



Institut für Biotechnologie

***Reaktionstechnische Untersuchungen
zur enzymatischen Glycosylierung
von Peptiden***

Gregor Dudziak

***Reaktionstechnische Untersuchungen
zur enzymatischen Glycosylierung
von Peptiden***

Gregor Dudziak

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3696

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-3696

D5 (Diss. Univ. Bonn, 1999)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461/61-61 02 · Telefax: 02461/61-61 03 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1996 bis Mai 1999 am Lehrstuhl für Biotechnologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. C. Wandrey angefertigt. Die praktischen Arbeiten wurden am Institut für Biotechnologie der Forschungszentrum Jülich GmbH durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt:

Meinem Doktorvater Herrn Professor Wandrey für die interessante Themenstellung, für seine unerschöpfliche Diskussionsbereitschaft und für die Freizügigkeit, die er mir bei der Bearbeitung dieses Themas gewährte

Herrn Professor Bargon, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie der Universität Bonn, für die freundliche Übernahme des Korreferates

Den Kooperationspartnern des EU-Projekts, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre: Herrn Prof. Henrik Clausen, Frau Helle Hassan, Herrn Dr. Eric Bennett und Herrn Dr. Tilo Schwientek, Universität Copenhagen, Frau Prof. Pauline Rudd, Frau Dr. Louise Royle sowie den Herren Dr. Tony Merry und Dr. David Neville, Universität Oxford, den Herren Prof. Vliegenthart, Prof. Kamerling und Ricardo Gutiérrez Gallego, Universität Utrecht, Herrn Dr. Lothar Elling, Frau Veronika Nieder, Frau Dr. Astrid Zervosen und Herrn Thomas Bülter, Universität Düsseldorf, Herrn Prof. Berger, Herrn Dr. André Dinter sowie Herrn Steffen Zeng, Universität Zürich

Herrn Prof. Ole Hindsgaul und im besonderen Frau Prof. Monica Palcic für die goßzügige Einladung nach Canada

Frau Dr. Keiko Sujino und Herrn Dr. Kenji Osumi für die Einführung in die Welt der chemischen Kohlenhydratsynthese wie der japanischen kulinarischen Genüsse

Herrn Prof. Kunz und Frau Nicole Bézay für eine erfolgreiche Zusammenarbeit

Herrn Prof. Udo Kragl für sein großes Interesse an meiner Arbeit, unzählige gute Tips und Hilfestellungen

Herrn Dr. Detlef Eisenkrätzer für die hervorragende Kooperation, einen Haufen Enzyme und viele erbauliche Abende – in Jülich und dem Rest Europas

Herrn Christoph Hoh für seine excellente Arbeit als Praktikant und Diplomand sowie für die Durchsicht der Arbeit

Frau Doris Hahn und Herrn Volker Lorbach für die tatkräftige Unterstützung bei den praktischen Arbeiten, sowie Frau Helga Schmitz für die Hilfe bei der Zellkulturtechnik

Frau Juliane Beliczey und Herrn Dr. Andreas Liese für die rasche und anregend kritische Durchsicht der Arbeit

Den Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie für die angenehme und freundschaftliche Atmosphäre

Herrn Dr. Sven Fey, der mich in Jülich nicht vereinsamen ließ

Herrn Dr. Guido Giffels, der mir zeigte, daß in der Ruhe die Kraft liegt

Meinen Eltern und nicht zuletzt meiner Lebensgefährtin Simone Küßner, der ich diese Arbeit widme

„Ich stelle mir das große Gehege der Wissenschaften als ein weites Feld mit dunklen und hellen Stellen vor. Unsere Arbeiten müssen darauf abzielen, die Grenzen der hellen Stellen zu erweitern oder die Lichtquellen auf diesem Feld zu vermehren. Das eine ist Aufgabe des schöpferischen Genies, das andere Aufgabe des verbessernden Scharfsinns.“

Denis Diderot, Über die Natur, 1780

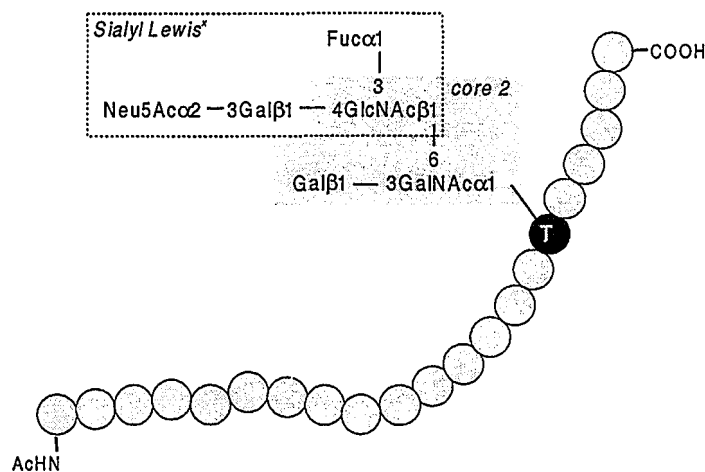
Reaktionstechnische Untersuchungen zur enzymatischen Glycosylierung von Peptiden

Während noch vor zwanzig Jahren angenommen wurde, daß die biochemischen Eigenschaften von Proteinen vor allem durch ihre Aminosäuresequenz bestimmt werden, so mußte diese Hypothese inzwischen revidiert werden: Tatsächlich werden interzelluläre Erkennungsprozesse oftmals durch die Struktur der mit den Proteinen verknüpften Zucker gesteuert. Wichtige Beispiele hierfür sind Entzündungsreaktionen, Infektionen sowie die Metastasierung von Tumoren.

Zur Untersuchung dieser Phänomene sowie zum Design von Wirkstoffen ist es notwendig, Teilstrukturen dieser biologisch aktiven Substanzen zu synthetisieren. Die Biosynthese wird durch Glycosyltransferasen katalysiert. Sie übertragen aktivierte Zucker selektiv und in quantitativen Ausbeuten – dabei wird jede Bindung durch ein spezielles Enzym geknüpft.

Für enzymatische Glycosylierungen *in vitro* ergeben sich die folgenden Probleme:

- Glycosyltransferasen werden nur in geringen Mengen exprimiert. Zur Gewinnung größerer Mengen werden rekombinante Zelllinien benötigt.
- Alternativ können Hydrolysenzyme, etwa eine Galactosidase, zur Synthese eingesetzt werden. Die Ausbeuten sind dabei in der Regel jedoch sehr niedrig.
- Aktivierte Zucker (Nucleotidzucker) sind ausgesprochen teuer – bis zu 100.000 DM/g.



Hexasaccharid am Peptid – die Zielstruktur

Ziel der Promotion war der Aufbau komplexer Zuckerstrukturen auf Peptiden. Dabei wurden folgende Lösungen gefunden:

- Eine GalNAc-Transferase konnte aus rekombinanter Zelllinie gewonnen werden.
- Es wurden Untersuchungen zur schnellen chemischen Synthese von Nucleotidzuckern sowie zu deren Aufreinigung mittels Nanofiltration durchgeführt.
- Der Einsatz einer Galactosidase wurde reaktionstechnisch optimiert, so daß im Modellsystem Ausbeuten von 90% erzielt werden konnten.
- Basierend auf den Erkenntnissen der Modelloptimierung konnte erstmalig ein Hydrolysenzym beim Aufbau einer Zuckerstruktur am Peptid eingesetzt werden. Ein Hexasaccharid wurde mit einer Ausbeute von 23% am Peptid synthetisiert (vgl. Abbildung).
- Es wurde eine chemoenzymatische Synthese zur Herstellung von Glycopeptid-Bausteinen entwickelt.

Die Ergebnisse wurden zum überwiegenden Teil in Kooperation mit akademischen Partnern erzielt – Verweise hierauf finden sich in den einzelnen Kapiteln.

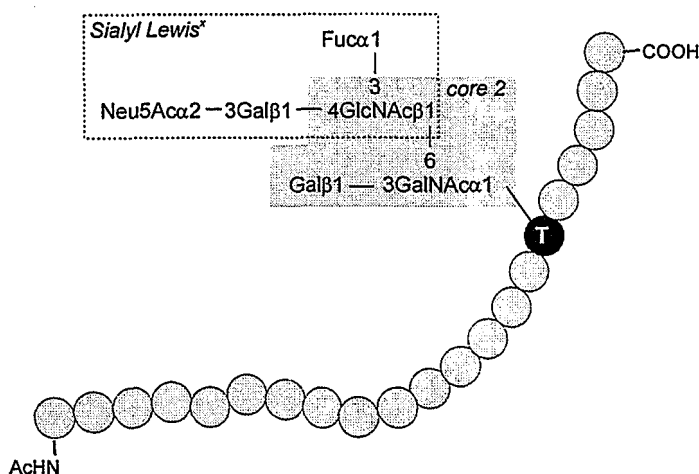
Engineering enzymatic glycosylation of peptides

Whereas twenty years ago, the amino acid sequence of a protein was considered most relevant for its biological activity, it is now obvious that intercellular recognition processes are often mediated by protein glycosylation sites. Important examples are inflammation, infections and tumor metastasis, respectively.

For the purpose of biochemical research as well as for drug design, fragments of bioactive proteins are needed, which are very often only available by laborious multistep synthesis. *In vivo*, Glycosylation is catalysed by glycosyltransferases. These enzymes selectively transfer activated sugars with quantitative yields.

Enzymatic glycosylation *in vitro* has to cope with several problems:

- Glycosyltransferases are expressed only in very small activities. For large scale production, recombinant cell lines are needed.
- Alternatively, enzymes catalyzing hydrolysis reactions *in vivo*, for example galactosidases, can be used for synthesis. In this case, yields are usually very low.
- Activated sugars (nucleotide sugars) are very expensive substrates – up to DM 100,000 per gramm.



Target compound: Hexasaccharide containing glycopeptide

Within this thesis, the enzymatic synthesis of complex oligosaccharides on peptides as acceptor substrates was carried out. The following progress could be made:

- A GalNAc-transferase was obtained from a recombinant cell line.
- Investigations on the rapid synthesis of nucleotide sugars were carried out. Purification was simplified by nanofiltration.
- By optimising the use of a galactosidase for glycan synthesis, 90% yields were obtained in model systems.
- Based on these findings, the galactosidase could be employed within a peptide glycosylation sequence with 30% yield. A hexasaccharide structure linked to a peptide was synthesised with 23% yield.
- A novel strategy for the chemoenzymatic synthesis of glycopeptide building blocks was developed.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Kohlenhydrate in der Natur	1
1.1.1	Glycoproteine	2
1.1.2	PSGL-1	3
1.1.3	Mucine	6
1.2	Biosynthese von Glycoproteinen	8
1.3	Oligosaccharidsynthese <i>in vitro</i>	9
1.3.1	Chemische Glycosylierung	9
1.3.2	Enzymatische Glycosylierung	10
1.4	Kooperationen	15
2	Zielsetzung	17
2.1	Entwicklung und Optimierung einer enzymatischen core1-Synthese	17
2.2	Aufbau der core2-ständigen Sialyl-Lewis ^x -Struktur am Peptid	18
2.3	Herstellung eines Bausteins für die chemische Glycopeptid-Synthese	19
3	Bereitstellung von Glycosyltransferasen	20
3.1	Produktion der GalNAc-Transferase 3	20
3.1.1	Das Baculovirus-Expressionssystem	21
3.1.2	Vorkulturen zur Anzucht eines Virenstamms	22
3.1.3	Fermentation	22
3.1.4	Aufreinigung	24
3.2	Bereitstellung der core2-GlcNAc-Transferase	25
3.2.1	Expression und Fermentation durch EU-Partner	26
3.2.2	Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie	26
3.3	Zusammenfassung	28
4	Synthese und Aufreinigung von Nucleotidzuckern	29
4.1	Chemische Synthese von GDP-Fucose	31
4.1.1	Schnelle Synthese von GDP-Fucose	33

4.1.2	Versuche zur Optimierung	33
4.1.3	Techniken zur Produktaufreinigung	36
4.2	Nanofiltration zur Aufreinigung von Nucleotidzuckern	38
4.2.1	Membranprozesse als Trennoperationen	38
4.2.2	Membranscreening	42
4.2.3	Entsalzung von CMP-Neuraminsäure und GDP-Fucose	44
4.2.4	Maßstabsverkleinerung der Nanofiltration	46
4.3	Zusammenfassung	47
5	Reaktionstechnische Optimierung von Mehrenzysystemen zur Synthese von O-Glycan-Strukturen	49
5.1	Modelle zur Beschreibung enzymatischer Reaktionen	51
5.2	Galactosidase-katalysierte Synthese der core1-Struktur	53
5.2.1	Aktivitäts- und Stabilitätsmessungen	53
5.2.2	Kinetik der Transgalactosylierung	55
5.3	Kombinierter Einsatz von Galactosidase und GlcNAc-Transferase	60
5.3.1	Aktivitäts- und Stabilitätsmessungen	61
5.3.2	Kinetik der core2-Synthese	63
5.3.3	Untersuchungen zum Einsatz einer Phosphatase	66
5.3.4	Synthese von core6-Bn	67
5.4	Optimierung der core2-Ausbeute mit einem genetischen Algorithmus	69
5.4.1	Grundlagen zum genetischen Algorithmus	70
5.4.2	Einrichten und Funktion des genetischen Algorithmus	71
5.4.3	Ergebnisse der Optimierung	73
5.5	Kombinierter Einsatz von Galactosidase und Sialyltransferase	78
5.5.1	Aktivitäts- und Stabilitätsmessungen	79
5.5.2	Kinetik der Sialyl-core1-Synthese	81
5.5.3	Synthese von Sialyl-core1-Bn	83
5.6	Zusammenfassung	85

6	Enzymatische Glycosylierung von Peptiden	87
6.1	GalNAc-Transfer	90
6.1.1	Synthese des MUC1a'-GalNAc- <i>building blocks</i>	91
6.1.2	Untersuchungen zur Glycosylierung von PSGL-1	91
6.2	Aufbau der core2-Struktur auf MUC1a'	92
6.2.1	Präparativer Einsatz des Galactosidase/GlcNAcT-Mehrenzzymsystems	93
6.2.2	Untersuchungen zum Aufbau der Sialyl-core1-Struktur an MUC1a'	96
6.3	Synthese der core2-ständigen Sialyl-Lewis ^x -Struktur an MUC1a'	96
6.3.1	Galactosylierung	97
6.3.2	Sialylierung	99
6.3.3	Fucosylierung	99
6.3.4	<i>O</i> -Glycan- <i>profiling</i>	100
6.4	Zusammenfassung	103
7	Herstellung eines Bausteins für die chemische Glycopeptidsynthese	104
7.1	Chemische Synthese des GalNAc-Thr-Bausteins	106
7.2	Einsatz von Cyclodextrinen als Lösungsvermittler	107
7.3	Glycosylierung der Cyclodextrin- Einschlußverbindung	109
7.4	Zusammenfassung	111
8	Diskussion und Ausblick	112
8.1	Beurteilung des Projekterfolgs	112
8.2	Bereitstellung der Glycosyltransferasen	113
8.2.1	Fermentation der GalNAc-Transferase 3	113
8.2.2	Aufreinigung der b1,6-GlcNAc-Transferase	113
8.3	Synthese und Aufreinigung von Nucleotidzuckern	114
8.3.1	Bewertung der Synthese von GDP-Fucose	114
8.3.2	Einsatz der Nanofiltration zur Aufreinigung von Feinchemikalien	114
8.4	Mehrenzzymsysteme zur Synthese <i>O</i> -glycosidischer core-Strukturen	117

8.4.1	Bewertung der Verfahren	118
8.4.2	Verfügbarkeit der Galactosidase	117
8.4.3	Synthese aktivierter Oligosaccharide	118
8.5	Glycosylierung von Peptiden	120
8.5.1	Aufbau von core-Strukturen auf PSGL-1	120
8.5.2	Aufbau von Poly-LacNAc-Strukturen	122
8.6	Sulfatierung von PSGL-1	124
8.6.1	Untersuchung zur Sulfatierung mit einer bakteriellen Sulfotransferase	125
8.6.2	Einsatz einer Tyrosylprotein-Sulfotransferase	127
8.7	Chemoenzymatische Glycopeptidsynthese	125
9	Zusammenfassung	129
9.1	Bereitstellung der Glycosyltransferasen	129
9.2	Synthese und Aufreinigung von Nucleotidzuckern	129
9.3	Reaktionstechnische Optimierung von Mehrenzzymsystemen	129
9.4	Enzymatische Glycosylierung von Peptiden	130
9.5	Herstellung eines Bausteins zur chemischen Peptidsynthese	130
10	Material und Methoden	131
10.1	Analytik	131
10.1.1	HPLC-Systeme	131
10.1.2	Kapillarelektrophorese	133
10.2	Enzymassays	134
10.2.1	β -Galactosidase-Assay 1 – Hydrolyse	134
10.2.2	β -Galactosidase-Assay 2 – Transglycosylierung	135
10.2.3	core2-GlcNAcT-Assay	135
10.2.4	α 2,3-O-SiaT-Assay	135
10.2.5	Radioaktivassay GalNAcT	135
10.3	Bereitstellung der GalNAc-Transferase 3	136
10.3.1	Kultivierung der Sf9-Zellen	136
10.3.2	Zellzahlbestimmung	137
10.3.3	Plaque-Assay	137
10.3.4	Umgang mit genetisch veränderten Organismen	137

10.3.5	Ionentauschchromatographie	138
10.4	Aufreinigung der GlcNAc-Transferase	139
10.4.1	Herstellung eines IgG-Sepharose-Gels	139
10.4.2	IgG-Affinitätschromatographie	139
10.4.3	Proteinbestimmung nach Bradford	139
10.5	Ultrafiltrationen zur Umpufferung von Enzymen	140
10.5.1	Sialyltransferase	140
10.5.2	β -Galactosidase	140
10.6	Synthesen	140
10.6.1	Kapitel 4	140
10.6.2	Kapitel 5	141
10.6.3	Kapitel 6	144
10.6.4	Kapitel 7	145
10.7	<i>O</i> -Glycan-profiling	149
10.8	Nanofiltration	149
10.9	Materialien	149
10.9.1	Liste der verwendeten Enzyme	149
10.9.2	Liste der verwendeten Chemikalien	150
10.9.3	Liste der verwendeten Geräte	151
11	Literatur	153

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1.1	Stammbaum der <i>O</i> -glycosidischen core-Strukturen	3
Abb. 1.2	Wirkweise von Rezeptorblockern bei der Selektin-initiierten Leukozytenextravasation	4
Abb. 1.3	Biologisch aktiver N-Terminus des PSGL-1	5
Abb. 1.4	Tumorassoziierte <i>O</i> -Glycane	7
Abb. 1.5	Primäres <i>N</i> -Glycan	9
Abb. 1.6	Sialyl-Lewis ^X und Mimetica	10
Abb. 1.7	Donor-Substrat für die Fucosyltransferase aus humaner Milch	12
Abb. 1.8	Reverse Hydrolyse und Transglycosylierung am Beispiel der LacNAc-Synthese	13
Abb. 1.9	Gekoppelte Galactosidase- und Sialyltransferase-katalysierte Reaktion mit Regenerierzyklus für CMP-Neu5Ac	14
Abb. 1.10	EU-Projekt "Engineering <i>O</i> -glycosylation for the production of receptor blockers"	15
Abb. 2.1	Einsatz einer Sialyltransferase zum Abfangen des core1-Produkts	17
Abb. 2.2	Core2-ständige Sialyl-Lewis ^X -Struktur	18
Abb. 2.3	Chemoenzymatische Synthese von Glycopeptiden	19
Abb. 3.1	Glycosyltransferasen zum Aufbau der core2-Struktur	20
Abb. 3.2	GalNAcT-Fermentation im 20 L-Fermenter: Anzucht und Enzymexpression	23
Abb. 3.3	Foto des Fermenters zur Kultivierung von Sf9-Zellen	24
Abb. 3.4	Elutionsprofil der chromatographischen Aufreinigung	27
Abb. 4.1	Katalogpreise der verwendeten Nucleotidzucker	29
Abb. 4.2	Zweistufige enzymatische Synthese von CMP-Neu5Ac	30
Abb. 4.3	Chemische Synthese der GDP-Fucose	31
Abb. 4.4	Neue Strategie zur Synthese von GDP-Fucose	32
Abb. 4.5	Reaktionsverlauf der GDP-Fucose-Synthese	34
Abb. 4.6	Säurekatalysierte Racemisierung der Fucose-Glycoside	35
Abb. 4.7	Anomerenverhältnis als Funktion der Ausbeute	36
Abb. 4.8	Selektive Hydrolyse der GDP- α -Fucose bei pH 10	37
Abb. 4.9	Nanofiltration als Alternativtechnik zur Gelpermeationschromatographie	38
Abb. 4.10	Membranverfahren	39

Abb. 4.11	Ausspülkurven – Restanteil als Funktion der Anzahl der Verweilzeiten	41
Abb. 4.12	Fließschema der Nanofiltrationsanlage	42
Abb. 4.13	Foto der Nanofiltrationsanlage incl. Kolbenpumpe zur Diafiltration	43
Abb. 4.14	Präparative Nanofiltrationen der Nucleotidzucker	45
Abb. 4.15	Vergleich der Filtrationsmodule	47
Abb. 5.1	Enzyme zum Aufbau der core2-Struktur	49
Abb. 5.2	Mehrenzzymsysteme zur Synthese von core-Strukturen	51
Abb. 5.3	Aktivitäten in Abhängigkeit von Puffersystem und pH; Stabilitäten in Abhängigkeit von pH und Temperatur	54
Abb. 5.4	Kinetik der Galactosidase bei der Synthese von core2-Bn	55
Abb. 5.5	Transgalactosylierungs-Aktivität als Funktion der Substratkonzentrationen	57
Abb. 5.6	Eingeschränkte Ausbeuten bei der Transgalactosylierung von GalNAc-Bn	58
Abb. 5.7	Inhibierung der Galactosidase-Aktivitäten durch freie Galactose	59
Abb. 5.8	Transformation der Folgeprodukte im Galactosidase/GlcNAc-Transferase-System	59
Abb. 5.9	Vereinfachte Darstellung des Galactosidase/GlcNAcT-Reaktionssystems	60
Abb. 5.10	Erster Syntheserversuch	61
Abb. 5.11	GlcNAc-Transferase-Aktivität in Abhängigkeit vom Puffersystem	62
Abb. 5.12	Stabilität der GlcNAc-Transferase als Funktion der Temperatur und des pH	63
Abb. 5.13	Aktivität der GlcNAcT als Funktion der Substratkonzentrationen	64
Abb. 5.14	Diskriminierung der Hydrolyse bei niedrigen core1-Bn-Konzentrationen	65
Abb. 5.15	Inhibierung der GlcNAc-Transferase durch UDP	65
Abb. 5.16	Aktivitäten der alkalischen und sauren Phosphatase in Abhängigkeit vom pH-Wert	67
Abb. 5.17	Vollständiges (?) Reaktionssystem	68
Abb. 5.18	Verbesserte Synthese	68
Abb. 5.19	Selektivitäten in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur	69
Abb. 5.20	Ein <i>string</i> codiert einen bestimmten Phänotypen	72
Abb. 5.21	Selektionsvorgang	72
Abb. 5.22	<i>Crossing over</i> und Mutation	73
Abb. 5.23	Entwicklung der Individuen sowie der <i>total fitness</i>	74
Abb. 5.24	Bestes Individuum bezüglich der core2-Bn-Maximalkonzentration	75
Abb. 5.25	Bestes Individuum bezüglich der Selektivität	76
Abb. 5.26	Optimierte core2-Synthese bei 10°C	78
Abb. 5.27	Vereinfachte Darstellung des Galactosidase/Sialyltransferase-Systems	79

Abb. 5.28	Sialyltransferase-Aktivität in Abhängigkeit vom Puffersystem und vom pH-Wert	80
Abb. 5.29	Stabilität der Sialyltransferase als Funktion des pH und der Temperatur	80
Abb. 5.30	Aktivität der Sialyltransferase als Funktion der Substratkonzentrationen	82
Abb. 5.31	Inhibierung der Sialyltransferase durch CMP und Cytidin	82
Abb. 5.32	Sialyl-core1-Bn-Synthese	84
Abb. 6.1	Enzymatischer <i>en bloc</i> -Transfer natürlicher <i>N</i> -Glycoside	87
Abb. 6.2	Glycopeptide und Glycopeptidanaloga	88
Abb. 6.3	Core2-ständiges Sialyl-Lewis ^x am PSGL-1 N-Terminus	89
Abb. 6.4	Enzymatische Synthese des MUC1a'-GalNAc- <i>building blocks</i>	91
Abb. 6.5	Transglycosylierung und Hydrolyse durch Protease-Nebenaktivität	93
Abb. 6.6	MUC1a'-core2-Synthese	94
Abb. 6.7	Synthese von MUC1a'-core2	95
Abb. 6.8	Einsatz des Galactosidase/SiaT-Systems zur Glycosylierung von MUC1a'-GalNAc	96
Abb. 6.9	Kinetik der core2-pnp-Galactosylierung	97
Abb. 6.10	Aufbau der Sialyl-Lewis ^x -Struktur auf MUC1a'-core2	98
Abb. 6.11	<i>O</i> -Glycan- <i>profiling</i> zur Analyse der Gal(β1-4)core2-Struktur	102
Abb. 7.1	Chemische Synthese von core2-Thr	105
Abb. 7.2	Syntheseplan zur Darstellung eines Sialyl-core1-Glycopeptids	106
Abb. 7.3	Chemische Synthese von GalNAc-Thr	107
Abb. 7.4	Cyclodextrine	108
Abb. 7.5	Steigerung der Akzeptor-Löslichkeit durch Cyclodextrine	109
Abb. 7.6	Galactosidase-Aktivität als Funktion der GalNAc-Thr/Cyclodextrin-Konzentration	110
Abb. 7.7	Präparative Sialyl-core1-Thr-Synthese	111
Abb. 8.1	Nanofiltration in der Glycopeptidsynthese	115
Abb. 8.2	Membrangestützte Aufreinigung von Glycopeptiden	115
Abb. 8.3	Diafiltrationsexperiment zur Aufreinigung von Glycopeptiden	116
Abb. 8.4	Synthese von core1-UDP	119
Abb. 8.5	Enzymatische Synthese von Sia-core1-UDP	119
Abb. 8.6	Kombinierte <i>in vivo/in vitro</i> -Produktion glycosylierter PSGL-1-Peptide	122
Abb. 8.7	An PSGL-1 gebundene <i>O</i> -Glycane	123
Abb. 8.8	Enzyme zum Aufbau sialylierter und fucosylierter Poly-LacNAc-Strukturen	124
Abb. 8.9	Enzymatische Sulfatierung durch Aryl- und Tyrosylprotein-Sulfotransferase	125

Abb. 8.10	Sulfatierung von Peptiden mit mikrobieller Arylsulfotransferase	126
Abb. 8.11	Chemoenzymatische Synthese der F1- α -Struktur	128
Abb. 10.1	Beispielchromatogramm des HPLC-Systems 2	132
Abb. 10.2	Beispielelektropherogramm für die Analyse von Glycopeptiden	134
Abb. 10.3	Excel- <i>spreadsheet</i> zur Berechnung des Virentiters	138
Abb. 10.4	2D TOCSY NMR-Spektrum von Sialyl-core1-Bn	143
Abb. 10.5	^1H -NMR-Spektrum von Sialyl-core1-Thr	147
Abb. 10.6	^{13}C - ^1H -COSY NMR-Spektrum von Sialyl-core1-Thr	148

