

Charakterisierung und Anwendung der rekombinanten Saccharose Synthase 1 aus Kartoffel zur Synthese von Saccharose- Analoga

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Ulrike Römer
aus Wuppertal

Jülich 2003

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

Referent: Frau Prof. Dr. M.-R. Kula

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. H. Weiß

2. Korreferent: Herr Prof. Dr. L. Elling

Tag der mündlichen Prüfung: 03.06.2003

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom Oktober 1998 bis Dezember 2001 am Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich und von Januar 2002 bis März 2003 am Lehrstuhl für Biotechnologie/Lehr- und Forschungsgebiet Biomaterialien unter der Leitung von Prof. Dr. M.-R. Kula und Prof. Dr. L. Elling angefertigt.

Diese Arbeit wurde mit finanziellen Mitteln der DFG im Rahmen des Sonderforschungsbereiches SFB 380 "Asymmetrische Synthesen mit chemischen und biologischen Methoden" Teilprojekt B26 (Projektleiter PD Dr. L. Elling) gefördert.

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab mit Genehmigung des Dekans veröffentlicht:

Römer U., Nettelstroth N., Köckenberger W. & Elling L. (2001) Characterization of Recombinant Sucrose Synthase 1 from Potato for the Synthesis of Sucrose Analogues. *Adv. Synth. Catal.*, **343**, 655-661.

Römer U., Rupprath C. & Elling L. (2003) The Donor Substrate Spectrum of Recombinant Sucrose Synthase 1 from Potato for the Synthesis of Sucrose Analogues. *Adv. Synth. Catal.*, **345**, No. 6+7.

Sinha A.K., Hofmann M.G., Römer U., Köckenberger W., Elling L. & Roitsch T. (2002) Metabolizable and Non-Metabolizable Sugar Activate Different Signal Transduction Pathways in Tomato. *Plant Physiol.*, **128**, 1480-1489.

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all denen bedanken, die durch Rat und Tat zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere möchte ich danken:

Frau Prof. Dr. M.-R. Kula für die Übernahme des Hauptreferats, ihre stete Diskussionsbereitschaft und die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut für Enzymtechnologie.

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

Herrn Prof. Dr. L. Elling, Lehrstuhl für Biotechnologie / Biomaterialien RWTH Aachen, für die freundliche Übernahme des Korreferats, die interessante Themstellung, die Betreuung der Arbeit und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. W. Köckenberger, University of Nottingham, UK, für die Bereitstellung Fluor-markierter Fructose und die Messung von NMR-Spektren.

Herrn Prof. Dr. Wandrey, Herrn Dr. Liese, Herrn Priv.-Doz. Dr. Müller, Institut für Biotechnologie I, Forschungszentrum Jülich und Herrn Priv.-Doz. Dr. Sprenger, Institut für Biotechnologie II, Forschungszentrum Jülich für die im Rahmen des SFB zur Verfügung gestellten wertvollen Substanzen.

Frau Dr. C. Bühne für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Anfertigung und Interpretation von NMR-Spektren.

Herrn Dipl.-Chem. M. Schmitz und Herrn Dipl.-Chem. A. Buchholtz für die Anfertigung vom MS-Spektren.

Frau Dipl.-Chem. N. Nettelstroth für die tatkräftige Unterstützung während ihrer Diplomarbeit.

Herrn Dipl.-Biol. T. Schumacher und Dipl.-Chem. C. Rupprath für ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft bei größeren und kleineren Problemen und insbesondere Herrn Dipl.-Chem. C. Rupprath für die schnelle und kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Frau Dr. V. Nieder, Herrn Dr. P. Iwan, Herrn Dipl.-Biol. P. Brixius und allen Mitarbeitern des IETs, insbesondere den Mitarbeitern der Zuckergruppe für die freundschaftliche und produktive Zusammenarbeit und manchen netten Abend.

Meinen Eltern und nicht zuletzt meinem Freund Dr. Axel Kühl für ihre stete Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis.....	XIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Bedeutung von Kohlenhydraten	1
1.2 Kohlenhydrate in Pflanzen.....	2
1.2.1 Synthese von Kohlenhydraten in fotosynthetisch aktiven Geweben höherer Pflanzen.....	2
1.2.2 Transport von Kohlenhydraten	4
1.2.3 Kohlenhydrate in den Speicherorganen und Verbraucherorganen	6
1.2.4 Regulation des Kohlenhydratmetabolismus	8
1.3 Die Isoenzyme der Saccharose Synthase.....	9
1.3.1 Vorkommen und Lokalisation	10
1.3.2 Klonierung und heterologe Expression von Isoenzymen der Saccharose Synthase..	12
1.3.3 Biochemische Eigenschaften der Isoenzyme.....	13
1.4 Anwendung der Saccharose Synthase	16
1.4.1 Heterologe Expression der Saccharose Synthase 1 aus Kartoffel in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
1.4.2 Synthese von Nukleotidzuckern mit Saccharose Synthase.....	19
1.4.3 Synthese von Saccharose Analoga	21
1.5 Chemische Synthese von Saccharose und Analoga.....	23
2 Zielsetzung.....	25
3 Methoden	27
3.1 Analytik	27

3.1.1	HPLC-Methoden zur Trennung von Nukleotiden und Nukleotidzuckern.	27
3.1.2	Trennung von Nukleotiden und Nukleotidzuckern mit Kapillarelektrophorese.....	29
3.1.3	HPLC-Methode zur Trennung von Mono- und Disacchariden.....	29
3.1.4	Fotometrische Bestimmung von Glucose und Saccharose	30
3.1.5	Dünnschichtchromatografie	31
3.1.6	Bestimmung des Proteingehaltes	32
3.1.7	Bestimmung der Enzymaktivität der Saccharose Synthase	33
3.1.8	Bestimmung der Nebenaktivitäten	35
3.2	Fermentation, Aufreinigung und proteinchemische Charakterisierung	36
3.2.1	Fermentation und Zellernte	36
3.2.2	Zellaufschluss.....	37
3.2.3	Kontrolle des Fermentationsverlauf.....	38
3.2.4	Aufreinigung	38
3.2.5	Proteinchemische Charakterisierung.....	41
3.3	Biochemische Charakterisierung der rekombinanten Saccharose Synthase 1	43
3.3.1	Kinetik der Spaltreaktion	43
3.3.2	Kinetik der Synthesereaktion	44
3.3.3	Auswertung der kinetischen Daten	47
3.3.4	Einfluss divalenter Kationen auf die Synthesereaktion.....	55
3.3.5	Akzeptorsubstratspektrum der Saccharose Synthase 1	56
3.3.6	Donorsubstratspektrum der Saccharose Synthase 1	60
3.3.7	Inhibitoren der Saccharose Synthase 1	62
3.4	Präparative Synthese von Saccharose-Analoga	64
3.4.1	1'-Desoxy-1'-fluoro- β -D-fructofuranosyl- α -D-glucopyranosid.....	64
3.4.2	α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranosid	65
3.4.3	α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid	67

3.4.4	α -D-Glucopyranosyl-L-arabinose.....	69
3.4.5	2-Acetamido-2-desoxy-D-glucopyranosyl- β -D-fructofuranosid.....	70
3.4.6	Aufreinigung der Saccharose-Analoga.....	71
3.4.7	Charakterisierung.....	74
3.5	Untersuchung der Saccharose-Analoga auf Hydrolyse durch Invertase	74
3.5.1	Invertasetest mit fotometrische Bestimmung von Glucose	74
3.5.2	Invertasetest mit fotometrischer Bestimmung von Glucose und Fructose.....	75
4	Ergebnisse und Diskussion	77
4.1	Fermentation, Aufreinigung und proteinchemische Charakterisierung.....	77
4.1.1	Fermentation	77
4.1.2	Aufreinigung.....	80
4.1.3	Proteinchemische Charakterisierung	83
4.2	Biochemische Charakterisierung der rekombinanten Saccharose Synthase 1	87
4.2.1	Kinetik der rekombinanten Saccharose Synthase 1	87
4.2.2	Einfluss divalenter Kationen auf die Synthesereaktion	108
4.2.3	Akzeptorsubstratspektrum der Saccharose Synthase 1.....	112
4.2.4	Donorsubstratspektrum der Saccharose Synthase 1	136
4.2.5	Inhibitoren der Saccharose Synthase 1	141
4.3	Präparative Synthese von Saccharose-Analoga.....	153
4.3.1	1'-Desoxy-1'-fluoro- β -D-fructofuranosyl- α -D-glucopyranosid	153
4.3.2	α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranosid	155
4.3.3	α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid.....	158
4.3.4	α -D-Glucopyranosyl- L-arabinose.....	161
4.3.5	2-Acetamido-2-desoxy-D-glucopyranosyl- β -D-fructofuranosid.....	165
4.4	Untersuchung der Saccharose-Analoga auf Hydrolyse durch Invertase	169
5	Zusammenfassung	173
6	Ausblick.....	175

7	Anhang	177
7.1	SD-Medium	177
7.2	Chemikalien und Enzyme	177
7.3	Geräte	179
7.4	Abkürzungen und Symbole	181
7.5	Chromatogramme und Kalibriergeraden	184
7.5.1	HPLC-Methoden zur Trennung von Nukleotiden und Nukleotidzuckern	184
7.5.2	CE-Methode zur zur Trennung von Nukleotiden und Nukleotidzuckern	185
7.5.3	HPLC-Methode zur Trennung von Mono- und Disacchariden	186
7.5.4	Fotometrische Bestimmung von Glucose und Saccharose	187
7.5.5	Kalibrierung zur Proteinbestimmung nach Bradford	188
7.5.6	NMR und MS-Spektren NMR-Spektren von 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose	189
7.5.7	NMR und MS-Spektren von α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranosid	192
7.5.8	NMR und MS-Spektren von α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid	195
7.5.9	NMR -Spektren von α -D-Glucopyranosyl- L-arabinose	198
7.5.10	NMR-Spektren von 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucopyranosyl- β -D-fructofuranosid	200
8	Literatur	203

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Transkriptionsraten der Gene <i>sus1</i> , <i>sus2</i> und <i>sus3</i> in verschiedenen Pflanzenorganen.....	10
Tabelle 1.2: Klonierungen von Saccharose Synthase Genen.	13
Tabelle 1.3 Kinetische Charakteristika der Isoenzyme Saccharose Synthase 1 (SS1) und 2 (SS2) aus Zuckerrohr (Buczynski et al. 1993).....	14
Tabelle 1.4 Kinetische Konstanten der Isoenzyme der rekombinanten Saccharose Synthase aus Erbse (Barratt et al. 2001).	14
Tabelle 1.5 Isolierung der Saccharose Synthase aus pflanzlichen Quellen zur Untersuchung des Substratspektrums.	16
Tabelle 1.6 Charakteristika der rekombinanten Saccharose Synthase 1 aus Kartoffel (Schrader 1998, Römer, 1998).....	19
Tabelle 3.1 Veränderliche Fermentationsbedingungen	37
Tabelle 3.2 Beschreibung verschiedener Produktinhibitionstypen.....	52
Tabelle 3.3 Definition der kinetischen Konstanten in einem sequenziellen Ordered-Bi-Bi-System	53
Tabelle 4.1 Fermentationsergebnisse.....	77
Tabelle 4.2 Enzymexpressionsraten der Fermentationen A bis E.	79
Tabelle 4.3 Aufreinigung der rekombinanten SuSy1 aus Kartoffel über Anionenaustauschchromatografie an Q-Sepharose FF.....	80
Tabelle 4.4 Reinigung der rekombinanten SuSy1 über Metallionen-affinitätschromatografie (Ni^{2+} -NTA).....	81
Tabelle 4.5 Feinreinigung der rekombinanten SuSy1 mit Gelfiltration.	81
Tabelle 4.6 In der vorliegenden Arbeit verwendete Enzymchargen.	82
Tabelle 4.7. Vorhersageergebnisse von NetPhos 2.0 zur Phosphorylierungs-Wahrscheinlichkeit an einem Serin (Ausschnitt) in der Sequenz von Sus1 aus <i>Solanum tuberosum</i>	84
Tabelle 4.8 Zusammenfassung der kinetischen Daten der Synthese- und Spaltreaktion berechnet über Einsubstratmodelle.....	92

Tabelle 4.9 Berechnung der kinetischen Daten der Synthesereaktion unter Annahme eines sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus. Substrat A: D-Fructose, Substrat B: UDP- α -D-Glucose, Substratinhibition durch Fructose.....	94
Tabelle 4.10 Berechnung der kinetischen Daten der Synthesereaktion unter Annahme eines sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus. Substrat A: UDP- α -D-Glucose, Substrat B: D-Fructose, Substratinhibition durch D-Fructose.....	95
Tabelle 4.11 Berechnung der kinetischen Daten der Synthesereaktion unter Annahme eines sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus. Substrat A: UDP- α -D-Glucose, Substrat B: D-Fructose, Substratinhibition durch UDP-Glucose.....	96
Tabelle 4.12 Berechnung der kinetischen Daten der Spaltreaktion unter Annahme eines sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus. Substrat A: UDP, Substrat B: Saccharose, Substratinhibition durch UDP.	97
Tabelle 4.13 Berechnung der kinetischen Daten der Spaltreaktion unter Annahme eines sequenziellen Ordered Bi Bi-Mechanismus. Substrat A: Saccharose, Substrat B: UDP, Substratinhibition durch UDP.	97
Tabelle 4.14 Berechnung der kinetischen Daten der Spaltreaktion unter Annahme eines sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus. Substrat A: UDP, Substrat B: Saccharose, Substratinhibition durch UDP.	97
Tabelle 4.15 Kinetische Daten der Synthese- und Spaltreaktion berechnet nach dem sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Modell.	98
Tabelle 4.16 Übersicht über die Inhibitionstypen der Produktinhibition von UDP und Saccharose in der Synthesereaktion	104
Tabelle 4.17 Kinetische Daten der rekombinanten SuSy1 aus Kartoffel im Vergleich zu Literaturdaten.....	107
Tabelle 4.18 Produktinhibition der Synthesereaktion durch UDP	108
Tabelle 4.19 Inhibition der Synthesereaktion der rekombinanten SuSy1 durch Cu^{2+} , Ni^{2+} und Zn^{2+}	111
Tabelle 4.20 Übersicht zur Untersuchung des Substratspektrums verschiedener SuSys aus pflanzlichen Quellen im Vergleich zur rekombinanten SuSy1 aus Kartoffel.	126
Tabelle 4.21 Kinetische Daten nicht-natürlicher Akzeptorsubstrate	132
Tabelle 4.22 Inhibition der Synthesereaktion durch Phenylglukoside.....	148

Tabelle 4.23 Mögliche Zuordnung der Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz, D_2O) von β -L-Arabinopyranosyl- α -D-glucopyranosid im Vergleich zum Spektrum von α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid.	164
Tabelle 4.24 Ergebnisse der präparativen Umsetzung nicht-natürlicher Substrate.	168
Tabelle 4.25 Hydrolytische Aktivität der Invertase gegenüber verschiedenen Disacchariden im Vergleich zu Saccharose.	171

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Funktionen von Kohlenhydraten auf der Oberfläche von Zellen.	1
Abbildung 1.2 Kohlenstoffmetabolismus in fotosynthetisch aktiven C ₃ -Pflanzen.	3
Abbildung 1.3 Zuckertransport von den fotosynthetisch aktiven Geweben („source“) zu den Speicherorganen („sink“).	5
Abbildung 1.4 Bildgebendes NMR-Verfahren.	6
Abbildung 1.5 Modell zu Cellulose Synthese an der pflanzlichen Zellmembran.	8
Abbildung 1.6 Hypothetische Signale der Speicherorgane zur Regelung des Saccharosemetabolismus in Pflanzen.	9
Abbildung 1.7 Modellvorstellung zur Steuerung der Lokalisation der Saccharose Synthese aus Mais durch Phosphorylierung.	12
Abbildung 1.8 Reaktion der Saccharose Synthese.	16
Abbildung 1.9 Expressionsplasmid pDRSuSy.	18
Abbildung 1.10 Synthese von ADP-Glucose aus AMP, ATP und Saccharose mit rekombinanter Saccharose Syntase 1 aus Kartoffel und Myokinase.	20
Abbildung 1.11 Enzymatische Synthese von <i>N</i> -Acetyllactosamin mit <i>in situ</i> Regeneration von UDP-Galactose.	21
Abbildung 1.12 Chemoenzymatische Synthese des 6-Desoxy- α -L-sorbofuranosyl- α -D-glucopyranosid.	22
Abbildung 1.13 Chemische Synthese von 2-Acetamido-2-desoxysaccharose.	24
Abbildung 3.1 Allgemeines Schema zur partiell gemischten Inhibition.	52
Abbildung 3.2 Schematische Darstellung eines sequenziellen Ordered-Bi-Bi- Mechanismus.	52
Abbildung 4.1 Fermentationsprofil von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pDR SuSy1 zur Produktion von SuSy1 aus Kartoffel im 30 l Fermenter.	78
Abbildung 4.2 SDS-PAGE zur SuSy Aufreinigung.	83
Abbildung 4.3 Nachweis der Proteinphosphorylierung mit Immuno-Western-Blots. ..	86
Abbildung 4.4 Synthesereaktion der Saccharose Synthase.	87

Abbildung 4.5 Kinetik der Synthesereaktion: D-Fructose.....	88
Abbildung 4.6 Kinetik der Synthesereaktion: UDP-Glc.....	89
Abbildung 4.7 Kinetik der Saccharose-Spaltreaktion: UDP.....	90
Abbildung 4.8 Kinetik der Saccharose-Spaltreaktion: Saccharose.....	91
Abbildung 4.9 Modell des sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus.	93
Abbildung 4.10 Schematische Darstellung einer kompetitiven Substratinhibition durch das Substrat A im sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus.....	94
Abbildung 4.11 Schematische Darstellung einer kompetitiven Substratinhibition durch das Substrat B im sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus.....	95
Abbildung 4.12 Potenzieller Enzymmechanismus der Synthesereaktion nach dem Modell des sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus, P und Q entsprechen Sac und UDP.....	96
Abbildung 4.13 Potenzieller Enzymmechanismus der Spaltreaktion nach dem Modell des sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus, P und Q entsprechen Fru und UDP-Glc.....	98
Abbildung 4.14 Produktinhibition der Synthesereaktion durch UDP gegenüber D-Fructose in der Lineweaver-Burk-Darstellung.....	99
Abbildung 4.15 Produktinhibition der Synthesereaktion durch UDP gegenüber UDP-Glc in der Lineweaver-Burk-Auftragung.....	100
Abbildung 4.16 Produktinhibition der Synthesereaktion durch UDP.....	101
Abbildung 4.17 Produktinhibition der Synthesereaktion durch Saccharose gegenüber UDP-Glc in der Lineweaver-Burk-Darstellung.....	102
Abbildung 4.18 Produktinhibition der Synthesereaktion durch Saccharose gegenüber D-Fructose.....	103
Abbildung 4.19 Schematische Darstellung des sequenziellen Iso-Ordered-Bi-Bi- Mechanismus der Synthesereaktion.....	104
Abbildung 4.20 Einfluss von Mn^{2+} auf die spez. Aktivität der rekombinanten Saccharose Synthase 1 in Syntheserichtung.....	109
Abbildung 4.21 Einfluss von Co^{2+} auf die spez. Aktivität der rekombinanten Saccharose Synthase 1 in Syntheserichtung.....	110

Abbildung 4.22 Einfluss von Cu^{2+} , Ni^{2+} und Zn^{2+} auf die spezifische Aktivität der Synthesereaktion der rekombinanten SuSy1.	111
Abbildung 4.23 Allgemeines Reaktionsschema zum Test verschiedener Akzeptorsubstrate.	112
Abbildung 4.24 Ergebnis der Untersuchung einiger Hexulosen.	113
Abbildung 4.25 Ergebnis der Untersuchung der Pentulosen D-Xylulose und L-Ribulose im Vergleich zum natürlichen Substrat D-Fructose.....	114
Abbildung 4.26 Ergebnis der Untersuchung von Heptulosen im Vergleich zu D-Fructose.	114
Abbildung 4.27 Das Substrat Lactulose.	115
Abbildung 4.28 In Inhibitionsstudien eingesetzte Akzeptorsubstrat-Analoga.	116
Abbildung 4.29 Inhibition der Synthesereaktion der Saccharose Synthase durch 5-Desoxy- β -D-fructose.....	117
Abbildung 4.30 Inhibition der Synthesereaktion der Saccharose Synthase durch DMDP.....	118
Abbildung 4.31 Einfluss von 2-Keto-3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> -dihydroxyhexan auf die Synthesereaktion der Saccharose Synthase.....	119
Abbildung 4.32 In Inhibitionsstudien eingesetzte, in ihren strukturellen Informationen stark reduzierte, Akzeptorsubstrat-Analoga.....	120
Abbildung 4.33 Einfluss von 2-Keto-5(<i>R/S</i>)-hydroxyhexan auf die Synthesereaktion der Saccharose Synthase.....	121
Abbildung 4.34 Einfluss von (<i>R/S</i>)-3-Hydroxypyrrolidin und (<i>R</i>)-3-Hydroxypyrrolidin auf die Synthesereaktion der Saccharose Synthase.	122
Abbildung 4.35 Untersuchung von Tetrosen.	122
Abbildung 4.36 Untersuchung von Pentosen.	123
Abbildung 4.37 Akzeptorsubstratscreening von Hexosen und Derivaten.	124
Abbildung 4.38 Kinetik von 1-Desoxy-1-fluorofructose.	127
Abbildung 4.39 Kinetik von L-Sorbose.	128
Abbildung 4.40 Kinetik von D-Xylulose.	129
Abbildung 4.41 Kinetik von D-Lyxose.....	130

Abbildung 4.42 Kinetik von L-Arabinose.	131
Abbildung 4.43 Modellvorstellung zur Substraterkennung von Aldosen Teil I.	134
Abbildung 4.44 Modellvorstellung zur Substraterkennung von Aldosen Teil II.	135
Abbildung 4.45 Allgemeines Schema zum Donorsubstratscreening.	137
Abbildung 4.46 Ergebnis des Screenings UDP- und dTDP-aktivierter Donorsubstrate.	137
Abbildung 4.47 Zeit-Umsatz-Kurven zum Umsatz von dTDP-Glc / UDP-Glc	138
Abbildung 4.48 Kinetik von UDP- <i>N</i> -Acetyl- α -D-glucosamin.	139
Abbildung 4.49 Kinetik von UDP- α -D-Galactose.	140
Abbildung 4.50 In Inhibitionsstudien gegenüber der Synthesereaktion von SuSy1 untersuchte Phenylglucoside.	141
Abbildung 4.51 Inhibition der Synthesereaktion der Saccharose Synthase durch Phenyl- β -D-glucosid.	142
Abbildung 4.52 Inhibition der Synthesereaktion der Saccharose Synthase durch Phenyl- β -D-glucosid gegenüber UDP-Glc in der Lineweaver-Burk- Darstellung.	142
Abbildung 4.53 Inhibition der Synthesereaktion der Saccharose Synthase durch Phenyl- β -D-glucosid gegenüber D-Fructose in der Lineweaver-Burk- Darstellung.	143
Abbildung 4.54 Einfluss von Phenyl- α -D-glucosid auf die Synthesereaktion der Saccharose Synthase.	144
Abbildung 4.55 Inhibition der Synthesereaktion der Saccharose Synthase durch <i>p</i> -Arbutin.	145
Abbildung 4.56 Inhibition der Synthesereaktion der Saccharose Synthase durch <i>p</i> -Arbutin gegenüber UDP-Glc in der Lineweaver-Burk-Darstellung.	145
Abbildung 4.57 Inhibition der Synthesereaktion der Saccharose Synthase durch <i>p</i> -Arbutin gegenüber D-Fructose in der Lineweaver-Burk-Darstellung.	146
Abbildung 4.58 Inhibition der Synthesereaktion der Saccharose Synthase durch D(-)-Salicin.	147
Abbildung 4.59 Inhibition der Synthesereaktion der Saccharose Synthase durch D(-)-Salicin gegenüber UDP-Glc in der Lineweaver-Burk-Darstellung.	147

Abbildung 4.60 Inhibition der Synthesereaktion der Saccharose Synthase durch D(-)-Salicin gegenüber D-Fructose in der Lineweaver-Burk-Darstellung.	148
Abbildung 4.61 Mechanismus einer α -konfigurationserhaltenden Glykosidase.	150
Abbildung 4.62 Untersuchung von 1-Desoxynojirimycin als Inhibitor der Synthesereaktion.	151
Abbildung 4.63 Potenzielle Wechselwirkung von 1-Desoxynojirimycin im aktiven Zentrum einer α -Glucosidase.	151
Abbildung 4.64 Einfluss von 1-Desoxynojirimycin auf die Synthesereaktion der Saccharose Synthase.	152
Abbildung 4.65 Synthese von 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose.	153
Abbildung 4.66 1'-Desoxy-1'-fluoro- β -D-fructofuranosyl- α -D-glucopyranosid	154
Abbildung 4.67 Synthese von α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranosid.	155
Abbildung 4.68 Zeit-Umsatz-Kurven zur Umsetzung von L-Sorbose.	156
Abbildung 4.69 α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranosid.	157
Abbildung 4.70 Synthese von α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid	158
Abbildung 4.71 Zeit-Umsatz-Kurven zur Umsetzung von D-Lyxose.	159
Abbildung 4.72 α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid.	160
Abbildung 4.73 Synthese von L-Arabinopyranosyl- α -D-glucopyranosid.	161
Abbildung 4.74 Zeit-Umsatz-Kurven zur Umsetzung von L-Arabinose.	162
Abbildung 4.75 Potenzielle Bindungsstellen der L-Arabinose.	163
Abbildung 4.76 β -L-Arabinopyranosyl- α -D-glucopyranosid.	164
Abbildung 4.77 Synthese von 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucopyranosyl- β -D-fructofuranosid.	165
Abbildung 4.78 Zeit-Umsatz-Kurven zur Umsetzung von UDP-GlcNAc.	166
Abbildung 4.79 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucopyranosyl- β -D-fructofuranosid.	167
Abbildung 4.80 Enzymatisch Dargestellte Saccharose-Analoga.	168
Abbildung 4.81 Untersuchung der Saccharose-Analoga auf Hydrolyse durch Invertase im Vergleich zu Saccharose (α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid, α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranosid, 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose).	169

Abbildung 4.82 Untersuchung der Saccharose-Analoga auf Hydrolyse durch Invertase im Vergleich zu Saccharose (α -D-Glucopyranosyl-L-arabinose, 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose).....	170
Abbildung 4.83 Untersuchung der Saccharose-Analoga auf Hydrolyse durch Invertase im Vergleich zu Saccharose (N-Acetylsaccharosamin, 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose).....	171
Abbildung 7.1 Beispielchromatogramm zur Trennung von Uridin, UMP, UDP-Glc und UDP.....	184
Abbildung 7.2 Kalibriergeraden von Uridin, UMP, UDP-Glucose und UDP im Konzentrationsbereich von 0-2 mM.....	184
Abbildung 7.3 Beispielchromatogramm zur Trennung von Uridin, UMP, UDP-GlcNAc und UDP.	185
Abbildung 7.4 Beispiel-Elektropherogramm zur Trennung von Uridin, UDP-Glc, UMP, UDP und UTP.....	185
Abbildung 7.5 Beispiel-Elektropherogramm zur Trennung von Thymidin, dTDP-Glc, dTDP-6d-4k-Glc, dTMP und dTDP.	185
Abbildung 7.6 Beispielchromatogramm zur Trennung von Saccharose, Glucose und Fructose.	186
Abbildung 7.7 Kalibriergeraden für Saccharose, Glucose und Fructose im Konzentrationsbereich von 0 bis 50 mM.	186
Abbildung 7.8 Kalibriergerade zur Bestimmung von Saccharose im fotometrischer Mikrotiterplattentest 0-0,1 mM Saccharose.	187
Abbildung 7.9 Kalibriergerade zur Bestimmung von Glucose im fotometrischer Mikrotiterplattentest. 0- 0,1 mM Glucose.....	187
Abbildung 7.10 Kalibriergerade zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford, 0-0,8 mg/ml BSA.....	188
Abbildung 7.11 ^1H -NMR (500 MHz, D_2O) von 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose	189
Abbildung 7.12 ^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O) von 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose.....	190
Abbildung 7.13 ^{19}F -Spektrum (470 MHz, D_2O) von 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose .	191
Abbildung 7.14 ^1H -NMR (500 MHz, D_2O) von α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranosid.....	192

Abbildung 7.15 ^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O) von α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranosid	193
Abbildung 7.16 MS-Spektrum von α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranosid	194
Abbildung 7.17 ^1H -NMR (500 MHz, D_2O) von α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid	195
Abbildung 7.18 ^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O) von α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid	196
Abbildung 7.19 MS-Spektrum von α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid	197
Abbildung 7.20 ^1H -NMR (500 MHz, D_2O) von α -D-Glucopyranosyl- L-arabinose	198
Abbildung 7.21 ^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O) von α -D-Glucopyranosyl- L-arabinose ...	199
Abbildung 7.22 ^1H -NMR (500 MHz, D_2O) von 2-Acetamido-2-desoxy- D-glucopyranosyl- β -D-fructofuranosid	200
Abbildung 7.23 ^{13}C -NMR DEPT (125 MHz, D_2O) von 2-Acetamido-2-desoxy- D-glucopyranosyl- β -D-fructofuranosid	201

1 Einleitung

1.1 Bedeutung von Kohlenhydraten

Kohlenhydrate stellen eine der vier Hauptklassen von Biomolekülen dar. Aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen in allen Lebensformen sind Kohlenhydrate die häufigsten organischen Verbindungen. Dass Zuckermoleküle auf vielfältige Weise miteinander verknüpft werden können, macht Kohlenhydrate zu potenteren Informationsträgern als Nukleinsäuren und Proteine (Sharon und Lis 1993).

Lange wurden die vielfältigen Funktionen von Kohlenhydraten verkannt. Zunächst sah man die Bedeutung von Kohlenhydraten nur in ihrer Funktion als Energieträger in Form von Monosacchariden (Glucose) oder langkettigen Speichermolekülen (Stärke, Glycogen) und als Schutz- und Gerüstsubstanzen in Pflanzen (Zellulose), Bakterien (Peptidoglycan) und Arthropoden (Chitin) (Feizi 1991, Sharon und Lis 1993).

Erst später wurde deutlich, dass komplexe Kohlenhydrate als Bestandteile von Glykokonjugaten wie z.B. Glykoproteinen, Glykolipiden und anderen Konjugaten Schlüsselemente in einer Reihe von Prozessen, z.B. der Signalgebung, der Zell-Zell-Kommunikation sowie der molekularen und zellulären Erkennung, sind (Sharon und Lis 1993, Varki 1993).

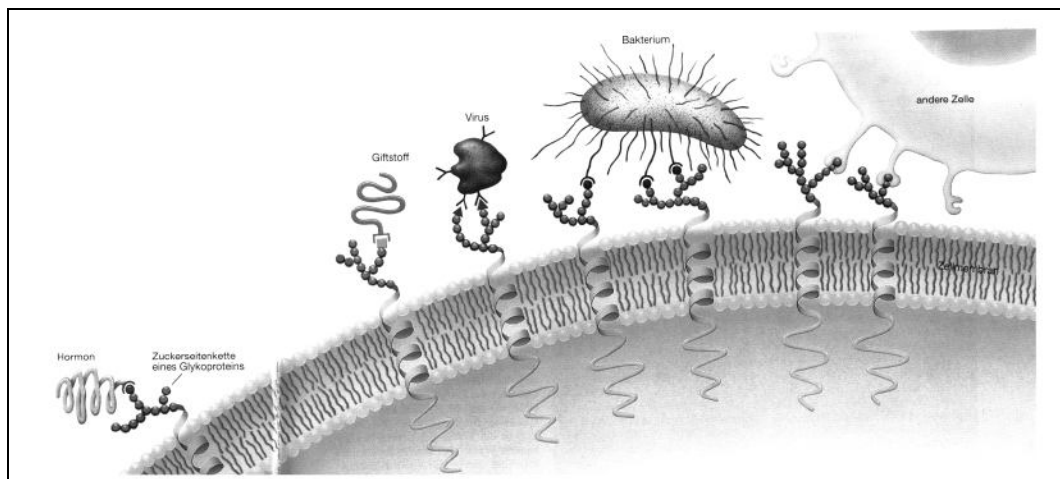


Abbildung 1.1 Funktionen von Kohlenhydraten auf der Oberfläche von Zellen (Sharon und Lis 1993)

Kohlenhydrate dienen weiterhin, als spezifische Erkennungsstrukturen für Bakterien, Viren, Toxine, blutgruppen- und tumorspezifische Antikörper, Enzyme, Hormone und Lectine (siehe Abbildung 1.1) (Hakomori 1986, Varki 1993, Brockhausen et al. 1998).

1.2 Kohlenhydrate in Pflanzen

In Pflanzen sind Stärke, Cellulose und Saccharose die bekanntesten Kohlenhydrate. Als Energieträger, Gerüstsubstanzen bzw. Transportmetaboliten werden sie aus Fructose und Glucose gebildet.

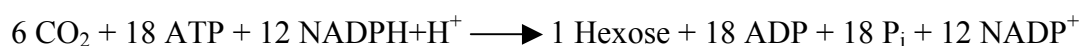
In den letzten Jahren wurden Zucker (wie z.B. 6-Desoxyglucose und Trehalose) als signalgebende Moleküle in Signaltransduktionskaskaden der Pflanze eingehend untersucht (Smeekens 2000).

Als Beispiel für die Synthese von Kohlenhydraten in Pflanzen soll im Folgenden die Biosynthese von Kohlenhydraten in C₃-Pflanzen gezeigt werden.

1.2.1 Synthese von Kohlenhydraten in fotosynthetisch aktiven Geweben höherer Pflanzen

In den Chloroplasten von fotosynthetisch aktivem Pflanzengewebe („source“) erfolgen die ersten Schritte der Kohlenhydrat-Biosynthese (Abbildung 1.2). Während der Fotosynthese wird Lichtenergie in chemische Energie (NADPH, ATP) umgewandelt. Diese wird benötigt, um Kohlendioxid reduktiv zu fixieren. Das Enzym Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase carboxyliert Ribulose-1,5-bisphosphat (RuBP) aus dessen C₆-Produkt zwei Moleküle 3-Phosphoglycerat (PGA) entstehen. Diese werden über 1,3-Bisphosphoglycerat zu Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) reduziert. In weiteren Reaktionen des Calvin Zyklus und im reduktiven Pentosephosphat-Zyklus wird Ribulose-1,5-bisphosphat ausgehend von Glycerinaldehyd-3-phosphat regeneriert. Weiterhin wird Glycerinaldehyd-3-phosphat in der Gluconeogenese für die Bildung von Glucose-6-phosphat (G6P) benötigt. Glucose-6-phosphat wird für die Biosynthese von Stärke im Chloroplasten und für die Bildung von Saccharose im Cytosol benötigt.

Um ein Hexosemolekül zu synthetisieren müssen in der Pflanze sechs CO₂, 18 ATP und 12 NADPH + H⁺ bereitgestellt werden:



Die Biosynthese von Stärke im Chloroplasten erfolgt ausgehend von Glucose-6-phosphat über Glucose-1-phosphat (G1P) als Substrat der ADP-Glucose Pyrophosphorylase. ADP-Glucose (ADP-Glc) wird von verschiedenen Stärkesynthasen

als Vorstufe (Amylose und Amylopektin) zur Stärkesynthese genutzt. Die Stärke wird dann als Korn im Chloroplasten abgelagert.

Die Biosynthese von Saccharose erfolgt ausgehend von Fructose-1,6-bisphosphat (FBP) über die Bildung von Fructose-6-phosphat (F6P). Die Bildung von Saccharose-6-phosphat (S6P) erfolgt aus Fructose-6-phosphat und UDP-Glucose (UDP-Glc), das von der UDP-Glucose Pyrophosphorylase synthetisiert wird. Die anschließende Dephosphorylierung von Saccharose-6-phosphat führt zur Bildung von Saccharose (Müller-Röbner und Koßmann 1994, Sonnewald et al. 1994, Sonnewald 2001).

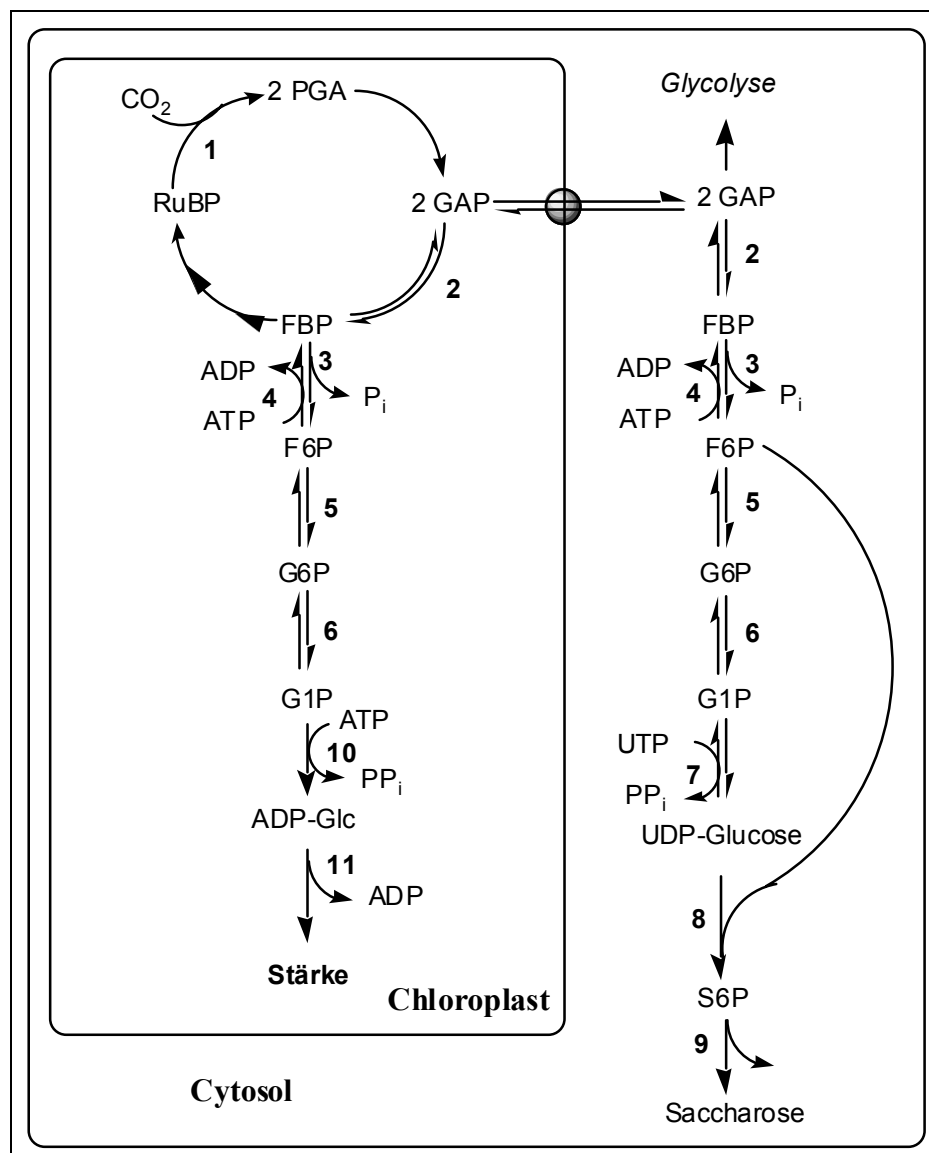


Abbildung 1.2 Kohlenstoffmetabolismus in fotosynthetisch aktiven C₃-Pflanzen (adaptiert nach Sonnewald et al. 1994). 1: Ribulosebisphosphat Carboxylase/Oxygenase, 2: Aldolase, 3: Fructosebisphosphat 1-Phosphatase, 4: Phosphofructokinase, 5: Phosphoglucose-isomerase, 6: Phosphoglucomutase, 7: UDP-Glucose Pyrophosphorylase, 8: Saccharose Phosphatsynthase, 9: Saccharose-6-phosphat Phosphatase, 10: ADP-Glucose Pyrophosphatase, 11: Stärkesynthasen.

1.2.2 Transport von Kohlenhydraten

Saccharose stellt bei den meisten Pflanzen die Haupttransportform fotosynthetisch assimilierter Kohlenhydrate dar. Sie ist ein nichtreduzierendes Disaccharid und somit weitgehend unempfindlich gegenüber chemischen Einflüssen. Die Dimerisierung der Monosaccharide hat den Vorteil, dass der osmotische Wert des Siebröhrensaftes der Pflanze so gering wie möglich gehalten wird. Bei Bedarf können die Monosaccharide Glucose und Fructose mit nur minimalem Energieaufwand enzymkatalysiert wieder aus Saccharose freigesetzt werden. Aufgrund des thermodynamischen Gleichgewichtes, das ganz auf Seiten der Monosaccharide liegt, ergibt sich ein hohes Gruppenübertragungspotential. Dies erlaubt sogar die Bildung nukleotidaktivierter Glucose mit lediglich geringem Energieaufwand (Lehmann 1996).

Um nichtfotosynthetische Gewebe und Organe mit Energie und Kohlenstoffquellen zu versorgen, wird Saccharose von den Erzeugerorganen über das Phloem in die Speicherorgane transportiert. Der Transport von Zuckern aus fotosynthetisch aktiven Geweben in die Speicherorgane ist in

Abbildung 1.3 schematisch dargestellt. Beim Saccharosetransport vom Mesophyll in das Phloem (Siebröhren/Geleitzellen-Komplex), werden zwei Wege der Übertragung unterschieden. Eine direkte symplastische Zell-zu-Zell-Diffusion über das Plasmodesmata und einen Transporter vermitteltem Export von Saccharose mit Carrier vermittelten Transport über die Siebröhren/Geleitzellen-Plasmamembran. Der Export geschieht durch apoplastische Diffusion durch das Zellwandkontinuum. Beim Import in das Phloem muss die Saccharose gegen einen Konzentrationsgradienten transportiert werden. Die hierzu benötigte Energie wird von H^+ -ATPasen bereitgestellt. In Abhängigkeit von der Art der Pflanze wird der eine oder der andere Transportweg genutzt (Lalonde et al. 1999). Weitere Aufklärung der Transportprozesse erhofft man sich von nicht-invasiven Methoden, die die Beobachtung des Transports von Metaboliten, insbesondere von Saccharose, in der lebenden Pflanze zulassen. Hierzu entwickelte Köckenberger (Köckenberger 2001b) eine bildgebende *in vivo* NMR-Technik, mit der geringe Mengen markierter Metabolite (z.B. ^{13}C oder F- markiert) in der Pflanze verfolgt werden können. Ein Beispiel ist die Anreicherung von Metaboliten im Hauptwachstumsbereich der Pflanzen. Die Verfügbarkeit der markierten Metabolite in ausreichenden Mengen stellt ein Problem dieser Methode dar.

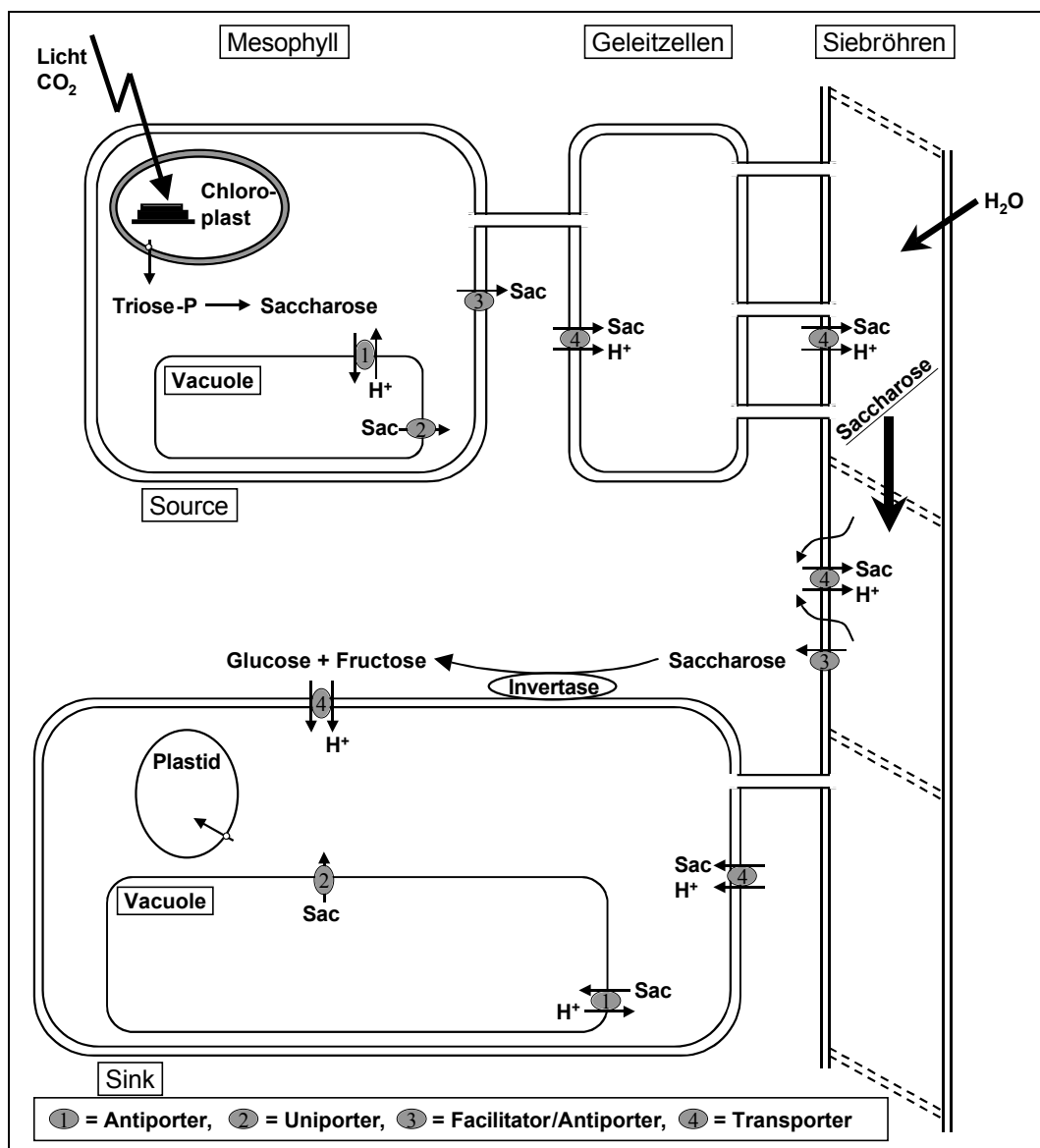


Abbildung 1.3 Zuckertransport von den fotosynthetisch aktiven Geweben („source“) zu den Speicherorganen („sink“) (Lalonde et al. 1999).

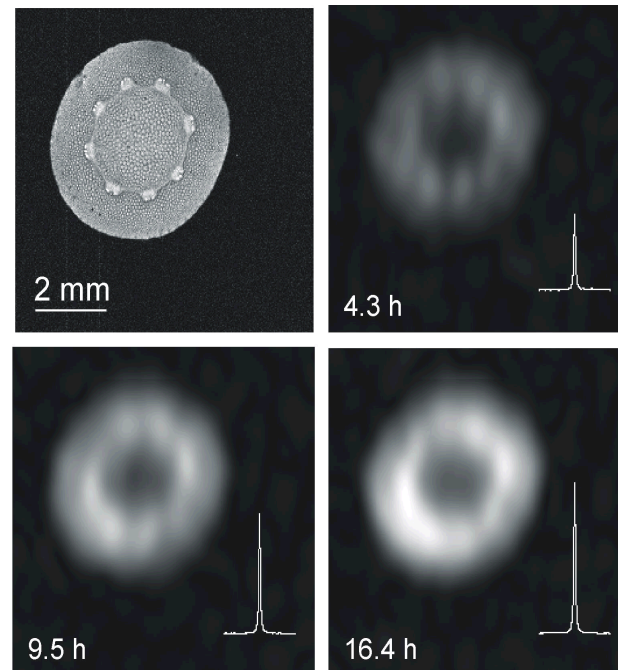


Abbildung 1.4 Bildgebendes NMR-Verfahren: (von oben links nach recht unten) 1: ^1H -NMR des Hypocotyls, 2-4: Anreicherung ^{13}C -markierter Saccharose im Hypocotyl über 16,4 h (Köckenberger 2001a, Köckenberger 2001b).

1.2.3 Kohlenhydrate in den Speicherorganen und Verbraucherorganen

Speicherorgane (z.B. Wurzelknollen (Kartoffel), Getreidekörner und Samen), Wachstumsbereiche und die energieverbrauchenden Organe sind die Hauptverbraucher von Saccharose in der Pflanze. Die Monosaccharide in der Saccharose werden durch zwei verschiedene Enzyme mobilisiert. Invertase katalysiert die nicht reversible Hydrolyse von Saccharose zu Glucose und Fructose. In einer reversiblen Reaktion wird durch Saccharose Synthase (Sucrose Synthase, SuSy EC 2.4.1.13), Saccharose mit UDP zu Fructose und UDP-Glucose, unter Erhalt der Energie der glykosidischen Bindung, gespalten. Diese Reaktion nimmt eine zentrale Rolle im Kohlenhydratstoffwechsel von Pflanzen ein. Die entstehende UDP-Glucose ist eine wichtige Vorstufe in der Biosynthese von Stärke und den in die Zellwandbiosynthese eingehenden Bausteinen UDP-Xylose, UDP-Arabinose und UDP-Glucuronsäure (Avigad 1982, Feingold 1982).

In den Speicherorganen werden Kohlenhydrate insbesondere in Form von Stärke abgelagert. Nach Export der Saccharose aus dem Phloem kann ihr Import in das Cytosol der Speicherzellen erfolgen. Der Import erfolgt direkt über Saccharose Transporter, das Plasmodesmata oder indirekt mittels Hexose-Transporter nach Spaltung durch eine apoplastische Invertase. Saccharose wird im Cytosol der Speicherzellen durch das Enzym Saccharose Synthase in Fructose und UDP-Glc gespalten. Fructose wird über die Fructokinase in Fructose-6-phosphat umgewandelt, und UDP-Glc wird in einer von

Pyrophosphat abhängigen Reaktion, die durch UDP-Glc Pyrophosphorylase katalysiert wird, zu Glucose-1-phosphat umgesetzt. Das Hexulosephosphat wird nach Isomerisierung durch Phosphoglucose-Isomerase als Glucose-6-phosphat in den Amyloplasten transportiert und in Glucose-1-phosphat umgewandelt. Anschließend erfolgt die Umsetzung durch ADP-Glucose Pyrophosphorylase zu ADP-Glucose, dem Substrat der Stärkesynthasen (Loef et al. 2001, Müller-Röbner und Koßmann 1994).

In den Wachstumsbereichen von Pflanzen werden Kohlenhydrate in Form von Cellulose [(1-4) β -D-Glucan], dem Hauptbestandteil der Zellwand, gespeichert. Baumwollfasern sind ein Beispiel in denen der Speichermechanismus fast ausschließlich auf die Synthese von Cellulose, insbesondere während der Synthese der zweiten Zellwand, ausgerichtet ist. Eine besondere Rolle bei der Biosynthese von Cellulose und auch Callose [(1-3) β -D-Glucan] spielt das Enzym Saccharose Synthase. Nach einem Modell von Amor et al. (Amor et al. 1995) bildet die an der Plasmamembran assoziierte Saccharose Synthase einen Komplex mit den Transmembranproteinen Cellulose Synthase und Callose Synthase und versorgt diese direkt mit dem Substrat UDP-Glucose. Cellulose bzw. Callose wird unter Abspaltung von UDP synthetisiert (Abbildung 1.5.). Die Vorteile der Kopplung von Saccharose Synthase und den Glucan Synthasen sind (1) die Förderung der Synthese von Cellulose/Callose aus Saccharose ohne zusätzlichen Energieaufwand, (2) die Vermeidung von Kompetitionen mit anderen UDP-Glc verbrauchenden Biosynthesewegen und (3) das interne Recycling von UDP, das sowohl die Cellulose Synthase als auch die Callose Synthase inhibiert (Haigler et al. 2001). Für die Callose Biosynthese fand Hong et al. (Hong et al. 2001) die zusätzliche Beteiligung einer UDP-Glc Transferase, welche den Transfer von UDP-Glc von Saccharose Synthase (SuSy, Sucrose Synthase, EC 2.4.1.13) zur Callose Synthase katalysiert.

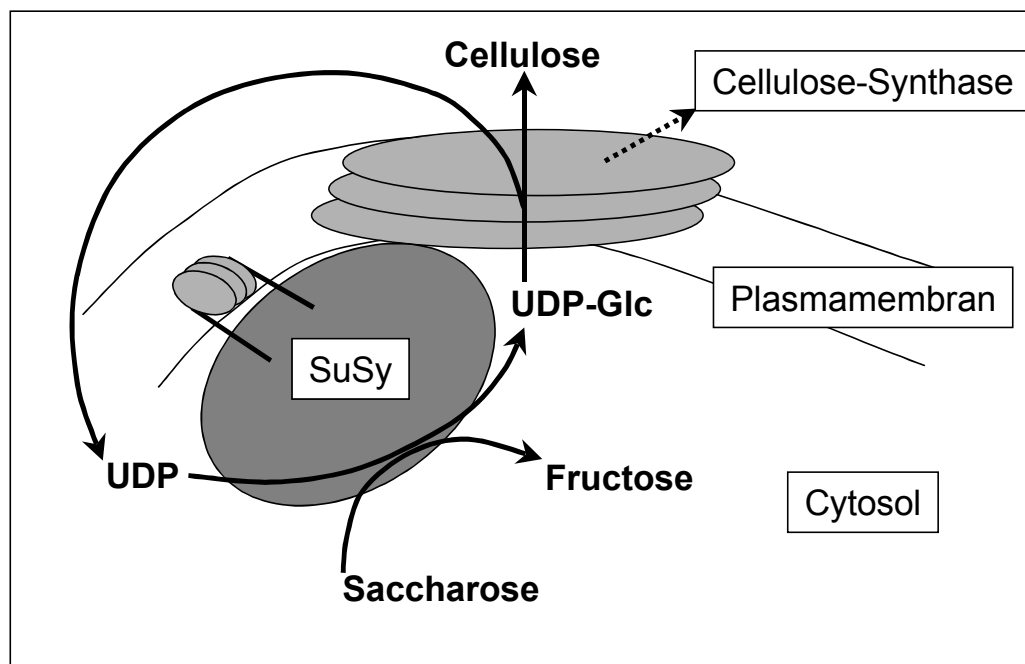


Abbildung 1.5 Modell zu Cellulose Synthese an der pflanzlichen Zellmembran (adaptiert nach (Amor et al. 1995) und (Haigler et al. 2001)).

1.2.4 Regulation des Kohlenhydratmetabolismus

Die Regulation des Kohlenhydratmetabolismus spielt eine zentrale Rolle beim Wachstum und der Entwicklung von Pflanzen. Diese Vorgänge zu verstehen, insbesondere die Regulation durch Kohlenhydrate selbst, ist momentan in der Forschung von großem Interesse.

Durch Signale, die von den Verbraucherorganen ausgehen, kann z.B. der Kohlenhydratmetabolismus in den fotosynthetisch aktiven Geweben dem Bedarf der Verbraucherorgane angepasst werden. Es gibt zwei verschiedene Konzepte, wie die Signalgebung aussehen kann. Die Signalgebung kann durch Phytohormone oder durch Zucker, z.B. Saccharose, erfolgen (Abbildung 1.6) (Sonnwald 2001). Die Wirkmechanismen von Hormonen und Zuckern sind ähnlich. Zwischen einem Zuckermolekül und einem Sensorprotein kommt es zu einer Interaktion. Dabei wird ein Signal generiert, das eine Signaltransduktionskaskade induziert und zu einer zellulären Antwort führt, die sich in Form einer geänderten Genexpression oder einer geänderten enzymatischen Aktivität äußert (Smeekens 2000).

Für Hexosen und Saccharose existieren separate Sensorsysteme. Insbesondere die Untersuchung des „Saccharose-Sensing“ ist schwierig, da Saccharose leicht durch Invertase hydrolysiert wird. Um eine direkte Funktion von Saccharose nachweisen zu können, benötigt man nicht-hydrolysierbare Saccharose-Analoga (Smeekens 2000).

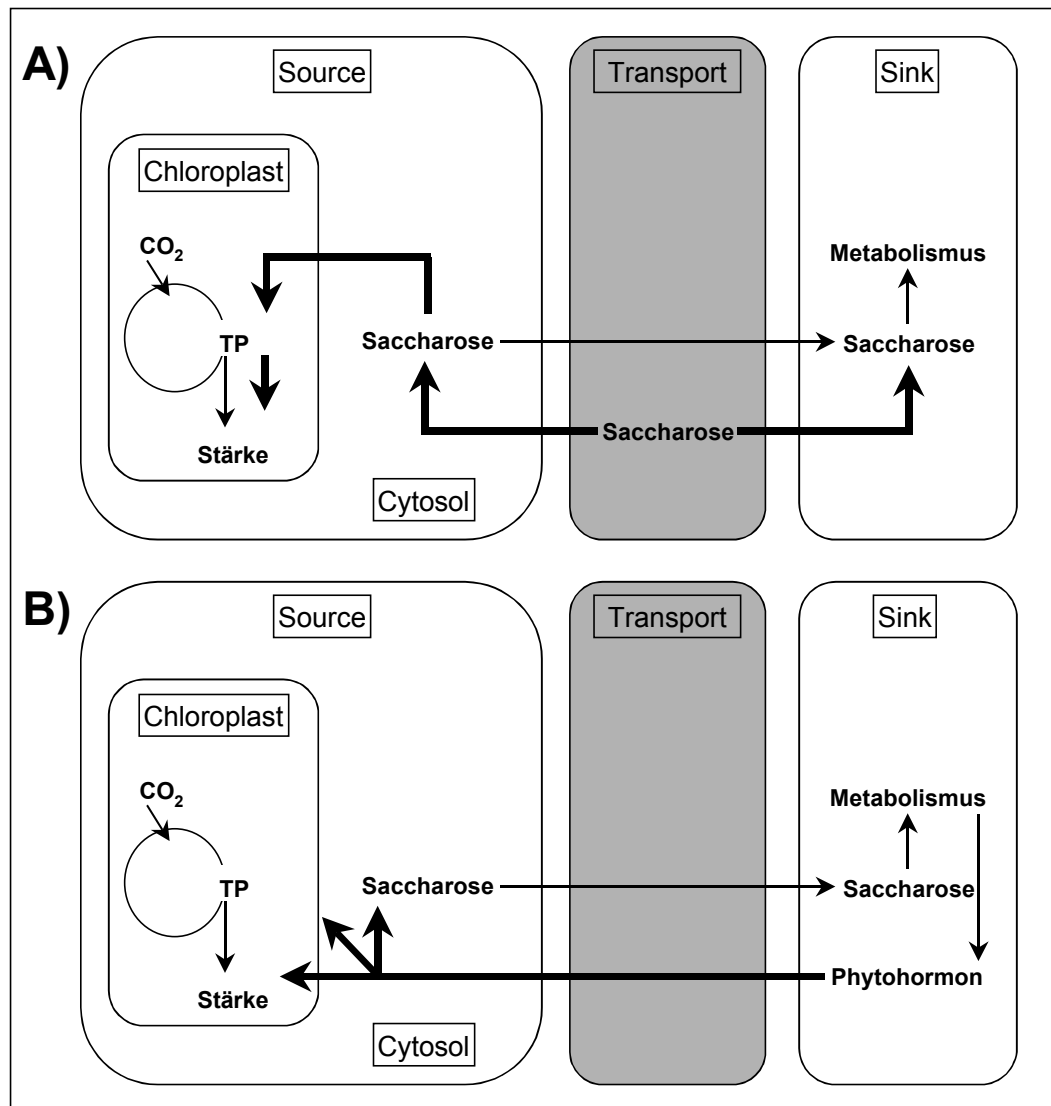


Abbildung 1.6 Hypothetische Signale der Speicherorgane (Pfeile mit großer Strichstärke), die den Saccharosemetabolismus der Pflanze regeln. **A:** Saccharose oder andere nicht verbrauchte Zucker als Signalgeber zur Regulation der Fotosynthese. **B:** Hormonelle Signale als Regulatoren der Produktion von Assimilaten (Sonnewald 2001).

1.3 Die Isoenzyme der Saccharose Synthase

In dem vorangehenden Kapitel wurde die Bedeutung von Saccharose Synthase (Sucrose Synthase, SuSy EC 2.4.1.13) in der Biosynthese von Kohlenhydraten angesprochen. Dieses Enzym wird im Folgenden genauer betrachtet. Saccharose Synthase wurde bereits aus vielen pflanzlichen Enzymquellen isoliert und charakterisiert. Eine Übersicht gibt Avigad (Avigad 1982). Saccharose Synthase wurde 1955 erstmals von Cardini (Cardini et al. 1955) aus Weizenkeimlingen isoliert. Er machte die Beobachtung, dass SuSy sowohl die Saccharosesynthese als auch die Spaltung katalysiert. Im Jahr 1971

fanden Wolosiuk und Pontis (Wolosuik und Pontis 1971) in Jerusalem Artischocke erstmals zwei Formen der SuSy, die sich in ihrem kinetischen Verhalten unterschieden. Damals wurde die Existenz von zwei Isoformen mit der Fähigkeit von SuSy, sowohl die Spaltung als auch die Synthese zu katalysieren, in Verbindung gebracht. Jedoch ist bis heute die Rolle der verschiedenen Isoenzyme unklar (Barratt et al. 2001).

1.3.1 Vorkommen und Lokalisation

Bisher sind in Pflanzen und Prokaryonten 30 verschiedene *sus* Gene identifiziert worden. In Pflanzen werden in der Regel 2-3 Isogene (*sus1*, *sus2*, *sus3*) ausgeprägt. Die Transkription und die Translation der verschiedenen Isogene werden unterschiedlich reguliert (Winter und Huber 2000). Northern-Blot Analysen verschiedener Pflanzenorgane der Erbsen (Barratt et al. 2001) und des Reis (Huang et al. 1996, Wang und Sayion 1997) zeigten, dass die Transkription der Gene abhängig vom Pflanzenorgan und dem Entwicklungsstadium der Pflanze ist.

In Erbsen waren *sus1* Transkripte in allen untersuchten Organen zu finden. Eine Übersicht über die Verteilung der *sus* Transkripte ist in Tabelle 1.1 zusammengestellt.

Tabelle 1.1 Transkriptionsraten der Gene *sus1*, *sus2* und *sus3* in verschiedenen Pflanzenorganen

Organ	<i>sus1</i>	<i>sus2</i>	<i>sus3</i>
Wurzelknöllchen (<i>R. leguminosarum</i> infiziert)	hoch		niedrig
Wurzel	hoch		
junge Embryos	hoch		niedrig
ältere Embryos	niedrig		
junge Testa	hoch		niedrig
ältere Testa	niedrig	hoch	
Blüten	niedrig		niedrig
Stängel	niedrig		
Hülsen	niedrig		
junge Blätter		hoch	
vollentwickelte Blätter	keine	hoch	niedrig

Wang et al. (Wang et al. 1999) untersuchten die Transkription der *sus* Gene (*sus1*, *sus2* und *sus3*) aus Reis. Die Gene *sus1* und *sus2* waren in allen Geweben sich entwickelnder Reiskeimlinge zu finden, während *sus3* Transkripte nur in den Samen nachzuweisen waren. Genauere Untersuchungen der Transkripte von *sus1* und *sus2* in den Blättern und Wurzeln der Keimlinge zeigten, dass sich die Verteilung in Abhängigkeit vom Alter und vom Entwicklungsstadium der Keimlinge ändert. In jungen Keimlingen finden sich Transkripte von *sus1* nur im Mesophyll, in älteren Keimlingen dagegen im Phloem.

Saccharose Synthase kommt in löslicher, membran-assoziiierter und actin-gebundener Form vor. Mit Hilfe eines Immuno-Gold-Labeling untersuchte Brangeon et al. (Brangeon et al. 1996) die Verteilung von SuSy in jungen Maisblättern. Das Enzym konnte im Cytosol sich teilender meristematischer Zellen, expandierender Zellen der Elongationszone, Zellen von jungem fotosynthetischem Gewebe, in Schutzzellen und untergeordneten Zellen des Stomas sowie in Begleitzellen des Phloemgewebes nachgewiesen werden. Nicht nachweisbar war das Enzym in fotosynthetisch aktiven Zellen. Amor et al. (Amor et al. 1995) beschrieb erstmals eine membran-assoziierte Form von SuSy und deren besondere Bedeutung in der Cellulose- und Callose-Synthese (vgl. Kapitel 1.2.3). Die Existenz einer membran-assoziierten SuSy konnte auch im Mais Endosperm (Carlson und Chourey 1996), im Stängel-Pulvinus und Elongationszonen in Blättern von Maispflanzen (Winter et al. 1998) sowie in Baumwollfasern (Haigler et al. 2001) nachgewiesen werden. Carlson und Chourey (Carlson und Chourey 1996) zeigten, dass beide in Mais vorkommenden Isoenzyme in membran-assoziiierter Form vorliegen können. Winter et al. (Winter et al. 1998) zeigten, dass SuSy auch in actin-gebundener Form vorliegen kann.

Es konnte gezeigt werden, dass eine reversible posttranslationale Proteinphosphorylierung einen regulatorischen Einfluss auf die Lokalisation von SuSy hat. Lösliche Mais SuSy im Cytosol ist *in vivo* stärker phosphoryliert. Diese phosphorylierte Form ist weniger hydrophob und kommt somit selten in membran-assoziiierter Form vor (Winter et al. 1997, Zhang et al. 1999). Das phosphorylierte, lösliche Enzym ist weiterhin teilweise über eine actinbindende Domäne an das Cytoskelett im Cytosol gebunden (Winter et al. 1998). Eine Modellvorstellung von Winter et al. (Winter und Huber, 2000) zur Regulation und Lokalisation der Saccharose Synthase aus Mais durch Proteinphosphorylierung ist in Abbildung 1.7 wiedergegeben. Unterschiede im Phosphorylierungsgrad zwischen der löslichen und membran-gebundenen Form konnten dagegen Haigler et al. (Haigler et al. 2001) für Baumwoll SuSy nicht feststellen. Das native Enzym wies eine Phosphorylierung ausschließlich an Ser11 auf, während die *in vitro* Phosphorylierungen mit einer Proteinkinase weitere Phosphorylierungen an hochkonservierten Serin-Resten zur Folge hatte. Dies lässt sie zu dem Schluss kommen, dass eine Übertragung der *in vitro* Ergebnisse auf die *in vivo* Situation mit großen Schwierigkeiten verbunden ist. Es existieren somit keine schlüssigen Ergebnisse zu der Frage, ob die intrazelluläre Lokalisation von SuSy tatsächlich durch die Phosphorylierung gesteuert wird.

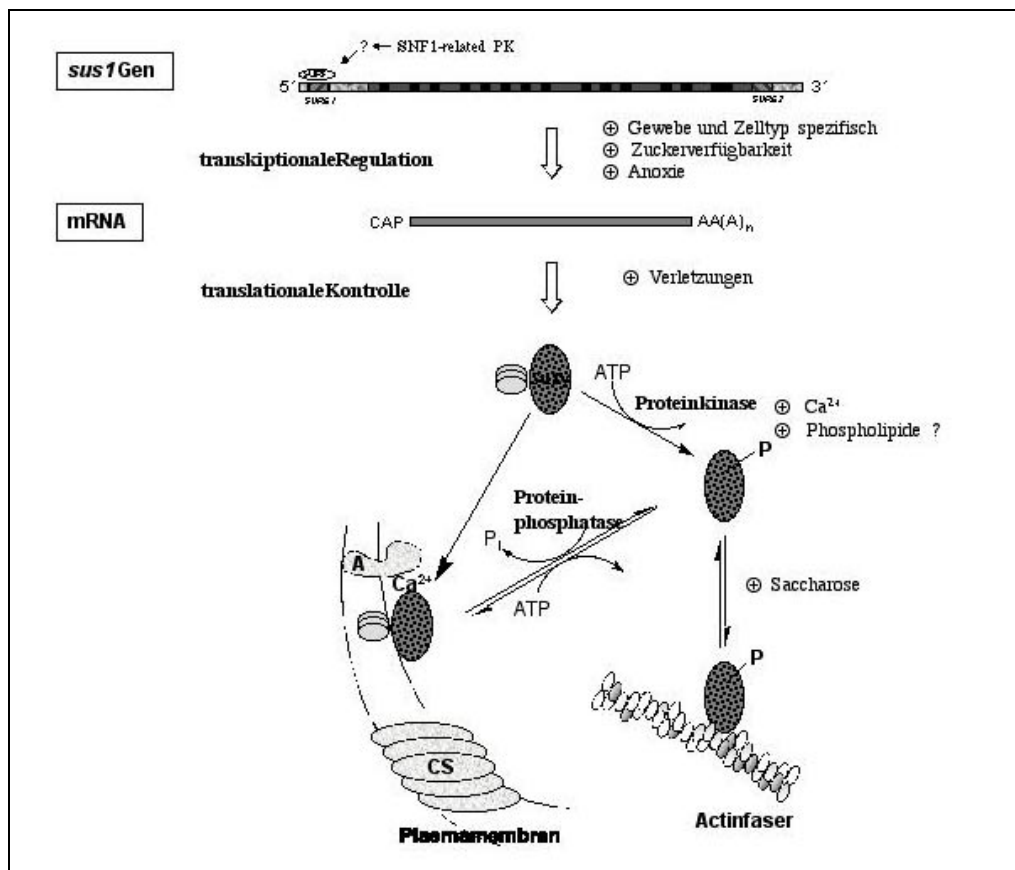


Abbildung 1.7 Modellvorstellung zur Steuerung der Lokalisation der Saccharose Synthase aus Mais durch Phosphorylierung (Winter und Huber 2000).

1.3.2 Klonierung und heterologe Expression von Isoenzymen der Saccharose Synthase

Riesmeier et al. (Riesmeier et al. 1992) expremierten erstmals das Gen *sus1* aus Kartoffel in *Saccharomyces cerevisiae* mit Expressionsraten von 25 mU/mg Protein. Seitdem sind die heterologen Expressionen von verschiedenen *sus* Genen aus 5 weiteren Organismen publiziert worden (Tabelle 1.2). Nakai et al. (Nakai et al. 1997) publizierten 1997 die Expression von *sus1* aus Mungobohnenkeimlingen in *Escherichia coli* mit einer Ausbeute von ca. 11 mg Enzym pro Liter Kulturvolumen. Die spezifische Aktivität nach Aufreinigung des rekombinanten Enzyms unterscheidet sich stark in Synthese- und Spaltrichtung. Für die Syntheserichtung geben Nakai et al. eine spez. Aktivität von 11,3 $\mu\text{mol/h}\cdot\text{mg}$ ($\approx 0,18 \mu\text{mol/min}\cdot\text{mg}$) und für die Spaltrichtung von 1,08 $\mu\text{mol/h mg}$ ($\approx 0,018 \mu\text{mol/min}\cdot\text{mg}$) an. Die drei Saccharose Synthase Gene aus Reis (Sayion et al. 1999) und Erbse (Barratt et al. 2001) wurden ebenfalls in *E. coli* expremiert. Saccharose Synthase aus Sojabohnenknöllchen (Zhang et al. 1999) konnte mit einer spez. Aktivität von 0,26 U/mg und eine Expressionsrate von 16-26 U/g *E. coli*

Zellen expremiert werden. Aus einer 2 L Kultur konnte Sayion et al. (Sayion et al. 1999) 685 U rekombinante SuSy1 aus Reis in *E. coli* mit einer hohen spez. Aktivität von 1,5 U/mg gewinnen. Reis SuSy2 zeigte sich in *E. coli* sehr instabil, so dass hauptsächlich Bruchstücke des Enzyms nachgewiesen werden konnten und die Expression von Reis *sus3* führte zu inclusion bodies. Schrader (Schrader 1998) konnte das *sus1* Gen aus Kartoffel in *Saccharomyces cerevisiae* mit einer spez. Aktivität von 0,38 U/mg und einer Expressionsrate von ca. 8 U/g Zellfeuchtmasse produzieren. Mit einer Expression in Hefe bietet sich der Vorteil, dass posttranslationale Modifikationen des Proteins, insbesondere Phosphorylierungen, eingeführt werden (Gellissen et al. 1992).

Tabelle 1.2: Klonierungen von Saccharose Synthase Genen.

Herkunft	Gen	Expressionsorganismus	Literatur
Kartoffel	<i>sus1</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Riesmeier et al. 1992)
Mungobohnenkeimlinge	<i>sus1</i>	<i>Escherichia coli</i>	(Nakai et al. 1997)
Reis	<i>sus1</i> , <i>sus2</i> ^{a)} , <i>sus3</i> ^{a)}	<i>Escherichia coli</i>	(Sayion et al. 1999)
Sojabohne	<i>ss</i> (nudolin-100)	<i>Escherichia coli</i>	(Zhang et al. 1999)
Anabaena	<i>susA</i> (SS-II)	<i>Escherichia coli</i>	(Curatti et al. 2000)
Erbse	<i>sus1</i> , <i>sus2</i> , <i>sus3</i>	<i>Escherichia coli</i>	(Barratt et al. 2001)
Kartoffel	<i>sus1</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Schrader 1998)

^{a)} Proteinexpression als Bruchstück bzw. in Form von Inclusion Bodies.

Eine Ausnahme bei den bisher klonierten Saccharose Synthase Genen bildet die Klonierung von *susA* aus der Blaualge *Anabaena* sp. (strain PCC 7119), einem filamentbildendem Cyanobacterium. In der Blaualge wurden zwei Isoformen der Saccharose Synthase identifiziert. Die Isoform SS-II wurde in *E. coli* expremiert. Diese, aus einem prokaryontischen Organismus stammende SS-II weist bemerkenswerte Unterschiede zu den pflanzlichen SuSys auf. Die Aminosäuresequenz weist lediglich eine Identität von 30-40% zu den SuSys aus Pflanzen auf. Auch findet man keine Identität in dem in Pflanzen hochkonservierten N-Terminus (Curatti et al. 2000).

1.3.3 Biochemische Eigenschaften der Isoenzyme

Wolosiuk und Pontis (Wolosiuk und Pontis 1971) gelang erstmals die Isolierung von zwei Isoenzymen (Form A und B) aus Artischocke mit Hilfe der Isoelektrofokussierung. Form A und B eluierten bei einem pH-Wert von 5,5 bzw. 5,9. Beiden Formen wiesen eine sehr unterschiedliche Affinität zu Saccharose auf (Form A $K_m = 56$ mM; Form B $K_m = 200$ mM). Weiter Arbeiten zeigten für die Isoenzyme der SuSy Unterschiede in den pH-Optima der Synthese- und Spaltreaktion von Saccharose

und in den kinetischen Konstanten. Die drei Isoenzyme aus Erbsenkeimlingen unterschieden sich in ihren pH-Optima, Temperaturstabilitäten und Substratspezifitäten (Sung und Su 1977). Buczynski et al. (Buczynski et al. 1993) isolierten aus Zuckerrohr mit Hilfe von Immunoaffinitätschromatografie zwei Isoenzyme die sich in den kinetischen Parametern, insbesondere in Saccharose Syntheserichtung, deutlich unterschieden (Tabelle 1.3).

Tabelle 1.3 Kinetische Charakteristika der Isoenzyme Saccharose Synthase 1 (SS1) und 2 (SS2) aus Zuckerrohr (Buczynski et al. 1993).

Substrat	SS1 Km [mM]	SS2 Km [mM]
UDP	0,022	0,032
Saccharose	44,5	53,5
UDP-Glucose	0,327	1,3
Fructose	15,8	2,77

Diese grundsätzlichen Ergebnisse wurden für die rekombinanten Isoenzyme SuSy1, 2 und 3 aus Erbse bestätigt (Barratt et al. 2001) (Tabelle 1.4). Die in *E. coli* expremierten Isoenzyme zeigten insbesondere deutliche Unterschiede in der Affinität zu UDP-Glucose und in der Substratüberschussinhibition durch Fructose.

Tabelle 1.4 Kinetische Konstanten der Isoenzyme der rekombinanten Saccharose Synthase aus Erbse (Barratt et al. 2001).

Substrat	Kinetische Konstante [mM] der Isoform von		
	sus1	sus2	sus3
UDP K_m	0,082	0,145	0,114
UDP K_i	0,107	0,175	0,072
Saccharose K_m	32,1	42,7	67,5
UDP-Glucose K_m	0,209	0,058	0,09
UDP-Glucose K_i	0,041	0,059	0,126
Fructose K_m	10,4	20,9	9,1
Fructose K_i	42,1	> 100	> 100

Im Jahr 1996 stellten Huber et al. (Huber et al. 1996) fest, dass Saccharose Synthase durch eine Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase posttranslational an einem Serinrest in einer hochkonservierten N-terminalen Sequenz (Mais Ser11, Mungobohne Ser11, Sojabohne Ser15) phosphoryliert wird. Die kinetische Analyse des *in vitro* phosphorylierten Enzyms erbrachte mit dem nativen phosphorylierten Enzym vergleichbare Affinitäten für die Substrate UDP und Saccharose. Die Autoren schlossen auf eine Begünstigung der Spaltreaktion in den Speicherorganen, die durch Proteinphosphorylierung reguliert wird. Allerdings wurde diese Schlussfolgerung später zurückgenommen, da die Unterschiede in den Kinetiken physiologisch nicht signifikant sind (Winter et al. 1997). Auch für SuSy aus Sojabohnenknöllchen konnte kein signifikanter Effekt in der Kinetik der Saccharosespaltung durch Phosphorylierung beobachtet werden (Zhang und Chollet

1997). Dagegen fand Nakai et al. (Nakai et al. 1998) für in *E. coli* rekombinant hergestellte SuSy einen, im Vergleich zum nativen Enzym, um das 10-fache erhöhten K_m -Wert für Saccharose und eine verminderte Bildungsrate für UDP-Glucose. In der Synthesereaktion waren die Kinetiken der beiden Enzyme vergleichbar. Das Ergebnis führt Nakai et al. (Nakai et al. 1997) auf die fehlende Phosphorylierung an Ser11 im Fall der rekombinanten SuSy aus Mungobohnen zurück. Die *in vitro* Phosphorylierung und Austausch des Ser11 gegen saure Aminosäuren (Asp, Glu) erhöhten die Affinität zu Saccharose und war mit den kinetischen Daten des nativen Enzyms vergleichbar (Nakai et al. 1998). Weitere Hinweise liefert ein Vergleich der K_m -Werte der kürzlich in *E. coli* klonierten Isoenzyme aus Erbse (Barratt et al. 2001) (Tabelle 1.4) mit einer Präparation aus den Samenhüllen der Erbse (Dejardin et al. 1997) (K_m -Werte UDP: 0,025 mM, Saccharose: 33 mM, Fructose: 7,2 mM, UDP-Glc: 0,158 mM). Es treten geringe Unterschiede sowohl in der Synthese- als auch in der Spaltreaktion auf. *In vitro* phosphorylierte Saccharose Synthase aus Tomaten zeigte ebenfalls Unterschiede in ihrer kinetischen Affinität gegenüber Saccharose und UDP (Anguenot et al. 1999). Der Unterschied der kinetischen Daten zwischen unphosphorylierter und einfach-phosphorylierter SuSy war gering und liegt innerhalb des angegebenen Fehlerbereichs. Mit zunehmendem Phosphorylierungsgrad steigt jedoch die Affinität gegenüber Saccharose und UDP.

Obwohl, wie oben gezeigt, das Enzym Saccharose Synthase eingehend kinetisch untersucht wurde, ist der Mechanismus der durch Saccharose Synthase katalysierten Reaktion bisher nicht geklärt. Wolosiuk und Pontis (Wolosiuk und Pontis 1974) und Doehlert (Doehlert 1987) schlagen anhand der von ihnen ermittelten Daten einen sequentiellen Ordered Bi Bi-Mechanismus vor. Dagegen werden von Delmer (Delmer 1972) ein Random-Mechanismus und von Su et al. (Su et al. 1976) ein Iso-Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus postuliert. Die Katalysereaktion erfolgt unter Retention der α -anomeren Konfiguration der D-Glucose, wobei die Katalysereaktion über ein Oxocarbonium-Ion oder einen kovalenten Glycosyl-Enzym-Komplex als Intermediate erfolgen könnte (Singh et al. 1987).

1.4 Anwendung der Saccharose Synthase

Seit der Entdeckung der Saccharose Synthase in Weizenkeimlingen durch Cardini et al. (Cardini et al. 1955), wurde das Enzym aus vielen pflanzlichen Quellen aufgereinigt. Saccharose Synthase katalysiert als einzige bekannte Leloir-Glycosyltransferase sowohl die Spaltung wie auch die Synthese von Saccharose. Die Reversibilität der Reaktion wird durch die vergleichbaren Größenordnungen der freien Standardenergien von UDP-D-Glucose $\Delta G^{\circ}_{\text{UDP-Glc}} = -31,8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ und Saccharose $\Delta G^{\circ}_{\text{Sac}} = -29,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ermöglicht (Grothus 1993). *In vitro* kann das Enzym je nach Wahl des pH-Wertes und damit nach Lage des Gleichgewichtes sowohl zur Synthese von Nukleotidzuckern als auch von Disacchariden eingesetzt werden (Copeland 1990) (Abbildung 1.8).

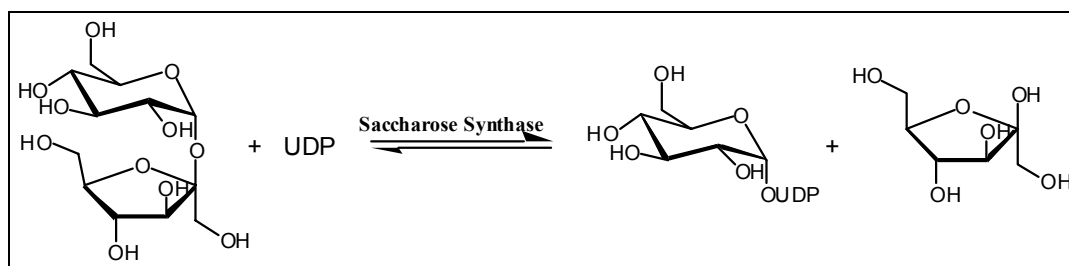


Abbildung 1.8 Reaktion der Saccharose Synthase.

