

**Enzymatische Synthese von GDP- $\beta$ -L-Fucose ausgehend  
von D-Mannose:  
Klonierung, Expression und Charakterisierung von  
Enzymen aus nicht-pathogenen *Enterobacteriaceae***

**Inaugural-Dissertation**

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

vorgelegt von

Stefan Weidner  
aus Stuttgart

Jülich, 2003



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

Referentin: Frau Prof. Dr. M.-R. Kula  
Korreferent: Herr Prof. Dr. J. F. Ernst  
Korreferent: Herr Prof. Dr. L. Elling

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Oktober 2003



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Januar 1996 bis Januar 2001 unter Anleitung von Frau Prof. Dr. M.-R. Kula am Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich, in der damaligen Arbeitsgruppe von Herrn Dr. L. Elling angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen recht herzlich bedanken, die durch Rat und Tat zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere danke ich

Frau Prof. Dr. M.-R. Kula für die Übernahme des Hauptreferates, ihre persönliche Anteilnahme und die sehr guten Arbeitsbedingungen am Institut für Enzymtechnologie,

Herrn Prof. Dr. J. F. Ernst für die freundliche Übernahme des Korreferates,

Herrn Prof. Dr. L. Elling für die Überlassung des Themas, sowie seine vielfältigen konstruktiven Anregungen, seine stete Diskussionsbereitschaft, kritische Durchsicht dieser Arbeit und letztendlich für die freundliche Übernahme des Korreferates,

Herrn Dipl. Chem. C. Hoh, Institut für Biotechnologie 2, für die gute Zusammenarbeit, seine unermüdliche Diskussions- und Hilfsbereitschaft,

allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe und allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts, die mir mit fachlichen Ratschlägen zur Seite standen und durch ihre Kooperationsbereitschaft für ein gutes Arbeitsklima gesorgt haben,

meinen guten Freunden für die ständige „Zwackerei“ ohne die diese Arbeit wohl nicht mehr zustande gekommen wäre,

zuguterletzt meinen Eltern, besonders meiner Mutter, die mich so viele Jahre unermüdlich unterstützt und meine wissenschaftliche Ausbildung ermöglicht haben.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Biologische Bedeutung von Kohlenhydraten und Glykokonjugaten.....	1
1.2	Glykokonjugate der Eukaryonten .....	3
1.3	Glykokonjugate der Prokaryonten .....	9
1.4	Lipopolysaccharide (LPS) und „Colanic Acid“ – Polysaccharide der <i>Enterobacteriaceen</i> .....	13
1.4.1	Vorkommen und Struktur von Lipopolysacchriden (LPS) .....	14
1.4.2	Vorkommen und Struktur von „Colanic Acid“ oder M-Antigen .....	17
1.5	Synthese von Glykokonjugaten .....	21
1.6	Glykosyltransferasen.....	24
1.7	Bereitstellung von Nukleotidzuckern als Substrate der Glykosyltransferasen .....	29
1.7.1	Chemische Synthese .....	29
1.7.2	Enzymatische Synthese .....	30
1.7.3	Chemische und enzymatische Synthese von GDP- $\alpha$ -D-Mannose.....	32
1.7.4	Chemische und enzymatische Synthese von GDP- $\beta$ -L-Fucose.....	34
1.8	Bedeutung der Kohlenhydrate als pharmakokinetisches Target - Kohlenhydrate als potentiell pharmakologische Wirkstoffe .....	39
1.9	Zielsetzung der Arbeit.....	43
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>45</b>
2.1	Medien und Lösungen.....	45
2.1.1	Anzuchtmedien für <i>Escherichia coli</i> .....	45
2.2	Bakterien, Vektoren und rekombinante Plasmide.....	46
2.2.1	Bakterienstämme .....	46
2.2.2	Vektoren und rekombinante Plasmide.....	46
2.3	Oligonukleotide.....	48
2.4	Gentechnische Methoden.....	50
2.4.1	Präparation von genomischer DNA aus <i>Escherichia coli</i> .....	50
2.4.2	Präparation von Plasmid-DNA.....	51

2.4.2.1	Schnellpräparation von Plasmid-DNA.....	51
2.4.2.2	Plasmid-Präparation mittels des Qiagen Spin Miniprep Kit.....	52
2.4.3	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren.....	52
2.4.3.1	Agarosegelelektrophorese von DNA .....	52
2.4.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	53
2.4.4.1	Jetsorb® Gelextraction Kit .....	53
2.4.4.2	Qiagen Gelextraction Kit .....	53
2.4.5	Ethanol-fällung .....	53
2.4.6	DNA-Restriktion.....	54
2.4.7	Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA .....	54
2.4.8	Ligationen .....	54
2.4.8.1	Ligationen von glatten Enden (blunt-ends).....	54
2.4.8.2	Ligation von überstehenden Enden („sticky-ends“) .....	55
2.4.9	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen .....	55
2.4.10	Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	55
2.4.11	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR).....	56
2.4.11.1	Berechnung der Schmelztemperatur der Primer .....	56
2.4.11.2	Amplifikation von DNA mittels PCR.....	57
2.4.12	DNA-Sequenzierung.....	58
2.5	Kulturbedingungen und Lagerung von Bakterienstämmen.....	58
2.5.1	Stammhaltung .....	58
2.5.2	Schüttelkulturen .....	59
2.5.3	Fermentation im Laborfermenter .....	59
2.5.4	Meß- und Regelvorgänge am Fermenter .....	60
2.5.4.1	pH-Messung und Regelung.....	60
2.5.4.2	pO <sub>2</sub> -Messung .....	60
2.6	Heterologe / homologe Genexpression in <i>Escherichia coli</i> .....	60
2.7	Herstellung zellfreier Extrakte.....	61
2.7.1	Aufschluss mittels Nassvermahlung.....	61
2.7.2	Aufschluss mittels Ultraschall .....	61
2.8	Proteinbestimmung nach Bradford.....	62
2.9	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	62
2.10	Diskontinuierliches Blotting nach Kyhse-Andersen .....	63

2.11	Färbungen von Proteinen in Polyacrylamidgelen.....	63
2.11.1	Färbung mit Coomassie Brilliant Blau R-250 oder Amidoschwarz.....	63
2.11.2	Färbung mit Silbernitrat .....	63
2.12	N-terminale Sequenzierung.....	64
2.13	Analytik.....	64
2.13.1	HPLC-Systeme („High performance liquid chromatography“)	64
2.13.2	Kapillarelektrophorese von Nukleotiden und Zuckernukleotiden .....	66
2.13.3	Aktivitätsbestimmung der Enzyme .....	69
2.13.3.1	Aktivitätsbestimmung der Phosphomannomutase .....	69
2.13.3.2	Aktivitätsbestimmung der Phosphoglucomutase .....	71
2.13.3.3	Aktivitätsbestimmung der GDP-Mannose Pyrophosphorylase.....	72
2.13.3.4	Optimierung der Aktivitätsbestimmung der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase .....	73
2.13.3.5	Aktivitätsbestimmung der GDP-Fucose Synthetase .....	75
2.14	Bestimmung der $K_m$ - und $v_{max}$ -Werte der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase....	77
2.15	Enzymaufreinigung.....	80
2.15.1	Partielle Reinigung der Phosphomannomutase.....	80
2.15.2	Partielle Reinigung der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-Pyrophosphorylase .....	81
2.15.3	Partielle Reinigung der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase.....	82
2.15.4	Reinigung der GDP-Fucose Synthetase .....	83
2.16	Charakterisierung und Anwendung der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase .....	85
2.16.1	Einfluss der $NADP^+$ -Cofaktorkonzentration auf die Aktivität der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase.....	85
2.16.2	Einfluss von NADPH auf die Aktivität der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase.	86
2.16.3	Versuch einer präparativen enzymatischen Synthese und Isolierung von GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose ausgehend von GDP- $\alpha$ -D-Mannose.....	87
2.17	Anwendung der GDP-Fucose Synthetase zur Synthese von GDP-Fucose.....	89
2.18	Qualitative Analyse der enzymatischen Synthese von GDP-Fucose aus GDP-Mannose .....	90
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>92</b>
3.1	Klonierung und Überproduktion der Proteine des „langen“ oder „de novo“ Biosyntheseweges von GDP- $\beta$ -L-Fucose aus nicht pathogenen <i>Enterobacteriaceae</i> in geeigneten Wirtsstämmen .....	92

3.1.1	Klonierung von <i>gmd</i> , <i>wcaG/fcl</i> , <i>wcaH</i> und <i>wcaI</i> in die Expressionsplasmide pET11a, pET16b und pET17b .....	92
3.1.2	Klonierung von <i>gmd</i> , <i>wcaG/fcl</i> , <i>wcaH</i> und <i>wcaI</i> in die Expressionsplasmide pBAD18 bzw. pBAD18HisA.....	94
3.1.3	Stammhaltung von <i>rfbK / manB</i> (Phosphomannomutase) und <i>rfbM / manC</i> (GDP- $\alpha$ -D-Mannose-Pyrophosphorylase) im Expressionsplasmid pT7-6 .....	96
3.1.4	Heterologe/Homologe Überproduktion der Proteine PMM, GMP, GMD, WcaG und WcaH aus <i>Salmonella enterica</i> B/ <i>Escherichia coli</i> K-12 in <i>E. coli</i> BL21(DE3) ....	98
3.1.5	Zusammenfassende Diskussion der Klonierung .....	99
3.2	Produktion und partielle Reinigung der rekombinanten Phosphomannomutase ( <i>RfbK</i> , <i>ManB</i> ) aus <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3).....	106
3.2.1	Fermentation von <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) pERJ-2 .....	106
3.2.2	Zellaufschluss .....	107
3.2.2.1	Anionenaustauscher Q-Sepharose FF .....	108
3.2.3	N-terminale Sequenzanalyse der Phosphomannomutase.....	109
3.2.4	Nachweis einer möglichen Phosphoglucomutase Aktivität.....	110
3.3	Produktion und partielle Reinigung der rekombinanten GDP- $\alpha$ -D-Mannose-Pyrophosphorylase ( <i>RfbM</i> , <i>ManC</i> ) aus <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) .....	110
3.3.1	Fermentation von <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) pERJ-1.....	111
3.3.1.1	Zellaufschluss .....	111
3.3.1.2	Anionenaustauscher Q-Sepharose FF .....	112
3.3.2	N-terminale Sequenzanalyse der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-Pyrophosphorylase .....	113
3.4	Produktion, partielle Reinigung und Charakterisierung der rekombinanten GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase ( <i>GMD</i> ) aus <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) .....	114
3.4.1	Produktion und partielle Reinigung der rekombinanten GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase ( <i>GMD</i> ) aus <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) .....	114
3.4.1.1	Fermentation von <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) pSWJ-3 (pET17b/ <i>gmd</i> ).....	115
3.4.1.2	Zellaufschluss .....	115
3.4.1.3	Entwicklung eines Enzymtests für die GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase.....	117
3.4.1.4	Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose FF .....	120
3.4.1.5	Partiell über Q-Sepharose FF gereinigte GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase liegt als Apoenzym vor .....	124
3.4.2	N-terminale Sequenzanalyse der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase.....	126
3.4.3	Charakterisierung und Anwendung der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase ....	127

3.4.3.1	NADP <sup>+</sup> -Spezifität der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase.....	127
3.4.3.2	Einfluss der NADP <sup>+</sup> -Cofaktorkonzentration auf die Aktivität der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase.....	129
3.4.3.3	Untersuchung eines möglichen Einflusses der Inkubationszeit und der Startbedingungen auf die lag-Phase bzw. Aktivität der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase .....	132
3.4.3.4	Einfluss von NADPH auf die Aktivität der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase .....	134
3.4.3.5	Bestimmung der K <sub>m</sub> - und v <sub>max</sub> -Werte für GDP- $\alpha$ -D-Mannose und NADP <sup>+</sup> bzw. NADPH .....	138
3.4.3.5.1	Bestimmung des K <sub>m</sub> - und v <sub>max</sub> -Wertes für GDP- $\alpha$ -D-Mannose.....	138
3.4.3.5.2	Bestimmung des K <sub>m</sub> - und v <sub>max</sub> -Wertes für NADP <sup>+</sup> und NADPH.....	140
3.4.3.5.3	Zusammenfassende Diskussion der kinetischen Daten der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase .....	142
3.4.3.6	Versuch einer präparativen enzymatischen Synthese und Isolierung von GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose ausgehend von GDP- $\alpha$ -D-Mannose.....	145
3.4.3.7	ESI-MS-Spektrum der GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose .....	146
3.5	Produktion und Reinigung der rekombinanten GDP-Fucose Synthetase bzw. GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose-3,5-Epimerase-4-Reduktase (WcaG/Fcl) aus <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3).....	148
3.5.1	Entwicklung eines Enzymtest für die GDP-Fucose Synthetase.....	149
3.5.2	Fermentation von <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) pSWJ-5 (pET16b/wcaG).....	150
3.5.3	Zellaufschluss .....	152
3.5.4	Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie der GDP-Fucose Synthetase .....	152
3.5.5	N-terminale Sequenzanalyse der GDP-Fucose Synthetase .....	155
3.6	Anwendung der GDP-Fucose Synthetase zur Synthese von GDP-Fucose.....	156
3.7	Qualitative Analyse der enzymatischen Synthese von GDP-Fucose aus GDP-Mannose .....	157
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>160</b>
<b>5</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>163</b>

<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>198</b>
6.1	DNA- und Proteinsequenzen der klonierten Gene .....	198
6.1.1	<i>Escherichia coli</i> – GDP-D-Mannose 4,6-Dehydratase (EC 4.2.1.47) – GMD .....	198
6.1.2	<i>Escherichia coli</i> – GDP-Fucose Synthetase (EC 5.1.3.-) GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose 3,5-Epimerase 4-Reduktase - Fcl .....	199
6.1.3	<i>Escherichia coli</i> – „Colanic Acid“ Biosyntheseprotein – wcaH.....	201
6.1.4	<i>Escherichia coli</i> –Mögliche Glycosyltransferase aus dem „Colanic Acid“ Biosyntheseweg - wcaI .....	202
6.1.5	<i>Salmonella typhimurium</i> – Phosphomannomutase (EC 5.4.2.8) – rfbK / manB ...	204
6.1.6	<i>Salmonella typhimurium</i> – GDP-Mannose Pyrophosphorylase (EC 2.7.7.22) – Mannose-1-phosphat Guanylyltransferase- rfbM / manC .....	206
6.2	Definitionen.....	208
6.3	Vektoren und Plasmide.....	208
6.4	Verwendete Geräte .....	214
6.5	Chemikalien und Enzyme.....	215

## Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

### Verzeichnis der Abbildungen:

<b>Abbildung 1:</b>	Funktionen von Kohlenhydraten auf der Oberfläche von eukaryontischen Zellen.....	2
<b>Abbildung 2:</b>	Bindungsstellen von <i>N</i> - und <i>O</i> -Glykanen an Proteinen.....	4
<b>Abbildung 3:</b>	Verschiedene Typen der <i>N</i> -Glykane: Oligomannose-Typ (High-Mannose-Typ), Hybrid-Typ und komplexer Typ.....	5
<b>Abbildung 4:</b>	<i>Core</i> -Strukturen der <i>O</i> -Glykane vom Mucin Typ. ....	8
<b>Abbildung 5:</b>	Struktur des Mureins von <i>Escherichia coli</i> .....	10
<b>Abbildung 6:</b>	Verschiedene Strukturtypen von Teichonsäuren aus gram-positiven Bakterien.....	12
<b>Abbildung 7:</b>	Struktur des Lipopolysaccharids (LPS) aus der Zellwand des gram-negativen Bakteriums <i>Salmonella enterica</i> LT2. ....	15
<b>Abbildung 8:</b>	Organisation des <i>rfb</i> -Genclusters ( <i>O</i> -Antigen-Biosynthese) von <i>Salmonella serovar typhimurium</i> , Stamm LT2 .....	16
<b>Abbildung 9:</b>	Struktur des extrazellulären Polysaccharids (EPS) „Colanic Acid“ von <i>E. coli</i> K-12.....	18
<b>Abbildung 10:</b>	Organisation des <i>wca</i> -Genclusters ( <i>cps</i> -Genclusters) für die Biosynthese des Kapselpolysaccharids „Colanic Acid“ von <i>Escherichia coli</i> K-12 .....	20
<b>Abbildung 11:</b>	Schema einer Leloir-Glykosyltransferase katalysierten Reaktion.....	24
<b>Abbildung 12:</b>	Topologie der Säuger-Leloir-Glykosyltransferasen .....	25
<b>Abbildung 13:</b>	Die Saccharidsynthese am Beispiel der Saccharose-Phosphorylase [EC 2.4.1.7] .....	26
<b>Abbildung 14:</b>	Allgemeines Reaktionsschema des Leloir Biosyntheseweges von primären und sekundären Nukleotidzuckern .....	30
<b>Abbildung 15:</b>	Biosyntheschema der „neun Nukleotidzucker“, die wichtig für die Glykokonjugatbiosynthese in Säugern sind. Die Biosynthesewege aus Säugern, Mikroorganismen und Pflanzen sind in dieser Darstellung zusammengefaßt. ....	31
<b>Abbildung 16:</b>	Biosyntheseweg der GDP- $\alpha$ -D-Mannose ausgehend von D-Mannose .....	33

<b>Abbildung 17:</b>	L-Fucose als wichtiger Bestandteil terminaler Strukturen von Glykokonjugaten aus Säugern.....	35
<b>Abbildung 18:</b>	„Langer Biosyntheseweg“ für die „ <i>de novo</i> “ Synthese von GDP-β-L-Fucose..	36
<b>Abbildung 19:</b>	Direkter Aktivierungsweg - „Salvage Pathway“ von GDP-β-L-Fucose. ....	37
<b>Abbildung 20:</b>	Wechselwirkung zwischen Leukozyten und Endothelzellen der Blutgefäße... .....	40
<b>Abbildung 21:</b>	Das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis-X (SLe <sup>x</sup> ) ist terminaler Bestandteil vieler Oligosaccharidstrukturen in Glykokonjugaten und wurde als Minimal-Ligand für Selektine identifiziert. Es besteht aus <i>N</i> -Acetylglucosamin, L-Fucose, D-Galactose und D-Neuraminsäure; Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc(β-R.....	41
<b>Abbildung 22:</b>	Aktuelle Katalogpreise einiger wichtiger Nukleotidzucker (Sigma; Biochemicals & Reagents, 2002/2003).....	43
<b>Abbildung 23:</b>	Das Prinzip der CZE - Schematische Darstellung der Ladungsverteilung an der Kapillaroberfläche.....	66
<b>Abbildung 24:</b>	Beispielelektropherogramm der verwendeten CE-Methode (HOH, 2000; BUCHHOLZ et al., 2002) für die Analyse von Nukleotiden und Zuckernukleotiden.....	67
<b>Abbildung 25 :</b>	Photometer-Assay zur Bestimmung der Phosphomannomutase-Aktivität. ....	69
<b>Abbildung 26:</b>	Photometer-Assay zur Bestimmung der Phosphoglucomutase-Aktivität. ....	71
<b>Abbildung 27:</b>	Isolierte genomische DNA von <i>Escherichia coli</i> K-12, die in den PCR-Ansätzen verwendet wurde..	93
<b>Abbildung 28:</b>	Beispiel einer PCR der Gene <i>gmd</i> , <i>wcaG</i> ; <i>wcaH</i> und <i>wcaI</i> aus dem <i>wca</i> -Gencluster von <i>Escherichia coli</i> K-12 .....	95
<b>Abbildung 29:</b>	Restriktionsanalyse der „klonierten Gene“ hier am Beispiel von <i>rfbM</i> und <i>rfbK</i> aus dem <i>rfb</i> -Gencluster von <i>Salmonella enterica</i> LT2.....	97
<b>Abbildung 30:</b>	SDS-PAGE-Analyse der überproduzierten Proteine RfbM, RfbK aus <i>Salmonella enterica</i> B, sowie GMD, WcaG/Fcl und WcaH aus <i>Escherichia coli</i> K-12 in <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	98
<b>Abbildung 31:</b>	Aufschlusskinetik der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD). ....	116

<b>Abbildung 32:</b>	Umsatz-Zeit-Plot eines Standard-Assays für die GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase mit Rohextrakt aus <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) - pSWJ-3. Die Analyse der Proben erfolgte mittels CE. ....	118
<b>Abbildung 33:</b>	Überprüfung der Linearität des verwendeten Enzym-Assays/ Linearität des Testsystems Katalysatormenge - Reaktionsgeschwindigkeit. ....	119
<b>Abbildung 34:</b>	SDS-PAGE-Analyse der partiellen Aufreinigung von in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) überproduzierter „nativer“ GMD mittels Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose FF. ....	122
<b>Abbildung 35:</b>	GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase als Apoenzym. ....	125
<b>Abbildung 36:</b>	Nachweis der NADP <sup>+</sup> -Spezifität der GDP-Mannose 4,6-Dehydratase. ....	128
<b>Abbildung 37:</b>	Einfluss der NADP <sup>+</sup> Cofaktorkonzentration auf die Enzymaktivität der GDP-Mannose 4,6-Dehydratase. ....	130
<b>Abbildung 38:</b>	Einfluss von Mg <sup>2+</sup> -Ionen auf die Aktivität der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD). ....	131
<b>Abbildung 39:</b>	Variation der Vorinkubationszeit. Der Start des Enzym-Assays erfolgte durch Zugabe von GDP-Mannose zum Ansatz. ....	133
<b>Abbildung 40:</b>	Variation der Startbedingungen des Enzym-Assays. Der Ansätze wurden vor Zugabe des „Starters“ 10 Minuten inkubiert. ....	133
<b>Abbildung 41:</b>	Einfluss von NADPH auf die lag-Phase des verwendeten Enzym-Assays. ....	135
<b>Abbildung 42:</b>	Einfluss von NADPH als einziger Cofaktor im verwendeten Enzym-Assay. ....	136
<b>Abbildung 43:</b>	Bestimmung des K <sub>m</sub> -Wertes für GDP-Mannose (0 – 10 mM GDP-Mannose; 5,0 mM NADP <sup>+</sup> , 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; T = 30 °C) ..	138
<b>Abbildung 44:</b>	Bestimmung des K <sub>m</sub> -Wertes für GDP-Mannose (0 – 10 mM GDP-Mannose; 0,1 mM NADP <sup>+</sup> und 0,1 mM NADPH, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; T = 30 °C) ..	139
<b>Abbildung 45:</b>	Bestimmung des K <sub>m</sub> -Wertes für NADP <sup>+</sup> (1 mM GDP-Mannose; 0 – 10 mM NADP <sup>+</sup> , 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; T = 30 °C) ..	140
<b>Abbildung 46:</b>	Bestimmung des K <sub>m</sub> -Wertes für NADPH (1 mM GDP-Mannose; 0 – 1 mM NADPH, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; T = 30 °C) ..	141
<b>Abbildung 47:</b>	ESI-MS (Negativ-Ionen Modus) Spektrum der GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose. ....	147

<b>Abbildung 48:</b>	Überprüfung der Linearität des verwendeten Enzymtests zur Aktivitätsbestimmung der GDP-Fucose Synthetase.....	149
<b>Abbildung 49:</b>	Wachstumskurve von <i>E. coli</i> BL21(DE3) pSWJ-5 (pET16b/ <i>wcaG</i> ) im Fermenter .....	151
<b>Abbildung 50:</b>	„Zusammenfassung“ der Daten zur Aufreinigung der GDP-Fucose Synthetase .....	152
<b>Abbildung 51:</b>	Aufreinigung von His-tag-GMD und His-tag-WcaG/Fcl. ....	154
<b>Abbildung 52:</b>	Reaktionsverlauf der GDP-Fucose Synthetase-Reaktion.....	156
<b>Abbildung 53:</b>	Verwendung von Rohextrakten der rekombinanten Enzyme GDP-Mannose 4,6-Dehydratase und Fucose-Synthetase zur Synthese von GDP-Fucose ausgehend von GDP-Mannose.....	157

## Verzeichnis der Tabellen

<b>Tabelle 1:</b>	Verwendete Bakterienstämme. ....	46
<b>Tabelle 2:</b>	Verwendete Vektoren.....	46
<b>Tabelle 3:</b>	In dieser Arbeit verwendete und konstruierte Plasmide.....	47
<b>Tabelle 4:</b>	Oligonukleotidprimer, die in dieser Arbeit verwendet wurden. ....	49
<b>Tabelle 5:</b>	Publizierte Arbeiten zur Klonierung und Expression von Genen die an der „ <i>de novo</i> “ Biosynthese der GDP-Fucose beteiligt sind.....	102
<b>Tabelle 6:</b>	Partielle Aufreinigung der Phosphomannomutase (PMM, RfbK, ManB) aus 30 g Zellfeuchtmasse.....	108
<b>Tabelle 7:</b>	Partielle Aufreinigung der GDP- $\alpha$ -D-Mannose Pyrophosphorylase (RfbM, ManC) aus 15 g Zellfeuchtmasse.....	112
<b>Tabelle 8:</b>	Partielle Aufreinigung der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) .....	120
<b>Tabelle 9:</b>	Vergleich der generierten kinetischen Daten der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) mit publizierten Literaturdaten.....	142

## Verzeichnis der Symbole und Abkürzungen

### Symbole

$A_M$	U/mg	massenspezifische Aktivität
$A_V$	U/mL	volumenspezifische Aktivität
$c(A)$	mol/L	Konzentration der Komponente A
Da	g/mol	Dalton
$K_m$	mM	Michaelis-Menten-Konstante
rpm	1/min	<i>revelations per minute</i>
t	min, h, d	Zeit
T	°C	Temperatur
U	μmol/min	<i>unit</i>
V	μL, mL	Volumen
$\lambda$	nm	Wellenlänge

### Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
Abe	Abequose
Ac	Acetyl
BSA	Bovine serum albumin - Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CA	„Colanic Acid“
CDP	Cytidin-5'-diphosphat
CDP-Abe	Cytidin-5'-diphospho- $\alpha$ -D-abequose
CIP	<u>c</u> alf <u>i</u> ntestine <u>p</u> hosphatase = alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
CMP-NeuAc	Cytidin-5'-monophospho-N-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure
CTAB	<u>C</u> etyl <u>t</u> rimethyl <u>a</u> mmonium <u>B</u> romid oder auch Hexadecyltrimethylammonium Bromid
C(Z)E	Kapillar(zonen)elektrophorese
d.h.	das heißt
Dol-P	Dolicholphosphat
dTDP-Rha	2'-Desoxythymidin-5'-diphospho- $\beta$ -L-Rhamnose
DTT	1,4-Dithio-D,L-Threitol
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
E	Extinktion
EDTA	<u>E</u> thylend <u>d</u> iamin <u>t</u> etra <u>a</u> cetic acid
EPS	Exopolysaccharid / „extrazelluläres Polysaccharid“
ER	endoplasmatisches Retikulum

<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
ff	fast flow
Fru	D-Fructose
Fru-6-P	Fructose-6-phosphat
Fuc	L-Fucose
g	Gramm
Gal	D-Galactose
GalNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamin
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GDP-Fuc	Guanosin-5'-diphospho- $\beta$ -L-fucose
GDP-Man	Guanosin-5'-diphospho- $\alpha$ -D-mannose
GDP-Man PP	GDP-Mannose Pyrophosphorylase
Glc	D-Glucose
Glc-1-P	Glucose-1-phosphat
Glc-6-P	Glucose-6-phosphat
Glc-1,6-P <sub>2</sub>	Glucose-1,6-bisphosphat
GlcA	D-Glucuronsäure
GlcN	D-Glucosamin
GlcNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamin
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
HK	Hexokinase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography oder Hochleistungsflüssigchromatographie
I.D.	Innendurchmesser
IMAC	Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KPS	Kapselpolysaccharid
kV	Kilovolt
L	Liter
LacNAc	<i>N</i> -Acetyllactosamin
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LOS	Lipooligosaccharid
LPS	Lipopolysaccharid
Man	D-Mannose
Man-1-P	Mannose-1-phosphat
ManB	Phosphomannomutase
ManC	GDP-Mannose Pyrophosphorylase
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min.	Minute(n)
ml	Milliliter
MnCl <sub>2</sub>	Manganchlorid

MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MurNAc	N-Acetylmuraminsäure
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid Hydrid (reduzierte Form)
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat Hydrid (reduzierte Form)
NaOH	Natronlauge
n.b.	nicht bestimmt
NDP	Nucleosid-5'-diphosphat
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetoesigsäure
nm	Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NTP	Nucleosid-5'-triphosphat
O-Ac	O-Acetyl
<i>orf</i> , ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PP <sub>i</sub>	anorganisches Pyrophosphat
PEG	Polyethylenglykol
PMM	Phosphomannomutase
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
RBS	ribosomale Bindungsstelle
rER	rauhes endoplasmatisches Retikulum
Rha	L-Rhamnose
RmlA	dTDP-Glucose-Pyrophosphorylase
RmlB	dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase
RmlC	dTDP-4-Dehydrorhamnose-3,5-Epimerase
RmlD	dTDP-4-Dehydrorhamnose-Reduktase
RP	Reversed Phase
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec.	Sekunde(n)
T <sub>a</sub>	Annealingtemperatur
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TBA	Tetra-N-butylammoniumhydrogensulfat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>units</i>
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UDP-Gal	Uridin-5'-diphospho- $\alpha$ -D-galactose
UDP-GalNAc	Uridin 5'-diphospho-N-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamin
UDP-Glc	Uridin-5'-diphospho- $\alpha$ -D-glucose
UDP-GlcA	Uridin-5'-diphospho- $\alpha$ -D-glucuronsäure
UDP-GlcNAc	Uridin-5'-diphospho-N-acetyl- $\alpha$ -D-glucosamin
UDP-Xyl	Uridin-5'-diphospho- $\alpha$ -D-xylose
UGD	UDP-Glucose Dehydrogenase
Upm	Umdrehungen pro Minute

UTP	Uridin-5'-Triphosphat
UV	Ultraviolett
v	Testvolumen
V	Ansatzvolumen
v/v	Volumenanteil pro Volumen
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid

### Ein- und Dreibuchstabencodes der Aminosäuren

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

*„Zucker und Ketten aus Zuckermolekülen sind die häufigsten Bestandteile lebender Materie. Immer wieder entdeckt man neue Verbindungen, die Kohlenhydrate enthalten. Welche mannigfaltigen Funktionen sie im normalen Lebensprozess erfüllen und welche Rolle sie bei Krankheiten spielen, beginnt sich erst allmählich abzuzeichnen.“*

Nathan Sharon (1981)

*„Together with nucleic acids and proteins, carbohydrates represent the third dimension of molecular biology.“*

François Jacob

## **1 Einleitung**

Die Glykobiologie bzw. Glykobiotechnologie hat sich in den vergangenen Jahren aus ihrem Schattendasein zu einem schnell wachsenden Forschungsgebiet, vergleichbar der Nukleinsäureforschung der sechziger und siebziger Jahre entwickelt. Dieser Forschungszweig ist in seinen Anwendungsmöglichkeiten sehr breit und steht noch am Anfang einer nicht abzusehenden Entwicklung, da viele Zusammenhänge sich erst allmählich abzuzeichnen beginnen.

Die folgende Einleitung soll einen kurzen Überblick über die vielfältigen Aufgaben der Kohlenhydrate in der belebten Natur vermitteln, sowie von den Möglichkeiten die sich einem eröffnen, wenn man dieses Potential zu nutzen lernt.

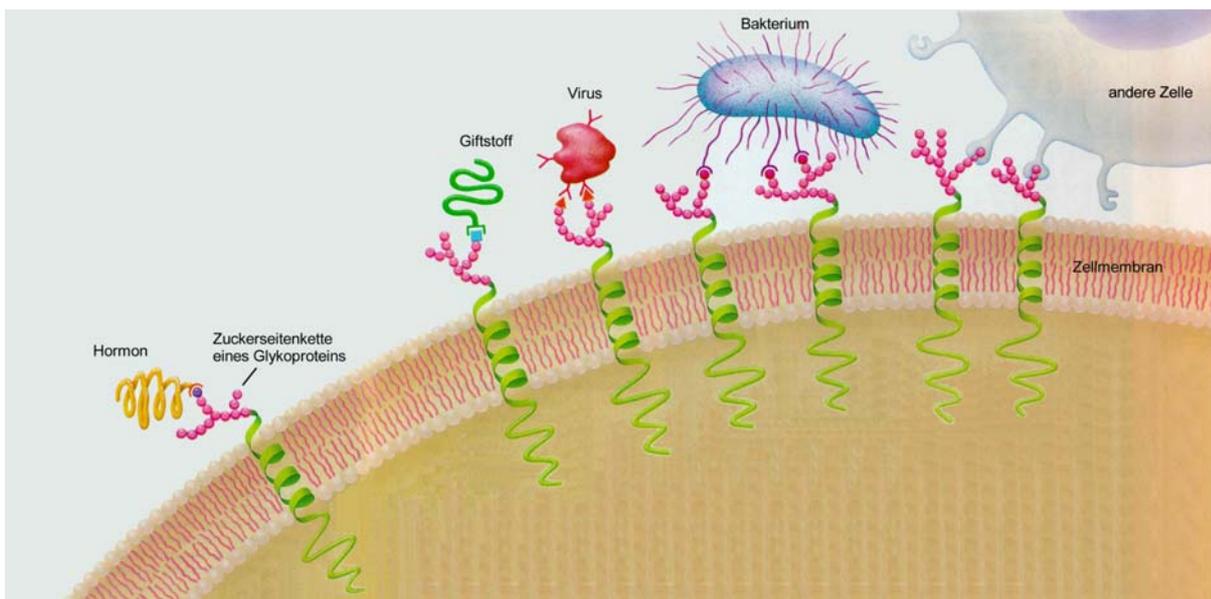
### **1.1 Biologische Bedeutung von Kohlenhydraten und Glykokonjugaten**

Kohlenhydrate (Zucker) zählen neben den Proteinen (Eiweißstoffe), Nukleinsäuren und Lipiden (Fette) zu den vier wichtigsten Klassen natürlicher Makromoleküle. Sie sind ubiquitär vorkommende Biomoleküle, die weltweit alljährlich im Maßstab von schätzungsweise fast 200 Milliarden Tonnen durch Photosynthese entstehen und damit die mit Abstand häufigsten organischen Verbindungen auf unserer Erde (LINDHORST, 2000[a]). Neben ihrer Funktion als Energiespeicher (Stärke; Glykogen), dienen sie als Strukturelemente, sowohl in den Zellwänden von Pflanzen (Cellulose) und Bakterien (Peptidoglykan), als auch in den Außenskeletten der Arthropoden (Chitin) (SHARON, 1981; STRYER, 1991; SHARON & LIS, 1993; KOOLMAN & RÖHM, 1998).

Erst in den letzten 25 Jahren erkannte man, dass sich die Bedeutung von Kohlenhydraten nicht nur auf die oben aufgeführten passiven Funktionen beschränkt. Verknüpft mit Proteinen, Lipiden oder anderen Aglykonen haben komplexe Kohlenhydrate eine große Bedeutung als multifunktionelle Informationsträger.

Dies wird deutlich, wenn man sich vor Augen hält, dass sich Oligosaccharide in der Monosaccharidsequenz, der anomeren Verknüpfung ( $\alpha$ - oder  $\beta$ -glykosidische Bindung) und im Verzweigungsmuster (Ort der Verknüpfung) unterscheiden können. So ergeben sich beispielsweise für ein Tetrasaccharid aus vier verschiedenen Hexosen bereits 34560 Kombinationsmöglichkeiten, wohingegen aus vier unterschiedlichen Amino- oder Nucleinsäuren lediglich 24 verschiedene Tetramere gebildet werden können (SCHMIDT, 1986; LINDHORST, 2000[a]). Dieses enorme Potential struktureller Variabilität prädestiniert die Oligosaccharide geradezu für die molekulare Verschlüsselung biologischer Informationen (RADEMACHER et al., 1988; KOBATA, 1992; LIS & SHARON, 1993; SHARON & LIS, 1993). Vor diesem Hintergrund scheint es durchaus berechtigt Kohlenhydrate, neben den Nucleinsäuren und Proteinen, als die dritte Dimension der molekularen Biologie zu bezeichnen (MONTREUIL, 1995).

---



**Abbildung 1:** Funktionen von Kohlenhydraten auf der Oberfläche von eukaryontischen Zellen (SHARON & LIS, 1993).

Eine besonders wichtige Rolle spielen die Kohlenhydrate als Bestandteil der **Glykokonjugate** (STANLEY, 1993; LEROY et al., 1997), ein Begriff, der erstmals 1973 von MONTREUIL geprägt wurde und neben Glykoproteinen auch Glykolipide und Proteoglykane - Glykosylamino-glykane - umfasst (MONTREUIL, 1995).

So stellen die Oligosaccharidreste von Glykoproteinen, Glykolipiden, Glykophospholipiden und Glykosphingolipiden die entscheidenden Strukturen bzw. Bindungsregionen in einer Vielzahl von inter- und intrazellulären Erkennungs- und Steuerungsprozessen dar (HAKOMORI, 1986; LIS & SHARON, 1993; SHARON & LIS, 1993; SEARS & WONG, 1996; SPILLMANN, 1994; VARKI, 1997; GAGNEUX & VARKI, 1999).

Wie in **Abbildung 1** dargestellt können Kohlenhydrate sowohl als Erkennungsstellen bzw. spezifische Rezeptoren für die Zell-Zell-Erkennung und Zelladhäsion, als auch als Akzeptoren für infektiöse Bakterien und Viren (z. B. Influenza oder HIV), verschiedene Toxine, Hormone, Enzyme, einer Anzahl von Lektinen und anderer Moleküle (z. B. blutgruppen- und tumorspezifische Antikörper) dienen (GREENE, 1991; VARKI, 1993; VARKI, 1997; GREENWELL, 1997; BROCKHAUSEN et al., 1998).

Die großen Oligosaccharidbestandteile der Glykokonjugate bilden dabei eine Zuckerschicht auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran, die die Zelle wie einen Mantel umgibt und als Glykokalix bezeichnet wird. Dieses Oligosaccharidmuster verleiht jedem Zelltyp ein spezifisches Aussehen und ist typisch für ihr Entwicklungsstadium. Abhängig von den physiologischen Umständen ist es dramatischen, zum Teil signifikanten Änderungen unterworfen, wie während der Embryogenese und Morphogenese, während des Zellwachstums und der Zellreifung und zu bestimmten Stadien der Zelldifferenzierung. Auch pathologische Veränderungen oder maligne Transformationen der Zellen gehen häufig mit charakteristischen Veränderungen des Oligosaccharidmusters einher (LINDHORST, 2000[a]). Oligosaccharide bieten damit für die pharmazeutische Industrie wichtige Ansatzpunkte zur Entwicklung neuer Wirkstoffe auf Saccharidbasis. Das Verständnis der krankheitsauslösenden Momente ist zur Zeit zwar immer noch zu wenig verstanden, als dass Wirkstoffen auf Kohlenhydratbasis bislang ein wirklicher Durchbruch gelungen wäre. Trotzdem stellen sie für die Zukunft vielversprechende Zielstrukturen zur Bekämpfung von Krankheiten dar.

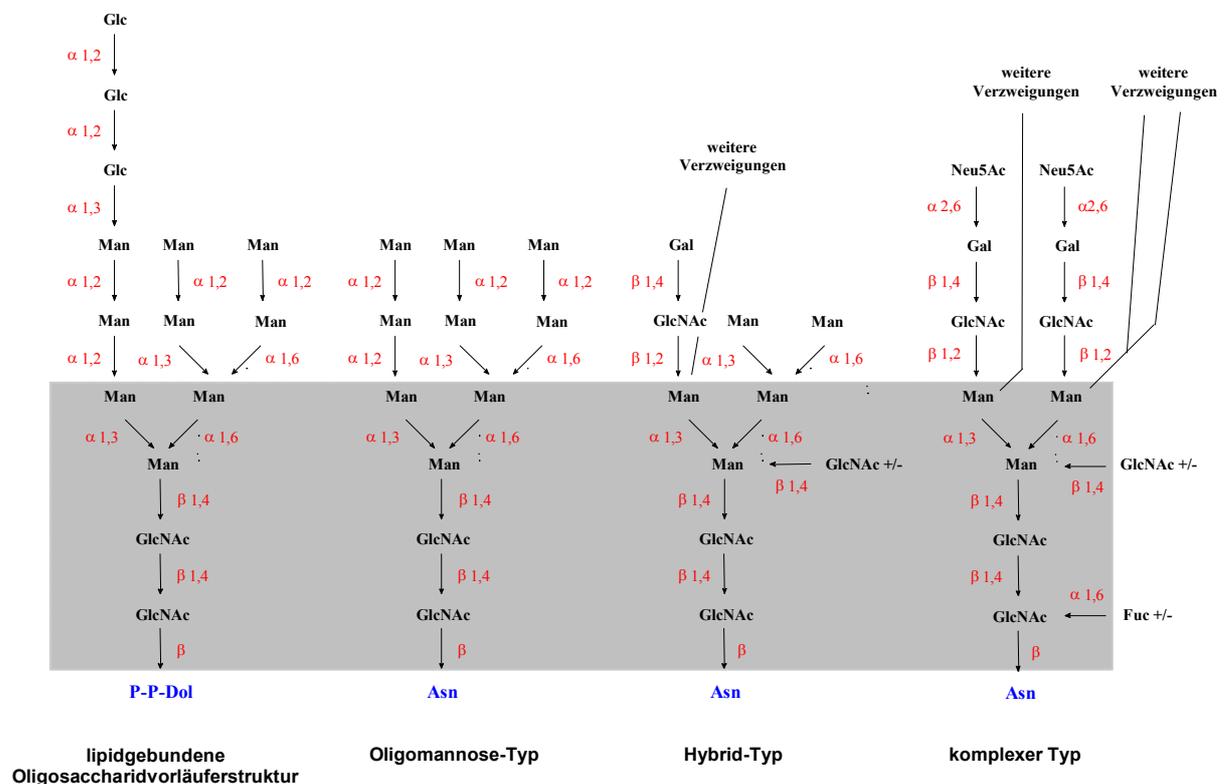
### 1.2 Glykokonjugate der Eukaryonten

Die Glykokonjugate in eukaryontischen Zellen lassen sich aufgrund bestimmter, gemeinsamer Strukturmerkmale in *N*- und *O*-Glykoproteine sowie Glykolipide einteilen.

In ***N*-Glykoproteinen** oder ***N*-Glykanen** ist stets ein Acetylglucosaminyl-Rest  $\beta$ -glykosidisch mit dem Amidstickstoff in der Seitenkette der Aminosäure Asparagin (Asn) verbunden, während in ***O*-Glykoproteinen** bzw. ***O*-Glykanen** *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc)  $\alpha$ -glyko-



- Der **Oligomannose-Typ** enthält außer dem *Core*-Pentasaccharid ausschließlich  $\alpha$ -Mannosyl-Reste. Die verschiedenen Strukturen entstehen durch Variation der Anzahl der Man( $\alpha$ 1-2)-Reste sowie deren Anordnung am *Core*-Pentasaccharid.



**Abbildung 3:** Verschiedene Typen der *N*-Glykane: **Oligomannose-Typ** (High-Mannose-Typ), **Hybrid-Typ** und **komplexer Typ**. Alle *N*-Glykane stammen dabei von einer lipidgebundenen **Oligosaccharidvorläuferstruktur** ab. Die gemeinsame verzweigte pentasaccharidische Kernregion (*Core*-Struktur) aus zwei GlcNAc und drei Mannoseresten ist grau hinterlegt (LINDHORST, 2000[b]).

- Im **komplexen Typ** treten außerhalb der *Core*-Region keine weiteren Mannosereste auf. Es kommt zur Ausbildung von mono- bis pentaantennären Strukturen, die neben GlcNAc und Galactose (Gal) an den Verzweigungspunkten, auch *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), GalNAc, Fucose (Fuc) und Sulfat enthalten können. Dadurch ergibt sich für diese Gruppe die größte strukturelle Vielfalt aller *N*-Glykane.

- Die dritte Gruppe der **Hybrid-Typ** vereint die Strukturelemente des Oligomannose-Typs und des komplexen Typs in einer Kette. Das Oligomannosemotiv findet sich dabei immer am Man( $\alpha$ 1-6)-Arm des *Core*-Pentasaccharids (mit einem oder zwei  $\alpha$ -Mannosyl-Resten) und das des komplexen Typs entsprechend am Man( $\alpha$ 1-3)-Arm.

Im Gegensatz zur *O*-Glykosylierung findet der erste Schritt der *N*-Glykanbiosynthese cotranslational im rauhen endoplasmatischen Retikulum (rER) statt. Unabhängig von der endgültigen Struktur des Saccharidteils wird zunächst eine lipidgebundene Oligosaccharidvorläuferstruktur mit der Summenformel  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$  (**siehe Abbildung 3**) durch die entsprechenden Transferasen aufgebaut.

Erster Schritt ist die Übertragung von GlcNAc in Form von UDP-GlcNAc auf ein Dolicholphosphat (Dol-P). Der lipophile Dolicholrest, ein Polyprenol-Derivat, dient dabei der Verankerung des Moleküls in der Membran des Syntheseortes, dem endoplasmatischen Retikulum (ER) (KORNFELD & KORNFELD, 1985; CUMMINGS, 1992; FUKUDA, 1994; DWEK, 1996; BROCKHAUSEN et al., 1998). An diesem Anker wird die gesamte Oligosaccharidkette membrangebunden aufgebaut. Sukzessiv werden mittels Leloir-Glykosyltransferasen (**siehe Kapitel 1.5**) weitere Monosaccharide, die als Nukleosidmono- oder Nukleosiddiphosphate aktiviert sind, angehängt. Zunächst wird ein weiterer GlcNAc-Rest, danach Mannose linear angehängt und anschließend die Verzweigung bis zum  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$  aufgebaut.

Alle bisher geschilderten Reaktionen finden auf der zytosolischen Seite des ER statt. An dieser Stelle erfolgt nun die Translokation der Oligosaccharidstruktur durch die Membran auf die luminal Seite des ER, wo die weitere Glykosylierung mit Nicht-Leloir-Glykosyltransferasen, die membranständige Dol-P-Zucker-Einheiten (Dol-P-Man, Dol-P-Glc) als Zucker-Donoren verwenden, fortgesetzt wird, da nukleotidaktivierte Zucker im Lumen des endoplasmatischen Retikulums nicht vorliegen (LENNARZ, 1987; HIRSCHBERG & SNIDER, 1987; BROCKHAUSEN et al., 1998).

Erst nach Abschluß sämtlicher Glykosylierungsreaktionen wird der gesamte Oligosaccharidteil dieser dolicholgebundenen  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Vorläuferstruktur mittels einer Oligosaccharyltransferase *en bloc* auf ein Asparagin eines geeigneten Polypeptids übertragen (SILBERSTEIN & GILMORE, 1996; SEARS & WONG, 1998).

Die weiteren Modifikationen des Tetradecasaccharids  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$  werden durch den Transport zum Golgi-Apparat eingeleitet. Katalysiert durch Glykosidasen und Glykosyltransferasen entsteht auf dem Weg zum und im Golgi-Apparat (*cis*-, *medial*- und *trans*-Golgiapparat) die Diversität der Seitenarme (Antennen) durch den teilweisen Abbau

(„*trimming*“), Verzweigung („*branching*“), Verlängerung („*elongation*“) und Terminierung („*termination*“) der *Core*-Struktur. Während dieser Prozesse bewegt sich das Glykoprotein durch die einzelnen Kompartimente des Golgi-Apparates bis hin zum *trans*-Kompartiment von wo aus es schließlich sekretiert wird (DENNIS et al., 1999).

Sowohl die Verzweigungen die auf die *Core*-Region folgen, als auch die hohe Diversität der Seitenarme dienen der multivalenten Präsentation zellspezifischer terminaler Strukturen auf der Zelloberfläche (FUKUDA, 1994; PAULSON, 1989).

*N*-Acetylgalactosamin (GalNAc), Galactose (Gal), Fucose (Fuc) und *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) treten hier, wie auch bei den *O*-Glykanen und Glykolipiden als Bausteine der terminalen Strukturen auf (WATKINS, 1995; YAMAMOTO et al., 1990).

### ***O*-Glykane**

GalNAc-Ser oder GalNAc-Thr verknüpfte Oligosaccharide - ***O*-Glykane** - kommen auf löslichen, sekretierten und membrangebundenen Glykoproteinen vor. Ihre Funktionen sind dabei ebenso vielfältig wie ihre Strukturen, so dienen sie dem Schutz von Proteinen und der Oberfläche von Epithelzellen, der Erhaltung der Proteinkonformation und sind beteiligt an interzellulären Wechselwirkungen, Wachstumsregulation, Blutgerinnung, Embryogenese und „programmierter“ Zelltod (Apoptose), um hier nur einige Beispiele zu nennen.

*O*-Glykane vom **Mucin Typ**<sup>1</sup> beinhalten bis auf das einheitliche **Tn-Antigen** (GalNAc $\alpha$ -Ser/-Thr) keine einheitliche *Core*-Struktur. Bisher konnten jedoch acht zellspezifische *Core*-Strukturen (**Abbildung 4**) auf *O*-Glykanen identifiziert werden (BROCKHAUSEN, 1995; VAN DEN STEEN et al., 1998; BROCKHAUSEN et al., 1998; BROCKHAUSEN, 1999).

Im Gegensatz zur *N*-Glykanbiosynthese, bei der eine bestimmte Aminosäuresequenz als Glykosylierungsmotiv erkannt wird, konnte bisher bei den *O*-Glykanen keine einheitliche Peptidstruktur als Akzeptorsubstrat für die  $\alpha$ -GalNAc-Transferase identifiziert werden. Allerdings wurde eine Bevorzugung von Ser/Thr/Pro-reichen Regionen und ein Einfluss der bereits vorhandenen Glykosylierung des Polypeptid-Rückgrats beobachtet (VAN DEN STEEN et al., 1998; SEARS & WONG, 1998; BROCKHAUSEN, 1999).

Die Glykosyltransferasen der *O*-Glykosylierung befinden sich ausschließlich im Golgi-Apparat (KORNFELD & KORNFELD, 1985). Anders als bei den *N*-Glykanen wird hier jedoch die Oligosaccharidkette schrittweise auf dem Peptid bzw. Protein aufgebaut. Es findet keine

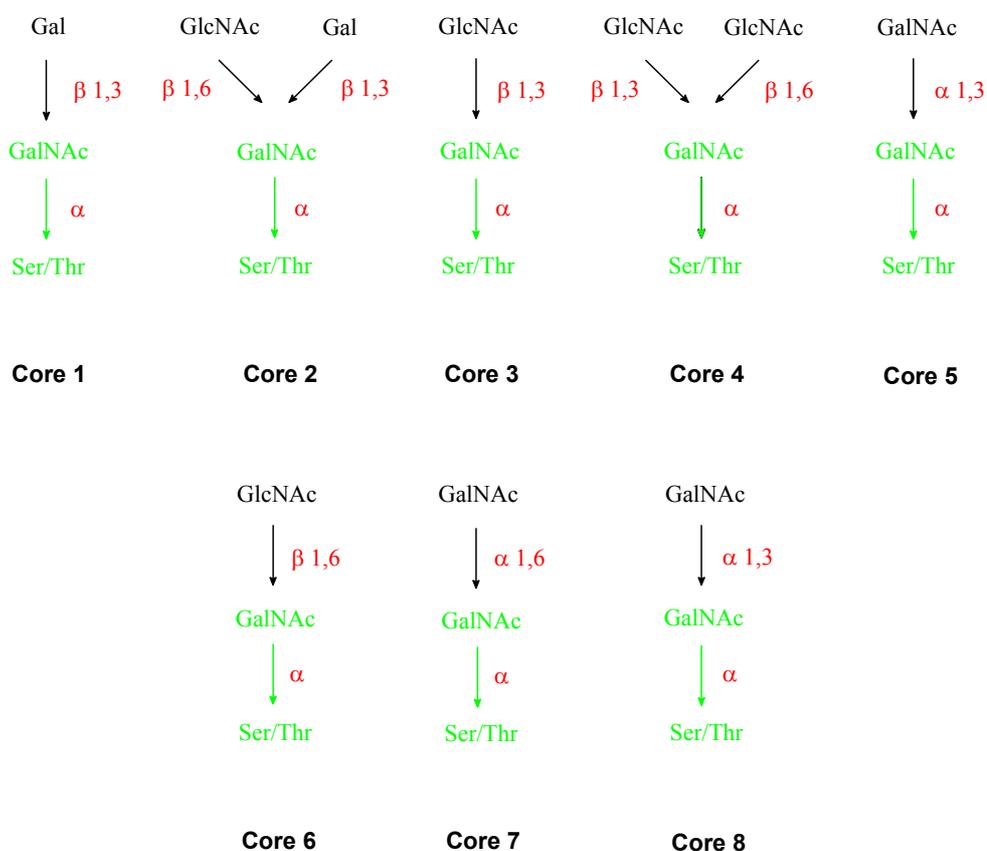
---

<sup>1</sup> *mucus* (lateinisch): Schleim.

*en bloc* Übertragung einer größeren Zuckereinheit statt; auch ist keine Prozessierung („*trimming*“) durch Glykosidasen, wie sie für die Biosynthese von *N*-Glykanen beschrieben ist, am Aufbau einer definierten Saccharidstruktur beteiligt (SCHACHTER, 1991).

Einleitender Schritt ist die Übertragung eines GalNAc-Restes  $\alpha$ -glykosidisch auf einen Serin- oder Threoninrest des Peptids im *cis*-Kompartiment des Golgi-Apparates. Durch die Verknüpfung weiterer Monosaccharide mit dieser Einheit entstehen anschließend die verschiedenen *Core*-Strukturen.

---



**Abbildung 4:** *Core*-Strukturen der *O*-Glykane vom Mucin Typ; grün hervorgehoben ist das allen gemeinsame **Tn-Antigen (GalNAc( $\alpha$ )Ser/Thr)**.

Diese Strukturen entstehen durch Kombination von nur drei Monosacchariden: GalNAc, GlcNAc und Gal. Die Ausbildung jeder einzelnen *Core*-Struktur wird durch eine dafür spezifische Glykosyltransferase katalysiert. Alle *Core*-Strukturen sind terminal fucosyliert und sialyliert oder mit den blutgruppentypischen Resten GalNAc, Fuc oder Gal substituiert.

Poly-LacNAc-Strukturen (*N*-Acetyllactosamin; Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc), wie sie auch bei den komplexen *N*-Glykanen zu finden sind, treten dabei oft als Verlängerung der *Core 2* Struktur auf. Man nimmt an, dass die Enzyme wie an einem Fließband im Golgi-Apparat angeordnet sind, wobei sich früh agierende Enzyme im *cis*-Kompartiment, Enzyme die die mittleren Strukturen aufbauen im *medialen*-Kompartiment und diejenigen die terminale Strukturen anknüpfen im *trans*-Kompartiment des Golgi-Apparates befinden (BROCKHAUSEN, 1999).

## Glykolipide

In **Glykolipiden** ist der Oligosaccharidanteil *O*-glykosidisch entweder an ein 1,2-Di-*O*-Diacylglycerin (Glykoglycerolipide) oder ein *N*-Acylsphingosin (Glykosphingolipide) gebunden (LINDHORST, 2000[a]).

Die **Glykosphingolipide** stellen wichtige Komponenten der Zellmembran dar und bestehen aus dem aglykonischen, hydrophoben Grundkörper, *N*-Acylsphingosin, einem auch als Ceramid bezeichneten Lipid, an das ein Oligosaccharid gebunden ist. Entsprechend der Art und Bindung der Zucker im inneren, also dem Ceramid ansitzenden Bereich der Kohlenhydratkette, werden wie bei den *O*-Glykanen verschiedene *Core*-Strukturen unterschieden (LEVERY et al., 1992; MAKAAARU et al., 1992; LEHMANN, 1996). Die Bildung von Ceramid findet auf der zytosolischen Membranseite des endoplasmatischen Retikulums (ER) statt, während die Zuckerreste auf der zytosolischen bzw. luminalen Seite des Golgi-Apparates, durch die schrittweise Übertragung von Monosacchariden durch Glykosyltransferasen, eingeführt werden (HAKOMORI, 1986; VAN ECHTEN & SANDHOFF, 1993; KOLTER & SANDHOFF, 1999).

### 1.3 Glykokonjugate der Prokaryonten

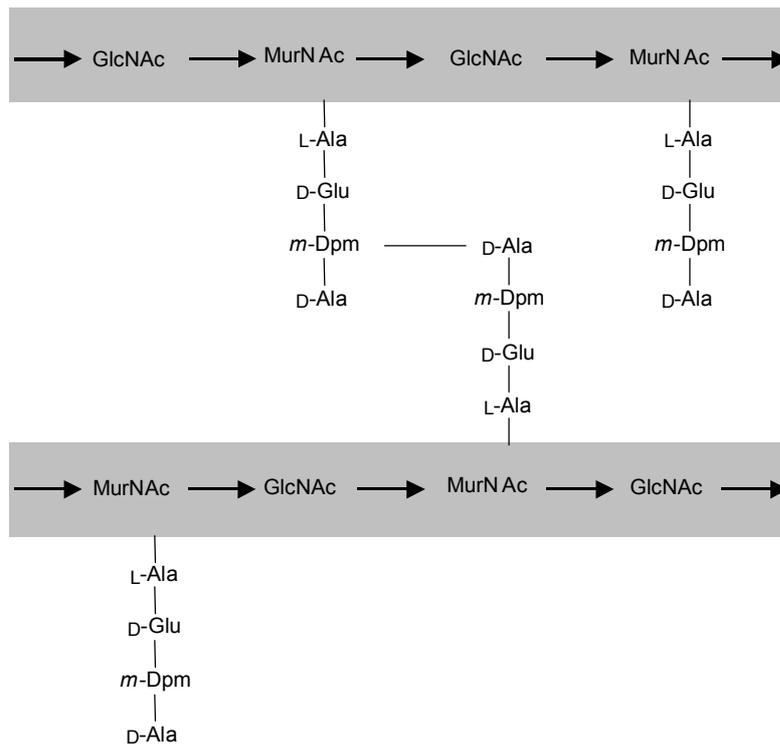
Das am weitesten verbreitete Glykokonjugat der Prokaryonten ist das Peptidoglykan Murein<sup>2</sup>. Es umhüllt die Zelle wie ein Netz (*sacculus*) und verleiht den Zellwänden der gram-positiven wie gram-negativen Bakterien ihre äußere Gestalt und Stabilität. Bei den gram-positiven Bakterien macht das Murein etwa 50 % der Zellwandmasse aus, bei den gram-negativen sind es nur etwa 10 %.

---

<sup>2</sup> *murus* (lateinisch): Mauer.

Der Kohlenhydratanteil besteht alternierend aus *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) und *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc), die  $\beta(1-4)$ -glykosidisch miteinander verknüpft sind. Dieses Disaccharid - GlcNAc $\beta(1-4)$ MurNAc - stellt mit einem Tetrapeptid verknüpft die Grundeinheit des Mureins dar.

---



**Abbildung 5:** Struktur des Mureins von *Escherichia coli*. Die aus einer alternierenden Folge von *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) und *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc) bestehenden heteropolymeren Ketten sind untereinander peptidisch verknüpft (SCHLEGEL, 1992).

Über die Laktylreste des MurNAc sind die einzelnen Kohlenhydratketten peptidisch miteinander zu Schichten verknüpft. Die quervernetzenden Peptide enthalten „unnatürliche“ D-Aminosäuren und sind miteinander über  $\alpha,\omega$ -Diaminosäuren verbunden (**Abbildung 5**). Diese meist an dritter Stelle stehende und für die Quervernetzung notwendige Aminosäure variiert häufig. Statt der *meso*-Diaminopimelinsäure (2,6-Diaminoheptandisäure) findet sich hier auch L-Lysin, L-Ornithin oder L-Hydroxylysin. Durch ihren D-Aminosäure-Anteil sind

die Peptidoglykane der Mikroorganismen gegen den Abbau durch Peptidasen geschützt (VOET & VOET, 1992; SCHLEGEL, 1992; LEHMANN, 1996).

Charakteristisches Merkmal der Archaeobakterien ist das Fehlen eines Peptidoglykangerüsts (Murein). Einige Archaeobakterien aus der Gruppe der methanogenen Bakterien verfügen jedoch über ein dem Murein recht ähnliches Polymer, welches aus diesem Grund auch als Pseudomurein bezeichnet wird. In diesem Polymer ist die *N*-Acetylmuraminsäure durch *N*-Acetyl-L-talosaminuronsäure ersetzt und die Monosaccharide  $\beta(1-3)$ -glykosidisch miteinander verknüpft. Außerdem unterscheidet sich das Pseudomurein vom Murein in der Aminosäuresequenz der quervernetzenden Peptide und durch das Fehlen von „unnatürlichen“ D-Aminosäuren. Die Biosynthese dieser beiden strukturell sehr ähnlichen und funktional einander entsprechenden Polymere verläuft über sehr unterschiedliche Wege. So wurde unter anderem festgestellt, dass im Gegensatz zur Mureinbiosynthese nukleotidaktivierte Oligosaccharide auftreten (HARTMANN & KÖNIG, 1990; KÖNIG et al., 1994). Dies scheint ein deutlicher Hinweis darauf zu sein, dass das Murein der Eubakterien und das Pseudomurein der methanogenen Archaeobakterien aus keiner gemeinsamen Vorläuferstruktur hervorgegangen sind, sondern sich vielmehr unabhängig voneinander erst nach der Bildung der zwei prokaryotischen Reiche - **Archaeobakterien** und **Eubakterien** - entwickelt haben müssen (KANDLER, 1994).

Die Teichonsäuren<sup>3</sup> sind typisch für die Zellwände der gram-positiven Bakterien und finden sich nicht in gram-negativen Bakterien. Vergleichbar den Lipopolysacchariden (vgl. **Kapitel 1.4.1**) der gram-negativen Bakterien bilden sie die antigene Determinante<sup>4</sup> gram-positiver Keime. Bei den Teichonsäuren handelt es sich um Polyester der Phosphorsäure mit Kohlenhydraten als Diol-Komponente, da die Kohlenhydrat-Anteile durch Phosphorsäure untereinander verknüpft sind (**Abbildung 6**).

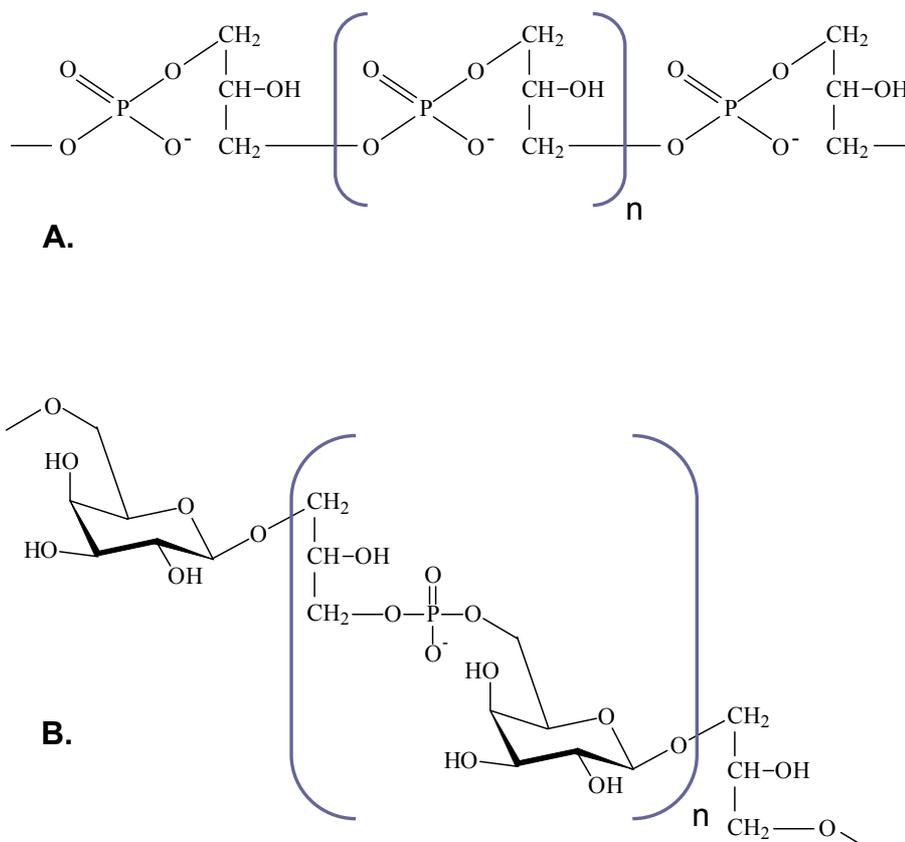
Am häufigsten finden sich dabei Diester von Glycerin und Ribitol, doch können auch Mono- oder Oligosaccharide in Form von Wiederholungseinheiten in diese hochpolymeren Verbindungen eingebaut sein. Teichonsäuren sind kovalent mit dem Peptidoglykangerüst verknüpft. Die Verknüpfung scheint dabei stets über eine Phosphodiester-Brücke mit der C-6-Position eines MurNAc-Restes des Mureins zu erfolgen (GOTTSCHALK, 1986; VOET & VOET, 1992; LEHMANN, 1996).

---

<sup>3</sup> *teichos* (griechisch): Stadtmauer.

<sup>4</sup> Als *antigene Determinante* oder *Epitop* wird ein diskreter und in seiner Struktur genau bekannter Bereich auf einem die Synthese von Antikörpern auslösenden Makromolekül bezeichnet, gegen die das Immunsystem einen spezifischen Antikörper ausbildet und an die dieser spezifisch binden kann.

Lange Zeit war man der Ansicht, dass das Vorhandensein von Glykoproteinen ausschließlich auf eukaryontische Zellen beschränkt ist. Diese Meinung musste jedoch in den letzten zwanzig Jahren revidiert werden. Heute weiß man, dass prokaryontische Glykoproteine nicht nur eine Besonderheit von bestimmten Organismen darstellen, sondern weit verbreitet sind, sowohl unter den Archaeobakterien, als auch unter den Eubakterien.



**Abbildung 6:** Verschiedene Strukturtypen von Teichonsäuren aus gram-positiven Bakterien. **A.:** weit verbreiteter Strukturtyp **B.:** *Bacillus licheniformis* (LEHMANN, 1996).

Zu den am am besten untersuchten Glykoproteinen gehören die „**surface-layer**“ oder „**S-layer**“ Glykoproteine. Die kristallinen „surface-layer“ bilden die äußere Hülle vieler Archae- und Eubakterien und setzen sich aus identischen Protein- oder Glykoproteinuntereinheiten zusammen (MESSNER & SLEYTR, 1991; SANDERCOCK et al., 1994; SUMPER & WIELAND,

1995; MESSNER, 1996; SLEYTR, 1997; SÁRA & SLEYTR, 2000; SCHUSTER & SLEYTR, 2000; SCHÄFFER et al., 2001).

Während bei den Archaeobakterien fast durchgängig eine Glykosylierung der „S-layer“ Proteine vorhanden ist, wurde sie bei den Eubakterien bisher nur bei den *Bacillaceae* (z. B. *Bacillus spec.*, *Clostridium spec.*, *Thermoanaerobacter spec.*) (ALTMAN et al., 1992; MESSNER, 1997) und den *Lactobacillus spec.* (MÖSCHL et al., 1993) gefunden.

Die meisten der bekannten archaebakteriellen „S-layer“ Glykane sind aus kurzen linearen Ketten von bis zu zehn Monosacchariden aufgebaut, die ohne eine *Core*-Struktur direkt *N*-glykosidisch über Glc-Asn, GalNAc-Asn und Rha-Asn, oder *O*-glykosidisch über Thr, an das Protein gebunden sind. Eubakterielle „S-layer“ Glykane hingegen sind zumeist lange Homo- und Heteropolysaccharidketten, die aus identischen Wiederholungseinheiten bestehen und häufig über eine *Core*-Struktur mit dem „S-layer“-Polypeptid verknüpft sind. Die Bindung erfolgt dabei meist *O*-glykosidisch, wobei neben den bereits von den Eukaryonten bekannten Bindungen via Serin und Threonin, auch solche über Tyrosin (Glc-Tyr oder Gal-Tyr) gefunden wurden (PAUL et al., 1986; MESSNER, 1997).

Außer den bereits erwähnten „**S-layer**“ Glykoproteinen finden sich bei den Prokaryonten auch sogenannte „**Non-S-layer**“ Glykoproteine. Diese können entweder membranassoziiert in Form von Glykoproteinen der äußeren Membran oder der Plasmamembran vorliegen, oder sind, wie im Falle der Flagelline und Pili, mit der Zelloberfläche assoziiert.

Weitere Beispiele prokaryontischer Glykoproteine stellen die sekretierbaren Glykoproteine bzw. Exoenzyme (wie z. B. Cellulasen, Endoglykosidasen und Phytotoxine), sowie eine Anzahl weiterer als „zelluläre Glykoproteine“ oder „nicht-klassifizierbare-Glykoproteine“ bezeichnete Gruppe dar (SANDERCOCK et al., 1994; MESSNER, 1997; SCHÄFFER et al., 2001).

In Erweiterung der klassischen Definition der Glykokonjugate nach MONTREUIL (1995) können ihnen auch Verbindungen zugeordnet werden, bei denen der Kohlenhydratanteil an andere Strukturen als an Proteine und Lipide geknüpft sind. Hierzu zählen, neben einer Reihe von pflanzlichen Inhaltsstoffen, wie z. B. die Herzglykoside, auch die Antibiotika als mikrobielle Sekundärmetabolite.

### **1.4 Lipopolysaccharide (LPS) und „Colanic Acid“ – Polysaccharide der *Enterobacteriaceen***

Wie schon im vorigen Kapitel erwähnt, synthetisieren Bakterien eine Vielzahl von Polysacchariden.

Einige befinden sich im Zytosol und dienen der Zelle als Kohlenstoff- bzw. Energiequelle, andere wiederum stellen wesentliche Bestandteile der Zelloberfläche dar und haben eine wichtige Rolle bei der Interaktion der Bakterienzelle mit ihrer Umgebung. Vertreter dieser letztgenannten Gruppe, sind neben den **Lipopolysacchariden (LPS)** und **Lipooligosacchariden (LOS)**<sup>5</sup>, die von vielen gram-negativen Bakterien produziert werden, die „extrazellulären Polysaccharide“ (EPS). Diese können entweder eine eng mit der Zelloberfläche verbundene Kapsel bilden, oder vollständig als Schleim in die Umgebung sekretiert werden. Im Gegensatz zu den LPS treten EPS sowohl bei gram-negativen als auch bei gram-positiven Bakterien auf (WHITFIELD & VALVANO, 1993; REEVES et al., 1996[a]).

### 1.4.1 Vorkommen und Struktur von Lipopolysacchariden (LPS)

Die **Lipopolysaccharide (LPS)**, oft auch als Endotoxine bezeichnet, sind charakteristische Bestandteile der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien, wie z. B. *Escherichia coli* und *Salmonella enterica*. In hohen Dosen verursachen Endotoxine durch ihre Wechselwirkung mit Makrophagen des Wirtes (Mensch), die übermäßige Ausschüttung von endogenen Mediatoren (Cytokine, Prostaglandine, Leukotriene und reduzierte Sauerstoffspezies), die zu einer Reihe von pathophysiologischen Reaktionen führen (RIETSCHEL et al., 1993; HOLST et al., 1996; PIOTROWSKI et al., 1997).

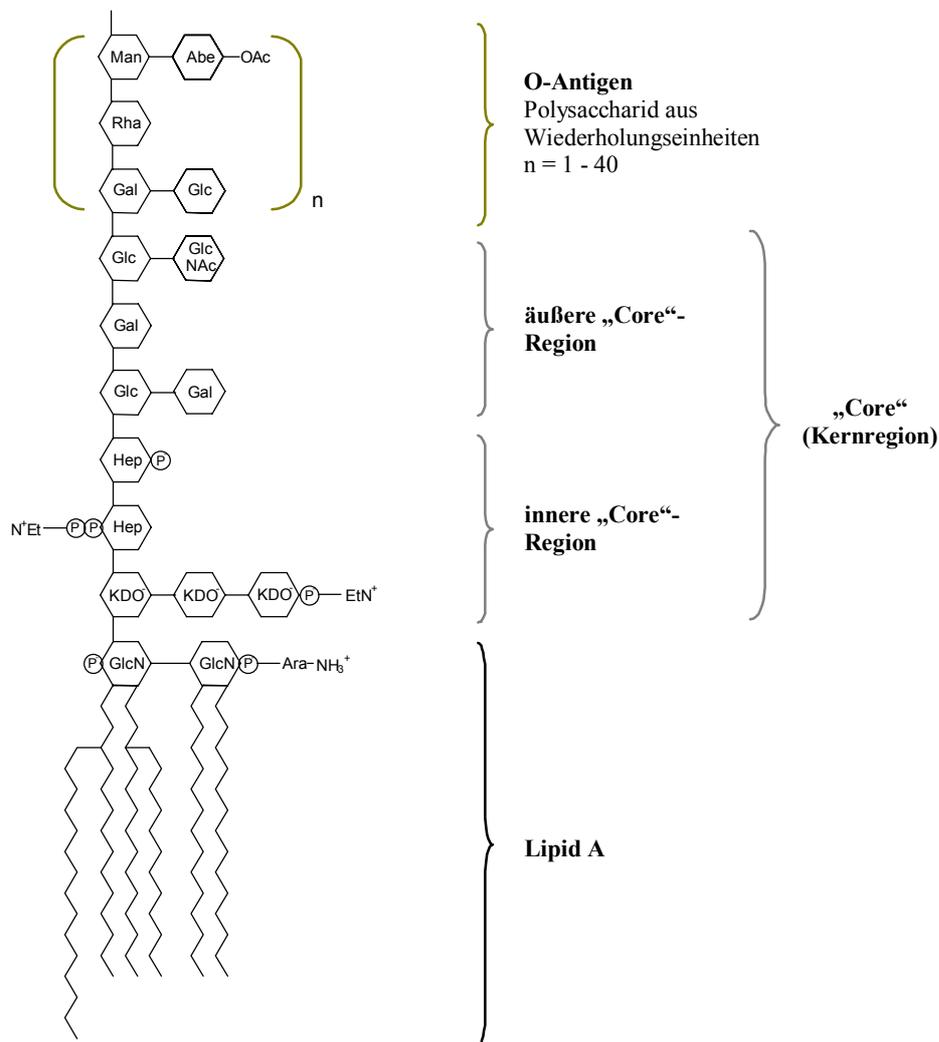
Lipopolysaccharide sind aus drei strukturellen Domänen (**Abbildung 7**) aufgebaut, die über glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind: dem **Lipid A**, dem **Kern-** oder „**Core**“-**Oligosaccharid** und den sich wiederholenden Zuckereinheiten des **O-Antigens** (NIKAIDO & VAARA, 1987; RICK, 1987; SCHNAITMAN & KLENA, 1993; RAETZ, 1996).