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 3.1	Aufreinigung der GalNAc-Transferase	25
Tab. 3.2	Aufreinigung der GlcNAc-Transferase	27
Tab. 4.1	Ausbeuten und Anomerenverhältnisse einiger GDP-Fucose-Synthesen	34
Tab. 4.2	Faktoren, die die Trennleistung der Nanofiltration beeinflussen	40
Tab. 4.3	<i>Screening</i> von Membranen für die Nanofiltration	44
Tab. 5.1	Core1-Synthesen mit β -Galactosidasen	50
Tab. 5.2	Desaktivierung der Galactosidase bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen	54
Tab. 5.3	Kinetische Daten der β -Galactosidase	56
Tab. 5.4	Desaktivierung der GlcNAc-Transferase	63
Tab. 5.5	Kinetische Parameter für die core2-GlcNAc-Transferase	66
Tab. 5.6	Parameter und ihre Variationsbreiten	71
Tab. 5.7	Neue Individuen aus der gerichteten Optimierung	77
Tab. 5.8	Desaktivierung der Sialyltransferase	81
Tab. 5.9	Kinetische Parameter für die α 2,3- <i>O</i> -Sialyltransferase	83
Tab. 6.1	Substratspektren der GalNAc-Transferasen 1-4	90
Tab. 6.2	Synthese der core2-ständigen Sialyl-Lewis ^x -Struktur an MUC1a‘	100
Tab. 8.1	Preise einiger Galactosidasen und Glycosyltransferasen	118
Tab. 10.1	Chemische Verschiebungen der Benzylglycoside	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
R	-	Retention
R	8,314 J/(mol·K)	allgemeine Gaskonstante
rpm	1/min	<i>revolutions per minute</i>
t	min, h, d	Zeit
T	°C	Temperatur
U	μmol/min	<i>unit</i>
V	μL, mL	Volumen
λ	nm	Wellenlänge

Abkürzungen

Ac	Acetyl
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Bn	Benzyl
<i>t</i> Bu	<i>tertiär</i> -Butyl
<i>n</i> Bu	Butyl
Bz	Benzoyl
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
CD	Dimethyl-β-cyclodextrin
CE	Kapillarelektrophorese
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
CMP	Cytidin-5'-monophosphat
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
CMP-Neu5Ac	Cytidin-5'-monophospho-β- <i>N</i> -acetylneuraminsäure
core2-GlcNAcT	core2 β1,6- <i>N</i> -Acetylglucosaminyltransferase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E.C.	<i>enzyme class</i>

FAB	<i>fast atom bombardment</i>
Fmoc	Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl
Fuc	L-Fucose
Gal	D-Galactose
GALOP	<i>genetic algorithms for the optimization of processes</i>
GalNAc	N-Acetyl-D-galactosamin
Glc	D-Glucose
GlcNAc	N-Acetyl-D-glucosamin
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GDP-Fuc	Guanosin-5'-diphospho- β -L-fucose
GMP	Guanosin-1'-monophosphat
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IgG	Immunoglobulin des Typs G
Lac	Lactosamin
LacNAc	N-Acetylactosamin
Man	Mannose
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MS	Massenspektrometer
Neu5Ac	N-acetylneuraminsäure
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
P _i	Phosphat
PAPS	3'-Phosphoadenosin 5'-phosphosulfat
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
per-TMS-Fuc	Per-O-trimethylsilyl- α -L-fucose
per-TMS-Fuc-I	Per-O-trimethylsilyl- α -L-fucosyliodid
pfu	<i>plaque forming units</i>
Ph	Phenyl
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pnp	para-Nitrophenyl
PSGL-1	<i>P selectin glycoprotein ligand-1</i>
RT	Raumtemperatur
Sf	Spodoptera frugiperda
Teoc	Trichloroethoxycarbonyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilyl

TOF	<i>time of flight</i>
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UDP-Gal	Uridin-5'-diphospho- α -D-galactose
UDP-GalNAc	Uridin-5'-diphospho- <i>N</i> -acetyl- α -D-galactosamin
UDP-GlcNAc	Uridin-5'-diphospho- <i>N</i> -acetyl- α -D-glucosamin
UMP	Uridin-1'-monophosphat

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

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

François Jacob

1 Einleitung

Kohlenhydrate sind die mit Abstand häufigsten Biomoleküle auf der Erde. Pro Jahr werden durch Photosynthese mehr als 100 Milliarden Tonnen Kohlendioxid und Wasser zu Cellulose und anderen Pflanzenprodukten umgesetzt. Wir ernähren uns von ihnen, sie sind Bausteine unserer Organismen, unsere Körperfunktionen werden durch Kohlenhydrate geregelt. Das erste Kapitel dieser Arbeit soll einen Eindruck von der Vielfältigkeit ihrer Aufgaben in der belebten Natur vermitteln, sowie von den Möglichkeiten, die sich dem eröffnen, der dieses Potential zu nutzen lernt.

1.1 Kohlenhydrate in der Natur

Die meisten der in der Natur vorkommenden Kohlenhydrate liegen als Polysaccharide vor. Stärke in pflanzlichen und Glycogen in tierischen Zellen sind Glucosepolymere und dienen zur Energiespeicherung. Cellulose und Chitin sind die bekanntesten Strukturpolymere. Da Kohlenhydrate unter anderem zu Aminosäuren, Nucleinsäuren, Fettsäuren und Terpenen metabolisiert werden, kann man zu Recht von Zuckern als den eigentlichen Grundbausteinen des Lebens sprechen.

In den letzten 25 Jahren erkannte man, daß sich die Bedeutung von Kohlenhydraten nicht auf passive Funktionen beschränkt. Verknüpft mit Proteinen, Lipiden oder anderen Aglyconen haben Oligosaccharide große Bedeutung als Informationsträger. Aufgrund der Polyfunktionalität der Monosaccharide und der so möglichen Stereodifferenzierung bei der Ausbildung glycosidischer Bindungen ergeben sich enorme Kombinationsmöglichkeiten. Vier verschiedene Hexosen können theoretisch zu etwa 35.500 verschiedenen Tetrasacchariden verknüpft werden (Berger, 1994). Im Vergleich dazu können aus vier unterschiedlichen Amino- oder Nucleinsäuren nur 24 verschiedene Tetramere gebildet werden. Diese hohe Informationsdichte läßt die Verwendung von Glycanen als biologische Informationsträger fast zwangsläufig erscheinen.

Es konnte gezeigt werden, daß Glycoconjugate¹ an intra- und interzellulären Erkennungsmechanismen beteiligt sind (Lis und Sharon, 1993; Varki, 1993; Fukuda und Hindsgaul,

¹ Der Begriff Glycoconjugat wurde von Montreuil 1973 für Glycoproteine, Proteoglycane und Glycolipide geprägt.

1994). So werden die Blutgruppenantigene durch die endständigen Oligosaccharidstrukturen bestimmt¹ (Lemieux *et al.*, 1980; Greenwell, 1997). Im Falle von Verletzungen oder Infektionen initiiert die Wechselwirkung von Glycoproteinen, der Selektine mit ihren Liganden, eine Immunreaktion (Springer, 1990; Janeway und Travers, 1995). Krebszellen präsentieren veränderte Zuckerstrukturen an ihrer Zelloberfläche, bestimmte Strukturen spielen zudem eine Rolle bei der Ausbildung von Metastasen (Brockhausen *et al.*, 1998a). Auch Bakterien und Viren bedienen sich Glycoprotein-Wechselwirkungen zur Infektion ihrer Wirte: Das HIV-Virus bindet mit Hilfe eines stark glycosylierten Oberflächenproteins an Rezeptoren humaner T-Lymphozyten (Mizuochi *et al.*, 1988; Greene, 1991). *Helicobacter pylori*, ein Bakterium, das Gastritis (Magenschleimhautentzündung) und Magengeschwüre verursachen kann und zudem unter Verdacht steht, Krebs auszulösen, bildet Glycoproteine nicht nur zur Adhäsion an Wirtszellen aus (Borén *et al.*, 1993). Vermutlich schützt es sich außerdem vor der menschlichen Immunabwehr durch Mimikry humaner Glycoproteine (Appelmelk *et al.*, 1996; Wirth *et al.*, 1996; Ge *et al.*, 1997).

Zur Inhibierung von Glycoprotein-Wechselwirkungen wurden bereits eine Reihe von Wirkstoffen auf Zuckerbasis entwickelt, die entweder bereits als Pharmazeutika auf dem Markt sind, oder sich in klinischen Tests befinden (McAuliffe und Hindsgaul, 1997; Wrotnowski, 1997).

1.1.1 Glycoproteine

Zuckerstrukturen an Proteinen können in zwei Gruppen unterteilt werden:

N-Glycane sind via N-Acetylglucosamin an Asparagin gebunden. Man unterscheidet drei Untergruppen, die jedoch auf einer gemeinsamen core-Struktur aufbauen (vgl. Abb. 1.5) (Fukuda, 1994).

O-Glycane sind Oligosaccharide, die mit der Hydroxylfunktion der Seitenkette von Serin oder Threonin verknüpft sind. Die Strukturvielfalt ist viel größer, der Zucker am reduzierenden Ende ist bei Säugern häufig N-Acetylgalactosamin. In diesem Fall spricht man vom Mucin-Typ, da diese Verknüpfung hier zuerst entdeckt wurde. Darüberhinaus sind eine Reihe weiterer O-glycosidische Grundmuster bekannt, die unter anderem auf N-Acetylglucosamin, Fucose, Mannose oder Galactose aufbauen (Vliegenthart und Montreuil, 1995; Messner, 1997; Sears und Wong, 1998).

Auf der GalNAc-Thr/Ser-Struktur basieren eine Reihe sogenannter core-Strukturen, die in Abbildung 1.1 aufgeführt sind (Van den Steen *et al.*, 1998).

¹ Die Blutgruppen A und B unterscheiden sich durch einen GalNAc- beziehungsweise Gal-Rest, das heißt in einer einzigen N-Acetylamino-Gruppe.

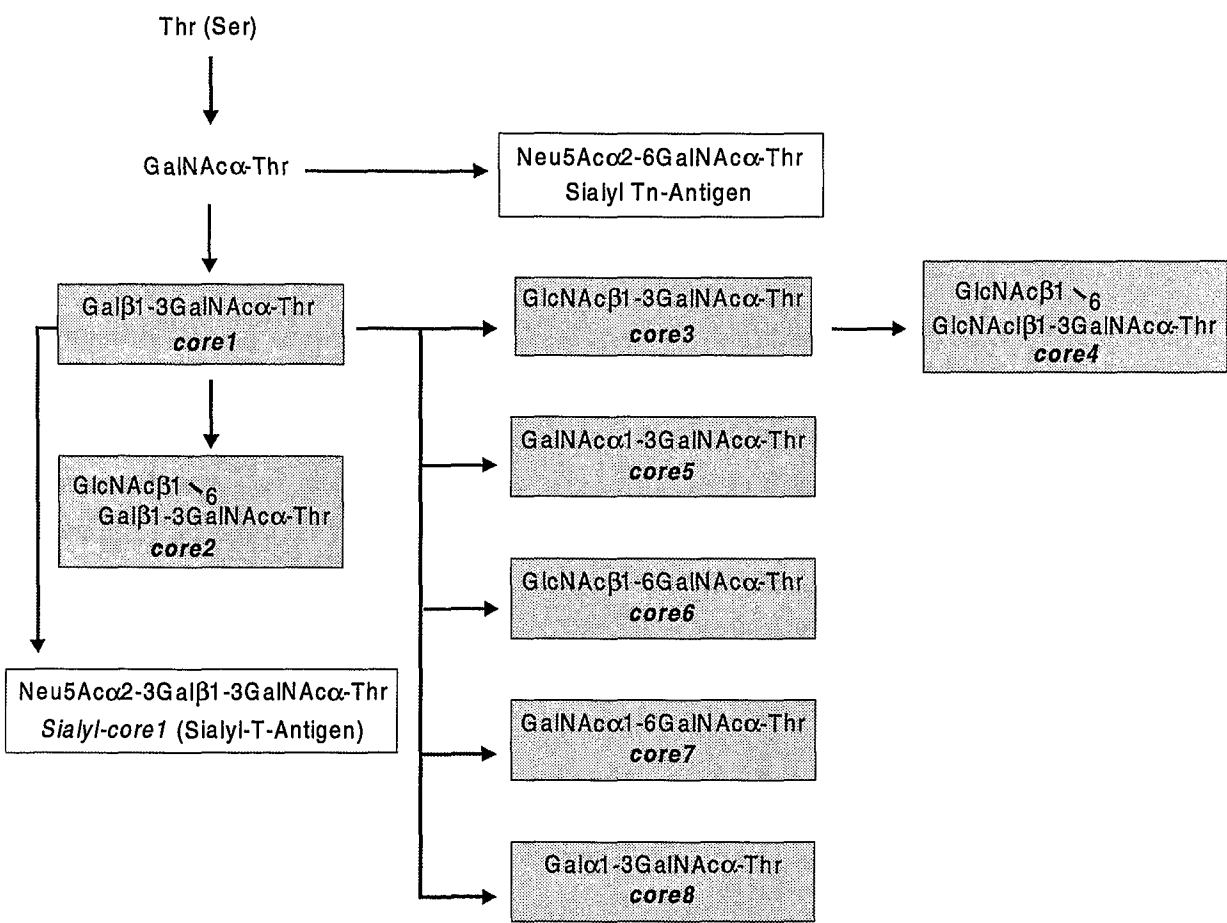


Abb. 1.1: Stammbaum der O-glycosidischen core-Strukturen

1.1.2 P-Selektin Glycoprotein Ligand 1 (PSGL-1)

Von großem Interesse für die aktuelle Forschung ist die Immunreaktion durch Leukozyten, die in der Blutbahn zirkulieren. Nach einer Infektion oder Verletzung werden Cytokine ausgeschüttet, die in den Endothelzellen¹ der Blutgefäße die Bildung von Adhäsionsmolekülen, sogenannten Selektinen (Bevilacqua *et al.*, 1991) induzieren. Innerhalb weniger Minuten kann das Glycoprotein P-Selektin aus intrazellulären Speichern mobilisiert werden und bewirkt durch Wechselwirkung mit seinem konstitutiv auf den Leukozyten exprimierten Liganden PSGL-1² eine schwache Adhäsion der Zellen an die Gefäßwand (Geng *et al.*, 1990). Neben den Selektinen werden auf den Endothelzellen Rezeptorproteine (ICAM-1, *intercellular adhesion molecule-1*) ausgebildet. Sie verstärken die Adhäsion durch Wechselwirkung mit Leukozyten-Integrinen. Die Leukozyten durchqueren die Gefäßwand (Diapedese) und

¹ Das Endothel ist die innere Auskleidung der Blutgefäße.
² Der Ligand wurde erstmals 1989 beschrieben (Johnston *et al.*, 1989; Skinner *et al.*, 1989). Neben P-Selektin, das sofort zur Verfügung steht, wird innerhalb einiger Stunden E-Selektin durch Proteinbiosynthese auf den Endothelzellen exprimiert (Bevilacqua *et al.*, 1989; Graves *et al.*, 1994). Diese Selektine überlappen somit in ihrer Funktion (Larsen *et al.*, 1992; Homeister *et al.*, 1998). Ein drittes Selektin, L-Selektin, ist konstitutiv auf Leukozyten exprimiert (Lasky *et al.*, 1989; Siegelman *et al.*, 1989).

wandern zum Infektionsherd (Extravasation), wo sie eine Entzündung auslösen (Abb. 1.2 – Springer, 1994; Fukuda, 1995; Butcher und Picker, 1996; Salmi und Jalkanen, 1997; Kaltner und Stierstorfer, 1998).

Gelangt eine zu große Zahl von Leukozyten an den Infektionsherd, so tritt ein septischer Schock auf, und das umliegende Gewebe wird geschädigt. Bei einem Herzinfarkt ist die Schädigung durch den folgenden septischen Schock oft größer als durch den akuten Vorfall. Eine weitere Fehlregulation tritt auf, wenn Krankheitserreger in großer Zahl in das Blutgefäßsystem eindringen. In diesem Fall werden Endothelzellen des gesamten Blutkreislaufs aktiviert und immunologisch aktive Zellen ausgeschleust, statt den Erreger im Blut zu bekämpfen. Folglich besteht großes Interesse an der Entwicklung von antiinflammatorischen, das heißt entzündungshemmenden Medikamenten. Könnten die Selektine mit freien Liganden abgesättigt werden, so würde die Adhäsion der Leukozyten – und somit auch die Diapedese – unterbunden (Lowe und Ward, 1997).

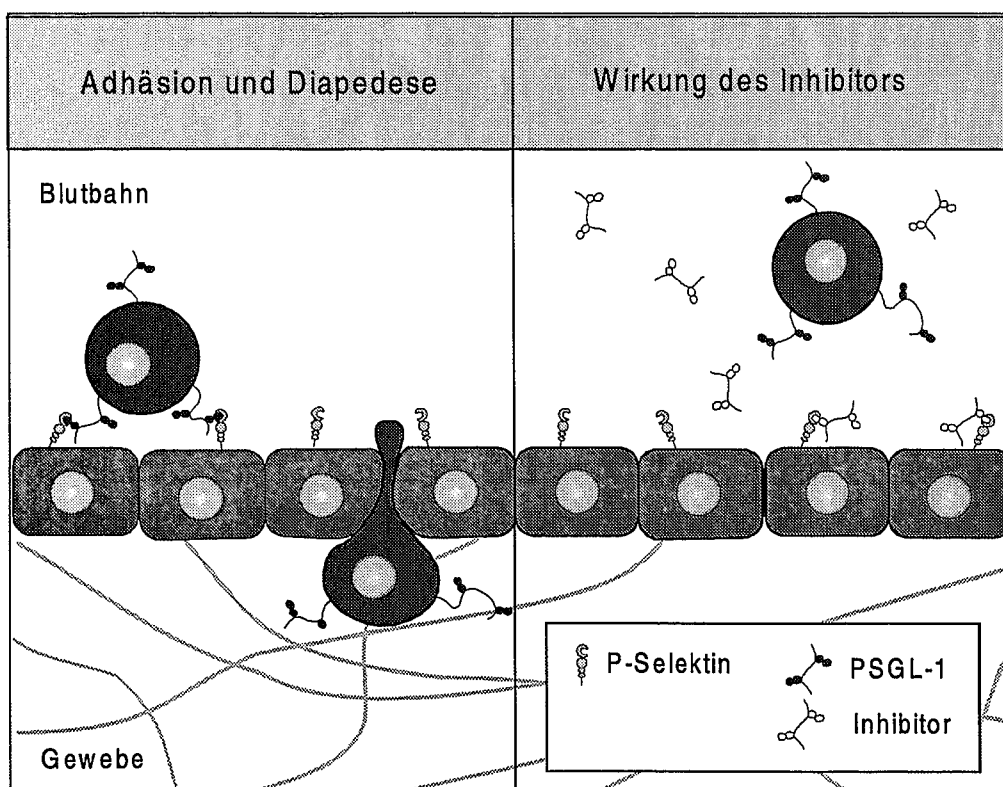


Abb. 1.2: Wirkweise von Rezeptorblockern bei der Selektin-initiierten Leukozytenextravasation

Zur Ermittlung einer Leitstruktur für einen Rezeptorblocker startete man die Suche nach den natürlichen Liganden der Selektine. Man fand zuerst Sialyl-Lewis^x, ein Tetrasaccharid, das von Selektinen erkannt wird (vgl. Abb. 1.3 – Polley *et al.*, 1991; Foxall *et al.*, 1992)). Cytel

(USA) führte mit einem Sialyl-Lewis^x-Pentasaccharid klinische Tests zur Behandlung von Herzinfarktpatienten durch, das Präparat zeigte in Phase II der klinischen Tests allerdings keine Wirkung (Simanek *et al.*, 1998).¹ 1992 wurde PSGL-1 entdeckt (Moore *et al.*, 1992), ein membranständiges Protein, das wahrscheinlich als Homodimer vorliegt. Ein Jahr später konnte es cloniert und in COS-Zellen exprimiert werden (Sako *et al.*, 1993). Da die Aminosäuresequenz allein keine biologische Aktivität zeigt, wurden die Glycosylierungsmuster in den folgenden Jahren genauer untersucht. (Moore *et al.*, 1994; Kumar *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996). Die bis heute bekannten Anforderungen an eine lösliche bioaktive Struktur werden im folgenden zusammengefaßt und sind in Abbildung 1.3 skizziert.

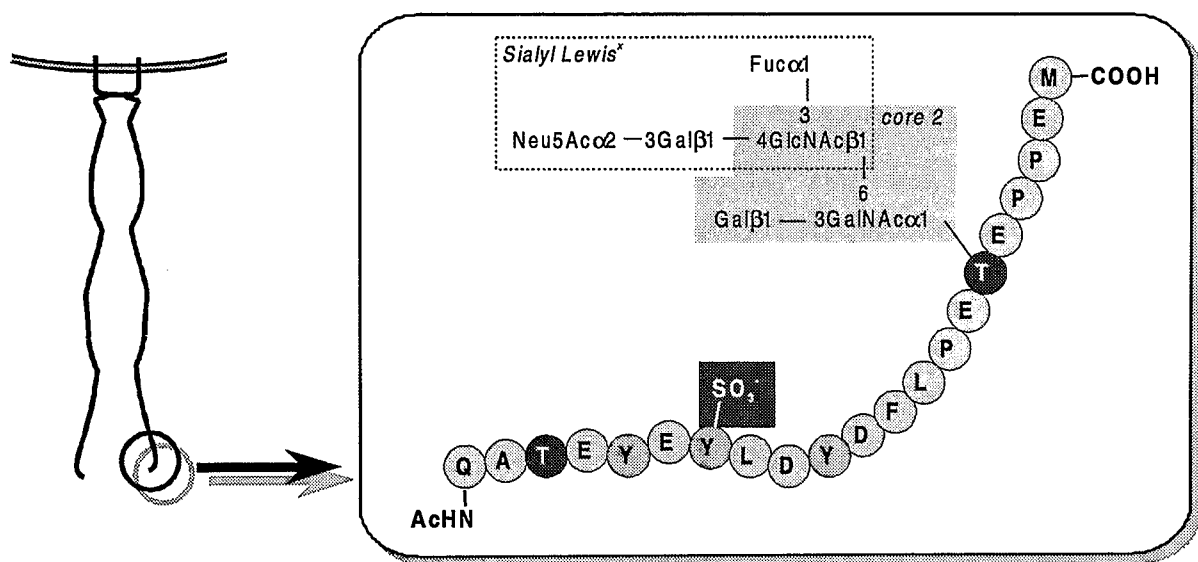


Abb. 1.3: Biologisch aktiver N-Terminus des PSGL-1

- Der N-Terminus bindet an P-Selektin, es müssen mindestens 19 Aminosäuren vorhanden sein (Goetz *et al.*, 1997). Die zwischen N-Terminus und Membrandomäne liegenden *tandem repeat units*² dienen wahrscheinlich zur Positionierung des Rezeptors im richtigen Abstand zur Membran.
- Das zweite Threonin (T) muß glycosyliert sein (Liu *et al.*, 1998), und zwar durch core2-ständige Sialyl Lewis^x-Strukturen (Wilkins *et al.*, 1996). Statt LacNAc (Galβ1-4GlcNAc) können sie auch Poly-LacNAc-Strukturen enthalten (vgl. Abb. 1.4).
- Zumindest ein Tyrosin (Y) muß sulfatiert sein (Pouyani und Seed, 1995; Sako *et al.*, 1995; Wilkins *et al.*, 1995).

¹ Eine Wirkung bei Bypass-Operationen am Herzen konnte jedoch nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich dimeres Lewis^x wirksam gegen Gelenkrheumatismus (Ochi *et al.*, 1993).

² *tandem repeat units* sind kurze, sich wiederholende Aminosäuresequenzen – vgl. auch Kap. 1.1.3.

Obwohl eine Reihe von Glycoproteinen gefunden wurde, die mit Selektinen wechselwirken, konnte bisher kein weiterer *in vivo*-Ligand zweifelsfrei ausgemacht werden (Varki, 1997). Andererseits konnte gezeigt werden, daß PSGL-1 ebenfalls eine hohe Affinität zu L-Selektin besitzt (Tu *et al.*, 1996). Ein detaillierter Review zu PSGL-1 findet sich bei Moore, 1998.

Inzwischen erschließen sich für PSGL-1 mögliche Anwendungen, obwohl es aufgrund seiner komplexen Struktur als Wirkstoff eher ungeeignet erscheint. So ist die Sicherstellung der Durchblutung eines Spenderorgans ein Hauptproblem der Transplantationsmedizin. Bei der Organentnahme an klinisch toten Spendern sind die Endothelzellen durch vorausgehende Verletzungen oder Erkrankungen bereits aktiviert. Wird das Organ wieder durchblutet, so startet die Adhäsion von Leukozyten an den Gefäßwänden eine Signalkaskade, die zu dem Verschluß von Kapillaren und dem Absterben des Transplantats führen kann.

In Versuchen mit Ratten wurden entnommene Lebern mit löslichem PSGL-1 durchspült, um vorhandene P-Selektine zu blockieren. Die so behandelten Organe wurden wesentlich besser durchblutet, die Überlebensrate der Ratten stieg auf 90% im Vergleich zu 50% bei unbehandelten Lebern (Dulkanchainun *et al.*, 1998).

1.1.3 Mucine

Als Mucine werden gelegentlich alle Proteine mit *O*-Glycosiden des Mucin-Typs bezeichnet, also auch PSGL-1. Im engeren Sinne handelt es sich allerdings um die Bestandteile des Mucus, eines Schleims, der das darunterliegende Epithelgewebe gegen das Umgebungsmilieu schützt. Mucine werden (mit Ausnahme des membranständigen MUC1) sekretiert und enthalten in der Regel *tandem repeats*, sich wiederholende Aminosäuresequenzen. Diese *tandem repeats* sind stark glycosyliert, folglich bestehen die Proteine zu etwa 80% aus Kohlenhydraten. Durch unterschiedliche Glycanstrukturen weisen Mucine eine enorme Mikroheterogenität auf: Es konnten zum Beispiel 88 verschiedene Zuckerstrukturen im Atemtrakt einer einzigen Person gefunden werden (Roussel und Lamblin, 1996).

Die Aufgaben der Mucine sind vielfältig: Im Magen-Darmtrakt dienen sie als biologische Schmierstoffe sowie als Diffusionsbarriere. Im Magen bildet sich zum Schutz des Epitheliums innerhalb des Mucus ein Gradient von pH 1 bis pH 6 aus. Daneben wird der Mucus im Verdauungs- und Genitaltrakt durch eine Vielzahl von Bakterienstämmen bevölkert, die den Wirtorganismus vor pathogenen Microben schützen. Glycoproteine des Atemwegs binden Mikroorganismen und befördern sie über die bronchociliare Treppe hinaus, um so den unteren Bereich steril zu halten. Im Gegensatz zu den sekretierten Mucinen ist MUC1 ein Anti-adhäsivum, das die Infektion durch Mikroorganismen behindern kann (Verma und Davidson, 1994; Roussel und Lamblin, 1996).

Es wurde gezeigt, daß Sialyl-Lewis^x-exprimierende Tumorzellen an E-Selektine des aktivierten Endothels binden, wodurch die Ausbildung von Metastasen eingeleitet werden könnte¹ (Kojima *et al.*, 1992; Sass, 1998).

Die molekularbiologischen Zusammenhänge sind zwar noch weitgehend unbekannt, es eröffnen sich aber bereits jetzt neue Möglichkeiten der Tumorbekämpfung. Zum Beispiel kann zur Früherkennung nach Antigenen gefahndet werden (Rye *et al.*, 1995). Auch für eine Impfung oder Immunotherapie zeigen sich vielversprechende Ansätze (Kotera *et al.*, 1994; Ragupathi *et al.*, 1997). Der Review von Brockhausen *et al.* gibt einen sehr guten Überblick über den Stand dieses Zweiges der Tumorforschung (Brockhausen *et al.*, 1998a).

