G.; Bennet, E.P.; Hollingsworth, M.A. und Clausen, H. (1999)

Control of O-glycan Branch formation - Molecular cloning of Human cDNA Encoding a Novel β 1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase forming Core2 and Core4
J. Biol. Chem. **274**, 4504-4512

Sears, P. und Wong, C.-H. (1998)

Enzyme Action in Glycoprotein Synthesis
Cell. Mol. Life Sci. **54**, 223-252

Sharon, N. und Lis, H. (1993)

Kohlenhydrate und Zellerkennung
Spektrum der Wissenschaft, März, 66-75

Silberstein, S. und Gilmore, R. (1996)

Biochemistry, Molecular Biology and the Genetics of the Oligosaccharyltransferase
FASEB J. **10**, 849-858

Singh, S.; Scigelova, M.; Vic, G.; Crout, D.H.G. (1996)

Glycosidase Catalysed Oligosaccharide Synthesis of Di-, Tri- and Tetrasaccharides Using the *N*-Acetylhexosaminidase from *Aspergillus oryzae* and the β -Galactosidase from *Bacillus circulans*

J. Chem. Soc., Perkin Trans. **1**, 1921-1926

Singh, S.; Scigelova, M.; Critchley, P.; Crout, D.H.G. (1998)

Trisaccharide Synthesis by Glycosyl Transfer from *p*-Nitrophenyl β -D-Acetylgalactosaminide on to Disaccharide Acceptors Catalysed by the β -*N*-Acetylhexosaminidase from *Aspergillus oryzae*

Carbohydr. Res., **305**, 363-370

Sinnot, M.L. (1990)

Catalytic Mechanism of Enzymic Glycosyl Transfer

Chem. Rev. **90**, 1171-1202

Srivastava, G.; Kaur, K.J.; Hindsgaul, O. und Palcic, M. (1992)

Enzymatic Transfer of a Preassembled Trisaccharide Antigen to Cell Surfaces Using a Fucosyltransferase

J. Biol. Chem. **267**, 22356-22361

Strominger, J.L. (1962)

Uridine and Guanosine Nucleotides of Hen Oviduct

J. Biol. Chem. **237**(5), 1388-1392

Stults, C.L.M.; Macher, B.A.; Bhatti, R.; Srivastava, O.P. und Hindsgaul, O. (1999)

Characterization of the Substrate Specificity of α 1,3Galactosyltransferase Utilizing Modified *N*-Acetyllactosamine Disaccharides

Glycobiology **9**, 661-668

Summers, M.F.; Marzilli, L.G. und Bax, A. (1986)

Complete ^1H and ^{13}C assignments of Coenzyme B_{12} through the use of new Two-Dimensional NMR Experiments

J. Am. Chem. Soc. **108**, 4285-4294

Stütz, A.E. (1966)

Ein neues Konzept zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus konfigurationserhaltender Glycosid-Hydrolasen
Angew. Chem. **108**, 2054-2056

Suzuki, S. (1962)

A Novel Uridine Nucleotide Containing *N*-Acetylglucosamine and Galactose
J. Biol. Chem. **237**(5), 1393-1399

Takayama, S.; Shimazaki, M.; Qiao, L. und Wong, C.-H. (1996)

Synthesis of Lactosamine Derivates Using β -D-Galactosidase from *Bacillus circulans*
Bioorg. Med. Chem. Lett. **6**, 1123-1126

Toone, E.J.; Simon, E.S.; Bednarsky, M.D. und Whitesides, G.M. (1989)

Enzyme-Catalyzed Synthesis of Carbohydrates
Tetrahedron **45**, 5365-5422

Trayer, I.P. und Hill, R.L. (1971)

The Purification and Properties of the A Protein of Lactose Synthetase
J. Biol. Chem. **246**, 6666-6675

Ünlügil, U.M.; Zhou, S.; Yuwaraj, S.; Sarkar, M.; Schachter, H. und Rini, J.M. (2000)

X-Ray Crystal Structure of Rabbit *N*-Acetylglucosaminyltransferase I: Catalytic Mechanism and a New Protein Superfamily
EMBO J. **19**, 5269-5280

Unverzagt, C. (1997)

Ein modulares System zur Synthese der häufigsten *N*-Glycane
Angew. Chemie **109**, Nr. 18, 2078-2081

Unverzagt, C. und Paulson, J.C. (1990)

High-Efficiency Synthesis of Sialyloligosaccharides and Sialylglycopeptides
J. Am. Chem. Soc. **112**, 9308-9309

Usui, T.; Kubota, S.; Ohi, H. (1993)

Convenient Synthesis of β -D-Galactosyl Disaccharide Derivates Using the β -D-Galactosidase from *Bacillus circulans*
Carbohydr. Res. **244**, 315-323

Usui, T.; Morimoto, S.; Hayakawa, Y.; Kawaguchi, M.; Murata, T.; Matahira, Y. und Nishida, Y. (1996)

Regioselectivity of β -D-Galactosyl-Disaccharide Formation using the β -D-Galactosidase from *Bacillus circulans*
Carbohydr. Res. **285**, 29-39

Vance, B.A.; Wu, W.Y.; Ribaud, R.K.; Segal, D.M.; Kearse, K.P. (1997)

Multiple Dimeric Forms of Human CD69 Result from Differential Addition of *N*-Glycans to Typical (Asn-X-Ser/Thr) and Atypical (Asn-X-Cys) Glycosylation Motifs
J. Biol. Chem. **272**, 23117-23122