Das Lipid A, die endotoxisch wirksame Komponente der Lipopolysaccharide, fungiert dabei als hydrophober Anker des LPS in der äußeren Membran. Es besteht aus Zuckern und Fettsäuren, und ersetzt bei einigen Spezies die Phospholipide (RAETZ, 1993; RAETZ, 1996; REEVES et al., 1996[a]). Die *Core*-Region, unterteilt in eine innere und äußere *Core*-Region, besteht aus einem sich nicht wiederholenden phosphorylierten Oligosaccharid, welches dafür verantwortlich ist, dass einige Antibiotika die äußere Membran nicht passieren können (NIKAIDO & VAARA, 1987; RAETZ, 1993). Sowohl das Lipid A als auch die *Core*-Region sind bei den bisher untersuchten Bakterien sehr ähnlich.

---

<sup>5</sup> Lipooligosacchariden (LOS) fehlt das polymere O-Antigen.

Das *O*-Antigen dagegen zeigt eine große strukturelle Vielfalt. Es besteht aus sich wiederholenden Oligosaccharideinheiten (1 - 40), die sich je nach Organismus aus drei bis sechs Monosacchariden zusammensetzen können und hoch variabel sind.



**Abbildung 7:** Struktur des **Lipopolysaccharids (LPS)** aus der Zellwand des gram-negativen Bakteriums *Salmonella enterica* LT2.

**Abe:** Abequose; **Man:** D-Mannose; **Rha:** L-Rhamnose; **Gal:** D-Galaktose; **Glc:** D-Glucose; **GlcN:** D-Glucosamin; **Hep:** L-Glycero-D-manno-Heptose; **GlcNac:** *N*-Acetyl-D-Glucosamin; **OAc:** *O*-Acetyl; **P:** Phosphat; **EtN<sup>+</sup>:** Ethanolamin, **Ara-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>:** 4-Aminoarabinose; **KDO:** 2-Keto-3-desoxyoctonsäure.

Gemeinsam mit den zellassozierten kapsulären Polysacchariden (KPS) bestimmen die *O*-spezifischen Polysaccharide die serologische Spezifität der gram-negativen Bakterien



kodieren, sowie die Gene, die für die entsprechenden Transferasen und Polymerasen kodieren.

Die Gene für die Biosynthese des Nukleotidzuckers UDP-Galactose (UDP-Gal, **vgl. Abbildung 7**) sind auf einer anderen Stelle des „Chromosoms“ von *Salmonella enterica* lokalisiert, da UDP-Gal neben der O-Antigen-Biosynthese noch an anderen wichtigen Stoffwechselwegen des Bakteriums beteiligt ist (JIANG et al., 1991; XIANG et al., 1993; REEVES et al., 1996[a]).

Ein Vergleich der *rfb*-Regionen zwischen den verschiedenen *Salmonella*-Gruppen hat gezeigt, dass alle die Biosynthesegene für die Nukleotidzucker dTDP-L-Rhamnose und GDP-Mannose besitzen und die Anordnung der Gene *rmlB* (dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase), *rmlD* (dTDP-4-Dehydrorhamnose Reduktase), *rmlA* (dTDP-Glucose Pyrophosphorylase), *rmlC* (dTDP-4-Dehydrorhamnose-3,5-Epimerase) bzw. *manC* (GDP-Mannose Pyrophosphorylase) und *manB* (Phosphomannomutase) konserviert scheint (XIANG et al., 1993; REEVES et al., 1996[a]).

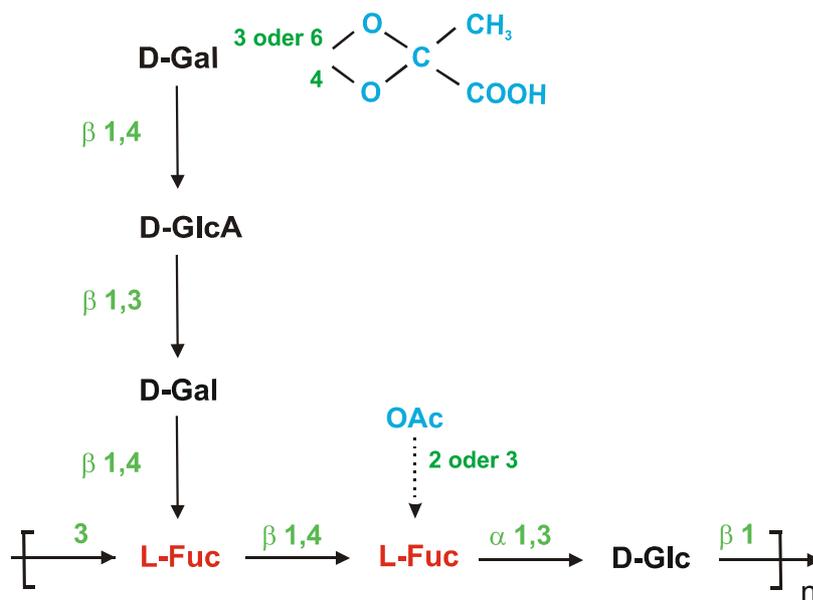
In den letzten Jahren wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen neben dem *rfb*-Gencluster von *Salmonella enterica* A, B, C2 und D (VERMA et al., 1988; VERMA & REEVES, 1989; BROWN et al., 1991; JIANG et al., 1991; LIU et al., 1991; BROWN et al., 1992; XIANG et al., 1994; CURD et al., 1998) auch die *rfb*-Regionen von *Escherichia coli* K-12, O111 und VW187 (STEVENSON et al., 1994; MAROLDA & VALVANO, 1993; BASTIN & REEVES, 1995; MAROLDA & VALVANO, 1995; MAROLDA et al., 1999), *Yersinia enterocolitica* O:3: und O:8: (ZHANG et al., 1993; ZHANG et al., 1996), *Shigella dysenteriae* 1 und *Shigella flexneri* (KLENA & SCHNAITMAN, 1993; MACPHERSON et al., 1994), sowie *Xanthomonas campestris* (KÖPLIN et al., 1993) kloniert und sequenziert.

#### **1.4.2 Vorkommen und Struktur von „Colanic Acid“ oder M-Antigen**

Bakterien sind in der Lage eine Vielzahl von Makromolekülen, unter anderem auch komplexe Polysaccharide, zu sekretieren. Dabei können zwei Arten unterschieden werden. Zum einen die *extrazellulären Polysaccharide*, die von der Zelle in das umgebene Medium ausgeschieden werden und zum anderen die mit der Zelle *assoziierten kapsulären Polysaccharide*, die häufig auch als **K-Antigene** bezeichnet werden (REEVES et al., 1996[a]; STEVENSON et al., 1996; WHITFIELD & ROBERTS, 1999).

Untersuchungen von verschiedenen Arbeitsgruppen seit den vierziger Jahren zeigten, dass mukoide *Salmonella*- und *Escherichia coli*-Stämme in der Lage sind ein Kapselpolysaccharid „**Colanic Acid**“ (CA) zu synthetisieren. Dabei konnte unter bestimmten Wachstumsbedingungen auch bei normalerweise nicht-mukoiden *Salmonella*- und *Escherichia coli*-Stämmen die Bildung, dieses auch als „**M-Antigen**“ bezeichneten Polysaccharids induziert werden (KAUFFMANN, 1941; HENRIKSEN, 1950; KAUFFMANN, 1954; ANDERSON, 1961; ANDERSON & ROGERS, 1963; GRANT et al., 1969).

Nach heutigem Kenntnisstand sind viele, jedoch nicht alle *Enterobacteriaceae* in der Lage zusätzlich zu ihrem K-Antigen dieses Exopolysaccharid „**Colanic Acid**“ (CA) zu synthetisieren (DRUMMELSMITH & WHITFIELD, 2000).



**Abbildung 9:** Struktur des extrazellulären Polysaccharids (EPS) „**Colanic Acid**“ von *E. coli* K-12 (ANDERSON & ROGERS, 1963; GRANT et al., 1969; GAREGG et al., 1971; MARKOVITZ, 1977).

**Fuc:** L-Fucose; **Gal:** D-Galactose; **GlcA:** D-Glucuronsäure, **Glc:** D-Glucose; **OAc:** *O*-Acetyl; **Pyruvat** acetalisch an Galactose gebunden.

Ähnlich den *O*-Antigenen setzt sich „Colanic Acid“ aus einer Hexasaccharid-Wiederholungseinheit, die aus den Zuckern Fucose, Glucose, Galactose und Glucuronsäure in einem Verhältnis von 2 : 1 : 2 : 1 besteht (**Abbildung 9**), zusammen. Zusätzlich ist das Hexasaccharid noch mit einem Pyruvatrest und einer Acetylgruppe modifiziert (GOEBEL,

1963; SUTHERLAND, 1969; LAWSON et al., 1971; GRANT et al., 1970; SUTHERLAND, 1971; GOTTESMAN & STOUT, 1991).

Die Synthese der Wiederholungseinheiten erfolgt an einem Lipid-Carrier-Undecaprenylphosphat durch die aufeinanderfolgende Aktivität spezifischer Glykosyltransferasen mit nukleotidaktivierten Zuckern als Substrate auf der zytoplasmatischen Seite der inneren Membran. Nach der Fertigstellung befördert der Lipid-Carrier die Einheiten auf die periplasmatische Seite der Zellmembran, wo die Polymerisierung stattfindet (JOHNSON & WILSON, 1977; MARKOVITZ, 1977; STEVENSON et al., 1996).

CA ähnelt den Kapselpolysacchariden der Gruppe IA im Hinblick auf ihr hohes Molekulargewicht, die Zuckerzusammensetzung, sowie die Lage der Gene in der Nähe der *his*- und *rfb*-Region bei etwa 45 min auf dem Chromosom (TRISLER & GOTTESMAN, 1984; STOUT, 1996). Außerdem steht die Synthese der Kapselpolysaccharide vom Typ I wie die von CA unter der Kontrolle der *rcs*-Gene („regulator of capsule synthesis“) *rcsA*, *rcsB* und *rcsC* (GOTTESMAN & STOUT, 1991; KEENLEYSIDE et al., 1992; GOTTESMAN, 1995).

Im Gegensatz zu den K-Antigenen spielt „Colanic Acid“ jedoch keine offensichtliche Rolle für die Pathogenität von *E. coli* (RUSSO et al., 1995). Diese Tatsache ist nicht verwunderlich, da das Kapselpolysaccharid im allgemeinen nicht bei Temperaturen von über 30 °C gebildet wird (GOTTESMAN, 1995), obgleich Mutationen zu einer gesteigerten Synthese führen können. Man nimmt heute an, dass CA eine wichtige Rolle für das Überleben von *E. coli* außerhalb seines Wirtes spielt und dabei eine Schutzfunktion gegen das Austrocknen übernimmt (OPHIR & GUTNICK, 1994; SLEDJESKI & GOTTESMAN, 1996; RAHN et al., 1999).

Trotz eines beachtlichen Interesses an den Kontroll- und Regulationsmechanismen der CA Kapselpolysaccharidsynthese, was zahlreiche Veröffentlichungen belegen (GRANT et al., 1970; TRISLER & GOTTESMAN, 1984; ALLEN et al., 1987; STOUT & GOTTESMAN, 1990; GOTTESMAN & STOUT, 1991; STOUT et al., 1991; DIERKSEN & TREMPY, 1996; STOUT, 1996; EBEL & TREMPY, 1999; WHITFIELD & ROBERTS, 1999), war bis vor kurzem nur wenig über die an seiner Synthese beteiligten Gene bekannt.

Erst seit Mitte der neunziger Jahre rückte die Biosynthese des fucosehaltigen Kapselpolysaccharids und seiner an der Biosynthese beteiligten Gene in den Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesses (STEVENSON et al., 1996). Ein Grund dafür war sicherlich die in den vergangenen Jahren erkannte enorme biologische Bedeutung der L-Fucose in pro- und eukaryontischen Glykokonjugatstrukturen, sowie ihre Beteiligung an verschiedenen Krankheiten, wie zum Beispiel der **L**eukozyten**a**dhäsions**d**efizienz vom Typ II (**siehe auch Kapitel 1.7.4 bzw. 1.8**). Ein weiterer, die beobachtete signifikante Homologie des



Aufgrund von Charakteristika in den DNA-Sequenzen konnte inzwischen den meisten Genen mögliche Funktionen zugeordnet werden.

Von den vier verschiedenen Nukleotidzuckern, die am Aufbau der CA-Wiederholungseinheit beteiligt sind, sind nur die Gene, die für die Biosynthese der GDP- $\beta$ -L-Fucose (**GDP-Fuc**) kodieren, innerhalb des CA-Genclusters (*wca*-Gencluster) gelegen. Die Gene für die beiden Nukleotidzucker UDP-D-Glucose (**UDP-Glc**) und UDP-D-Galactose (**UDP-Gal**) sind an einer anderen Stelle auf dem *E. coli* Chromosom lokalisiert, da sie noch an anderen Stoffwechselwegen beteiligt sind. Verantwortlich für ihre Synthese sind sogenannte „housekeeping genes“<sup>6</sup>.

UDP-Glucuronsäure (**UDP-GlcA**), der vierte Nukleotidzucker, wird ausgehend von UDP-D-Glucose (**UDP-Glc**) durch die Aktivität der UDP-Glucose Dehydrogenase (UGD) gebildet, die ebenfalls nicht innerhalb des *wca*-Genclusters gelegen ist (STEVENSON et al., 1991; STEVENSON et al., 1996).

Ein Vergleich der „Colanic Acid“ Gencluster von *Escherichia coli* K-12 und *Salmonella enterica* LT2 legt den Schluß nahe, dass ein lateraler Gentransfer von einer GC-reicheren Art auf die Vorfahren von *E. coli* und *Salmonella enterica* stattgefunden haben muss (LAN & REEVES, 1996; STEVENSON et al., 2000).

### 1.5 Synthese von Glykokonjugaten

Die in den letzten zwanzig Jahren erkannte Bedeutung von Glykokonjugatstrukturen bei einer Vielzahl von biologischen Prozessen, brachte auch ein wachsendes Interesse an deren Synthese hervor, da zur Untersuchung und Manipulation von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen die Kohlenhydratstrukturen in größeren Mengen benötigt werden. Um derartige Verbindungen zu erhalten gibt es zwei Möglichkeiten.

Entweder gewinnt man sie durch Isolierung aus natürlichen Quellen oder man stellt sie synthetisch (chemisch bzw. enzymatisch) dar.

---

<sup>6</sup> Gene die an grundlegenden Stoffwechselwegen beteiligt sind, sind in allen Zellen immer aktiv. Da diese Gene für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion gebraucht werden, nennt man sie auch konstitutive Gene oder auf englisch *housekeeping genes* - Haushaltsgene.

Die **Isolierung** komplexer Oligosaccharide aus natürlichen Quellen ist nur eingeschränkt sinnvoll, da das Glykosylierungsmuster von Zellen deutlichen Schwankungen unterliegt, auch wenn es sich dabei um Zellen des gleichen „Typs“ handelt (LINDHORST, 2000[a]).

### **Chemische Synthese**

Für den organischen Chemiker stellt die chemische Synthese dieser komplexen und multifunktionalen Moleküle, vor allem die Knüpfung der glykosidischen Verbindung zwischen Kohlenhydraten, eine besondere Herausforderung dar (PAULSEN, 1982; SCHMIDT, 1986; KLAFFKE & THIEM, 1991; KOBATA, 1993; KHAN & HINDSGAUL, 1994). Die Nachteile von chemischen Glykosylierungsmethoden liegen in der Kompliziertheit der Synthesen. So kann eine stereospezifische Knüpfung der glykosidischen Bindung oftmals nur durch eine aufwendige Schutzgruppenchemie und Reaktionsschritte zur Aktivierung erreicht werden (NILSSON, 1988; WHITFIELD & DOUGLAS, 1996). Zudem muss für den Aufbau jeder Oligosaccharidstruktur eine individuelle Synthesestrategie entwickelt werden (PAULSEN, 1982). Häufig lässt sich aber auch eine vollständige Stereokontrolle nicht erzielen und durch die Verwendung von organischen Lösungsmitteln in vielen Stufen mit entsprechend vielen Aufreinigungsschritten stellt sich spätestens beim scale-up die Frage nach der Umweltverträglichkeit bzw. den Kosten für die Entsorgung. Diese Schwierigkeiten können durch die Nutzung der Biosynthesewege und deren Enzyme *in vitro* überwunden werden. Grundsätzlich ermöglichen chemische Synthesen jedoch eine viel weitergehende Abwandlung, beziehungsweise Vereinfachung und Variation der natürlichen Vorbildstrukturen, die auf enzymatischem Weg nicht zugänglich sind, so dass sich in diesem Falle der hohe Syntheseaufwand auszahlt.

### **Enzymatische Synthese**

Im Vergleich zur chemischen Oligosaccharidsynthese bietet die enzymkatalysierte Synthese eine Reihe von Vorteilen. Eine große Anzahl von regio- und stereospezifischen Reaktionen kann ohne eine aufwendige Schutzgruppenchemie mit relativ hohen Ausbeuten und vergleichsweise geringem Zeitaufwand durchgeführt werden. Dabei laufen die meisten Reaktionen unter milden Bedingungen bei Raumtemperatur und im Gegensatz zu chemischen Synthesen in wässrigem Milieu bei fast neutralem pH-Wert ab. Bei der enzymatischen Oligosaccharidsynthese können entweder **Glykosidasen [EC 3.2]** oder **Glykosyltransferasen [EC 2.4]** als Biokatalysatoren eingesetzt werden (NILSSON, 1988).

Die **Glykosidasen** gehören zur Klasse der Hydrolasen, welche unter physiologischen Bedingungen die Hydrolyse von glykosidischen Bindungen katalysieren. Bei geeigneter Wahl der Reaktionsbedingungen können diese Enzyme allerdings auch zur Glykosidsynthese eingesetzt werden (NILSSON, 1988). In der präparativen Synthese zeichnen sich die Glykosidasen durch einige Vorteile aus. Sie sind gut verfügbar, da sie leicht aus natürlichen Quellen aufgereinigt werden können und sowohl die Enzyme als auch die Donorsubstrate sind relativ preiswert. Weiterhin tolerieren sie ein breites Substratspektrum vor allem in Bezug auf den Akzeptor. Die Nachteile sind zum einen die nur schwer zu kontrollierende Regioselektivität der Bindungsknüpfung aufgrund der niedrigen Akzeptorspezifität dieser Enzyme und zum anderen die häufig nur geringen Ausbeuten von etwa 20 % bis 40 % (THIEM, 1995; WONG, 1995; FERNÁNDEZ-MAYORALAS, 1997).

Eine attraktive Alternative zu der von Glykosidasen katalysierten Reaktion stellt die Anwendung des „Leloir-Weges“<sup>7</sup> *in vitro* dar (OEHRLEIN et al., 1993; PALCIC & HINDSGAUL, 1996). Die **Glykosyltransferasen** (vgl. auch Kapitel 1.6) dieses Stoffwechselweges zeichnen sich durch ihre hohe Selektivität, sowohl für die Substrate der Enzyme, als auch für die Regio- und Stereoselektivität der durch sie katalysierten glykosidischen Bindung aus. Die nahezu quantitativen Ausbeuten liegen deutlich über den mit Glykosidasen erreichbaren Werten. Limitierungen in der praktischen Nutzung des Leloir-Weges entstanden in der Vergangenheit durch die mangelnde Verfügbarkeit und Stabilität der Enzyme, sowie durch den hohen Preis und die schwierige Synthese der als Substrate benötigten Nukleotidzucker<sup>8</sup>. Aufgrund von neu entwickelten Klonierungstechniken steht heute eine steigende Zahl von Glykosyltransferasen für die Verwendung in der Synthese zur Verfügung (FIELD & WAINWRIGHT, 1995).

Da weder chemische noch enzymatische Synthesen den absoluten Anspruch bei der rationalen Entwicklung einer neuen Generation von therapeutischen Zielstrukturen erfüllen können, werden heute Kombinationen in Form von chemoenzymatischen Ansätzen zur Synthese von interessanten Glykomimetika<sup>9</sup> genutzt (WONG et al., 1995[a]; WONG et al., 1995[b]; GIJSEN et al., 1996).

---

<sup>7</sup> Benannt nach dem französischen Biochemiker L. F. LELOIR, der für die Entdeckung 1970 den Nobelpreis erhielt.

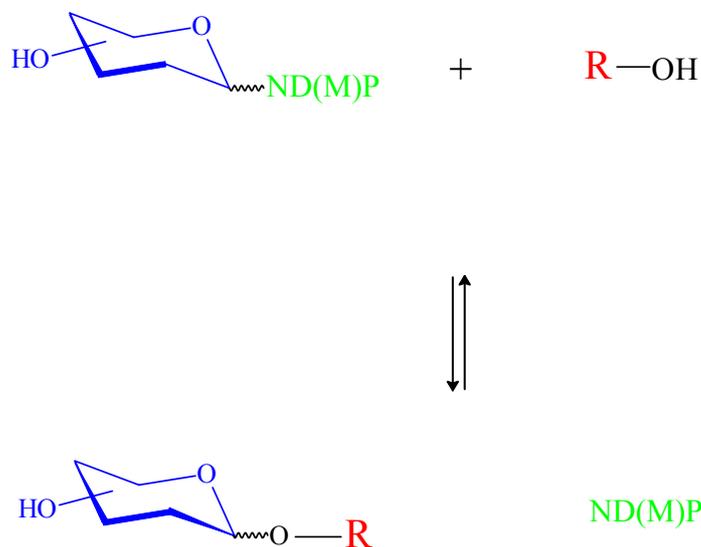
<sup>8</sup> Auf die Bereitstellung der Nukleotidzucker wird gesondert in Kapitel 1.7 eingegangen.

<sup>9</sup> *Glykomimetika*: Nach dem Vorbild natürlich vorkommender Verbindungen abgewandelte synthetische Kohlenhydratanaloga.

## 1.6 Glykosyltransferasen

Die Biosynthese von Oligosacchariden verläuft anders als die Biosynthese von Proteinen nicht unmittelbar genkodiert, sondern wird durch die geordnete Reaktionsabfolge verschiedener **Glykosyltransferasen** in einem Zellkompartiment bestimmt. Sie bildet auch die Grundlage für die Mikroheterogenität des Glykosylierungsmusters von Zellen, da die korrekte Struktur der Oligosaccharide von der Selektivität der aufbauenden Glykosyltransferasen abhängt, die im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat lokalisiert sind (LINDHORST, 2000[a]). Dabei gibt es in der Glykokonjugatbiosynthese mindestens eine spezifische Glykosyltransferase für jede Bindung und für jedes Monosaccharid. Für einige Bindungsknüpfungen wurden ganze Enzymfamilien gefunden, die innerhalb eines Organismus dieselbe Reaktion katalysieren, sich aber in ihren kinetischen Eigenschaften und in ihrem *in vitro* Substratspektrum und Expressionsmuster unterscheiden (DINTER & BERGER, 1995; ALMEIDA et al., 1997; AMADO et al., 1998; HENNET et al., 1998; SATO et al., 1998).

---



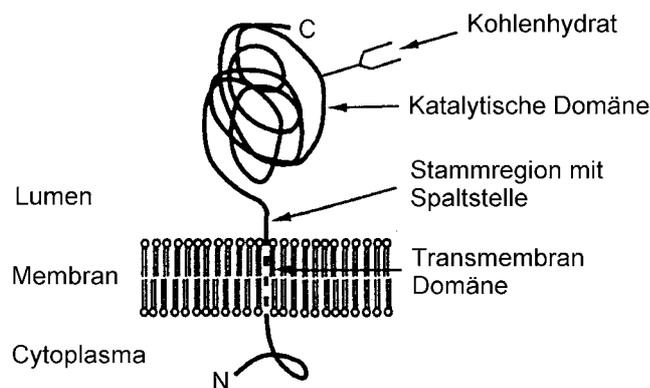
**Abbildung 11:** Schema einer Leloir-Glykosyltransferase katalysierten Reaktion.

Generell unterscheidet man zwei Gruppen von Glykosyltransferasen die am Aufbau von Oligosacchariden beteiligt sind (PALCIC, 1994; WONG & WHITESIDES, 1995), die **Leloir-** und die **Nicht-Leloir-Glykosyltransferasen**. Die Substrate der Enzyme beider Gruppen sind aktivierte Monosaccharide.

Die Glykosyltransferasen des Leloir-Weges (LELOIR, 1971) katalysieren den regio- und stereoselektiven Transfer eines Glykosylrestes von einem Nukleosidmono- oder Nukleosiddiphosphat aktivierten Zucker (Nukleotidzucker) auf einen Akzeptor unter Freisetzung des Nukleotids (ND(M)P; **vgl. Abbildung 11**). Als Akzeptorsubstrat kann dabei ein Mono-, Oligosaccharid oder ein Aglykon, wie z. B. ein Protein, Peptid, Lipid oder auch eine andere Verbindung fungieren (KORNFELD & KORNFELD, 1985; TOONE et al., 1989; ICHIKAWA et al., 1992[b]).

Relativ gut untersucht sind die eukaryontischen Glykosyltransferasen, die im Golgi-Apparat und im endoplasmatischen Retikulum als Membranproteine lokalisiert sind und für die Synthese von Glykolipiden bzw. Glykoproteinen verantwortlich sind (KLEENE & BERGER, 1993). Im Säugerstoffwechsel spielen die Glykosyltransferasen des Leloir-Weges die zentrale Rolle in der Biosynthese glykosidischer Bindungen.

---



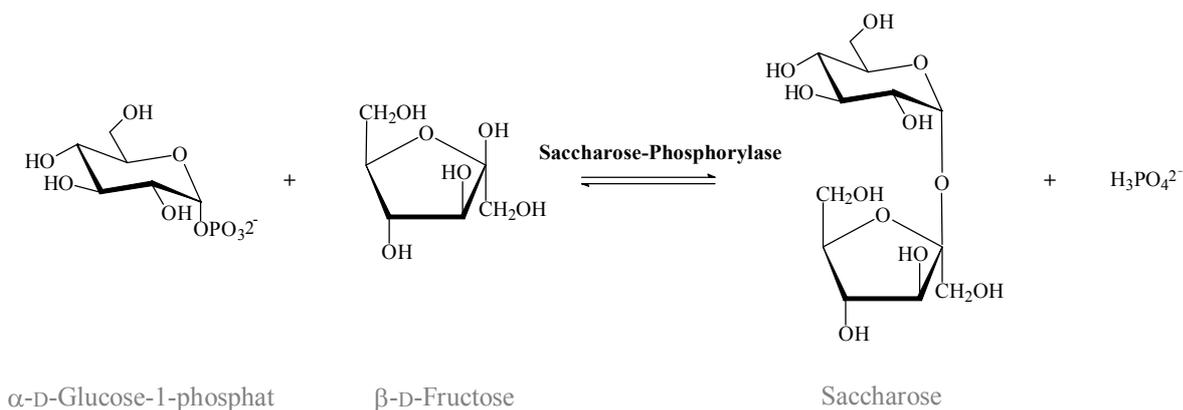
---

**Abbildung 12:** Topologie der Säuger-Leloir-Glykosyltransferasen (FIELD & WAINWRIGHT, 1995).

Bei den Glykosyltransferasen aus Säugetieren handelt es sich um integrale Membranproteine vom Typ 2, die aus einer kurzen *N*-terminalen, zytoplasmatischen Sequenz, einer

Transmembran-Domäne, einer kurzen Stammregion und einer großen C-terminalen, luminalen Domäne bestehen (**Abbildung 12**). Der N-terminale Teil der Enzyme ist für die katalytische Aktivität nicht notwendig, weshalb die Glykosyltransferasen in löslicher Form auf die katalytische Domäne reduziert exprimiert werden können (PAULSON & COLLEY, 1989; PAULSON et al. 1991).

Donorsubstrate der Glykosyltransferasen des Nicht-Leloir-Weges sind Zuckerphosphate. Verdeutlicht wird dies in der **Abbildung 13** anhand der Saccharose-Phosphorylase-Reaktion. Das Enzym katalysiert *in vivo* die Spaltung von Saccharose mit Phosphat zu Glucose-1-phosphat und D-Fructose. Die Reaktion ist reversibel, *in vitro* kann somit die Saccharose-Phosphorylase auch in Syntheserichtung eingesetzt werden.



**Abbildung 13:** Die Saccharidsynthese am Beispiel der Saccharose-Phosphorylase [EC 2.4.1.7] (WONG et al., 1995[b]).

Über die **prokaryontischen Glykosyltransferasen** ist indessen nur wenig bekannt. Von ihnen sind die Glykosyltransferasen, die an der O-Antigen-Synthese in gram-negativen Bakterien beteiligt sind, am besten untersucht (LIU et al., 1993; SCHNAITMAN & KLENA, 1993; KIDO et al., 1995; LIU et al., 1995; WHITFIELD, 1995; WAKARCHUK et al., 1996).

Glykosyltransferase-katalysierte Reaktionen zeichnen sich im Vergleich zu chemischen Synthesen durch ihre hohen Ausbeuten von bis zu 100 % und exzellente Regioselektivitäten aus. Die enzymatische Synthese von Oligosacchariden mittels Glykosyltransferasen hat sich daher in der Zwischenzeit als eine Standardmethode zur Synthese natürlicher Oligosaccharid-

strukturen etabliert, was auch zahlreiche Übersichten belegen (TOONE et al., 1989; WALDMANN, 1995; WONG et al., 1995[a]; WONG et al., 1995[b]; GIJSEN et al., 1996; GAMBERT & THIEM, 1997; WATT et al., 1997).

Wie in **Kapitel 1.5** erwähnt war diese äußerst leistungsfähige Methode bis vor kurzem durch die geringe Zugänglichkeit der Enzyme stark limitiert. Aufgrund von neu entwickelten Klonierungstechniken steht heute jedoch eine steigende Zahl von rekombinanten Glykosyltransferasen für den Einsatz in der enzymatischen Synthese zur Verfügung (FIELD & WAINWRIGHT, 1995; WONG & WHITESIDES, 1995). Dabei werden für die Expression der Glykosyltransferasen verschiedene Expressionssysteme eingesetzt, auf die im folgenden kurz eingegangen werden soll.

Die Expression in **eukaryontischen Systemen** kann in Hefezellen - *Saccharomyces cerevisiae* - (KREZDORN et al., 1993; MALLISARD et al., 1996; BORSIG et al., 1997), in *Cos7*-Zellen (NAKAZAWA et al., 1993; BORSIG et al., 1997; SATO et al., 1998), in CHO-Zellen<sup>10</sup> (ZENG et al., 1997) und im *Baculovirus*-System (ALMEIDA et al., 1997) stattfinden. Ein Vorteil der eukaryontischen Expression besteht darin, dass sowohl die korrekte Faltung des Proteins als auch die korrekte Ausbildung der für die katalytische Aktivität essentiellen Disulfidbrücke gewährleistet ist, da in diesen Systemen die dafür erforderliche Enzymausstattung (Disulfidisomerasen, Chaperone etc.) vorhanden ist (ALMEIDA et al., 1997). Durch die Verwendung von Signalpeptiden (z. B. Invertase-Signalsequenz bei *Saccharomyces cerevisiae* oder *Cos7*-Zellen) ist es weiterhin möglich dafür zu sorgen, dass das Protein in das Kulturmedium abgegeben wird (MALLISARD et al., 1996; BORSIG et al., 1997).

Ein generelles Problem bei der Expression von Glykosyltransferasen in **prokaryontischen Systemen**, wie etwa *Escherichia coli*, besteht darin, dass das gebildete Protein im Zytosol der Zellen nicht korrekt prozessiert werden kann und sich somit inaktive „inclusion bodies“ bilden. Dies liegt daran, dass im zytosolischen Kompartiment spezielle Disulfidbrücken bildende Enzyme und Disulfidisomerasen fehlen, die für eine korrekte Faltung der Enzyme verantwortlich sind (BOEGGEMAN et al., 1993; BOEGGEMAN et al., 1995; ALMEIDA et al., 1997). Weiterhin vermutet man, dass es im Zytosol von *E. coli* ein System gibt, welches Disulfidbrücken zerstört, um so empfindliche Proteine im Zytosol vor Oxidation zu schützen (BARDWELL, 1994). Dies erklärt die Schwierigkeiten bei der Expression von Glykosyltransferasen in *Escherichia coli*.

---

<sup>10</sup> **C**hinese-**H**amster-**O**vary-Zellen – diese Zelllinie wurde bereits 1958 isoliert und hat sich inzwischen zur wichtigsten Produktionszelllinie entwickelt (PUCK et al., 1958).

Einen Ausweg stellt die Sekretion des Zielproteins in das Periplasma von *E. coli* dar. Mit Hilfe eines Signalpeptids bzw. einer Signalsequenz ist es möglich ein Zielprotein nach der Synthese im Zytosol über den Sekretionsapparat von *E. coli* in den periplasmatischen Raum zu transportieren. Hier wird in der Regel das Signalpeptid durch eine bakterielle Signalpeptidase abgespalten und das Protein anschließend in den periplasmatischen Raum entlassen. Im Periplasma herrscht wahrscheinlich eine nicht-reduzierende Umgebung, so dass hier die Formation und die Isomerisierung von Disulfidbrücken stattfinden kann (BARDWELL, 1994).

Neben der Expression in gram-negativen Bakterien existiert auch die Möglichkeit Proteine in gram-positiven Bakterien zu exprimieren (z. B. *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus carnosus*), da diese in der Lage sind Proteine ins Kulturmedium auszuscheiden. Schon seit langem werden diese Organismen für die industrielle Massenproduktion von verschiedenen Enzymen, wie zum Beispiel Amylasen, Lipasen und Proteasen, eingesetzt. Es besteht daher auch ein großes Interesse pharmakologisch relevante Proteine (heterologe Proteine) mit diesen Organismen zu produzieren. Das Problem besteht jedoch darin, dass die Sekretion von heterologen Proteinen vielfach nicht korrekt erfolgt. Die Proteine lösen sich nicht von der Zellwand ab sondern aggregieren dort. Zugleich kann auch ein proteolytischer Verdau der Proteine beobachtet werden, der sowohl auf mit der Zellwand assoziierte Proteasen als auch auf zytoplasmatische Proteasen zurückzuführen ist (FREUDL, 1998). Eine erfolgreiche Sekretion heterologer Proteine ist unter Verwendung eines Signalpeptids in Kombination mit einem Propeptid möglich. Das Propeptid, das bei vielen sekretierten Proteinen der gram-positiven Bakterien vorkommt, scheint dabei gleichzeitig den proteolytischen Abbau der sekretierten Proteine zu minimieren (MEENS et al., 1997; FREUDL, 1998).

Mit Hilfe eines solchen Konstruktes, welches das Propeptid einer Lipase aus *Staphylococcus hyicus* enthält, konnte kürzlich in unserer Arbeitsgruppe die humane  $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase aktiv im Periplasma von *Escherichia coli* exprimiert werden (SCHUMACHER, 1999).

Trotz einer steigenden Anzahl rekombinant vorliegender Glykosyltransferasen stellen die hohen Kosten für die Nukleotidzucker (vgl. **Abbildung 22**) weiterhin einen erheblichen Nachteil für die praktische Nutzung von Leloir-Glykosyltransferasen zur Synthese von Oligosaccharidstrukturen dar. Aus diesem Grund wurden bereits Versuche zu ihrer *in situ*-Regenerierung in Multi-Enzym-Systemen gemacht (WONG et al., 1982; ICHIKAWA et al., 1991; WONG et al., 1992; ICHIKAWA et al., 1994). Die Donoren (Nukleotidzucker) müssen in diesem Fall nur in katalytischen Mengen eingesetzt werden.

## 1.7 Bereitstellung von Nukleotidzuckern als Substrate der Glykosyltransferasen

Zum Aufbau sämtlicher Oligosaccharide des Säugerstoffwechsels werden *in vivo* lediglich neun Nukleotidzucker benötigt (BÜLTER & ELLING, 1999). Im Einzelnen sind dies Uridin 5'-diphospho- $\alpha$ -D-glucose (**UDP-Glc**), Uridin 5'-diphospho- $\alpha$ -D-glucuronsäure (**UDP-GlcA**), Uridin 5'-diphospho- $\alpha$ -D-galactose (**UDP-Gal**), Uridin 5'-diphospho-*N*-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamin (**UDP-GalNAc**), Uridin 5'-diphospho-*N*-acetyl- $\alpha$ -D-glucosamin (**UDP-GlcNAc**), Guanosin 5'-diphospho- $\beta$ -L-fucose (**GDP-Fuc**), Guanosin 5'-diphospho- $\alpha$ -D-mannose (**GDP-Man**), Cytidin 5'-monophospho-*N*-acetyl- $\alpha$ -D-neuraminsäure (**CMP-NeuAc**) und Uridin 5'-diphospho- $\alpha$ -D-xylose (**UDP-Xyl**).

Für die Bereitstellung von Nukleotidzuckern als Substrate für die enzymatische Oligosaccharidsynthese mit Glykosyltransferasen sind in den letzten Jahren sowohl chemische als auch enzymatische Verfahren entwickelt worden (SIMON et al., 1988; FEINGOLD & BARBER, 1990; ELLING, 1997).

### 1.7.1 Chemische Synthese

Die am häufigsten benutzte Methode zur chemischen Synthese von Nukleotidzuckern ist die Kopplung von Zucker-1-phosphaten mit aktivierten Nukleosidmonophosphaten in Form ihrer Phosphoramidate, z. B. als Phosphorimidazolidat oder Phosphormorpholidat (KOCHETKOV & SHIBAEV, 1973; WITTMANN & WONG, 1997). Im Allgemeinen werden aber nur geringe Ausbeuten erzielt (KLAFFKE, 1994), was eine Überführung in einen größeren Maßstab erschwert und verteuert (KHAN & HINDSGAUL, 1994).

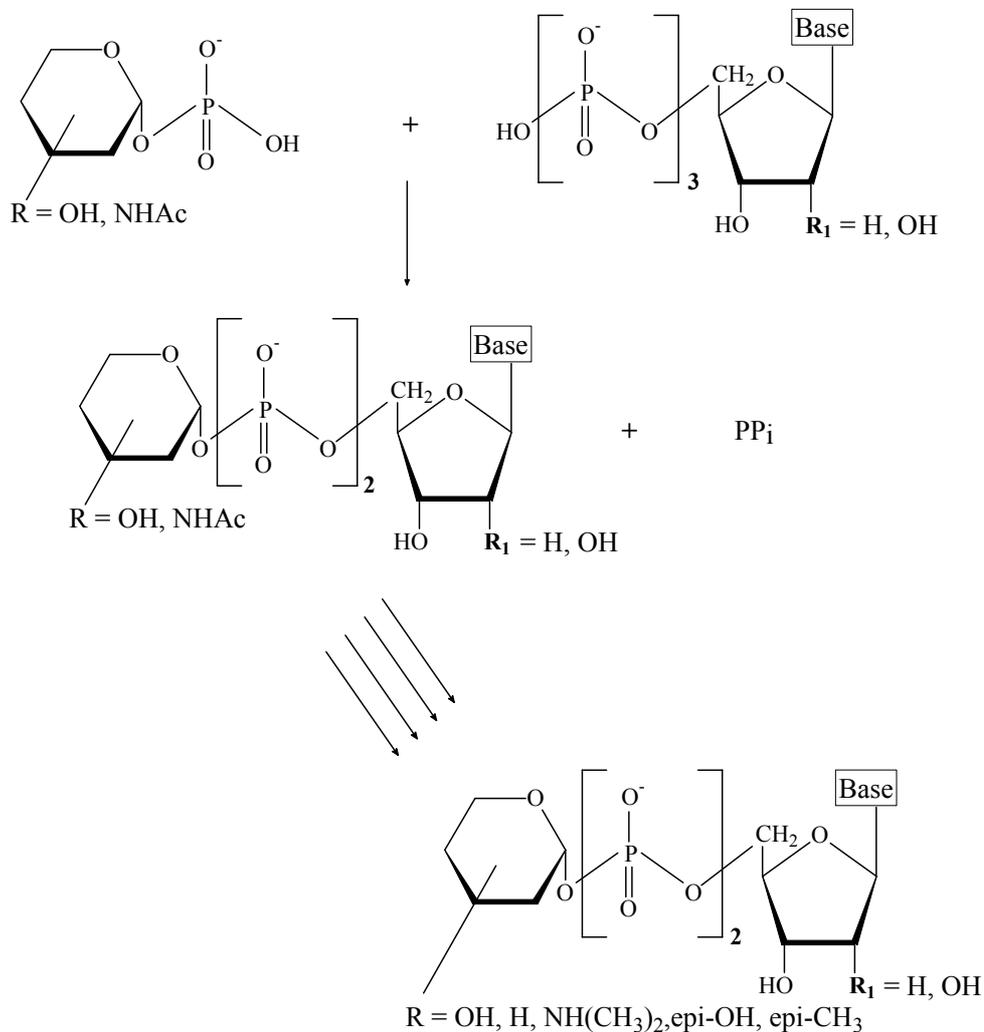
Chemische Synthesen werden häufig angewendet, um im Zuckeranteil modifizierte Donorsubstrate für Reaktionen der Leloir-Glykosyltransferasen herzustellen. Dazu gehören zum Beispiel Desoxyzuckerderivate von UDP-Gal (SRIVASTAVA et al., 1993) und GDP-Fuc (GOKHALE et al., 1990; LINDHORST & THIEM, 1990; LINDHORST & THIEM, 1991; LEON et al., 1994), biotinmarkierte Derivate von GDP-Fuc (HÄLLGREN & HINDSGAUL, 1995) und fluoreszenzmarkierte CMP-NeuAc (BROSSMER & GROSS, 1994).

Schließlich sind auch für GDP-Fucose eine Reihe von chemischen und chemoenzymatischen Synthesen entwickelt worden (**siehe auch Kapitel 1.7.4**), da ein präparativer enzymatischer

Zugang zur Zeit noch nicht möglich ist (SCHMIDT et al., 1991; ICHIKAWA et al., 1992[a]; ADELHORST & WHITESIDES, 1993; ARLT & HINDSGAUL, 1995, BAISCH & ÖHRLEIN, 1997).

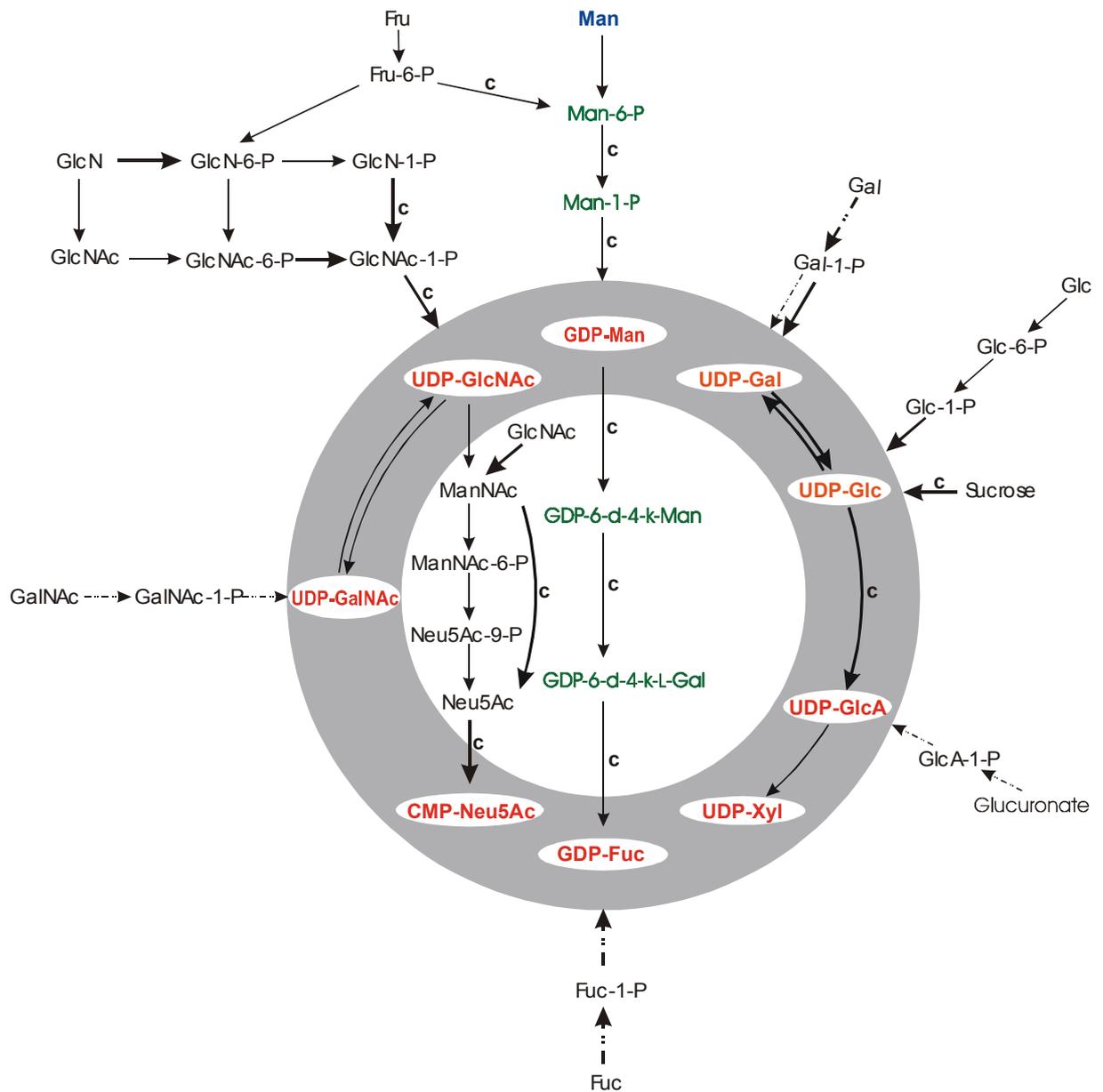
### 1.7.2 Enzymatische Synthese

Nach KOCHETKOV und SHIBAEV (1973) werden die Nukleotidzucker in **primäre** und **sekundäre Nukleotidzucker** unterteilt.



**Abbildung 14:** Allgemeines Reaktionsschema des Leloir Biosyntheseweges von primären und sekundären Nukleotidzuckern (ELLING, 1997).

*In vivo* werden primäre Nukleotidzucker in einer durch NDP-Hexose-Pyrophosphorylasen katalysierten Reaktion [EC 2.7.7.x] aus einem Zucker-1-phosphat und einem Nucleosidtriphosphat unter Freisetzung von anorganischem Pyrophosphat gebildet.



**Abbildung 15:** Biosyntheseschema der „neun Nucleotidzucker“, die für die Glykokonjugatbiosynthese in Säugern wichtig sind. Die Biosynthesewege aus Säugern, Mikroorganismen und Pflanzen sind in dieser Darstellung zusammengefasst (BÜLTER & ELLING, 1999). **c**: Gen, das das Enzym kodiert, welches diesen Schritt katalysiert, wurde kloniert → : Reaktion wurde in einer Synthese in großem Maßstab eingesetzt ---> : Reaktion ist teil eines direkten Aktivierungsweges.

Sekundäre Nukleotidzucker gehen aus den primären Nukleotidzuckern durch weitere enzymatische Modifikationen wie Dehydratisierung, Epimerisierung, Reduktion oder auch Aminierung und Methylierung hervor (**Abbildung 14**). Für einige Zucker wurden zusätzlich zwei Reaktionsschritte umfassende *de novo* Biosynthesewege gefunden.

Diese direkten Aktivierungswege, auch „*Salvage Pathways*“ genannt, erlauben es der Zelle Monosaccharide, die aus dem lysosomalen Abbau zelleigener Komponenten oder aus der Nahrung stammen zu aktivieren. Die Zucker werden hierbei durch Kinasen an der anomeren Position phosphoryliert und anschließend durch Pyrophosphorylasen aktiviert. Direkte Aktivierungswege (**siehe auch Kapitel 1.7.4, Abbildung 17**) wurden für GDP-Fuc, UDP-Gal, UDP-GalNAc und UDP-GlcA gefunden, die aus diesem Grund auch als primäre Nukleotidzucker klassifiziert werden können.

Für die Bereitstellung von Nukleotidzuckern mittels enzymatischer Synthese gibt es verschiedene Ansätze:

Zum einen die **enzymatische Synthese im großen Maßstab** (TOONE & WHITESIDES, 1991) und zum anderen die ***in situ* Regenerierung von Nukleotidzuckern** (WONG et al., 1982; ICHIKAWA et al., 1994). Für beide Ansätze werden dabei Enzyme benötigt, die primäre und sekundäre Nukleotidzucker synthetisieren (WONG & WHITESIDES, 1994; ELLING, 1997; SEARS & WONG, 1998). Die Synthesen folgen dabei den Biosynthesewegen der Nukleotidzucker (**siehe Abbildung 15**) (BÜLTER & ELLING, 1999).

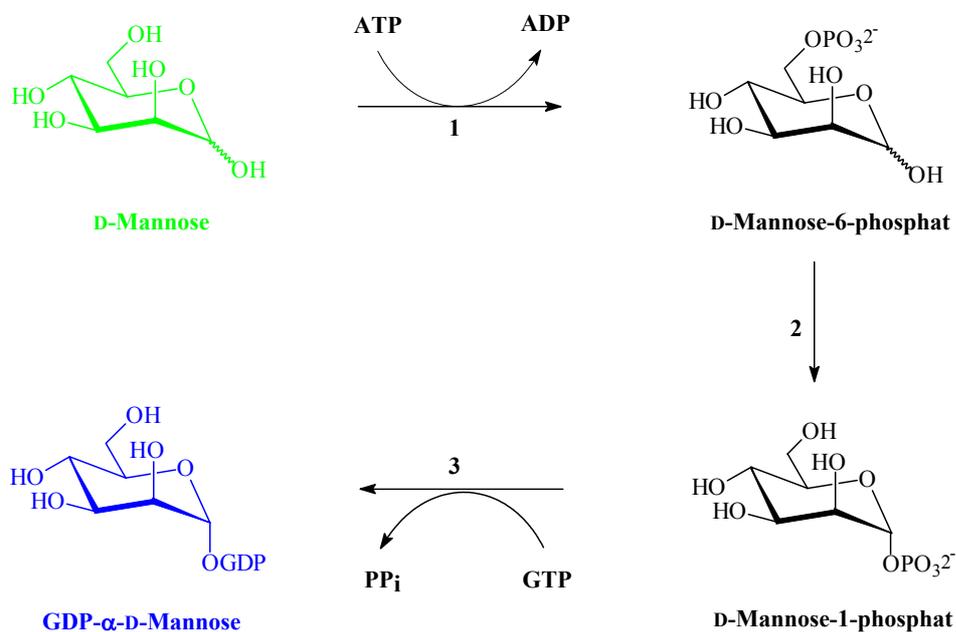
Neben den beiden zuvor beschriebenen Strategien für die enzymatischen Synthese von Nukleotidzuckern gibt es noch den erst kürzlich etablierten Ansatz der **Biokatalyse** bzw. **Biotransformation**. Mittels Biokatalyse bzw. Biotransformation mit ganzen Zellen gelang es einer japanischen Arbeitsgruppe bei Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd. durch „Kopplung“ rekombinanter Bakterienstämme (*Escherichia coli*, *Corynebacterium ammoniagenes*), welche die entsprechenden Biosyntheseenzyme überexprimieren, verschiedene Nukleotidzucker, wie zum Beispiel CMP-NeuAc, GDP-Man, GDP-Fuc und UDP-Gal, in einem größeren Maßstab herzustellen (ENDO et al., 1999; ENDO et al., 2000[a]; ENDO et al., 2000[b]; KOIZUMI et al., 2000; ENDO & KOIZUMI, 2001).

### 1.7.3 Chemische und enzymatische Synthese von GDP- $\alpha$ -D-Mannose

Bereits im Jahre 1888 entdeckte EMIL FISCHER eine damals unbekannte, zur Glucose isomere Hexose, indem er Mannit mit Salpetersäure oxidierte (FISCHER & HIRSCHBERGER, 1888). Wegen ihrer direkten Beziehung zu Mannit nannte er sie Mannose. Im Jahre 1954 gelang

dann CABIB und LELOIR die Isolierung einer aktivierten Form der Mannose aus Hefe, die Guanosindiphosphat-Mannose (CABIB & LELOIR, 1954).

GDP- $\alpha$ -D-Mannose dient zum einen als Donorsubstrat für Glykosyltransferasen, hier Mannosyltransferasen (FLITSCH et al., 1991; WANG et al., 1993; HERRMANN et al., 1994[a]; HERRMANN et al., 1994 [b]; LEHLE & TANNER, 1995) und stellt zum anderen die metabolische Vorstufe für die aktivierte 6-Desoxyhexose GDP- $\beta$ -L-Fucose dar (GINSBURG, 1960; KORNFELD & GINSBURG, 1966; FLOWERS, 1981; YAMAMOTO et al., 1993).



**Abbildung 16:** Biosyntheseweg der GDP- $\alpha$ -D-Mannose ausgehend von D-Mannose. Die Reaktion 1 wird katalysiert durch die **Hexokinase (HK; EC 2.7.1.1)**, während die Reaktionen 2 und 3 durch die **Phosphomannomutase (PMM - RfbK/ManB; EC 5.4.2.8)** bzw. **GDP- $\alpha$ -D-Mannose Pyrophosphorylase (GMP - RfbM/ManC; EC 2.7.7.13)** katalysiert werden.

Für die GDP-Mannose sind in der Literatur verschiedene Synthesen beschrieben worden. Die chemische Synthese von GDP-Mannose wurde erstmalig von Roseman 1961 publiziert (ROSEMAN et al., 1961). Sie erfolgte, wie auch die später beschriebenen Synthesen (PALLANCA & TURNER, 1993; WITTMANN & WONG, 1997), nach der Phosphormorpholidat-Methode (MOFFAT & KHORANA, 1959; MOFFAT & KHORANA, 1961).

Hierbei werden Zucker-1-phosphate mit NMP-Morpholidaten in wasserfreien Lösungsmitteln gekoppelt (**siehe auch Kapitel 1.7.1**). Die publizierten chemischen Synthesen sind gekennzeichnet durch moderate Ausbeuten und zum Teil lange Reaktionszeiten, nicht selten bis zu 5 Tagen.

Fermentativ wurde GDP-Mannose mit luftgetrockneten Zellen der Bäckerhefe hergestellt (TOCHIKURA et al., 1969; KAWAGUCHI et al., 1970) aber auch zellfreie Extrakte von Hefe und *Arthrobacter* wurden zur Synthese von GDP-Mannose und <sup>14</sup>C-markierter GDP-Mannose eingesetzt (MUNCH-PETERSEN, 1955; MUNCH-PETERSEN, 1956; MUNCH-PETERSEN, 1962; PREISS & GREENBERG, 1967; PREISS & GREENBERG, 1972; BRAELL et al., 1976; GRIER & RASMUSSEN, 1982; SIMON et al., 1990; NIGGEMANN & THIEM, 1992; PALLANCA & TURNER, 1993; LEON et al., 1994; KLAFFKE, 1995). Grundlage für alle diese Synthesen bildet der Zucker-Nukleotidzucker-Stoffwechsel in der Zelle, der in **Abbildung 15** für Säuger, Mikroorganismen und Pflanzen zusammenfassend dargestellt ist.

GDP- $\alpha$ -D-Mannose wird in drei aufeinanderfolgenden Reaktionen aus D-Mannose und GTP synthetisiert. Im ersten Schritt wird D-Mannose durch das Enzym Hexokinase an der Position 6 phosphoryliert und das entstehende D-Mannose-6-phosphat anschließend durch die Phosphomannomutase zum 1-Phosphat isomerisiert. Letzter Schritt in der Biosynthese ist die Nukleotidaktivierung von D-Mannose-1-phosphat mit GTP zur GDP- $\alpha$ -D-Mannose, welcher durch die GDP-Mannose-Pyrophosphorylase katalysiert wird. Das Reaktionsschema zeigt die **Abbildung 16**. Eine effiziente *in vitro* Synthese von GDP-Mannose ausgehend von D-Mannose und GTP mit isolierten, rekombinanten Enzymen, sowie kommerziell erhältlicher Hexokinase gelang erstmals in der Arbeitsgruppe von Elling (RITTER, 1995; ELLING et al., 1996) am Institut für Enzymtechnologie. Die Gene, die für die Enzyme Phosphomannomutase (PMM, EC 5.4.2.8) und GDP-Mannose Pyrophosphorylase (GDP-Man PP, EC 2.7.7.13) kodieren, wurden aus *Salmonella enterica*, Gruppe B kloniert, einzeln in *Escherichia coli* heterolog exprimiert und zur Synthese von GDP- $\alpha$ -D-Mannose eingesetzt.

Die präparative Isolierung aus Hefe (CABIB & LOEHR, 1954) stellt bis heute die Hauptquelle für kommerziell erhältliche GDP-Mannose dar.

### 1.7.4 Chemische und enzymatische Synthese von GDP- $\beta$ -L-Fucose

Bei den meisten lebenden Systemen findet sich als Bestandteil komplexer Kohlenhydrate die Desoxyhexose L-Fucose (6-Desoxy-L-galactose).

In tierischen Zellen ist L-Fucose der einzige Zucker der als L-Enantiomer vorkommt und ein wichtiger Bestandteil von Glykokonjugaten in extrazellulären Flüssigkeiten und der Oberfläche von Membranen. Diese Glykokonjugate sind an interzellulären Adhäsions- und Erkennungsprozessen (FEIZI & CHILDS, 1987; FEIZI, 1990) beteiligt. So ist L-Fucose unter anderem ein Bestandteil der ABH Blutgruppen-Antigene und Oligosaccharidstrukturen die dem Lewis-System angehören, wie (S)Le<sup>x</sup>, Le<sup>y</sup>, Le<sup>a</sup> und Le<sup>b</sup> (NISHIHARA et al., 1994) (**Abbildung 17**). Diese Strukturen sind von besonderem Interesse, da sie natürliche Liganden für Selektine darstellen oder mit charakteristischen Veränderungen der Glykosylierung bei verschiedenen pathologischen Bedingungen (Krankheiten) einhergehen.

---

**Blutgruppen - Antigene ABH(O):**

**A** GalNAc(α1-3)[Fuc(α1-2)]Gal(β1-R)

**B** Gal(α1-3)[Fuc(α1-2)]Gal(β1-R)

**H(O)** Fuc(α1-2)Gal(β1-R)

**Lewis – Antigene:**

Le<sup>a</sup> Gal(β1-3)[Fuc(α1-4)]GlcNAc(β1-R)

Le<sup>b</sup> Fuc(α1-2)Gal(β1-3)[Fuc(α1-4)]GlcNAc(β1-R)

Le<sup>x</sup> Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc(β1-R \*)

Le<sup>y</sup> Fuc(α1-2)Gal(β1-4) [Fuc(α1-3)]GlcNAc(β1-R \*)

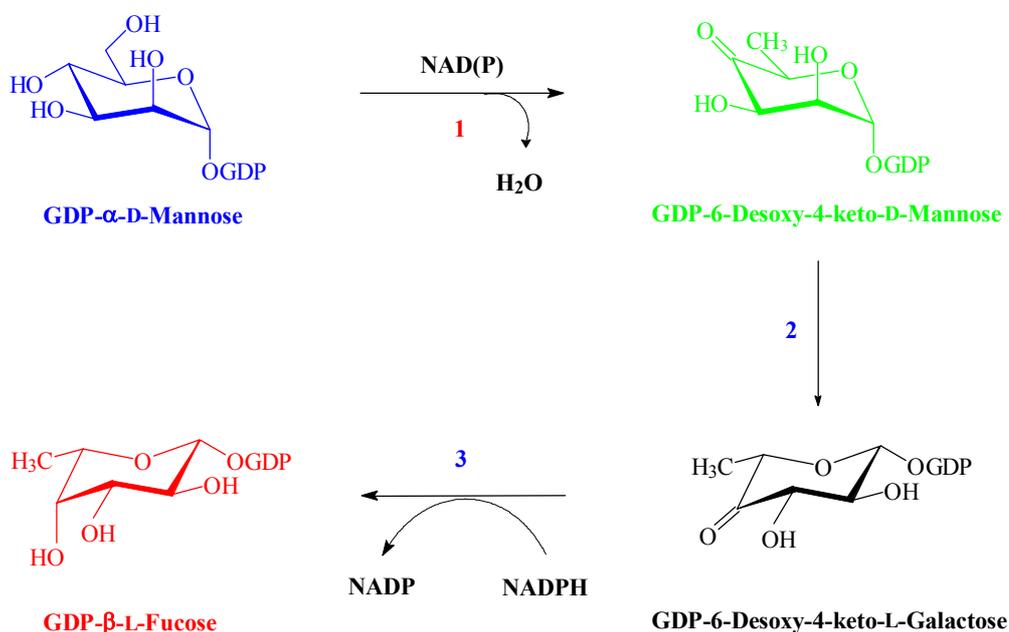
\*) *Helicobacter pylori*

---

**Abbildung 17:** L-Fucose als wichtiger Bestandteil terminaler Strukturen von Glykokonjugaten aus Säugern.

Bei den Prokaryonten ist L-Fucose unter anderem ein Bestandteil von Polysacchariden in den Bakterienzellwänden und in den Lipopolysacchariden einiger gram-negativer Bakterien (FLOWERS, 1981). Das Vorhandensein von L-Fucose in diesen Kohlenhydrat-Strukturen scheint einen starken Einfluss auf die Wechselwirkungen zwischen den Mikroorganismen und ihren Wirtszellen zu haben. So bildet zum Beispiel *Helicobacter pylori* fucosylierte Oligosaccharidstrukturen die den Antigenen des Lewis-Systems entsprechen und

normalerweise auf den Oberflächen von menschlichen Zellen zu finden sind (**Abbildung 17**). Diese spezifischen Kohlenhydratstrukturen dienen der Kontaktaufnahme mit Oligosaccharidstrukturen der Wirtszelle, desweiteren ermöglichen sie es *Helicobacter pylori* der Kontrolle durch das Immunsystem des Wirtes zu entgehen (MORAN, 1996; APPELMELK et al., 1997). GDP- $\beta$ -L-Fucose kann über zwei verschiedene Biosynthesewege gebildet werden. Im sogenannten langen oder „*de novo*“ Biosyntheseweg wird GDP- $\beta$ -L-Fucose in drei enzymatischen Schritten aus GDP- $\alpha$ -D-Mannose gebildet.

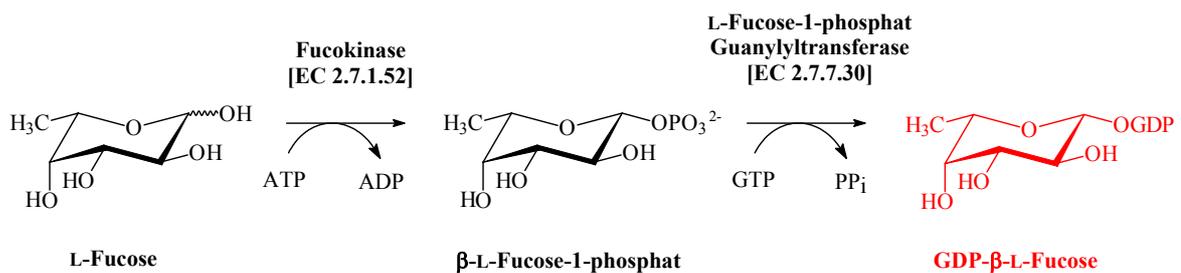


**Abbildung 18:** „Langer Biosyntheseweg“ für die „*de novo*“ Synthese von GDP- $\beta$ -L-Fucose. Reaktion 1 wird katalysiert durch die **GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD)**, während die Reaktionen 2 und 3 durch ein einzelnes bifunktionelles Enzym, welches sowohl eine Epimerase als auch eine NADPH-abhängige Reduktase-Aktivität besitzt, **Fucose-Synthetase (WcaG/Fcl)**, katalysiert wird.

Im ersten Schritt wird GDP- $\alpha$ -D-Mannose zur GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose dehydratisiert. Diese Reaktion wird durch das Enzym GDP-D-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD, EC 4.2.1.47) katalysiert. Die anschließende Epimerisierung an C-3 und C-5, die für den Wechsel von der D- zur L-Konfiguration verantwortlich ist, führt zu GDP-4-Keto-6-Desoxy-L-Galactose. Im letzten Schritt wird die Ketogruppe am C-4 in einer NADPH-

abhängigen Reaktion reduziert, was zur Bildung von GDP- $\beta$ -L-Fucose führt. Beide Reaktionen, Epimerisierung und Reduktion, werden durch ein bifunktionelles Enzym die GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose 3,5-epimerase 4-reduktase bzw. Fucose-Synthetase (WcaG/Fcl; EC bisher noch nicht klassifiziert) katalysiert (**Abbildung 18**).

Der kurze Aktivierungsweg oder auch „Salvage Pathway“ stellt den zweiten Biosyntheseweg dar und umfasst zwei Reaktionsschritte. Im ersten Schritt wird L-Fucose durch eine Fucokinase [EC 2.7.1.52] unter Verbrauch von ATP in  $\beta$ -L-Fucose-1-phosphat umgewandelt und anschließend mit Hilfe einer GDP-Fucose Pyrophosphorylase [EC 2.7.7.30] und GTP in die aktivierte Form, GDP- $\beta$ -L-Fucose, überführt (ISHIHARA et al., 1968; ISHIHARA & HEATH, 1968; ISHIHARA et al., 1972; ISHIHARA & HEATH, 1972; PARK et al., 1998; PASTUSZAK et al., 1998; DRUZHININA et al., 1999) (**Abbildung 19**).



**Abbildung 19:** Direkter Aktivierungsweg - „Salvage Pathway“ von GDP- $\beta$ -L-Fucose.

Der direkte Aktivierungsweg oder „Salvage Pathway“ konnte bisher hauptsächlich in Säugerzellen nachgewiesen werden und spielt gegenüber dem langen oder „*de novo*“ Biosyntheseweg nur eine untergeordnete Rolle (YURCHENKO & ATKINSON, 1977). Etwa 10 % des intrazellulären GDP- $\beta$ -L-Fucose Pools stammen aus diesem Biosyntheseweg. Der weitaus größere Teil wird mittels des langen Biosyntheseweges gebildet, der evolutiv konserviert bisher in Bakterien (GINSBURG & KIRKMAN, 1958; GINSBURG, 1960; GINSBURG, 1961), Pflanzen (BONIN et al., 1997; BONIN & REITER, 2000), Invertebraten (BULET et al., 1984), Amphibien (DRUZHININA et al., 1999) und Säugern (FOSTER & GINSBURG, 1961; REITMAN et al., 1980; BROCHAT et al., 1985; RIPKA et al., 1986; CHANG et al., 1988) nachgewiesen werden konnte.

Bei der GDP- $\beta$ -L-Fucose handelt es sich somit definitionsgemäß sowohl um einen primären, als auch um einen sekundären Nukleotidzucker.

Die chemische Synthese von GDP-Fucose wurde erstmalig von NUNEZ et al. 1981 publiziert. Ausbeuten über 30% konnten aber auch in später beschriebenen Synthesen nicht erzielt werden (GOKHALE et al., 1990; SCHMIDT et al., 1991; ICHIKAWA et al., 1992[a]; ADELHORST & WHITESIDES, 1993; ARLT & HINDSGAUL, 1995; WITTMANN & WONG, 1997; BINCH et al., 1998). Mittels einer chemoenzymatischen Synthesestrategie konnte dann von BAISCH und ÖHRLEIN 1997 die Synthese der GDP-Fucose hin zu hohen Produktausbeuten optimiert werden und sowohl GDP-Fucose als auch Derivate davon im Gramm-Maßstab hergestellt werden. Kennzeichnend für alle diese chemischen Synthesen sind eine aufwendige Schutzgruppenchemie, sowie der wiederholte Einsatz chromatographischer Trennmethode. Obwohl bereits Versuche unternommen wurden GDP-Fucose enzymatisch mittels Zellextrakten herzustellen (PROHNSKA & SCHENKEL-BRUNNER, 1975; YAMAMOTO et al., 1984; ICHIKAWA et al., 1992[b]; STILLER & THIEM, 1992), wird das kommerziell erhältliche Produkt bisher ausschließlich chemisch produziert, was einer der Gründe für seinen enorm hohen Preis ist (**siehe auch Abbildung 22**).

Für die „large-scale“-Synthese von GDP- $\beta$ -L-Fucose kann der sogenannte lange Biosyntheseweg einen eleganten Weg darstellen (KORNFELD & GINSBURG, 1966). Die Synthese kann entweder mittels isolierter und gereinigter Enzyme oder wie erst kürzlich von der bereits in **Kapitel 1.7.2** erwähnten japanischen Arbeitsgruppe (Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd.) publiziert, mittels Ganzzell-Biotransformation erfolgen. Durch die „Kopplung“ metabolisch veränderter (rekombinanter) Bakterienstämme konnte die GDP-Fucose ausgehend von Mannose und GMP in einem größeren Maßstab (18,4 g/l nach 22 h Reaktionsdauer) synthetisiert werden. Dabei wurden die Enzyme des langen Biosyntheseweges von rekombinanten *Escherichia coli*-Stämmen überproduziert, wohingegen *Corynebacterium ammoniagenes* zur Bereitstellung von GTP, ausgehend von GMP, diente (KOIZUMI et al., 2000).

Die enzymatische Synthese von GDP- $\beta$ -L-Fucose mit isolierten und gereinigten Enzymen des Hauptbiosyntheseweges ist aber bisher noch nicht beschrieben worden.

## 1.8 Bedeutung der Kohlenhydrate als pharmakokinetisches Target - Kohlenhydrate als potentiell pharmakologische Wirkstoffe

Das Interesse an Kohlenhydratstrukturen ist nicht nur auf die molekularbiologische Grundlagenforschung beschränkt. Viele Oligosaccharide und ihre Derivate sind von pharmakologischem Interesse, da diese Strukturen in Zusammenhang mit dem Auftreten von verschiedenen Krankheiten stehen (BORMAN, 1993). So sind sie zum Beispiel unter anderem an der Entstehung von Tumoren (BERGER, 1994; NAGATA et al., 1994; LASKY, 1995; MCEVER, 1997), sowie an Entzündungsprozessen (HANISCH et al., 1996; KIM et al., 1996; KANNAGI, 1997; TURNER & CATTERALL, 1997) beteiligt.

Eine Entzündung ist die Reaktion des Körpers auf einen Reiz, wie etwa das Eindringen eines infektiösen Erregers in das Körpergewebe. Dann müssen, angezogen durch chemische Fremdstoffe oder Komplementfaktoren (Chemotaxis), vermehrt neutrophile Granulozyten aus dem Blut an den Infektionsort transportiert werden. Dafür müssen sich die Granulozyten zuerst an die Gefäßwand heften, um anschließend die Blutbahn verlassen und sich auf den geschädigten Bezirk zubewegen zu können. Dort umschließen sie die Erreger und phagozytieren sie. Zusammen mit einer erhöhten Durchblutung und einer erhöhten Kapillarpermeabilität für Proteine ergeben diese Vorgänge eine Entzündung (**Abbildung 20**). Der komplizierte Prozeß der Leukozytenrekrutierung läßt sich vereinfachend in zwei Phasen unterteilen. In der „initialen Phase“ kommt es ausgelöst durch eine Schädigung des Gewebes und entzündungsunterstützende Substanzen zu einer erhöhten Viskosität des Blutplasmas, so dass der Leukozytenstrom verlangsamt wird. Cytokine (z. B. Interleukin I (IL-1) und Tumornekrosefaktor (TNF) werden ausgeschüttet und führen zu einer vermehrten Präsentation von P- und E-Selektinen<sup>11</sup> auf dem Endothel<sup>12</sup>. Wechselwirkungen von P- und E-Selektinen mit Kohlenhydraten auf den Leukozyten, sowie von L-Selektinen mit Kohlenhydratstrukturen auf dem Endothel führen zu einer zunächst noch reversiblen und wenig stabilen Interaktion von Leukozyten mit der Endotheloberfläche. Durch die treibende Kraft des Blutstromes kommt es so zum „Rolling“ der Leukozyten auf den Endothelzellen.