1.2 Biosynthese von Glycoproteinen

Im Anschluß an die Proteinbiosynthese (Translation) finden eine Reihe posttranslationaler Veränderungen statt. Dazu gehören die Abspaltung von Signalsequenzen, Ausbildung von Disulfidbrücken, Methylierung, Carboxylierung, Sulfatierung und Glycosylierung. Erst durch diese Modifikationen erlangt das Protein seine physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften (Lehninger *et al.*, 1994).

Die Glycosylierung findet im wesentlichen im Golgi statt (Roth, 1995; Burger *et al.*, 1998; Röttger *et al.*, 1998). Im Fall der O-Glycosylierung bewirkt eine Serie von Glycosyltransferasen das Anwachsen der Zuckerkette. Da Strukturvarianten möglich sind, wie in Abbildung 1.1 deutlich wird, und Glycosylierungen oft unvollständig ablaufen, entsteht eine Vielzahl von Glycoformen. Das Konzentrationsniveau der Transferasen und Nucleotidzucker, deren Lokalisierung in der Zelle, sowie die Kompartimentierungen derselben beeinflussen somit das Ergebnis. In unterschiedlichen Gewebetypen werden zudem verschiedene Transferasen exprimiert.

Zur Synthese der bekannten komplexen Oligosaccharide existieren allein in Säugerorganismen hunderte verschiedener, hochgradig spezifischer Glycosyltransferasen, von denen bisher weniger als 100 cloniert werden konnten (Sears und Wong, 1998). Diese enorme Zahl an Leloir-Glycosyltransferasen² benötigt als Donorsubstrate lediglich acht verschiedene Nucleotidzucker.³

Die Biosynthese der N-Glycane ist komplizierter (Sears und Wong, 1998): Hier wird zunächst ein Tetradasaccharid an einem membranständigen Anker (Dolichol) im endoplasmatischen Retikulum aufgebaut, das dann durch eine Oligosaccharyltransferase auf das Protein übertra-

¹ Dieses Modell beschreibt nur eine Ursache, die wirklichen Mechanismen sind viel komplexer. Da MUC1 Sialyl Lewis^x exprimiert, könnte eine Überexpression des MUC1-Gens bewirken, daß große Mengen des freien Proteins in der Blutbahn die spezifische T-Zell-Aktivität inhibieren und so die Lyse der Krebszellen verhindern (Gendler und Spicer, 1995).

² Benannt nach dem kanadischen Biochemiker L. F. Leloir, der für die Entdeckung 1970 den Nobelpreis erhielt.

³ UDP-Galactose, UDP-Glucose, UDP-N-Acetylgalactosamin, UDP-N-Acetylglucosamin, UDP-Glucuronsäure, GDP-Mannose, GDP-Fucose und CMP-Neuraminsäure.

gen wird. Auf seinem Weg vom endoplasmatischen Retikulum in den Golgi werden bis zu neun Zucker wieder durch Glycosidasen abgespalten, sowie neue Verknüpfungen durch Glycosyltransferasen erzeugt. Die *N*-glycosidische Grundstruktur zeigt Abbildung 1.5.

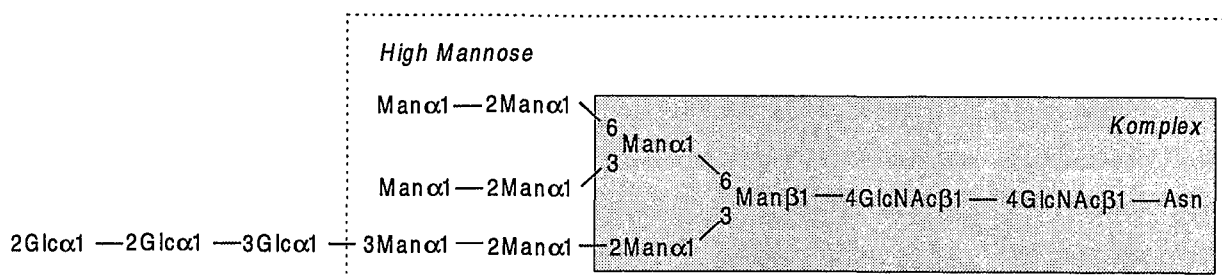


Abb. 1.5: Primäres *N*-Glycan; die core-Strukturen entstehen durch partielle Hydrolyse des Tetradecasaccharids. Der Hybridtyp ist eine Mischung aus *High Mannose*- und *Komplex*-Typ.

1.3 Oligosaccharidsynthese *in vitro*

1.3.1 Chemische Glycosylierung

Die stereoselektive Verknüpfung der multivalenten Zuckermoleküle stellt nach wie vor eine besondere Herausforderung für präparativ arbeitende Chemiker dar. Inzwischen wurde ein breites Repertoire effizienter Synthesen entwickelt, die die Probleme der Stereokontrolle durch elegante Schutzgruppenstrategien lösen.¹ Der Aufwand ist jedoch enorm: In der Regel sind zur Kopplung eines Monosaccharids fünf Stufen notwendig, was einer Woche Laborarbeit entspricht (Khan und Hindsgaul, 1994). Durch die Verwendung organischer Lösungsmittel in Synthese und Aufreinigung entstehen hohe Entsorgungskosten. Zudem muß für den Aufbau jeder Oligosaccharidstruktur ein individueller Syntheseweg ausgearbeitet werden (Paulsen, 1982).

Dieser Aufwand zahlt sich jedoch aus, wenn nichtnatürliche Derivate synthetisiert werden sollen, die auf enzymatischem Weg nicht zugänglich sind. So konnten Pseudo-Oligosaccharide wie zum Beispiel Carbocyclen verknüpft werden (Yuasa *et al.*, 1995; Marron *et al.*, 1996). Diese Moleküle besitzen eine sehr viel größere Hydrolysestabilität als ihre Vorbilder und zeigen somit einen vielversprechenden Ansatz zur Herstellung von Wirkstoffen auf.² Eine weitere Strategie besteht in der Substitution von Oligosaccharid-Teilstrukturen durch Aglycone (Ikeda *et al.*, 1997; Ishida *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 1997). Auf diese Weise können

¹ Beispielhaft hier einige Reviews: Toshima und Tatsuta, 1993; Schultz und Kunz, 1995; Danishefsky und Bilodeau, 1996; Whitfield und Douglas, 1996; Kunz und Schultz, 1997.

² Die Hydrolyseanfälligkeit von Oligosacchariden bewirkt zum einen einen schnellen Abbau im Organismus; solche Strukturen können also nicht effektiv als Rezeptorblocker eingesetzt werden. Zum anderen sind sie nicht oral verfügbar, was ein wichtiges Kriterium bei der Entwicklung neuer Arzneimittel ist.

Mimetika mit verbesserter Pharmacokinetik gefunden werden, die durch einfachere Synthesen zugänglich sind.¹ Auf der Suche nach neuen Glycosid-Leitstrukturen werden verstärkt kombinatorische Methoden eingesetzt (Liang *et al.*, 1996; Lampe *et al.*, 1998; Lockhoff, 1998; Tsai *et al.*, 1998; Wang und Hindsgaul, 1998; Wunberg *et al.*, 1998). Der Aufbau umfangreicher Substanzbibliotheken wird dabei durch die verhältnismäßig unselektiven chemischen Reaktionen ermöglicht. Abbildung 1.6 zeigt einige Sialyl-Lewis^x-Mimetica.

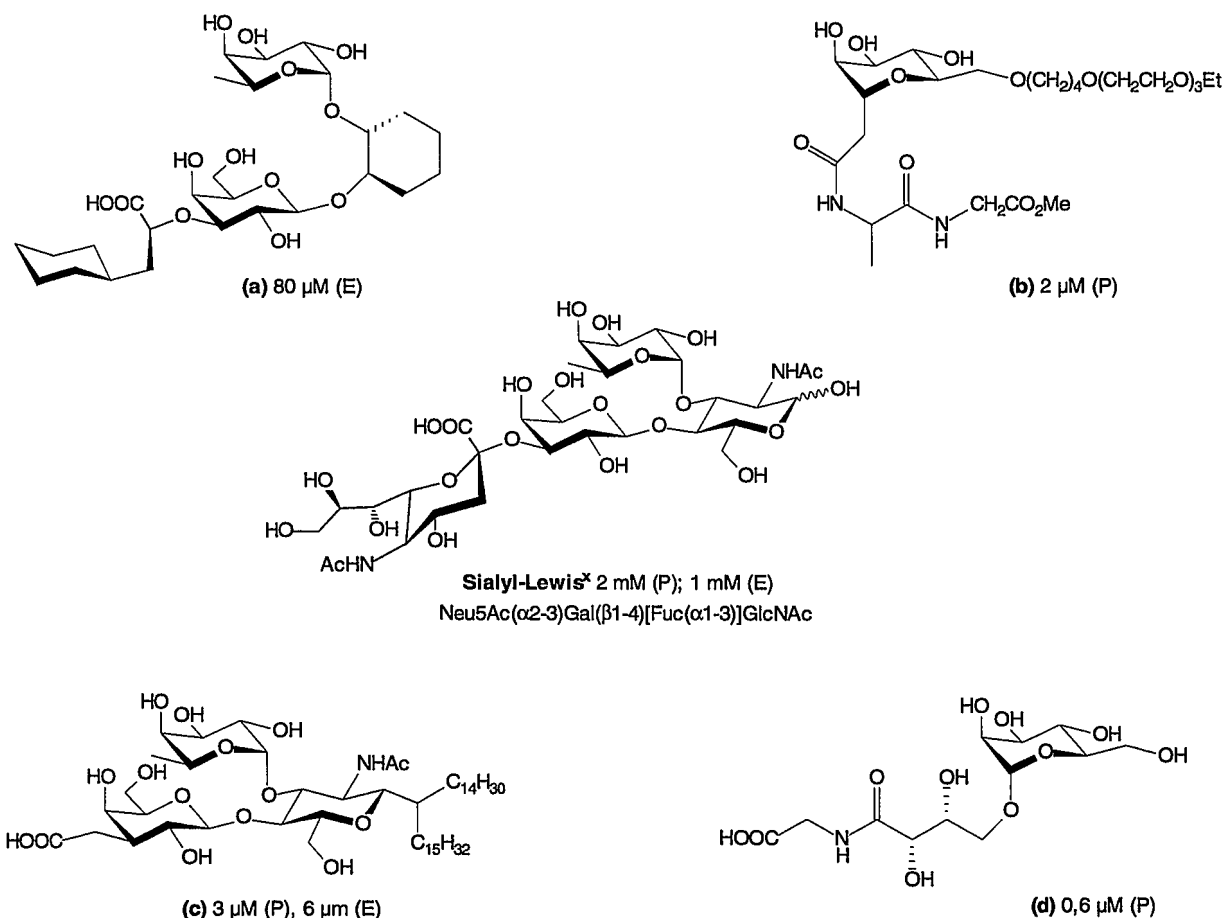


Abb. 1.6: Sialyl-Lewis^x und Mimetica mit IC₅₀-Werten für P- bzw. E-Selektin

^a Bänteli und Ernst, 1997; ^b Tsai *et al.*, 1998; ^c Ishida *et al.*, 1997; ^d Wong *et al.*, 1997

1.3.2 Enzymatische Glycosylierung

Zur enzymatischen Synthese können entweder Glycosyltransferasen oder Glycosidasen als Biokatalysatoren eingesetzt werden. Da beide Enzymklassen *in vivo* diametrale Aufgaben besitzen – Glycosyltransferasen sind Synthese-, Glycosidasen sind Hydrolyseenzyme – unter-

¹ Einen Überblick über diese Bemühungen verschafft der Review von Wong und Mitarbeitern (Simanek *et al.*, 1998).

scheiden sie sich bezüglich ihrer Einsatzmöglichkeiten. Im folgenden sollen die Potentiale und Limitierungen diskutiert werden.

Einsatz von Glycosyltransferasen

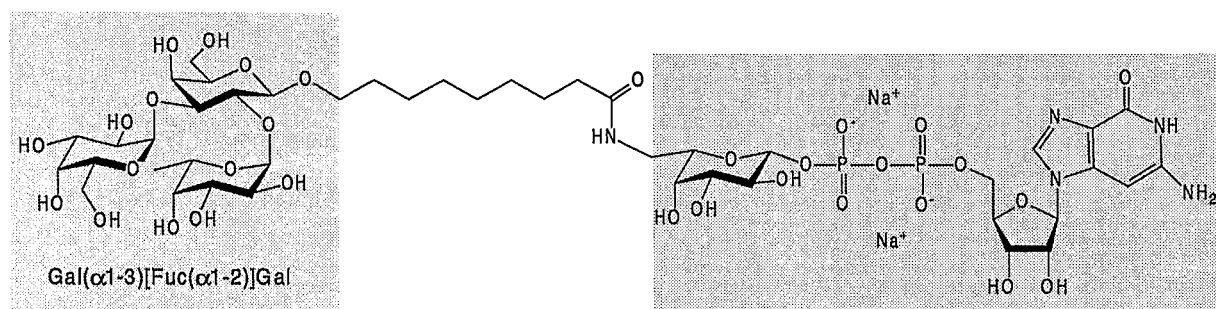
Im Vergleich zu chemischen Synthesen zeichnen sich Glycosyltransferase-katalysierte Reaktionen durch hohe Ausbeuten und exzellente Regioselektivitäten aus. Schutzgruppen werden selbstverständlich nicht benötigt, und die Reaktion kann im wässrigen Medium durchgeführt werden. Somit kann diese Methode als Standardverfahren zur Synthese natürlicher Oligosaccharidstrukturen bezeichnet werden. Die nachfolgend zitierten Reviews untermauern dies. (Waldmann, 1995; Wong *et al.*, 1995a; Wong *et al.*, 1995b; Gijsen *et al.*, 1996; Gambert und Thiem, 1997a; Watt *et al.*, 1997)

Limitierungen entstehen jedoch durch die schlechte Verfügbarkeit vieler Enzyme. So konnte zum Beispiel die GlcNAc-Transferase zur Synthese der core2-Struktur (vgl. Abb. 1.1) bisher nicht cloniert, sondern nur in Kleinstmengen aus natürlichen Quellen aufgereinigt werden (Mendicino *et al.*, 1982; Furukawa und Roth, 1985). Da Glycosyltransferasen membranständige Proteine sind, ist die Isolierung in der Regel sehr aufwendig (Öhrlein *et al.*, 1992). Auch bereits heterogen exprimierte Transferasen sind in der Regel nicht kommerziell erhältlich. Ein weiterer Nachteil sind die hohen Kosten für Nucleotidzucker,¹ weshalb Versuche zu ihrer *in situ*-Regenerierung in Multi-Enzym-Systemen gemacht wurden (vgl. Abb. 1.9) (Wong *et al.*, 1982; Ichikawa *et al.*, 1991; Wong *et al.*, 1992). Die Donoren müssen dann nur in katalytischen Mengen eingesetzt werden.

Der große Vorteil beim Einsatz dieser Enzyme, die spezifische Ausbildung definierter Strukturen, impliziert ebenfalls eine beträchtliche Einschränkung des Substratspektrums. Ursprünglich wurde das *one enzyme – one linkage* Konzept formuliert. Inzwischen wurden jedoch eine Reihe von Ausnahmen gefunden,² so daß auch hier eine gewisse synthetische Breite möglich ist (Groß *et al.*, 1987; Palcic und Hindsgaul, 1991; Baisch *et al.*, 1997; Baisch und Öhrlein, 1998; Baisch *et al.*, 1998; Lubineau *et al.*, 1998; Qian *et al.*, 1998; Sala *et al.*, 1998; Stangier *et al.*, 1998). Als bislang größter Erfolg zur Ausweitung des Substratspektrums kann die Übertragung eines komplexen Oligosaccharids durch eine Fucosyltransferase gelten (Abb. 1.7 – Srivastava *et al.*, 1992; Hällgren und Hindsgaul, 1995)

¹ Auf die Bereitstellung der Nucleotidzucker wird gesondert in Kapitel 4 eingegangen.

² Für einige Enzyme wurden sogenannte *hydroxyl group mappings* durchgeführt, um festzustellen, welche funktionellen Gruppen der Substrate essentiell sind, und in welchen Molekülbereichen Änderungen toleriert werden (Palcic und Hindsgaul, 1996; Sujino *et al.*, 1997; Kajihara *et al.*, 1998).



Blutgruppenderminante B

GDP-Fucose

Abb.1.7: Donor-Substrat für die Fucosyltransferase aus humaner Milch

Glycosidasen in der Oligosaccharidsynthese

Glycosidasen erwecken seit nunmehr fast 200 Jahren das Interesse der Wissenschaft. Bereits 1814 beschrieb Kirchhoff die Glucosidase-katalysierte Hydrolyse von Stärke zu Zucker (Kirchhoff, 1814).¹ Ihre grundlegenden Untersuchungen zur Kinetik von Enzymen führten Menten und Michaelis ebenfalls mit einer Glucosidase durch (Michaelis und Menten, 1913).

In der präparativen Synthese zeichnen sich Glycosidasen durch eine Reihe von Vorteilen aus, die sie zu attraktiven Biokatalysatoren machen. Da sie leicht aus natürlichen Quellen aufgereinigt werden können, sind sie gut verfügbar. Eine Reihe von Glycosidasen wurden inzwischen cloniert und in Mikroorganismen wie *E.coli* exprimiert. Sowohl die Enzyme als auch die Donorsubstrate sind relativ preiswert. Zudem tolerieren die Glycosidasen ein breites Substratspektrum, vor allem in Bezug auf den Akzeptor. Andererseits sind die Ausbeuten oft niedrig, und die Regioselektivität ist aufgrund der niedrigen Akzeptorspezifität dieser Enzyme nur schwer zu kontrollieren. Die folgenden Reviews bieten eine kurze Übersicht. (Thiem, 1995; Fernández-Mayoralas, 1997; Kren und Thiem, 1997)

Grundsätzlich werden bei der Synthese zwei verschiedene Ansätze verfolgt, reverse Hydrolyse und Transglycosylierung. Der Unterschied wird in Abbildung 1.8 deutlich.

Im Fall der reversen Hydrolyse werden zwei Zuckermoleküle unter Abspaltung von Wasser kondensiert. Diese Reaktion ist thermodynamisch kontrolliert. Da das Gleichgewicht weit auf der Substratseite liegt, muß es verschoben werden, was in der Regel durch Erhöhung einer Substratkonzentration geschieht. Ein weiterer Ansatz besteht in der bevorzugten Adsorption von Di- und Oligosacchariden an Aktivkohle – die Reaktionsprodukte werden so dem Gleichgewicht entzogen (Ajisaka *et al.*, 1988; Ajisaka und Fujimoto, 1989). Glycoside hydrophober Alkohole wurden durch reverse Hydrolyse in Zweiphasensystemen erzeugt (Beecher *et al.*, 1990; Ljunger *et al.*, 1994). Obwohl bei einer Kondensation mit einer Mannosidase in

¹ Die Existenz des Enzyms selbst war ihm unbekannt; den Enzymextrakt aus Mehl bezeichnete er als „Kleber“.

85%iger Mannose-Lösung eine Gesamtausbeute an Di- und Oligosacchariden von 70% erzielt wurde (Johansson *et al.*, 1989), bleiben die Ausbeuten jedoch im Normalfall weit unter 20%.

Erfolgversprechender ist die kinetisch kontrollierte Transglycosylierungsreaktion. Hier wird ein anomer verknüpfter Zucker mit hoher Affinität zum Enzym verwendet; das kann ein Disaccharid oder ein Arylglycosid sein. In Analogie zu den Donoren für Glycosyltransferase-katalysierte Reaktionen spricht man auch hier von aktivierten Zuckern.

Die Ausbeute hängt somit von der Geschwindigkeit ab, mit der der Donorzucker übertragen wird. Die Reaktion muß außerdem rechtzeitig abgebrochen werden, da sie mit der Produkt-hydrolyse konkurriert. Transglycosylierungen sind schneller als reverse Hydrolysen, und die Ausbeuten sind höher, wenn auch meistens unter 30%. Aufgrund niedriger Substrat- und Enzymkosten sind sie Glycosyltransferase-katalysierten Reaktionen oft wirtschaftlich überlegen. Durch kontinuierliche Transgalactosylierung im Membranreaktor gelang etwa die kostengünstige LacNAc-Synthese im Multigramm-Maßstab (Herrmann *et al.*, 1993b).

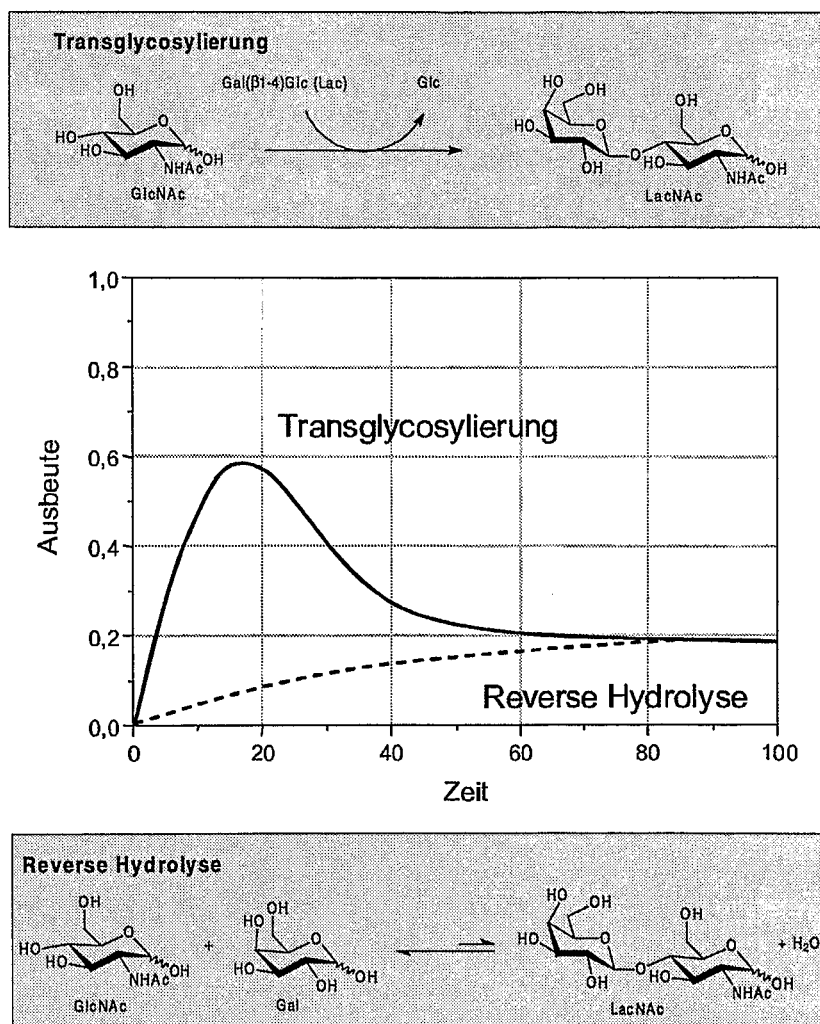


Abb. 1.8: Reverse Hydrolyse und Transglycosylierung am Beispiel der LacNAc-Synthese

Auch durch Transglycosylierung wurden Alkyl-Glycoside im wäßrig-organischen Zweiphasensystem hergestellt. Können die Enzyme selbst hydrophobisiert werden, so befinden sie sich in der organischen Phase, so daß keine Hydrolyse-reaktion mehr stattfinden kann. In diesem Fall konnten Ausbeuten von 66% erzielt werden (Mori *et al.*, 1997).

Neben niedrigen Ausbeuten ist die oft geringe Regioselektivität der Glycosidasen ein weiteres Problem (Sauerbrei und Thiem, 1992; Murata und Usui, 1997; Montero *et al.*, 1998).

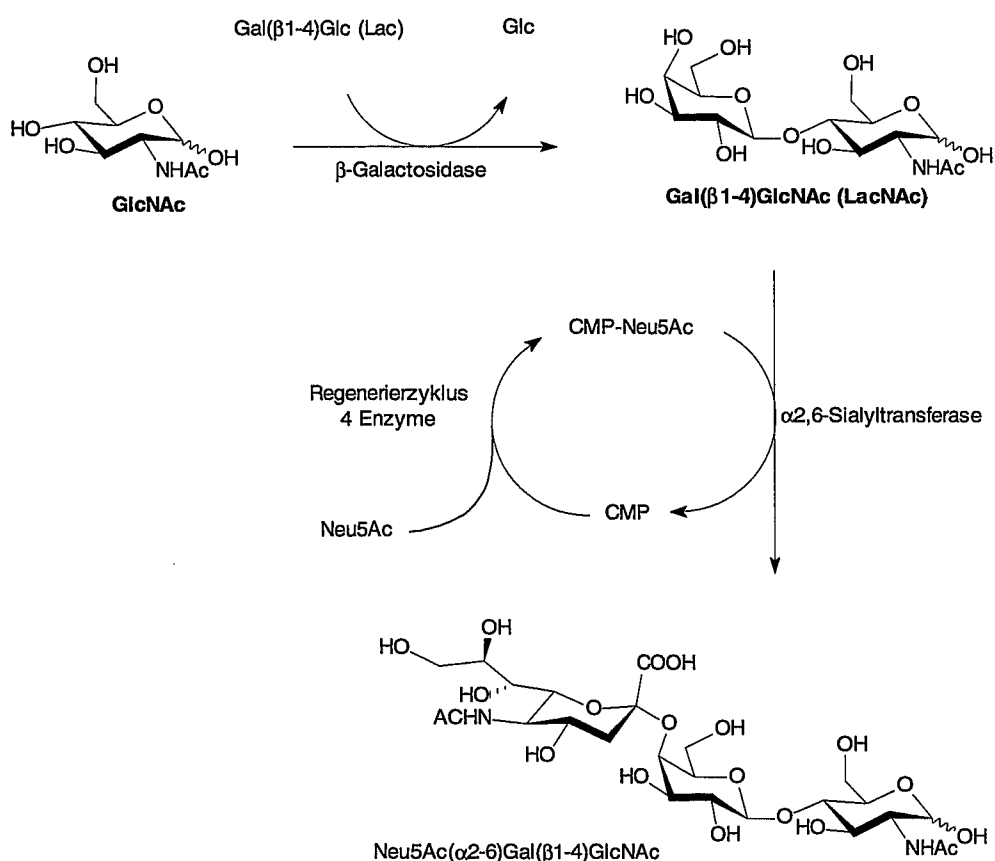


Abb. 1.9: Gekoppelte Galactosidase- und Sialyltransferase-katalysierte Reaktion mit Regenerierzyklus für CMP-Neu5Ac

Die hier aufgeführten Schwächen können durch die Kopplung der Glycosidase- mit einer Glycosyltransferase-katalysierten Reaktion kompensiert werden. Dabei wird das Produkt der ersten Stufe durch die Transferase abgefangen und kann nicht mehr hydrolysiert werden. Die Triebkraft der Reaktion beruht also auf der Spaltung des Nucleotidzuckers. Ein solches Reaktionssystem wurde von Herrmann *et al.* publiziert (Herrmann *et al.*, 1993a). Es umfaßt außerdem einen Zyklus zur *in situ*-Regenerierung des Nucleotidzuckers CMP-Neu5Ac (vgl. Abb. 1.9). Die verhältnismäßig niedrigen Ausbeuten¹ dieser und ähnlicher Reaktionssysteme

¹ Herrmann *et al.*: 26%; Kren und Thiem: 36% (isolierte Ausbeuten)

(Kren und Thiem, 1995) zeigen, daß hohe Ausbeuten in komplexen Multi-Enzym-Systemen wohl nur durch eine sorgfältige Optimierung zu erzielen sind.