Das breite Substratspektrum der Saccharose Synthase in Spalt- und Synthesereaktion (Echt und Chourey 1985) macht dieses Enzym besonders interessant für die Synthese von Nukleotidzuckern und Disacchariden. Das Enzym wurde aus unterschiedlichen Quellen isoliert um das Substratspektrum zu untersuchen. Eine Übersicht befindet sich in Tabelle 1.5.

Tabelle 1.5 Isolierung der Saccharose Synthase aus pflanzlichen Quellen zur Untersuchung des Substratspektrums.

Quelle	Literatur
Weizen	(Cardini et al. 1955, Cardini und Recondo 1962)
Erbse	(Bean und Hassid 1955, Gabrielyan et al. 1969, Sung und Su 1977)
Zuckerrübe	(Avigad und Millner 1966)
Kartoffel	(Slabnik et al. 1968)
Phaseolus aureus	(Grimes et al. 1969, Delmer 1972)
Bambus	(Su et al. 1977)
Mais	(Su und Preiss 1977)
Lein	(Sharma und Bhatia 1980)
Gerste	(Card und Hitz 1984, Card et al. 1986)
Sojabohne	(Morell und Copeland 1985)
Pfirsich	(Moriguchi und Yamaki 1988)
Reis	(Elling et al. 1993, Grothus 1993)

Um das Enzym in präparativen Synthesen zu nutzen, muss es in ausreichenden Mengen zur Verfügung gestellt werden. Die Isolierung von Saccharose Synthase aus Reis wurde bereits mehrfach dokumentiert (Chan et al. 1990, Chen et al. 1981, Elling et al. 1995b, Elling und Kula 1993, Nomura und Akazawa 1973). Im Jahr 1995 reinigten Elling et al. (Elling et al. 1995b) Saccharose Synthase aus Reis im Pilotmaßstab auf. Aus 9 kg Reis konnten nach fünf Reinigungsschritten 566 U SuSy, mit einer spez. Aktivität von 13,6 U/mg und einer Gesamtausbeute von 11,3 %, gewonnen werden. Die Reissamen wurden nach dem Quellen im Mixer homogenisiert und die freigesetzte Stärke durch eine Druckfiltration entfernt, bevor sich eine Anionenaustauschchromatografie anschloß. Dieser Aufreinigungsschritt führte zu einem starken Verlust an Enzym. Die Gesamtausbeute an Enzym, nach Anionenaustauschchromatografie, sank auf 28 %. Nach Aufkonzentration des Anionentauscher-Pools lieferte eine Feinreinigung mit präparativer Gelfiltration eine Präparation, die frei von Phosphatasen war. Invertase- und UDP-Glucose-hydrolysierende-Nebenaktivitäten konnten allerdings nicht vollständig abgetrennt werden. Sie lagen jeweils noch zu 0,005% vor. Diese Nebenaktivitäten sind störend bei der Synthese von aktivierten Zuckern und Disacchariden.

Die Reinigung der Saccharose Synthase aus pflanzlichen Speicherorganen weist einige Nachteile aus. Anfallende Stärke muss entfernt werden. Die vollständige Abtrennung von Nebenaktivitäten erweist sich als schwierig und verringert die Ausbeute. Die Aufreinigung aus Pflanzenmaterial unterliegt im Enzymgehalt starken Schwankungen (0,55 U/g Reissamen (Elling et al. 1995a) bis 0,12 U/g (Schrader 1998)). Ein entscheidender Nachteil ist, dass die erhaltenen Enzympräparationen ein Gemisch aus Isoenzymen der SuSy enthalten, die nur sehr aufwendig voneinander getrennt werden können. Nach Literaturangaben überwiegt in Reissamen das Isoenzym SuSy 3 (Huang et al. 1996).

Eine Verbesserung bezüglich der Verfügbarkeit, des Syntheseinsatzes und der Charakterisierung sollte mit der Klonierung und heterologen Expression des Enzyms erzielt werden, was im Folgenden beschrieben wird.

1.4.1 Heterologe Expression der Saccharose Synthase 1 aus Kartoffel in *Saccharomyces cerevisiae*

Das Gen *sus1* aus *Solanum tuberosum*, welches für Saccharose Synthase 1 kodiert, wurde unter Kontrolle des *PMA1* Promotors (*ATPase*-Promotor) in das Plasmid pDR195 kloniert. Das resultierende Konstrukt wurde in *Saccharomyces cerevisiae* Stamm 22574d (MAT- α , *ura3-1*, *gap1-1*, *put4-1*, *uga4-1*) transformiert (Schrader 1998) (Abbildung 1.9)

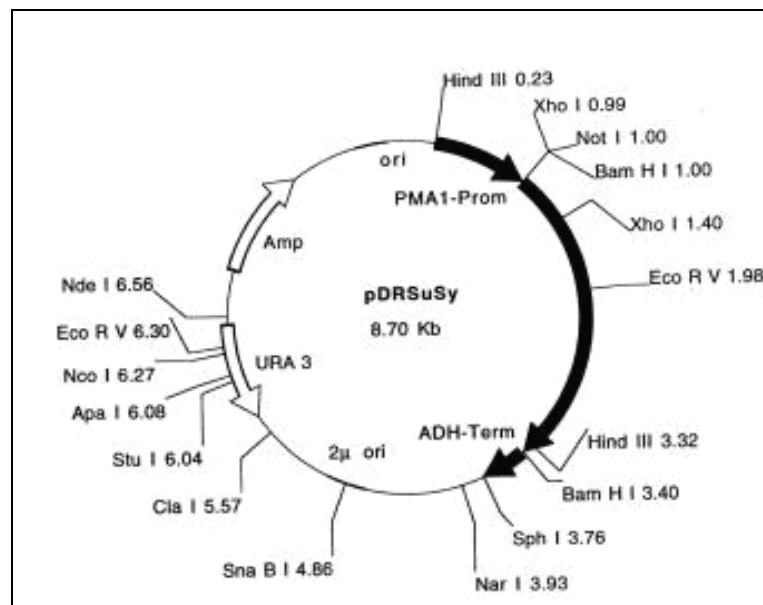


Abbildung 1.9 Expressionsplasmid pDRSuSy (Schrader 1998).

Die Expression von *sus1* erfolgt mit diesem Plasmid konstitutiv unter aeroben Bedingungen. Im 10 l-Maßstab (5 Schüttelkolben mit jeweils 2 l Kulturvolumen) wurden Expressionsraten von 8,4 U/g Zellfeuchtmasse erzielt. Dies entspricht, im Vergleich zum Reis, einer Steigerung des Enzymgehalts um den Faktor 15. In Anlehnung an das Aufreinigungsprotokoll für Reissamen konnte in einem ersten Aufreinigungsschritt über einen Anionentauscher eine Enzympräparation gewonnen werden, die frei von Phosphatase- und Invertase-Nebenaktivitäten war und nur noch 0,015% Nukleotidzucker-spaltenden Nebenaktivitäten enthielt. Untersuchungen an Saccharose Synthase aus Reis zum Effekt von 2-wertigen Metallkationen führten zu der Erkenntnis, dass das Enzym mittels Immobilisierter-Metallionenaffinitäts-Chromatografie (IMAC) (Elling 1995) aufgereinigt werden kann. Für protein- und biochemische Untersuchungen wurde das rekombinante Enzym an einer Cu^{2+} -IMAC feingereinigt. Schrader (Schrader 1998) erhielt in einer Gesamtausbeute von 33% eine homogene Enzympräparation mit einer spez. Aktivität von 10 U/mg. In Tabelle 1.6 sind

einige protein- und biochemischen Charakteristika der rekombinanten Saccharose Synthase 1 aus Kartoffel zusammengefasst.

Tabelle 1.6 Charakteristika der rekombinanten Saccharose Synthase 1 aus Kartoffel (Schrader 1998, Römer, 1998).

Molekulargewicht (Gelfiltration)	393890 Da (Homotetramer)
Molekulargewicht je Untereinheit (MALDI-TOF)	92692 Da (theoret. 92577 Da)
Isoelektrischer Punkt	pH 5,5
pH-Optimum	pH 7,5
pH-Optimum Spaltreaktion	pH 7,6
pH-Optimum Synthesereaktion	ca. pH 8,0
Temperaturoptimum für die Synthese	30 °C
Halbwertszeit Synthesebedingung (pH 8,0; 30 °C)	$\tau_{1/2} = 10,75$ Tage

Die spezifische Aktivität der rekombinanten Saccharose Synthase 1 wird durch Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen um das 3 bzw. 2,5 fache gesteigert. Erste Untersuchungen zeigten, dass Cu^{2+} -Ionen das Enzym inhibieren (Römer 1998).

Weitere Untersuchungen zur Nukleotid-, Nukleotidzucker- und Monosaccharid-Akzeptanz zeigten, dass auch das rekombinante Enzym ein breites Substratspektrum besitzt. Die Nukleotid-Akzeptanz ist wie bei dem Reis-Enzym

UDP>(dUDP)=dTDP>ADP >>CDP>GDP.

1.4.2 Synthese von Nukleotidzuckern mit Saccharose Synthase

Bereits 1965 zeigten Millner und Avigad (Millner und Avigad 1965) für Saccharose Synthase aus Zuckerrübe, dass in der Spaltreaktion neben dem natürlichen Substrat UDP auch dTDP, ADP, CDP und GDP umgesetzt werden können. Saccharose kann in Abhängigkeit von der Enzymquelle durch andere Disaccharide, z.B. Melibiose und Trehalose, ersetzt werden (Su und Preiss 1977, Sung und Su 1977). Im Gegensatz zu den Pyrophosphorylasen, die sehr spezifisch für die Nukleosidtriphosphate und Zucker-1-phosphate sind, können mit der Saccharose Synthase sechs verschiedene Nukleotidzucker aus Nukleosiddiphosphaten und Saccharose synthetisiert werden. In Kombination mit weiteren Enzymen können die entstehenden NDP-Glucosen zur präparativen Synthese schwer zugänglicher und oft sehr teurer Nukleotiddesoxyzucker genutzt werden.

Ein diesbezüglich sehr interessanter Nukleotidzucker ist dTDP-Glucose als Vorstufe für viele dTDP-aktivierte Desoxyzucker, die als Intermediate in der Biosynthese von Makrolid-Antibiotika vorkommen. Zervosen et al. (Zervosen et al. 1994) etablierte die kontinuierliche Synthese von dTDP- α -D-Glucose ausgehend von Saccharose und dTDP

im Enzym-Membran-Reaktor mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von $98 \text{ g l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und einem Verbrauch von 10 U Reis SuSy pro Gram Nukleotidzucker. Durch weitere Kombination der SuSy mit einer rekombinanten dTDP-D-Glucose-4,6-dehydratase konnte im präparativen Maßstab mit einer Fed-Batch-Synthese dTDP-6-Desoxy-4-keto- α -D-glucose gewonnen werden (Stein et al. 1998). Eine Verbesserung der Synthese hinsichtlich der Kosten der eingesetzten Edukte konnte erzielt werden, indem die dTDP-Quelle aus dTMP mit einer Kinase generiert wurde (Günther 2000). Das Prinzip von Nukleosidmonophosphaten über eine entsprechende Kinase Nukleosiddiphosphate als Substrate für die Saccharose Synthase bereitzustellen, wurde zuvor von Zervosen et al. erfolgreich zur Synthese von 2,2 g ADP- α -D-Glucose eingesetzt (Zervosen et al. 1998) (Abbildung 1.10).

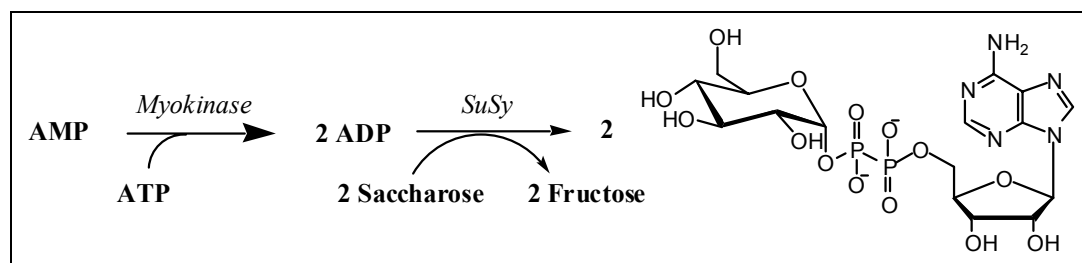


Abbildung 1.10 Synthese von ADP-Glucose aus AMP, ATP und Saccharose mit rekombinanter Saccharose Syntase 1 aus Kartoffel und Myokinase (Zervosen et al. 1998).

Ein weiteres Beispiel ist die Synthese von UDP- α -D-Galactosamin, das ausgehend von UMP durch Kombination von 3 Enzymen synthetisiert und anschließend chemisch in UDP-*N*-Acetyl- α -D-galactosamin umgesetzt wurde (Bülter et al. 1997).

Saccharose Synthase wurde auch zur *in situ* Regeneration von Nukleotidzuckern in der enzymatischen Synthese von *N*-Acetylactosamin (Zervosen und Elling 1996) (Abbildung 1.11), des Gal α (1–3)Gal β (1–4)GlcNAc-Epitops (Hokke et al. 1996) und des entsprechenden Epitops auf einem PEG Polymer (Brinkmann et al. 2001) eingesetzt.

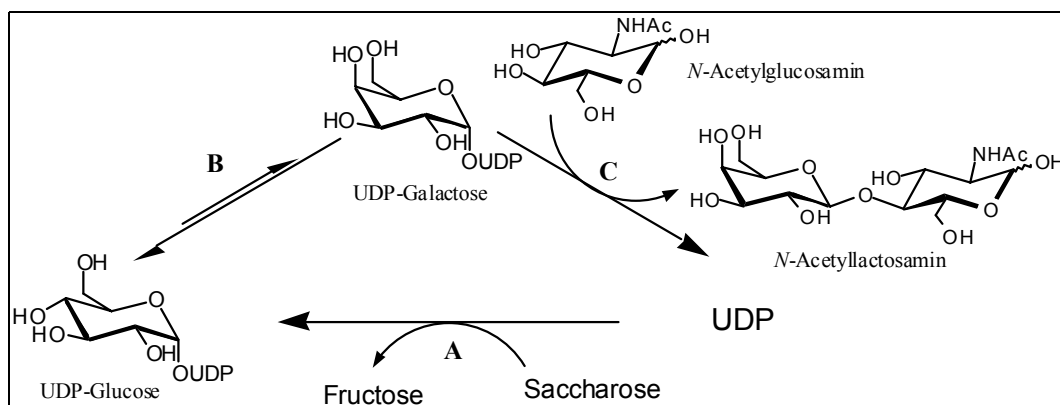


Abbildung 1.11 Enzymatische Synthese von N-Acetylglucosamin mit *in situ* Regeneration von UDP-Galactose. A: SuSy, B: UDP-Glucose 4-epimerase, C: β1-4Galactosyltransferase (Zervosen und Elling 1996).

1.4.3 Synthese von Saccharose Analoga

Im Jahre 1955 stellten Bean und Hassid (Bean und Hassid 1955) fest, dass mit Saccharose Synthase aus Erbsenkeimlingen neben Fructose weitere Akzeptoren, z.B. D-Fructose-6-phosphat, D-Xylulose, D-Rhamnulose und L-Sorbose, umgesetzt werden können. Card et al. (Card und Hitz 1984, Card et al. 1986) setzten erfolgreich verschiedene Fluoro- und Azidoderivate der Fructose mit Saccharose Synthase um. Neben UDP-Glc wurde, abhängig von der Enzymquelle, die Akzeptanz weiterer NDP-Glc (N = A, T, G, C) (Avigad 1982), sowie von UDP-Gal, ADP-Gal, UDP-Xyl (Cardini und Recondo 1962) und UDP-2d-Glc (Farkas et al. 1968) festgestellt.

Zum Akzeptor- und Donorsubstratspektrum der Synthesereaktion für das aus Reis gewonnene Enzym führten Elling et al., Grothus und Amann (Elling et al. 1993, Grothus 1993, Amann 1995) umfangreiche Untersuchungen durch. Neben dem natürlichen Donorsubstrat konnten mit guter Akzeptanz ADP-Glc und dTDP-Glc, sowie mit geringer Aktivität UDP-Xyl, UDP-5'-Thioglucoose und UDP-GlcNAc umgesetzt werden. Das Akzeptorsubstratspektrum der Saccharose Synthase aus Reis besitzt eine hohe Flexibilität. Neben D-Fructose werden als weitere Ketosen D-Xylulose, D-Tagatose, L-Sorbose, 6-Desoxy-L-sorbose und Sedoheptulose, sowie die Fructosederivate 5,6-Didesoxy-5-methyl-D-fructose, 5,6-Didesoxy-D-fructose und 5-Keto-6-desoxy-D-fructose umgesetzt. Gemeinsam ist allen akzeptierten Ketosen die konservierte Konfiguration der Hydroxylgruppe an C₃. Die Ketosen D-Xylulose, D-Tagatose und 6-Desoxy-L-sorbose wurden in präparativen Synthesen umgesetzt (Grothus 1993, Grothus et al. 1994, Peters et al. 1993), wobei 6-Desoxy-α-L-sorbofuranosyl-α-D-glucopyranosid in einer chemoenzymatischen Synthese ausgehend

von Methylglyoxal dimethylacetal dargestellt werden konnte (Abbildung 1.12) (Peters et al. 1993).

Auch wurde die Akzeptanz der Aldosen D-Mannose, L-Arabinose und D-Lyxose und des Derivates 1,6-Anhydroglucose beobachtet. Die Produkte α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid (Grothus et al. 1994), α -D-Glucopyranosyl-L-arabinose und 1,6-Anhydro- α -D-glucopyranosyl-4-O- β -D-glucopyranose (Amann 1995) konnten hergestellt und analysiert werden. Neben den Zuckerstrukturen konnte der Heterozyklus 3-Hydroxypyrrolidin mit Saccharose Synthase aus Reis und UDP-Glucose als Donor umgesetzt und das Produkt im NMR identifiziert werden (Günther 1996).

In einer weiteren Anwendung wurde rekombinante SuSy1 zur Synthese von ^{13}C -markierter Saccharose eingesetzt. Mit einer Enzymproduktivität von 61 mg U^{-1} und einer Raum-Zeit-Ausbeute von 3,03 g $\text{l}^{-1} \text{d}^{-1}$ konnten 710 mg $[^{13}\text{C}_1]$ - β -D-Fructofuranosyl- α -D-glucopyranosid mit einer Gesamtausbeute von 55 % synthetisiert werden (Römer 1998).

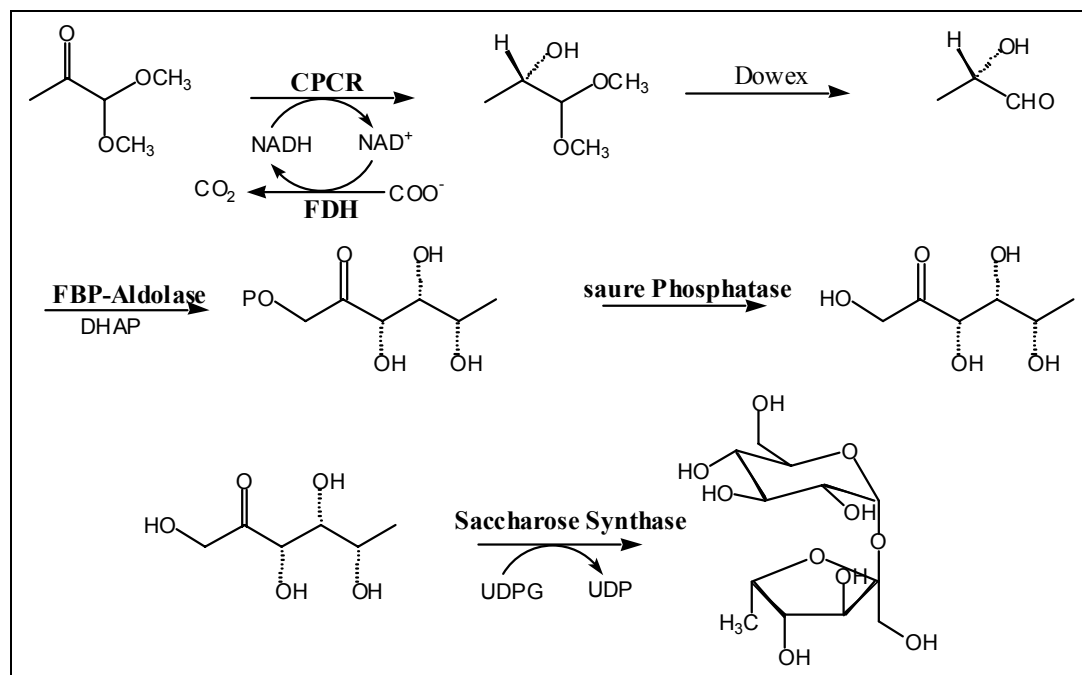


Abbildung 1.12 Chemoenzymatische Synthese des 6-Desoxy- α -L-sorbofuranosyl- α -D-glucopyranosid (Peters et al. 1993)

Eine Alternative zur Synthese von Saccharose-Analoga mit Saccharose Synthase stellt das bakterielle Enzym Saccharose Phosphorylase (EC 2.4.1.7) dar. Es katalysiert die reversible Spaltung von Saccharose mit anorganischem Phosphat zu Fructose und α -D-Glucose-1-phosphat. Schon früh konnte gezeigt werden, dass in der Synthesereaktion an Stelle von Fructose auch L-Sorbose, D-Xylulose, L-Arabinose und L-Arabinulose

akzeptiert werden (Hassid und Doudoroff 1950, Doudoroff et al. 1947, Doudoroff et al. 1943). Kitao et al. (Kitao und Sekin 1994, Kitao et al. 1993) konnten unter anderem die Übertragung von Glucose auf Catechine und phenolische Verbindungen mit Saccharose Phosphorylase zeigen. Von der Akzeptanz weiteren Glycosyldonoren wurde bisher nicht berichtet, was nicht zuletzt auf die aufwändige und schwierige Darstellung von Zucker-1-phosphat-Analoga zurückzuführen ist.

1.5 Chemische Synthese von Saccharose und Analoga

Die chemische Synthese von Saccharose ist besonders wegen der Disaccharidverknüpfung vom Trehalose-Typ problematisch, da die Stereochemie an allen anomeren Zentren gleichzeitig kontrolliert werden muss. Hierzu sind eine aufwändige Schutzgruppentechnik und gleichzeitig eine Aktivierung des Glycosyldonors am anomeren Zentrum nötig. Aufgrund vieler Syntheseschritte sind die Ausbeuten in der Regel niedrig. Lemieux und Huber gelang erstmals 1953 die chemische Synthese von Saccharose (Lemieux und Huber 1953). In der Kopplungsreaktion eines geschützten Glycosyldonors und Fructosylakzeptors erreichten sie eine Ausbeute von 5,5 %. Bis zu diesem Zeitpunkt waren die chemischen Synthesen hauptsächlich auf die korrekte α -Verknüpfung der Glucoseeinheit ausgerichtet. Die Stereochemie der Fructose wurde nicht berücksichtigt, es wurden daher häufig α/β -Gemische des Disaccharids erhalten. Erst kürzlich wurde eine stereospezifische Synthese von Saccharose beschrieben, in der eine β -dirigierende Fructofuranosyleinheit als Donor eingesetzt wird. Die Ausbeuten der Verknüpfung von Glycosyldonor und Akzeptor liegen bei 80%, die Gesamtausbeute mit vorhergehender Synthese des Fructofuranosyldonors bei 26% (Oscarson und Sehgelmeble 2000).

Die chemische Synthese von Saccharose-Analoga erfolgt zumeist ausgehend von Saccharose. Ein Beispiel ist die in Abbildung 1.13 dargestellte Synthese von 2-Acetamido-2-desoxysaccharose (Lichtenthaler et al. 1995). Mit Saccharose als Edukt konnte in 7 Stufen 2-Acetamido-2-desoxysaccharose (*N*-Acetylsaccharosamin) mit einer Gesamtausbeute von 12,5 % synthetisiert werden. Auf ähnliche Weise wurden auch 2-Desoxy- und 2-Keto-Derivate der Saccharose dargestellt.

Eine besondere Herausforderung bei der chemischen Synthese stellt die selektive Mono-Funktionalisierung dar. Zuckermoleküle sind „überfunktionalisiert“ mit Hydroxylgruppen von ähnlicher oder gleicher Reaktivität, so dass die regioselektive Funktionalisierung oft schwer zu erreichen ist. Oft entstehen unerwünschte Produktgemische die an verschiedenen Stellen derivatisiert sind. Zusätzlich kann die

glykosidische Bindung der Saccharose leicht durch den Einsatz schon schwacher Säuren hydolysiert werden (Lichtenthaler et al. 1995). Hier bietet die Verknüpfung zweier funktionalisierte Monosaccharideinheiten Vorteile. Jedoch stößt man hier wieder auf das Problem der exakten regio- und stereospezifischen Verknüpfung.

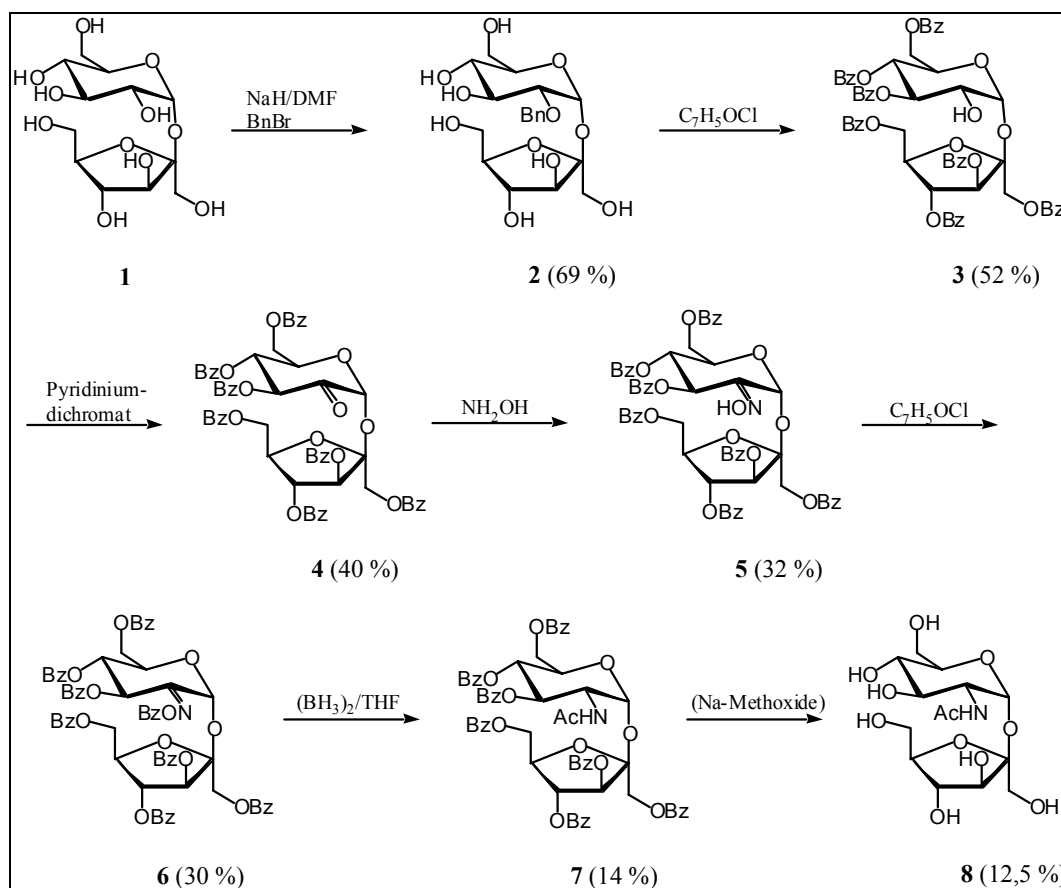


Abbildung 1.13 Chemische Synthese von 2-Acetamido-2-desoxysaccharose (1 Saccharose, 2 2-O-Benzoylsaccharose, 3 Hepta-O-benzoylsaccharose, 4 Hepta-O-benzoyl-2-oxosaccharose, 5 Oxim der Hepta-O-benzoyl-2-oxosaccharose, 6 O-Benzoyloxim der Hepta-O-benzoyl-2-oxosaccharose, 7 *N*-Acetyl-hepta-O-benzoylsaccharosamin, 8 2-Acetamido-2-desoxysaccharose) (Lichtenthaler et al. 1995).

Enzyme stellen aufgrund ihrer hohen Stereo- und Regioselektivität sowie den milden Reaktionsbedingungen eine Alternative dar. Wie in dem vorangegangenen Kapitel gezeigt, bieten die Enzyme Saccharose Synthase oder auch Saccharose Phosphorylase einen solchen alternativen Zugang zu neuen Disacchariden. Jedoch ist auch hier eine Grenze gesetzt, da nicht jedes beliebige Substrat mit diesen Enzymen umgesetzt werden kann.

2 Zielsetzung

Saccharose-Analoga, wie z.B. 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose, sind interessante Verbindungen für pflanzenphysiologische Untersuchungen (Smeekens 2000, Sinha et al. 2002). Sie finden Einsatz in Studien zum Transport und zur Signaltransduktion von Kohlenhydraten in Pflanzen.

Die chemische Synthese von Saccharose-Analoga ist aufwändig (vgl. Kapitel 1.5), da für jedes Saccharose-Analogon eine neue Synthesestrategie entwickelt werden muss. Zusätzlich sind die Ausbeuten der chemischen Synthesen gering. Einen alternativen Syntheseweg bieten Enzyme. Neben den milden Reaktionsbedingungen, weisen sie in der Regel eine hohen Regio- und Stereospezifität auf.

Das Enzym Saccharose Synthase (Sucrose Synthase, SuSy, EC 2.4.1.13) katalysiert sowohl die Spaltung als auch die Synthese von Saccharose. Neben den natürlichen Akzeptoren D-Fructose und UDP-Glc können weitere Akzeptoren und Donoren umgesetzt werden (Bean und Hassid 1955, Cardini und Recondo 1962). Eine erste systematische Untersuchung des Substratspektrums wurde von Elling et al. (Elling et al. 1993) für Saccharose Synthase aus Reis durchgeführt. In diesen Arbeiten wurde das Enzym außerdem erstmals zur Synthese neuer Saccharose-Analoga eingesetzt.

Das Potenzial von SuSy ist jedoch noch nicht vollständig ausgeschöpft. Eine Schwierigkeit ist hierbei die ausreichende Verfügbarkeit und Isolierung des Enzyms aus natürlichen Quellen (siehe Kapitel 1.4). Mit der Etablierung eines Systems zur Expression von SuSy Isoenzymen in Hefe (Schrader 1998), konnte ein einfacher Zugang zum Enzym zur Verfügung gestellt werden.

In dieser Arbeit wurde Saccharose Synthase 1 aus Kartoffel eingesetzt, die rekombinant in Hefe vorlag. In einem ersten Schritt wird die Hefe im Fermenter produziert und das Enzym aufgereinigt. Die Anzucht der Hefen soll hinsichtlich des Maßstabs optimiert werden. An die Aufreinigung schließt sich die protein- und biochemische Charakterisierung an. Die biochemische Charakterisierung soll sowohl die Ermittlung der kinetischen Daten als auch die Erstellung eines Modells zum kinetischen Mechanismus des Enzyms umfassen. Des Weiteren sollen in einem umfassenden Screening neue Akzeptor-, Donorsubstrate und Inhibitoren identifiziert werden. Aus dem Screening ausgewählte Substrate und Inhibitoren werden anschließend eingehender kinetisch untersucht. Die ermittelten kinetischen Daten fließen dann in Modellvorstellungen zur Substraterkennung und Produktbildung sowie in die Entwicklung

effizienter präparativer Synthesen neuer Saccharose-Analoga ein. Die Produkte der präparativen Synthese sollen mit spektroskopischen und spektrometrischen Methoden (NMR und MS) untersucht und charakterisiert werden.

Weiterhin ist es für den Einsatz der Disaccharide in pflanzenphysiologischen Untersuchungen entscheidend, dass diese nicht durch Invertase gespalten werden (vgl. Kapitel 1.2). Dazu sollen im Rahmen dieser Arbeit Testmethoden entwickelt werden.

3 Methoden

3.1 Analytik

3.1.1 HPLC-Methoden zur Trennung von Nukleotiden und Nukleotidzuckern

3.1.1.1 Trennung von Nukleotiden und Nukleotidzuckern; Gradienten-Methode

Nukleotide und Nukleotidzucker können mit Hilfe der Reversed Phase Ionenpaar-chromatografie getrennt (Ryll und Wagner 1991) und anhand ihrer UV-Absorption bei 254 nm detektiert werden. Die Quantifizierung erfolgt mit einer Kalibriergerade (Peakfläche/Konzentration) im Bereich von 0,1- 2 mM der jeweiligen Substanz.

3.1.1.1.1 Trennung von Uridin, UMP, UDP und UDP- α -D-Glucose

Säule: Reversed Phase, Hypersil-ODS 5 μ , RP-18, 125 x 4 mm
(Thermohypersil, Kleinostheim)

Laufmittel: Puffer A (100 mM KH₂PO₄, 8 mM TBA mit KOH auf pH 5,3 eingestellt)
Puffer B (Puffer A mit 30% (v/v) Methanol, pH 5,9)

Fluss: 1 ml/min

Temperatur: 40 °C

Detektion: UV bei 254 nm

Gradient : 0-2,5 min 100% Puffer A
2,5 –12,4 min linearer Gradient 0-30% Puffer B
12,4 -13,5 min linearer Gradient 30-100% Puffer B
13,5-16,5 min 100% Puffer B
16,5-17 min linearer Gradient 100-0% Puffer B
17-21 min Puffer A

Die zu untersuchenden Proben wurden vor der HPLC-Analytik 15 min bei 13.000 rpm zentrifugiert um störende Feststoffe abzutrennen.

Beispielchromatogramme und Kalibriergeraden finden sich im Anhang unter 7.5.

3.1.1.2 Trennung von Uridin, UMP, UDP und UDP-*N*-Acetyl- α -D-glucosamin

Um eine ausreichende Trennung von UDP und UDP-GlcNAc zu erzielen, wurde der Gradient optimiert.

Säule:	Reversed Phase, Hypersil-ODS 5 μ , RP-18, 125 x 4 mm
Laufmittel:	Puffer A (100 mM KH ₂ PO ₄ , 8 mM TBA, pH 5,3 (KOH)) Puffer B (Puffer A mit 30% (v/v) Methanol, pH 5,9)
Fluss:	1 ml/min
Temperatur:	40 °C
Detektion:	UV bei 254 nm
Gradient :	0-4,5 min 100% Puffer A 4,5 –12,5 min linearer Gradient 0-10% Puffer B 12,5 -13,0 min linearer Gradient 10-0% Puffer B 13,0-15 min 100% Puffer A

3.1.1.3 Trennung von Nukleotiden und Nukleotidzuckern; Isokratische-Methode

Alternativ kann zur Trennung von Nukleotiden und Nukleotidzuckern eine isokratische Methode nach Elling und Kula (Elling und Kula 1993) angewendet werden.

Säule:	Reversed Phase, Hypersil-ODS 5 μ , RP-18, 250 x 4,6 mm (Thermohypersil, Kleinostheim)
Laufmittel:	100 mM Kaliumacetat 0,013% (v/v) Octylamin 5 % (v/v) Methanol pH 5,6 (Essigsäure)
Fluss:	1 ml/min
Temperatur:	RT
Detektion:	UV bei 254 nm

3.1.2 Trennung von Nukleotiden und Nukleotidzuckern mit Kapillarelektrophorese

Eine weitere Alternative zur Trennung von Nukleotiden und Nukleotidzuckern ist die Verwendung der Kapillarelektrophorese (CE). Die Trennung beruht auf den unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten der Probenbestandteile. Der elektrophoretischen Wanderung von Ionen ist außerdem stets eine zweite Bewegung überlagert. Sie wird als elektroosmotischer Fluss (EOF) bezeichnet. Dieser verursacht eine Bewegung der gesamten Elektrolytlösung und führt damit zu einer Trennung aller Probenbestandteile unabhängig davon, ob sie eine positive, negative oder gar keine Ladung besitzen.

Es wurde ein P/ACE MDQ Carbohydrate System von Beckman-Coulter, (Unterschleißheim) verwendet.

Kapillare: *fused silica*, ID: 75 µm, effektive Länge: 50 cm, totale Länge: 57 cm (Beckman-Coulter, Unterschleißheim)

Elektrolyt: Capillary Performance Run Buffer A (Beckman-Coulter, Unterschleißheim)

Spannung: 25 kV

Injektion: hydrodynamisch über Druck (0,5 psi), 5 sec

Temperatur: 25 °C

Detektion: UV bei 254 nm

Spülen: zwischen den Läufen für je 2 min hydrodynamisch (20 psi) mit Elektrolyt

Beispiel-Elektropherogramme siehe Anhang 7.5.2.

3.1.3 HPLC-Methode zur Trennung von Mono- und Disacchariden

Zur Trennung der Zucker wurde eine Aminex HPX-87C-Säule, ein Kationentauscher in der Ca²⁺-Form, eingesetzt. Die Trennung beruht auf der Komplexbildung cis-ständiger Hydroxylgruppen mit den Calcium-Kationen. Die Quantifizierung der Zucker erfolgte anhand einer Kalibriergerade im Bereich von 0,2 bis 50 mM (siehe Anhang 7.5.3).

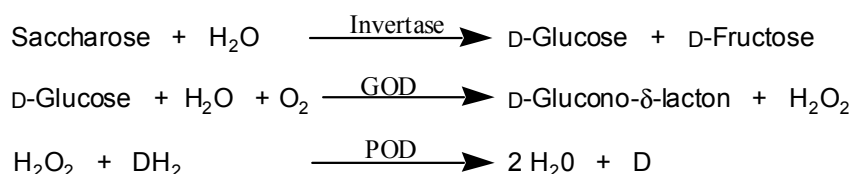
Säule: Aminex HPX-87C (BioRad, München)
 Laufmittel: Millipore-Wasser
 Fluss: 0,6 ml/min
 Temperatur: 85 °C
 Detektion: RI-Detektor

Probenvorbereitung

Da der Reaktionspuffer die Analytik erheblich störte, musste dieser zuvor abgetrennt werden. Dazu wurde die Probe über eine Anionentauschersäule (1 ml Dowex 1-X8, Cl⁻-Form, Serva) gegeben. Es wurden jeweils 500 µl Probe aufgegeben und mit 5 ml Millipore-Wasser eluiert. Das Volumen wurde an der Speedvac eingengt und wieder in 500 µl Millipore-Wasser aufgenommen.

3.1.4 Fotometrische Bestimmung von Glucose und Saccharose

Die Bestimmung der Konzentration von Saccharose und Glucose erfolgte fotometrisch in Anlehnung an Bergmeyer und Bernt (Bergmeyer und Bernt 1974) im Mikrotiterplatten-Maßstab. Es liegt folgendes Prinzip zugrunde:



D Farbreagenz ABTS (2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonat)

GOD Glucoseoxidase

POD Peroxidase

Zur Bestimmung der Glucosekonzentration wurde die Reaktion ohne den ersten Invertase-Schritt durchgeführt.

Test-Ansatz:

25 µl Probe

25 µl Invertase (40 U/ml in Phosphatpuffer 0,2 M pH 5,0)

oder

25 µl Phosphatpuffer 0,2 M pH 5,0 (Bestimmung von Glucose)

Der Ansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden

50 µl Glucose-Reagenz (s.u.)

hinzugegeben und für weitere 30 min inkubiert. Mit einem Mikrotiterplattenlesegerät (Molecular Devices, Menlo Park, Ca, USA) wurde die Extinktion bei 405 nm bestimmt.

Glucose-Reagenz:

3 U/ml Peroxidase (POD)

18 U/ml Glucoseoxidase (GOD)

1 mg/ml ABTS

in Phosphatpuffer 0,2 M pH 6,5.

Es wurde jeweils eine dreifache Bestimmung durchgeführt. Bei jeder Messung wurde eine Saccharose- und/ oder Glucose-Kalibrierung von 0 – 0,1 mM Saccharose /Glucose mitgeführt (siehe Anhang 7.5.4). Die Berechnung der Glucose- bzw. Saccharosekonzentration erfolgte anhand der für die Kalibrierung ermittelten Regressionsgerade (siehe Gleichung 3.1 und Gleichung 3.2).

$$c_{Sac} = \frac{\bar{E}_{405}}{0,47} \quad \text{Gleichung 3.1}$$

$$c_{Glc} = \frac{\bar{E}_{405}}{0,59} \quad \text{Gleichung 3.2}$$

3.1.5 Dünnschichtchromatografie

Zur qualitativen Analyse der Disaccharide wurde ein dünnschichtchromatographisches Verfahren angewendet (Peters et al. 1993). Die Proben wurden auf eine DC-Alufolie mit Kieselgel 60 F₂₅₄ Beschichtung aufgebracht und durch aufsteigende, eindimensionale Entwicklung mit einem Laufmittel aus 75% (v/v) Acetonitril und 25%

(v/v) 0,1 M Ammoniumchlorid-Lösung aufgetrennt. Die Detektion von Uridin, UMP, UDP und UDP-Zucker, Mono- und Disaccharide erfolgte bei 254 nm und durch Anfärben der Platte. Nach dem Besprühen der Platte mit dem Färbereagenz erfolgte die Entwicklung bei 110 °C für 10 min.

Färbereagenz:

100 mg	Naphtoresorcinol
200 mg	Diphenylamin
50 ml	Ethanol
2 ml	Schwefelsäure (konz.)

R_F-Werte: Saccharose: 0,34; D-Glucose 0,43; D-Fructose: 0,48; L-Sorbose: 0,47; D-Lyxose 0,52; L-Arabinose 0,52.

3.1.6 Bestimmung des Proteingehaltes

Der Proteingehalt wurde mit Hilfe der Bradford-Methode (Bradford 1976) bestimmt.

Standardtest:

100 µl	Probe in Puffer (10-100 µg Protein)
900 µl	Bradford-Reagenz

Die Probe wurde für 7 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 595 nm gegen eine Referenzküvette mit Puffer vermessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Kalibriergeraden bestimmt, bei der die Absorption gegen die BSA-Konzentration [mg/ml] aufgetragen wurde (Kalibriergrade siehe 7.5.5).

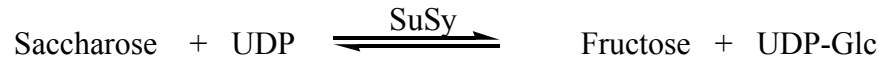
Reagenz zur Proteinbestimmung:

100 mg	Coomassie-Brilliant-Blue G-250
50 ml	Ethanol (95%)
den Farbstoff vollständig lösen	
100 ml	Phosphorsäure (85% w/v)
ad 1 l	mit Aqua dest..

Die Lösung wurde nach 24 h über einen Faltenfilter filtriert und kann anschließend zur Analyse eingesetzt werden.

3.1.7 Bestimmung der Enzymaktivität der Saccharose Synthase

3.1.7.1 Spaltreaktion



3.1.7.1.1 HPLC-Test

Die Enzymaktivität der Saccharose Synthase wurde über die Synthese von UDP-Glc aus Saccharose und UDP bestimmt.

Inkubationsansatz:

55 µl HEPES-NaOH (200 mM, pH 7,6)

25 µl Saccharose (2 M in Puffer)

10 µl UDP (20 mM in Puffer)

10 µl Enzymlösung

Die Proben wurden für 10 min bei 30 °C inkubiert und anschließend 5 min bei 95 °C abgestoppt. Die Bildung von UDP-Glc wurde mittels HPLC nach Methode 3.1.1.1.1 überprüft.

Berechnung der Enzymaktivität:

1 U Saccharose Synthase entspricht der Enzymmenge, die unter Standardbedingungen die Synthese von 1 µmol pro Minute UDP-Glc katalysiert.

$$\text{Aktivität} = \frac{c \cdot X \cdot F}{t_{\text{In}} \cdot x} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml} \cdot \text{min}} = \frac{\text{U}}{\text{ml}} \right] \quad \text{Gleichung 3.3}$$

c UDP-Glc-Konzentration [mM]

X Gesamtvolumen der Probe [ml]

x Eingesetztes Volumen an Enzymlösung [ml]

t_{In} Inkubationszeit [min]

F Verdünnungsfaktor der Saccharose Synthase Probe

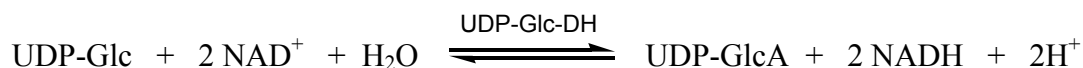
Hieraus wird die spezifische Aktivität berechnet:

$$\text{spez. Aktivität} = \frac{\text{Aktivität}}{P} \left[\frac{\text{U}}{\text{mg}} \right] \quad \text{Gleichung 3.4}$$

P Proteingehalt [mg/ml]

3.1.7.1.2 Diskontinuierlicher fotometrischer Enzymtest

Alternativ zur Bestimmung der UDP-Glc-Konzentration mittels HPLC kann ein fotometrischer Test durchgeführt werden (Elling und Kula 1991).



Die im Inkubationsansatz entstandene UDP-Glc wird durch UDP-Glucose-Dehydrogenase (UDP-Glc-DH) zu UDP-GlcA oxidiert, wobei NAD^+ zu NADH reduziert wird. Die Bildung des NADH wird fotometrisch bei 340 nm verfolgt.

Hier wurde der Test als Schnelltest am Mikrotiterplattenlesegerät durchgeführt. Er diente zur Überprüfung der Aktivität der einzelnen Fraktionen während der Aufreinigung des Enzyms. Die Aktivität wurde nicht berechnet.

Testansatz:

135 µl	NAD^+ (3 mM) in Tris-HCl Puffer (50 mM, pH=8,7)
5 µl	Saccharose Synthase Inkubationsansatz
10 µl	UDP-Glucose-Dehydrogenase (0,9 mU/ml)

Die Bildung von NADH wurde im Mikrotiterplattenlesegerät (Spectramax Plus, Molecular Devices) 15 min bei 340 nm verfolgt.

3.1.7.2 Synthesereaktion

Die Aktivität der Saccharose Synthase wurde in Syntheserichtung anhand der Bildung von UDP bestimmt.



Inkubationsansatz:

70 µl	HEPES-NaOH (200 mM, pH 8,0)
10 µl	Fructose (200 mM in Puffer)
10 µl	UDP-Glc (10 mM in Puffer)
10 µl	Enzymlösung

Die Proben wurden 5 min bei 30 °C inkubiert und anschließend 5 min bei 95 °C abgestoppt. Die Konzentration an gebildeten UDP wurde mittels HPLC (Methode 3.1.1.1) bestimmt. Die Berechnung der Aktivität erfolgte gemäß Gleichung 3.3.

3.1.8 Bestimmung der Nebenaktivitäten

3.1.8.1 Phosphatasen

Die Bestimmung der Nukleosidmono- und -diphosphat spaltenden Enzymaktivitäten erfolgte nach der Methode von Elling und Kula (Elling und Kula 1993).

Inkubationsansatz:

80 µl HEPES-NaOH (200 mM, pH 7,6)

10 µl UDP (20 mM in Puffer)

10 µl Enzymlösung

Der Reaktionsansatz wurde für 1 Stunde bei 30 °C inkubiert und 5 min bei 95 °C abgestoppt.

Um den nichtenzymatischen Zerfall von UDP zu UMP und Uridin zu berücksichtigen, wurde ein Blindwert ohne Enzymlösung angesetzt. Die Analytik der Proben erfolgte mittels HPLC. Aus dem Verhältnis der Peakflächen von Uridin, UMP und UDP lässt sich die relative Enzymaktivität berechnen.

$$Faktor_1 = \frac{Fläche_{UDP} + Fläche_{Uridin}}{Fläche_{UMP}} \quad \text{Gleichung 3.5}$$

$$Faktor_2 = \frac{Faktor_1_{Probe}}{Faktor_1_{Blindwert}} \quad \text{Gleichung 3.6}$$

Phosphatasen liegen vor, wenn Faktor₂ größer ist als 1.

3.1.8.2 Nukleotidzuckerspaltende Aktivitäten

Feingold (Feingold 1982) beschreibt verschiedene Enzymaktivitäten, die in der Lage sind Nukleotidzucker zu spalten, dazu zählen Phosphodiesterasen, die den aktivierten Zucker zu Nukleosidmonophosphaten und Zucker-1-phosphaten spalten. Hydrolasen spalten dann weiter zu Nukleosid und Phosphat.

Inkubationsansatz:

65 oder 75 µl HEPES-NaOH Puffer (200 mM, pH 7,6)

10 µl UDP-Glc (20 mM in Puffer)

15 oder 25 µl Enzymlösung

Die Enzymsätze, sowie eine Blindprobe, wurden 16 Stunden bei 30°C inkubiert und dann 5 min bei 95°C abgestoppt. Als Blindprobe wurde ein Ansatz, der anstelle der Enzymlösung Puffer enthielt, mitgeführt. 1 Unit Enzym katalysiert die Hydrolyse von 1 µmol UDP-Glc pro Minute. Die Abnahme an UDP-Glc wurde mit Hilfe der HPLC-Analytik (siehe Methoden 3.1.1.1) bestimmt.

Berechnung der Enzymaktivität:

$$\text{Aktivität} = \frac{(c_{\text{Probe}} - c_{\text{Blindprobe}}) \cdot X}{t_{\text{In}} \cdot x} \quad \text{Gleichung 3.7}$$

Aktivität	[U/ml]
c	UDP-Glc-Konzentration [µmol/ml]
t _{In}	Inkubationszeit [min]
X	Gesamtvolumen der Probe [µl]
x	Volumen der eingesetzten Enzymlösung [µl]

3.2 Fermentation, Aufreinigung und proteinchemische Charakterisierung

Hefezellen, die das Plasmid pDRSuSy1 enthielten, wurden im Fermenter angezogen. Nach Ernte und Aufschluss der Zellen erfolgte die Reinigung in einem ersten Schritt über Anionenaustauschchromatografie. Für bio- und proteinchemische Untersuchungen wurde das Enzym mit IMAC und Gelfiltration feingereinigt.

3.2.1 Fermentation und Zellernte

Ausgehend von SD-Agarerhaltungsplatten wurden 2x50 ml SD-Medium mit 2% Glucose (siehe Anhang 6.1) mit je einer Einzelkolonie angeimpft und 24 h bei 30 °C und 120 rpm (Schüttler HT, Infors, Bottmingen) inkubiert. Diese Kulturen wurden in 2x350 ml SD-Medium mit 2% Glucose überführt und für weitere 24 h bei 30 °C unter Schütteln inkubiert.

Die Fermentation wurden in einem 40 l Fermenter (Techfors 40 l, Infors, Bottmingen) mit 20 – 31 l SD-Medium (Tabelle 3.1) mit 1% Glucose und 3 ml Antifoam (Sigma, zur Verhinderung starker Schaumbildung) bei einer Temperatur von 30 °C und einem

anfänglichen Lufteintrag von 5 l/min sowie einer Rührfrequenz von 400 rpm durchgeführt. Der pH-Wert wurde auf 3,8 mit den in Tabelle 3.1 aufgeführten Säuren und Laugen eingestellt und während der Fermentation konstant gehalten. Der Fermenter wurde 1,5%ig mit der Übernachtskultur angeimpft und für ca. 19 h inkubiert bis die vorgegebene Glucose nahezu aufgebraucht war. Danach wurde ein exponentieller Glucose-Feed mit einer 50%igen Glucoselösung gestartet, der Lufteintrag auf 10 l/min und die Rührfrequenz auf 500 rpm erhöht.

Der exponentielle Glucose-Feed erfolgte gemäß Gleichung 3.8:

$$Feed = \frac{(S_0 \cdot m_y)}{S_F} \cdot e^{(m_y \cdot t)} \cdot \rho \quad \text{Gleichung 3.8}$$

mit

S_0	Gesamtmenge an vorgelegter Glucose im Fermenter [g]
S_F	Glucosegehalt der Feedlösung [g/l], hier 500 g/l
m_y	spez. Wachstumsgeschwindigkeit [h^{-1}], hier 0,1 h^{-1}
t	Fermentationszeit [h]
ρ	Dichte der Glucose-Feedlösung [g/l], hier 1170 g/l

Die Fermentation wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) verfolgt. Nachdem kein Wachstum mehr zu beobachten war, wurden die Zellen mit Hilfe eines Kammerseparators (Typ KA 02, Westfalia Separator) über 4 Kammern bei 9.600 rpm geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Tabelle 3.1 Veränderliche Fermentationsbedingungen

Fermentation	A	B	C	D	E
Volumen [L]	20	30	30	31	30
Fermentationszeit [h]	31	36	54	36	41
Säure	3 M HCl	3 M HCl	3 M H_3PO_4	3 M H_2SO_4	3 M H_2SO_4
Base	3 M NaOH	3 M NaOH	NH_3 (25%)	3 M KOH	3 M NaOH

3.2.2 Zellaufschluss

Zum Aufschluss der Hefezellen wurde eine 40 %ige (w/v) Zellsuspension in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,6) hergestellt. Zellen der Fermentationen A-D wurden mit einer Rührwerkskugelmühle (Netzsch-Mühle LME 0,5, Netzsch, Selb), die mit 500 g Glasperlen (Durchmesser 0,5 mm) befüllt war, bei einer Drehzahl der Rührwelle von 2500 rpm in sechs Durchläufen aufgeschlossen. Zum Aufschluss der Zellen aus der Fermentation E wurde ein neueres Gerät (Netzsch-Mühle LabStar 0.1, Netzsch, Selb), welches mit 500 g Glasperlen (Durchmesser 0,5 mm) befüllt war, verwendet. Der Aufschluss erfolgte in drei Umläufen bei einem Volumenstrom von 108 ml/min, einem

Gegendruck von 0,25 bar und einer Drehzahl von 3000 rpm. Die Leistung des Rührwerks liegt bei 1,3 kW.

Zur Abtrennung der Zellbruchstücke wurde das Homogenat 20 min bei 15.000 rpm (Sorvall RC-SB, Rotor: SS-34, DuPont, Bad Homburg) und 4 °C zentrifugiert.

3.2.3 Kontrolle des Fermentationsverlauf

Der Verlauf der Fermentation wurde nach dem Start des Glucose-Feed überprüft. Zur Überprüfung wurden alle ein bis zwei Stunden am Fermenter Proben von 15 ml entnommen. Nach Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm wurden die Proben 15 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 50 mM HEPES-NaOH pH 7,6 zu einer 40%igen Zellsuspension resuspendiert.

Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit einer Schwing-Mühle (Typ MM, Retsch, Haan). 0,6 ml Zellsuspension wurden mit 1,2 g Glasperlen (Durchmesser 0,3 mm) versetzt. Die Zellen wurden anschließend 10 min bei maximaler Amplitude aufgeschlossen. Die Glasperlen und Zellbruchstücke wurden 15 min bei 13000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand zur Bestimmung des Proteingehaltes und der Aktivität eingesetzt.

3.2.4 Aufreinigung

Das Prinzip der Aufreinigung wird beispielhaft an der Aufreinigung von 340 g aufgeschlossenen Zellen der Fermentation E gezeigt. Nach Zentrifugation des Homogenats wurden 1120 ml Rohextrakt mit einem Gesamtproteingehalt von 18 g erhalten.

3.2.4.1 Anionenaustauschchromatografie

In einem ersten Aufreinigungsschritt wurde eine Anionenaustauschchromatografie an Q-Sepharose FF Material durchgeführt. Verwendete Geräte und Material waren von Pharmacia (Freiburg).

Säule:	5 x 53 cm (Gelvolumen 1040 ml), Leersäule XK50/60
Detektion:	UV-Detektor (UV-1) mit UV-Durchflusszelle (280 nm)
Äquilibration:	5 l Puffer A (HEPES-NaOH 50 mM, pH 8,0)
Probe:	1120 ml Rohextrakt, lineare Fließgeschw.: 46 cm/h
Waschen:	4,5 l Puffer A mit 0,1 M KCl
Elution:	linearer Gradient von 0,1 – 0,4 M KCl in 6 l Puffer A
lineare Fließgeschwindigkeit:	76 cm/h (HighLoad™ Pumpe P50)

Die einzelnen Fraktionen wurden auf Saccharose Synthase Aktivität nach Methode 3.1.7.1.2 getestet und die aktiven Fraktionen zu einem Volumen von 1720 ml vereinigt. Der Pool wurde mit einer Ultrafiltrationszelle (VivaCell 250, Satorius, Göttingen) über eine Membran mit einem Molekulargewichts cut-off von 50 kDa, die zuvor mit 5% PEG₄₀₀₀ belegt wurde, auf 196 ml aufkonzentriert.

3.2.4.2 Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatografie (IMAC)

Zur weiteren Aufreinigung des Enzyms wurde eine Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatografie (IMAC) durchgeführt. Als Material wurde Ni²⁺-NTA Superflow (Qiagen, Hilden), eine hochvernetzte Agarosematrix mit Nitrilotriessigsäure-Liganden an denen Ni²⁺-Ionen koordinativ gebunden sind, verwendet. Histidinreiche Bereiche an der Oberfläche eines Proteins können an dieses Material binden. Durch Untersuchungen zum Effekt von Metallkationen (Elling, 1995) konnte gezeigt werden, dass SuSy an der Oberfläche solche histidinreiche Regionen besitzt. Aus der vorangegangenen Aufreinigung wurden 100 ml des aufkonzentrierten SuSy-Pools (1950 U, 453 mg Protein) aufgetragen.

Säule:	2,6 x 20 cm (Gelvolumen 100 ml), Leersäule XK26/30
Detektion:	UV-Detektor (UV-1) mit UV-Durchflussszelle (280 nm)
Äquilibration:	1 l Puffer B (HEPES-NaOH 50 mM, pH 8,0 + 0,1 M NaCl)
Probe:	100 ml SuSy aus Kapitel 3.2.4.1 (1950 U, 453 mg Protein), lineare Fließgeschw.: 45 cm/h
Waschen I:	300 ml Puffer B
Waschen II:	200 ml Puffer B mit 1,25 mM Imidazol
Elution:	linearer Gradient von 1,25 – 25 mM Imidazol in 1,5 l Puffer B
lineare Fließgeschwindigkeit:	68 cm/h (HighLoad™ Pumpe P50)

Die einzelnen Fraktionen wurden auf Enzymaktivität untersucht und zu 550 ml vereinigt. Die Elution der aktiven Fraktionen erfolgte zwischen 10 und 15 mM Imidazol. Der Pool wurde wie unter Kapitel 3.2.4.1 beschrieben auf 15 ml aufkonzentriert.

3.2.4.3 Gelfiltration

Um homogenes Enzym für proteinchemische Untersuchungen zu erhalten, wurde ein kleiner Teil der IMAC-Aufreinigung (3 ml, 263 U, 47 mg Protein) durch Gelfiltration an Superdex 200 prep grade (Pharmacia) feingereinigt.

Säule:	2,6 x 83 cm (Gelvolumen 440 ml), Leersäule XK26/100
Detektion:	UV-Detektor (LBK VWM 2141) mit UV-Durchflussszelle (280 nm)
Äquilibration:	1 l Puffer C (HEPES-NaOH 50 mM, pH 7,6 + 0,5 M NaCl)
Probe:	3 ml SuSy aus Kapitel 3.2.4.2 (263 U, 47 mg Protein)
Elution :	800 ml Puffer C
lineare Fließgeschwindigkeit:	34 cm/h (LCC-500Plus mit Pumpe P500)

Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt (60 ml) und durch Ultrafiltration auf 2,2 ml aufkonzentriert. Hier ist insbesondere darauf zu achten, dass das Enzym während des Aufkonzentrierens nicht ausflockt.

3.2.4.4 Lagerung

Die konzentrierten Enzympräparationen wurden aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Das Enzym kann zur Lagerung auch gefriergetrocknet werden. Dazu wurden 20 ml (390 U, 91 mg Protein) der Enzympräparation aus der Anionenaustauschchromatografie (siehe Kapitel 3.2.4.1) mit Hilfe einer Ultrafiltrationszelle (VivaCell 70, MWCO 50 kDa, Satorius, Göttingen) auf HEPES-NaOH 10 mM, pH 7,6 umgepuffert und anschließend lyophilisiert (Lyovac, Steris, Heisly Road Mentor, Ohio, USA)

3.2.5 Proteinchemische Charakterisierung

3.2.5.1 SDS-PAGE

Es wurden 10%ige Bis-Tris NuPAGE-Fertiggele von Invitrogen (Paisley, UK) mit NuPAGE MOPS-Laufpuffer (Invitrogen, Paisley, UK) verwendet. Die Puffer- und Probenvorbereitung erfolgte nach dem NuPAGE Standardprotokoll für reduzierte Proben. Die Proben wurden so verdünnt, dass pro Bande etwa 1-2 μg Protein auf das Gel aufgetragen wurden. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde ein pre-mixed Standard low-range (Marker-Proteine: 97,4 kDa, 66,2 kDa, 39,2 kDa, 26,6 kDa, 21,5 kDa und 14,4 kDa, Roche, Mannheim), der 1:100 verdünnt wurde, mitgeführt.

Puffer: 50 ml 20x NuPAGE MOPS SDS-Laufpuffer wurden mit 950 ml Millipore-Wasser verdünnt und in die äußere Pufferkammer der Laufvorrichtung gegeben. In die innere Pufferkammer wurden 200 ml des Puffers gegeben, der zuvor mit 500 μl NuPAGE Antioxidant versetzt wurde.

Proben: Für 100 μl Proteinprobe wurden 65 μl verdünnte Proteinprobe mit 25 μl 4x NuPAGE Probenpuffer und 10 μl 10x NuPAGE Reduzierlösung (0,5 M DTT) vermischt und 10 min bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt.

Der Gellauf erfolgte bei 200 V, die Laufzeit betrug 1 h 10 min. Das Gel wurden anschließend nach der Methode von Blum et al. (Blum et al. 1987) mit Silbernitrat gefärbt.

Zur Immobilisierung der Proteine wurde das Gel dreimal für 30 min in Fixierer (40% (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure (98%ig)) inkubiert. Anschließend wurde zunächst mit 20 % (v/v) Ethanol und dann mit Millipore-Wasser für jeweils 10 min gewaschen. Für die nachfolgende Färbung wurde das Gel für 1 min mit einer 0,02 %igen Natriumthiosulfatlösung sensitiviert und danach dreimal 20 sec mit Millipore-Wasser gewaschen. Das Gel wurde 30 min mit einer Silbernitratlösung (2 g/l Silbernitrat, 750 $\mu\text{l/l}$ Formaldehyd) inkubiert und erneut dreimal für 20 sec mit Wasser gewaschen. Die

Entwicklung erfolgte durch Zugabe einer Natriumcarbonatlösung (60 g/l Natriumcarbonat, 500 µl/l Formaldehyd, 5 mg/l Natriumthiosulfat). Zum Abstoppen des Färbeprozess wurde Fixierer auf das Gel gegeben.

Mit Hilfe der Kalibrierproteine des pre-mixed Standard low-range konnte das Molekulargewicht der rekombinanten Saccharose Synthase 1 ermittelt werden. Die Auftragung des dekadischen Logarithmus der Molekulargewichte gegen die entsprechenden R_f -Werte der Markerproteine ergibt einen linearen Zusammenhang. Mit Hilfe einer linearen Regression wurde die Geradengleichung ermittelt, anhand derer das Molekulargewicht der rekombinanten SuSy 1 ermittelt werden konnte.

3.2.5.2 Nachweis der Proteinphosphorylierung

Zum Nachweis der Phosphorylierung wurde zunächst eine SDS-Gelelektrophorese mit 7%igen NuPAGE Tris-Acetat-Gelen und NuPAGE Tris-Acetat-Laufpuffer durchgeführt. Die Probenvorbereitung erfolgte nach dem NuPAGE Standardprotokoll (vgl. Kapitel 3.2.5.1). Anstelle von 20x NuPAGE MOPS SDS-Laufpuffer wurde 20x NuPAGE Tris-Acetat SDS-Laufpuffer verwendet. Die Proteinproben wurden so verdünnt, dass ca. 5 µg auf das Gel aufgetragen wurden.

Zur Kalibrierung wurden pro Gel jeweils 10 µl Biotin-Marker broad range 1:5 verd. (Kalibrierproteine: 250 kDa, 150 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 50 kDa, 37 kDa, 25 kDa, 20 kDa, 15 kDa, 10 kDa, Biorad, München) und „Precision Pre-Stained“ Marker broad range (Kalibrierproteine: 200 kDa, 116,25 kDa, 97,4 kDa, 66,2 kDa, 45,0 kDa, 31 kDa, 21,5 kDa, 14,4 kDa, 6,5 kDa, Biorad, München) aufgetragen. Desweiteren wurden pro Gel jeweils 10 µl SuSy GF-Fraktion, Negativ-Kontrolle β -Galactosidase aus *E. coli* (Boehringer Mannheim), Positiv-Kontrolle 1 aus Phosphoserin Detection Kit (Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach) und als zweite Positiv-Kontrolle „Control Mouse IgG“ aus ChemiBlot Immunoblotting Kit Anti-Mouse (Chemicon International, Hofheim) aufgetragen.

Der Gellauf wurde bei 150 V durchgeführt. Die Laufzeit betrug 1 h 20 min. Anschließend erfolgte ein NuPAGE Western-Transfer auf eine PVDF-Membran (Biorad, München). Der NuPAGE Transfer-Puffer wurde nach dem NuPAGE Standardprotokoll angefertigt.

Transfer-Puffer: 50 ml NuPAGE-Transfer-Puffer wurden mit 749 ml Millipore-Wasser, 200 ml Methanol und 1 ml NuPAGE Antioxidant verdünnt.

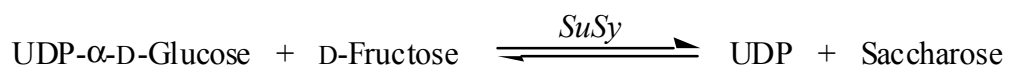
Zur Überprüfung der Phosphorylierung wurden ein Phosphoserin Detection Kit (Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach) in Kombination mit einem ChemiBlot Immunoblotting Kit Anti-Mouse (Chemicon International, Hofheim) verwendet. Es

wurden vier verschiedene monoklonale Phosphoserinantikörper (Klone 1C8, 4A3, 4A9 und 16B4 aus Maus, Phosphoserin Detection Kit) eingesetzt.

Nach dem Transfer wurde die Membran zunächst mit TTBS-Puffer (0,1 M Tris-HCl pH 7,5 mit 0,15 M NaCl und 0,1 % (v/v) Tween-20) gewaschen und anschließend mit 4% (w/v) BSA in TTBS eine Stunde geblockt. Danach wurde die Membran mit 1% (w/v) BSA in TTBS gewaschen und mit einem der Phosphoserinantikörper 1 µg/ml in 1% BSA (w/v) in TTBS zwei Stunden unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach erneutem Waschen (3 x 5 min) erfolgte die Inkubation mit biotinyliertem Anti IgG (ChemiBlot Immunoblotting Kit Anti-Mouse) in TTBS + 1% BSA (50 µl auf 10 ml) für 30 min unter Schütteln. Die Membran wurde dreimal gewaschen und für weitere 30 min mit Streptavidin-Peroxidase in TTBS mit 1% BSA (50 µl auf 10 ml) inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen erfolgte die Entwicklung mit dem Farbreagenz TMB (1 ml TMB-Fällungsreagenz mit 9 ml TMB-Substratlösung). Nach 2-5 min entwickelte sich eine blaue Farbe, der Blot wurde mit dest. Wasser gewaschen und in der Dunkelheit getrocknet.

3.3 Biochemische Charakterisierung der rekombinanten Saccharose Synthase 1

Der Charakterisierung der rekombinanten Saccharose Synthase lag folgendes allgemeines Reaktionsschema zugrunde:



Alle kinetischen Messungen wurden so aufgenommen, dass der Umsatz der Reaktion bei max. 10% lag und damit eine lineare Reaktionsgeschwindigkeit gewährleistet war. Die Einhaltung des 10% Umsatzlimits wurde durch Variation der Inkubationszeit erreicht. Die Reaktion wurde mit dem invarianten Substrat gestartet. Um den nicht-enzymatische bedingten Zerfall der Substrate zu berücksichtigen, wurden entsprechende Blindproben mitgeführt.

3.3.1 Kinetik der Spaltreaktion

Der Messung der Kinetik der rekombinanten Saccharose Synthase 1 aus Kartoffel lag die physiologische Reaktion des Enzyms zugrunde. Die Reaktion wurde in HEPES-NaOH (50 mM) bei einem pH-Wert von 7,6 und 30 °C durchgeführt.

3.3.1.1 Die Substrate UDP und Saccharose

UDP als variables Substrat :

Ansatz mit 1 ml Geamtvolumen:

0 – 1 mM UDP

1 M Saccharose

2,5 mU/ml SuSy (Enzymcharge I)

in HEPES-NaOH 50 mM, pH 7,6.

Saccharose als variables Substrat:

Ansatz in 1 ml Gesamtvolumen:

0 – 1 M Saccharose

0,1 mM UDP

2,5 mU/ml SuSy (Enzymcharge I)

in HEPES-NaOH 50 mM, pH 7,6.

Die Ansätze wurden bei 30 °C inkubiert und nach Ablauf der Reaktionszeit wurden die Proben 5 min bei 95 °C abgestoppt.

Die Kinetik der Spaltreaktion wurde anhand der Bildung von UDP-Glc mittels HPLC (vgl. Kapitel 3.1.1.1.1) verfolgt.

3.3.2 Kinetik der Synthesereaktion

3.3.2.1 Die Substrate UDP- α -D-Glucose und D-Fructose

Die Reaktionen wurden bei 30 °C in HEPES-NaOH (50 mM) bei einem pH-Wert von 8,0 durchgeführt.

UDP- α -D-Glucose als variables Substrat:

Ansatz in 1 ml Gesamtvolumen:

0 - 4 mM UDP-Glc

10 mM D-Fructose

10 mU/ml SuSy (Enzymcharge I)

in HEPES-NaOH 50 mM, pH 8,0.

D-Fructose als variables Substrat:

Ansatz in 1 ml Gesamtvolumen:

0 - 100 mM D-Fructose

2 mM UDP-Glc

50 mU/ml SuSy (Enzymcharge I)

in HEPES-NaOH 50 mM, pH 8,0.

Die Ansätze wurden bei 30 °C inkubiert und nach Ablauf der Reaktionszeit bei 95 °C abgestoppt.

Die Kinetik der Synthesereaktion wurde anhand der Bildung von UDP mittels HPLC (siehe Kapitel 3.1.1.1.1) verfolgt.

3.3.2.2 Produktinhibition durch UDP*UDP und UDP- α -D-Glucose variabel, Fructose invariabel:*

Ansatz in 250 μ l Gesamtvolumen:

0 - 1 mM UDP

0 - 3 mM UDP-Glc

10 mM D-Fructose

10 mU/ml SuSy (Enzymcharge II)

in HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0.

UDP und Fructose variabel, UDP- α -D-Glucose invariabel:

Ansatz in 250 μ l Gesamtvolumen:

0 - 1 mM UDP

0 - 40 mM D-Fructose

2 mM UDP-Glc

10 mU/ml SuSy (Enzymcharge II)

in HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0.

UDP variabel, Fructose und UDP- α -D-Glucose invariabel:

Ansatz in 1 ml Gesamtvolumen:

0 - 1 mM UDP

2 mM D-Fructose

0,5 mM UDP-Glc

50 mU/ml SuSy (Enzymcharge I)

in HEPES-NaOH 50 mM, pH 8,0.

Die Proben wurden bei 30 °C inkubiert und nach Ablauf der Reaktionszeit bei 95 °C abgestoppt, nach 15 min Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde die Bildung von Saccharose nach Kapitel 3.1.4 bestimmt.

3.3.2.3 Produktinhibition durch Saccharose

Saccharose und UDP- α -D-Glucose variabel, Fructose invariabel:

Ansatz in 250 μ l Gesamtvolumen:

0 - 500 mM Saccharose

0 - 3 mM UDP-Glc

10 mM D-Fructose

10 mU/ml SuSy (Enzymcharge II)

in HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0.

Saccharose und Fructose variabel, UDP- α -D-Glucose invariabel:

Ansatz in 250 μ l Gesamtvolumen:

0 – 500 mM Saccharose

0 - 40 mM D-Fructose

2 mM UDP-Glc

50 mU/ml SuSy (Enzymcharge II)

in HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0.

Die Proben wurden bei 30 °C inkubiert und 5 min bei 95 °C abgestoppt. Die Bildung von UDP wurde mittels HPLC nach Kapitel 3.1.1 verfolgt.

3.3.3 Auswertung der kinetischen Daten

Die mittels HPLC-Analytik erhaltenen Konzentrationen an UDP-Glc (Spaltreaktion) bzw. UDP oder Saccharose (Synthesereaktion) wurden gemäß Gleichung 3.9 in die spez. Aktivität v umgerechnet.

$$v = \frac{c \cdot X}{t_{In} \cdot P \cdot x} \quad \text{Gleichung 3.9}$$

v spez. Aktivität [U/mg]/Reaktionsgeschwindigkeit

c Konzentration an UDP-Glc bzw UDP oder Saccharose [mM]

X Gesamtvolumen der Probe [ml]

x Eingesetztes Volumen an Enzymlösung [ml]

t_{In} Inkubationszeit [min]

P Proteingehalt [mg/ml]

Die weitere Auswertung erfolgte mit den Programmen „Scientist“ (MicroMath, Scientific Software, Saint Louis, Missouri, USA), „Origin 6.1“ (OriginLab Cooperation, Northampton, Maine, USA) bzw. „SigmaPlot 2001“ (SPSS GmbH Software, München). Die kinetischen Daten wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse der experimentellen Daten unter Verwendung eines Marquardt-Levenberg-Algorithmus bestimmt. Zur Berechnung der kinetischen Konstanten wurde zunächst vereinfacht von Einsubstratkinetiken ausgegangen. Diese Vereinfachung ist prinzipiell möglich, wenn eines der beiden Substrate gesättigt vorliegt und somit die Konzentration dieses Substrates während der Reaktion annähernd konstant ist. Im Allgemeinen wird eine Konzentration im Bereich des 10-fachen K_m -Werts gewählt. Es ist jedoch zu beachten,

dass eine Substratsättigung oft erst bei einem 100-fachen K_m -Wert erreicht ist. Zusätzlich müssen bei der Konzentrationswahl des konstanten Substrates auch mögliche Substrat- und Produktinhibitionen berücksichtigt werden, so dass häufig nicht einmal ein 10-facher K_m -Wert eingehalten werden kann. Hieraus ergibt sich, dass die Berechnung unter der Annahme von Doppelsubstratkinetiken, oft sinnvoller ist, da beide Substrate in die Berechnung der kinetischen Daten eingehen.

Alle Gleichungen zu Berechnung der kinetischen Daten sind dem Buch „Enzyme Kinetics Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems“ von I.H. Segel (Segel 1975) entnommen. Im Folgenden werden die Grundlagen zur Berechnung von Ein- und Doppelsubstratkinetiken erläutert.

3.3.3.1 Berechnung der kinetischen Konstanten unter Annahme von Einsubstratreaktionen

Bei einem hyperbolen Kurvenverlauf wurde zur Berechnung der kinetischen Daten die Michaelis-Menten Gleichung (Gleichung 3.10) eingesetzt:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m + S} \quad \text{Gleichung 3.10}$$

S Substratkonzentration [mM]

v Reaktionsgeschwindigkeit [U/mg]

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

K_m Michaelis-Menten-Konstante [mM]

Diese Gleichung wurde zur Berechnung der kinetischen Daten von Saccharose, 1-Desoxy-1-fluorofructose, D-Xylulose, D-Lyxose, L-Arabinose und UDP-GlcNAc eingesetzt.

Unter Berücksichtigung einer Substratüberschussinhibition wurde Gleichung 3.11 zur Berechnung der kinetischen Konstanten verwendet.

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m + S + \frac{S^2}{K_{iS}}} \quad \text{Gleichung 3.11}$$

K_{iS} Substratinhibitionskonstante [mM]

Die Berechnung der kinetischen Konstanten von UDP, UDP-Glc, D-Fructose und L-Sorbose wurden mit Gleichung 3.11 durchgeführt.

Inhibitionen:

Die Messungen zur Produktinhibition von UDP und Saccharose und der Inhibition durch β -Phenylglukoside in denen ein Substrat konstant gehalten wurde, wurden mit Hilfe des Programms Sigma Plot 2001 an ein Einsubstratinhibitionsmodell angepasst. Dabei wurden verschiedene Inhibitionsmodelle zugrunde gelegt.

kompetitive Inhibition:

In einem einfachen Fall liegt eine kompetitive Inhibition vor. Der Inhibitor ist ein Substratanalogon des eigentlichen Substrates. Der K_m -Wert wird in Anwesenheit eines kompetitiven Inhibitors erhöht, während die maximale Reaktionsgeschwindigkeit unverändert bleibt. Das Modell der kompetitiven Inhibition wird durch Gleichung 3.12 beschrieben.

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S} \quad \text{Gleichung 3.12}$$

I Inhibitorkonzentration [mM]

K_i Inhibitionskonstante [mM]

nicht-kompetitive Inhibition:

Eine nicht-kompetitive Inhibition liegt vor, wenn der Inhibitor mit einer für die Aktivität wichtigen Gruppe reagiert, ohne jedoch die Substratbindung zu beeinträchtigen. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wird durch einen nicht-kompetitiven Inhibitor erniedrigt, während der K_m -Wert konstant bleibt. Das Modell wird durch Gleichung 3.13 beschrieben.

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)} \quad \text{Gleichung 3.13}$$

unkompetitive Inhibition:

Der klassische unkompetitive Inhibitor ist eine Substanz die reversibel an den Ezym-Substratkomplex bindet und somit zu einem inaktiven Übergangskomplex führt. Durch den unkompetitiven Inhibitor werden sowohl der K_m - wie auch der $V_{\max}$ -Wert erniedrigt. Die unkompetitive Inhibition wird durch Gleichung 3.14 beschrieben.

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m + S \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)} \quad \text{Gleichung 3.14}$$

Neben diesen einfachen Inhibitionstypen existieren komplexere Typen.

partiell kompetitive Inhibition:

Die partiell kompetitive Inhibition ist ein Sonderfall der kompetitiven Inhibition. Neben der Ausbildung des inaktiven Enzym-Inhibitor-Komplexes kann ein Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex gebildet werden, der ebenso wie der Enzym-Substrat-Komplex das Produkt bilden kann. Die Affinität des Substrates zum freien Enzym ist größer als die zum Enzym-Inhibitor-Komplex. Der K_m -Wert ändert sich, wenn der Inhibitor das Enzym besetzt. Der Faktor um den sich der K_m -Wert ändert, bezeichnet man als α . Das Modell wird durch Gleichung 3.15 wiedergegeben.

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m \left(1 + \frac{I}{\alpha K_i}\right) + S} \quad \text{Gleichung 3.15}$$

α Faktor um den der K_m -Wert durch die Interaktion des Inhibitors mit dem Enzym geändert wird

partiell nicht-kompetitive Inhibition:

Auch bei der partiell nicht-kompetitiven Inhibition kann der Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex das Produkt bilden. Jedoch ist dieser Komplex weniger produktiv als der eigentliche Enzym-Substrat-Komplex. Der Faktor, um den sich die maximale Reaktionsgeschwindigkeit durch die Bindung des Inhibitors ändert, wird mit β bezeichnet. Das Modell wird durch Gleichung 3.16 beschrieben.

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m \cdot \frac{\left(1 + \frac{I}{K_i}\right)}{\left(1 + \frac{\beta \cdot I}{K_i}\right)} + S \cdot \frac{\left(1 + \frac{I}{K_i}\right)}{\left(1 + \frac{\beta \cdot I}{K_i}\right)}} \quad \text{Gleichung 3.16}$$

β Faktor um den der $V_{\max}$ -Wert durch die Interaktion des Inhibitors mit dem Enzym geändert wird

partiell unkompetitive Inhibition:

Bei der partiell unkompetitiven Inhibition handelt es sich um einen Sonder Fall der unkompetitiven Inhibition. Der sich reversibel gebildete Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex kann das Produkt bilden. Das Modell wird durch Gleichung 3.17 beschrieben.

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S}{\left(\frac{K_m}{\left(1 + \frac{\gamma \cdot I}{K_i}\right)} + S \cdot \left(\frac{1 + \frac{I}{K_i}}{1 + \frac{\gamma \cdot I}{K_i}} \right) \right)} \quad \text{Gleichung 3.17}$$

γ Faktor um den der $V_{\max}$ -Wert und K_m -Wert durch die Interaktion des Inhibitors mit dem Enzym geändert wird.

gemischte Inhibition:

Bei der gemischten Inhibition handelt es sich um eine Mischung einer partiell kompetitiver Inhibition und einer reinen nicht-kompetitiver Inhibition, die durch Gleichung 3.18 beschrieben wird.

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S \cdot \left(1 + \frac{I}{\alpha \cdot K_i}\right)} \quad \text{Gleichung 3.18}$$

partiell gemischte Inhibition:

Die partiell gemischte Inhibition ist eine Mischung aus partiell kompetitiver und partiell nicht-kompetitiver Inhibition und wird durch Gleichung 3.19 wieder gegeben.

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S}{\alpha \cdot K_m \cdot \left(\frac{I + K_i}{\beta \cdot I + \alpha \cdot K_i} \right) + S \cdot \left(\frac{I + \alpha \cdot K_i}{\beta \cdot I + \alpha \cdot K_i} \right)} \quad \text{Gleichung 3.19}$$

Das System der partiell gemischten Inhibition ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Anhand dieses Modells lassen sich alle weiteren hier dargestellten Inhibitionstypen beschreiben (siehe Tabelle 3.2).