Die zweite Phase der Leukozytenrekrutierung wird von Protein-Protein-Wechselwirkungen gesteuert und resultiert in der festen Adhäsion und Ausschleusung der Neutrophilen. Während der Leukozyt noch auf der Gefäßwand rollt, werden bestimmte Zelladhäsionsproteine

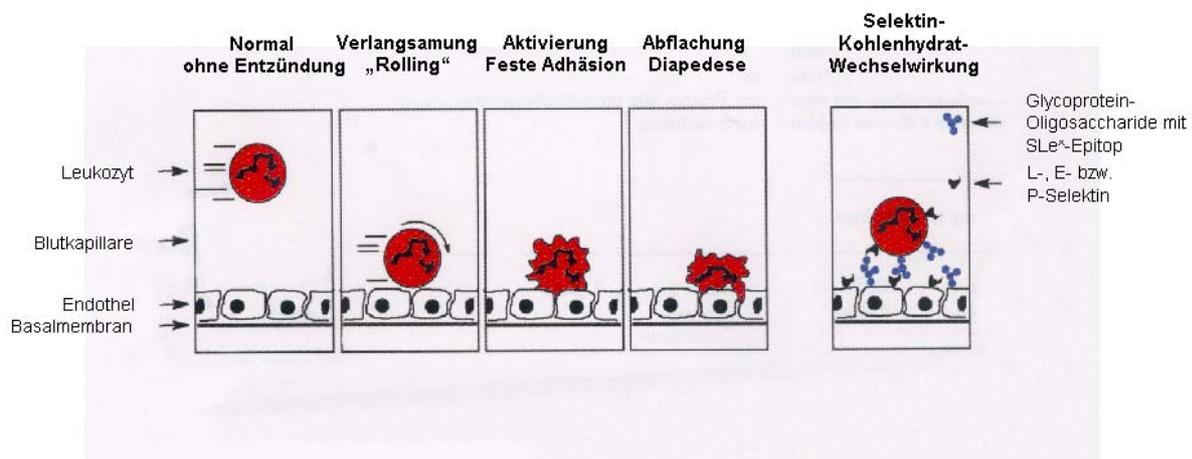
---

<sup>11</sup> Selektine sind echte Lektine, die bestimmte Kohlenhydratstrukturen erkennen.

<sup>12</sup> Endothelzellen kleiden die Innenfläche von Lymph- und Blutgefäßen aus.

(Integrine) auf der Leukozytenoberfläche aktiviert. Die aktivierte Integrinkonformation geht nun eine hochaffine Wechselwirkung mit dem sogenannten ICAM-1-Rezeptor („intracellular adhesion molecule“ I) auf dem Endothel ein, wodurch die feste Adhäsion des Leukozyten bewirkt wird. Der Leukozyt stoppt, flacht ab und kann nach Durchtritt durch die Endothelschicht und die Basalmembran (Diapedese) in das infizierte Gewebe einwandern (**Abbildung 20**) (SHARON & LIS, 1993; GIANNIS, 1994; LASKY, 1995; EBNET & VESTWEBER, 1999; LINDHORST, 2000[a]; KALTNER & STIERSTORFER, 1998).

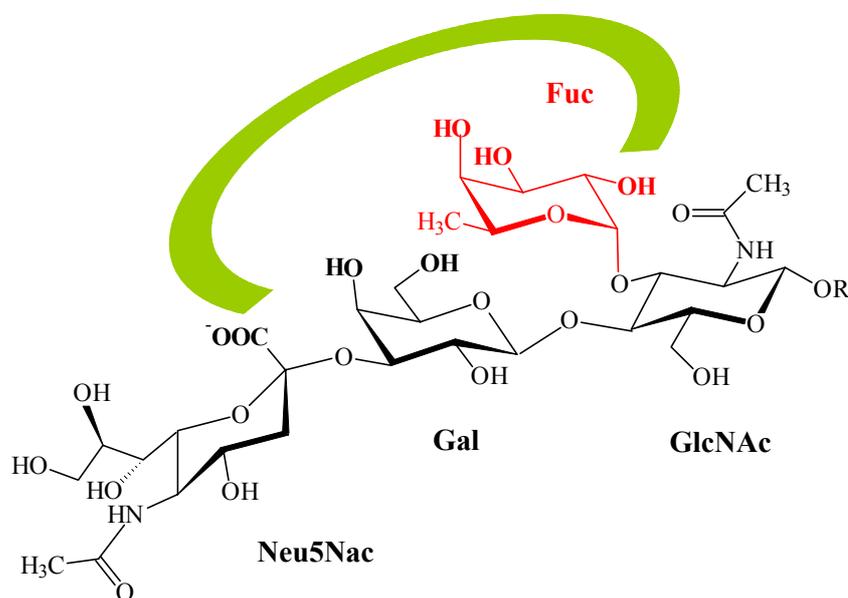
---



**Abbildung 20:** Wechselwirkung zwischen Leukozyten und Endothelzellen der Blutgefäße. (LINDHORST, 2000[a]).

Heute ist bekannt, dass eine überschießende Entzündungsreaktion, ausgelöst durch eine fehlgesteuerte Leukozytenrekrutierung dem Körper erhebliche Schäden zufügen kann. Eine übermäßige Ansammlung von Leukozyten im Bereich der Infektion bzw. des pathologischen Prozesses ist mitverantwortlich für eine Reihe akuter wie chronischer Krankheiten. Als Beispiele seien hier aufgeführt: Kardiogener Schock, Schlaganfall, Thrombosen, Rheuma, Psoriasis, Dermatitis, Bronchialasthma sowie Autoimmunerkrankungen wie zum Beispiel Multiple Sklerose (MS). Daher besteht ein großes medizinisches Interesse, die Mechanismen der Leukozyten-Migration zu erforschen und Medikamente zu entwickeln, mit denen diese beeinflusst werden kann (GIANNIS, 1994; LINDHORST, 2000[a]).

Angesichts der großen Zahl von Molekülen, die an diesem komplexen Prozeß beteiligt sind, gibt es zahlreiche Ansatzpunkte für die Manipulation übertriebener Leukozytenauswanderung als Teil einer Therapie. Ein möglicher Ansatz stellt die Inhibierung des initialen Kohlenhydrat-abhängigen Adhäsionsschrittes am Endothel durch Sialyl-Lewis-X-Mimetika dar. Das Sialyl-Lewis-X-(SLe<sup>x</sup>)-Tetrasaccharid (**Abbildung 21**) ist ein terminaler Bestandteil vieler Oligosaccharidstrukturen in Glykokonjugaten und konnte als gemeinsamer Ligand für alle drei Selektine identifiziert werden (DEFREES et al., 1995).



**Abbildung 21:** Das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis-X (SLe<sup>x</sup>) ist terminaler Bestandteil vieler Oligosaccharidstrukturen in Glykokonjugaten und wurde als Minimal-Ligand für Selektine identifiziert. Es besteht aus *N*-Acetylglucosamin, *L*-Fucose, *D*-Galactose und *D*-Neuraminsäure; **Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc(β-R**. Grün unterlegt ist diejenige Molekülregion, die für die Selektinbindung wichtig ist, wobei die essentiellen Funktionalitäten fett hervorgehoben sind (nach LINDHORST, 2000[a]).

Es wird als Referenzligand und Leitstruktur für alle derzeitigen Untersuchungen verwendet. Sialyl-Lewis-X bzw. entsprechende Analoga und Derivate (STAHL et al., 1994; BAISCH & ÖHRLEIN, 1996; CAPPI et al., 1996; DEFREES et al., 1996; HIRUMA et al., 1996; SANDERS et al., 1996; SEPPO et al., 1996; SPRENGARD et al., 1996; WU et al., 1996; BANTELI & ERNST, 1997)

könnten als Antiphlogistika, Antithrombotika und Immunsuppressiva therapeutisch einsetzbar sein (GIANNIS, 1994).

L-Fucose stellt dabei die essentielle Funktionalität des Tetrasaccharids SLe<sup>x</sup> für die Bindung an die Selektine dar (**Abbildung 21**) und sollte in Glykomimetika möglichst beibehalten werden. Die Bedeutung der Fucose für die Leukozytenadhäsion wird an einer seltenen Erbkrankheit, der Leuukozytenadhäsionsdefizienz vom Typ II (LADII) deutlich. Wegen einer noch nicht in allen Details geklärten Störung sind die Patienten nicht in der Lage fucosylierte Oligosaccharidstrukturen, darunter auch SLe<sup>x</sup>, zu synthetisieren. Die Leukozyten sind somit nicht mehr in der Lage an stimuliertem Endothel zu adhären und in einen Entzündungsherd einzuwandern. Patienten mit diesem Syndrom leiden daher unter immer wiederkehrenden Infektionen einhergehend mit schweren geistigen und körperlichen Beeinträchtigungen (ETZIONI et al., 1992; FRYDMAN et al., 1992; PHILLIPS et al., 1995; BECKER & LOWE, 1999; ETZIONI & TONETTI, 2000).

Die Synthese von Glykomimetika ist ein wesentlicher Schritt auf dem Weg, zu neuen Wirkstoffen auf Kohlenhydratbasis, die sich als potentielle Therapeutika für Krankheiten eignen, die mit der Funktion von Kohlenhydraten in Zusammenhang stehen. Ein wichtiges Beispiel hierfür sind Erkrankungen, die mit akuten oder chronischen entzündlichen Prozessen einhergehen, wie Rheumatismus, Psoriasis oder Dermatitis. Ursache dieser Erkrankungen ist eine fehlgesteuerte Leukozytenrekrutierung, die sich negativ auf den Organismus auswirkt. Zweifellos haben Kohlenhydrate als Träger biologischer Informationen, wie in den vorangegangenen Kapiteln bereits angedeutet, biochemische Funktionen, die weit über ihre bisher bekannten Aufgaben als Energiespeichermoleküle oder Strukturbildner hinausgehen. Für die Beantwortung nahezu aller Fragen der Glykobiologie werden Saccharidstrukturen nach natürlichem Vorbild, sowie Glykomimetika benötigt. Die Herausforderungen ihres Designs und ihrer Synthese werden die Kohlenhydratchemie weiterhin stimulieren und faszinieren.

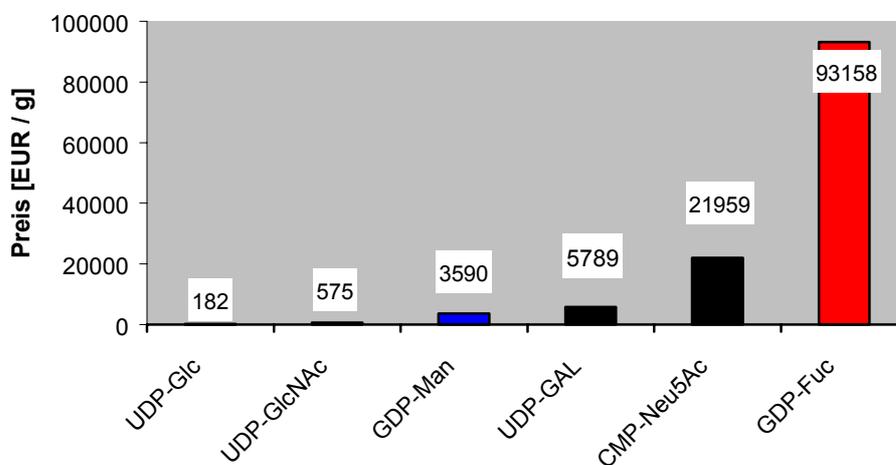
Die neu gewonnenen Erkenntnisse über die Rolle der Oligosaccharide in den Glykokonjugaten wurden von NATHAN SHARON im folgenden Zitat treffend zusammengefaßt:

*„We know now that the specificity of many natur polymers is written in terms of sugar residues, not of amino acids or nucleotides“ (SHARON, 1975).*

## 1.9 Zielsetzung der Arbeit

Im Bereich der pharmazeutischen Forschung werden für die Untersuchung und Manipulation von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen Oligosaccharidstrukturen in größeren Mengen benötigt. Um derartige Verbindungen enzymatisch herstellen zu können, müssen einerseits Glykosyltransferasen und andererseits deren Substrate, die Nukleotidzucker, in ausreichenden Mengen bereitgestellt werden.

Inzwischen sind eine Vielzahl von Nukleotidzuckern als Substrate für die enzymatische Oligosaccharidsynthese kommerziell erhältlich. Nach wie vor stellen sie aber einen beträchtlichen Kostenfaktor dar, um sie in stöchiometrischen Mengen bei größeren Ansätzen einsetzen zu können. **Abbildung 22** zeigt die aktuellen Grammpreise einiger wichtiger Nukleotidzucker.



**Abbildung 22:** Aktuelle Katalogpreise einiger wichtiger Nukleotidzucker (Sigma; Biochemicals & Reagents, 2002/2003)

So nimmt es nicht wunder, dass in den letzten Jahren eine Vielzahl von Publikationen zur Synthese von Nukleotidzuckern erschienen sind. Neben der chemischen Synthese gewinnen dabei enzymatische Methoden aufgrund hoher Selektivitäten und Ausbeuten immer mehr an

Bedeutung. Die hier vorliegende Arbeit ist Teil eines Projektes mit dem Ziel, einen Zugang für die präparative, enzymatische Synthese der Nukleotidzucker GDP- $\alpha$ -D-Mannose und GDP- $\beta$ -L-Fucose ausgehend vom kostengünstigen Monosaccharid Mannose zu eröffnen. Grundvoraussetzung dafür ist die Bereitstellung zuverlässiger Enzymquellen, in Form von rekombinant verfügbaren Biosyntheseenzymen. Die Gene für diese Biosynthesewege finden sich zum einen im *rfb*-Cluster von *Salmonella enterica* LT2 (O-Antigen) und zum anderen im *wca*-Gencluster („Colanic Acid“) von *Escherichia coli* (vgl. **Kapitel 1.7.3 bzw. 1.7.4**).

Aufbauend auf der vorangegangenen Arbeit von RITTER zur enzymatischen Synthese von GDP- $\alpha$ -D-Mannose (RITTER, 1995; ELLING et al., 1996; RITTER et al., 1996) war es das Ziel dieser Arbeit, die bereits vorhandenen rekombinanten Enzymquellen Phosphomannomutase (RfbK/ManB) und GDP-Mannose-Pyrophosphorylase (RfbM/ManC) für die Synthese der GDP- $\alpha$ -D-Mannose zu reaktivieren und das Enzymsystem durch die Bereitstellung der GDP-D-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) und der GDP-Fucose Synthetase (WcaG/Fcl) zu vervollständigen.

Die Gene, die für die Biosyntheseenzyme der GDP- $\beta$ -L-Fucose kodieren, sollten aus *Escherichia coli* K-12 kloniert und einzeln in *Escherichia coli* BL21(DE3) überexprimiert werden.

Um die Voraussetzungen für eine anschließende reaktionstechnische Untersuchung der GDP- $\beta$ -L-Fucose Synthese ausgehend von GDP- $\alpha$ -D-Mannose zu schaffen, sollten die Enzyme aufgereinigt und charakterisiert werden.

Für die Aktivitätsbestimmung und kinetischen Untersuchungen sollten Enzymtests neu entwickelt und etabliert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Medien und Lösungen

Die Medien wurden 20 Minuten bei 121 °C im Autoklaven sterilisiert. Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit 4 N HCl bzw. 4 N NaOH auf den gewünschten Wert eingestellt. Die Gewichtsangaben beziehen sich auf 1 Liter Medium. Alle Medien wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt.

#### 2.1.1 Anzuchtmedien für *Escherichia coli*

##### LB-Medium (Luria-Bertani Medium) (MILLER, 1972)

Trypton	10,00 g
Hefeextrakt	5,00 g
NaCl	10,00 g

Die Nährlösung wird vor dem Sterilisieren auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt.

##### LB-Agar

Trypton	10,00 g
Hefeextrakt	5,00 g
NaCl	10,00 g
Agar	15,00 g

Die Nährlösung wird vor dem Sterilisieren auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt.

##### SOB-Medium (HANAHAN, 1983)

Trypton	20,00 g
Hefeextrakt	5,00 g
NaCl	0,58 g
KCl	0,19 g

nach dem Autoklavieren dazugeben:

MgCl <sub>2</sub> (1 M)	10,00 ml
MgSO <sub>4</sub> (1 M)	10,00 ml

**SOC-Medium** (HANAHAN, 1983)

Glucose 3,60 g  
in SOB-Medium

**2.2 Bakterien, Vektoren und rekombinante Plasmide**

**2.2.1 Bakterienstämme**

**Tabelle 1:** Verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Eigenschaften	Herkunft
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\phi 80d$ lacZ $\Delta$ M15 endA1 recA1 hsdR17 ( $r_K^- m_K^+$ ) supE44 deoR thi-1 $\lambda$ gyrA96 relA1 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169	GRANT et al., 1990
Nova Blue	endA1 hsdR17 ( $r_{K12}^- m_{K12}^+$ ) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F <sup>+</sup> proA <sup>+</sup> B <sup>+</sup> lacI <sup>f</sup> Z $\Delta$ M15::Tn10]	Novagen, Madison, USA
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> ( $r_B^- m_B^-$ ) gal dcm $\lambda$ Prophage (DE3) mit T7-Polymerase	STUDIER et al., 1990
BL21(DE3) pLysS	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> ( $r_B^- m_B^-$ ) gal dcm (DE3) pLysS	Novagen, Madison, USA
LMG194	F <sup>-</sup> $\Delta$ lacX74 galE thi rpsL $\Delta$ phoA (PvuII) $\Delta$ ara714 leu::Tn10	GUZMAN et al, 1995
TOP10	F <sup>-</sup> mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\phi 80lacZ$ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 deoR recA1 araD139 $\Delta$ (araA-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG	Invitrogen, Carlsbad, USA

**2.2.2 Vektoren und rekombinante Plasmide**

**Tabelle 2:** Verwendete Vektoren.

Plasmide	Eigenschaften	Herkunft
pUC18	bla lacZ- $\alpha$	VIEIRA & MESSING, 1982
pET11a	bla lacI T7- $\phi$ 10 lacO s10	STUDIER et al., 1990
pET17b	bla T7- $\phi$ 10 lacO s10	STUDIER et al., 1990
pET16b	bla lacI T7- $\phi$ 10 lacO s10 His-tag	STUDIER et al., 1990
pBAD18	bla P <sub>BAD</sub> araC rrnB	GUZMAN et al, 1995
pBADHisA/B/C	bla P <sub>BAD</sub> araC rrnB His-tag	Invitrogen, Carlsbad, USA
pT7-6	bla T7- $\phi$ 10	TABOR & RICHARDSON, 1985

**Tabelle 3:** In dieser Arbeit verwendete und konstruierte Plasmide.

Bezeichnung	Konstruktion/Bemerkungen	Wirtstamm
<b>pSWJ-1</b>	<b>pET11a/gmd:</b> 1.1 kb PCR-Fragment <i>NdeI/BglIII</i> aus <i>E. coli</i> K-12 in pET11a <i>NdeI/BamHI</i> , Expression von <i>gmd</i>	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ; BL21(DE3)
<b>pSWJ-2</b>	<b>pET16b/gmd:</b> 1.1 kb PCR-Fragment <i>NdeI/BglIII</i> aus <i>E. coli</i> K-12 in pET16b <i>NdeI/BamHI</i> , Expression von <i>gmd</i>	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ; BL21(DE3)
<b>pSWJ-3</b>	<b>pET17b/gmd:</b> 1.1 kb PCR-Fragment <i>NdeI/HindIII</i> aus <i>E. coli</i> K-12 in pET17b <i>NdeI/HindIII</i> , Expression von <i>gmd</i>	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ; BL21(DE3)
<b>pSWJ-4</b>	<b>pET11a/wcaG(fcl):</b> 0.9 kb PCR-Fragment <i>NdeI/BamHI</i> aus <i>E. coli</i> K-12 in pET11a <i>NdeI/BamHI</i> , Expression von <i>wcaG/fcl</i>	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ; BL21(DE3)
<b>pSWJ-5</b>	<b>pET16b/wcaG(fcl):</b> 0.9 kb PCR-Fragment <i>NdeI/BamHI</i> aus <i>E. coli</i> K-12 in pET16b <i>NdeI/BamHI</i> , Expression von <i>wcaG/fcl</i>	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ; BL21(DE3)
<b>pSWJ-6</b>	<b>pET11a/wcaH:</b> 0.4 kb PCR-Fragment <i>NdeI/BamHI</i> aus <i>E. coli</i> K-12 in pET11a <i>NdeI/BamHI</i> , Expression von <i>wcaH</i>	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ; BL21(DE3)
<b>pSWJ-7</b>	<b>pET16b/wcaH:</b> 0.4 kb PCR-Fragment <i>NdeI/BamHI</i> aus <i>E. coli</i> K-12 in pET16b <i>NdeI/BamHI</i> , Expression von <i>wcaH</i>	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ; BL21(DE3)
<b>pSWJ-8</b>	<b>pET11a/wcaI:</b> 1.2 kb PCR-Fragment <i>NdeI/BglIII</i> aus <i>E. coli</i> K-12 in pET11a <i>NdeI/BamHI</i> , Expression von <i>wcaI</i>	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ; BL21(DE3)
<b>pSWJ-9</b>	<b>pET16b/wcaI:</b> 1.2 kb PCR-Fragment <i>NdeI/BglIII</i> aus <i>E. coli</i> K-12 in pET16b <i>NdeI/BamHI</i> , Expression von <i>wcaI</i>	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ; BL21(DE3)
<b>pSWJ-10</b>	<b>pUC18/gmd:</b> 1.1 kb PCR-Fragment (Primer-10 und Primer-12; <i>gmd</i> ) aus <i>E. coli</i> K-12 in pUC18 <i>SmaI</i> („blunt end“)	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ; LMG194
<b>pSWJ-11</b>	<b>pUC18/wcaG:</b> 0.9 kb PCR-Fragment (Primer-13 und Primer-15; <i>wcaG</i> ) aus <i>E. coli</i> K-12 in pUC18 <i>SmaI</i> („blunt end“)	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ; LMG194
<b>pSWJ-12</b>	<b>pUC18/wcaH:</b> 0.4 kb PCR-Fragment (Primer-16 und Primer-17; <i>wcaH</i> ) aus <i>E. coli</i> K-12 in pUC18 <i>SmaI</i> („blunt end“)	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ; LMG194
<b>pSWJ-13</b>	<b>pUC18/wcaI:</b> 1.2 kb PCR-Fragment (Primer-18 und Primer-20; <i>wcaI</i> ) aus <i>E. coli</i> K-12 in pUC18 <i>SmaI</i> („blunt end“)	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ; LMG194
<b>pSWJ-14</b>	<b>pBAD18/gmd:</b> 1.1 kb <i>Asp718/HindIII</i> Fragment aus pSWJ-10 in pBAD18 <i>Asp718/HindIII</i> , Expression von <i>gmd</i>	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ; LMG194
<b>pSWJ-15</b>	<b>pBAD18/wcaG (fcl):</b> 0.9 kb <i>Asp718/HindIII</i> Fragment aus pSWJ-11 in pBAD18	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ; LMG194

	<i>Asp718/HindIII</i> , Expression von <i>wcaG/fcl</i>	
--	--	--

<b>pSWJ-16</b>	<b>pBAD18/wcaH:</b> 0.4 kb <i>Asp718/HindIII</i> Fragment aus pSWJ-12 in pBAD18 <i>Asp718/HindIII</i> , Expression von <i>wcaH</i>	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ; LMG194
<b>pSWJ-17</b>	<b>pBAD18/wcaI:</b> 1.2 kb <i>Asp718/HindIII</i> Fragment aus pSWJ-13 in pBAD18 <i>Asp718/HindIII</i> , Expression von <i>wcaI</i>	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ; LMG194
<b>pSWJ-18</b>	<b>pBAD18HisA/gmd:</b> 1.1 kb PCR-Fragment <i>KpnI/HindIII</i> in pBAD/HisA <i>KpnI/HindIII</i> , Expression von <i>gmd</i>	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ; LMG194
<b>pSWJ-19</b>	<b>pBAD18HisA/wcaG:</b> 0.9 kb PCR-Fragment <i>KpnI/HindIII</i> in pBAD/HisA <i>KpnI/HindIII</i> , Expression von <i>wcaG</i>	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ; LMG194
<b>pSWJ-20</b>	<b>pBAD18HisA/wcaI:</b> 1.2 kb PCR-Fragment <i>NdeI/BglII</i> in pBAD/HisA <i>KpnI/HindIII</i> , Expression von <i>wcaI</i>	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ; LMG194
<b>pERJ-1</b>	<b>pT7-6/rfbM:</b> 1.6 kb <i>EcoRI/BamHI</i> Fragment in pT7-6 <i>EcoRI/BamHI</i>	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ; BL21(DE3)
<b>pERJ-2</b>	<b>pT7-6/rfbK:</b> 1.6 kb <i>EcoRI/BamHI</i> Fragment in pT7-6 <i>EcoRI/BamHI</i>	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ; BL21(DE3)

## 2.3 Oligonukleotide

Die Primer wurden so konstruiert, dass diese Restriktionsschnittstellen enthalten. Dazu wurden die Enzymerkennungssequenzen als kurze Abschnitte an das 5'-Ende der Primer angefügt. Diese Abschnitte hybridisieren zwar nicht mit der Matrize, werden aber in der PCR-Reaktion ebenfalls kopiert, so dass die Produkte an den Enden jeweils eine Restriktionsschnittstelle tragen.

Sofern nicht anders erwähnt, wurden die neu entstandenen DNA-Fragmente mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease, die die DNA in der Primersequenz schneidet, behandelt. Die entstehenden Fragmente wurden anschließend über ihre klebrigen Enden („sticky-ends“) in einen Klonierungsvektor eingebaut.

Die Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma MWG (MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) als Lyophilisat bezogen und sind in der folgenden **Tabelle 4** aufgelistet:

**Tabelle 4:** Oligonukleotidprimer, die in dieser Arbeit verwendet wurden<sup>13</sup>.

Name	Gen/Anmerkungen	Sequenz
<b><u>Oligonukleotide für die Klonierung in Plasmide der pET-Reihe:</u></b>		
Primer-1: (P-1)	<i>gmd</i> , <i>NdeI</i> -Schnittstelle	$T_m$ : 66.1 °C 5'-AATACAGAGGAATAA <u>CATATG</u> TCAAAAGTCGCTCTC-3'
Primer-2: (P-2)	<i>gmd</i> , <i>HindIII</i> -Schnittstelle	$T_m$ : 68.2 °C 5'-TTGTTT <u>AAGCTT</u> GCTTATGACTCCAGCGGATC-3'
Primer-3: (P-3)	<i>gmd</i> , <i>BglII</i> -Schnittstelle	$T_m$ : 62.9 °C 5'-CCAGCAATAAAA <u>AGATCT</u> TTGTTTACTCATGC-3'
Primer-4: (P-4)	<i>wcaG (fcl)</i> , <i>NdeI</i> -Schnittstelle	$T_m$ : 67.0 °C 5'-GATCGCGCTGGAGTCATA <u>CATATG</u> AGTAAACAA-3'
Primer-5: (P-5)	<i>wcaG (fcl)</i> , <i>BamHI</i> -Schnittstelle	$T_m$ : 65.1 °C 5'-TGACGTAAAA <u>GGATCC</u> TACCCCGAAA-3'
Primer-6: (P-6)	<i>wcaH</i> , <i>NdeI</i> -Schnittstelle	$T_m$ : 68.2 °C 5'-AGACCGCTTTCGGGG <u>CATATG</u> ATGTTTTTACGT-3'
Primer-7: (P-7)	<i>wcaH</i> , <i>BamHI</i> -Schnittstelle	$T_m$ : 74.0 °C 5'-TGCCGTAGACCA <u>GGATCC</u> TCATAATCCGGGTACTCC-3'
Primer-8: (P-8)	<i>wcaI</i> , <i>NdeI</i> -Schnittstelle	$T_m$ : 66.8 °C 5'-GTACCCGG <u>CATATG</u> AAAATACTGGTCTACG-3'
Primer-9: (P-9)	<i>wcaI</i> , <i>BglII</i> -Schnittstelle	$T_m$ : 65.5 °C 5'-ACTGGAT <u>AGATCT</u> TCGACTGCGCCATAATTA-3'
<b><u>Oligonukleotide für die Klonierung in die Plasmide pBAD18 und pBAD/HisA:</u></b>		
Primer-10: (P-10)	<i>gmd</i> , <i>Asp718</i> -Schnittstelle	$T_m$ : 65.9 °C 5'-GCGTT <u>GGTACC</u> GAATAAATTCAAAAATACAGAGG-3'
Primer-11: (P-11)	<i>gmd</i> , <i>KpnI</i> -Schnittstelle (bei vorhandener <i>rbs</i> -site)	$T_m$ : 68.1 °C 5'-CAGAGG <u>GGTACC</u> ACATGTCAAAAGTCGCT-3'
Primer-12: (P-12)	<i>gmd</i> , <i>HindIII</i> -Schnittstelle	$T_m$ : 65.1 °C 5'-TGTTT <u>AAGCTT</u> GCTTATGACTCCAGCGC-3'

<sup>13</sup> Schnittstellen für Endonukleasen sind in der Tabelle angegeben und in der Nukleotidsequenz unterstrichen.

Primer-13: (P-13)	<i>wcaG (fcl)</i> , <b>Asp718</b> -Schnittstelle 5'-CTCTCT <b>GGTACC</b> ATCTCACGGCTACGACGT-3'	T <sub>m</sub> : 70.9 °C
Primer-14: (P-14)	<i>wcaG (fcl)</i> , <b>KpnI</b> -Schnittstelle (bei vorhandener <i>rbs</i> -site) 5'-CTGGAG <b>GGTACC</b> GCATGAGTAAACAACGAGTTT-3'	T <sub>m</sub> : 69.5 °C
Primer-15: (P-15)	<i>wcaG (fcl)</i> , <b>HindIII</b> -Schnittstelle 5'-CGTAA <b>AAGCTT</b> CATTACCCCCGAAAGC-3'	T <sub>m</sub> : 65.0 °C
Primer-16: (P-16)	<i>wcaH</i> , <b>Asp718</b> -Schnittstell 5'-ACCAGT <b>GGTACC</b> TTGAGAATCAAGACCGCTT-3'	T <sub>m</sub> : 68.2 °C
Primer-17: (P-17)	<i>wcaH</i> , <b>HindIII</b> -Schnittstelle 5'-AGACC <b>AAGCTT</b> TTTCATAATCCGGGTACTCC-3'	T <sub>m</sub> : 66.8 °C
Primer-18: (P-18)	<i>wcaI</i> , <b>Asp718</b> -Schnittstelle 5'-AACAGC <b>GGTACC</b> TATTTTCTCGCTGAGAAG-3'	T <sub>m</sub> : 66.8 °C
Primer-19: (P-19)	<i>wcaI</i> , <b>KpnI</b> - Schnittstelle (bei vorhandener <i>rbs</i> -site) 5'-GGAGTA <b>GGTACC</b> TTATGAAAATACTGGTCTA-3'	T <sub>m</sub> : 64.2 °C
Primer-20: (P-20)	<i>wcaI</i> , <b>HindIII</b> -Schnittstelle 5'-CGACTG <b>AAGCTT</b> AATTATCCCCGAATATCATT-3'	T <sub>m</sub> : 64.4 °C

---

## 2.4 Gentechnische Methoden

### 2.4.1 Präparation von genomischer DNA aus *Escherichia coli*

Die Präparation genomischer DNA aus *Escherichia coli* wurde wie folgt durchgeführt. Etwa 1,5 ml einer Übernachtskultur wurden bei Raumtemperatur 2 min. mit etwa 13000 rpm (Biofuge A, Heraeus Sepratech GmbH, Osterode, Deutschland) zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 567 µl TE-Puffer, pH 8,0; 30 µl 10 %-iger SDS-Lösung und 3 µl Proteinase K-Lösung mit einer Konzentration von 20 mg/ml resuspendiert.

Nach 60 min. Inkubation bei 37 °C wurden 100 µl 5 M NaCl-Lösung zugegeben. Die Suspension wurde kräftig durchmischt, anschließend mit 80 µl CTAB/NaCl-Lösung (**CTAB**: Hexadecyltrimethylammonium Bromid bzw. Cetyltrimethylammonium **B**romid) versetzt und 10 min. bei 65 °C inkubiert. Im Anschluß wurde mit demselben Volumen (Vol.) Chloroform-Isoamylalkohol (CI) extrahiert und 5 min. bei 13000 rpm (Biofuge A) zentrifugiert.

Die wässrige Phase wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI) extrahiert, erneut bei 13000 rpm für 5 min. zentrifugiert (Biofuge A) und die wässrige Phase in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurde die DNA in der wässrigen Phase mit 0,6 Vol. Isopropanol gefällt und nach Zentrifugation (5 min., 13000 rpm; Biofuge A) der Niederschlag zweimal mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, kurz in der Vakuumentrifuge (Speed-Vac-Konzentrator Univapo 150 H; Uniequip) getrocknet und in 100 µl TE-Puffer, pH 8,0 gelöst.

Die genomische DNA wurde anschließend in einem 0,8 %-igem (w/v) Agarosegel hinsichtlich der Größenverteilung analysiert und durch Bestimmung der OD<sub>260nm</sub> und OD<sub>280nm</sub> quantifiziert und qualifiziert.

Mit dieser Methode konnte hochmolekulare und für die meisten molekularbiologischen Anwendungen ausreichend saubere genomische DNA in guter Ausbeute gewonnen werden.

<b>CTAB/NaCl-Lösung</b>	10 % CTAB 0,7 M NaCl
<b>TE-Puffer, pH 8,0</b>	10,0 mM Tris-HCl, pH 8,0 1,0 mM EDTA, pH 8,0
<b>PCI</b>	Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25 : 24 : 1)
<b>CI</b>	Chloroform / Isoamylalkohol (24 : 1)

### 2.4.2 Präparation von Plasmid-DNA

#### 2.4.2.1 Schnellpräparation von Plasmid-DNA

Zur Schnellpräparation von Plasmid-DNA wurden 1,5 ml einer 3,0 ml-Übernachtskultur, supplementiert mit dem entsprechenden Antibiotikum, in ein Eppendorfgefäß überführt und 1 min. bei 13000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Bakterienpellet wurde in 100 µl **Lösung A** durch vortexen resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 200 µl **Lösung B** und 5-minütiger Inkubation auf Eis lysiert. Die dadurch denaturierten Proteine wurden anschließend mit 150 µl **Lösung C** für 15 min. auf Eis gefällt. Durch Zentrifugation (10 min., 4 °C, 13000 rpm; Eppendorfszentrifuge 5415 C) wurden die Zelltrümmer, präzipitierte Proteine und genomische DNA pelletiert. Die Plasmid-DNA im Überstand wurde durch

Zugabe von 0,7 Vol. Isopropanol gefällt und 15 min. bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 %-igem (v/v) Ethanol gewaschen, in einer Vakuumzentrifuge (Speed-Vac-Konzentrator Univapo 150 H; Uniequip) getrocknet und in 20 µl TE-Puffer, pH 8,0 resuspendiert. Die so präparierte Plasmid-DNA eignete sich sowohl zur Restriktionsanalyse als auch zur Präparation von Insert-DNA für Ligationen.

**Lösung A:**

50,0	mM	Glucose
10,0	mM	EDTA
25,0	mM	Tris-HCl, pH 8,0
100,0	µg	RNase A / ml

**Lösung B:**

0,2	M	NaOH
1,0	%	SDS (w/v)

**Lösung C:**

3,0	M	Natriumacetat, pH 4,8
-----	---	-----------------------

### 2.4.2.2 Plasmid-Präparation mittels des Qiagen Spin Miniprep Kit

Die Präparation der Plasmide wurde gemäß dem beiliegenden Protokoll zum „QIAprep Spin Miniprep Kit“ von Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde sowohl für Ligationen, als auch zur Sequenzierung eingesetzt.

## 2.4.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

### 2.4.3.1 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die mit Restriktionsenzymen geschnittene DNA wurde zur Identifizierung, Quantifizierung und Isolierung elektrophoretisch in Agarosegelen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Herstellung der Gele sowie die Durchführung der Elektrophorese erfolgte gemäß SAMBROOK et al. (1989). Verwendet wurden 0,5 – 1,2 %-ige (w/v) Agarosegele in 1 x TAE-Puffer, denen 0,005 % (v/v) Ethidiumbromidlösung zugesetzt worden war. Zuvor wurden die DNA Proben mit 1/6 Volumenanteile Probenauftragspuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x TAE-Puffer bei 5 - 10 V/cm Gellänge.

Die Agarosegele wurden mit dem Videosystem „EagleEye II®“ (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) dokumentiert. Die Ethidiumbromidfluoreszenz wurde dabei im UV-Durchlicht bei 312 nm angeregt.

### **TAE – Tris-Acetat-Puffer (50x)** (SAMBROOK et al., 1989)

Tris	242,00 g
Eisessig	57,10 ml
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	100,00 ml

Die Gewichtsangaben beziehen sich auf 1 Liter Lösung. Das Ansetzen der Lösung erfolgte mit Aqua bidest..

## **2.4.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

### **2.4.4.1 Jetsorb® Gelextraction Kit**

Die Isolierung der DNA-Fragmente erfolgte gemäß dem Jetsorb-Protokoll (Genomed, Bad Oeynhausen, Deutschland) mit Ausnahme, dass die DNA zweimal mit auf 56 °C temperierten Tris-HCl, pH 8,0, eluiert wurde. Nach dem Vereinigen der Eluate wurden diese in einer Vakuumzentrifuge auf 1/10 des Ausgangsvolumens eingeeengt.

### **2.4.4.2 Qiagen Gelextraction Kit**

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ von Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) wurde anhand des beiliegenden Protokolls durchgeführt.

## **2.4.5 Ethanolfällung**

Zur Wiedergewinnung der DNA nach einer Phenolextraktion oder zur Konzentrierung und Reinigung von DNA-Lösungen wurde eine Ethanolfällung durchgeführt. Nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 2 Volumen eiskaltem Ethanol (abs.) zu einer DNA-haltigen Lösung wurde die DNA für mindestens 30 min. bei -20 °C gefällt und bei 4 °C in einer Eppendorftischzentrifuge für 20 min. bei 13000 rpm pelletiert. Bei ausreichenden

DNA-Konzentrationen wurde die DNA bei 15 °C für 40 min. gefällt und durch Zentrifugation pelletiert, um eine Kopräzipitation von Salzen zu vermeiden. Die pelletierte DNA wurde mit 70 %-igem (v/v) Ethanol zweimal gewaschen, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in TE-Puffer, pH 8,0 resuspendiert.

#### 2.4.6 DNA-Restriktion

Zu analytischen Zwecken wurden 0,5 – 1 µg DNA mit 1 – 5 U Restriktionsendonuklease in einem Gesamtvolumen von 10 – 20 µl für 1 – 2 h verdaut. Für präparative Ansätze wurde die DNA-Menge auf 5 – 10 µg DNA pro Ansatz und das Gesamtvolumen auf 40 µl pro Ansatz erhöht.

#### 2.4.7 Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA

Zur Dephosphorylierung wurde den präparativen Restriktionsansätzen 5 µl 10 x CIP-Puffer und 0,5 µl alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (calf intestine phosphatase = CIP; 1 U/µl) zugegeben. Nach einer Inkubation von 30 min. bei 37 °C wurde erneut ein Aliquot von 0,5 µl CIP zugegeben und für weitere 30 min. inkubiert. Das Enzym wurde mit einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI) aus dem Ansatz extrahiert und die dephosphorylierte Vektor-DNA mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 2 Vol. Ethanol (abs.) gefällt.

<b>CIP-Puffer (10 x):</b>	500	mM	Tris-HCl, pH 9,0
	10	mM	MgCl <sub>2</sub>
	1	mM	ZnCl <sub>2</sub>
	10	mM	Spermidin

#### 2.4.8 Ligationen

##### 2.4.8.1 Ligationen von glatten Enden (blunt-ends)

Zur Ligation von glatten Enden wurde das „sureClone™ ligation kit“ von Pharmacia (Pharmacia, Freiburg, Deutschland) verwendet. Mit Hilfe dieses Kits wurden unter anderem PCR-Fragmente kloniert. Es enthält den mit *Sma*I linearisierten Vektor pUC 18, dessen

„blunt-ends“ 5'-dephosphoryliert vorliegen. Die Ligation in den Vektor pUC18-*Sma*I / CIP erfolgte nach dem „sure clone ligation“-Protokoll. Für die Ligation wurden Vektor : Insert-Verhältnisse von etwa 1 : 3 bis 1 : 5 eingesetzt. 5 µl des Ligationsansatzes wurden anschließend zur Transformation in kompetente *E. coli* DH5α verwendet.

#### **2.4.8.2 Ligation von überstehenden Enden („sticky-ends“)**

Die Ligationsansätze enthielten 1 x Ligationspuffer und 0,5 µl T4-DNA-Ligase (10 U/µl) des gleichen Herstellers (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) in einem Gesamtvolumen von maximal 20 µl. Das Insert wurde in einem dreifach-molaren Überschuss zum Vektor eingesetzt und die Ligationsansätze über Nacht bei 16 °C inkubiert.

#### **2.4.9 Herstellung kompetenter *Escherichia coli*-Zellen**

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte nach der Methode von HANAHAN (1983). Die Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

#### **2.4.10 Transformation von *Escherichia coli***

Die Standardtransformation wurde weitgehend nach dem Protokoll von HANAHAN (1983) durchgeführt. Hierzu wurden 100 – 200 µl kompetente *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und 20 – 100 ng DNA aus dem Ligationsansatz zugegeben. Die Plasmid-Zellsuspension wurde 20 min. auf Eis gestellt und anschließend 90 sec. bei 42 °C inkubiert. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden dem Ansatz vier Volumen SOC- bzw. LB-Medium zugegeben und die Zellen zur Regeneration 1 h bei 37 °C geschüttelt. Aliquots des Transformationsansatzes (etwa 200 µl) wurden auf den entsprechenden Selektionsmedien ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Das Protokoll kann verkürzt werden, indem auf die einstündige Regeneration der Zellen in SOC- bzw. LB-Medium verzichtet und der Transformationsansatz direkt auf vorgewärmte Selektionsplatten ausplattiert wird. Mit diesem modifizierten Protokoll konnten vergleichbare Transformationsraten erzielt werden.

### 2.4.11 Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Die PCR bewirkt die selektive Vervielfältigung eines beliebigen Abschnitts in einem DNA-Molekül. Man kann hierzu jeden DNA-Bereich auswählen, vorausgesetzt die Sequenzen an seinen Enden sind bekannt. Dies ist notwendig, weil zu Beginn der PCR zwei kurze Oligonukleotide mit dem DNA-Molekül hybridisieren müssen – an jedem Strang der Doppelhelix eines. Die Oligonukleotide dienen dabei als Primer für die DNA-Synthesereaktion und begrenzen den zu vervielfältigenden Abschnitt. Für die *in vitro*-Amplifikation der DNA wurden deshalb zuerst die geeigneten Primersequenzen ermittelt, die den Sequenzen beiderseits des gewünschten Abschnittes entsprechen. Natürlich muss jeder Primer nicht identisch, sondern komplementär zum Matrizenstrang sein, damit es zur Hybridisierung kommt und die 3'-Enden der hybridisierten Primer einander gegenüberstehen. DNA-Amplifikationen mittels der Polymerasekettenreaktion wurden mit dem Biometra Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) und dem Stratagene RoboCycler Gradient 40 Temperatur Cycler (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) in Anlehnung an SAIKI et al. (1988) durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in der **Tabelle 4** aufgelistet.

#### 2.4.11.1 Berechnung der Schmelztemperatur der Primer

Die Hybridisierungstemperatur, die Temperatur bei der sich die Primer an die Matrize heften, kann man abschätzen, indem man die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) des vollständig gepaarten Hybrids aus Primer und Matrize ermittelt. Bei  $T_m$  dissoziiert („schmilzt“) das vollständig gepaarte Hybrid; bei 1 bis 2 °C darunter können sich in der Regel die richtigen Hybride zwischen Primer und Matrize bilden, ohne das fehlgepaarte Hybride stabil sind. Eine Abschätzung der Schmelztemperatur  $T_m$  der Primer kann mit Hilfe einer der beiden unten aufgeführten Formeln erfolgen:

$$\text{Schmelztemperatur } T_m [^\circ\text{C}] = (2 \cdot [A + T]) + (3 \cdot [G + C])$$

Diese Beziehung gilt für Primerlängen  $\leq 24$  bp, dabei ist  $[A + T]$  die Anzahl der A- und T-Nukleotide in der Primersequenz und  $[G + C]$  ist die Zahl der G's und C's (THEIN & WALLACE, 1989).

$$\text{Schmelztemperatur } T_m [^\circ\text{C}] = 69.3 \text{ }^\circ\text{C} + 0.41 \cdot (\text{GC-Gehalt } [\%]) - 650 / \text{Primerlänge}$$

Diese Beziehung gilt für Primerlängen  $\geq 14$  bp (MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland).

$$\text{Annealingtemperatur } T_a \text{ [}^\circ\text{C]} = T_m - 3 \text{ }^\circ\text{C}$$

#### 2.4.11.2 Amplifikation von DNA mittels PCR

Für die PCR-Reaktionen wurde die *Pfu* DNA Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* verwendet. Die *Pfu* DNA Polymerase (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) besitzt im Gegensatz zur häufig verwendeten *Taq*-Polymerase die Fähigkeit zum Korrekturlesen, das heißt sie kann ihre Fehler beseitigen, indem das Enzym umkehren, die falsch gepaarte Stelle beseitigen und die richtige Sequenz aufbauen kann. Diese als „Korrekturlesefunktion“ bezeichnete Eigenschaft hängt von der 3'→5'-Exonukleaseaktivität der Polymerase ab.

Ein Standard-PCR-Ansatz für die Amplifikation der Gene aus genomischer DNA setzte sich wie folgt zusammen.

Zusammensetzung der durchgeführten PCR-Ansätze:

---

<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (10 x) <sup>14</sup>	10 $\mu$ l
dNTP's (dATP, dCTP, dGTP und dTTP)	je 20 nmol
Primer 1 (10 pmol/ $\mu$ l)	20 – 40 pmol
Primer 2 (10 pmol/ $\mu$ l)	20 – 40 pmol
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	5 U
Chromosomale DNA	20 – 100 ng
Auffüllen mit H <sub>2</sub> O auf	100 $\mu$ l

---

Alle PCR-Ansätze wurden mit 50 – 100  $\mu$ l leichtem Mineralöl (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) überschichtet und die PCR nach folgendem Programm durchgeführt:

---

<sup>14</sup> Es wurden die vom Enzymhersteller mitgelieferten Puffer verwendet.

Schritt	Temperatur	Dauer / Bemerkungen
1	95 °C	5 min.; Denaturierung (1 x zu Anfang des Programmes)
2	95 °C	90 sec.; Denaturierung
3	46 – 62 °C	90 sec.; Annealing der Primer, abhängig von der Schmelztemperatur
4	72 °C	x (*) sec.; Extension, Verlängerung der Primer durch die <i>Pfu</i> -Polymerase
5	72 °C	10 min.; Extension der Primer um zu gewährleisten, dass alle amplifizierten Fragmente vollständig verlängert werden
6	6 °C	Pause

---

**Die Schritte 2 – 4 wurden 25 - 30 mal durchlaufen**

(\*): Da die *Pfu*-Polymerase langsamer arbeitet als die *Taq*-Polymerase richtete sich die Zeit „x“ für die Kettenreaktion der DNA-Polymerase in diesem Fall nach der **1 kb = 2 min.**-Regel.

Nach der DNA-Amplifikation wurden die Fragmente mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ von Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach dem beiliegenden Protokoll aufgereinigt.

## **2.4.12 DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierungen zur Verifizierung der erzeugten klonierten DNA erfolgte durch die Firma Sequiserve (Sequiserve, Vaterstetten, Deutschland) im Rahmen von Auftragssequenzierungen.

## **2.5 Kulturbedingungen und Lagerung von Bakterienstämmen**

### **2.5.1 Stammhaltung**

Die Kultivierung von *E. coli*-Zellen erfolgte, sofern nicht anders angegeben, in LB-Medium bzw. auf LB-Agarplatten bei 37 °C. Für das Wachstum von plasmidtragenden Stämmen wurden die Medien mit den entsprechenden Antibiotika supplementiert. Zur blau-weiß

Selektion von rekombinanten pUC-Derivaten wurde dem LB-Agar 40 µg/ml X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid) zugesetzt.

Für die Stammhaltung wurden 0,9 ml der gewachsenen Zellen einer Übernachtskultur zu jeweils 0,9 ml sterilem Glycerin in Kryoröhrchen gegeben und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.5.2 Schüttelkulturen

Versuche im Schüttelkolbenmaßstab wurden in Langhals-Erlenmeyerkolben mit vier Schikanen und einer Füllmenge an Nährlösung von 10 % – 20 % des Kolbenvolumens durchgeführt, um einen ausreichenden Sauerstoff-Eintrag in das Medium zu gewährleisten. Die Inkubation erfolgte, sofern nicht anders angegeben, bei 37 °C auf einer Rotations-schüttelmaschine (Multitron, Infors AG, Bottmingen, Schweiz; Drehzahl 120 rpm, Auslenkradius 50 mm). Angeimpft wurden die Kolben jeweils mit 1 % des Endvolumens bzw. mit Einzelkolonien von Platte.

### 2.5.3 Fermentation im Laborfermenter

Die Fermentationen erfolgten in Blattrührreaktoren vom Typ Techfors (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) mit einem Volumen von 20 bzw. 40 Liter. Die Sterilisation erfolgte *in situ* 30 min. bei 121 °C und 250 mbar Überdruck.

#### Fermentationsparameter:

Reaktor:	Techfors 20	Techfors 40
Arbeitsvolumen	15 Liter	20 Liter
Rührwerk:	2-fach 6-Blatt Scheibenrührer	3-fach 6-Blatt Scheibenrührer
Medium:	15 L LB <sub>Amp</sub> -Medium mit 0,5 % Glycerin	20 L LB <sub>Amp</sub> -Medium mit 0,5 % Glycerin
Animpfvolumen:	0,5 %	0,5 %
Temperatur:	37 °C	37 °C
Drehzahl:	400 UpM	400 UpM
Belüftungsrate:	20 L/min	20 L/min
pH-Wert-Messung:	on line	on line
pO <sub>2</sub> -Messung:	on line	on line
pO <sub>2</sub> -Regelung	über Rührer bis maximal 1200 UpM	über Rührer bis maximal 1200 UpM

---

Vor dem Autoklavieren wurde dem Bioreaktor Antischaummittel (Antifoam 289; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) zugegeben und der pH-Wert mit 3 N KOH bzw. 3 N H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> auf den gewünschten Wert eingestellt. Die Anzucht der rekombinanten *E. coli*-Stämme erfolgte in LB-Medium mit 0,5 % (v/v) Glycerin im 15 - 25 Liter Maßstab.

#### **2.5.4 Meß- und Regelvorgänge am Fermenter**

Die Erfassung der Messwerte (pH-Wert, pO<sub>2</sub>, Temperatur und Drehzahl), sowie die Regelung und Steuerung der Fermenter erfolgte mittels der Steuerungssoftware „IRIS 1.0“ der Firma Infors AG, über einen PC (Infors AG, Bottmingen, Schweiz).

##### **2.5.4.1 pH-Messung und Regelung**

Der pH-Wert wurde kontinuierlich mittels einer sterilisierbaren drucküberlagerten Elektrode vom Typ 465 (Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland) bestimmt. Als Vorlagen zur Regelung des pH-Wertes dienten 3 N KOH bzw. 3 N H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

##### **2.5.4.2 pO<sub>2</sub>-Messung**

Der relative Sauerstoffpartialdruck wurde mit einer sterilisierbaren amperometrischen Sauerstoffelektrode der Firma Mettler-Toledo (Gießen, Deutschland) kontinuierlich gemessen. Gemessener pO<sub>2</sub> wurde zu Anfang der Fermentation auf 100 % gesetzt.

#### **2.6 Heterologe / homologe Genexpression in *Escherichia coli***

Mit den pET-Plasmiden zur Überexpression (vgl. **Tabelle 3**) transformierte *E. coli* BL21(DE3)-Derivate (STUDIER et al., 1990) wurden in LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) bei 37 °C inkubiert. In den Schüttelkulturen (**siehe Kapitel 2.4.1**) wurde die T7-Polymerase bei einer Zelldichte von OD<sub>600nm</sub> = 0,5 – 0,8 durch die Zugabe von 0,4 mM IPTG induziert und die Zellen nach weiteren 90 – 120 min. geerntet. Bei den Fermentationen im Laborfermenter fand die Induktion der T7-Polymerase während der logarithmischen Wachstumsphase nach etwa 3 - 4 h durch Zugabe von 0,4 mM IPTG zum Kulturmedium statt. Etwa 4 h nach der Induktion mit IPTG erfolgte die Ernte der Zellen zu Beginn der stationären

Phase. Mit den arabinose-induzierbaren pBAD-Vektoren transformierte *E. coli* LMG194 und TOP10 wurden ebenfalls in LB-Medium, das mit 0,2 % Glucose und 100 µg/ml Ampicillin supplementiert wurde, bei 37 °C inkubiert. Die Induktion des *araBAD* Promotors ( $P_{BAD}$ ) erfolgte hier bei einer Zelldichte von  $OD_{600nm} = 0,5 - 0,8$  durch Zugabe von 0,2 % L-Arabinose. Nach weiteren 4 h wurden die Zellen geerntet.

## **2.7 Herstellung zellfreier Extrakte**

Zur Ernte der Biomasse wurde die Kulturflüssigkeit 20 min. in einer Sorvall-RC5B-Kühlzentrifuge (DuPont, Bad Homburg, Deutschland) mit 8000 g bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellmaterial wurde bis zu seiner Verwendung portionsweise bei -20 °C gelagert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall-Aufschluss bzw. Nassvermahlung.

### **2.7.1 Aufschluss mittels Nassvermahlung**

Bei der Nassvermahlung erfolgte der Zellaufschluss mittels Glasperlen (Durchmesser 0,3 mm). Es wurden 30 %-ige (w/w) *E. coli*-Zellsuspensionen im entsprechenden Aufschlusspuffer hergestellt, denen die doppelten Gewichtsanteile an Glasperlen zugefügt wurden. Der Aufschluss erfolgte je nach Volumen im 1 – 2 ml Maßstab in einer Schwingmühle (Retsch, Haan, Deutschland) (HUMMEL & KULA, 1989) oder in einem Desintegrator S (20,0 – 50,0 ml) (IMA, Frankfurt, Deutschland) über einen Zeitraum von 20 min.. Der Aufschluss wurde 10 min. bei 13000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge, Eppendorf, Hamburg, Deutschland; kleine Volumina) bzw. 18000 rpm (SS-34 Rotor; Sorvall RC-5B Kühlzentrifuge, DuPont, Bad Homburg, Deutschland) und 4 °C zentrifugiert, der zellfreie Überstand abgenommen und die Glasperlen und das Zellpellet einmal mit  $\frac{1}{4} - \frac{1}{2}$  des Zellsuspensionsvolumens an Aufschlusspuffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die zellfreien Überstände vereinigt und für die enzymatische Untersuchung eingesetzt.

### **2.7.2 Aufschluss mittels Ultraschall**

Hierbei wurden ebenfalls ca 30 %-ige (w/w) *E. coli*-Zellsuspensionen (1 – 25 ml) mit den entsprechenden Aufschlusspuffern hergestellt, im Eisbad vorgekühlt und anschließend mit Ultraschall aufgeschlossen. Für den Ultraschall-Aufschluss wurde der Bandelin Sonopuls

(Bandelin, Berlin, Deutschland; max. 60 W Leistung, Arbeitsfrequenz 20 kHz) verwendet. Für den Aufschluss konnten sowohl die abgegebene Leistung als auch die Beschallungsdauer pro Beschallungsintervall („Cycle“) stufenlos eingestellt werden. Das Zellhomogenat wurde anschließend für 30 Minuten in einem SS-34 Rotor bei 4 °C mit 18000 rpm in einer Sorvall Kühlzentrifuge (Sorvall RC-5B, DuPont, Bad Homburg, Deutschland) zentrifugiert. Dabei wurden die unlöslichen Zellbestandteile (Zelltrümmer) sedimentiert und der Überstand (= Rohextrakt) für die enzymatische Untersuchung eingesetzt.

Für kleine Volumina wurde für die Zentrifugationsschritte wie bei der Nassvermahlung eine Eppendorf-Tischzentrifuge (Hamburg, Deutschland) verwendet.

## 2.8 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Proben erfolgte photometrisch nach der Methode von Bradford (BRADFORD, 1976). Anhand einer Eichkurve mit BSA (10 – 100 µg/ml) wurden die Proteinkonzentrationen in den Enzymlösungen ermittelt.

## 2.9 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die denaturierende SDS-PAGE wurde nach der Methode von LÄMMLI (1970) durchgeführt. Die Proteinproben wurden 1 : 2 bis 1 : 10 mit reduzierendem Probenpuffer nach LÄMMLI versetzt und 2 min. bei 94 °C denaturiert bzw. reduziert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Folgende Trennbedingungen wurden dabei gewählt:

Midi-Gele (8 x 10 cm <sup>2</sup> )	20 mA const.	15 °C
Maxi-Gele (12 x 16 cm <sup>2</sup> )	20 – 40 mA	15 °C

Als Molekulargewichtsstandards wurde der „Premixed Standard“ (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) verwendet. Für eine Coomassie-Färbung wurde der Proteinmarker 1 : 20, für eine Silberfärbung 1 : 100 in reduzierendem Probenpuffer verdünnt und ebenfalls 2 min. bei 94 °C denaturiert. Jeweils ein Aliquot (20 µl für Midi-Gele, 40 µl für Maxi-Gele) wurde auf das Gel aufgetragen.

## 2.10 Diskontinuierliches Blotting nach Kyhse-Andersen

Zur *N*-terminalen Sequenzierung des Proteins wurde das Enzym nach der SDS-Page auf eine PVDF-Membran Immobilon P (Millipore, Bedford, USA) transferiert. Das diskontinuierliche Blotting wurde mit 1,5 mA/cm<sup>2</sup> nach dem semi-dry-Verfahren (KYHSE-ANDERSEN, 1984) durchgeführt.

## 2.11 Färbungen von Proteinen in Polyacrylamidgelen

### 2.11.1 Färbung mit Coomassie Brilliant Blau R-250 oder Amidoschwarz

Die Gele wurden nach der Elektrophorese 30 - 40 min. in der jeweiligen Färbelösung inkubiert und bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes in Entfärbelösung geschüttelt. Für die Detektion im Polyacrylamidgel wurde die Coomassie-Färbung verwendet, während die Proteine nach einem Elektroblothing auf PVDF-Membranen mit Amidoschwarz sichtbar gemacht wurden.

<b>Färbelösung:</b>	0,1	%	(w/v)Coomassie Brilliant Blau R-250
	0,1	%	(w/v)Amidoschwarz)
	40,0	%	(v/v) Ethanol (technisch)
	10,0	%	(v/v) Eisessig
	50,0	%	(v/v) H <sub>2</sub> O bidest.

<b>Entfärbelösung:</b>	40,0	%	(v/v) Ethanol (technisch)
	10,0	%	(v/v) Eisessig
	50,0	%	(v/v) H <sub>2</sub> O bidest.

### 2.11.2 Färbung mit Silbernitrat

Die Silberfärbung wurde nach BLUM et al. (1987) durchgeführt. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Färbemethode wurde für alle Lösungen und Waschschrte Aqua bidest. verwendet.

## 2.12 *N*-terminale Sequenzierung

Die *N*-terminale Sequenzanalyse wurde mit Hilfe des Edman-Abbaus durchgeführt. Bei dem Verfahren (EDMAN, 1956; MATSUDAIRA, 1989) reagiert Phenylisothiocyanat (PITC) mit der  $\alpha$ -Aminogruppe der *N*-terminalen Aminosäure bei pH 8,0 – 8,5 und 45 °C unter Bildung der entsprechenden Phenylthiocarbonylderivate (PTC-Peptid), die anschließend in saurer Lösung in 2-Anilino-thiazolin-5-on und in die um die *N*-terminale Aminosäure verkürzte Peptidkette gespalten werden. Die Restpeptidkette kann dem Edman-Abbau erneut zugeführt werden. Das entstandene zyklische Thiazolinonderivat lagert sich anschließend unter sauren Bedingungen bei erhöhter Temperatur zum 3-Phenyl-2-thiohydantoin (PTH-Aminosäure) um. Die Identifizierung der PTH-Aminosäure erfolgt mittels HPLC durch Vergleich mit einem PTH-Aminosäurestandard. Die Automatisierung dieses Verfahrens gelang EDMAN & BEGG 1967 im Protein-Sequenator.

Die Proteinproben wurden mit Hilfe des automatischen Edman-Abbaus mit einem Pulsed-Liquid-Sequencer 477A der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Auf diese Weise können Aminosäuresequenzen von maximal 40 – 60 Aminosäuren ermittelt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die *N*-terminale Sequenzierung mit geblotteten Proben durchgeführt.

## 2.13 Analytik

Zur Analyse von Nukleotid-aktivierten Zuckern wurde die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und Kapillarelektrophorese (CE/CZE) eingesetzt. Folgende Trennsysteme wurden verwendet.

### 2.13.1 HPLC-Systeme („High performance liquid chromatography“)

#### HPLC-System 1 - Reversed-Phase Ionenpaar HPLC

In dieser von RYLL & WAGNER veröffentlichten HPLC-Methode wird die Trennung der Nukleotide durch die Kombination von hydrophoben Wechselwirkungen der Substanzen mit dem „reversed phase“-Material der Säule und ionischen Wechselwirkungen mit dem

Ionenpaarreagenz Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBA) gewährleistet (RYLL & WAGNER, 1991).

**Säule:** Hypersil ODS RP-18 (5 µm), 125 x 4,0 mm

**Laufmittel:** **Eluent A:**  
100 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)  
8 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBA)  
pH 5,3

**Eluent B:**  
Eluent A  
30 % Methanol  
pH 5,9

<b>Gradient:</b>	Zeit [min.]	A [%]	B [%]
	0	100	0
	2.5	100	0
	16.5	60	40
	17.5	0	100
	29	0	100
	30	100	0
	35	100	0

**Fließrate:** 1,0 ml/min

**Temperatur:** 40 °C

**Detektion:** UV-Absorption (254 nm)

**Injektionsvolumen:** 20,0 µl

**Retentionszeiten der Nukleotide auf der HPLC-Analytik:**

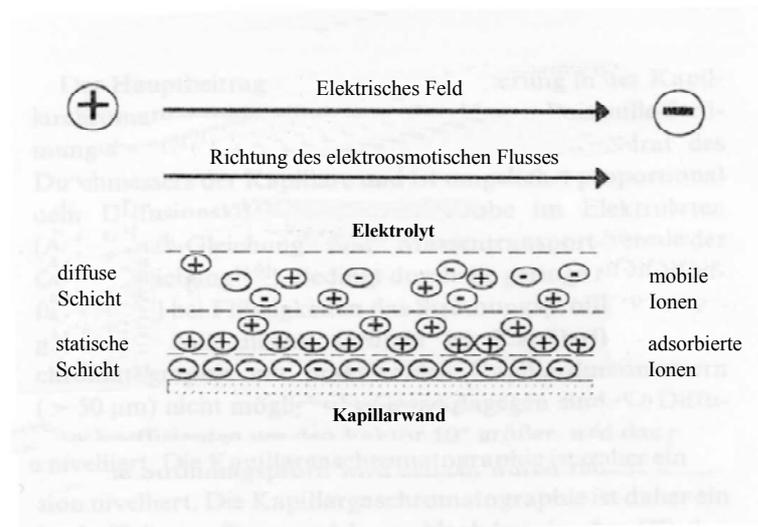
Guanosin	2,9 min.
GMP	3,4 min.
GDP-Mannose	6,5 min.
GDP	7,7 min.
GDP-Fucose	7,9 min.
GDP-4-Keto-6-desoxy-D-mannose	10,2 min.
GTP	15,1 min.

Die Identifizierung der Zucker erfolgte durch Cochromatographie, sowie durch den Vergleich der Retentionszeiten mit Standardsubstanzen. Für die Quantifizierung der Nukleotidzucker wurde mit Standardsubstanzen eine Eichung der Peakflächen in Abhängigkeit von der Konzentration vorgenommen.

Der Nachteil des HPLC-Systems ist die zum Teil sehr lange Analysenzeit, sowie der hohe Verbrauch an Lösungsmittel.

### 2.13.2 Kapillarelektrophorese von Nukleotiden und Zuckernukleotiden

Die Kapillarelektrophoresetechnik wurde Ende der siebziger Jahre entwickelt und hat sich inzwischen als ein Standard-Analyseverfahren in der Biochemie etabliert.

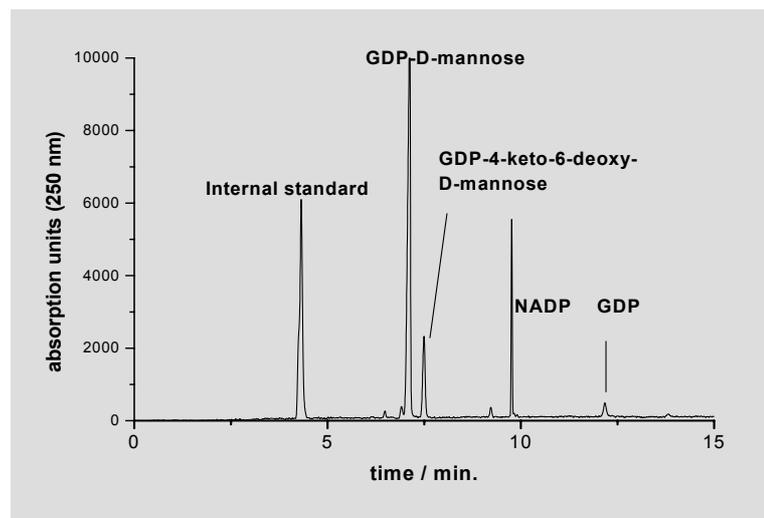


**Abbildung 23:** Das Prinzip der CZE - Schematische Darstellung der Ladungsverteilung an der Kapillaroberfläche.

Die Kapillarelektrophorese vereint verschiedene Techniken wie die Elektrophorese (PAGE) und die High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Zur kapillarelektrophoretischen Trennung werden Quarzkapillaren mit einem optischen Fenster, ein Spannungsgeber für Spannungen im kV-Bereich, zwei Elektroden, zwei Pufferreservoirs und ein UV-Detektor benötigt.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Kapillarzonenelektrophorese (CZE) durchgeführt. Weitere Anwendungen dieser Technik sind die isoelektrische Fokussierung, die Kapillargelelektrophorese, die Isotachophorese und die micellarelektrokinetische Kapillarelektrophorese.

---



**Abbildung 24:** Beispielerlektropherogramm der verwendeten CE-Methode (HOH, 2000; BUCHHOLZ et al., 2002) für die Analyse von Nukleotiden und Zuckernukleotiden.

Der Mechanismus der Trennung der Kapillarzonenelektrophorese beruht auf Unterschieden in dem Ladungs-Masse-Verhältnis der zu trennenden Substanzen. Wichtig ist ebenfalls die Homogenität der Pufferlösung und eine konstante Feldstärke. Die treibende Kraft ist die Elektroosmose. Die freien SiOH (Silanol)-Gruppen der Quarzkapillaren besitzen negativ geladene Gruppen, deren pI bei 1.5 liegt und deren Isolierung vom verwendeten pH-Wert des Puffers abhängt. Abhängig vom pH-Wert liegen diese SiOH-Gruppen protoniert oder deprotoniert vor. Beim verwendeten pH-Wert von 8,5 liegen die Gruppen vollständig deprotoniert vor. Diese negativ geladene Kapillarwand zieht positiv geladene Ionen des Puffers an und bildet eine geladene Doppelschicht. Durch Anlegen einer Spannung wandern die Kationen der Doppelschicht in Richtung der Kathode (negativer Pol) und ziehen Wasser

mit. Somit entsteht ein Nettofluss von Puffer in Richtung der negativ geladenen Kathode, der als elektroosmotischer Fluss bezeichnet wird (**Abbildung 23**).

Der elektroosmotische Fluss ist dabei so stark, dass selbst Anionen in Richtung Kathode transportiert werden.

Die Kapillarelektrophorese stellt also kein chromatographisches Verfahren dar, da die Trennung nicht auf Wechselwirkungen zwischen stationärer und mobiler Phase beruht. Diese Wechselwirkungen sind bei der CE idealerweise nicht vorhanden, so dass sie sich sehr gut als komplementäre Methode zur HPLC eignet. Die folgenden Übersichtsartikel ENGELHARDT et al., 1993; ENGELHARDT et al., 1994; OEFNER & CHIESA, 1994; ALTRIA, 1999 ermöglichen einen schnellen Einstieg in dieses Themengebiet.

Die hier verwendete schnelle und effiziente CE-Methode zur Analyse von Nukleotiden und Zuckernukleotiden wurde von HOH mit Hilfe eines genetischen Algorithmus (GA) (HOH, 2000; BUCHHOLZ et al., 2002) basierend auf einer literaturbekannten CE-Methode (UHROVÁ et al., 1996) entwickelt.

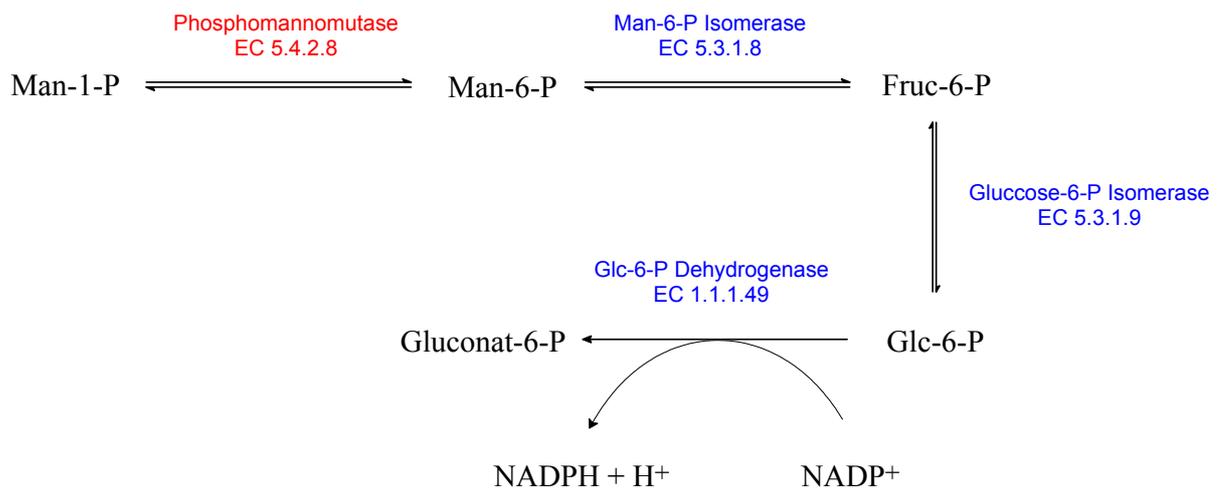
<b>Gerät:</b>	P/ACE MDQ System Capillary Electrophoresis (Beckman, München, Deutschland); Software for P/ACE MDQ System, Version 2.2		
<b>Detektion (UV):</b>	250 nm (G-Reihe) 260 nm (Uridin/Interner Standard)		
<b>Kapillare:</b>	L = 50 cm, ID = 50 µm fused silica		
<b>Trennpuffer:</b>	40 mM $KP_i$ , 10 mM Borat; pH 8,5; 25 kV		
<b>Temperatur:</b>	40 °C		
<b>Probeninjektion:</b>	5 sec. 0,5 psi		
<b>Spülschritte:</b>	1 min.	Aqua bidest.	40 psi
	1 min.	1 M NaOH	40 psi
	1 min.	Aqua bidest.	40 psi
	3 min.	Trennpuffer	40 psi

### 2.13.3 Aktivitätsbestimmung der Enzyme

#### 2.13.3.1 Aktivitätsbestimmung der Phosphomannomutase

Die Aktivität der Phosphomannomutase (PMM) wurde mit einem gekoppelten Multienzym-Assay (GOLDBERG et al., 1993; RITTER et al., 1995; FEY, 1998). bestimmt, dessen Reaktionsfolge in **Abbildung 25** dargestellt ist.

Ausgangssubstanz ist hierbei Mannose-1-phosphat, das in einer durch die Phosphomannomutase katalysierten Reaktion zu Mannose-6-phosphat reagiert, welches dann von drei Hilfsenzymen unter Reduktion von  $\text{NADP}^+$  zu Gluconat-6-phosphat umgesetzt wird.



**Abbildung 25 :** Photometer-Assay zur Bestimmung der Phosphomannomutase-Aktivität.

Der letzte Schritt der Reaktionskaskade (**Abbildung 25**) stellt die  $\text{NADP}^+$ -abhängige Oxidation von Glucose-6-phosphat dar. Da  $\text{NADPH}$  im Gegensatz zu  $\text{NADP}^+$  eine starke Absorption im UV-Bereich bei 340 nm aufweist ( $\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6220 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), kann die Reaktionsgeschwindigkeit aus der Zunahme der Extinktion  $E$  pro Zeiteinheit berechnet werden.

Hierbei muß sichergestellt werden, dass alle Hilfsenzyme im Überschuss vorliegen und die Phosphomannomutase-Reaktion den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt.

Als Kontrolle diente der Vergleich zu einer „blank“-Messung, die unter identischen Bedingungen ohne Substratzugabe (Mannose-1-phosphat) durchgeführt wurde.

### Ansatz:

Mannose-1-phosphat	1,0	mM
Glucose-1,6-bisphosphat	0,25	mM
Phosphomannose-Isomerase	0,60	U/ml
Phosphoglucose-Isomerase	0,70	U/ml
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	1,0	U/ml
NADP <sup>+</sup>	1,0	mM
MgCl <sub>2</sub>	10,0	mM
Tris-HCl, pH 8,0	50,0	mM
T = 30 °C		
<hr/>		
Gesamtvolumen	200,0	µl

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrates (Mannose-1-phosphat) zum Assay gestartet und die Zunahme der Extinktion bei 340 nm in einem Mikrotiterplatten Photometer (Molecular Devices, Menlo Park, USA) verfolgt. Dabei ist die Änderung der NADPH-Konzentration äquivalent zur Änderung der Mannose-1-phosphat-Konzentration.