1.4 Kooperationen

Diese Promotion ist in das EU-Projekt "*Engineering O-Glycosylation for the Production of Receptor Blockers*" eingebunden, an dem zellbiologische, biotechnologische und analytisch chemische Arbeitsgruppen beteiligt sind.¹ Aufgabe ist die Bereitstellung O-glycosylierter Peptide zur Untersuchung der oben diskutierten Wirkmechanismen. Die Zielstruktur ist eine core2-ständige Sialyl-Lewis^x-Gruppe an einem löslichen PSGL-1-Fragment (vgl. Abb. 1.3) Dabei ist das Projekt in zwei Teilbereiche gegliedert:

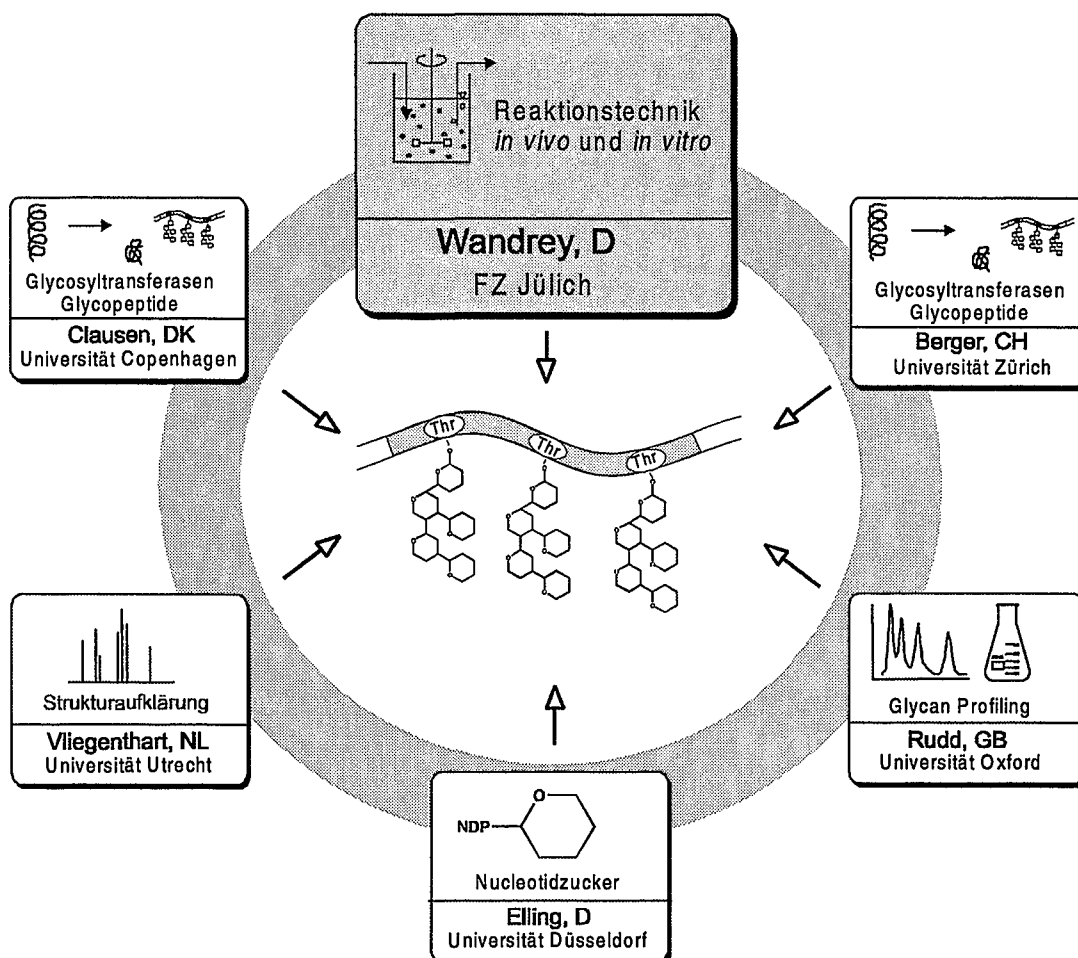


Abb. 1.10: EU-Projekt "*Engineering O-glycosylation for the production of receptor blockers*"

¹ Die Promotion wurde im Rahmen dieses Projekts (BIO CT 95-0138) finanziell von der EU unterstützt.

Im *in vivo*-Bereich sollen Glycoproteine in CHO-Zellen¹ produziert werden. Zum Erhalt biologisch aktiver Glycosylierungsmuster müssen Glycosyltransferasen² zusammen mit dem Strukturgen für das humane Protein in seiner löslichen Form in die Zellen cloniert werden. Die rekombinanten Zellen sekretieren ein glycosyliertes und biologisch aktives Glycoprotein.

Im *in vitro*-Bereich sollen Peptide enzymatisch glycosyliert werden. Die Aufgabenteilung in diesem Teilprojekt ist wie folgt:

- **Herstellung rekombinanter CHO-Zelllinien** zur Produktion löslicher Glycosyltransferasen. Die Enzyme werden sekretiert und können aus dem Zellüberstand gewonnen werden (Arbeitskreise in Copenhagen und Zürich).
- **Fermentation im *pilot scale* und Aufreinigung der Enzyme** (Jülich).
- **Enzymatische Glycosylierung** der Peptide und Aufreinigung (Jülich).
- **Nucleotidzucker-Synthese** – Entwicklung neuer Verfahren zur Synthese der Enzymsubstrate (Universität Düsseldorf).
- **Strukturanalyse** der Glycopeptide mittels NMR-Spektrometrie, Massenspektroskopie und Glycan-*profiling*³ (Oxford und Utrecht).

Neben der Einbindung in das EU-Projekt, eröffnete sich die Möglichkeit zu einem zwei-monatigen Forschungsaufenthalt in Edmonton (Canada). Außerdem konnte eine Kooperation mit dem Arbeitskreis Prof. Kunz an der Universität Mainz zur chemoenzymatischen Synthese von Glycopeptiden angestoßen werden. Die Ergebnisse dieser Zusammenarbeiten sind in den Kapiteln 4.1 und 7 beschrieben.

¹ Chinese Hamster Ovary cells – diese Zelllinie wurde bereits 1958 isoliert und hat sich inzwischen zur wichtigsten Produktionszelllinie entwickelt (Puck *et al.*, 1958; Eisenkrätzer, 1999)

² CHO-Zellen exprimieren weder α 1,3-Fucosyltransferasen noch die GlcNAcT, die zum Aufbau der core1-Struktur nötig sind (Sasaki *et al.*, 1987; Li *et al.*, 1996).

³ Diese Methode wird kurz in Kapitel 10.7 beschrieben.

"One of the principle goals of research into oligosaccharide synthesis is the synthesis of homogeneous glycoproteins. This synthesis would allow a more precise definition of the roles of individual glycans in determining the physical properties and the biological function of their parent glycoproteins."

G. M. Watt, P. A. S. Lowden, S. L. Flitsch, 1997

2 Zielsetzung

Das Ziel der Arbeit ist die Entwicklung neuer Synthesen zum Aufbau von Glycopeptiden. Als biologisch interessante Zielstrukturen wurden *O*-Glycoside gewählt, die auf der core1-Struktur basieren (vgl. Abb. 2.2). Die Arbeit ist in ein EU-Projekt integriert, in dem Glycosyltransferasen cloniert, exprimiert und für die enzymatische Synthese bereitgestellt werden. Mittels dieser Enzyme sollen Glycopeptidsynthesen exemplarisch durchgeführt werden, um die Produkte abschließend der Strukturuntersuchung im Projektrahmen zuzuführen.

2.1 Entwicklung und Optimierung einer enzymatischen core1-Synthese

Der enzymatische Aufbau der core1-Struktur ist problematisch, da die hierfür benötigte Galactosyltransferase bisher nicht rekombinant zur Verfügung steht. Der alternative Einsatz einer Galactosidase führte in früheren Arbeiten zu mäßigen Ausbeuten an einfachen Aglyconen und zu keinen Resultaten am Glycopeptid.

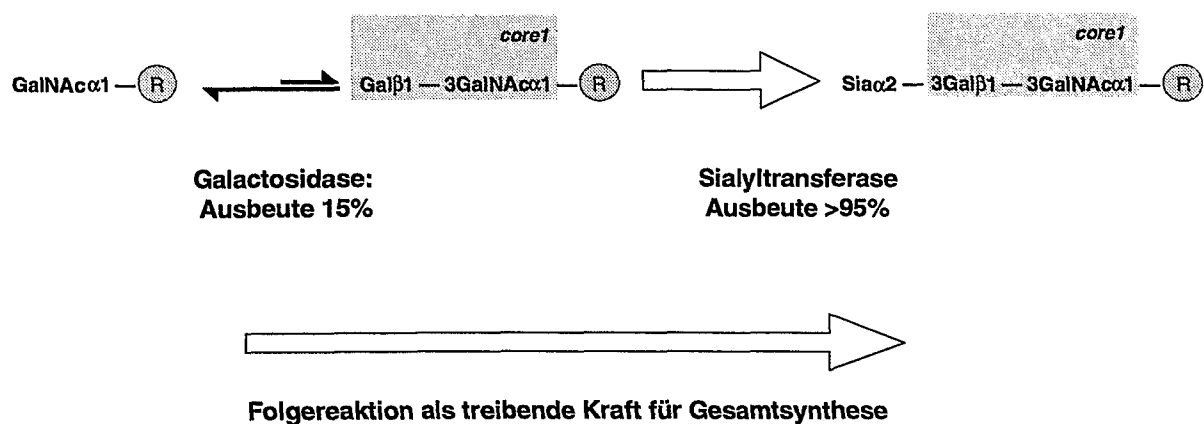


Abb. 2.1: Einsatz einer Sialyltransferase zum Abfangen des core1-Produkts

2.3 Herstellung eines Bausteins für die chemische Glycopeptidsynthese

Die Ergebnisse der Mehrenzym-Optimierung sollen zudem in eine neue Strategie zur chemoenzymatischen Synthese von Glycopeptiden einfließen. Diese Methode, die zusammen mit dem Arbeitskreis um Professor Kunz in Mainz entwickelt wurde, soll die Vorteile enzymatischer und chemischer Synthesetechniken vereinen.

Ein chemisch synthetisierter GalNAc-Thr-*building block* soll enzymatisch glycosyliert werden. Das Glycosid kann anschließend geschützt werden und mittels chemischer Festphasensynthese zum Glycopeptid aufgebaut werden. Als glycosidische Zielkomponente wurde die tumorassoziierte Sialyl-core1-Struktur bestimmt. Die Abfolge chemischer und enzymatischer Schritte ist in Abbildung 2.3 skizziert.

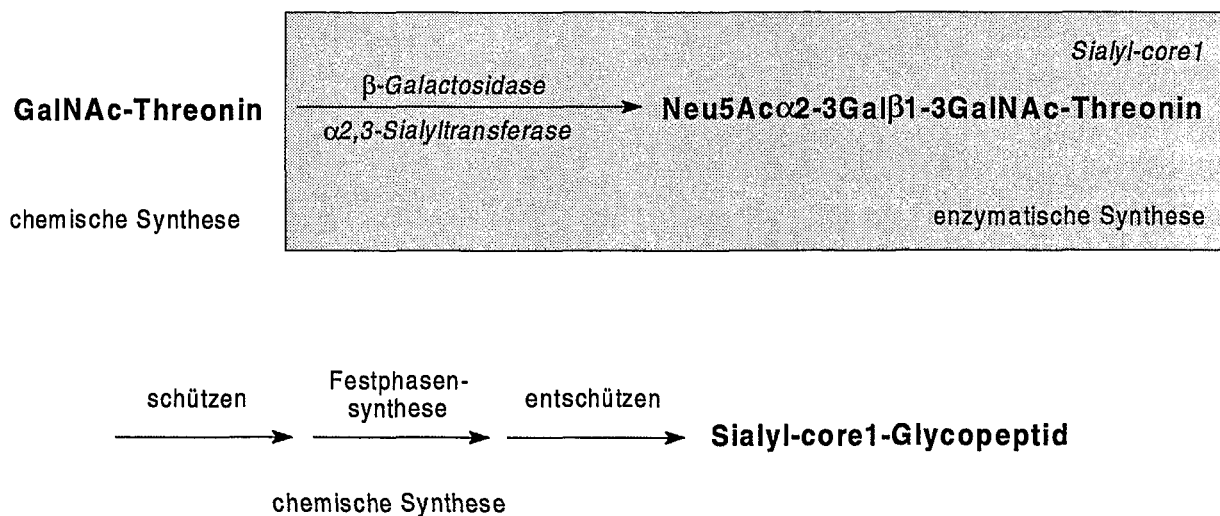


Abb. 2.3: Chemoenzymatische Synthese von Glycopeptiden; der enzymatische Schritt soll im Rahmen der Promotion durchgeführt werden.

*„Mit dem Faseln und Spekulieren ist nichts geholfen;
man muß wissen, wie die Natur es macht!“*

Francis Bacon

3 Bereitstellung von Glycosyltransferasen

In diesem Kapitel wird die Bereitstellung einer GalNAc-Transferase sowie der β 1,6-GlcNAc-Transferase beschrieben. Beide Enzyme werden zum Aufbau der core2-Struktur benötigt, wie Abbildung 3.1 verdeutlicht.

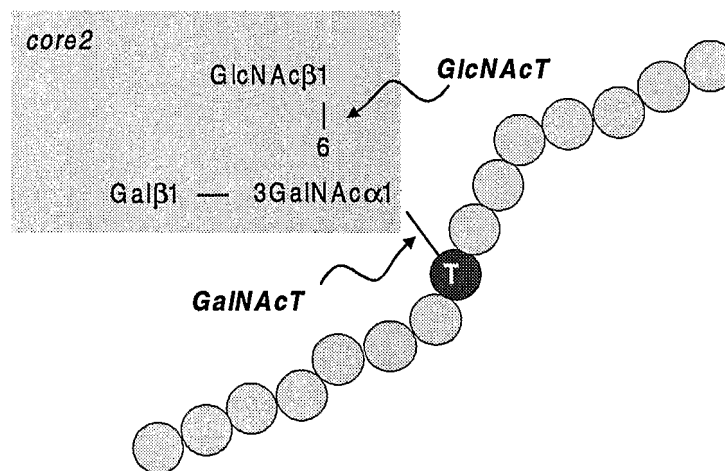


Abb. 3.1: Glycosyltransferasen zum Aufbau der core2-Struktur

3.1 Produktion der GalNAc-Transferase 3

Die Mucin-Typ-*O*-Glycosylierung wird durch Polypeptid-*N*-Acetylgalactosaminyltransferasen¹ eingeleitet. Diese katalysieren die Übertragung von *N*-Acetylgalactosamin an Threonin- und Serin-Seitenketten.

Erste Untersuchungen mit Enzymextrakten aus tierischen Bauchspeicheldrüsen wurden Ende der sechziger Jahre durchgeführt (McGuire und Roseman, 1967; Hagopian und Eylar, 1968). Später konnte das Enzym in seiner membranständigen wie auch in einer homogen löslichen Form isoliert werden (Sugiura *et al.*, 1982; Elhammer und Kornfeld, 1986). Inzwischen gelang es, die cDNAs der GalNAc-Transferasen aus Rinderkolostrum (Homa *et al.*, 1993; Homa *et al.*, 1995) und humaner Placenta (White *et al.*, 1995) zu klonieren. Als im Rahmen der Clonierung der Mäuse-cDNA eine Reihe homologer Sequenzen durch Datenbanksuche

¹ E.C. 2.4.1.41

gefunden wurden, postulierten die Entdecker eine Familie von Polypeptid-GalNAc-Transferasen (Hagen *et al.*, 1995). Folgerichtig konnten in den letzten Jahren die Enzyme GalNAcT2 (Sørensen *et al.*, 1995; White *et al.*, 1995), GalNAcT3 (Bennett *et al.*, 1996; Zara *et al.*, 1996), GalNAcT4 (Hagen *et al.*, 1997; Bennett *et al.*, 1998) und GalNAcT5 (TenHagen *et al.*, 1998) cloniert und überexprimiert werden. Die Transferasen weisen unterschiedliche, aber überlappende Spezifitäten für Akzeptorpeptide auf.¹

Das im Rahmen der Dissertation bearbeitete Enzym ist eine lösliche Form der humanen GalNAc-Transferase 3. Sie wurde von der Arbeitsgruppe Professor Clausens in Baculoviren cloniert.

3.1.1 Das Baculovirus-Expressionssystem

Baculoviren befallen in der Regel Insekten, es wurden Baculoinfektionen für über 600 Spezies beschrieben. Aufgrund ihres verheerenden Effekts, den sie auf natürliche Populationen ausüben können, wurden sie ursprünglich als biologische Insektizide eingesetzt. In den letzten 15 Jahren stellte die Entwicklung des Expressionssystems diese Anwendung allerdings in den Schatten² (King und Possee, 1992). Dabei wird der Virus benutzt, um die rekombinante DNA in die Wirtszelle einzuschleusen und das Zielprotein zu exprimieren. Dieses Procedere kann wahlweise in Zellkultur oder in ganzen Insektenlarven ablaufen, inzwischen hat sich jedoch die Zellkulturtechnik als *scale up*-fähiges Verfahren durchgesetzt. Die Baculo-DNA, die aus bis zu 200 Kilobasenpaaren besteht, ist in stabförmigen Kapseln verpackt. Deren Größe ist variabel, so daß große Fremd-DNA-Plasmide integriert werden können (Burgess, 1977; Fraser, 1986). Der in dieser Arbeit verwendete *Autographa californica*-Virus ist der bestuntersuchte und am häufigsten eingesetzte Baculo-Stamm (Smith und Summers, 1978; O'Reilly *et al.*, 1994).

Die DNA-Replikation beginnt sechs Stunden nach der Infektion der Zelle. In einer ersten Phase verlassen freie Viren die Zelle, später sammeln sich virale *occlusion bodies* an, die erst nach der Zell-Lyse freigesetzt werden. Diese *occlusion bodies*, die im wesentlichen aus dem sogenannten Polyhedrin-Protein bestehen, schützen die Viren vor Umwelteinflüssen und lösen sich erst im alkalischen Milieu des Insektendarms auf (Harrap, 1972; Rohrmann, 1986). Zwar spielen sie somit in der Zellkultur keine Rolle, der sehr starke Polyhedrin-Promoter wird jedoch in der Regel zur Expression des Fremdproteins genutzt (Luckow und Summers, 1988). In diesem Fall wird die maximale Produktkonzentration nach drei bis fünf Tagen erreicht (Licari und Bailey, 1991).

¹ Hierauf wird *en détail* in Kapitel 6.1 eingegangen.

² Da jeder Baculovirustyp nur einige wenige Insektenspezies (und in Ausnahmefällen Krebstiere) infizieren kann, kann man dieses Expressionssystem wohl als eines der sichersten bezeichnen (Gröner, 1986).

Die Verwendung des *Autographa californica*-Virus zusammen mit einer *Spodoptera frugiperda*-Zelllinie hat sich in der weitaus größten Zahl aller Versuche als die günstigste Option herausgestellt (Hink *et al.*, 1991). In den siebziger Jahren wurde die Sf21-Zelllinie und aus dieser die für diese Arbeiten eingesetzte Sf9-Linie entwickelt (Vaughn *et al.*, 1977). Mit Hilfe des Baculo-Expressionssystems können Proteine mitsamt der meisten posttranslationalen Veränderungen exprimiert werden. Die Glycosylierung ist durch die oft extrem hohe Expressionsrate allerdings eingeschränkt (Chen und Bahl, 1991; Zhao und Sane, 1993).

Vorteile dieses Systems sind zum einen die hohe Expressionsrate, die bis zu 20% des gesamten zellulären Proteins ausmachen kann, was einer Produktmenge von bis zu 0,5 g pro Liter oder 10^9 Zellen entspricht. Desweiteren können große Gene in das Virus insertiert werden, und die Herstellung rekombinanter Baculoviren ist relativ einfach und wenig zeitaufwendig. Andererseits ist eine kontinuierliche Produktion rekombinanter Proteine nicht möglich.¹

3.1.2 Vorkulturen zur Anzucht eines Virenstamms

Zur Vermehrung des Copenhagener Virenstammes wurden Sf9-Zellen infiziert.² Nach vier Tagen wurde der Überstand von den Zellen abzentrifugiert und der Virustiter darin mittels eines Plaque-Assays bestimmt. Die Virenlösung kann mehrere Monate im Kühlschrank gelagert werden. Ausgehend von 0,5 mL Virenlösung konnte so in T-Flaschen und Suspensionskulturen ein Virenstamm von 400 mL mit einem Virentiter von $1,2 \times 10^7$ pfu/mL gewonnen werden.³

3.1.3 Fermentation

Zunächst wurden die Sf9-Zellen an ein serumfreies Medium adaptiert. Die Proteinmenge im Zellüberstand konnte so verringert werden, was die Aufreinigung der GalNAc-Transferase erleichtert. Im Anschluß wurden die Zellen in T-Flasche und Suspensionskultur solange vermehrt, bis ein 20 L-Fermenter mit einem Anfangsvolumen von 2 L angeimpft werden konnte (Abb. 3.3).

Der Fermenter wird durch einen Schrägblattrührer gerührt. Da Insektenzellen einen sehr hohen Sauerstoffverbrauch haben, ist ab einem Volumen von etwa einem Liter eine optimale Sauerstoffversorgung der Zellen über Oberflächenbegasung nicht mehr gegeben (Maiorella *et al.*, 1988). Da die Scherbeanspruchung in einer Blasensäule für Insektenzellen kritisch ist

¹ Bei der kontinuierlichen Infektion ist der Virustiter sehr hoch, so daß die Insektenzellen von jeweils mehreren Viren befallen werden. Das hat zur Folge, daß auch defekte DNAs repliziert werden, was zu einer Degeneration der Erbinformation führt. Aus diesem Grund werden die Zellen zur Virenvermehrung im *batch*-Verfahren bei niedrigen Titern infiziert (Kompier *et al.*, 1988; Kool *et al.*, 1991).

² Dabei entsprach die Virenzahl einem Zehntel der Zellzahl.

³ pfu: *Plaque Forming Units* – entspricht der Zahl der Viren, vgl. Material und Methoden.

(Tramper *et al.*, 1986; Jöbses *et al.*, 1991), wurde ein Silikonschlauch zur blasenfreien Sauerstoffversorgung eingesetzt. Die Temperatur wurde mittels eines internen Wärmetauschers bei 27°C konstant gehalten.

Bis zum Erreichen des Endvolumens von 17 L wurde die Fermentation im *fed batch*-Modus durchgeführt, daraufhin erfolgte die Infektion mit rekombinanten Baculoviren. Vier Tage später konnte die Fermentation bei einer Enzymaktivität von 7,5 U/L im Zellüberstand abgebrochen werden. Es wurden insgesamt 128 *units* gewonnen.

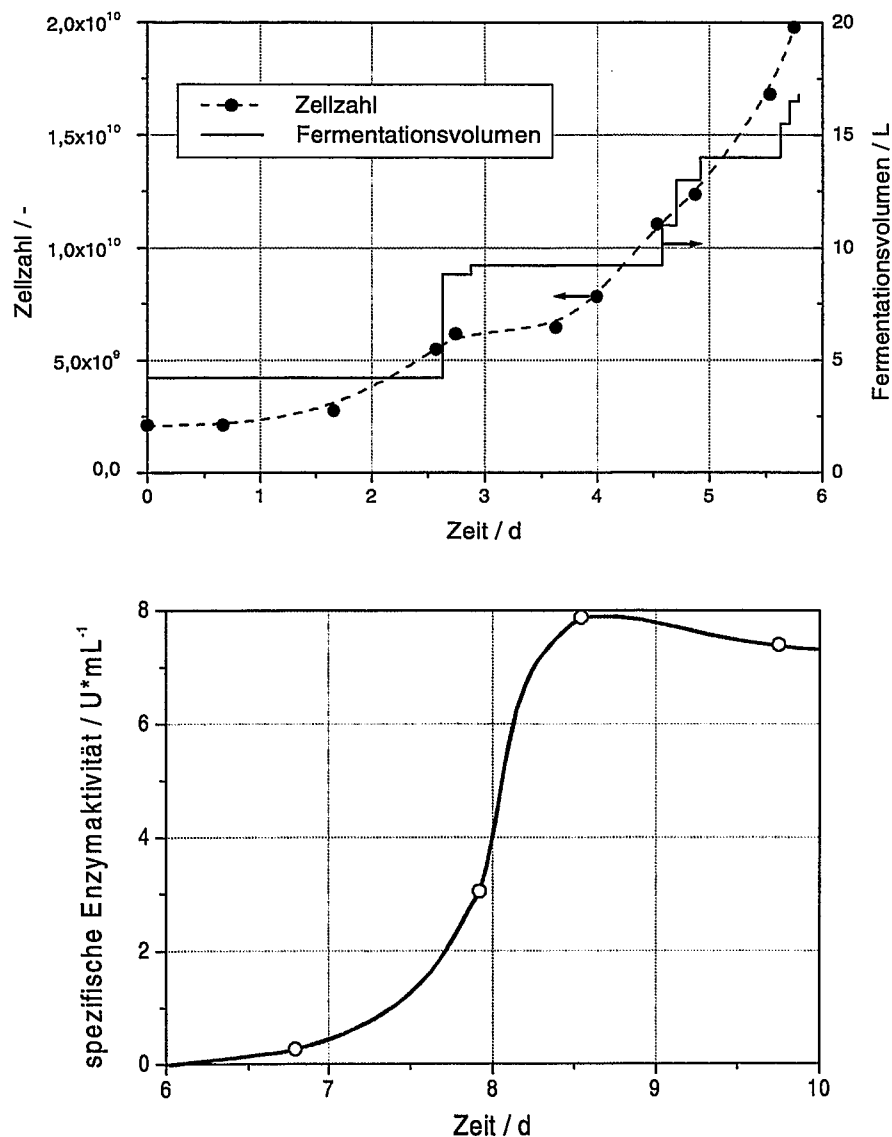


Abb. 3.2: GalNAcT-Fermentation im 20 L-Fermenter: Anzucht und Enzymexpression



Abb. 3.3: Foto des Fermenters zur Kultivierung von Sf9-Zellen

3.1.4 Aufreinigung

Die GalNAc-Transferase wurde durch Ionenauschromatographie aufgereinigt (Bennett *et al.*, 1996). Die zur Feinreinigung nötige Gelpermeationschromatographie konnte entfallen, da bereits zuvor keine Nebenaktivitäten mehr gefunden wurden.¹ Die Aufreinigung umfaßte die folgenden Schritte:

- **Zellabtrennung** in einer kontinuierlichen Zentrifuge
- **Ultrafiltration** zur Elution niedermolekularer Komponenten und Konzentration
- Aufreinigung durch **Ionenauschromatographie**
- **Konzentration**

¹ Das Enzympräparat wurde mit dem MUC1a'-Peptid und dem entsprechenden GalNAc-Glycopeptid auf Protease- und Hexosaminidase-Aktivitäten untersucht. Hexosaminidasen hydrolysieren GalNAc- und GlcNAc-Konjugate.

Zunächst wurde das Fermentationsmedium in einem *cross flow*-Ultrafiltrationsmodul (Membran mit einer 10 kDa-Ausschlußgrenze) gegen Bis-Tris-Puffer dialysiert¹ und etwa zehnfach konzentriert.

Zur weiteren Aufreinigung wurden eine Anionentauschersäule und eine Kationentauschersäule miteinander gekoppelt. Das Anionentauscherharz hält einen Teil der Proteine zurück, die GalNAc-Transferase adsorbiert jedoch erst am Kationentauscher. Anschließend wurde das Produkt mit einem NaCl-Gradienten eluiert und in einer Rührzelle durch eine Ultrafiltrationsmembran aufkonzentriert. Die gesamte Aufreinigung wurde bei 4°C durchgeführt. Das Ultrafiltrat wurde mit 50% Glycerin versetzt und bei -25° gelagert. Aus 6 L Medium konnten 21 *units* aufgereinigt werden. Tabelle 3.1 gibt eine Übersicht über den Verlauf der Aufreinigung

Probe	Gesamtaktivität U	Volumen mL	spez. Aktivität mU/mL	Ausbeute %
Medium	37 (128) ^a	6000 (17000)	7,5	100
Konzentrat	36 (126)	600 (1700)	74	98
Ionentauscher-Eluat	21	400	53	57
Konzentrat	21	60	350	57

^a Die Werte in Klammern beziehen sich auf die Gesamt-Enzymmenge, da nur ein Drittel der des Fermentationsmediums chromatographisch aufgereinigt wurde.