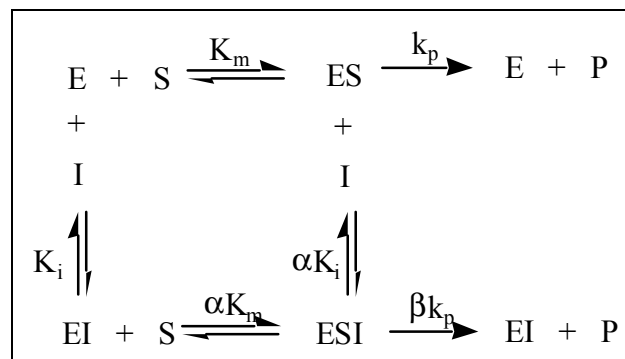


Abbildung 3.1 Allgemeines Schema zur partiell gemischten Inhibition

Tabelle 3.2 Beschreibung verschiedener Produktinhibitionstypen

Inhibitionstyp	Fall
kompetitive Inhibition	$\alpha=\infty, \beta=0$
nicht-kompetitive Inhibition	$\alpha=1, \beta=0$
partiell kompetitive Inhibition	$1 < \alpha < \infty, \beta=1$
partiell nicht-kompetitive Inhibition	$\alpha=1, 0 < \beta < 1$
gemischte Inhibition	$1 < \alpha < \infty, \beta=0$
partiell gemischte Inhibition	$1 < \alpha < \infty, 0 < \beta < 1$

Das Modell, das bei den Berechnungen die geringsten Abweichungen zu den ermittelten Daten zeigte wurde zur Auswertung der Produktinhibitionen von UDP und Saccharose herangezogen. Hier wurden die Gleichungen der gemischten und partiell gemischten Inhibition (Gleichung 3.18 und Gleichung 3.19) verwendet.

3.3.3.2 Berechnung der kinetischen Konstanten durch Doppelsubstratkinetiken

Die Berechnung der kinetischen Konstanten erfolgte unter Annahme eines sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus, in dem das Substrat A zuerst an das Enzym bindet (siehe Abbildung 3.2).

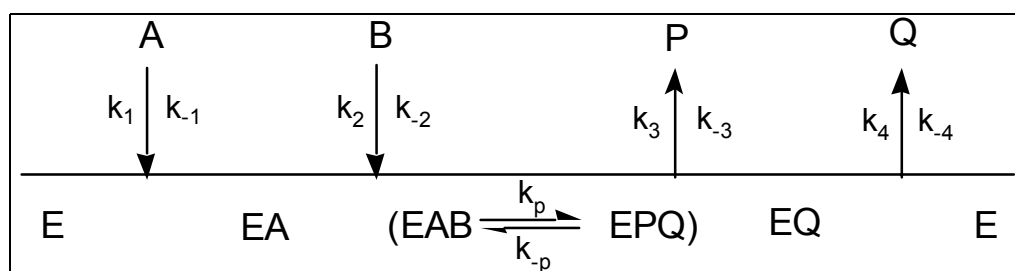


Abbildung 3.2 Schematische Darstellung eines sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus

In Tabelle 3.3 sind die Definitionen aller im sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus beteiligten kinetischen Konstanten zusammengefasst.

Tabelle 3.3 Definition der kinetischen Konstanten in einem sequenziellen Ordered-Bi-Bi-System

kinetische Konstante	Definition
K_{ia}	$K_{ia} = \frac{k_{-1}}{k_1}$
K_{mA}	$K_{mA} = \frac{k_3 k_4 k_p}{k_1 (k_3 k_4 + k_3 k_p + k_4 k_p + k_4 k_{-p})}$
K_{ib}	$K_{ib} = \frac{k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_p + k_{-1} k_{-p} + k_{-2} k_{-p}}{k_2 (k_p + k_{-p})}$
K_{mB}	$K_{mB} = \frac{k_4 (k_{-2} k_3 + k_{-2} k_{-p} + k_3 k_p)}{k_2 (k_3 k_4 + k_3 k_p + k_4 k_p + k_4 k_{-p})}$
K_{iq}	$K_{iq} = \frac{k_4}{k_{-4}}$
K_{mQ}	$K_{mQ} = \frac{k_{-1} k_{-2} k_{-p}}{k_{-4} (k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_p + k_{-1} k_{-p} + k_{-2} k_{-p})}$
K_{ip}	$K_{ip} = \frac{k_3 k_4 + k_3 k_p + k_4 k_p + k_4 k_{-p}}{k_{-3} (k_p + k_{-p})}$
K_{mP}	$K_{mP} = \frac{k_{-1} (k_{-2} k_3 + k_{-2} k_{-p} + k_3 k_p)}{k_{-3} (k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_p + k_{-1} k_{-p} + k_{-2} k_{-p})}$

Unter der Annahme, dass die Produkte nicht an der Reaktion beteiligt sind, ergibt sich als allgemeine Gleichung eines Ordered-Bi-Bi-Mechanismus:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot A \cdot B}{K_{ia} \cdot K_{mB} + K_{mB} \cdot A + K_{mA} \cdot B + A \cdot B}$$

Gleichung 3.20

- A Konzentration des Substrats A [mM]
- B Konzentration des Substrats B [mM]
- K_{mA} Michaelis-Menten- Konstante des Substrats A [mM]
- K_{mB} Michaelis-Menten- Konstante des Substrats B [mM]
- K_{ia} Dissoziationskonstante mit der A an das Enzym bindet und dissoziiert

Unter Berücksichtigung einer Substratüberschussinhibition durch das Substrat B, bei dem B mit dem Enzym im Überschuss einen dead-end Komplex bildet, gilt:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot A \cdot B}{K_{ia} \cdot K_{mB} \cdot \left(1 + \frac{B}{K_{iB}}\right) + K_{mA} \cdot B \cdot \left(1 + \frac{B}{K_{iB}}\right) + K_{mB} \cdot A + A \cdot B} \quad \text{Gleichung 3.21}$$

K_{iB} Substratüberschussinhibitionskonstante des Substrats B [mM]

Bildet dagegen das Substrat A mit dem Enzym einen dead-end Komplex so erhält man Gleichung 3.22.

$$v = \frac{V_{\max} \cdot A \cdot B}{K_{ia} \cdot K_{mB} + K_{mA} \cdot B + K_{mB} \cdot A \cdot \left(1 + \frac{A}{K_{iA}}\right) + A \cdot B} \quad \text{Gleichung 3.22}$$

K_{iA} Substratüberschussinhibitionskonstante des Substrates A [mM]

Die Berechnung der Produktinhibition durch UDP unter Annahme einer Doppelsubstratkinetik erfolgt nach Gleichung 3.23:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot A \cdot B}{K_{ia} \cdot K_{mB} + K_{mB} \cdot A + K_{mA} \cdot B + \frac{K_{ia} \cdot K_{mB} \cdot Q}{K_{iQ}} + A \cdot B + \frac{K_{mA} \cdot B \cdot Q}{K_{iQ}}} \quad \text{Gleichung 3.23}$$

Q Konzentration des Substrat Q [mM]

K_{iQ} Produktinhibitionskonstante des Substrats Q [mM]

Anhand von Doppelsubstratkinetiken wurden auch die Inhibitionskonstanten verschiedener Inhibitoren berechnet. Hierzu wurden zwei Fälle unterschieden, a) der Inhibitor kombiniert mit freiem Enzym und bildet einen inaktiven Enzym-Inhibitor-Komplex oder b) der Inhibitor kombiniert mit dem sich bereits gebildeten Enzym-Substrat-Komplex, so dass das zweite Substrat nicht mehr binden kann.

Bei Kombination mit dem freien Enzym gilt:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot A \cdot B}{K_{ia} \cdot K_{mB} \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + K_{mB} \cdot A + K_{mA} \cdot B \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + A \cdot B} \quad \text{Gleichung 3.24}$$

I Inhibitorkonzentration [mM]

K_i Inhibitionskonstante [mM]

Für den Fall, dass der Inhibitor einen inaktiven Enzym-Substrat-Komplex bildet, gilt:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot A \cdot B}{K_{ia} \cdot K_{mB} + K_{mB} \cdot A \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + K_{mA} \cdot B + A \cdot B} \quad \text{Gleichung 3.25}$$

3.3.3.3 Berechnung von k_{cat} und der katalytischen Effizienz k_{cat}/K_m

Aus den vorher ermittelten kinetischen Konstanten konnte anschließend k_{cat} und k_{cat}/K_m berechnet werden:

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\max} \cdot \frac{1}{60} \cdot P}{c_{\text{Enz}} \cdot 1000 \cdot F} \quad \text{Gleichung 3.26}$$

$$c_{\text{Enz}} = \frac{P \cdot X}{M_{\text{SuSy}} \cdot x} \quad \text{Gleichung 3.27}$$

k_{cat} Wechselzahl [s^{-1}]

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

c_{Enz} Enzymkonzentration [M]

P Proteingehalt [mg/ml]

F Verdünnungsfaktor der Enzymlösung

1/60 Umrechnungsfaktor von Minute auf Sekunde

X Gesamtvolumen der Probe [ml]

x Eingesetztes Volumen an Enzymlösung [ml]

M_{SuSy} Molekulargewicht der rekombinanten SuSy1 [g/mol] (393890 g/mol)

Die katalytische Effizienz berechnet sich aus dem Quotienten

$$\frac{k_{\text{cat}}}{K_m} \quad [\text{s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}]$$

K_m Michaelis-Menten-Konstante [mM]

3.3.4 Einfluss divalenter Kationen auf die Synthesereaktion

Der Einfluss der zweiwertigen Kationen von Mangan, Kobalt, Kupfer, Nickel und Zink auf die Synthesereaktion sollte überprüft werden. Dazu wurden die Ansätze jeweils 5 min bei 30 °C inkubiert und anschließend 5 min durch Hitzedenaturierung des Enzyms bei 95 °C abgestoppt. Es wurden jeweils Blindproben ohne Enzym mitgeführt, um den Einfluss des Kations auf die Stabilität der UDP-Glc zu beobachten. Die Effekte der Metallkationen auf das Enzym wurden anhand der Bildung von UDP mittels HPLC (Methode 3.1.1.1.1.) verfolgt.

Mangan (II)

Ansatz in 1 ml Gesamtvolumen:

0 – 10 mM	MnCl ₂
20 mM	D-Fructose
1 mM	UDP-Glc
10 mU/ml	SuSy (Enzymcharge I)
in	HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0.

Kobalt (II)

Ansatz in 1 ml Gesamtvolumen:

0 – 2 mM	CoCl ₂
20 mM	D-Fructose
1 mM	UDP-Glc
10 mU/ml	SuSy (Enzymcharge I)
in	HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0.

Kupfer (II), Nickel (II), Zink (II)

Ansatz in 1 ml Gesamtvolumen:

0 – 1 mM	CuCl ₂ / NiCl ₂ / ZnCl ₂
10 mM	D-Fructose
0,5 mM	UDP-Glc
10 mU/ml	SuSy (Enzymcharge I)
in	HEPES-NaOH 50 mM, pH 8,0.

3.3.5 Akzeptorsubstratspektrum der Saccharose Synthase 1

Das Akzeptorsubstratspektrum wurde, wie im allgemeinen Reaktionsschema (Abbildung 4.23) dargestellt, überprüft. Verschiedene Ketosen, Ketosederivate und Aldosen wurden getestet. Durch Zugabe von alkalischer Phosphatase wurde der Produktinhibitor UDP der Reaktion entzogen und damit auch das Gleichgewicht auf die Seite der Produkte verschoben.

3.3.5.1 Akzeptorsubstratscreening

Es wurde die Akzeptanz verschiedener Ketosen, Aldosen und Disaccharide im Vergleich zum natürlichen Substrat D-Fructose getestet.

Ansatz in 1 ml Gesamtvolumen:

100 mM Akzeptor
1 mM UDP-Glc
200 mU/ml SuSy (Enzymcharge I, II, IV, V)
1 U/ml alkalische Phosphatase
in HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0.

Die Proben wurden 18 Stunden bei 30 °C inkubiert und anschließend 5 min bei 95 °C erhitzt. Die Analytik erfolgte sowohl anhand des sich bildenden Disaccharids nach Methode 3.1.2 und der Bildung von UDP, UMP und Uridin nach Methode 3.1.1.1.1. Gleichzeitig wurde die Bildung von Glucose mit den Methoden 3.1.4. und 3.1.2 überprüft.

Ketosen:

D-Xylulose (Enzymcharge IV), D-Psicose (Enzymcharge I), D-Sorbose (Enzymcharge IV), L-Erytrulose (Enzymcharge I), L-Ribulose (Enzymcharge I), L-Sorbose (Enzymcharge IV), *altro*-2-Heptulose (Enzymcharge II), *manno*-2-Heptulose (Enzymcharge II), 1-Desoxy-1-fluoro- β -D-fructose (1-Desoxy-1-fluoro- β -D-fructose wurde von W. Köckenberger zur Verfügung gestellt) (Enzymcharge I)

Aldosen:

D-Erythrose (Enzymcharge I), D-Threose (Enzymcharge I), D-Ribose (Enzymcharge I), D-Arabinose (Enzymcharge I), D-Xylose (Enzymcharge I), D-Lyxose (Enzymcharge I), D-Allose (Enzymcharge I), D-Altrose (Enzymcharge I), D-Glucose (Enzymcharge I), D-Mannose (Enzymcharge I), D-Gulose (Enzymcharge IV), D-Idose (Enzymcharge IV), D-Galactose (Enzymcharge I), D-Talose (Enzymcharge IV), L-Erythrose (Enzymcharge I), L-Threose (Enzymcharge I), L-Ribose (Enzymcharge I), L-Arabinose (Enzymcharge I), L-Xylose (Enzymcharge I), L-Lyxose (Enzymcharge I), L-Allose (Enzymcharge IV), L-Glucose (Enzymcharge I), L-Galactose (Enzymcharge I), L-Talose (Enzymcharge I), L-Fucose (Enzymcharge V), L-Rhamnose (Enzymcharge V), β -1,6-Anhydroglucose (Enzymcharge I)

Fructose-Analoga:

5-Desoxy-D-fructose (Enzymcharge I/ Substrat aus dem SFB 380: Prof. Dr. Wandrey, PD Dr. Sprenger), 2-Keto-3*S*,4*R*-dihydroxyhexan (Enzymcharge II/ Substrat aus dem SFB 380: Dr. Müller), 3-Pyrrolidin (Enzymcharge V)

Disaccharide:

Lactulose (Enzymcharge II)

3.3.5.2 Kinetik ausgewählter Akzeptorsubstrate

Die Bestimmung der kinetischen Daten der ausgewählten Akzeptoren wurde in HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0, bei 30 °C durchgeführt. Es wurden jeweils Blindproben mitgeführt, um den nicht spezifischen Zerfall von UDP- α -D-Glucose zu berücksichtigen.

3.3.5.2.1 1-Desoxy-1-fluoro- β -D-fructose

Ansatz in 1 ml Gesamtvolumen:

0-100 mM	1-Desoxy-1-fluoro- β -D-fructose
1 mM	UDP-Glc
25 mU/ml	SuSy (Enzymcharge III)
in	HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0.

Die Proben wurden 15 min bei 30 °C inkubiert und anschließend durch Hitzedenaturierung (5 min, 95 °C) abgestoppt. Die Kinetik wurde anhand der Bildung von UDP nach Methode 3.1.1.1 verfolgt.

3.3.5.2.2 L-Sorbose

Ansatz in 1 ml Gesamtvolumen:

0-1,4 M	L-Sorbose
1 mM	UDP-Glc
200 mU/ml	SuSy (Enzymcharge IV)
1 U/ml	alkalische Phosphatase
in	HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0.

Es wurden nach 30, 60 und 90 min Proben entnommen. Die Reaktion wurde durch Hitzedenaturierung des Enzyms bei 95 °C für 5 min abgestoppt. Es wurde die Bildung

von Uridin, UMP und UDP mittels HPLC (Methode 3.1.1.1.1) bestimmt. Zur Auswertung der kinetischen Analyse wurde die Summe der Produkte Uridin, UMP und UDP (Gleichung 3.28) unter Berücksichtigung des nichtenzymatisch bedingten Zerfalls gebildet.

$$c_{UDP_{gesamt}} = \sum c_{Uridin,UMP,UDP} - \sum c_{Uridin_{blind},UMP_{blind},UDP_{blind}} \quad \text{Gleichung 3.28}$$

3.3.5.2.3 D-Xylulose

Ansatz in 1 ml Gesamtvolumen:

0-0,8 M D-Xylulose
 1 mM UDP-Glc
 200 mU/ml SuSy (Enzymcharge IV)
 1 U/ml alkalische Phosphatase
 in HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0.

Die Proben wurden 15 min bei 30 °C inkubiert und anschließend abgestoppt. Die Analytik erfolgte wie unter Methode 1.3.5.2.2.

3.3.5.2.4 D-Lyxose

Ansatz in 1 ml Gesamtvolumen:

0-0,8 M D-Lyxose
 1 mM UDP-Glc
 200 mU/ml SuSy (Enzymcharge IV)
 1 U/ml alkalische Phosphatase
 in HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0.

Die Inkubation erfolgte 60 min bei 30 °C, anschließend wurde abgestoppt. Die Analytik erfolgte nach Methode 3.3.5.2.2.

3.3.5.2.5 L-Arabinose

Ansatz in 1 ml Gesamtvolumen:

0-1 M	L-Arabinose
1 mM	UDP-Glc
200 mU/ml	SuSy (Enzymcharge II)
1 U/ml	alkalische Phosphatase
in	HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0.

Es wurden nach 30 und 60 min Proben entnommen und abgestoppt. Die Analytik und Auswertung erfolgte analog der für L-Sorbose (siehe Methode 3.3.5.2.2.).

3.3.6 Donorsubstratspektrum der Saccharose Synthase 1

3.3.6.1 Screening

Verschiedene UDP-aktivierte Zucker wurden nach dem allgemeinen Reaktionsschema in Abbildung 4.45 getestet. Als Referenz diente UDP- α -D-Glucose.

Ansatz in 1 ml Gesamtvolumen:

2 mM	D-Fructose
1 mM	Donor
1 U/ml	SuSy (Enzymcharge V)
1 U/ml	alkalische Phosphatase
in	HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0.

Donoren:

UDP-GlcNAc, UDP-GlcA, UDP-Xyl, UDP-Gal, UDP-GalNAc

Die Proben wurden 16 h bei 30 °C inkubiert, 5 min bei 95 °C abgestoppt und anschließend mittels HPLC auf die Bildung eines Disaccharids mit der Methode 3.1.2 bzw. der Bildung von UDP, UMP und Uridin (siehe Methode 3.1.1.3) analysiert.

Neben den UDP-aktivierten Zuckern wurden auch dTDP-Glc und dTDP-6d,4k-Glc getestet. Als Referenz diente UDP- α -D-Glucose.

Ansatz in 200 µl Gesamtvolumen:

2 mM	D-Fructose
1 mM	dTDP-Glc, dTDP-6-desoxy,4-keto-Glc, UDP-Glc
1 U/ml	SuSy (Enzymcharge VII)
1 U/ml	alkalische Phosphatase
in	Tris-HCl 100 mM, pH 8,0.

Die Proben wurden im CE-Gerät (siehe Kapitel 3.1.2) auf 30 °C temperiert. Der Reaktionsverlauf wurde über 17 h kontinuierlich mit der CE anhand der Bildung von dTDP, dTMP und Tymidin bzw. UDP, UMP und Uridin verfolgt (siehe Methode 3.1.2).

3.3.6.2 Kinetik ausgewählter Donorsubstrate

Die Kinetiken von UDP-GlcNAc und UDP-Gal wurde in Anwesenheit des natürlichen Akzeptorsubstrates D-Fructose gemessen.

3.3.6.2.1 UDP-*N*-Acetyl- α -D-glucosamin

Ansatz in 1 ml Gesamtvolumen:

10 mM	D-Fructose
0-5 mM	UDP-GlcNAc
100 mU/ml	SuSy (Enzymcharge II)
1U/ml	alkalische Phosphatase
in	HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0.

Die Proben wurden bei 30 °C inkubiert und zu unterschiedlichen Zeiten durch Hitzedenaturierung abgestoppt. Die Auswertung erfolgte analog der Methode für L-Sorbose unter 3.3.5.2.1. Zur Nukleotid/Nukleotidzucker-Analytik wurde Methode 3.1.1.2 angewandt.

3.3.6.2.2 UDP- α -D-Galactose

Ansatz in 1 ml Gesamtvolumen:

10 mM D-Fructose
0-2 mM UDP-Gal
100 mU/ml SuSy (Enzymcharge VIII)
1U/ml alkalische Phosphatase
in HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0.

Die Proben wurden bei 30 °C inkubiert und zu unterschiedlichen Zeiten durch Hitzedenaturierung abgestoppt. Die Auswertung erfolgte analog der Methode für L-Sorbose unter 3.3.5.2.1. Zur Nukleotid/Nukleotidzucker-Analytik wurde Methode 3.1.1.1.1 angewandt.

3.3.7 Inhibitoren der Saccharose Synthase 1

Es wurde die Wirkung verschiedener Inhibitoren auf die Synthesereaktion der rekombinanten Saccharose Synthase 1 überprüft.

Ansatz in 500 μ l Gesamtvolumen:

0-10 mM Inhibitor
2 mM D-Fructose
0,5 mM UDP- α -D-Glucose
10 mU/ml SuSy (Enzymcharge II)
in HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0

Inhibitoren:

5-Desoxy-D-fructose (SFB 380: Prof. Dr. Wandrey, PD Dr. Sprenger) 2-Keto-5(*R/S*)-hydroxyhexan (SFB 380: Dr. Liese), 2-Keto-3*S*,4*R*-dihydroxyhexan (SFB 380: Dr. Müller), DMDP (SFB 380: Prof. Dr. Wandrey, PD Dr. Sprenger, Prof. Dr. Fessner), *R/S*-Pyrrolidinol, *R*-Pyrrolidinol, Phenyl- α -D-glucosid, Phenyl- β -D-glucosid, *p*-Arbutin, D(-)-Salicin, 1-Desoxynojirimycin

Die Proben wurden bei 30 °C inkubiert. Die Reaktionszeit wurde so gewählt, dass der Umsatz bei etwa 10% lag. Nach dem Abstoppen erfolgte die Analytik sowohl anhand der Bildung von Saccharose nach dem fotometrischen Test (siehe Kapitel 3.1.4) als auch anhand der Bildung von UDP (Methode 3.1.1.1) Gleichzeitig wurde mit dem fotometrischen Test eine eventuelle Bildung von Glucose überprüft (Methode 3.1.4).

Die Inhibitoren Phenyl- β -D-glucosid, *p*-Arbutin und D(-)-Salicin wurden in Tests, in denen die Inhibitorkonzentration und die Konzentration des Akzeptor- bzw. Donorsubstrats variiert wurden, genauer untersucht.

Variation der Inhibitorkonzentration und der D-Fructose-Konzentration

Ansatz in 100 μ l Gesamtvolumen:

0-10 mM	Inhibitor
0-15 mM	D-Fructose
2 mM	UDP- α -D-Glucose
10 mU/ml	SuSy (Enzymcharge II)
in	HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0

Variation der Inhibitorkonzentration und der UDP- α -D-Glucose -Konzentration

Ansatz in 100 μ l Gesamtvolumen:

0-10 mM	Inhibitor
0-1,5 mM	UDP- α -D-Glucose
10 mM	D-Fructose
10 mU/ml	SuSy (Enzymcharge II)
in	HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0

Die Proben wurden bei 30 °C inkubiert. Die Reaktionszeit wurde so gewählt, dass der Umsatz bei etwa 10% lag. Die Proben wurden für 5 min bei 95 °C abgestoppt. Anschließend erfolgte die Analytik anhand der Bildung von UDP mittels HPLC (Methode 3.1.1.1)

3.4 Präparative Synthese von Saccharose-Analoga

Die präparativen Synthesen wurden auf Basis der zuvor bestimmten kinetischen Daten geplant. In Vorversuchen wurden Zeit-Umsatz-Kurven für optimale Umsätze bestimmt.

3.4.1 1'-Desoxy-1'-fluoro- β -D-fructofuranosyl- α -D-glucopyranosid

Die Synthese von 1'-Desoxy-1'-fluoro- β -D-fructofuranosyl- α -D-glucopyranosid (1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose) erfolgte in Anlehnung an die bereits durchgeführte Synthese von [$^{13}\text{C}_1$]- β -D-Fructofuranosyl- α -D-glucopyranosid (Römer 1998, Römer et al. 2001).

1-Desoxy-1-fluoro-D-fructose wurde von W. Köckenberger nach der Methode von Card und Hitz (Römer et al. 2001, Card and Hitz 1984) synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Zur Synthese von 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose wurde die Repetitive-Batch-Technik angewendet.

Ansatz 100 ml:

0,96 mmol (176 mg) 1-Desoxy-1-fluoro- β -D-fructose

1 mmol UDP-Glc

40 U SuSy1 (Enzymcharge V)

200 U alk. Phosphatase

in HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0.

Der Ansatz wurde unter leichtem Rühren bei 30 °C inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden die Enzyme mittels Ultrafiltration mit einer Amicon-Zelle (Millipore; Amicon, Eschborn) über eine YM 30 Membran (Millipore; Amicon, Eschborn) abgetrennt. Die Enzyme wurden in einem 2. und 3. Ansatz nach Zugabe neuer Substrate wieder verwendet.

Insgesamt wurden in drei Ansätzen in einem Gesamtvolumen von 280 ml eingesetzt:

2,88 mmol (528 mg) 1-Desoxy-1-fluoro- β -D-fructose

3 mmol UDP-Glc

40 U SuSy1 (Enzymcharge V)

200 U alk. Phosphatase

Die Gesamtreaktionszeit betrug 144 h.

Die Reaktion wurde mittels HPLC nach Methode 3.1.2 verfolgt.

Das Produkt wurde, wie in Kapitel 3.4.6.1, 3.4.6.2 und 3.4.6.5 beschrieben, aufgereinigt.

3.4.2 α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranosid

In den kinetischen Messungen wurde für L-Sorbose ein K_m -Wert von 226,5 mM und ein V_{max} -Wert von 0,35 U mg⁻¹ ermittelt. In den folgenden Versuchen wurden 300 mM L-Sorbose eingesetzt, da das Substrat im Überschuss die Synthesereaktion inhibiert.

3.4.2.1 Vorversuche

Um einen optimalen Syntheseansatz zu finden, wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase und Konzentration an UDP-Glc variiert.

Zeit-Umsatz-Kurven:

Ansatz	L-Sorbose [mM]	UDP-Glc [mM]	SuSy1 (Enzymcharge IV) [mU/ml]	alkalische Phosphatase [U/ml]
a	300	1	500	1
b	300	2	500	1
c	300	1	500	2
d	300	2	500	2

in HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0. Das Gesamtvolumen betrug 1 ml.

Die Proben wurden bei 30 °C inkubiert, es wurden nach 0,5, 1, 2, 3, 4,5 und 16 h Proben entnommen, die mittels HPLC (3.1.1) untersucht wurden.

3.4.2.2 Synthese

Aus den Zeit-Umsatz-Kurven ging hervor, dass bei der Kombination von 300 mM L-Sorbose, 1 mM UDP- α -D-Glucose, 500 mU/ml SuSy, 2 U/ml alkalische Phosphatase nach 3,5 h ein 90%iger Umsatz erreicht werden konnte. Da das Donorsubstrat UDP-Glc eine starke Substratüberschussinhibition (K_{is} =2,3 mM) aufweist und der Akzeptor in einem großen Überschuss eingesetzt werden muss, erfolgte die Synthese von α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranosid unter Verwendung der Fed-Batch-Technik. Es wurden 2 Ansätze angesetzt. Die Synthese wurde mittels HPLC anhand der Produktbildung nach Methode 3.1.2 verfolgt.

Ansatz 1:

Gesamtvolumen 25 ml:

7,5 mmol	L-Sorbose
0,025 mmol	UDP-Glc
12,5 U	SuSy1 (Enzymcharge V)
50 U	alk. Phosphatase
in	HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0.

Die Reaktion wurde mit einer Ausgangskonzentration von 0,025 mmol UDP-Glc gestartet. Nach 3, 6, 9, 23, und 26 h wurden dem Ansatz jeweils 0,025 mmol UDP-Glc hinzugegeben. Nach 29 h erfolgte die Zugabe von 0,05 mmol UDP-Glc: Da die Syntheseleistung nachließ wurden zusätzlich 2,5 U SuSy1 und 25 U alk. Phosphatase hinzugefügt. Nach 46 h wurden nochmals 0,025 mmol UDP-Glc in den Ansatz gegeben und anschließend für weitere 4 h inkubiert. Die Enzyme wurden durch Ultrafiltration über eine YM 10 Membran (Amicon; Millipore, Eschborn) abgetrennt. Die Gesamtreaktionszeit betrug 50 h. Insgesamt wurden 0,225 mmol UDP-Glc und 7,5 mmol L-Sorbose mit 15 U SuSy1 und 75 U alk. Phosphatase umgesetzt.

Ansatz 2:

Gesamtvolumen 50 ml:

15 mmol	L-Sorbose
0,1 mmol	UDP-Glc
25 U	SuSy1 (Enzymcharge V)
100 U	alk. Phosphatase
in	HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0.

Die Reaktion wurde mit einer Ausgangskonzentration von 0,1 mmol UDP-Glc gestartet. Nach 16, 19 und 22 h wurden dem Ansatz 0,05 mmol UDP- α -D-Glucose hinzugegeben. Nach 24 erfolgte die Zugabe von 0,15 mmol UDP-Glc, 10 U SuSy1 und 50 U alkalische Phosphatase. Anschließend wurde für weitere 18 h inkubiert. Die Enzyme wurden durch Ultrafiltration über eine YM 10 Membran abgetrennt. Die Gesamtreaktionszeit betrug 42 h. Insgesamt wurden für den 2. Ansatz 15 mmol L-Sorbose, 0,4 mmol UDP-Glc, 35 U SuSy1 und 150 U alk. Phosphatase eingesetzt.

Insgesamt wurden in 2 Ansätzen in einem Endvolumen von 75 ml 22,5 mmol L-Sorbose, 0,625 mmol UDP-Glc, 50 U SuSy1 (Enzymcharge V) und 225 U alk.

Phosphatase eingesetzt. Die Reaktionszeiten betrugen 50 bzw. 42 h. Die Aufreinigung des Disaccharids erfolgte wie in Kapitel 3.4.6.1a), 3.4.6.2 und 3.4.6.4 beschrieben.

3.4.3 α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid

In den kinetischen Messungen wurde für D-Lyxose ein K_m -Wert von 125,7 mM und ein V_{max} -Wert von 0,35 U mg⁻¹ ermittelt. Zur Messung der Zeit-Umsatz-Kurven wurde eine D-Lyxose-Konzentration von 200 mM eingesetzt.

3.4.3.1 Vorversuche

Es wurden verschiedene Zeit-Umsatz-Kurven aufgenommen, in denen die Konzentration an UDP- α -D-Glucose und die Aktivität der alkalischen Phosphatase variiert wurden.

Zeit-Umsatz-Kurven:

Ansatz	D-Lyxose [mM]	UDP-Glc [mM]	SuSy1 (Enzymcharge IV) [mU/ml]	alkalische Phosphatase [U/ml]
a	200	1	500	1
b	200	2	500	1
c	200	1	500	2
d	200	2	500	2

in HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0. Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 1 ml durchgeführt.

Die Proben wurden bei 30 °C inkubiert, es wurden nach 0, 15, 30, 50, 80, 110, 140, 170, 230 und 300 Minuten Proben entnommen, die mittels HPLC (siehe Methode 3.1.1) untersucht wurden.

3.4.3.2 Synthese

Aus den Vorversuchen wurde der Ansatz c ausgewählt. Hier konnte nach zwei Stunden ein 98,5 % Umsatz erzielt werden. Die Synthese von α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid wurde dann in einer kontinuierlichen Fed-Batch-Synthese in 2 Ansätzen durchgeführt. Die Synthese wurde mittels HPLC anhand der Produktbildung nach Methode 3.1.2 verfolgt.

Ansatz 1:

5 mmol	D-Lyxose
0,025 mmol	UDP-Glc
12,5 U	SuSy1 (Enzymcharge V)
50 U	alk. Phosphatase
in 25 ml	HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0.

Der Ansatz wurde unter leichtem Rühren bei 30 °C inkubiert. Nach einer Stunde wurde ein linearer UDP-Glc-Feed einer 55,6 mM Stammlösung (0,4605 mmol in 7,83 ml) mit einer Fließgeschwindigkeit von 340 µl/h (Peristaltikpumpe P1, Pharmacia, Freiburg) gestartet. Insgesamt wurde 23 h zugetropft, anschließend wurde für weitere 5 h inkubiert. Nach 17 h wurden 4 U Saccharose Synthase und 25 U alk. Phosphatase in den Ansatz gegeben, um die Reaktion fortzuführen. Die Enzyme wurden durch Ultrafiltration über eine YM 10 Membran nach 29 h Gesamtreaktionszeit abgetrennt. Das Endvolumen des Ansatzes betrug 32,9 ml.

Ansatz 2:

4 mmol	D-Lyxose
0,02 mmol	UDP-Glc
10 U	SuSy1 (Enzymcharge V)
40 U	alk. Phosphatase
in 20 ml	HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0.

wurden vorgelegt. Nach einer halben Stunde wurde mit einer 48,5 mM UDP-Glc Stammlösung (0,2475 mmol in 5,1 ml) ein linearer Feed mit einer Fließgeschwindigkeit von 340 µl/h gestartet. Es wurde 15 h zugetropft. Anschließend wurde für weitere 4 h bei 30 °C inkubiert. Nach insgesamt 19,5 h wurden die Enzyme durch Ultrafiltration über eine YM 10 Membran abgetrennt. Das Endvolumen betrug 25,1 ml, die Gesamtreaktionszeit 19,5 h.

Insgesamt wurde in 2 Ansätzen mit einem Endvolumen von 58 ml 9 mmol L-Sorbose, 0,728 mmol UDP-Glc, 26,5 U SuSy1 (Enzymcharge V) und 115 U alk. Phosphatase eingesetzt.

Die Aufreinigung erfolgte wie in Kapitel 3.4.6.1a) und 3.4.6.4 beschrieben.

3.4.4 α -D-Glucopyranosyl-L-arabinose

Der K_m -Wert für L-Arabinose wurde zu 274 mM bestimmt. Da keine Substratüberschussinhibition vorliegt, wurde für die Syntheseansätze eine Konzentration von 1 M gewählt.

3.4.4.1 Vorversuche

Es wurden verschiedene Zeit-Umsatz-Kurven aufgenommen, in denen die Konzentration an UDP-Glc und die Aktivität der alkalischen Phosphatase variiert wurden.

Zeit-Umsatz-Kurven:

Ansatz	L-Arabinose [M]	UDP-Glc [mM]	SuSy1 (Enzymcharge VI) [U/ml]	alk. Phosphatase [U/ml]
a	1	0,5	2	2
b	1	0,5	2	4
c	1	0,5	4	8

in HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0. Das Gesamtvolumen betrug 1 ml.

Die Proben wurden bei 30 °C inkubiert, es wurden nach 0, 15, 30, 70, 150, und 300 min Proben entnommen, die mittels HPLC (Methode 3.1.1.1.1) analysiert wurden.

3.4.4.2 Synthese

Aus den Vorversuchen wurde der Ansatz c für die Synthese von α -D-Glucopyranosyl-L-arabinose ausgewählt. In diesem Ansatz konnte nach 2,5 h ein Umsatz von 87 % erreicht werden. Die Synthese erfolgte im kontinuierlichen Fed-Batch.

Ansatz:

60 mmol	L-Arabinose
0,03 mmol	UDP-Glc
240 U	SuSy1 (Enzymcharge VII)
480 U	alk. Phosphatase
in 60 ml	HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0.

Der Ansatz wurde unter leichtem Rühren bei 30 °C inkubiert. Nach 0,5 h wurde über einen Zeitraum von 67 h wurden mit einer Fließgeschwindigkeit von 300 μ l/h 20 ml einer 36 mM Stammlösung von UDP-Glc (0,72 mmol in 20 ml) hinzuge tropft. Der Ansatz wurde weitere 6 h bei 30 °C inkubiert und die Enzyme anschließend durch

Ultrafiltration (VivaCell 70, 50 kDa MWCO Membran, Satorius, Göttingen) abgetrennt. Der Reaktionsverlauf wurde mit HPLC mit Methode 3.1.2 verfolgt.

Die Aufreinigung des Produktes erfolgte wie in den Kapiteln 3.4.6.1b) und 3.4.6.3 beschrieben.

3.4.5 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucopyranosyl- β -D-fructofuranosid

3.4.5.1 Vorversuche

Es wurden verschiedene Zeit-Umsatz-Kurven aufgenommen, in denen das Akzeptor/Donor-Verhältnis variiert wurde. Der K_m -Wert für UDP-GlcNAc liegt bei 0,9 mM.

Zeit-Umsatz-Kurven:

Ansätze 1 ml

Ansatz	D-Fructose [mM]	UDP-GlcNAc [mM]	SuSy1 (Enzymcharge IV) [U/ml]	alk. Phosphatase [U/ml]
a	2	0,5	1	2
b	2	1	1	2
c	20	0,5	1	2
d	20	1	1	2
e	20	0,5	4	8

in HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0. Das Gesamtvolumen betrug 1 ml.

Die Proben wurden bei 30 °C inkubiert. Es wurden nach 0, 1, 2, 4, 5, 6, 8, 25 h Proben entnommen, die mittels HPLC (Methode 3.1.1) untersucht wurden.

3.4.5.2 Synthese

Aus den Vorversuchen wurde der Ansatz e ausgewählt, der nach 4 h einen 100% Umsatz an UDP-GlcNAc zeigte. Er wurde für die Synthese von 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucopyranosyl- β -D-fructofuranosid im kontinuierlichen Fed-Batch eingesetzt.

Ansatz:

2 mmol	D-Fructose
0,05 mmol	UDP-GlcNAc
400 U	SuSy1 (Enzymcharge VII)
800 U	alk. Phosphatase
in 100 ml	HEPES-NaOH 200 mM, pH 8,0.

Der Ansatz wurde unter leichtem Rühren bei 30 °C inkubiert. Über einen Zeitraum von 39 h wurden mit einer Fließgeschwindigkeit von 760 µl/h, 30 ml eine 27 mM Stammlösung von UDP-GlcNAc (0,8 mmol in 30 ml) hinzugetropft. Es wurden weitere 16 h bei 30 °C inkubiert und die Enzyme anschließend mit Ultrafiltration (VivaCell 70, 50 kDa MWCO Membran Satorius, Göttingen) abgetrennt. Der Reaktionsverlauf wurde mit HPLC (Methode 3.1.2) verfolgt.

Das Disaccharid wurde wie in Kapitel 3.4.6.1b) und 3.4.6.3 beschrieben aufgereinigt.

3.4.6 Aufreinigung der Saccharose-Analoga

3.4.6.1 Anionenaustauschchromatografie

In einem ersten Schritt wurden UMP, UDP und Donorsubstrat (UDP-Zucker) und das Sulfonat des HEPES-Puffers mittels Anionenaustauschchromatografie abgetrennt. Um den HEPES-Puffer in die Sulfonat-Form zu bringen, mussten die Synthese-Pools zunächst auf pH 8,6 eingestellt werden.

Zur Aufreinigung von 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose, α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid, α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranosid wurde AG 1-X8 (100-200 mesh, BioRad, München) in der Formiat-Form eingesetzt:

Säule: 2,6 x 23 cm (Gelvolumen 122 ml), Leersäule XK26/40

Äquilibration: Millipore-Wasser

Probe: Synthese-Pools

Elution: Millipore-Wasser

lineare Fließgeschwindigkeit: 56,5 cm/h (HighLoad™ Pumpe P50)

α -D-Glucopyranosyl-L-arabinose und N-Acetylsaccharosamin wurden mit Dowex 1-X8 (100-200 mesh, Serva, Heidelberg) in der Chlorid-Form aufgereinigt:

Säule: 5 x 8,5 cm (Gelvolumen 167 ml), Leersäule XK50/60

Äquilibration: Millipore-Wasser

Probe: Synthese-Pools

Elution: Millipore-Wasser

lineare Fließgeschwindigkeit: 30,5 cm/h (HighLoad™ Pumpe P50)

Die einzelnen Fraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatografie (siehe Kapitel 3.1.5) untersucht und die zuckerhaltigen Fraktionen vereinigt. Die Pools wurden

anschließend am Rotationsverdampfer im Ölpumpenvakuum bei 30 °C auf 5-15 ml eingeeengt.

3.4.6.2 Kationenaustauschchromatografie

Zur weiteren Trennung der Zucker wurde ein Kationentauscher-Material in der Ca^{2+} -Form verwendet. Zucker mit cis-ständigen Hydroxylgruppen bilden einen Komplex mit den Calcium-Ionen und werden dadurch unterschiedlich retardiert.

Diese Methode wurde zur Reinigung von 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose und α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranosid eingesetzt. Als Gelmaterial wurde AG 50W-X8 (200-400 mesh, BioRad, München).

Säule: 5 x 80 cm (Gelvolumen 1570 ml), Leersäule XK50/100

Äquilibration: Millipore-Wasser

Probe: 5 ml eingeeengter Pool aus Kapitel 3.4.6.1

Elution: Millipore-Wasser

lineare Fließgeschwindigkeit: 3 cm/h (HighLoad™ Pumpe P50)

Die einzelnen Fraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatografie analysiert. Die disaccharidhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert.

3.4.6.3 Gelfiltration

Zur Entsalzung und weiteren Abtrennung von Monosacchariden wurde eine Gelfiltrationssäule (Biogel P2 extra fine; BioRad, München) verwendet. α -D-glucopyranosyl-L-arabinose und N-Acetylsaccharosamin wurden mit Biogel P2 extra fine (BioRad, München) aufgereinigt. Um Interaktionen des Zuckers mit der Gelmatrix zu vermeiden wurde als Laufmittel Ammoniumformiatpuffer verwendet.

Säule: 1,6 x 84 cm (Gelvolumen 169 ml), Leersäule XK16/100

Äquilibration: 10 mM Ammoniumformiat, pH 7,0

Probe: 5 ml eingeeengter Pool aus Abschnitt 3.4.6.1

Elution: 10 mM Ammoniumformiat

lineare Fließgeschwindigkeit: 2,4 cm/h (Peristaltikpumpe P1)

Die Aufreinigung wurde mittels Dünnschichtchromatografie und HPLC (Kapitel 3.1.2) verfolgt. Die disaccharidhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und gefriergetrocknet.

3.4.6.4 Präparative HPLC

Die präparative HPLC wurde zur Aufreinigung von α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid und zur Feinreinigung von α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranosid eingesetzt. Die präparative Säule entsprach der analytischen Säule aus Kapitel 3.1.2.

Säule :	300 x 20 mm (Carbohydrate-Ca, CS-Langerwehe)
Temperatur:	85 °C
Äquilibration:	Millipore-Wasser
Probe:	Lyophilisat gelöst in 5 ml aus Kapitel 3.4.6.2 (α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranosid) bzw. 5 ml Probe aus Kapitel 3.4.6.1 (α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid)
Elution:	Millipore-Wasser
lineare Fließgeschwindigkeit:	1,2 ml/min (High Precision Pump Modell 300 mit präp. Pumpenkopf, Gynkotek, Germaring)

Die Aufreinigung wurde mittels Dünnschichtchromatografie und HPLC (3.1.2) verfolgt. Die disaccharidhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und gefriergetrocknet.

3.4.6.5 Umkristallisation

Das Disaccharid 1'-Desoxy-1'-fluoro- β -D-fructofuranosyl- α -D-glucopyranosid wurde zusätzlich durch Umkristallisation aus Methanol gereinigt.

Dazu wurde das trockene Produkt in 10 ml abs. Methanol gelöst und bei 25 °C kristallisiert. Kristalle zur weiteren Untersuchung, wie z.B. eine Röntgenstrukturanalyse, wurden jedoch nicht erhalten.

3.4.7 Charakterisierung

3.4.7.1 NMR

Die Proben wurden in D₂O gelöst und mit einem Bruker NMR-Spektrometer (DRX 500 bzw. DAX 500) vermessen. Es wurden ¹H-Spektren (500 MHz), ¹³C₁-Spektren (¹³C{¹H}entkoppelt) (125 MHz), ¹³C₁-Spektren DEPT (¹³C{¹H}entkoppelt) (125 MHz) und ¹⁹F-Spektren (470 MHz) aufgenommen.

Die Spektren wurden am Institut für Organische und Makromolekulare Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf sowie am Magnetic Resonance Center, School of Physics and Astronomy, der Universität Nottingham, aufgenommen.

3.4.7.2 Massenspektrometrie

Die Proben wurden in einem Methanol/Wasser-Gemisch (50:50) gelöst. Die Molekularemasse wurde mit einem ESI-MS im *Negativ Ion Modus* (Finnigan MAT, LCQ) bestimmt.

Die Spektren wurden am Institut für Biotechnologie 2 im Forschungszentrum Jülich gemessen.

3.5 Untersuchung der Saccharose-Analoga auf Hydrolyse durch Invertase

Das Enzym Invertase spaltet Saccharose in Glucose und Fructose. Die Invertase sollte auf ihre hydrolytische Aktivität mit den Saccharose-Analoga getestet werden. Die aus der Invertasespaltung hervorgehende Glucose bzw. Fructose wurde fotometrisch bestimmt.

3.5.1 Invertasetest mit fotometrische Bestimmung von Glucose

Die aus der Invertasereaktion hervorgehende Glucose wurde mit dem schon in Kapitel 3.1.4 beschriebenen Test bestimmt. In Abänderung der Methode wurde die Reaktion kontinuierlich verfolgt.

Die Produkte 1'-Desoxy-1'-fluoro-β-D-fructofuranosyl-α-D-glucopyranosid, α-D-Glucopyranosyl-α-L-sorbofuranosid, α-D-Glucopyranosyl-α-D-lyxopyranosid und α-D-Glucopyranosyl-L-arabinose wurden getestet. 1'-Desoxy-1'-fluorsaccharose diente als

Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurde Saccharose vermessen. Zusätzlich wurde eine Probe ohne Substrat bzw. alle Proben mit Substrat aber ohne Invertase vermessen.

Testansatz:

50 µl	Disaccharid 0,05 mM
50 µl	Invertase (40 U/ml in 0,2 M Phosphatpuffer, pH 5,0)/
oder 50 µl	Puffer (Kontrolle)
100 µl	Glucose-Reagenz (siehe Kapitel 3.1.4)

Die Aufnahme der Extinktionsänderung erfolgte über 60 min bei 405 nm und Raumtemperatur im Mikrotiterplattenfotometer. Die relative Aktivität wurde anhand der Steigung der Extinktionskurven der Disaccharid-Proben im Bereich maximaler Extinktionsänderung in Relation zur maximalen Steigung der Saccharose-Probe berechnet (Gleichung 3.29).

$$A_{rel} = \frac{100}{\left(\frac{\Delta E}{\min}\right)^*_{Sac}} \cdot \left(\frac{\Delta E}{\min}\right)^*_{Probe} \quad \text{Gleichung 3.29}$$

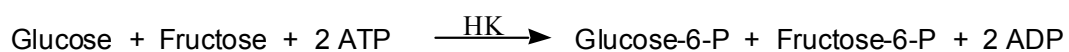
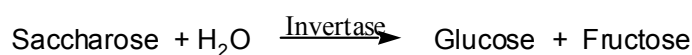
$\left(\frac{\Delta E}{\min}\right)^*_{Sac}$ max. Extinktionsänderung pro min der Saccharose

$\left(\frac{\Delta E}{\min}\right)^*_{Probe}$ max. Extinktionsänderung pro min der Saccharose-Analoga

A_{rel} relative Aktivität [%]

3.5.2 Invertasetest mit fotometrischer Bestimmung von Glucose und Fructose

Da die Glucose Oxidase nicht mit 2-Acetamido-2-desoxyglucose reagiert, wurde zur Untersuchung von 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucopyranosyl-β-D-fructofuranosid folgender Test angewendet:



Testansatz:

100 µl MOPS (100 mM, pH 6,0 mit 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP und 0,4 mM NADP⁺)

10 µl Saccharose bzw. *N*-Acetylsaccharosamin (0,1 mM in H₂O)

oder 10 µl Probe (Kontrolle)

10 µl Hexokinase (3 U/ml), Phosphoglucose Isomerase (3,3 U/ml), Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (1,5 U/ml) in Tris-HCl 20 mM, pH 8,1

10 µl Invertase (80 U/ml in Tris-HCl 20 mM, pH 8,1)

Die Aufnahme der Extinktion erfolgte über 60 min bei 340 nm und 30 °C im Mikrotiterplattenfotometer. Vor der Zugabe von Invertase wurden erst ca. 5 min vorinkubiert bis die Extinktion konstant war. Als Kontrolle wurde Wasser statt Disaccharid mitgeführt, um die unspezifische Extinktion mitzuverfolgen. 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose wurde als weitere Negativ-Kontrolle mitgeführt. Die Berechnung der relativen Aktivität erfolgte entsprechend Gleichung 3.30. Wenn *N*-Acetylsaccharosamin und 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose gespalten würden, sollte hier ein NADH pro Disaccharid-Molekül, während bei Saccharose zwei NADH pro Saccharose-Molekül entstehen.

$$A_{rel} = \frac{100}{\frac{1}{2} \left[\left(\frac{\Delta E}{\min} \right)^*_{Sac} - \left(\frac{\Delta E}{\min} \right)^*_{H_2O} \right]} \cdot \left[\left(\frac{\Delta E}{\min} \right)^*_{Probe} - \left(\frac{\Delta E}{\min} \right)^*_{H_2O} \right] \quad \text{Gleichung 3.30}$$

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Fermentation, Aufreinigung und proteinchemische Charakterisierung

Die Expression der rekombinanten Saccharose Synthase aus *Solanum tuberosum* erfolgt konstitutiv unter der Kontrolle des Protonen-ATPase-Promotors (*PMA1*) in *Saccharomyces cerevisiae* Stamm 22574d. Das rekombinant vorliegende Enzym zeigt wesentliche Vorteile im Vergleich zu der Gewinnung des Enzyms aus pflanzlichem Material, wie z.B. aus Reis (Elling et al. 1995b). Der größte Vorteil ist natürlich der erleichterte Zugang und somit auch die ständige Verfügbarkeit. Weiterhin wird die Aufreinigung und Abtrennung störender Nebenaktivitäten vereinfacht. Durch die Anzucht der Hefen auf glucosehaltigem Medium können keine Invertasen gebildet werden. Dies ist bei der Nutzung der Saccharose Synthase in Syntheserichtung von großem Vorteil. Um höhere Zellausbeuten zu erzielen, wurde das zuvor angewandte Anzuchtverfahren der Schüttelkolbenkultivierung im 10 l-Maßstab (Schrader 1998) auf die Fermentation im 30 l-Maßstab umgestellt.

4.1.1 Fermentation

Die Fermentation der Hefezellen erfolgte in SD-Medium. Als Kohlenstoffquelle wurde dem Medium in einem exponentiellen Feed Glucose zugeführt und der pH-Wert auf pH 3,8 einreguliert. Der Feed wurde so gestaltet, dass eine starke Glucoselimitierung vorlag, um eine Gärung (Deregulation des PMA1-Promotors) zu vermeiden. In Tabelle 4.1 sind die Ergebnisse von fünf verschiedenen Fermentationen zusammengefasst.

Tabelle 4.1 Fermentationsergebnisse

Fermentation	A	B	C	D	E
Fermentationsvolumen [l]	20	30	30	31	30
Zellausbeute [g]	391	796	580	823	798
volumenspez. Zellausbeute [g/l]	19,6	26,5	19,3	26,5	26,6
Raum-Zeit -Ausbeute [g/l·h]	0,63	0,74	0,36	0,74	0,65
spez. Aktivität [U/mg]	0,25	0,26	0,24	0,28	0,29
max. OD ₆₀₀	12,6	25	19,5	24	26

In Abbildung 4.1 ist ein typisches Fermentationsprofil (Fermentation D) dargestellt. Nach einer Gesamtfermentationszeit von 36 Stunden wurde eine maximale OD_{600} von 24 erreicht. Aus 31 l Kulturmedium konnten 823 g Zellfeuchtmasse gewonnen werden. Das entspricht einer Raumzeitausbeute von 0,74 g/l·h, mit einer spezifischen Aktivität von 0,28 U/mg. Die ermittelte spezifische Aktivität von 0,28 U/mg weist einen Unterschied zur Endaktivität in Abbildung 4.1 von nur 0,24 U/mg auf. Um den Fermentationsverlauf zu überprüfen wurden kleine Zellmengen mit einer Schwigmühle aufgeschlossen. Hierbei ist vermutlich die Güte des Aufschlusses weniger gut, was sich im Folgenden in der niedrigeren spezifischen Aktivität von 0,24 U/m am Ende der Fermentation niederschlägt. Die Fermentationen A und C bilden bezüglich der Zellausbeuten Ausnahmen. Bei Fermentation A war der Glucose-Feed nicht optimal eingestellt und die automatische Glucosezufütterung musste mehrfach unterbrochen werden, so dass einerseits die Wachstumsbedingungen nicht optimal waren und andererseits die Fermentation zu früh abgebrochen werden musste. In Fermentation C war der exponentielle Feed zu flach eingestellt. Anstelle von 3 M NaOH/KOH bzw. 3 M H_2SO_4 wurde in Fermentation C zur pH-Regulierung 25%-ige Ammoniaklösung bzw. 3 M Phosphorsäure verwendet, die sich eventuell auch negativ auf das Zellwachstum auswirken. Ursprünglich sollte dadurch dem Fermentationsmedium eine zusätzlich Stickstoff- und Phosphatquelle zugeführt werden, um bessere Zellausbeuten zu erzielen.

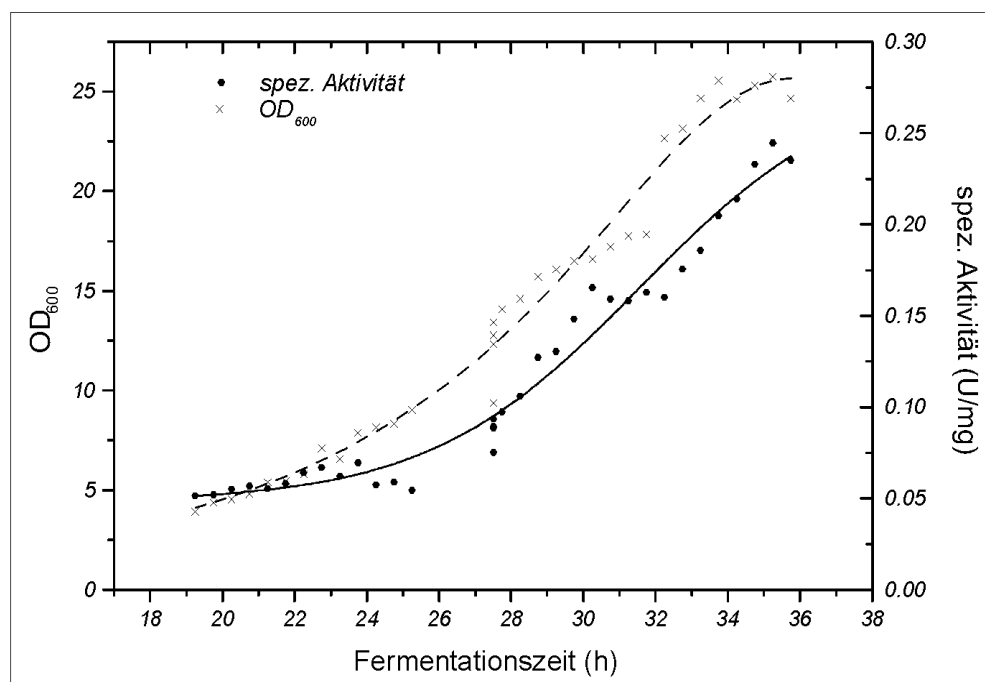


Abbildung 4.1 Fermentationsprofil von *Saccharomyces cerevisiae* pDR SuSy1 zur Produktion von SuSy1 aus Kartoffel im 30 l Fermenter (Fermentation D).

Die Kultivierung im 2 l Maßstab mit Schüttelkolben (5 parallele Ansätze) lieferte bei einer OD₆₀₀ von 4,3 ca. 90 g Zellfeuchtmasse (Schrader 1998). Dies entspricht einer volumenspezifischen Zellausbeute von 9 g/l. Sie konnte somit in den Fermentationen B, D und E um den Faktor 3 gesteigert werden. Ein wesentlicher Vorteil der Kultivierung im Fermenter ist die Vermeidung eines anaeroben Stoffwechsels, was letztendlich zu höheren Zellausbeuten und besseren spez. Aktivitäten führt. Bei einer Kultivierung der Hefen im Schüttelkolben kommt es verstärkt zu einer alkoholischen Gärung, da aufgrund eines erhöhten Glucoseanteils schnell eine Sauerstofflimitierung eintritt. Anstatt Zellmasse wird Alkohol produziert. Dieser Prozess kann durch die Wahl geeigneter Fermentationsbedingungen, wie z. B. starke Glucoselimitierung und ausreichende Sauerstoffversorgung, vermieden werden.

Zur Bestimmung der Enzymexpressionsraten wurden größere Chargen (200 bis 400 g Zellfeuchtmasse) mit der Kugelmühle aufgeschlossen (Tabelle 4.2) und anschließend zur Aufreinigung eingesetzt. Die Zellen aus Fermentation **E** wurden mit einer neuen Kugelmühle aufgeschlossen, was sich in der doppelt so hohen Enzymexpressionsrate bemerkbar macht. Ein Vergleich der beiden Kugelmühlen ist nicht möglich, da sich allein die Zellgeometrie der Aufschlusskammer und das Prinzip der Kugelabtrennung unterscheiden.

Tabelle 4.2 Enzymexpressionsraten der Fermentationen A bis E.

Fermentation	A	B	C	D	E
zellspez. Enzymexpressionsrate [U/g]	6,1	5,8	7,1	7,8	15,1
volumenspez. Enzymexpressionsrate [U/l]	120	116	137	207	402

Der Aufschluss mit der neuen Kugelmühle war wesentlich effizienter, da sehr viel mehr Protein freigesetzt werden konnte. Bei der Schüttelkolben-Fermentation im 2 l Maßstab konnte eine Enzymexpressionsrate von ca. 75 U/l Kulturvolumen bzw. 8,4 U/g Zellfeuchtmasse erreicht werden. In den geschilderten Fermentationen konnten die volumenspezifischen Enzymexpressionsraten zwischen 55% und 176% deutlich gesteigert werden. In der Fermentation E wurde eine Steigerung um 436% erreicht und die zellspezifische Enzymexpressionsrate um 80% erhöht.

Im Vergleich zu verschiedenen Pflanzenmaterialien zeigte sich, dass das rekombinante Enzym mit einer 17-fach gesteigerten Enzymexpressionsrate produziert wird. Elling et al. konnten aus einem Gramm Reiskörnern 0,55 U SuSy gewinnen (Elling et al. 1995b). Ähnlich sehen diese Werte für eine Aufreinigung aus Kartoffeln von Pressey aus (Pressey 1969). Hier konnten 0,54 U/g Pflanzenmaterialien isoliert werden. Ein

Vergleich mit rekombinanten Enzymen aus *E. coli* zeigt, dass die Enzymexpressionsraten im Bereich der Ergebnisse der Fermentation E mit dem verbessertem Aufschluss liegen. Aus 3-5 g Zellen konnten 77,8 U rekombinante SuSy aus Sojabohne gewonnen werden (Zhang et al. 1999), was einer Enzymexpressionsrate von 16-26 U/g Zellen entspricht. Sayion et al. (Sayion et al. 1999) konnten aus einer 2 l *E. coli* Kultur 685 U (342,5 U/l) rekombinante SuSy1 aus Reis gewinnen.

4.1.2 Aufreinigung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die rekombinante SuSy1 mehrfach aus Zellmaterial verschiedener Fermentationen aufgereinigt. Als Beispiel wird hier die Aufreinigung der SuSy1 aus 340 g Zellfeuchtmasse (Fermentation E) gezeigt.

Die Aufreinigung der Saccharose Synthase erfolgte in drei Schritten. In einem ersten Schritt wurde eine Anionenaustauschchromatografie an Q-Sepharose FF-Material durchgeführt.

Tabelle 4.3 Aufreinigung der rekombinanten SuSy1 aus Kartoffel über Anionenaustauschchromatografie an Q-Sepharose FF.

Schritt	Volumen [ml]	Gesamt- aktivität [U]	Gesamt- protein [mg]	spez. Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Faktor [-]
Rohextrakt	1120	5152	18032	0,3	100	1
Pool Q-Seph.	1720	4472	1049	4,3	87	15
Q-Seph konz.	196	3822	888	4,3	74	15

Die aktiven Fraktionen eluierten bei einem KCl-Salzgehalt von 300 mM. Die erhaltene Enzympräparation war frei von Invertasen und Phosphatasen (Faktor₂: 0,95). Die nucleotidzucker-spaltenden Nebenaktivitäten lagen bei 0,05% bezogen auf die SuSy Aktivität. Diese Enzympräparation wurde direkt zur präparativen Synthese von Saccharose-Analoga eingesetzt.

Das Enzym wurde in der Regel aliquotiert bei -20 °C aufbewahrt. Zusätzlich wurde ein Teil der Q-Sepharose Fraktion lyophilisiert. Aus 20 ml Q-Sepharose-Konzentrat (390 U) mit einem Gesamtproteingehalt von 90,4 mg wurde 97,6 mg Lyophilisat gewonnen. In 1 mg/ml Lyophilisat waren 3,01 U/ml mit einer spez. Aktivität von 4,5 U/mg Protein enthalten. Das entspricht 292,8 U in 97,6 mg Lyophilisat und einer Gesamtausbeute von 75%. Tests zur Langzeitstabilität des Lyophilisats wurden bisher noch nicht durchgeführt.

Für kinetische- und proteinchemische Untersuchungen wurden 100 ml des Q-Sepharose Konzentrats mit Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatografie (IMAC) gereinigt.

Tabelle 4.4 Reinigung der rekombinanten SuSy1 über Metallionenaffinitätschromatografie (Ni²⁺-NTA).

Schritt	Volumen [ml]	Gesamt- aktivität [U]	Gesamt- protein [mg]	spez. Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%] ¹	Faktor [-]
Q-Seph konz.	100	1950	453	4,3	100 (74)	1
Pool NiNTA	550	1199	215	5,6	61 (46)	19
NiNTA konz.	15	1313	235	5,6	67 (50)	19

¹ Die Zahlen in Klammern geben die relative Ausbeute bezogen auf den Rohextrakt in Tabelle 4.3 an.

Im Gegensatz zu vorhergehenden Arbeiten (Römer 1998, Schrader 1998), in denen ein Kupferchelate-Material eingesetzt wurde, wurde hier ein Ni²⁺-NTA-Material verwendet. Hierdurch konnten die Ausbeuteverluste des Aufreinigungsschrittes um etwa 10-15 % vermindert werden. SuSy1 eluierte bei einem Imidazolgehalt zwischen 10 und 15 mM. Eine vollständige Abtrennung aller Nebenproteine (vgl. Kapitel 4.1.3.1) konnte nicht erreicht werden. Die hydrolytischen Nebenaktivitäten wurden jedoch durch diesen Aufreinigungsschritt weiter gesenkt. Sie lagen bei 0,04% bezogen auf die Aktivität von SuSy. In kinetische Messungen wurden Ni²⁺-NTA aufgereinigte Enzymchargen eingesetzt.

Für proteinchemische Untersuchungen wurden 3 ml des IMAC-Konzentrats durch einen weiteren Gelfiltrationsschritt bis zur Homogenität (Kapitel 4.1.3.1) aufgereinigt.

Tabelle 4.5 Feinreinigung der rekombinanten SuSy1 mit Gelfiltration.

Schritt	Volumen [ml]	Gesamt- aktivität [U]	Gesamt- Protein [mg]	spez. Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Faktor [-]
NiNTA konz.	3	263	47	5,6	100 (50)	19
Pool GF	60	110	10	11,3	42 (21)	39
GF konz.	2,2	75	11	6,9	28 (14)	24

¹ Die Zahlen in Klammern geben die relative Ausbeute bezogen auf den Rohextrakt in Tabelle 4.3 an.

Das homogen aufgereinigte Protein wurde in den Untersuchungen zur Proteinphosphorylierung eingesetzt und eignet sich auch für Untersuchungen zur Enzymkristallisation.

In Tabelle 4.6 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Enzymchargen zusammengefasst.

Tabelle 4.6 In der vorliegenden Arbeit verwendete Enzymchargen.

Charge	Fermentation ¹	Aktivität [U/ml]	Proteingehalt [mg/ml]	spez. Aktivität [U/mg]	Nebenaktivitäten Phosphatasen ⁴ /Hydrolasen ⁵ [%]
I ² (aus V)	B	18,3	2,8	6,7	0,95/0,04
II ² (aus VII)	E	23,3	4,5	5,2	0,94/0,03
III ² (aus VI)	D	9,4	3,6	2,6	0,99/0,04
IV ³	C	81,5	12,2	6,7	1,50/0,03
V ³	B	42,2	13,0	3,3	1,01/0,05
VI ³	D	108	2,5	2,7	0,98/0,05
VII ³	E	19,5	4,5	4,3	0,95/0,05
VIII ² (aus VII)	E	87,5	15,7	5,6	0,95/0,04

¹ Die Aufreinigung des Enzyms erfolgte aus Aufschlüssen von Zellen, die in den Fermentationen B-E gewonnen wurden. ² Über Ni²⁺-NTA aufgereinigte Enzymchargen. ³ Über Q-Sepharose aufgereinigte Enzymchargen. ⁴ Wenn der Faktor kleiner 1 ist, sind keine Phosphatasen vorhanden. ⁵ Die rel. Hydrolaseaktivität ist bezogen auf SuSy Aktivität.

Die einzelnen Chargen weisen zum Teil sehr starke Schwankungen in ihrer spezifischen Aktivität auf. Dies wird besonders deutlich bei der Charge III im Vergleich zu den anderen über Ni²⁺-NTA aufgereinigten Chargen. Einen Einfluss hierauf hat insbesondere der nach dem Aufreinigungsschritt gewählte Pool von Fraktionen. Je enger dieser um das Maximum an SuSy-Aktivität gewählt wird, desto weniger Fremdproteine sind im Pool. Es wird dadurch eine höhere Reinheit des Enzym-Pools erreicht und die spezifische Aktivität ist somit höher. Zusätzlich kann es bei zu starker Aufkonzentration des Pools zur Aggregation von Proteinen kommen. Dies führt zur Inaktivierung des Enzyms, wodurch die spezifische Aktivität sinkt.

4.1.3 Proteinchemische Charakterisierung

4.1.3.1 SDS-PAGE

Abbildung 4.2 dokumentiert die Aufreinigung der rekombinanten SuSy1 bis zur Homogenität.

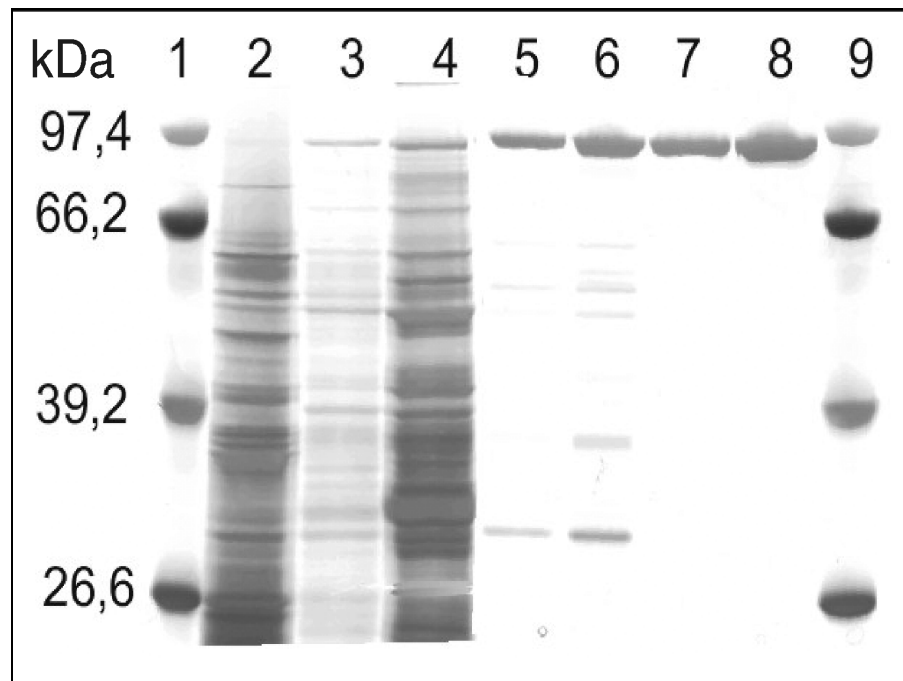


Abbildung 4.2 SDS-PAGE zur SuSy Aufreinigung (1,9: Marker, 2: Rohextrakt, 3: Pool Q-Sepharose, 4: Q-Sepharose konz., 5: Pool NiNTA, 6: NiNTA konz, 7: Pool GF, 8: GF konz.).

Das Molekulargewicht von SuSy1 im SDS-PAGE wurde zu 92 kDa für die Untereinheit bestimmt (Schrader 1998). In dieser Arbeit wurde anhand einer Kalibriergeraden ein Molekulargewicht von 90,3 kDa für die Untereinheit bestimmt. Die dazugehörige Bande ist deutlich unterhalb des 97,4 kDa-Markerproteins zu erkennen. Die Aufreinigung in drei chromatographischen Schritten liefert SuSy1 als homogen gereinigtes Protein.

4.1.3.2 Nachweis der Proteinphosphorylierung

In Pflanzen wird SuSy *in vivo* durch eine Ca^{2+} -abhängige Protein Kinase posttranslational in einer hochkonservierten N-terminalen Sequenz (Mais Ser11, Mungobohne Ser11, Sojabohne Ser15) phosphoryliert (Winter and Huber 2000). Das Erkennungsmuster (hochkonservierte Sequenz) für diese Proteinkinase ist spezifisch. Aus Sequenzvergleichen geht hervor, dass SuSy-Isoenzyme Konsensussequenzen enthalten, die unter anderem auch von anderen Ca^{2+} -abhängige Proteinkinasen (CDPK), wie die

Protein Kinase C (PKC) aus Säugetieren, erkannt werden (Winter and Huber 2000). Literaturdaten zeigen, dass die Phosphorylierung Auswirkungen auf die Aktivität des Enzyms (Nakai et al. 1997) und auf die Lokalisation des Enzyms (phosphoryliertes Enzym: löslich und actingebunden, nicht-phosphoryliertes Enzym: membrangebunden) hat.

Zur Überprüfung der Phosphorylierung der rekombinanten SuSy1 wurde ein Immunonachweis durchgeführt. Es wurden verschiedene Phosphoserin-Antikörper der Firma Calbiochem eingesetzt, die die Phosphorylierung nur dann erkennen sollen, wenn das Protein phosphoryliert ist und das umgebende Aminosäuremotiv stimmt. Lediglich über einen der 4 Phosphoserin-Antikörper konnten nähere Informationen erhalten werden. Klon 16B4 hat eine breite Spezifität und zeigt starke Interaktionen mit den Sequenzmotiven pS-K und pS-P. Aus Datenbankrecherchen (www.expasy.ch, NetPhos 2.0) ergibt sich, dass in der Aminosäuresequenz von SuSy1 aus Kartoffel 16 potenzielle Phosphorylierungsstellen an Serinen existieren. Davon haben fünf eine Phosphorylierungs-Wahrscheinlichkeit von über 95 % (siehe Tabelle 4.7).

Tabelle 4.7. Vorhersageergebnisse von NetPhos 2.0 zur Phosphorylierungs-Wahrscheinlichkeit an einem Serin (Ausschnitt) in der Sequenz von Sus1 aus *Solanum tuberosum*.

Position	Umgebende AS-Sequenz	Phosphorylierungs-Wahrscheinlichkeit [%]
11	TRVHSLRER	99,6
165	NRHLSAKMF	95,8
533	NLYFSYSET	99,7
615	RRKESKDLE	98,7
734	KKDP SHWET	97,7

Phosphorylierte Serine, die mit dem in Maus hergestellten Phosphoserin-Antikörper reagieren, werden mit einem biotinylierten-Anti-Maus-Antikörper und anschließender Streptavidin- und Farbreaktion nachgewiesen (Abbildung 4.3).

Neben den Positiv-Kontrollen und den SuSy-Proben (SuSy aus Gelfiltrationsaufreinigung siehe Kapitel 4.1.2.) erkennt man auch eine starke Reaktion mit der Negativ-Kontrolle. Als Negativ-Kontrolle wurde eine β -Galactosidase gewählt, die aus *E. coli* isoliert wurde. Sie sollte keine Phosphorylierungen aufweisen. Dies kann bedeuten, dass die Anti-Phosphoserin Antikörper nicht spezifisch sind und allein schon die umgebende Aminosäuresequenz als Erkennungsmuster für die Antikörper dient. Aus Datenbankrecherchen (www.expasy.ch, NetPhos 2.0) geht hervor, dass die Aminosäuresequenz der β -Galactosidase 26 potenzielle Serin-Phosphorylierungsstellen besitzt. Fünf dieser Serine können potenzielle durch eine Protein Kinase C phosphoryliert werden (www.expasy.ch, ScanProsite). Am C-Terminus der β -

Galactosidase-Sequenz (Pos. 1000) findet man auch das Sequenzmuster, zu welchem der Klon 16B4 in phosphoryliertem Fall eine starke Interaktion aufweisen soll.

Im Gegensatz zu prokaryontischen Expressionssystemen können Hefen posttranslationale Proteinphosphorylierung durchführen (Gellissen et al. 1992). In *Saccharomyces cerevisiae* existiert eine Serin/Threonin Protein Kinase (Protein Kinase C-like 1) die zur PKC Subfamilie gehört (www.expasy.ch, SWISS-PROT). Die Protein Kinase C phosphoryliert Serin- oder Threonin-Reste, die nahe am C-terminalen Ende der Sequenz liegen und deren Umgebung das allgemeine Sequenzmotiv [ST]-x-[RK] besitzen. Auch am N-Terminus kann eine entsprechende Phosphorylierung stattfinden (www.expasy.ch, PROSITE). Neben dieser Calcium-abhängigen Proteinkinase findet man viele weitere Protein Kinasen in *Saccharomyces cerevisiae*, wie z.B. die Casein Kinase I Homolog 2. Die Serine an Position 11 (S-L-R) und 165 (S-A-K) besitzen umgebende Aminosäuresequenzen, die von der in *Saccharomyces cerevisiae* vorliegenden PKC erkannt und phosphoryliert werden könnten.

Aufgrund der Datenbankvorhersagen ist die in *Saccharomyces cervisiae* vorliegende rekombinante SuSy1 aus Kartoffel mit hoher Wahrscheinlichkeit phosphoryliert. Jedoch konnte dies mit dem hier angewendeten Kit zum Nachweis der Phosphorylierung nicht eindeutig bewiesen werden. Weitere Untersuchungen müssen folgen. Eine alternative Methode zur Untersuchung der Proteinphosphorylierung stellt ein Kit der Firma Qiagen dar. Phosphorylierte Proteine werden an einem Affinitätsmaterial, das spezifisch phosphorylierte Proteine bindet, aufgereinigt. Der Nachweis der phosphorylierten Proteine erfolgt anschließend über einen Immuno-Western-Blot. Eine weitere Alternative ist die massenspektrometrische Untersuchung von Spaltstücken der SuSy1-Aminosäuresequenz.

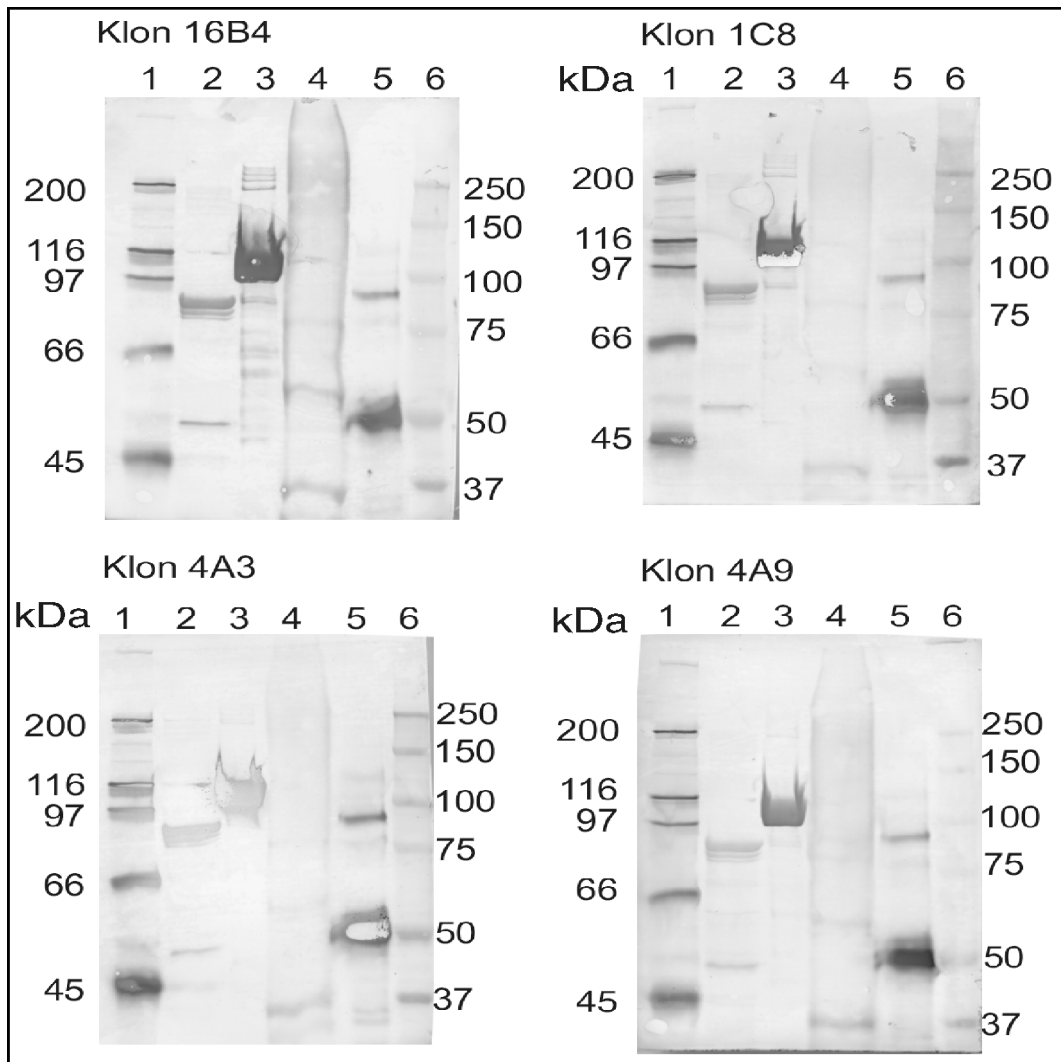


Abbildung 4.3 Nachweis der Proteinphosphorylierung mit Immuno-Western-Blots mit vier verschiedenen Antikörpern der Firma Calbiochem (1: Biotin-Marker, 2: SuSy, 3: Negativ-Kontrolle (β-Galactosidase aus *E.coli*), 4: Positiv-Kontrolle aus Phosphoserin Detection Kit (Phosphoproteine aus Kaninchenmuskel), 5: Positiv-Kontrolle aus Immunoblotting Kit (Control Mouse IgG), 6: Marker).

4.2 Biochemische Charakterisierung der rekombinanten Saccharose Synthase 1

Die biochemische Charakterisierung der rekombinanten SuSy1 aus Kartoffel umfasst die Ermittlung der kinetischen Daten und Produktinhibitionen anhand derer man auf einen möglichen Enzymmechanismus schließen kann. Durch die eingehende Untersuchung des Substratspektrums und von Inhibitoren können Modellvorstellungen zur Substraterkennung und Produktbildung entwickelt werden. Diese können durch anschließende präparative Synthesen der entsprechenden Saccharose-Analoga verifiziert werden.

4.2.1 Kinetik der rekombinanten Saccharose Synthase 1

Die Kinetik der rekombinanten Saccharose Synthase 1 wurde mit den natürlichen Substraten UDP- α -D-Glucose, D-Fructose, UDP und Saccharose ermittelt. Zur Berechnung der kinetischen Konstanten wurden zunächst vereinfacht von Einsubstratkinetiken ausgegangen. Diese Vereinfachung ist prinzipiell möglich, wenn eines der beiden Substrate gesättigt vorliegt und somit die Konzentration dieses Substrats während der Reaktion annähernd konstant ist. Im Allgemeinen wird eine Konzentration im Bereich des 10-fachen K_m -Wertes gewählt. Jedoch ist zu beachten, dass eine Substratsättigung oft erst bei einem 100-fachen K_m -Wert erreicht ist. Zusätzlich müssen bei der Konzentrationswahl des konstanten Substrats, auch mögliche Substrat- und Produktinhibitionen beachtet werden. Daraus wird deutlich, dass die Annahme von Doppelsubstratkinetiken für die Berechnung oft sinnvoller ist, da beide Substrate in die Berechnung der kinetischen Daten eingehen.

4.2.1.1 Berechnung der kinetischen Konstanten unter Annahme von Einsubstratkinetiken

4.2.1.1.1 Kinetik der Synthesereaktion

Die Ermittlung der kinetischen Daten der Synthesereaktion folgte dem allgemeinen Reaktionsschema in Abbildung 4.4.

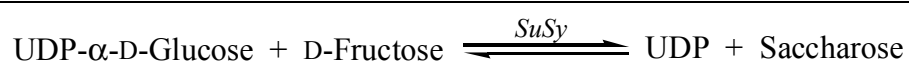


Abbildung 4.4 Synthesereaktion der Saccharose Synthase.