Die Enzymaktivität wird nach folgender Formel berechnet:

$$A[\text{U/ml}] = \frac{\Delta E [\text{mOD/min}] \cdot F \cdot V}{v \cdot d \cdot \epsilon_{\text{NADPH}}}$$

mit:	$\epsilon_{340 \text{ nm}}$	Extinktionskoeffizient von NADPH (340 nm)	$6220 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ( $6300 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )
	d	Schichtdicke der Küvette <sup>15</sup>	0,54 cm
	F	Verdünnungsfaktor	-
	V	Messvolumen	µl
	v	Probenvolumen	µl

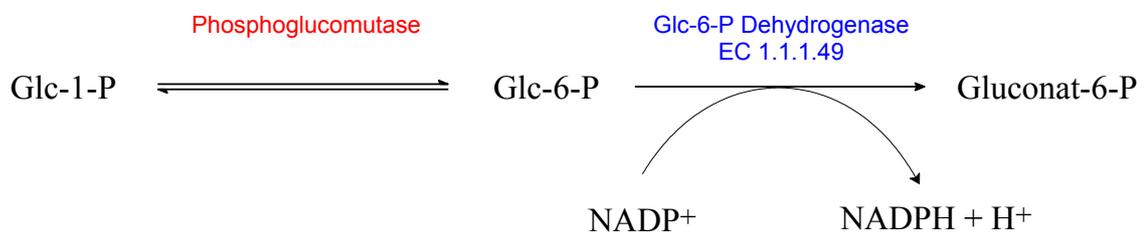
---

<sup>15</sup> Bei einer Füllmenge von 200 µl ergibt sich für Standard-Mikrotiter-Platten ein Strahlenweg von 0,54 cm.

1 U Phosphomannomutase entspricht dabei der Enzymmenge, die unter Standardbedingungen die Synthese von 1  $\mu\text{mol}$  Mannose-6-phosphat pro Minute katalysiert.

### 2.13.3.2 Aktivitätsbestimmung der Phosphoglucomutase

Die Aktivitätsbestimmung der Phosphoglucomutase wurde analog zum Phosphomannomutase Assay durchgeführt. Die Reaktion folgt dabei folgendem Schema (**Abbildung 26**).



**Abbildung 26:** Photometer-Assay zur Bestimmung der Phosphoglucomutase-Aktivität.

#### Ansatz:

Glucose-1-phosphat	1,0	mM
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	1,0	U/ml
NADP <sup>+</sup>	1,0	mM
MgCl <sub>2</sub>	10,0	mM
Tris-HCl, pH 8,0	50,0	mM
T = 30 °C		
Gesamtvolumen	200,0	$\mu\text{l}$

---

Als Substrat wird anstelle von Mannose-1-phosphat Glucose-1-phosphat (Glc-1-P) eingesetzt und die zwei Hilfsenzyme Phosphomannose-Isomerase und Phosphoglucose-Isomerase weggelassen. Glucose-1-P (Glc-1-P) wird durch die Phosphoglucomutase zu Glucose-6-

phosphat (Glc-6-P) umgesetzt, welches anschließend in einer NADP<sup>+</sup>-abhängigen Reaktion, die durch die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase katalysiert wird, zu Gluconat-6-phosphat reagiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrates (Glucose-1-phosphat) zum Assay gestartet und die Zunahme der Extinktion bei 340 nm in einem Mikrotiterplatten Photometer (Molecular Devices, Menlo Park, USA) verfolgt. Dabei ist die Änderung der NADPH-Konzentration äquivalent zur Änderung der Glucose-1-phosphat-Konzentration.

Die Enzymaktivität wird nach folgender Formel berechnet

$$A[\text{U/ml}] = \frac{\Delta E [\text{mOD/min}] \cdot F \cdot V}{v \cdot d \cdot \epsilon_{\text{NADPH}}}$$

mit:	$\epsilon_{340 \text{ nm}}$	Extinktionskoeffizient von NADPH (340 nm)	6220 l · mol <sup>-1</sup> · cm <sup>-1</sup> (6300 l · mol <sup>-1</sup> · cm <sup>-1</sup> )
	d	Schichtdicke der Küvette <sup>16</sup>	0,54 cm
	F	Verdünnungsfaktor	-
	V	Messvolumen	μl
	v	Probenvolumen	μl

1 U Phosphoglucomutase entspricht dabei der Enzymmenge, die unter Standardbedingungen die Synthese von 1 μmol Glucose-6-phosphat pro Minute katalysiert.

### 2.13.3.3 Aktivitätsbestimmung der GDP-Mannose Pyrophosphorylase

Die Aktivitätsbestimmung der GDP-Mannose Pyrophosphorylase erfolgte durch Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit unter folgenden Bedingungen:

Die Ansätze wurden 5 min. bei 30 °C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Hitzedenaturierung des Enzyms abgestoppt (5 min. bei 95 °C). Das ausgefallene Enzym wurde abzentrifugiert und die Konzentration der gebildeten GDP-Mannose mittels HPLC bestimmt.

---

<sup>16</sup> Bei einer Füllmenge von 200 μl ergibt sich für Standard-Mikrotiter-Platten ein Strahlenweg von 0,54 cm.

**Ansatz:**

GTP	1,0	mM
Mannose-1-Phosphat	1,0	mM
MgCl <sub>2</sub>	1,0	mM
Tris-HCl	50,0	mM
pH 8,0		
T = 30 °C		

---

Gesamtvolumen: 100,0 µl

Dabei ist darauf zu achten, dass der Umsatz der Reaktion nicht über 10 % liegt. Die volumenspezifische Aktivität  $A_v$  der Enzympräparation läßt sich nach der folgenden Formel berechnen:

$$A_v = \frac{c_{\text{GDP-Mannose}} \cdot F}{t}$$

mit:	$c_{\text{GDP-Mannose}}$	GDP-Mannose Konzentration	[µmol/ml]
	F	Verdünnungsfaktor	[-]
	t	Reaktionszeit	[min.]

1 U GDP-Mannose Pyrophosphorylase entspricht dabei der Enzymmenge, die unter Standardbedingungen die Synthese von 1 µmol GDP-Mannose pro Minute katalysiert.

**2.13.3.4 Optimierung der Aktivitätsbestimmung der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase**

Ausgehend von folgendem „Standardtest“, der auf einem bereits publizierten Enzymtest zum Nachweis der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase aus *Klebsiella pneumoniae* ATCC 12658 basiert (YAMAMOTO et al., 1993), wurde im Laufe dieser Arbeit (vgl. **Kapitel 3.4.3.1**) der Enzymtest zur Bestimmung der *in vitro*-Aktivität der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase aus *Escherichia coli* optimiert:

**„Standardtest“:**

GDP-Mannose	1,0	mM
NADP <sup>+</sup>	0,1	mM
MgCl <sub>2</sub>	10,0	mM
Tris-HCl	50,0	mM
pH 8,0		
T = 30 °C		
<hr/>		
Gesamtvolumen:	1,0	ml

Der Start der Reaktion erfolgte nach einer 10-minütigen Vorinkubation des Assays, sofern nichts anderes angegeben, durch die Zugabe von GDP-Mannose. Während der Inkubation des Ansatzes bei 30 °C wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0 min., 3 min., 5 min., 10 min., 15 min., 20 min., 30 min., 60 min. und 90 min.) Proben von jeweils 50 µl gezogen und die Reaktion durch 1-minütiges Erhitzen bei 95 °C abgestoppt. Anschließend wurde das denaturierte Enzym durch Zentrifugation sedimentiert und die Proben mittels Kapillarelektrophorese analysiert. Mit Hilfe der unter **Kapitel 2.13.2** beschriebenen CE-Analytik wurde die Enzymaktivität aufgrund des Fehlens eines Eichstandards nicht über die Konzentration an gebildeter GDP-4-Keto-6-desoxy-D-Mannose, sondern über die Abnahme des Substrates GDP-D-Mannose bestimmt. Für die Bestimmung der Aktivität der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase wurde der Umsatz gegen die Zeit aufgetragen und anschließend aus der Steigung im linearen Bereich des Umsatz-Zeit-Plots (**vgl. dazu auch Abbildung 32**) die Enzymaktivität ermittelt.

Wie sich im Laufe der Arbeit (**vgl. dazu Kapitel 3.4.3.4 & Kapitel 3.4.3.5.1**) herausstellte erwies sich für die Bestimmung der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase Aktivität die Zugabe von sowohl NADP<sup>+</sup> als auch von NADPH in einer Konzentration von jeweils 0,1 mM zum Standardtest am geeignetsten, da damit die bisher beim Standardtest beobachtete lag-Phase (**vgl. Abbildung 32**) zu Beginn der Umsetzung vermieden werden konnte.

Am Ende dieser Arbeit ergab sich daher aus den erhaltenen Versuchsergebnissen der folgende „optimierte Inkubationsansatz“ zur Bestimmung der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) Aktivität.

**„Optimierter“ Ansatz:**

GDP-Mannose	1,0	mM
NADP <sup>+</sup>	0,1	mM
NADPH	0,1	mM
MgCl <sub>2</sub>	10,0	mM
Tris-HCl	50,0	mM
pH 8,0		
T = 30 °C		
<hr/>		
Gesamtvolumen:	1,0	ml

Die Enzymaktivität kann dabei nach folgender Formel berechnet werden:

$$A_V = m \cdot c_{\text{GDP-Mannose}} \cdot F$$

mit:	$c_{\text{GDP-Mannose}}$	Startkonzentration an GDP-Mannose	[mM]
	F	Verdünnungsfaktor	[-]
	m	Steigung im linearen Bereich	[min <sup>-1</sup> ]

1 U GDP-Mannose-4,6-Dehydratase entspricht dabei der Enzymmenge, die unter Standardbedingungen die Synthese von 1 µmol GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose pro Minute katalysiert.

**2.13.3.5 Aktivitätsbestimmung der GDP-Fucose Synthetase**

Bei der GDP-Fucose Synthetase handelt es sich um ein bifunktionelles Enzym, das sowohl die Epimerisierung der GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose an C-3 und C-5, als auch die anschließende Reduktion katalysiert. Diese Reduktion der Ketogruppe am C-4 ist NADPH abhängig und kann dementsprechend bei 340 nm photometrisch verfolgt werden.

Für die Etablierung des Assaysystems wurde die unter **Kapitel 3.4.3.6** synthetisierte GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose verwendet. Das Ansatzvolumen betrug 100 µl.

**Ansatz:**

GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose	ca. 1,0 mM
NADPH	1,0 mM
MgCl <sub>2</sub>	10,0 mM
Tris-HCl	50,0 mM
pH 8,0	
T = 30 °C	

---

Gesamtvolumen: 100,0 µl

Die Reaktion wurde durch die Zugabe von NADPH zum Assay gestartet und die Abnahme der Extinktion bei 340 nm in einem Mikrotiterplatten Photometer (Molecular Devices, Menlo Park, USA) verfolgt.

Dabei ist die Änderung der NADPH-Konzentration äquivalent zur Konzentration an umgesetztter GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose bzw. zur Konzentration an gebildeter GDP-Fucose. Als Kontrolle diente der Vergleich zu einer „blank“-Messung, die unter identischen Bedingungen ohne Substratzugabe (GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose) durchgeführt wurde.

Die Enzymaktivität kann dabei nach folgender Formel berechnet werden:

$$A[\text{U/ml}] = \frac{\Delta E [\text{mOD/min}] \cdot F \cdot V}{v \cdot d \cdot \epsilon_{\text{NADPH}}}$$

mit:	$\epsilon_{340 \text{ nm}}$	Extinktionskoeffizient von NADPH (340 nm)	$6220 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ( $6300 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )
	d	Schichtdicke der Küvette <sup>17</sup>	0,27 cm
	F	Verdünnungsfaktor	-
	V	Messvolumen	µl
	v	Probenvolumen	µl

Alternativ kann die Konzentration an gebildeter GDP-Fucose mit Hilfe der HPLC- bzw. CE-Analytik bestimmt und nach folgender Formel berechnet werden:

---

<sup>17</sup> Bei einer Füllmenge von 100 µl ergibt sich für Standard-Mikrotiter-Platten ein Strahlenweg von 0,27 cm.

$$A_v = \frac{c_{\text{GDP-Fucose}} \cdot F}{t}$$

mit:	$c_{\text{GDP-Fucose}}$	GDP-Fucose Konzentration	[ $\mu\text{mol/ml}$ ]
	F	Verdünnungsfaktor	[-]
	t	Reaktionszeit	[min.]

1 U GDP-Fucose Synthetase entspricht dabei der Enzymmenge, die unter Standardbedingungen die Synthese von 1  $\mu\text{mol}$  GDP-Fucose pro Minute katalysiert.

## 2.14 Bestimmung der $K_m$ - und $v_{\text{max}}$ -Werte der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase

Die Generierung der kinetischen Daten für die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase erfolgte im Rahmen der Zusammenarbeit mit Herrn Dipl. Chem. C. Hoh am Institut für Biotechnologie II im Forschungszentrum Jülich.

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter  $K_m$  und  $v_{\text{max}}$  für das natürliche Substrat GDP-Mannose wurde das Substrat in Konzentrationen zwischen 0 – 10 mM variiert. Um den unter **Kapitel 3.4.3.1** und **Kapitel 3.4.3.4** erhaltenen Ergebnissen Rechnung zu tragen und um gleichzeitig zu überprüfen, ob unterschiedliche Cofaktorkonzentrationen einen Einfluss auf den  $K_m$ -Wert für die GDP-Mannose haben, wurde der  $K_m$ - bzw.  $v_{\text{max}}$ -Wert für das natürliche Substrat GDP-Mannose, sowohl in Gegenwart eines  $\text{NADP}^+$ -Überschusses von 5,0 mM (**Ansatz 1**), als auch unter den „optimierten“ Reaktionsbedingungen von jeweils 0,1 mM  $\text{NADP}^+$  und 0,1 mM NADPH (**Ansatz 2**), ermittelt.

Der Start der Reaktion erfolgte nach einer 10-minütigen Vorinkubation der Ansätze durch Zugabe von GDP-Mannose. Während der Inkubation der Ansätze bei 30 °C wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0 min., 1 min., 3 min., 5 min., 7 min., 10 min., 13 min., 15 min., 20 min., 25 min., 30 min. und 45 min.) Proben von jeweils 50  $\mu\text{l}$  gezogen und die Reaktion durch 1 minütiges Erhitzen bei 95 °C abgestoppt. Anschließend wurde das denaturierte Enzym durch Zentrifugation bei 4 °C sedimentiert und die Proben mittels Kapillarelektrophorese (**Kapitel 2.13.2**) analysiert.

**Ansatz 1:**

GDP-Mannose	0 – 10,0	mM
NADP <sup>+</sup>	5,0	mM
MgCl <sub>2</sub>	10,0	mM
Tris-HCl, pH 8,0	50,0	mM

---

Gesamtvolumen: 1,0 ml

**Ansatz 2:**

GDP-Mannose	0 – 10,0	mM
NADP <sup>+</sup>	0,1	mM
NADPH	0,1	mM
MgCl <sub>2</sub>	10,0	mM
Tris-HCl, pH 8,0	50,0	mM

---

Gesamtvolumen: 1,0 ml

Die kinetischen Daten wurden aus den erhaltenen Datensätzen der CE-Analyse generiert. Dabei wurde den Berechnungen für das natürliche Substrat GDP-Mannose das Modell der Michaelis-Menten-Kinetik zugrundegelegt: Der erhaltene Datensatz wurde an eine einfache Michaelis-Menten-Kinetik als Modell angepasst (nichtlineare Regression).

$$v = v_{\max} \cdot \frac{S}{K_m + S}$$

mit:	$v_{\max}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit	[U/mg]
	$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante	[mM]
	S	Substratkonzentration	[mM]

Die Bestimmung der kinetischen Parameter  $K_m$  und  $v_{max}$  erfolgte für den Cofaktor  $NADP^+$  durch Variation der  $NADP^+$ -Konzentration zwischen 0 – 10 mM (**Ansatz 3**) bzw. für NADPH in einem Bereich zwischen 0 – 1 mM (**Ansatz 4**).

### Ansatz 3:

GDP-Mannose	1,0	mM
$NADP^+$	0 – 10,0	mM
GMD	50,0	$\mu$ l
$MgCl_2$	10,0	mM
Tris-HCl, pH 8,0	50,0	mM

---

Gesamtvolumen: 1,0 ml

### Ansatz 4:

GDP-Mannose	1,0	mM
NADPH	0 – 1,0	mM
GMD	50,0	$\mu$ l
$MgCl_2$	10,0	mM
Tris-HCl, pH 8,0	50,0	mM

---

Gesamtvolumen: 1,0 ml

Der Start der Reaktion erfolgte nach einer 10-minütigen Vorinkubation der Ansätze durch Zugabe von GDP-Mannose. Während der Inkubation der Ansätze bei 30 °C wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0 min., 1 min., 3 min., 5 min., 7 min., 10 min., 13 min., 15 min., 20 min., 25 min., 30 min. und 45 min.) Proben von jeweils 50  $\mu$ l gezogen und die Reaktion durch 1-minütiges Erhitzen bei 95 °C abgestoppt. Anschließend wurde das denaturierte Enzym durch Zentrifugation bei 4 °C sedimentiert und die Proben mittels Kapillarelektrophorese (**Kapitel 2.13.2**) analysiert.

Die kinetischen Daten wurden aus den Ergebnissen der CE-Analyse generiert. Dabei wurden die kinetischen Parameter  $K_m$  und  $v_{max}$  für die Cofaktoren  $NADP^+$  bzw. NADPH auf der Grundlage einer Michaelis-Menten-Kinetik (nichtlineare Regression) und Anpassung der Messwerte an dieses Modell berechnet.

### 2.15 Enzymaufreinigung

#### 2.15.1 Partielle Reinigung der Phosphomannomutase

Nach der Anzucht von *Escherichia coli* BL21(DE3) pERJ-2 im Fermenter und Aufschluss der Zellen mit Ultraschall (Aufschlusspuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM  $MgCl_2$ ; 1 mM DTT) wurden die unlöslichen Zellbestandteile (Zelltrümmer) sedimentiert und der Überstand (Rohextrakt) für die folgende Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose FF verwendet. Bei der Matrix Q-Sepharose FF handelt es sich um eine Agarose, die in hohem Maße quervernetzt ist und quartäre Amine als Liganden enthält. Dadurch wird eine große physikalische und chemische Stabilität erreicht.

Für den verwendeten Anionenaustauscher galten folgende Bedingungen:

<b>Säule:</b>	Material: Q-Sepharose FF (Pharmacia, Freiburg, Deutschland) Betthöhe: 11,0 cm Durchmesser: 5,0 cm Volumen: 215 ml
<b>Flußrate:</b>	20,0 ml/min.
<b>Detektion:</b>	UV-Detektor bei 280 nm
<b>Äquilibrierung:</b>	50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM $MgCl_2$
<b>Probenaufgabe:</b>	106 ml Rohextrakt, 1400 mg Gesamtprotein
<b>Spülen:</b>	50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM $MgCl_2$ mit 100 mM KCl
<b>Elution:</b>	Die Elution erfolgte mittels eines Stufengradienten: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM $MgCl_2$ mit 300 mM KCl
<b>Pufferlösungen:</b>	Puffer A: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM $MgCl_2$ Puffer B: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM $MgCl_2$ mit 1 M KCl

Die gesamte Aufreinigung der Phosphomannomutase erfolgte bei 4 °C im Kühlraum. Nach der Probenaufgabe wurde solange mit dem Start-Puffer gespült bis kein Protein mehr von der Säule gewaschen werden konnte. Anschließend wurde der Stufengradient angelegt und die erhaltenen Fraktionen auf Aktivität überprüft. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und mittels Ultrafiltrationszelle (Amicon) über einer YM10 Membran, die zuvor mit 5 % (w/v) PEG4000 belegt worden war, aufkonzentriert.

Mit einem Teil der Enzympräparation wurde eine 3,2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Suspension hergestellt, während der andere Teil lyophilisiert wurde. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C bzw. -20 °C bis zur weiteren Verwendung.

### 2.15.2 Partielle Reinigung der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-Pyrophosphorylase

Zur Isolierung der rekombinanten GDP-Mannose-Pyrophosphorylase wurde *Escherichia coli* BL21 (DE3) pERJ-1 im größeren Maßstab im Fermenter kultiviert. Nach dem Aufschluss der Zellen mittels Ultraschall (Aufschlusspuffer : 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT) wurden die unlöslichen Zellbestandteile (Zelltrümmer) sedimentiert und der Überstand (Rohextrakt) anschließend für die Anionenaustauschchromatographie verwendet.

Die folgende Anionenaustauschchromatographie wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, dabei galten folgende Bedingungen:

<b>Säule:</b>	Material: Q-Sepharose FF (Pharmacia, Freiburg, Deutschland)
	Betthöhe: 11,0 cm
	Durchmesser: 2,6 cm
	Volumen: 58 ml
<b>Flußrate:</b>	3,0 ml/min.
<b>Detektion:</b>	UV-Detektor bei 280 nm
<b>Äquilibrierung:</b>	50 mM Tris-HCl, pH 8,0
<b>Probenaufgabe:</b>	50 ml Rohextrakt, 785 mg Gesamtprotein
<b>Spülen:</b>	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 mit 100 mM KCl
<b>Elution:</b>	Die Elution erfolgte mittels eines Stufengradienten: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 mit 400 mM KCl

**Pufferlösungen:** Puffer A:  
50 mM Tris-HCl, pH 8,0  
Puffer B:  
50 mM Tris-HCl, pH 8,0 mit 1 M KCl

Nach der Probenaufgabe wurde solange mit Puffer gespült bis kein Protein mehr von der Säule gewaschen werden konnte. Anschließend wurde der Stufengradient angelegt. Die Fraktionen mit GDP-Mannose-Pyrophosphorylase Aktivität wurden vereinigt und mittels einer Ultrafiltrationszelle (Amicon) über einer YM10 Membran, die zuvor mit 5 % (w/v) PEG4000 belegt worden war, aufkonzentriert.

Das Konzentrat wurde mit 25 % (v/v) Glycerin versetzt und bei 4 °C bis zu seiner weiteren Verwendung gelagert.

### 2.15.3 Partielle Reinigung der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase

Zur Isolierung der rekombinanten GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase wurde der Stamm *Escherichia coli* BL21(DE3) pSWJ-3 (pET17b/*gmd*) in einem größerem Maßstab angezogen. Nach der Ernte und dem Aufschluss der Zellen mittels Ultraschall (Aufschlusspuffer: 50 mM MOPS, pH 7,0; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM Mercaptoethanol) wurden die unlöslichen Zellbestandteile (Zelltrümmer) abzentrifugiert und der erhaltene Überstand (Rohextrakt) auf einen Anionenaustauscher (Q-Sepharose FF) gegeben.

Die GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase Enzympräparation wurde in einem chromatographischen Schritt mit Hilfe der Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose FF (Pharmacia, Freiburg, Deutschland) partiell aufgereinigt. Dabei galten die folgenden Bedingungen:

**Säule:** Material: Q-Sepharose FF (Pharmacia, Freiburg, Deutschland)  
Betthöhe: 11,0 cm  
Durchmesser: 2,6 cm  
Volumen: 58 ml

**Flußrate:** 10,0 ml/min.

**Detektion:** UV-Detektor bei 280 nm

**Äquilibrierung:** 50 mM MOPS, pH 7,0

<b>Probenaufgabe:</b>	29 ml Rohextrakt, 554 mg Gesamtprotein
<b>Spülen:</b>	50 mM MOPS, pH 7,0 mit 100 mM KCl
<b>Elution:</b>	Die Elution erfolgte mittels eines linear ansteigenden Gradienten zwischen 100 und 600 mM KCl in 50 mM MOPS, pH 7,0
<b>Pufferlösungen:</b>	Puffer A: 50 mM MOPS, pH 7,0  Puffer B: 50 mM MOPS, pH 7,0 mit 1 M KCl

Die Fraktionen wurden auf enzymatische Aktivität untersucht und die aktiven Fraktionen vereinigt. Der erhaltene Q-Sepharose Pool wurde in einer Ultrafiltrationszelle über einer YM10 Membran, die zuvor mit 5 % (w/v) PEG4000 belegt worden war, aufkonzentriert. Das Konzentrat wurde mit 50 % (v/v) Glycerin versetzt und bis zu seiner weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Der Versuch einer Aufreinigung der *N*-terminal His-tag klonierten GMD mittels immobilisierter Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC) an Ni-NTA-Agarose erfolgte analog zur beschriebenen Aufreinigung der Fucose Synthetase (vgl. **Kapitel 2.15.4**). Die Aufreinigung führte allerdings zu einer inaktiven Enzympräparation.

#### **2.15.4 Reinigung der GDP-Fucose Synthetase**

Zur Isolierung der rekombinanten GDP-Fucose Synthetase wurde der Stamm *Escherichia coli* BL21(DE3) pSWJ-5 (pET16b/*wcaG*) zunächst in einem größerem Maßstab (15 Liter) im Fermenter angezogen.

Nach der Ernte und dem Aufschluss der Zellen mittels Ultraschall (Aufschlusspuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 150 mM NaCl; 5 mM Mercaptoethanol) wurden die unlöslichen Zellbestandteile bzw. Zelltrümmer sedimentiert und der erhaltene Rohextrakt einer immobilisierten Metallionenaffinitätschromatographie unterzogen.

Die Aufreinigung der GDP-Fucose Synthetase (His-WcaG/His-Fcl) erfolgte aufgrund des vorhandenen *N*-terminalen Histidinrest mit Hilfe der **I**mmobilisierten **M**etallionen **A**ffinitäts**c**hromatografie oder kurz IMAC. Als Gelmaterial wurde Ni-NTA Superflow (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Dieses Material besteht aus einer hochvernetzten Agarose-Matrix mit Nickel-Nitrilotriacetoessigsäure Liganden. Der Ligand belegt dabei vier

der sechs vorhandenen Koordinationsstellen des  $\text{Ni}^{2+}$ -Ions. Die zwei freien Koordinationsstellen binden  $\text{H}_2\text{O}$ , welches mit großer Selektivität und Affinität von histidinreichen Proteinen verdrängt wird. Dabei bindet NTA das Metallion aufgrund der höheren Koordinationszahl stärker als viele andere Chelatbildner und hält das Ion so besser unter sehr verschiedenartigen Bedingungen am Liganden zurück.

Für die Metallionenaffinitätschromatographie galten folgende Bedingungen:

<b>Säule:</b>	Material: Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden, Deutschland)
	Betthöhe: 10,5 cm
	Durchmesser: 1,6 cm
	Volumen: 21 ml
<b>Flußrate:</b>	5,0 ml/min. (150 cm/h)
<b>Detektion:</b>	UV-Detektor bei 280 nm
<b>Äquilibration:</b>	50 mM Tris-HCl
	10 mM $\text{MgCl}_2$
	150 mM NaCl
	5 mM $\beta$ -Mercaptoethanol
<b>Probenaufgabe:</b>	15 ml Rohextrakt
<b>Spülen:</b>	50 mM Tris-HCl
	10 mM $\text{MgCl}_2$
	150 mM NaCl
	5 mM $\beta$ -Mercaptoethanol
	20 mM Imidazol
<b>Elution:</b>	50 mM Tris-HCl
	10 mM $\text{MgCl}_2$
	5 mM $\beta$ -Mercaptoethanol
	200 mM Imidazol
	10 % Glycerin

Nach dem Auftragen wurde solange mit dem Start-Puffer gespült, bis kein Protein mehr von der Säule eluiert werden konnte. Anschließend wurde der Elutionspuffer angelegt und der folgende Elutionspeak (His-Fcl) in Fraktionen zu je 2 ml aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen, die die GDP-Fucose Synthetase enthielten wurden vereinigt und in einer Ultrafiltrationszelle über eine YM10 Membran, die zuvor mit 5 % (w/v) PEG4000 belegt

worden war, umgepuffert und aufkonzentriert (Puffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 % (v/v) Glycerin).

Die konzentrierte Enzymlösung wurde mit 50 % (v/v) Glycerin versetzt und bis zur ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

## **2.16 Charakterisierung und Anwendung der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase**

### **2.16.1 Einfluss der NADP<sup>+</sup>-Cofaktorkonzentration auf die Aktivität der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase**

In diesem Versuch wurde untersucht, inwieweit die Cofaktorkonzentration an NADP<sup>+</sup> einen Einfluss auf die Aktivität der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase hat. Dazu wurde die Aktivität der partiell aufgereinigten GMD bei zwei verschiedenen Cofaktorkonzentrationen bestimmt. Um einen möglichst breiten Bereich abzudecken wurde zum einen die bisher im „Standardtest“ verwendete Cofaktorkonzentration von 0,1 mM und in einem zweiten Ansatz ein großer Überschuss an Cofaktor von 5,0 mM eingesetzt. Dabei wurden folgende Ansätze verwendet:

#### **Ansatz:**

GDP-Mannose	1,0 mM
NADP <sup>+</sup>	0,1 bzw. 5,0 mM
GMD	50,0 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	10,0 mM
Tris-HCl, pH 8,0	50,0 mM

---

Gesamtvolumen: 1,0 ml

Der Start der Reaktion erfolgte nach einer 10-minütigen Vorinkubation der Ansätze durch Zugabe von GDP-Mannose. Während der Inkubation der Ansätze bei 30 °C wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0 min., 1 min., 3 min., 5 min., 7 min., 10 min., 13 min., 15 min.,

20 min., 25 min., 30 min. und 45 min.) Proben von jeweils 50 µl gezogen und die Reaktion 1 min. bei 95 °C abgestoppt. Anschließend wurde das denaturierte Enzym sedimentiert und die Proben mittels Kapillarelektrophorese (**Kapitel 2.13.2**) analysiert.

### **2.16.2 Einfluss von NADPH auf die Aktivität der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase**

In zwei Versuchen wurde untersucht, inwieweit die reduzierte Form des Cofaktors NADPH einen möglichen Einfluss auf die Aktivität der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) hat. Dabei wurden die unten aufgeführten Ansätze unter Verwendung der partiell aufgereinigten Enzympräparation (**Kapitel 3.4.1.4**) durchgeführt:

#### **Ansatz 1 $\cong$ „Standardtest“:**

GDP-Mannose	1,0 mM
NADP <sup>+</sup>	0,1 mM
GMD	50,0 µl
MgCl <sub>2</sub>	10,0 mM
Tris-HCl, pH 8,0	50,0 mM

---

Gesamtvolumen: 1,0 ml

#### **Ansatz 2:**

GDP-Mannose	1,0 mM
NADP <sup>+</sup>	0,1 mM
NADPH	0,1 mM
GMD	50,0 µl
MgCl <sub>2</sub>	10,0 mM
Tris-HCl, pH 8,0	50,0 mM

---

Gesamtvolumen: 1,0 ml

In einem weiteren Versuch sollte dann untersucht werden, ob eine Umsetzung bzw. Aktivität auch allein durch Zugabe von NADPH zum Ansatz beobachtet werden kann.

**Ansatz 3:**

GDP-Mannose	1,0 mM
NADPH	0,1 mM
GMD	50,0 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	10,0 mM
Tris-HCl, pH 8,0	50,0 mM

---

Gesamtvolumen:	1,0 ml
----------------	--------

Dazu wurde dem unter **Kapitel 2.14.3.4** beschriebenen „Standardtest“ NADPH in einer Konzentration von 0,1 mM anstelle von NADP zugesetzt (**Ansatz 3**).

Der Start der Reaktion erfolgte nach einer 10-minütigen Vorinkubation der Ansätze durch die Zugabe von GDP-Mannose. Während der Inkubation der Ansätze bei 30 °C wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0 min., 1 min., 3 min., 5 min., 7 min., 10 min., 13 min., 15 min., 20 min., 25 min. und 30 min.) Proben von jeweils 50  $\mu$ l gezogen und die Reaktion 1 min. bei 95 °C abgestoppt. Anschließend wurde das denaturierte Enzym sedimentiert und die Proben mittels Kapillarelektrophorese (**Kapitel 2.13.2**) analysiert.

**2.16.3 Versuch einer präparativen enzymatischen Synthese und Isolierung von GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose ausgehend von GDP- $\alpha$ -D-Mannose**

Die präparative enzymatische Synthese der GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose erfolgte ausgehend von GDP-Mannose unter Verwendung eines Rohextraktes der rekombinanten GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD). Dabei wurde der folgende Ansatz verwendet:

**Ansatz:**

GDP-Mannose	≈ 7,3 mM (50 mg)
NADP <sup>+</sup>	0,1 mM
GMD	0,16 U/ml
MgCl <sub>2</sub>	10,0 mM
Tris-HCl, pH 8,0	50,0 mM

---

Gesamtvolumen:	10,0 ml
----------------	---------

Die anschließende Aufreinigung der GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose erfolgte über zwei chromatographische Schritte. Im ersten Schritt wurden mit Hilfe einer Anionenaustauschchromatographie alle ungeladenen Nebenprodukte, Verunreinigungen sowie der Tris-Puffer von der Produktlösung abgetrennt. Als Gelmaterial wurde ein Dowex-Ionenaustauschermaterial 1 x 2, 100 – 200 mesh (Serva) in der Chlorid-Form verwendet. Bei diesem Material handelt es sich um einen stark basischen Anionentauscher auf Kunstharzbasis, der mit 2 % Divinylbenzol quervernetzt ist und als funktionelle Einheiten Trimethylammoniumgruppen enthält. Das Dowex-Ionenaustauschermaterial wurde durch Regeneration mit 2 M HCl in die Chlorid-Form überführt und so lange mit Wasser gewaschen bis das Waschwasser neutral war.

**Säule:** Material: Dowex, 100 – 200 mesh (Serva, Heidelberg, Deutschland)

Betthöhe: 34,0 cm

Durchmesser: 2,6 cm

Volumen: 180 ml

**Flußrate:** 6,0 ml/min.

**Detektion:** UV-Detektor bei 254 nm

**Probenaufgabe:** 10 ml ultrafiltrierte Produktlösung

**Spülen:** Millipore Wasser bis zum Erreichen der Basislinie im UV

**Elution:** Die Elution erfolgte mittels eines linear ansteigenden Gradienten von 0 bis 1 M NaCl in Millipore Wasser

Die erhaltenen Fraktionen wurden mit der unter **Kapitel 2.13.1** beschriebenen HPLC-Analytik analysiert und diejenigen, welche das Produkt enthielten, gepoolt. Aufgrund des hohen Salzeintrags war die Detektion der GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose sehr erschwert. Der erhaltene Pool wurde zur Volumenverkleinerung in einem Rotationsverdampfer bei RT soweit aufkonzentriert, dass das Löslichkeitsprodukt des NaCl-Salzes nicht überschritten wurde.

Nach der Aufkonzentrierung schloss sich zur Entsalzung, als zweiter chromatographischer Schritt, eine präparative Gelfiltration an Sephadex G-10 (Pharmacia) bei 4 °C im Kühlraum an. Das hier verwendete Gelmaterial ist zum Entsalzen und Trennen von kleinen Molekülen bis zu einem Molekulargewicht von 700 g/mol geeignet.

<b>Säule:</b>	Material: Sephadex G-10 (Pharmacia, Freiburg, Deutschland)
	Betthöhe: 85,0 cm
	Durchmesser: 5,0 cm
	Volumen: 1668 ml
<b>Flußrate:</b>	2,0 ml/min.
<b>Detektion:</b>	UV-Detektor bei 254 nm
	Leitfähigkeitsmesszelle
<b>Spülen:</b>	Millipore Wasser
<b>Elution:</b>	Millipore Wasser

Die gesammelten Fraktionen wurden erneut mit Hilfe der HPLC (**Kapitel 2.13.1**) analysiert und die produkthaltigen Fraktionen gepoolt.

Abschließend wurde die Produktlösung bei -20 °C eingefroren und mittels Lyophilisation (Lyovac GT 3, Leybold) getrocknet.

### **2.17 Anwendung der GDP-Fucose Synthetase zur Synthese von GDP-Fucose**

Für diesen Versuch wurde eine Charge der mittels immobilisierter Metallionenaffinitätschromatographie aufgereinigten GDP-Fucose Synthetase verwendet. Als Substrat diente die unter **Kapitel 3.3.3.6** synthetisierte GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose. Dabei wurde der folgende Ansatz verwendet:

**Ansatz:**

GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose	≈ 1,0 mM
NADPH	1,0 mM
MgCl <sub>2</sub>	10,0 mM
GFS	50,0 µl
Tris-HCl	50,0 mM
pH 8,0	
T = 30 °C	

---

Gesamtvolumen: 1.0 ml

Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von NADPH. Während der Inkubation der Ansätze bei 30 °C wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0 min., 0,5 min., 1 min., 3 min., 5 min., 10 min., 15 min., 20 min., 30 min. und 45 min.) Proben von jeweils 50 µl gezogen und die Reaktion 1 min. bei 95 °C abgestoppt. Anschließend wurde das denaturierte Enzym sedimentiert und die Proben mittels Kapillarelektrophorese (**Kapitel 2.13.2**) analysiert.

## **2.18 Qualitative Analyse der enzymatischen Synthese von GDP-Fucose aus GDP-Mannose**

Die qualitative Analyse der enzymatischen Synthese von GDP-Fucose wurde ausgehend von GDP-Mannose mit Rohextrakten der in dieser Arbeit klonierten und überexprimierten Proteine - GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) und GDP-Fucose Synthetase (GFS) - durchgeführt.

Die Umsetzung erfolgte in zwei aufeinanderfolgenden Schritten bei 30 °C. Dies war notwendig, da die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase durch das Endprodukt GDP-Fucose stark inhibiert wird (Feedback-Inhibition). Für den Versuch wurde der folgende Ansatz gewählt:

Schritt 1 wurde durch die Zugabe von GDP-Mannose zum Assay gestartet. Nach vollständiger Umsetzung zur GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose wurde im zweiten Schritt

NADPH und GDP-Fucose Synthetase dem Ansatz zugesetzt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels HPLC (**Kapitel 2.13.1**) verfolgt.

**Ansatz:**

<b>1.Schritt:</b>	GDP-Mannose	1,0 mM
	NADP <sup>+</sup>	0,1 mM
	GMD	100,0 µl
	MgCl <sub>2</sub>	10,0 mM
	Tris-HCl, pH 8,0	50,0 mM

<b>2.Schritt:</b>	<u>Zugabe von:</u>	
	NADPH	1,0 mM
	GFS	100,0 µl

---

Gesamtvolumen: ≈ 2,0 ml

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Klonierung und Überproduktion der Proteine des „langen“ oder „*de novo*“ Biosyntheseweges von GDP- $\beta$ -L-Fucose aus nicht pathogenen *Enterobacteriaceae* in geeigneten Wirtsstämmen

Um Zwischenstufen von GDP-aktivierten 6-Desoxyhexosen (6DOH) in ausreichender Menge herstellen und GDP- $\beta$ -L-Fucose synthetisieren und isolieren zu können, wurden in einem ersten Schritt die Gene, die für die Enzyme des *de novo* Biosyntheseweges von GDP-Fucose kodieren, GMD (GDP-D-Mannose-4,6-Dehydratase; EC 4.2.1.47) und WcaG/Fcl (GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose 3,5-epimerase 4-reduktase/Fucose-Synthetase; EC: keine Klassifizierung), einzeln aus *Escherichia coli* K-12 kloniert und anschließend die rekombinanten Enzyme in geeigneten Wirtsstämmen überexprimiert.

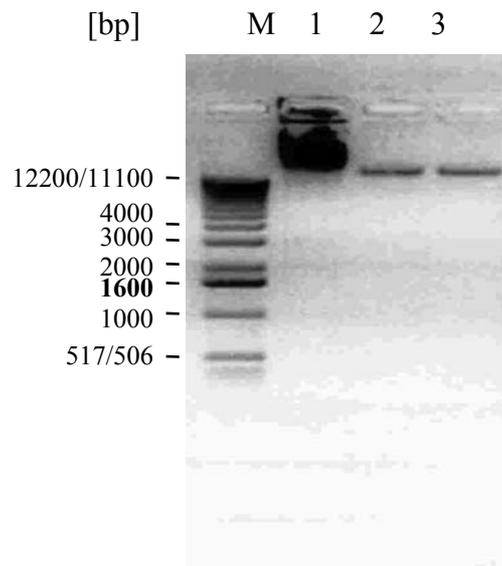
##### 3.1.1 Klonierung von *gmd*, *wcaG/fcl*, *wcaH* und *wcaI* in die Expressionsplasmide pET11a, pET16b und pET17b

Für die Überproduktion der Proteine GMD, WcaG/Fcl, WcaH und WcaI wurden Plasmide der pET-Reihe (STUDIER et al., 1990) verwendet. Diese Plasmide (vgl. **Tabelle 2**) besitzen als Kontrollelemente der Transkription und Translation den Promotor und die RBS („ribosomale Bindungsstelle“) des Gens *10*, sowie den Terminator *t $\phi$*  des Phagen T7 (TABOR & RICHARDSON, 1985; STUDIER & MOFFAT, 1986; STUDIER et al., 1990; NOVAGEN, 1997). Zusätzlich ermöglicht der Vektor pET16b durch seine „leader“-Sequenz eine Fusion von 12 Histidinresten an den N-Terminus des überexprimierten Proteins, welche eine Voraussetzung für die spätere Aufreinigung über eine Ni-NTA-Säule sind (NOVAGEN, 1997).

Für die Klonierung der Gene *gmd*, *wcaG*, *wcaH* und *wcaI* aus dem Colanic-Acid-Gencluster (*wca*-Gencluster) von *Escherichia coli* K-12 konnte auf die erst kürzlich von P.R. Reeves und seiner Arbeitsgruppe veröffentlichte Sequenz des *wca*-Genclusters zurückgegriffen werden (STEVENSON et al., 1996). Dadurch, dass die DNA-Sequenzen der gewünschten Gene bereits bekannt waren, konnte die Polymerasekettenreaktion (PCR) gezielt angewendet und Oligonukleotidprimer von der DNA-Sequenz des *wca*-Clusters abgeleitet werden (STEVENSON et al., 1996). Die Primer wurden dabei so gewählt, dass eine *Nde*I-Schnittstelle

am Start der Gene und unterhalb des Stop-Kodons entweder eine *Hind*III (*gmd*) bzw. *Bgl*II (*gmd*, *wcaI*) oder eine *Bam*HI-Schnittstelle (*wcaG* und *wcaH*) gebildet wurden (vgl. **Tabelle 4**). Für die Amplifikation der Gene *gmd*, *wcaG*, *wcaH* und *wcaI* aus chromosomaler DNA von *Escherichia coli* K-12 (siehe **Abbildung 27**) wurden die Primer **P-1/P-2** bzw. **P-1/P-3** für *gmd*, **P-4/P-5** für *wcaG*, **P-6/P-7** für *wcaH*, sowie die Primer **P-8** und **P-9** für *wcaI* eingesetzt (vgl. **Tabelle 4**).

---



---

**Abbildung 27:** Isolierte genomische DNA von *Escherichia coli* K-12, die in den PCR-Ansätzen verwendet wurde. **M:** 1 kb DNA-Leiter (Gibco BRL); **Spur 1, 2, 3:** genomische DNA in verschiedenen Verdünnungen.

Für die PCR-Reaktion wurde der unter **Kapitel 2.4.11.2** aufgeführte Ansatz und das ebenfalls in diesem Kapitel beschriebene Amplifikationsprogramm verwendet. Die Berechnung der Annealing-Temperaturen erfolgte mit den unter **Kapitel 2.4.11.1** angegebenen Formeln. Nach der PCR-Reaktion wurden die erhaltenen 1,1 kb, 0,9 kb, 0,4 kb und 1,2 kb großen Amplifikate von *gmd*, *wcaG*, *wcaH* und *wcaI* über ein 0,8 %-iges Agarosegel von unspezifischen DNA-Amplifikaten abgetrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und aus der Agarose isoliert. Anschließend wurden die isolierten Fragmente mit *Nde*I/*Hind*III (*gmd*) bzw. *Nde*I/*Bgl*II (*gmd*, *wcaI*) und *Nde*I/*Bam*HI (*wcaG*, *wcaH*) hydrolysiert und erneut über ein Agarosegel aufgereinigt.

Die DNA-Fragmente mit den kodierenden Nukleotidsequenzen wurden über Nacht in die pET17b-*NdeI/HindIII* (*gmd*), pET11a-*NdeI/BamHI* sowie pET16b-*NdeI/BamHI* (*gmd*, *wcaG*, *wcaH* und *wcaI*) hydrolysierten Vektoren ligiert. Daraus resultierten die Plasmide pSWJ-1 (*gmd*), pSWJ-4 (*wcaG*), pSWJ-6 (*wcaH*) und pSWJ-8 (*wcaI*) mit pET11a als Basisvektor, sowie pSWJ-2 (*gmd*), pSWJ-5 (*wcaG*), pSWJ-7 (*wcaH*), pSWJ-9 (*wcaI*) mit pET16b als Basisvektor und pSWJ-3 (*gmd*) mit pET17b als Basisvektor. Diese Expressionsplasmide wurden in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  transformiert.

Von den erhaltenen Transformanten wurde zur Kontrolle eine Plasmidisolierung und eine anschließende Restriktion mit *NdeI/BamHI* bzw. *NdeI/HindIII* (pSWJ-3) durchgeführt. „Positive“ Transformanten, das heißt Transformanten die ein Plasmid trugen, welches inserierte DNA enthält, wurden erneut angezogen und als 50 %-ige (v/v) Glycerin-Kultur bei -80 °C aufbewahrt. Für die Überproduktion der Proteine wurde die isolierte und getestete Plasmid-DNA anschließend in den Wirtstamm BL21(DE3) transformiert.

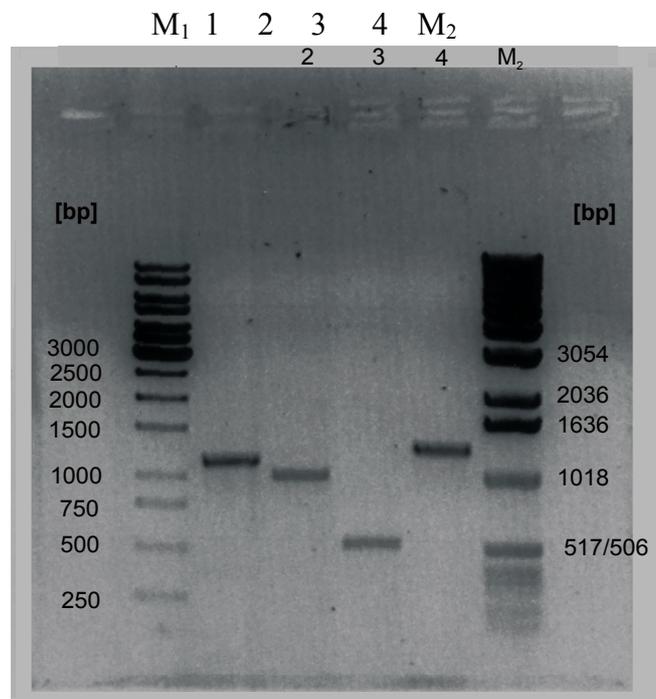
### 3.1.2 Klonierung von *gmd*, *wcaG/fcl*, *wcaH* und *wcaI* in die Expressionsplasmide pBAD18 bzw. pBAD18HisA

Als Alternative zur Klonierung in Expressionsplasmide der pET-Reihe wurden die Gene auch in die Vektoren pBAD18 bzw. pBADHisA kloniert. In diesen Vektoren stehen die zu exprimierenden Gene unter der Kontrolle des arabinose-induzierbaren Promotors P<sub>BAD</sub> (GUZMAN et al., 1992; GUZMAN et al., 1995; SIEGELE & HU, 1997).

Für die Klonierung von *gmd*, *wcaG/fcl*, *wcaH* und *wcaI* in pBAD18 und pBADHisA wurden zwei verschiedene Wege gewählt. Bei der Klonierung in pBAD18 wurden für die Amplifikation von *gmd* die Primer **P-10/P-12**, *wcaG* die Primer **P-13/P-15**, *wcaH* die Primer **P-16/P-17** und für *wcaI* die Primer **P-18** und **P-20** eingesetzt (vgl. **Tabelle 4**). Die Oligonukleotidprimer leiteten sich dabei aus der bereits publizierten DNA-Sequenz des *wca*-Genclusters (STEVENSON et al., 1996) ab. Für die PCR-Reaktionen wurden der unter **Kapitel 2.4.11.2** beschriebene PCR-Ansatz und das Amplifikationsprogramm verwendet und die „Annealing“-Temperaturen nach den Formeln unter **Kapitel 2.4.11.1** bestimmt. Die erhaltenen Amplifikate (**siehe Abbildung 28**) wurden über ein 0,8 %-iges Agarosegel von unspezifischen DNA-Amplifikaten abgetrennt, ausgeschnitten und aus der Agarose isoliert. Auf den amplifizierten DNA-Fragmenten lag das jeweilige Gen mit seiner „stromaufwärts“ des Genstarts gelegenen natürlichen ribosomalen Bindungsstelle (RBS).

Die Polymerasekettenreaktion wurde mit *Pfu*-Polymerase (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt, welche ein 5'→3'-„proof-reading“ besitzt und weiterhin auch kein zusätzliches Adenosin am 3'-Ende des neu gebildeten DNA-Stranges produziert. Letztere Eigenschaft ermöglichte eine direkte „blunt-end“ Ligation (sureClone™ ligation kit; Pharmacia, Freiburg, Deutschland) der isolierten DNA-Fragmente mit *Sma*I-hydrolysiertem pUC18 Plasmid. Die resultierenden Plasmide pSWJ-10 (*gmd*), pSWJ-11 (*wcaG*), pSWJ-12 (*wcaH*) und pSWJ-13 (*wcaI*) wurden einer Restriktionsanalyse unterzogen, zur Kontrolle sequenziert und anschließend diejenigen Konstrukte, die die richtige Orientierung im Leserahmen besaßen, mit den Restriktionsenzymen *Asp*718 und *Hind*III hydrolysiert.

---



**Abbildung 28:** Beispiel einer PCR der Gene *gmd*, *wcaG*; *wcaH* und *wcaI* aus dem *wca*-Gencluster von *Escherichia coli* K-12. **M<sub>1</sub>**: 1kb DNA-Leiter (MBI Fermentas); **Spur 1:** *gmd*; **Spur 2:** *wcaG*; **Spur 3:** *wcaH*; **Spur 4:** *wcaI*; **M<sub>2</sub>**: 1kb DNA-Leiter (Gibco BRL).

Die 1,1 kb, 0,9 kb, 0,4 kb und 1,2 kb großen DNA-Fragmente wurden in den Expressionsvektor pBAD18 ligiert und die daraus resultierenden Plasmide pSWJ-14 (*gmd*),

pSWJ-15 (*wcaG*), pSWJ-16 (*wcaH*) und pSWJ-17 (*wcaI*) in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  transformiert.

Bei der Klonierung in den arabinose-induzierbaren Vektor pBADHisA konnte auf die Einführung einer „stromaufwärts“ des Genstarts gelegenen natürlichen ribosomalen Bindungsstelle (RBS) verzichtet werden. Für die Amplifikation der Gene aus chromosomaler DNA von *Escherichia coli* K-12 wurden hier die Primer **P-11/P-12** (*gmd*), die Primer **P-14/P-15** (*wcaG*), sowie die Primer **P-19** und **P-20** (*wcaI*) eingesetzt. Die Oligonukleotidprimer wurden von der kürzlich veröffentlichten DNA-Sequenz des *wca*-Genclusters (STEVENSON et al., 1996) abgeleitet und die Primer so gewählt, dass eine *KpnI*-Schnittstelle am Start der Gene und hinter den Stop-Kodons eine *HindIII*-Schnittstelle gebildet wurde (vgl. **Tabelle 4**). Für die PCR-Reaktionen wurden die unter **Kapitel 2.4.11.2** aufgeführten PCR-Ansätze und Amplifikationsprogramme verwendet und die „Annealing“-Temperaturen nach den Formeln unter **Kapitel 2.4.11.1** bestimmt. Nach der PCR wurden die erhaltenen Amplifikate über ein Agarosegel aufgereinigt und mit *KpnI/HindIII* hydrolysiert. Im letzten Schritt wurden die DNA-Fragmente mit den kodierenden Nukleotidsequenzen in den zuvor *KpnI/HindIII* hydrolysierten Expressionsvektor pBADHisA ligiert und die daraus resultierenden Plasmide pSWJ-18 (*gmd*), pSWJ-19 (*wcaG*) und pSWJ-20 (*wcaI*) in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  transformiert.

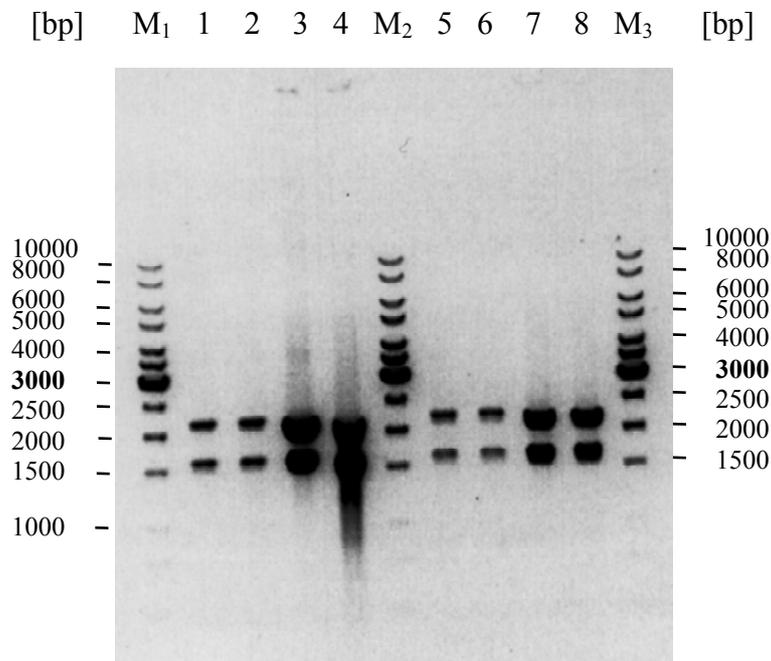
### **3.1.3 Stammhaltung von *rfbK* / *manB* (Phosphomannomutase) und *rfbM* / *manC* (GDP- $\alpha$ -D-Mannose-Pyrophosphorylase) im Expressionsplasmid pT7-6**

Die Gene, die für die Enzyme Phosphomannomutase (*RfbK* / *ManB*) und GDP-Mannose-Pyrophosphorylase (*RfbM* / *ManC*) kodieren, wurden bereits von RITTER (1995) aus *Salmonella enterica*, Gruppe B, kloniert und einzeln in *Escherichia coli* BL21(DE3) bzw. BL21(DE3)pLysS heterolog exprimiert.

Von vorhandenen Glycerolstocks der Überexpressionsklone *E. coli* BL21(DE3) / **pERJ-2** (***RfbK* / *ManB***), sowie *E. coli* BL21(DE3)pLysS / **pERJ-1** (***RfbM* / *ManC***), wurden Übernachtskulturen angezogen und die Plasmide isoliert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI linearisiert und die erhaltenen 3,8 kb großen DNA-Fragmente über ein Agarosegel aufgetrennt, isoliert und aufgereinigt. Anschließend wurden die Plasmide religiert und in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert.

Zur Kontrolle wurden von einigen Transformanden die Plasmide isoliert, einer Restriktionsanalyse unterzogen und die Ansätze danach auf ein Agarosegel aufgetragen (**Abbildung 29**). Nach Hydrolyse durch die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *BamHI* konnten bei einer vollständigen Restriktion zwei Banden gefunden werden. Die oberen Banden entsprechen dabei dem Plasmid Vektorbande), in diesem Falle dem Expressionsvektor pT7-6 (2,2 kb), während die unteren Banden (Insert) den herausgeschnittenen Genen *rfbM* und *rfbK* (~ 1,6 kb) entsprechen. Die positiven Transformanden wurden erneut angezogen und in Dauerkultur genommen.

---



**Abbildung 29:** Restriktionsanalyse der „klonierten Gene“ hier am Beispiel von *rfbM* und *rfbK* aus dem *rfb*-Gencluster von *Salmonella enterica* LT2. Eine Restriktion mit den Enzymen *EcoRI* und *BamHI* setzt das inserierte Gen frei. Es zeigt sich eine „Vektorbande“ (oben) - linearisierter Vektor pT7-6 - bei 2,2 kb und eine untere Bande mit 1,6 kb -linearisierte Gene. **M<sub>1,2,3</sub>**: 1kb DNA-Leiter (MBI Fermentas); **Spur 1, 2, 5, 6**: pERJ-2 (*EcoRI* / *BamHI*); **Spur 3, 4, 7, 8**: pERJ-1 (*EcoRI* / *BamHI*).

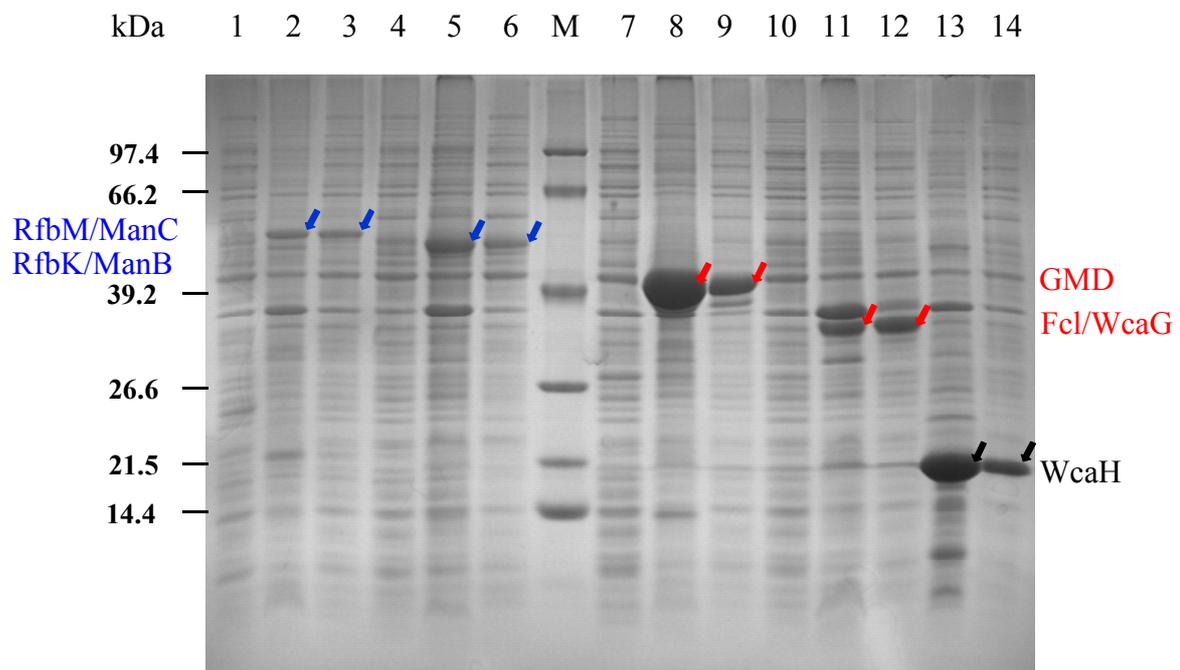
Zusätzlich wurden die positiven Expressionsplasmide auch in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und nach einer wiederholten Restriktionsanalyse ebenfalls in Dauerkultur genommen. Im Gegensatz zur Arbeit von RITTER (1995) liegt nun auch das

Expressionsplasmid pERJ-1 (pT7-6/*rfbM*) im Expressionsstamm BL21(DE3) vor, da sich das Handling des Stammes BL21(DE3)pLysS als nicht so günstig erwies (Lyse der Zellen).

### 3.1.4 Heterologe/Homologe Überproduktion der Proteine PMM, GMP, GMD, WcaG und WcaH aus *Salmonella enterica* B/*Escherichia coli* K-12 in *E. coli* BL21(DE3)

Im Anschluß an die Klonierung der Gene in die Expressionsplasmide erfolgten erste Versuche zur Überproduktion der Proteine in geeigneten Wirtsstämmen.

---



**Abbildung 30:** SDS-PAGE-Analyse der überproduzierten Proteine RfbM, RfbK aus *Salmonella enterica* B, sowie GMD, WcaG/Fcl und WcaH aus *Escherichia coli* K-12 in *E. coli* BL21(DE3). **Spur 1, 4,7,10:** Kontrolle – Vektor ohne Insert; **Spur 2, 5, 8, 11, 13:** Zellpellet; **Spur 3, 6, 9, 12, 14:** Rohextrakte.

Die in der **Abbildung 30** gezeigte Überexpression der Proteine RfbM, RfbK, GMD, WcaG/Fcl und WcaH erfolgte mit den Plasmiden pERJ-1, pERJ-2, pSWJ-3, pSWJ-4 und

pSWJ-5 (vgl. **Tabelle 3**) in den Wirtsstämmen *E. coli* BL21(DE3). Die Expression wurde dabei wie unter **Kapitel 2.6** beschrieben durchgeführt.

Eine SDS-PAGE-Analyse der Zellextrakte zeigte, dass 90 min. nach Induktion der Expression durch die Zugabe von IPTG zum Kulturmedium zusätzliche Proteine gebildet wurden. Die mit Hilfe des aufgetragenen Molekulargewichtsstandards im Gel ermittelten molekularen Massen der überproduzierten Proteine stimmten dabei mit den aus der Aminosäuresequenz berechneten molekularen Massen überein: RfbM – 55,6 kDa (54,0 kDa - berechnetes Molekulargewicht aus der Aminosäuresequenz); RfbK – 53,7 kDa (52,1 kDa); GMD – 43,9 kDa (42,0 kDa); WcaG/Fcl – 35,4 kDa (36,5 kDa); WcaH – 18,6 kDa (18,4 kDa).

Die beobachteten ausgeprägten Proteinbanden im Pellet resultieren aus der Tatsache, dass nicht lösliche Enzymaggregate, sogenannte „inclusion bodies“, gebildet wurden. In den anschließenden Versuchen zeigten jedoch die löslichen Proteine im Überstand eine ausreichende Aktivität, so dass auf eine weitere Optimierung der Expression verzichtet werden konnte. Mittels SDS-PAGE-Analyse konnte bei den Konstrukten, bei denen die zu exprimierenden Gene unter der Kontrolle des arabinose-induzierbaren Promotors  $P_{BAD}$  standen, keine Überproduktion der gewünschten Proteine im Rohextrakt bzw. „inclusion bodies“ im Zellpellet festgestellt werden, obgleich auch hier eine GDP-Mannose-4,6-Dehydratase-Aktivität (GMD) und Fucose-Synthetase-Aktivität (WcaG/Fcl) nachweisbar war. Aufgrund der schlechteren Überproduktion wurde deshalb im folgenden auf die weitere Verwendung dieser Expressionsplasmide verzichtet.

### 3.1.5 Zusammenfassende Diskussion der Klonierung

Im ersten Teil dieser Arbeit konnten die Voraussetzungen für die Bereitstellung zuverlässiger Enzymquellen für die enzymatische Synthese von GDP-Fucose, in Form von rekombinant verfügbaren Biosyntheseenzymen geschaffen werden. Die Gene, die für die Enzyme des langen Biosyntheseweges kodieren, liegen aufeinanderfolgend im *wca*-Gencluster (Kapselpolysaccharid „Colanic Acid“) von *Escherichia coli* K-12 vor, dessen Struktur und Sequenz in der Arbeitsgruppe von P. R. REEVES aufgeklärt werden konnte (STEVENSON et al., 1996). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Gene, die für die Enzyme des *de novo* Biosyntheseweges von GDP-Fucose, GMD (GDP-D-Mannose-4,6-Dehydratase) und WcaG/Fcl (GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose 3,5-epimerase 4-reduktase, kurz Fucose-Synthetase) kodieren, einzeln aus *Escherichia coli* K-12 in Vektoren der pET-Reihe (pET11a,

pET17b und pET16b) kloniert und in *Escherichia coli* BL21(DE3) überexprimiert. Bei den verwendeten Plasmiden, die den Promotor und die Shine-Dalgarno-Sequenz des Gens *l0* des Phagen T7 als Initiationssignal der Translation und die Nukleotidsequenz des *t $\phi$* -Terminators als Stop-Signal der Transkription besitzen, handelt es sich um ein sehr starkes System für die Klonierung und Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli*. Das klonierte Gen steht dabei unter der Kontrolle eines T7-Promotors, der spezifisch durch die T7-RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 erkannt wird. Durch die Verwendung von *E. coli*-Stämmen während der Klonierung die kein Gen für die T7-RNA-Polymerase in ihrem Genom enthalten wird eine Hintergrundexpression vermieden. Dies ist insofern von Vorteil, da man häufig über die Toxizität des exprimierten Genproduktes für den Wirtstamm keine klare Aussage machen kann. Für die Expression werden *E. coli*-Stämme verwendet die eine Kopie des Gen, welches für die T7-RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 kodiert, in ihrem Genom integriert enthalten (z. B. *E. coli* BL21(DE3)). Die T7-RNA-Polymerase steht dabei unter der Kontrolle des IPTG induzierbaren *lacUV5*-Promotors (TABOR & RICHARDSON, 1985; STUDIER & MOFFAT, 1986; STUDIER et al., 1990; NOVAGEN, 1997).

Bei der Überproduktion der klonierten Gene unter der Kontrolle des T7-Promotors in *E. coli* BL21(DE3) konnte die Bildung von unlöslichen Aggregaten, sogenannter „inclusion bodies“, beobachtet werden. Die Gründe für die Bildung von „inclusion bodies“ sind bisher nur wenig verstanden. Mögliche Ansatzpunkte um die Ausbildung dieser Aggregate zu vermeiden sind lediglich empirischer Art. Zu den am häufigsten angewandten Strategien gehören dabei unter anderem die Absenkung der Induktionstemperatur, die Variation des pH-Wertes im Medium, eine limitierende Induktion der Expression oder die Anzucht der Zellen unter osmotischen Stressbedingungen durch Zugabe von z. B. Glycin zum Medium (KOPETZKI et al., 1989; HOCKNEY, 1994). Alle diese Maßnahmen sollen zu einer Verlangsamung des Faltungsvorganges der rekombinanten Proteine führen, was es den Polypeptiden ermöglicht Unterstrukturen auszubilden und Disulfidbrücken zu knüpfen. Die löslichen Proteine im Überstand zeigten jedoch eine ausreichende Aktivität, so dass auf eine weitere Optimierung der Expression, um einen höheren löslichen Proteinanteil bei der Überproduktion zu erhalten, verzichtet werden konnte.

Neben der Klonierung in das pET-System in dem die klonierten Gene wie oben beschrieben unter der Kontrolle eines T7-Promotors stehen, wurden die Gene im Rahmen dieser Arbeit auch in Vektoren, die den arabinose-induzierbaren Promotor P<sub>BAD</sub> besitzen, kloniert. Dies geschah aufgrund der Feststellung, dass nur frisch transformierte Expressionsstämme von *E. coli* BL21(DE3) in der Lage waren die rekombinanten Proteine überzuexprimieren. Eine

Lagerung der Expressionsstämme in Form von Dauerkulturen, sowohl bei -20 °C als auch bei -80 °C war nicht möglich, da danach die rekombinanten Proteine nicht mehr überproduziert werden konnten. Eine eindeutige Erklärungen für dieses Phänomen konnte allerdings nicht gefunden werden. Die Plasmide wurden daher in *E. coli* DH5 $\alpha$  vermehrt und vor jeder Überproduktion frisch in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert.

Aus diesem Grund sollte ein Expressionssystem Verwendung finden, dass zum einen die Gene weniger stark überexprimiert und zum anderen eine gezielte Modulation der Proteinüberproduktion, je nach Induktorkonzentration, erlaubt. Deshalb wurde ein arabinose-induzierbares Vektorsystem in dem die zu exprimierenden Gene unter der Kontrolle des arabinose-induzierbaren Promotors P<sub>BAD</sub> (GUZMAN et al., 1992; GUZMAN et al., 1995; SIEGELE & HU, 1997) stehen, ausgewählt. Da aber auch hier das gleiche Phänomen, wie zuvor bei den pET-Vektoren beschrieben, auftrat und zum anderen die Expression wesentlich schwächer als im pET-System war (Test auf vorhandene oder nicht vorhandene Enzymaktivität im Rohextrakt), wurde auf eine weitere Verwendung der arabinose-induzierbaren Konstrukte verzichtet.

Waren die publizierten Arbeiten zur GDP-Fucose Biosynthese bis Anfang der neunziger Jahre ausschließlich auf die Isolierung von Enzymen aus natürlichen Quellen beschränkt (LIAO & BARBER, 1972; BROCHAT et al, 1985; CHANG et al., 1988; YAMAMOTO et al., 1993), führten die in den letzten Jahren erzielten Fortschritte in der Klonierung und die mittlerweile erkannte immense biologische Bedeutung der L-Fucose in pro- und eukaryontischen Glykokonjugatstrukturen dazu, dass ein gesteigertes wissenschaftliches Interesse an der Biosynthese dieses wichtigen Nukleotidzuckers und an der Klonierung und Expression der Gene des langen Biosyntheseweges bestand (**vgl. auch Kapitel 1.7.4**). In der folgenden **Tabelle 5** sind einige in der Zwischenzeit publizierten Arbeiten zur Klonierung und Expression der an der GDP-Fucose Biosynthese beteiligten Gene, sowie der dabei verwendeten Expressionssysteme aufgelistet. Neben der Klonierung von Genen aus Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*) und Mensch standen die Gene aus *Escherichia coli* K-12 im Mittelpunkt des Interesses. Dies liegt sicher unter anderem darin begründet, dass die DNA-Sequenz des *wca*-Gencluster aus *E. coli* K-12, das die an der GDP-Fucose Biosynthese beteiligten Gene enthält, als erstes sequenziert und publiziert worden ist (STEVENSON et al., 1996).

**Tabelle 5:** Publierte Arbeiten zur Klonierung und Expression von Genen die an der „*de novo*“ Biosynthese der GDP-Fucose beteiligt sind. **Fett** hervorgehoben sind dabei jeweils die Gene auf denen der Schwerpunkt der jeweiligen Arbeiten lag.

Gen	Expressionssystem und Bemerkungen	Referenz
<b><i>gmd</i> &amp; <i>wcaG</i></b>	Klonierung beider Gene (chromosomale DNA aus <i>E. coli</i> K-12) in Vektoren der pET-Reihe unter die Kontrolle eines T7-Promotors; die Induktion erfolgt durch Zugabe von IPTG; Überproduktion als native Proteine und als Fusionsproteine mit N-terminalem His-Tag in <i>E. coli</i> BL21(DE3).	„diese Arbeit“
<b><i>gmd</i> &amp; <i>wcaG</i></b>	Klonierung beider Gene (chromosomale DNA aus <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ ) in Vektoren der pET-Reihe unter die Kontrolle eines T7-Promotors; die Induktion erfolgt durch Zugabe von IPTG; Überproduktion als native Proteine und als Fusionsproteine mit N-terminalem His-Tag in <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS.	ALBERMANN et al., 2000
<b><i>gmd</i> &amp; <i>wcaG</i></b>	Klonierung beider Gene (chromosomale DNA aus <i>E. coli</i> W3110) in Vektoren die den Tryptophan Promotor bzw. den P <sub>L</sub> -Promotor des Phagen Lambda enthalten; die Induktion erfolgt hier durch einen Temperaturshift von 30 °C → 40 °C); Überproduktion als native Proteine in <i>E. coli</i> NM522. <b>Besonderheit:</b> Die rekombinanten <i>E. coli</i> -Zellen werden im Rahmen dieser Arbeit in einer die Ganzzell-Biotransformation eingesetzt ( <b>vgl. auch Kapitel 1.7.2 &amp; 1.7.4</b> ).	KOIZUMI et al., 2000
<b><i>gmd</i></b>	Klonierung des Gens (chromosomale DNA aus <i>E. coli</i> INV1) in den Vektor pGEX-4T-2; die Induktion erfolgt durch Zugabe von IPTG; Überproduktion als GST-(Glutathione-S-Transferase) Fusionsprotein (GST-GMD) in <i>E. coli</i> ; Spaltstelle für Thrombin im N-terminal gelegenen Fusionsprotein vorhanden, so dass nach Spaltung auch das native Protein (GMD) erhalten werden kann.	STURLA et al., 1997
<b><i>wcaG</i></b>	Klonierung des Gens (chromosomale DNA aus <i>E. coli</i> K-12) in den Vektor pGEX-6P-1; die Induktion erfolgt durch Zugabe von IPTG; Überproduktion als GST-Fusionsprotein (GST-WcaG) in <i>E. coli</i> ; Spaltstelle für Thrombin im N-terminal gelegenen Fusionsprotein vorhanden, so dass nach Spaltung auch das native Protein (WcaG) erhalten werden kann.	TONETTI et al., 1998[a]

<b><i>gmd</i></b>	Klonierung von drei aus der cDNA Sequenz abgeleiteten Formen der humanen GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (L-, M- und S-GMD) in den Vektor pGEX-6P-1; die Induktion erfolgt durch Zugabe von IPTG; Überproduktion als GST-Fusionsprotein in <i>E. coli</i> K803; Spaltstelle für Thrombin im N-terminal gelegenen Fusionsprotein vorhanden, so dass nach Spaltung auch die nativen Proteine erhalten werden können.	BISSO et al., 1999
<b><i>gmd &amp; wcaG</i></b>	Klonierung der humanen GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (hGMD) und GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose 3,5-epimerase 4-reduktase (hFX) in den Vektor pRSETB; die Induktion erfolgt durch Zugabe von IPTG; Überproduktion als Fusionsprotein (N-Terminus) in <i>E. coli</i> BL21 (DE3).  Klonierung der beiden Gene aus <i>E. coli</i> K-12 in den Vektor pSE380; die Induktion erfolgt durch Zugabe von IPTG; Überproduktion als native Proteine in <i>E. coli</i> GI934.	SULLIVAN et al., 1998
<b><i>gmd</i></b>	Klonierung des Gens (chromosomale DNA aus <i>E. coli</i> K-12) in den Vektor pGEM-T unter die Kontrolle eines T7-Promotors; die Expression erfolgt in <i>E. coli</i> SØ874 (Mutante die im O-Antigen- und CA Gencluster deletiert ist) nach Cotransformation mit einem zweiten Plasmid, welches das Gen das für die T7-RNA-Polymerase kodiert enthält.	STEVENSON et al., 1996
<b><i>wcaG &amp; gmd</i></b>	Klonierung beider Gene (chromosomale DNA aus <i>E. coli</i> K-12) in den Vektor pGEM-T unter die Kontrolle eines T7-Promotors; die Expression erfolgt in <i>E. coli</i> SØ874 (Mutante die im O-Antigen- und CA Gencluster deletiert ist) nach Cotransformation mit einem zweiten Plasmid, welches das Gen das für die T7-RNA-Polymerase kodiert enthält.	ANDRIANOPOULOS et al., 1998
<b><i>gmd</i></b>	Klonierung und Expression der humanen GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (hGMD) zur Wiederherstellung der GDP-Fucose-Biosynthese in der mutierten CHO-Zelllinie Lec 13.	OHYAMA et al., 1998
<b><i>gmd &amp; wcaG</i></b>	Klonierung der beiden Gene (chromosomale DNA aus <i>E. coli</i> K-12) in den pESC-leu-Vektor unter die Kontrolle eines P <sub>GAL1</sub> bzw. P <sub>GAL10</sub> -Promotors; nach Transformation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> erfolgt die Induktion der Proteinüberproduktion durch Kultivierung in galactosehaltigem SG-Medium.	MATTILA et al., 2000
<b><i>MUR1</i> ≅ <i>gmd</i></b>	Klonierung einer Isoform der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase aus <i>Arabidopsis thaliana</i> in die Vektoren pBluescript (KS+) und pET11d, die Überproduktion erfolgt als natives Protein in <i>E. coli</i> BL21(DE3) im Vektor pET11d nach Induktion durch Zugabe von IPTG.	BONIN et al., 1997

*MUR1*  $\cong$  Klonierung eines bifunktionellen Enzyms (Epimerase- und Reduktase-Aktivität) aus *Arabidopsis thaliana*, die 2000  
*gmd* & *GER1*  $\cong$  Überproduktion beider Proteine (MUR1 und GER1) erfolgt  
*wcaG* im Vektor pET28b nach Induktion durch Zugabe von IPTG als Fusionsprotein mit C-terminalem His-Tag in *E. coli* BL21(DE3).