Tab. 3.1: Aufreinigung der GalNAc-Transferase

3.2 Bereitstellung der core2-GlcNAc-Transferase

Die core2-GlcNAc-Transferase² katalysiert die Übertragung von *N*-Acetylglucosamin vom Donor UDP-*N*-Acetylglucosamin auf die core1-Struktur unter Ausbildung des core2-Tri-saccharids. Das Enzym wurde vor 20 Jahren erstmals als Rohextrakt eingesetzt (Williams und Schachter, 1980), die Aufreinigung konnte vier Jahre später publiziert werden (Wingert und Cheng, 1984). 1992 gelang die Expressierung einer humanen core2 GlcNAcT in CHO-Zellen (Bierhuizen und Fukuda, 1992).³

¹ Der Begriff Diafiltration bezeichnet ein kontinuierliches Filtrationsverfahren. Der Füllstand wird konstant gehalten, indem das Permeatvolumen durch Waschflüssigkeit ersetzt wird.

² E.C. 2.4.1.102

³ Kürzlich wurde eine weitere GlcNAc-Transferase cloniert, die sich durch ein breiteres Substratspektrum auszeichnet. Neben der core2-Bildung katalysiert sie die Synthese core 3 → core 4 (vgl. Abb. 1.1) und akzeptiert außerdem Poly-LacNAc-Strukturen (vgl. Abb. 1.4) (Yeh *et al.*, 1999).

3.2.1 Expression und Fermentation durch EU-Partner

Die Zürcher Arbeitsgruppe um Professor Berger exprimierte eine lösliche Form der murinen GalNAc-Transferase in CHO-Zellen durch Deletion des Membranankers. An das verbleibende Fragment wurden die Sequenzen für sekretorische Signalpeptide und eine Sequenz für einen Aufreinigungs-tag (Protein A) angefügt. Das Fusionsprotein trägt 4 *N*-Glycane am Protein A und 2 *N*-Glycane am Enzymteil. Die Oligosaccharide tragen mit 9 kDa zur Gesamtgröße von 84 kDa bei (Zeng *et al.*, 1997).

Der beste Clon mit einer Expressionsrate von 0,5 U/mL in Suspensionskultur wurde in einem kontinuierlichen Wirbelschichtreaktor fermentiert. Die maximale spezifische Aktivität im Überstand betrug dabei 0,95 U/mL, es konnten insgesamt 18 *units* gewonnen werden. Die Zellen wurden abzentrifugiert und das Medium fünffach konzentriert.¹

3.2.2 Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie

Die Affinität der Protein A-Sequenz zu Immunglobulinen macht die einfache chromatographische Aufreinigung des Enzyms mit einer IgG-Sepharose möglich. Das Prinzip der Aufreinigung beruht also auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion und ist ein Standardverfahren der Proteinaufreinigung im Labormaßstab (Guss *et al.*, 1986; Lundström *et al.*, 1990; Shinkai *et al.*, 1997).

Das Verfahren besteht somit aus nur drei Stufen:

- **Ultrafiltration** zur Abtrennung niedermolekularer Komponenten der Fermentation
- **Affinitätschromatographie** mit IgG-Sepharose zur Feinreinigung
- **Ultrafiltration** zur Aufkonzentrierung und Umpufferung

Im ersten Schritt wurden 3 L des Konzentrats in einem *cross flow*-Ultrafiltrationsmodul (Membran mit einer 10 kDa-Ausschlußgrenze) gegen 30 L PBS-Puffer² dialysiert.

Zur Feinreinigung der core2-GlcNAc-Transferase wurde sowohl eine kommerziell erhältliche als auch eine selber hergestellte IgG-Sepharose eingesetzt. Das Diafiltrat wurde mit einem pH-Wert von 7,2 auf die Säule aufgetragen. Die Elution des gebundenen Proteins gelingt durch einen pH-*shift* zu pH 3. Abbildung 3.4 zeigt exemplarisch ein Elutionsprofil:

¹ Die Fermentation wurde im Rahmen der Promotion von Dr. Detlef Eisenkrätzer durchgeführt.

² Phosphatpuffer, siehe Material und Methoden

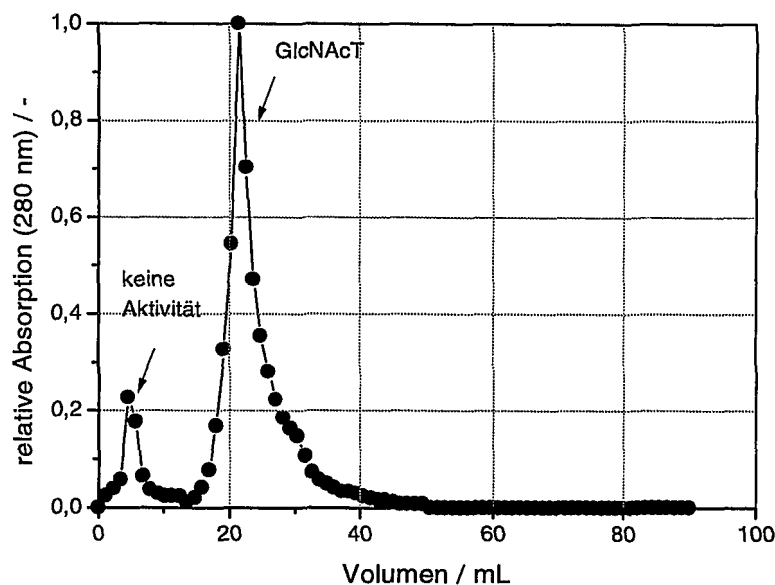


Abb. 3.4: Elutionsprofil der chromatographischen Aufreinigung

Die Aktivität der GlcNAc-Transferase ist sehr stark vom jeweiligen Puffer abhängig. Die im Chromatographieschritt eingesetzten Puffer erniedrigen die Enzymaktivität nachweislich. Zwecks Umpufferung und Aufkonzentrierung wurden die Eluate deshalb abschließend in einer Rührzelle ultrafiltriert. Alle Aufreinigungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. In der so erhaltenen MES-Lösung¹ konnte die höchste Gesamtaktivität gemessen werden. Die folgende Tabelle faßt die Ergebnisse zusammen.

Probe	Gesamtaktivität U	Gesamtprotein- menge / mg	Massenspez. Akt. mU/mg	Aufreinigungs- faktor	Ausbeute %
Konzentrat	18,0	13500	1,3	1,0	100
IgG-Eluat	1,7	35,7	47,6	36,6	9,4
MES-Diafiltrat	14,3	35,7	400,6	308,2	79,4

Tab. 3.2: Aufreinigung der GlcNAc-Transferase

Da das aufgereinigte Enzym in den folgenden Arbeiten ausschließlich in Lösung zum Einsatz kommt, wird in den übrigen Kapiteln die Aktivität volumenspezifisch angegeben.

¹ MES: 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure

3.3 Zusammenfassung

- Die GalNAc-Transferase 3, die vom Projektpartner in Copenhagen in Baculoviren cloniert wurde, wurde im 20 L-Reaktor in Insektenzellen exprimiert.
- Bei einer spezifischen Aktivität von 7,5 U/L im Zellüberstand konnten 128 U produziert werden.
- Ein Teil der Enzymlösung wurde mittels Ionentauscherchromatographie aufgereinigt. 21 U wurden mit einer Gesamtausbeute von 57% gewonnen.
- Mittels IgG-Affinitätschromatographie konnten 14 U einer core2-GlcNAc-Transferase bei einer Ausbeute von 80% aufgereinigt werden. Das Enzym war von der Zürcher Arbeitsgruppe in CHO-Zellen cloniert und im Institut für Biotechnologie produziert worden.

"Seek simplicity, and distrust it."

A. N. Whitehead

4 Synthese und Aufreinigung von Nucleotidzuckern

In diesem Kapitel sollen Untersuchungen zur Bereitstellung von Nucleotidzuckern beleuchtet werden. Nucleotidzucker als Substrate für die enzymatische Oligosaccharidsynthese sind zwar inzwischen kommerziell erhältlich, stellen aber einen beträchtlichen Kostenfaktor dar. Abbildung 4.1 zeigt die aktuellen Grammpreise der in dieser Arbeit verwendeten Donoren.

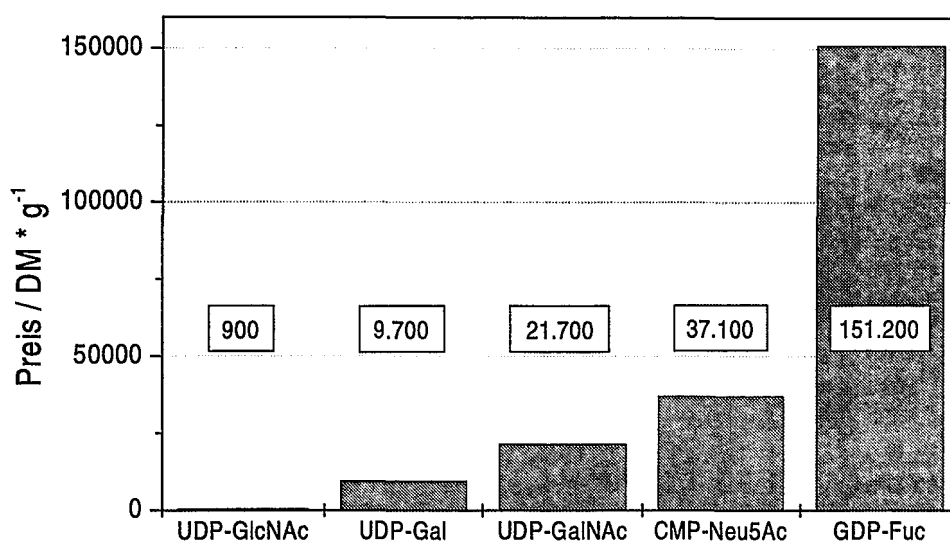


Abb. 4.1: Katalogpreise der verwendeten Nucleotidzucker (Sigma Biochemikalien, 1999)

So nimmt es nicht wunder, daß eine Reihe von Arbeiten zur Synthese von Nucleotidzuckern publiziert wurden. Neben der chemischen Synthese gewinnen enzymatische Methoden aufgrund hoher Selektivitäten und Ausbeuten an Interesse – insbesondere angesichts der Tatsache, daß inzwischen eine Vielzahl der benötigten Enzyme rekombinant verfügbar ist (Elling, 1997). Bezüglich ihrer Biosynthese unterscheidet man primäre und sekundäre Nucleotidzucker.

Primäre Nucleotidzucker wie UDP-Glucose können durch Pyrophosphorylasen direkt aus Zucker-1'-phosphat und Nucleosidtriphosphat gebildet werden (Leloir, 1971). CMP-Neuraminsäure bildet hierbei eine Ausnahme: Eine Synthetase katalysiert die direkte Kondensation von Neuraminsäure und Cytidintriphosphat (CTP). Diese Synthese wurde auch *in vitro* mehrfach publiziert (Higa und Paulson, 1985; Augé und Gautheron, 1988; Simon *et al.*, 1988;

Thiem und Stangier, 1990).¹ Im Institut für Biotechnologie wurde eine Syntheseroute von CMP-Neuraminsäure ausgehend von *N*-Acetylglucosamin und Brenztraubensäure sowie CTP reaktionstechnisch optimiert und im Multigramm-Maßstab durchgeführt (Kragl *et al.*, 1991; Kragl, 1992; Klein, 1994; Kittelmann *et al.*, 1995; Kragl *et al.*, 1995; Kragl *et al.*, 1996).

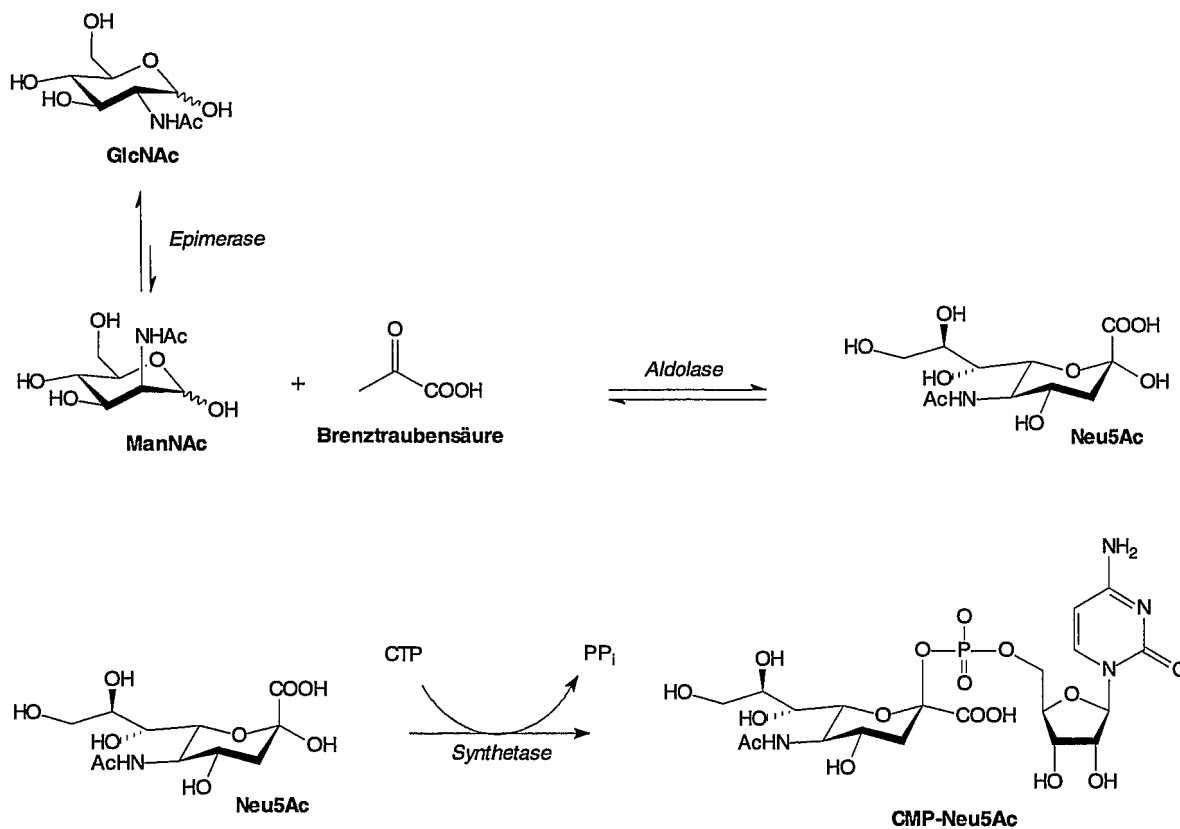


Abb. 4.2: Zweistufige enzymatische Synthese von CMP-Neu5Ac

Sekundäre Nucleotidzucker müssen durch den Einsatz weiterer Enzyme aus primären Nucleotidzuckern hergestellt werden. So gelang die Synthese von UDP-Galactose via UDP-Glucose mittels einer Epimerase im Multigramm-Maßstab (Wong *et al.*, 1982).² UDP-*N*-Acetylgalactosamin (Heidlas *et al.*, 1992b; Bültner *et al.*, 1997) und UDP-*N*-Acetylglucosamin (Ropp und Cheng, 1990; Heidlas *et al.*, 1992a) werden in der Regel chemoenzymatisch synthetisiert. Auf die enzymatische Gewinnung der aktivierten Aminosucker folgt die chemische Acetylierung. Inzwischen wurden auch enzymatische Kurzrouten für die sekundären Nucleotidzucker in Säugern und Pflanzen beschrieben (Elling, 1997). Insofern kann in Zukunft mit neuen effizienten Syntheserouten gerechnet werden.

¹ Chemische Synthesen der CMP-Neuraminsäure wurden ebenfalls publiziert, sie eignen sich vor allem zur Synthese nichtnatürlicher Derivate (Kondo *et al.*, 1992; Makino *et al.*, 1993; Martin und Schmidt, 1993)

² Da die Epimerase-katalysierte UDP-Gal-Synthese in ein thermodynamisch ungünstiges Gleichgewicht läuft, kann das Produkt nur in etwa 20%iger Ausbeute gewonnen werden. Stattdessen wurde der Nucleotidzucker *in situ* durch eine Galactosyltransferase abgefangen. Reaktionsprodukt war LacNAc.

4.1 Chemische Synthese von GDP-Fucose¹

Obwohl bereits Versuche unternommen wurden, GDP-Fucose enzymatisch herzustellen (Ichikawa *et al.*, 1992a; Stiller und Thiem, 1992), wird das kommerziell erhältliche Produkt bisher ausschließlich chemisch produziert, was einer der Gründe für den enorm hohen Preis ist. Die Synthese von GDP-Fucose wurde erstmalig von Nunez *et al.* 1981 publiziert. Ausbeuten über 30% konnten auch in später beschriebenen Synthesen nicht erzielt werden (Gokhale *et al.*, 1990; Schmidt *et al.*, 1991; Ichikawa *et al.*, 1992b; Arlt und Hindsgaul, 1995; Binch *et al.*, 1998). Eine Optimierung zu hohen Produktausbeuten wurde erst 1997 von Baisch und Öhrlein berichtet. Alle Methoden sind jedoch durch aufwendige Schutzgruppenchemie und wiederholten Einsatz chromatographischer Trennmethoden gekennzeichnet.

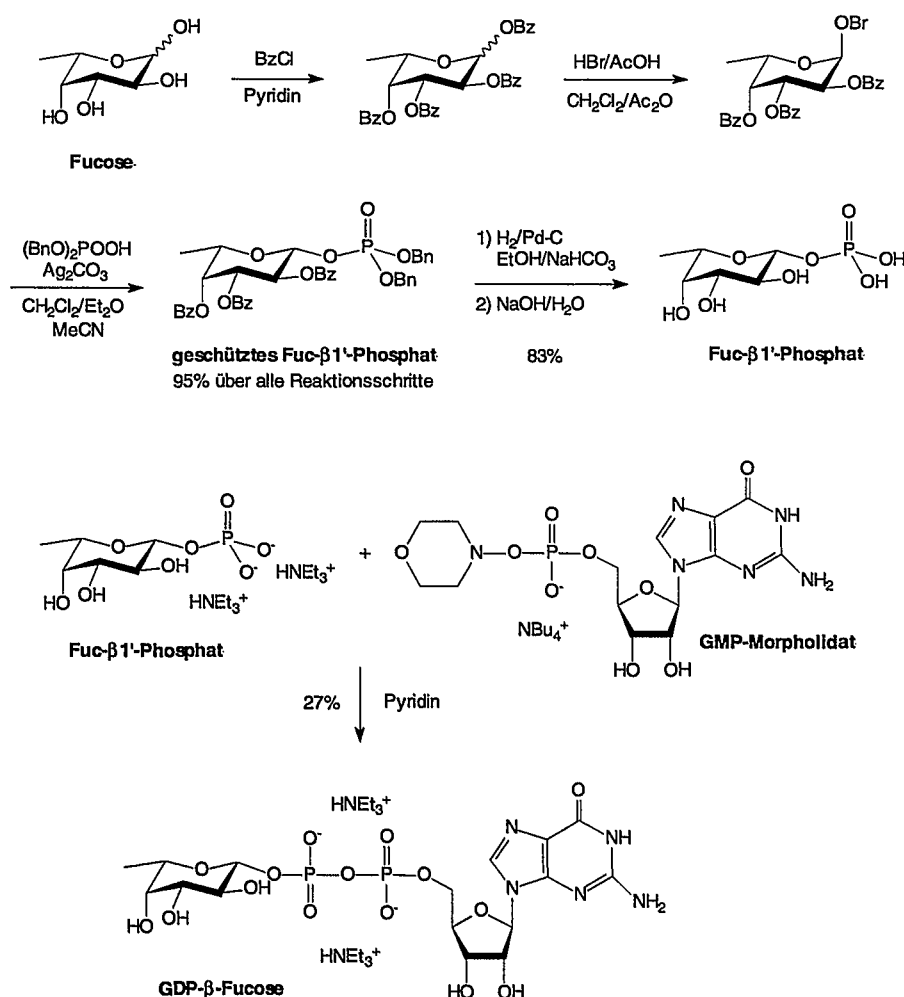


Abb. 4.3: Chemische Synthese der GDP-Fucose nach Gokhale *et al.*, 1990; Ichikawa *et al.*, 1992b

¹ Die Arbeiten wurden während eines Forschungsaufenthalts in Edmonton (Canada) im Arbeitskreis von Prof. Palcic durchgeführt.

Ein klassischer Syntheseweg ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Zwischenprodukt ist in der Regel ein Fucose-1'-phosphat, das mit einem aktivierten Phosphat des Nucleotids unter Ausbildung des Diphosphats verknüpft wird.

Aufbauend auf einer Publikation zur Synthese von UDP-Galactose und Derivaten (Uchiyama und Hindsgaul, in Druck) sollte während eines Forschungsaufenthaltes im Arbeitskreis von Prof. Palcic eine neue Methode zur Herstellung von GDP-Fucose entwickelt werden. Neben einer unkomplizierten und schnellen Synthese sollte vor allem die Zahl der chromatographischen Trennungen, die oft die zeitintensivsten Schritte darstellen, verringert werden.

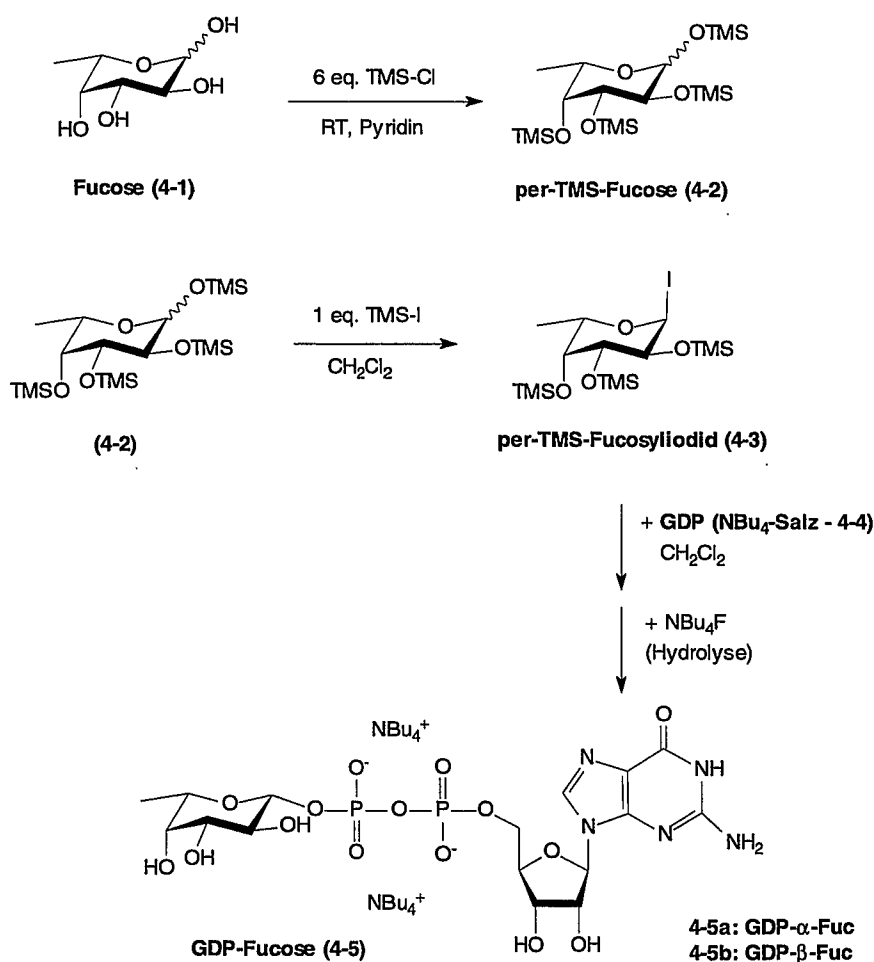


Abb. 4.4: Neue Strategie zur Synthese von GDP-Fucose

4.1.1 Schnelle Synthese von GDP-Fucose

Mit der oben erwähnten Synthese von Uchiyama und Hindsgaul konnten Gesamtausbeuten von etwa 30% für Derivate der UDP-Galactose erzielt werden; das Produkt war jedoch in jedem Fall eine Anomerenmischung.¹ Die Übertragung der Synthese auf GDP-Fucose als Produkt ist in Abbildung 4.4 dargestellt.

Diese Alternative ist bestechend durch ihre Kürze von nur zwei Stufen:

- Zunächst wird die Fucose durch Trimethylsilylchlorid (TMS-Cl) geschützt. Diese Reaktion verläuft quantitativ, das Produkt wird mit Pentan extrahiert.
- Die geschützte Fucose wird mit Trimethylsilyliodid (TMS-I) in anomerer Position aktiviert,² nach Zugabe des Nucleotids Guanosindiphosphat (GDP) erfolgt die Kopplung. Als Nebenprodukt entsteht GMP-Fucose.

4.1.2 Versuche zur Optimierung

Bei ersten Versuchen konnten Ausbeuten von ca. 20% bei einem Anomerenverhältnis (β/α) von 1:1 erzielt werden. Ziel war deshalb eine Optimierung der Synthese hin zu höheren Ausbeuten und günstigeren Anomerenverhältnissen. Es wurde der Einfluß einiger Parameter auf Ausbeute und Selektivität untersucht.

- **Substratverhältnis** – Einsatz der preisgünstigen Fucose im Überschuß
- **Abfangen von Protonen** mittels einer Base
- **Reaktionstemperatur**
- **Wassergehalt** – Entfernen von Wasserresten mittels Molekularsieb

Für den letzten Punkt konnte kein Einfluß auf die Reaktion nachgewiesen werden. Die ersten drei Parameter sollen im folgenden diskutiert werden. Die im Text diskutierten Synthesergebnisse sind in Tabelle 4.1 zusammengefaßt.

¹ Anomere unterscheiden sich in der Orientierung des Restes am C¹ des Zuckerrings.

Im Fall der UDP-Galactose-Derivate wurde das α -Anomer benötigt, bei der Synthese von GDP-Fucose ist das β -Anomer das gewünschte Produkt, das von Fucosyltransferasen umgesetzt werden kann.

² Die Kombination von TMS als Schutzgruppe mit der Aktivierung durch TMS-I wurde erstmals von Uchiyama und Hindsgaul zur Glycosylierung eingesetzt (Uchiyama und Hindsgaul, 1996). Ein umfangreicher Review zur Chemie von TMS-I findet sich bei Olah und Narang, 1982.

Versuch	Ausbeute		Verhältnis $\beta:\alpha$
	GDP-Fuc	GDP- β -Fuc	
RT, 1 eq. TMS-Fuc-I	18,3%	11,0%	1,5
0°C, 1 eq. TMS-Fuc-I	20,9%	10,5%	1,0
0°C, 2 eq. TMS-Fuc-I	34,2%	11,4%	0,5
0°C, 2 eq. TMS-Fuc-I, 1 eq. Hünig-Base	23,5%	14,3%	1,6
-78°C, 1 eq. TMS-Fuc-I	12,4%	8,2%	1,9
-78°C, 2 eq. TMS-Fuc-I	16,1%	9,9%	1,6

Tab. 4.1: Ausbeuten und Anomerenverhältnisse einiger GDP-Fucose-Synthesen

Einsatz der Fucose im Überschuß

Durch die Zugabe eines zweiten Äquivalents per-TMS-Fuc-I konnte die Gesamtausbeute an GDP-Fucose erhöht werden, allerdings bei gleichzeitiger Verschlechterung des Anomerenverhältnisses. Abbildung 4.5 zeigt den Reaktionsverlauf.