Die kinetischen Messungen wurden in 50 mM HEPES-NaOH bei einem pH-Wert von 8,0 und einer Temperatur von 30 °C durchgeführt.

D-Fructose

Die Berechnung der kinetischen Konstanten von D-Fructose erfolgte nach Gleichung 3.11 (Kapitel 3.3.3.1). D-Fructose zeigt ab einer Konzentration von 20 mM eine deutliche Substratüberschussinhibition (Abbildung 4.5).

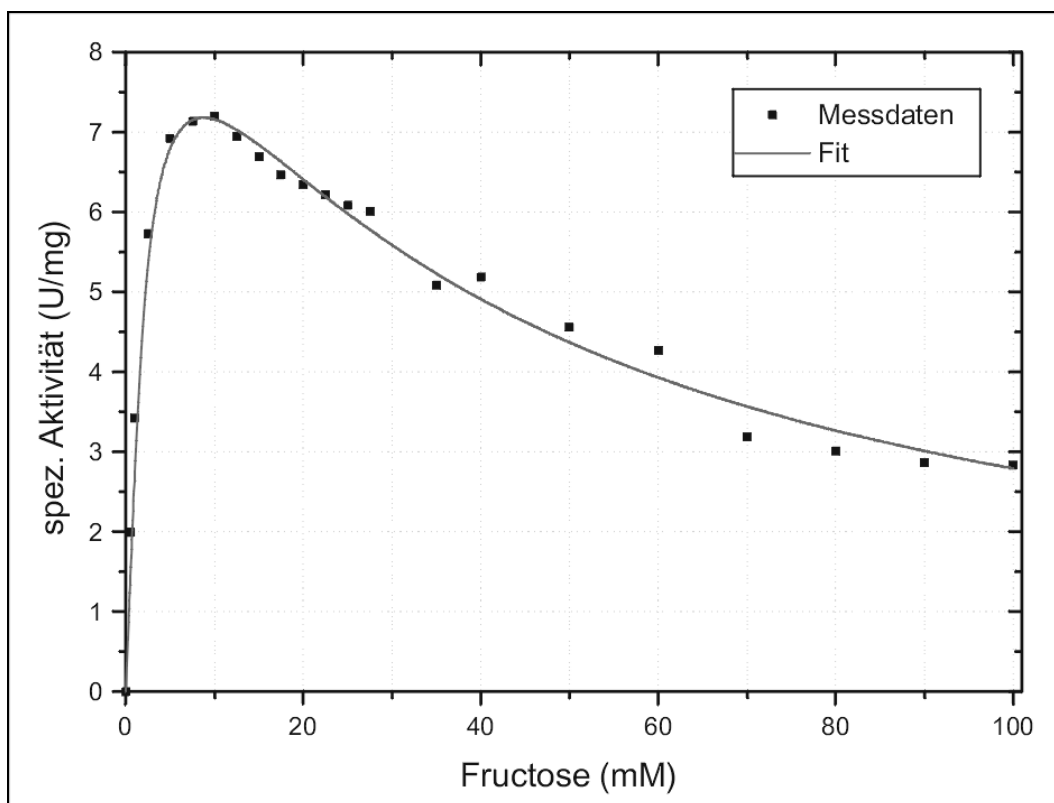


Abbildung 4.5 Kinetik der Synthesereaktion: 0-100 mM D-Fructose, 2 mM UDP-Glc, 50 mU SuSy1 (Spaltaktivität) in 50 mM HEPES-NaOH pH 8,0, T= 30 °C.

Die Berechnungen ergaben:

$$K_m \quad 2,1 \quad \pm 0,2 \text{ mM}$$

$$K_{iS} \quad 35,9 \quad \pm 2,3 \text{ mM}$$

$$V_{\max} \quad 10,6 \quad \pm 0,3 \text{ U mg}^{-1}$$

Anhand dieser Daten kann mit Gleichung 3.26 und Gleichung 3.27 (siehe Kapitel 3.3.3.3) der k_{cat} -Wert (Wechselzahl) und die katalytische Effizienz k_{cat}/K_m berechnet werden:

$$k_{\text{cat}} \quad 69,8 \quad \text{s}^{-1}$$

$$k_{\text{cat}}/K_m \quad 34,1 \quad \text{s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$$

UDP- α -D-Glucose

Auch bei der Kinetik von UDP- α -D-Glucose muss eine Substratüberschussinhibition berücksichtigt werden. Die Berechnung der kinetischen Daten erfolgte nach Gleichung 3.11 (siehe Kapitel 3.3.3.1).

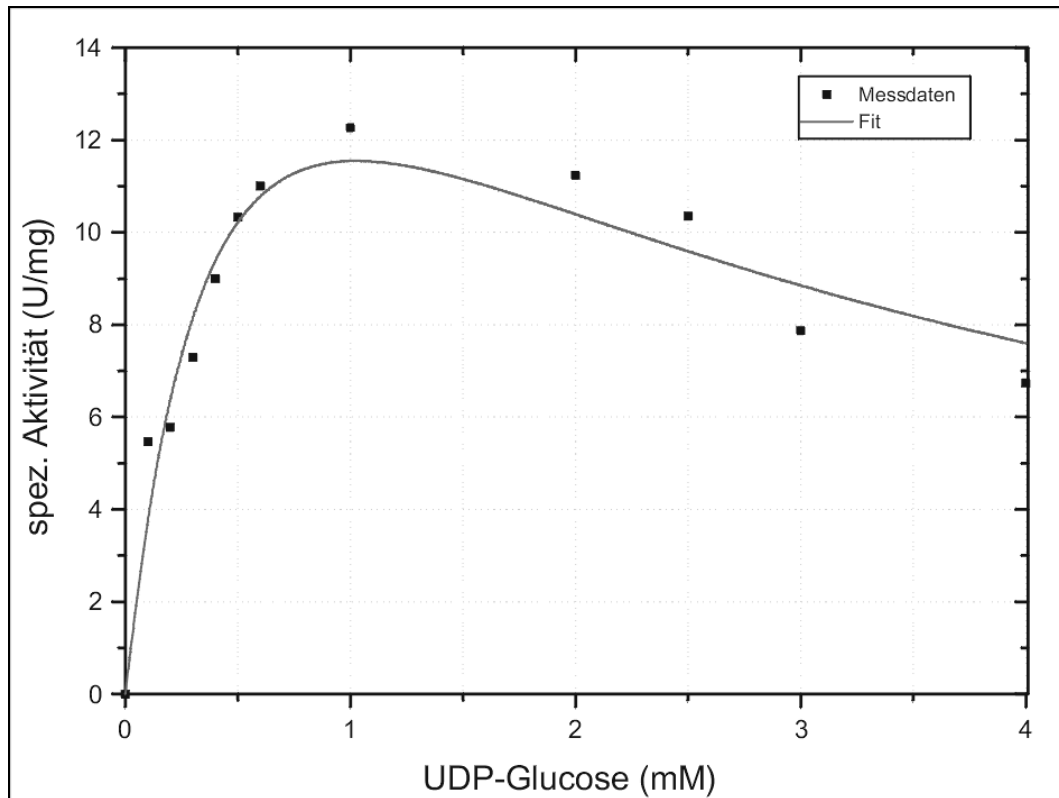


Abbildung 4.6 Kinetik der Synthesereaktion: 0-4 mM UDP-Glc, 10 mM Fructose, 10 mU/ml SuSy1 (Spaltaktivität) in 50 mM HEPES-NaOH pH 8,0, T= 30 °C.

Die Berechnungen ergaben:

$$K_m \quad 0,5 \quad \pm 0,04 \text{ mM}$$

$$K_{iS} \quad 2,3 \quad \pm 0,2 \text{ mM}$$

$$V_{\max} \quad 21,8 \quad \pm 4,7 \text{ U mg}^{-1}$$

Für k_{cat} und die katalytische Effizienz erhält man:

$$k_{\text{cat}} \quad 142,8 \quad \text{s}^{-1}$$

$$k_{\text{cat}}/K_m \quad 310,4 \quad \text{s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$$

4.2.1.1.2 Kinetik der Spaltreaktion

Den kinetischen Messungen der Spaltreaktion, lag die Rückreaktion des allgemeinen Schemas in Abbildung 4.4 zugrunde. Die Messungen wurden bei einem pH-Wert von 7,6 in 50 mM HEPES-NaOH bei 30 °C durchgeführt.

UDP

Das Substrat UDP zeigt eine starke Substratüberschussinhibition. Zur Berechnung der kinetischen Daten wurde daher Gleichung 3.11 (siehe Kapitel 3.3.3.1) angewendet.

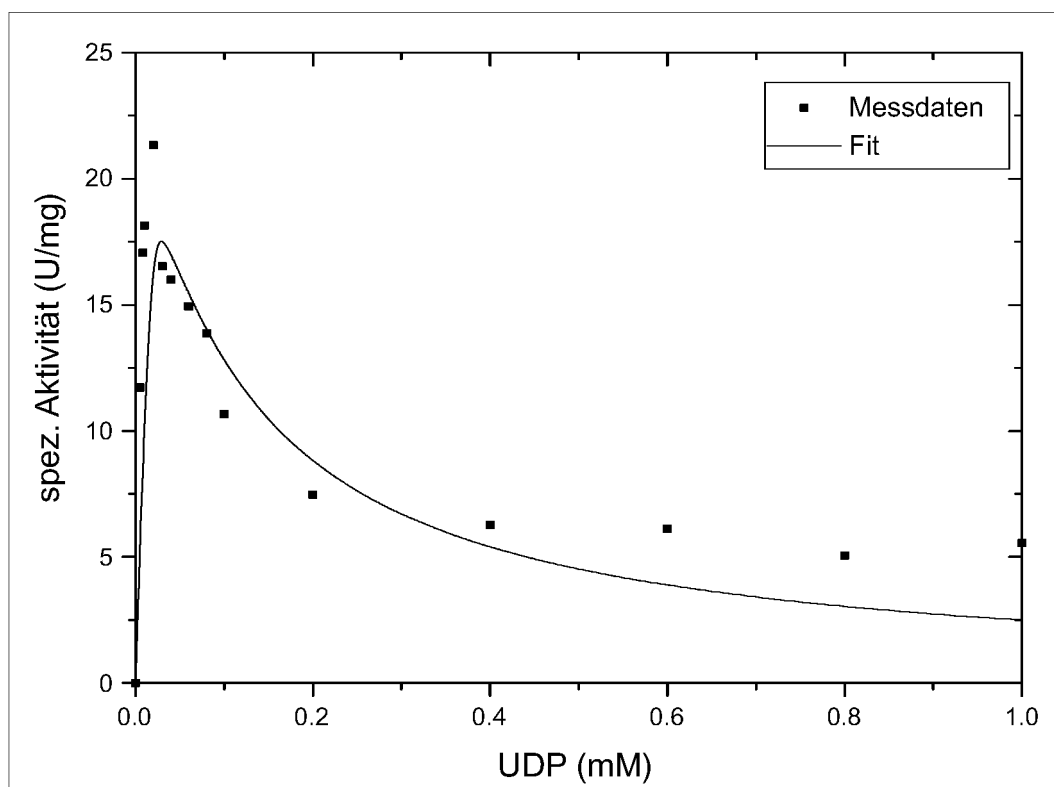


Abbildung 4.7 Kinetik der Saccharose-Spaltreaktion: Spez. Aktivität bei verschiedenen UDP-Konzentrationen (0-1 mM), 1 M Saccharose, 2,5 mU SuSy (Spaltaktivität) in 50 mM HEPES-NaOH pH 7,6, T= 30 °C.

Die Berechnungen ergaben:

$$K_m \quad 4 \cdot 10^{-3} \quad \pm 8 \cdot 10^{-4} \text{ mM}$$

$$V_{\max} \quad 24,6 \quad \pm 3,7 \text{ U mg}^{-1}$$

$$K_{iS} \quad 0,11 \quad \pm 0,01 \text{ mM}$$

Für k_{cat} und die katalytische Effizienz erhält man:

$$k_{\text{cat}} \quad 164,9 \quad \text{s}^{-1}$$

$$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}} \quad 41212,5 \quad \text{s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$$

Saccharose

Die Kinetik der Saccharose folgt einem hyperbolischen Kurvenverlauf, daher wurde zur Berechnung der kinetischen Daten die Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 3.10) eingesetzt.

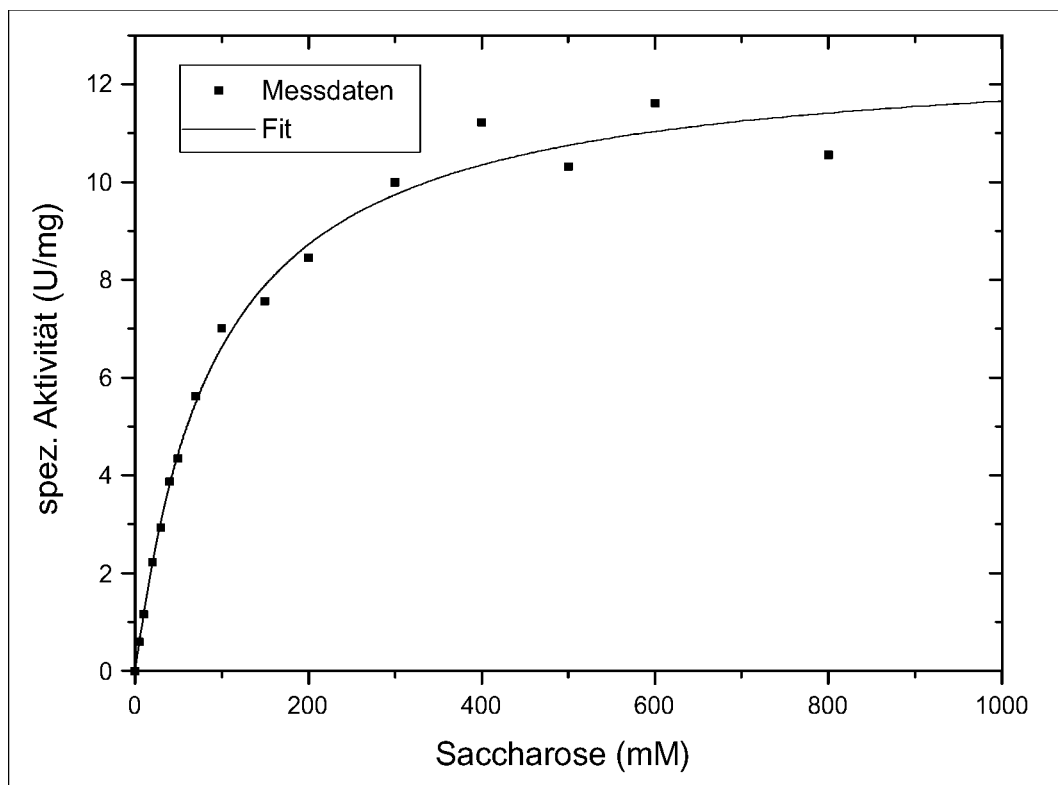


Abbildung 4.8 Kinetik der Saccharose-Spaltreaktion: Spez. Aktivität bei verschiedenen Saccharose-Konzentrationen (0-1 M), 0,1 mM UDP, 2,5 mU SuSy (Spaltaktivität) in 50 mM HEPES-NaOH pH 7,6, T= 30 °C.

Für die Kinetik von Saccharose erhält man:

$$K_{\text{m}} \quad 91,6 \quad \pm 8,0 \text{ mM}$$

$$V_{\text{max}} \quad 12,7 \quad \pm 0,3 \text{ U mg}^{-1}$$

Der k_{cat} -Wert und die katalytische Effizienz k_{cat}/K_m berechnen sich zu:

$$k_{\text{cat}} \quad 83,3 \quad \text{s}^{-1}$$

$$k_{\text{cat}}/K_m \quad 0,9 \quad \text{s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$$

4.2.1.2 Zusammenfassung der Einsubstratkinetiken

Die kinetischen Konstanten der Synthese- und Spaltreaktion sind in Tabelle 4.8 zusammengefasst.

Tabelle 4.8 Zusammenfassung der kinetischen Daten der Synthese- und Spaltreaktion berechnet über Einsubstratmodelle.

variables Substrat	konstantes Substrat	K_m [mM]	K_{is} [mM]	V_{max} [U mg ⁻¹]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_m [s ⁻¹ mM ⁻¹]
D-Fructose	UDP-Glc	$2,1 \pm 0,2$	$35,9 \pm 2,3$	$10,6 \pm 0,3$	69,8	34,1
UDP-Glc	D-Fructose	$0,5 \pm 0,04$	$2,3 \pm 0,2$	$21,8 \pm 4,7$	142,8	310,4
UDP	Saccharose	$4 \cdot 10^{-3} \pm 8 \cdot 10^{-4}$	$0,11 \pm 0,01$	$24,6 \pm 3,7$	164,9	41212,5
Saccharose	UDP	$91,6 \pm 8,0$	-	$12,7 \pm 0,3$	83,3	0,9

Die Berechnungen erfolgten unter der Annahme, dass das jeweils nicht betrachtete Substrat im hohen Überschuss eingesetzt wurde, und somit während der Reaktion konstant ist. Jedoch wurden aufgrund starker Substratüberschussinhibitionen die Konzentrationsüberschüsse bei der Ermittlung der kinetischen Daten der Synthesereaktion gering gehalten. D-Fructose wurde in einem 5-fachen, UDP- α -D-Glucose lediglich in einem 2,5-fachen Überschuss eingesetzt. Die Berechnung der Daten über Gleichungen für eine Doppelsubstratkinetik erscheinen daher sinnvoll.

Die Messung der Kinetik von Saccharose erfolgte aus messtechnischen Gründen bei einer Konzentration von 0,1 mM UDP, die im Bereich des K_{is} -Wertes liegt. Dies wirkt sich automatisch auf die gemessene Maximalgeschwindigkeit für Saccharose aus, die nur halb so groß ist wie für das Substrat UDP.

4.2.1.3 Berechnung der kinetischen Konstanten durch Doppelsubstratkinetiken

Die zuvor über Einsubstratmodelle ermittelten kinetischen Daten wurden zusätzlich über Doppelsubstratmodelle berechnet. Die Vereinfachung der Berechnungen über Einsubstratmodell gilt prinzipiell nur dann, wenn eines der an der Reaktion beteiligten Substrate gesättigt vorliegt. Insbesondere bei der Betrachtung der Synthesereaktion wurden die Reaktanden nur in einem geringen Überschuss eingesetzt, so dass die Berechnung über Doppelsubstratmodelle hier andere Werte liefern könnte. Zusätzlich können aus den Berechnungen über Doppelsubstratkinetiken weiter Informationen zu Reihenfolge der Substratbindung erhalten werden.

Die Berechnung der kinetische Daten erfolgte unter Annahme eines sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus (vgl. Abbildung 4.9).

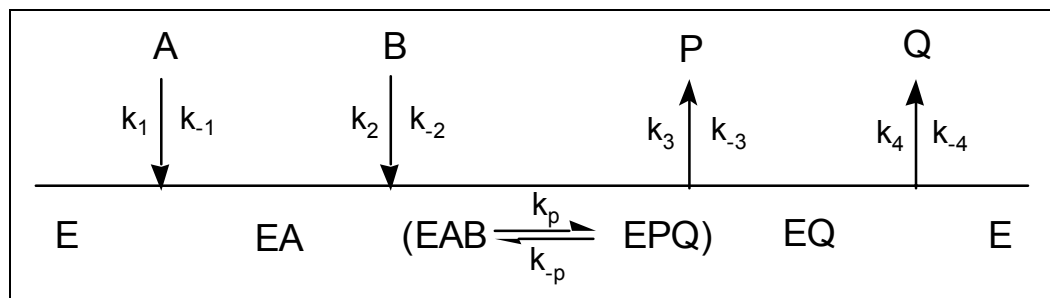


Abbildung 4.9 Modell des sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus.

Dieses Modell wurde auch zur Berechnung der kinetische Daten der rekombinanten SuSys 1-3 aus Erbse eingesetzt (Barratt et al. 2001). Bei einem sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus erfolgt die Bindung der Substrate in einer definierten Reihenfolge. Die Edukte müssen alle an das Enzym gebunden sein, bevor die Bildung der Produkte erfolgen kann. Die Reihenfolge der Substratbindung ist zunächst unbekannt. Sie kann durch Berechnung der Dissoziationskonstante K_{ia} ermittelt werden. K_{ia} ist ein Maß für die Güte einer Substratbindung und wird aus dem Quotienten k_{-1}/k_1 gebildet. Ist die Geschwindigkeit der Substratbindung des ersten Substrates an das Enzym sehr hoch, so ist K_{ia} sehr klein und die Bindung des Substrates an das Enzym sehr gut. Einen eindeutigen Beweis für die aus den Berechnungen resultierenden Annahmen könnten Bindungsstudien erbringen, die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt wurden. Die Michaelis-Menten-Konstante des Substrats A (K_{mA}) unterscheidet sich von der reinen Dissoziationskonstante K_{ia} . In den K_{mA} -Wert gehen zusätzlich die Geschwindigkeitskonstanten des zentralen Übergangskomplexes (EAB/EPQ) und die Geschwindigkeitskonstanten, mit denen die Produkte P und Q gebildet werden, ein (Definition der kinetischen Konstanten siehe Tabelle 3.3 Methoden 3.3.3.2.).

Die grafische Darstellung der Fit-Ergebnisse decken sich mit denen der Einsubstratkinetiken (Abbildung 4.5 bis Abbildung 4.8). Deshalb wurde hier auf die erneute Abbildung verzichtet.

4.2.1.3.1 Kinetik der Synthesereaktion

Bei den Berechnungen der kinetischen Daten nach dem Modell eines sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus mussten die schon zuvor für die Einsubstratkinetiken gezeigten Substratüberschussinhibitionen beachtet werden. Zur Berechnung wurden die Gleichung 3.21 und Gleichung 3.22 (Kapitel 3.3.3.2) eingesetzt. Da bei der Berechnung der kinetischen Daten zunächst unklar ist, welches der beiden Substrate zuerst an das

Enzym bindet, wurden beide Fälle betrachtet. Im Folgenden wird zunächst D-Fructose und anschließend UDP- α -D-Glucose als variables Substrat betrachtet.

D-Fructose als variables Substrat

Es wurde zunächst von dem Fall ausgegangen, dass Fructose als erstes Substrat bindet. Gleichzeitig inhibiert Fructose das Enzym, wie bereits unter Kapitel 4.2.1.1.1 gezeigt. Es muss also eine Substratüberschussinhibition berücksichtigt werden. Fructose bildet dann einen dead-end EA_2 -Komplex mit dem Enzym (siehe Abbildung 4.10).

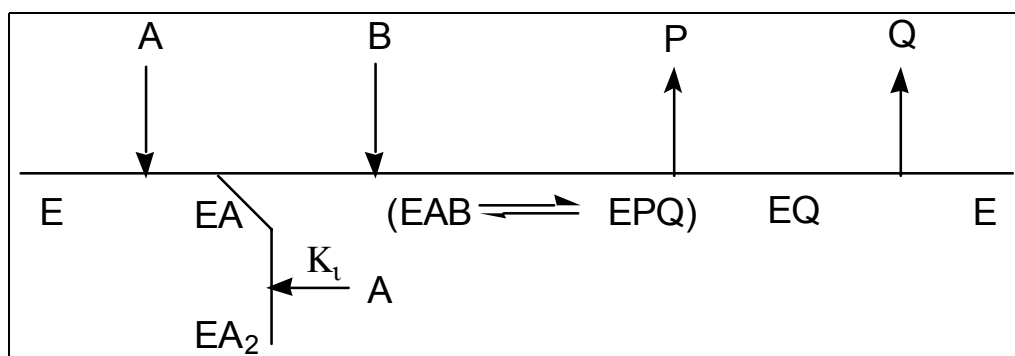


Abbildung 4.10 Schematische Darstellung einer kompetitiven Substratinhibition durch das Substrat A im sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus, A bildet einen dead-end EA_2 -Komplex.

Zur Berechnung der kinetischen Konstanten wurde Gleichung 3.22 eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.9 zusammengefasst.

Tabelle 4.9 Berechnung der kinetischen Daten der Synthesereaktion unter Annahme eines sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus. Substrat A: D-Fructose, Substrat B: UDP- α -D-Glucose, Substratinhibition durch Fructose.

erstbindendes Substrat	$V_{\max}$ [$\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$]	K_{mA} [mM]	K_{mB} [mM]	K_{is} [mM]	K_{ia}
D-Fructose	$13,8 \pm 0,4$	$2,3 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,01$	$8,14 \pm 0,5$	$1,4 \pm 0,4$

Die Berechnung des umgekehrten Falles, UDP- α -D-Glucose bindet vor D-Fructose, erfolgte nach Gleichung 3.21. D-Fructose bildet in diesem Fall einen dead-end EB-Komplex, die Inhibition ist kompetitiv (siehe Abbildung 4.11).

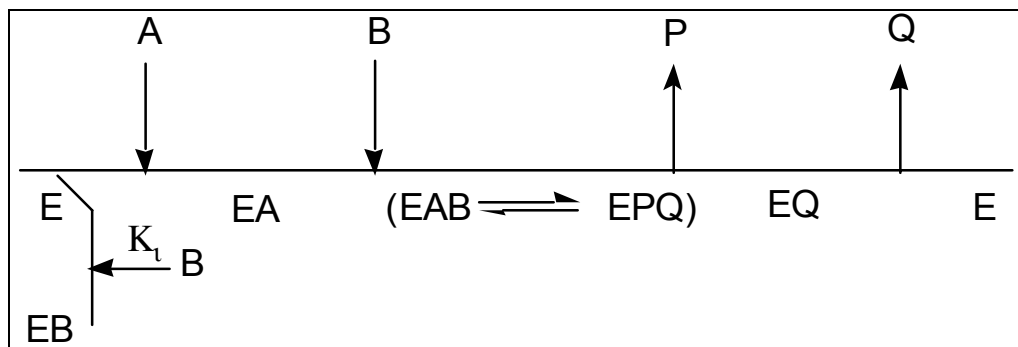


Abbildung 4.11 Schematische Darstellung einer kompetitiven Substratinhibition durch das Substrat B im sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus, B bildet einen dead-end EB-Komplex.

In Tabelle 4.10. sind die Ergebnisse der Berechnung zusammengestellt.

Tabelle 4.10 Berechnung der kinetischen Daten der Synthesereaktion unter Annahme eines sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus. Substrat A: UDP- α -D-Glucose, Substrat B: D-Fructose, Substratinhibition durch D-Fructose.

erstbindendes Substrat	$V_{\max}$ [$\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$]	K_{mA} [mM]	K_{mB} [mM]	K_{is} [mM]	K_{ia}
UDP-Glc	$14,7 \pm 0,6$	$0,6 \pm 0,05$	$2,2 \pm 0,2$	$7,6 \pm 0,6$	$0,6 \pm 0,2$

Vergleicht man die erhaltenen kinetischen Daten, so ergeben sich keine großen Veränderungen aus beiden Berechnungen. Jedoch ist der K_{ia} -Wert für UDP- α -D-Glucose kleiner, das bedeutet, dass die Bindung von UDP- α -D-Glucose an das Enzym besser ist. Hieraus kann man schlussfolgern, dass das Enzym sehr wahrscheinlich UDP- α -D-Glucose vor D-Fructose bindet.

Aus den erhaltenen Daten lassen sich nach Gleichung 3.26 und Gleichung 3.27 der k_{cat} -Wert und die katalytische Effizienz k_{cat}/K_m der Substrate UDP-Glucose und Fructose berechnen.

k_{cat}	96,5	s^{-1}	
k_{cat}/K_{mA}	160,8	$\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$	UDP-Glc
k_{cat}/K_{mB}	43,8	$\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$	D-Fructose

UDP- α -D-Glucose als variables Substrat

In den vorhergehenden Berechnungen konnte der K_{is} -Wert der Substratüberschussinhibition von D-Fructose berechnet werden. Um den K_{is} -Wert für UDP- α -D-Glucose zu ermitteln, wurde die Konzentration von UDP- α -D-Glucose variiert und D-Fructose konstant gehalten. UDP-Glucose bindet als erstes Substrat und bildet im Überschuss

einen dead-end EA₂-Komplex, so dass die Synthesereaktion inhibiert wird (siehe auch Abbildung 4.10). In Tabelle 4.11 sind die Ergebnisse der Berechnung nach Gleichung 3.22, zusammengefasst.

Tabelle 4.11 Berechnung der kinetischen Daten der Synthesereaktion unter Annahme eines sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus. Substrat A: UDP- α -D-Glucose, Substrat B: D-Fructose, Substratinhibition durch UDP-Glucose.

erstbindendes Substrat	$V_{\max}$ [U·mg ⁻¹]	K_{mA} [mM]	K_{mB} [mM]	K_i [mM]	K_{ia}
UDP- α -D-Glucose	31,3 $\pm$ 1,0	0,6 $\pm$ 0,05	2,2 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,03	0,6 $\pm$ 0,2

Die ermittelten Michaelis-Menten-Konstanten entsprechen denen aus Tabelle 4.10. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ist etwa doppelt so hoch wie in der vorhergehenden Berechnungen für das Substrat D-Fructose, da UDP- α -D-Glucose im Bereich starker Substratüberschussinhibition eingesetzt wurde. Damit konnte keine maximale Geschwindigkeit erreicht werden. Dies wirkt sich auch auf die Berechnung des k_{cat} -Wertes und somit auf die katalytische Effizienz aus.

$$k_{\text{cat}} \quad 205,4 \quad \text{s}^{-1}$$

$$k_{\text{cat}}/K_{mA} \quad 342,3 \quad \text{s}^{-1} \text{ mM}^{-1} \quad \text{UDP-Glc}$$

$$k_{\text{cat}}/K_{mB} \quad 93,4 \quad \text{s}^{-1} \text{ mM}^{-1} \quad \text{D-Fructose}$$

Aus den erhaltenen Daten zur Substratbindung ergibt sich, dass UDP- α -D-Glucose vor D-Fructose an das Substrat bindet. Eine Aussage über Dissoziation der Produkte kann anhand der hier erfolgten Messungen und Berechnungen nicht gemacht werden. Hierzu werden im Folgenden Produktinhibitionsstudien durchgeführt. Es ergibt sich folgendes vorläufiges Modell zum Enzymmechanismus:

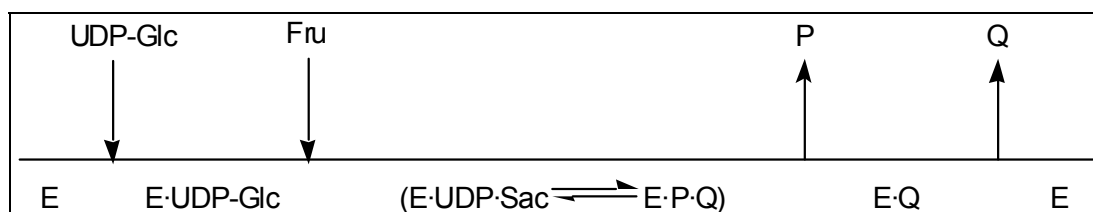


Abbildung 4.12 Potenzieller Enzymmechanismus der Synthesereaktion nach dem Modell des sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus, P und Q entsprechen Sac und UDP.

4.2.1.3.2 Kinetik der Spaltreaktion

Aus den Ergebnissen der Synthesereaktion können Rückschlüsse auf die Spaltreaktion gezogen werden. UDP bindet vermutlich vor Saccharose an das Enzym. Dies soll im Folgenden belegt werden.

UDP als variables Substrat

Es wurde zunächst davon ausgegangen, dass UDP als erstes Substrat bindet. Die Berechnung erfolgte nach Gleichung 3.22, die Ergebnisse sind in Tabelle 4.12 zusammengestellt. UDP bildet mit dem Enzym einen dead-end EA_2 -Komplex, die Inhibition ist kompetitiv (siehe Abbildung 4.10).

Tabelle 4.12 Berechnung der kinetischen Daten der Spaltreaktion unter Annahme eines sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus. Substrat A: UDP, Substrat B: Saccharose, Substratinhibition durch UDP.

erstbindendes Substrat	$V_{\max}$ [U·mg ⁻¹]	K_{mA} [mM]	K_{mB} [mM]	K_{is} [mM]	K_{ia}
UDP	$26,2 \pm 0,6$	$3 \cdot 10^{-3} \pm 3 \cdot 10^{-4}$	$45,1 \pm 2,0$	$0,03 \pm 6 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3} \pm 2 \cdot 10^{-4}$

Hieraus ergeben sich folgende k_{cat} und k_{cat}/K_m -Werte für das Substrat UDP

$$k_{cat} \quad 172 \quad s^{-1}$$

$$k_{cat}/K_{mA} \quad 64664 \quad s^{-1} \text{ mM}^{-1}$$

bezogen auf Saccharose erhält man eine katalytische Effizienz von

$$k_{cat}/K_{mB} \quad 3,8 \quad s^{-1} \text{ mM}^{-1}$$

Erfolgt die Berechnung unter der Annahme, dass Saccharose als erstes Substrat bindet, so erhält man einen um das 340-fache größeren K_{ia} -Wert (siehe Tabelle 4.13). Die oben gemachte Annahme, dass UDP als erstes Substrat bindet, wird hierdurch bestätigt.

Tabelle 4.13 Berechnung der kinetischen Daten der Spaltreaktion unter Annahme eines sequenziellen Ordered Bi Bi-Mechanismus. Substrat A: Saccharose, Substrat B: UDP, Substratinhibition durch UDP.

erstbindendes Substrat	$V_{\max}$ [U·mg ⁻¹]	K_{mA} [mM]	K_{mB} [mM]	K_i [mM]	K_{ia}
Saccharose	$27,6 \pm 4,3$	$99,8 \pm 5,7$	$3 \cdot 10^{-3} \pm 1 \cdot 10^{-3}$	$0,01 \pm 1 \cdot 10^{-3}$	$1,7 \pm 0,1$

Saccharose als variables Substrat

Die Berechnung erfolgt nach Gleichung 3.20.

Tabelle 4.14 Berechnung der kinetischen Daten der Spaltreaktion unter Annahme eines sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus. Substrat A: UDP, Substrat B: Saccharose, Substratinhibition durch UDP.

erstbindendes Substrat	$V_{\max}$ [U·mg ⁻¹]	K_{mA} [mM]	K_{mB} [mM]	K_{is} [mM]	K_{ia}
UDP	13,3	$3 \cdot 10^{-3}$	21,1	0,03	$5 \cdot 10^{-3}$

Die Ergebnisse der Berechnung sind schwer zu interpretieren, da die einzelnen Werte einen hohen Fehlerbereich aufweisen. Dies liegt wahrscheinlich an dem Einsatz von

UDP in einem Bereich starker Substratüberschussinhibition. Aufgrund der großen Fehlerbereiche ist es nicht sinnvoll den k_{cat} -Wert und die katalytische Effizienz aus den ermittelten Daten zu berechnen.

Für die Spaltreaktion kann in Analogie zur Synthesereaktion das folgende vorläufige Enzymmechanismusmodell aufgestellt werden:



Abbildung 4.13 Potenzieller Enzymmechanismus der Spaltreaktion nach dem Modell des sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus, P und Q entsprechen Fru und UDP-Glc.

4.2.1.3.3 Zusammenfassung der Doppelsubstratkinetiken

In Tabelle 4.15 sind die kinetischen Daten der Synthese- und Spaltreaktion zusammengefasst.

Tabelle 4.15 Kinetische Daten der Synthese- und Spaltreaktion berechnet nach dem sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Modell.

variables Substrat	K_m [mM]	K_{is} [mM]	K_{ia}	V_{max} [U mg ⁻¹]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_m [s ⁻¹ mM ⁻¹]
UDP-Glc	$0,6 \pm 0,05$	$2,2 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,2$	$31,3 \pm 1,0$	205,4	342,3
Fructose	$2,2 \pm 0,2$	$7,6 \pm 0,6$		$14,7 \pm 0,2$	96,5	43,8
UDP	$3 \cdot 10^{-3} \pm 3 \cdot 10^{-4}$	$0,03 \pm 6 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-3} \pm 3 \cdot 10^{-4}$	$26,2 \pm 0,6$	172	64664
Saccharose	21,1			13,3		

Es zeigen sich gute Übereinstimmungen zwischen den aus Doppelsubstratkinetiken und den aus Einsubstratkinetiken (vgl. Tabelle 4.8) berechneten K_m -Werten. Die errechneten V_{max} -Werte liegen im Allgemeinen höher. Dies wirkt sich auf die Berechnung von k_{cat} und der katalytischen Effizienz aus. Der nach dem Doppelsubstratmodell berechnete K_{ia} -Wert für die Substratüberschussinhibition durch D-Fructose beträgt nur ein Fünftel. Im Vergleich zu den Ergebnissen aus Einsubstratkinetiken, zeigen sich bezogen auf das Substrat UDP nur geringe Änderungen, der K_{is} -Wert für die Substratüberschussinhibition durch UDP ist jedoch um das 4-fache niedriger und der K_m -Wert für Saccharose liegt etwa bei einem Viertel des zuvor errechneten Wertes.

4.2.1.4 Produktinhibition durch UDP und Saccharose

Durch die Untersuchung der Produktinhibitionen von UDP und Saccharose auf die Synthesereaktion kann ein möglicher Enzymmechanismus bestimmt werden.

Zunächst wurde die Inhibition von UDP auf die Synthesereaktion gegenüber D-Fructose und UDP- α -D-Glucose untersucht. Die Anpassung an die bekannten Inhibitionsmodelle für Einsubstratkinetiken gestaltete sich schwierig. Die Ergebnisse der Berechnungen sind alle mit großen Fehlern behaftet. Dies resultiert vor allem aus der zusätzlichen Substratüberschussinhibition der Substrate D-Fructose und UDP- α -D-Glucose. Die erhaltenen Daten wurden lediglich zur Bestimmung des Inhibitionstyps in der Lineweaver-Burk-Auftragung verwendet.

Produktinhibition durch UDP

Zunächst wurde die Inhibition von UDP gegenüber D-Fructose bei konstanter UDP- α -D-Glucose-Konzentration untersucht. Die Analyse der Daten erfolgte nach einem Modell für eine gemischte Inhibition Gleichung 3.18 und Gleichung 3.19 (Abbildung 4.14). Die gemischte Inhibition ist eine Mischung aus einer partiell kompetitiven und einer reinen nicht-kompetitiven Inhibition (siehe Kapitel 3.3.3.1).

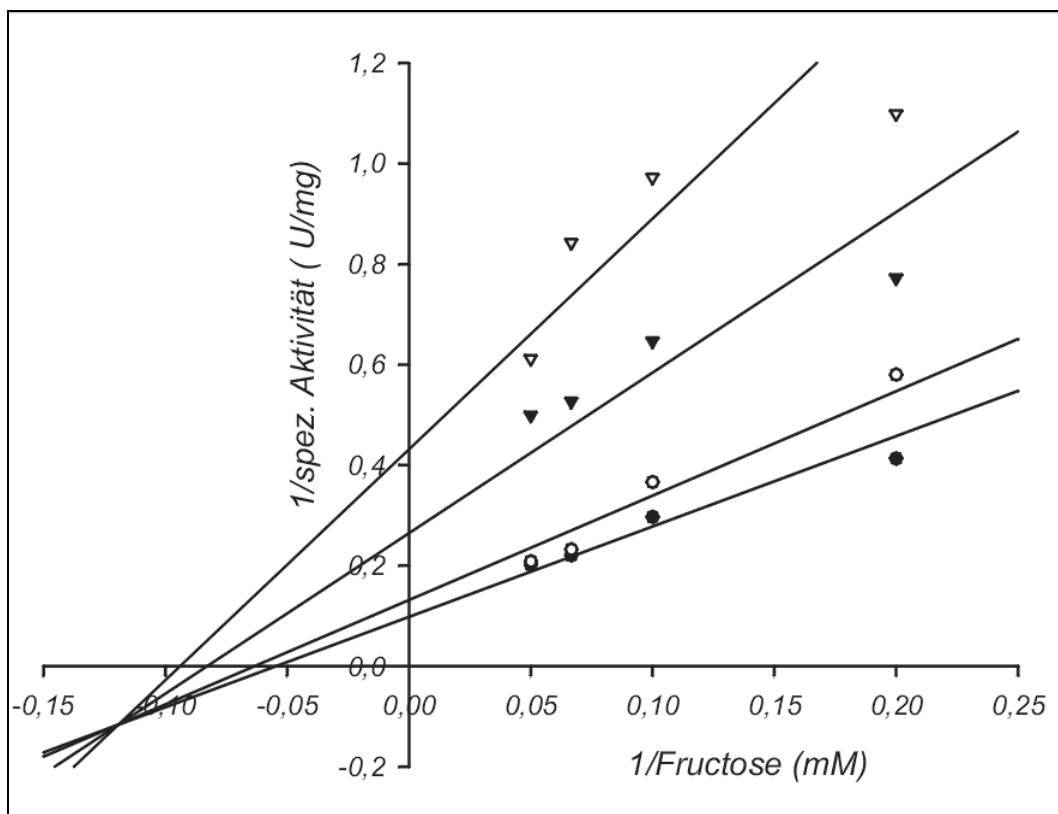


Abbildung 4.14 Produktinhibition der Synthesereaktion durch UDP gegenüber D-Fructose in der Lineweaver-Burk-Darstellung. 0-40 mM Fructose, 2 mM UDP-Glc, 10 mU SuSy (Spaltaktivität) und UDP 0 (●), 0,1 (○), 0,5 (▼) und 1 (▽) mM in 200 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C.

Für D-Fructose und den Inhibitor UDP erhält man:

$$K_m \quad 18,3 \quad \pm 7,2 \text{ mM}$$

$$K_i \quad 0,64 \quad \pm 0,59 \text{ mM}$$

$$V_{\max} \quad 10,2 \quad \pm 2,3 \text{ U mg}^{-1}$$

$$\alpha \quad 0,46 \quad \pm 0,69$$

Der Korrelationskoeffizient lag bei $R=0,98$.

Die Daten der Untersuchung der UDP-Inhibition gegenüber UDP-Glc konnten an das Modell einer partiell gemischten Inhibition, mit einem Korrelationskoeffizient von $R=0,98$, angepasst werden (Abbildung 4.15).

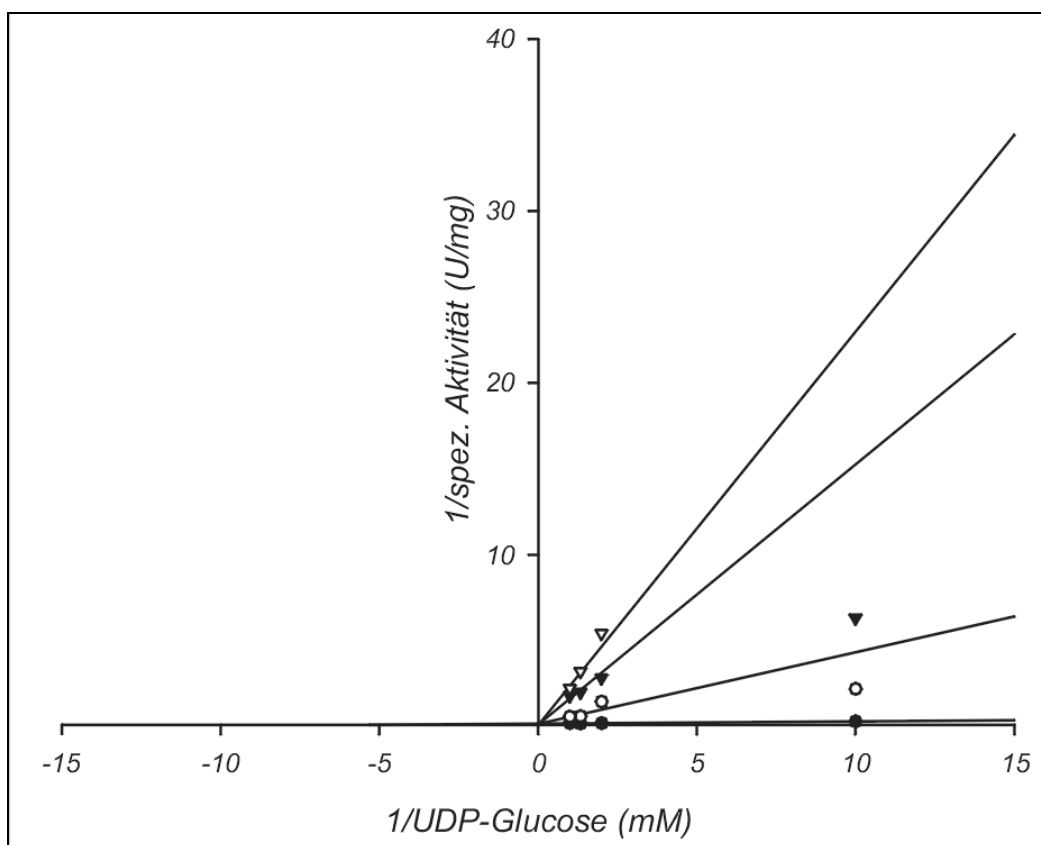


Abbildung 4.15 Produktinhibition der Synthesereaktion durch UDP gegenüber UDP-Glc in der Lineweaver-Burk-Auftragung. 0-3 mM UDP-Glc, 10 mM Fructose, 10 mU SuSy (Spaltaktivität), UDP 0 (●), 0,1 (○), 0,5 (▼) und 1 (▽) mM in 200 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C.

Es ergaben sich die folgenden kinetischen Daten für UDP- α -D-Glucose und den Inhibitor UDP.

K_m	0,07	$\pm 0,01$ mM
K_i	$2,9 \cdot 10^{-3}$	$\pm 1,1 \cdot 10^{-3}$ mM
V_{max}	5,3	$\pm 0,2$ U mg ⁻¹
α	$1,3 \cdot 10^6$	$\pm 7,9 \cdot 10^9$
β	3563	$\pm 2,1 \cdot 10^7$

Die Produktinhibition durch UDP wurde zusätzlich über eine Doppelsubstratkinetik bestimmt. Dazu wurden die Substrate UDP- α -D-Glucose und D-Fructose konstant gehalten und nur der Inhibitor variiert. Die Berechnung der Daten erfolgte nach einem sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus nach Gleichung 3.23.

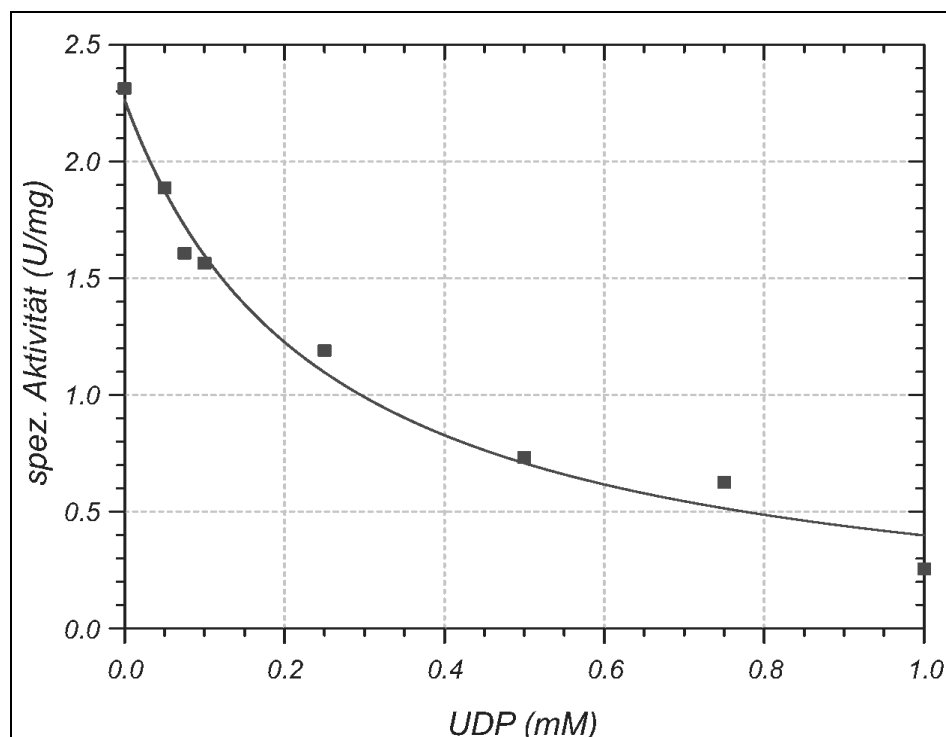


Abbildung 4.16 Produktinhibition der Synthesereaktion durch UDP. 0-1 mM UDP, 0,5 mM UDP-Glc, 2 mM D-Fructose, 10 mU/ml SuSy (Spaltaktivität).

Die Konstanten $K_{mA} = 0,6$ mM (A: UDP- α -D-Glucose), $K_{mB} = 2,3$ (B: D-Fructose) und $K_{ia} = 0,6$ wurden zur Berechnung in die Gleichung 3.23 eingesetzt.

Die Berechnung ergab folgende kinetische Parameter:

$$V_{\max} \quad 10,6 \quad \pm 0,4 \text{ U mg}^{-1}$$

$$K_{iQ} \quad 0,12 \quad \pm 0,02 \text{ mM}$$

UDP ist mit einem K_i -Wert von 0,12 mM ein starker Produktinhibitor, der ermittelte K_i -Wert ist kleiner als der K_m -Wert des erstbindenden Substrates UDP- α -D-Glucose. Schon geringe Mengen Produkt beeinflussen die Kinetik. Unter den Messbedingungen ist der Einfluss vermutlich gering, da bei Beachtung der Umsatzregel von max. 10 % nur 0,05 mM Produkt entstehen sollten.

Produktinhibition durch Saccharose

Die Analyse der erhaltenen Daten für die Inhibition durch Saccharose gegenüber UDP- α -D-Glucose erfolgte nach dem Modell der partiell gemischten Inhibition (siehe Abbildung 4.17).

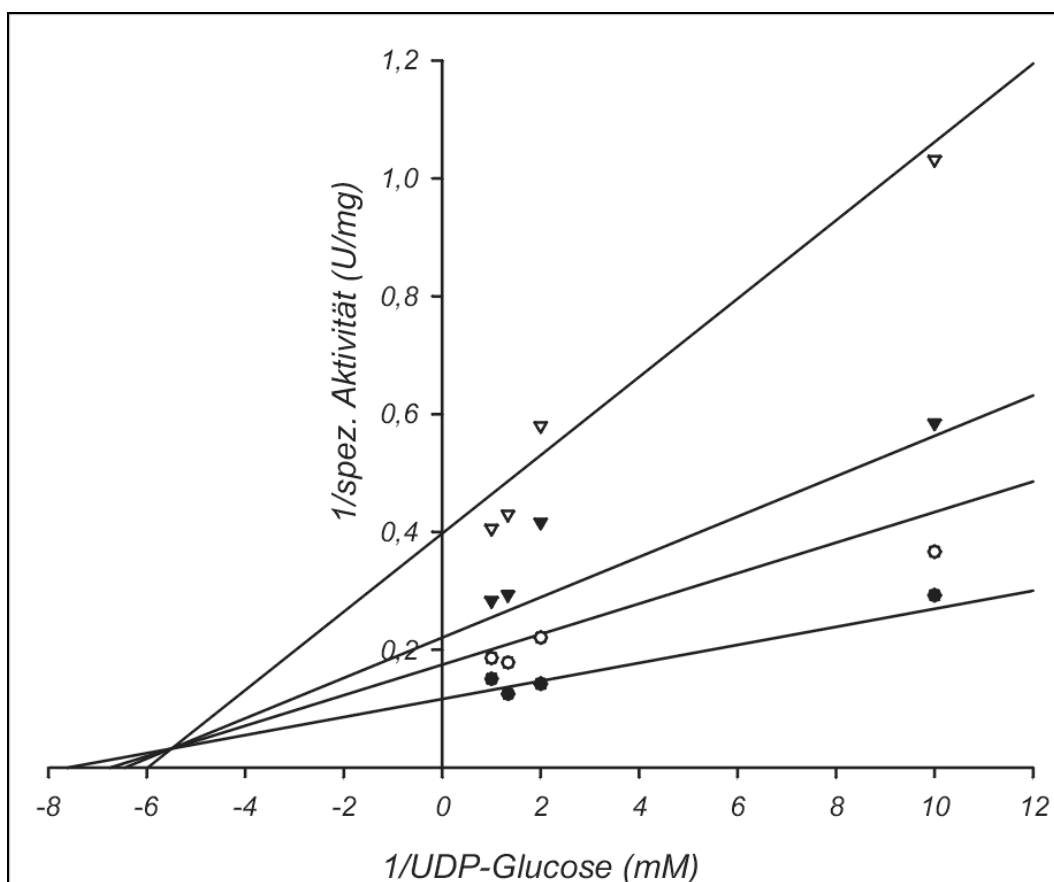


Abbildung 4.17 Produktinhibition der Synthesereaktion durch Saccharose gegenüber UDP-Glc in der Lineweaver-Burk-Darstellung. 0-3 mM UDP-Glc, 10 mM Fructose, 10 mU SuSy (Spaltaktivität) und Saccharose 0 (●), 50 (○), 100 (▼) und 500 (▽)mM in 200 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C.

Mit einem Korrelationskoeffizient von $R = 0,97$ erhält man für UDP- α -D-Glucose und Saccharose die folgenden kinetischen Konstanten.

K_m	0,13	$\pm 0,05$ mM
K_i	54,3	$\pm 45,9$ mM
V_{max}	8,5	$\pm 0,7$ U mg ⁻¹
α	1,31	$\pm 1,33$
β	0,19	$\pm 0,08$

Die Daten der Inhibitionsstudien von Saccharose gegenüber Fructose konnten keinem der bekannten Inhibitionsmodelle zugeordnet werden. Die Daten sind in Abbildung 4.18 in einer Lineweaver-Burk-Darstellung wiedergegeben.

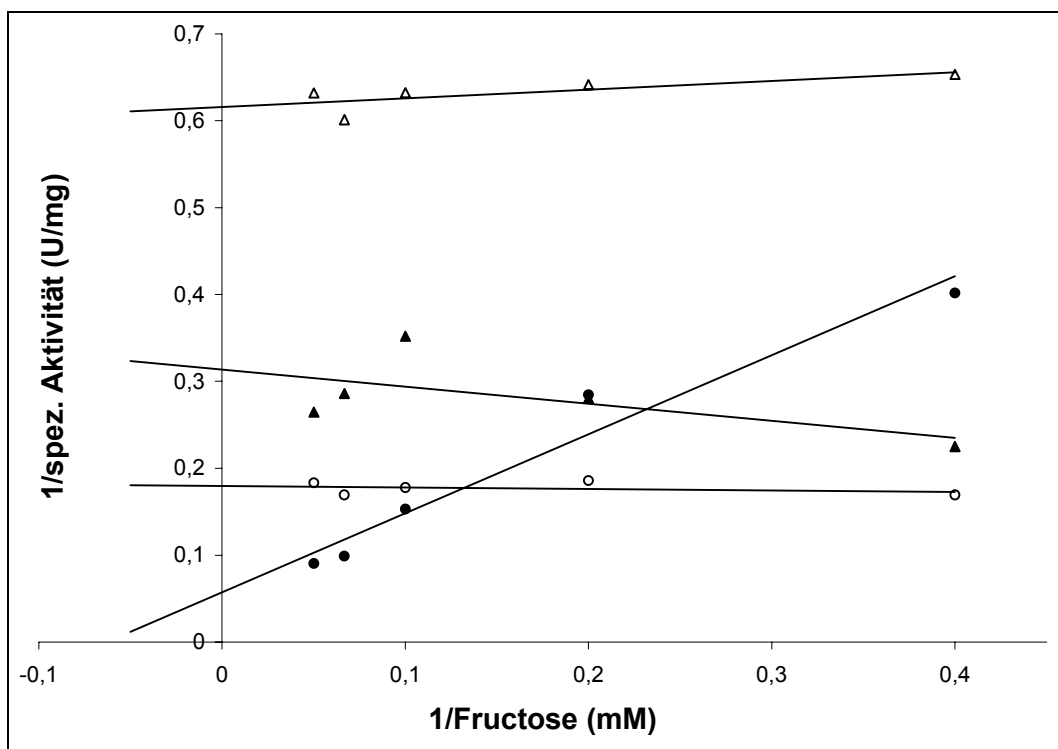


Abbildung 4.18 Produktinhibition der Synthesereaktion durch Saccharose gegenüber D-Fructose. 0-40 mM Fructose, 2 mM UDP-Glc, 10 mU SuSy (Spaltaktivität) und 0 (●), 50 (○), 100 (▲) und 500 (△) mM in 200 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C.

In Tabelle 4.16 sind die Inhibitionstypen bezogen auf die verschiedenen Substrate und Produktinhibitoren zusammengefasst.

Tabelle 4.16 Übersicht über die Inhibitionstypen der Produktinhibition von UDP und Saccharose in der Synthesereaktion

Produktinhibitor	inhibiertes Substrat	Inhibitinstyp
UDP	UDP-Glc	partiell gemischte Inhibition
UDP	D-Fructose	gemischte Inhibition
Saccharose	UDP-Glc	partiell gemischte Inhibition
Saccharose	D-Fructose	-

In der Literatur sind die Produktinhibitionsmuster verschiedener Enzymmechanismen beschrieben (Segel 1975). Die Einordnung der hier ermittelten Inhibitionstypen zu diesen Produktinhibitionsmustern, lassen auf einen sequenziellen Iso-Ordered-Bi-Bi-Mechanismus schließen. Die Reaktanden in einem sequenziellen Iso-Ordered-Bi-Bi-Mechanismus lassen sich in Gruppen aufteilen, eine A/Q-Paar und eine B/P-Paar (Cleland 1963). Für die Synthesereaktion müsste somit UDP- α -D-Glucose ein Paar mit UDP und D-Fructose mit Saccharose bilden. Es kann der folgende Enzymmechanismus abgeleitet werden (siehe Abbildung 4.19):



Abbildung 4.19 Schematische Darstellung des sequenziellen Iso-Ordered-Bi-Bi-Mechanismus der Synthesereaktion.

In der Spaltreaktion bindet UDP vor Saccharose und somit wird vermutlich auch D-Fructose vor UDP-Glc aus dem Übergangskomplex entlassen. Ein Iso-Ordered-Bi-Bi-Mechanismus unterscheidet sich von einem normalen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus durch die Isomerisierung des Enzyms im Übergangskomplex. Das Enzym kommt in zwei verschiedenen Formen vor (E und E') und muss vor der Bindung neuer Substrate erst in die ursprüngliche Form zurückgebildet werden. In Abwesenheit von Produkten gilt die Geschwindigkeitsgleichung eines normalen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus (vgl. Gleichung 3.20). Bei der Betrachtung von Produktinhibitionen müssen zusätzliche Terme in die Geschwindigkeitsgleichung aufgenommen werden, die die Isomerisierung des Enzyms berücksichtigen.

4.2.1.5 Zusammenfassende Diskussion der kinetischen Daten

Die kinetischen Daten der rekombinanten Saccharose Synthase 1 aus Kartoffel in Synthese- und Spaltrichtung wurden ermittelt.

In Tabelle 4.17 sind einige Literaturdaten im Vergleich zu den in dieser Arbeit gemessenen kinetischen Konstanten für rekombinante SuSy1 aus Kartoffel zusammengestellt.

In Saccharose Syntheserichtung werden für Saccharose Synthase aus pflanzlichen Quellen K_m -Werte für D-Fructose zwischen 1 und 20 mM angegeben. Für UDP- α -D-Glucose liegen die angegebenen K_m -Werte zwischen 0,01 und 8,5 mM. Der berechnete K_m -Wert von D-Fructose mit 2,1 mM für das rekombinante Kartoffelenzym liegt im Bereich des von Murata (Murata 1972) bestimmten Wertes. Der berechnete K_m -Wert für UDP-Glc ist vergleichbar mit dem vom Jarma und Rydström (Jaarma und Rydström 1969) ermittelten Wert von 0,6 mM (vgl. Tabelle 4.17). In Pflanzen findet man *in vivo* Konzentrationen, z. B. in Kartoffelknollen, von 5 mM D-Fructose und 1,6 mM UDP- α -D-Glucose (Geigenberger und Stitt 1993). Obwohl die Synthesereaktion in Pflanzen eine untergeordnete Rolle spielt, findet man auch hier eine gute Übereinstimmung der ermittelten K_m -Werte mit der *in vivo* Situation in Pflanzen. Ganz im Gegensatz zu Präparationen aus pflanzlichen Quellen wird in dieser Arbeit für beide Substrate eine starke Substratüberschuss-inhibition festgestellt. Der K_i -Wert für UDP- α -D-Glucose liegt bei 2,3 mM und der für D-Fructose bei 35,9 mM. In der Literatur wird lediglich für SuSy aus Sojabohnenekeimlingen und Mais eine Substratinhibition durch D-Fructose bei Konzentrationen über 15 bzw. 20 mM beobachtet (Doehlert 1987, Morell und Copeland 1985). Für rekombinante SuSy1 aus Erbse wurden für Fructose ein K_m -Wert von 10,4 mM und eine Substratüberschussinhibition mit einem K_i -Wert von 42,1 mM festgestellt. Bei den ebenfalls untersuchten rekombinanten SuSy2 und SuSy3 wurden auch Substratüberschussinhibitionen beobachtet, jedoch war hier der K_i -Wert größer 100 mM.

UDP- α -D-Glucose ist auch bei den rekombinanten SuSys aus Erbse ein starker Substratinhibitor. Die experimentell bestimmten K_i -Werte liegen im Bereich der ermittelten Michaelis-Menten-Konstanten. Für SuSy1 wird ein K_m -Wert von 0,21 mM und ein K_i -Wert von nur 0,04 mM angegeben (Barratt et al. 2001). Für weitere rekombinante SuSy-Enzyme wie z.B. SuSy1 aus Mungobohne (Nakai et al. 1997) und Reis (Sayion et al. 1999) finden sich in der Literatur keine Anhaltspunkte über eine Substratinhibition durch D-Fructose und UDP- α -D-Glucose.

In Saccharose Spaltrichtung ist der in dieser Arbeit bestimmte K_m -Wert für UDP verglichen mit Daten für das Enzym aus pflanzlichen Quellen sehr klein. Für das Kartoffelenzym werden K_m -Werte für UDP von 1,7 mM (Pressey 1969) und 0,14 mM (Murata 1972) angegeben. Ähnliche K_m -Werte wurden für Saccharose Synthase aus Sojabohnenkeimlingen und Saccharose Synthase aus Erbse bestimmt (siehe Tabelle 4.17). Die von Sayion et al. (Sayion et al. 1999) und Barratt et al. (Barratt et al. 2001) ermittelten Daten für rekombinante Saccharose Synthase 1 aus Reis und Erbse liegen bei etwa dem 20-fachen des in dieser Arbeit ermittelten Wertes von 4 μ M. In Pflanzenzellen liegt das UDP nur in sehr geringen Mengen vor. In wachsenden Kartoffelknollen wurden ca. 0,09 mM UDP bestimmt (Geigenberger und Stitt 1993). Eine hohe Affinität der SuSy zu UDP ist daher physiologisch sinnvoll. UDP zeigt zusätzlich eine starke Substratüberschussinhibition, der hier ermittelte K_i -Wert der rekombinanten SuSy1 aus Kartoffel ist mit 0,11 mM etwa 25-fach größer als der K_m -Wert von UDP. Barratt et al. (Barratt et al. 2001) geben für die rekombinante SuSy1 aus Erbse einen K_i -Wert von 0,107 mM und dieser ist damit nur wenig größer, als der ermittelte K_m -Wert für UDP. Bereits Avigad und Milner identifizierten UDP als Substratinhibitor mit einem K_i -Wert von 7,6 mM für SuSy aus Zuckerrübe (Avigad und Milner 1966). Für weitere SuSy Präparationen aus pflanzlichem Material werden in der Regel hyperbole Kurvenverläufe für UDP beobachtet.

Die Konzentrationen von Saccharose ist in Pflanzen etwa um den Faktor 10^4 größer als die für UDP. Für die Kartoffelknollen konnte ein Wert von ca. 200 mM bestimmt werden (Geigenberger und Stitt 1993). Auch hier ist es physiologisch sinnvoll, dass die Affinität der SuSy zu Saccharose wesentlich niedriger ist. Der K_m -Wert für Saccharose liegt im Allgemeinen zwischen 10 mM und 290 mM (Shukla und Sanwal 1971, Nomura und Akazawa 1971). Der in dieser Arbeit ermittelte K_m -Wert von 91,6 mM zeigt gute Übereinstimmungen mit den Literaturdaten für das pflanzliche Kartoffelenzym von 130 mM (Pressey 1969) und 55 mM (Murata 1972). Für rekombinante Saccharose Synthase 1 aus Reis geben Sayion et al. (Sayion et al. 1999) für Saccharose einen K_m -Wert von 62,3 mM an. Rekombinante SuSy1 aus Erbse (Barratt et al. 2001) besitzt einen K_m -Wert für Saccharose von 32,1 mM.

Nakai et al. bestimmten für rekombinante SuSy aus Mungobohnenkeimlingen einen K_m -Wert von 161 mM für Saccharose (Nakai et al. 1997). Dieser Wert ist 10-mal so hoch wie der für das pflanzliche Mungobohnenzym, liegt jedoch im Bereich der für verschiedene pflanzliche SuSys beobachteten K_m -Werte. Aufgrund dieser Beobachtung schlossen Nakai et al., dass die fehlende Phosphorylierung des rekombinanten *E. coli* Enzyms verantwortlich für den Abfall der Affinität von Saccharose zum Enzym sein könnte. Anhand von *in vitro* Phosphorylierung des rekombinanten Enzyms konnte

nachgewiesen werden, dass durch Phosphorylierung die Affinität auf einen K_m -Wert von 61 mM ansteigt (Nakai et al. 1998). Das Substrat UDP wurde von Nakai et al. nicht untersucht (Nakai et al. 1997). Vergleiche der Daten der rekombinanten *E. coli* SuSy aus Erbse und Reis mit Daten für die pflanzlichen Enzymen lassen keinen Einfluss einer fehlenden Phosphorylierung erkennen (siehe auch Einleitung Kapitel 1.3.1).

Tabelle 4.17 Kinetische Daten der rekombinanten SuSy1 aus Kartoffel im Vergleich zu Literaturdaten.

Substrat	Enzymquelle	K_m [mM]	K_i [mM]	Literatur
D-Fructose	rekombinante SuSy1 aus Kartoffel	2,1	35,9	eigene Daten
	Kartoffel	6,6		(Jaarma und Rydström 1969)
	Kartoffel	5,9		(Slabnik et al. 1968)
	Kartoffel	1,4		(Murata 1972)
	Kartoffel	6,2		(Pressey 1969)
	rekombinante SuSy1 aus Erbse	10,4	42,1	(Barratt et al. 2001)
	rekombinante SuSy aus Mungobohnenkeimlingen	7,78		(Nakai et al. 1997)
UDP-Glc	rekombinante SuSy1 aus Kartoffel	0,5	2,3	eigene Daten
	Kartoffel	5,9		(Slabnik et al. 1968)
	Kartoffel	2,0		(Murata 1972)
	Kartoffel	1,6		(Pressey 1969)
	Kartoffel	0,6		(Jaarma und Rydström 1969)
	rekombinante SuSy1 aus Erbse	0,21	0,04	(Barratt et al. 2001)
	rekombinante SuSy aus Mungobohnenkeimlingen	0,4		(Nakai et al. 1997)
UDP	rekombinante SuSy1 aus Kartoffel	$4 \cdot 10^{-3}$	0,11	eigene Daten
	Kartoffel	1,7		(Pressey 1969)
	Kartoffel	0,14		(Murata 1972)
	Sojabohnenkeimlinge	$5 \cdot 10^{-3}$		(Morell und Copeland 1985)
	Erbse	0,025		(Dejardin et al. 1997)
	rekombinante SuSy1 aus Erbse	0,082	0,107	(Barratt et al. 2001)
	rekombinante SuSy1 aus Reis	0,07		(Sayion et al. 1999)
Saccharose	rekombinante SuSy1 aus Kartoffel	91,6		eigene Daten
	Kartoffel	130		(Pressey 1969)
	Kartoffel	55		(Murata 1972)
	rekombinante SuSy1 aus Erbse	32,1		(Barratt et al. 2001)
	rekombinante SuSy1 aus Reis	62,3		(Sayion et al. 1999)
	rekombinante SuSy aus Mungobohnenkeimlingen	161		(Nakai et al. 1997)

Die Produkte der Synthesereaktion der rekombinanten SuSy1 wurden als Produktinhibitoren identifiziert. UDP ist mit einem K_i -Wert von 0,12 mM verglichen mit dem

K_m -Werte des Substrates UDP-Glc von 0,5 mM ein starker Produktinhibitor. Die Produktinhibition durch UDP wurde zuvor auch für verschiedene SuSys aus pflanzlichen Präparationen festgestellt (Tabelle 4.18). Für Saccharose Synthase aus Gurke wurde mit einer Inhibition von 44% bei einer Konzentration 0,1 mM UDP eine ähnlich starke Inhibition beobachtet (Gross und Pharr 1981).

Tabelle 4.18 Produktinhibition der Synthesereaktion durch UDP

Enzymquelle	Inhibition durch UDP	Literatur
rekombinante SuSy1 aus Kartoffel	$K_i = 0,12$ mM	eigene Daten
Kartoffel	3 mM 60% Inhibition	(Slabnik et al. 1968)
Tapioca Knolle	$K_i = 4,9$ mM	(Shukla und Sanwal 1971)
Lein	$K_i = 2,1$ mM	(Sharma und Bhatia 1979)
Gurke	0,1 mM 44% Inhibition	(Gross und Pharr 1981)
Sojabohnenkeimlinge	0,7 mM 50% Inhibition	(Morell und Copeland 1985)

Die Untersuchung von Saccharose als Produktinhibitor erwies sich als schwierig. In der Literatur sind keine Untersuchungen zur Produktinhibition von Saccharose beschrieben. Aufgrund von Invertase in pflanzlichen Enzympräparationen konnten diese Untersuchungen nicht durchgeführt werden (Gross und Pharr 1981, Gabielyan et al. 1973). Die Inhibition der Spaltreaktion durch D-Fructose und UDP-Glc wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Morell und Copeland identifizierten beide Substrate als Produktinhibitoren der Spaltreaktion (Morell und Copeland 1985). Auch Sebkova et al. konnte zeigen, dass D-Fructose ein Produktinhibitor der Spaltreaktion ist (Sebkova et al. 1995).

4.2.2 Einfluss divalenter Kationen auf die Synthesereaktion

In der Literatur sind viele kinetische Untersuchungen zum Einfluss zweiwertiger Metallkationen beschrieben. Für die rekombinante Saccharose Synthase 1 aus Kartoffel wurde bereits der Einfluss von Mg^{2+} - und Ca^{2+} getestet, die jeweils die spez. Aktivität des Enzyms in Syntheserichtung steigern. Kupfer(II)-Kationen sind dagegen starke Inhibitoren (Römer 1998). In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Mangan(II) und Kobalt(II), sowie neben Kupfer(II) auch Nickel(II) und Zink(II) getestet.

Die Syntheseaktivität der rekombinanten Saccharose Synthase 1 aus Kartoffel wird durch Mn^{2+} - Ionen zunächst bis zu einem Maximum bei 2 mM $MnCl_2$ um das 3-fache gesteigert (Abbildung 4.20). Bei höheren Konzentrationen sinkt die spez. Aktivität auf die Ausgangsaktivität. Neben der Bildung des Produkts UDP war auch die Bildung von UMP zu beobachten. Ursache hierfür ist der im alkalischen Milieu durch Mangan, wie auch durch Magnesium und Calcium, katalysierte Zerfall von UDP-Glc zu UMP und einem zyklischen Zuckermonophosphat (Nunez und Barker 1976). Für Mangan konnte

gezeigt werden, dass bei Zugabe von 2 mM MnCl_2 über einen Zeitraum von 20 Stunden 50 % der vorgelegten UDP-Glc zu UMP und einem zyklischen Glucose-1-phosphat zersetzt werden. Der Einsatz von zweiwertigen Metallkationen zur Aktivitätssteigerung der SuSy in einer Synthese ist daher, insbesondere aufgrund der langen Standzeiten eines Syntheseansatzes, nicht sinnvoll.

Bereits Pressey und Slabnik et al. (Slabnik et al. 1968, Pressey 1969) stellten die aktivierende Wirkung von Mg^{2+} und Mn^{2+} fest. Eine maximale Aktivierung der Synthesereaktion durch Mangan(II) wurde bei 5 mM Mn^{2+} festgestellt. Bei höheren Konzentrationen wurde auch hier eine Inhibition festgestellt. Bei Saccharose Synthase aus Sojabohne wurde eine Aktivierung um das 2-fache bis zu einer Konzentration von 2 mM Mn^{2+} -Kationen beobachtet (Morell und Copeland 1985).

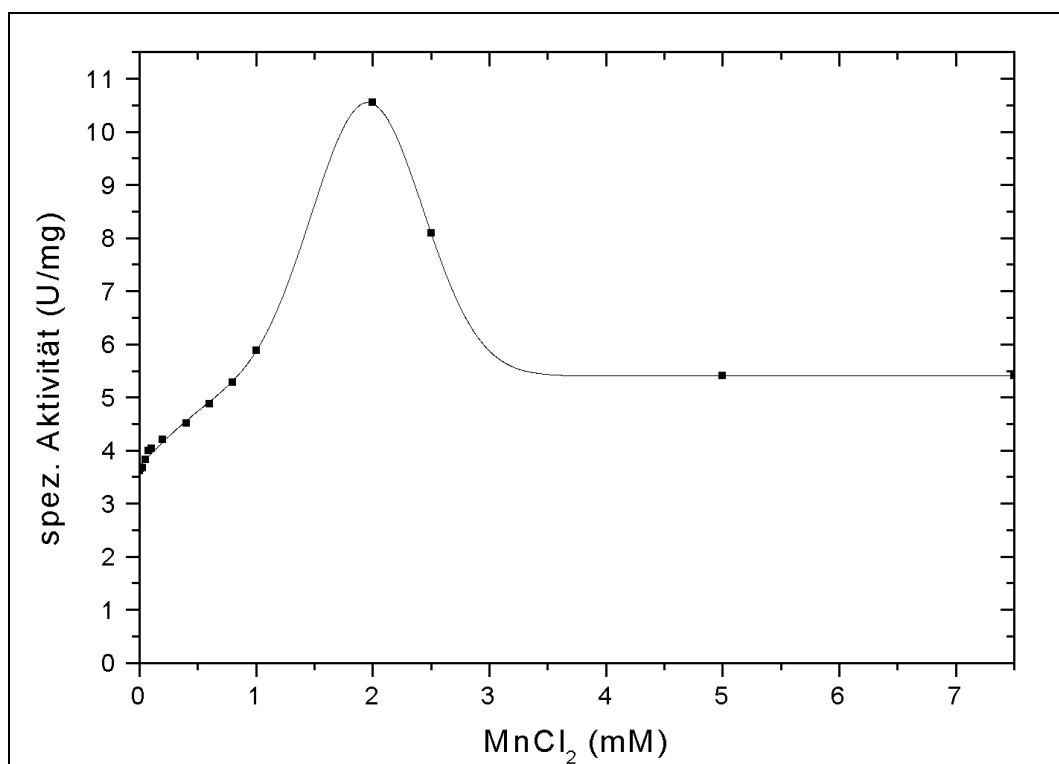


Abbildung 4.20 Einfluss von Mn^{2+} auf die spez. Aktivität der rekombinanten Saccharose Synthase 1 in Syntheserichtung. 0-7,5 mM MnCl_2 , 1 mM UDP-Glc, 20 mM D-Fructose, 10 mU/ml SuSy (Spaltaktivität) in 200 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C.

In Spaltrichtung besitzen die Erdalkalimetalle und Mangan eine hemmende Wirkung auf das Enzym wie Untersuchungen an Saccharose Synthase aus Pfirsich (Moriguchi und Yamaki 1988) und Winden (*Pharbitis nil*) (Hisajima und Ito 1981) zeigen.

Außer Mangan wirken zweiwertige Metallkationen der ersten Übergangsreihe sowohl in der Synthese- als auch in der Spaltreaktion inhibitorisch auf das Enzym. Hierzu wurden

ausführliche Untersuchungen für Saccharose Synthase aus Reis (Elling 1995) und aus Pfirsich (Moriguchi und Yamaki 1988) durchgeführt.

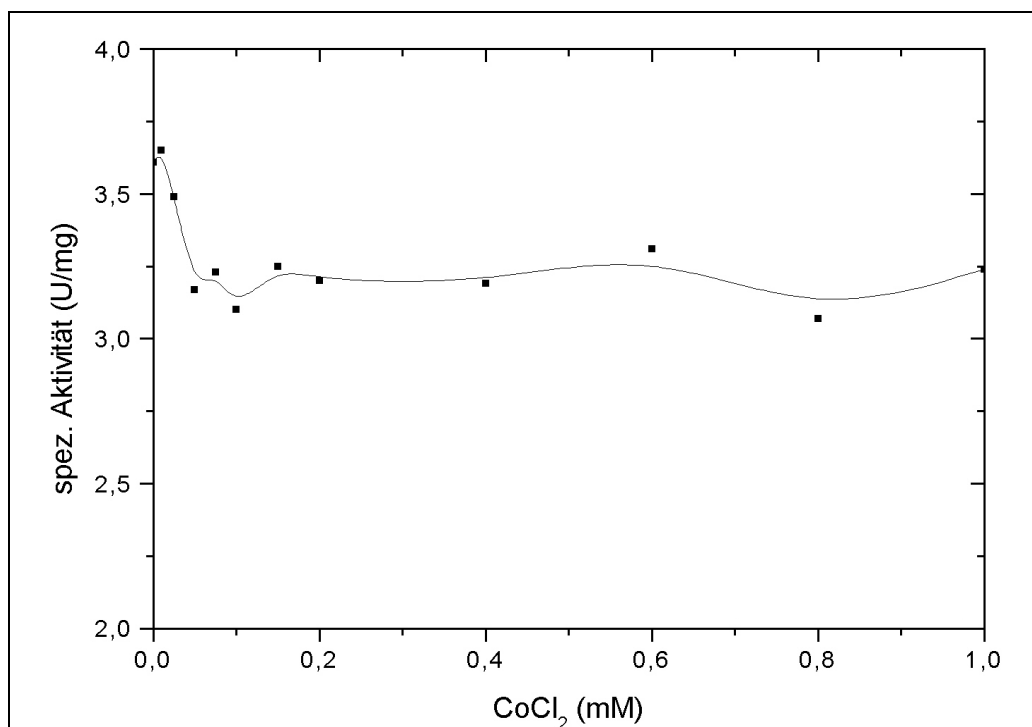


Abbildung 4.21 Einfluss von Co^{2+} auf die spez. Aktivität der rekombinanten Saccharose Synthase 1 in Syntheserichtung. 0-1 mM CoCl_2 , 1 mM UDP-Glc, 20 mM D-Fructose, 10 mU/ml SuSy (Spaltaktivität) in 200 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C.

Durch Zugabe von 0,05 mM Kobalt(II) wird die spezifische Aktivität der rekombinanten SuSy 1 aus Kartoffel um 20% reduziert. Es wird kein weiterer Abfall der Aktivität mit zunehmender Kobalt(II)-Konzentration beobachtet (Abbildung 4.21).

Moriguchi und Yamaki (Moriguchi und Yamaki 1988) beobachteten eine stärkere Inhibierung der Enzymaktivität durch Co^{2+} . Bei einer Konzentration von 5 mM CoCl_2 liegen nur noch 31% Restaktivität vor.

Elling (Elling 1995) untersuchte ausführlich die Wirkung von Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} und Fe^{2+} auf Saccharose Synthase aus Reis in der Spaltreaktion. Die rekombinante SuSy1 aus Kartoffel wird durch Kupfer(II), Zink(II) und Nickel(II) komplett inhibiert, was in Abbildung 4.22 deutlich wird.

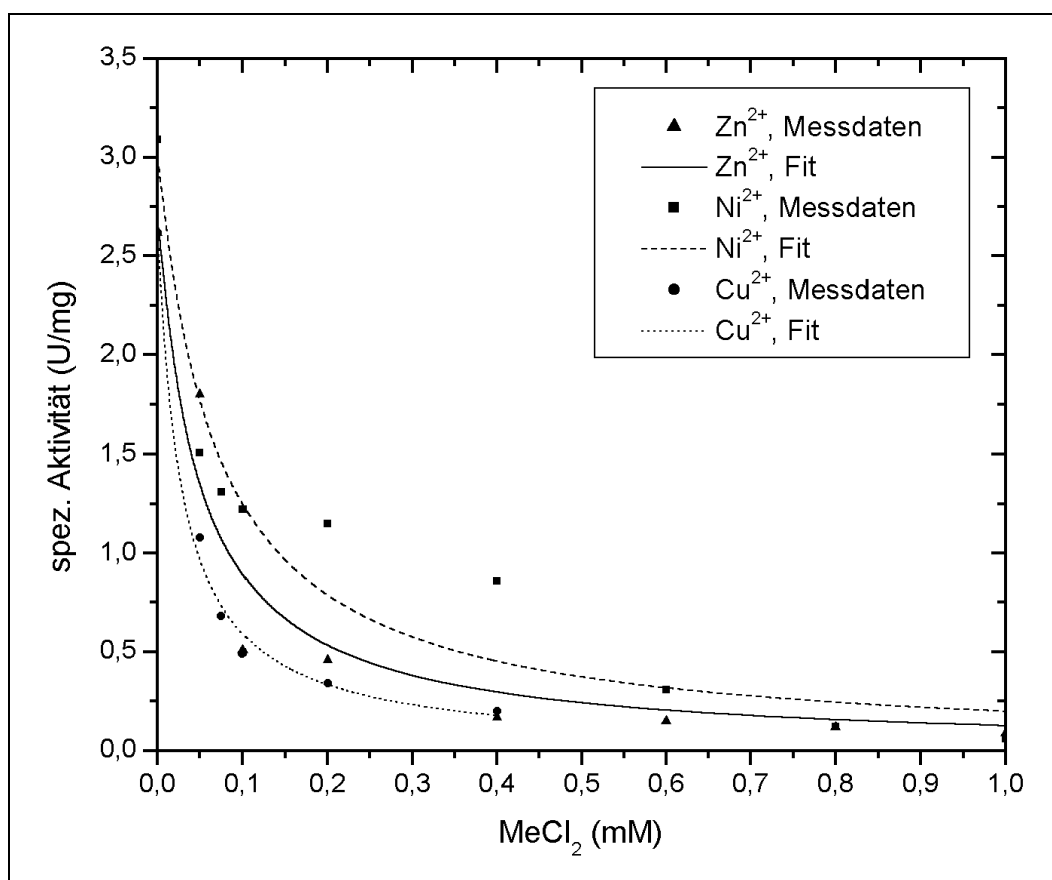


Abbildung 4.22 Einfluss von Cu^{2+} , Ni^{2+} und Zn^{2+} auf die spezifische Aktivität der Synthesereaktion der rekombinanten SuSy1. 0-1 mM $\text{CuCl}_2/\text{ZnCl}_2/\text{NiCl}_2$, 2 mM UDP-Glc, 10 mM D-Fructose, 10 mU/ml SuSy in 50 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C.