---

Neben den Genen *gmd* und *wcaG*, die für Enzyme der GDP-Fucose Biosynthese kodieren, wurden in dieser Arbeit zusätzlich noch die Gene *wcaH* und *wcaI* aus dem *wca*-Gencluster von *E. coli* K-12 kloniert.

Wie bereits in **Kapitel 1.7.4** erwähnt besteht der zweite Teil des *de novo* Biosyntheseweges der GDP-Fucose aus einer Epimerisierung gefolgt von einer NADPH-abhängigen Reduktion. Ursprünglich wurde angenommen, dass vergleichbar dem dTDP-Rhamnose (dTDP-Rha) Biosyntheseweg (MELO & GLASER, 1968; JIANG et al., 1991; GRANINGER et al., 1999) zwei verschiedene Enzyme an diesen Reaktionsschritten beteiligt sind. Daher wurde für das Gen *wcaH* anfangs noch eine mögliche Beteiligung - Epimerase- oder Reduktase-Aktivität - an der GDP-Fucose Biosynthese angenommen. Wie sich jedoch im Laufe dieser Arbeit herausstellte (**siehe Kapitel 3.7**) und zwischenzeitlich auch von anderen Arbeitsgruppen (ANDRIANOPOULOS et al., 1998; SULLIVAN et al., 1998) gezeigt wurde, sind für die Synthese der GDP-Fucose ausgehend von GDP-Mannose nur zwei Enzyme notwendig. Zum einen die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) und zum anderen das bifunktionelle Enzym GDP-Fucose Synthetase, das auch als GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose 3,5-epimerase 4-reduktase (Fcl/WcaG) bezeichnet wird und sowohl die Epimerisierung als auch die anschließende Reduktion katalysiert. Wie eine durchgeführte Literaturrecherche ergab, war schon bereits 1995 von FRICK et al. eine katalytische Aktivität für das WcaH-Protein publiziert worden. Dabei wurde das *wcaH*- oder *yefC*-Gen aus *Escherichia coli* in den Vektor pET11b unter die Kontrolle eines T7-Promotors kloniert, exprimiert und anschließend nahezu bis zur Homogenität aufgereinigt. Die biochemische Charakterisierung ergab, dass es sich beim WcaH-Protein um eine GDP-Mannose Mannosyl-Hydrolase handelt. WcaH katalysiert die Hydrolyse von GDP-Mannose und GDP-Glucose zu GDP und der entsprechenden Hexose. Für die GDP-Mannose konnte dabei ein  $K_m$ -Wert von 0,3 mM und ein  $v_{max}$ -Wert von  $1,6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  bestimmt werden. Desweiteren konnte für das Enzym ein pH-Optimum im Bereich zwischen 9,0 und 9,5, sowie eine Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Gegenwart zweiwertiger Kationen ( $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$ ) festgestellt werden. Eine Überproduktion

des Proteins WcaH im pET-System wurde in dieser Arbeit zwar ebenfalls durchgeführt (**siehe Abbildung 30**) jedoch nicht weiter verfolgt, da dieses Enzym keine Rolle in der Biosynthese der GDP-Fucose zu spielen scheint.

Eine biochemische Charakterisierung des Gens *wcaI* steht bis heute noch aus. Als mögliche katalytische Funktion wird eine Glycosyltransferase postuliert (**vgl. auch Abbildung 10**). Aufgrund seiner Nähe zu den Genen des GDP-Fucose Biosyntheseweges und der Tatsache, dass Biosynthesegene häufig geclustert vorliegen, könnte es sich bei dem Protein WcaI möglicherweise um eine Fucosyltransferase handeln. Die Klonierung von *wcaI* in die Vektoren pET11a bzw. pET16b hat nach den durchgeführten Restriktionsanalysen zwar funktioniert, eine Überproduktion konnte aber mittels SDS-PAGE Analyse nicht nachgewiesen werden.

In der vorangegangenen Arbeit von RITTER zur enzymatischen Synthese von GDP- $\alpha$ -D-Mannose konnten bereits die Gene, die für die Enzyme Phosphomannomutase und GDP-Mannose Pyrophosphorylase kodieren, aus *Salmonella enterica*, Gruppe B kloniert und einzeln in den Expressionsstämmen *Escherichia coli* BL21(DE3) bzw. BL21(DE3)pLysS überexprimiert werden (RITTER, 1995; ELLING et al, 1996; RITTER et al., 1996; ELLING, 1999). Die vorhandenen rekombinanten Enzymquellen wurden reaktiviert, wobei beide Enzyme, im Gegensatz zu der Arbeit von RITTER, in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert wurden.

Eine Überproduktion der rekombinanten Proteine in einem größeren Maßstab (Fermentationen im Maßstab von 10 – 15 Liter), sowie die anschließende Reinigung der rekombinanten Proteine erfolgte mit den unten aufgeführten Konstrukten:

<b>pERJ-1</b>	pT7-6/ <i>rfbM</i>	GDP-Mannosepyrophosphorylase ( <b>GMP</b> )
<b>pERJ-2</b>	pT7-6/ <i>rfbK</i>	Phosphomannomutase ( <b>PMM</b> )
<b>pSWJ-3</b>	pET17b/ <i>gmd</i>	GDP-Mannose-4,6-Dehydratase ( <b>GMD</b> )
<b>Konstrukte mit N-terminalem His-Tag:</b>		
<b>pSWJ-2<sup>18</sup></b>	pET16b/ <i>gmd</i>	GDP-Mannose-4,6-Dehydratase ( <b>His-GMD</b> )
<b>pSWJ-5</b>	pET16b/ <i>wcaG</i>	GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose 3,5-epimerase 4-reduktase / Fucose Synthetase ( <b>His-Fcl / His- WcaG</b> )

---

<sup>18</sup> Im Vergleich zu den anderen aufgeführten Konstrukten erfolgte hier die Expression nur im Schüttelkolbenmaßstab (**vgl. Abschnitt 2.4.2**)

Durch die Klonierung sämtlicher Gene, die am langen Biosyntheseweg der GDP-Fucose beteiligt sind, sowie ihre heterologe/homologe Expression in *Escherichia coli* BL21(DE3) konnte ein Zugang für die Bereitstellung von Enzymmengen geschaffen werden, die eine zukünftige Verwendung dieser rekombinanten Enzyme in präparativen enzymatischen Synthesen ermöglichen.

In den nun folgenden Abschnitten dieser Arbeit soll ein Überblick über die Bereitstellung und partielle Aufreinigung der Enzyme, sowie deren Charakterisierung gegeben werden.

### **3.2 Produktion und partielle Reinigung der rekombinanten Phosphomannomutase (RfbK, ManB) aus *Escherichia coli* BL21(DE3)**

Die Phosphomannomutase konnte erstmals aus Hefe isoliert und von der Phosphoglucosomutase, die Glucose-6-phosphat zu Glucose-1-phosphat isomerisiert, abgegrenzt werden (GLASER et al., 1959). Weiterhin wurde das Enzym im Rahmen der Aufklärung der Biosynthese von Alginat und Lipopolysacchariden bei *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben (GOLDBERG et al., 1993; YE et al., 1994). Medizinisches Interesse erlangt die Phosphomannomutase durch eine humane Erbkrankheit, dem CDG1a-Syndrom (Congenital Disorders of Glycosylation). Bei den betroffenen Patienten wurde eine fehlende Phosphomannomutase-Aktivität in Fibroblasten, Leber und Leukocyten festgestellt, die zu einer Unterbrechung des Stoffwechsels von Glucose zu Mannose-1-phosphat und GDP-Mannose bzw. Dol-P-Man führt und somit zu einer defekten *N*-Glycosylierung von Glycoproteinen. Alle weiteren am Stoffwechselweg beteiligten Enzyme weisen eine normale Aktivität auf, so dass das Fehlen der Phosphomannomutase als ursächlich für diese Krankheit angesehen werden kann (MATTHIJS et al., 1997; KÖRNER & VON FIGURA, 2001).

#### **3.2.1 Fermentation von *Escherichia coli* BL21(DE3) pERJ-2**

Die Fermentation des *E. coli* BL21(DE3)-Stammes mit der rekombinanten Phosphomannomutase wurde im Maßstab von 15 L mit Temperatur- und pH-Regelung durchgeführt. Alle fermentationsrelevanten Parameter wie pH-Wert, Temperatur, Zuluft, Drehzahl und Sauerstoffpartialdruck wurden online gemessen und mit Hilfe des Meßdatenerfassungsprogrammes Iris 1.0 (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) aufgezeichnet und ausgewertet.

Nach Animpfen des Fermenters mit einer Vorkultur, die über Nacht aus einem tiefgefrorenen Glycerinstock (-80 °C) angezogen worden war, erreichte der rekombinante *E. coli*-Stamm nach einer ca. dreistündigen lag-Phase ein exponentielles Wachstum. Nach einer Fermentationsdauer von etwa vier Stunden erfolgte die Induktion der Proteinüberproduktion durch Zugabe von 0,4 mM IPTG zum Kulturmedium während der exponentiellen Wachstumsphase des rekombinanten *E. coli* BL21(DE3)-Stammes. Zwei bis drei Stunden nach der Induktion, beim Übergang der Wachstumskurve in eine stationäre Phase (**vgl. auch Abbildung 49**), erfolgte die Ernte der Zellen durch Abkühlen der Kulturbrühe. Die Aufreinigung des Enzyms wurde durch das Abtrennen der Zellen vom Medium mittels Zentrifugation eingeleitet.

Die Fermentation der rekombinanten Phosphomannomutase (RfbK/ManB) im 15 Liter Maßstab ergab eine Ausbeute von 158 g Zellen (Feuchtgewicht) mit einer volumetrischen Aktivität von 726 U/L<sub>Medium</sub> bzw. 69 U/g Zellfeuchtmasse, was einer Gesamtaktivität von 10900 U entspricht.

Ebenso wie die im folgenden beschriebenen Fermentationen der anderen rekombinanten *E. coli* BL21(DE3)-Stämme (**vgl. Kapitel 3.3.1; 3.4.1.1 und 3.5.2**) enthält die Fermentation der rekombinanten Phosphomannomutase noch ein beträchtliches Optimierungspotential. Mögliche Ansatzpunkte einer Optimierung könnten dabei der Induktionszeitpunkt, die Induktorkonzentration, das Dosierprofil des Induktors (fed-batch) und die Induktionslänge darstellen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden diese Ansatzpunkte jedoch nicht weiter verfolgt.

### 3.2.2 Zellaufschluss

Da das überproduzierte Enzym intrazellulär vorliegt, wurde zunächst eine 30 %-ige Zellsuspension (w/w) hergestellt und anschließend die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Nach dem Abtrennen der Zelltrümmer vom proteinhaltigen Überstand wurde das Volumen, der Proteingehalt und die Aktivität des Enzyms im Rohextrakt bestimmt. Aus etwa 30 g Zellmasse (Feuchtgewicht) konnten 106 ml Rohextrakt mit einem Gesamtproteingehalt von 1400 mg und einer Gesamtaktivität von 2199 U gewonnen werden. Im Rohextrakt wurde dabei eine spezifische Aktivität von 1,57 U/mg bzw. eine volumetrische Aktivität von  $A_v = 20,7$  U/ml detektiert. Nach Aufschluss der Zellen erfolgte die partielle Aufreinigung der PMM mittels Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose FF.

### 3.2.2.1 Anionenaustauscher Q-Sepharose FF

Nach dem Anlegen eines Stufengradienten – 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 300 mM KCl – konnte die Phosphomannomutase in einem einzigen Peak von der Säule eluiert werden. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und anschließend mittels Ultrafiltration über eine YM10 Membran umgepuffert und aufkonzentriert. Nach der Ultrafiltration wurde von einem Teil der Enzympräparation eine Suspension in 3,2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hergestellt, während der andere Teil versuchsweise lyophilisiert wurde. In beiden Fällen schien das Enzym ohne merklichen Aktivitätsverlust über mehrere Wochen bei 4 °C bzw. –20 °C stabil.

Insgesamt konnte eine Ausbeute von 96 % (2119 U) bei einem Reinigungsfaktor von etwa 1,2 nach Q-Sepharose FF bzw. 75 % (1647 U) bei einem Reinigungsfaktor von 1,33 nach Ultrafiltration erzielt werden.

**Tabelle 6:** Partielle Aufreinigung der Phosphomannomutase (PMM, RfbK, ManB) aus 30 g Zellfeuchtmasse.

	Volumen (ml)	Gesamt- protein (mg)	Gesamt- aktivität (U)	spezifische Aktivität (U/mg)	Faktor (-)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	106	1400	2199	1,57	1,00	100
Q-Sepharose	180	1075	2119	1,97	1,26	96
UF (YM10)	70	784	1647	2,10	1,33	75

Die Aufreinigung der Phosphomannomutase bereitet einige Probleme, da das Enzym im verdünnten Zustand auf der Chromatographiesäule bei RT eine geringe Stabilität aufzuweisen scheint. In ersten Aufreinigungsversuchen (Ergebnisse nicht aufgeführt) konnten Ausbeuteverluste (Aktivitätsverluste) von über 50 % während des Chromatographieschrittes beobachtet werden, was sich auch mit den Ergebnissen von FEY (1996) deckt.

Durch die Veränderung einiger Aufreinigungsparameter konnte dieses Problem jedoch gelöst werden, was schließlich zu einer Ausbeutesteigerung auf 96 % nach der Anionenaustauschchromatographie führte. Im Gegensatz zu der Arbeit von RITTER (1995) wurde die

Chromatographie nicht wie bisher bei Raumtemperatur, sondern im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt. Durch das Spülen der Säule nach Probenaufgabe (100 mM KCl; 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM MgCl<sub>2</sub>) und die Verwendung eines Stufengradienten (300 mM KCl; 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM MgCl<sub>2</sub>) anstelle des bisherigen linearen Gradienten (0 – 600 mM KCl), gelang es die Phosphomannomutase in einem einzigen Peak von der Säule zu eluieren. Zusätzlich wurde auch durch die Verwendung einer höheren Flußrate (20 ml/min) die Verweildauer des Enzyms auf der Chromatographiesäule verkürzt. Die auf die Anionenaustauschchromatographie folgende Ultrafiltration des Eluats führt jedoch weiterhin zu einem Verlust des Enzyms und bietet daher sicher noch einen Ansatzpunkt für Optimierungen. Weitere Reinigungsschritte könnten sich anschließen. Allerdings ist eine partielle Reinigung der Phosphomannomutase für den späteren Einsatz des Enzyms in einer präparativen Synthese ausreichend.

Die hier durchgeführte Maßstabsvergrößerung vom Schüttelkolben in der Arbeit von RITTER (1995) auf einen Fermenter in dieser Arbeit ergab eine Steigerung der Biomassekonzentration von 3 g/l auf 11 g/l und der volumenspezifischen Aktivität von 47 U/L auf 726 U/L im Medium. Gleichzeitig erhöhte sich die spezifische Aktivität im Rohextrakt von 0,11 U/mg auf 1,57 U/mg. Diese Steigerung liegt unter anderem darin begründet, dass sich im Fermenter aufgrund des besseren Sauerstoffeintrags und des damit verstärkten Wachstums bessere Ergebnisse erzielen lassen. Weiterhin konnte eine *N*-terminale Sequenzanalyse der rekombinanten Phosphomannomutase (**siehe Kapitel 3.2.3**) durchgeführt werden.

### **3.2.3 *N*-terminale Sequenzanalyse der Phosphomannomutase**

Zur *N*-terminalen Sequenzanalyse wurde ein Aliquot des Zellaufschlusses und des partiell gereinigten Proteins über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und das Gel auf eine PVDF-Membran geblottet. In der anschließenden Sequenzierung konnten die ersten 20 Aminosäuren des *N*-Terminus eindeutig bestimmt werden (ab Aminosäure 21 Angaben nur unter Vorbehalt), die im folgenden wiedergegeben sind:

**Met-Asn-Val-Val-Asn-Asn-Ser-Arg-Asp-Val-Ile-Tyr-Ser-Ser-Gly-Ile-Val-Phe-Gly-Thr-  
(Leu)/(Ser)-(Gly)/(Arg)-Ala-(Arg)/(Trp)-(Gly)-(Leu)-(Val)-(Lys)-(Asp)-(Phe)**

Auf Grund der erhaltenen Sequenzdaten konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem klonierten und überproduzierten Protein eindeutig um die Phosphomannomutase aus

*Salmonella enterica* LT2 handelt. Die ermittelte N-terminale Aminosäuresequenz stimmt mit der aus der DNA-Sequenz (JIANG et al., 1996) abgeleiteten Aminosäuresequenz überein.

### 3.2.4 Nachweis einer möglichen Phosphoglucomutase Aktivität

In verschiedenen Publikationen wird über eine Kopplung der Phosphomannomutase-Aktivität (PMM) mit einer Phosphoglucomutase-Aktivität (PGM) berichtet (YE et al., 1994; DWIVEDI et al., 1996; OESTERHELT et al., 1997; POPOVA et al., 1998; REGNI et al., 2000). Durch Abänderung des Phosphomannomutase-Aktivitätstests (vgl. **Kapitel 2.13.3.1**) konnte im Rohextrakt des PMM-überproduzierenden *E. coli* BL21(DE3)-Stammes neben einer Phosphomannomutase-Aktivität von 20,7 U/ml (spez. Aktivität 1,57 U/mg) auch eine Phosphoglucomutase-Aktivität von etwa 27 U/ml (spez. Aktivität 2,04 U/mg) nachgewiesen werden. Um jedoch den endgültigen Beweis führen zu können, dass es sich bei der Phosphomannomutase aus *Salmonella enterica* LT2 ebenfalls um ein bifunktionelles Enzym handelt, müsste das rekombinante Enzym nahezu bis zur Homogenität aufgereinigt werden. Dies wird jedoch durch die bereits beschriebene Instabilität des Enzyms während des Chromatographieschrittes erschwert. Eine mögliche Alternative stellt eine His-tag Klonierung mit einem entsprechenden Expressionsplasmid, wie z. B. dem Vektor pET16b (vgl. **Kapitel 2.2.2; Tabelle 2**) dar, der eine nahezu homogene Aufreinigung von Proteinen in einem einzigen Schritt über Ni-NT-Agarose möglich macht.

Die festgestellte Bifunktionalität der PMM aus *Salmonella enterica* LT2 stellt sicher noch einen näher zu untersuchenden Aspekt, im Hinblick auf seine spätere Verwendung im Rahmen einer präparativen Synthese, dar.

### 3.3 Produktion und partielle Reinigung der rekombinanten GDP- $\alpha$ -D-Mannose-Pyrophosphorylase (RfbM, ManC) aus *Escherichia coli* BL21(DE3)

Seit der ersten Isolierung und Beschreibung der GDP-ManPP aus Hefe (MUNCH-PETERSEN, 1956; MUNCH-PETERSEN, 1962) ist das Enzym in der Zwischenzeit aus verschiedenen natürlichen Quellen isoliert worden (PREISS & WOOD, 1964; SMOOT & SERIF, 1985; IDEGUCHI et al., 1993; SZUMILO et al., 1993).

Enzympräparationen aus natürlichen Quellen sind jedoch für einen Einsatz in der präparativen Synthese ungeeignet, da sie nur eine geringe Aktivität aufweisen und die Enzyme deutlichen Schwankungen unterliegen, auch wenn es sich dabei um Zellen des gleichen Typs handelt.

Durch die Klonierung des Gens *rfbM* aus *S. enterica*, Gruppe B und seine heterologe Expression in *E. coli* BL21(DE3) pLysS konnte von RITTER das Enzym mit einer spezifischen Aktivität von 300 – 600 mU/mg gewonnen werden (RITTER, 1995; ELLING et al., 1996). Im Gegensatz zur Arbeit von RITTER wurde das frisch isolierte und anschließend verifizierte Expressionsplasmid (s. **Kapitel 3.1.3**) in *E. coli* BL21(DE3) ohne pLysS transformiert. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass es bei der Verwendung eines pLysS tragenden *E. coli* BL21(DE3)-Stammes sehr leicht zur Lyse der Zellen kommen kann, was die Handhabung größerer Zellmengen deutlich erschwert.

### 3.3.1 Fermentation von *Escherichia coli* BL21(DE3) pERJ-1

Die Fermentation von *Escherichia coli* BL21(DE3) pERJ-1 und die partielle Aufreinigung der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-Pyrophosphorylase wurden in Analogie zur Phosphomannomutase durchgeführt (s. **Kapitel 3.2.**). Die Fermentation im 15 Liter Maßstab ergab eine Ausbeute von etwa 142 g Zellen (Feuchtgewicht) mit einer volumenspezifischen Aktivität von 713 U/L<sub>Medium</sub>, was einer Gesamtaktivität von 10700 U (75 U/g Zellfeuchtmasse) entspricht. Im Rohextrakt konnte für die GDP-Man PP eine spezifische Aktivität von 1,44 U/mg Protein ( $A_V$ : 23 U/ml) detektiert werden. Zellseparation, Zellaufschluss und Herstellung des Rohextraktes erfolgten wie unter **Kapitel 2.7.1/2.7.2** beschrieben.

#### 3.3.1.1 Zellaufschluss

Nach der Herstellung einer 30 %-igen Zellsuspension (w/w), Aufschluss der Zellen mittels Ultraschall und Sedimentation der Zelltrümmer durch Zenrifugation wurde das Volumen, der Proteingehalt und die Aktivität des Enzyms im Rohextrakt bestimmt. Aus etwa 15 g Zellmasse (Feuchtgewicht) konnten 50 ml Rohextrakt mit einem Gesamtproteingehalt von 785 mg und einer Gesamtaktivität von 1130 U erhalten werden. Der zellfreie Überstand wurde anschließend auf einen Anionenaustauscher (Q-Sepharose FF) gegeben.

### 3.3.1.2 Anionenaustauscher Q-Sepharose FF

Nach Aufgabe der Probe auf den Anionenaustauscher wurde solange mit Startpuffer - 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 mit 100 mM KCl - gespült bis kein Protein mehr von der Säule gewaschen werden konnte. Anschließend wurde das Enzym durch das Anlegen eines Stufengradienten mit 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 mit 400 mM KCl in einem einzigen Peak eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden auf GDP- $\alpha$ -D-Mannose-Pyrophosphorylase Aktivität geprüft und vereinigt.

Das Volumen des Elutionspeaks betrug 200 ml mit einer spezifischen Aktivität von 2,89 U/mg. Dies entsprach einem Aufreinigungsfaktor von etwa 2,0 bei einer Ausbeute von 84 %. Das Eluat wurde mittels Ultrafiltration über eine YM 10-Membran („cut off“: 10 kDa) aufkonzentriert. Zur Stabilisierung wurde die GDP-Mann PP aufgrund der von FEY beschriebenen inhibierenden Wirkung von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $K_i = 0,85 \text{ mM} \pm 0,08 \text{ mM}$ ) mit 25 % (v/v) Glycerin versetzt (FEY et al., 1997; FEY, 1998).

**Tabelle 7:** Partielle Aufreinigung der GDP- $\alpha$ -D-Mannose Pyrophosphorylase (RfbM, ManC) aus 15 g Zellfeuchtmasse.

	Volumen (ml)	Gesamt- protein (mg)	Gesamt- aktivität (U)	spezifische Aktivität (U/mg)	Faktor (-)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	50	785	1130	1,44	1,00	100
Q-Sepharose	200	330	952	2,89	2,00	84
UF (YM10)	18	221	693	3,14	2,10	61
Konzentrat mit 25 % Glycerin	24	216	854	3,96	2,75	76

Damit konnte das Enzym über mehrere Wochen bei 4 °C ohne merklichen Aktivitätsverlust gelagert werden. Glycerin scheint dabei auch noch einen positiven Effekt auf die Aktivität der GDP- $\alpha$ -D-Mannose Pyrophosphorylase zu haben. Durch die Zugabe von Glycerin zum Konzentrat konnte eine Zunahme der Aktivität beobachtet werden (**vgl. Tabelle 7**). Alternativ scheint auch eine Lagerung der Enzympräparation bei -20 °C nach Zugabe von 50 % Glycerin (v/v) über einen längeren Zeitraum möglich.

Für die aufkonzentrierte Enzymlösung konnte eine GDP-Man PP Aktivität von 35,6 U/ml bei einer spezifischen Aktivität von 3,96 U/mg Protein bestimmt werden. In der erhaltenen Enzympräparation konnten keine Phosphatase und Nukleotidzucker-hydrolysierende Aktivitäten mehr nachgewiesen werden. Durch einen einzigen chromatographischen Schritt ließ sich damit eine für präparative Synthesen geeignete Enzympräparation mit einem Aufreinigungsfaktor von 2,75 und einer Ausbeute von 76 % herstellen.

Eine Optimierung der GDP-Mannose-Pyrophosphorylase Aufreinigung war im Gegensatz zur Aufreinigung der Phosphomannomutase nicht notwendig. Der erzielte Aufreinigungsfaktor von 2,0 bei einer Ausbeute von 84 % nach Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose FF war in etwa vergleichbar mit den von RITTER (1995) erzielten Werten (Aufreinigungsfaktor von 2,2 mit einer Ausbeute von 85,2 % nach Q-Sepharose FF). Auch für die GDP-Mannose-Pyrophosphorylase zeigte sich, dass eine Maßstabsvergrößerung vom Schüttelkolben auf einen Fermenter neben einer Steigerung der Biomassekonzentration (2,5 g/l auf 11 g/l ) auch zu einer Steigerung der volumenspezifischen Aktivität (92 U/L auf 713 U/L) im Medium führt. Bei der spezifische Aktivität im Rohextrakt konnte eine Erhöhung von 0,37 U/mg auf 1,44 U/mg beobachtet werden.

Wie in der Arbeit von RITTER wurde auch mit der überexprimierten und partiell aufgereinigten GDP-Mannose-Pyrophosphorylase eine *N*-terminale Sequenzanalyse (**siehe Kapitel 3.3.2**) durchgeführt.

### **3.3.2 *N*-terminale Sequenzanalyse der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-Pyrophosphorylase**

Zur *N*-terminalen Sequenzanalyse wurde ein Aliquot des Zellaufschlusses und der angereinigten GDP-Mannose-Pyrophosphorylase über SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel auf eine PVDF-Membran geblottet. Durch die anschließende *N*-terminale Sequenzierung konnte die Reihenfolge der ersten 17 Aminosäuren des *N*-Terminus eindeutig bestimmt werden (ab Aminosäure 18 Angaben nur unter Vorbehalt):

**Ser-Phe-Leu-Pro-Val-Ile-Met-Ala-Gly-Gly-Thr-Gly-Ser-Arg-Leu-Trp-Pro-(Leu)-(Ser)-(Arg)-(Asp)/(Glu)/(Ala)-(Tyr)-(His)-(Pro)/(Lys)**

Die erhaltene *N*-terminale Aminosäuresequenz stimmt mit der aus der DNA-Sequenz von JIANG et al. (1996) abgeleiteten bekannten Aminosäuresequenz überein (vgl. **Kapitel 6.1.6**). Somit konnten die erhaltenen Sequenzdaten eindeutig der überproduzierten GDP- $\alpha$ -D-Mannose-Pyrophosphorylase aus *Salmonella enterica*, Gruppe B zugeordnet werden.

### **3.4 Produktion, partielle Reinigung und Charakterisierung der rekombinanten GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) aus *Escherichia coli* BL21(DE3)**

Die Experimente und Ergebnisse zur Charakterisierung der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase entstanden im Rahmen einer Zusammenarbeit mit Herrn Dipl. Chem. Christoph Hoh vom Institut für Biotechnologie II (Prof. Dr. Wandrey; Arbeitsgruppe A. Liese) im Forschungszentrum Jülich GmbH.

#### **3.4.1 Produktion und partielle Reinigung der rekombinanten GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) aus *Escherichia coli* BL21(DE3)**

Die GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase [EC 4.2.1.47; GMD], früher auch als GDP- $\alpha$ -D-Mannose-Oxidoreduktase bezeichnet, stellt das erste Enzym im *de novo* Biosyntheseweg der GDP- $\beta$ -L-Fucose dar. Es katalysiert die Oxidation von GDP-Mannose am C-4 Kohlenstoffatom gefolgt von einer Reduktion an Position C-6, was zur Bildung einer Methylgruppe führt. Als Reaktionsprodukt entsteht dabei das relativ instabile Zwischenprodukt GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose (vgl. **Abbildung 18**).

Seit der ersten Isolierung und Beschreibung der GMD aus *Aerobacter aerogenes* in den sechziger Jahren durch GINSBURG (GINSBURG, 1960; GINSBURG, 1961) konnte das Enzym in verschiedenen Reinheitsgraden neben Bakterien auch aus Säugern und Pflanzen isoliert werden (FOSTER & GINSBURG, 1961; ELBEIN & HEATH, 1965; LIAO & BARBER, 1972; BROCHAT et al., 1985; YAMAMOTO et al., 1993).

Die große biologische Bedeutung des Desoxyzuckers L-Fucose als Bestandteil von pro- und eukaryontischen Glykokonjugatstrukturen (vgl. auch Kapitel 1.7.4 & 3.1.5) führte in den letzten Jahren zu einem gesteigerten Interesse an der Biosynthese seiner aktivierten „Zwischenstufe“, der GDP-Fucose und den an seiner Synthese beteiligten Gene. So ist es nicht verwunderlich, dass mittlerweile eine wachsende Zahl von Arbeiten zur Klonierung und Expression der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) aus verschiedenen Quellen (Bakterien, Mensch und Pflanzen) erschienen sind (STEVENSON et al., 1996; BONIN et al., 1997; STURLA et al., 1997; SULLIVAN et al., 1998; BISSO et al., 1999; ALBERMANN et al., 2000; KOIZUMI et al., 2000).

Durch die Klonierung der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase aus *Escherichia coli* K-12 und ihre anschließende Expression in *Escherichia coli* BL21(DE3) in der vorliegenden Arbeit (vgl. Kapitel 3.1.1) konnte ein sicherer Zugang zu Enzymmengen geschaffen werden, die eine spätere präparative Anwendung und reaktionstechnische Untersuchung der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase erlauben.

### 3.4.1.1 Fermentation von *Escherichia coli* BL21(DE3) pSWJ-3 (pET17b/gmd)

Die Fermentation der rekombinanten GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) erfolgte analog zu den bisher beschriebenen Fermentationen. Im folgenden sollen deshalb die Ergebnisse nur kurz zusammengefaßt werden. Das native Enzym wurde in einem Maßstab von 20 Litern fermentiert und ergab eine Ausbeute von etwa 400 g Zellen (Zellfeuchtmasse) mit einer volumenspezifischen Aktivität von 140 U/L<sub>Medium</sub> (10,1 U/g Zellfeuchtmasse), was einer Gesamtaktivität von 2800 U entspricht.

### 3.4.1.2 Zellaufschluss

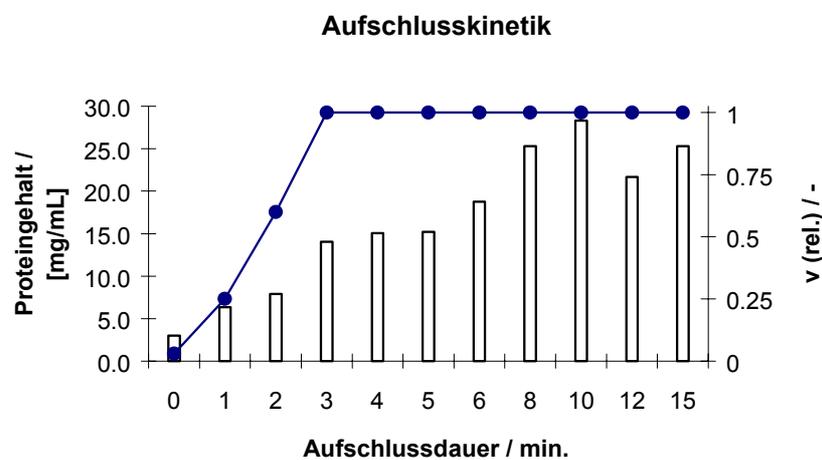
Bei den Vorversuchen zur Etablierung eines Enzymtests für die Bestimmung der Enzymaktivität im Rohextrakt zeigte sich, dass je nach Aufschlussbedingungen die Proteingehalte und damit zusammenhängend auch die resultierenden Enzymaktivitäten sehr stark variieren können. Ein erster Versuch beschäftigte sich deshalb damit eine Aufschlusskinetik - Bestimmung des Proteingehaltes und der „relativen Enzymaktivität“ in Abhängigkeit von der Beschalldauer - zu messen, um so die optimalen Bedingungen, für

einen Zellaufschluss der rekombinanten GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) herauszufinden.

Während des Ultraschallauschlusses wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben gezogen, der Proteingehalt bestimmt und anschließend eine Abschätzung der Enzymaktivität durchgeführt. Hierbei wurde ein Assay verwendet, der mit dem später unter **Kapitel 2.13.3.4** beschriebenen „Standardtest“ (1 mM GDP-Mannose, 0,1 mM NADP<sup>+</sup>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; T = 30 °C) zur Bestimmung der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase Aktivität identisch ist. Zum Vergleich der Aktivitäten wurden hier die Umsätze nach 5 min. Inkubationszeit herangezogen. Ein v(rel.) von 1 bedeutet dabei, dass eine vollständige Umsetzung des Substrats GDP-Mannose nach 5 min. stattgefunden hat.

Eine genaue Bestimmung der Enzymaktivität war zu diesem Zeitpunkt der Arbeit noch nicht möglich, da das später unter **Kapitel 3.4.1.3** beschriebene Assaysystem („Standardtest“ und „optimierter“ Ansatz) zum Nachweis der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase-Aktivität noch nicht etabliert war.

---



---

**Abbildung 31:** Aufschlusskinetik der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD).

Wie der **Abbildung 31** zu entnehmen ist nimmt, der Proteingehalt im Rohextrakt erwartungsgemäß mit zunehmender Beschallungsdauer deutlich zu. Die „maximale

Enzymaktivität“ im Rohextrakt, das heißt die vollständige Umsetzung der GDP-Mannose zur GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose nach 5 min., kann aber bereits nach einer Aufschlussdauer von etwa 3 bis 4 Minuten beobachtet werden. Eine längere Beschallung der Zellen scheint nicht notwendig, da sie vielmehr sogar zu einer unerwünschten Abnahme der spezifischen Aktivität des Enzyms führt.

Für die weiteren Versuche wurde deshalb für die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) eine Aufschlussdauer von 4 min. gewählt. Die in diesem Versuch ermittelte optimale Aufschlussdauer von 4 min. wurde später auch für die GDP-Fucose-Synthetase (Fcl/WcaG) übernommen.

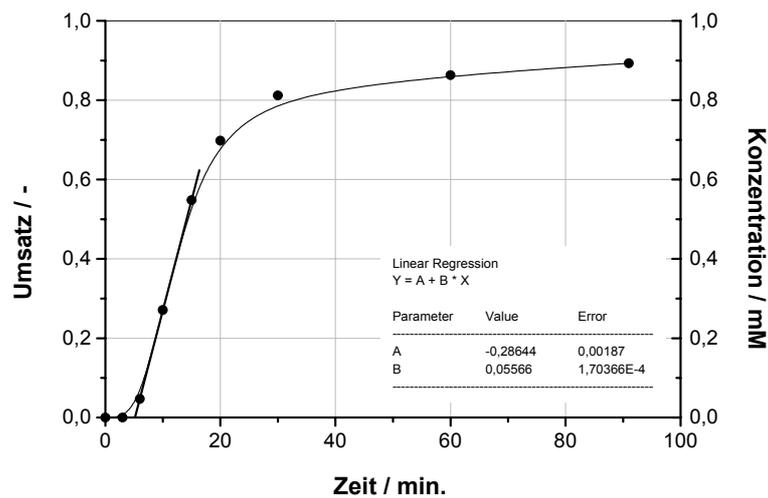
### **3.4.1.3 Entwicklung eines Enzymtests für die GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase**

Zur Quantifizierung der Enzymaktivität, sowie zur kinetischen und reaktionstechnischen Charakterisierung der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase, war es notwendig ein entsprechendes Testsystem zu etablieren. Als Analysemethoden kamen dabei die Kapillarelektrophorese (CE) und HPLC (siehe Kapitel 2.13.2/2.13.1) zum Einsatz.

Das in dieser Arbeit verwendete Assaysystem zum Nachweis der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase Aktivität wurde in Analogie zu bereits publizierten Enzymtests (LIAO & BARBER, 1972; BROCHAT et al., 1985; CHANG et al., 1985; YAMAMOTO et al., 1993) entwickelt.

Der unter **Kapitel 2.13.3.4** beschriebene „Standardtest“ (1 mM GDP-Mannose, 0,1 mM NADP<sup>+</sup>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; T = 30 °C), der auf die Verwendung von radioaktiv-markierter GDP-Mannose verzichtet, basiert auf einem Enzymassay, der zum Nachweis der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase aus *Klebsiella pneumoniae* ATCC 12658 verwendet wurde (YAMAMOTO et al., 1993). Durch die starke Überexpression der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase in *Escherichia coli* BL21(DE3) wurde davon ausgegangen, dass die vorhandene Enzymaktivität mit Hilfe geeigneter Analysemethoden (Kapillarelektrophorese (CE) bzw. HPLC) direkt verfolgt werden kann. Aufgrund eines fehlenden Eichstandards für die GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose wurde die Aktivität über die Abnahme der GDP-Mannose-Konzentration bestimmt.

Bereits erste Umsetzungsversuche machten deutlich, dass die Aktivitätsbestimmung für die GMD nicht einfach durch eine Endpunkt-Bestimmung vergleichbar der Aktivitätsbestimmung der GDP-Mannose Pyrophosphorylase (vgl. **Kapitel 2.13.3.3**) durchgeführt werden kann.



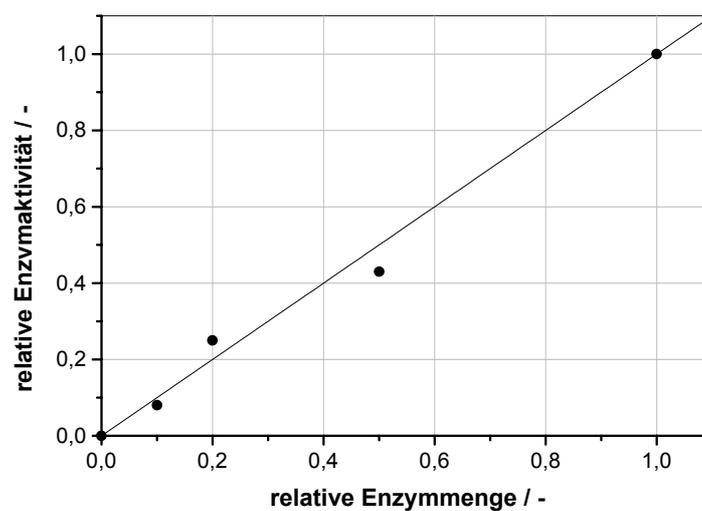
**Abbildung 32:** Umsatz-Zeit-Plot eines „Standardtests“ (1 mM GDP-Mannose, 0,1 mM NADP<sup>+</sup>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; T = 30 °C) für die GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase mit Rohextrakt aus *Escherichia coli* BL21(DE3) - pSWJ-3. Die Bestimmung des Umsatzes erfolgte mit Hilfe der CE-Analytik über die Abnahme der GDP-Mannose-Konzentration.

Wie aus der **Abbildung 32** zu entnehmen ist, zeigt der erhaltene Umsatz-Zeit-Verlauf des verwendeten „Standardtests“, dass nach einer anfänglichen lag-Phase der lineare Verlauf der Reaktion bzw. Umsetzung erst nach etwa 6 Minuten beginnt. Daher wurde im folgenden die Enzymaktivität über die Steigung im linearen Bereich der Reaktion ermittelt.

Schwierigkeiten bei der Aktivitätsbestimmung der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase ergaben sich anfangs auch durch die Instabilität des Zwischenproduktes GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose. Die Verbindung zerfällt sehr leicht zu GDP und dem freien Zucker, was beim Abstoppen der Testansätze durch 5-minütiges Abkochen bei 95 °C beobachtet werden konnte. Es zeigte sich allerdings, dass bereits durch 1-minütiges Abkochen des Testansatzes das Enzym vollständig desaktiviert werden konnte, ein Zerfall des Ketoproduktes aber wie oben beschrieben, nicht mehr beobachtet werden konnte.

Um die Eignung des verwendeten Enzymtests für die Aktivitätsbestimmung der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase beurteilen zu können, wurde in einem weiteren Versuch die Linearität der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit des verwendeten „Standardtests“ näher untersucht. Eingesetzt wurde eine Charge des partiell aufgereinigten Enzyms (**Kapitel 3.4.1.4**) in verschiedenen Verdünnungsstufen. Es wurde die relative Enzymaktivität bestimmt und gegen die relative eingesetzte Katalysatormenge aufgetragen (**Abbildung 33**).

---



---

**Abbildung 33:** Überprüfung der Linearität des verwendeten „Standardtests“ (1 mM GDP-Mannose, 0,1 mM NADP<sup>+</sup>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; T = 30 °C). Aufgetragen wurde die relative Enzymaktivität (1  $\cong$  1,4 U/ml) gegen die relative eingesetzte Katalysatormenge (1  $\cong$  0,28 mg/ml).

Wie der **Abbildung 33** zu entnehmen ist, verhält sich die relative Enzymaktivität (1  $\cong$  1,4 U/ml) in etwa proportional zu der relativen Enzymmenge. Innerhalb der verwendeten Katalysatormengen, in diesem Fall zwischen 0,28 mg/ml und 0,028 mg/ml bei Verwendung eines Probenvolumens von 50  $\mu$ l zu 1000  $\mu$ l Gesamtvolumen des Testansatzes, ist die Aktivitätsbestimmung linear. Der verwendete Enzymtest scheint damit geeignet für die Bestimmung der Aktivität der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase.

### 3.4.1.4 Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose FF

In ersten Versuchen konnte gezeigt werden, dass Nukleotidzucker-spaltende Nebenaktivitäten, sowie Phosphatase-Aktivitäten im Rohextrakt vorhanden sind. Um die Enzympräparationen der rekombinanten GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) für präparative Synthesen einsetzbar zu machen, müssen diese Nebenaktivitäten, die sich störend auf eine Synthese auswirken können, abgetrennt werden. Aus diesem Grund war es notwendig das Enzym nach dem Zellaufschluss zumindest partiell aufzureinigen.

Die partielle Aufreinigung des Enzyms erfolgte mittels Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose FF (Pharmacia, Freiburg, Deutschland). Nach der Probenaufgabe wurde die Säule solange mit Puffer - 50 mM MOPS, pH 7,0 mit 100 mM KCl - gespült bis kein Protein mehr von der Säule eluiert werden konnte. Anschließend wurde das Enzym mit einem linear aufsteigenden KCl-Gradienten von 100 bis 600 mM, in einem Konzentrationsbereich von 200 - 400 mM KCl eluiert und die aktiven Fraktionen vereinigt.

**Tabelle 8:** Partielle Aufreinigung der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD). Für die Bestimmung der Enzymaktivität wurde der unter **Kapitel 2.13.3.4** beschriebene „Standardtest“ (1 mM GDP-Mannose, 0,1 mM NADP<sup>+</sup>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; T = 30 °C) verwendet.

	Volumen (ml)	Gesamt- protein (mg)	Gesamt- aktivität (U)	spezifische Aktivität (mU/mg)	Faktor (-)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	29	554	61	110	1	100
Q-Sepharose <sup>a)</sup>	270	232	14	6	0.05	22
UF (YM10) Konzentrat (50 % Glycerin)	38	214	54	252	2.3	87

<sup>a)</sup>: Für den Q-Sepharose-Pool war eine genaue Aktivitätsbestimmung nicht möglich.

Nach der Ultrafiltration wurde der Enzympräparation 50 % Glycerin (v/v) zugesetzt und anschließend die Aktivität bestimmt.

Während der Aufreinigung konnte festgestellt werden, dass eine genaue Aktivitätsbestimmung der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) mit dem unter **Kapitel 2.13.3.4** beschriebenen „Standardtest“ im stark verdünnten Zustand bzw. bei hohem Salzgehalt nicht möglich ist. Diesen Sachverhalt macht auch die Aufreinigungstabelle für die GMD (**Tabelle 8**) deutlich. Im Q-Sepharose Pool konnte nach der Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose FF nur noch eine Gesamtaktivität von etwa 14 U wiedergefunden werden, was einer Gesamtausbeute von etwa 22 % und damit einem Aktivitätsverlust von 80 % während des Chromatographieschrittes entspricht. Nach der sich anschließenden Ultrafiltration (YM10, Amicon) und Zusatz von 50 % Glycerin (v/v) zur Enzympräparation konnte jedoch wieder eine Gesamtaktivität von 54 U, was einer Gesamtausbeute von 87 % entspricht, detektiert werden.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist vielleicht darin zu finden, dass der hier verwendete „Standardtest“ nicht geeignet für eine Aktivitätsbestimmung der GMD bei hohen Verdünnungen bzw. hohem Salzgehalt ist. Dies konnte später auch für den „optimierten“ Ansatz (1 mM GDP-Mannose, 0,1 mM NADP<sup>+</sup>, 0,1 mM NADPH, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; T = 30 °C; Versuch nicht aufgeführt) beobachtet werden.

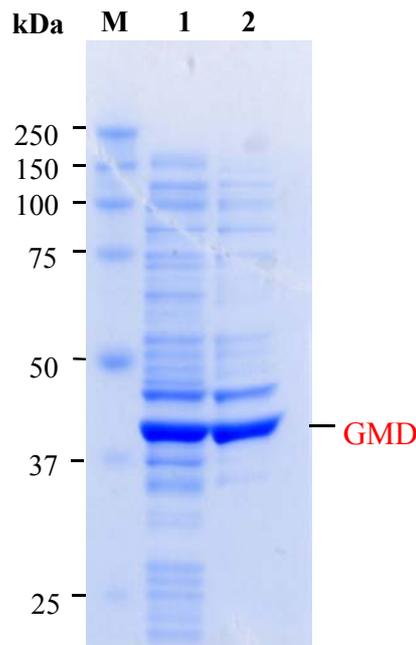
Schuld daran könnte möglicherweise auch eine zu geringe Enzymkonzentration (Proteinkonzentration: Q-Sepharose: 0,86 mg/ml; UF-Konzentrat mit 50 % Glycerin: 5,63 mg/ml) oder in Zusammenhang mit der hohen Verdünnung eine zu lange lag-Phase des Enzyms sein. Zum anderen könnten hohe Verdünnungen aber auch zu einem Zerfall des Enzyms in seine Untereinheiten und damit zu seiner Inaktivierung führen. Durch die Aufkonzentrierung der Enzymlösung kommt es dann wieder zu einem Zusammenschluß der Untereinheiten zum aktiven Enzym.

Durch die zweistufige Aufreinigung konnte eine für die Synthese verwendbare Enzympräparation mit einer volumenspezifischen Aktivität von 1,4 U/ml und einer spezifischen Aktivität von 252 mU/mg (**Tabelle 8**) hergestellt werden. Dies entspricht einem Aufreinigungsfaktor von etwa 2,3 bei einer Gesamtausbeute von 87 %. Im Dialysat konnten keine störenden Nebenaktivitäten mehr nachgewiesen werden, so dass von einer weiteren Feinreinigung des Enzyms abgesehen werden konnte.

Die anschließende SDS-PAGE-Analyse der partiellen Aufreinigung (**Abbildung 34**) ergab für die GMD ein Molekulargewicht von 41,7 kDa (42 kDa: berechnetes Molekulargewicht aus der Aminosäuresequenz). Das Gel zeigt neben der deutlichen Bande für die GDP-

Mannose-4,6-Dehydratase eine weitere deutliche Bande bei etwa 47,5 kDa, die ebenfalls während der Aufreinigung angereichert wurde. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass durch die Ultrafiltration kleinere Proteine abgetrennt wurden. Eine Bestimmung des nativen Molekulargewichtes wurde nicht durchgeführt.

---



---

**Abbildung 34:** SDS-PAGE-Analyse der partiellen Aufreinigung von in *E. coli* BL21 (DE3) überproduzierter „nativer“ GMD mittels Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose FF. **M:** Proteinmarker; **Spur 1:** Gesamtzellextrakt; **Spur 2:** nach Anreicherung über Q-Sepharose FF (UF-Pool mit 50 % Glycerin).

Für das Molekulargewicht des nativen Enzyms aus *Escherichia coli* finden sich in der Literatur zwei verschiedene Angaben. STURLA und Mitarbeiter kamen im Rahmen ihrer Arbeiten zur GDP-Mannose-4,6-Dehydratase aus *E. coli* zu dem Ergebnis, dass die GMD als Hexamer vorliegt. Die Untersuchungen fanden aufgrund von Stabilitätsproblemen nicht mit dem nativen Enzym, sondern mit der als GST-Fusionsprotein überproduzierten GMD statt. Dabei konnte für das Enzym aus *E. coli* ein natives Molekulargewicht von 410 kDa für das GST- (Glutathione-S-Transferase) Fusionsprotein bzw. 250 kDa für die „native“ GMD ermittelt werden. Die SDS-PAGE-Analyse ergab für das Fusionsprotein ein Molekulargewicht von 68 kDa bzw. 42 kDa für das „native“ Enzym (STURLA et al., 1997).

Dieses Ergebnis deckt sich mit Arbeiten zur GDP-Mannose-4,6-Dehydratase aus Schweineschilddrüsen die ebenfalls als Hexamer vorliegt und für die ein natives Molekulargewicht von 251 kDa und mittels SDS-PAGE-Analyse ein Molekulargewicht der Untereinheiten von 41,5 kDa bestimmt werden konnte (BROSCHAT et al, 1985).

SOMOZA und Mitarbeiter kamen dagegen zu dem Ergebnis, dass die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase aus *E. coli* als Homodimer vorliegt (SOMOZA et al., 2000). Ihr Ergebnis deckt sich mit den Befunden für die Dehydratase aus *Klebsiella pneumoniae* (natives Molekulargewicht: 110 kDa; SDS-PAGE 50 kDa; YAMAMOTO et al., 1993) und für die humane GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (SDS-PAGE-Analyse: L-GMD 42 kDa, M-GMD 40,2 kDa; BISSO et al., 1999). Im Rahmen der Arbeiten von SOMOZA gelang es auch die Struktur der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase aus *Escherichia coli* aufzuklären.

Neben der „nativen“ Form der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase wurde das Enzym in der vorliegenden Arbeit auch als *N*-terminales His-tag-Fusionsprotein kloniert und erfolgreich in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert. Die Aufreinigung der *N*-terminal mit einem His-tag versehenen GDP-Mannose-4,6-Dehydratase erfolgte analog zu der in **Kapitel 2.15.4** beschriebenen Aufreinigung der GDP-Fucose Synthetase (GFS). Durch den vorhandenen *N*-terminalen His-tag konnte die GMD in einem einzigen Aufreinigungsschritt über eine immobilisierte **M**etallionen **A**ffinitäts**c**hromatographie (IMAC) nahezu bis zur Homogenität (**Abbildung 51**) aufgereinigt werden. Es zeigte sich jedoch, dass das Enzym während der Aufreinigung mittels IMAC vollständig deaktiviert wurde. Trotz weiterer Versuche mit verschiedenen IMAC-Säulenmaterialien sowie Puffern bzw. Elutionsmitteln, konnte eine Inaktivierung des Enzyms während der Chromatographie nicht verhindert bzw. rückgängig gemacht werden.

Um mögliche Einflüsse der IMAC-Aufreinigung auf die Aktivität der His-GMD näher zu untersuchen, wurden in einem Versuch verschiedene in der IMAC verwendete Metallionen und Salze getestet.  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  und  $Mn^{2+}$  wurden in einer Konzentration von 1 mM und Imidazol in einer Konzentration von 10 mM dem „Standardtest“ (**Kapitel 2.13.3.4**) zugesetzt. Dabei konnte in allen Ansätzen eine vollständige Inaktivierung der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase beobachtet werden. Nur in den mitgeführten Kontrollansätzen („Standardtest“) war eine Enzymaktivität nachweisbar. Spätere Untersuchungen von HOH mit der „nativen“ GMD zeigten, dass das Enzym durch die oben genannten Metallionen nicht inaktiviert wird. Demnach scheint also nur der vorhandene *N*-terminale His-tag für die Inaktivierung verantwortlich zu sein (HOH, 2001).

Im Rahmen der Aufreinigung konnte für das His-getaggte Enzym eindeutig gezeigt werden, dass es aktiv in *E. coli* BL21(DE3) überproduziert werden kann und dabei etwa dieselbe Aktivität wie das „native“ Enzym aufweist. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu der Publikation von ALBERMANN et al. (2000) in der der vorhandene *N*-terminale His-Tag für die inaktive Überexpression der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase in *E. coli* BL21(DE3) verantwortlich gemacht wird.

Da keine Möglichkeit bestand den vorhandenen *N*-terminalen His-Tag für die Aufreinigung nutzbar zu machen, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit mit der nativen überproduzierten Form der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase gearbeitet.

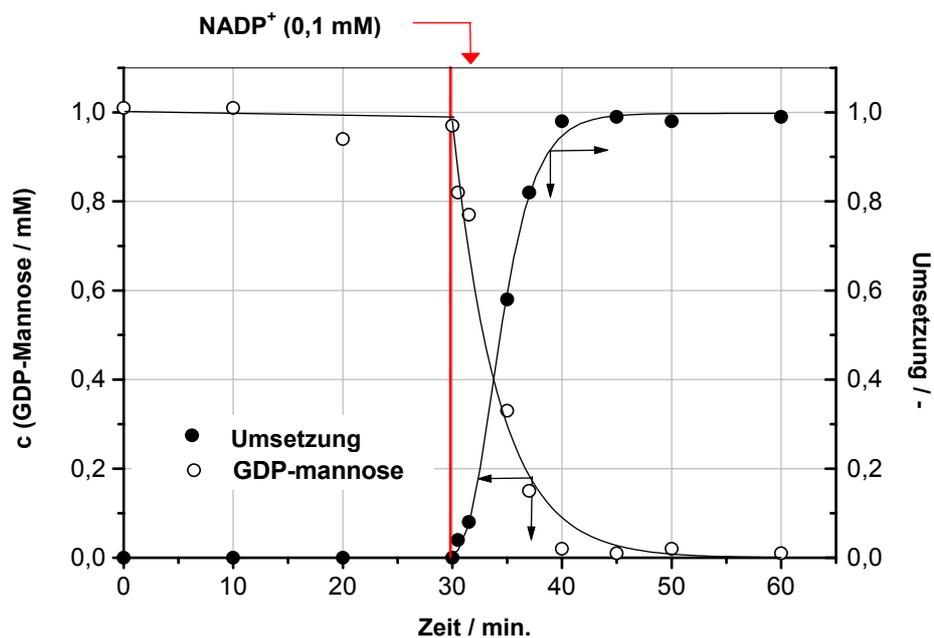
#### **3.4.1.5 Partiiell über Q-Sepharose FF gereinigte GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase liegt als Apoenzym vor**

In verschiedenen Veröffentlichungen findet sich der Hinweis, dass die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase ihren Pyridinnukleotid-Cofaktor NAD(P)<sup>+</sup> (**siehe auch Kapitel 3.4.3.1**) fest gebunden hat (LIAO & BARBER, 1972; BROSCHEAT et al., 1985; STURLA et al., 1997; TONETTI et al., 1998[b]; BISSO et al., 1999), so dass eigentlich eine Zugabe von NADP<sup>+</sup> in den Enzymtest nicht notwendig wäre.

Versuche mit dem unter **Kapitel 2.13.3.4** beschriebenen „Standardtest“ (1 mM GDP-Mannose, 0,1 mM NADP<sup>+</sup>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; T = 30 °C) zeigten jedoch, dass nach Entfernen des Cofaktors aus dem Assay nur im Rohextrakt, jedoch nicht mehr in Enzympräparationen der partiell aufgereinigten GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD), eine Aktivität festgestellt werden konnte. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass das Enzym während der Chromatographie an Q-Sepharose FF seinen Cofaktor NADP<sup>+</sup> verloren hat und nun als Apoenzym vorliegt. Um diesen Sachverhalt näher zu untersuchen wurde der folgende Versuch (**Abbildung 35**) durchgeführt.

Ein „Standardtest“ mit einer Enzympräparation der partiell aufgereinigten GDP-Mannose-4,6-Dehydratase wurde zunächst ohne den Cofaktor NADP<sup>+</sup> (1 mM GDP-Mannose, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; T = 30 °C) inkubiert. Während dieses Zeitraums kommt es zu keiner Umsetzung der GDP-Mannose bzw. ist keine Enzymaktivität detektierbar. Erst durch Zugabe des Cofaktors NADP<sup>+</sup> (0,1 mM) nach 30 min zum Ansatz kommt es, nach der zuvor bereits beschriebenen lag-Phase (**Kapitel 3.4.1.3**), innerhalb von 10 min. zu einer vollständigen Umsetzung der GDP-Mannose bzw. ist eine Enzymaktivität nachweisbar.

Der Versuch macht deutlich, dass dem partiell gereinigten Enzym der Cofaktor  $\text{NADP}^+$  von außen (*exogen*) zugesetzt werden muss, damit überhaupt eine Umsetzung der GDP-Mannose zur GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose stattfindet bzw. eine Enzymaktivität nachgewiesen werden kann. Dementsprechend muss auch dem verwendeten Enzymtest der Cofaktor  $\text{NADP}^+$  zugesetzt werden.



**Abbildung 35:** Partiiell aufgereinigte GMD liegt als Apoenzym vor. Inkubation eines „Standardtest“ ohne Cofaktor  $\text{NADP}^+$  (1 mM GDP-Mannose, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; T = 30 °C) mit einer Enzympräparation der partiell gereinigten GMD führt zu keiner Umsetzung. Durch  $\text{NADP}^+$ -Zugabe (0,1 mM) nach 30 min. kommt es dann innerhalb von 10 min. zur vollständigen Umsetzung der GDP-Mannose.

Durch die Überproduktion als GST- (Glutathione-S-Transferase) Fusionsprotein (GST-GMD) konnte von STURLA und seinen Mitarbeitern die GMD mittels Affinitätschromatographie an GST-Sepharose in einem einzigen Schritt aufgereinigt werden, während von SULLIVAN und seinen Mitarbeitern die Aufreinigung der GMD in mehreren Aufreinigungsschritten (Anionenaustauschchromatographie an Toyopearl DEAE; Chromatographie an

Hydroxylapatit und Anionenaustauschchromatographie an MonoQ) durchgeführt wurde (STURLA et al., 1997; SULLIVAN et al., 1998). Trotzdem findet sich bei beiden publizierten Arbeiten zur Aufreinigung der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase aus *Escherichia coli* kein Hinweis darauf, dass das gereinigte Enzym als Apoenzym vorliegt. Beide Arbeitsgruppen verwenden zur Bestimmung der *in vitro*-Aktivität der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase einen Enzymtest mit <sup>14</sup>C-gelabelter GDP-Mannose. Während der von STURLA verwendete Enzymtest auf den Zusatz des Cofaktor NADP<sup>+</sup> verzichtet, geht dies aus der Publikation von SULLIVAN nicht eindeutig hervor (STURLA et al., 1997; SULLIVAN et al., 1998).

Lediglich in der Publikation von YAMAMOTO für die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase aus *Klebsiella pneumoniae* findet sich der Hinweis, dass das Enzym bei der Aufreinigung nach der Chromatographie an Blue Sepharose CL-6B keine Aktivität mehr zeigt, wenn der Cofaktor aus dem Enzymtest entfernt wird (YAMAMOTO et al., 1993). Allerdings konnte dieser Effekt nach Chromatographie an Blue Sepharose CL-6B nicht bei der partiellen Aufreinigung der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase aus der Schilddrüse vom Schwein beobachtet werden. Aufgrund dieser Feststellung wird vom Autor die Vermutung geäußert, dass bei mikrobiellen Enzymen der Cofaktor weniger fest gebunden vorliegt.

Der von YAMAMOTO verwendete Assay für die GMD aus *Klebsiella pneumoniae* diene auch als Grundlage für den in dieser Arbeit verwendeten Aktivitätstest.

### 3.4.2 N-terminale Sequenzanalyse der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase

Zur N-terminalen Sequenzanalyse wurden sowohl ein Aliquot des Zellaufschlusses und des partiell gereinigten Enzyms über SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel auf eine PVDF-Membran geblottet. In der anschließenden Sequenzierung konnten die ersten 40 Aminosäuren des N-Terminus eindeutig bestimmt werden (ab Aminosäure 41 nur unter Vorbehalt), die im folgenden wiedergegeben sind:

**Ser-Lys-Val-Ala-Leu-Ile-Thr-Gly-Val-Thr-Gly-Gln-Asp-Gly-Ser-Tyr-Leu-Ala-Glu-Phe-Leu-Leu-Glu-Lys-Gly-Tyr-Glu-Val-His-Gly-Ile-Lys-Arg-Arg-Ala-Ser-Ser-Phe-Asn-Thr-(Glu)-(Glu)/(Arg)-(Val)-(Asp)**

Die so bestimmte Aminosäuresequenz der GDP-D-Mannose-4,6-Dehydratase ist identisch mit der Aminosäuresequenz, die aus der von STEVENSON publizierte DNA-Sequenz abgeleitet werden (STEVENSON et al., 1996, vgl Kapitel 6.1.1) konnte.

Mehrere Versuche einer *N*-terminalen Sequenzierung des His-tag überexprimierten Proteins mit einem Aliquot des Zellaufschlusses und des aufgereinigten Enzyms (vgl. **Abbildung 50**) schlugen fehl, da sich der *N*-terminal gelegene His-tag offenbar störend auf die Sequenzierungsreaktion auszuwirken schien.

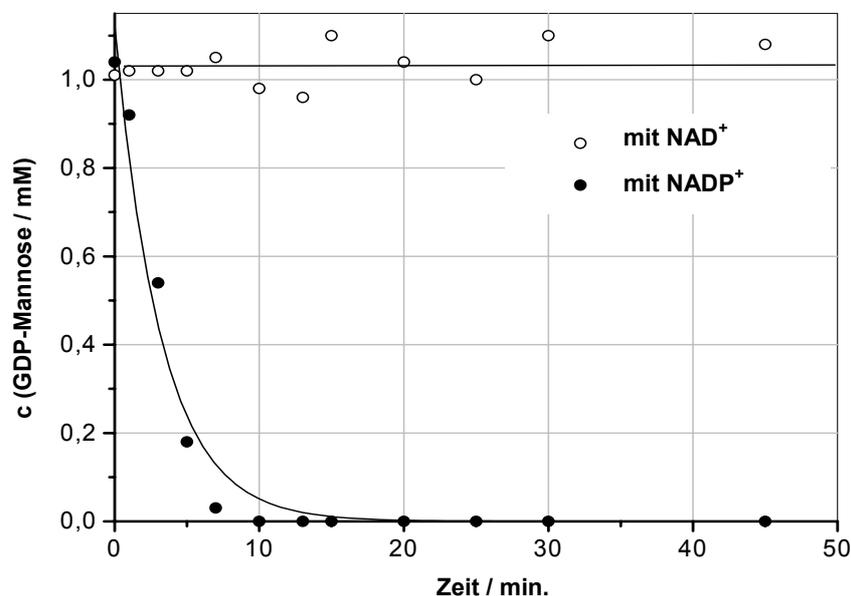
### **3.4.3 Charakterisierung und Anwendung der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase**

#### **3.4.3.1 NADP<sup>+</sup>-Spezifität der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase**

Wie bereits im **Kapitel 3.4.1** beschrieben, katalysiert die GDP-Mannose 4,6-Dehydratase in einer irreversiblen Reaktion die Oxidation von GDP-Mannose am C-4 Kohlenstoffatom gefolgt von einer Reduktion am C-6 Kohlenstoffatom, was zur Bildung einer Methylgruppe führt. Mit dieser Reaktion einher geht ein intramolekularer Hydrid-Transfer vom C-4 zum C-6 Kohlenstoffatom mittels eines fest gebundenen Pyridinnukleotid-Cofaktors, NAD<sup>+</sup> bzw. NADP<sup>+</sup>, der während des Reaktionsverlaufs regeneriert wird (CHANG et al., 1985; OTHS et al., 1990; SOMOZA et al., 2000).

Um festzustellen welchen der beiden Pyridinnukleotid-Cofaktoren die GMD benötigt, wurden zwei Ansätze mit der partiell aufgereinigten Enzympräparation durchgeführt. Ein Testansatz entsprach dem unter **Kapitel 2.13.3.4** beschriebenen „Standardtest“ (1 mM GDP-Mannose, 0,1 mM NADP<sup>+</sup>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; T = 30 °C), während der andere Ansatz anstelle von NADP<sup>+</sup> den Cofaktor NAD<sup>+</sup> in einer Konzentration von 0,1 mM enthielt. Wie aus der **Abbildung 36** ersichtlich, konnte nur in dem Ansatz der NADP<sup>+</sup> als Cofaktor enthielt eine Umsetzung der GDP-Mannose und damit eine Enzymaktivität beobachtet werden. Dagegen konnte im Assay der NAD<sup>+</sup> als Cofaktor enthielt über den gesamten Versuchszeitraum keine Umsetzung der GDP-Mannose beobachtet beziehungsweise keine GDP-Mannose-4,6-Dehydratase Aktivität festgestellt werden. Auf dem Hintergrund, dass es sich bei der partiell aufgereinigten GDP-Mannose-4,6-Dehydratase um das Apoenzym handelt - die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase liegt ohne den für die Reaktion notwendigen

Pyridinnukleotid-Cofaktor vor (vgl. Kapitel 3.4.1.5) -, lässt sich aus dem erhaltenen Ergebnis eine Spezifität der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase aus *E. coli* für den Cofaktor  $\text{NADP}^+$  ableiten. Eine  $\text{NADP}^+$ -Spezifität der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase konnte auch von STURLA und SULLIVAN in ihren Arbeiten für das Enzym aus *Escherichia coli* festgestellt werden (STURLA et al., 1997; SULLIVAN et al., 1998). Weiterhin konnte eine  $\text{NADP}^+$ -Spezifität von SULLIVAN und seinen Mitarbeitern auch für die humane GMD, sowie von YAMAMOTO für die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase aus *Klebsiella pneumoniae* gezeigt werden (YAMAMOTO et al., 1993; SULLIVAN et al., 1998).



**Abbildung 36:** Nachweis der  $\text{NADP}^+$ -Spezifität der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase. Umsatz-Zeit Verlauf zweier „Standardtests“ mit partiell aufgereinigter GMD die sich im Cofaktor  $\text{NADP}^+$  bzw.  $\text{NAD}^+$  unterscheiden (1 mM GDP-Mannose, 0,1 mM  $\text{NADP}^+$  bzw.  $\text{NAD}^+$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; T = 30 °C)

Dies unterscheidet die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase von zwei weiteren gut charakterisierten Nukleotidzucker-4,6-Dehydratasen. Sowohl die dTDP-Glucose-4,6-Dehydratase, als auch die CDP-Glucose-4,6-Dehydratase benötigen nämlich  $\text{NAD}^+$  als Pyridinnukleotid-Cofaktor (GLASER & ZARKOWSKY, 1971; YU et al., 1992).

### 3.4.3.2 Einfluss der NADP<sup>+</sup>-Cofaktorkonzentration auf die Aktivität der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase

Im folgenden Versuch wurde ein möglicher Einfluss des Cofaktors NADP<sup>+</sup> auf die Aktivität der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase bei zwei unterschiedlichen Cofaktorkonzentrationen untersucht. Dabei wurde der unter **Kapitel 2.16.1** beschriebene Ansatz verwendet. Um einen möglichst breiten Bereich abzudecken, wurde in einem Ansatz die bisher in den „Standardtests“ verwendete Cofaktorkonzentration von 0,1 mM NADP<sup>+</sup> und in einem weiteren Ansatz ein großer Überschuss an Cofaktor von 5,0 mM NADP<sup>+</sup> eingesetzt.

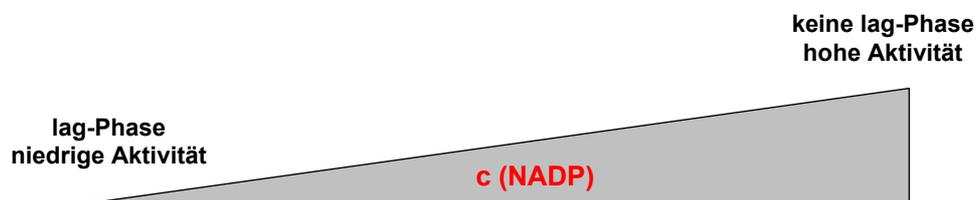
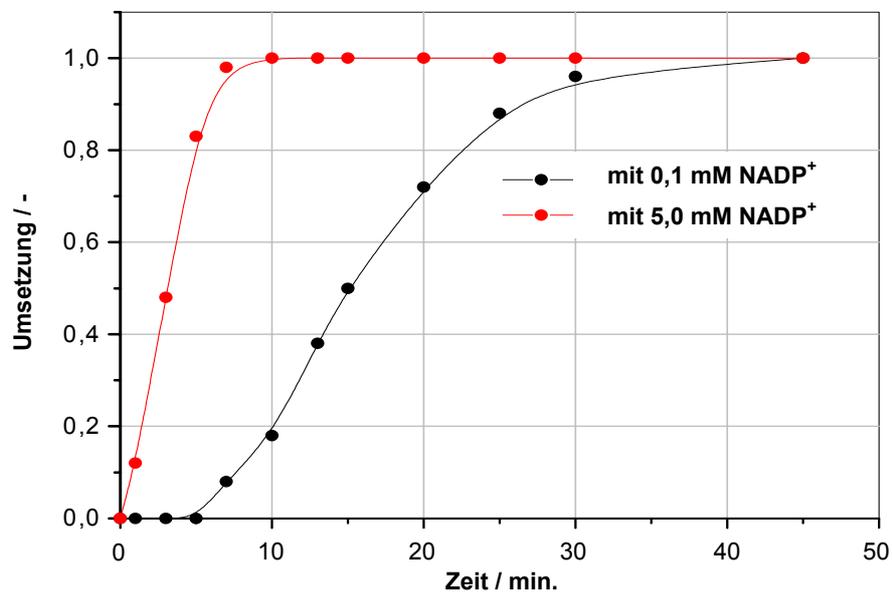
Wie aus der **Abbildung 37** zu entnehmen ist, kommt es bei der niedrigen Cofaktorkonzentration von 0,1 mM zu Beginn der Reaktion zunächst zum Auftreten einer lag-Phase wie sie bereits in früheren Versuchen beobachtet werden konnte. Die Reaktion erreicht erst nach etwa 6 min. ihren linearen Verlauf.

Im Ansatz der den Cofaktor NADP<sup>+</sup> in einer Konzentration von 5 mM enthält, ist dagegen keine lag-Phase im Reaktionsverlauf mehr feststellbar. Die Reaktion geht sofort in einen linearen Verlauf über und ist nach etwa 5 min. abgeschlossen. Aufgrund des schnelleren Reaktionsverlaufes bzw. der schnelleren Umsetzung der GDP-Mannose konnte bei diesen Ansatz auch eine deutlich höhere Aktivität für die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase bestimmt werden. Gegenüber einer Aktivität von etwa 1,1 U/ml im Ansatz mit 0,1 mM NADP<sup>+</sup> stieg die Aktivität im Ansatz mit 5,0 mM NADP<sup>+</sup> auf etwa 3,5 U/ml an.