Van den Eijnden, D.H.; Neeleman, A.P.; Van der Knaap, W.P.W.; Bakker, H.; Agterberg, M. und Van Die, I. (1994)

Control and Function of Complex-Type Oligosaccharide Synthesis. Novel Variants of the LacNAc Pathway
Adv. Exp. Med. Biol. **376**, 47-52

Van den Steen, P.; Rudd, P.M.; Dwek, R.A.; Opdenakker, G. (1998)

Concepts and Principles of O-linked Glycosylation
Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. **33**, 151-208

Van Laere, K.M.J.; Hartemink, R.; Beldman, G.; Pitson, S.; Dijkema, C.; Schols, H.A., Voragen, A.G.J. (1999)

Transglycosidase Activity of *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083
 α -Galactosidase
Appl. Microbiol. Biotech. **52**, 681-688

Varki, A. (1993)

Biological Roles of Oligosaccharides: All of the Theories are Correct
Glycobiology **3**, 97-130

Vic, G.; Scigelova, M.; Hastings, J.; Howarth, O.W. und Crout, D.H.G. (1996)

Glycosidase-Catalysed Synthesis of Oligosaccharides: Trisaccharides with the α -D-Gal-(1-3)-D-Gal terminus responsible for the Hyperacute Rejection Response in Cross-Species Transplant Rejection from Pigs to Man
Chem. Commun.

Wandall, H.H.; Hassan, H.; Mirgorodskaya, E.; Kristensen, A.K.; Roepstorff, P.;

Bennet, E.P.; Nielsen, P.A.; Hollingsworth, M.a.; Burchell, J.;

Taylor-Papadimitriou, J.; Clausen, H. (1997)

Substrate Specificities of Three Members of the Human UDP-*N*-Acetyl-D-Galactosamine:Polypeptide *N*-Acetylgalactosamiyltransferase Family, GalNAc-T1, -T2 and -T3
J. Biol. Chem. **272**, 23503-23514

Weng, S. und Spiro, R.G. (1996)

Evaluation of the Early Processing Routes of *N*-linked Oligosaccharides of Glycoproteins through the Characterisation of Man₈GlcNAc₂ Isomers: Evidence that Endomannosidase Functions in the Absence of Glucosidase Blockade.
Glycobiology **6**, 861-868

Wenz, G. (1994)

Cyclodextrine als Bausteine supramolekularer Strukturen und Funktionseinheiten
Angew. Chem. **106**, 851-870

Wilkins, P.P.; Mc Ever, R.P.; Cummings, R.C. (1996)

Structures of the *O*-Glycans on P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 from HL-60 cells
J. Biol. Chem. **271**, 18732-17742

- Woerdenbag, H.J.; Pras, N.; Frijlink, H.W.; Lerk, C.F.; Malingre, T.M. (1991)
Cyclodextrin-facilitated Bioconversion of 17 β -Estradiol by a Phenoloxidase from
Mucuna pruriens Cell Cultures
Phytochemistry **29**, 1551-1554
- Wong, C.-H.; Krach, T.; Gautheron-Le Narvor, C.; Ichikawa, Y.; Look, G.C.; Gaeta, F.;
Thompson, D. und Nicolaou, K.C. (1991)
Tetrahedron Lett. **32**, 4867-4870
- Wong, C.-H.; Ichikawa, Y.; Krach, T.; Gautheron-LeNarvor, C.; Dumas, D.P. und Look,
G.C. (1991)
Probing the Acceptor Specificity of β 1-4Galactosyltransferase for the Development
of Enzymatic Synthesis of Novel Oligosaccharides
J. Am. Chem. Soc. **113**, 8137-8145
- Wong, C.-H. und Whitesides, G.M. (1994)
Enzymes in Synthetic Organic Chemistry
Elsevier Science, Oxford
- Wong, C.-H. und Whitesides, G.M. (1995)
Tetrahedron Organic Chemistry Series Vol 12
Enzymes in Synthetic Organic Chemistry, Pergamon, 286-287
- Wong, C.-H.; Halcomb, R.-L.; Ichikawa, Y. und Kajimoto, T. (1995)
Enzyme in der organischen Synthese: das Problem der molekularen Erkennung
von Kohlenhydraten (Teil 2)
Angew. Chem. **107**, 569-593
- Yoon, J.-H. und Ajisaka, K. (1996)
The Synthesis of Galactopyranosyl Derivatives with β -Galactosidases of Different
Origins
Carbohydr. Res. **292**, 153-163

Zechel, D.L. und Withers, S.G. (2000)

Glycosidase Mechanism: Anatomy of a Finely Tuned Catalyst

Acc. Chem. Res **33**, 11-18

Zervosen, A.; Nieder, V.; Gutiérrez Gallego, R.; Kamerling, J.P.; Vliegthart J.F.G. und
Elling, L. (2001)

Synthesis of Nucleotide-Activated Oligosaccharides by β -Galactosidase from
Bacillus circulans

Biol. Chem, Februar 2001, im Druck

Zeng, S.; Dinter, A.; Eisenkrätzer, D; Biselli, M.; Wandrey, C.; Berger, E.G. (1997)

Pilot Scale Expression and Purification of Soluble Protein A tagged β 1,6N-Acetylglucosaminyltransferase in CHO cells

Biochem. Biophys. Res. Commun. **237**, 653-658