In Tabelle 4.19 sind die Ergebnisse der Inhibitionsstudien der drei Metallkationen zusammengefasst.

Tabelle 4.19 Inhibition der Synthesereaktion der rekombinanten SuSy1 durch Cu^{2+} , Ni^{2+} und Zn^{2+} .

	Kupfer(II)	Nickel(II)	Zink(II)
K_i [μM]	$15,2 \pm 1,4$	$37,4 \pm 8,1$	$25,1 \pm 7,3$
V_{max} [U/mg]	$11,3 \pm 0,4$	$12,9 \pm 1,0$	$11,6 \pm 1,1$

Kupfer(II), Nickel(II) und Zink(II) sind sehr starke Inhibitoren. Stärkster Inhibitor ist Cu^{2+} mit einem K_i -Wert von 15,2 μM . Elling (Elling 1995) bestimmte für die Spaltreaktion bei einer Zugabe von 30 μM Cu^{2+} eine Restaktivität für SuSy aus Reis von 15,4 %. Für Zink wurde ebenfalls eine stärkere Inhibition als für Nickel bestimmt, jedoch konnte bei Saccharose Synthase aus Reis bei Zugabe von 0,5 mM ZnCl_2 noch eine Restaktivität von 23,3% und bei Zugabe von 3 mM NiCl_2 von 25,9% bestimmt werden. Die Metallionen-Inhibitoren können in immobilisierter Form (IMAC) zur Reinigung des Enzyms eingesetzt werden. Entscheidend für die Bindung eines Proteins ist, dass dieses Aminosäurereste an der Oberfläche besitzt, die mit den auf einem inerten

Trägermaterial immobilisierten Metallionen Chelatkomplexe ausbilden. Durch Verdrängung mit einem anderen Chelatbildner oder einem pH-Shift, wird das Enzym wieder von der Säule verdrängt. Neben Histidinresten können auch SH-Gruppen des Cysteins für eine Komplexbildung verantwortlich sein. Der pK_a -Wert der Cysteinseitenketten liegt jedoch bei 8,4. In neutralen Lösungen ist somit eine Komplexbildung durch Cysteine nicht zu erwarten. Die Affinität zu komplexierten Metallionen ist von Protein zu Protein unterschiedlich und hängt von der Anzahl und der räumlichen Anordnung der Histidine ab. Durch die Wahl des Metallions kann die Bindungsstärke zu dem Protein variieren. Die Bindungsstärke mit der die Proteine an die verschiedenen komplexierten Metallionen gebunden werden, folgt der Reihenfolge $Cu^{2+} > Ni^{2+} > Zn^{2+} = Co^{2+}$ (Arnold und Hymore 1991). Diese Reihenfolge wurde für Saccharose Synthase aus Reis bestätigt (Elling 1995). In dieser Arbeit wurde eine Ni^{2+} -NTA-Material zur Reinigung des Enzyms eingesetzt (siehe Kapitel 4.1.2). Ni^{2+} kann 6-fach koordinativ gebunden werden und bildet mit Nitrilotriessigsäure (NTA) einen Trichelat-Komplex aus. Die Bindung des Chelatbildners zum Metallkation ist in der Regel stärker als die zum Protein. Ein Ausbluten des Metallkations und somit die Inaktivierung des Enzyms wird vermieden.

4.2.3 Akzeptorsubstratspektrum der Saccharose Synthase 1

Das Akzeptorsubstratspektrum der rekombinanten Saccharose Synthase 1 aus Kartoffel wurde systematisch untersucht. Das Akzeptorsubstratscreening wurde nach dem allgemeine Reaktionsschema in Abbildung 4.23 durchgeführt und Reaktionen mittels HPLC anhand der Bildung des Disaccharids und UDP verfolgt.

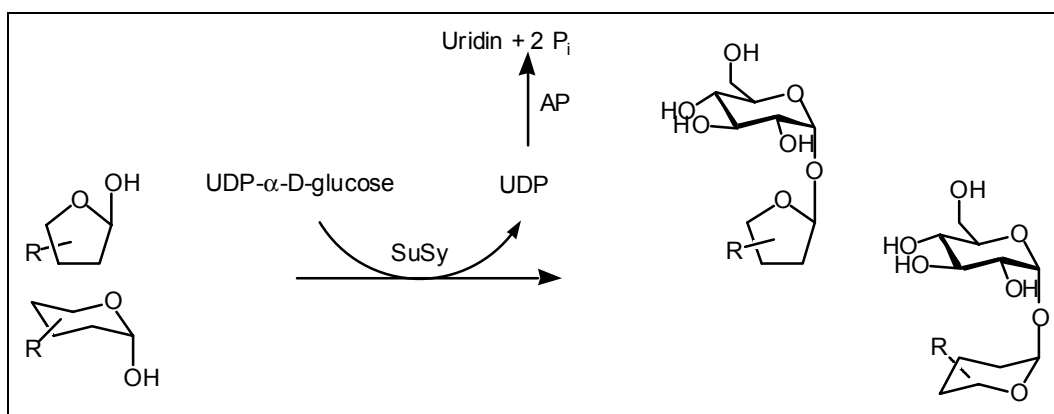


Abbildung 4.23 Allgemeines Reaktionsschema zum Test verschiedener Akzeptorsubstrate.

4.2.3.1 Ketosen

Neben den von D-Fructose abgeleiteten Hexulosen wurden auch Pentulose, Heptulose, D-Fructose-Derivate und das Disaccharid Lactulose getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.24 bis Abbildung 4.27 dargestellt.

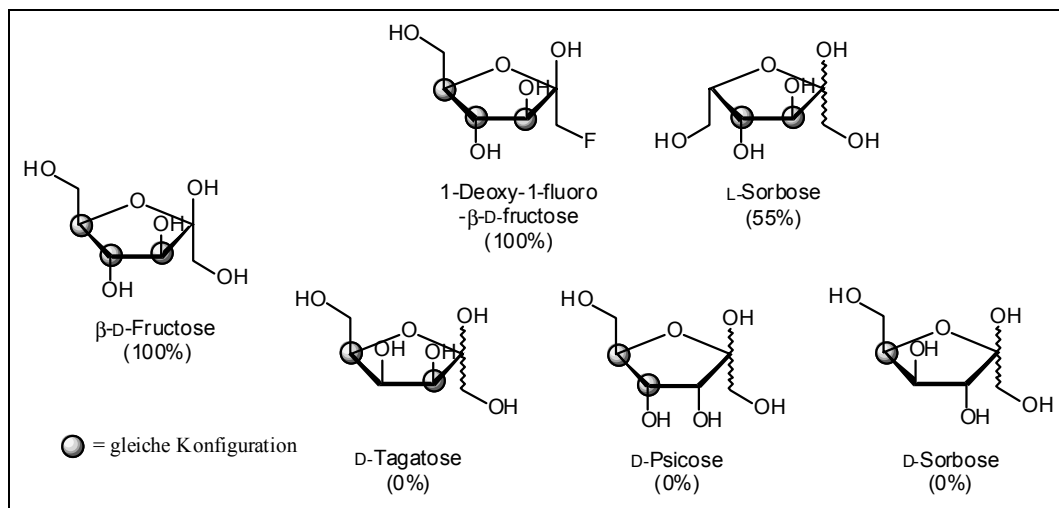


Abbildung 4.24 Ergebnis der Untersuchung einiger Hexulosen (relative Aktivität bezogen auf 100% Umsatz des eingesetzten Donors UDP- α -D-Glucose).

Anstelle von β -D-Fructose konnte 1-Desoxy-1-fluoro- β -D-fructose und L-Sorbose mit hohen relativen Aktivitäten umgesetzt werden. Neben diesen Ketosen akzeptierte das Enzym nur noch die Pentulose D-Xylulose. Für Saccharose Synthase aus Reis konnte zusätzlich die Akzeptanz von D-Tagatose (Elling et al. 1993) beobachtet werden. Bereits 1955 wurden mit SuSy aus Erbse (Bean und Hassid 1955) Umsätze mit L-Sorbose, D-Xylulose, D-Rhamnulose und D-Fructose-6-phosphat beobachtet. Das Zuckerrübenenzym (Avigad und Millner 1966) akzeptierte neben L-Sorbose auch D-Tagatose, D-Fructose-6-phosphat und 5-Keto-D-fructose. Die Akzeptanz von 1-Desoxy-1-fluoro- β -D-fructose wurde bereits von Card und Hitz (Card und Hitz 1984) beschrieben, die dieses Substrat auch in einer präparativen Synthese einsetzten. Neben diesem Fluoranalogen konnten auch weitere Fluor- und Azidoanaloga umgesetzt werden (Card et al. 1986).

Anhand der akzeptierten und nicht akzeptierten Ketosen lässt sich eine Modellvorstellung zur Substraterkennung von SuSy bezüglich Ketosen entwickeln. In Abbildung 4.24 und Abbildung 4.25 sind die akzeptierten Ketosen im Vergleich zu den nicht akzeptierten Hexulosen und Pentulosen dargestellt. Es sind jeweils die Stereozentren grau unterlegt, an denen die Konfiguration der Hydroxyl- bzw. Hydroxymethylgruppe der Konfiguration in D-Fructosefuranose entspricht. Es wird deutlich, dass die 3*S*,4*R*-Konfiguration der OH-Gruppen über die Akzeptanz eines

Substrates entscheidet. Eine Änderung der Konfiguration an nur einem dieser Stereozentren wird nicht toleriert, wie anhand von D-Tagatose und D-Psicose zu sehen ist. Die Hydroxylgruppe der D-Fructose an C₁ kann durch Fluor ersetzt werden, was keine Auswirkungen auf die relative Aktivität hat. Ändert man jedoch die Konfiguration der Hydroxymethylgruppe an C₅ (L-Sorbose) oder entfernt diese (D-Xylulose) so sinkt die Akzeptanz des Substrates. Die Reaktionsgeschwindigkeit und die Affinität dieser Substrate sinkt verglichen mit dem natürlichen Substrat stark, was aus den kinetischen Betrachtungen dieser Substrate hervorgeht (vgl. 4.2.3.5).

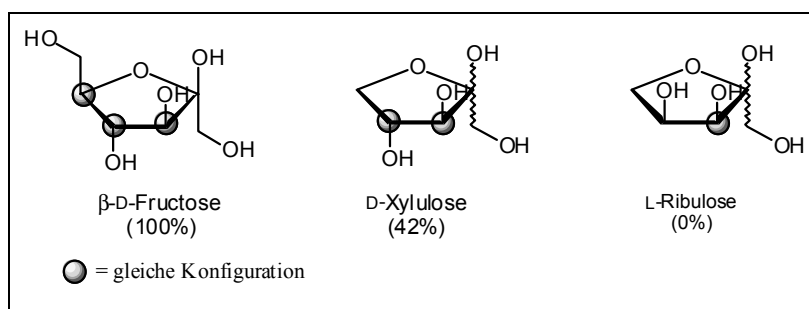


Abbildung 4.25 Ergebnis der Untersuchung der Pentulosen D-Xylulose und L-Ribulose im Vergleich zum natürlichen Substrat D-Fructose. (relative Aktivität bezogen auf 100% Umsatz des eingesetzten Donors UDP- α -D-Glucose).

Heptulosen werden von rekombinanter SuSy1 aus Kartoffel, im Gegensatz zu SuSy aus Reis, nicht akzeptiert. *Altro*-2-Heptulose (auch Sedoheptulose) konnte mit einer sehr geringen rel. Aktivität (1,1%) umgesetzt werden, für *manno*-2-Heptulose beobachtete man keinen Umsatz (Elling et al. 1993). Die Analytik des Akzeptorscreening bei Reis SuSy wurde anhand der Abnahme der UDP- α -D-Glucose-Konzentration durchgeführt. Eine relative Aktivität von 1,1 % liegt vermutlich im Bereich des Fehlers dieser Analytikmethode. Mit Saccharose Synthase aus Zuckerrübe testeten Avigad und Millner (Avigad und Millner 1966) die Heptulosen Glucoheptulose und Mannoheptulose. Sie beobachteten keinen Umsatz.

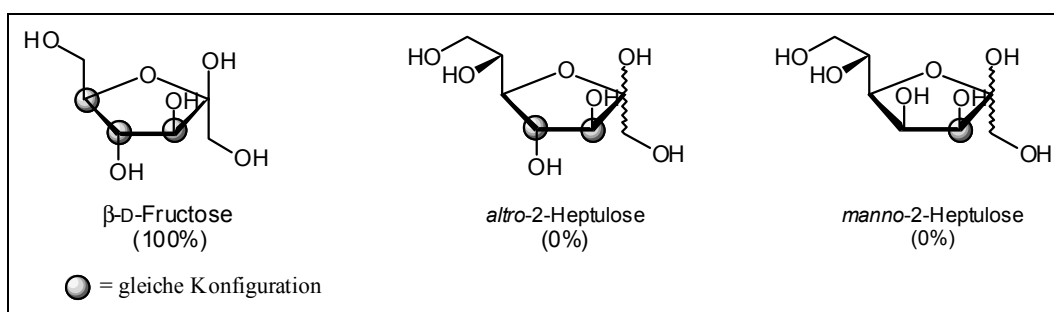


Abbildung 4.26 Ergebnis der Untersuchung von Heptulosen im Vergleich zu D-Fructose. (relative Aktivität bezogen auf 100% Umsatz des eingesetzten Donors UDP- α -D-Glucose).

Dagegen konnten mit dem Reisenzym sehr hohe Umsätze mit dem Disaccharid Lactulose (68%) beobachtet werden. Die rekombinante Kartoffel SuSy1 zeigte keine Akzeptanz dieses Substrates.

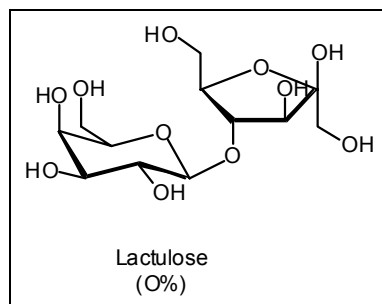


Abbildung 4.27 Das Substrat Lactulose. (relative Aktivität bezogen auf 100% Umsatz des eingesetzten Donors UDP- α -D-Glucose)

Lactulose wurde ebenfalls mit dem Zuckerrübenenzym getestet, es wurde keine Akzeptanz beobachtet. Das Disaccharid Levanbiose (6-O- β -D-Fructofuranosyl-D-fructose) wurde dagegen akzeptiert (Avigad und Millner 1966). Mit Saccharose Synthase aus Reis konnten neben den Ketosen auch Stickstoffheterocyclen sehr effizient umgesetzt werden, wie dies zum Beispiel mit der präparativen Umsetzung von 3-Hydroxypyrrolidin geschehen ist (Günther 1996). Für rekombinante SuSy1 aus Kartoffel stellt 3-Hydroxypyrrolidin kein Substrat dar.

Anhand der akzeptierten Ketosen konnten schon deutliche Unterschiede zwischen der rekombinanten SuSy1 aus Kartoffel und SuSys aus pflanzlichen Materialien gezeigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die 3*S*,4*R*-Konfiguration der OH-Gruppen in der furanoiden Form über die Akzeptanz eines Substrates entscheidet. Jedoch stellt sich die Frage, wie SuSy das Substrat D-Fructose erkennt. Aus thermodynamischen Studien ist bekannt, dass D-Fructose in wässrigen Lösungen zu 70% in der pyranoiden und nur zu 23% in der furanoiden Form vorliegt. Die β -D-Fructopyranose liegt dabei in der thermodynamisch bevorzugten 1C_4 -Konformation vor. Die L-Sorbose liegt sogar zu 95 % als Pyranose vor. Zur Untersuchung dieses Zusammenhangs konnten im Rahmen des SFB 380 Verbindungen zur Verfügung gestellt werden, die Analoga der pyranoiden, furanoiden und offenkettigen Form der D-Fructose darstellen (siehe Abbildung 4.28).

4.2.3.2 Akzeptorsubstrat-Analoga

Die Substrate 5-Desoxy- β -D-fructose, 2,5-Dihydroxymethyl-3*S*,4*R*-hydroxypyrrolidin (DMDP) und 2-Keto-3*S*,4*R*-dihydroxyhexan wurden in Inhibitionsstudien eingesetzt und die Wirkung auf die Synthesereaktion untersucht (Abbildung 4.28). Dazu wurde zunächst die enzymatische Reaktion in Anwesenheit der verschiedenen Analoga durchgeführt. Anschließend wurden die Reaktionsansätze in einem Mikrotiterplattentest

untersucht. Sowohl die Konzentration an gebildeter Saccharose als auch die durch eine mögliche Hydrolyse des Donors UDP-Glc entstehende Glucose wurde ermittelt.

Die Auswertung der Messdaten erfolgte nach dem Kinetikmodell eines sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus nach Gleichung 3.24 bzw. Gleichung 3.25.

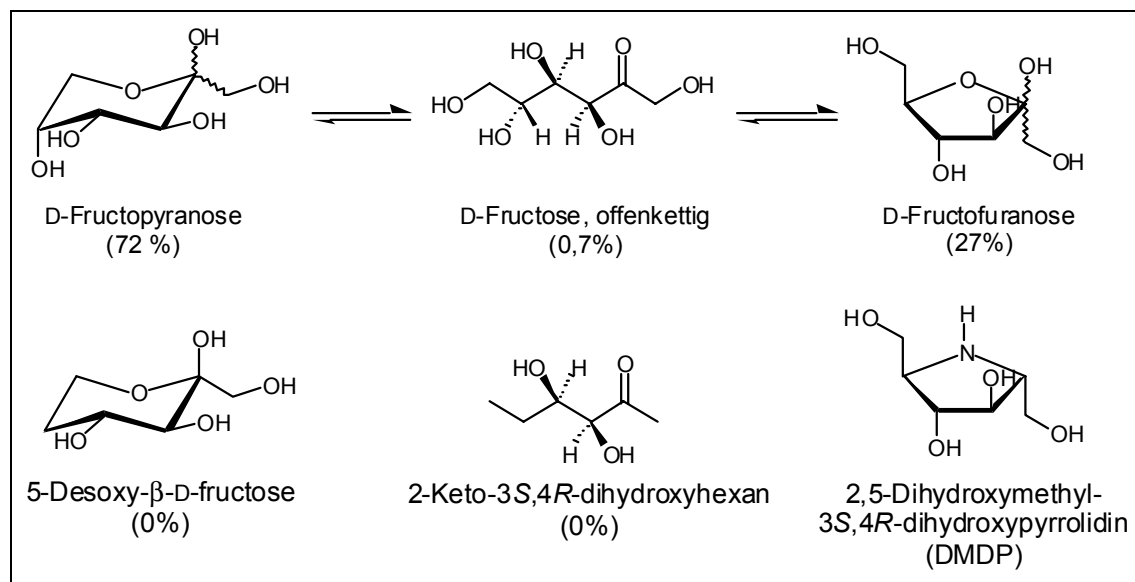


Abbildung 4.28 In Inhibitionsstudien eingesetzte Akzeptorsubstrat-Analoga.

5-Desoxy-β-D-fructose

5-Desoxy-β-D-fructose ist ein Strukturanalogen der β-D-Fructopyranose und kann aufgrund der fehlenden OH-Gruppe an C-5, im Gegensatz zur Fructose, keinen furanoiden Ring bilden. Es konnte gezeigt werden, dass 5-Desoxy-β-D-fructose kein Substrat der rekombinanten SuSy1 ist. Dies führte zunächst zu der Vermutung, dass SuSy1 pyranoider Ringsysteme nicht erkennt. In den Inhibitionsstudien zeigte sich jedoch, dass 5-Desoxy-β-D-fructose ein sehr effizienter Inhibitor ist (Abbildung 4.29). Bei einer Inhibitorkonzentration von 5 mM ist die spez. Aktivität praktisch auf null abgesunken. Die Hydrolyse des Donorsubstrates und damit die Bildung von Glucose konnte im Test nicht beobachtet werden.

Die Auswertung der Messdaten nach Gleichung 3.12 zeigt, dass 5-Desoxy-β-D-fructose ein starker kompetitiver Inhibitor zu D-Fructose ist.

$$K_i \quad 0,34 \quad \pm 0,08 \text{ mM}$$

$$V_{\max} \quad 2,4 \quad \pm 0,2 \text{ U mg}^{-1}$$

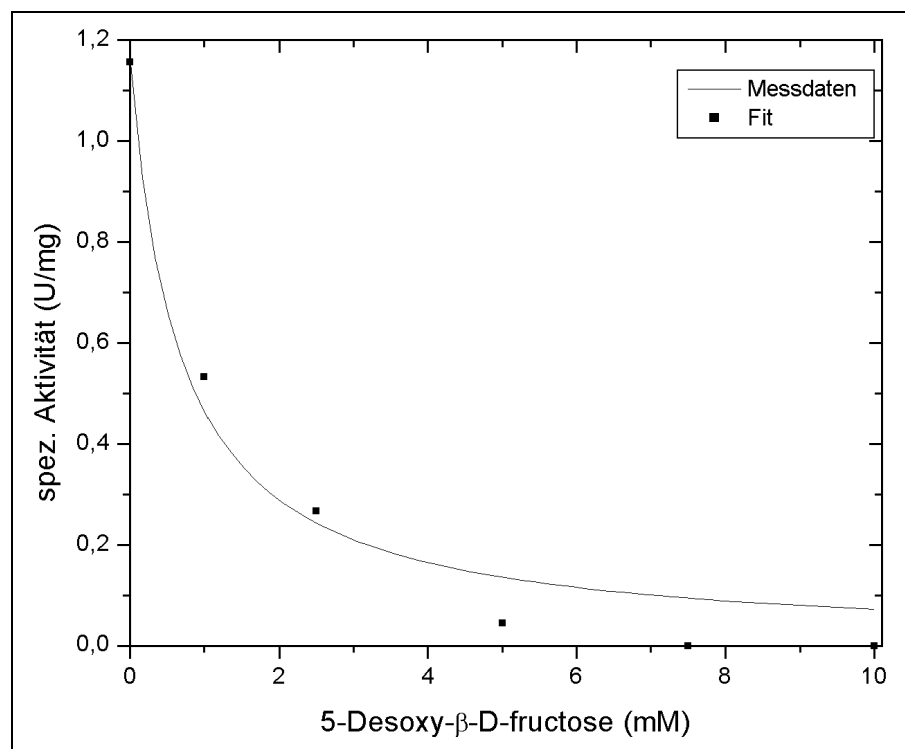


Abbildung 4.29 Inhibition der Synthesereaktion der Saccharose Synthase durch 5-Desoxy-β-D-fructose. 0-10 mM 5-Desoxy-β-D-fructose, 0,5 mM UDP-Glucose, 2 mM Fructose, 10 mM SuSy1 in 200 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C.

Der ermittelte K_i -Wert für 5-Desoxy-β-D-fructose liegt weit unter dem für D-Fructose ermittelten K_m -Wert von 2,2 mM. Der Donor UDP-Glucose wird nicht hydrolysiert. Somit ist der Einschluss von Wasser im aktiven Zentrum des Enzyms ausgeschlossen. Dies bedeutet, dass das Substrat 5-Desoxy-β-D-fructose sehr genau in das aktive Zentrum des Enzyms passt. 5-Desoxy-β-D-fructose kann jedoch nicht umgesetzt werden, obwohl dies über die OH-Gruppe am anomeren C-Atom möglich wäre. Das Ergebnis zeigt, dass SuSy1 die 1C_4 -Konformation der β-D-Fructopyranose erkennt, jedoch für die Katalyse der Transferreaktion das Substrat in die β-D-Fructofuranose überführen muss.

2,5-Dihydroxymethyl-3*S*,4*R*-dihydroxypyrrolidin (DMDP)

Einen weiteren Hinweis für die Richtigkeit der zuvor gewonnen Erkenntnisse liefert das Substrat 2,5-Dihydroxymethyl-3*S*,4*R*-dihydroxypyrrolidin (DMDP).

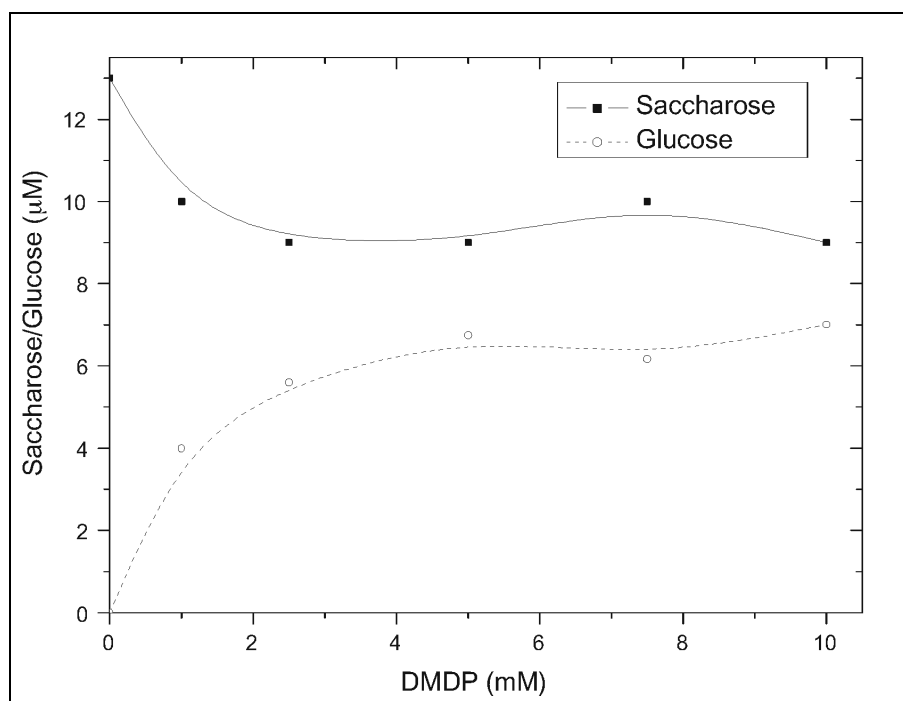


Abbildung 4.30 Inhibition der Synthesereaktion der Saccharose Synthase durch DMDP. 0-10 mM DMDP, 0,5 mM UDP-Glucose, 2 mM Fructose, 10 mM SuSy1 in 200 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C.

DMDP stellt ein Strukturanalogon der β -D-Fructofuranose dar, jedoch fehlt die für eine Übertragung wichtige Hydroxylgruppe an C-2. Aus Abbildung 4.30 geht hervor, dass DMDP eine schwache inhibitorische Wirkung hat. Bei einer Konzentration von 3-10 mM des Inhibitors wird die Saccharosesynthese der SuSy1 um ca. 30 % inhibiert. Gleichzeitig wird zusätzlich die Bildung von Glucose und damit die Hydrolyse des Donors beobachtet. Hieraus kann man schließen, dass die β -D-Fructofuranose vom Enzym erkannt wird. Anhand der Hydrolysereaktion erkennt man jedoch, dass das Substrat nicht so exakt in das katalytische Zentrum gebunden sein kann, da Wasser als Nukleophil den Donor angreifen kann und Glucose freigesetzt wird. β -D-Fructofuranose ist vermutlich nicht die bevorzugte Konformation für die Enzym-Substrat-Bindung.

Die β -D-Fructofuranose wird jedoch zur Produktbildung benötigt, obwohl die β -D-Fructopyranose die bevorzugte Konformation der SuSy1 zur Substratbindung ist. Die β -D-Fructofuranose muss somit intermediär über die offenkettige Form gebildet werden.

2-Keto-3S,4R-dihydroxyhexan

Zur genaueren Untersuchung der offenkettigen Form stand das Substrate 2-Keto-3S,4R-dihydroxyhexan zur Verfügung. 2-Keto-3S,4R-dihydroxyhexan stellt ein Strukturanalogon der offenkettigen Form von D-Fructose dar. Dieses Substrat besitzt die 3S,4R-Konfiguration der Hydroxylgruppen.

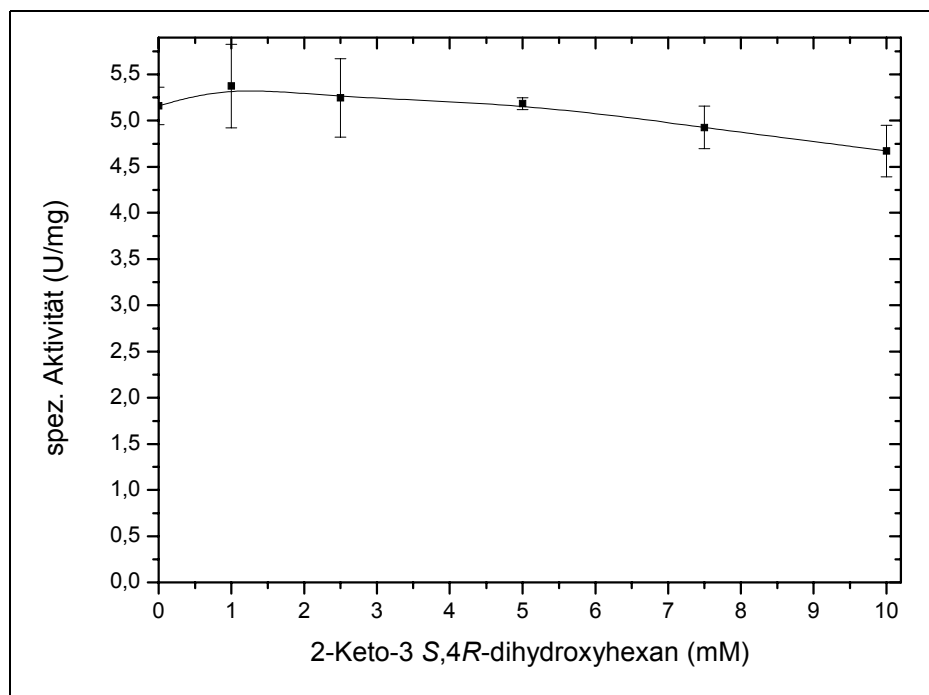


Abbildung 4.31 Einfluss von 2-Keto-3S,4R-dihydroxyhexan auf die Synthesereaktion der Saccharose Synthase. 0-10 mM von 2-Keto-3S,4R-dihydroxyhexan, 0,5 mM UDP-Glucose, 2 mM Fructose, 10 mM SuSy1 in 200 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C.

Aus Abbildung 4.31 geht hervor, dass das Substrat 2-Keto-3S,4R-dihydroxyhexan einen schwachen Einfluss auf die enzymatische Reaktion hat. Bei einer Konzentration von 10 mM, des 5-fachen K_m -Wertes von D-Fructose, kann man eine Erniedrigung der Ausgangsaktivität von 10% beobachten. Die Bildung von Glucose konnte nicht beobachtet werden. Der Fehler der Messung liegt bei unter 10 %. Hieraus lässt sich schließen, dass die offenkettige Form der D-Fructose vom Enzym erkannt wird, jedoch nur in sehr geringen Maß. In wässriger Lösung liegt die offenkettige Form zu weniger als 1 % vor, so dass diese Form sich dem Enzym in der Regel nicht als Akzeptor anbietet. Die offenkettige Struktur wird vom Enzym vermutlich nur vorübergehend in einem geschlossenen katalytischen Zentrum beim Übergang von der pyranoiden in die furanoide Ringform gebildet. Sie stellt jedoch kein Substrat für SuSy1 dar.

Mit Hilfe der hier getesteten Fructose-Analoga, die im Rahmen des SFB 380 zur Verfügung gestellt wurden, konnte erstmals die Frage geklärt werden in welcher Form

Saccharose Synthase den Akzeptor bindet. Es konnte gezeigt werden, dass die β -D-Fructopyranose, die auch in wässriger Lösung überwiegt, die von SuSy akzeptierte Form ist. Es kann jedoch nur zur Produktbildung kommen, wenn über die offenkettige Form der D-Fructose die β -D-Fructofuranose gebildet werden kann.

Neben den Fructoseanaloga wurden Substanzen getestet, die in ihren strukturellen Merkmalen, bezüglich einer Ähnlichkeit zu D-Fructose, weiter reduziert sind.

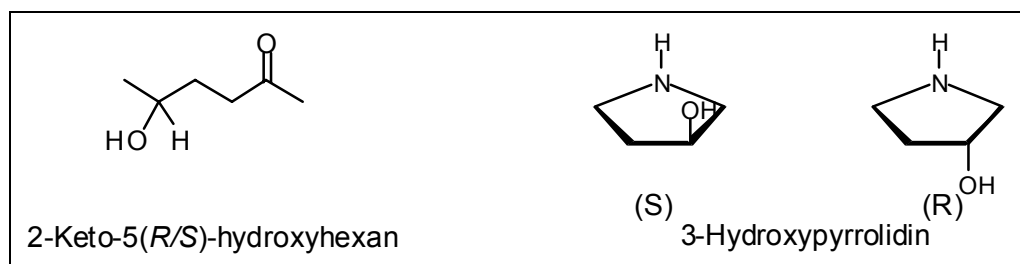


Abbildung 4.32 In Inhibitionsstudien eingesetzte in ihren strukturellen Informationen stark reduzierte Akzeptorsubstrat-Analoga.

2-Keto-5(R/S)-hydroxyhexan

2-Keto-5-hydroxyhexan besitzt im Gegensatz zu 2-Keto-3*S*,4*R*-dihydroxyhexan nicht die für eine Akzeptanz entscheidende 3*S*,4*R*-Konfiguration der Hydroxylgruppen. Bei pH-Werten über 9 erfolgt die Zyklisierung dieses Substrates. Bei dem Arbeits-pH-Wert von 8 ist eine Zyklisierung nicht zu erwarten, so dass 2-Keto-5-hydroxyhexan in der linearen Form in Lösung vorliegt.

Aus Abbildung 4.33 wird ersichtlich, dass 2-Keto-5-hydroxyhexan keinen Einfluss auf die Synthesereaktion der SuSy1 hat. Der Fehler der Reaktion liegt unter 4 %. Die Bildung von Glucose und somit die Hydrolyse des Donors wurde nicht beobachtet. Im Gegensatz zu 2-Keto-3*S*,4*R*-dihydroxyhexan hat dieses Substrat keine inhibitorische Wirkung. Dies ist insbesondere auf die fehlende strukturelle Information der Hydroxylgruppen zurückzuführen.

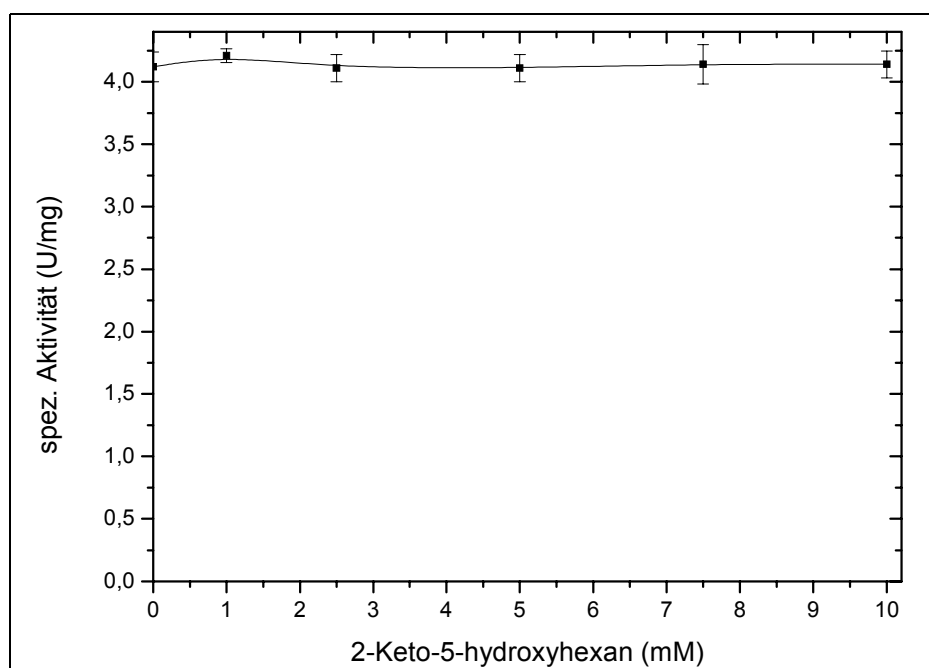


Abbildung 4.33 Einfluss von 2-Keto-5(*R/S*)-hydroxyhexan auf die Synthesereaktion der Saccharose Synthase. 0-10 mM von 2-Keto-5-hydroxyhexan, 0,5 mM UDP-Glucose, 2 mM Fructose, 10 mM SuSy1 in 200 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C.

(R/S)-3-Hydroxypyrrolidin und (*R*)-3-Hydroxypyrrolidin

3-Hydroxypyrrolidin ist ein Akzeptorsubstrat der Saccharose Synthase aus Reis. Es wurde präparativ umgesetzt und das Produkt isoliert und charakterisiert (Günther 1996). Für SuSy1 aus Kartoffel stellt es dagegen kein Substrat dar. (*R/S*)-3-Hydroxypyrrolidin und (*R*)-3-Hydroxypyrrolidin zeigen, ähnlich dem DMDP, eine schwache inhibitorische Wirkung von ca. 30% bei einer Konzentration von 10 mM. Die Bildung von Glucose konnte nicht beobachtet werden.

Aufgrund der starken Eigenabsorption von 3-Hydroxypyrrolidin sind bei den höheren Konzentrationen starke Absorptionsschwankungen zu beobachten. Bei der Konzentration von 10 mM lag der Fehler bei 59% für (*R*)-3-Hydroxypyrrolidin bzw. 38% für (*R/S*)-3-Hydroxypyrrolidin. Dies liegt über dem theoretisch zu beobachtende Inhibitionswert. Die Untersuchung von 3-Hydroxypyrrolidin mit einem fotometrischen Test scheint somit nicht geeignet. Alternativ könnte zur Untersuchung der Inhibition die HPLC-Analytik eingesetzt werden. Jedoch ist die in dieser Arbeit eingesetzte Zuckernalytik aufgrund der aufwändigen Probenvorbereitung wenig geeignet.

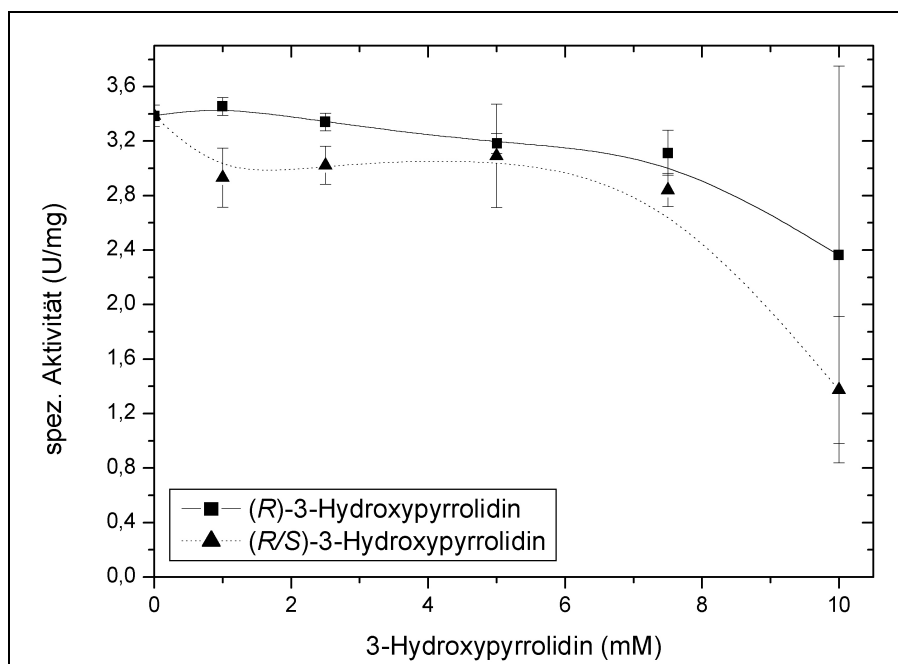


Abbildung 4.34 Einfluss von (*R/S*)-3-Hydroxypyrrolidin und (*R*)-3-Hydroxypyrrolidin auf die Synthesereaktion der Saccharose Synthase. 0-10 mM 3-Hydroxypyrrolidin, 0,5 mM UDP-Glucose, 2 mM Fructose, 10 mM SuSy1 in 200 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C.

4.2.3.3 Aldosen

Aus der Untersuchung der Fructose-Analoga geht hervor, dass die pyranoiden Ringform der β -D-Fructopyranose erkannt wird. Aufgrund dieser Tatsache wurden 30 verschiedene Pentosen und Hexosen, sowie in Ergänzung die in der furaniden Form vorliegenden Tetrosen, in das Akzeptorsubstratscreening aufgenommen.

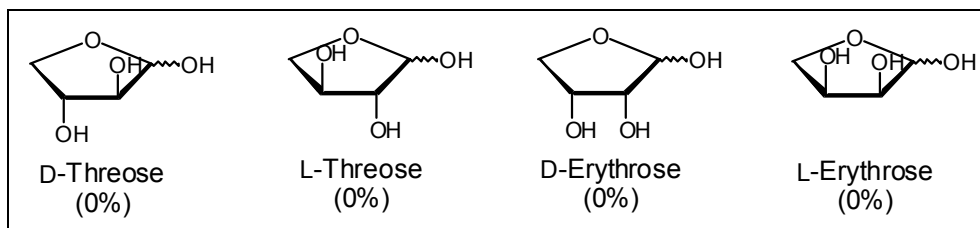


Abbildung 4.35 Untersuchung von Tetrosen (relative Aktivität bezogen auf 100% Umsatz des eingesetzten Donors UDP- α -D-Glucose).

Tetrosen können in wässriger Lösung eine furanoide Konformation einnehmen. D-Threose besitzt, analog der 3*S*,4*R*-Konfiguration der D-Fructofuranose, eine 2*S*,3*R*-Konfiguration der Hydroxylgruppen, was entsprechend dem Substraterkennungsmodell für Ketosen auf eine mögliche Akzeptanz dieses Substrates hinweisen könnte. Jedoch wird keine der getesteten Tetrosen von rekombinanter SuSy1 aus Kartoffel akzeptiert (Abbildung 4.35). Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Notwendigkeit einer pyranoiden Form zur Akzeptanz einer Aldose sein. Eine weitere Ursache für die mangelnde

Akzeptanz von Tetrosen als Substrate kann die, im Vergleich zu den Pentulosen und Hexulosen, fehlende Hydroxymethylgruppe an der Furanose sein.

Anders sieht dies bei den getesteten Pentosen aus, die in wässriger Lösung überwiegend als Pyranose vorliegen. Die Pentosen wie auch die Hexosen wurden hier jeweils in ihrer in wässrigen Lösungen thermodynamisch stabilsten Konformation dargestellt.

Neben D-Lyxose konnte L-Arabinose mit guten relativen Aktivitäten umgesetzt werden. D-Xylose und D-Ribose wurden ebenfalls akzeptiert (Abbildung 4.36).

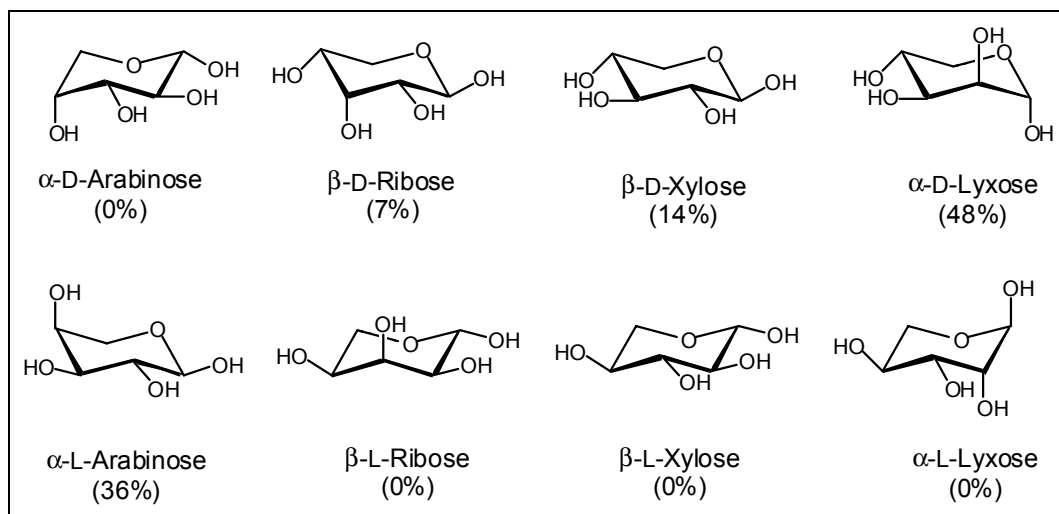


Abbildung 4.36 Untersuchung von Pentosen (rel. Aktivität im Vergleich zum nat. Akzeptor D-Fructose bezogen auf 100% Umsatz des eingesetzten Donors UDP- α -D-Glucose).

Die Akzeptanz von D-Lyxose und L-Arabinose wurde bereits für Saccharose Synthase aus Reis (Elling et al. 1993, Grothus 1993) gezeigt. D-Xylose und D-Ribose konnten mit Reis SuSy wie auch mit SuSy aus Zuckerrübe (Avigad und Millner 1966) nicht umgesetzt werden. Bei den Hexosen konnten eine Akzeptanz der Monosaccharide D-Glucose, D- und L-Mannose, D-Gulose, D-Idose, D-Talose, L-Allose und L-Galactose beobachtet werden (siehe Abbildung 4.37). Für alle weiteren Hexosen und Desoxyaldosen wurde keine Aktivität beobachtet.

Saccharose Synthase aus Reis besitzt bezüglich der Hexosen ein weniger breites Substratspektrum. Lediglich D-Mannose und als Derivat 1,6-Anhydroglucose zeigten gute rel. Aktivitäten. 1,6-Anhydroglucose wurde nicht von rekombinanter SuSy1 akzeptiert.

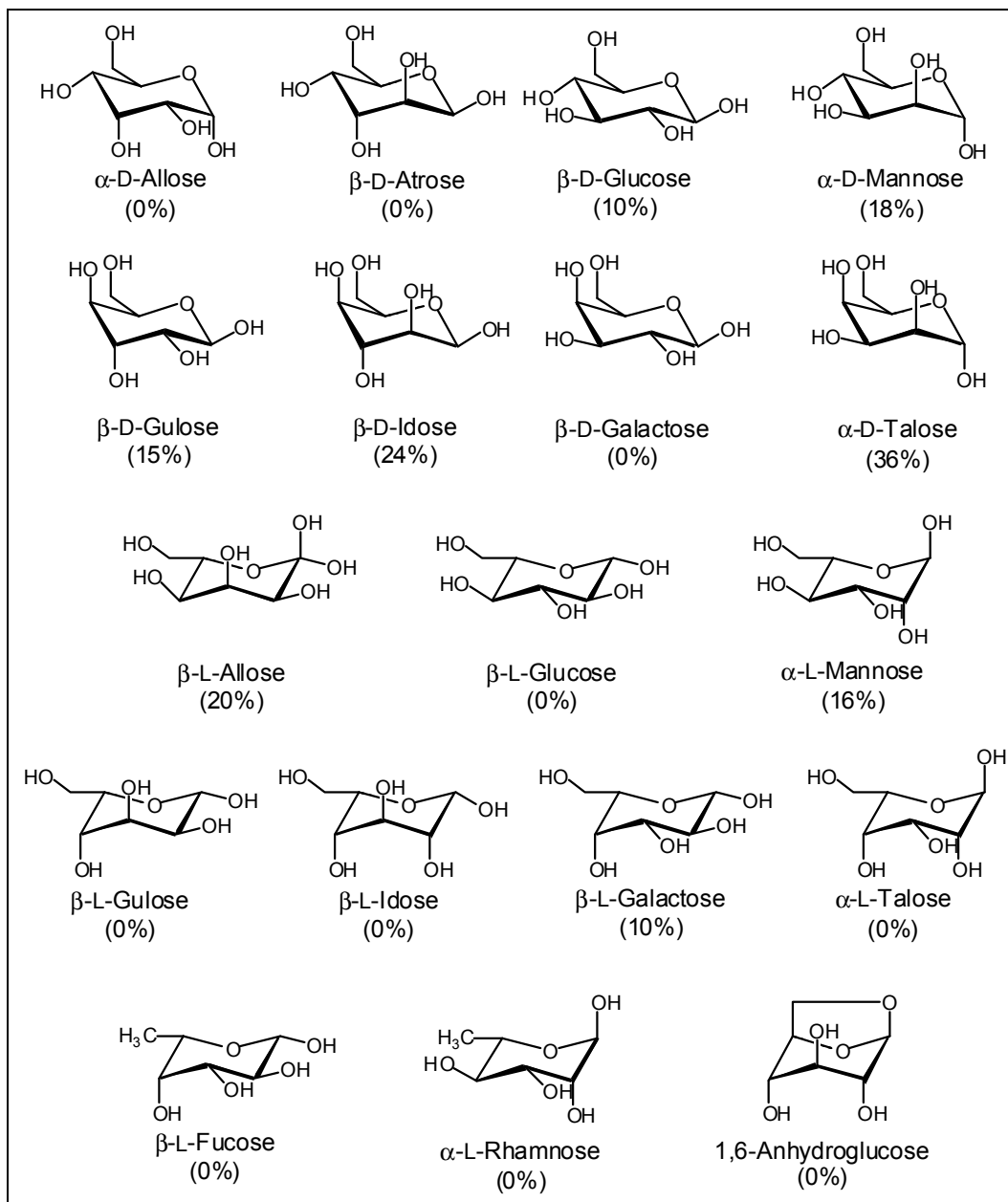


Abbildung 4.37 Akzeptorsubstratscreening von Hexosen und Derivaten (rel. Aktivität im Vergleich zu D-Fructose bezogen auf 100% Umsatz des eingesetzten Donors UDP- α -D-Glucose).

4.2.3.4 Zusammenfassung des Akzeptorsubstratscreenings

Es konnte gezeigt werden, dass rekombinante SuSy1 aus Kartoffel ein sehr breites Substratspektrum besitzt. Auch werden deutliche Unterschiede in der Akzeptorsubstratakzeptanz verschiedener SuSys sichtbar. Eine Übersicht im Vergleich zu Literaturdaten ist in Tabelle 4.20 zusammengestellt.

Ein Vergleich des für rekombinante SuSy1 ermittelten Substratspektrums war im Wesentlichen nur mit SuSy aus Reis möglich, da hier das erste umfassende Screening von Ketosen, Aldosen und entsprechenden Derivaten durchgeführt wurde (Elling et al. 1993, Grothus 1994). Aldosen wurden weiterhin nur in der Untersuchung des Substratspektrums von Weizen eingesetzt, jedoch konnte keine Akzeptanz der untersuchten Aldosen beobachtet werden (Cardini et al. 1955). Während für SuSy aus Reis lediglich die Akzeptanz der drei Aldosen D-Lyxose, L-Arabinose und D-Mannose sowie des Derivates 1,6-Anhydroglucose gezeigt werden, wurde für rekombinante SuSy1 die Akzeptanz von neun weiteren Aldosen gezeigt. Auf Seiten der Ketosen hingegen ist die Varianz der rekombinanten SuSy1 eingeschränkter. Es wurden lediglich Ketosen akzeptiert, die eine 3*S*,4*R*-Konfiguration der Hydroxylgruppen aufwiesen. Für SuSy aus Reis ist dagegen lediglich die 3*S*-Konfiguration der OH-Gruppe entscheidend, so dass auch D-Tagatose und D-Psicose umgesetzt werden konnte (Elling et al. 1993, Grothus 1994). Aus der Untersuchung neuer Akzeptorsubstrat-Analoga konnte erstmals gezeigt werden, dass rekombinante Saccharose Synthase 1 die pyranoide Form der β -D-Fructose bindet und über die offenkettige Form die zur Produktbildung entscheidende furanoide Form gebildet wird.

Tabelle 4.20 Übersicht zur Untersuchung des Substratspektrums verschiedener SuSys aus pflanzlichen Quellen im Vergleich zur rekombinanten SuSy1 aus Kartoffel.

Quelle	Akzeptor (mit UDP-Glc als Donor)	keine Reaktion
rekombinante SuSy1 aus Kartoffel	D-Xylulose, D-Fructose, L-Sorbose ¹ , 1-Desoxy-1- fluorofructose ¹ , D-Ribose, D-Lyxose ¹ , L-Xylose, L-Arabinose ¹ , L-Allose, D-Glucose, D-/L-Mannose, D-Gulose, D-Idose, L- Galactose, D-Talose	D-Tagatose, D-Psicose, D-Sorbose, L-Ribulose, <i>altro</i> - 2-Heptulose, <i>manno</i> -2- Heptulose, 5-Desoxy- α -D- fructose, 2-Keto-3S,4R- dihydroxyhexan, D-/L-Threose, D-/L-Erythrose, D-Arabinose, D-Xylose, L-Lyxose, L-Ribose, D-Allose, D-Altrose, L-Glucose, L-Gulose, L-Idose, D-Galactose, L-Talose, L-Fucose, L-Rhamnose, 1,6-Anhydro- glucose, Lactulose
Weizen (Cardini et al. 1955)		D-Glucose, D-Galactose, D-Mannose, D-/L-Arabinose, D-Ribose, Inositol
Erbse (Bean und Hassid 1955)	D-Fructose, D-Fructose-6-P, D-Xylulose, D-Rhamnulose, L-Sorbose	
Zuckerrübe (Avigad und Millner 1966)	D-Fructose, L-Sorbose, 5- Keto-D-fructose, D-Tagatose, Fructose-6-P, Levanbiose	D-Xylose, L-Rhamnulose, D-Glucoheptulose, D-Mannoheptulose, 3,4-Di- O-methyl-fructose, Dihydroxyaceton, Pyruvat, Lactulose, Turanose
Gerste (Card und Hitz 1984)	1-Desoxy-1-fluorofructose	
Gerste (Card et al. 1986)	1-Azido-1-deoxyfructose, 6-Deoxyfructose, 6-Desoxy- 6-fluorofructose, 4-Desoxy-4-fluorofructose,	
Reis (Elling et al. 1993, Grothus 1994)	D-Xylulose ¹ , D-Fructose, D-Tagatose ¹ , D-Psicose, L-Sorbose, Sedoheptulose, D-Lyxose ¹ , L-Arabinose, D-Mannose 1,6-Anhydro- glucose, Lactulose, Raffinose, Isomaltulose	D-Erythrulose, L-Xylulose, D-Ribulose, D-Sorbose, Mannoheptulose, D-Glucoheptulose, D-/L-Allose, D-Altrose, D-/L-Glucose, L-Mannose, L-Gulose, D-/L-Idose, D-/L-Galactose, D-/L-Talose, D-/L-Ribose, D-Arabinose, D-/L-Xylose
Reis (Elling et al 1995, Peters et al. 1993)	6-Desoxy-L-sorbose ¹	

¹Präparativ umgesetzte Substrate.

4.2.3.5 Kinetik ausgewählter Akzeptorsubstrate

Zur Beurteilung der Qualität eines Akzeptors, wurden einige nichtnatürliche Akzeptorsubstrate, Ketosen wie auch Aldosen, eingehender kinetisch untersucht. Hierbei wurden die Akzeptoren eingesetzt, die im Screening eine relative Aktivität von 35 bis 55 % zeigten. Die Berechnung der kinetischen Konstanten erfolgte mit dem Modell einer Einsubstratkinetik nach Gleichung 3.10 und im Falle einer Substratüberschussinhibition nach Gleichung 3.11.

4.2.3.5.1 1-Desoxy-1-fluorofructose

Die Kinetik des Fructose-Analogen 1-Desoxy-1-fluoroglucose folgt einem hyperbolischen Kurvenverlauf (Abbildung 4.38)

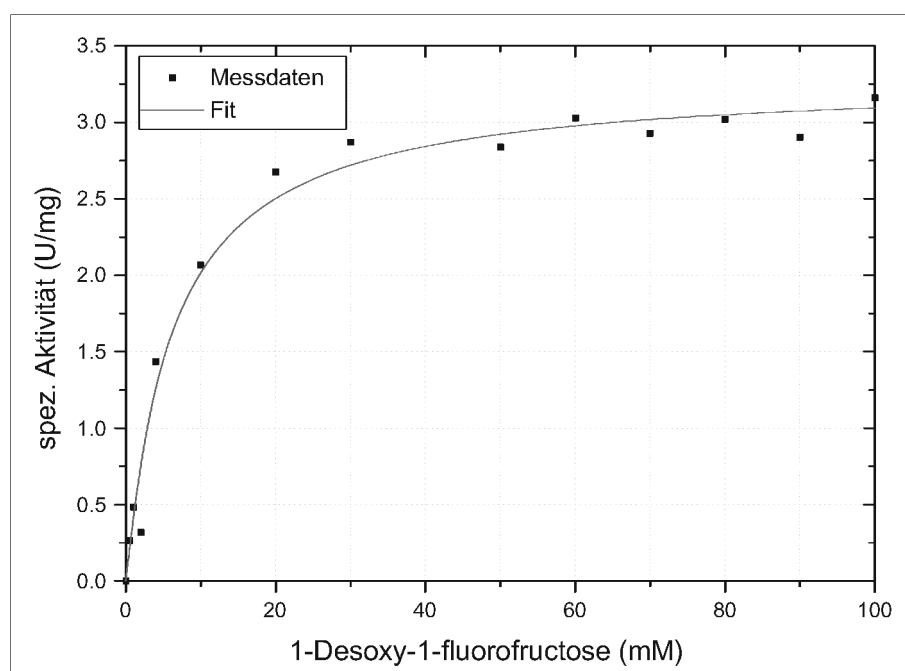


Abbildung 4.38 Kinetik von 1-Desoxy-1-fluorofructose: 0-100 mM 1-Desoxy-1-fluorofructose, 1 mM UDP- α -D-Glucose, 25 mU SuSy1 (Spaltaktivität) in 200 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C.

Die Berechnungen ergaben:

$$K_m \quad 6,3 \quad \pm 0,9 \text{ mM}$$

$$V_{\max} \quad 3,3 \quad \pm 0,1 \text{ U mg}^{-1}$$

Der k_{cat} -Wert und die katalytische Effizienz K_{cat}/K_m wurden mit Gleichung 3.26 und Gleichung 3.27 berechnet.

$$k_{\text{cat}} \quad 21,7 \quad \text{s}^{-1}$$

$$k_{\text{cat}}/K_m \quad 3,5 \quad \text{s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$$

Im Vergleich zum natürlichen Substrat D-Fructose geht von 1-Desoxy-1-fluorofructose keine Substratüberschussinhibition aus. Der Austausch der Hydroxylgruppe an C-1 gegen Fluor führt zu einem Anstieg des K_m -Wertes von 2,2 mM auf etwa das dreifache und die Reaktion verläuft wesentlich langsamer. Dies hat eine Erniedrigung der katalytischen Effizienz um den Faktor 10 zur Folge. 1-Desoxy-1-fluorofructose stellt insbesondere im Vergleich mit den weiteren kinetisch untersuchten Akzeptoren (siehe unten) dennoch ein gutes Substrat dar.

4.2.3.5.2 L-Sorbose

Die kinetische Messung für L-Sorbose erfolgte unter zusätzlichem Einsatz von alk. Phosphatase. Für L-Sorbose findet man wie bei der D-Fructose eine Substratüberschussinhibition (Abbildung 4.39).

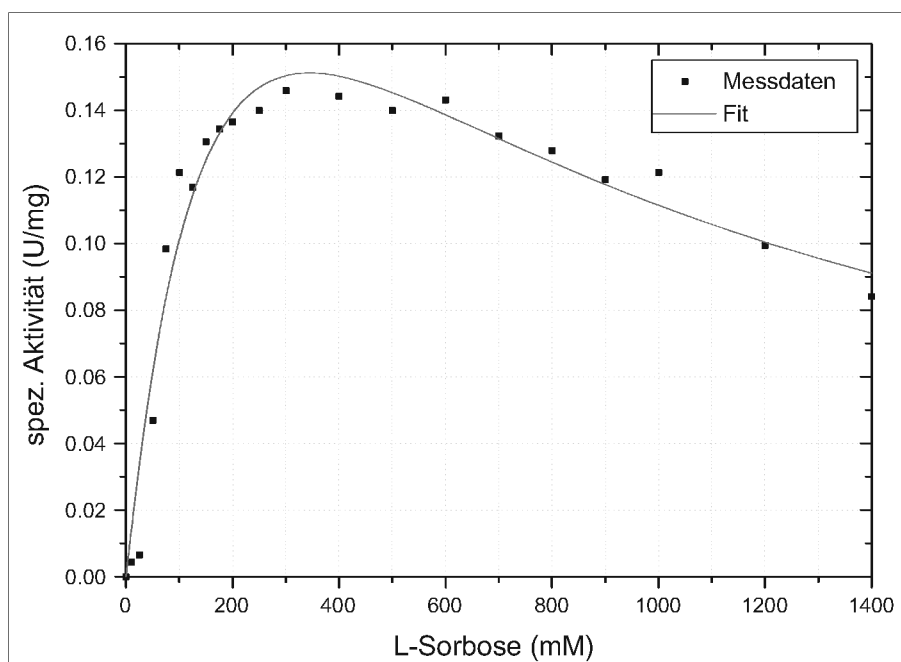


Abbildung 4.39 Kinetik von L-Sorbose: 0-1400 mM von L-Sorbose, 1 mM UDP- α -D-Glucose, 200 mU SuSy1 (Spaltaktivität), 1 U alk. Phosphatase in 200 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C.

Wie man an den Ergebnissen sieht, hat die Änderung der Konfiguration der Hydroxymethylgruppe an C-5 einen starken Einfluss auf die Kinetik des Substrates.

K_m	226,5	$\pm 78,5$ mM
K_{iS}	521,2	$\pm 185,7$ mM
V_{max}	0,35	$\pm 0,08$ U mg ⁻¹
k_{cat}	2,3	s ⁻¹
k_{cat}/K_m	0,01	s ⁻¹ mM ⁻¹

Im Vergleich zum natürlichen Akzeptor steigt der K_m -Wert um den Faktor 100, die Reaktionsgeschwindigkeit sinkt drastisch und somit ist auch die katalytische Effizienz um das 1000 fache erniedrigt.

4.2.3.5.3 D-Xylulose

Ein ähnliches Bild wie bei der L-Sorbose ist auch bei der kinetischen Messung von D-Xylulose zu beobachten, jedoch zeigt D-Xylulose keine Substratüberschussinhibition (Abbildung 4.40). Auch hier wurde zur Messung zusätzlich alk. Phosphatase eingesetzt.

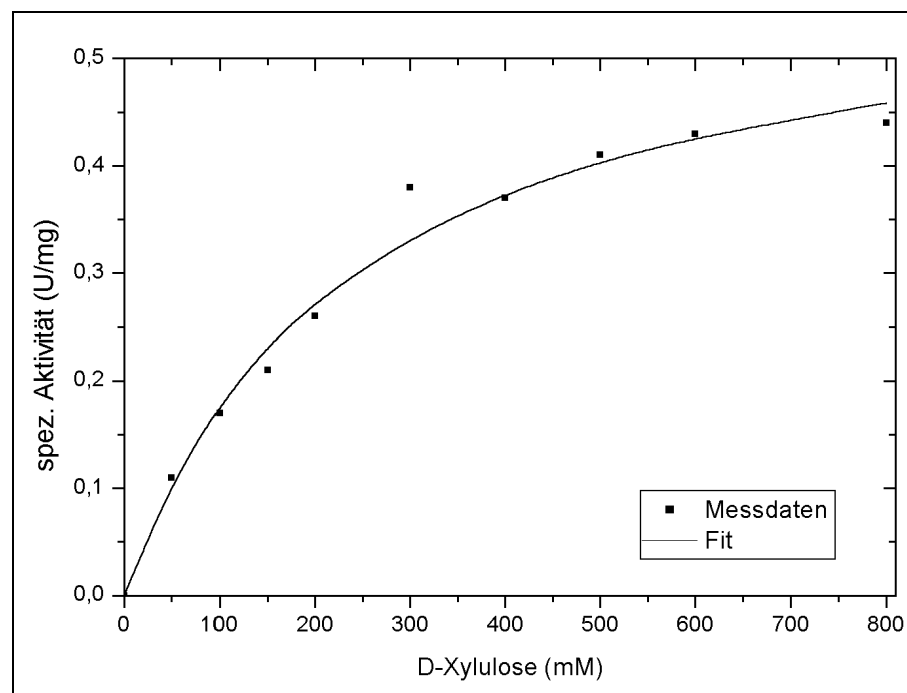


Abbildung 4.40 Kinetik von D-Xylulose: 0-800 mM D-Xylulose, 1 mM UDP- α -D-Glucose, 200 mU SuSy1 (Spaltaktivität), 1 U alk. Phosphatase in 200 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C.

Der Wegfall der Hydroxymethylgruppe verschlechtert Affinität des Substrates im Vergleich zu D-Fructose erheblich.

K_m	244,3	$\pm 37,8$ mM
V_{max}	0,61	$\pm 0,04$ U mg^{-1}
k_{cat}	4,0	s^{-1}
k_{cat}/K_m	0,02	$\text{s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$

Die hier erhaltenen Werte sind vergleichbar zur Kinetik von L-Sorbose. Der K_m -Wert ist etwa genauso hoch und die Reaktionsgeschwindigkeit ist für dieses Substrat ebenfalls stark abgesenkt.

4.2.3.5.4 D-Lyxose

Die kinetischen Messungen der Aldose D-Lyxose erfolgten wie bei den Ketosen in Anwesenheit von alk. Phosphatase. Für die Kinetik dieses Substrates findet man einen hyperbolischen Kurvenverlauf.

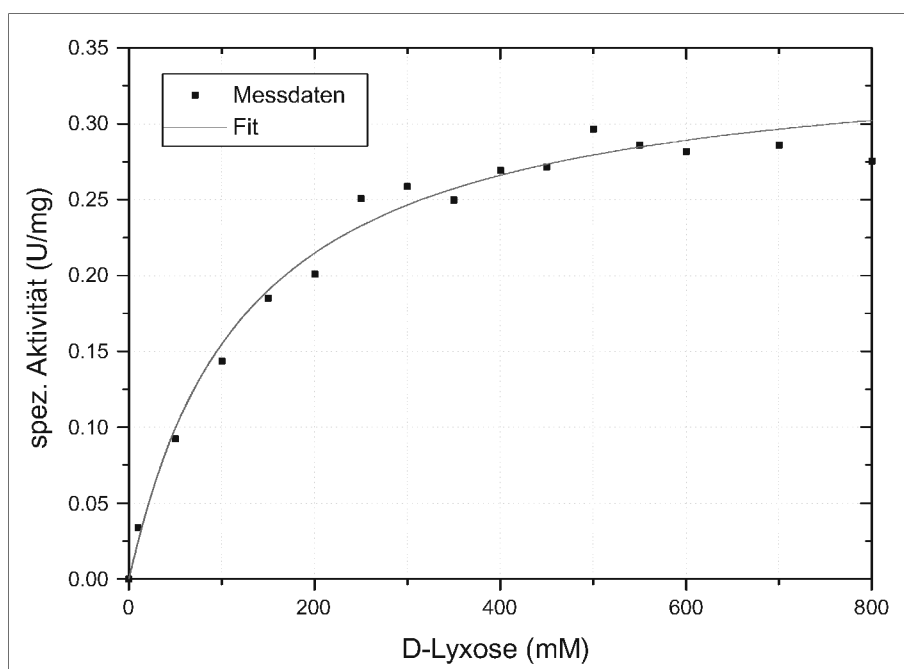


Abbildung 4.41 Kinetik von D-Lyxose: 0-800 mM D-Lyxose, 1 mM UDP- α -D-Glucose, 200 mU SuSy1 (Spaltaktivität), 1 U alk. Phosphatase in 200 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C.

D-Lyxose wird in der pyranoiden Form von SuSy1 erkannt und zeigt wie die zuvor getesteten Ketosen eine stark erhöhten K_m -Wert und eine sehr niedrige Reaktionsgeschwindigkeit.

K_m	125,7	$\pm 17,9$ mM
V_{max}	0,35	$\pm 0,01$ U mg ⁻¹
k_{cat}	2,3	s ⁻¹
k_{cat}/K_m	0,02	s ⁻¹ mM ⁻¹

Die Substrataffinität von SuSy gegenüber D-Lyxose im Vergleich zu L-Sorbose und D-Xylulose etwa doppelt so hoch. Die katalytische Effizienz ist vergleichbar niedrig.

4.2.3.5.5 L-Arabinose

Neben D-Lyxose wurde als weitere Aldose L-Arabinose getestet. In Abbildung 4.42 ist der Kurvenverlauf der kinetischen Messung, die in Anwesenheit von alk. Phosphatase bestimmt wurde, dargestellt.

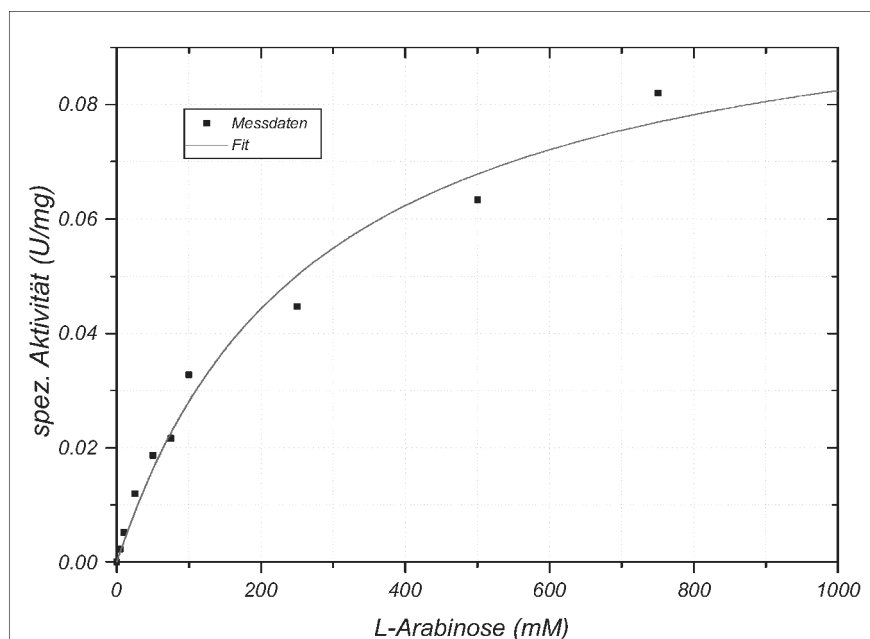


Abbildung 4.42 Kinetik von L-Arabinose: 0-100 mM L-Arabinose, 1 mM UDP- α -D-Glucose, 200 mU SuSy1 (Spaltaktivität), 1 U alk. Phosphatase in 200 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C.

Das Enzym besitzt gegenüber L-Arabinose eine zu den nicht-natürlichen Ketosen L-Sorbose und D-Xylulose, vergleichbare Substrataffinität, jedoch ist die Reaktionsgeschwindigkeit nochmals deutlich erniedrigt.

K_m	273,9	$\pm 52,9$ mM
V_{max}	0,11	$\pm 0,01$ U mg ⁻¹
k_{cat}	0,7	s ⁻¹
k_{cat}/K_m	0,003	s ⁻¹ mM ⁻¹

Die sich aus den Daten ergebende katalytische Effizienz im Vergleich zum natürlichen Substrat um den Faktor 10000 erniedrigt.

In Tabelle 4.21 sind noch einmal die Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen nichtnatürlicher Akzeptorsubstrate zusammengefasst.

Tabelle 4.21 Kinetische Daten nicht-natürlicher Akzeptorsubstrate

Substrat	K_m [mM]	K_{is} [mM]	V_{max} [U·mg ⁻¹]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_m [s ⁻¹ ·mM ⁻¹]
1-Desoxy-1-fluoro-β-D-fructose	6,3 ± 0,9	-	3,3 ± 0,1	21,7	3,5
L-Sorbose ¹	226,5 ± 78,5	521,2 ± 185	0,35 ± 0,08	2,3	0,01
D-Xylulose ¹	244,3 ± 37,8	-	0,61 ± 0,04	4,0	0,02
D-Lyxose ¹	125,7 ± 17,9	-	0,35 ± 0,01	2,3	0,02
L-Arabinose ¹	273,9 ± 52,9	-	0,11 ± 0,01	0,7	0,003

¹ Aktivitätsbestimmung in Anwesenheit von alkalischer Phosphatase.

Die hier ermittelten kinetischen Daten der Substrate 1-Desoxy-1-fluorofructose, L-Sorbose, D-Lyxose und L-Arabinose flossen in die angestrebte präparative Umsetzung dieser Substrate ein. Es konnten so auch für die Substrate mit sehr niedriger Substrataffinität und Reaktionsgeschwindigkeit effiziente Synthesestrategien entwickelt werden (vgl. Kapitel 4.3).

Die in den kinetischen Untersuchungen eingesetzten Ketosen und Aldosen besitzen mit Ausnahme von 1-Desoxy-1-fluoro-β-D-fructose eine stark herabgesetzte Substrataffinität. Die katalytische Effizienz ist im Vergleich zu D-Fructose um den Faktor 1000 bzw. 10000 für L-Arabinose erniedrigt. Auffällig ist der K_m -Wert der Pentose D-Lyxose, er ist verglichen zu den Ketosen L-Sorbose und D-Xylulose nur halb so groß. Eine Erklärung für die höhere Substrataffinität der Aldose kann anhand von Strukturvergleichen nicht gefunden werden. D-Lyxose wie auch L-Sorbose liegen in wässriger Lösung in der pyranoiden Form vor, beide weisen eine 3*S*,4*R*-Konfiguration der OH-Gruppen auf. L-Arabinose besitzt keine *R*-Konfiguration der Hydroxylgruppe an C-4, hierdurch ist vermutlich die schlechte katalytische Effizienz zu erklären.

4.2.3.6 Modellvorstellung für die Substraterkennung von Aldosen

Bei der Betrachtung der Aldosen muss man sich von dem zuvor aufgestellten Modell zur Substraterkennung von Ketosen lösen. Zwar können Aldosen neben der bevorzugten pyranoiden auch die furanoide Form einnehmen, jedoch konnte anhand des Substrates 5-Desoxy- β -D-fructose gezeigt werden, dass eigentlich die pyranoid Form erkannt wird. Für die Akzeptanz einer Aldose ist die 3*S*,4*R*-Konfiguration der Hydroxygruppen nicht ausschlaggebend. Ein Vergleich der akzeptierten mit den nicht akzeptierten Aldosen zeigt, dass die rekombinante SuSy1 entweder die D- oder die L-Konformation eines Monosaccharids erkennt. Eine Ausnahme bildet die Mannose. Hier konnte im Screening sowohl für die D- als auch für die L-Konfiguration die Bildung eines Disaccharids beobachtet werden. Bei der Akzeptanz des Monosaccharids ist dabei nicht entscheidend welche Konfiguration des anomeren C-Atoms der Aldose in wässriger Lösung am stabilsten ist. D-Glucose, D-Xylose und L-Allose müssen, obwohl die β -D-Pyranose in wässriger Lösung überwiegt, als α -Pyranose akzeptiert werden.

Zur Untersuchung der Substraterkennung von Aldose wurden die akzeptierten Aldosen in zwei Gruppen aufgeteilt. In der ersten Gruppe werden die Aldosen betrachtet, deren relative Aktivität bezogen auf das Donorsubstrat über 20 % lag (Abbildung 4.43). In der zweiten Gruppe in Abbildung 4.44 werden die Aldosen betrachtet deren relative Aktivität im Screening unter 20 % lag.

Bei den Aldosen der ersten Gruppe (Abbildung 4.43) wird deutlich, dass die Aldosen, die gute relative Aktivitäten zeigten (α -D-Lyxose, β -L-Arabinose, α -D-Idose), eine flexible Sesselkonformation besitzen. Bei diesen Zuckern ist weder die 1C_4 - noch die 4C_1 -Konformation thermodynamisch begünstigt. Jedoch ist diese Flexibilität kein Ausschlusskriterium für eine Akzeptanz einer Aldose, da auch die α -D-Talose und β -L-Allose aus dieser Gruppe mit guten relativen Aktivitäten umgesetzt werden können. Um zu entscheiden ob die Flexibilität der Konformation einen Einfluss auf die Affinität des Substrates zum Enzym hat, ist die kinetische Untersuchung der Substrate D-Talose und L-Allose von Interesse. In der zweiten Gruppe (Abbildung 4.44) besitzt lediglich das schlechteste Substrat die α -D-Ribose eine flexible 1C_4 -/ 4C_1 -Sesselkonformation, die anderen Substrate dieser Gruppe weisen eine starre Konformation auf. Aus diesem Ergebnis lässt sich ableiten, dass eine flexible 1C_4 -/ 4C_1 -Konformation die Akzeptanz eines nichtnatürlichen Akzeptorsubstrates begünstigt.

Vergleicht man die getesteten Aldosen mit der 1C_4 -Konformation der β -D-Fructopyranose so zeigen sich zunächst keine Übereinstimmungen mit dieser (siehe Abbildung 4.36 und Abbildung 4.37). Durch Rotation und Spiegelung der Moleküle werden isosterische OH-Gruppen der Aldosen offensichtlich, die mit den OH-Gruppen

der β -D-Fructopyranose in der 1C_4 -Sesselkonformation übereinstimmen (in Abbildung 4.43 und Abbildung 4.44 mit Kreisen markiert). Es wurden bei der Betrachtung der Zucker nur isosterische Konformationen berücksichtigt, in denen der Ringsauerstoff in der Ringebene liegt. Für die Substraterkennung sind somit isosterische OH-Gruppen entscheidend.

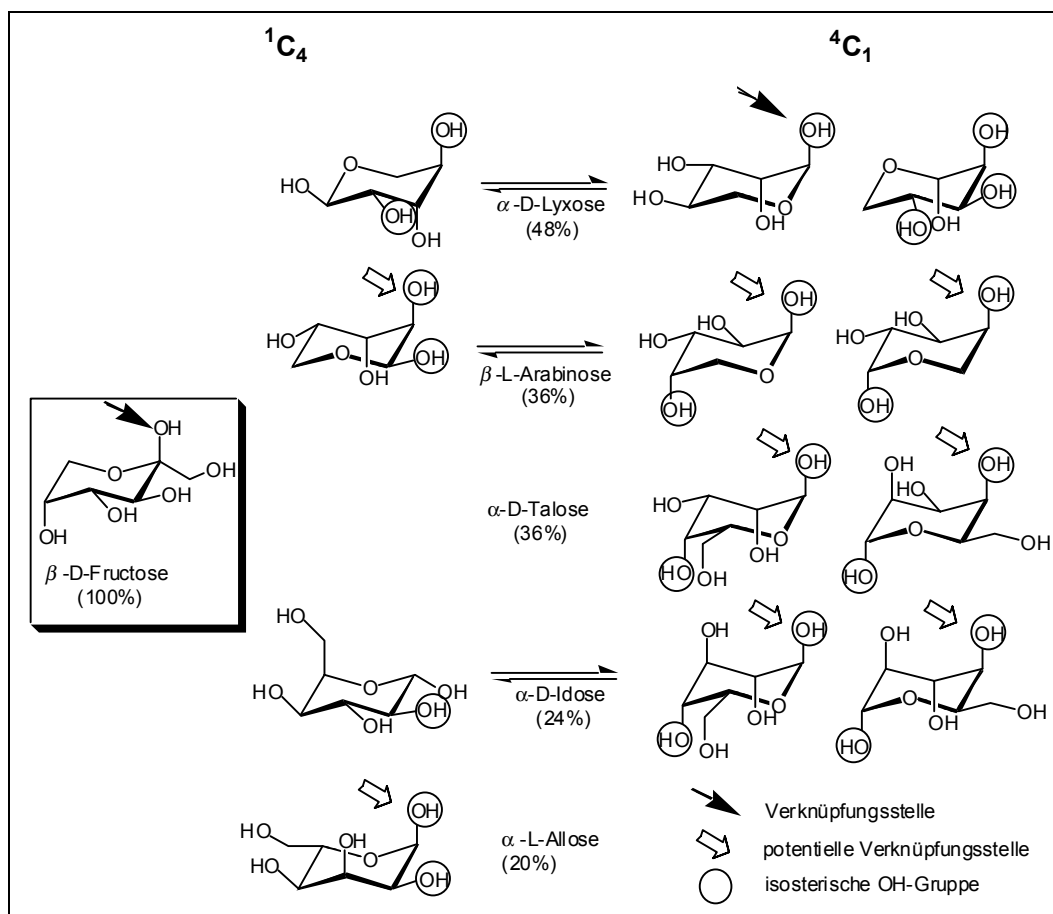


Abbildung 4.43 Modellvorstellung zur Substraterkennung von Aldosen Teil I.