Der exogen zugesetzte Cofaktor NADP<sup>+</sup> scheint demnach einen Einfluss auf die Aktivität der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase aus *Escherichia coli* zu haben. Da es sich bei der verwendeten partiell aufgereinigten Enzympräparation, wie bereits unter **Kapitel 3.4.1.5** beschrieben, um das Apoenzym handelt scheint dies nicht verwunderlich. Um überhaupt eine Enzymaktivität bestimmen zu können, muß dem Enzymtest der Cofaktor NADP<sup>+</sup> zugesetzt werden. Eine Steigerung der Enzymaktivität durch exogene Zugabe von NADP<sup>+</sup> wurde von YAMAMOTO auch für die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase aus *Klebsiella pneumoniae* beschrieben (YAMAMOTO et al., 1993). Dagegen konnte eine derartige Aktivitätssteigerung des Enzyms von anderen Arbeitsgruppen für die Enzyme aus der Schilddrüse vom Schwein (BROSCHAT et al., 1985), Mensch (BISSO et al., 1999) und auch für die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase aus *Escherichia coli* (STURLA et al., 1997; TONETTI et al., 1998[b]) nicht festgestellt werden.

Im Falle der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase aus *Escherichia coli* könnte das widersprüchliche Ergebnis von STURLA und TONETTI folgende Ursachen haben. Das Enzym

wurde hier als GST-Fusionsprotein überexprimiert (vgl. auch Kapitel 3.1.5). Dadurch konnte für die Aufreinigung eine andere Strategie verfolgt werden, die dazu führte, dass das Enzym seinen Cofaktor während der Aufreinigung nicht verlor. Darauf deutet auch das von STURLA und seinen Mitarbeitern verwendete Assaysystem hin, das selbst nach der Aufreinigung der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase auf eine Zugabe des Cofaktors  $\text{NADP}^+$  zum Enzymtest verzichtet.

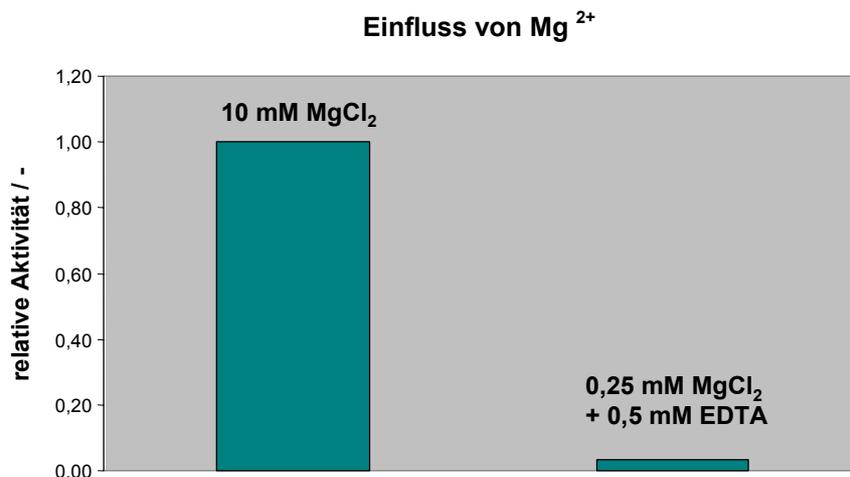


**Abbildung 37:** Einfluss der  $\text{NADP}^+$  Cofaktorkonzentration auf die Enzymaktivität der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die partielle Aufreinigung der GMD eine Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose FF durchgeführt. Bei der Q-Sepharose handelt es sich um einen starken Anionenaustauscher bei dem das Enzym an die Matrix bindet und im Falle der GMD wahrscheinlich auch der Cofaktor, so dass dieser bei der anschließenden Elution an der Matrix hängen bleibt. Durch Verwendung eines GST-Fusionsproteins wie in der Arbeit von STURLA, ist es möglich das Enzym mittels einer Affinitätschromatographie an GST-Sepharose aufzureinigen. In diesem Fall bindet nur der GST-Anker an die Matrix, so dass es dabei zu keinem Verlust des Cofaktors während der Aufreinigung kommt.

Die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit weisen darauf hin, dass der Cofaktor  $\text{NADP}^+$  nicht so fest an das Enzym gebunden vorliegt wie schon des öfteren publiziert wurde. Vielmehr scheint dieser während der partiellen Aufreinigung über Q-Sepharose FF verloren zu gehen (vgl. Kapitel 3.4.1.5).

---



**Abbildung 38:** Einfluss von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen auf die Aktivität der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD).

In der Publikation von STURLA findet sich auch ein Hinweis, dass die  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionenkonzentration einen Einfluss auf die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase-Aktivität hat. Für die GMD konnte dabei eine optimale Konzentration von 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$  ermittelt werden (STURLA et al., 1997). Um diesen Sachverhalt näher zu untersuchen, wurde mit der partiell gereinigten Enzympräparation ein „Standardtest“ (10 mM  $\text{MgCl}_2$ ) wie unter **Kapitel 2.13.3.4**

beschrieben und ein weiterer ohne den Zusatz von  $\text{MgCl}_2$  zum Assay durchgeführt. Um eventuell aus der Enzymaufreinigung stammende  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen abzufangen, wurde diesem Ansatz zusätzlich noch EDTA in einer Konzentration von 0,5 mM zugesetzt. Wie der **Abbildung 38** zu entnehmen ist, scheint  $\text{Mg}^{2+}$  tatsächlich einen stimulierenden Effekt auf die Aktivität der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase zu haben. Während im Ansatz ohne  $\text{MgCl}_2$  nur noch eine „Restaktivität“ von etwa 58 mU/ml nachweisbar war, konnte für den „Standardtest“ (10 mM  $\text{MgCl}_2$ ) eine Aktivität von etwa 1,42 U/ml ( $\cong$  relative Aktivität von 1) bestimmt werden. Ein möglicher Einfluss der  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionenkonzentration auf die lag-Phase konnte jedoch nicht beobachtet werden.

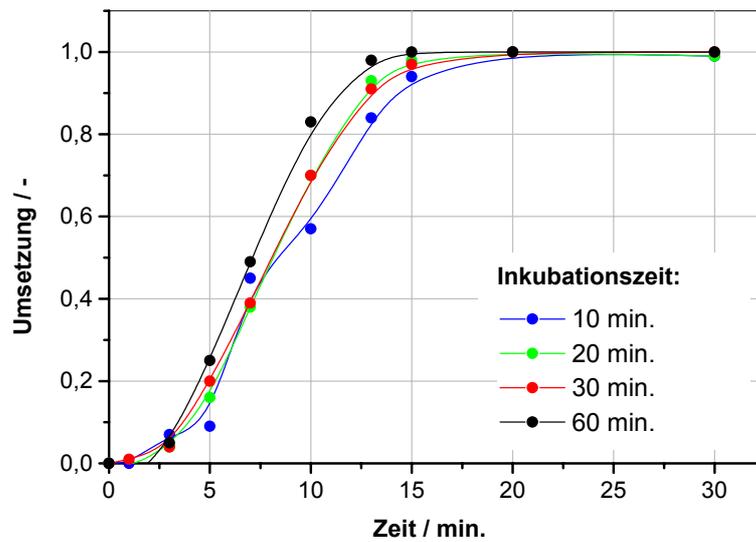
### **3.4.3.3 Untersuchung eines möglichen Einflusses der Inkubationszeit und der Startbedingungen auf die lag-Phase bzw. Aktivität der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase**

In den vorangegangenen Kapiteln wurde schon mehrmals über das Auftreten einer lag-Phase in Zusammenhang mit der Durchführung des Aktivitätstests für die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) berichtet. Dem Auftreten einer lag-Phase bei der Aktivitätsbestimmung der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase könnten folgende Ursachen zugrunde liegen:

- Zu Beginn der Reaktion muss sich zunächst ein Gleichgewicht in der Enzym-Cofaktor-Bindung ( $\text{NADP}^+$ ) einstellen
- Mechanistische Gründe

Aus diesem Grund sollte nun mit den beiden folgenden Versuchen die genannten Ursachen näher untersucht werden. Um die Einstellung eines Gleichgewichtes in der Enzym-Cofaktor-Bindung zu untersuchen wurden in einem Versuch die Vorinkubationszeiten des unter **Kapitel 2.13.3.4** beschriebenen „Standardtests“ variiert und der Umsatz-Zeit-Verlauf mit vier verschiedenen Vorinkubationszeiten (10 min., 20 min., 30 min. und 60 min.) ermittelt. Wie aus der **Abbildung 39** ersichtlich, konnte bei allen Ansätzen in etwa der gleiche Umsatz-Zeit-Verlauf beobachtet werden. Ein Einfluss auf die lag-Phase zu Beginn der Reaktion konnte jedoch nicht festgestellt werden.

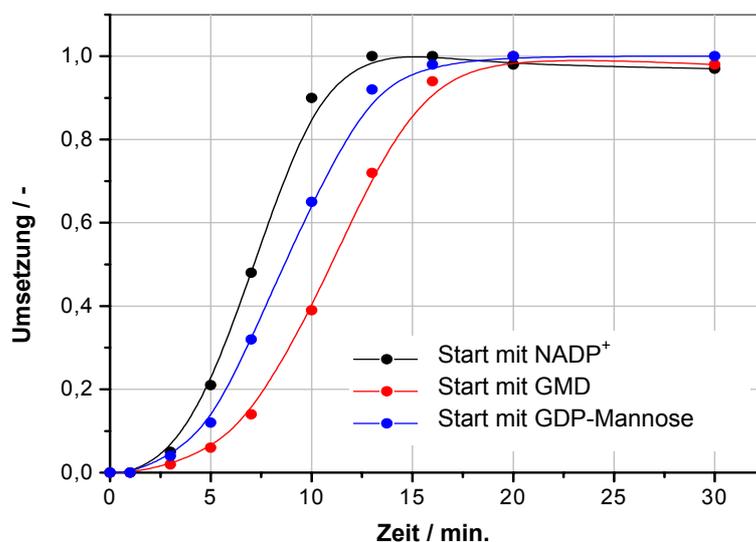
Zur Untersuchung möglicher mechanistischer Gründe, die für das Auftreten der lag-Phase verantwortlich sein könnten, wurden in einem zweiten Versuch die Startbedingungen variiert.



---

**Abbildung 39:** Variation der Vorinkubationszeit. Der Start des Enzym-Assays erfolgte durch Zugabe von GDP-Mannose zum Ansatz.

---



---

**Abbildung 40:** Variation der Startbedingungen des Enzym-Assays. Der Ansätze wurden vor Zugabe des „Starters“ 10 Minuten inkubiert.

---

Statt wie bisher die Reaktion durch die Zugabe von GDP-Mannose zum Assay zu starten, wurden nun die Reaktionen alternativ durch die Zugabe von NADP<sup>+</sup> bzw. durch die Zugabe des Enzyms (GDP-Mannose-4,6-Dehydratase; GMD) gestartet.

Wie aus den Umsatz-Zeit-Verläufen der **Abbildung 40** zu entnehmen ist, konnte auch hier das Vorhandensein einer lag-Phase zu Beginn der Reaktion festgestellt werden. Die beobachtete leichte Verschiebung der lag-Phase bei den Ansätzen die mit GDP-Mannose bzw. GMD gestartet wurden, gegenüber dem Ansatz der durch Zugabe von NADP<sup>+</sup> gestartet wurde, sollte nicht übermäßig interpretiert werden. Zum einen ist die verwendete Analytik in einem gewissen Bereich variabel und auch das Handling der Proben kann zu einer gewissen Verschiebung führen, so dass die hier beobachteten Unterschiede im Grunde genommen gar nicht so groß sind.

Als Fazit der beiden Versuche kann festgehalten werden, dass sowohl die Enzym-Cofaktor-Bindung (NADP<sup>+</sup>) als auch mechanistische Gründe keinen merklichen Einfluss auf das Auftreten der beobachteten lag-Phase haben.

Das Phänomen respektive das Auftreten einer lag-Phase wurde bei den bisher publizierten Enzymtests für die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase, auch für das Enzym aus *Escherichia coli*, nicht beschrieben.

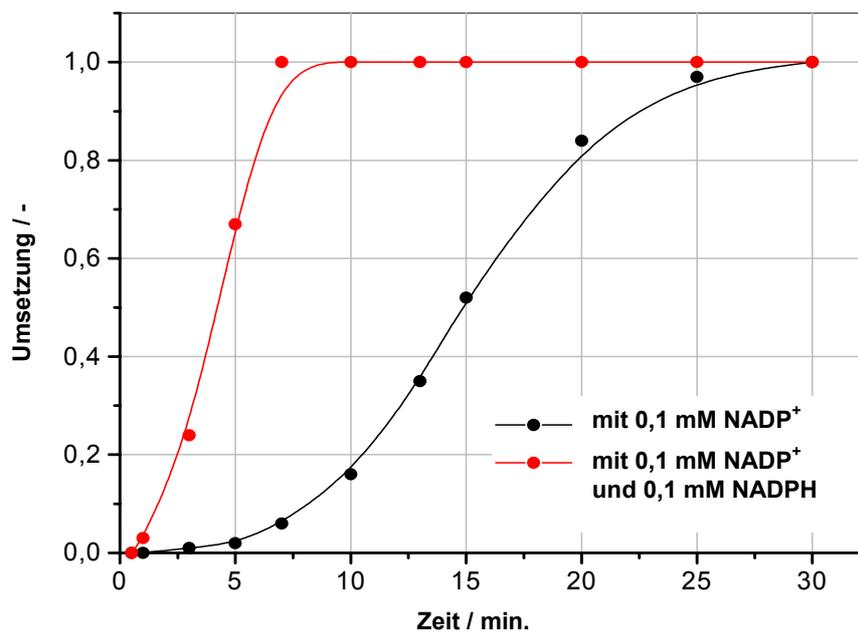
### **3.4.3.4 Einfluss von NADPH auf die Aktivität der GDP- $\alpha$ -D-Mannose-4,6-Dehydratase**

In der Veröffentlichung von SULLIVAN wurde das unten aufgeführte Zitat gefunden, das auf einen möglichen Einfluss des reduzierten Cofaktors, NADPH, auf die Aktivität der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase hinweist. Im Zusammenhang mit dieser Feststellung wurde vermutet, ob nicht vielleicht auch ein Einfluss auf die in der vorliegenden Arbeit festgestellte lag-Phase, bei der Durchführung der Enzymtests für die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase, zu beobachten sein könnte.

SULLIVAN *et al.* (1998):

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

Um einen möglichen Einfluss von NADPH auf die Aktivität der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase zu überprüfen wurden in einem Versuch zwei verschiedene Ansätze, wie unter **Kapitel 2.16.2** beschrieben, durchgeführt. Neben Ansatz 1, der dem unter **Kapitel 2.13.3.4** beschriebenen „Standardtest“ zur Bestimmung der Enzymaktivität der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase entsprach, wurde ein weiterer Ansatz (Ansatz 2), der neben  $\text{NADP}^+$  auch die reduzierte Form des Cofaktors (NADPH) in einer Konzentration von 0,1 mM enthielt, durchgeführt.



**Abbildung 41:** Einfluss von NADPH auf die lag-Phase des verwendeten Enzym-Assays.

Wie aus der **Abbildung 41** ersichtlich, zeigte der Umsatz-Zeit-Verlauf des „Standardtests“ (Ansatz 1) das erwartete Verhalten. Nach einer anfänglichen lag-Phase ging die Reaktion erst nach etwa 6 min. in einen linearen Verlauf über. Für den Ansatz 2, der sowohl  $\text{NADP}^+$  als auch NADPH in einer Konzentration von 0,1 mM enthielt, konnte dagegen festgestellt werden, dass die Reaktion sofort in einen linearen Verlauf überging und das Auftreten einer lag-Phase nicht mehr beobachtet werden konnte.

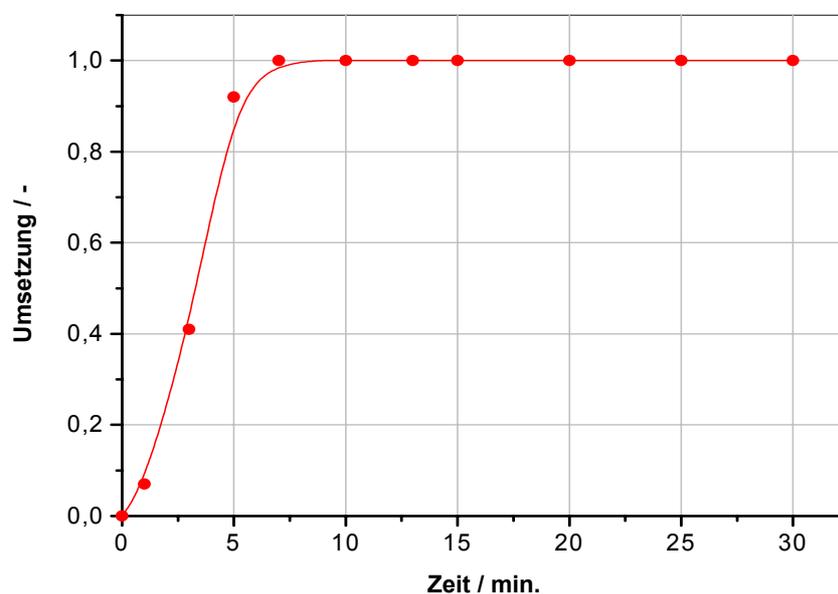
Demnach scheint nicht nur die Absolutkonzentration des Cofaktors  $\text{NADP}^+$  (vgl. **Kapitel 3.4.3.2**) einen Einfluss auf die Aktivität der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase zu haben, sondern auch die oxidierte ( $\text{NADP}^+$ ) und reduzierte ( $\text{NADPH}$ ) Form des Pyridinnukleotid-Cofaktors.

Im Rahmen seiner Dissertation konnte von HOH zwischenzeitlich mittels eines mathematisch/kinetischen Modells ein optimales Verhältnis von oxidiertem ( $\text{NADP}^+$ ) und reduziertem ( $\text{NADPH}$ ) Cofaktor von 1 : 1 ermittelt werden (HOH, 2001).

Der beobachtete stimulatorische Effekt von  $\text{NADPH}$  auf die Aktivität der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase ist verwunderlich, da  $\text{NADPH}$  als Cofaktor eigentlich keine Rolle bei der Katalyse spielt (SULLIVAN et al., 1998).

Aufgrund des festgestellten Einflusses auf die Aktivität der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase nach der Zugabe von  $\text{NADPH}$  zum Ansatz, stellte sich die Frage, ob eine Umsetzung bzw. Aktivität auch durch die Zugabe von  $\text{NADPH}$  als einzigen Cofaktor zum Enzymtest beobachtet werden kann.

---



---

**Abbildung 42:** Einfluss von  $\text{NADPH}$  als einziger Cofaktor im verwendeten Enzym-Assay. Durchgeführt wurde der unter **Kapitel 2.13.3.4** beschriebene „Standardtest“, der jedoch  $\text{NADPH}$  in einer Konzentration von 0,1 mM anstelle von 0,1 mM  $\text{NADP}^+$ , enthielt.

Für die nähere Untersuchung dieses Sachverhaltes wurde in einem weiteren Versuch der unter **Kapitel 2.16.2.** beschriebene Ansatz 3 durchgeführt. Dieser entsprach in seiner Zusammensetzung dem unter **Kapitel 2.14.3.4** beschriebenen „Standardtest“, enthielt jedoch anstelle von  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{NADPH}$  in einer Konzentration von 0,1 mM.

Bei der Verwendung von  $\text{NADPH}$  als Cofaktor anstelle von  $\text{NADP}^+$  im „Standardtest“ konnte ebenfalls eine Umsetzung bzw. Aktivität der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase festgestellt werden. Wie aus **Abbildung 42** ersichtlich, geht die Reaktion ohne das Auftreten einer lag-Phase sofort in einen linearen Verlauf über und ist nach etwa 7 min. abgeschlossen.

Eine Erklärung für den stimulatorischen Einfluss von  $\text{NADPH}$  auf die Aktivität der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase zu finden fällt schwer, da  $\text{NADPH}$ , wie bereits zuvor erwähnt, eigentlich keine Rolle bei der Katalyse zu spielen scheint. Während des katalytischen Zyklus tritt es nur als „vorübergehendes Intermediat“ auf und liegt dabei so fest an das Enzym gebunden vor, dass es zu keiner Dissoziation respektive Freisetzung kommt. Darauf deuten auch röntgenkristallographische Untersuchungen und daraus abgeleitete postulierte Reaktionsmechanismen für die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase hin (CHANG et al., 1985; OTHS et al., 1990; SOMOZA et al., 2000).

Die beim letzten Versuch (**Abbildung 42**) festgestellte Aktivität könnte eventuell auf geringe „Verunreinigungen“ an  $\text{NADP}^+$  in der verwendeten  $\text{NADPH}$ -Charge zurückzuführen sein. Allerdings kann diese „Verunreinigung“ nicht allein für den hier und im vorangegangenen Versuch (**Abbildung 41**) beobachteten starken stimulatorischen Einfluss von  $\text{NADPH}$  auf die Aktivität der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase verantwortlich sein.

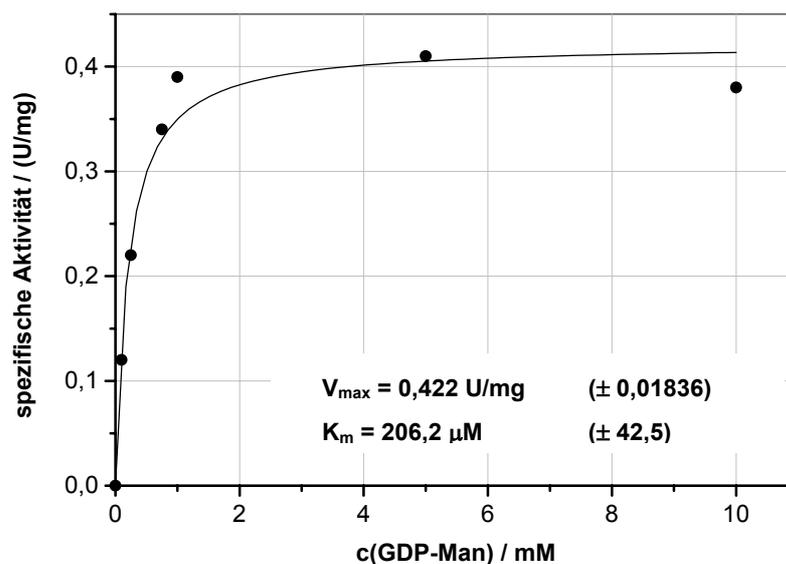
Aus den erhaltenen Ergebnissen wurde der unter **Kapitel 2.13.3.4** beschriebene „optimierte Inkubationsansatz“ zur Bestimmung der Aktivität der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) abgeleitet. Dieser „optimierte“ Test wurde zur weiteren Bestimmung der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase Aktivität eingesetzt. Gegenüber dem „Standardtest“ war dieser dahingehend verändert, dass dem Enzymtest jetzt sowohl die oxidierte ( $\text{NADP}^+$ ) als auch die reduzierte Form ( $\text{NADPH}$ ) des Pyridinnukleotid-Cofaktors in einer Konzentration von jeweils 0,1 mM zugesetzt wurden.

### 3.4.3.5 Bestimmung der $K_m$ - und $v_{max}$ -Werte für GDP- $\alpha$ -D-Mannose und NADP<sup>+</sup> bzw. NADPH

#### 3.4.3.5.1 Bestimmung des $K_m$ - und $v_{max}$ -Wertes für GDP- $\alpha$ -D-Mannose

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter  $K_m$  und  $v_{max}$  für das natürliche Substrat GDP-Mannose wurde eine Charge der partiell aufgereinigten GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) eingesetzt (siehe auch Kapitel 3.4.1.4).

Bestimmt wurde die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase von der Konzentration an GDP-Mannose in einem Bereich zwischen 0 - 10 mM).



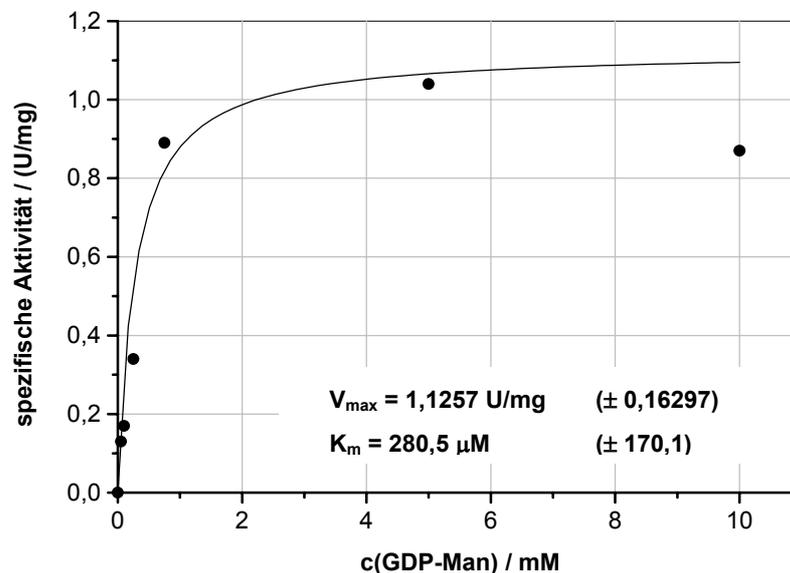
**Abbildung 43:** Bestimmung des  $K_m$ -Wertes für GDP-Mannose (0 – 10 mM GDP-Mannose, 5,0 mM NADP<sup>+</sup>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; T = 30 °C)

Um den unter Kapitel 3.4.3.1 und Kapitel 3.4.3.4 erhaltenen Ergebnissen Rechnung zu tragen und um gleichzeitig zu überprüfen, ob unterschiedliche Cofaktorkonzentrationen einen Einfluss auf den  $K_m$ -Wert für die GDP-Mannose haben, wurde der  $K_m$ -Wert für das natürliche Substrat GDP-Mannose, sowohl in Gegenwart eines NADP<sup>+</sup>-Überschusses von 5,0 mM, als

auch unter den „optimierten“ Reaktionsbedingungen von jeweils 0,1 mM NADP<sup>+</sup> und 0,1 mM NADPH, ermittelt (vgl. Ansätze 1 und 2, Kapitel 2.14).

Für das natürliche Substrat GDP-Mannose konnte ein K<sub>m</sub>-Wert von 206 µM respektive 280 µM bestimmt werden. Die ermittelte maximale Reaktionsgeschwindigkeit v<sub>max</sub> betrug 0,42 U/mg für die Testreihe mit einer Cofaktorkonzentration von 5 mM NADP<sup>+</sup> und 1,13 U/mg für die Testreihe mit den „optimierten“ Reaktionsbedingungen von jeweils 0,1 mM NADP<sup>+</sup> und 0,1 mM NADPH (siehe Abbildungen 43/44).

---



---

**Abbildung 44:** Bestimmung des K<sub>m</sub>-Wertes für GDP-Mannose (0 – 10 mM GDP-Mannose, 0,1 mM NADP<sup>+</sup> und 0,1 mM NADPH, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; T = 30 °C)

Verschiedene Cofaktorkonzentrationen scheinen demnach keinen grossen Einfluss auf den K<sub>m</sub>-Wert für die GDP-Mannose zu haben. Während für die beiden unterschiedlichen Cofaktorkonzentrationen annähernd gleiche K<sub>m</sub>-Werte ermittelt werden konnten (K<sub>m</sub>-Werte unterscheiden sich um einen Faktor von etwa 1,3), war bei der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit v<sub>max</sub> ein deutlicherer Unterschied feststellbar. Bei dem Ansatz mit den optimierten Reaktionsbedingungen (0,1 mM NADP<sup>+</sup>/NADPH) war die maximale

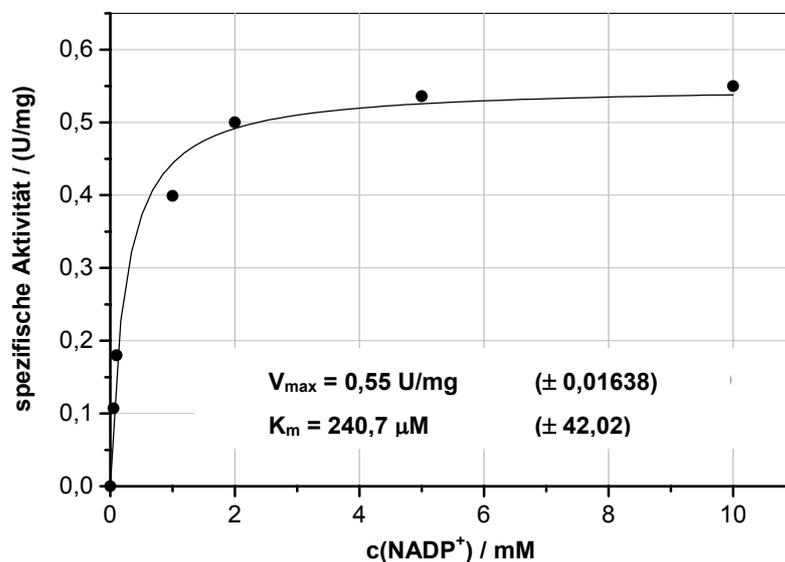
Reaktionsgeschwindigkeit um etwa das 3-fache (Faktor 2,7) höher als beim Ansatz mit einem Überschuss an Cofaktor. Mögliche Ursache dafür scheint der bereits beschriebene stimulatorische Effekt von NADPH auf die Aktivität der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase zu sein (vgl. Kapitel 3.4.3.4).

### 3.4.3.5.2 Bestimmung des $K_m$ - und $v_{max}$ -Wertes für $NADP^+$ und NADPH

Da die partiell aufgereinigte GDP-Mannose-4,6-Dehydratase, wie unter Kapitel 3.4.1.5 gezeigt werden konnte, als Apoenzym vorliegt, war es möglich neben den  $K_m$ - bzw.  $v_{max}$ -Werten für das natürliche Substrat GDP-D-Mannose auch die  $K_m$ - bzw.  $v_{max}$ -Werte für die beiden Pyridinnukleotid-Cofaktoren  $NADP^+$  bzw. NADPH zu bestimmen.

Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte für den Cofaktor  $NADP^+$  durch Variation der  $NADP^+$ -Konzentrationen in einem Bereich zwischen 0 - 10 mM bzw. für NADPH in einem Bereich zwischen 0 - 1 mM (vgl. Ansätze 3 und 4; Kapitel 2.14)

---



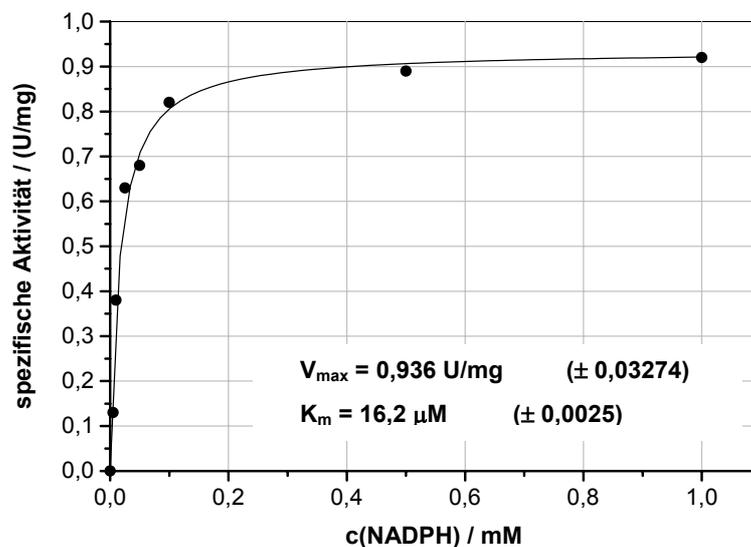
**Abbildung 45:** Bestimmung des  $K_m$ -Wertes für  $NADP^+$  (1 mM GDP-Mannose, 0 – 10 mM  $NADP^+$ , 10 mM  $MgCl_2$ , 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; T = 30 °C)

Unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen konnte für  $\text{NADP}^+$  ein  $K_m$ -Wert von  $240 \mu\text{M}$  und für  $\text{NADPH}$  ein  $K_m$ -Wert von  $16 \mu\text{M}$  ermittelt werden. Die reduzierte Form des Cofaktors,  $\text{NADPH}$ , weist damit eine 15-fach höhere Affinität zur GDP-Mannose-4,6-Dehydratase auf als die oxidierte Form,  $\text{NADP}^+$ .

Die hohe Affinität könnte mit der Rolle von  $\text{NADPH}$  beim intramolekularen Hydridtransfer vom C-4 Kohlenstoffatom des Mannose-Ringes zum C-6 Kohlenstoffatom zusammenhängen. Zu diesem Zweck muss das Enzym neben dem GDP-Zucker-Intermediat auch den vorübergehend reduzierten Cofaktor,  $\text{NADPH}$ , so fest binden, dass es zu keiner Dissoziation während des katalytischen Zyklus kommt (OTHS et al., 1990; SOMOZA et al., 2000)

Für  $\text{NADP}^+$  konnte ein  $v_{\text{max}}$ -Wert von  $0,55 \text{ U/mg}$  (**Abbildung 45**) bestimmt werden. Dieser ist um etwa 40 % niedriger als der ermittelte Wert für  $\text{NADPH}$  mit  $0,93 \text{ U/mg}$  (**Abbildung 46**).

---



---

**Abbildung 46:** Bestimmung des  $K_m$ -Wertes für  $\text{NADPH}$  (1 mM GDP-Mannose, 0 – 1 mM  $\text{NADPH}$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; T = 30 °C)

Das Ergebnis bestätigt damit ebenfalls den in dieser Arbeit beobachteten aktivitätssteigernden Einfluss von  $\text{NADPH}$  auf die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase. Dieser kann jedoch nicht

durch die bereits in der Literatur beschriebenen postulierten Reaktionsmechanismen für die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (OTHS et al., 1990; SOMOZA *et al.*, 2000) erklärt werden, da hier NADPH nur als „vorübergehendes“ Intermediat auftritt und es zu keiner Freisetzung während des katalytischen Zyklus kommt.

### 3.4.3.5.3 Zusammenfassende Diskussion der kinetischen Daten der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase

Im folgenden sollen die in der vorliegenden Arbeit generierten kinetischen Daten mit bereits veröffentlichten kinetischen Daten zur GDP-Mannose-4,6-Dehydratase verglichen werden.

Die nachfolgende **Tabelle 9** gibt einen Überblick über die mittlerweile publizierten kinetischen Daten für die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase aus *Escherichia coli*, Mensch und Schweineschilddrüsen.

Wie aus **Tabelle 9** ersichtlich, liegen die in dieser Arbeit ermittelten  $K_m$ -Werte für das natürliche Substrat GDP-Mannose von 206  $\mu\text{M}$  bzw. 280  $\mu\text{M}$  ( $K_m$ -Werte wurden mit unterschiedlichen Cofaktorkonzentrationen ermittelt, **vgl. Kapitel 2.14**) in der gleichen Größenordnung wie bereits veröffentlichte  $K_m$ -Werte anderer Arbeitsgruppen für die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase aus *Escherichia coli*. Für das natürliche Substrat GDP-Mannose konnte von STURLA ein  $K_m$ -Wert von 220  $\mu\text{M}$ , SULLIVAN ein  $K_m$ -Wert von 260  $\mu\text{M}$  und von SOMOZA ein  $K_m$ -Wert von 280  $\mu\text{M}$  für das Enzym aus *E. coli* bestimmt werden (STURLA et al., 1997; SULLIVAN et al., 1998; SOMOZA et al., 1999).

**Tabelle 9:** Vergleich der generierten kinetischen Daten der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) mit publizierten Literaturdaten.

Organismus/Referenz/ Bemerkungen	$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]			$K_i$ [ $\mu\text{M}$ ]
	GDP-Mannose	NADP <sup>+</sup>	NADPH	GDP-Fucose
<i>Escherichia coli</i> „diese Arbeit“	280,5 ± 170,1 <sup>a)</sup>	240,7 ± 170,11 <sup>c)</sup>	16,2 ± 0,00251 <sup>c)</sup>	-
Bestimmung erfolgte mit dem partiell gereinigten nativen Enzym.	206,2 ± 42,5 <sup>b)</sup>			

## Ergebnisse und Diskussion

<i>Escherichia coli</i> STURLA et al., 1997	220 ± 44 <sup>d)</sup>	-	-	-
Bestimmung erfolgte mit dem aufgereinigten GST-Fusionsprotein (Glutathione-S-Transferase).				
Mensch BISSO et al., 1999	L-GMD <sup>e)</sup> 3,64 ± 1,2	-	-	L- & M-GMD 11,25 ± 1,7
Bestimmung erfolgte mit dem aufgereinigten nativen Enzym.				
<i>Escherichia coli</i>	260 <sup>f)</sup>	-	-	IC <sub>50</sub> = 260 <sup>g)</sup>
Mensch SULLIVAN et al., 1998	80			IC <sub>50</sub> = 80
Bestimmung erfolgte für <i>E. coli</i> mit dem nativen Enzym und für die humane GMD mit dem N-terminalen Fusionsprotein .				
<i>Escherichia coli</i> SOMOZA et al., 1999	280 ± 12 <sup>h)</sup>	38 ± 2 <sup>h)</sup>		78,9 ± 10,1
Bestimmung erfolgte mit dem aufgereinigten nativen Enzym.				
Schweineschilddrüse BROSCHAT et al., 1985	3,3	-	-	-

a): Reaktionsbedingungen: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM NADP<sup>+</sup>, 0,1 mM NADPH, T = 30 °C.

b): Reaktionsbedingungen: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM NADP<sup>+</sup>, T = 30 °C.

c): Reaktionsbedingungen: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM GDP-Mannose, T = 30°C.

d): Reaktionsbedingungen: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, T = 37°C.

e): Aus der cDNA Sequenz konnte für die humane GMD drei Formen mit unterschiedlicher Länge abgeleitet werden, wobei nur die L- und die M-Form als lösliches aktives Protein exprimiert werden konnten. Reaktionsbedingungen: 100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8.0 mit 2 mg/ml BSA.

f): Reaktionsbedingungen: 25 mM MOPS, pH 7.0, 100 mM NaCl, 10 mM DTT, 5 mM EDTA, 1 mM NADP<sup>+</sup>, T = 37 °C.

g): IC<sub>50</sub>-Wert für GDP-Fucose in µM.

h): Reaktionsbedingungen: 100 mM MOPS, pH 7.0, 100 mM NaCl, 10 mM DTT, 5 mM EDTA, mit mehreren Messreihen durch Variation der NADP<sup>+</sup>-Konzentration bei konstanter GDP-Mannose-Konzentration, T = 37 °C.

Auffallend ist, dass die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase aus Schweineschilddrüsen (K<sub>m</sub>-Wert von 3,3 µM; BROSCHAT et al., 1985) und die humane GMD (K<sub>m</sub>-Wert von 3,6 µM bzw.

3,5  $\mu\text{M}$ ; BISSO et al., 1999) einen etwa 50-fach niedrigeren  $K_m$ -Wert für das natürliche Substrat GDP-Mannose aufweisen, als das Enzym aus *Escherichia coli*. [In der Arbeit von SULLIVAN konnte für die humane GMD nur ein um etwa das 2-fache niedrigerer  $K_m$ -Wert für die GDP-Mannose bestimmt werden ( $K_m$ -Wert von 80  $\mu\text{M}$ ; SULLIVAN et al., 1998)]

Dennoch scheinen aufgrund der vorliegenden Daten die GDP-Mannose-4,6-Dehydratasen aus „Säugetern“ eine höhere Affinität zum natürlichen Substrat GDP-Mannose aufzuweisen als die bakterielle GDP-Mannose-4,6-Dehydratase aus *Escherichia coli*.

Einen  $K_m$ -Wert für die Cofaktoren findet sich nur für  $\text{NADP}^+$ . Dabei konnte von SOMOZA für  $\text{NADP}^+$  ein  $K_m$ -Wert von 38  $\mu\text{M}$  für die GMD aus *Escherichia coli* ermittelt werden (SOMOZA et al., 1999). Dieser ist damit um etwa das 6-fache niedriger als der in der vorliegenden Arbeit bestimmte  $K_m$ -Wert von 280  $\mu\text{M}$  für den Cofaktor  $\text{NADP}^+$ .

Für den Cofaktor NADPH wurden bisher keine kinetischen Daten generiert. Der in dieser Arbeit ermittelte  $K_m$ -Wert für NADPH von 16  $\mu\text{M}$  ist um etwa das 15-fache niedriger als der  $K_m$ -Wert für  $\text{NADP}^+$  (280  $\mu\text{M}$ ) und lässt damit, wie bereits unter **Kapitel 3.4.3.5.2** erwähnt, den Schluss zu, dass die reduzierte Form des Cofaktors NADPH eine weitaus höhere Affinität zur GDP-Mannose-4,6-Dehydratase aufweist als die oxidierte Form  $\text{NADP}^+$ . Es sollte allerdings bedacht werden, dass es sich hierbei nicht um einen „echten“  $K_m$ -Wert bzw.  $v_{\text{max}}$ -Wert für NADPH handeln kann, da die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase, um überhaupt katalytisch aktiv zu sein, trotzdem mit NADP abgesättigt sein muss. Es müsste ein Experiment durchgeführt werden, welches die Reaktion mit „reinem“ NADPH untersucht. Dies ist aber nur sehr schwer möglich, da kommerziell erhältliches NADPH immer auch  $\text{NADP}^+$  enthält.

Von GINSBURG konnte bereits in den sechziger Jahren eine Endprodukthemmung der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase durch GDP-Fucose festgestellt werden (KORNFELD & GINSBURG, 1966). In den aufgeführten Publikationen wurde in den Arbeiten von SOMOZA und BISSO ein  $K_i$ -Wert für die GDP-Fucose ermittelt. Dabei konnte von SOMOZA ein  $K_i$ -Wert von 78,9  $\mu\text{M}$  für die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase aus *E. coli* und von BISSO ein  $K_i$ -Wert von 11,25  $\mu\text{M}$  für das humane Enzym bestimmt werden (BISSO et al., 1999; SOMOZA et al., 1999).

### **3.4.3.6 Versuch einer präparativen enzymatischen Synthese und Isolierung von GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose ausgehend von GDP- $\alpha$ -D-Mannose**

Für die Etablierung eines Testsystems für die GDP-Fucose Synthetase, sowie zur MS- und NMR-Analyse wurde eine präparative enzymatische Synthese und Isolierung der GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose ausgehend von GDP-Mannose, wie unter **Kapitel 2.16.3** beschrieben, durchgeführt.

50 mg GDP-Mannose wurden unter Verwendung eines Rohextraktes der rekombinanten GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) zunächst zu GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose umgesetzt. Da keine Eichstandards für die GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose vorhanden waren, wurde die Umsetzung mit Hilfe der HPLC-Analytik über die Abnahme der GDP-Mannose (**Kapitel 2.13.1**) verfolgt. Nach vollständiger Umsetzung wurde die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase mittels Ultrafiltration über eine YM10 Membran von der Produktlösung abgetrennt.

Die Aufreinigung bzw. Isolierung der GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose fand mit Hilfe von zwei aufeinanderfolgenden chromatographischen Schritten (Anionenaustauschromatographie & Gelfiltration) statt. Mit Hilfe der Anionenaustauschromatographie wurden zunächst der Tris-Puffer sowie alle ungeladenen Nebenprodukte respektive Verunreinigungen von der GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose abgetrennt. Mit der Verwendung eines Anionenaustauschers macht man sich zunutze, dass der aktivierte Zucker mit seiner geladenen Diphosphatgruppe an das Säulenmaterial binden kann, während die ungeladenen Substrate und Puffersubstanzen, in diesem Falle Tris, nicht an das Säulenmaterial binden können. Bei der folgenden Elution werden die gebundenen Moleküle (aktivierter Zucker) dann durch Cl<sup>-</sup>-Ionen ersetzt und liegen nun abgetrennt von den ungeladenen Verunreinigungen der Ausgangsprobe vor. Als Gelmaterial wurde Dowex-Ionenaustauschermaterial 1 x 2, 100 – 200 mesh (Serva) in der Chlorid-Form verwendet. Nach der Probenaufgabe wurde die GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose mit einem linear ansteigenden NaCl-Gradienten von 0 – 1 M NaCl-Lösung in Millipore Wasser eluiert. Die Fraktionen wurden mit Hilfe der HPLC-Analytik (**Kapitel 2.13.1**) analysiert und diejenigen, welche das Produkt enthielten, gepoolt. Aufgrund des hohen Salzeintrags war die Detektion der GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose sehr erschwert. Bedingt durch den hohen Salzgehalt kam es aller Wahrscheinlichkeit nach während dieses Schrittes zu einer Zersetzung der GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose.

Der erhaltene Pool wurde zur Volumenverkleinerung in einem Rotationsverdampfer bei RT soweit aufkonzentriert, dass das Löslichkeitsprodukt des NaCl-Salzes gerade nicht überschritten wurde. Anschließend schloss sich zur Entsalzung eine präparative Gelfiltration an Sephadex G-10 (Pharmacia) bei 4 °C im Kühlraum an. Dieses Gelmaterial ist zum Entsalzen und Trennen von kleinen Molekülen bis zu einem Molekulargewicht von 700 g/mol geeignet.

Die entsalzten Fraktionen, welche die GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose enthielten wurden gepoolt, bei -20 °C eingefroren und anschließend mittels Lyophilisation getrocknet. Mittels diesem nicht optimierten Ansatz konnten etwa 5 mg der GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose synthetisiert werden, was einer Gesamtausbeute von etwa 10 % entspricht.

Mit dieser Charge wurden zum einen die ersten Versuche zur Etablierung eines Enzymtests für die GDP-Fucose Synthetase durchgeführt und zum anderen versucht die Molmasse (ESI-MS) und Struktur (NMR) zu bestimmen.

Da die Bereitstellung einer größeren Menge des Ketoproduktes für weitere kinetische Untersuchungen der GDP-Fucose Synthetase unerlässlich ist, wurde in der Zwischenzeit von HOH aufbauend auf dieser Arbeit ein optimiertes Synthese- und Aufreinigungsverfahren für die GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose entwickelt, das sich von dem in dieser Arbeit beschriebenen Verfahren völlig unterscheidet (HOH, 2001; RENTMEISTER, 2002).

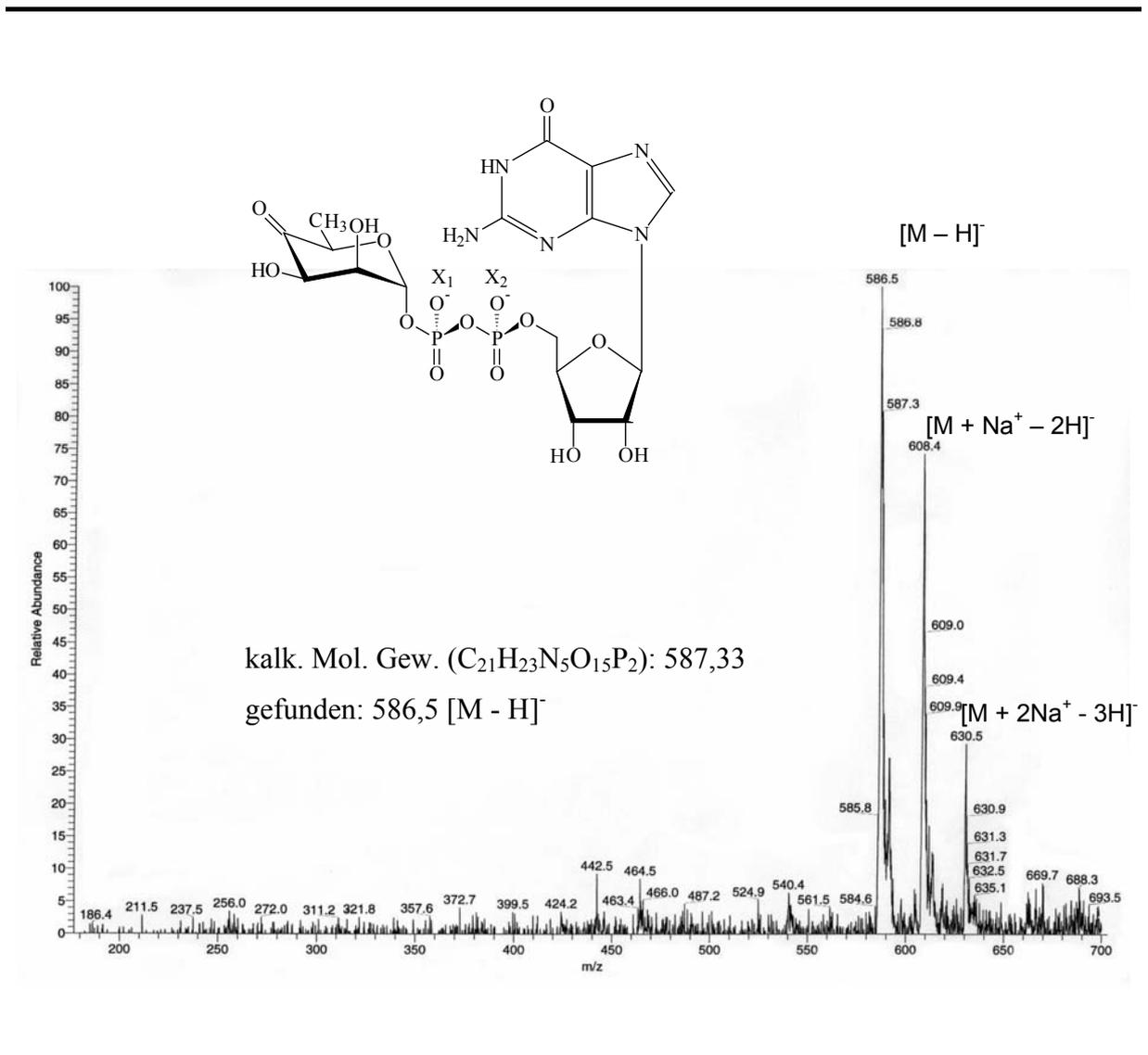
Über eine präparative Synthese und Isolierung der GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose wurde auch bereits von SULLIVAN berichtet (SULLIVAN et al., 1998).

### 3.4.3.7 ESI-MS-Spektrum der GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose

Die Bestimmung der Molmasse der GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose wurde im Arbeitskreis von PROF. DR. C. WANDREY (Institut für Biotechnologie II, Forschungszentrum Jülich GmbH) durchgeführt.

Die molekulare Masse der synthetisierten und isolierten GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose wurde mittels Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS) im Negativ-Ionen Modus bestimmt. Für die GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose (**Abbildung 47**) konnte ein Peak in der Hochmassenregion bei  $m/z$  586,5 beobachtet werden, welcher dem pseudomolekularen Ion  $[M - H]^-$  entspricht. Zusätzlich konnten die pseudomolekularen Ionen mit Natrium bei  $m/z$  608,4  $[M + Na^+ - 2H]^-$ , sowie bei  $m/z$  630,5  $[M + 2Na^+ - 3H]^-$  nachgewiesen werden.

Mit Hilfe der ESI-MS konnte für die GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose ein Molekulargewicht von 586,5  $[M - H]^-$  gefunden werden, das mit dem kalkulierten bzw. errechneten Molekulargewicht ( $C_{21}H_{23}N_5O_{15}P_2$ ) von 587,33 übereinstimmt. Eine Strukturaufklärung des isolierten Produktes mittels NMR-Spektroskopie muss aber noch durchgeführt werden. Erste Messungen mit diesem Substrat lieferten bisher jedoch keine interpretierbaren Ergebnisse.



**Abbildung 47:** ESI-MS (Negativ-Ionen Modus) Spektrum der GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose

Das in der vorliegenden Arbeit ermittelte Molekulargewicht für die GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose stimmt auch mit den bereits veröffentlichten Literaturdaten von YAMAMOTO und SULLIVAN für die GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose überein. YAMAMOTO und seinen

Mitarbeitern, denen zum ersten Mal die Bestimmung des Molekulargewichtes der GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose gelang, ermittelten einen Wert von 586 [M - H]<sup>-</sup> für die GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose mittels ISLC-MS (YAMAMOTO et al., 1993). Der von SULLIVAN und seinen Mitarbeitern bestimmte Wert für das Molekulargewicht der GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose betrug 586,1 [M - H]<sup>-</sup>. Ein Vergleich mit dem publizierten ESI-MS-Spektrum zeigt, dass von SULLIVAN dieselben Peaks beobachtet werden konnten. Weiterhin war auch kein anderes Derivat der GDP-Mannose mit einer unterschiedlichen Masse feststellbar. Der von ihm festgestellte Peak bei 604,0 [M - H]<sup>-</sup> (Peak für restliche GDP-Mannose) konnte in dem hier gezeigten Spektrum (**Abbildung 47**) jedoch nicht beobachtet werden.

Die von SULLIVAN und seinen Mitarbeitern durchgeführte NMR-Spektroskopie ergab, dass es sich bei dem isolierten Produkt um ein Gemisch von zwei verwandten Verbindungen - Zuckernukleotide - handelt, die als GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose und GDP-3-Keto-6-Desoxy-D-Mannose identifiziert werden konnten (SULLIVAN et al., 1998).

### **3.5 Produktion und Reinigung der rekombinanten GDP-Fucose Synthetase bzw. GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose-3,5-Epimerase-4-Reduktase (WcaG /Fcl) aus *Escherichia coli* BL21(DE3)**

Im zweiten Teil des *de novo* Biosyntheseweges der GDP-Fucose wird das im ersten Schritt erhaltene Zwischenprodukt GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose an C-3 und C-5 epimerisiert, was für den Wechsel von der D- zur L-Konfiguration verantwortlich ist und zur GDP-4-Keto-6-Desoxy-L-Galactose führt. Anschließend wird im letzten Schritt die Ketogruppe am C-4 in einer NADH bzw. NADPH abhängigen Reaktion reduziert, was dann zur Bildung der GDP-β-L-Fucose führt.

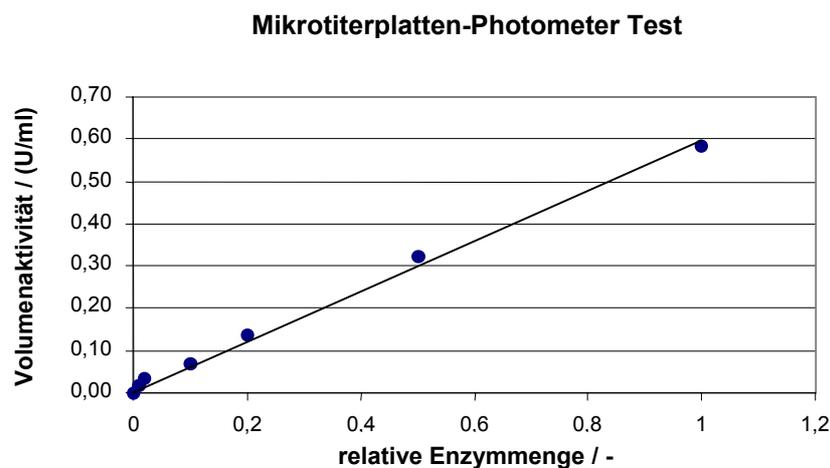
Ogleich frühere Untersuchungen mit anderen Nukleotidzuckern den Schluß nahe legten, dass zwei verschiedene Enzyme an diesen Reaktionen beteiligt sind (MELO & GLASER, 1968; GAUGLER & GABRIEL, 1973), konnte doch keines der beiden Enzyme eindeutig identifiziert werden. Erstmals gelang es dann CHANG und seinen Mitarbeitern aus Schweineschilddrüsen ein bifunktionelles Enzym zu isolieren, welches sowohl die Epimerisierung als auch die anschließende Reduktion katalysiert und deshalb als GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose-3,5-Epimerase-4-Reduktase bezeichnet wurde (CHANG et al., 1988). Später erhielt das Enzym dann die Bezeichnung GDP-Fucose Synthetase (GFS).

In der Zwischenzeit konnten von verschiedenen Arbeitsgruppen weitere GDP-Fucose Synthetasen aus unterschiedlichen Quellen isoliert bzw. kloniert und exprimiert werden (MORELLI & DE FLORA, 1977; MORELLI et al., 1977; TONETTI et al., 1996; MERGAERT et al., 1997; ANDRIANOPOULOS et al., 1998; SULLIVAN et al., 1998; ALBERMANN et al., 2000; BONIN & REITER, 2000). Bei der GDP-Fucose Synthetase aus *Escherichia coli* handelt es sich um ein bifunktionelles Enzym, was auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte.

### 3.5.1 Entwicklung eines Enzymtest für die GDP-Fucose Synthetase

Zur Quantifizierung der GDP-Fucose Synthetase Aktivität war es notwendig, wie zuvor für die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase, ein Testsystem zu etablieren.

---



---

**Abbildung 48:** Überprüfung der Linearität des verwendeten Enzymtests zur Aktivitätsbestimmung der GDP-Fucose Synthetase. Aufgetragen wurde die volumetrische Enzymaktivität gegen die relative eingesetzte Katalysatormenge.

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei der GDP-Fucose Synthetase um ein bifunktionelles Enzym, welches sowohl die Epimerisierung der GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose an C-3 und C-5, als auch die anschließende Reduktion katalysiert. Diese Reduktion der Ketogruppe

am C-4 ist NADPH abhängig und kann daher bei 340 nm photometrisch über die Abnahme der Extinktion  $E$  verfolgt werden.

Der verwendete photometrische Enzymtest zur Bestimmung der GFS-Aktivität beruht auf der Feststellung, dass die Änderung der NADPH-Konzentration äquivalent zur Konzentration an umgesetzter GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose bzw. zur Konzentration an gebildeter GDP-Fucose ist. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von NADPH zum Ansatz gestartet und die Abnahme der Extinktion bei 340 nm in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Molecular Devices, Menlo Park, USA) verfolgt. Der verwendete Enzymtest setzte sich dabei wie unter **Kapitel 2.13.3.5** beschrieben zusammen. Als Kontrolle diente der Vergleich zu einer „blank“-Messung, die unter identischen Bedingungen jedoch ohne Substratzugabe durchgeführt wurde. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte entsprechend der unter **Kapitel 2.13.3.5** beschriebenen Formel.

Schwierigkeiten bei der Etablierung des Aktivitätstests ergaben sich zu Anfang aus der schlechten Verfügbarkeit des Substrates GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose (Ketoprodukt) für die GDP-Fucose Synthetase bzw. GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose-3,5-Epimerase-4-Reduktase. Mittels einer präparativen enzymatischen Synthese und Isolierung des Ketoproduktes konnten diese Schwierigkeiten jedoch gelöst werden (**vgl. Kapitel 3.4.3.6**).

Um die Leistungsfähigkeit des photometrischen Aktivitätstests der GDP-Fucose Synthetase beurteilen zu können, wurde die Abhängigkeit der volumetrischen Aktivität der GDP-Fucose Synthetase von der eingesetzten Katalysatormenge untersucht. Es wurde eine Charge des mittels IMAC aufgereinigten Enzyms (**siehe Kapitel 3.5.4**) in verschiedenen Verdünnungsstufen eingesetzt. Dabei entsprach der Wert von 1,0 der normalerweise im Aktivitätstest eingesetzten Enzymmenge. Wie der **Abbildung 48** zu entnehmen ist, verhält sich die volumetrische Aktivität proportional zur eingesetzten Enzymmenge. Der Enzymtest ist damit geeignet für die Aktivitätsbestimmung der GDP-Fucose Synthetase.

Alternativ zum oben beschriebenen Photometertest wurde die Bildung der GDP-Fucose auch mit Hilfe der HPLC- bzw. CE-Analytik verfolgt (**Kapitel 2.13**).

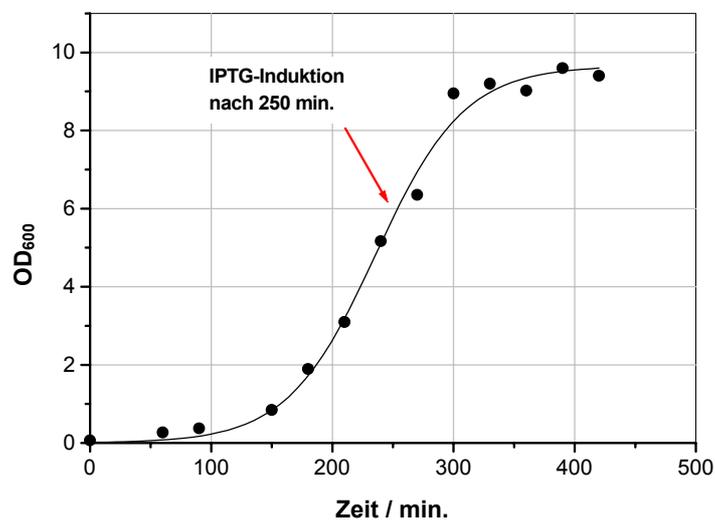
### **3.5.2 Fermentation von *Escherichia coli* BL21(DE3) pSWJ-5 (pET16b/wcaG)**

Die Fermentation der rekombinanten GDP-Fucose Synthetase (His-WcaG / His-Fcl) erfolgte in Analogie zu den bisher beschriebenen Fermentationen. Den Wachstumsverlauf des

rekombinanten *E. coli* Stammes - *E. coli* BL21(DE3) pSWJ-5 (pET16b/*wcaG*) - während der Fermentation gibt die folgende **Abbildung 49** wieder.

Nach Animpfen des Fermenters mit einer Vorkultur, die über Nacht angezogen worden war, erreichte die Kultur nach einer etwa dreistündigen lag-Phase ein exponentielles Wachstum. Während dieser Phase erfolgte die Induktion der Proteinüberproduktion durch Zugabe von 0,4 mM IPTG zum Kulturmedium. Nach weiteren drei Stunden, beim Übergang der Kultur in die stationäre Phase, wurden die Zellen dann durch das Abtrennen vom Kulturmedium mittels Zentrifugation abgeerntet.

---



---

**Abbildung 49:** Wachstumskurve von *E. coli* BL21(DE3) pSWJ-5 (pET16b/*wcaG*) im Fermenter

Wie bereits in **Kapitel 3.2.1** erwähnt, besitzen die Fermentationen der rekombinanten *E. coli*-Stämme noch ein großes Optimierungspotential, wenn man die Expression der Proteine noch weiter steigern möchte. Durch Fermentation im 15 Liter Maßstab konnte die rekombinante *N*-terminal His-getaggte GDP-Fucose Synthetase (His-*WcaG*) mit einer Ausbeute von etwa 230 g Zellen (Feuchtwicht) und einer volumenspezifischen Aktivität von etwa 912 U/L<sub>Medium</sub> (60 U/g Zellfeuchtmasse) erhalten werden, was einer Gesamtaktivität von 13680 U entspricht.

### 3.5.3 Zellaufschluss

Nach der Herstellung einer 30 %-igen Zellsuspension (w/w), Aufschluss mittels Ultraschall (vgl. dazu Kapitel 3.4.1.2) und Sedimentation der Zelltrümmer wurde der zellfreie Überstand zur weiteren Aufreinigung auf eine Ni-NTA-Säule aufgetragen.

### 3.5.4 Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie der GDP-Fucose Synthetase

Die Aufreinigung der GDP-Fucose Synthetase (Fcl/WcaG) erfolgte aufgrund ihres N-terminalen His-tags unter Verwendung einer Immobilisierten Metallionen Affinitätschromatographie oder kurz IMAC.

---

The image shows a grey rectangular box containing text. At the top, it reads 'GDP-Fucose Synthetase' in blue, followed by 'GFS' in bold blue, and '(bisher nicht klassifiziert)' in blue. Below this, it says 'Ni-NTA Aufreinigung' in bold black. There are two bullet points: '➤ 60 U/g Zellfeuchtmasse (13680 U)' and '➤ A<sub>m</sub>: ~ 1 U/mg'. At the bottom, there is another bullet point: '➤ Verlust von Enzym während der Ultrafiltration'.

---

**Abbildung 50:** „Zusammenfassung“ der Daten zur Aufreinigung der GDP-Fucose Synthetase

Nach dem Auftragen des Rohextraktes auf die Ni-NTA (**N**ickel-**N**itrilo**t**riacetoessigsäure) wurde die Säule solange mit Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0 mit 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM

NaCl, 5 mM Mercaptoethanol und 20 mM Imidazol) gespült, bis alle nichtbindenden Proteine von der Säule eluiert waren. Anschließend erfolgte die Elution der GDP-Fucose Synthetase in einer einzigen Stufe mit 200 mM Imidazol im Puffersystem (50 mM Tris-HCl, pH 8,0 mit 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Mercaptoethanol, 10 % (v/v) Glycerin und 200 mM Imidazol; **vgl. auch Kapitel 2.15.4**).

Die GDP-Fucose Synthetase-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und anschließend mittels Ultrafiltration über eine YM10-Membran entsalzt und aufkonzentriert. Das Retentat (Enzympräparation) wurde auf 50 % (v/v) Glycerin gebracht und bis zu seiner weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Bei der Entsalzung und Aufkonzentrierung der Enzympräparation konnte ein Ausfallen des Proteins in der Ultrafiltrationzelle beobachtet werden. Dies könnte auf den hohen Imidazolgehalt (200 mM) im Eluat zurückzuführen sein. Um zukünftig die Enzymverluste während der Aufkonzentrierung zu minimieren, könnte sich nach dem Poolen der aktiven GFS-Fraktionen alternativ ein Gelfiltrationsschritt über Sephadex G-25 zur Entsalzung anschließen. Nach Entfernen des Imidazols könnte dann die Aufkonzentrierung des Gelfiltrationspools mittels Ultrafiltration über eine YM10-Membran erfolgen.

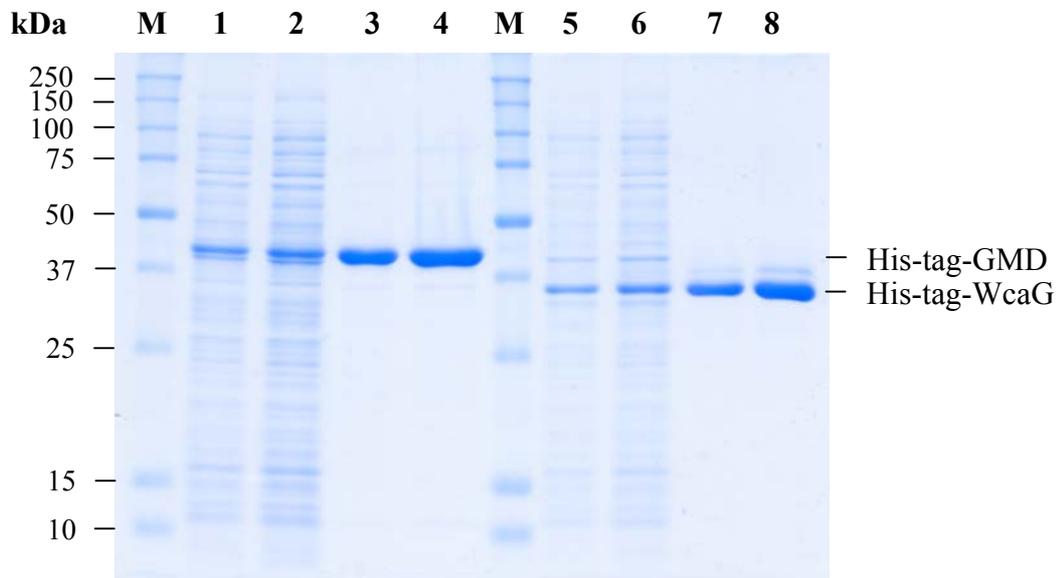
In ersten Aktivitätstests konnte für den Rohextrakt der GDP-Fucose Synthetase eine volumetrische Aktivität von etwa 20 U/ml und eine spezifische Aktivität von etwa 1 U/mg ermittelt werden (**Abbildung 50**). Eine genaue Bestimmung der Enzymaktivitäten in Form einer Aufreinigungstabelle wurde nicht durchgeführt, da zum Zeitpunkt der Aufreinigung der Enzymtest für die GDP-Fucose Synthetase noch nicht etabliert worden war. Bei der Aufreinigung wurde aufgrund des vorhandenen *N*-terminalen His-tag davon ausgegangen, dass es sich bei dem eluierten Peak um die GDP-Fucose Synthetase handelt, so dass zur Bestimmung der aktiven Fraktionen auf einen Aktivitätstest verzichtet wurde. Außerdem stand zum Zeitpunkt der Aufreinigung das Substrat, die GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose, noch nicht in ausreichender Menge zur Verfügung.

Mittlerweile konnte die Bereitstellung der GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose sichergestellt und der Enzymtest für die GDP-Fucose Synthetase (**s. Kapitel 3.5.5**) endgültig etabliert werden (HOH, 2001; RENTMEISTER, 2002).

Eine SDS-PAGE-Analyse der Aufreinigung (**Abbildung 51**) ergab für die mit einem *N*-terminalen His-tag versehene GDP-Fucose Synthetase ein Molekulargewicht von 36,3 kDa (36,1 kDa: Berechnetes Molekulargewicht aus der Aminosäuresequenz des nativen Enzyms). Das Gel zeigt weiterhin, dass in einem einzigen chromatographischen Schritt über Ni-NTA

die GDP-Fucose Synthetase nahezu bis zur Homogenität - lediglich eine gefärbte Bande - aufgereinigt werden konnte.

---



---

**Abbildung 51:** Aufreinigung von His-tag-GMD und His-tag-WcaG/Fcl. SDS-PAGE-Analyse von in *E. coli* BL21 (DE3) produziertem His-tag-GMD und His-tag-WcaG/Fcl. **His-tag-GMD:** **Spur 1, 2:** Gesamtzellextrakt; **Spur 3, 4:** nach Reinigung mit Ni-NTA-Agarose. **His-tag-WcaG/Fcl:** **Spur 5, 6:** Gesamtzellextrakt; **Spur 7,8:** nach Reinigung mit Ni-NTA-Agarose. Es wurden jeweils ca. 30 µg Gesamtprotein (**Spur 1, 3, 5 und 7**) bzw. ca. 60 µg Gesamtprotein (**Spur 2, 4, 6 und 8**) auf ein 10 %-iges Trenngel aufgetragen. **M:** Molekulargewichtsstandard; die Größen der Markerproteine sind in kDa angegeben.

Für das Molekulargewicht des nativen Enzyms finden sich in der Literatur verschiedene Angaben. CHANG und Mitarbeiter kamen in ihrer Arbeit zu dem Ergebnis, dass die GDP-Fucose Synthetase aus Schweineschilddrüsen als ein Homodimer vorliegt. Dabei konnte von ihnen ein natives Molekulargewicht von 63,1 kDa und mittels SDS-PAGE-Analyse ein Molekulargewicht von 31,5 kDa für die Untereinheiten bestimmt werden (CHANG et al., 1988). Das die GDP-Fucose Synthetase als Homodimer vorliegt konnte später auch sowohl für die humane GDP-Fucose Synthetase, auch als FX-Protein bezeichnet (natives Molekulargewicht: 68 kDa; SDS-PAGE: 40 kDa; MALDI-TOF Massenspektrometrie: 35,9 kDa;

TONETTI et al., 1996), als auch für die GDP-Fucose Synthetase aus *E. coli* (natives Molekulargewicht: 70 kDa; SDS-PAGE: 35 kDa; TONETTI et al., 1998) gezeigt werden.

In der Zwischenzeit konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen die Struktur der GDP-Fucose Synthetase aus *Escherichia coli* mittels röntgenkristallographischer Untersuchungen aufgeklärt (RIZZI et al., 1998; SOMERS et al., 1998; ROSANO et al., 2000) werden.

Ein etwas widersprüchliches Ergebnis findet sich in der Publikation von ALBERMANN. Dieser stellte nämlich im Rahmen seiner Arbeiten zur GDP-Fucose Synthetase aus *Escherichia coli* fest, dass diese als Monomer vorliegt. Die Untersuchungen wurden nicht mit einer nativen GDP-Fucose Synthetase, sondern mit einer GDP-Fucose Synthetase durchgeführt die mit einem *N*-terminalen His-tag (His-FcI) überexprimiert worden war. Dabei konnte von ALBERMANN für das native His-tag-Fusionsprotein ein Molekulargewicht von 40 kDa und mittels SDS-PAGE-Analyse ein Molekulargewicht von 38,5 kDa bestimmt werden, was darauf hin deutete, dass das Protein als Monomer vorlag. Als mögliche Ursache wurde das Vorhandensein des *N*-terminalen His-Tag angeführt. Dieser behindere die Ausbildung der quartären Struktur in Form eines Homodimers, wie sie normalerweise für das native Enzym beobachtet werden kann. Das führe dann zu der beobachteten monomeren Form der GFS, ohne dabei jedoch die Aktivität des Enzyms zu beeinflussen (ALBERMANN et al., 2000).

Dieser Sachverhalt ist insofern interessant, da die in dieser Arbeit klonierte GDP-Fucose-Synthetase ebenfalls mit einem *N*-terminalen His-tag überexprimiert wurde. Eine Bestimmung des nativen Molekulargewichtes wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

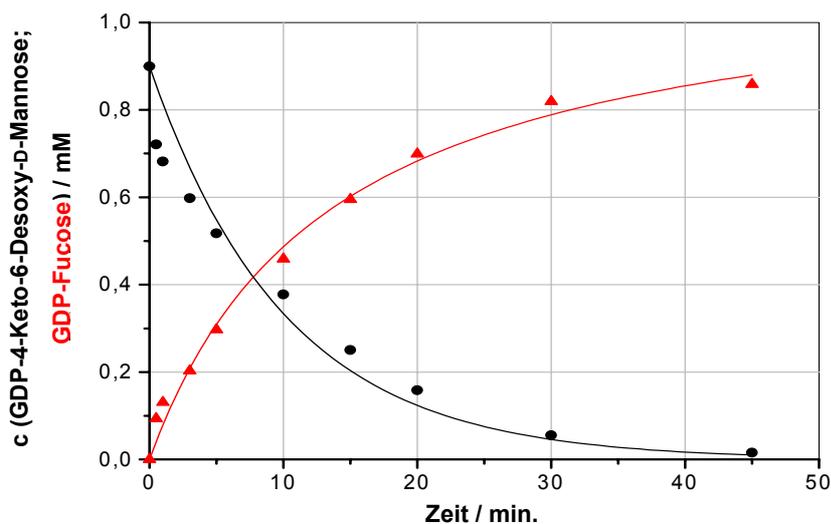
### **3.5.5 *N*-terminale Sequenzanalyse der GDP-Fucose Synthetase**

Zur *N*-terminalen Sequenzanalyse der GDP-Fucose Synthetase wurde ein Aliquot des Zellaufschlusses und des IMAC-aufgereinigten Enzyms (vgl. **Abbildung 50**) über SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Trotz mehrerer Versuche konnten, wie zuvor bei der mit einem *N*-terminalen His-tag überproduzierten GDP-Mannose-4,6-Dehydratase, keine Sequenzdaten erhalten werden, da auch hier der *N*-terminal gelegene His-tag die Sequenzierungsreaktion zu stören schien.