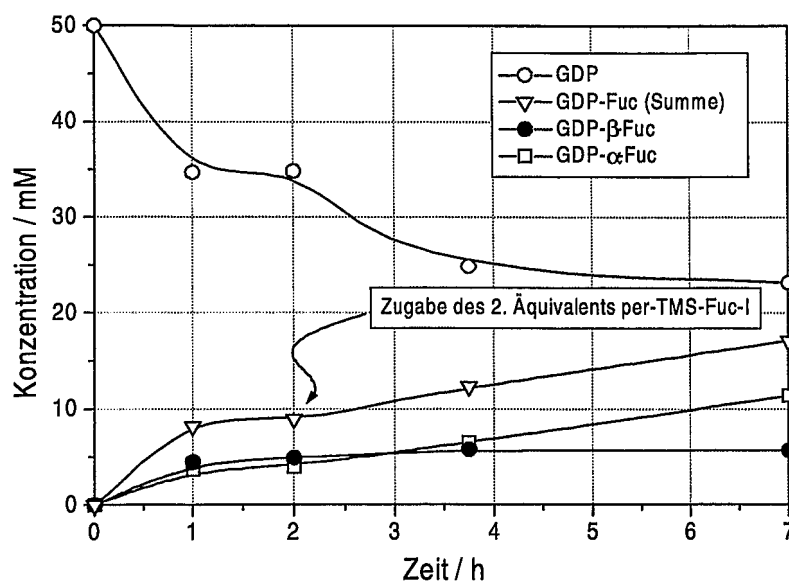


Abb. 4.5: Reaktionsverlauf der GDP-Fucose-Synthese

Einsatz einer nicht-nucleophilen Base

Der oben beschriebene Ausbeuteverlauf von GDP- β -Fucose läßt sich durch einen säurekatalysierten Mechanismus erklären. Das kinetisch favorisierte Produkt wird dabei während der Reaktion zunehmend zum thermodynamisch stabileren α -Anomer umgelagert oder abgebaut.

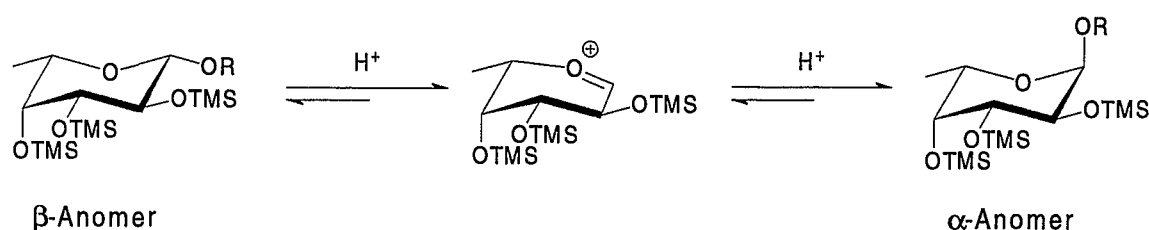


Abb. 4.6: Säurekatalysierte Racemisierung der Fucose-Glycoside

Zur Vermeidung oder Einschränkung dieser unerwünschten Anomerisierung wurde ein Äquivalent Hünig-Base zugegeben. Das Dipropylethylamin ist eine Base ohne nennenswerte nucleophile Eigenschaften. Somit kann ein basenkatalysierter Mechanismus statt der Säurekatalyse ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse zeigen ein verbessertes Anomerenverhältnis bei einer leicht erhöhten Ausbeute.

Reaktionstemperatur

Um die Anomerisierung der kinetisch favorisierten GDP- β -Fucose zum thermodynamisch stabilen α -Anomer einzuschränken, wurde die Reaktionstemperatur auf -78°C abgesenkt. Bei dieser Temperatur wurden niedrigere Umsätze erzielt, ein Einfluß auf das Anomerenverhältnis ließ sich jedoch nicht erkennen.

Zusammenfassung der Syntheseergebnisse

Die Anomerenverhältnisse und Ausbeuten aller Synthesen sind in Abbildung 4.7 aufgetragen. Das Anomerenverhältnis stellt sich als Funktion der Gesamtausbeute an GDP-Fucose dar und ließ sich nur durch Einsatz von Hünig-Base beeinflussen. Eine Variation des Lösungsmittels erfolgte im Rahmen der Arbeit nicht, da hierzu intensive Vorarbeiten im Rahmen der UDP-Galactose-Synthesen geleistet worden waren.

Der Anteil der GMP-Fucose am Reaktionsgemisch betrug bei allen Synthesen etwa 2%. Im Anschluß an die Versuche im analytischen Maßstab wurde 1 g GDP mit einer Ausbeute von 12% zu GDP- β -Fucose umgesetzt.

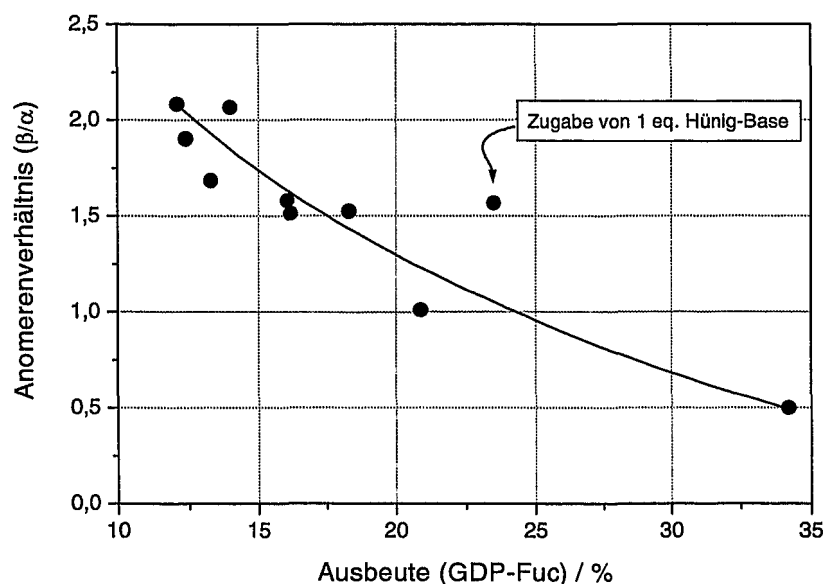


Abb. 4.7: Anomerenverhältnis als Funktion der Ausbeute

4.1.3 Techniken zur Produktaufreinigung

Die Trennung von GDP-Fucose-Anomerengemischen ist nur unter relativ hohem Aufwand möglich – so zeigen beide Produkte auf Ionentauschersäulen ein quasi identisches Elutionsverhalten. Da aber aufwendigere Schritte wie zum Beispiel eine Gelpermeationschromatographie vermieden werden sollten, wurde nach einer Alternative zur Gewinnung des β -Anomers gesucht.

So konnte gezeigt werden, daß sich die Hydrolysestabilität der GDP-Fucose-Anomeren stark unterscheidet. Bei pH 10 wurde eine quantitative Hydrolyse der GDP- α -Fucose bei einer Ausbeute >90% für das β -Anomer erzielt (vgl. Abb. 4.8).¹

¹ Die Versuche wurden mit dem aufgereinigten GDP-Fucose-Anomerengemisch durchgeführt, für die Reaktionslösungen ergab sich eine höhere Stabilität. Die Hydrolyse im präparativen Maßstab wurde deshalb bei pH 11 mit gleicher Ausbeute durchgeführt.

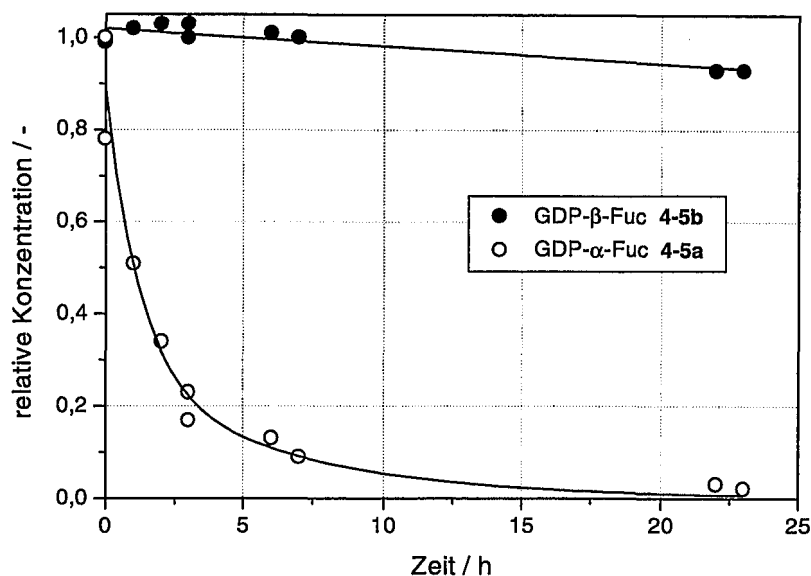


Abb. 4.8: Selektive Hydrolyse der GDP- α -Fucose bei pH 10 (1 mM GDP-Fuc, 100 mM Carbonat-Puffer, RT)

Im Anschluß müssen die verbliebenen Nucleotide mittels alkalischer Phosphatase¹ bei pH 9 hydrolysiert werden. Nucleotidzucker werden durch das Enzym nicht angegriffen. Im folgenden Schritt kann das Produkt auf einer Anionentauschersäule gereinigt werden. Je nach gewünschter Produktspezifikation ergeben sich unterschiedliche Varianten:

- **Einsatz eines flüchtigen Puffers**, zum Beispiel Ammoniumhydrogencarbonat. Die Produkte werden mittels eines Gradienten eluiert, das Salz kann allerdings auch durch mehrfaches Lyophilisieren nicht vollständig entfernt werden.²
- **Elution mittels eines nichtflüchtigen Salzes** – verwendet man LiCl in Verbindung mit Dowex 1 $\times$ 2 Anionentauscherharz, so eluiert der Nucleotidzucker bei einer Salzkonzentration von etwa 500 mM (Vogel *et al.*, 1997). Zur Abtrennung des Salzes ist eine weitere Trennoperation erforderlich.

Zur Aufreinigung der GDP-Fucose wurde die zweite Möglichkeit gewählt. Sie wird im folgenden Kapitel diskutiert.

¹ E.C. 3.1.3.1

² Nach zweifachem Gefriertrocknen wurde eine Produktreinheit von etwa 50% erreicht.

4.2 Nanofiltration zur Aufreinigung von Nucleotidzuckern¹

Nucleotidzucker – ob chemisch oder enzymatisch synthetisiert – werden in der Regel durch Anionentauschchromatographie aufgereinigt. Problematisch ist die anschließende Abtrennung des Wertstoffs vom Salz, das in etwa hundertfacher Konzentration in der Produktfraktion vorliegt. Dies geschieht meist durch Gelpermeationschromatographie, die jedoch zeitaufwendig und kaum *scale up*-fähig ist.

Stattdessen wurde die Eignung von Membranverfahren zur Entsalzung untersucht. Mit einer hinreichend selektiven Membran sollte es möglich sein, den Wertstoff zurückzuhalten, während das Salz mit dem Lösungsmittel permeiert. Die Maßstabsvergrößerung von Membranprozessen ist vergleichsweise unproblematisch.² Abbildung 4.9 veranschaulicht die alternativen Grundoperationen.

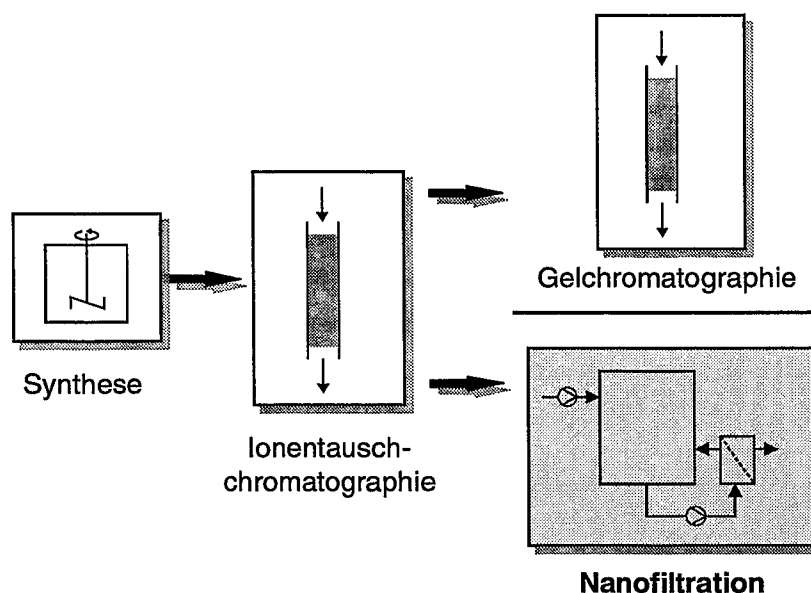


Abb. 4.9: Nanofiltration als Alternativtechnik zur Gelpermeationschromatographie

4.2.1 Membranprozesse als Trennoperationen

Der erste Einsatz einer Membran für Dialyseexperimente erfolgte im Jahr 1861 durch Thomas Graham (Mulder, 1996). Seitdem wurden Membranverfahren als Trennprozesse der chemischen Verfahrenstechnik etabliert. Eine Unterteilung von Membranprozessen kann nach

¹ Ergebnisse dieses Kapitels wurden zusammen mit Arbeiten von Dr. Sven Fey zur membrangestützten Aufreinigung von GDP-Mannose publiziert: G. Dudziak, S. Fey, L. Hasbach, U. Kragl "Nanofiltration for purification of nucleotide sugars" *J. Carbohydr. Chem.* **18** (1999) 41-50.

Erste Retentionsmessungen wurden von Lutz Hasbach im Rahmen seiner Examensarbeit angestellt (Hasbach, 1994).

² Zur Trinkwassergewinnung aus Meerwasser werden Umkehrosmoseanlagen mit einer Kapazität von 36.000 t/d betrieben (Rautenbach, 1995).

Phasenzuständen des Einsatzgemisches sowie des Permeats erfolgen, eine weitere nach der Art der Triebkräfte. Hier sollen nur Trennungen in flüssiger Phase behandelt werden, bei denen die Triebkraft des transmembranen Flusses auf einer Druckdifferenz beruht. Abbildung 4.10 gibt eine Übersicht über das weite Feld der Membranverfahren.

Kommen poröse Membranen zum Einsatz, wie in der Mikro- und Ultrafiltration, so wird ein konvektiver Fluß durch die Membran erzeugt. Der Trenneffekt beruht hier im wesentlichen auf der unterschiedlichen Größe der Teilchen. Für Reversosmose und Dialyse werden dichte, nichtporöse Membranen verwendet. Es erfolgt ein diffusiver Transport der in der Membranismatrix gelösten Moleküle. Somit spielen die chemischen Eigenschaften der zu trennenden Moleküle sowie der Membran eine wichtige Rolle.

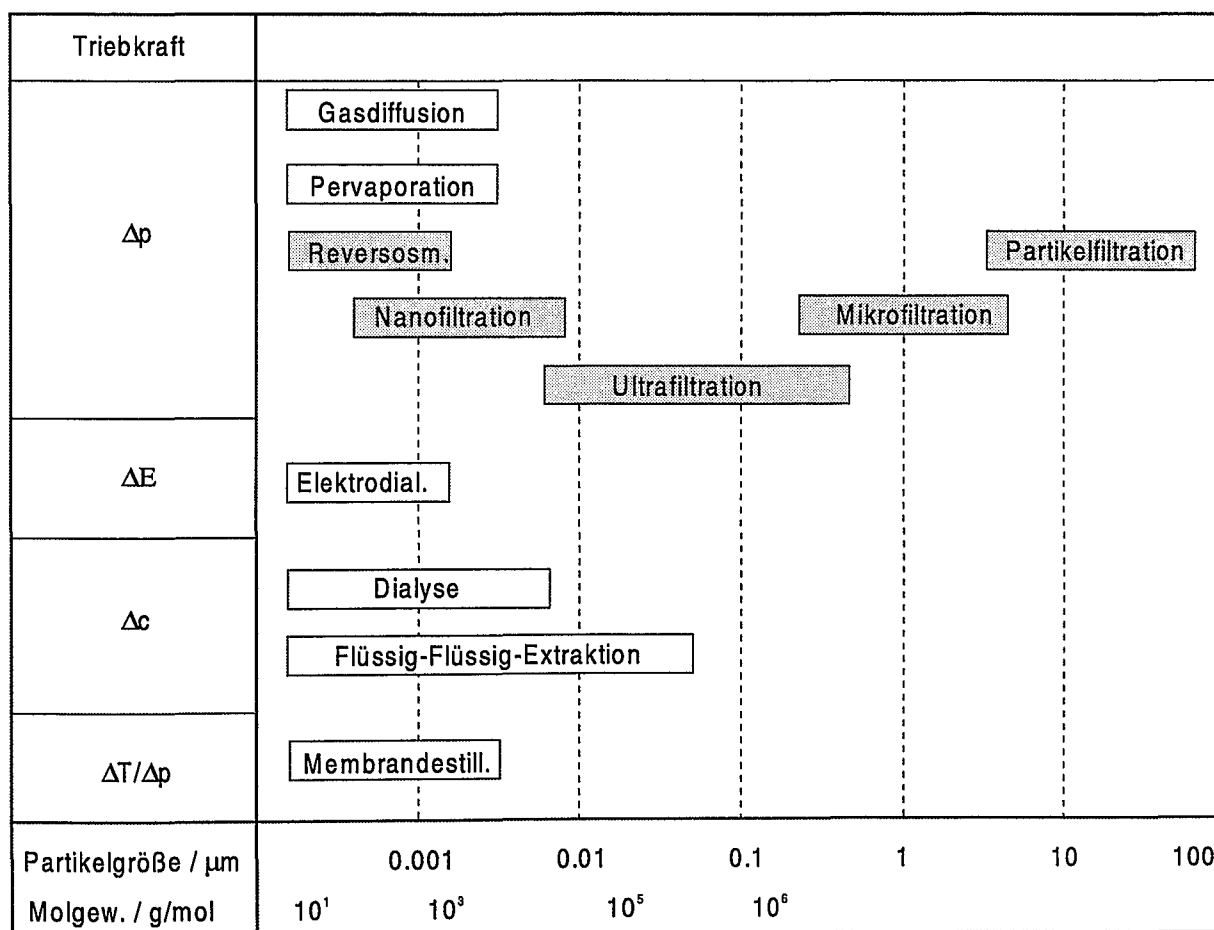


Abb. 4.10: Membranverfahren

Die Nanofiltration deckt einen Molekulargewichtsbereich zwischen 100 und 1000 Da ab und ist somit zwischen Reversosmose und Ultrafiltration einzuordnen. Bei der Nanofiltration bedient man sich in der Regel mikroporöser Membranen – konvektiver und diffusiver Transport überlagern sich. Da die Membranen häufig aus ionischen Polymeren gefertigt sind,

werden geladene Teilchen stärker zurückgehalten als neutrale Moleküle. Informationen zu Struktur und Eigenschaften von Nanofiltrationsmembranen finden sich in zahlreichen Übersichten und Monographien (Rautenbach und Göschl, 1990; Staude, 1992; Raman *et al.*, 1994; Noble und Stern, 1995; Rautenbach, 1995; Scott, 1995; Mulder, 1996).

Betriebsparameter, die die Retention beeinflussen, sind in Tabelle 4.2 aufgezählt (Hasbach, 1994). Desweiteren können *fouling*-Effekte durch Quellung oder Ablagerungen auf der Membran das Retentionsverhalten und den transmembranen Fluß beeinflussen.

Parameter	Auswirkung
Temperatur	Zunahme der Retention mit abnehmender Temperatur
Fluß	Zunahme der Retention mit steigendem Transmembranfluß ¹
Konzentration	Abnahme der Retention mit steigender Konzentration
Ladung	Zunahme der Retention mit steigender Ladung

Tab. 4.2: Faktoren, die die Trennleistung der Nanofiltration beeinflussen

Die Nanofiltration als industrielle Grundoperation ist eine relativ junge Technologie – sie wurde erst in den letzten 15 Jahren entwickelt. Neben dem Einsatz in der Lebensmittelindustrie und der Abwasserbehandlung (Chen und Lichtenthaler, 1993; Mulder, 1996; Sommerer *et al.*, 1998) wurden eine Reihe neuer Anwendungsfelder erschlossen, wie die Reinigung von Feinchemikalien (Mc Gregor, 1989; Danzig *et al.*, 1995), die Trennung von Peptiden und Aminosäuren am isoelektrischen Punkt (Tsuru *et al.*, 1994), die Abtrennung von Milchsäure aus Fermentationsbrühe (Timmer *et al.*, 1994) oder die Kofaktorrückhaltung in kontinuierlich betriebenen Enzym-Membran-Reaktoren zur Steigerung der Zyklenzahlen (Seelbach und Kragl, 1997).

Als entscheidende Größe zur Charakterisierung einer Membran dient das Rückhaltevermögen für die betreffende Substanz. Die Retention ist definiert nach Gleichung 4.1.

$$R = 1 - \frac{c(\text{Permeat})}{c(\text{Retentat})} \quad (4.1)$$

mit:	R	-	Retention
	c (Permeat)	mol/L	Konzentration im Permeat
	c (Retentat)	mol/L	Konzentration im Retentat

¹ Bei zunehmendem transmembranem Fluß dominiert der konvektive Stofftransport den diffusiven Transport. Somit erhöht sich der Wasserfluß, der fast ausschließlich konvektiv erfolgt, im Verhältnis zum Salzfluß.

Entscheidend für Trennoperationen mit hohen Ausbeuten ist die Selektivität der eingesetzten Membran. Mit Hilfe der Retention kann eine Gleichung zur Simulation des Ausspülvorgangs während einer Diafiltration¹ aufgestellt werden:

$$c(A) = c(A_0) \times e^{-(1-R) \times \theta} \quad (4.2)$$

mit:	R	-	Retention
	c (A)	mol/L	Konzentration der Komponente A im Retentat
	c (A ₀)	mol/L	Anfangskonzentration der Komponente A
	θ	-	Anzahl der Verweilzeiten (ausgetauschte Volumina)

Abbildung 4.11 verdeutlicht, daß zur Rückhaltung von Wertstoffen Retentionen von 95% nicht ausreichen. Bei einem Wert um 99% ist eine Retention von 50% für die permeierende Komponente jedoch durchaus akzeptabel.

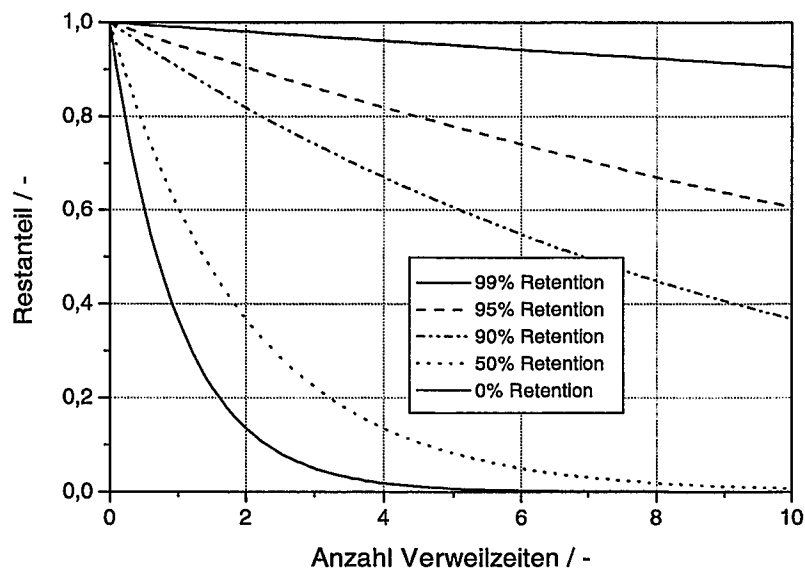


Abb. 4.11: Ausspülpkurven – Restanteil als Funktion der Anzahl der Verweilzeiten

¹ Der Begriff Diafiltration bezeichnet ein kontinuierliches Filtrationsverfahren. Der Füllstand wird konstant gehalten, indem das Permeatvolumen durch Waschflüssigkeit ersetzt wird.

4.2.2 Membranscreening

Eine Reihe kommerziell erhältlicher Nanofiltrationsmembranen wurden bezüglich ihres Retentionsvermögens für CMP-Neuraminsäure, GDP-Fucose, Na-Formiat und LiCl getestet.¹ Die hier vorgestellten Untersuchungen sowie die Entsalzungen im präparativen Maßstab wurden in der Laboranlage P 28 der Firma Celfa durchgeführt. Das Fließschema der Anlage ist in Abbildung 5.12 dargestellt.

Sie besteht aus einem thermostatisierbaren Druckzylinder (Volumen 500 mL), einer Zahnradpumpe zur Umwälzung der Lösung und dem Membranmodul, das unterhalb des Druckzylinders angebracht ist. Das Retentat wird in den Druckbehälter zurückgeführt. Drücke bis maximal 40 bar können durch Drucküberlagerung mit einem Inertgas erzielt werden. Für die Diafiltration wurde über einen vorhandenen Blindstopfen eine gegendruckstabile Wechselkolbenpumpe angeschlossen, die für die Mitteldruckchromatographie ausgelegt ist. Die Pumpe wird durch einen Füllstandschalter gesteuert.

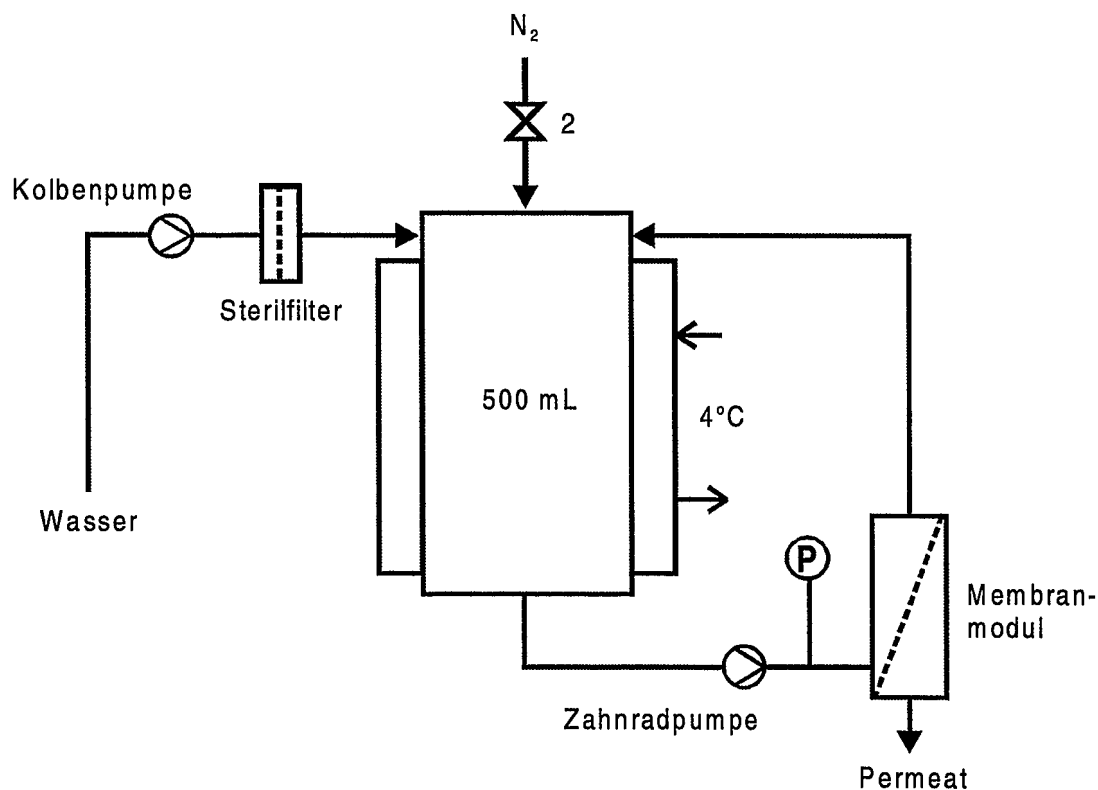


Abb. 4.12: Fließschema der Nanofiltrationsanlage

¹ Die Untersuchungen wurden zuerst für CMP-Neu5Ac durchgeführt. Hierfür geeignete Membranen wurden im Anschluß auch zur Aufreinigung der GDP-Fuc getestet.