Die Bindung der Fructose im Produkt Saccharose erfolgt über die Hydroxylgruppe an C-2. Für die α -D-Lyxose wurden durch Rotation und Spiegelung drei zu dieser Hydroxylgruppe der β -D-Fructopyranose isosterische OH-Gruppen identifiziert: (1) durch Rotation der 1C_4 -Sesselkonformation der α -D-Lyxose die OH-Gruppe am C-4, (2) durch horizontale Spiegelung der 4C_1 -Sesselkonformation die OH-Gruppe am C-1 und (3) durch Rotation der 4C_1 -Sesselkonformation die OH-Gruppe am C-2 (Abbildung 4.43). Potenziell stehen alle diese OH-Gruppen für eine Bindung im Produkt zu Verfügung (in Abbildung 4.43 mit breiten Pfeilen markiert). Jedoch ist für die D-Lyxose bekannt, dass sie im Produkt α 1- α 1 gebunden ist. Es wird also nur ein Produkt gebildet (Verknüpfungsstelle ist in Abbildung 4.43 mit einem schwarzen Pfeilen gekennzeichnet)

(Elling et al. 1993, Grothus 1994). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte für D-Lyxose ausschließlich das nichtreduzierende Disaccharid α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid synthetisiert werden (siehe Kapitel 4.3.3). Bei der Betrachtung der β -L-Arabinose ergeben sich ebenfalls drei potenzielle Verknüpfungsstellen, die Hydroxylgruppe an C-2 in der ${}^1\text{C}_4$ -Sesselkonformation und die Hydroxylgruppen an C-1 und C-4 in der ${}^4\text{C}_1$ -Konformation. Die präparative Umsetzung von L-Arabinose bestätigt diese Hypothese, es konnte die Bildung eines Produktgemischs nachgewiesen werden. Aufgrund des sehr komplexen NMR-Spektrums war die Identifizierung der Strukturen nicht möglich (siehe Kapitel 4.3.4).

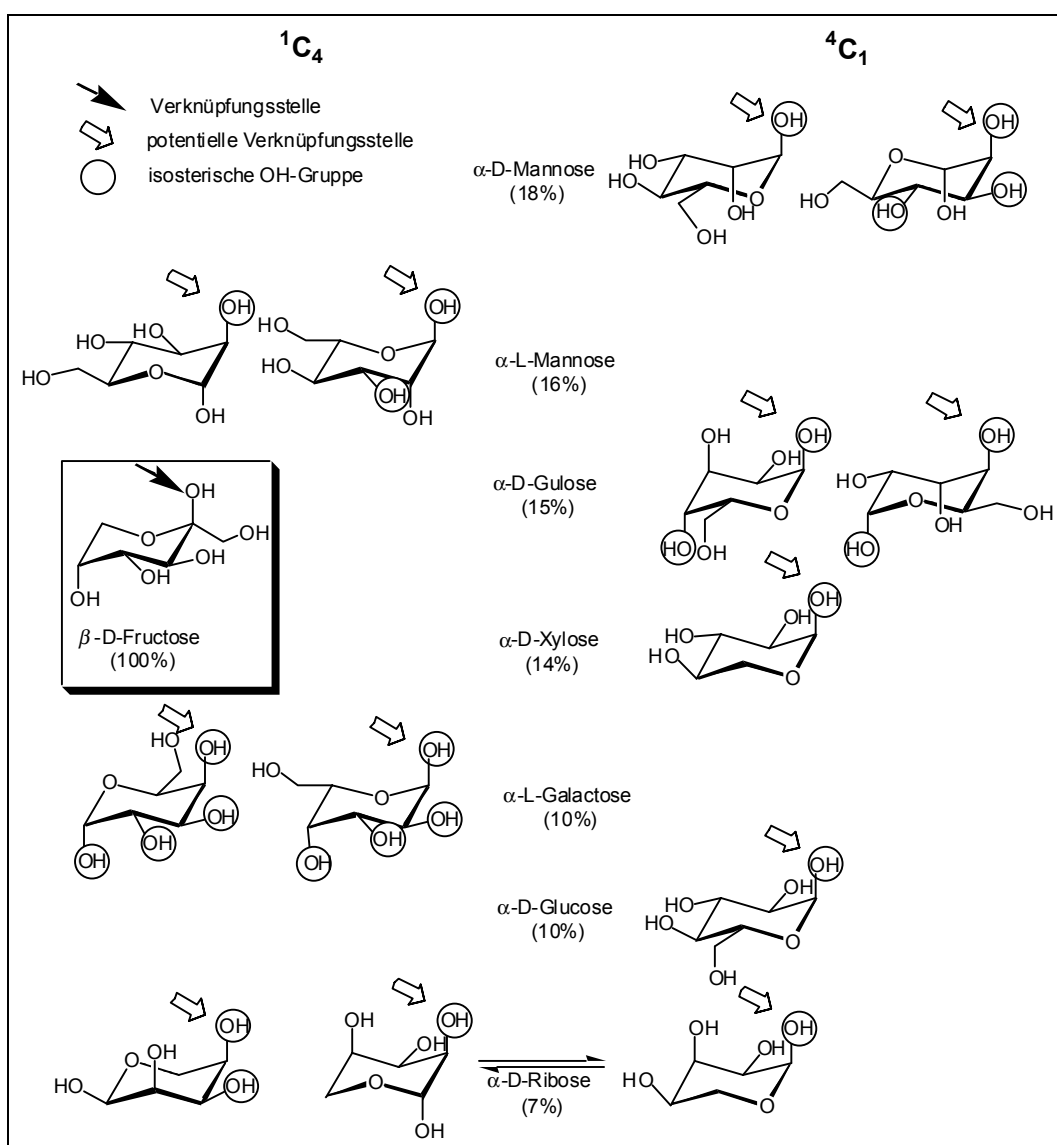


Abbildung 4.44 Modellvorstellung zur Substraterkennung von Aldosen Teil II.

Da bei der D-Lyxose im Gegensatz zur L-Arabinose nur eines von drei möglichen Produkten gebildet wird, liegt die Vermutung nah, dass neben der Existenz von

isosterischen Hydroxylgruppen auch die Lage des Ringsauerstoffs eine entscheidende Bedeutung bei der Produktbildung hat.

Eine Bestätigung des Modells ließe sich mit der Umsetzung weiterer ausgesuchter Aldosen, wie zum Beispiel der L-Allose, D-Xylose und D-Glucose erreichen, bei denen nach dem Modell nur ein Produkt gebildet würde. Für alle diese Produkte wird ein Produkt des Trehalose-Typs erwartet. Auch von Interesse ist die D-Mannose. Unter der Voraussetzung, dass die Lage des Ringsauerstoffs eine entscheidende Bedeutung bei der Produktbildung hat, sollte in Analogie zur D-Lyxose nur eine der beiden potenziellen Verknüpfungen entstehen. Bei den weiteren in Abbildung 4.43 und Abbildung 4.44 gezeigten Aldosen werden nach diesem Modell, in Analogie zur L-Arabinose, vermutlich mehrere Produkte gebildet.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals ein Modell für die Substraterkennung von Aldosen durch die rekombinanten SuSy1 entwickelt werden. Dieses Modell wurde durch präparative Umsetzungen untermauert. Es konnte gezeigt werden, dass eine flexible Seselkonformation der Substrate eine Akzeptanz dieser begünstigt. Für die Substraterkennung einer Aldose sind, im Vergleich zur β -D-Fructopyranose, isosterische Hydroxylgruppen entscheidend, wobei Produktbildung zusätzlich durch die Lage des Ringsauerstoffs beeinflusst wird. Neben der Untermauerung dieser Theorie durch die Synthese weiterer Saccharose-Analoga und deren spektroskopischer Untersuchung, ist in diesem Zusammenhang auch die Enzymkristallisation von Interesse. Die Kristallstruktur des Enzyms, insbesondere die potenzielle Bindungstasche, könnte weiterführende Erkenntnisse zum Mechanismus der Substraterkennung von Aldosen bringen.

4.2.4 Donorsubstratspektrum der Saccharose Synthase 1

Neben den Akzeptorsubstratscreening wurden verschiedene UDP- und dTDP-aktivierte Donorsubstrate getestet. Das Screening erfolgte nach dem allgemeinen Schema in Abbildung 4.45. Anhand der Bildung von Disaccharid und UDP wurden die Reaktionen mittels HPLC verfolgt.

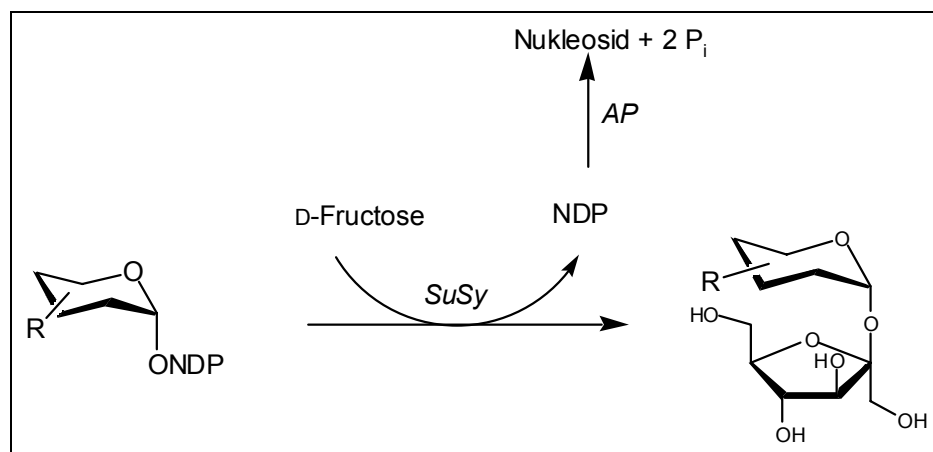


Abbildung 4.45 Allgemeines Schema zum Donorsubstratscreening.

Die im Rahmen dieser Arbeit getesteten Donorsubstrate sind in Abbildung 4.48 zusammengefasst.

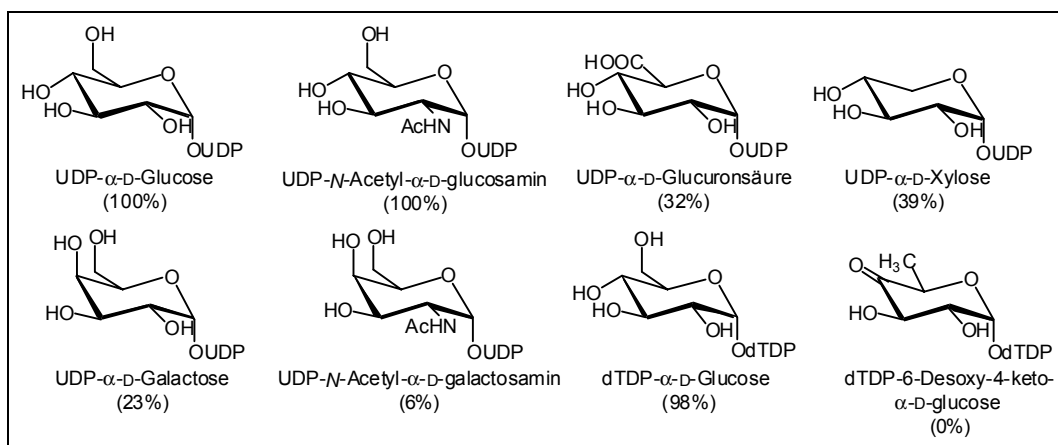


Abbildung 4.46 Ergebnis des Screenings UDP- und dTDP-aktivierter Donorsubstrate (rel. Aktivitäten bezogen auf 100 % Umsatz von UDP-α-D-Glucose).

Rekombinante Saccharose Synthase 1 aus Kartoffel weist ein breites Substratspektrum für die verschiedenen UDP-aktivierten Nukleotidzucker auf. UDP-GlcNAc wird sogar mit einer rel. Aktivität von 100% akzeptiert. Auch UDP-GlcA kann mit recht guten rel. Aktivitäten umgesetzt werden.

Mit Saccharose Synthase aus Reis konnte neben UDP-Glc nur die Akzeptanz von UDP-GlcNAc und UDP-Xyl beobachtet werden. Keine Reaktion zeigten hier UDP-Gal, UDP-GalNAc, UDP-GlcA und UDP-Man (Elling et al. 1993). Cardini und Recondo (Cardini und Recondo 1962) beobachtete für SuSy aus Weizenkeimlingen die Akzeptanz von UDP-α-D-Galactose und UDP-α-D-Xylose.

Neben den UDP-aktivierten Zuckern wurden auch dTDP- α -D-Glucose und dTDP-6-Desoxy-4-keto- α -D-glucose, die nach der Methode von Günther synthetisiert wurde (Günther 2000), getestet. Die Akzeptanz von dTDP-Glc wurde bereits für verschiedene SuSys aus pflanzlichem Material gezeigt (Avigad 1982). Aus Abbildung 4.47 wird deutlich, dass für rekombinante SuSy1 in Syntheserichtung die Enzymaktivität bei Einsatz von dTDP-Glc, anstelle von UDP-Glc, als Donor geringer ist. Während nach 6 h der Umsatz von UDP-Glc mit D-Fructose als Akzeptor vollständig ist, so konnten in der gleichen Zeit nur etwa 50% der dTDP-Glc umgesetzt werden.

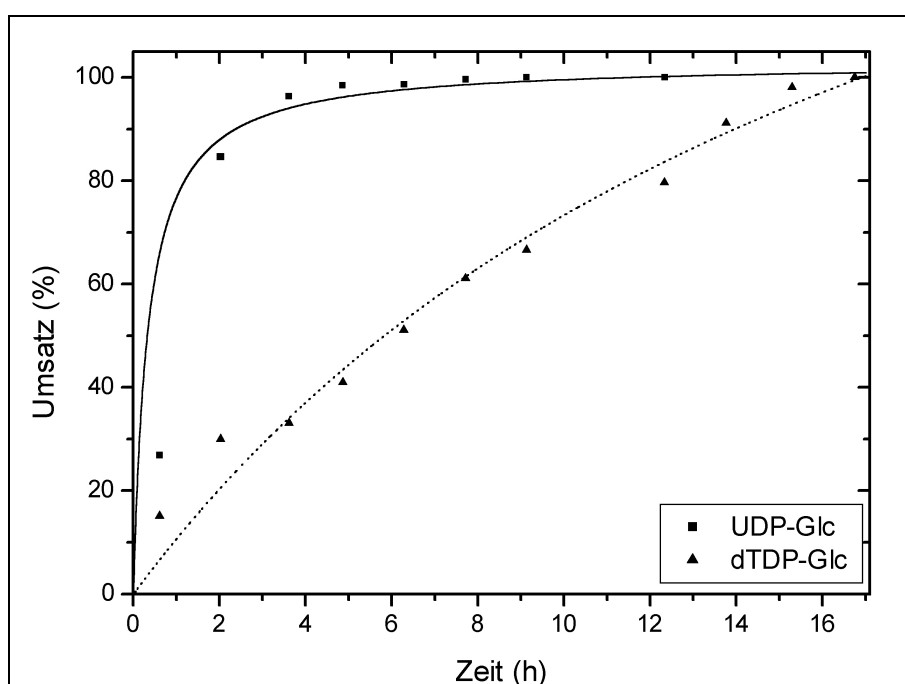


Abbildung 4.47 Zeit-Umsatz-Kurven mit 2 mM D-Fructose, 1 mM dTDP-Glc / UDP-Glc, 1 U/ml SuSy, 1 U/ml alkalische Phosphatase in Tris-HCl 100 mM, pH 8,0.

dTDP-6-Desoxy-4-keto- α -D-glucose ist kein Donorsubstrat der rekombinanten SuSy1. Ursache hierfür ist vermutlich die Ketogruppe am C-4 und die Desoxyfunktion am C-6. Der Einfluss der OH-Gruppe am C-6 wird auch durch die niedrigeren rel. Aktivitäten von UDP-GlcA und UDP-Xyl deutlich.

4.2.4.1 Kinetik ausgewählter Donorsubstrate

Die kinetischen Messungen erfolgten mit D-Fructose als Akzeptor unter zusätzlichem Einsatz von alkalischer Phosphatase. Die Berechnung der kinetischen Konstanten erfolgte nach dem Modell der Einsubstratkinetik nach Gleichung 3.10.

4.2.4.1.1 Kinetik von UDP-*N*-Acetyl- α -D-glucosamin

Für die kinetischen Untersuchungen wurde das Substrat UDP-*N*-Acetyl- α -D-glucosamin gewählt, das im Donorsubstratscreening die höchste relative Aktivität, verglichen mit UDP-Glc, hat. Der Verlauf der Kinetik von UDP-GlcNAc ist in Abbildung 4.48 wiedergegeben. Im Vergleich zum natürlichen Substrat UDP-Glc inhibiert ein Überschuss an UDP-GlcNAc die Synthesereaktion nicht.

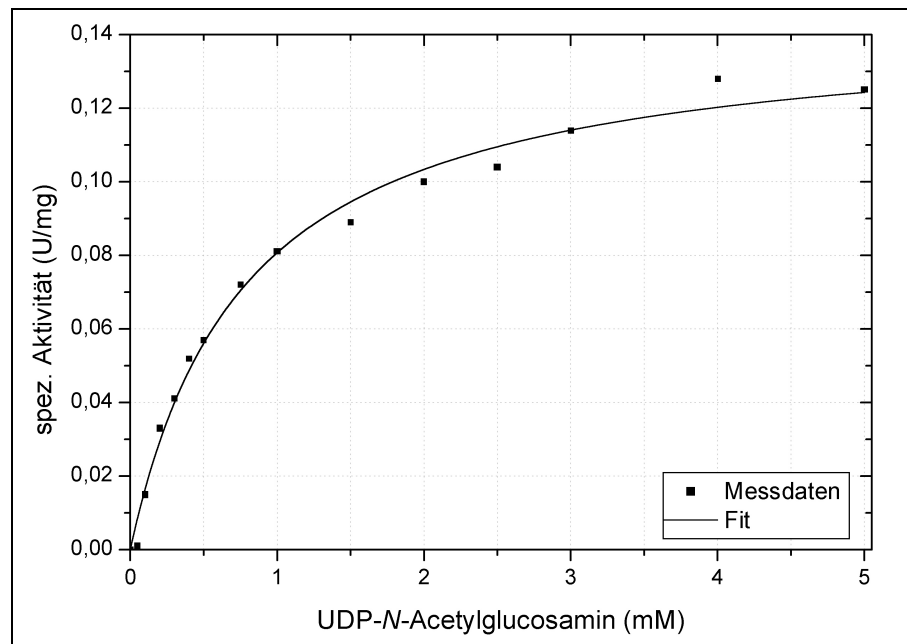


Abbildung 4.48 Kinetik von UDP-*N*-Acetyl- α -D-glucosamin: 0-5 mM UDP-GlcNAc, 10 mM D-Fructose, 100 mU SuSy1 (Spaltaktivität), 1 U alk. Phosphatase in 200 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C.

SuSy1 besitzt gegenüber UDP-GlcNAc eine zu UDP-Glc vergleichbare Affinität, jedoch ist die Reaktionsgeschwindigkeit um das 200-fache niedriger.

$$K_m \quad 0,76 \quad \pm 0,06 \text{ mM}$$

$$V_{\max} \quad 0,14 \quad \pm 0,003 \text{ U mg}^{-1}$$

$$k_{\text{cat}} \quad 0,9 \quad \text{s}^{-1}$$

$$k_{\text{cat}}/K_m \quad 1,23 \quad \text{s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$$

Die niedrige Reaktionsgeschwindigkeit wirkt sich stark auf die katalytische Effizienz aus. Sie ist im Vergleich zu natürlichen Substrat um das 250-fache erniedrigt.

Auch diese Ergebnisse der Kinetik wurden zur Entwicklung einer effizienten Synthese genutzt (siehe Kapitel 4.1).

4.2.4.2 Kinetik von UDP- α -D-Galactose

Als weiteres Donorsubstrat wurde UDP- α -D-Galactose kinetisch untersucht. Der Verlauf der Kinetik von UDP-Gal ist in Abbildung 4.49 wiedergegeben. Im Vergleich zum natürlichen Substrat UDP-Glc inhibiert ein Überschuss an UDP-Gal die Synthesereaktion nicht.

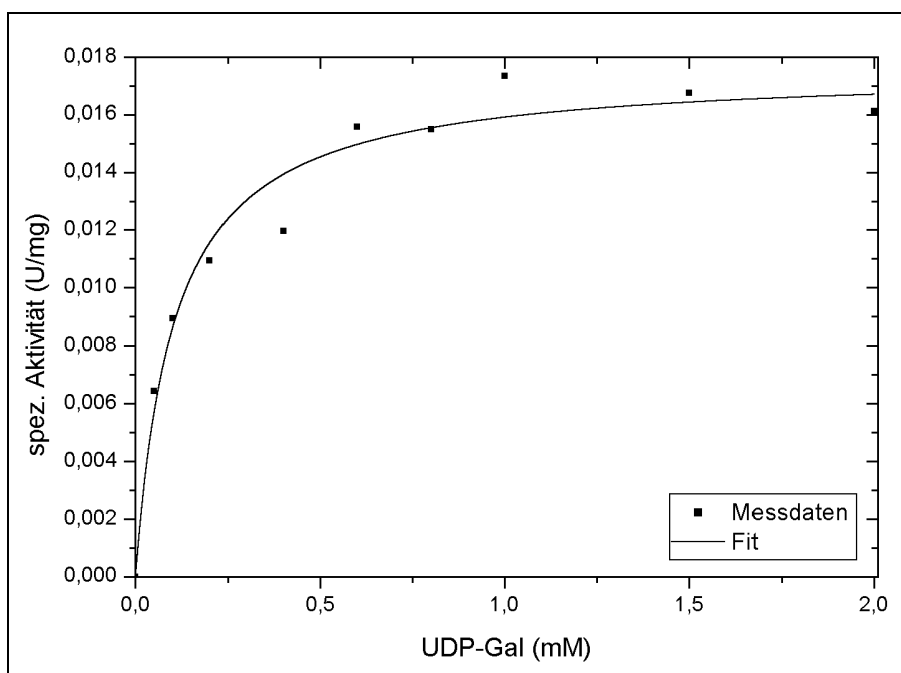


Abbildung 4.49 Kinetik von UDP- α -D-Galactose: 0-2 mM UDP-Gal, 10 mM D-Fructose, 100 mU SuSy1 (Spaltaktivität), 1 U alk. Phosphatase in 200 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C

Im Vergleich zu UDP-Glc besitzt SuSy1 zu UDP-Gal einen um das 5-fache erhöhte Affinität, trotz der Konfigurationsänderung am C-4 Atom. Jedoch ist die Reaktionsgeschwindigkeit um das 1000-fache niedriger.

$$K_m \quad 0,11 \quad \pm 0,02 \text{ mM}$$

$$V_{\max} \quad 0,02 \quad \pm 6,5 \cdot 10^{-4} \text{ U mg}^{-1}$$

$$k_{\text{cat}} \quad 0,001 \quad \text{s}^{-1}$$

$$k_{\text{cat}}/K_m \quad 0,01 \quad \text{s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$$

Die niedrige Reaktionsgeschwindigkeit wirkt sich stark auf die katalytische Effizienz aus. Sie ist im Vergleich zu natürlichen Substrat um das 30000-fache erniedrigt.

4.2.5 Inhibitoren der Saccharose Synthase 1

Es wurden verschiedene Substanzen auf ihre inhibitorische Wirkung bezüglich der Synthesereaktion von SuSy untersucht. Dazu führte man die enzymatische Reaktion in Anwesenheit der verschiedenen Inhibitoren durch. Anschließend wurden die Reaktionsansätze in einem Mikrotiterplattentest untersucht, der sowohl die Bestimmung der gebildeten Saccharose als auch die Bestimmung der durch Hydrolyse des Donors UDP-Glc entstehenden Glucose erlaubt.

Die Inhibition von Phenyl- β -D-glucosid, *p*-Arbutin und D-(-)-Salicin wurde bereits als Inhibitoren in der Synthesereaktion in Literatur beschrieben (Slabnik et al. 1968, Nakai et al. 1998).

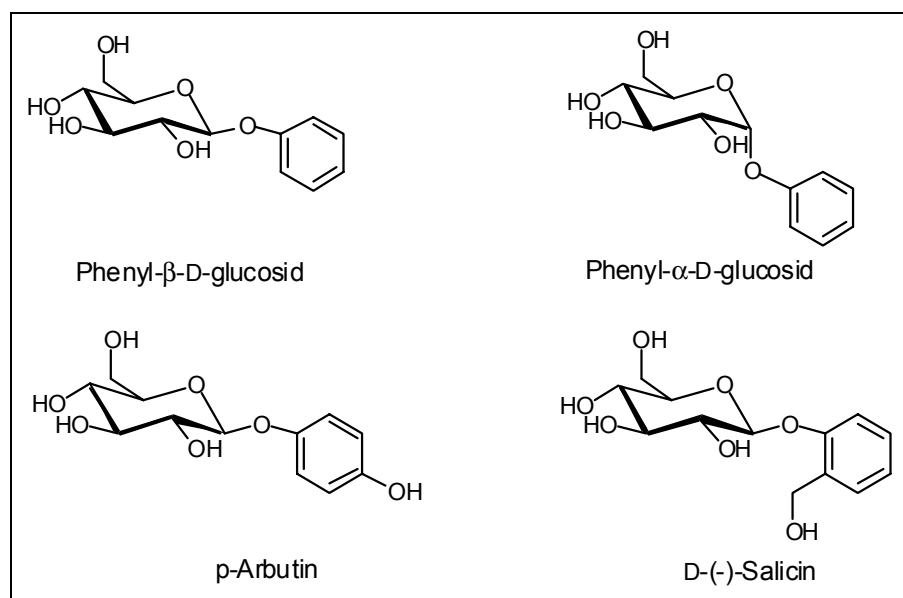


Abbildung 4.50 In Inhibitionsstudien gegenüber der Synthesereaktion von SuSy1 untersuchte Phenylglucoside.

Phenyl- β -D-glucosid

Die kinetischen Untersuchungen von Phenyl- β -D-glucosid zeigen, dass in Syntheserichtung die Substanz ein Inhibitor der rekombinante SuSy1 ist. In ersten Untersuchungen wurde bei konstanten Substratkonzentrationen die Konzentration des Inhibitors variiert. Hierbei wurde offensichtlich, dass Phenyl- β -D-glucosid ein starker Inhibitor ist. Bei Zugabe von 1 mM des Inhibitors wird die anfängliche spezifische Aktivität etwa auf die Hälfte reduziert (Abbildung 4.51). Die Freisetzung von Glucose und somit die Hydrolyse des Donors oder des Inhibitors konnte nicht beobachtet.

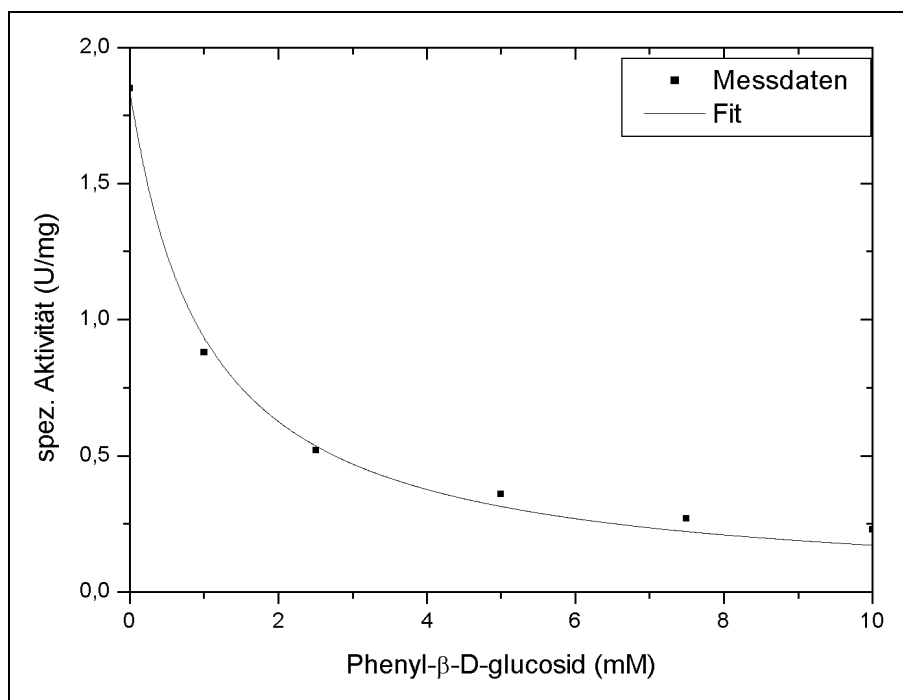


Abbildung 4.51 Inhibition der Synthesereaktion der Saccharose Synthase durch Phenyl- β -D-glucosid. 0-10 mM Phenyl- β -D-glucosid, 0,5 mM UDP-Glc, 2 mM D-Fructose, 10 mM SuSy1 in 200 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C.

Um die Art Inhibition besser beurteilen zu können, wurden zusätzliche Untersuchungen durchgeführt, in denen neben der Inhibitor-Konzentration auch die Konzentration von UDP-Glc bzw. D-Fructose variiert wurden (Abbildung 4.52 und Abbildung 4.53).

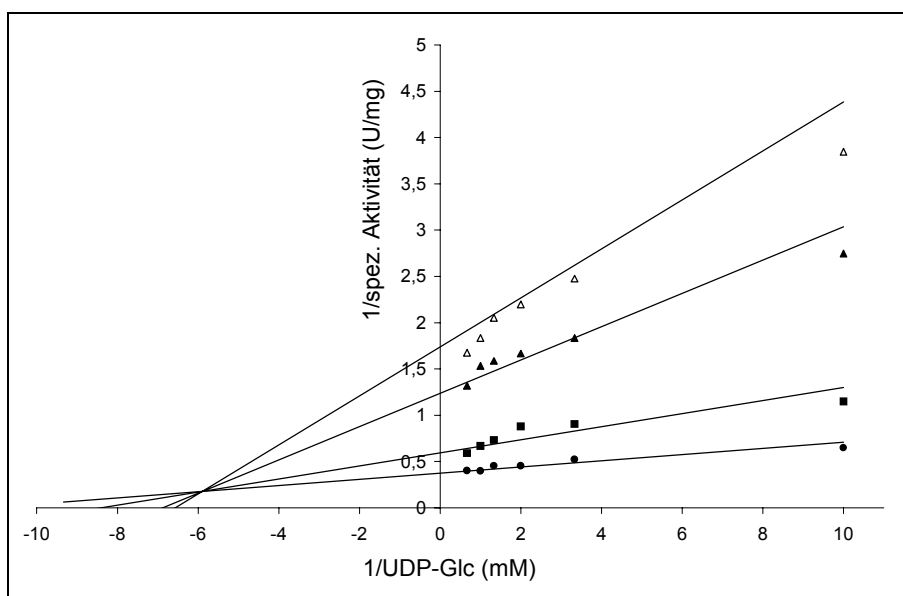


Abbildung 4.52 Inhibition der Synthesereaktion der Saccharose Synthase durch Phenyl- β -D-glucosid in der Lineweaver-Burk-Darstellung. 0 (●), 1 (■), 5 (▲) und 10 (△) mM Phenyl- β -D-glucosid, 0- 1,5 mM UDP-Glc, 10 mM D-Fructose, 10 mM SuSy1 in 200 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C.

Es wird deutlich, dass keiner der drei „Grundinhibitionstypen“ vorliegt. Die Anpassung an ein Einsubstratinhibitionsmodell ergibt näherungsweise eine partiell gemischte Inhibition sowohl bei Variation des Donor- wie auch des Akzeptorsubstrats. In einem sequenziellen Orderd-Bi-Bi-Mechanismus liegt eine klassische kompetitive Inhibition bezüglich des Substrates A (hier UDP-Glc) vor, wenn bei konstantem Substrat B (hier Fructose) in der reziproken Auftragung der y-Achsenabschnitt und damit die maximale Reaktionsgeschwindigkeit unverändert bleibt. Variiert man das Substrat B, so ändern sich in der reziproken Auftragung sowohl die Steigung der Gerade und damit der K_m -Wert als auch der y-Achsenabschnitt. Generell weist in der Lineweaver-Burk-Auftragung eine Änderung des y-Achsenabschnitts darauf hin, dass der Inhibitor und das Substrat an unterschiedliche Enzymformen binden. Die Steigung der Geraden ändert sich, wenn der Inhibitor und das Substrat mit der gleichen Bindungsstelle konkurrieren (Segel 1975).

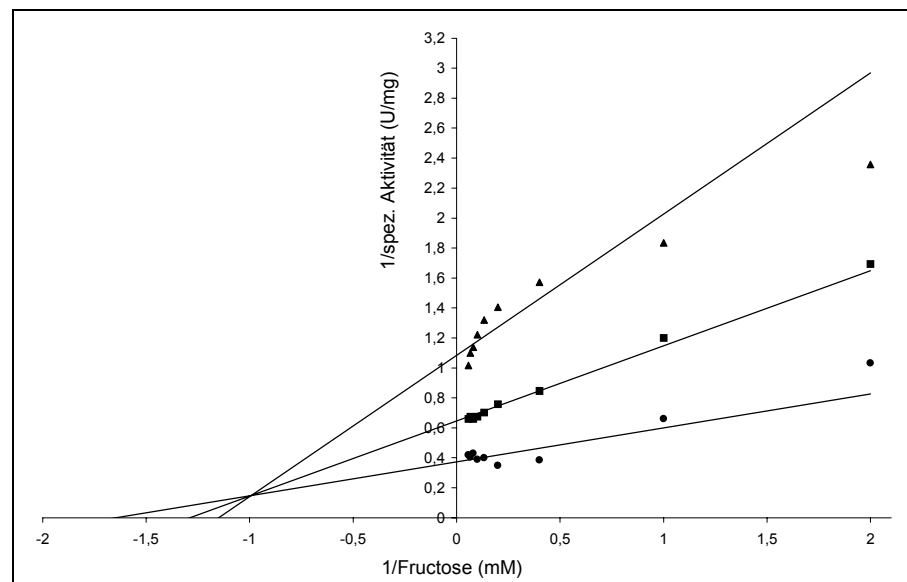


Abbildung 4.53 Inhibition der Synthesereaktion der Saccharose Synthase durch Phenyl- β -D-glucosid in der Lineweaver-Burk-Darstellung. 0 (●), 1 (■) und 5 (▲) mM Phenyl- β -D-glucosid, 0-17,5 mM D-Fructose, 2 mM UDP-Glc, 10 mU SuSy1 in 200 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C.

Zur Vereinfachung der Berechnung der Inhibitionskonstante wurde näherungsweise davon ausgegangen, dass sowohl bezüglich des Donors wie auch des Akzeptors eine kompetitive Inhibition vorliegt. Die Auswertung der kinetischen Messdaten erfolgte nach Gleichung 3.24 und Gleichung 3.25 (siehe Kapitel 3.3.3.2). Diese Annahme wurde auch für die folgenden Inhibitoren *p*-Arbutin und D(-)-Salicin gemacht.

Für die Inhibition gegenüber UDP- α -D-Glucose wurde ein K_i -Wert von $0,99 \pm 0,15$ mM ermittelt. Dieser Wert liegt im Bereich der K_m -Wertes des natürlichen Substrates (0,6

mM). Slabnik et al. (Slabnik et al. 1968) ermittelte für Phenyl- β -D-glucosid einen K_i -Wert von 0,0092 mM gegenüber UDP- α -D-Glucose. Jedoch wurde dieser Wert lediglich bei einer konstanten Inhibitorkonzentration von 6 mM gemessen.

Für die Inhibition gegenüber D-Fructose errechnet sich ein K_i -Wert von $0,20 \pm 0,03$ mM. Dieser Wert ist um den Faktor 10 kleiner als der zuvor bestimmte K_m -Wert von 2,1 mM für D-Fructose.

Phenyl- α -D-glucosid

Im Gegensatz zu Phenyl- β -D-glucosid ist Phenyl- α -D-glucosid kein Inhibitor der Saccharosesynthesereaktion (Abbildung 4.54).

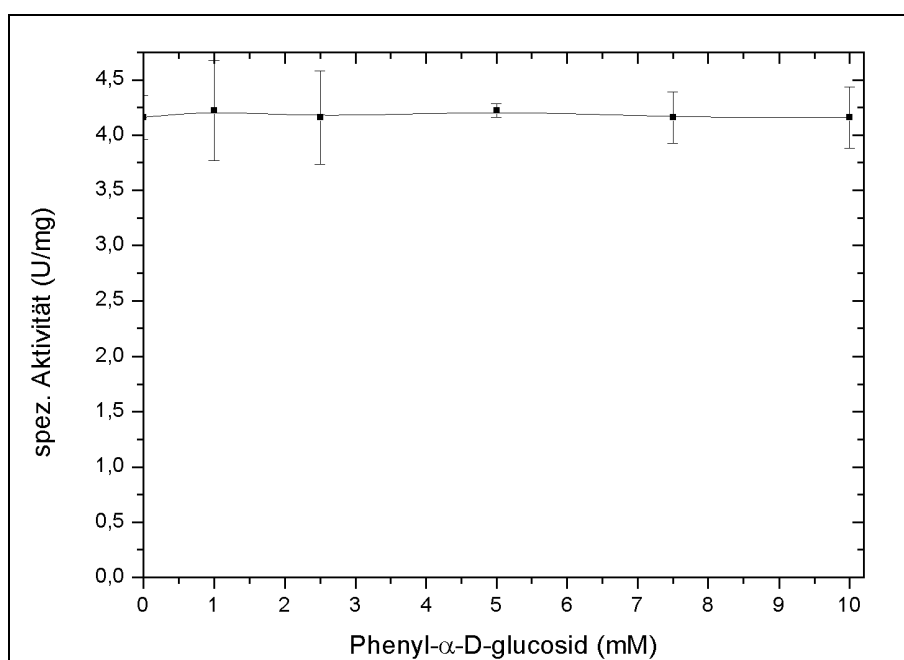


Abbildung 4.54 Einfluss von Phenyl- α -D-glucosid auf die Synthesereaktion der Saccharose Synthase. 0-10 mM Inhibitor, 0,5 mM UDP-Glucose, 2 mM D-Fructose, 10 mM SuSy1 in 200 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C.

Die spezifische Aktivität bleibt bei Zugabe von Phenyl- α -D-glucosid unverändert. Der Fehler der Messung liegt unter 10 %.

p-Arbutin

Auch *p*-Arbutin inhibiert die Synthesereaktion der Saccharose Synthase, jedoch ist die inhibitorische Wirkung im Vergleich zu Phenyl- β -D-glucosid abgeschwächt (Abbildung 4.55). Die Bildung von Glucose konnte nicht beobachtet werden.

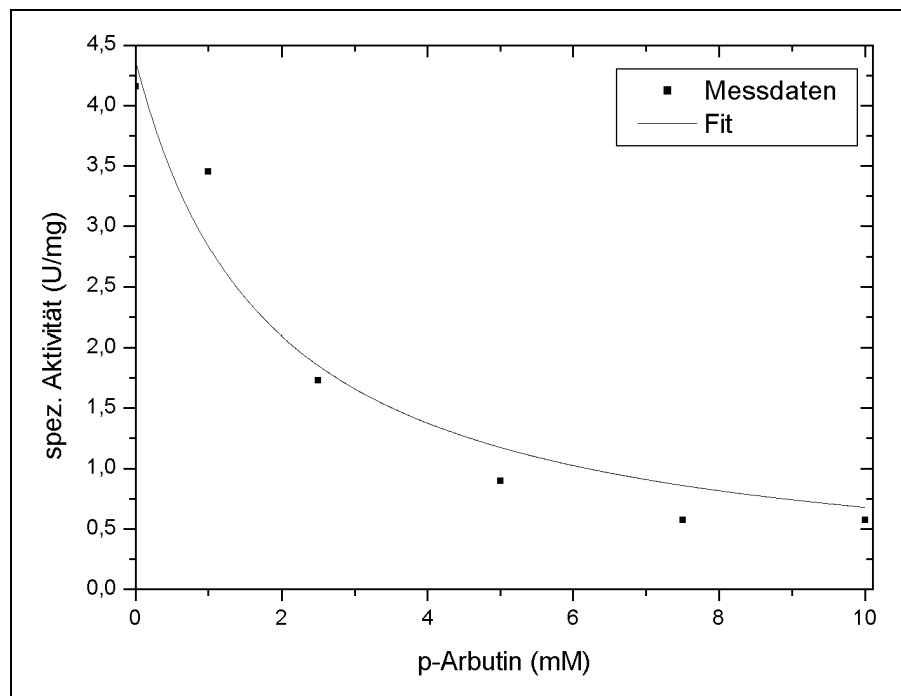


Abbildung 4.55 Inhibition der Synthesereaktion der Saccharose Synthase durch *p*-Arbutin. 0-10 mM *p*-Arbutin, 0,5 mM UDP-Glc, 2 mM D-Fructose, 10 mM SuSy1 in 200 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C.

Auch hier wurde die Inhibition genauer betrachtet und es wurde sowohl bei der Variation des Akzeptors wie auch des Donors eine Abnahme der spezifischen Aktivität bei zunehmender Inhibitorkonzentration beobachtet (siehe Abbildung 4.56 und Abbildung 4.57).

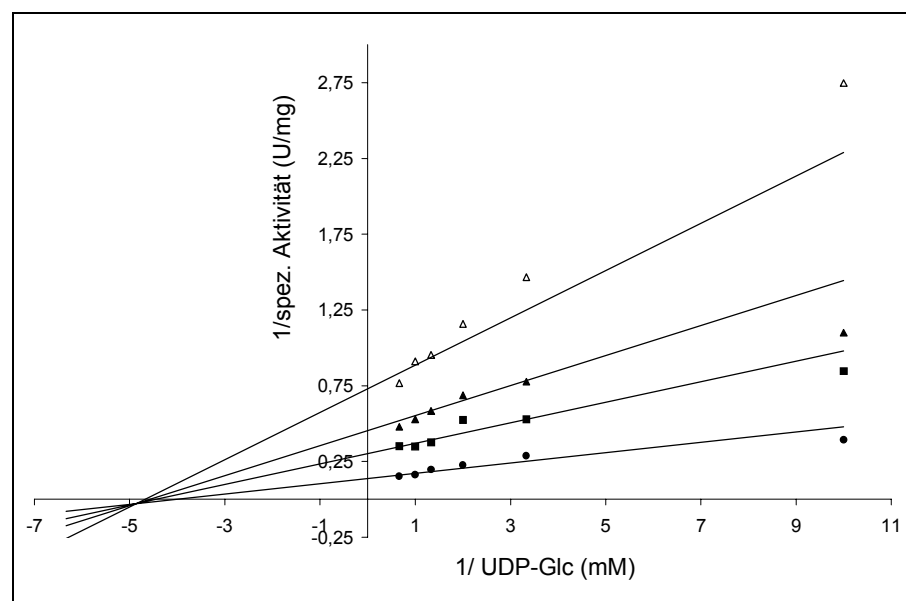


Abbildung 4.56 Inhibition der Synthesereaktion der Saccharose Synthase durch *p*-Arbutin in der Lineweaver-Burk-Darstellung. 0 (●), 2,5 (■), 5 (▲) und 10 (△) mM *p*-Arbutin, 0-1,5 mM UDP-Glc, 10 mM D-Fructose, 10 mU SuSy1 in 200 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C.

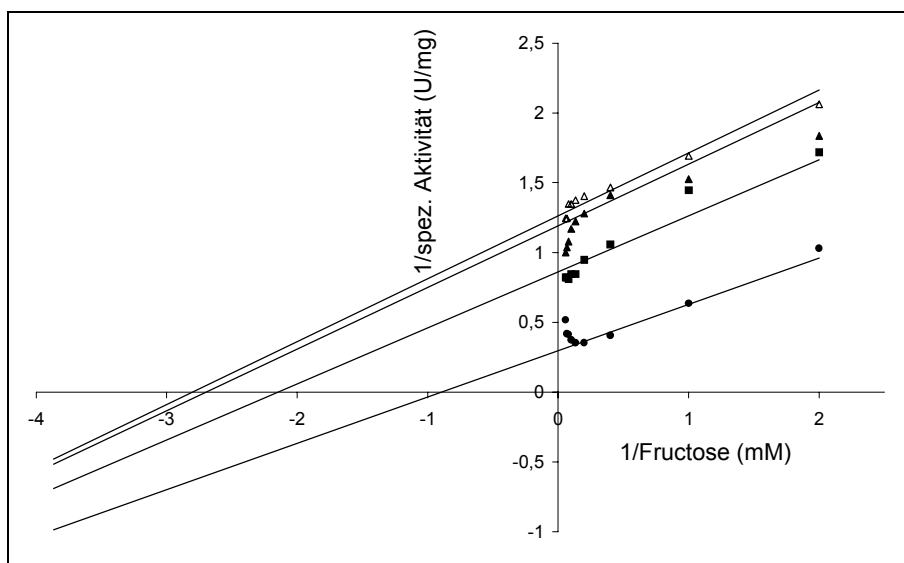


Abbildung 4.57 Inhibition der Synthesereaktion der Saccharose Synthase durch *p*-Arbutin in der Lineweaver-Burk-Darstellung. 0 (●), 1 (■), 5 (▲) und 10 (△) mM *p*-Arbutin, 0-17,5 mM D-Fructose, 2 mM UDP-Glc, 10 mU SuSy1 in 200 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C.

Die Anpassung an ein Einsubstratinhibitionsmodell ergibt für *p*-Arbutin näherungsweise eine partiell gemischte Inhibition, sowohl bei Variation des Donor- wie auch des Akzeptorsubstrat. Anhand der Messdaten wurden die Inhibitionskonstanten unter Annahme einer kompetitiven Inhibition berechnet. Für die Inhibition gegenüber UDP- α -D-Glucose wurde ein K_i -Werte von $1,36 \pm 0,17$ mM, gegenüber D-Fructose von $0,31 \pm 0,07$ berechnet. In der Literatur wird ein K_i -Wert von 0,16 mM bezüglich UDP-Glc angegeben (Slabnik et al. 1968).

D-(-)-Salicin

D(-)-Salicin ist der schwächste Inhibitor verglichen mit den andere β -Phenylglukosiden. Es handelt sich hierbei auch nicht um einen „dead-end“ Inhibitor Die spezifische Aktivität wird bei einer Zugabe von 10 mM D(-)-Salicin nur um ca. 40 % erniedrigt. Durch Zugabe von D(-)-Salicin kann die Synthesereaktion der Saccharose Synthase 1 nicht vollständig inhibiert werden (Abbildung 4.58). Die Bildung von Glucose wurde nicht beobachtet.

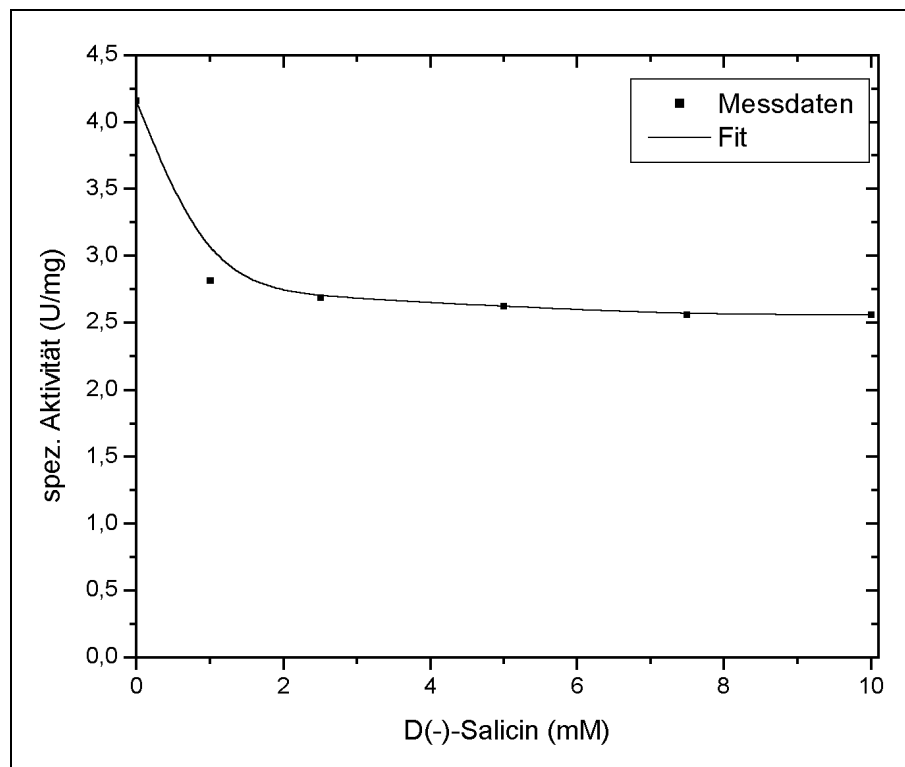


Abbildung 4.58 Inhibition der Synthesereaktion der Saccharose Synthase durch D(-)-Salicin. 0-10 mM D(-)-Salicin, 0,5 mM UDP-Glc, 2 mM D-Fructose, 10 mM SuSy1 in 200 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C.

Die genauere Betrachtung der Einzelreaktionen lassen, nach der Anpassung über Ein-substratinhibitionsmodelle, auf einen partiell unkompetitiven Inhibitor schließen.

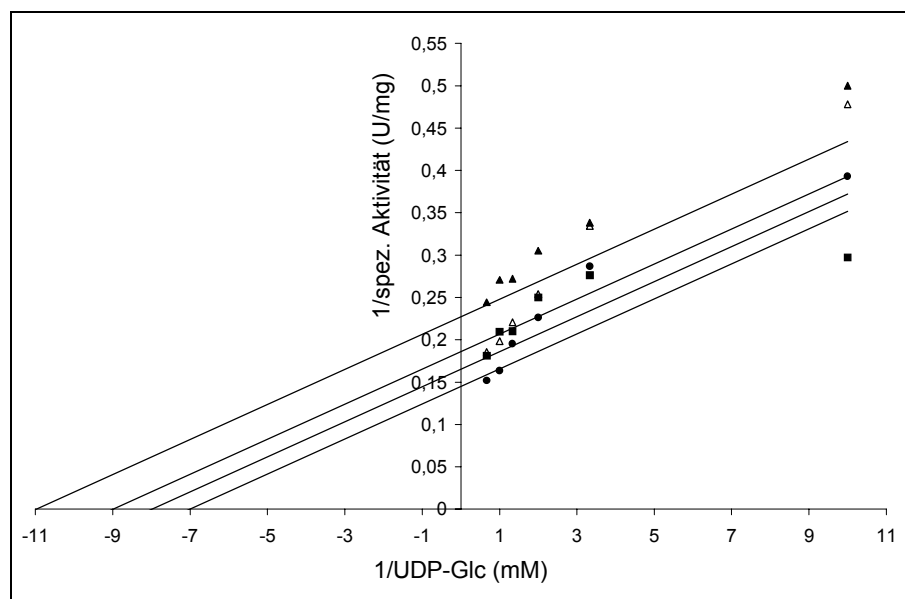


Abbildung 4.59 Inhibition der Synthesereaktion der Saccharose Synthase durch D(-)-Salicin in der Lineweaver-Burk-Darstellung. 0 (●), 2,5 (■), 5 (△) und 10 (▲) mM D(-)-Salicin, 0-1,5 mM UDP-Glc, 10 mM D-Fructose, 10 mU SuSy1 in 200 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C.

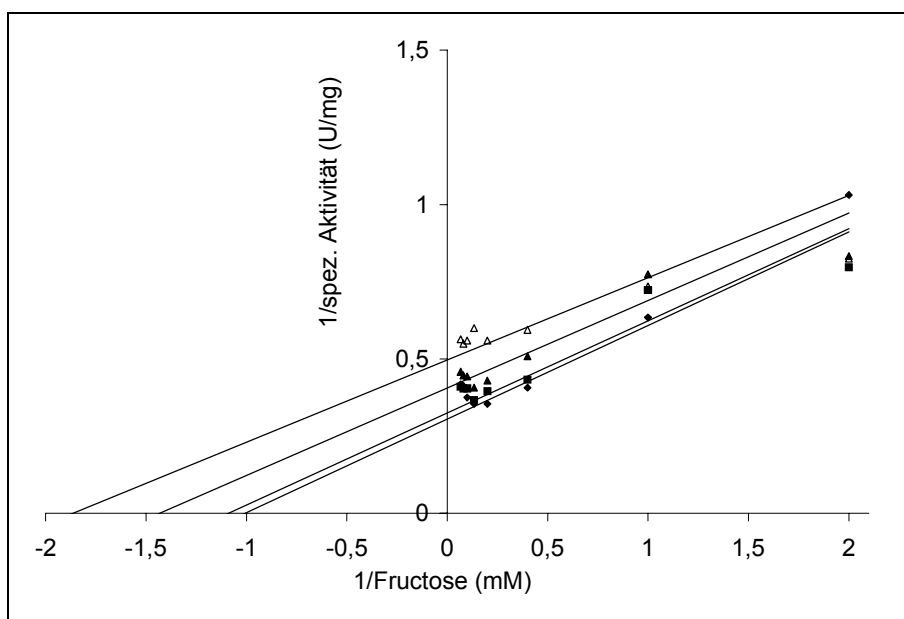


Abbildung 4.60 Inhibition der Synthesereaktion der Saccharose Synthase durch D(-)-Salicin in der Lineweaver-Burk-Darstellung. 0 (●), 1 (■), 5 (▲) und 10 (△) mM D(-)-Salicin, 0-1,5 mM UDP-Glc, 10 mM D-Fructose, 10 mU SuSy1 in 200 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C.

Die Anpassung nach dem Modell einer kompetitiven Inhibition im sequenziellen Ordered-Bi-Bi-Mechanismus ergab für D(-)-Salicin einen K_i -Wert von $26,15 \pm 7,95$ mM gegenüber UDP- α -D-Glucose und einen K_i -Wert von $8,70 \pm 6,21$ mM gegenüber D-Fructose. Allein die sehr großen Fehler bei der Berechnung der Inhibitionskonstanten von über 30 % deuten auf ein anderes Inhibitionsmodell hin. In der Literatur (Slabnik et al. 1968) wird ein Wert von 2,5 mM gegenüber UDP-Glc angegeben.

In Tabelle 4.22 sind die Inhibitionskonstanten der Substanzen Phenyl- β -D-glucosid, *p*-Arbutin und D(-)-Salicin zusammengefasst.

Tabelle 4.22 Inhibition der Synthesereaktion durch Phenylglukoside

Inhibition gegenüber	Phenyl- β -D-glucosid K_i [mM]	<i>p</i> -Arbutin K_i [mM]	D(-)-Salicin K_i [mM]
UDP-Glc	$0,99 \pm 0,16$	$1,39 \pm 0,17$	$26,15 \pm 7,95$
D-Fructose	$0,20 \pm 0,03$	$0,31 \pm 0,06$	$8,70 \pm 6,21$

Es wird deutlich dass mit zunehmendem sterischen Anspruch des Phenylrings die inhibitorische Wirkung des Phenylglukosid schlechter wird. Dies gilt sowohl für die Inhibition gegenüber UDP-Glc als auch gegenüber D-Fructose. Diese Beobachtung machten bereits Slabnik et al. (Slabnik et al. 1968), jedoch wurde nur die Inhibition gegenüber UDP- α -D-Glucose untersucht. In dieser Arbeit ist der ermittelte K_i -Wert für

eine Inhibition gegenüber Fructose für Phenyl- β -D-glucosid 80 %, für *p*-Arbutin 77 % und für D(-)-Salicin etwa 67 % kleiner als der K_i -Wert für UDP-Glc. Die Berechnung der Inhibitionskonstanten erfolgte näherungsweise für alle drei Substrate unter der Annahme einer rein kompetitiven Inhibition sowohl gegenüber dem Donor- wie auch dem Akzeptorsubstrat. Allein aus den Lineweaver-Burk-Auftragungen wird deutlich, dass dies nur eine Näherung ist. Der Fehler bei der Berechnung der K_i -Werte wird in der Reihe Substrate Phenyl- β -D-glucosid, *p*-Arbutin und D(-)-Salicin größer. Während der Fehler bei der Berechnung der Daten für Phenyl- β -D-glucosid und *p*-Arbutin unter 20 % liegt, so ist die Abweichung bei D(-)-Salicin größer 30 %. Für alle drei Substrate werden keine klassischen Inhibitionstypen beobachtet. Dies liegt unter anderem an der Tatsache, dass sowohl D-Fructose als auch UDP-Glc die Synthesereaktion im Überschuss inhibieren. Dieser Effekt sollte jedoch die drei Inhibitionsmessungen der Phenylglukoside im gleichen Maße beeinflussen.

Es kann anhand der ermittelten Daten nicht eindeutig entschieden werden, welche Substratbindungstasche durch den Inhibitor beeinflusst wird. Es ist denkbar, dass der Phenylrest eine Art Analogon der Uridinrestes des Nukleotidzucker darstellt und somit mit dem natürlichen Substrat um diese Bindungstasche konkurriert. Mit zunehmendem sterischen Anspruch des Phenylrings wird die Bindung des Inhibitors labiler. Das wird besonders für D(-)-Salicin deutlich, da durch diesen Inhibitor keine vollständige Inhibition erreicht werden kann. In diesem Zusammenhang ist es wichtig, dass Phenyl- α -D-glucosid die Synthesereaktion nicht inhibiert. Aufgrund der α -Stellung des Phenylrings wird das Substrat nicht erkannt.

Die in dieser Arbeit errechneten K_i -Werte für die Inhibition gegenüber D-Fructose sind wesentlich kleiner als die für UDP-Glc. Dies legt die Vermutung nahe, dass der Inhibitor auch mit der Bindungstasche von D-Fructose eine Bindung eingeht. Hier kommt nur der Glucoseteil des Inhibitors in Frage. Im Akzeptorsubstratscreening konnte bereits gezeigt werden, dass SuSyl anstelle von D-Fructose auch D-Glucose akzeptiert. Es ist somit denkbar, dass die Phenylglukoside als eine Art „Zwitterinhibitor“ agieren und somit sowohl die Bindung von UDP-Glc wie auch die Bindung von D-Fructose an das Enzym hemmen. Anhand der Messdaten kann jedoch nicht genau differenziert werden, ob durch den Inhibitor nicht allein die Bindungstasche des Donorsubstrates beeinflusst wird. Einen eindeutigen Beweis könnte man durch Kokristallisation des Inhibitors mit dem Enzym erhalten. Durch eine Kristallstrukturanalyse kann dann die Lage des Inhibitors im aktiven Zentrum des Enzyms bestimmt werden.

1-Desoxynojirimycin

In der Literatur wird für Glykosyltransferasen ein Mechanismus diskutiert, der ähnlich dem für konfigurationserhaltende Glykosidasen ist (Ünlilil und Rini 2000). Im Mechanismus einer konfigurationserhaltenden Glykosidase wird das Donorsubstrat intermediär im katalytischen Zentrum kovalent an eine Base gebunden. Dies ist in Abbildung 4.61 am Beispiel einer α -konfigurationserhaltenen Glykosidase dargestellt (Stütz 1996). Diese Theorie wird durch frühere Untersuchungen von Singh et al. (Singh et al. 1987) anhand von Isotopenaustausch-Untersuchungen an Saccharose Synthase unterstützt. Anhand dieser Untersuchungen schlugen Singh et al. zwei Intermediate des katalytischen Übergangszustandes vor. Zum einen die Bildung eines Oxocarbeniumions und zum anderen, in Übereinstimmung mit dem Glykosidase-Mechanismus, die Bildung eines kovalenten Enzym-Substrat-Komplexes.

Sears und Wong favorisieren als Übergangszustand ein Ringoxocarbeniumion-Intermediat. Mehrere mechanistische Studien deuten darauf hin, dass Glykosidase- und Glykosyltransferase-Reaktionen nach einem S_N1 -Mechanismus verlaufen, wobei die Abgangsgruppe meist vor dem Angriff durch das Nukleophil abgespalten wird. Der Übergangszustand ist vermutlich ein verzerrter Ring in Halbsesselform mit einer positiven Ladung am anomeren C-Atom, die teilweise zum Ringsauerstoff delokalisiert ist (Sears und Wong 1999).

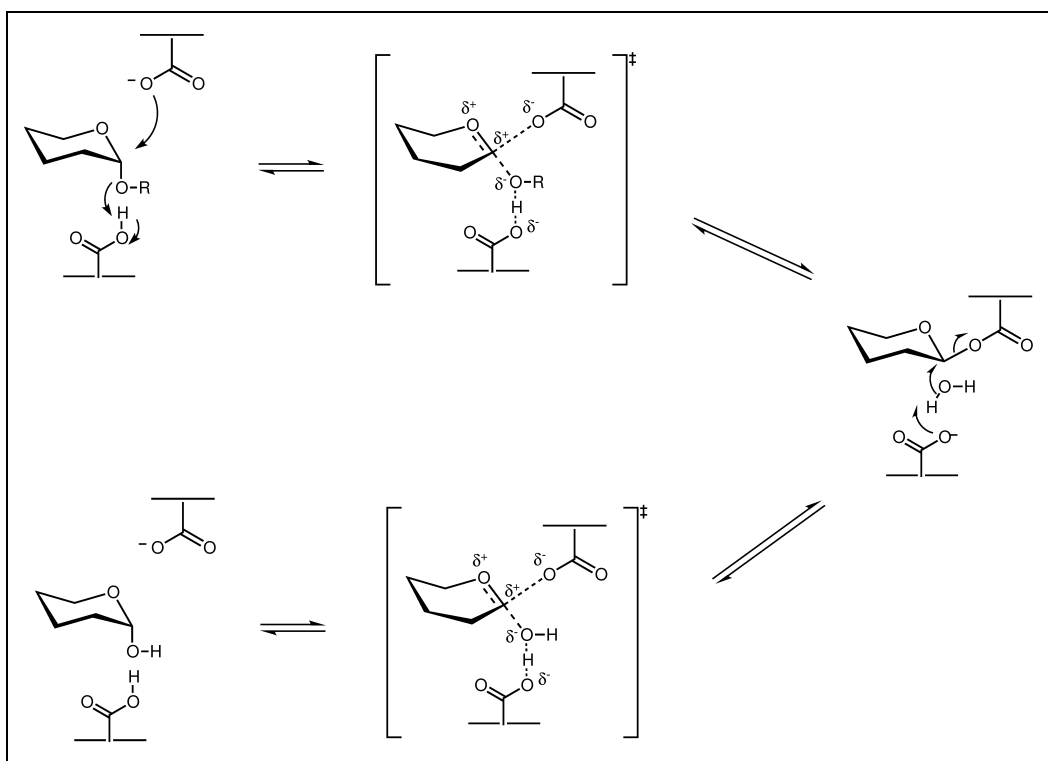


Abbildung 4.61 Mechanismus einer α -konfigurationserhaltenden Glykosidase (Stütz 1996).

1-Desoxynojirimycin ist, als ein Übergangszustandsanalogon, in der Literatur als sehr effizienter Inhibitor für α -Glykosidasen beschrieben (Abbildung 4.62). 1-Desoxynojirimycin bindet vermutlich in einer protonierten Form. In Abbildung 4.63 ist die potenzielle Wechselwirkung von 1-Desoxynojirimycin im aktiven Zentrum eine α -Glucosidase dargestellt (Heightman und Vasella 1999).

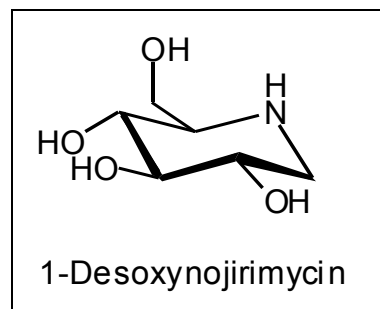


Abbildung 4.62 Untersuchung von 1-Desoxynojirimycin als Inhibitor der Synthesereaktion.

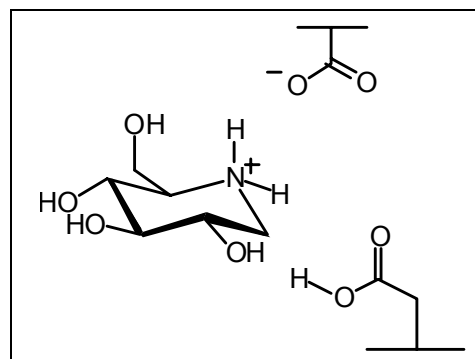


Abbildung 4.63 Potenzielle Wechselwirkung von 1-Desoxynojirimycin im aktiven Zentrum einer α -Glucosidase (Heightman und Vasella 1999).

Für Saccharose Synthase kann man, unter der Voraussetzung, dass der Mechanismus einer Glycosyltransferase ähnlich dem für konfigurationserhaltende Glykosidasen ist, vermuten, dass das Substrat die Synthesereaktion der Saccharose Synthase inhibiert. Aus Abbildung 4.64 geht jedoch hervor, dass 1-Desoxynojirimycin die Synthesereaktion der rekombinanten SuSy1 nicht hemmt. Der Fehler der Messungen liegt bei maximal 37 %. Die Bildung von Glucose konnte nicht beobachtet werden.

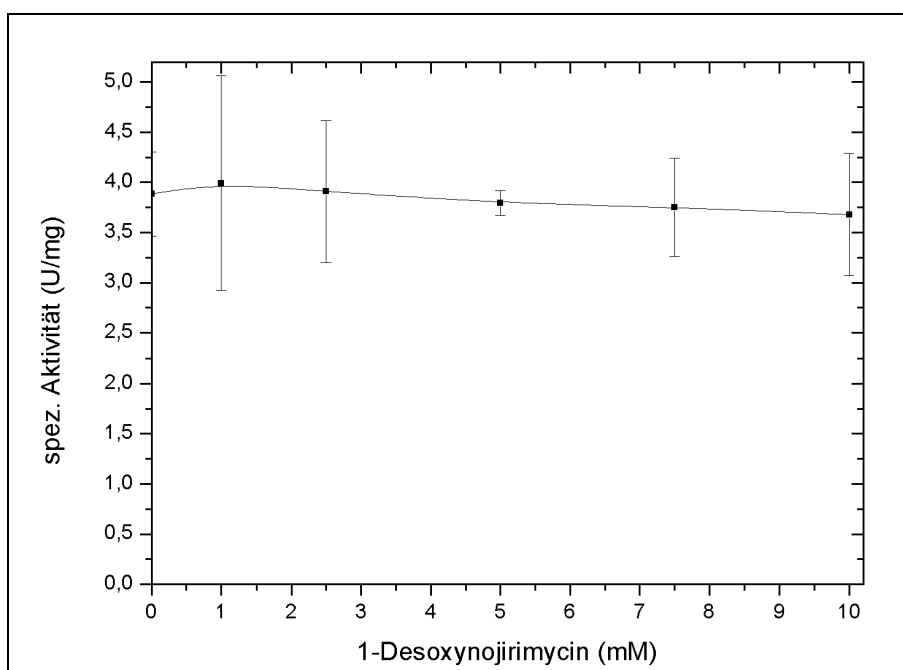


Abbildung 4.64 Einfluss von 1-Desoxynojirimycin auf die Synthesereaktion der Saccharose Synthase. 0-10 mM Inhibitor, 0,5 mM UDP-Glucose, 2 mM D-Fructose, 10 mM SuSy1 in 200 mM HEPES-NaOH pH 8,0 bei 30 °C.

1-Desoxynojirimycin stellt ein Analogon dar, das ausschließlich den Übergangszustand des Zuckerteils nachbildet. Diese Analoga wurden selten als gute Inhibitoren von Glycosyltransferasen beobachtet. Bessere Inhibitoren enthalten Donor-Nukleotid- und/oder Akzeptor-Mimetika, wie zum Beispiel hydrolyseunempfindliche Pyrophosphat-Analoga des Donors (Seers und Wong 1999). Dies ist vermutlich auch die Ursache, warum für die rekombinante SuSy1 keine Hemmung durch das Substrat 1-Desoxynojirimycin beobachtet wird. Entscheidend für eine irreversible Bindung ist der Nucleotidteil, was auch durch die Tatsache gestützt wird, dass UDP ein starker Produktinhibitor der Synthesereaktion ist. Anstelle von 1-Desoxynojirimycin bietet sich für SuSy die Untersuchung eines reinen Glycosyltransferase-Inhibitors an, in denen das Uridin über ein Pyrophosphat-Analogon, wie z.B. eine Phosphonsäure-Brücke mit dem Zucker verknüpft ist.

4.3 Präparative Synthese von Saccharose-Analoga

Die Synthese der Saccharose Analoga erfolgte auf Basis der ermittelten kinetischen Daten.

4.3.1 1'-Desoxy-1'-fluoro-β-D-fructofuranosyl-α-D-glucopyranosid

In Anlehnung an eine bereits durchgeführte Synthese von ^{13}C -markierter Saccharose (Römer et al. 2001) wurde auch zur Synthese von 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose (1'-Desoxy-1'-fluoro-β-D-fructofuranosyl-α-D-glucopyranosid) das Repetitive-Batch-Verfahren (Kragl et al. 1993) angewendet. 1-Desoxy-1-fluorofructose ist, im Vergleich zum natürlichen Substrat D-Fructose, ein ähnlich gutes Substrat. Dies wird durch kinetische Untersuchungen der katalytischen Effizienz bestätigt, die nur etwa um den Faktor 10 kleiner ist als bei D-Fructose. Die Synthese wurde so gestaltet, dass der Umsatz des Akzeptorsubstrats bei 100% liegt. Das Akzeptorsubstrat 1-Desoxy-1-fluorofructose wurde von W. Köckenberger nach der Methode von Card und Hitz synthetisiert (Card und Hitz 1984) und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

4.3.1.1 Synthese

Die Synthese von 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose erfolgte nach dem Schema in Abbildung 4.65 und wurde in drei aufeinander folgenden Ansätzen im Repetitive-Batch Verfahren durchgeführt.

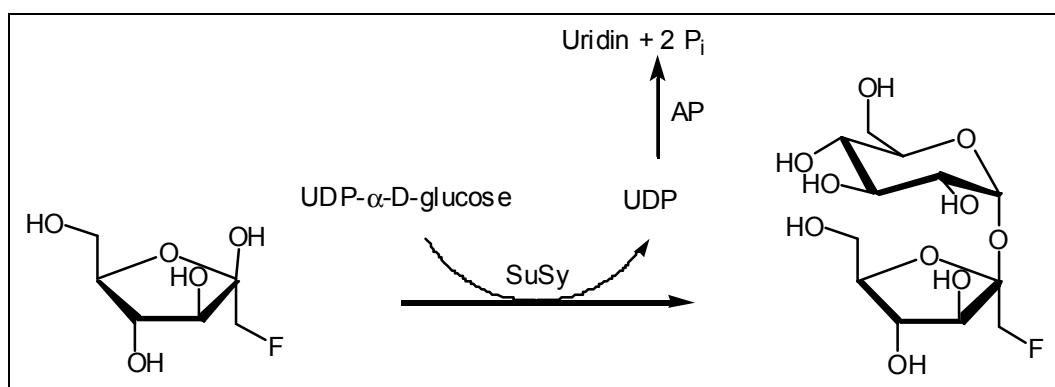


Abbildung 4.65 Synthese von 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose.

Die Synthesausbeute der vereinigten Produktlösungen lag bei 100% (2,9 mmol, HPLC). Bei einem Einsatz von 40 U rekombinanter SuSy1 entspricht dies einer Enzymproduktivität von 25 mg/U mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 0,59 g/l·d. Aufgrund des guten Akzeptorsubstrats werden ähnlich hohe Enzymproduktivitäten erreicht wie bei der Synthese von $[^{13}\text{C}_1]$ -β-D-Fructofuranosyl-α-D-glucopyranosid

(Enzymproduktivität 61 mg/U) (Römer et al. 2001). Im Vergleich zu Fed-Batch Synthesen (siehe z.B. Synthese von α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranosid Kapitel 4.3.2) ist die Raum-Zeit-Ausbeute geringer, da bei Repetitive-Batch-Synthesen ein wesentlich größeres Gesamtsynthesevolumen anfällt. Hinsichtlich der Raum-Zeit-Ausbeute kann man die Syntheseergebnisse verbessern, indem man das Fed-Batch-Verfahren anwendet. Dies ist bei der Synthese von 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose möglich, da 1-Desoxy-1-fluorofructose im Gegensatz zu D-Fructose keine Substratüberschussinhibition aufweist.

Nach Aufreinigung über Anionenaustauschchromatografie, Feinreinigung an einem Kationentauscher in Calcium-Form und abschließender Umkristallisation aus Methanol erhielt man 860,5 mg (2,5 mmol) 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose in einer Gesamtausbeute von 86% als weißen Feststoff. Die Reinheit nach HPLC liegt bei 89%.

4.3.1.2 Charakterisierung

Das Produkt wurde mittels NMR charakterisiert.

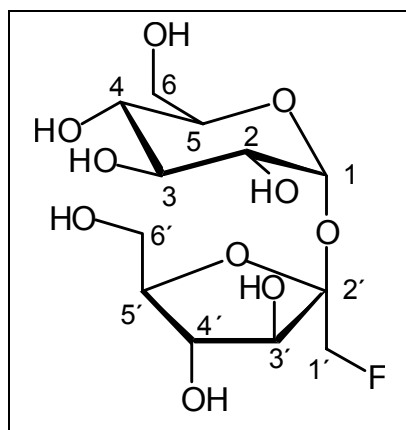


Abbildung 4.66 1'-Desoxy-1'-fluoro- β -D-fructofuranosyl- α -D-glucopyranosid

^1H -, ^{13}C - und ^{19}F - NMR Spektrum (Anhang 6.4.5)

^1H -NMR (500 MHz, D_2O): δ = 4,29-4,49 (1'-H, m, $J_{1\text{H}-19\text{F}}$ = 46,6 Hz, $J_{1\text{H}-1\text{H}}$ = 10,4 Hz); 4,12 (2'-H, d); 4,09 (3'-H, d); 3,95 (4'-H, t); 3,35 (4-H, t); 5,29 (1-H, dd); 3,43 (2-H, qd); 3,60-3,83 (3-H, 5-H, 6- $\text{H}_{\text{a,b}}$, 5'- $\text{H}_{\text{a,b}}$, m) ppm

^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O): δ = 80,7 (1'-C, d, $J_{13\text{C}-19\text{F}}$ = 174,2 Hz); 101,8 (2'-C, d, $J_{13\text{C}-19\text{F}}$ = 19,6 Hz); 76,1 (3'-C); 73,5 (4'-C); 81,4 (5'-C); 62,1 (6'-C); 92,6 (1-C); 70,8 (2-C); 72,4 (3-C); 69,1 (4-C); 72,4 (5-C); 60,0 (6-C) ppm

^{19}F -NMR (470 MHz, D_2O): δ_{CFCl_3} = -229,4 ppm (2'-C, t, $J_{13\text{C}-19\text{F}}$ = 46,6 Hz)

Die hier erhaltenen NMR-spektroskopischen Daten entsprechen den Literaturdaten (Card and Hitz 1984).

4.3.2 α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranosid

Die kinetischen Messungen ergaben einen K_m -Wert für L-Sorbose von 226,5 mM und ein K_{is} -Wert von 521,2 mM. Zur Synthese und den Vorversuchen wurde deshalb eine Konzentration von 300 mM L-Sorbose gewählt. Die Umsetzung erfolgte nach dem Schema in Abbildung 4.67.

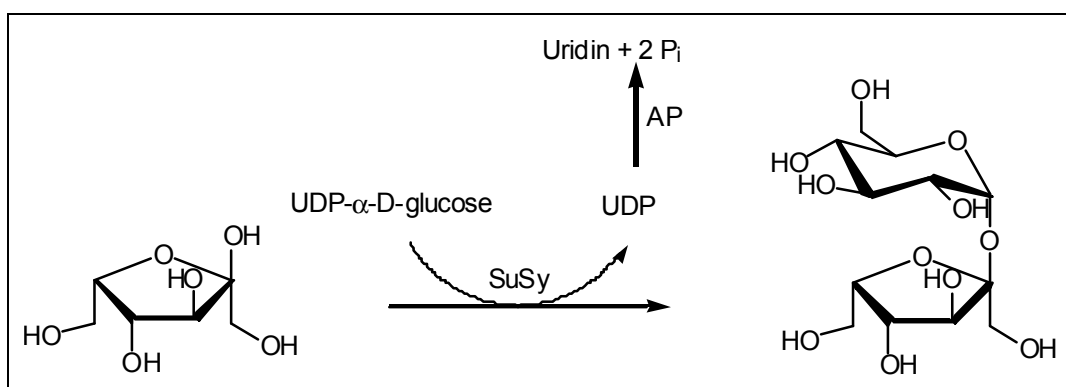


Abbildung 4.67 Synthese von α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranosid.

4.3.2.1 Vorversuche

Zunächst wurden einige Vorversuche durchgeführt, um bezogen auf die eingesetzte Menge an UDP- α -D-Glucose und alk. Phosphatase einen optimalen Syntheseansatz zu finden.

Aus Abbildung 4.68 geht hervor, dass der Umsatz nach vier Stunden bei einem Einsatz von 1 mM UDP- α -D-Glucose und 2 U/ml alk. Phosphatase am höchsten war (Ansatz b). Bei Einsatz von 2 mM UDP- α -D-Glucose war die Umsetzung deutlich langsamer. UDP- α -D-Glucose inhibiert im Überschuss die Synthesereaktion ($K_{is} = 2,3$ mM). Zusätzlich liegt bei allen Reaktionen noch eine starke Produktinhibition durch UDP ($K_i = 0,12$ mM) vor. Durch den Zusatz von alkalischer Phosphatase wird UDP dem Gleichgewicht entzogen und die Reaktion beschleunigt. Zur Synthese des Disaccharids wurde der Ansatz b) mit 300 mM L-Sorbose, 1 mM UDP- α -D-Glucose, 500 mU/ml rekombinante SuSy1 und 2 U/ml alk. Phosphatase eingesetzt.

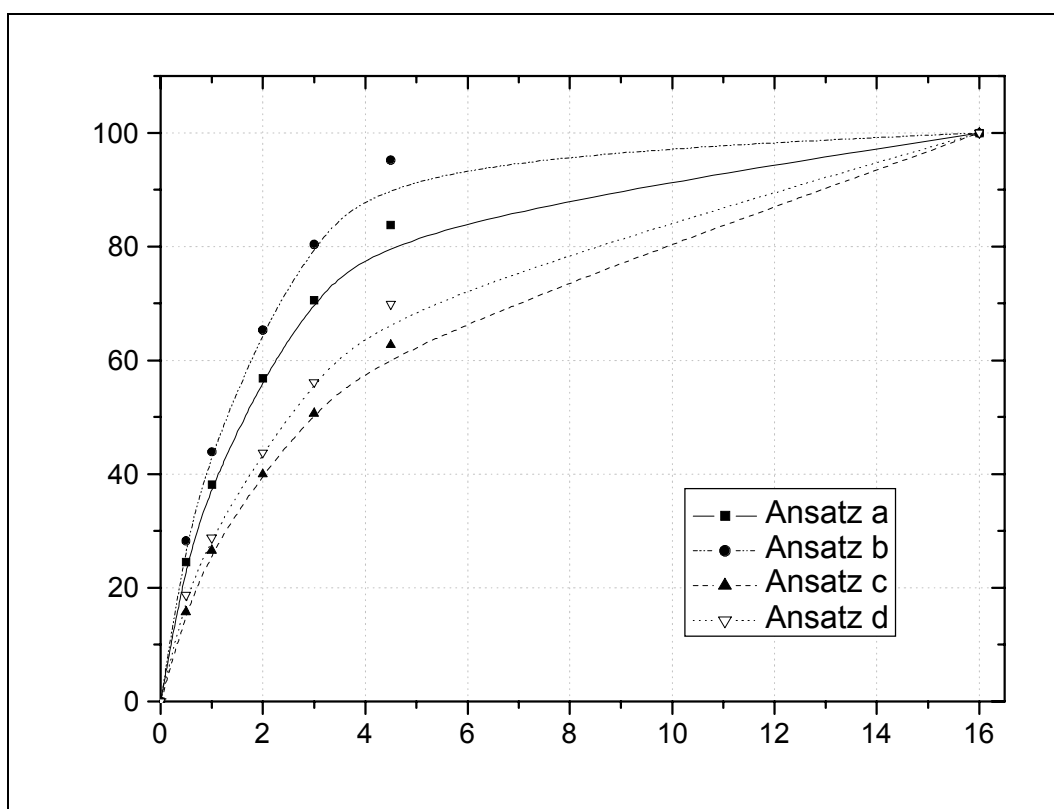


Abbildung 4.68 Zeit-Umsatz-Kurven mit 300 mM L-Sorbose, 500 mU/ml rekombinanter SuSy1 und a) 1 U/ml alk. Phosphatase, 1 mM UDP-Glc, b) 2 U/ml alk. Phosphatase, 1 mM UDP-Glc, c) 2 U/ml alk. Phosphatase, 2 mM UDP-Glc, d) 2 U/ml alk. Phosphatase, 2 mM UDP-Glc. Umsatz bezogen auf UDP-Glc.

4.3.2.2 Synthese

Die Synthese von α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranosid wurde mit dem Fed-Batch-Verfahren durchgeführt. In zwei Ansätzen konnten mit einer Gesamtsyntheseausbeute von 81% (0,5 mmol, HPLC) das Disaccharid synthetisiert werden. Die Enzymproduktivität lag mit 3,5 mg/U wesentlich niedriger als bei der Synthese von 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose, was aufgrund der deutlich geringeren katalytischen Effizienz für L-Sorbose (vgl. Kapitel 4.2.3.5) verständlich ist. Die Raum-Zeit-Ausbeute dagegen ist mit 1,1 g/l·d höher, da hier die Fed-Batch-Technik Anwendung fand.

Nach Aufreinigung konnte 79 mg (0,22 mmol) des Disaccharids α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranosid in einer Gesamtausbeute von 35% gewonnen werden.

Das in einer chemoenzymatischen Synthese mit Saccharose aus Reis hergestellte 6-Desoxy-Analogon von L-Sorbose (6-Desoxy-L-Sorbose) (siehe auch Kapitel 1.4.3) konnte Grothus (Grothus 1993) mit einer Gesamtausbeute von 17% umsetzen. α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranosid konnte bereits aus Umsetzungen mit dem Enzym Saccharose Phosphorylase gewonnen werden. Hassid und Doudoroff (Hassid and

Doudoroff 1950) konnten 1950 ausgehend von α -D-Glucose-1-phosphat und L-Sorbose mit Saccharose Phosphorylase aus *Pseudomonas saccharophila* ein nichtreduzierendes, süß schmeckendes, durch Invertase nur sehr schwach hydrolysierbares Disaccharid synthetisieren. Mazza et al. (Mazza et al. 1975) konnte das Produkt ausgehend von verschiedenen Glycosyldonoren, wie α -D-Glucopyranosyl-1-phosphat, Saccharose und α -D-Glucopyranosylfluorid ebenfalls mit Saccharose Phosphorylase aus *Pseudomonas saccharophila* synthetisieren. Jedoch lagen die erzielten Ausbeuten mit 9 % ausgehend von α -D-Glucopyranosyl-1-phosphat, 11 % ausgehend von Saccharose und 3 % α -D-Glucopyranosylfluorid weit unter der Ausbeute, die mit der rekombinanten Saccharose Synthase 1 aus Kartoffel erzielt wurde.