### 3.6 Anwendung der GDP-Fucose Synthetase zur Synthese von GDP-Fucose

In einem ersten Versuch wurde in einer Batch-Reaktion GDP-Fucose ausgehend von GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose mit Hilfe der aufgereinigten GDP-Fucose Synthetase synthetisiert.

Dabei wurde der unter **Kapitel 2.17** beschriebene Ansatz verwendet. Den Reaktionsverlauf gibt die nachfolgende **Abbildung 52** wieder. Wie daraus ersichtlich, geht die Reaktion sofort nach dem Start des Ansatzes mit NADPH in einen linearen Verlauf über. Im Unterschied zu der von der GDP-Mannose-4,6-Dehydratase katalysierten Reaktion konnte bei der GDP-Fucose Synthetase Reaktion das Auftreten einer lag-Phase nicht beobachtet werden.

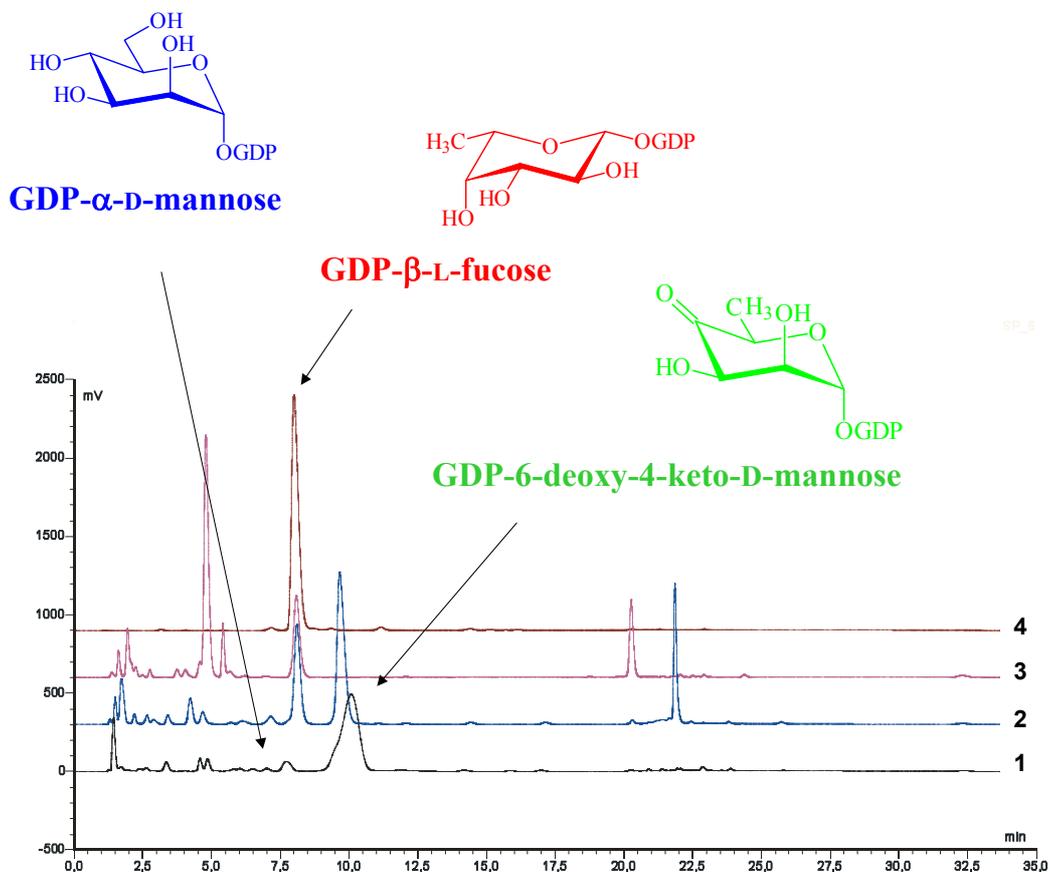


**Abbildung 52:** Reaktionsverlauf der GDP-Fucose Synthetase-Reaktion. ●: GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose, ▲: GDP-Fucose.

Innerhalb von etwa 45 Minuten kam es zu einer quantitativen Umsetzung der GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose zur GDP-Fucose. Der Cofaktor NADPH wurde dem Ansatz dabei in stöchiometrischen Mengen zugesetzt.

### 3.7 Qualitative Analyse der enzymatischen Synthese von GDP-Fucose aus GDP-Mannose

In diesem Versuch wurden die rekombinanten Enzyme GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) und GDP-Fucose Synthetase (GFS) zur enzymatischen Synthese von GDP-Fucose ausgehend von GDP-Mannose eingesetzt.



**Abbildung 53:** Verwendung von Rohextrakten der rekombinanten Enzyme GDP-Mannose 4,6-Dehydratase und Fucose-Synthetase zur Synthese von GDP-Fucose ausgehend von GDP-Mannose. **1:** Umsetzung GDP-Mannose (1,0 mM) zur GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose; **2:** Zugabe von GFS zum Ansatz; **3:** GDP-Fucose nach Phosphatase; **4:** GDP-Fucose Standard.

Die Reaktion erfolgte dabei in zwei aufeinanderfolgenden Schritten. Dies war notwendig, da die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase durch das Endprodukt GDP-Fucose stark inhibiert wird

(Feedback-Inhibition). Diese wurde bereits von GINSBURG in den sechziger Jahren für das Enzym aus *Aerobacter aerogenes* beschrieben (KORNFELD & GINSBURG, 1966). Die durch die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase und GDP-Fucose Synthetase katalysierten enzymatischen Reaktionen wurden mittels HPLC-Analytik (**Kapitel 2.13.1; Abbildung 53**) verfolgt.

Im ersten Schritt wurde die GDP-Mannose in der durch die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase katalysierten Reaktion zur GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose umgesetzt. Nach vollständiger Umsetzung der GDP-Mannose zum Ketoprodukt (1,0 mM) wurde dem Ansatz im zweiten Schritt die Fucose-Synthetase und NADPH als Cofaktor zugesetzt. Dabei konnte die Bildung von GDP-Fucose beobachtet werden. Zur Verifizierung der Umsetzung bzw. Bildung der GDP-Fucose wurde zusätzlich ein GDP-Fucose Eichstandard auf der HPLC analysiert.

Im der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die rekombinanten Enzyme GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) und GDP-Fucose Synthetase (GFS) ausreichend sind, um die Synthese der GDP-Fucose ausgehend von GDP-Mannose zu katalysieren. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit den bereits publizierten Arbeiten anderer Arbeitsgruppen (ANDRIANOPOULOS et al., 1998; SULLIVAN et al., 1998; TONETTI et al., 1998; ALBERMANN et al., 2000; BONIN & REITER, 2000).

Mittels röntgenkristallographischer Untersuchungen konnte in der Zwischenzeit auch eindeutig belegt werden, dass es sich bei der GFS um ein bifunktionelles Enzym handelt, das sowohl die Epimerisierung, als auch die Reduktion, am gleichen aktiven Zentrum katalysiert. Dies ist ein wichtiger Aspekt, der die Biosynthese der GDP-Fucose von den Biosynthesewegen anderer Desoxy- bzw. Didesoxy-Zuckern unterscheidet. Bei diesen Biosynthesewegen wird die 3,5-Epimerisierung und die 4-Keto-Reduktion von zwei separaten Enzymen, die von zwei voneinander unabhängigen Genen codiert werden, katalysiert (RIZZI et al., 1998; SOMERS et al., 1998; MENON et al., 1999; ROSANO et al., 2000; SOMOZA et al., 2000).

Um die beiden Enzymreaktionen später in einer präparativen Synthese einsetzen zu können, bedarf es noch einer weiteren Charakterisierung der GFS-Reaktion. Arbeiten dazu sind am Institut für Biotechnologie II im Forschungszentrum Jülich GmbH im Rahmen einer Diplomarbeit und Dissertation im Gange (HOH, 2001).

Die vorliegende Arbeit war in einem Projekt angesiedelt, dessen Ziel es war, einen Baukasten von Enzymen aus den Biosynthesewegen GDP-aktivierter Zucker zusammenzustellen, um so den Zugang für die präparative enzymatische Synthese von GDP-Mannose und der aktivierten 6-Desoxyhexose GDP-Fucose zu eröffnen.

Nachdem nun im Rahmen dieser Arbeit zum einen die restlichen Enzyme des *de novo* Biosyntheseweges der GDP-Fucose kloniert und in geeigneten Wirtsstämmen überexprimiert werden konnten und zum anderen einfache Verfahren zur Gewinnung größerer Enzymmengen etabliert werden konnten, sollte es das Ziel nachfolgender Arbeiten sein alle vier rekombinanten Enzyme – Phosphomannomutase (PMM), GDP-Mannos-Pyrophosphorylase (GDP-ManPP), GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) und Fucose Synthetase (GFS) - zu koppeln, um so mittels einer präparativen enzymatischen Synthese ausgehend von D-Mannose, einen preisgünstigen Zugang zur GDP-Fucose zu erhalten.

Längerfristig könnten diese Enzyme aus den Biosynthesewegen aktivierter GDP-Hexosen und GDP-Desoxyhexosen auch zusammen mit Glykosyltransferasen - Mannosyltransferasen und Fucosyltransferasen - zur präparativen enzymatischen Synthese modifizierter Glykokonjugatstrukturen eingesetzt werden.

## 4 Zusammenfassung

Für die Untersuchung und Manipulation von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen werden zunehmend Oligosaccharidstrukturen in größeren Mengen benötigt. Um derartige Verbindungen enzymatisch herstellen zu können, müssen einerseits Glykosyltransferasen und andererseits deren Substrate, die Nukleotidzucker, in ausreichenden Mengen bereitgestellt werden.

Die Etablierung einer enzymatischen Synthese der GDP-Fucose ist aus mehreren Gründen interessant. Zum einen ist dieser aktivierte Zucker, als wichtiger Bestandteil von Glykokonjugaten, für die Forschung auf dem Gebiet der Glykobiologie unerlässlich und zum anderen stellen Nukleotidzucker, allen voran die GDP-Fucose, nach wie vor einen beträchtlichen Kostenfaktor dar, wenn man sie in stöchiometrischen Mengen in einer Synthese einsetzen will. Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Voraussetzungen für die enzymatische Synthese dieser wichtigen 6-Desoxyhexose zu schaffen:

Um zuverlässige Enzymquellen in Form von rekombinant verfügbaren Biosyntheseenzymen bereitzustellen, wurden im ersten Teil der Arbeit die Gene *gmd* und *wcaG*, die für die beiden Biosyntheseenzyme GDP-Mannose-4,6-Dehydratase und das bifunktionelle Enzym GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose 3,5-epimerase 4-reduktase (GDP-Fucose Synthetase) kodieren, einzeln aus dem *wca*-Gencluster von *Escherichia coli* K-12 kloniert und die rekombinanten Enzyme anschließend in *E. coli* BL21(DE3) überproduziert. Die bereits aus der Arbeit von RITTER (RITTER, 1995) als rekombinante Proteine verfügbaren Enzyme Phosphomannomutase und GDP-Mannose Pyrophosphorylase wurden reaktiviert und ebenfalls in *E. coli* BL21(DE3) überproduziert.

Das rekombinante Enzym Phosphomannomutase (RfbK / ManB) [EC 5.4.2.8] konnte durch Fermentation im 15 L Maßstab mit einer Gesamtaktivität von 10900 U (69 U/g Zellfeuchtmasse) produziert und partiell bis zu einer für die Synthese ausreichenden Reinheit mit einer Ausbeute von 75 % aufgereinigt werden. Mittels *N*-terminaler Sequenzanalyse konnte gezeigt werden, dass es sich um das Enzym aus *Salmonella enterica* LT2 handelt.

Durch eine Fermentation im 15 L Maßstab konnte die rekombinante GDP-Mannose Pyrophosphorylase (RfbM / ManC) [EC 2.7.7.13] mit einer Gesamtaktivität von 10700 U (75 U/g Zellfeuchtmasse) produziert und partiell bis zu einer für die Synthese ausreichenden Reinheit mit einer Ausbeute von 76 % aufgereinigt werden. Durch *N*-terminale

Sequenzanalyse konnte ebenfalls verifiziert werden, dass es sich bei dem überproduzierten Protein um das Enzym aus *Salmonella enterica* LT2 handelt.

Die rekombinante GDP-Mannose-4,6-Dehydratase (GMD) [E.C. 4.2.1.47] konnte durch Fermentation im 20 L Maßstab mit einer Gesamtaktivität von 2800 U (10,1 U/g Zellfeuchtmasse) produziert und partiell bis zu einer für die Synthese ausreichenden Reinheit mit einer Ausbeute von 87 % aufgereinigt werden. Durch eine N-terminale Sequenzanalyse konnte eindeutig gezeigt werden, dass es sich bei dem überproduzierten Protein tatsächlich um das Enzym aus *Escherichia coli* handelt. Für die Charakterisierung und Quantifizierung der GMD wurde ein nicht radioaktiver Enzymtest entwickelt und im Laufe der Arbeit optimiert. Dabei konnte bei der Aktivitätsbestimmung der GMD das Auftreten einer lag-Phase zu Beginn der Reaktion beobachtet werden, ein Phänomen, das bis dahin für die GMD noch nicht beschrieben worden war. Versuche mit dem partiell aufgereinigten Enzym zeigten, dass das Enzym nach Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose FF als Apoenzym, also ohne gebundenen Cofaktor, vorliegt. Die für das Enzym aus *Escherichia coli* festgestellte NADP<sup>+</sup>-Spezifität deckt sich mit den Ergebnissen für GDP-Mannose-4,6-Dehydratasen aus anderen Quellen. Zugabe von NAD<sup>+</sup> als Cofaktor führte zu keiner Umsetzung. Entgegen anderer Veröffentlichungen konnte bei diesen Versuchen auch eine Beeinflussung der GMD-Aktivität durch die „exogene“ Zugabe des Cofaktors NADP<sup>+</sup> beobachtet werden. Neben der Absolutkonzentration des Cofaktors NADP<sup>+</sup> scheint aber auch die oxidierte (NADP<sup>+</sup>) und reduzierte Form (NADPH) des Pyridinnukleotidcofaktors eine Rolle zu spielen. Der beobachtete starke stimulatorische Effekt von NADPH lässt sich jedoch nicht durch den Reaktionsmechanismus der GMD erklären.

Für die GDP-Mannose-4,6-Dehydratase aus *E. coli* konnte ein K<sub>m</sub>-Wert von 206 µM bzw. 280 µM für das natürliche Substrat GDP-Mannose ermittelt werden. Da das Enzym nach der Aufreinigung als Apoenzym vorliegt konnten auch für die Cofaktoren NADP<sup>+</sup> (240 µM) und NADPH (16 µM) K<sub>m</sub>-Werte bestimmt werden.

Mittels der rekombinanten GMD wurde eine präparative enzymatische Synthese und Isolierung der GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose ausgehend von GDP-α-D-Mannose durchgeführt. Die GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose konnte dabei mit einer Gesamtausbeute von etwa 10 % synthetisiert werden. Zur Verifizierung des isolierten Produktes wurde anschließend die Molmasse mittels ESI-MS bestimmt.

Die als His-Tag Fusionsprotein überproduzierte GDP-Fucose Synthetase (His-Fcl / His-WcaG) [EC nicht klassifiziert] konnte durch Fermentation im 15 L Maßstab mit einer

Gesamtaktivität von 13680 U (60 U/g Zellfeuchtmasse) produziert und nahezu bis Homogenität mittels Immobilisierter Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC) aufgereinigt werden. Zur Quantifizierung der Fcl-Aktivität konnte neben einer HPLC-Analytik auch ein Photometer-Test etabliert werden.

Mit der isolierten GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose und der aufgereinigten GFS gelang in einer batch-Reaktion die Synthese von GDP-Fucose und damit der Nachweis, dass es sich bei der aufgereinigten GFS tatsächlich um ein bifunktionelles Enzym handelt.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der beiden rekombinanten Enzyme GDP-Mannose 4,6-Dehydratase und Fucose-Synthetase ausreichend ist für die Synthese von GDP-Fucose ausgehend von GDP-Mannose.

Durch diese Arbeit konnten die Grundlagen geschaffen werden, die einen späteren Einsatz der rekombinanten Enzyme im Rahmen einer präparativen enzymatischen Synthese der GDP-Fucose erlauben.

## 5 Literatur

- ADELHORST, K. & G. M. WHITESIDES:** Large-scale synthesis of L-fucopyranosyl phosphate and the preparation of GDP-L-fucose. *Carbohydr. Res.* **242**, 69-76 (1993)
- ALBERMANN, C.; J. DISTLER & W. PIEPERSBERG:** Preparative synthesis of GDP- $\beta$ -L-fucose by recombinant enzymes from enterobacterial sources. *Glycobiology* **10**, 875-881 (2000)
- ALLEN, P.; C. A. HART & J. R. SAUNDERS:** Isolation from *Klebsiella* and characterization of two *rca* genes that activate colanic acid capsular biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 331-340 (1987)
- ALMEIDA, R.; M. AMADO, L. DAVID, S. B. LEVERY, E. H. HOLMES, G. MERKX, A.G. VAN KESSEL, E. RYGAARD, H. HASSAN, E. BENNETT & H. CLAUSEN:** A family of human  $\beta$ 4-galactosyltransferases – cloning and expression of two novel UDP-galactose: $\beta$ -N-acetylglucosamine  $\beta$ 1,4-galactosyltransferases,  $\beta$ 4Gal-T2 and  $\beta$ 4Gal-T3. *J. Biol. Chem.* **272**, 31979-31991 (1997)
- ALTMANN, E.; J. R. BRISSON, S. M. GAGNE, J. KOLBE, P. MESSNER & U. B. SLEYTR:** Structure of the glycan chain from the surface layer glycoprotein of *Clostridium thermohydrosulfuricum* L77-66. *Biochim. Biophys. Acta* **1117**, 71-77 (1992)
- ALTRIA, K. D.:** Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A* **856**, 443-463 (1999)
- AMADO, M.; R. ALMEIDA, F. CARNEIRO, S. B. LEVERY, E. H. HOLMES, M. NOMOTO, M. A. HOLLINGSWORTH, H. HASSAN, T. SCHWIENSTEK, P. A. NIELSEN, E. BENNETT & H. CLAUSEN:** A family of human  $\beta$ 3-galactosyltransferases – characterization of four members of a UDP-galactose: $\beta$ -N-acetylglucosamine/ $\beta$ -N-acetylgalactosamine  $\beta$ 3-galactosyltransferase family. *J. Biol. Chem.* **273**, 12770-12778 (1998)
- ANDERSON, E. S.:** Slime wall formation in the *Salmonellae*. *Nature* **190**, 284-285 (1961)
- ANDERSON, E. S. & A. H. ROGERS:** Slime polysaccharides of the *Enterobacteriaceae*. *Nature* **198**, 714-715 (1963)

- ANDRIANOPOULOS, K.; L. WANG & P. R. REEVES:** Identification of the fucose synthetase gene in the colanic acid gene cluster of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **180**, 998-1001 (1998)
- AOYAMA, K.; A. M. HAASE & P. R. REEVES:** Evidence for effect of random genetic drift on G+C content after lateral transfer of fucose pathway genes to *Escherichia coli* K-12. *Mol. Biol. Evol.* **11**, 829-838 (1994)
- APPELMELK, B. J.; R. NEGRINI, A. P. MORAN & E. J. KUIPERS:** Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* and the host. *Trends Microbiol.* **5**, 70-73 (1997)
- ARLT, M. & O. HINDSGAUL:** Rapid chemical synthesis of sugar nucleotides in a form suitable for enzymatic oligosaccharide synthesis. *J. Org. Chem.* **60**, 14-15 (1995)
- BAISCH, G. & R. ÖHRLEIN:** Chemo-enzymatische Synthese von Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Glycopeptiden. *Angew. Chem.* **108**, 1949-1952 (1996)
- BAISCH, G. & R. ÖHRLEIN:** Convenient chemoenzymatic synthesis of  $\beta$ -purine-diphosphate sugars (GDP-fucose-analogues). *Bioorg. Med. Chem.* **5**, 383-391 (1997)
- BANTELI, R. & B. ERNST:** Synthesis of sialyl Lewis<sup>x</sup> mimics: Replacement of galactose by aromatic spacers. *Tetrahedron Lett.* **38**, 4059-4062 (1997)
- BARDWELL, J. C. A.:** *MicroReview* Building bridges: disulphide bond formation in the cell. *Mol. Microbiol.* **14**, 199-205 (1994)
- BASTIN, D. A. & P. R. REEVES:** Sequence and analysis of the O antigen gene (*rfb*) cluster of *Escherichia coli* O111. *Gene* **164**, 17-23 (1995)
- BECKER, D. J. & J. B. LOWE:** Leukocyte adhesion deficiency type II. *Biochim. Biophys. Acta* **1455**, 193-204 (1999)
- BERGER, E. G. :** Glykobiologie: Ein neuer Zugang zur Entzündungsforschung. *Neue Zürcher Zeitung* 26.05.1994, 7 (1994)
- BINCH, H.; K. STANGIER & J. THIEM:** Chemical synthesis of GDP-L-galactose and analogues. *Carbohydr. Res.* **306**, 409-419 (1998)
- BISSO, A.; L. STURLA, D. ZANARDI, A. DE FLORA & M. TONETTI:** Structural and enzymatic characterization of human recombinant GDP-D-mannose-4,6-dehydratase. *FEBS Lett.* **456**, 370-374 (1999)

- BLUM, H.; H. BEIER & H. J. GROSS:** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99 (1987)
- BOEGGEMAN, E. E.; P. V. BALAJI, N. SETHI, A. S. MASIBAY & P. K. QASBA:** Expression of deletion constructs of bovine  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase in *Escherichia coli*: importance of Cys134 for its activity. *Protein Eng.* **6**, 779-785 (1993)
- BOEGGEMAN, E. E.; P. V. BALAJI & P. K. QASBA:** Functional domains of bovine  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase. *Glycoconjugate J.* **12**, 865-887 (1995)
- BONIN, C. P.; I. POTTER, G. F. VANZIN & W.-D. REITER:** The *Mur1* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes an isoform of GDP-D-mannose-4,6-dehydratase, catalyzing the first step in the *de novo* synthesis of GDP-L-fucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2085-2090 (1997)
- BONIN, C. P. & W.-D. REITER:** A bifunctional epimerase-reductase acts downstream of the MUR1 gene product and completes the *de novo* synthesis of GDP-L-fucose in *Arabidopsis*. *Plant J.* **21**, 445-454 (2000)
- BORMAN, S.:** Glycotechnology drugs begin to emerge from the lab. *Chem. Eng. News*, 27-34 (1993)
- BORSIG, L.; E. G. BERGER & M. MALISSARD:** Expression and purification of His-tagged  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase in yeast and in COS-cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**, 586-589 (1997)
- BRADFORD, M. M.:** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976)
- BRAELL, W. A.; M. A. TYO, S. S. KRAG & P. W. ROBBINS:** A new procedure for the preparation of GDP-[U-<sup>14</sup>C]mannose. *Anal. Biochem.* **74**, 484-487 (1976)
- BROCKHAUSEN, I.:** Biosynthesis 3. Biosynthesis of O-glycans of the N-acetylgalactosamine- $\alpha$ -Ser/Thr linkage type. In Montreuil, J.; J. F. G. Vliegenhart & H. Schachter (eds.) *Glycoproteins, New Comprehensive Biochemistry* Vol. **29a**, Elsevier Science, Amsterdam, 201-260 (1995)
- BROCKHAUSEN, I.; J. SCHUTZBACH & W. KUHN:** Glycoproteins and their relationship to human disease. *Acta Anat.* **161**, 36-78 (1998)

- BROCKHAUSEN, I.:** Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1473**, 67-95 (1999)
- BROSCHAT, K. O.; S. CHANG & G. SERIF:** Purification and characterization of GDP-D-mannose-4,6-dehydratase from porcine thyroid. *Eur. J. Biochem.* **153**, 397-401 (1985)
- BROSSMER, R. & H. J. GROSS:** Fluorescent and photoactivatable sialic acids. *Methods Enzymol.* **247**, 177-193 (1994)
- BROWN, P. K.; L. K. ROMANA & P. R. REEVES:** Cloning of the *rfb* gene cluster of a group C2 *Salmonella* strain: comparison with the *rfb* regions of groups B and D. *Mol. Microbiol.* **5**, 1873-1881 (1991)
- BROWN, P. K.; L. K. ROMANA & P. R. REEVES:** Molecular analysis of the *rfb* gene cluster of *Salmonella* serovar muenchen (strain M67): the genetic basis of the polymorphism between groups C2 and B. *Mol. Microbiol.* **6**, 1385-1394 (1992)
- BUCHHOLZ, A.; L. GREINER, C. HOH & A. LIESE:** Genetic algorithms as a tool for capillary electrophoresis method development. *J. Capillary Electrophor.* **7(3-4)**, 51-60 (2002)
- BÜLTER, T. & L. ELLING:** Enzymatic synthesis of nucleotide sugars. *Glycoconjugate J.* **16**, 147-159 (1999)
- BULET P.; B. HOFLACK, M. PORCHERT & A. VERBERT:** Study of the conversion of GDP-mannose into GDP-fucose in Nereids: a biochemical marker of oocyte maturation. *Eur. J. Biochem.* **144**, 255-259 (1984)
- CABIB, E. & L. F. LELOIR:** Guanosine diphosphate mannose. *J. Biol. Chem.* **206**, 779-790 (1954)
- CAMARDELLA, L.; V. CARRATORE, M. A. CIARDIELLO, G. DAMONTE, U. BENATTI & A. DE FLORA:** Primary structure of human erythrocyte nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP[H])-binding protein FX: identification with the mouse tum-transplantation antigen P35B. *Blood* **85**, 264-267 (1995)
- CAPPI, M. W.; W. J. MOREE, L. QIAO, T. G. MARRON, G. WEITZSCHMIDT & C.-H. WONG:** The synthesis of novel 6-amido-6-deoxy-L-galactose derivatives as potent sialyl Lewis<sup>x</sup> mimetics. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **35**, 2346-2348 (1996)

- CARCHON, H.; E. VAN SCHAFTINGEN, G. MATTHIJS & J. JAEKEN:** Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type IA (phosphomannomutase-deficiency). *Biochim. Biophys. Acta* **1455**, 155-165 (1999)
- CHANG S.; K. BROCHAT & G. SERIF:** An assay for GDP-D-mannose-4,6-dehydratase. *Anal. Biochem.* **144**, 253-257 (1985)
- CHANG S.; B. DUERR & G. SERIF:** An epimerase-reductase in L-fucose synthesis. *J. Biol. Chem.* **263**, 1693-1697 (1988)
- CUMMINGS, R. D.:** Synthesis of asparagine-linked oligosaccharides: Pathways, genetics and metabolic regulation. In Allen, H. J. & E. C. Kisalius (eds.) *Glycoconjugates, Composition, Structure and Function*, Marcel Dekker, New York, 333-360 (1992)
- CURD, H.; D. LIU & P. R. REEVES:** Relationships among the O-antigen gene clusters of *Salmonella enterica* groups B, D1, D2, and D3. *J. Bacteriol.* **180**, 1002-1007 (1998)
- DE FLORA, A.; A. MORELLI, M. FRASCIO, G. CORTE, B. CURTI, M. GALLIANO, C. GOZZER, L. MINCHIOTTI, C. MARENI & G. GAETANI:** Radioimmunoassay and chemical properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase and of a specific NADP(H)-binding protein (FX) from human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **500**, 109-123 (1977)
- DEFREES, E. A.; W. KOSCH, W. WAY, J. C. PAULSON, S. SABESAN, R. L. HALCOMB, D. H. HUANG, Y. ICHIKAWA & C.-H. WONG:** Ligand recognition by E-selectin: synthesis, inhibitory activity and conformational analysis of bivalent Sialyl Lewis x analogs. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 66-79 (1995)
- DEFREES, E. A.; L. PHILLIPS, L. GUO & S. ZALIPSKY:** Sialyl Lewis x liposomes as a multivalent ligand and inhibitor of E-selectin mediated cellular adhesion. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 6101-6104 (1996)
- DENNIS, J. W.; M. GRANOVSKY & C. E. WARREN:** Protein glycosylation in development and disease. *Bioessays* **21**, 412-421 (1999)
- DIERKSEN, K. P. & J. E. TREMPY:** Identification of a second RcsA protein, a positive regulator of colanic acid capsular polysaccharide genes, in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**, 5053-5056 (1996)

- DINTER, A. & E. G. BERGER:** The regulation of cell- and tissue-specific expression of glycans by glycosyltransferases. In Alavi, A & J. S. Axford (eds.), Glycoimmunology, Plenum Press, New York, 53-82 (1995)
- DRUZHININA, T. N.; N. S. UTKINA, K. CHAN, G. STRECKER & V. N. SHIBAEV:** Activity of enzymes catalyzing formation of  $\beta$ -L-fucosyl phosphate and GDP- $\beta$ -L-fucose in amphibian tissues and their application in chemo-enzymic synthesis of GDP- $\beta$ -L-fucose. Biochemistry (Moscow) **64**, 935-940 (1999)
- DRUMMELSMITH, J. & C. WHITFIELD:** Translocation of group 1 capsular polysaccharide to the surface of *Escherichia coli* requires a multimeric complex in the outer membrane. EMBO J. **19**, 57-66 (2000)
- DWEK R. A.:** Glycobiology: Toward understanding the function of sugars. Chem. Rev. **96**, 683-720 (1996)
- DWIVEDI, K.; A. F. POST & S. BULLERJAHN:** Cloning and functional analysis of the *pmmA* gene encoding phosphomannomutase from photosynthetic prokaryote *Prochlorothrix hollandica*. Biochim. Biophys. Acta **1290**, 210-214 (1996)
- EBEL, W. & J. E. TREMPY:** *Escherichia coli* RcsA, a positive activator of colanic acid capsular polysaccharide synthesis, functions to activate its own expression. J. Bacteriol. **181**, 577-584 (1999)
- EBNET, K. & D. VESTWEBER:** Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and chemokines. Histochem. Cell Biol. **112**, 1-23 (1999)
- EDMAN, P.:** On the mechanisms of the phenyl isothiocyanate degradation of peptides. Acta Chem. Scand. **10**, 761-768 (1956)
- EDMAN, P. & G. Begg:** A protein sequenator. Eur. J. Biochem. **1**, 80-91 (1967)
- ELBEIN, A. D. & E. C. HEATH:** The biosynthesis of cell wall lipopolysaccharide in *Escherichia coli* – II. Guanosine diphosphate 4-keto-6-deoxy-D-mannose, an intermediate in the biosynthesis of guanosine diphosphate colitose. J. Biol. Chem. **240**, 1926-1931 (1965)

- ELLING, L.; J. E. RITTER & S. VERSECK:** Expression, purification and characterization of recombinant phosphomannomutase and GDP- $\alpha$ -D-mannose pyrophosphorylase from *Salmonella enterica*, group B, for the synthesis of GDP- $\alpha$ -D-mannose from D-mannose. *Glycobiology* **6**, 591-597 (1996)
- ELLING, L.:** Glycobiotechnology: Enzymes for the synthesis of nucleotide sugars. In Scheper, T. (Ed.), *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Springer-Verlag: Berlin, Band **58**, 89-144 (1997)
- ELLING, L.:** Enzymatic tools for the synthesis of nucleotide (deoxy)sugars. In Dedrichsen, U.; T. K. Lindhorst, B. Westermann & L. Wessjohann (eds.), *Bioorganic Chemistry – Highlights and New Aspects*, Wiley-VCH Weinheim, 166-171 (1999)
- ENDO, T.; S. KOIZUMI, K. TABATA, S. KAKITA & A. OZAKI:** Large-scale production of *N*-acetyllactosamine through bacterial coupling. *Carbohydr. Res.* **316**, 179-183 (1999)
- ENDO, T.; S. KOIZUMI, K. TABATA & A. OZAKI:** Large-scale production of CMP-NeuAc and sialylated oligosaccharides through bacterial coupling. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 257-261 (2000[a])
- ENDO, T.; S. KOIZUMI, K. TABATA & A. OZAKI:** Cloning and expression of  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase gene from *Helicobacter pylori*. *Glycobiology* **10**, 809-813 (2000[b])
- ENDO, T. & S. KOIZUMI:** Microbial conversion with cofactor regeneration using genetically engineered bacteria. *Adv. Synth. Catal.* **343**, 521-526 (2001)
- ENGELHARDT, H.; W. BECK, J. KOHR & T. SCHMIDT:** Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten. *Angew. Chem.* **105**, 659-680 (1993)
- ENGELHARDT, H.; W. BECK & T. SCHMIDT:** Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten. Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden (1994)
- ETZIONI, A.; M. FRYDMAN, S. POLLACK, I. AVIDOR, M. L. PHILLIPS, J. C. PAULSON & R. GERSHONI-BARUCH:** Recurrent severe infections caused by a novel leukocyte adhesion deficiency. *N. Engl. J. Med.* **327**, 1789-1792 (1992)
- ETZIONI, A. & M. TONETTI:** Leukocyte adhesion deficiency II-from A to almost Z. *Immunol. Rev.* **178**, 138-147 (2000)

- FEIZI, T. & R. A. CHILDS:** Carbohydrates as antigenic determinants of glycoproteins. *Biochem. J.* **245**, 1-11 (1987)
- FEIZI, T.:** The major blood group ABO (H) determining genes are isolated. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 330-331 (1990)
- FEINGOLD, D. S. & G. A. BARBER:** Nucleotide sugars. In Dey, P. M. & J. B. Harborne (eds.) *Methods in Plant Biochemistry* Vol. **2**, Academic Press, New York, 39-78 (1990)
- FERNÁNDEZ-MAYORALAS, A.:** Synthesis and modification of carbohydrates using glycosidases and lipases. *Top. Curr. Chem.* **186**, 1-21 (1997).
- FEY, S.; L. ELLING & U. KRAGL:** The cofactor Mg<sup>2+</sup> - a key switch for effective continuous enzymatic production of GDP-mannose using recombinant GDP-mannose pyrophosphorylase. *Carbohydr. Res.* **305**, 475-481 (1997)
- FEY, S.:** Reaktionstechnik der chemoenzymatischen Synthese natürlicher und nicht-natürlicher Guanosin-5'-diphosphat-aktivierter Kohlenhydrate. Dissertation, Universität Bonn (1998)
- FIELD, M. C. & L. J. WAINWRIGHT:** Molecular cloning of eukaryotic glycoprotein and glycolipid glycosyltransferases: a survey. *Glycobiology* **5**, 463-472 (1995)
- FISCHER, E. & J. HIRSCHBERGER:** *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **21**, 1805-1809 (1888)
- FLITSCH, S. L.; J. P. TAYLOR & N. J. TURNER:** Chemo-enzymatic synthesis of a  $\alpha$ -mannosyl-containing trisaccharide. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 382-384 (1991)
- FLOWERS, H. M.:** Chemistry and biochemistry of D- and L-fucose. In Tipson, R. S. & D. Horton (eds.), *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Academic Press, New York, London, Band **39**, 279-345 (1981)
- FOSTER, D. W. & V. GINSBURG:** Biosynthesis of L-fucose by mammalian tissue. *Biochim. Biophys. Acta* **54**, 373-376 (1961)
- FRICK, D. N.; B. D. TOWNSEND & M. J. BESSMAN:** A novel GDP-mannose mannosyl hydrolase shares homology with the MutT family of enzymes. *J. Biol. Chem.* **270**, 24086-24091 (1995)
- FREEZE, H. H. & M. AEBI:** Molecular basis of carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes type I with normal phosphomannomutase activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1455**, 167-178 (1999)

- FREUDL, R.:** Molekularbiologische Grundlagen für die sekretorische Gewinnung von Proteinen mit Hilfe Gram-positiver Bakterien. <http://www.fz-juelich.de/ibt/protsec/grundlagen.html> (1998)
- FRYDMAN, M.; A. ETZIONI, T. EIDLITZ-MARKUS, I. AVIDOR, I. VARSANO, Y. SHECHTER, J. B. ORLIN & R. GERSHONI-BARUCH:** Rambam-Hasharon syndrome of psychomotor retardation, short stature, defective neutrophil motility, and Bombay phenotype. *Am. J. Med. Genet.* **44**, 297-302 (1992)
- FUKUDA, M.:** Cell surface carbohydrates: cell-type specific expression. In Fukuda, M. & O. Hindsgaul (eds.) *Molecular Glycobiology*, Oxford University Press, Oxford, 1-52 (1994)
- GAGNEUX, P. & A. VARKI:** Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology* **9**, 747-755 (1999)
- GAMBERT, U. & J. THIEM:** Chemical transformations employing glycosyltransferases. *Top. Curr. Chem.* **186**, 21-43 (1997)
- GAREGG, P. J.; B. LINDBERG, T. ONN & I. W. SUTHERLAND:** Comparative structural studies on the M-Antigen from *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* and *Aerobacter cloacae*. *Acta Chem. Scand.* **25**, 2103-2108 (1971)
- GAUGLER, R. W. & O. GABRIEL:** Biological mechanisms involved in the formation of deoxysugars. VII. Biosynthesis of 6-Deoxy-L-talose. *J. Biol. Chem.* **248**, 6041-6049 (1973)
- GIANNIS, A.:** Die Sialyl-Lewis-X-Gruppe und ihre Analoga als Liganden für Selektine: chemoenzymatische Synthesen und biologische Funktionen. *Angew. Chem.* **106**, 188-191 (1994)
- GIJSEN, H. J. M.; L. QIAO, W. FRITZ & C.-H. WONG:** Recent advances in the chemoenzymatic synthesis of carbohydrates and carbohydrate mimetics. *Chem. Rev.* **96**, 443-473 (1996)
- GINSBURG, V. & H. N. KIRKMAN:** Isolation of guanosine diphosphate fucose from *Aerobacter aerogenes*. *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 3481 (1958)
- GINSBURG, V.:** Formation of guanosine diphosphate L-fucose from guanosine diphosphate D-mannose. *J. Biol. Chem.* **235**, 2196-2201 (1960)

- GINSBURG, V.:** Studies on the biosynthesis of guanosine diphosphate L-fucose. *J. Biol. Chem.* **236**, 2389-2393 (1961)
- GLASER, L.; S. KORNFELD & D. H. BROWN:** Preparation and properties of phosphomannomutase from baker's yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **33**, 522-526 (1959)
- GLASER, L. & H. ZARKOWSKY:** Dehydration in nucleotide-linked deoxysugar synthesis. In Boyer, P. D. (ed.) *The Enzymes*, Academic Press, New York **5**, 465-497 (1971)
- GOEBEL, W. F.:** Colanic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **49**, 464-471 (1963)
- GOKHALE, U. B.; O. HINDSGAUL & M. M. PALCIC:** Chemical synthesis of GDP-fucose analogs and their utilization by the Lewis  $\alpha$ (1-4)fucosyltransferase. *Can. J. Chem.* **68**, 1063-1071 (1990)
- GOLDBERG, J. B.; K. HATANO & G. B. PIER:** Synthesis of lipopolysaccharide O side chains by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 requires the enzyme phosphomannomutase. *J. Bacteriol.* **175**, 1605-1611 (1993)
- GOTTESMAN, S. & V. STOUT:** Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K12. *Mol. Microbiol.* **5**, 1599-1606 (1991)
- GOTTESMAN, S.:** Regulation of capsule synthesis: modification of the two-component paradigm by an accessory unstable regulator. In Hoch, J. A. & T. J. Silhavy (eds.) *Two-Component Signal Transduction*, American Society for Microbiology Press, Washington DC, 253-262 (1995)
- GOTTSCHALK, G.:** *Bacterial metabolism – Second Edition*. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo (1986)
- GRANINGER, M.; B. NIDETZKY, D. E. HEINRICHS, C. WHITFIELD & P. MESSNER:** Characterization of dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase and dTDP-4-dehydrorhamnose reductase, required for dTDP-L-rhamnose biosynthesis in *Salmonella enterica* serovar typhimurium LT2. *J. Biol. Chem.* **274**, 25069-25077 (1999)
- GRANT, W. D.; I. W. SUTHERLAND & J. F. WILKINSON:** Exopolysaccharide colanic acid and its occurrence in the *Enterobacteriaceae*. *J. Bacteriol.* **100** (3), 1187-1193 (1969)
- GRANT, W. D.; I. W. SUTHERLAND & J. F. WILKINSON:** Control of colanic acid synthesis. *J. Bacteriol.* **103**, 89-96 (1970)

- GRANT, S. G. N.; F. JESSEE, F. R. BLOOM & D. HANAHAN:** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**, 4645 (1990)
- GREENE, W. C.:** The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. N. Engl. J. Med. **324**, 308-317 (1991)
- GREENWELL, P.:** Blood group antigens: molecules seeking a function? Glycoconjugate J. **14**, 159-173 (1997)
- GRIER, T. J. & J. R. RASMUSSEN:** A convenient enzymic synthesis of guanosine diphosphate-[<sup>14</sup>C]mannose. Anal. Biochem. **127**, 100-104 (1982)
- GROSSMAN, P. D. & J. C. COLBURN (Hrsg.):** Capillary Electrophoresis: Theory and practice. Academic press, San Diego (1992)
- GUZMAN, L.-M.; J. J. BARONDESS & J. BECKWITH:** FtsL, an essential cytoplasmic membrane protein involved in cell division in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **174**, 7716-7728 (1992)
- GUZMAN, L.-M.; D. BELIN, M. J. CARSON & J. BECKWITH:** Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P<sub>BAD</sub> promoter. J. Bacteriol. **177**, 4121-4130 (1995)
- HÄLLGREN, C. & O. HINDSGAUL:** An aminated GDP-fucose analog useful in the fucosyltransferase catalyzed addition of biological probes onto oligosaccharide chains. J. Carbohydr. Chem. **14**, 453-464 (1995)
- HAKOMORI, S.-I.:** Glycosphingolipide. Spektrum der Wissenschaft **7**, 90-100 (1986)
- HANAHAN, D.:** Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. J. Mol. Biol. **166**, 557-580 (1983)
- HANISCH F. G.; T. R. E. STADIE, F. DEUTZMANN & J. PETERKATALINIC:** MUC1 glycoforms in breast cancer – Cell line T47D as a model for carcinoma-associated alterations of O-glycosylation. Eur. J. Biochem. **236**, 318-327 (1996)
- HARTMANN, E. & H. KÖNIG:** Comparison of the biosynthesis of the methanobacterial pseudomurein and the eubacterial murein. Naturwissenschaften **77**, 472-475 (1990)

- HEINRICHS, D. E.; J. A. YETHON & C. WHITFIELD:** Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* **30**, 221-232 (1998)
- HENNET, T.; A. DINTER, P. KUHNERT, T. S. MATTU, P. M. RUDD & E. G. BERGER:** Genomic cloning and expression of 3 murine UDP-galactose:  $\beta$ -*N*-acetylglucosamine  $\beta$ -1,3-galactosyltransferase genes. *J. Biol. Chem.* **273**, 58-65 (1998)
- HENRIKSEN, S. D.:** Cross-reacting M-antigens in *Escherichia coli* and *Salmonella paratyphi* B. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **27**, 107-109 (1950)
- HERRMANN, G. F.; P. WANG, G.-S. SHEN & C.-H. WONG:** Recombinant whole cells as catalysts for the enzymatic synthesis of oligosaccharides and glycopeptides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **33**, 1241 (1994[a])
- HERRMANN, G. F.; P. WANG, G.-J. SHEN, E. GARCIA-JUNCEDA, S. H. KHAN, K. L. MATTA & C.-H. WONG:** Large scale production of recombinant  $\alpha$ -1,2-mannosyltransferase from *E. coli* for the study of acceptor specificity and use of the recombinant whole cells in synthesis. *J. Org. Chem.* **59**, 6356-6362 (1994[b])
- HIRSCHBERG, C. B. & M. B. SNIDER:** Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 63-87 (1987)
- HIRUMA, K.; T. KAJIMOTO, G. WEITZ-SCHMIDT, I. OLLMANN & C.-H. WONG:** Rational design and synthesis of a 1,1-linked disaccharide that is 5 times as active as Sialyl Lewis X in binding to E-selectin. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 9265-9270 (1996)
- HOBBS, M. & P. R. REEVES:** The JUMPstart sequence: a 39bp element common to several polysaccharide gene clusters. *Mol. Microbiol.* **12**, 855-856 (1994)
- HOCKNEY, R. C.:** Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. *TIBTECH* **12**, 456-463 (1994)
- HOH, C.:** Persönliche Mitteilung. (2000)
- HOH, C.:** Persönliche Mitteilung. (2001)
- HOLST, O.; A. J. ULMER, H. BRADE, H.-D. FLAD & E. T. RIETSCHEL:** Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **16**, 83-104 (1996)

- HUMMEL, W. & M.-R. KULA:** Simple method for small scale disruption of bacteria and yeasts. *J. Microbiol. Meth.* **9**, 201-209 (1989)
- ICHIKAWA, Y.; G.-J. DHEN & C.-H. WONG:** Enzyme-catalyzed synthesis of sialyl oligosaccharide with *in situ* regeneration of CMP-sialic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 4698-4700 (1991)
- ICHIKAWA, Y.; M. M. SIM & C.-H. WONG:** Efficient chemical synthesis of GDP-fucose. *J. Org. Chem.* **57**, 2943-2946 (1992[a])
- ICHIKAWA, Y.; Y.-C. LIN, D. P. DUMAS, G. J. SHEN, E. GARCIA-JUNCEDA, M. A. WILLIAMS, R. BAYER, C. KETCHAM, L. E. WALKER, J. C. PAULSON & C.-H. WONG:** Chemical-enzymatic synthesis and conformational analysis of sialyl Lewis x and derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 9283-9298 (1992[b])
- ICHIKAWA, Y.; G. C. LOOK & C.-H. WONG:** Enzyme-catalyzed oligosaccharide synthesis. *Anal. Biochem.* **202**, 215-238 (1992[c])
- ICHIKAWA, Y.; R. WANG & C.-H. WONG:** Regeneration of sugar nucleotide for enzymatic oligosaccharide synthesis. *Meth. Enzymol.* **247**, 107-127 (1994)
- IDEGUCHI, T.; C. HU, B.-H. KIM, H. NISHISE, J. YAMASHITA & T. KAKUNO:** An open reading frame in the *Rhodospirillum rubrum* plasmid, pKY1, similar to algA, encoding the bifunctional enzyme phosphomannose isomerase-guanosine diphospho-D-mannose pyrophosphorylase (PMI-GMP). *Biochim. Biophys. Acta* **1172**, 329-331 (1993)
- ISHIHARA, H.; D. J. MASSARO & E. C. HEATH:** The metabolism of L-fucose: III. The enzymic synthesis of  $\beta$ -L-fucose 1-phosphate. *J. Biol. Chem.* **243**, 1103-1109 (1968)
- ISHIHARA, H. & E. C. HEATH:** The metabolism of L-fucose: IV. The biosynthesis of guanosine diphosphate L-fucose in porcine liver. *J. Biol. Chem.* **243**, 1110-1115 (1968)
- ISHIHARA, H.; H. Schachter & E. C. HEATH:** L-fucose kinase from pig liver. *Meth. Enzymol.* **28**, 399-402 (1972)
- ISHIHARA, H. & E. C. HEATH:** GDP-L-fucose pyrophosphorylase from pig liver. *Meth. Enzymol.* **28**, 403-406 (1972)
- JIANG, X.-M.; B. NEAL, F. SANTIAGO, S. J. LEE, L. K. ROMANA & P. R. REEVES:** Structure and sequence of the *rfb* (O antigen) gene cluster of *Salmonella* serovar typhimurium (strain LT2). *Mol. Microbiol.* **5**, 695-713 (1991)

- JOHNSON, J. G. & D. B. WILSON:** Role of a sugar-lipid intermediate in colanic acid synthesis by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **129**, 225-236 (1977)
- KALTNER, H. & B. STIERSTORFER:** Animal lectins as cell adhesion molecules. *Acta Anat.* **161**, 162-179 (1998)
- KANDLER, O:** Cell-wall biochemistry and 3-domain concept of life. *System. Appl. Microbiol.* **16**, 501-509 (1994)
- KANNAGI, R.:** Carbohydrate-mediated cell-adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer. *Glycoconjugate J.* **14**, 577-584 (1997)
- KAUFFMANN, F.:** Die Bakteriologie der *Salmonella*-Gruppe. Enjar Munksgaard, Copenhagen, 90 (1941)
- KAUFFMANN, F.:** *Enterobacteriaceae*. Enjar Munksgaard, Copenhagen, 52-53 (1954)
- KAWAGUCHI, T.; K. OGATA & T. TOCHIKURA:** Studies on microbial metabolism of sugar nucleotides Part V. Effects of various factors on the fermentative production of GDP-mannose; GDP and GTP from 5'-GMP by air-dried cells of baker's yeast. *Agric. Biol. Chem.* **34**, 908-918 (1970)
- KEENLEYSIDE, W. J.; P. JAYARATNE, P. R. MACLACHLAN & C. WHITFIELD:** The *rcaA* gene of *Escherichia coli* O9:K30:H12 is involved in the expression of the serotype specific group I K (capsular) antigen. *J. Bacteriol.* **174**; 8-16 (1992)
- KHAN, S. H. & O. HINDSGAUL:** Chemical synthesis of oligosaccharides. In Fukuda, M. & O. Hindsgaul (eds.) *Molecular Glycobiology*, Oxford University Press, Oxford, 206-226 (1994)
- KIDO, N.; V. I. TORGOV, T. SUGIYAMA, K. UCHIYA, H. SUGIHARA, T. KOMATSU, N. KATO & K. JANN:** Expression of the O9 polysaccharide of *Escherichia coli*: Sequencing of the *E. coli* O9 *rfb* gene cluster, characterization of mannosyl transferases and evidence for an ATP-binding cassette transport system. *J. Bacteriol.* **177**, 2178-2187 (1995)
- KIM, Y. S.; J. GUM & I. BROCKHAUSEN:** Mucin glycoproteins in neoplasia. *Glycoconjugate J.* **13**, 693-707 (1996)
- KLAFFKE W. & J. THIEM:** Kohlenhydratchemie. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **39**, 290-298 (1991)

- KLAFFKE W.:** Application of enzymes in the synthesis of saccharides and activated sugars. Carbohydrates in Europe **10**, 9-17 (1994)
- KLAFFKE W.:** Synthesis of GDP-3-acetamido-3-deoxy- $\alpha$ -D-mannose and GDP-3-azido-3-deoxy- $\alpha$ -D-mannose. Carbohydr. Res. **266**, 285-292 (1995)
- KLEENE, R. & E. G. BERGER:** The molecular and cell biology of glycosyltransferases. Biochim. Biophys. Acta **1154**, 283-325 (1993)
- KLENA, J. D. & C. A. SCHNAITMAN:** Function of the *rfb* gene cluster and the *rfe* gene in the synthesis of O antigen by *Shigella dysenteriae* 1. Mol. Microbiol. **9**, 393-402 (1993)
- KOBATA, A.:** Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. Eur. J. Biochem. **209**, 483-501 (1992)
- KOBATA, A.:** Glycobiology: An expanding research area in carbohydrate chemistry. Acc. Chem. Res. **26**, 319-324 (1993)
- KOCHETKOV, N. K. & V. N. SHIBAEV:** Glycosyl esters of nucleoside pyrophosphates. In Tipson, R. S. & D. Horton (eds.), Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Academic Press, New York, London, Band **28**, 307-399 (1973)
- KÖNIG, H.; E. HARTMANN & U. KARCHER:** Pathways and principles of the biosynthesis of methanobacterial cell-wall polymers. System. Appl. Microbiol. **16**, 510-517 (1994)
- KÖPLIN, R.; G. WANG, B. HÖTTE, U. B. PRIEFER & A. PÜHLER:** A 3.9 kb DNA region of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* that is necessary for lipopolysaccharide production encodes a set of enzymes involved in the synthesis of dTDP-rhamnose. J. Bacteriol. **175**, 7786-7792 (1993)
- KÖRNER, C. & K. VON FIGURA:** Genetisch bedingte Erkrankungen der Glykoproteinbiosynthese. Biospektrum **5**, 426-430 (2001)
- KOIZUMI, S.; T. ENDO, K. TABATA, H. NAGANO, J. OHNISHI & A. OZAKI:** Large-scale production of GDP-fucose and Lewis X by bacterial coupling. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **25**, 213-217 (2000)
- KOLTER, T. & K. SANDHOFF:** Sphingolipide – ihre Stoffwechselwege und die Pathobiochemie neurodegenerativer Erkrankungen. Angew. Chem. **111**, 1632-1670 (1999)

- KOOLMAN, J. & K.-H. RÖHM:** Taschenatlas der Biochemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1998)
- KOPETZKI, E.; G. SCHUMACHER & P. BUCKEL:** Control of formation of active soluble or inactive insoluble baker's yeast alpha-glucosidase PI in *Escherichia coli* by induction and growth condition. Mol. Gen. Genet. **216**, 149-155 (1989)
- KORNFELD R. H. & V. GINSBURG:** Control of synthesis of guanosine 5'-diphosphate D-mannose and guanosine 5'-diphosphate L-fucose in bacteria. Biochim. Biophys. Acta **117**, 79-87 (1966)
- KORNFELD, R. & S. KORNFELD:** Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. Ann. Rev. Biochem. **54**, 631-664 (1985)
- KREZDORN, C. H.; G. WATZELE, R. B. KLEENE, S. X. IVANOV & E. G. BERGER:** Purification and characterization of recombinant human  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. **212**, 113-120 (1993)
- KYHSE-ANDERSEN, J.:** Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J. Biochem. Biophys. Meth. **10**, 203-209 (1984)
- LÄMMLI, U. K.:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**, 680-685 (1970)
- LAN, R. & P. R. REEVES:** Gene transfer is a major factor in bacterial evolution. Mol. Biol. Evol. **13**, 47-55 (1996)
- LASKY, L. A.:** Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of inflammatory response. Ann. Rev. Biochem. **64**, 113-139 (1995)
- LAWSON, C. J.; C. W. MCCLEARY, H. I. NAKADA, D. A. REES, I. W. SUTHERLAND & J. F. WILKINSON:** Structural analysis of colanic acid from *Escherichia coli* by using methylation and base-catalysed fragmentation. Biochem. J. **115**, 947-958 (1969)
- LEE, Y.-H. & T.-I. LIN:** Determination of carbohydrates by high-performance capillary electrophoresis with indirect absorbance detection. J. Chromatogr. B **681**, 87-97 (1996)
- LEHLE, L. & W. TANNER:** Protein glycosylation in yeast. In Montreuil, J.; H. Schachter & J. F. G. Vliegthart (eds.), Glycoproteins. New Comprehensive Biochemistry Vol. **29a**, Elsevier Science, Amsterdam, 475-510 (1995)

- LEHMANN, J.:** Kohlenhydrate – Chemie und Biologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1996)
- LELOIR, L. F.:** Two decades of research on the biosynthesis of saccharides. *Science* **172**, 1299-1303 (1971)
- LENNARZ, W. J.:** Proteinglycosylation in the endoplasmatic reticulum: Current topological issues. *Biochemistry* **26**, 7205-7210 (1987)
- LEON, B.; T. K. LINDHORST, A. RIEKS-EVERDIKING & W. KLAFFKE:** Synthesis of GDP-4,6-dideoxy-L-xylohexopyranose (GDP-4-deoxy-L-fucose). *Synthesis*, 689-691 (1994)
- LERERY, S. B.; J. B. WEISS, M. E. SALYAN, C. E. ROBERTS, S. I. HAKOMORI, J. L. MAGNANI & M. STRAND:** Characterization of a series of novel fucose-containing glycosphingolipid immunogens from eggs of *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* **267**, 5542-5551 (1992)
- LEROY, A.; V. NOE, M. MAREEL & H. NELIS:** Glycoconjugate cross-talk in metastatic cancer cells, leucocytes, parasites and bacteria. *Biochem. Soc. Trans.* **25**, 228-234 (1997)
- LIAO, T.-H. & G. A. BARBER:** Purification of guanosine 5'-diphosphate D-mannose oxidoreductase from *Phaseolus vulgaris*. *Biochim. Biophys. Acta* **276**, 85-93 (1972)
- LINDHORST, T. K. & J. THIEM:** The synthesis of 3-deoxy-L-fucose (3,6-dideoxy-L-xylohexose). *Liebigs Ann. Chem.*, 1237-1241 (1990)
- LINDHORST, T. K. & J. THIEM:** Synthesis of 4-deoxy and 4-deoxy-4-halogeno-derivatives of L-fucose as potential enzyme inhibitors. *Carbohydr. Res.* **209**, 119-129 (1991)
- LINDHORST, T. K.:** Struktur und Funktion von Kohlenhydraten. *Chemie in unserer Zeit* **34**, 38-52 (2000[a])
- LINDHORST, T. K.:** Essentials of carbohydrate chemistry and biochemistry. Wiley-VCH Verlag GmbH Weinheim (2000[b])
- LIS, H. & N. SHARON:** Protein glycosylation – Structural and functional aspects. *Eur. J. Biochem.* **218**, 1-27 (1993)
- LIU, D.; N. K. VERMA, L. K. ROMANA & P. R. REEVES:** Relationships among the *rfb* regions of *Salmonella* serovars A, B and D. *J. Bacteriol.* **173**, 4814-4819 (1991)

- LIU, D.; A. M. HAASE, L. LINDQVIST, A. A. LINDBERG & P. R. REEVES:** Glycosyltransferases of *O*-antigen biosynthesis in *Salmonella enterica*: Identification and characterization of transferase genes of groups B, C2, and E1. *J. Bacteriol.* **175**, 3408-3413 (1993)
- LIU, D.; L. LINDQVIST & P. R. REEVES:** Transferases of *O*-antigen biosynthesis in *Salmonella enterica*: Didesoxyhexosyltransferases of group B and C2 and acetyltransferase of group C2. *J. Biol. Chem.* **177**, 4084-4088 (1995)
- MACPHERSON, D. F.; P. A. MANNING & R. MORONA:** Characterization of the dTDP-rhamnose biosynthetic genes encoded in the *rfb* locus of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* **11**, 281-292 (1994)
- MAKAARU, C. K.; R. T. DAMIAN, D. F. SMITH & R. D. CUMMINGS:** The human blood fluke *Schistosoma mansoni* synthesizes a novel type of glycosphingolipid. *J. Biol. Chem.* **267**, 2251-2257 (1992)
- MALLISARD, M.; L. BORSIG, S. DiMARCO, G. M. GRÜTTER, U. KRAGL, C. WANDREY, & E. G. BERGER:** Recombinant soluble  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase expressed in *Saccharomyces cerevisiae*: purification, characterization and comparison with human enzyme. *Eur. J. Biochem.* **239**, 340-348 (1996)
- MANIATIS, T.; E. F. FRITSCH & J. SAMBROOK:** Molecular cloning A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982)
- MARKOVITZ, A.:** Genetics and regulation of bacterial capsular polysaccharide synthesis and radiation sensitivity. In Sutherland, I. W. (ed.), *Surface carbohydrates of the prokaryotic cell*, Vol. I, Academic Press, New York, 415-462 (1977)
- MAROLDA, C. L. & M. A. VALVANO:** Identification, expression and DNA sequence of the GDP-mannose biosynthesis genes encoded by the *O7 rfb* gene cluster of strain VW187 (*Escherichia coli* O7:K1). *J. Bacteriol.* **175**, 148-158 (1993)
- MAROLDA, C. L. & M. A. VALVANO:** Genetic analysis of the dTDP-rhamnose biosynthesis region of the *Escherichia coli* VW187 (O7:K1) *rfb* gene cluster: identification of functional homologs of *rfbB* and *rfbA* in the *rff* cluster and correct location of the *rffE* gene. *J. Bacteriol.* **177**, 5539-5546 (1995)

- MAROLDA, C. L. M. F. FELDMAN & M. A. VALVANO:** Genetic organization of the O7-specific lipopolysaccharide biosynthesis cluster of *Escherichia coli* VW187 (O7:K1). *Microbiology* **145**, 2485-2495 (1999)
- MATSUDAIRA, P. T.:** A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing. Academic Press, San Diego, USA (1989)
- MATTHIJS, G.; E. SCHOLLEN, E. PARDON, M. VEIGA-DA-CUNHA, J. JAEKEN, J. CASSIMAN & E. VAN SCHAFTINGEN:** Mutations in PMM2, a phosphomannomutase gene on chromosome 16p13, in carbohydrate-deficient glycoprotein type I syndrome (Jaeken syndrome). *Nature Gen.* **16**, 88-92 (1997)
- MATTILA, P.; J. RÄBINÄ, S. HORTLING, J. HELIN & R. RENKONEN:** Functional expression of *Escherichia coli* enzymes synthesizing GDP-L-fucose from inherent GDP-D-mannose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Glycobiology* **10**, 1041-1047 (2000)
- MCEVER, R. P.:** Selectin-carbohydrate interactions during inflammation and metastasis. *Glycoconjugate J.* **14**, 585-591 (1997)
- MEENS, J. B.; M. HERBORT, M. KLEIN & R. FREUDL:** Use of the pre-pro part of *Staphylococcus hyicus* lipase as a carrier for secretion of *Escherichia coli* outer membrane protein A (OmpA) prevents proteolytic degradation of OmpA by cell-associated protease(s) in two different gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2814-2820 (1997).
- MELO, A. & L. GLASER:** The mechanism of 6-deoxyhexose synthesis. II. Conversion of deoxythymidine diphosphate 4-keto-6-deoxy-D-glucose to deoxythymidine diphosphate L-rhamnose. *J. Biol. Chem.* **243**, 1475-1478 (1968)
- MENON, S.; M. STAHL, R. KUMAR, G-Y XU & F. SULLIVAN:** Stereochemical course and steady state mechanism of the reaction catalyzed by the GDP-fucose synthetase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **274**, 26743-26750 (1999)
- MERGAERT, P.; M. V. MONTAGU & M. HOLSTERS:** The nodulation gene *nolK* of *Azorhizobium caulinodans* is involved in the formation of GDP-fucose from GDP-mannose. *FEBS Lett.* **409**, 312-316 (1997)
- MESSNER, P & U. B. SLEYTR:** Bacterial surface layer glycoproteins. *Glycobiology* **1**, 545-551 (1991)

- MESSNER, P.:** Chemical composition and biosynthesis of S-layers. In Sleytr, U. B.; P. Messner, D. Pum & M. Sara (eds.), Crystalline bacterial cell surface proteins. Austin, R. G. Landes/Academic Press, 35-76 (1996)
- MESSNER, P.:** Bacterial glycoproteins. Glycoconjugate J. **14**, 3-11 (1997)
- MILLER, J. H.:** Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 433 (1972)
- MORAN, A. P.:** Pathogenic properties of *Helicobacter pylori*. Scand. J. Gastroenterol. **215**, 22-31 (1996)
- MÖSCHL, A.; C. Schäffer, U. B. SLEYTR, P. MESSNER, R. CHRISTIAN & G. SCHULZ:** Characterization of the S-layer glycoproteins of two *Lactobacilli*. In Beveridge, T. J. & S. F. Koval (eds.), Advances in bacterial paracrystalline surface layers. Plenum Press, New York, 281-284 (1993)
- MOFFAT, J. G. & H. G. KOHRANA:** The total synthesis of coenzyme A. J. Am. Chem. Soc. **81**, 1265 (1959)
- MOFFAT, J. G. & H. G. KOHRANA:** Nucleoside polyphosphates. X. The synthesis and some reactions of nucleoside-5`phosphomorpholidates and related compounds. Improved methods for the preparation of nucleoside-5`polyphosphates. J. Am. Chem. Soc. **83**, 649-658 (1961)
- MONTREUIL, J.:** The history of glycoprotein research, a personal view. In Montreuil, J.; H. Schachter & J. F. G. Vliegenthart (eds.), Glycoproteins. New Comprehensive Biochemistry Vol. **29a**, Elsevier Science, Amsterdam, 1-12 (1995)
- MORELLI, A. & A. DE FLORA:** Isolation and partial characterization of an NADP- and NADPH-binding protein from human erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys. **179**, 698-705 (1977)
- MORELLI, A.; U. BENATTI, L. RADIN, N. G. WRIGLEY & A. DE FLORA:** Subunit structure and physical properties of an NADP (H)-binding protein from human erythrocytes. FEBS Lett. **80**, 1-4 (1977)
- MUNCH-PETERSEN, A.:** Enzymatic synthesis and pyrophosphorolysis of guanosine diphosphate mannose. Arch. Biochem. Biophys. **55**, 592-593 (1955)

- MUNCH-PETERSEN, A.:** Reversible enzymatic synthesis of guanosine diphosphate mannose from guanosine triphosphate and mannose-1-phosphate. *Acta Chem. Scand.* **10**, 928-934 (1956)
- MUNCH-PETERSEN, A.:** GDP-mannose-pyrophosphorylase. In: Colowick, S. P. & N. O. Kaplan (eds.): *Meth. Enzymol.* **5**, Academic Press, 171-174 (1962)
- NAGATA, K.; T. TSUJI, N. HANAI & T. IRIMURA:** Role of *O*-linked carbohydrate chains on leukocyte cell membranes in platelet-induced leukocyte activation. *J. Biol. Chem.* **269**, 23290-23295 (1994)
- NAKAZAWA, K.; K. FURUKAWA, H. NARIMATSU & A. KOBATA:** Kinetic study of human  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase expressed in *E. coli*. *J. Biochem.* **113**, 747-753 (1993)
- NIGGEMANN, J. & J. THIEM:** Synthesis of some deoxymannosyl phosphates. *Liebigs Ann. Chem.* **5**, 535-538 (1992)
- NIKAIDO, H. & M. VAARA:** Outer membrane. In Neidhardt, F. C.; J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter & H. E. Umbarger (eds.) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology, vol. 1, ASM, Washington D. C., 7-22 (1987)
- NILSSON, K. G. I.:** Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *TIBTECH* **6**, 256-264 (1988)
- NISHIHARA, S.; H. NARIMATSU, H. IWASAKI, S. YAZAWA, S. AKAMATSU, T. ANDO, T. SENO & I. NARIMATSU:** Molecular genetic analysis of the human Lewis histo-blood group system. *J. Biol. Chem.* **269**, 29271-29278 (1994)
- NOVAGEN:** pET system manual. Novagen, Inc.; Madison, USA (1997)
- NUNEZ, H. A.; J. V. O'CONNOR, P. ROSEVEAR & R. BARKER:** The synthesis and characterization of  $\alpha$ - and  $\beta$ -L-fucopyranosyl phosphates and GDP fucose. *Can. J. Chem.* **59**, 2086-2095 (1981)
- OEHRLEIN, R.; O. HINDSGAUL & M. M. PALCIC:** Use of the "core-2"-*N*-acetylglucosaminyltransferase in the chemical-enzymatic synthesis of a sialyl-Le<sup>x</sup>-containing hexasaccharide found on *O*-linked glycoproteins. *Carbohydr. Res.* **244**, 149-159 (1993)
- OESTERHELT, C.; C. SCHNARRENBERGER & W. GROSS:** The reaction mechanism of phosphomannomutase in plants. *FEBS Lett.* **401**, 35-37 (1997)

- OEFNER, P. J. & C. CHIESA:** Capillary electrophoresis of carbohydrates. *Glycobiology* **4**, 397-412 (1994)
- OHYAMA, C.; P. L. SMITH, K. ANGATA, M. N. FUKUDA, J. B. LOWE & M. FUKUDA:** Molecular cloning and expression of GDP-D-mannose-4,6-dehydratase, a key enzyme for fucose metabolism defective in Lec13 cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 14582-14587 (1998)
- OPHIR, T. & D. L. Gutnick:** A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 740-745 (1994)
- OTHS, P. J.; R. M. MEYER & H. G. FLOSS:** Stereochemistry and mechanism of the GDP-mannose dehydratase reaction. *Carbohydr. Res.* **198**, 91-100 (1990)
- PALCIC, M.M.:** Glycosyltransferases in Glycobiology. *Meth. Enzymol.* **230**, 300-316 (1994)
- PALCIC, M.M. & O. HINDSGAUL:** Glycosyltransferases in the synthesis of oligosaccharide analogs. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **8**, 37-49 (1996)
- PALLANCA, J. E. & N. J. TURNER:** Chemo-enzymatic synthesis of guanosine 5'-diphosphomannose (GDP-mannose) and selected analogues. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**, 3017-3022 (1993)
- PARK, S. H.; I. PASTUSZAK, R. DRAKE & A. D. ELBEIN:** Purification to apparent homogeneity and properties of pig kidney L-fucose kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 5685-5691 (1998)
- PASTUSZAK, I.; C. KETCHUM, G. HERMANSON, E. J. SJOBERG, R. DRAKE & A. D. ELBEIN:** GDP-L-fucose pyrophosphorylase. *J. Biol. Chem.* **273**, 30165-30174 (1998)
- PAUL, G.; F. LOTTSPEICH & F. WIELAND:** Asparaginyln-acetylgalactosamine. Linkage unit of halobacterial glycosaminoglycan. *J. Biol. Chem.* **261**, 1020-1024 (1986)
- PAULSEN, H.:** Fortschritte bei der selektiven chemischen Synthese komplexer Oligosaccharide. *Angew. Chem.* **94**, 184-201 (1982)
- PAULSON, J. C. & K. J. COLLEY:** Glycosyltransferases. Structure, localization and control of cell type-specific glycosylation. *J. Biol. Chem.* **264**, 17615-17618 (1989)
- PAULSON, J. C.:** Glycoproteins: what are the sugar chains for? *Trends Biochem. Sci.* **14**, 272-276 (1989)

- PAULSON, J. C.; E. UJITA-LEE, K. J. COLLEY, B. ADLER & J. K. BROWNE:** Method for producing secretable glycosyltransferases and other golgi processing enzymes. US-Patent 5,032,519 (1991)
- PAYNE, S. M. & B. N. AMES:** A procedure for rapid extraction and high pressure liquid chromatographic separation of the nucleotides and other small molecules from bacterial cells. *Anal. Biochem.* **123**, 151-161 (1982)
- PHILLIPS, M. L.; B. R. SCHWARTZ, A. ETZIONI, R. BAYER, H. D. OCHS, J. C. PAULSON & J. M. HARLAN:** Neutrophil adhesion in leukocytes adhesion deficiency syndrome type II. *J. Clin. Invest.* **96**, 2898-2906 (1995)
- PIEPERSBERG, W.; J. DISTLER & C. ALBERMANN:** Method for enzymatically producing guanosine diphosphate-6-deoxyhexoses and the use thereof for producing oligosaccharides. Patentschrift WO 99/09180 (1999)
- PIOTROWSKI, J.; E. PIOTROWSKI, D. SKRODZKA, A. SLOMIANY & B. L. SLOMIANY:** Induction of acute gastritis and epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Scand. J. Gastroenterol.* **32**, 203-211 (1997)
- POPOVA, T. N.; L. V. MATASOVA & A. A. LAPOT`KO:** Purification, separation and characterization of phosphoglucomutase and phosphomannomutase from maize leaves. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **46**, 461-470 (1998)
- PREISS, J. & E. WOOD:** Sugar nucleotide reactions in *Arthrobacter*. I. Guanosine diphosphate mannose pyrophosphorylase: purification and properties. *J. Biol. Chem.* **239**, 3119-3126 (1964)
- PREISS, J. & E. GREENBERG:** Enzymic synthesis of GDP-mannose-<sup>14</sup>C from mannose-<sup>14</sup>C<sup>1</sup>. *Anal. Biochem.* **18**, 464-471 (1967)
- PREISS, J. & E. GREENBERG:** GDP-[<sup>14</sup>C]mannose. *Meth. Enzymol.* **28**, 281-284 (1972)
- PROHKA, R. & H. SCHENKEL-BRUNNER:** A simple efficient method for the preparation of GDP-fucose. *Anal. Biochem.* **69**, 536-544 (1975)
- PUCK, T. T.; S. J. CIECIURA & A. ROBINSON:** Genetics of mammalian cells III: long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J. Exp. Med.* **108**, 845-855 (1958)