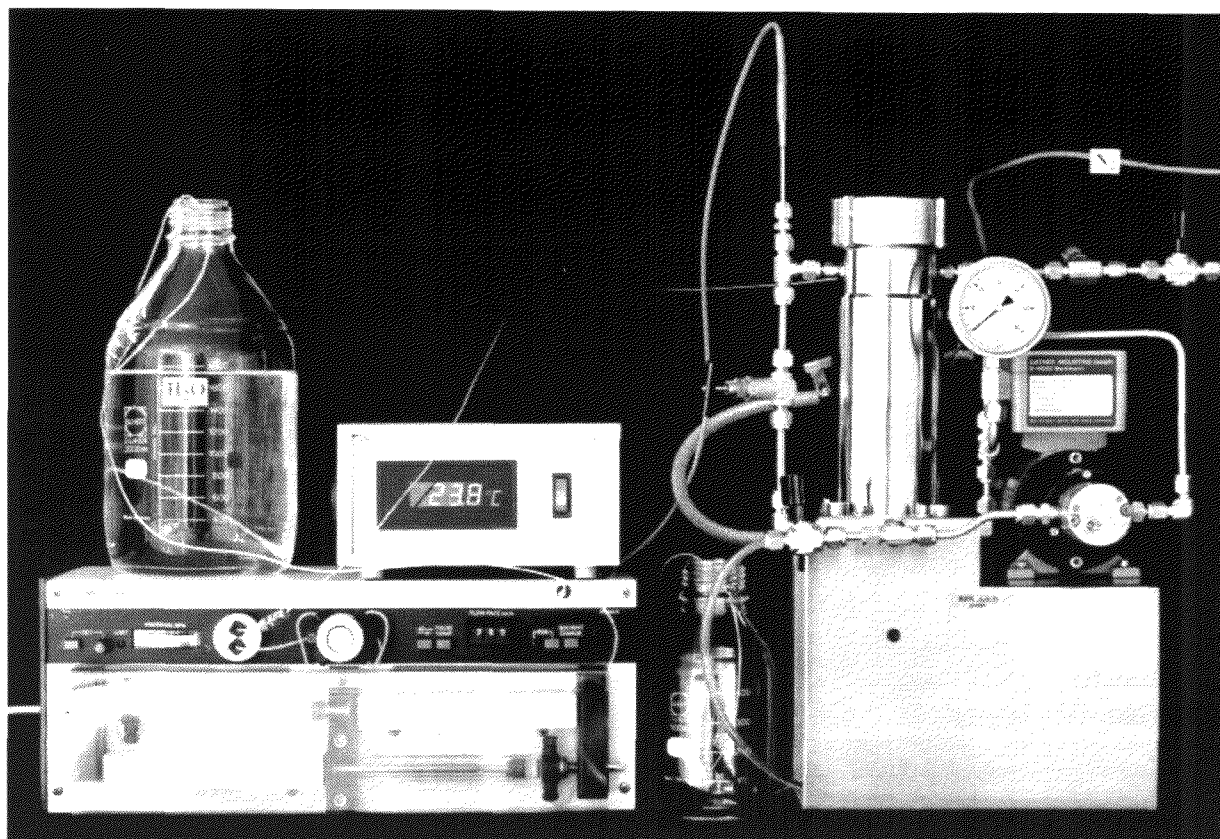


Abb. 4.13: Foto der Nanofiltrationsanlage (rechts) incl. Kolbenpumpe zur Diafiltration (links)

Die Retentionsmessungen erfolgten in diskontinuierlicher Betriebsweise bei Raumtemperatur. Tabelle 4.3 listet die Ergebnisse des Membranscreenings auf, sie sollen im folgenden diskutiert werden:

- Die besten Ergebnisse für die Aufreinigung von CMP-Neu5Ac wurden mit den Membranen ROM 375 und MX 07 erzielt. Erstere zeichnet sich durch einen höheren Transmembranfluß bei gleichem Betriebsdruck aus, letztere durch eine niedrigere Retention für Natriumformiat.¹
- Eine weitere Erhöhung des Retentionswertes dieser Membran für CMP-Neu5Ac von 0,992 auf 0,995 konnte durch Absenken der Temperatur auf 4°C erzielt werden. Die Retention für Natriumformiat änderte sich im Rahmen der Meßgenauigkeit nicht.
- Der erzielte flächenspezifische Fluß von 0,12 mL/(cm² × min) entspricht einem experimentellen Wert von 3,4 mL/min.

¹ Die Membran MX07 war erst zu einem späteren Zeitpunkt verfügbar, als die Untersuchungen zur Aufreinigung von GDP-Fuc und zur Maßstabsverkleinerung durchgeführt wurden (vgl. Kap. 4.2.4). Aus diesem Grund wurde für die Diafiltration von CMP-Neu5Ac eine Membran des Typs ROM 375 eingesetzt.

- Die Membran MX 07, die erfolgreich zur Aufreinigung der chemisch ähnlichen GDP-Mannose eingesetzt werden konnte (Fey, 1997; Dudziak *et al.*, 1998), wurde zur Rückhaltung von GDP-Fucose getestet. Die Retention war mit 0,988 im Vergleich zu 0,983 für GDP-Mannose sehr zufriedenstellend. Die Membran wurde im Anschluß zur Entsalzung von GDP-Fucose eingesetzt.

Membran	Hersteller ^a	Retention / -			p / bar	Fluß ^e
		CMP-Neu5Ac ^b	Na-Formiat ^c	LiCl ^d		
CMS-KX-021	Celfa	0,995	0,484	0,036	8	0,04
MPF 44	Celfa	0,992	0,730	0,557	20	0,04
MX 07	Osmonics	0,995^f	0,317	0,035	8	0,06
ROM 365	Toray	0,921	-	0,109	8	0,12
ROM 375	Toray	0,992^g	0,484	0,152	8	0,12
ROM 380	Celfa	0,985	0,860	0,400	40	0,06
ROM 395	Nitto	0,974	0,173	-	30	0,25

^a ROM-Membranen wurden von Amafilter (Langenhagen) bezogen; ^b 1 mM; ^c 100 mM; ^d 1000 mM – die Retentionsmessungen für LiCl wurden im Rahmen der Dissertation von Sven Fey bestimmt; ^e mL/(cm²×min); ^f bei 4°C; ^g 0,995 bei 4°C

Tab. 4.3: Screening von Membranen für die Nanofiltration bei Raumtemperatur

4.2.3 Entsalzung von CMP-Neuraminsäure und GDP-Fucose

Die Diafiltrationsexperimente erfolgten in der oben beschriebenen Laboranlage, die vor dem Experiment mit 0,1% Peressigsäure sterilisiert wurde. Abbildung 4.14 zeigt eine Entsalzung von CMP-Neuraminsäure im 100 mL-Maßstab. Dabei wurden 65 mg CMP-Neuraminsäure von 1,7 g Natriumformiat getrennt.¹ Die Ausspülkurve für CMP-Neu5Ac wurde nach Gleichung 4.2 mit einem Retentionswert von 0,995 berechnet und stimmt exakt mit dem im vorherigen Kapitel gefundenen Wert überein. Die Retention von Natriumformiat nimmt im Verlauf der Entsalzung auf 0,62 zu, was sich durch die abnehmende Konzentration begründen läßt. Die angestrebte Produktreinheit von 95%, die theoretisch nach 12 Verweilzeiten erreicht sein sollte, wurde so erst nach 17 ausgetauschten Volumina mit einer Ausbeute von 90% erzielt. Nach 21 Verweilzeiten wurde die Nachweisgrenze für Natriumformiat von 0,25 mmol/mL erreicht. Dies entspricht einem Masseanteil von weniger als 3% bezogen auf CMP-Neuraminsäure.

¹ CMP-Neu5Ac kann mit Natriumformiat von Dowex 1×2 Anionentauscherharz mit einem Stufengradienten eluiert werden, das Produkt fällt in 250 mM Salzlösung an.

Der Retentionsfaktor für GDP-Fucose konnte im Rahmen der Meßgenauigkeit ebenfalls reproduziert werden, die Rückhaltung für LiCl stieg im Verlauf der Diafiltration auf über 0,8 an. Nach 13 Verweilzeiten wurden 61 mg des Nucleotidzuckers bei einer Ausbeute von 88% in 90%iger Reinheit erhalten.¹

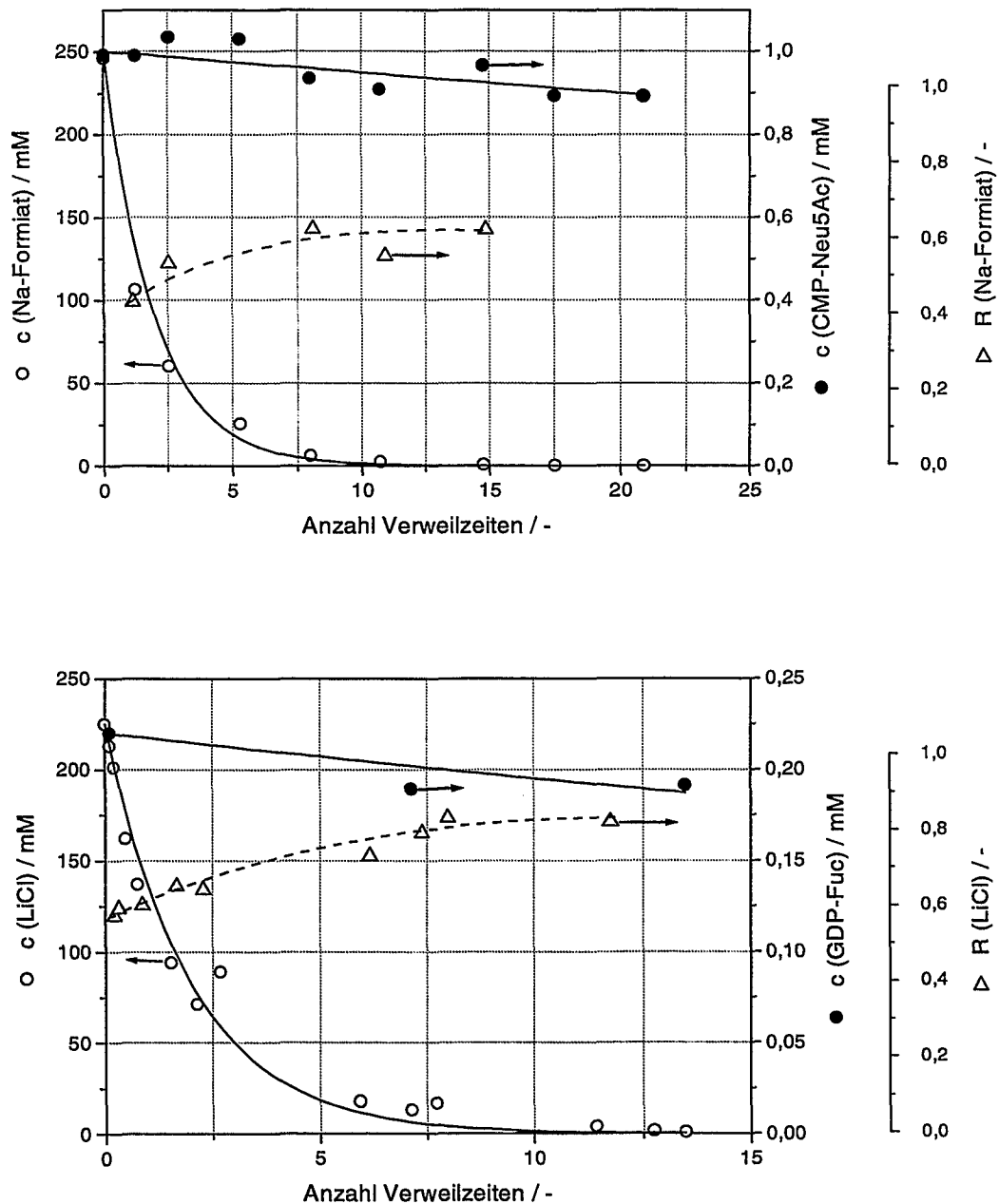


Abb. 4.14: Präparative Nanofiltrationen der Nucleotidzucker; CMP-Neu5Ac (oben): 100 mL; 4°C; pH 7; p = 8 bar; GDP-Fuc (unten): 250 mL; 4°C; pH 7; p = 8 bar

¹ Zur Aufreinigung wurden 70 mg GDP-Fucose eingesetzt. Das übrige Produkt wurde für Versuche mit flüchtigen Elutionspuffern verwendet (vgl. Kap. 4.1.3).

4.2.4 Maßstabsverkleinerung der Nanofiltration

Der größte Teil der publizierten Glycosidsynthesen bewegt sich im Milligramm-Maßstab, da zur Strukturaufklärung oder für biologische Tests nur sehr geringe Mengen erforderlich sind. Da sich die Nanofiltrationstechnik sehr gut zur Aufreinigung von Oligosacchariden und insbesondere von Glycopeptiden eignen sollte, ist eine Maßstabsverkleinerung der hier entwickelten Methode von Interesse.

Zur Übertragung von 0,5 L Volumen auf einige Milliliter wurden zunächst kommerziell erhältliche Rührzellen der Firma Amicon getestet, die zum Einsatz in der Ultrafiltration entwickelt worden waren. Problematisch war dabei die geringe Druckfestigkeit, es können nur maximal 5 bar beaufschlagt werden. Angesichts der Tatsache, daß bereits eine 0,1 molare LiCl-Lösung einen osmotischen Druck von etwa 5 bar entwickelt, der bei einer Retention von 0,5 zu 50% kompensiert werden muß, ergeben sich für diese Zellen stark eingeschränkte Einsatzmöglichkeiten.

Bei Retentionsmessungen in der 10 mL-Rührzelle mit CMP-Neuraminsäure als Standard wurden wesentlich schlechtere Retentionen für die Amicon-Zellen selbst bei hoher Rührerdrehzahl gefunden. Offensichtlich ist die Rührergeometrie nicht geeignet, eine Konzentrationspolarisation an der Membran zu vermeiden.¹ Der Rührer der 3-mL-Zelle überstreicht einen kleineren Teil der effektiven Membranfläche, somit war eine weitere Verschlechterung des Retentionskoeffizienten voraussehbar.

Als geeignet erwies sich ein *cross flow*-Modul der Firma IftwD. Hier wird eine Membran mittels einer HPLC-Pumpe überströmt. Durch einen kleineren Innendurchmesser der Auslaßkapillaren kann bei einer Pumpleistung von 5 mL/min ein Druck von 6 bar aufgebaut werden.² Das Modul selbst hat ein Volumen von etwa 0,8 mL, das Retentat wird in einem gekühlten Becherglas vorgelegt. Die Retention von 0,994 für CMP-Neu5Ac ist mit dem im Celfa-Modul gemessenen Wert von 0,995 vergleichbar.

¹ Die maximale Rührerdrehzahl betrug 1000 rpm. Die 10 mL-Filtrationszelle enthält einen axial fördernden Rührer, der die effektive Membranfläche faktisch vollständig überstreicht.

² Der Fluß von 5 mL/min entspricht einem *cross flow* von 1,7 m/s. Dieser Wert ist mit dem des Celfa-Moduls von 2,9 m/s vergleichbar.

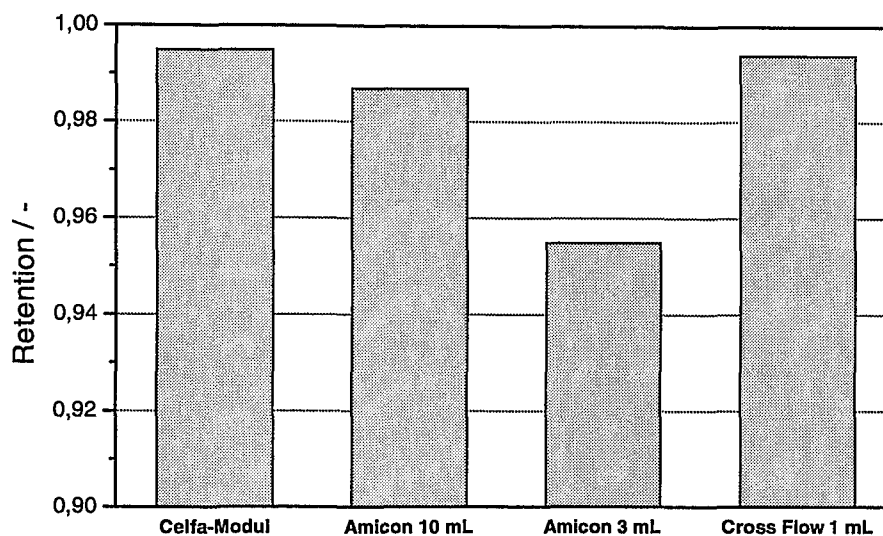


Abb. 4.15: Vergleich der Filtrationsmodule (Retention von CMP-Neu5Ac, MX 07, 4°C)

Somit konnte ein geeignetes Modul für die Aufreinigung von Milligramm-Mengen gefunden werden. Die Firma IftwD entwickelt derzeit ein Miniatur-Nanofiltrationsmodul, in das ein Druckgefäß integriert ist, so daß die HPLC-Pumpe durch eine preisgünstigere Zahnrad- oder Schlauchpumpe ersetzt werden kann (Kudszus, 1998). Die Nanofiltration von Glycopeptiden wird im Abschnitt 8.3.2 diskutiert.

4.3 Zusammenfassung

Chemische Synthese von GDP-Fucose

- Es wurde eine zweistufige Synthese von GDP-Fucose im Labormaßstab entwickelt. Dabei wurde eine leicht hydrolysierbare Schutzgruppe eingesetzt, auf komplexe orthogonale Schutzgruppenstrategien und den damit verbundenen Synthese- und Zeitaufwand konnte somit verzichtet werden. Die Ausbeute für GDP- β -Fucose betrug 14%, was angesichts des hohen Preises des Produkts akzeptabel ist.
- Neben dem Produkt GDP- β -Fucose wird das Anomer GDP- α -Fucose gebildet. Da auf chromatographische Trennungen weitestgehend verzichtet werden sollte, wurde eine Alternative zur Anomerentrennung gesucht. Es konnte gezeigt werden, daß das Nebenprodukt im Alkalischen selektiv hydrolysiert wird. Die Ausbeute der GDP- β -Fucose betrug bei 95%iger Reinheit 90%.
- Im Anschluß folgte die Aufreinigung über eine Anionentauschersäule als einzige chromatographische Trennoperation.

Nanofiltration zur Aufreinigung von Nucleotidzuckern

- Durch ein Membranscreening konnten geeignete Nanofiltrationsmembranen zur Entsalzung von Nucleotidzuckern gefunden werden.
- Im Anschluß an die Anionentauschchromatographie wurden CMP-Neuraminsäure und GDP-Fucose durch Diafiltrationsexperimente entsalzt. Die Ausbeuten dieser Trennoperationen lagen bei >90% für CMP-Neuraminsäure und 88% für GDP-Fucose. Dabei wurden Reinheiten von 95% beziehungsweise 90% erzielt.
- Die Eignung des Verfahrens konnte durch die Entsalzung von je 60 mg beider Produkte demonstriert werden. Es wurde inzwischen zur Aufreinigung von GDP-Manose im Gramm-Maßstab eingesetzt (Fey, 1997).
- Es wurde eine Maßstabsverkleinerung zur Aufreinigung von Milligramm-Mengen durchgeführt, um Proben für Strukturaufklärung und biologische Assays effektiv aufreinigen zu können.

„Wenn Zusammenhänge erscheinen,
dann sind es komplizierte“

Die Sterne, Zucker

5 Reaktionstechnische Optimierung von Mehrenzysystemen zur Synthese von O-Glycan-Strukturen

Die enzymatische Synthese O-glycosydischer core1-Strukturen mittels Glycosyltransferasen ist problematisch, da die notwendige β 1,3-Galactosyltransferase bisher nicht cloniert werden konnte. Mit dem Enzym aus natürlichen Quellen¹ wurden zwar eine Reihe kinetischer Studien veröffentlicht (Brockhausen *et al.*, 1990; Granovsky *et al.*, 1994), zum Einsatz in der präparativen Synthese ist die Aufreinigung allerdings zu mühselig.

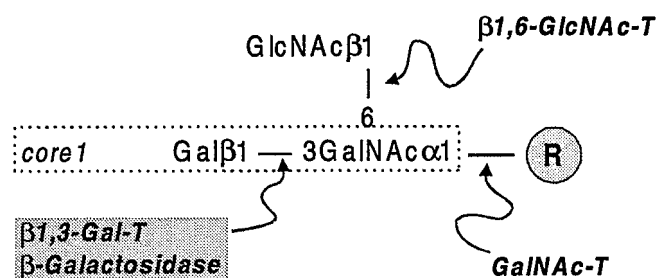


Abb. 5.1: Enzyme zum Aufbau der core2-Struktur

Alternativ kann eine β -Galactosidase² eingesetzt werden. Diese Milchzucker-spaltenden Enzyme sind für die Biotechnologie seit langem von großem Interesse. Die Enzyme aus *Escherichia coli* (Kuby und Lardy, 1953; Wallenfels und Fischer, 1960; Wallenfels *et al.*, 1960; Huber *et al.*, 1976; Deschavanne *et al.*, 1978; Huber *et al.*, 1984) und *Bacillus circulans* (Nakanishi *et al.*, 1983; Herrmann, 1992) wurden kinetisch charakterisiert und sind preisgünstig erhältlich. Diese Galactosidasen katalysieren jedoch bevorzugt die β 1,4-Verknüpfung und sind somit zur Synthese O-glycosidischer core-Strukturen ungeeignet. 1973 wurde die Aufreinigung einer Galactosidase aus Stierhoden publiziert, die bei Transglycosylierungen β 1,3-Verknüpfungen als Hauptprodukt erzeugt (Distler und Jourdian, 1973). Die Kinetik der Transglycosylierungsreaktion ist bislang kaum untersucht worden, bei allen bisherigen Arbeiten standen präparativ synthetische Aspekte im Vordergrund.

¹ Das Enzym wird in der Regel aus Rattenlebern gewonnen.

² E.C.-Nummer der β -Galactosidasen: 3.2.1.23

Die Stierhoden-Galactosidase wurde bereits vor zehn Jahren zur Synthese der core1-Struktur eingesetzt (Hedbys *et al.*, 1989a). Dabei zeigte sich, daß die Regioselektivität der Transglycosylierung oft unbefriedigend ist und zudem vom Aglycon des Akzeptors abhängt (Hedbys *et al.*, 1989b; Murata *et al.*, 1996; Montero *et al.*, 1998). Tabelle 5.1 zeigt einige core1-Syntheseprodukte sowie die erzielten Ausbeuten und Regioselektivitäten.

Produkt	Ausbeute (β 1-3) ^a	Selektivität (β 1-3)	Quelle
Gal(β 1-3)GalNAc	37%	85%	Hedbys <i>et al.</i> , 1989a
Gal(β 1-3)GalNAc(β 1-R) ^b	10-35%	50-80%	Nilsson, 1989
Gal(β 1-3)GalNAc(α 1-R) ^b	13-40 %	100%	Gambert <i>et al.</i> , 1997
Gal(β 1-3)GalNAc(α 1-Ser/Thr)	22-28%	100%	Gambert und Thiem, 1997b
Gal(β 1-3)GalNAc(α 1-[Z]Ser-OAll) ^c	23% ^d	100%	Suzuki <i>et al.</i> , 1997
Gal(β 1-3)GalNAc ^e	3% ^f	100%	Fujimoto <i>et al.</i> , 1998
Gal(β 1-3)GalNAc(α 1-pnp) ^c	22% ^g	100%	Fujimoto <i>et al.</i> , 1998

^a Ausbeuten bezogen auf das Akzeptorsubstrat

^b R: verschiedene aliphatische hydrophobe Reste

^c Galactosidase aus *E.coli*; ^d bezogen auf den Donor beträgt die Ausbeute 68%

^e Galactosidase aus *X. manihotis*; ^f 10% bezogen auf Donor; ^g 46% bezogen auf Donor

Tab. 5.1: Core1-Synthesen mit β -Galactosidasen

Auch gelang die Synthese der kompletten core2-Struktur ausschließlich mit Glycosidasen; das Produkt mußte allerdings bei nur 5% Ausbeute aus einer wahren Oligosaccharid-Bibliothek aufgereinigt werden (Murata *et al.*, 1998).

Insgesamt scheinen die oben beschriebenen Ansätze zur Synthese der core1-Struktur nicht zur Transformation hochpreisiger Akzeptoren geeignet zu sein, wie Peptide sie darstellen. Quantitative Umsätze der Donorsubstanzen können theoretisch durch Kopplung einer Transgalactosylierung mit einer Glycosyltransferase-katalysierten Reaktion erzielt werden. Das Galactosidase-Produkt wird dabei dem Gleichgewicht entzogen, und die Triebkraft der Gesamtreaktion resultiert somit aus der Spaltung der Nucleotidzucker (vgl. Kapitel 1.3.2, Abb. 2.1). Zur Optimierung der Ausbeute müssen diese komplexen Reaktionssysteme allerdings einer kinetischen Analyse unterzogen werden. Formalkinetische Ansätze zur Beschreibung Enzym-katalysierter Reaktionen werden in Kapitel 5.1 diskutiert.

In dieser Arbeit werden zwei Systeme vorgestellt, mit denen Ausbeuten bis zu 90% erzielt werden können. Sie sind schematisch in Abbildung 5.2 dargestellt. Da der Einsatz von Glycopeptiden für die Untersuchung der Reaktionssysteme zu kostspielig gewesen wäre,

mußte eine Modellkomponente verwendet werden. Es wurde GalNAc(α 1-Bn) benutzt, das zudem für sich ein attraktives Substrat darstellt. Da dieser Akzeptor in einigen Punkten, wie zum Beispiel dem sterischen Anspruch an die aktiven Zentren der Enzyme, nicht das Ähnlichkeitskriterium erfüllt, müssen im Anschluß jedoch weitere Untersuchungen mit Peptiden durchgeführt werden.