4.3.2.3 Charakterisierung

Das Produkt wurde mittels HPLC und Massenspektrometrie charakterisiert und eindeutig identifiziert. Es handelt sich um ein nichtreduzierendes Disaccharid in dem die D-Glucose und L-Sorbose mit ihren α -C-Atomen miteinander verknüpft sind (α,α -Trehalose-Typ).

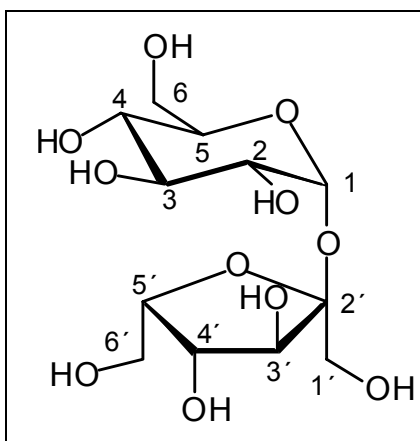


Abbildung 4.69 α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranosid.

^1H - und ^{13}C -NMR Spektrum (Anhang 6.4.6)

^1H -NMR(500 MHz, D_2O): δ = 5,31 (1-H, d); 4,40 (4'-H, t); 4,31 (5'-H, dq); 4,14 (3'-H, d); 3,61 –3,82 (1'-H_{a,b}, 3-H, 5-H, 6-H_{a,b}, m); 3,50 (2-H, dd); 3,34 (4-H, t) ppm; $^3J_{1,2}$ = 4,1; $^3J_{3',4'}$ = 7,3; $^3J_{4',5'}$ = 7,6; $^4J_{2,4}$ = 10,0 Hz.

^{13}C -NMR(125 MHz, D_2O): δ = 104,03 (C-2'); 92,66 (C-1); 78,59 (C-5'); 77,74 (C-3'); 75,13 (C-4'); 73,11 (C-3); 73,05 (C-5); 71,48 (C-2); 69,84 (C-4); 61,06 (C-6'); 60,97 (C-1'); 60,81 (C-6) ppm.

Massensektrum (Anhang 6.4.6)

Massenspektrum ESI-MS:

gefunden: 341,1 m/z für $[M-H]^-$

berechnet: 341,12 m/z für $[M-H]^-$

4.3.3 α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid

Die kinetischen Messungen ergaben, dass der K_m -Wert für D-Lyxose bei 126 mM liegt. Eine Substratüberschussinhibition war dabei nicht zu beobachten. Es wurde für die Vorversuche und die Synthese eine Konzentration von 200 mM D-Lyxose eingesetzt. In Abbildung 4.70 ist das Reaktionsschema dargestellt.

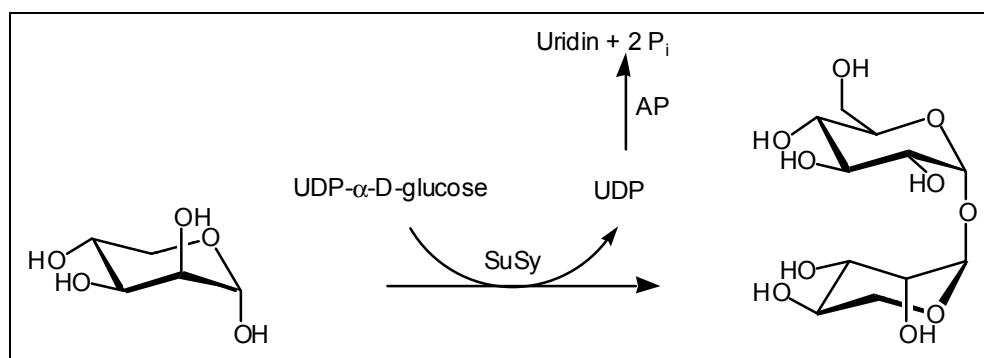


Abbildung 4.70 Synthese von α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid

4.3.3.1 Vorversuche

Die verschiedenen Zeit-Umsatz-Kurven, in denen die Konzentrationen an UDP- α -D-Glucose und alk. Phosphatase variiert wurden, sind in Abbildung 4.73 dargestellt.

Der Ansatz c in Abbildung 4.71 mit 200 mM D-Lyxose, 1 mM UDP- α -D-Glucose, 500 mU/ml SuSy und 2 U/ml alk. Phosphatase zeigte die beste Syntheseleistung pro Zeit. Dieser Ansatz wurde auch für die folgende Synthese ausgewählt.

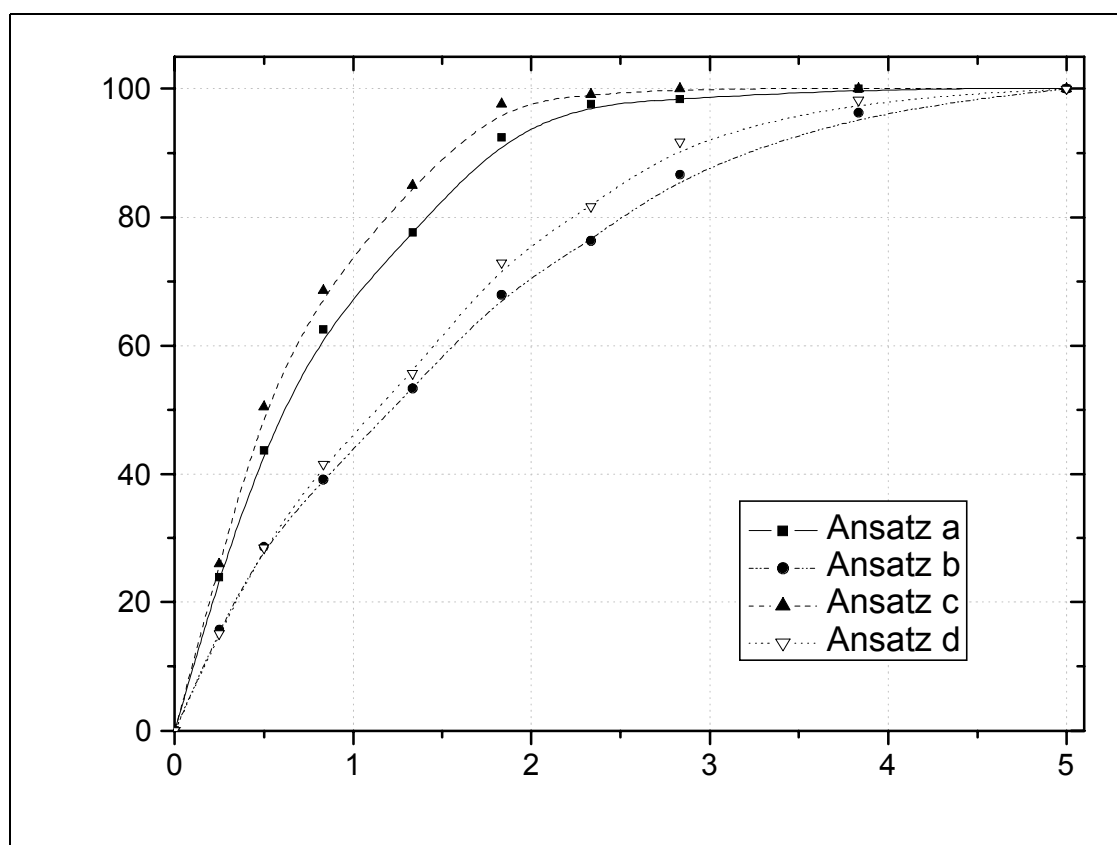


Abbildung 4.71 Zeit-Umsatz-Kurven mit 300 mM D-Lyxose, 500 mU/ml rekombinante SuSy1 und a) 1 U/ml alk. Phosphatase, 1 mM UDP-Glc b) 1 U/ml alk. Phosphatase, 2 mM UDP-Glc c) 2 U/ml alk. Phosphatase, 1 mM UDP-Glc, d) 2 U/ml alk. Phosphatase, 2 mM UDP-Glc (Umsätze bezogen auf den Donor UDP-Glc).

4.3.3.2 Synthese

Die Synthese wurde im Fed-Batch-Verfahren durchgeführt, wobei ein kontinuierlicher Feed eingestellt wurde. Dies wirkte sich insbesondere auf die Gesamtreaktionszeiten günstig aus. Die Syntheseausbeute lag nach HPLC bei 81% (0,59 mmol). Die Enzymproduktivität lag bei 6,9 mg/U in einem ähnlichen Bereich wie bei der vorangegangenen Synthese. Auch hier spiegeln sich die Ergebnisse der kinetischen Messungen (siehe Kapitel 4.2.3.5) wider. Die katalytische Effizienz bezogen auf D-Lyxose ist genauso gering wie die für L-Sorbose. Die Raum-Zeit-Ausbeute mit 2,6 g/l·d konnte durch die Anwendung eines kontinuierlichen Fed-Batch-Verfahrens auf das Doppelte gesteigert werden.

Nach Aufreinigung erhielt man 160 mg (0,51 mmol) α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid mit einer Gesamtausbeute von 70%.

Die Charakterisierung des Produktes erfolgte mittels NMR und Massenspektrometrie.

Das Disaccharid α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid wurde bereits mit Saccharose aus Reis synthetisiert (Grothus 1993). Nach Aufreinigung konnte eine Ausbeute von lediglich 7,5% erzielt werden. Diese Synthese war jedoch, hinsichtlich der Kinetiken der beiden Substrate, nicht optimiert. Die Substrate wurden etwa in äquimolaren Mengen eingesetzt. Grothus setzte 35,5 mM D-Lyxose und UDP- α -D-Glucose ein (Grothus 1993). Vermutlich liegt bei Saccharose Synthese aus Reis der K_m -Wert für D-Lyxose wesentlich höher, auch für UDP- α -D-Glucose ist in diesem Konzentrationsbereich vermutlich eine starke Substratüberschussinhibition zu erwarten.

4.3.3.3 Charakterisierung

NMR-spektroskopische Untersuchungen ergaben die Bildung eines Produktes. Es wurde ein nichtreduzierendes Disaccharid gebildet, indem die D-Lyxose in der pyranoiden Form α 1- α 1 mit D-Glucose verknüpft ist.

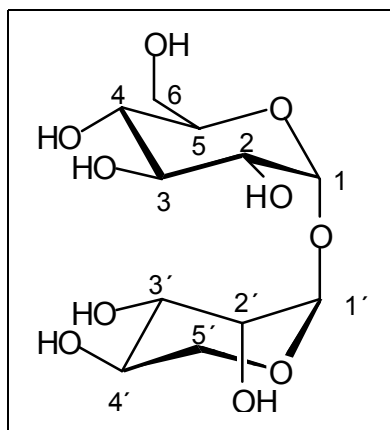


Abbildung 4.72 α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid

^1H - und ^{13}C -NMR Spektrum (Anhang 6.4.7)

^1H -NMR(500 MHz, D_2O): δ = 4,99 (1'-H, d); 3,89 (2'-H, t); 3,87 (3'-H, t); 3,68 (4'-H, ddd); 3,79 – 3,85 (5'-H_{a,b}, 3-H, 5-H, 6-H_{a,b}, m); 5,09 (1-H, d); 3,55 (2-H, t); 3,38 (4-H, t) ppm; $^3J_{1,2}$ = 3,8, $^3J_{1',2'}$ = 2,8, $^3J_{2',3'}$ = 3,0, $^3J_{3',4'}$ = 2,2, $^3J_{3,4}$ = 9,4, $^4J_{1',3'}$ = 12,3 Hz.

^{13}C -NMR(125 MHz, D_2O): δ = 95,72 (C-1'); 69,95 (C-2'); 70,77 (C-3'); 67,03 (C-4'); 63,23 (C-5'); 94,18 (C-1); 71,25 (C-2); 73,00 (C-3); 69,93 (C-4); 72,77 (C-5); 60,87 (C-6) ppm.

Massenspektrum (Anhang 6.4.7)

Massenspektrum ESI-MS

gefunden: 311,0 m/z für $[\text{M-H}]^-$

berechnet: 311,11 m/z für $[\text{M-H}]^-$

4.3.4 α -D-Glucopyranosyl- L-arabinose

L-Arabinose ist im Vergleich zu L-Sorbose und D-Lyxose ein weniger gutes Substrat. Allein durch die katalytische Effizienz, die nochmals um eine Größenordnung im Vergleich zu L-Sorbose und D-Lyxose erniedrigt ist, wird dies deutlich. Der K_m -Wert für L-Arabinose liegt bei 273 mM, eine Substratüberschussinhibition liegt nicht vor. Zur Synthese und für die Vorversuche wurde eine Konzentration von 1 M L-Arabinose gewählt. Die Umsetzung wurde gemäß Abbildung 4.73 durchgeführt.

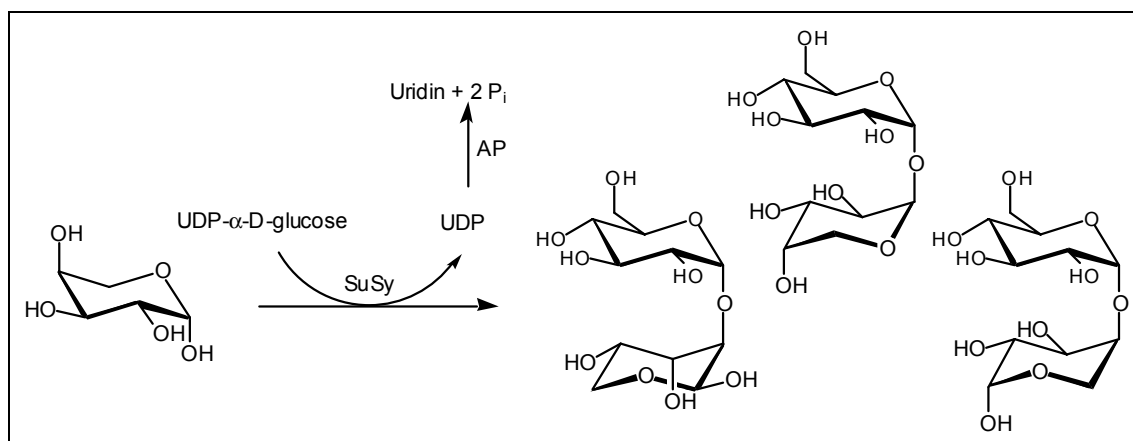


Abbildung 4.73 Synthese von L-Arabinopyranosyl- α -D-glucopyranosid.

4.3.4.1 Vorversuche

Es wurden Zeit-Umsatz-Kurven aufgenommen, in denen die Konzentration an rekombinanter SuSy1 und alk. Phosphatase variiert wurden.

Der Ansatz c (Abbildung 4.78) mit 1 M L-Arabinose, 0,5 mM UDP- α -D-Glucose, 4 U/ml rekombinante SuSy1 und 8 U/ml alk. Phosphatase zeigte die besten Umsätze pro Zeiteinheit. Nach fünf Stunden konnte ein Umsatz des Donors von 97% erzielt werden. Die folgende Synthese basiert auf diesem Ansatz.

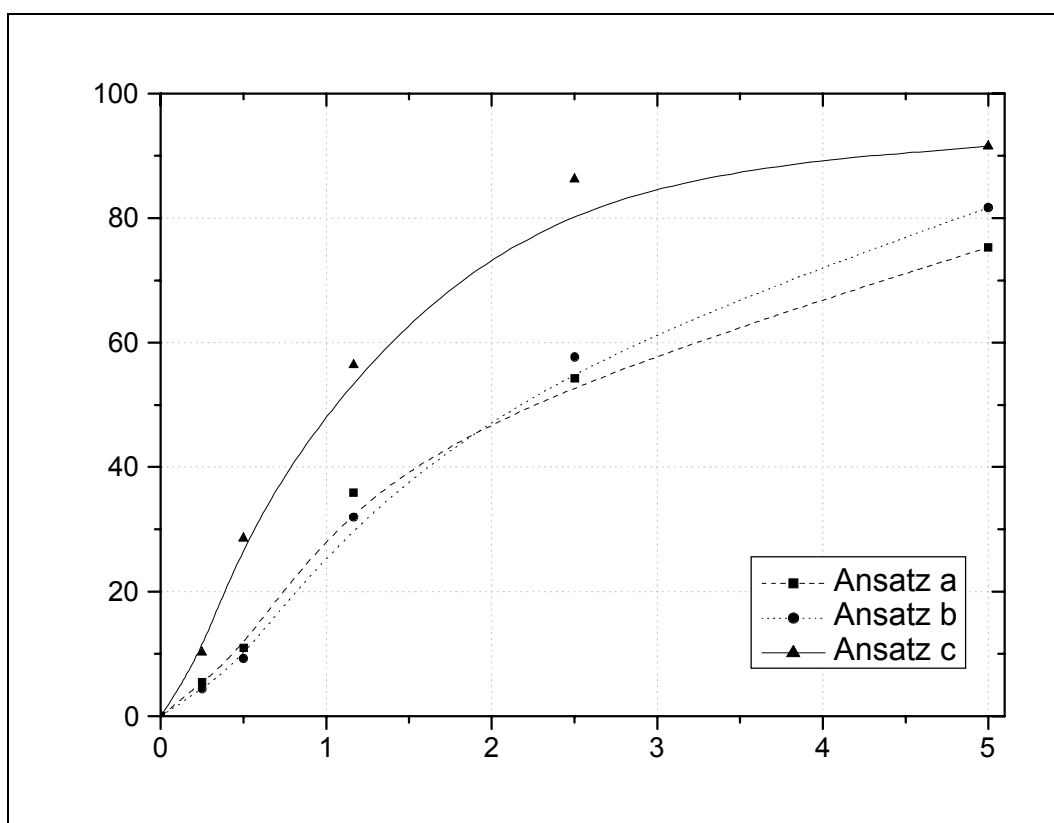


Abbildung 4.74 Zeit-Umsatz-Kurven mit 1 M L-Arabinose, 0,5 mM UDP-Glc und a) 2 U/ml rekombinante SuSy1, 2 U/ml alk. Phosphatase b) 2 U/ml rekombinante SuSy1, 2 U/ml alk. Phosphatase c) 4 U/ml rekombinante SuSy1, 8 U/ml alk. Phosphatase. Der Umsatz bezieht sich auf den eingesetzten Donor UDP-Glc.

4.3.4.2 Synthese

Zur Synthese wurde die Fed-Batch-Technik gewählt. Das Produkt konnte mit einer Synthesausbeute von 59% (0,4 mmol, HPLC) gewonnen werden. Die Enzymproduktivität war aufgrund des hohen Enzymeinsatzes deutlich niedriger und lag bei 0,6 mg/U. Auch die Raum-Zeit-Ausbeute ist mit 0,6 g/l·d deutlich niedriger als bei den Synthesen in Kapitel 4.3.2 und 4.3.3. Hier spiegelt sich insbesondere die schlechte katalytische Effizienz bezogen auf L-Arabinose wider. Nach Aufreinigung erhielt man 77 mg (0,23 mmol) eines HPLC reinen Produktes (HPLC-Reinheit 97 %), in einer Gesamtausbeute von 31%.

Weiterhin wurde L-Arabinose mit dem Enzym Saccharose Phosphorylase aus *Pseudomonas saccharophila* umgesetzt (Hassid and Doudoroff 1950). Bei der Umsetzung entstand ein reduzierendes Disaccharid in dem die D-Glucose α 1-3 mit der L-Arabinose verknüpft war.

4.3.4.3 Charakterisierung

Die NMR-spektroskopische Untersuchung lieferte kein eindeutiges Produkt. Im Bereich zwischen 5,3 und 5,5 ppm sind mindestens fünf einzelne Dubletts zu erkennen (Spektren siehe Anhang 6.4.8), die sich alle in ihren Kopplungen unterscheiden. Eine Auswertung dieses Spektrums war, aufgrund seiner Komplexität, nicht möglich. Auch das ^{13}C -Spektrum weist auf mindestens 2 Verbindungen hin, jedoch ist das Grundrauschen bei diesem Spektrum sehr hoch, so dass Signale mit geringerer Intensität darin nicht aufgelöst werden.

Aus dem Modell zur Substraterkennung von Aldosen geht hervor, dass –unter der Voraussetzung, dass der Ringsauerstoff in der Molekülebene liegt– drei OH-Gruppen für eine Bindung zur Verfügung stehen.

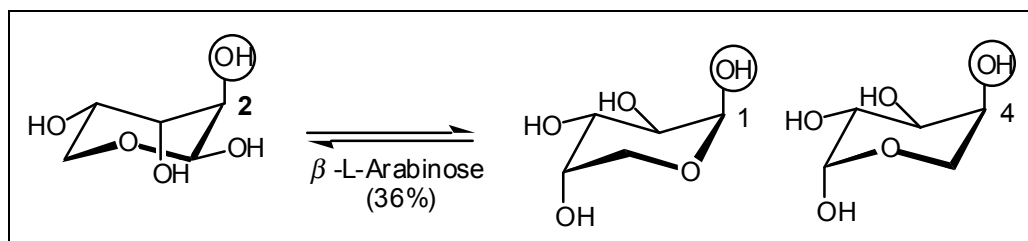


Abbildung 4.75 Potenzielle Bindungsstellen der L-Arabinose (mit Kreisen markiert) bei der Umsetzung mit rekombinanter SuSy1.

L-Arabinose kann möglicherweise über die axial stehenden OH-Gruppen an C-1, C-2 und C-4 mit α -D-Glucose verknüpft sein (siehe Abbildung 4.75). Bei einer Verknüpfung über C-2, und C-4 entstehen reduzierende Disaccharide (2-O- α -D-Glucopyranosid-L-arabinose und 4-O- α -D-Glucopyranosyl-L-arabinose), in denen die OH-Gruppe am anomeren C-Atom der Arabinose sowohl in einer α - wie auch β -Konfiguration in der pyranoiden Form vorliegen kann. Die furanoide Form ist ebenfalls möglich. ^{13}C -NMR-spektroskopische Untersuchungen an 2-O- β -D-Glucopyranosyl- und 4-O- β -D-Glucopyranosyl-L-arabinose zeigten, dass die Arabinose in der α,β -pyranoiden und furanoiden Form in wässriger Lösung vorliegt (Liptak et al. 1982).

Anhand des ^{13}C -Spektrums des Produktgemisches (siehe Anhang 6.4.8) kann man im Vergleich zum Spektrum von α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid die Signale in erster Näherung einem Produkt zuordnen, in dem die L-Arabinose $\alpha 1\text{-}\beta 1$ mit der Glucose verknüpft ist. Das resultierende Disaccharid β -L-Arabinopyranosyl- α -D-glucopyranosid ist ein nichtreduzierendes Disaccharid (siehe Abbildung 4.76).

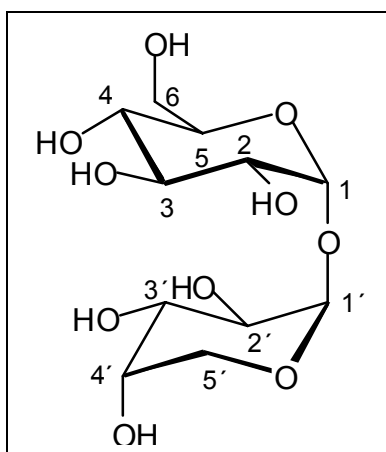


Abbildung 4.76 β -L-Arabinopyranosyl- α -D-glucopyranosid.

Tabelle 4.23 Mögliche Zuordnung der Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz, D_2O) von β -L-Arabinopyranosyl- α -D-glucopyranosid im Vergleich zum Spektrum von α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid.

C-Atom	α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid δ [ppm]	β -L-Arabinopyranosyl- α -D-glucopyranosid δ [ppm]
C-1	94,18	97,07
C-2	71,25	71,72
C-3	73,00	73,15
C-4	69,93	69,84
C-5	72,77	72,12
C-6	60,87	60,80
C-1'	95,72	98,44
C-2'	69,95	69,84
C-3'	70,77	71,41
C-4'	67,03	67,61
C-5'	63,23	62,92 oder 66,39

Eine genaue Untersuchung der Produkte ist nur dann möglich, wenn man die entstanden Disaccharide voneinander trennt. Eine Trennung mit chromatographischen Methoden ist aufgrund der Ähnlichkeit der Produkte nicht möglich. Möglicherweise können die Produkte durch chemische Derivatvisierung und anschließender chromatographischer Trennung voneinander isoliert werden. Diese Trennmöglichkeit müsste zumindest bezüglich der Trennung von reduzierenden und nichtreduzierenden Disacchariden funktionieren.

4.3.5 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucopyranosyl- β -D-fructofuranosid

Die kinetischen Untersuchungen lieferten einen K_m -Wert für UDP-*N*-Acetyl- α -D-glucosamin von 0,84 mM, eine Substratüberschussinhibition wurde nicht beobachtet. Bei dieser Umsetzung musste jedoch die Substratüberschussinhibition durch D-Fructose berücksichtigt werden. In den Vorversuchen wurden sowohl die Konzentration von D-Fructose und UDP-*N*-Acetyl- α -D-glucosamin, als auch die Enzymkonzentrationen variiert. Die Synthese erfolgte nach dem Schema in Abbildung 4.77.

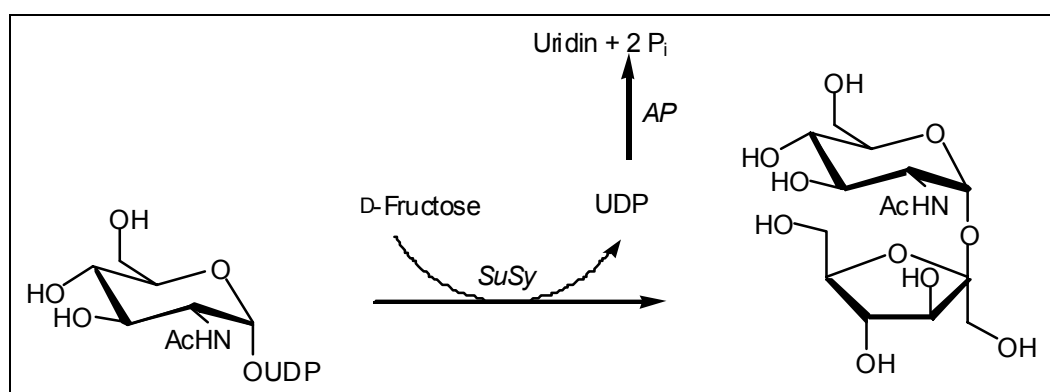


Abbildung 4.77 Synthese von 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucopyranosyl- β -D-fructofuranosid.

4.3.5.1 Vorversuche

In den Ansätzen a-d in Abbildung 4.78 wurde die Konzentration an D-Fructose und UDP-*N*-Acetyl- α -D-glucosamin variiert und die Enzymkonzentrationen mit 1 U/ml rekombinante SuSy und 2 U/ml alk. Phosphatase konstant gehalten. Da nach 8 Stunden ein maximaler Umsatz von nur 40 % beobachtet werden konnte, wurde der hier beste Ansatz c mit 20 mM D-Fructose, 0,5 mM UDP-*N*-Acetyl- α -D-glucosamin 1 U/ml rekombinante SuSy und 2 U/ml alk. Phosphatase mit der 4-fachen Menge an Enzym erneut angesetzt.

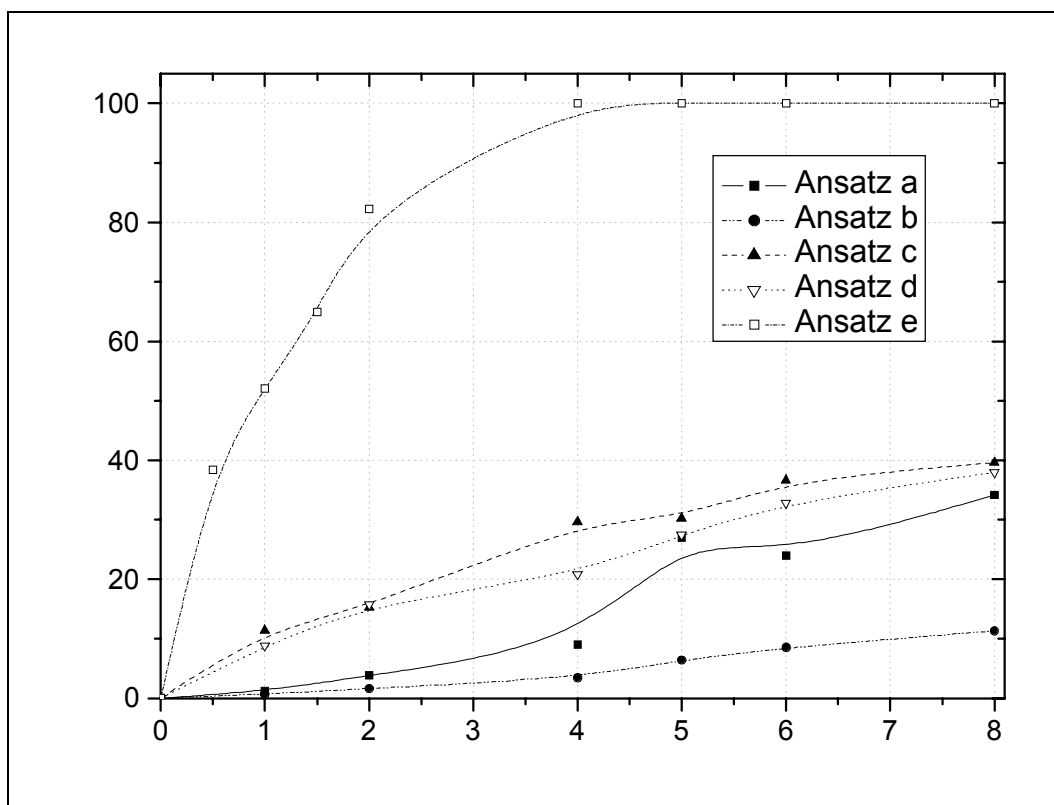


Abbildung 4.78 Zeit-Umsatz-Kurven mit a) 2 mM D-Fructose, 0,5 mM UDP-GlcNAc, 1 U/ml rekombinante SuSy1, 2 U/ml alk. Phosphatase b) 2 mM D-Fructose, 1 mM UDP-GlcNAc, 1 U/ml rekombinante SuSy1, 2 U/ml alk. Phosphatase c) 20 mM D-Fructose, 0,5 mM UDP-GlcNAc, 1 U/ml rekombinante SuSy1, 2 U/ml alk. Phosphatase d) 20 mM D-Fructose, 1 mM UDP-GlcNAc, 1 U/ml rekombinante SuSy1, 2 U/ml alk. Phosphatase e) 20 mM D-Fructose, 0,5 mM UDP-GlcNAc, 4 U/ml rekombinante SuSy1, 8 U/ml alk. Phosphatase. Umsatz bezogen auf den Donor UDP-GlcNAc.

Bei Einsatz der vierfachen Menge an Enzym konnte nach vier Stunden ein 100%iger Umsatz beobachtet werden. Der Ansatz e) wurde für die folgende Synthese ausgewählt.

4.3.5.2 Synthese

Die Synthese wurde im Fed-Batch durchgeführt. Aus 0,85 mmol des Donorsubstrates konnten mit einer Syntheseausbeute von 98%, 0,83 mmol des Disaccharids *N*-Acetylsaccharosamin (2-Acetamido-2-desoxy-D-glucopyranosyl- β -D-fructofuranosid) synthetisiert werden. Aufgrund des hohen Einsatzes an Enzym lag die Enzymproduktivität lediglich bei 0,8 mg pro eingesetzte Unit an rekombinanter Saccharose Synthase 1. Die Synthese wurde in einem Endvolumen von insgesamt 130 ml in 55 Stunden durchgeführt. Die Raum-Zeit-Ausbeute beträgt 1,03 g/l·d. Nach Aufreinigung eine über Anionenaustauschchromatografie und Gelfiltration wurden 188 mg (0,5 mmol) eines schwach gelben Feststoffes mit einer Gesamtausbeute von 59% isoliert.

N-Acetylsaccharosamin wurde zuvor bereits chemisch in einer 7-stufigen Synthese ausgehend von Saccharose mit 12,5 % Gesamtausbeute synthetisiert (vgl. Kapitel 1.5)

(Lichtenthaler et al. 1995). Die Vorteile der enzymatischen Synthese werden hier klar deutlich. Die Ausbeuten sind deutlich höher und die Synthese ist wesentlich weniger aufwändig.

4.3.5.3 Charakterisierung

Das Produkt wurde mittels NMR genauer charakterisiert. Die erhaltenen Signale entsprechen den von Lichtenthaler (Lichtenthaler et al. 1995) publizierten Ergebnissen.

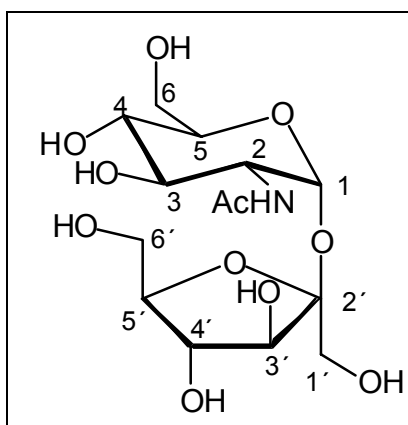


Abbildung 4.79 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucopyranosyl- β -D-fructofuranosid.

^1H - und ^{13}C -NMR Spektrum (Anhang 6.4.9)

^1H -NMR(500 MHz, D_2O): δ = 1,89 (CH_3 von Ac, s); 3,35 ($1'\text{-H}_a$, d); 3,44 ($1'\text{-H}_b$, d); 3,89 ($2'\text{-H}$, t); 3,87 ($3'\text{-H}$, t); 4,06 ($4'\text{-H}$, d); 3,61–3,73 ($5'\text{-H}_{a,b}$, $6'\text{-H}_{a,b}$, 2-H, 3-H, 5-H, 6- $\text{H}_{a,b}$, m); 5,22 (1-H, d); 3,39 (4-H, d) ppm; $^3J_{1,2} = 3,7$; $^3J_{3,4} = ^3J_{4,5} = 8,9$; $^3J_{3',4'} = ^3J_{4',5'} = 9,1$; $J_{1',1'} = 12,1$ Hz.

^{13}C -NMR(125 MHz, D_2O): δ = 21,21 (CH_3 von Ac); 54,16 (C-2); 60,43 (C-2'); 61,20 (C-1'); 62,59 (C-6); 69,97 (C-4); 70,63 (C-3); 72,79 (C-5); 74,10 (C-4'); 76,01 (C-3'); 81,68 (C-5'); 91,09 (C-1); ppm.

In Abbildung 4.80 sind noch einmal alle in dieser Arbeit enzymatisch synthetisierten Saccharose-Analoga zusammengestellt.

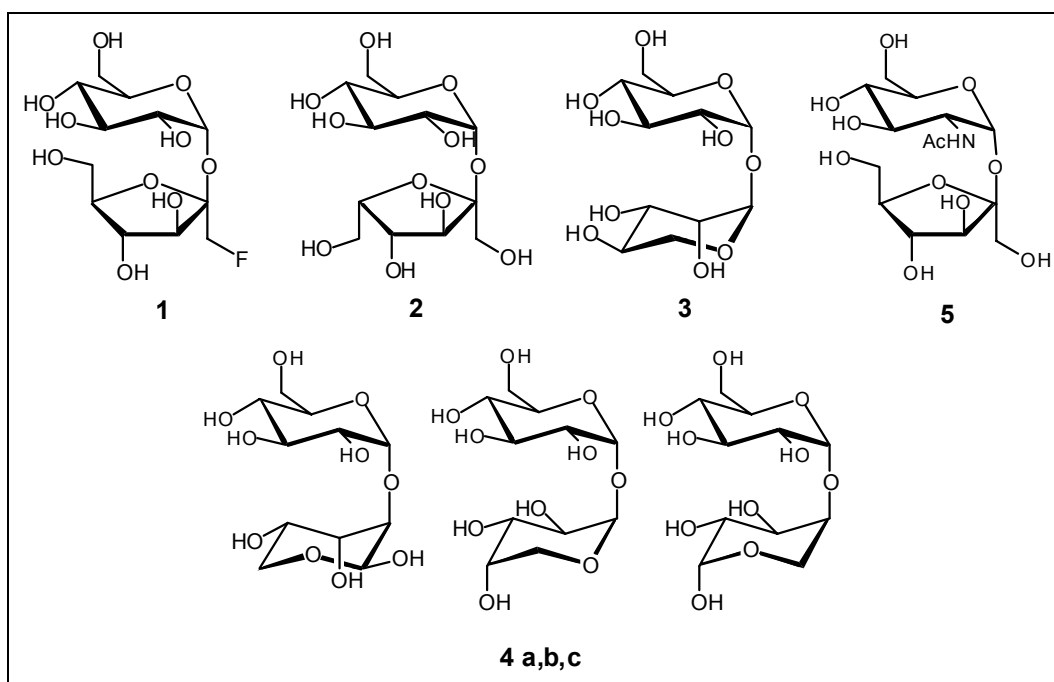


Abbildung 4.80 Enzymatisch Dargestellte Saccharose-Analoga. 1 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose, 2 α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranosid, 3 α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid, 4a,b,c α -D-Glucopyranosyl-L-arabinose, 5 N-Acetylsaccharosamin.

Die Ergebnisse der präparativen Synthesen sind in Tabelle 4.24 zusammengefasst.

Tabelle 4.24 Ergebnisse der präparativen Umsetzung nicht-natürlicher Substrate.

Produkt	Synthese- ausbeute [%]	Enzyme produktivität ^[a] [mg U ⁻¹]	Raum-Zeit- Ausbeute [g l ⁻¹ d ⁻¹]	Gesamtausbeute [%]	Ausbeute [g]
1	100 ^[b]	25	0,6	86 ^[b]	0,86
2	81 ^[c]	3,5	1,1	35 ^[c]	0,079
3	81 ^[c]	6,9	2,6	69 ^[c]	0,160
4 a,b,c	59 ^[c]	0,6	0,6	31 ^[c]	0,077
5	98 ^[c]	0,8	1,1	55 ^[c]	0,188

^[a] mg gebildetes Produkt pro Unit rekombinanter SuSy1, ^[b] bezogen auf das Akzeptorsubstrat, ^[c] bezogen auf das Donorsubstrat.

4.4 Untersuchung der Saccharose-Analoga auf Hydrolyse durch Invertase

Die erhaltenen Saccharose-Analoga wurden auf ihre Hydrolysierbarkeit durch Invertase untersucht. Disaccharide wie 1-Desoxy-1-fluorosaccharose, die nicht durch Invertase gespalten werden, sind besonders wertvoll für Untersuchungen zur Signaltransduktion und Saccharosetransport in Pflanzen (vgl. Kapitel 1.2.3.)

Zur Untersuchung der Disaccharide auf Hydrolyse durch Invertase wurde der fotometrische Test zur Saccharose/Glucose-Bestimmung dahin gehend umgestellt, dass die Extinktion bei 405 nm kontinuierlich gemessen werden konnte. Die Bildung von Glucose wurde über einen Zeitraum von einer Stunde verfolgt. Für den Test wurden 0,05 mM des jeweiligen Disaccharids eingesetzt.

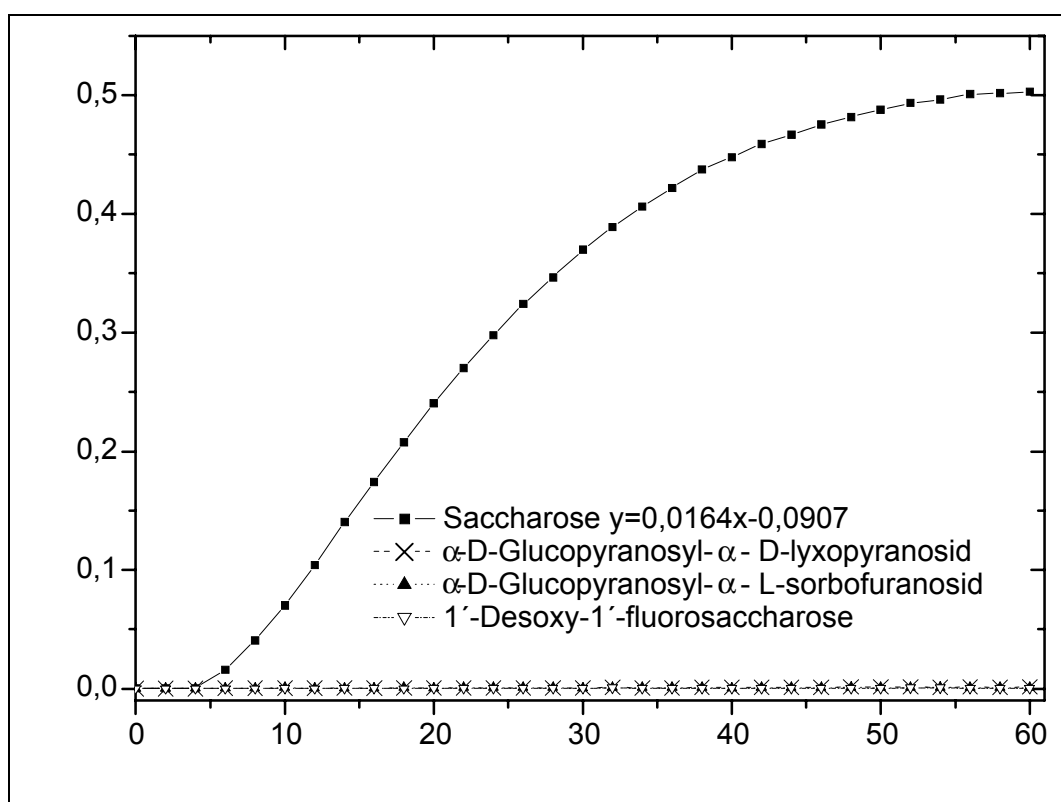


Abbildung 4.81 Untersuchung der Saccharose-Analoga α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid, α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranosid und 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose auf Hydrolyse durch Invertase im Vergleich zu Saccharose.

Aus Abbildung 4.81 geht hervor, dass die hier eingesetzte Invertase die eingesetzten Disaccharide α -D-Glucopyranosyl- β -L-sorbofuranosid, α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid und 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose nicht hydrolysieren kann. Die relativen

Restaktivitäten der Invertase liegen im Vergleich zur Saccharose (rel. Aktivität = 100 %) unter einem Prozent (siehe Tabelle 4.25). Es ist bekannt, dass die im Rahmen dieser Arbeit enzymatisch synthetisierte 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose nicht durch Invertase gespalten werden kann. Dieses Analogon wurde bereits erfolgreich in Signaltransduktionsstudien eingesetzt (Sinha et al. 2002). Für das Disaccharid α -D-Glucopyranosyl- β -L-sorbofuranosid stellten bereits Hassid und Doudoroff (Hassid and Doudoroff 1950) fest, dass es nicht durch Invertase gespalten werden kann.

Auch das L-Arabinose Disaccharidgemisch kann nicht durch Invertase hydrolysiert werden. Dies wird aus Abbildung 4.82 ersichtlich.

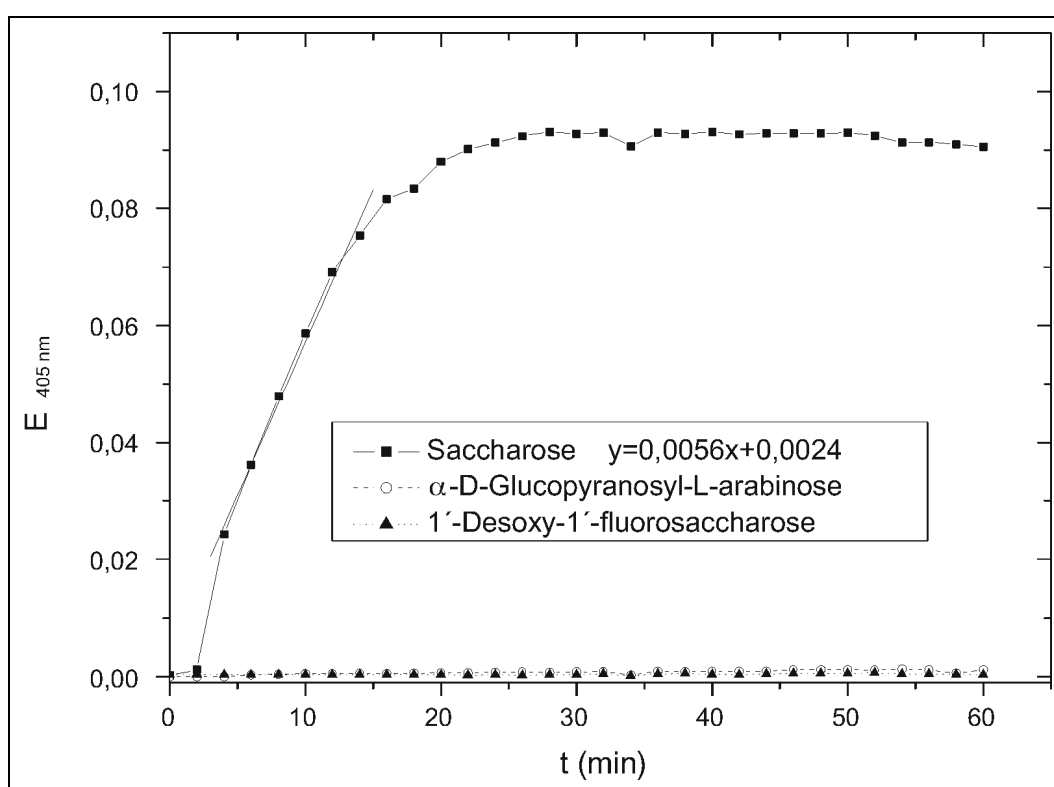


Abbildung 4.82 Untersuchung der hydrolytische Aktivität von Invertase gegenüber den Saccharose-Analoga α -D-Glucopyranosyl-L-arabinose und 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose im Vergleich zu Saccharose.

Auch hier ist eine Restaktivität von unter einem Prozent zu beobachten (vgl. Tabelle 4.25).

Da das Glucosenachweis-Reagenz keine Reaktion mit *N*-Acetylglucosamin zeigte, musste zur Untersuchung des Disaccharids *N*-Acetylsaccharosamin ein anderer Test herangezogen werden. Der Nachweis, der bei der hydrolytischen Spaltung frei werdenden D-Fructose, erfolgte über einen NADP/NADPH-gekoppelten Enzymtest bei 340 nm. Die Dissacchride wurden jeweils zu 0,1 mM im Test eingesetzt. Als zu-

sätzliche Kontrolle wurde eine Probe mit Wasser, anstelle des Substrats, mitgeführt, um die unspezifische Absorption zu verfolgen.

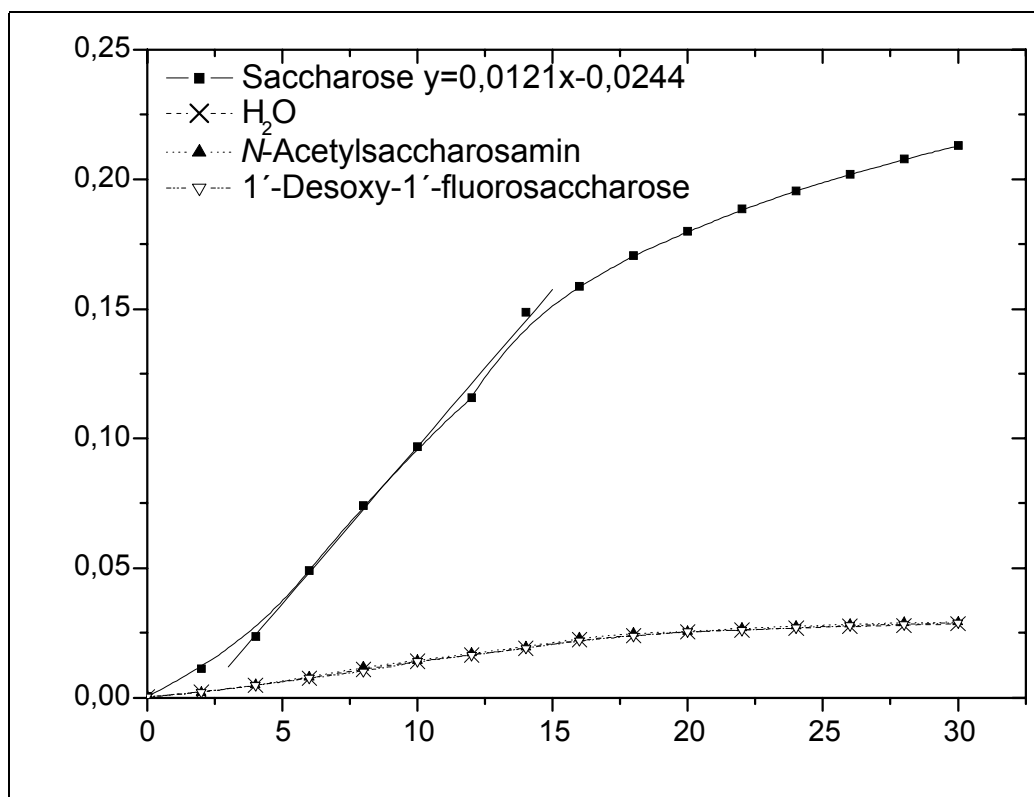


Abbildung 4.83 Untersuchung der hydrolytische Aktivität von Invertase gegenüber den Saccharose-Analoga *N*-Acetylsaccharosamin und 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose im Vergleich zu Saccharose und H₂O.

Wie aus Abbildung 4.83 hervor geht, kann auch dieses Disaccharid nicht durch Invertase gespalten werden.

In Tabelle 4.25 sind die Ergebnisse der Untersuchungen zur hydrolytischen Spaltaktivität der Invertase gegenüber den Saccharose-Analoga zusammen gefasst. Die Tatsache, dass die Disaccharide durch Invertase nicht spaltbar sind, macht sie zu wertvollen Substanzen für den Einsatz in pflanzenphysiologischen Untersuchungen.

Tabelle 4.25 Hydrolytische Aktivität der Invertase gegenüber verschiedenen Disacchariden im Vergleich zu Saccharose.

Disaccharid	rel. Aktivität [%]
Saccharose	100
1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose	< 0,1
α -D-Glucopyranosyl- β -L-sorbofuranosid	< 0,1
α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid	< 0,2
α -D-Glucopyranosyl-L-arabinose	< 0,4
<i>N</i> -Acetylsaccharosamin	0

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die rekombinante Saccharose Synthase 1 aus Kartoffel eingehend biochemisch charakterisiert und zur Synthese von Saccharose-Analoga genutzt werden.

Um ausreichend Mengen des Enzyms zu erhalten wurde der rekombinante *Saccharomyces cerevisiae* Stamm, der die genetische Information zur Produktion von SuSy enthält, von der Kultivierung im Schüttelkolben auf die Fermentation im 30 l-Maßstab umgestellt. Die Volumenausbeute konnte hierdurch um den Faktor 3 gesteigert werden. Die Aufreinigung des Enzyms erfolgte in drei Schritten bis zur Homogenität.

Neben der Bestimmung der kinetischen Daten des Enzyms (siehe Tabelle 4.8), wurden Modelle für den Mechanismus des Enzyms erstellt. Anhand der in dieser Arbeit ermittelten kinetischen Daten wird als kinetisches Modell ein sequenzieller Iso-Ordered-Bi-Bi-Mechanismus vorgeschlagen.

Die Untersuchung des Einflusses von zweiwertigen Metallkationen auf Saccharose Synthase 1 zeigte, dass Cu^{2+} , Ni^{2+} und Zn^{2+} sehr starke Inhibitoren des Enzyms sind.

Weiterhin wurde ein umfangreiches Akzeptorsubstratscreening von über 40 Ketosen und Aldosen, deren Analoga und Inhibitoren, sowie das Screening neuer Donorsubstrate durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurden Modellvorstellung zur Substraterkennung und Produktbildung entwickelt.

Es konnte gezeigt werden, dass Saccharose Synthase 1 aus Kartoffel ein sehr breites Akzeptorsubstratspektrum bezüglich der Ketosen als auch der Aldosen besitzt. Für Ketosen wurde deutlich, dass die 3*S*,4*R*-Konfiguration der Hydroxylgruppen der D-Fructose für die Akzeptanz weiterer Ketosen entscheidend ist. Kinetische Untersuchungen der Ketosen 1-Desoxy-1-fluorofructose, L-Sorbose und D-Xylulose zeigten, dass der Austausch der Hydroxylgruppe an C-1 wenig Einfluss auf die Substraterkennung und Reaktionsgeschwindigkeit hat. Jedoch führen Änderungen der Konfiguration der OH-Gruppe an C-5 (L-Sorbose) oder völliger Wegfall dieser (D-Xylulose) zu einem starken Abfall der Substrataffinität und Reaktionsgeschwindigkeit.

Aus dem Inhibitorscreening konnten wichtige Erkenntnisse zur Substraterkennung gewonnenen werden. Es wurden verschiedene Strukturanaloga der D-Fructose untersucht. 5-Desoxy-D-fructose, ein Analogon der β -D-Fructopyranose, wurde als ein starker kompetitiver Inhibitor zu D-Fructose identifiziert. Dies führte zu dem Schluss,

dass die pyranoid Form des Substrates erkannt wird. Über die offenkettige Form wird ein furanoides Ringsystem gebildet, das für die Produktbildung benötigt wird. Dies wurde durch Inhibitionsstudien an DMDP, einem Analogon zur Fructofuranose, und an 2-Keto-3*S*,4*R*-dihydroxyhexan, ein Analogon der linearen Form, belegt.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden im Screening Aldosen eingesetzt. Es wurden vier verschiedene Pentosen und acht Hexosen als Akzeptoren identifiziert. Sowohl die 1C_4 als auch 4C_1 -Sesselkonformation von α -D- und α -L-Aldosen werden vom Enzym erkannt. Die Akzeptanz einer Aldose wird durch eine flexible Sesselkonformation begünstigt. Entscheidend für eine Akzeptanz einer Aldose sind die isosterische Übereinstimmung der Hydroxylgruppen mit denen der β -D-Fructopyranose in der 1C_4 -Sesselkonformation sowie die Lage des Ringsauerstoffes. Das entwickelte Modell eignet sich zur Vorhersage der regiospezifischen Anbindung des Donors an den Akzeptor. Dies konnte an den präparativ umgesetzten und charakterisierten Produkten α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid und α -D-Glucopyranosyl-L-arabinose gezeigt werden.

Das Screening von Donorsubstraten lieferte ein breites Substratspektrum. Die Donoren UDP-*N*-Acetyl- α -D-glucosamin und UDP- α -D-Galactose wurde kinetisch untersucht.

Die Verbindungen Phenyl- β -D-glucosid, *p*-Arbutin und D(-)-Salicin konnten als weitere Inhibitoren der SuSyl identifiziert werden.

Auf Basis der ermittelten kinetischen Daten der Akzeptorsubstrate 1-Desoxy-1-fluorofructose, L-Sorbose, D-Lyxose und L-Arabinose, sowie des Donorsubstrates UDP-*N*-Acetyl- α -D-glucosamin konnten effiziente enzymatische Synthesen von Saccharose-Analoga entwickelt werden. Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Saccharose-Analoga sind nicht durch Invertase hydrolysierbar. Dies macht sie zu besonders wertvollen Substanzen für den Einsatz in Signaltransduktionsstudien in Pflanzen. Das Produkt 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose wurde bereits erfolgreich in Signaltransduktionsstudien (Sinha et al. 2002) und Transportstudien eingesetzt.

6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten viele neuer Erkenntnisse über die rekombinante Saccharose Synthase1 gewonnen werden. Es ist von Interesse, die aus dieser Arbeit hervorgegangenen Erkenntnisse und entwickelten Theorien weiter zu untermauern.

So konnte die Proteinphosphorylierung der rekombinanten SuSy1 in dieser Arbeit nicht eindeutig festgestellt werden. Hier sollten sich weitere Untersuchungen anschließen, entweder durch einen verbesserten Antikörpertest oder durch die Massenspektrometrie von Spaltstücken der rekombinanten SuSy1. In diesem Zusammenhang ist auch ein Vergleich zu einer in *E. coli* rekombinant vorliegenden SuSy1 wichtig. Dieser Vergleich kann Erkenntnisse dazu liefern, ob eine mögliche Phosphorylierung des Hefe Enzyms einen Einfluss auf die Substrataffinität der natürlichen Donor- und Akzeptorsubstrate sowohl in Spalt- als auch der Syntheserichtung hat.

Im Hinblick auf die kinetische Charakterisierung sollte die Spaltreaktion weitergehend untersucht werden. Zur Bestätigung des in dieser Arbeit ermittelten Iso-Ordered-Bi-Bi-Mechanismus, sind weiterführende Substrat-Enzym-Bindungsstudien wichtig.

Zusätzliche präparative Umsetzungen, speziell von Akzeptoren, die nach dem vorgestellten Modell nur ein Produkt ergeben, würden ein tieferes Verständnis für die Zusammenhänge zwischen Enzym und Substrat erlauben. Die spektroskopischen Daten könnten dann die in dieser Arbeit entwickelten Modellvorstellungen belegen.

In diesem Zusammenhang ist auch die Kristallisation der Saccharose Synthase von großem Interesse. Die Kristallstruktur kann sehr wichtige Einblicke zur Substratbindung, Substraterkennung und zum enzymatischen Reaktionsmechanismus liefern. Die Kokristallisation mit dem sehr guten Inhibitor 5-Desoxy-D-fructose und weiterer Inhibitoren können in diesem Zusammenhang wertvolle Erkenntnisse liefern.

Die Kristallstruktur eröffnet neue Wege um das Akzeptor- und/oder Donorsubstratspektrum zu erweitern. Durch gezielten Austausch von Aminosäuren im katalytisch aktiven Zentrum könnte die Substratspezifität verändert werden. Ein neues erweitertes Substratspektrum zur Synthese neuer Saccharose-Analoga könnte gewonnen werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass auch in Zukunft ein großes Interesse besteht neue Saccharose-Analoga, insbesondere Fluor und ¹³C-markierte Analoga, für pflanzenphysiologische Untersuchungen bereitzustellen.

7 Anhang

7.1 SD-Medium

Die Zusammensetzung des SD-Mediums (Angabe pro Liter):

2 µg Biotin	40 µg Kupfersulfat
400 µg Calciumpantothenat	100 µg Kaliumiodid
2 µg Folsäure	200 µg Eisenchlorid
2 mg Inositol	400 µg Mangansulfat
400 µg Niacin	200 µg Natriummolybdat
200 µg p-Aminobenzoessäure	400 µg Zinksulfat
400 µg Pyridoxinhydrochlorid	1 g Kaliumdihydrogenphosphat
200 µg Riboflavin	0,5 g Magnesiumsulfat
400 µg Thiaminhydrochlorid	0,1 g Natriumchlorid
	0,1 g Calciumchlorid
	5 g Ammoniumsulfat
	500 µg Borsäure

7.2 Chemikalien und Enzyme

Acros, Geel, Belgien

D-Lyxose

Aldrich, Steinheim

L-Arabinose

Beckman-Coulter, Unterschleißheim

Capillary Performance Run Buffer A

Biomol, Hamburg

Nicotinadenindinucleotid, oxidierte Form

BioRad, München

AG W50-X8 (200-400 mesh), Biogel P2 extra fine, Biotin-Marker broad range, β -Galactosidase aus *E. coli*, Precision Pre-Stained Marker broad range, PVDF-Membran

Calbiochem/Novabiochem

1-Desoxynojirimycin, Phosphoserin Detection Kit

Chemicon International, Hofheim

ChemiBlot Immunoblotting Kit Anti-Mouse

Fluka, Buchs, Schweiz

p-Arbutin, D-Erythrose, Formaldehyd-Lösung L-Galactose, Naphtoresorcinol, R/S-3-Hydroxypyrrolidin, R-3-Hydroxypyrrolidin, D-Ribose, D(-)-Salicin

Hüls, Marl

PEG₄₀₀₀

Invitrogen, Paisley, UK

10 %ige Bis-Tris NuPAGE-Fertiggele, NuPAGE MOPS-Laufpuffer, 7%igen NuPAGE Tris-Acetat-Gele, NuPAGE Tris-Acetat-Laufpuffer

Merk, Darmstadt

p-Aminobenzoesäure, Ammoniumchlorid, Ammoniumsulfat, Biotin, Borsäure, Calciumchlorid, Calciumpantothenat, Cobaltchlorid, DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄, Eisen(II)chlorid, Folsäure, D-Fructose, D-Glucose, Inositol, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumiodid, Magnesiumsulfat, Manganchlorid, Mangansulfat, Natriumchlorid, Natriumhydroxid, Natriummolybdat, Niacin, Pyridoxinhydrochlorid, Riboflavin, Thiaminhydrochlorid, Zinksulfat

Pharmacia, Freiburg

Q-Sepharose FF, Superdex 200 prep grade

Roche Diagnostics, Mannheim (früher Boehringer, Mannheim)

alkalische Phosphatase aus Kälberdarm, Hexokinase, Phosphoglucose Isomerase, Glucose-6-phosphat Dehydrogenase, ABTS

Roth, Karlsruhe

Acetonitril, Calciumcarbonat, Ethanol (95%), HEPES, Kaliumhydroxid, Kupfersulfat, Methanol, Natriumcarbonat, Natriumchlorid, Saccharose, Salzsäure konz., Silbernitrat, Tris

Qiagen, Hilden

Ni-NTA super flow

Serva, Heidelberg

Dowex in Chlorid Form (1x2; 100-200 mesh), Dowex in Formiatform (1X8 200-400 mesh), TBA

Sigma, Deisenhofen

L-Allose, D-Altrose, Diphenylamin, D-Glucose, L-Glucose, D-Gulose, L-Gulose, D-Idose, L-Idose, Invertase, α -Phenylglucosid, β -Phenylglucosid, D-Sorbose, L-Sorbose, D-Talose, L-Talose, D-Threose, L-Threose, UDP (Na-Salz), UDP- α -D-Glucose (Na-Salz), UDP-Glucose-Dehydrogenase aus Rinderleber, UDP-N-Acetyl- α -D-glucosamin (Na-Salz), UDP- α -D-Glucuronsäure (Na-Salz), UDP- α -D-Xylose (Na-Salz), UDP- α -D-Galactose (Na-Salz), UDP-N-Acetyl- α -D-galactosamin (Na-Salz), D-Xylulose

persönliche Gaben

1-Desoxy-1-fluorofructose, W.Köckenberger, Magnetic Resonance Center, School of Physics and Astronomy der Universität Nottingham.

5-Desoxy-D-fructose, SFB380 Prof. Dr. Wandrey, PD Dr. Sprenger

DMDP, SFB 380 Prof. Dr. Wandrey, PD Dr. Sprenger, Prof. Dr. Fessner

2-Keto-5-hydroxyhexan SFB380 Dr. Liese

2-Keto-3,4-dihydroxyhexan, SFB 380 Dr. Müller

7.3 Geräte**Amicon, Witten**

Ultrafiltrationszelle 500 und 350 ml, Ultrafiltrationsmembranen YM 10 und YM 30

Beckman-Coulter, Unterschleißheim

Kapillarelektrophorese P/ACE MDQ Carbohydrate System, *fused silica* Kapillare(ID 50 μ m, effektive Länge 50 cm)

BioRad, München

Aminex HPX-87C (7,8 x 300 mm)

Bruker, Karlsruhe

NMR-Spektrometer Typ DRX 500

Du Pont, Bad Homburg

Zentrifuge Sorvall RC-SB mit Rotor SS 34, Rotor GSA, Rotor GS 3

Falcon, New York

Microtiterplatten 96-well microtest III

GynkoteK, Germering

HPLC-Pumpe 480, HPLC-Pumpe 300 mit analytischem und präparativen Pumpenkopf
Degaser DG1310, Probengeber GINA 50 und 160, Motorventil 94/344, Analysator
UVD 160S, Refraktometer mit analytischer und präparativer Analysenkammer

Hettich

Zentrifugen, Mikro 22 R

Infors, Bottmingen

Schüttler HF, Techfors 40 L Fermenter

Invitogen, Paisley, UK

Novex Gel- und Blottkammer, Power Supply

Leybold, Hanau

Gefriertrockner Lyovac GT3

Macherey und Nagel, Düren

HPLC-Vorsäule Nucleogel Zucker Ca

Molecular Devices, Kalifornien, USA

UV_{max} microplate reader

Netzsch

Netzsch-Mühle LME 0,5 , Netzsch-Mühle LabStar 0.1

Novex

Gelkammer, Power Supply

Pharmacia, Freiburg

Pharmacia-Säule XK 50/100, Pharmacia-Säule XK 50/60, Pharmacia-Säule XK 50/100,
Pharmacia-Säule XK 26/100, Gradi-Frac System mit HiLoadPump P-50, UV-Monitor
(UV-1) mit Durchflußzelle, Fraktionssammler, Schreiber REC 102, Peristaltikpumpe P1

Satorius, Gottingen

Waage MC 1 research RC 210 P, Waage MC 1 laboratory LC 6200 D, HPLC-Filter 0,2 μm , Celluloseacetat-Membran, Vivacell 70, Vivacell 250, Vivacellmembranen für Vivacell 70 und 250 mit MWCO 50 und 30

Schott, Mainz

pH-Elektrode

Shimadzu, Duisburg

Spektralfotometer, UV 160

Thermohypersil, Kleinostheim

Hypersil ODS 5, 125x4,6 mm

Westfalia

Kammerseparator Typ KA 02

7.4 Abkürzungen und Symbole

ABTS [®]	2.2'-Azido-bis-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ADP-Glc	Adenin-5'-diphosphat- α -D-glucose
alk. Phosphatase	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
CDP	Cytidin-5'-diphosphat
CE	Kapillarelektrophorese
CoCl ₂	Kobalt(II)chlorid
CuCl ₂	Kupfer(II)chlorid
d	Dublett
d	Tag
DC	Dünnschichtchromatografie
dd	Dublett vom Dublett
ddd	Dublett vom Dublett vom Dublett

dq	Dublett vom Quartett
dTMP	2'-Desoxythymidin-5'-monophosphat
dTDP	2'-Desoxythymidin-5'-diphosphat
dTDP-Glc	2'-Desoxythymidin -5'-diphosphat- α -D-glucose
dTDP-6d-4k-Glc	2'-Desoxythymidin -5'-diphosphat-6-desoxy-4-keto- α -D-glucose
evtl.	eventuell
Fru	D-Fructose
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GF	Gelfiltration
GOD	Glucoseoxidase
h	Stunde
HCL	Salzsäure
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
ID	Innendurchmesser
J	Kopplungskonstante
KCL	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
m	Multiplett
MgCl ₂	Magnesium(II)chlorid
MnCl ₂	Mangan(II)chlorid
min	Minute
NAD(H)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, oxidierte bzw. reduzierte Form
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₃	Ammoniak
NDP	Nucleosid-5'-diphosphat
NTP	Nucleosid-5'-triphosphat

P_i	anorganisches Phosphat
POD	Peroxidase
PEG	Polyetylglycol
ppm	parts per million
rel.	relativ
R_f -Wert	Retentionsfaktor
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s, sec	Sekunde
s	Singulett
Suc	Saccharose
SuSy	Saccharose Synthase, Succrose Synthase EC 2.1.4.13
s.u.	siehe unten
t	Triplett
TBA	Tetra-n-butylammoniumhydrogenphosphat
Tris-HCL	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UDP-Glc	Uridin-5'-diphosphat- α -D-glucose
UDP-GlcNAc	UDP-N-Acetyl- α -D-glucosamin
UDP-GlcA	UDP- α -D-Glucuronsäure
UDP-Xyl	UDP- α -D-Xylose
UDP-Gal	UDP- α -D-Galactose
UDP-GalNAc	UDP-N-Acetyl- α -D-galactosamin
UMP	Uridin-5'-monophosphat
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
z.B	zum Beispiel

7.5 Chromatogramme und Kalibriergeraden

7.5.1 HPLC-Methoden zur Trennung von Nukleotiden und Nukleotidzuckern

7.5.1.1 Trennung von Uridin, UMP, UDP und UDP-Glc

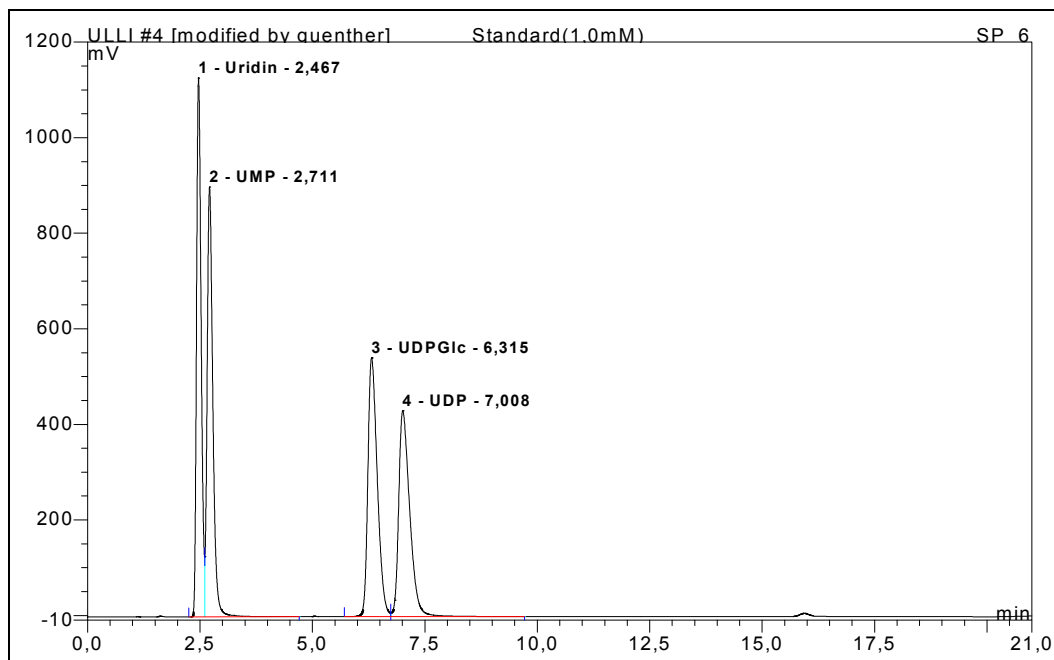


Abbildung 7.1 Beispielchromatogramm zur Trennung von Uridin, UMP, UDP-Glc und UDP.

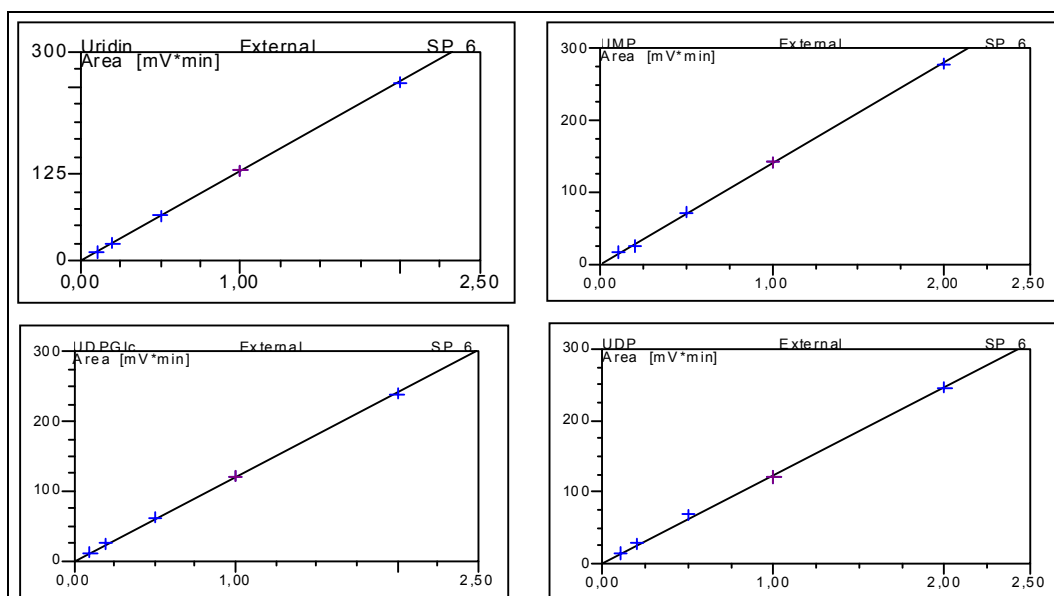


Abbildung 7.2 Kalibriergeraden von Uridin, UMP, UDP-Glucose und UDP im Konzentrationsbereich von 0-2 mM.

7.5.1.2 Trennung von Uridin, UMP, UDP und UDP-GlcNAc

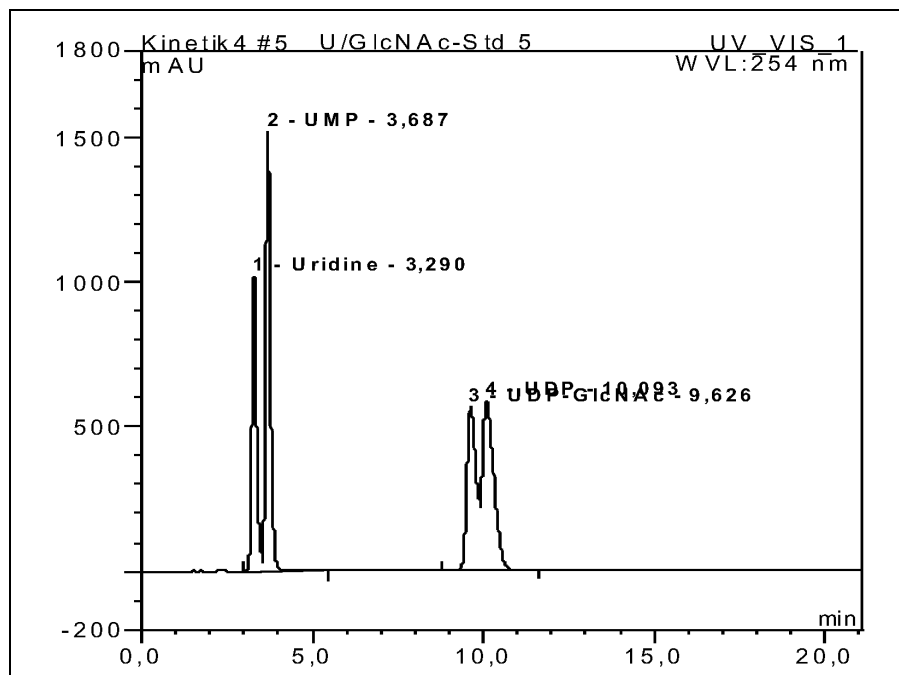


Abbildung 7.3 Beispielchromatogramm zur Trennung von Uridin, UMP, UDP-GlcNAc und UDP.

7.5.2 CE-Methode zur zur Trennung von Nukleotiden und Nukleotidzuckern

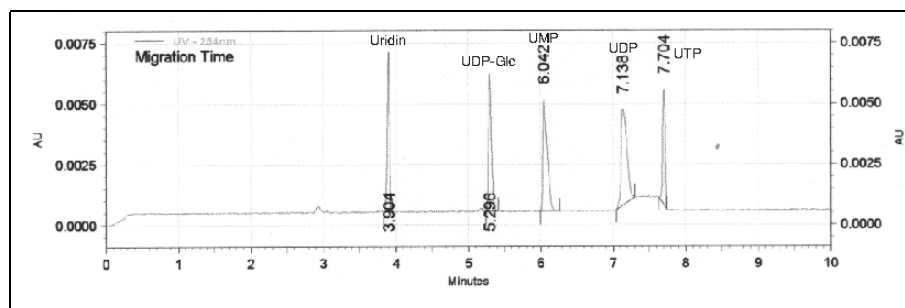


Abbildung 7.4 Beispiel-Elektropherogramm zur Trennung von Uridin, UDP-Glc, UMP, UDP und UTP.

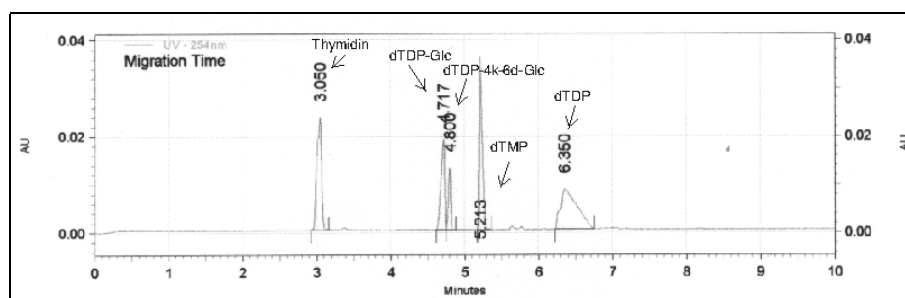


Abbildung 7.5 Beispiel-Elektropherogramm zur Trennung von Thymidin, dTDP-Glc, dTDP-6d-4k-Glc, dTMP und dTDP.

7.5.3 HPLC-Methode zur Trennung von Mono- und Disacchariden

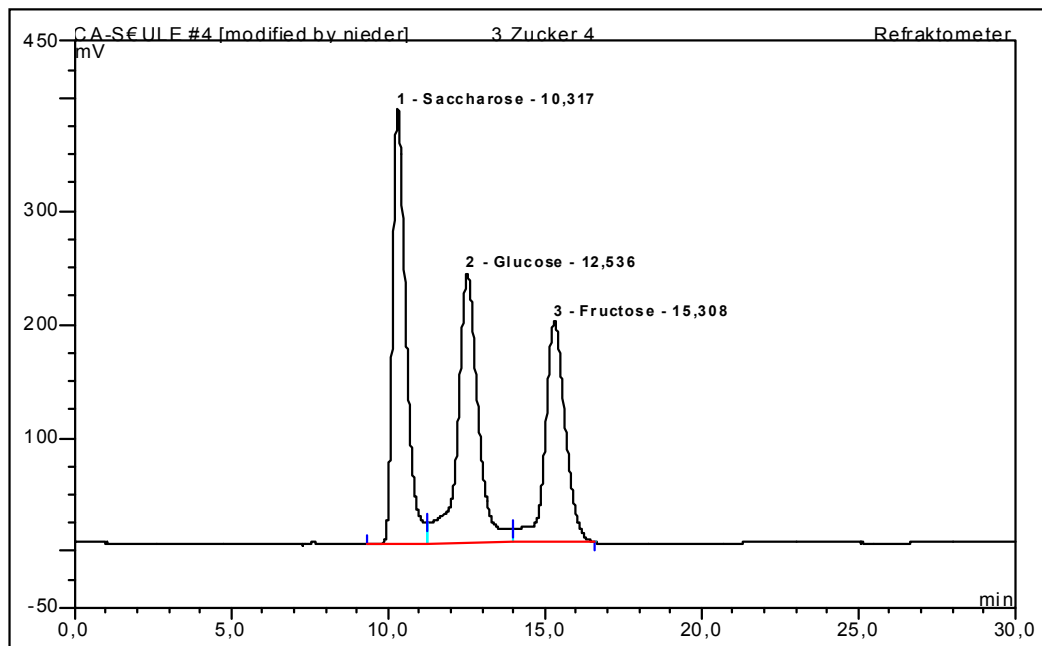


Abbildung 7.6 Beispielchromatogramm zur Trennung von Saccharose, Glucose und Fructose.

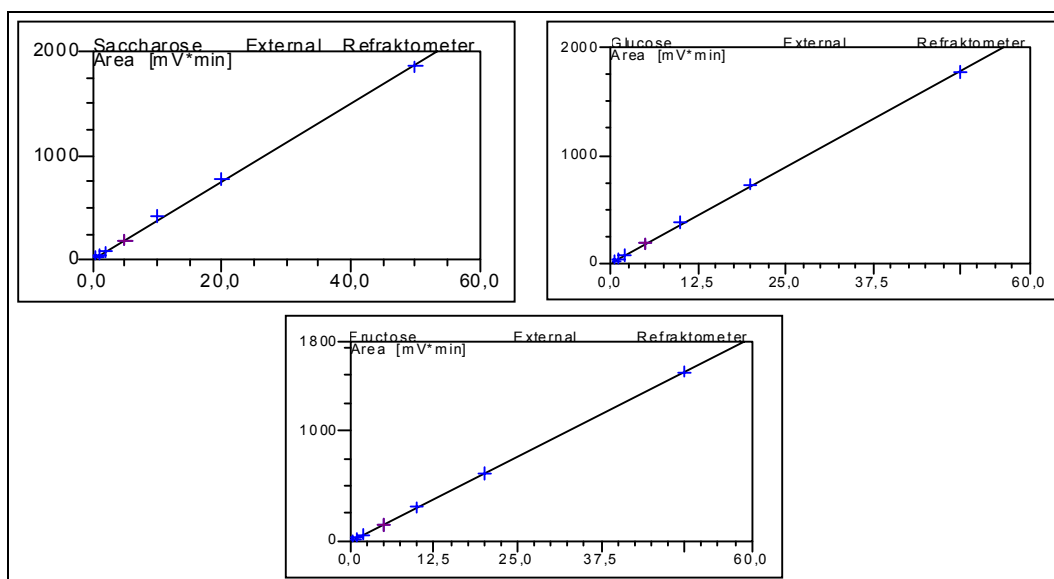


Abbildung 7.7 Kalibriergeraden für Saccharose, Glucose und Fructose im Konzentrationsbereich von 0 bis 50 mM.