- RADEMACHER, T. W.; R. B. PAREKH & R. A. DWEK:** Glycobiology. Ann. Rev. Biochem. **57**, 785-838 (1988)
- RAETZ, C. R. H.:** Bacterial endotoxins: extraordinary lipids that activate eucaryotic signal transduction. J. Bacteriol. **175**, 5745-5753 (1993)
- RAETZ, C. R. H.:** Bacterial lipopolysaccharides: a remarkable family of bioactive macroamphiphiles. In Neidhardt, F. C.; J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter & H. E. Umbarger (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology, 2<sup>nd</sup> edn., vol. 1, ASM, Washington D. C., 1035-1063 (1996)
- REEVES, P. R.:** Evolution of *Salmonella* O antigen variation by interspecific gene transfer on a large scale. Trends Genet. **9**, 17-22 (1993)
- REEVES, P. R.:** Biosynthesis and assembly of lipopolysaccharide. In Ghuysen, J.-M. & R. Hakenbeck (eds) Bacterial cell wall, Elsevier Science Publishers, 281-314 (1994)
- REEVES, P. R.; M. HOBBS, M. A. VALVANO, M. SKURNIK, C. WHITFIELD, D. COPLIN, N. KIDO, J. KLENA, D. MASKELL, C. R. H. RAETZ & P. D. RICK:** Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. Trends Microbiol. **4**, 495-503 (1996[a])
- REEVES, P. R.; M. HOBBS, M. A. VALVANO, M. SKURNIK, C. WHITFIELD, D. COPLIN, N. KIDO, J. KLENA, D. MASKELL, C. R. H. RAETZ & P. D. RICK:** <http://www.angis.su.oz.au/BacPol/Genes/BPGN.html> (1996[b])
- REGNI, C. A.; P. A. TIPTON & L. J. BEAMER:** Crystallization and initial crystallographic analysis of phosphomannomutase/phosphoglucomutase from *Pseudomonas aeruginosa*. Acta Cryst. D **56**, 761-762 (2000)
- REITMAN, M. L.; I. S. TROWBRIDGE & S. KORNFELD:** Mouse lymphoma cell lines resistant to pea lectin are defective in fucose metabolism. J. Biol. Chem. **255**, 9900-9906 (1980)
- RENTMEISTER, A.:** Diplomarbeit am Institut für Biotechnologie II im Forschungszentrum Jülich GmbH, Universität Bonn (2002)
- RICK, P. D.:** Lipopolysaccharide biosynthesis. In Neidhardt, F. C.; J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter & H. E. Umbarger (eds.) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology, vol. 1, ASM, Washington D. C., 648-662 (1987)

- RIETSCHEL, E. T.; L. BRADE, F. U. SCHADE & H. BRADE:** Bakterielle Endotoxine: Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und biologischer Wirkung. *Infect. Immun.* **21**, 26-35 (1993)
- RIPKA, J.; A. ADAMANY & P. STANLEY:** Two chinese hamster ovary glycosylation mutants affected in the conversion of GDP-mannose to GDP-fucose. *Arch. Biochem. Biophys.* **249**, 533-545 (1986)
- RITTER, J. E.:** Überexpression und Anwendung der Phosphomannomutase und GDP- $\alpha$ -D-Mannose-Pyrophosphorylase aus *Salmonella enterica*, Gruppe B zur präparativen Synthese von GDP- $\alpha$ -D-Mannose. Dissertation, Universität Düsseldorf (1995)
- RITTER, J. E.; C. BERLIN & L. ELLING:** A continuous microtiter plate assay for screening nucleotide sugar-synthesizing nucleotidyltransferases. *Anal. Biochem.* **234**, 74-82 (1996)
- RIZZI, M.; M. TONETTI, P. VIGEVANI, L. STURLA, A. BISSO, A. DE FLORA, D. BORDO & M. BOLOGNESI:** GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose epimerase/reductase from *Escherichia coli*, a key enzyme in the biosynthesis of GDP-L-fucose, displays the structural characteristics of the RED protein homology superfamily. *Structure* **6**, 1453-1465 (1998)
- ROCHE, M. E.; R. P. ODA & J. P. LANDERS:** Capillary electrophoresis in biotechnology. *Biotechnol. Prog.* **13**, 659-668 (1997).
- ROSANO, C.; A. BISSO, G. IZZO, M. TONETTI, L. STURLA, A. DE FLORA & M. BOLOGNESI:** Probing the catalytic mechanism of GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose epimerase/reductase by kinetic and crystallographic characterization of site-specific mutants. *J. Mol. Biol.* **303**, 77-91 (2000)
- ROSEMAN, S.; J. J. DISTLER, J. G. MOFFAT & H. G. KOHRANA:** Nucleoside polyphosphates. XI. An improved general method for the synthesis of nucleotide coenzymes. Synthesis of uridine-5', cytidine-5' and guanosine-5' diphosphate derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 659-663 (1961)
- ROTH, J.:** Biosynthesis 4c. Compartmentation of glycoprotein biosynthesis. In Montreuil, J.; H. Schachter & J. F. G. Vliegthart (eds.), *Glycoproteins. New Comprehensive Biochemistry Vol. 29a*, Elsevier Science, Amsterdam, 287-312 (1995)
- ROTHMAN, J. E.:** Der Golgiapparat. *Spektrum der Wissenschaft* **11**, 72-83 (1985)

- RUSSO, T. A.; G. SHARMA, J. WEISS & C. BROWN:** The construction and characterization of colanic acid deficient mutants in an extraintestinal isolate of *Escherichia coli* (O4/K54/H5). *Microb. Pathog.* **18**, 269-278 (1995)
- RYLL, T. & R. WAGNER:** Improved ion-pair high performance liquid chromatographic method for the quantification of a wide variety of nucleotides and sugar-nucleotides in animal cells. *J. Chromatogr.* **570**, 77-88 (1991)
- SAIKI, R. K.; D. H. GELFAND, S. STOFFEL, S. J. SCHARF, R. HIGUCHI, G. T. HORN, K. B. MULLIS & H. A. EHRLICH:** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491 (1988)
- SAMBROOK, J.; E. F. FRITSCH & T. MANIATIS:** *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989)
- SANDERCOCK, L. E.; A. M. MACLEOD; E. ONG & R. A. J. WARREN:** Non-S-layer glycoproteins in eubacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **118**, 1-7 (1994)
- SANDERS, W. J.; T. R. KATSUMOTO, C. R. BERTOZZI, S. D. ROSEN & L. L. KIESSLING:** L-Selectin-carbohydrate interactions: relevant modifications of the Lewis x trisaccharide. *Biochemistry* **35**, 14862-14867 (1996)
- SÁRA, M. & U. B. SLEYTR:** S-Layer proteins. *J. Bacteriol* **182**(4), 859-868 (2000)
- SATO, T.; K. FURUKAWA, H. BAKKER, D. H. VAN DEN EIJNDEN & I. VAN DIE:** Molecular cloning of a human cDNA encoding  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase with 37% identity to mammalian UDP-Gal:GlcNAc  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 472-477 (1998)
- SCHACHTER, H.:** Enzymes associated with glycosylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1**, 755-765 (1991)
- SCHACHTER, H.:** Molecular basis of glycoconjugate disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1455**, 61-62 (1999)
- SCHÄFFER, C.; M. GRANINGER & P. MESSNER:** Prokaryotic glycosylation. *Proteomics* **1**, 248-261 (2001)
- SCHLEGEL, H. G.:** *Allgemeine Mikrobiologie.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1992)

- SCHMIDT, R. R.:** Neue Methoden zur Glycosid- und Oligosaccharidsynthese – gibt es Alternativen zur Koenigs-Knorr-Methode? *Angew. Chem.* **98**, 213-236 (1986)
- SCHMIDT, R. R.; B. Wegmann & K.-H. Jung:** stereospecific synthesis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -L-fucopyranosyl-phosphates and of GDP-fucose via trichloroacetimidate. *Liebigs Ann. Chem.* **2**, 121-124 (1991)
- SCHNAITMAN, C. A. & J. D. KLENA:** Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**, 655-682 (1993)
- SCHUMACHER, T.:** Expression, Isolierung und Charakterisierung eines rekombinanten, humanen  $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase-Fusionsproteins aus *Escherichia coli*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (1999)
- SCHUSTER, B. & U. B. SLEYTR:** S-layer-supported lipid membranes. *Rev. Mol. Biotechnol.* **74**, 233-254 (2000)
- SEARS, P. & C.-H. WONG:** Intervention of carbohydrate recognition by proteins and nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12086-12093 (1996)
- SEARS, P. & C.-H. WONG:** Enzyme action in glycoprotein synthesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **54**, 223-252 (1998)
- SEPPO, A.; J. P. TURUNEN, L. PENTTILA, A. KEANE, O. RENKONEN & R. RENKONEN:** Synthesis of a tetravalent sialyl Lewis x glycan, a high-affinity inhibitor of L-selectin-mediated lymphocyte binding to endothelium. *Glycobiology* **6**, 65-71 (1996)
- SHARON, N.:** Kohlenhydrate. *Spektrum der Wissenschaft* **1**, 71-85 (1981)
- SHARON, N. & H. LIS:** Kohlenhydrate und Zellerkennung. *Spektrum der Wissenschaft* **3**, 66-74 (1993)
- SIEGELE, D. A. & J. C. HU:** Gene expression from plasmids containing the *araBAD* promoter at subsaturating inducer concentrations represents mixed populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8168-8172 (1997)
- SILBERSTEIN, S. & R. GILMORE:** Biochemistry, molecular biology and the genetics of the oligosaccharyltransferase. *FASEB J.* **10**, 849-858 (1996)
- SIMON, E. S.; M. D. BEDNARSKI & G. M. WHITESIDES:** Synthesis of CMP-NeuAc from *N*-acetylglucosamine: generation of CTP from CMP using adenylate kinase. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 7159-7163 (1988)

- SIMON, E. S.; S. GRABOWSKI & G. M. WHITESIDES:** Convenient syntheses of cytidine 5'-triphosphate, guanosine 5'-triphosphate, and uridine 5'-triphosphate and their use in the preparation of UDP-glucose, UDP-glucuronic acid, and GDP-mannose. *J. Org. Chem.* **55**, 1834-1841 (1990)
- SLEDJESKI, D. D. & S. GOTTESMAN:** Osmotic shock induction of capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **178**, 1204-1206 (1996)
- SLEYTR, U. B.:** Basic and applied S-layer research – an overview. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**, 5-12 (1997)
- SMOOT, J. W. & G. SERIF:** Purification of GTP: $\alpha$ -D-mannose-1-phosphate guanyl-transferase. *Eur. J. Biochem.* **148**, 83-87 (1985)
- SOMERS, W. S.; M. L. STAHL & F. X. SULLIVAN:** GDP-fucose synthetase from *Escherichia coli*: structure of a unique member of the short-chain dehydrogenase/reductase family that catalyzes two distinct reactions at the same active site. *Structure* **6**, 1601-1612 (1998)
- SOMOZA, J. R.; S. MENON, H. SCHMIDT, D. JOSEPH-MCCARTHY, A. DESSEN, M. L. STAHL, W. S. SOMERS & F. X. SULLIVAN:** Structural and kinetic analysis of *Escherichia coli* GDP-mannose 4,6 dehydratase provides insights into the enzyme's catalytic mechanism and regulation by GDP-fucose. *Structure* **8**, 123-135 (2000)
- SPILLMANN, D.:** Carbohydrates in cellular recognition: from leucine-zipper to sugar-zipper. *Glycoconjugate J.* **11**, 169-171 (1994)
- SPRENGARD, U.; M. SCHUDOK, W. SCHMIDT, G. KRETZSCHMAR & H. KUNZ:** Multiple Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-N-Glycopeptide: Effektive Liganden für E-Selectin. *Angew. Chem.* **108**, 359-362 (1996)
- SRIVASTAVA, G.; O. HINDSGAUL & M. M. PALCIC:** Chemical synthesis and kinetic characterization of UDP-2-deoxy-D-lyxo-hexose („UDP-2-deoxy-D-galactose“), a donor substrate for  $\beta$ -(1-4)-D-galactosyltransferase. *Carbohydr. Res.* **245**, 137-144 (1993)
- STAHL W.; U. SPRENGARD, G. KRETZSCHMAR & H. KUNZ:** Synthese von Desoxy-Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Analoga, potentiellen Selectin-Antagonisten. *Angew. Chem.* **106**, 2186-2188 (1994)

- STANLEY, P.:** Use of mammalian cell mutants to study the functions of N- and O-linked glycosylation. In Mecham, R. P. & D. Roberts (eds.), Cell surface and extracellular glycoconjugates: structure and function, Academic press: New York, 181-222 (1993)
- STEVENSON, G.; S. J. LEE, L. K. ROMANA & P. R. REEVES:** The *cps* gene cluster of *Salmonella* strain LT2 includes a second mannose pathway: sequence of two genes and relationship to genes in the *rfb* gene cluster. Mol. Gen. Genet. **227**, 173-180 (1991)
- STEVENSON, G.; B. NEAL, D. LIU, M. HOBBS, N. H. PACKER, M. BATLEY, J. W. REDMOND, L. LINDQVIST & P. R. REEVES:** Structure of the O antigen of *Escherichia coli* K-12 and the sequence of its *rfb* gene cluster. J. Bacteriol. **176**, 4144-4156 (1994)
- STEVENSON, G.; K. ANDRIANOPOULOS, M. HOBBS & P. R. REEVES:** Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. J. Bacteriol. **178**, 4885-4893 (1996)
- STILLER, R. & J. THIEM:** Enzymatic synthesis of  $\beta$ -L-fucose-1-phosphate and GDP-fucose Liebigs Ann. Chem., 467-471 (1992)
- STOUT, V. & S. GOTTESMAN:** RcsB and RcsC: a two-component regulator of capsule synthesis in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **172**, 659-669 (1990)
- STOUT, V.; A. TORRES-CABASSA, M. R. MAURIZI, D. GUTNICK & S. GOTTESMAN:** RcsA, an unstable positive regulator of capsular polysaccharide synthesis. J. Bacteriol. **173**, 1738-1747 (1991)
- STOUT, V.:** Identification of the promoter region for the colanic acid polysaccharide biosynthetic genes in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **178**, 4273-4280 (1996)
- STRYER, L:** Biochemie. Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH (1990)
- STUDIER, W. F. & B. A. MOFFAT:** Use of Bacteriophage T7-RNA-Polymerase to direct selective high level expression of cloned genes. J. Mol. Biol. **189**, 113-130 (1986)
- STUDIER, W. F.; A. H. ROSENBERG, J. J. DUNN & J. W. DUBENDROFF:** Use of the T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. Meth. Enzymol. **185**, 61-89 (1990)
- STURLA, L.; A. BISSO, D. ZANARDI, U. BENATTI, A. DE FLORA & M. TONETTI:** Expression, purification and characterization of GDP-D-mannose 4,6-dehydratase from *Escherichia coli*. FEBS Lett. **412**, 126-130 (1997)

- STURLA, L.; A. ETZIONI, A. BISSO, D. ZANARDI, G. DE FLORA, L. SILENGO, A. DE FLORA & M. TONETTI:** Defective intracellular activity of GDP-D-mannose 4,6-dehydratase in leukocyte adhesion deficiency type II syndrome. *FEBS Lett.* **429**, 274-278 (1998)
- SULLIVAN, F. X.; R. KUMAR, R. KRIZ, M. STAHL, G-Y XU, J. ROUSE, X.-J. CHANG, A. BOODHOO, B. POTVIN & D. A. CUMMING:** Molecular cloning of human GDP-mannose 4,6-dehydratase and reconstitution of GDP-fucose biosynthesis *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **273**, 8193-8202 (1998)
- SUMPER, M. & F. T. WIELAND:** Bacterial glycoproteins. In Montreuil, J.; H. Schachter & J. F. G. Vliegenthart (eds.) *Glycoproteins*. Elsevier Science B. V., 455-473 (1995)
- SUTHERLAND, I. W.:** Structural studies on colanic acid, the common exopolysaccharide found in the *Enterobacteriaceae*, by partial acid hydrolysis – oligosaccharides from colanic acid. *Biochem. J.* **115**, 935-945 (1969)
- SUTHERLAND, I. W.:** Enzymic hydrolysis of colanic acid. *Eur. J. Biochem.* **23**, 582-587 (1971)
- SZUMILO, T.; R. R. DRAKE, J. L. YORK & A. D. ELBEIN:** GDP-mannose pyrophosphorylase – purification to homogeneity, properties, and utilization to prepare photoaffinity analogs. *J. Biol. Chem.* **268**, 17943-17950 (1993)
- TABOR, S. & C. C. RICHARDSON:** A bacteriophage T7 RNA polymerase/promotor system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1074-1078 (1985)
- THEIN, S. L. & R. B. WALLACE:** The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. In Davis, K. E. (ed.) *Human genetic diseases: a practical approach*, IRL Press, Hemdon, Virginia (1988)
- THIEM, J.:** Applications of enzymes in synthetic carbohydrate chemistry. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**, 193-211 (1995)
- TOCHIKURA, T.; K. KAWAGUCHI, T. KANO & K. OGATA:** Studies on microbial metabolism of sugar nucleotides (III) GDP-mannose; GDP and GTP formation from 5`-GMP by air-dried cells of baker`s yeast. *J. Ferment. Technol.* **47**, 564-572 (1969)
- TONETTI, M.; L. STURLA, A. BISSO, U. BENATTI & A. DE FLORA:** Synthesis of GDP-L-fucose by the human FX protein. *J. Biol. Chem.* **271**, 27274-27279 (1996)

- TONETTI, M.; M. RIZZI, P. VIGEVANI, L. STURLA, A. BISSO, A. DE FLORA & M. BOLOGNESI:** Preliminary crystallographic investigations of recombinant GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose epimerase/reductase from *E. coli*. *Acta Cryst.* **D54**, 684-686 (1998[a])
- TONETTI, M.; L. STURLA, A. BISSO, D. ZANARDI, U. BENATTI & A. DE FLORA:** The metabolism of 6-deoxyhexoses in bacterial and animal cells. *Biochimie* **80**, 923-931 (1998[b])
- TOONE, E. J.; E. S. SIMON, M. D. BEDNARSKI & G. M. WHITESIDES:** Enzyme-catalyzed synthesis of carbohydrates. *Tetrahedron* **45**, 5365-5422 (1989)
- TOONE, E. J. & G. M. WHITESIDES:** Enzymes-as catalysts in carbohydrate synthesis. *Am. Chem. Soc. Sympos. Ser.* **466**, 1-22 (1991)
- TRISLER, P. & S. GOTTESMAN:** *lon* transcriptional regulation of genes necessary for capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **160**, 184-191 (1984)
- TURNER, G. A. & J. B. CATTERALL:** Surface carbohydrates involved in the adhesive interactions of metastatic cells. *Biochem. Soc. Trans.* **25**, 234-241 (1997)
- UHROVÁ, M.; Z. DEYL & M. SUCHÁNEK:** Separation of common nucleotides, mono-, di- and triphosphates, by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B* **681**, 87-97 (1996)
- VAN DEN STEEN, P.; P. M. RUDD, R. A. DWEK & G. OPDENAKKER:** Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **33**, 151-208 (1998)
- VAN ECHTEN, G. & K. SANDHOFF :** Ganglioside metabolism: enzymology, topology and regulation. *J. Biol. Chem.* **268**, 5341-5344 (1993)
- VARKI, A.:** Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **3**, 97-130 (1993)
- VARKI, A.:** Selectin ligands: will the real ones please stand up? *J. Clin. Invest.* **99**, 158-162 (1997)
- VERMA, N. K.; N. B. QUIGLEY & P. R. REEVES:** O-antigen variation in *Salmonella* ssp.: *rfb* gene cluster of three strains. *J. Bacteriol.* **170**, 103-107 (1988)
- VERMA, N. K. & P. R. REEVES:** Identification and sequence of *rfbS* and *rfbE*, which determine antigenic specificity of group A and group D salmonellae. *J. Bacteriol.* **171**, 5694-5701 (1989)

- VIEIRA, J. & J. R. MESSING:** The pUC plasmids and M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**, 259-268 (1982)
- VOET, D. & J. G. VOET:** *Biochemie*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1992)
- WAKARCHUK, W.; A. MARTIN, M. P. JENNINGS, E. R. MOXON & J. C. RICHARDS:** Functional relationships of the genetic locus encoding the glycosyltransferase enzymes involved in expression of the lacto-*N*-neotetraose terminal lipopolysaccharide structure in *Neisseria meningitidis*. *J. Biol. Chem.* **271**, 19166-19173 (1996)
- WALDMANN, H.:** Enzymatic synthesis of *O*-glycosides. In Waldmann, H. (Hrsg.), *Organic Synthesis Highlights II*. VCH, Weinheim, 157-166 (1995)
- WANG, P.; G.-S. SHENG, Y.-F. WANG, Y. ICHIKAWA & C.-H. WONG:** Enzymes in oligosaccharide synthesis: active domain overproduction, specificity study, and synthetic use of an  $\alpha$ 1,2-mannosyltransferase with regeneration of GDP-Man. *J. Org. Chem.* **58**, 3985-3990 (1993)
- WATKINS, W. M.:** Molecular basis of antigenic specificity in the ABO, H and Lewis blood-group systems. In Montreuil, J.; H. Schachter & J. F. G. Vliegthart (eds.), *Glycoproteins. New Comprehensive Biochemistry Vol. 29a*, Elsevier Science, Amsterdam, 313-390 (1995)
- WATT, G. M.; P. A. S. LOWDEN & S. L. FLITSCH:** Enzyme-catalyzed formation of glycosidic linkages. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 652-660 (1997)
- WHITFIELD, C. & M. A. VALVANO:** Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in gram-negative bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **35**, 135-246 (1993)
- WHITFIELD, C.:** Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. *Trends Microbiol.* **3**, 178-185 (1995)
- WHITFIELD, C. & I. S. ROBERTS:** Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **31**, 1307-1319 (1999)
- WHITFIELD, D. M. & S. P. DOUGLAS:** Glycosylation reactions - present status future directions. *Glycoconjugate J.* **13**, 5-17 (1996)
- WILKINSON, S. G.:** Bacterial lipopolysaccharides – themes and variations. *Prog. Lipid Res.* **35**, 283-343 (1996)

- WITTMANN, V. & C.-H. WONG:** 1H-tetrazole as catalyst in phosphomorpholidate coupling reactions: efficient synthesis of GDP-fucose, GDP-mannose, and UDP-galactose. *J. Org. Chem.* **62**, 2144-2147 (1997)
- WONG, C.-H.; S. L. HAYNIE & G. M. WHITESIDES:** Enzyme-catalyzed synthesis of *N*-acetyllactosamine with in situ regeneration of uridine 5'-diphosphate glucose and uridine 5'-diphosphate galactose. *J. Org. Chem.* **47**, 5416-5418 (1982)
- WONG, C.-H.; S. L. HAYNIE & G. M. WHITESIDES:** Regeneration of sugar nucleotide for enzymatic oligosaccharide synthesis: use of Gal-1-phosphate uridylyltransferase in the regeneration of UDP-galactose, UDP-2-deoxygalactose, and UDP-galactosamine. *J. Org. Chem.* **57**, 4343-4344 (1992)
- WONG, C.-H. & G. M. WHITESIDES:** Enzymes in synthetic organic chemistry. Elsevier Science Ltd., Oxford, New York, Tokyo **12**, 252-311 (1994)
- WONG, C.-H. & G. M. WHITESIDES:** Enzymes in synthetic organic chemistry. Tetrahedron Organic Chemistry Series Vol. **12**, Pergamon, 286-287 (1995)
- WONG, C.-H.:** Enzymatic and chemo-enzymatic synthesis of carbohydrates. *Pure Appl. Chem.* **67**, 1609-1616 (1995)
- WONG, C.-H.; R. L. HALCOMB, Y. ICHIKAWA & T. KAJIMOTO:** Enzyme in der organischen Synthese: das Problem der molekularen Erkennung von Kohlenhydraten (**Teil 1**). *Angew. Chem.* **107**, 453-474 (1995[a])
- WONG, C.-H.; R. L. HALCOMB, Y. ICHIKAWA & T. KAJIMOTO:** Enzyme in der organischen Synthese: das Problem der molekularen Erkennung von Kohlenhydraten (**Teil 2**). *Angew. Chem.* **107**, 569-593 (1995[b])
- WU, S.-H.; M. SHIMAZAKI, C.-C. LIN, L. QIAO, W. J. MOREE, G. WEITZ-SCHMIDT & C.-H. WONG:** Synthese von Fucopeptiden als Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Mimetica. *Angew. Chem.* **108**, 106-108 (1996)
- XIANG, S.-H.; A. M. HAASE & P. R. REEVES:** Variation of the *rfb* gene clusters in *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* **175**, 4877-4884 (1993)
- XIANG, S.-H.; M. HOBBS & P. R. REEVES:** Molecular analysis of *rfb* gene cluster of a group D2 *Salmonella enterica* strain: evidence for its origin from an insertion sequence-mediated recombination event between group E and D1 strains. *J. Bacteriol.* **176**, 4357-4365 (1994)

- YAMAMOTO, F.; J. MARKEN, T. TSUJI, T. WHITE, H. CLAUSEN & S. HAKOMORI:** Cloning and characterization of DNA complementary to human UDP-GalNAc: Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\alpha$ 1-3GalNAc transferase (histo-blood group A transferase) mRNA. *J. Biol. Chem.* **265**, 1146-1151 (1990)
- YAMAMOTO, K.; T. MARUYAMA, H. KUMAGAI, T. TOCHIKURA, T. SENO & H. YAMAGUCHI:** Preparation of GDP-L-fucose by using microbial enzymes. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 823-824 (1984)
- YAMAMOTO, K.; I. KATAYAMA, Y. ONODA, M. INAMI, H. KUMAGAI & T. TOCHIKURA:** Evidence that the enzyme catalyzing the conversion of guanosine diphosphate D-mannose to a 4-keto sugar nucleotide intermediate requires nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 694-698 (1993)
- YE, R. W.; N. A. ZIELINSKI & A. M. CHAKRABARTY:** Purification and characterization of phosphomannomutase/phosphoglucomutase from *Pseudomonas aeruginosa* involved in biosynthesis of both alginate and lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* **176**, 4851-4857 (1994)
- YU, Y.; R. N. RUSSELL, J. S. THORSON, L. D. LIU & H. W. LIU:** Mechanistic studies of the biosynthesis of 3,6-dideoxyhexoses in *Yersinia pseudotuberculosis*. purification and stereochemical analysis of CDP-D-glucose oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* **267**, 5868-5875 (1992)
- YURCHENKO, P. D. & P. H. ATKINSON:** Equilibration of fucosyl glycoprotein pools in HeLa cells. *Biochemistry* **16**, 944-953 (1977)
- ZHANG, L.; P. TOIVANEN & M. SKURNIK:** The gene cluster directing O-antigen biosynthesis in *Yersinia enterocolitica* serotype O:8: identification of the genes for mannose and galactose biosynthesis and the gene for the O-antigen polymerase. *Microbiology* **142**, 277-288 (1996)
- ZENG, S; A. DINTER, D. EISENKRÄTZER, M. BISELLI, C. WANDREY & E. G. BERGER:** Pilot scale expression and purification of soluble protein A tagged  $\beta$ 1,6N-acetylglucosaminyltransferase in CHO cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 653-658 (1997)

**ZHANG, L.; P. TOIVANEN & M. SKURNIK:** The gene cluster directing O-antigen biosynthesis in *Yersinia enterocolitica* serotype O:8: identification of the genes for mannose and galactose biosynthesis and the gene for the O-antigen polymerase. *Microbiology* **142**, 277-288 (1996)

## 6 Anhang

### 6.1 DNA- und Proteinsequenzen der klonierten Gene

#### 6.1.1 *Escherichia coli* – GDP-D-Mannose 4,6-Dehydratase (EC 4.2.1.47) – GMD

```

      10      20      30      40      50      60
ATGTCAAAAAGTCGCTCTCATCACCGGTGTAACCGGACAAGACGGTTCTTACCTGGCAGAG
  M S K V A L I T G V T G Q D G S Y L A E
                                10                                20

      70      80      90      100     110     120
TTTCTGCTGGAAAAAGGTTACGAGGTGCATGGTATTAAGCGTCGCGCATCGTCATTCAAC
  F L L E K G Y E V H G I K R R A S S F N
                                30                                40

      130     140     150     160     170     180
ACCGAGCGGTGGATCACATTTATCAGGATCCGCACACCTGCAACCCGAAATTCCATCTG
  T E R V D H I Y Q D P H T C N P K F H L
                                50                                60

      190     200     210     220     230     240
CATTATGGCGACCTGAGTGATACCTCTAACCTGACGCGCATTTTGCGTGAAGTACAGCCG
  H Y G D L S D T S N L T R I L R E V Q P
                                70                                80

      250     260     270     280     290     300
GATGAAGTGTACAACCTGGGCGCAATGAGCCACGTTGCGGTCTCTTTTGAGTCACCAGAA
  D E V Y N L G A M S H V A V S F E S P E
                                90                                100

      310     320     330     340     350     360
TATACCGCTGACGTCGACGCGATGGGTACGCTGCGCCTGCTGGAGGCGATCCGCTTCCTC
  Y T A D V D A M G T L R L L E A I R F L
                                110                                120

      370     380     390     400     410     420
GGTCTGAAAAAGAAAAGTCTCGTTTCTATCAGGCTTCCACCTCTGAACTGTATGGTCTGGTG
  G L E K K T R F Y Q A S T S E L Y G L V
                                130                                140

      430     440     450     460     470     480
CAGGAAATCCGCAGAAAGAGACCACGCCGTTCTACCCGCGATCTCCGTATGCGGTCGCC
  Q E I P Q K E T T P F Y P R S P Y A V A
                                150                                160

      490     500     510     520     530     540
AAACTGTACGCCTACTGGATCACCGTTAACTACCGTGAATCCTACGGCATGTACGCCTGT
  K L Y A Y W I T V N Y R E S Y G M Y A C
                                170                                180

```

## Anhang

```
550      560      570      580      590      600
AACGGAATTCCTCTTCAACCATGAATCCCCGCGCCGCGGGCGAAACCTTCGTTACCCGCAAA
N G I L F N H E S P R R G E T F V T R K
190                                     200

610      620      630      640      650      660
ATCACCCGCGCAATCGCCAACATCGCCCAGGGGCTGGAGTCGTGCCTGTACCTCGGCAAT
I T R A I A N I A Q G L E S C L Y L G N
210                                     220

670      680      690      700      710      720
ATGGATTCCCTGCGTGACTGGGGCCACGCCAAAGACTACGTAAAAATGCAGTGGATGATG
M D S L R D W G H A K D Y V K M Q W M M
230                                     240

730      740      750      760      770      780
CTGCAGCAGGAACAGCCGGAAGATTTTCGTTATCGCGACCGGCGTTTCAGTACTCCGTGCGT
L Q Q E Q P E D F V I A T G V Q Y S V R
250                                     260

790      800      810      820      830      840
CAGTTCGTGGAAATGGCGGCAGCACAGCTGGGCATCAAACCTGCGCTTTGAAGGCACGGGC
Q F V E M A A A Q L G I K L R F E G T G
270                                     280

850      860      870      880      890      900
GTTGAAGAGAAGGGCATTGTGGTTTTCCGTCACCGGGCATGACGCGCCGGGCGTTAAACCG
V E E K G I V V S V T G H D A P G V K P
290                                     300

910      920      930      940      950      960
GGTGATGTGATTATCGCTGTTGACCCGCGTTACTTCCGTCCGGCTGAAGTTGAAACGCTG
G D V I I A V D P R Y F R P A E V E T L
310                                     320

970      980      990      1000      1010      1020
CTCGGCGACCCGACCAAAGCGCACGAAAACTGGGCTGGAAACCGGAAATCACCCCTCAGA
L G D P T K A H E K L G W K P E I T L R
330                                     340

1030     1040     1050     1060     1070     1080
GAGATGGTGTCTGAAATGGTGGCTAATGACCTCGAAGCGGCGAAAAAACACTCTCTGCTG
E M V S E M V A N D L E A A K K H S L L
350                                     360

1090     1100     1110     1120
AAATCTCACGGCTACGACGTGGCGATCGCGCTGGAGTCATAA
K S H G Y D V A I A L E S *
370                                     374
```

### 6.1.2 *Escherichia coli* – GDP-Fucose Synthetase (EC 5.1.3.-) GDP-4-Keto-6-Desoxy-D-Mannose 3,5-Epimerase 4-Reduktase - Fcl

```
10      20      30      40      50      60
ATGAGTAAACAACGAGTTTTTATTGCTGGTCATCGCGGGATGGTCGGTTCGCCATCAGG
M S K Q R V F I A G H R G M V G S A I R
10                                     20
```

# Anhang

---

70 80 90 100 110 120  
CGGCAGCTCGAACAGCGCGGTGATGTGGAAC TGGTATTACGCACCCGCGACGAGCTGAAC  
R Q L E Q R G D V E L V L R T R D E L N  
30 40

130 140 150 160 170 180  
CTGCTGGACAGCCGCGCCGTGCATGATTTCTTTGCCAGCGAACGTATTGACCAGGTCTAT  
L L D S R A V H D F F A S E R I D Q V Y  
50 60

190 200 210 220 230 240  
CTGGCGGCGGCGAAAGTGGGCGGCATTGTTGCCAACAACACCTATCCGGCGGATTTTCATC  
L A A A K V G G I V A N N T Y P A D F I  
70 80

250 260 270 280 290 300  
TACCAGAACATGATGATTGAGAGCAACATCATTACGCCGCGCATCAGAACGACGTGAAC  
Y Q N M M I E S N I I H A A H Q N D V N  
90 100

310 320 330 340 350 360  
AAACTGCTGTTTCTCGGATCGTCTGCATCTACCCGAAACTGGCAAAACAGCCGATGGCA  
K L L F L G S S C I Y P K L A K Q P M A  
110 120

370 380 390 400 410 420  
GAAAGCGAGTTGTTGCAGGGCAGCTGGAGCCGACTAACGAGCCTTATGCTATTGCCAAA  
E S E L L Q G T L E P T N E P Y A I A K  
130 140

430 440 450 460 470 480  
ATCGCCGGGATCAAAC TGTGCGAATCATAACAACCGCCAGTACGGACGCGATTACCGCTCA  
I A G I K L C E S Y N R Q Y G R D Y R S  
150 160

490 500 510 520 530 540  
GTCATGCCGACCAACCTGTACGGGCCACACGACAACTTCCACCCGAGTAATTCGCATGTG  
V M P T N L Y G P H D N F H P S N S H V  
170 180

550 560 570 580 590 600  
ATCCCAGCATTGCTGCGTCGCTTCCACGAGGCGACGGCACAGAATGCGCCGGACGTGGTG  
I P A L L R R F H E A T A Q N A P D V V  
190 200

610 620 630 640 650 660  
GTATGGGGCAGCGGTACACCGATGCGCGAATTTCTGCACGTCGATGATATGGCGGCGGCG  
V W G S G T P M R E F L H V D D M A A A  
210 220

670 680 690 700 710 720  
AGCATTTCATGTCATGGAGCTGGCGCATGAAGTCTGGCTGGAGAACACCCAGCCGATGTTG  
S I H V M E L A H E V W L E N T Q P M L  
230 240

730 740 750 760 770 780  
TCGCACATTAACGTCGGCACGGGCGTTGACTGCACTATCCGCGACGTGGCGCAAACCATC  
S H I N V G T G V D C T I R D V A Q T I  
250 260

```

790      800      810      820      830      840
GCCAAAGTGGTGGGTTACAAAGGCCGGGTGGTTTTTGGATGCCAGCAAACCGGATGGCAGG
A K V V G Y K G R V V F D A S K P D G T
270                                     280

850      860      870      880      890      900
CCGCGCAAACCTGCTGGATGTGACGCGCCTGCATCAGCTTGGCTGGTATCACGAAATCTCA
P R K L L D V T R L H Q L G W Y H E I S
290                                     300

910      920      930      940      950      960
CTGGAAGCGGGGCTTGCCAGCACTTACCAGTGGTTCCTTGAGAATCAAGACCGCTTTTCGG
L E A G L A S T Y Q W F L E N Q D R F R
310                                     320

966
GGGTAA
G *
321

```

### 6.1.3 *Escherichia coli* – „Colanic Acid“ Biosyntheseprotein – wcaH

```

10      20      30      40      50      60
ATGATGTTTTTACGTCAGGAAGACTTTTGCCACGGTAGTGCCTCCACTCCGCTTGTCTCT
M M F L R Q E D F A T V V R S T P L V S
10                                     20

70      80      90      100     110     120
CTCGACTTTATTGTGCGAAGACAGTCGCGGCGAGTTTCTGCTTGGCAAAGAACCAACCGC
L D F I V E N S R G E F L L G K R T N R
30                                     40

130     140     150     160     170     180
CCGGCGCAGGGTTACTGGTTTTGTGCCGGGAGGGCGCGTGCAGAAAGACGAAACGCTGGAA
P A Q G Y W F V P G G R V Q K D E T L E
50                                     60

190     200     210     220     230     240
GCCGCATTTGAGCGGCTGACGATGGCGGAACCTGGGGCTGCGTTTGGCGATAACAGCAGGC
A A F E R L T M A E L G L R L P I T A G
70                                     80

250     260     270     280     290     300
CAGTTTTACGGTGTCTGGCAGCACTTTTATGACGATAACTTCTCTGGCACGGATTTACAC
Q F Y G V W Q H F Y D D N F S G T D F T
90                                     100

310     320     330     340     350     360
ACTCACTATGTGGTGCTCGGTTTTTCGCTTCAGAGTATCGGAAGAAGAGCTGTTACTGCCG
T H Y V V L G F R F R V S E E E L L L P
110                                    120

370     380     390     400     410     420
GATGAGCAGCATGACGATTACCGCTGGCTGACGTCGGACGCGCTGCTCGCCAGTGATAAT
D E Q H D D Y R W L T S D A L L A S D N
130                                    140

```

430 440 450 460 470 480  
 GTTCATGCTAACAGCCGCGCCTATTTTCTCGCTGAGAAGCGTACCGGAGTACCCGGATTA  
 V H A N S R A Y F L A E K R T G V P G L  
 150 160

483  
**TGA**  
 \*  
 161

### 6.1.4 *Escherichia coli* –Mögliche Glycosyltransferase aus dem „Colanic Acid“ Biosyntheseweg - wcal

10 20 30 40 50 60  
ATGAAAATACTGGTCTACGGCATTAACTACTCGCCGGAGTTAACCGGCATCGGCAAATAC  
 M K I L V Y G I N Y S P E L T G I G K Y  
 10 20

70 80 90 100 110 120  
 ACCGGCGAGATGGTGGAAATGGCTGGCGGCACAAGGTCATGAGGTGCGGGTCATTACCGCA  
 T G E M V E W L A A Q G H E V R V I T A  
 30 40

130 140 150 160 170 180  
 CCGCCTTACTACCCGCAATGGCAGGTGGCGGAGAAGTATCCGCCTGGCGCTACAAACGA  
 P P Y Y P Q W Q V G E N Y S A W R Y K R  
 50 60

190 200 210 220 230 240  
 GAAGAGGGGGCCGCCACGGTGTGGCGCTGCCCGCTGTATGTGCCAAAACAGCCGAGCACC  
 E E G A A T V W R C P L Y V P K Q P S T  
 70 80

250 260 270 280 290 300  
 CTGAAACGCCTGTTGCATCTGGGCAGTTTTGCCGTCAGCAGTTTCTTTCCGCTGATGGCG  
 L K R L L H L G S F A V S S F F P L M A  
 90 100

310 320 330 340 350 360  
 CAACGTCGCTGGAAGCCGGATCGCATTATTGGCGTGGTGCCAACGCTGTTTTGCGCGCCG  
 Q R R W K P D R I I G V V P T L F C A P  
 110 120

370 380 390 400 410 420  
 GGAATGCGCCTGCTGGCGAAACTCTCTGGTGCGCGTACCGTGCTGCATATTCAGGATTAC  
 G M R L L A K L S G A R T V L H I Q D Y  
 130 140

430 440 450 460 470 480  
 GAAGTGGACGCCATGCTGGGGCTGGGCCCTTGCCGAAAAGGCAAAGGCGGCAAAGTGGCA  
 E V D A M L G L G L A G K G K G G K V A  
 150 160

## Anhang

---

490 500 510 520 530 540  
CAGCTGGCAACGGCGTTTCGAACGTAGCGGACTGCATAACGTCGATAACGTCTCCACGATT  
Q L A T A F E R S G L H N V D N V S T I  
170 180

550 560 570 580 590 600  
TCGCGTTCGATGATGAATAAAGCCATCGAAAAAGGCGTGGCGGGCGAAAAACGTCATCTTC  
S R S M M N K A I E K G V A A E N V I F  
190 200

610 620 630 640 650 660  
TTCCCCAACTGGTCGGAAATTGCCCGTTTTTCAGCATGTTGCAGATGCCGATGTTGATGCC  
F P N W S E I A R F Q H V A D A D V D A  
210 220

670 680 690 700 710 720  
CTTCGTAACCAGCTTGACCTGCCGGATAACAAAAAATCATTCTTTACTCCGGCAATATT  
L R N Q L D L P D N K K I I L Y S G N I  
230 240

730 740 750 760 770 780  
GGTGAAAAGCAGGGGCTGGAAAACGTTATTGAAGCTGCCGATCGTCTGCGCGATGAACCG  
G E K Q G L E N V I E A A D R L R D E P  
250 260

790 800 810 820 830 840  
CTGATTTTTGCCATTGTTCGGGCAGGGCGGGCGCAAAGCGCGGCTGGAAAAAATGGCGCAG  
L I F A I V G Q G G G K A R L E K M A Q  
270 280

850 860 870 880 890 900  
CAGCGTGGACTGCGCAACATGCAATTTTTCCCGCTGCAATCGTATGACGCTTTACCCGCA  
Q R G L R N M Q F F P L Q S Y D A L P A  
290 300

910 920 930 940 950 960  
CTGCTGAAGATGGGCGATTGCCATCTGGTGGTGCAAAAACGCGGGCGGGCAGATGCCGTA  
L L K M G D C H L V V Q K R G A A D A V  
310 320

970 980 990 1000 1010 1020  
TTGCCGTCGAAACTGACCAATATTCTGGCAGTAGGCGGTAACGCGGTGATTACTGCTGAA  
L P S K L T N I L A V G G N A V I T A E  
330 340

1030 1040 1050 1060 1070 1080  
GCCTACACAGAACTGGGGCAGCTTTGCGAAACCTTTCCGGGCATTGCGGTTTTCGTTGAA  
A Y T E L G Q L C E T F P G I A V C V E  
350 360

1090 1100 1110 1120 1130 1140  
CCGGAATCGGTCGAGGCGCTGGTGGCGGGGATCCGTCAGGCGCTCCTGCTGCCCAAACAC  
P E S V E A L V A G I R Q A L L L P K H  
370 380

1150 1160 1170 1180 1190 1200  
AACACGGTGGCACGTGAATATGCCGAACGCACGCTCGATAAAGAGAACGTGTTACGTCAA  
N T V A R E Y A E R T L D K E N V L R Q  
390 400

1210 1220  
 TTTATAAATGATATTCGGGGATAA  
 F I N D I R G \*  
 408

**6.1.5 *Salmonella typhimurium* – Phosphomannomutase (EC 5.4.2.8) – rfbK / manB**

10 20 30 40 50 60  
ATGAACGTAGTTAATAATAGCCGTGATGTTATTTATTCATCAGGTATTGTGTTTGAACG  
 M N V V N N S R D V I Y S S G I V F G T  
 10 20

70 80 90 100 110 120  
 AGTGGGGCTCGCGGTCTTGTAAGATTTTACACCTCAGGTATGTGCTGCTTTTACGGTT  
 S G A R G L V K D F T P Q V C A A F T V  
 30 40

130 140 150 160 170 180  
 TCATTTGTTGCCGTTATGCAGGAACATTTTTCTTTGATACCGTAGCATTGGCAATAGAT  
 S F V A V M Q E H F S F D T V A L A I D  
 50 60

190 200 210 220 230 240  
 AATCGTCCAAGTAGTTATGGGATGGCTCAGGCGTGTGCTGCTGCATTGGCGGATAAAGGC  
 N R P S S Y G M A Q A C A A A L A D K G  
 70 80

250 260 270 280 290 300  
 GTTAACTGTATTTTTTATGGAGTGGTACCAACCCAGCTTTGGCCTTTTCAGTCTATGTCT  
 V N C I F Y G V V P T P A L A F Q S M S  
 90 100

310 320 330 340 350 360  
 GACAATATGCCTGCGATAATGGTTACGGGAAGTCATATTCCATTCGAGCGGAACGGCCTC  
 D N M P A I M V T G S H I P F E R N G L  
 110 120

370 380 390 400 410 420  
 AAGTTTTATCGTCCTGATGGTCAAATCACGAAACATGATGAGGCTGCGATCCTTAGTGTT  
 K F Y R P D G E I T K H D E A A I L S V  
 130 140

430 440 450 460 470 480  
 GAAGATACGTGCAGCCATTTAGAGCTTAAAGAACTCATAGTTTCAGAAATGGCTGCTGTT  
 E D T C S H L E L K E L I V S E M A A V  
 150 160

490 500 510 520 530 540  
 AATTATATATCTCGTTATACATCTTTATTTTCTACTCCATTCCTGAAAAATAAGCGTATT  
 N Y I S R Y T S L F S T P F L K N K R I  
 170 180

## Anhang

---

550 560 570 580 590 600  
GGTATTTACGAACATTCAAGCGCTGGGCGTGATCTTTATAAGCCTTTATTTATTGCATTG  
G I Y E H S S A G R D L Y K P L F I A L  
190 200

610 620 630 640 650 660  
GGGGCTGAAGTCGTTAGCTTGGGTAGAAGCGATAATTTTGTACCTATAGATACAGAGGCT  
G A E V V S L G R S D N F V P I D T E A  
210 220

670 680 690 700 710 720  
GTAAGCAAAGAGGATCGGGAAAAAGCTCGCTCATGGGCTAAAGAGTTTCGATTTAGATGCC  
V S K E D R E K A R S W A K E F D L D A  
230 240

730 740 750 760 770 780  
ATATTCTCGACAGATGGGGATGGTGATCGCCCTCTTATTGCTGATGAGGCCGGTGAGTGG  
I F S T D G D G D R P L I A D E A G E W  
250 260

790 800 810 820 830 840  
CTAAGAGGCGATATACTAGGTCTATTATGTTCACTTGCATTGGATGCAGAAGCCGTCGCT  
L R G D I L G L L C S L A L D A E A V A  
270 280

850 860 870 880 890 900  
ATTCCTGTTAGTTGTAACAGCATAATTTCTTCTGGCCGCTTTTTTAAACATGTTAAGCTT  
I P V S C N S I I S S G R F F K H V K L  
290 300

910 920 930 940 950 960  
ACAAAAATTGGCTCGCCTTATGTTATCGAAGCTTTTAAATGAATTATCGCGGAGTTATAGT  
T K I G S P Y V I E A F N E L S R S Y S  
310 320

970 980 990 1000 1010 1020  
CGTATTGTCGGTTTTGAAGCCAATGGCGGTTTTTTATTAGGAAGCGACATCTGTATTAAC  
R I V G F E A N G G F L L G S D I C I N  
330 340

1030 1040 1050 1060 1070 1080  
GAGCAGAATCTTCATGCCTTACCAACTCGTGATGCTGTATTACCAGCAATAATGCTGCTT  
E Q N L H A L P T R D A V L P A I M L L  
350 360

1090 1100 1110 1120 1130 1140  
TACAAAAGTAGGAATACCAGCATTAGCGCTTTAGTCAATGAACTCCCAACTCGTTACACC  
Y K S R N T S I S A L V N E L P T R Y T  
370 380

1150 1160 1170 1180 1190 1200  
CATTCTGACAGATTACAGGGGATTACAAGTATAAAAGTCAATCCTTAATTAGTATGGGC  
H S D R L Q G I T T D K S Q S L I S M G  
390 400

1210 1220 1230 1240 1250 1260  
AGAGAAAATCTGAGCAACCTCTTAAGCTATATTGGTTTGGAGAATGAAGGTGCAATTTCT  
R E N L S N L L S Y I G L E N E G A I S  
410 420

```

1270      1280      1290      1300      1310      1320
ACAGATATGACAGATGGTATGCGAATTACTTTACGTGATGGATGTATTGTGCATTTGCGC
  T D M T D G M R I T L R D G C I V H L R
                                430                                440

1330      1340      1350      1360      1370      1380
GCTTCTGGTAATGCACCTGAGTTACGCTGCTATGCAGAAGCTAATTTATTAATAGGGCT
  A S G N A P E L R C Y A E A N L L N R A
                                450                                460

1390      1400      1410      1420      1430
CAGGATCTTGTAATAACAACGCTTGCTAATATTAACGATGCTTGCTGTAA
  Q D L V N T T L A N I K K R C L L *
                                470                                478

```

### 6.1.6 *Salmonella typhimurium* – GDP-Mannose Pyrophosphorylase (EC 2.7.7.22) – Mannose-1-phosphat Guanylyltransferase- rfbM / manC

```

10      20      30      40      50      60
ATGTCTTTTCTTCCCGTAATTATGGCTGGCGGCACAGGTAGCCGTTTATGGCCGCTTTCA
  M S F L P V I M A G G T G S R L W P L S
                                10                                20

70      80      90      100     110     120
CGCGAATATCATCCGAAGCAGTTTCTAAGCGTTGAAGGTAACTATCAATGCTGCAAAAT
  R E Y H P K Q F L S V E G K L S M L Q N
                                30                                40

130     140     150     160     170     180
ACTATAAAGCGATTAGCTTCACTTTCTACAGAAGAACCCGTTGTCATTTGCAATGACAGA
  T I K R L A S L S T E E P V V I C N D R
                                50                                60

190     200     210     220     230     240
CACCGTTTCTTAGTCGCTGAACAACCTCCGTGAAATTGACAAGTTAGCAAATAATATTATT
  H R F L V A E Q L R E I D K L A N N I I
                                70                                80

250     260     270     280     290     300
CTCGAACCGGTAGGCCGTAATACTGCACCAGCGATCGCTCTTGCCGCGTTTTGTGCGCTC
  L E P V G R N T A P A I A L A A F C A L
                                90                                100

310     320     330     340     350     360
CAGAATGCTGATAATGCTGATCCTCTTTTGTGGTTCTTGCTGCAGATCATGTGATTGAG
  Q N A D N A D P L L L V L A A D H V I Q
                                110                                120

370     380     390     400     410     420
GATGAAATAGCTTTTACGAAAGCTGTGACAGATGCTGAAGAATACGCTGCAAATGGTAAG
  D E I A F T K A V R H A E E Y A A N G K
                                130                                140

```

## Anhang

---

430 440 450 460 470 480  
CTTGTAACTTTTGGTATTGTTCCAACGCATGCTGAAACGGGTTATGGATATATTCGTCGT  
L V T F G I V P T H A E T G Y G Y I R R  
150 160

490 500 510 520 530 540  
GGTGAGTTGATAGGAAATGACGCTTATGCAGTGGCTGAATTTGTGGAGAAACCGGATATC  
G E L I G N D A Y A V A E F V E K P D I  
170 180

550 560 570 580 590 600  
GATACCGCCGGTGACTATTTCAAATCAGGGAAATATTACTGGAATAGCGGTATGTTTTTA  
D T A G D Y F K S G K Y Y W N S G M F L  
190 200

610 620 630 640 650 660  
TTTCGTGCAAGCTCTTATTTAAACGAATTAAGTATTTATCACCTGAAATTTATAAAGCT  
F R A S S Y L N E L K Y L S P E I Y K A  
210 220

670 680 690 700 710 720  
TGTGAAAAGCGGTAGGACATATAAATCCCGATCTTGATTTTATTCGTATTGATAAAGAA  
C E K A V G H I N P D L D F I R I D K E  
230 240

730 740 750 760 770 780  
GAGTTTATGTCATGCCCGAGTGATTCTATCGATTATGCAGTTATGGAGCACACACAGCAT  
E F M S C P S D S I D Y A V M E H T Q H  
250 260

790 800 810 820 830 840  
GCGGTGGTGATACCAATGAGCGCTGGCTGGTCGGATGTGGGTTCCCTGGTCCTCACTTTGG  
A V V I P M S A G W S D V G S W S S L W  
270 280

850 860 870 880 890 900  
GATATATCGAATAAAGATCATCAGAGAAATGTTTTAAAAGGAGATATTTTCGCACATGCT  
D I S N K D H Q R N V L K G D I F A H A  
290 300

910 920 930 940 950 960  
TGTAATGATAATTACATTTATCCGAAGATATGTTTATAAGTGCATTGGTGTAAGCAAT  
C N D N Y I Y S E D M F I S A I G V S N  
310 320

970 980 990 1000 1010 1020  
CTTGTCATTGTTCAAACAACAGACGCTTTACTGGTGGCTAATAAAGATACAGTACAAGAT  
L V I V Q T T D A L L V A N K D T V Q D  
330 340

1030 1040 1050 1060 1070 1080  
GTTAAAAAATTGTCGATTATTTAAACCGGAATGATAGGAACGAATATAAACAACATCAA  
V K K I V D Y L K R N D R N E Y K Q H Q  
350 360

1090 1100 1110 1120 1130 1140  
GAAGTTTTCCGCCCTGGGGAAAATATAATGTGATTGATAGCGGCAAAAATTACCTCGTT  
E V F R P W G K Y N V I D S G K N Y L V  
370 380

```
1150      1160      1170      1180      1190      1200
CGATGTATCACTGTTAAGCCGGGTGAGAAATTTGTGGCGCAGATGCATCACCACCGGGCT
R C I T V K P G E K F V A Q M H H H R A
390                                     400

1210      1220      1230      1240      1250      1260
GAGCATTGGATAGTATTATCCGGGACTGCTCGTGTACAAAGGGAGAGCAGACTTATATG
E H W I V L S G T A R V T K G E Q T Y M
410                                     420

1270      1280      1290      1300      1310      1320
GTTTCTGAAAATGAATCAACATTTATTCCTCCGAATACTATTCACGCGCTGGAAAATCCT
V S E N E S T F I P P N T I H A L E N P
430                                     440

1330      1340      1350      1360      1370      1380
GGAATGACCCCTGAAGTTAATTGAGATTCAATCAGGTACCTATCTTGGTGAGGATGAT
G M T P L K L I E I Q S G T Y L G E D D
450                                     460

1390      1400      1410      1420      1430      1440
ATTATTCGTTTAGAACAACGTTCTGGATTTTCGAAGGAGTGGACTAATGAACGTAGTTAA
I I R L E Q R S G F S K E W T N E R S *
470                                     480
```

## 6.2 Definitionen

### Enzymaktivität:

Nach der alten Regel der International Union of Biochemistry (IUB) von 1961 ist eine Einheit der Enzymaktivität (U) die Menge Enzym, die unter definierten Bedingungen in einer Minute 1 Mikromol Substrat umsetzt. Dabei sollte die eingesetzte Substratkonzentration oberhalb des Sättigungsbereiches liegen, damit die Reaktionsgeschwindigkeit unabhängig von der Änderung der Substratkonzentration ist. Obwohl nach dem Internationalen Einheitssystem die Enzymaktivität in Katal angegeben wird (Stoffumsatz von 1 Mol pro Sekunden), ist die Einheit Unit heute noch weitgehend im Gebrauch. Für die Umrechnung der Einheiten untereinander gilt: 1 U = 16,67 nkat bzw. 1 nkat = 0,06 U.

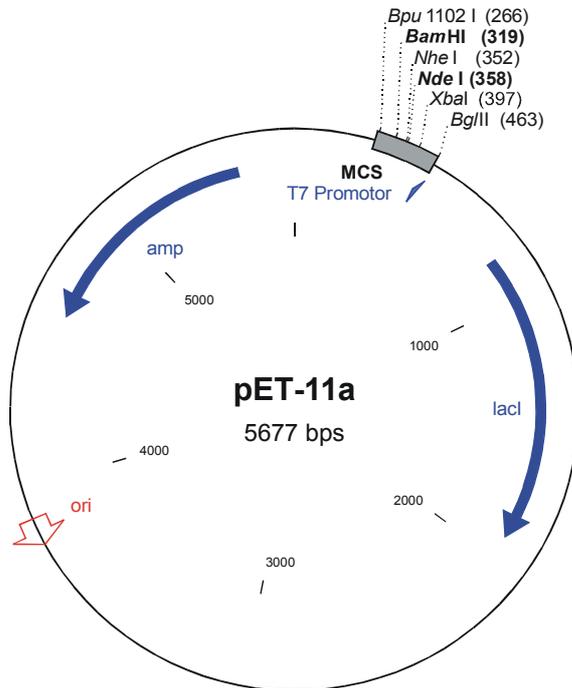
### Spezifische Aktivität:

Die spezifische Aktivität wird in U/mg Protein bzw. in kat/kg angegeben.

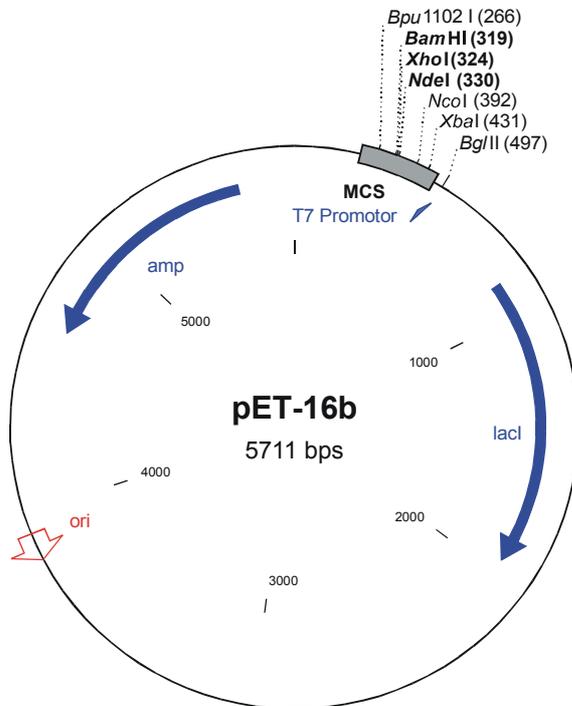
## 6.3 Vektoren und Plasmide

Plasmidkarten der verwendeten Expressionsplasmide:

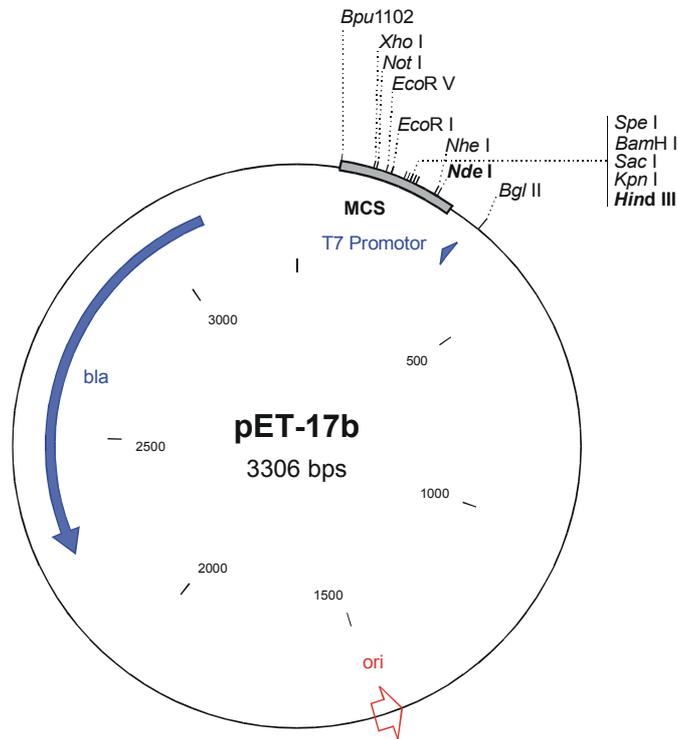
▪ pET-11a:



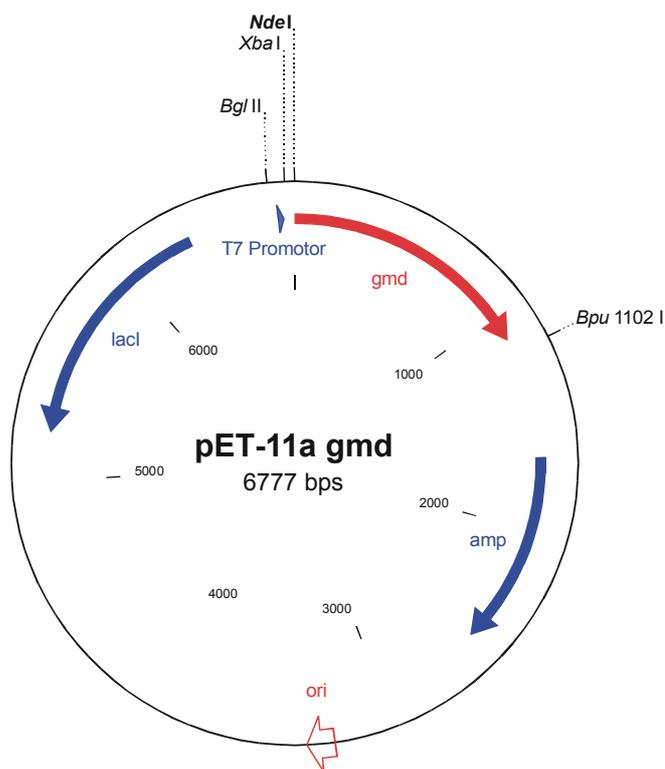
▪ pET-16b:



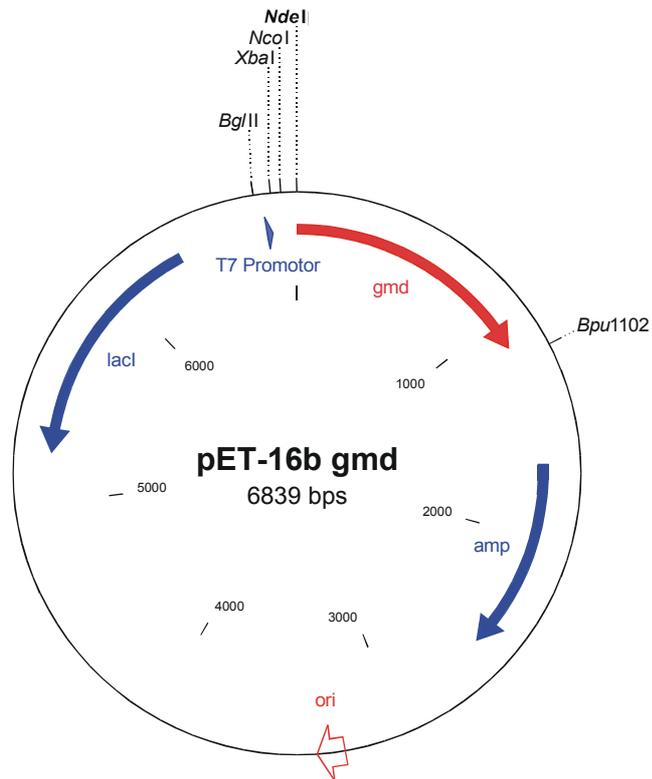
▪ pET-17b:



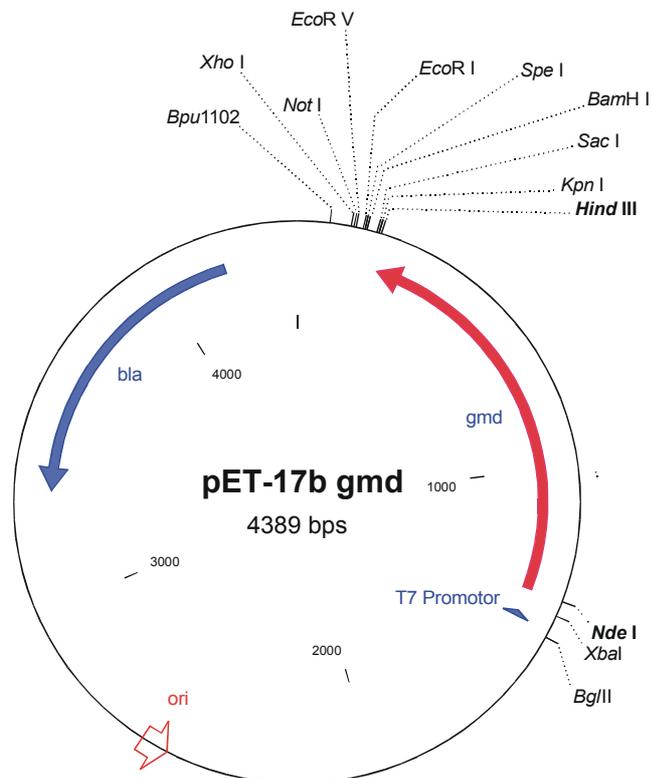
▪ pET-11a-gmd:



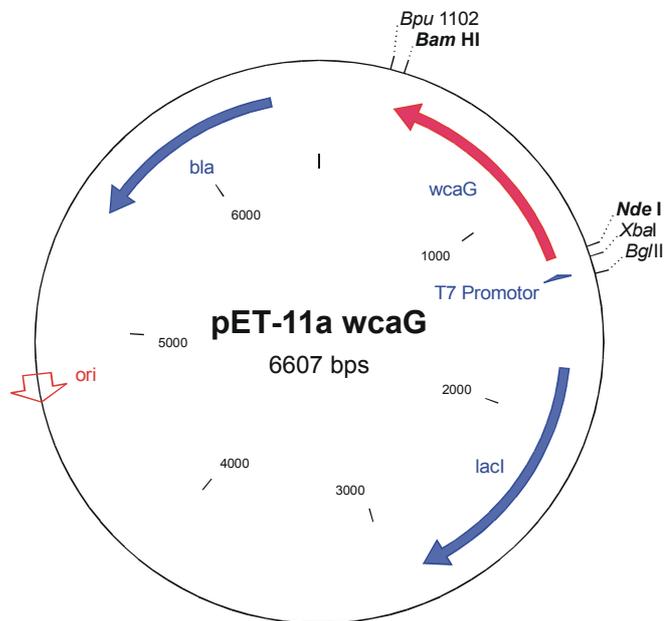
▪ pET-16b-gmd:



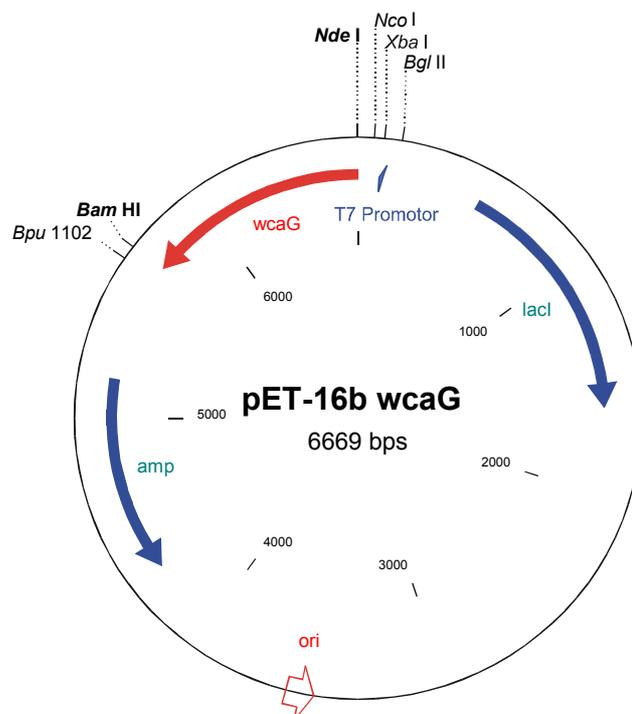
▪ pET-17b-gmd:



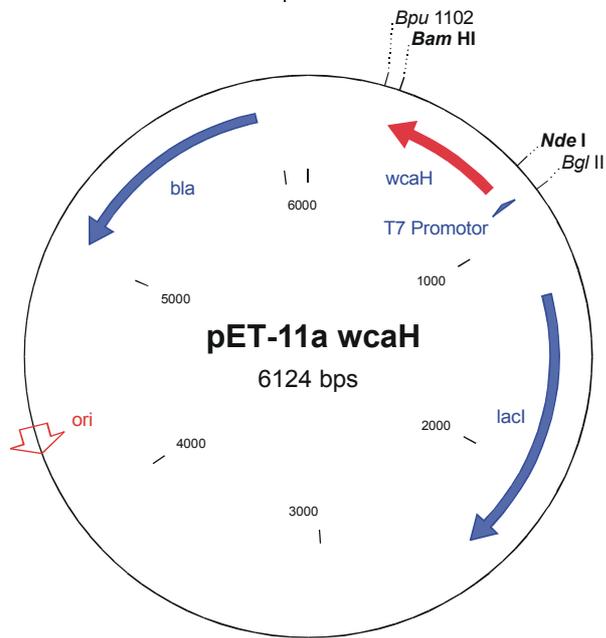
▪ pET-11a-wcaG(fcl):



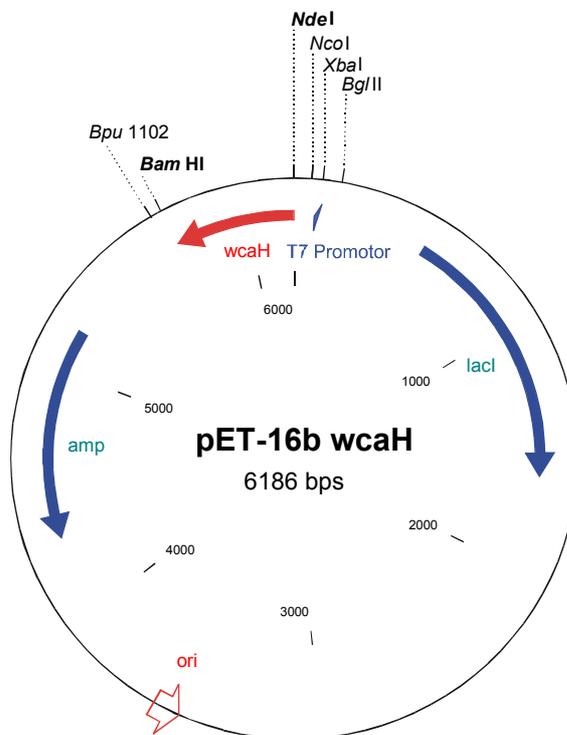
▪ pET-16b-wcaG(fcl):



▪ **pET-11a-wcaH:**



▪ **pET-16b-wcaH:**



## 6.4 Verwendete Geräte

### **Amicon, Witten:**

Ultrafiltrationzellen 10 ml und 50 ml mit Ultrafiltrationsmembranen YM-10 und YM-30;  
Tischzentrifuge Microfuge A; Microcon™ 10

### **Applied Biosystems, Weiterstadt:**

Protein Sequencer 477 A; PTH Analyzer 120A

### **B. Braun AG, Melsungen:**

pH-Control Einheit Typ 88001020 mit pH-Meter und pH-Controller

### **Bio-Rad, München:**

Protean Xi Gelkammer

### **Büchi GmbH, Göppingen:**

Rotavapor RE 111

### **CS, Langerwehe:**

Hypersil ODS 5 µm RP-18 Säule 125 x 4 x 8 mm mit Vorsäule 10 x 4 mm; Kromasil C18  
5 µm 250 x 4,6 mm

### **DuPont, Bad Homburg:**

Zentrifuge Sorvall RC-SB mit Rotor GS3 und mit Rotor SS-34

### **Eppendorf, Hamburg:**

Eppendorf Mixer 5432; Eppendorf Thermostat 5320; Eppendorf-Pipetten Research;  
Eppendorf Reaktionsgefäße

### **Falcon, Lincoln Park, New York, U.S.A.:**

Mikrotiterplatten 96-well microtest III

### **Gynkotek, Germering:**

Probengeber GINA 160; HPLC Pumpe Modell 300 sowie Modell 480; UVD-160 S; UVD-  
320 S; SP-6; Säulenofen; Degaser DG1310

### **Hettich:**

Rotina Sigma-3MK; Rotina 35R

### **Hofer Scientific:**

Gelkammer Mighty Small 250

### **IMA, Frankfurt:**

Disintegrator S

### **Infors, Bottmingen:**

Schüttler HAT; Techfors 20 L / 40 L Fermenter

**Leybold Heraeus AG, Hanau:**

Gefriertrockner Lyovac GT3; Tischzentrifuge Biofuge A

**Molecular Devices, Menlo Park, Kalifornien, USA:**

UVmax microplate reader

**Pharmacia, Freiburg:**

Diverse Pharmacia-Säulen; Gradi Frac System mit HiLoadPump P-50; UV-Monitor UV-1 mit Durchflußzelle; Fraktionssammler FRAC-100; Schreiber REC 102 , P1 Peristaltikpumpe; LKB NovaBlot

**Retsch, Haan:**

Schwingmühle Typ MM

**Satorius, Göttingen:**

Waage MC 1 laboratory LC 6200 D; Filter 0,2 µm, Celluloseacetat-Membran

**Schott, Mainz:**

pH-Elektrode

**Shimadzu Europa GmbH, Duisburg:**

Spectrophotometer UV 160

## 6.5 Chemikalien und Enzyme

Neben den unten aufgelisteten Substanzen wurden in dieser Arbeit nur Chemikalien der Reinheitsgrade „zur Analyse“, „reinst“ und für „biochemische Zwecke“ verwendet. Diese wurden in der Regel von Fluka, Merck, Roth oder Sigma bezogen. Nährmedienbestandteile waren von Difco, Merck oder Oxoid. Enzyme und Kits für die Molekularbiologie wurden von Biozym, Genomed, NEB, Pharmacia, Roche Diagnostics (früher Boehringer Mannheim) oder Stratagene bezogen. Die Chemikalien für molekularbiologische Untersuchungen waren dabei von höchster Qualität.

**Biomol, Hamburg:**

NAD<sup>+</sup>; NADH; NADP<sup>+</sup>; NADPH

**BioRad, München:**

Acrylamid-Fertiglösung (30 %-ig); „Pre-stained“-Marker low range

**Fluka, Neu-Ulm:**

Bromphenolblau; Coomassie Brilliant Blue G-250; 1,4-Dithiothreitol; Dowex 1x2 (100 – 200 mesh) Chloridform; Silbernitrat

**Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg:**

Ampicillin

**Hüls, Marl:**

PEG<sub>4000</sub>

**ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA:**

DTT

**Pharmacia, Freiburg:**

Q-Sepharose Fast Flow; Sephadex G-10; Sephadex G-15

**Qiagen, Hilden:**

Ni-NTA-Superflow

**Roche Diagnostics, Mannheim (früher Boehringer Mannheim):**

Molekulargewichtsstandard low range

**Serva, Heidelberg:**

TBA