7.5.4 Fotometrische Bestimmung von Glucose und Saccharose

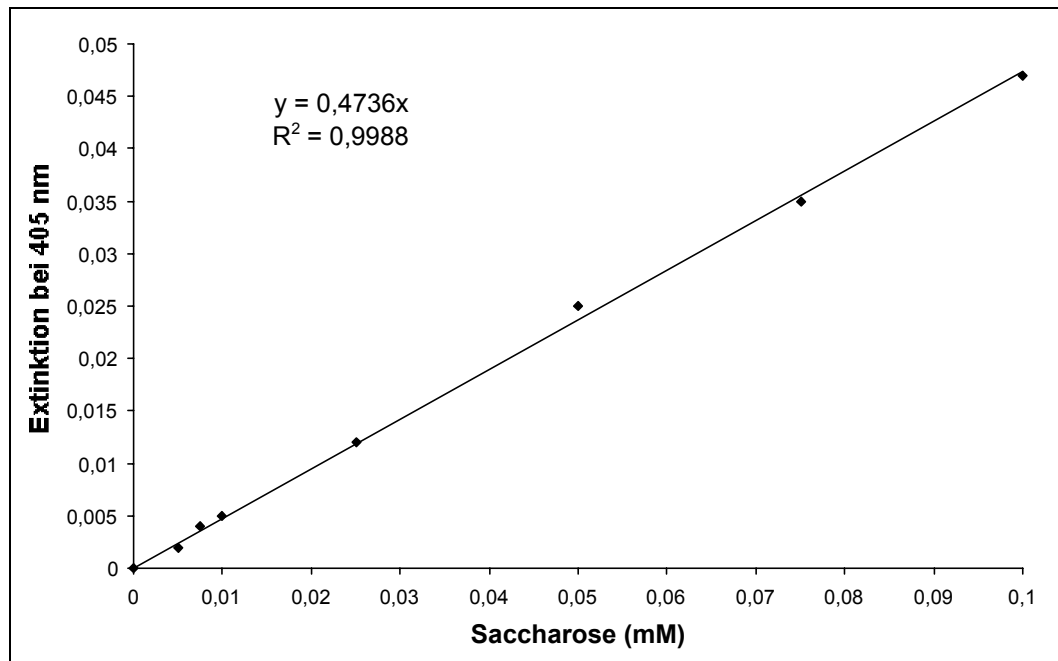


Abbildung 7.8 Kalibriergerade zur Bestimmung von Saccharose im fotometrischer Mikrotiterplattentest 0-0,1 mM Saccharose.

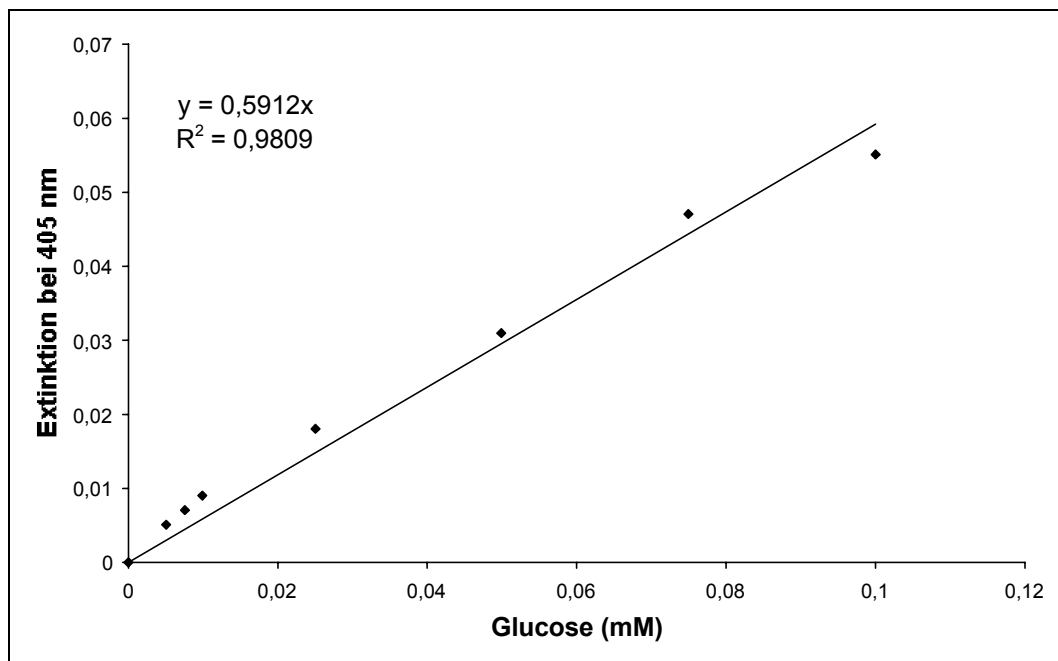


Abbildung 7.9 Kalibriergerade zur Bestimmung von Glucose im fotometrischer Mikrotiterplattentest. 0- 0,1 mM Glucose.

7.5.5 Kalibrierung zur Proteinbestimmung nach Bradford

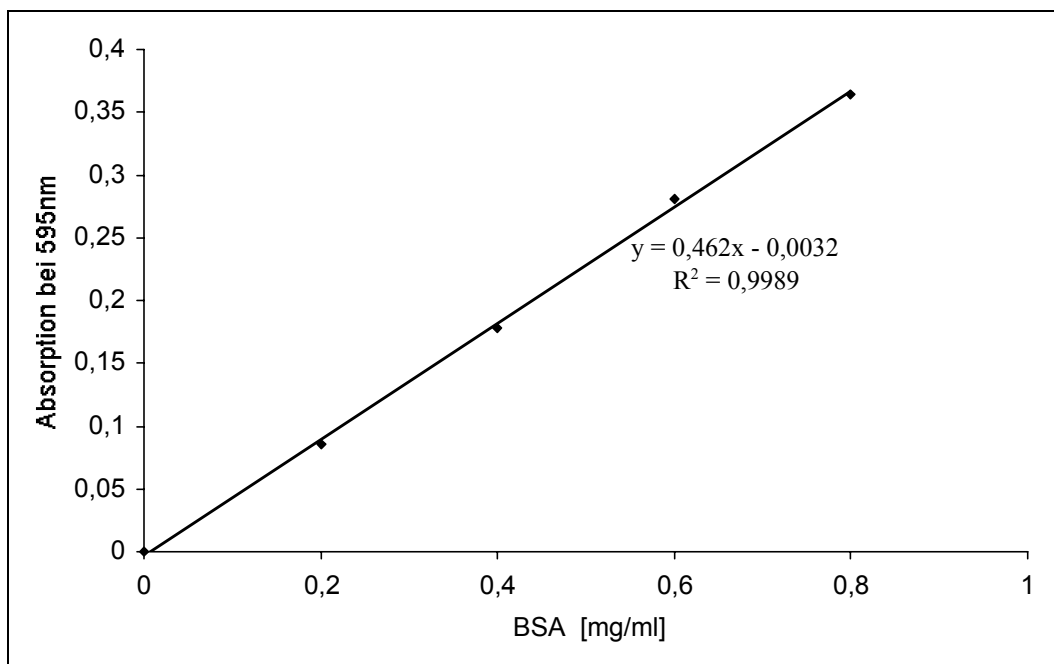


Abbildung 7.10 Kalibriergerade zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford, 0-0,8 mg/ml BSA.

7.5.6 NMR und MS-Spektren NMR-Spektren von 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose

7.5.6.1 ^1H -NMR (500 MHz, D_2O)

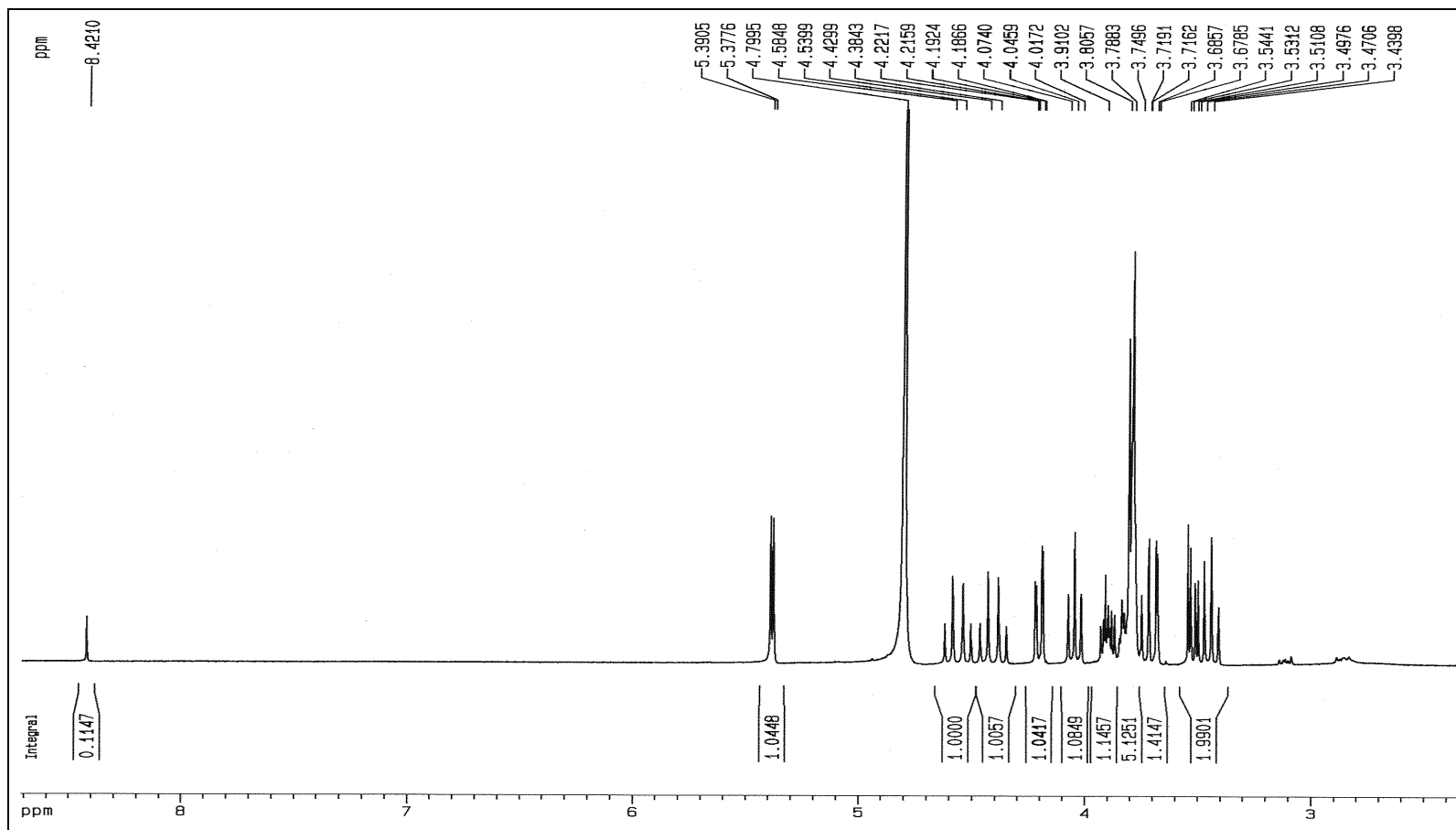


Abbildung 7.11 ^1H -NMR (500 MHz, D_2O) von 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose

7.5.6.2 ^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O)

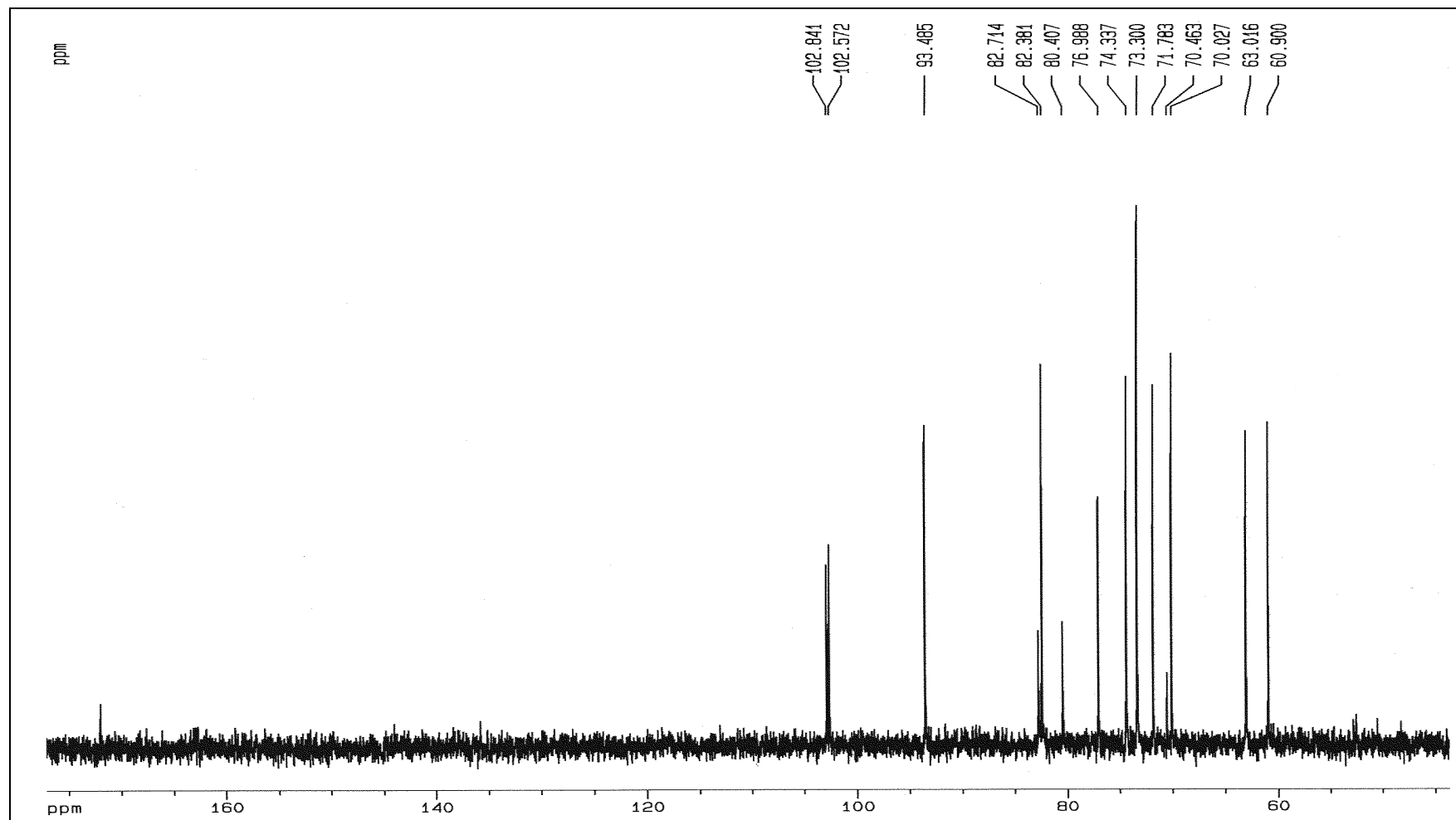
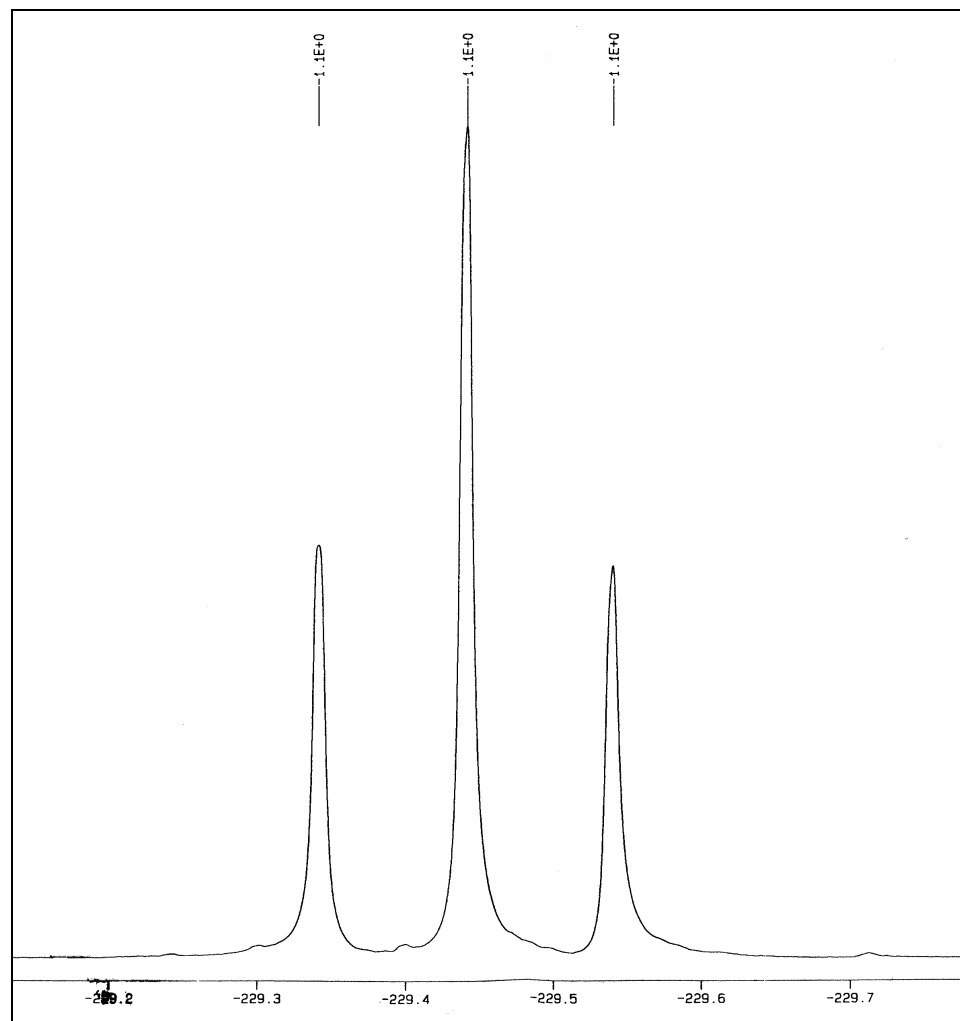


Abbildung 7.12 ^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O) von 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose.

7.5.6.3 ^{19}F -NMR (470 MHz, D_2O)Abbildung 7.13 ^{19}F -Spektrum (470 MHz, D_2O) von 1'-Desoxy-1'-fluorosaccharose

7.5.7 NMR und MS-Spektren von α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranosid

7.5.7.1 ^1H -NMR (500 MHz, D_2O)

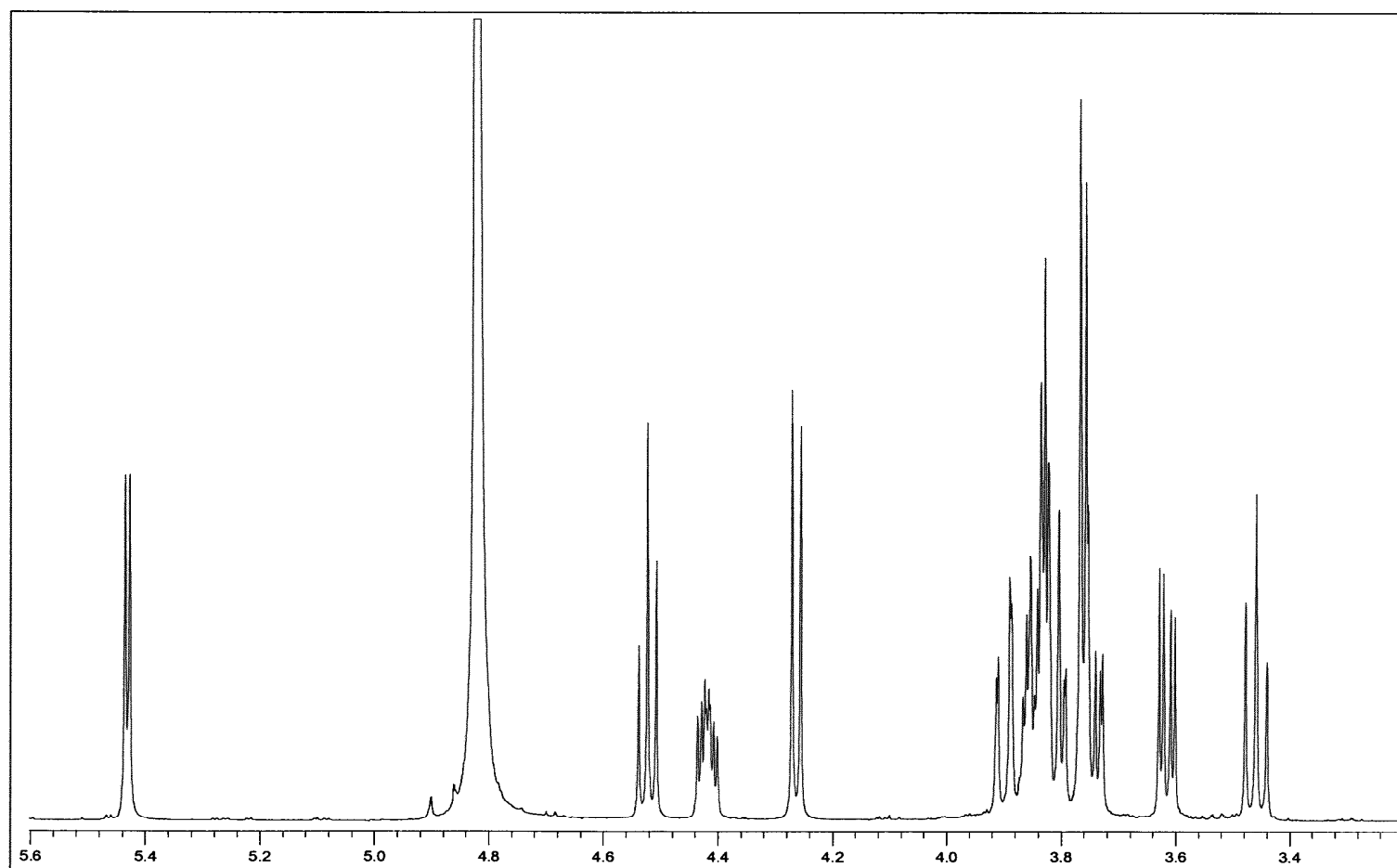


Abbildung 7.14 ^1H -NMR (500 MHz, D_2O) von α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranosid

7.5.7.2 ^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O)

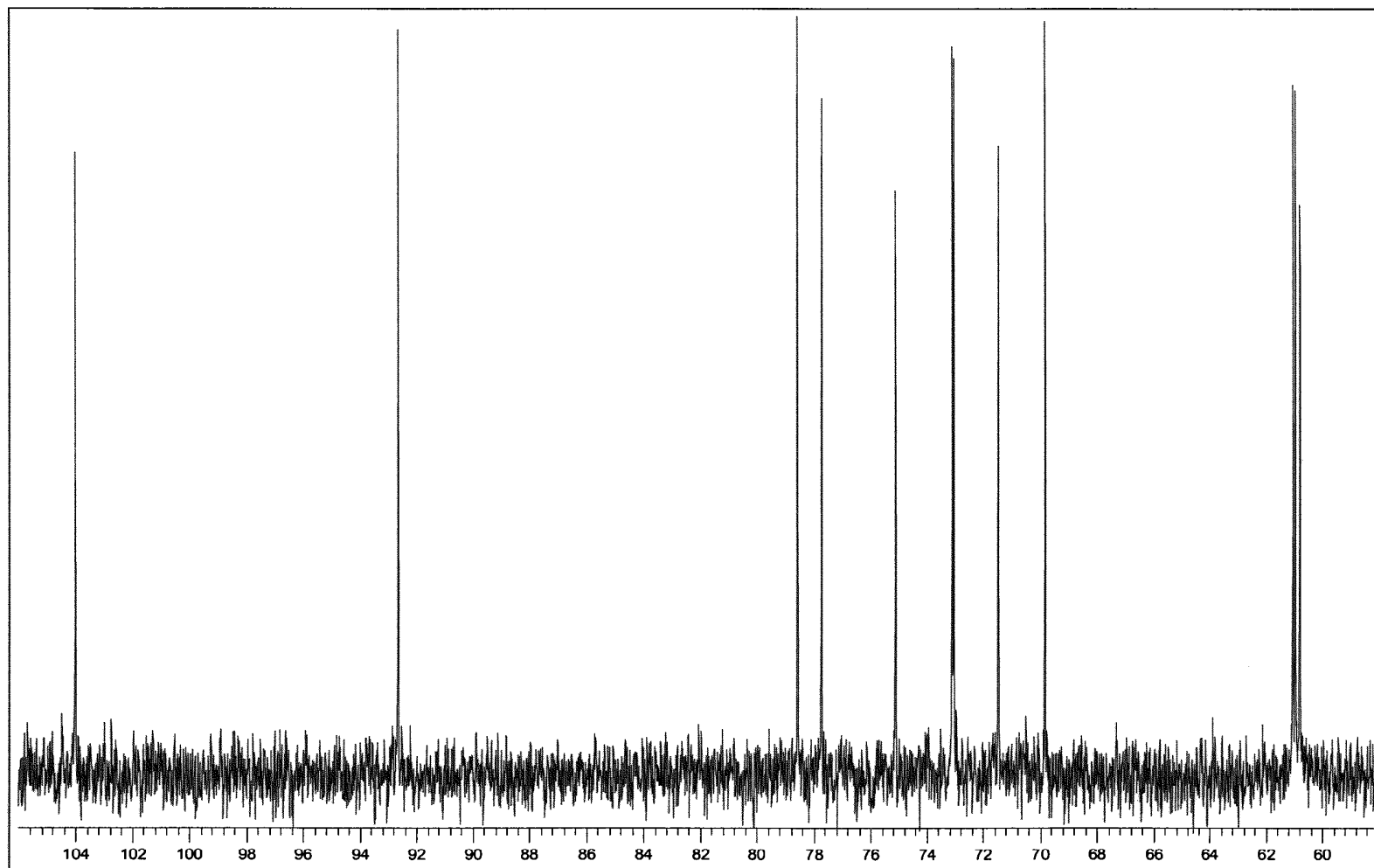
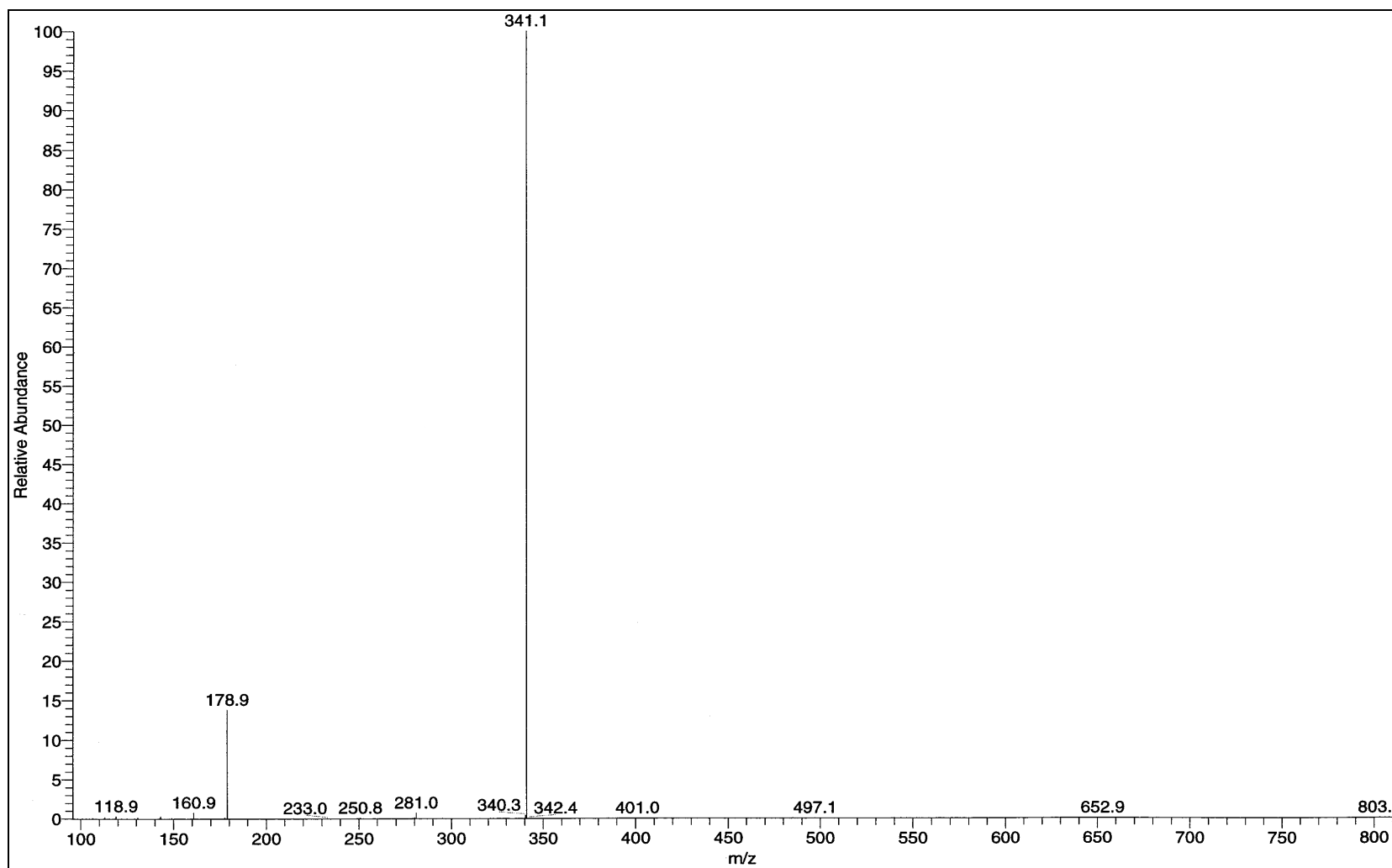


Abbildung 7.15 ^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O) von α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranosid

7.5.7.3 MS-Spektrum

Abbildung 7.16 MS-Spektrum von α -D-Glucopyranosyl- α -L-sorbofuranosid

7.5.8 NMR und MS-Spektren von α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid

7.5.8.1 ^1H -NMR (500 MHz, D_2O)

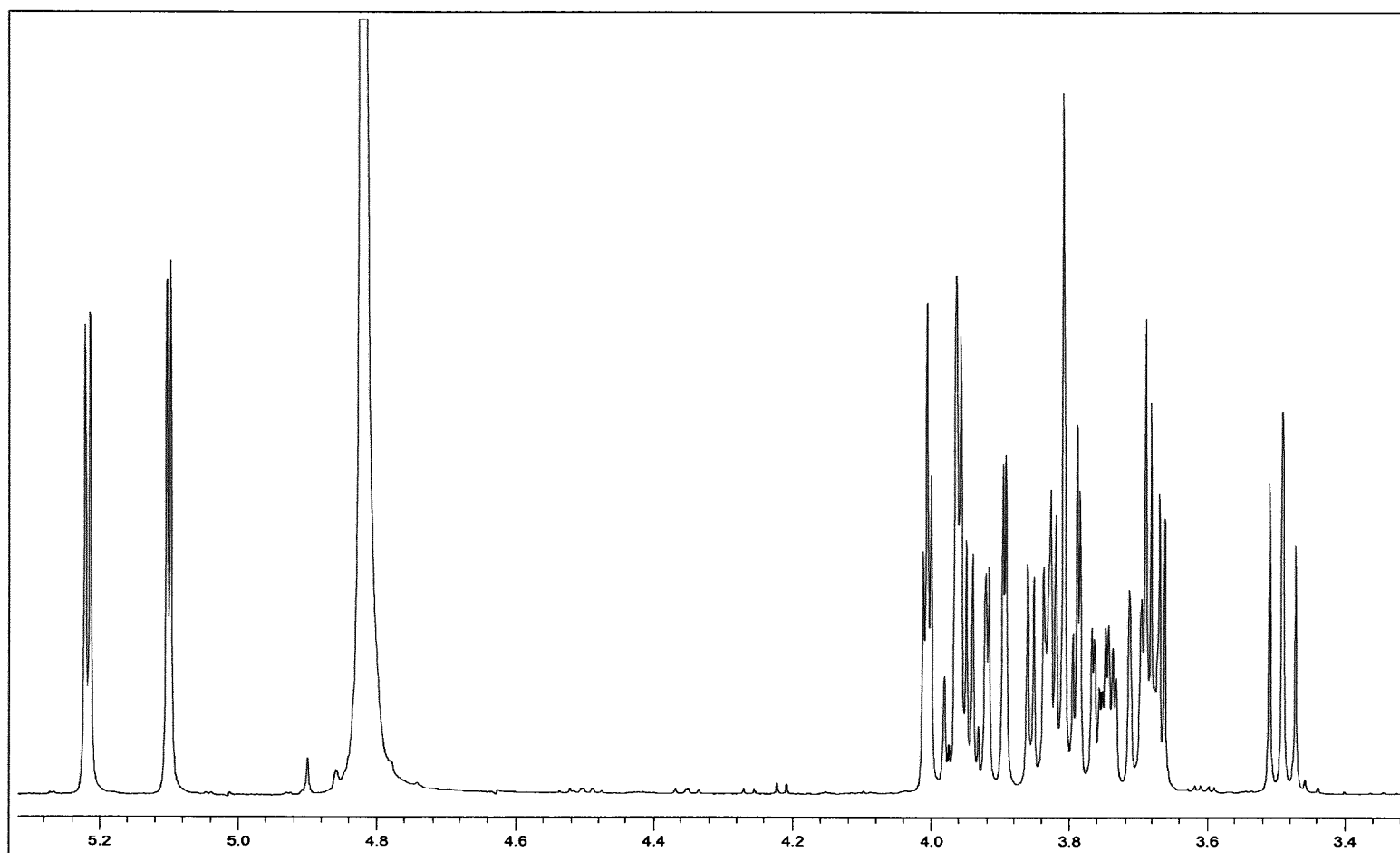
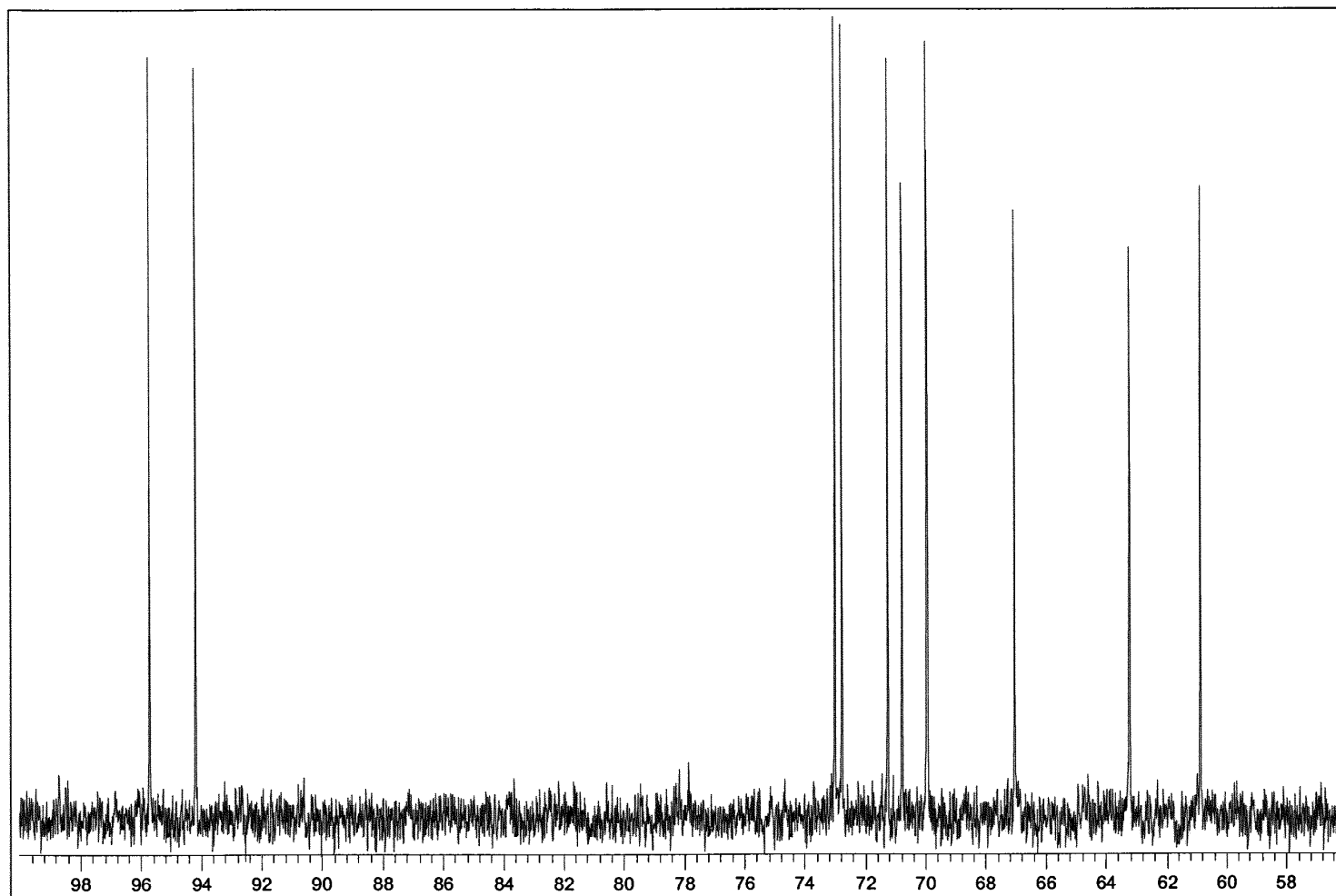


Abbildung 7.17 ^1H -NMR (500 MHz, D_2O) von α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid

7.5.8.2 ^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O)Abbildung 7.18 ^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O) von $\alpha\text{-D-Glucopyranosyl-}\alpha\text{-D-lyxopyranosid}$

7.5.8.3 MS-Spektrum

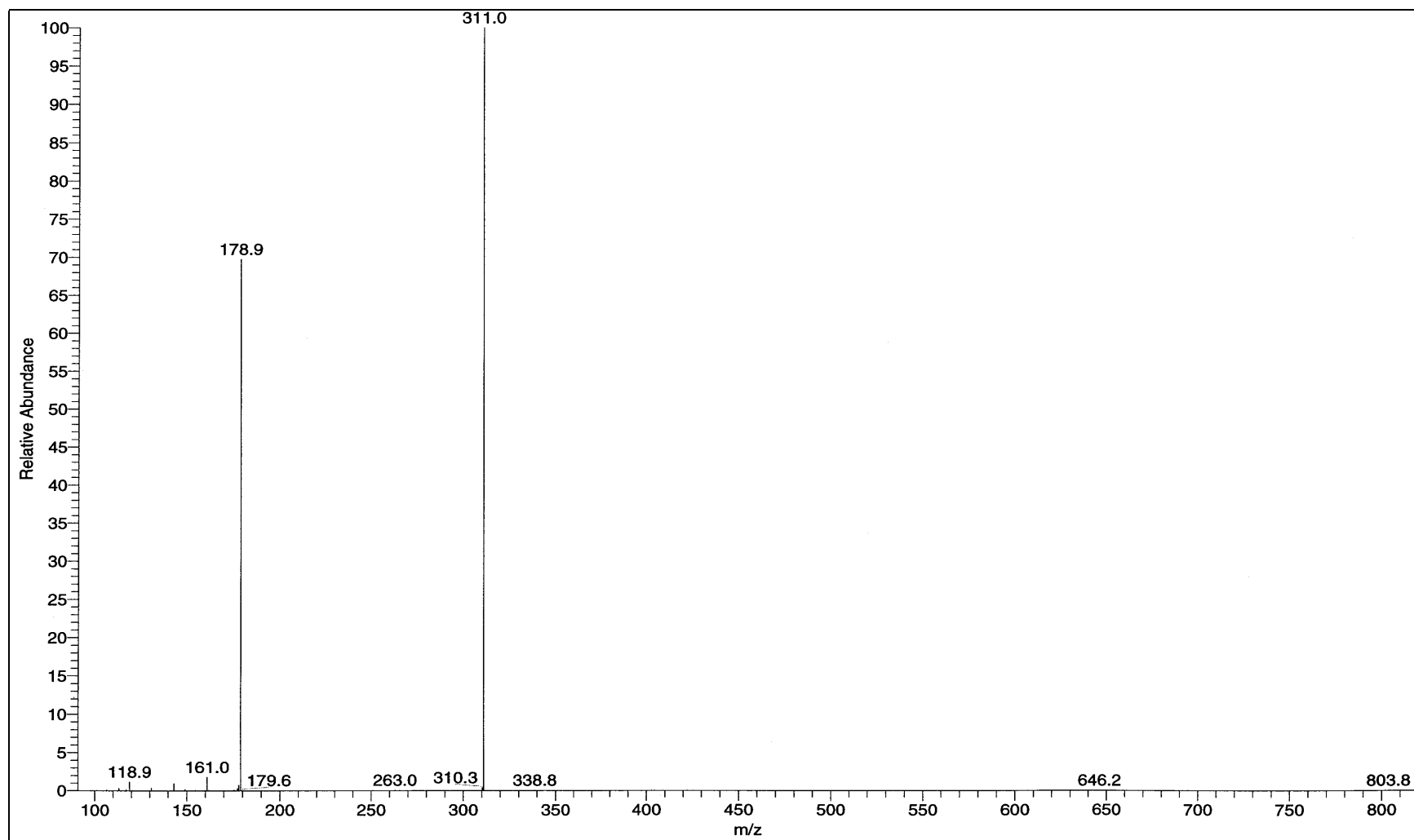


Abbildung 7.19 MS-Spektrum von α -D-Glucopyranosyl- α -D-lyxopyranosid

7.5.9 NMR -Spektren von α -D-Glucopyranosyl- L-arabinose

7.5.9.1 ^1H -NMR (500 MHz, D_2O)

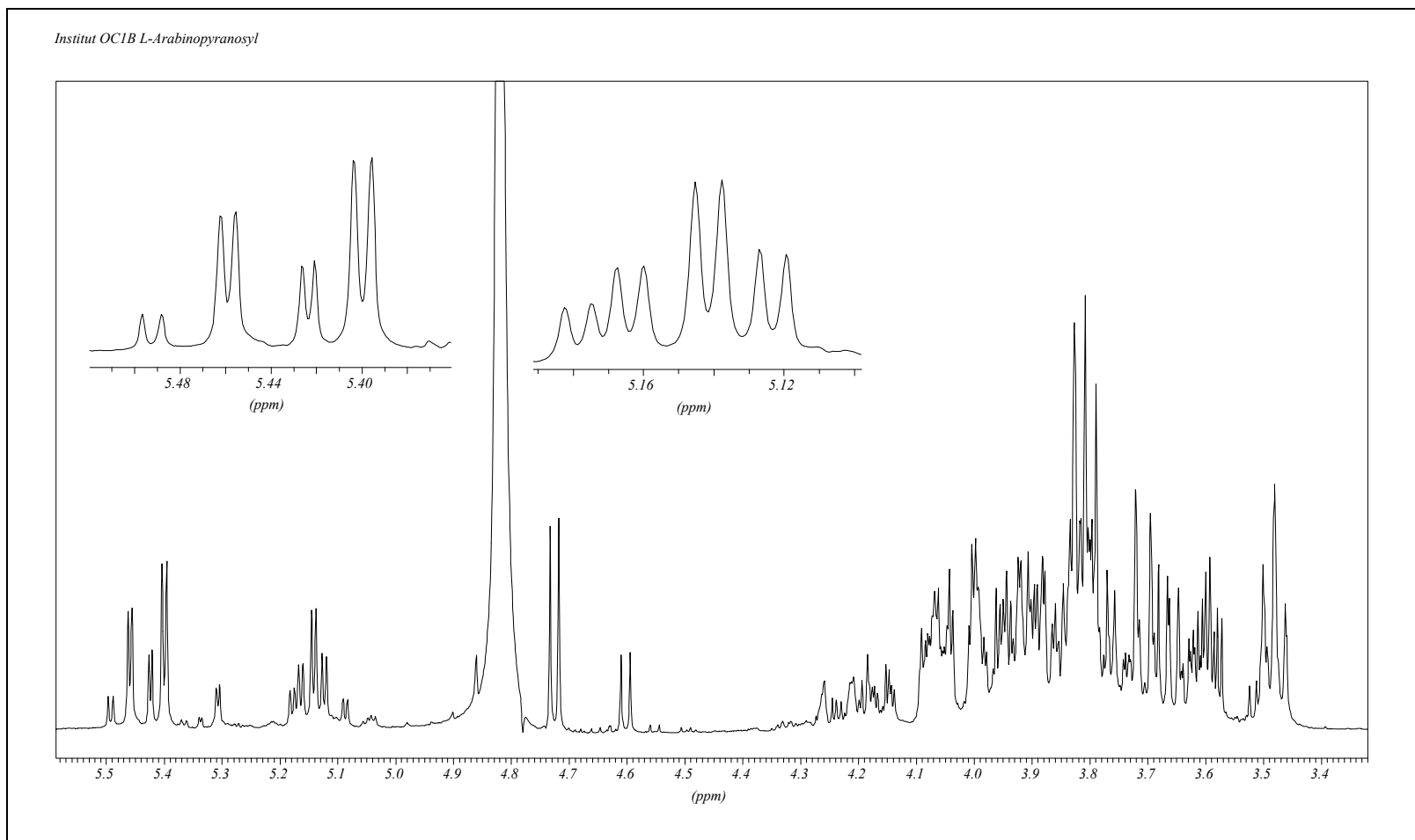


Abbildung 7.20 ^1H -NMR (500 MHz, D_2O) von α -D-Glucopyranosyl- L-arabinose

7.5.9.2 ^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O)

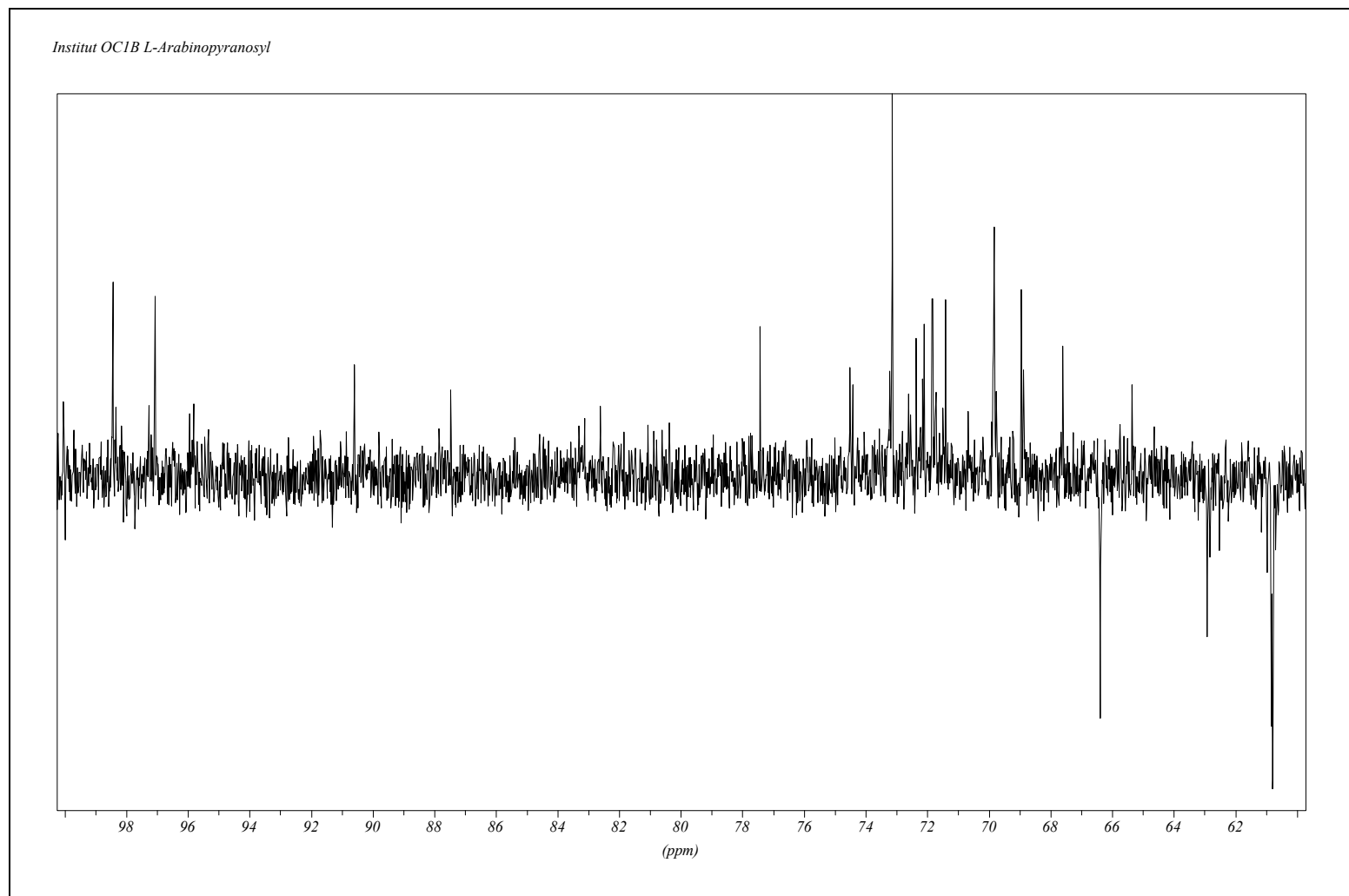


Abbildung 7.21 ^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O) von α -D-Glucopyranosyl- L-arabinose

7.5.10 NMR-Spektren von 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucopyranosyl- β -D-fructofuranosid

7.5.10.1 ^1H -NMR (500 MHz, D_2O)

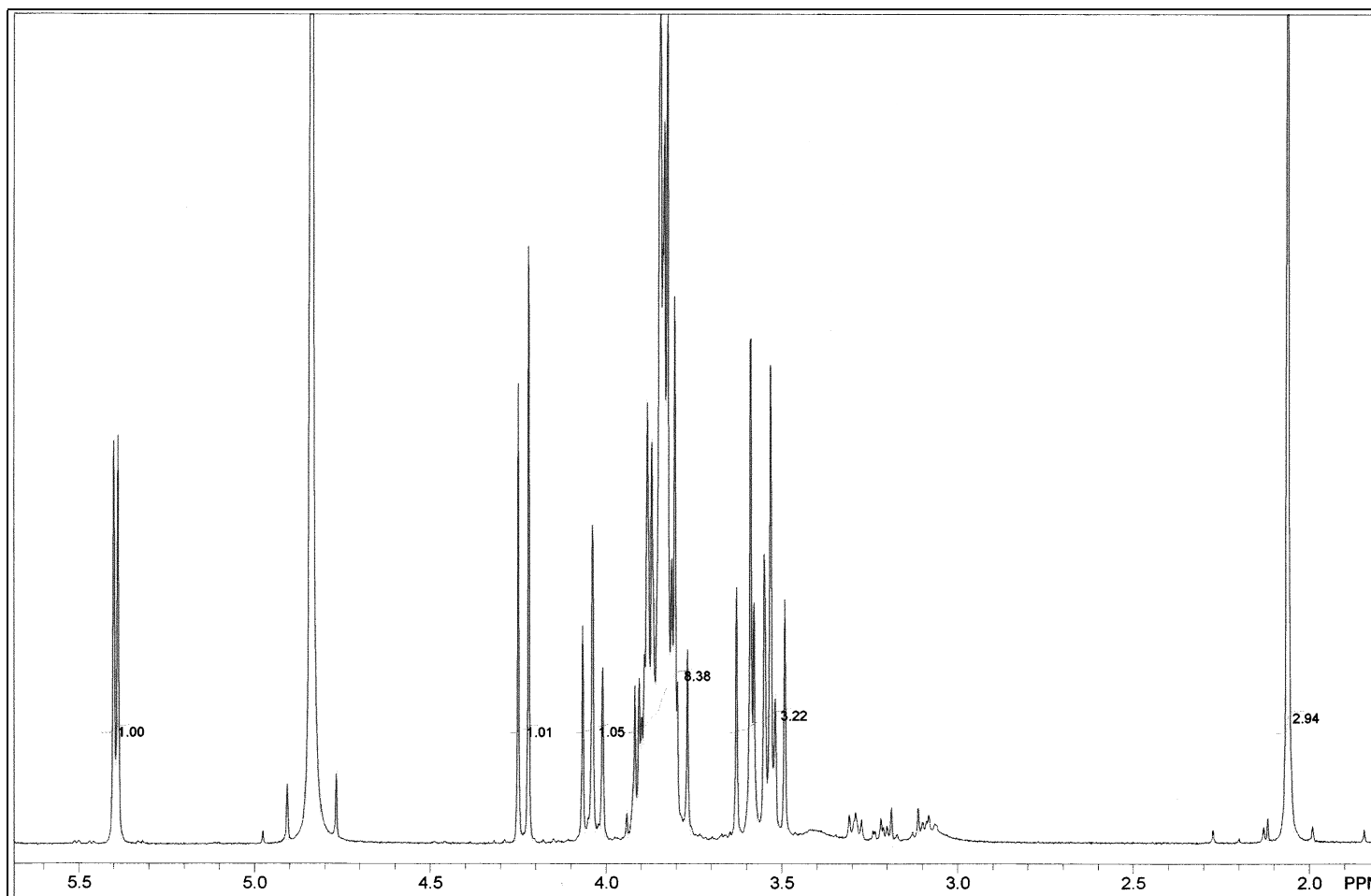
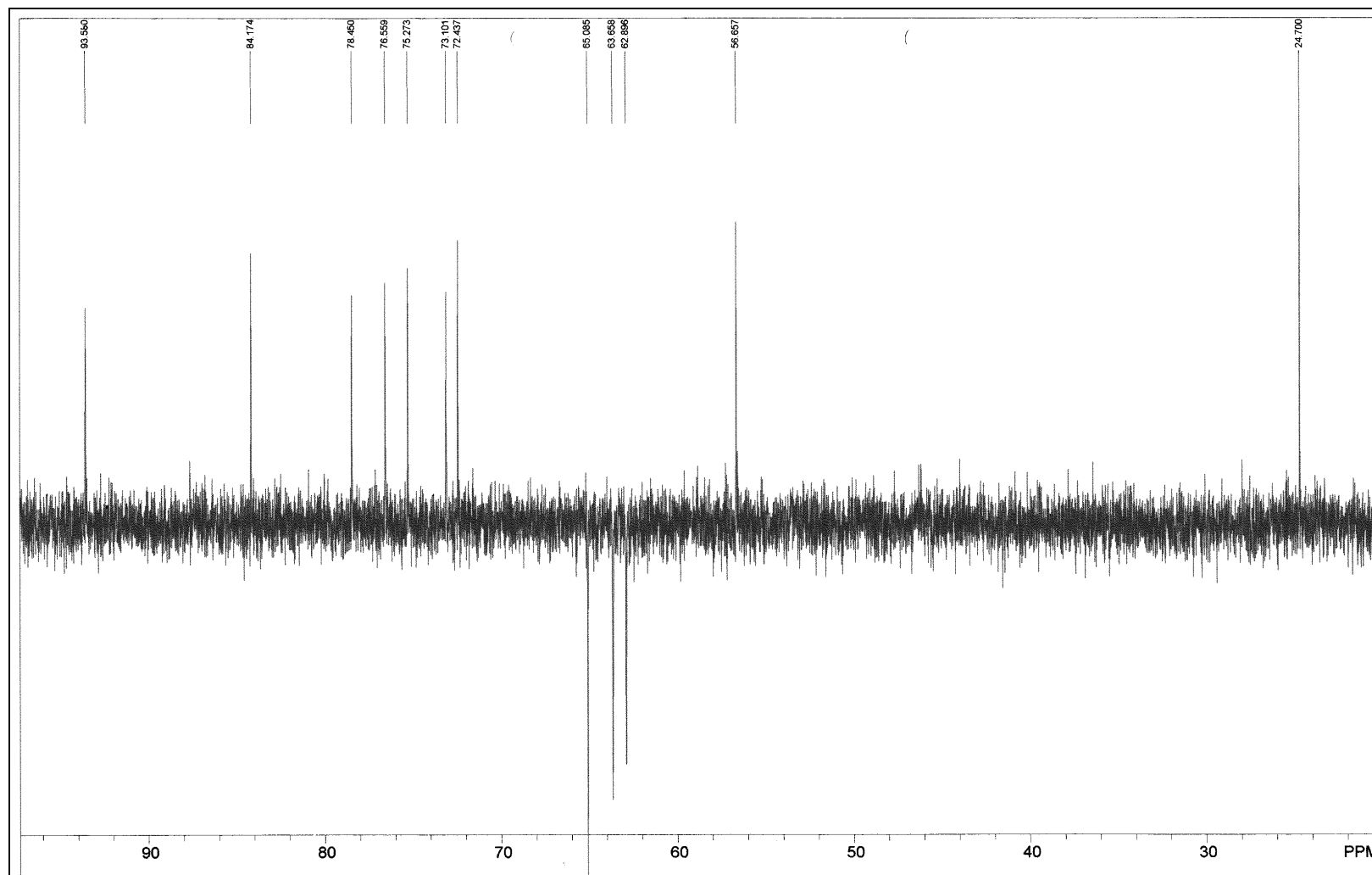


Abbildung 7.22 ^1H -NMR (500 MHz, D_2O) von 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucopyranosyl- β -D-fructofuranosid

7.5.10.2 ^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O)Abbildung 7.23 ^{13}C -NMR DEPT (125 MHz, D_2O) von 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucopyranosyl- β -D-fructofuranosid

8 Literatur

- Amann S. (1995) Enzymatische Synthese von Saccharose-Analoga mit Saccharose Synthase aus Reis. Diplomarbeit, RWTH Aachen.
- Amor Y., Haigler C.H., Johnson S., Wainscott M. & Delmer D.P. (1995) A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in the synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 9353-9357.
- Anguenot R., Yelle S. & NguyenQuoc B. (1999) Purification of tomato sucrose synthase phosphorylated isoforms by Fe(III)-immobilized metal affinity chromatography. *Arch. Bioch. Biophys.*, **365**, 163-169.
- Arnold F.H. & Haymore B.L. (1991) Engineered Metal-Binding Proteins: Purification to Protein Folding. *Science*, **252**, 1796-1797.
- Avigad G. (1982) Sucrose and other disaccharides. In: Encyclopedia of plant physiology, New Series, Carbohydrates (eds F.A. Loewus & W. Tanner), pp. 217-347. Springer Verlag, Berlin.
- Avigad G. & Millner Y. (1966) UDP-Glucose:Fructose Transglucosylase from Sugar Beet Roots. *Meth. Enzymol.*, **8**, 341-345.
- Barratt D.H.P., Barber L., Kruger N.J., Smith A.M., Wang T.L. & Martin C. (2001) Multiple, Distinct Isoforms of Sucrose Synthase in Pea. *Plant Physiol.*, **127**, 655-664.
- Bean R.C. & Hassid W.Z. (1955) Synthesis of disaccharides with pea preparations. *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 5737-5738.
- Bergmeyer H.U. & Bernt E. (1974) Bestimmung mit Glucose-Oxydase und Peroxydase. In: Methoden der enzymatischen Analyse (ed H.U. Bergmeyer), pp. 1250 - 1259. Verlag Chemie, Weinheim.
- Blum H., Beier H. & Grons H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**, 93-99.
- Bradford M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method of the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.

- Brangeon J., Nguyen-Quoc B. & Lechamy A. (1996) Ultrastructural detection of sucrose synthase distribution in developing maize leaves. *Protoplasma*, **192**, 150-158.
- Brinkmann N., Malissard M., Ramuz M., Römer U., Schumacher T., Berger E.C., Elling L., Wandrey C. & Liese A. (2001) Chemo-enzymatic synthesis of the galili epitope Gal α (1 $\rightarrow$ 3)Gal β (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc on homogeneously soluble PEG polymer by a multi-enzyme system. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 2503-2506.
- Brockhausen I., Schutzbach J. & Kuhns W. (1998) Glycoproteins and their relationship to human disease. *Acta Anat.*, **161**, 36-78.
- Buczynski S.R., Thom M., Chourey P. & Maretzki A. (1993) Tissue Distribution and Characterization of Sucrose Synthase Isozymes in Sugarcane. *J. Plant Physiol.*, **142**, 641-646.
- Bülter T., Wandrey C. & Elling L. (1997) Chemoenzymatic synthesis of UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine. *Carbohydr. Res.*, **305**, 469-473.
- Card P.J. & Hitz W.D. (1984) Synthesis of 1'-deoxy-1'-fluorosucrose via sucrose synthetase mediated coupling of 1-deoxy-1-fluorofructose with uridine diphosphate glucose. *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 5348-5350.
- Card P.J., Hitz W.D. & Ripp K.G. (1986) Chemoenzymatic synthesis of fructose-modified sucroses via multienzyme systems. Some topographical aspects of the binding of sucrose to a sucrose carrier protein. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 158-161.
- Cardini C.E., Leloir L.F. & Chiriboga J. (1955) The biosynthesis of sucrose. *J. Biol. Chem.*, **214**, 149-155.
- Cardini C.E. & Recondo E. (1962) Specificity of nucleoside diphosphate sugars in sucrose biosynthesis. *Plant Cell Physiol.*, **3**, 313-318.
- Carlson S.J. & Chourey P.S. (1996) Evidence for plasma membrane-associated forms of sucrose synthase in maize. *Mol. Gen. Genet.*, **252**, 303-310.
- Chan H.-Y., Ling T.-Y., Juang R.-H., Ting I.-N., Sung H.-Y. & Su J.-C. (1990) Sucrose Synthase in Rice Plants. *Plant Physiol.*, **94**, 1456-1461.
- Chen H.-J., Sung H.-Y. & Su J.-C. (1981) Role of Sucrose Synthase in Sucrose-Starch Conversion in Rice grains. *Proc. Natl. Sci. Council. B, ROC*, **5**, 165-170.

- Chourey P.S. & Nelson O.E. (1979) Interallelic complementation at the *sh* locus in maize at the enzyme level. *Genetics*, **91**, 317-325.
- Chourey P.S., Taliercio E.W., Carlson S.J. & Ruan Y.L. (1998) Genetic evidence that the two isozymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.*, **259**, 88-96.
- Cleland W.W. (1963) The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 104-137.
- Copeland L. (1990) Enzymes of sucrose metabolism. *Meth. Plant Biochem.*, **3**, 73-85.
- Curatti L., Porchia A.C., Herrera-Estrella L. & Salerno G.L. (2000) A prokaryotic sucrose synthase gene (*susA*) isolated from a filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium encodes a protein similar to those of plants. *Planta*, **211**, 729-735.
- Dejardin A., Rochat C., Maugenest S. & Boutin J.-P. (1997) Purification, characterization and physiological role of sucrose synthase in the pea seed coat (*Pisum sativum* L.). *Planta*, **201**, 128-137.
- Delmer D.P. (1972) The Purification and Properties of Sucrose Synthetase from Etiolated *Phaseolus aureus* Seedlings. *J. Biol. Chem.*, **247**, 3822-3828.
- Doudoroff M., Kaplan N.O. & Hassid W.Z. (1943) Phosphorolysis and synthesis of sucrose with a bacterial preparation. *J. Biol. Chem.*, **148**, 67-75.
- Doudoroff M., Hassid W.Z. & Barker H.A. (1947) Studies with Bacterial Sucrose Phosphorylase. *J. Biol. Chem.*, **148**, 67-75.
- Doehlert D.C. (1987) Substrate inhibition of maize endosperm sucrose synthase by fructose and its interaction with glucose inhibition. *Plant Science*, **52**, 153-157.
- Echt C.S. & Chourey P.S. (1985) A comparison of two sucrose synthetase isoenzymes from normal and shrunken-1 maize. *Plant Physiol.*, **79**, 530-536.
- Elling L. (1995) Effect of metal ions on sucrose synthase from rice grains--a study on enzyme inhibition and enzyme topography. *Glycobiology*, **5**, 201-206.
- Elling L., Grothus M. & Kula M.-R. (1993) Investigation of sucrose synthase from rice for the synthesis of various nucleotide sugars and saccharides. *Glycobiology*, **3**, 349-355.

- Elling L., Grothus M., Zervosen A. & Kula M.-R. (1995a) Application of sucrose synthase from rice grains for the synthesis of carbohydrates. *Ann. NY Acad. Sci.*, **750**, 329-331.
- Elling L., Güldenbergh B., Grothus M., Zervosen A., Peus M., Helfer A., Stein A., Adrian H. & Kula M.-R. (1995b) Isolation of sucrose synthase from rice (*Oryza sativa*) grains in pilot scale for application in carbohydrate synthesis. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **21**, 29-37.
- Elling, L., & Kula M.-R. (1991) Investigation of the UDP-glucose dehydrogenase reaction for a coupled assay of UDP-glucose pyrophosphorylase activities. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **14**, 306-316.
- Elling L. & Kula M.-R. (1993) Purification of sucrose synthase from rice and its protein-chemical characterization. *J. Biotechnol.*, **29**, 277-286.
- Farkas V., Biely P. & Bauer S. (1968) Transglycosylic reactions of nucleotides of 2-deoxy-sugars 1. Biosynthesis of 2-deoxysucrose. *Biochim. Biophys. Acta*, **165**, 63-67.
- Feingold D.S. (1982) Aldo (and Keto) Hexoses and Uronic Acids. In: Encyclopedia of plant physiology New Series, pp. 3-76. Springer-Verlag, Berlin.
- Feizi T. (1991) Carbohydrate differentiation antigens: probable ligands for cell adhesion molecules. *Nature*, **314**, 84-86.
- Gabrielyan N.D., Komaleva R.L. & Shibaev N.V. (1973) The kinetic mechanism of the reaction catalyzed by sucrose synthase from pea seedlings. *Mol. Biol.*, **7**, 268-272.
- Geigenberger P. & Stitt M. (1993) Sucrose synthase catalyzes a readily reversible reaction in vivo in developing potato tubers and other plant tissues. *Planta*, **189**, 329-339.
- Gellissen G., Melber K., Janowicz Z.A., Dahlems U.M., Weydemann U., Piontek M., Strasser A.W. & Hollenberg C.P. (1992) Heterologous protein production in yeast. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **62**, 79-93.
- Grimes W.J., Jones B.L. & Albersheim P. (1969) Sucrose Synthase from *Phaseolus aureus* seedlings. *J. Biol. Chem.*, **245**, 188-197.
- Gross K.C. & Pharr D.M. (1982) Cucumber fruit sucrose synthase isozymes. *Phytochem.*, **21**, 1241-1244.

- Grothus M. (1993) Synthese von Disacchariden und aktivierten Zuckern mit Hilfe von Saccharose Synthase aus Reis. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Grothus M., Steigel A., Kula M.-R. & Elling L. (1994) Enzymatic Synthesis of α -D-Glucopyranosyl- α -D-Lyxopyranoside and α -D-Glucopyranosyl- β -D-Xylulofuranoside. *Carbohydr. Lett.*, **1**, 83-88.
- Günther N. (1996) Synthese von Glycosiden mit Saccharose Synthase. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität.
- Günther N. (2000) Untersuchungen zur Aufreinigung und in vitro Charakterisierung von rekombinante Glycosyltransferasen aus Actinomyceten für die Entwicklung von hybriden Makrolid-Antibiotika. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität.
- Haigler C.H., Ivanova-Datcheva M., Hogan P.S., Salnikov V.V., Hwang S., Martin K. & Delmer D.P. (2001) Carbon partitioning to cellulose synthesis. *Plant Mol. Biol.*, **47**, 29-51.
- Hakomori S.-I. (1986) Glykosphingolipide. *Spektrum der Wissenschaften*, **Juli**, 90-100.
- Hassid W.Z. & Doudoroff M. (1950) Synthesis of disaccharides with bacterial enzymes. *Advances in enzymology and related subjects of biochemistry*, **10**, 123-143.
- Heightman, T. D. & Vasella A. T. (1999) Neue Erkenntnisse über Hemmung, Struktur und Mechanismus konfigurationserhaltender Glycosidasen. *Angew. Chem.*, **111**, 794-815.
- Hisajima S. & Ito T. (1981) Purification and Properties of Sucrose Synthetase from Morning-Glory Callus Cells. *Biologia Plantarum*, **23**, 356-364.
- Hokke C.H., Zervosen A., Elling L., Joziase D.H. & van den Eijnden D.H. (1996) One-pot enzymatic synthesis of the Gal(α 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc sequence with *in situ* UDP-Gal regeneration. *Glycoconjugate J.*, **13**, 687-692.
- Hong Z., Zhang Z., Olson J.M. & Verma D.P.S. (2001) A Novel UDP-Glucose Transferase Is Part of the Callose Synthase Complex and Interacts with Phragmoplastin at the Forming Cell Plate. *Plant Cell*, **13**, 769-779.
- Huang J.-W., Chen J.-T., Yu W.-P., Shyr L.-F., Wang A.-Y., Sung H.-Y., Lee P.-D. & Su J.-C. (1996) Complete structures of three rice sucrose synthase isogenes and differential regulation of their expression. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 233-239.

- Huber S.C., Huber J.L., Liao P.-C., Gage D.A., McMichael R.W.j., Chourey P.S., Hannah L.C. & Koch K. (1996) Phosphorylation of serine-15 of maize leaf sucrose synthase - Occurrence *in vivo* and possible regulatory significance. *Plant Physiol.*, **112**, 793-802.
- Jaarma M. & Rydström J. (1969) Studies on UDPglucose-Fructose Glucosyltransferase in Potato Tubers *in vitro* and *in vivo*. *Acta Chem Scan*, **23**, 3443-3450.
- Kitao S., Ariga T., Matsudo T. & Sekine H. (1993) The Syntheses of Catechin-glucosides by Transglycosylation with *Leuconostoc mesenteroides* Sucrose Phosphorylase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 2010-2015.
- Kitao S. & Sekine H. (1994) α -D-Glucosyl Transfer to Phenolic Compounds by Sucrose Phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* and Production of α -Arbutin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 38-42.
- Köckenberger W. (2001a) Functional imaging of plants by magnetic resonance experiments. *Trends in Plant Science*, **6**, 286-292.
- Köckenberger W. (2001b) persönliche Mitteilung.
- Kragl U., Gödde A., Wandrey C., Kinzy W., Cappon J.J. & Lugtenburg J. (1993) Repetitive batch as an efficient method for preparative scale enzymatic synthesis of 5-azido-neuraminic-acid and ^{15}N -L-gluamic acid. *Tetrahedron Asymm.*, **4**, 1193 -1202.
- Lalonde S., Boles E., Hellmann H., Barker L., Patrick J.W., Frommer W.B. & Ward J.M. (1999) The Dual Function of Sugar Carriers: Transport and Sugar Sensing. *Plant Cell*, **11**, 707-726.
- Lehmann J. (1996) Kohlenhydrate: Chemie und Biologie - 2., neubearbeitete und erweiterte Auflage. Thieme, Stuttgart.
- Lemieux R.U. & Huber G. (1953) A Chemical Synthesis of Sucrose. *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 4118.
- Lichtenthaler F.W., Immel S. & Pokinskyj P. (1995) Selective 2-O-Benzylation of Sucrose: A Facile to Its 2-Deoxy- and Keto-Derivates and to Sucrosamine. *Liebigs Ann.*, 1939-1947.

- Liptak A., Szurmai Z. & Nanasi P. (1982) ^{13}C -NMR study of methyl- and benzyl ethers of L-arabinose and oligosaccharides having L-arabinose at the reducing end. Synthesis of 2-O- β -D-glucopyranosyl-, 2-O- α -L-rhamnopyranosyl-, 3-O- β -D-Glucopyranosyl-2-O- α -L-rhamnopyranosyl- and 4-O- β -D-Glucopyranosyl-2-O- α -L-rhamnopyranosyl-L-Arabinose. *Tetrahedron*, **38**, 3489-3497.
- Loef I., Stitt M. & Geigenberger P. (2001) Increased levels of adenine nucleotides modify the interaction between starch synthesis and respiration when adenine is supplied to discs from growing potato tubers. *Planta*, **212**, 782-791.
- Mazza J.C., Akgerman A. & Edwards J.R. (1975) Synthesis of α -D-glucopyranosyl- α -L-sorbofuranosid, and its use as a D-glycosyl donor. *Carbohydr. Res.*, **40**, 402-406.
- Millner Y. & Avigad G. (1965) Thymidin Diphosphate Nucleotides as Substrates in the Sucrose Synthase Reaction. *Nature*, **206**, 825.
- Morell M. & Copeland L. (1985) Sucrose synthase of soybean nodules. *Plant Physiol.*, **78**, 149-154.
- Moriguchi T. & Yamaki S. (1988) Purification and Characterization of Sucrose Synthase from Peach (*Prunus persica*) Fruit. *Plant Cell Physiol.*, **29**, 1361-1366.
- Müller-Röbner B. & Koßmann J. (1994) Approches to influence starch quantity and starch quality in transgenic plants. *Plant Cell Env.*, **17**, 601-613.
- Murata T. (1972) Sucrose synthetase from rice grains and potato tubers. *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1815-1818.
- Nakai T., Konishi T., Zhang X.Q., Chollet R., Tonouchi N., Tsuchida T., Yoshinaga F., Mori H., Sakai F. & Hayashi T. (1998) An increase in apparent affinity for sucrose of mung bean sucrose synthase is caused by in vitro phosphorylation or directed mutagenesis of Ser(11). *Plant Cell Physiol.*, **39**, 1337-1341.
- Nakai T., Tonouchi N., Konishi T., Kojima Y., Tsuchida T., Yoshinaga F., Sakai F. & Hayashi T. (1999) Enhancement of cellulose production by expression of sucrose synthase in *Acetobacter xylinum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 14-18.

- Nakai T., Tonouchi N., Tsuchida T., Mori H., Sakai F. & Hayashi T. (1997) Expression and characterization of sucrose synthase from mung bean seedlings in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1500-1503.
- Nomura T. & Akazawa T. (1973) Enzymic mechanism of starch synthesis in ripening rice grains. *Arch. Biochem. Biophys.*, **156**, 644-652.
- Notenboom V., Williams S.J., Hoos R., Withers S.G. & Rose D.R. (2000) Detailed Structural Analysis of Glycosidase/Inhibitor Interactins: Complexes of Cex from *Cellulomonas fimi* with Xylobiose-Derived Aza-Sugars. *Biochem.*, **39**, 11553-11563.
- Nunez, H. A., & Barker R. (1976). The metal ion catalyzed decomposition of nucleoside diphosphate sugars. *Biochem.*, **15**, 3843-3847.
- Oscarson S. & F.W. S. (2000) A Novel b-Directing Fructofuranosyl Donor Concept. Stereospecific Synthesis of Sucrose. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 8869-8872.
- Peters J., Brockamp H.-P., Minuth T., Grothus M., Steigel A., Kula M.-R. & Elling L. (1993) Combined Chemoenzymatic Synthesis of 2O-6-Deoxy- α -L-Sorbofuranosyl-D-Glucose. *Tetrahedron Asymm.*, **4**, 1173-1182.
- Pressey R. (1969) Potato sucrose synthase: Purification, properties, and changes in activity associated with maturation. *Plant Physiol.*, **44**, 759-764.
- Riesmeier J.W., Willmitzer L. & Frommer W.B. (1992) Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J.*, **11**, 4705-4713.
- Römer U. (1998) Charakterisierung und Anwendung der rekombinanten Saccharose Synthase aus Kartoffel zur Synthese von Saccharose-Analoga. Diplomarbeit, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Römer U., Nettelstroth N., Köckenberger W. & Elling L. (2001) Characterization of Recombinant Sucrose Synthase 1 from Potato for the Synthesis of Sucrose Analogues. *Adv. Synth. Catal.*, **343**, 655-661.
- Ryll T. & Wagner R. (1991) Improved ion pair high-performance liquid chromatographic method for the quantification of wide variety of nucleotides and sugar-nucleotides in animal cells. *J. Chromatogr.*, **570**, 77-88.
- Sayion Y., Huang Y.-W., Chen H.-M., Liao Y.-C. & Wang A.-Y. (1999) Expression and Charakterization of Rice Sucrose Synthase in *Escherichia coli*. *Food Science and Agricultural Chemistry*, **1**, 122-128.

- Schrader H. (1998) Expression des Gens *sus1* aus *Solanum Tuberosum*, Aufreinigung seines Genproduktes Saccharose Synthase (EC 2.4.1.13) und dessen Charakterisierung. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Sears P. & Wong C.-H. (1999) Kohlenhydratmimetika: ein neuer Lösungsansatz für das Problem der kohlenhydratvermittelten biologischen Erkennung. *Angew. Chem.*, **111**, 2446-2471.
- Segel I.H. (1975) Enzyme Kinetics Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems. John Wiley & Sons, New York, London, Sydney, Toronto.
- Sharma K.P. & Bhatia I.S. (1980) Sucrose metabolism in *Sorghum vulgare* at ripening. *Physiologia Plantarum*, **48**, 470-476.
- Sharon N. & Lis H. (1993) Kohlenhydrate und Zellerkennung. Spektrum der Wissenschaft, **März**, 66 - 74.
- Singh A.N., Hester L.S. & Raushel F.M. (1987) Examination of the mechanism of sucrose synthetase by positional isotope exchange. *J. Biol. Chem.*, **262**, 2554-2557.
- Sinha A.K., Hofmann M.G., Römer U., Köckenberger W., Elling L. & Roitsch T. (2002) Metabolizable and Non-Metabolizable Sugar Activate Different Signal Transduction Pathways in Tomato. *Plant Physiol.*, **128**, 1480-1489.
- Slabnik E., Frydman R.B. & Cardini C.E. (1968) Some properties of potato tuber UDPG:D-fructose-2-glucosyltransferase (EC 2.4.1.13) and UDPG:D-fructose6-phosphate-2-glucosyltransferase (EC 2.4.1.14). *Plant Physiol.*, **43**, 1063-1068.
- Smeeckens S. (2000) Sugar-Induced Signal Transduction in Plants. *Ann. Rev.Plant Physiol.Plant Mol. Biol.*, **51**, 49-81.
- Sonnewald U. (2001) Sugar Sensing and Regulation of Photosynthetic Carbon Metabolism. In: Regulation of Photosynthesis (eds E.-M. Aro & B. Andresson), pp. 109-120. Kluwer Academic Publisher, The Netherlands.
- Sonnewald U., Lerchel J., Zrenner R. & Frommer W.B. (1994) Manipulation of sink-source relations in transgenic plants. *Plant Cell Env.*, **17**, 649-658.
- Stein A., Kula M.R. & Elling L. (1998) Combined preparative enzymatic synthesis of dTDP-6-deoxy-4- keto-D-glucose from dTDP and sucrose. *Glycoconjugate J.*, **15**, 139-145.

- Stütz, A. E. (1996) Ein neues Konzept zur Aufklärung des reaktionsmechanismus konfigurationserhaltender Glycosid-Hydrolasen. *Angew. Chem.*, **108**, 2054-2056.
- Su J.-C., Wu J.-L. & Yang C.-L. (1977) Purification and Characterization of Sucrose Synthase from the Shoot of Bamboo *Leleba oldhami*. *Plant Physiol.*, **60**, 17-21.
- Su J.C. & Preiss J. (1977) Purification and properties of sucrose synthase from maize kernels. *Plant Physiol.*, **61**, 17-21.
- Su J.C., Sung H.-Y., Cheng L., Yang C.-L. & Zia K. (1976) Studies on sucrose synthetase and some sugar nucleotide transforming enzymes. *Proc. Natl. Sci.*, **9**, 299-317.
- Sung H.-Y. & Su J.-C. (1977) Sucrose Synthase Isoenzymes of Pea Seedlings - Purification and General Properties. *Journal of Chinese Biochemical Society*, **6**, 22-37.
- Tanase K. & Yamaki S. (2000) Purification and Characterization of Two Sucrose Synthase Isoforms from Japanese Pear Fruit. *Plant Cell Physiol.*, **41**, 408-414.
- Ünlügil U.M. & Rini J.M. (2000) Glycosyltransferase structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 510-517.
- Varki A. (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, **3**, 97-130.
- Wang A.-Y. & Sayion Y. (1997) Rice sucrose synthase protomers expressed in *Escherichia coli* and their application in characterizing native isozymes. *FASEB J.*, **11**, A889.
- Wang A.Y., Kao M.H., Yang W.H., Sayion Y., Liu L.F., Lee P.D. & Su J.C. (1999) Differentially and developmentally regulated expression of three rice sucrose synthase genes. *Plant and Cell Physiology*, **40**, 800-807.
- Winter H., Huber J.L. & Huber S.C. (1997) Membrane association of sucrose synthase: changes during the graviresponse and possible control by protein phosphorylation. *FEBS Lett.*, **420**, 151-155.
- Winter H., Huber J.L. & Huber S.C. (1998) Identification of sucrose synthase as an actin-binding protein. *FEBS Lett.*, **430**, 205-208.

- Winter H. & Huber S.C. (2000) Regulation of sucrose metabolism in higher plants: Localization and regulation of activity of key enzymes. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **19**, 31-67.
- Wolosiuk R.A. & Pontis H.G. (1974) Studies on sucrose synthetase - Kinetic mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.*, **165**, 140-145.
- Wolosuik R.W. & Pontis H.G. (1971) Evidence of the existence of two forms of sucrose synthetase. *FEBS Lett.*, **16**, 237-240.
- Zervosen A. & Elling L. (1996) A novel three-enzyme reaction cycle for the synthesis of N- acetyllactosamine with in situ regeneration of uridine 5'- diphosphate glucose and uridine 5'-diphosphate galactose. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 1836-1840.
- Zervosen A., Elling L. & Kula M.-R. (1994) Continuous enzymatic synthesis of 2'-deoxythymidine-5'-(α -D-glucopyranosyl)diphosphate. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **33**, 571-572.
- Zervosen A., Römer U. & Elling L. (1998) Application of recombinant sucrose synthase - large scale synthesis of ADP-glucose -. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **5**, 25-28.
- Zhang X.-Q. & Chollet R. (1997) Seryl-phosphorylation of soybean nodule sucrose synthase (nodulin 100) by a Ca^{2+} -dependent protein kinase. *FEBS Lett.*, **410**, 126-130.
- Zhang X.-Q., Lund A.A., Sarath G., Cerny R.L., Roberts D.M. & Chollet R. (1999) Soybean nodule sucrose synthase (nodulin-100): Further analysis of its Phosphorylation using recombinant and authentic root-nodule enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **371**, 70 - 82.