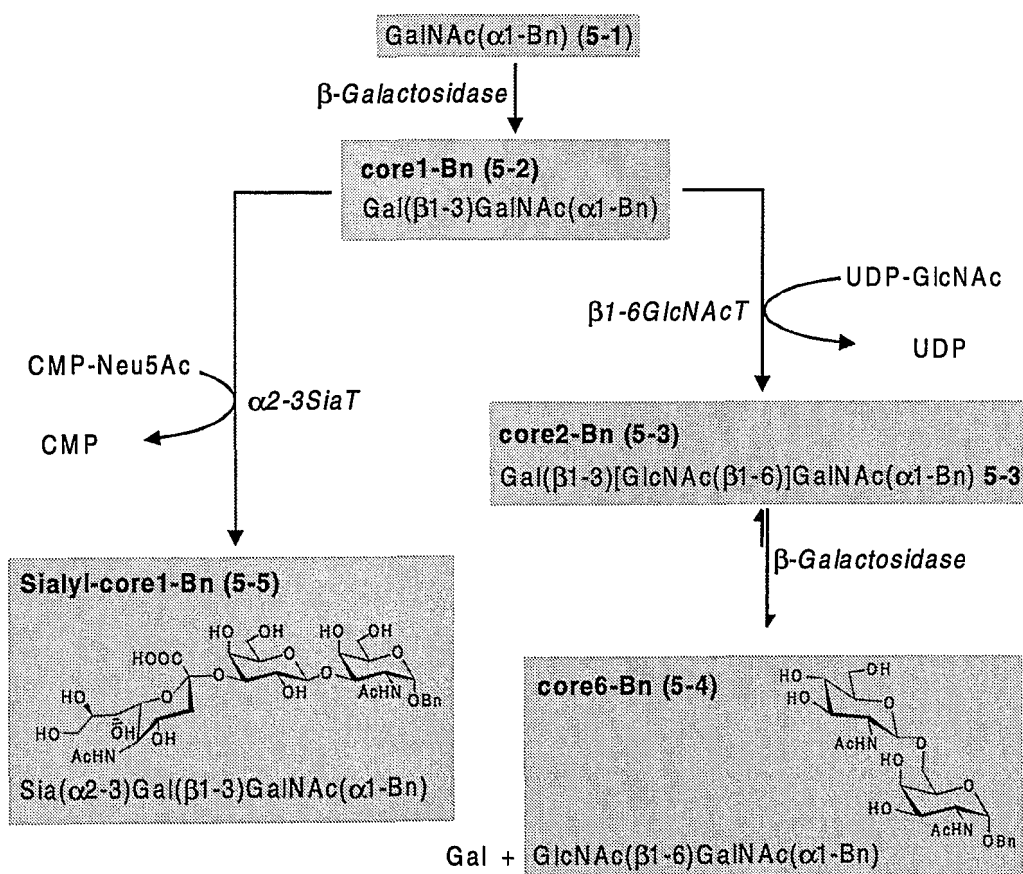


Abb. 5.2: Mehrenzzymsysteme zur Synthese von core-Strukturen

5.1 Modelle zur Beschreibung enzymatischer Reaktionen

Ziel der Reaktionstechnik ist die gerichtete Optimierung von Reaktionssystemen, im vorliegenden Fall im Hinblick auf Ausbeute, Selektivität und Enzymverbrauch. Neben der Untersuchung der Reaktionssysteme sollen dabei auch die kinetischen Zusammenhänge erfaßt werden (Biselli *et al.*, 1995; Kragl, 1997; Levenspiel, 1998).

Enzyme wirken als Katalysatoren, somit müssen ihre Reaktionen durch eine Sättigungskinetik beschrieben werden. Menten und Michaelis postulierten in ihrer grundlegenden Arbeit zur Enzymkatalyse ein der Reaktion vorgelagertes Gleichgewicht, das zur Ausbildung eines Enzym-Substrat-Komplexes führt. Die Dissoziation des Komplexes in Produkt und Enzym

wurde als geschwindigkeitsbestimmender Schritt angenommen (Michaelis und Menten, 1913).



mit:	k_1	mL/(μ mol·min)	Assoziationskonstante
	k_{-1}	min ⁻¹	Dissoziationskonstante
	k_2	min ⁻¹	turnover number (k_{cat})

Unter den oben postulierten Bedingungen kann daraus die Michaelis-Menten-Gleichung abgeleitet werden:

$$v = \frac{v_{max} \cdot c}{K_M + c} \quad (5.2)$$

mit:	v	μ mol/(mL·min)	Reaktionsgeschwindigkeit
	v_{max}	μ mol/(mL·min)	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
	c	μ mol/mL	Substratkonzentration
	K_M	μ mol/mL	Dissoziationskonstante des ES-Komplexes Michaelis-Menten-Konstante

Formel 5.2 beschreibt eine Sättigungskinetik, die bei kleinen Substratkonzentrationen einer Kinetik 1. Ordnung und bei hohen Substratkonzentrationen einer Kinetik 0. Ordnung folgt. Die Michaelis-Menten-Konstante entspricht der Substratkonzentration, bei der die halb-maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird. Eine Reaktion, an der mehrere Substrate beteiligt sind, läßt sich durch Multiplikation getrennt aufgestellter Michaelis-Menten-Terme beschreiben. Formel 5.3 beschreibt eine solche Doppelsubstratkinetik.

$$v = v_{max} \cdot \frac{c_A}{K_M + c_A} \cdot \frac{c_B}{K_M + c_B} \quad (5.3)$$

Mit diesem makrokinetischen Ansatz können enzymatische Reaktionen oft sehr gut beschrieben werden, ohne den Mechanismus der Reaktion berücksichtigen zu müssen (Kruse, 1995; Liese, 1998).¹ Die Kenntnis der Mikrokinetik ist für die hier behandelten Untersuchungen nicht notwendig, so daß allen Modellen der formalkinetische Ansatz von Menten und Michaelis zugrunde liegt.

¹ Für mathematische Modelle zur Beschreibung unterschiedlicher Reaktionsmechanismen sei auf Lehrbücher der Enzymkinetik verwiesen (Segel, 1975; Bisswanger, 1979; Cornish-Bowden, 1995).

5.2 Galactosidase-katalysierte Synthese der core1-Struktur

Für die Untersuchungen wurde partiell aufgereinigtes Enzym der Firmen Oxford Glyco-Sciences und Sigma verwendet. Die Chargen zeigten in Versuchen keine Glycosidase-Nebenaktivitäten. Die Enzyme, die in Citrat- beziehungsweise Ammoniumsulfatlösung mit einem pH-Wert von 5 geliefert werden, wurden zur Lagerung und zwecks Aufkonzentrierung in MES-Puffer, pH 6, umgepuffert.

Da die Galactosidase-Lösungen zum größten Teil Fremdproteine enthielten, wurden keine massenspezifischen Aktivitäten bestimmt. Galactosidase-Assays wurden in der Regel in 100 mM Citratpuffer bei pH 4,3 und 37°C durchgeführt (vgl. Kap. 10.2.1 und 10.2.2), Abweichungen sind in einzelnen vermerkt.

5.2.1 Aktivitäts- und Stabilitätsmessungen

Die maximale Aktivität sowohl für die Hydrolyse als auch für die Transglycosylierung liegt in Citratpuffer bei pH 4,3. Unter diesen Bedingungen hat das Enzym jedoch nur eine sehr begrenzte Stabilität. Zudem komplexiert Citrat mehrwertige Kationen, die einigen Glycosyltransferasen als Cofaktoren dienen, und ist somit für Mehrenzysysteme nicht geeignet. Als günstig erwies sich die Verwendung von MES-Puffer, wobei die höhere Stabilität bei pH 6 im Vergleich zu pH 5 die etwas geringere Aktivität kompensiert. Eine weitere Erhöhung der Stabilität durch Zugabe von Antioxidantien wie Dithiothreitol oder Substraten war nicht möglich. Rinderserumalbumin (BSA) verringert die Adsorption von Enzymen an Oberflächen und wurde deshalb grundsätzlich zugegeben. Auf die Stabilität der Galactosidase hatte es jedoch keinen Einfluß.

Abbildung 5.3 zeigt einige Meßergebnisse. Zur besseren Übersichtlichkeit sind alle Graphen auf relative Aktivitäten normiert. Desaktivierungskonstanten wurden mit der folgenden Gleichung berechnet:

$$A = A_0 \cdot e^{-kt} \quad (5.4)$$

mit:	A	mU/mL	Aktivität
	A_0	mU/mL	Anfangsaktivität
	k	d ⁻¹	Desaktivierungskonstante
	t	d	Zeit

Die gefundenen Desaktivierungskonstanten und Halbwertszeiten sind in Tabelle 5.2 zusammengefaßt.

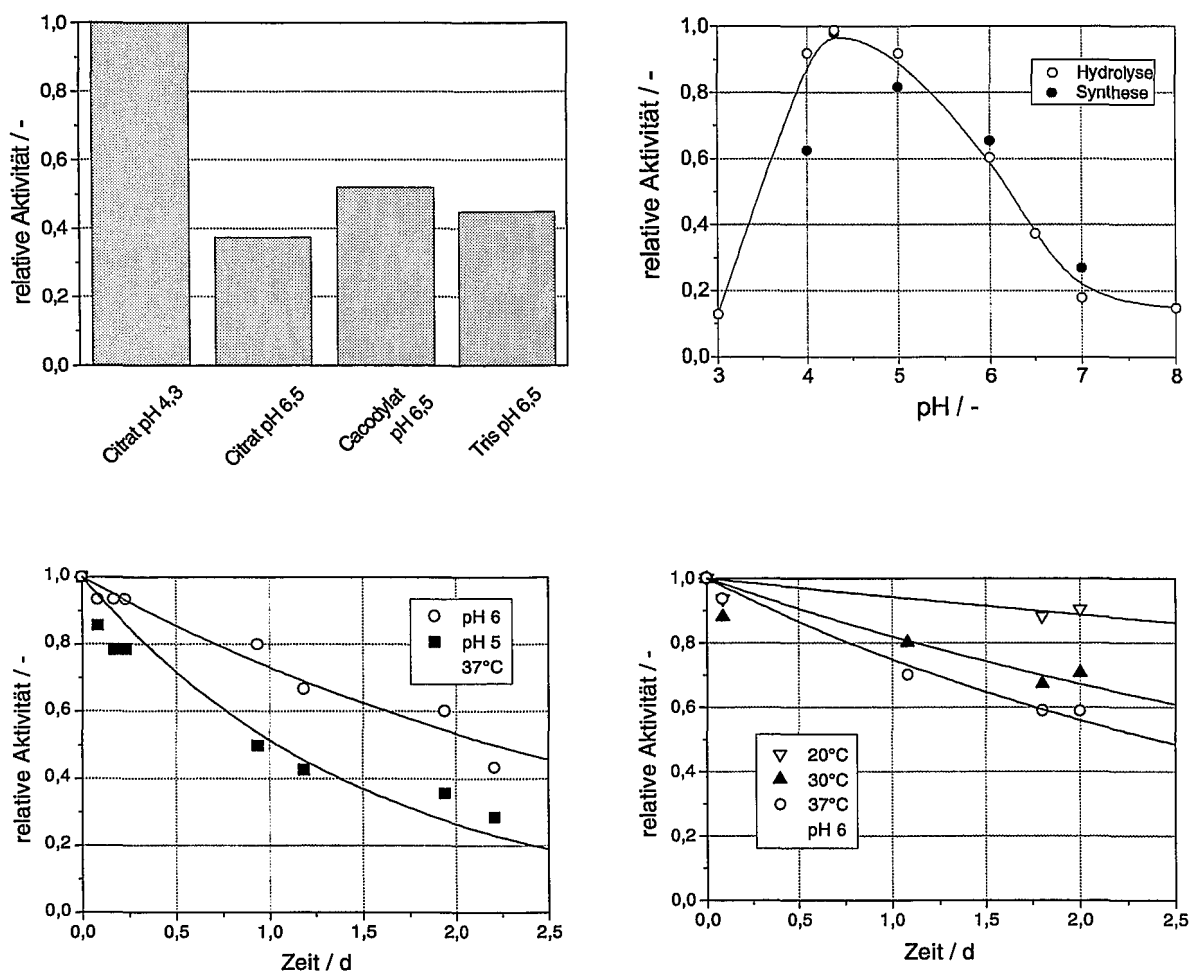


Abb. 5.3: Aktivitäten in Abhängigkeit von Puffersystem und pH (oben); Stabilitäten in Abhängigkeit von pH und Temperatur (unten); (alle Puffer 100 mM; oben rechts und unten: MES)

Parameter	Desaktivierungskonstante k / d^{-1}	Halbwertszeit τ / d^a
100 mM MES, pH 5, 37°C	$0,67 \pm 0,07$	1,0
100 mM MES, pH 6, 37°C	$0,30 \pm 0,02$	2,3
100 mM MES, pH 6, 30°C	$0,20 \pm 0,03$	3,5
100 mM MES, pH 6, 20°C	$0,06 \pm 0,01$	11,6

^a Berechnet nach $\tau = \ln 2 / k$

Tab. 5.2: Desaktivierung der Galactosidase bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen

Aus der Temperaturabhängigkeit der Aktivitäten ergaben sich Aktivierungsenergien von 45 kJ für die Hydrolyse beziehungsweise 47 kJ für die Transglycosylierung – die Differenz liegt

im Rahmen der Meßgenauigkeit. Die Aktivierungsenergie wurde durch eine Parameteranpassung für die Arrhenius-Gleichung bestimmt:

$$A = k \cdot e^{-\frac{E_A}{R \cdot (T + 273 \text{ K})}} \quad (5.5)$$

mit:	A	μmol/min	Aktivität
	k	μmol/min	Frequenzfaktor
	E _A	J/mol	Aktivierungsenergie
	R	8,314 J/(mol · K)	allgemeine Gaskonstante
	T	°C	Temperatur

5.2.2 Kinetik der Transgalactosylierung

Zur Beschreibung der Galactosidase-Kinetik wurden die folgenden Reaktionen mittels Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsmessungen untersucht:

- **Transglycosylierung (I)** zur Synthese von core1-Bn. Als Donoren kommen Lactose und para-Nitrophenyl-Galactose (pnp-Gal) in Frage.
- **Hydrolyse des Transglycosylierungsprodukts core1-Bn (II)**
- **Hydrolyse der Lactose (III) und Inhibierung durch Galactose (IV)**
- **Hydrolyse von core2-Bn (V), des Produkts der GlcNAc-Transferase, zu core6-Bn.** (vgl. Kap. 5.3, Abb. 5.2)
- **Transglycosylierung von core6-Bn (VI)**

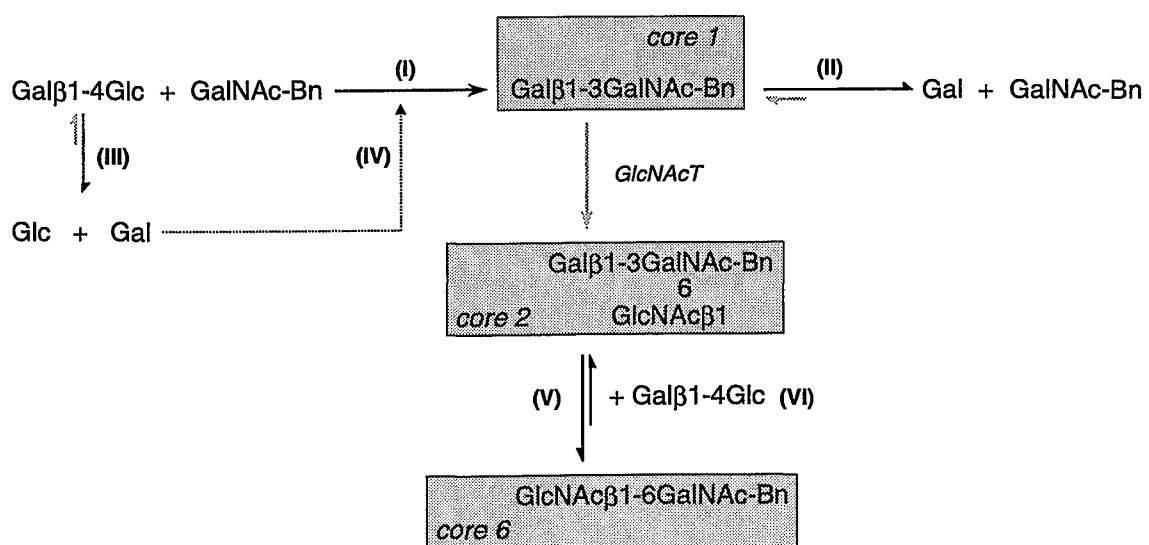


Abb. 5.4: Kinetik der Galactosidase bei der Synthese von core2-Bn

Die obigen Reaktionen sind in Abbildung 5.4 im Zusammenhang dargestellt. Tabelle 5.3 listet die kinetischen Parameter auf: Eigene Werte sind **halbfett**, Literaturdaten *kursiv* gedruckt. Die Ergebnisse sollen im folgenden diskutiert werden.

Donorsubstrate	Hydrolysereaktion ^a	Transglycosylierung ^a
Gal β -pnp	$K_M = 0,05 \text{ mM} \pm 0,01 \text{ mM}$ $v_{\max} = 1$	$K_M = 1,0 \text{ mM} \pm 0,15 \text{ mM}^b$
Lac	<i>$K_M = 1,8 \text{ mM}^e$</i> <i>$v_{\max} = 0,94$</i>	$K_M = 78 \text{ mM} \pm 26 \text{ mM}$ $v_{\max} = 1,1^c$
LacNAc	<i>$K_M = 0,98 \text{ mM}^e$</i> <i>$v_{\max} = 0,98$</i>	
core1-Bn	$K_M = 3,6 \text{ mM} \pm 1,1 \text{ mM}$ $v_{\max} = 0,8$	–
core2-Bn	$K_M = 0,68 \text{ mM} \pm 0,04 \text{ mM}$ $v_{\max} = 0,35$	–
Akzeptorsubstrate	Transglycosylierung	
GalNAc		$K_M = 93 \text{ mM} \pm 23 \text{ mM}$ $v_{\max} = 0,8^d$
GalNAc-Bn		$K_M = 50 \text{ mM} \pm 14 \text{ mM}$ $v_{\max} = 1,1^d$
core6-Bn		$K_M = 29,5 \text{ mM} \pm 4,8 \text{ mM}$ $v_{\max} = 0,28^d$
Inhibitor	Hydrolyse	Transglycosylierung
Gal	$K_I = 0,52 \text{ mM} \pm 0,09 \text{ mM}$ (kompetitiv zu pnp-Gal)	$K_I = 5,4 \text{ mM} \pm 1,8 \text{ mM}$ (kompetitiv zu Lac)

^a Die $v_{\max}$ -Werte sind auf $v_{\max}(\text{pnp-Gal})$ normiert. Da verschiedene Enzymchargen für die kinetischen Messungen benutzt wurden, ist der Fehler des $v_{\max}$ -Wertes im wesentlichen von den Assays zum Vergleich der Enzymaktivitäten abhängig. Auf eine Angabe des Fehlers aus den Kinetikmessungen wurde deshalb verzichtet.

^b mit GalNAc als Cosubstrat; ^c mit GalNAc-Bn als Co-Substrat; ^d mit Lactose als Cosubstrat

^e Distler und Jourdan, 1973

Tab.5.3: Kinetische Daten der β -Galactosidase – eigene Werte und Literaturdaten.

Transglycosylierung (I)

Die β -Galactosidase aus Stierhoden katalysiert die Synthese von core1-Bn (**5-2**) aus GalNAc-Bn (**5-1**) und Lactose regiospezifisch. Ein weiteres Isomer konnte in keinem Fall nachgewiesen werden. Da der K_M -Wert von 50 mM für den Akzeptor die Löslichkeit von 40 mM übersteigt, wäre der Einsatz eines organischen Lösungsmittels als Cosolvens wünschenswert. Auf diese Weise könnte die Löslichkeit des hydrophoben Substrats beträchtlich gesteigert werden. Leider konnte kein Lösungsmittel gefunden werden, daß von dieser Galactosidase toleriert wird. Bei späteren Arbeiten konnte die Substratlöslichkeit jedoch durch den Einsatz von Cyclodextrinen gesteigert werden (vgl. Kap. 7.2).

Der K_M -Wert von 78 mM für Lactose als Donor ist etwa fünfzig mal so hoch wie der für para-Nitrophenyl-Galactose (pnp-Gal), allerdings können ohne weiteres 0,5 M Lösungen hergestellt werden, so daß die Sättigungskonzentration erreicht wird. Der Einsatz von Lactose bietet zwei Vorteile: Sie ist preiswerter als pnp-Gal und kann leicht von Benzyl-Glycosiden und Peptiden abgetrennt werden, die an hydrophober Phase zurückgehalten werden.

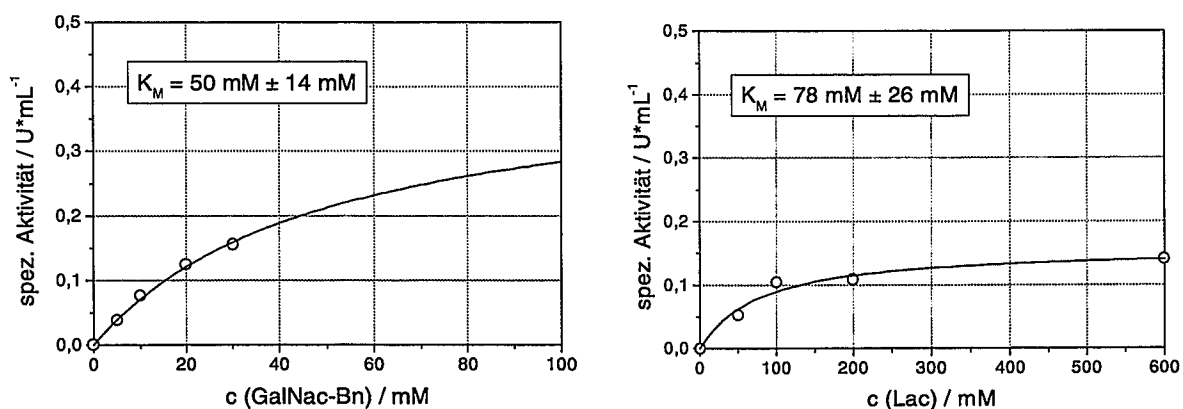


Abb. 5.5: Transgalactosylierungs-Aktivität als Funktion der Substratkonzentrationen (100 mM Citrat; pH 4,3; 37°C; links: 0,5 M Lac; rechts: 30 mM GalNAc-Bn)

Hydrolyse von core1-Bn (II)

Die Hydrolyse des Produkts core1-Bn wird mit ähnlicher maximaler Geschwindigkeit wie dessen Synthese katalysiert, der K_M -Wert von 3,6 mM für diese Folgereaktion ist allerdings viel kleiner. Während die Hydrolysereaktion also vergleichsweise schnell nahe der Sättigungskonzentration abläuft, wird die maximale Transglycosylierungsgeschwindigkeit aufgrund der geringen Löslichkeit des Akzeptorsubstrats nicht erreicht. Somit wird die maximale Ausbeute bei einer Transgalactosylierung stark eingeschränkt. Die Gültigkeit dieser Voraussage konnte in einem Experiment zur core1-Bn-Synthese untermauert werden, in dem lediglich eine Ausbeute von 15% erzielt werden konnte (Abb. 5.6). Zum Erreichen hoher

Ausbeuten ist es also notwendig, das core1-Reaktionsprodukt durch eine Glycosyltransferase abzufangen.

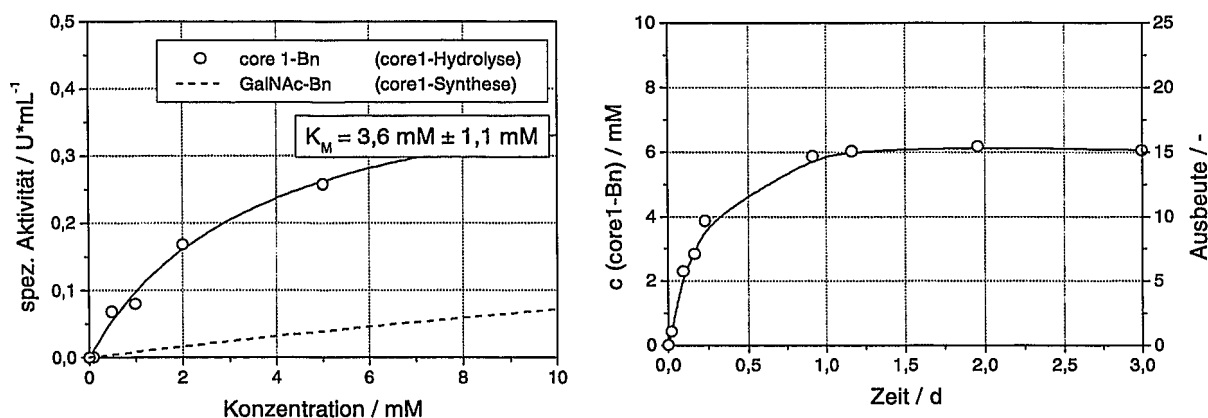


Abb. 5.6: Eingeschränkte Ausbeuten bei der Transgalactosylierung von GalNAc-Bn;
 links: Kinetik der core1-Hydrolyse; rechts: *batch*-Experiment zur core1-Bn-Synthese;
 (40 mM GalNAc-Bn; 500 mM Lac; 100 mU/mL Galactosidase; 100 mM Citrat; pH 4,3)

Hydrolyse der Lactose sowie Inhibierung durch Galactose (III+IV)

Die Hydrolyse der Lactose wurde bereits untersucht, Literaturdaten finden sich in Tabelle 5.3. Da Galactose ein Substrat für die reverse Hydrolyse ist, kann sie an das aktive Zentrum des Enzyms binden und inhibiert somit die Transgalactosylierung. Im folgenden kann die Galactosylierung mittels reverser Hydrolyse vernachlässigt werden, da diese Reaktion verhältnismäßig langsam verläuft und das Gleichgewicht stark zur Hydrolyse verschoben ist. Der oben beschriebene Effekt kann somit vereinfachend als kompetitive Inhibierung dargestellt werden. Durch die Hydrolyse von Lactose zu Galactose und Glucose als Nebenreaktion wird die Galactosidaseaktivität während einer Synthese also in zunehmendem Maße herabgesetzt (Abb. 5.7).

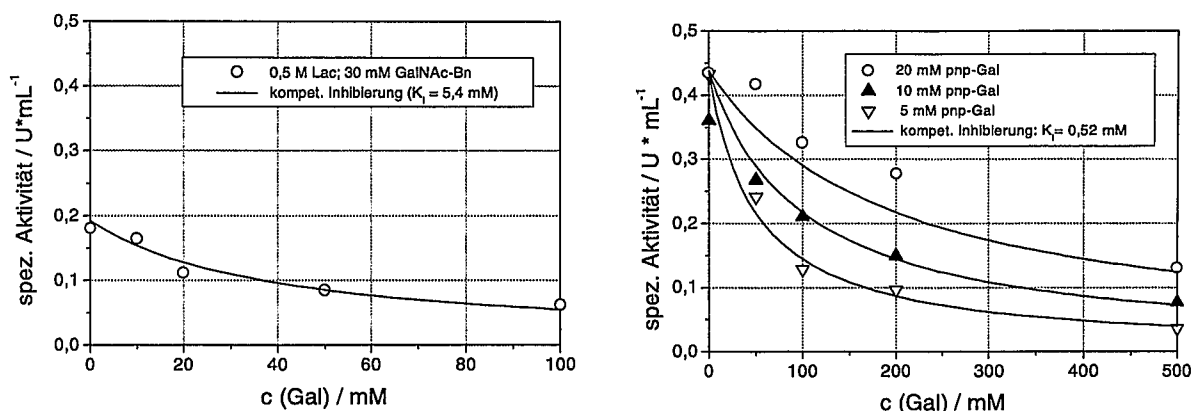


Abb. 5.7: Inhibition der Galactosidase-Aktivitäten durch freie Galactose;
links: Inhibition der core1-Bn-Synthese; rechts: Inhibition der pnp-Gal-Hydrolyse
(100 mM Citrat; pH 4,3; 37°C)

Hydrolyse von core2-Bn und Transglycosylierung von core6-Bn (V+VI)

Wird die GlcNAc-Transferase als Enzym für die Folgereaktion verwendet, so entsteht core2-Bn (5-3). Das Trisaccharid ist jedoch selbst ein Substrat für die Galactosidase und wird hydrolysiert: Durch Abspaltung von Galactose wird core6-Bn (5-4) gebildet. Dieses kann zwar durch Transgalactosylierung wiederum zu core2-Bn galactosyliert werden, der K_M -Wert hierfür ist allerdings um zwei Größenordnungen höher. Als Hauptprodukt sollte somit core6-Bn entstehen.

Auffällig ist, daß die maximalen Aktivitäten für diese beiden Reaktionen verhältnismäßig niedrig sind (vgl. Tabelle 5.3). Möglicherweise wirkt sich der zusätzliche GlcNAc-Rest, der ja eine Verzweigung der core1-Struktur darstellt, ungünstig aus.

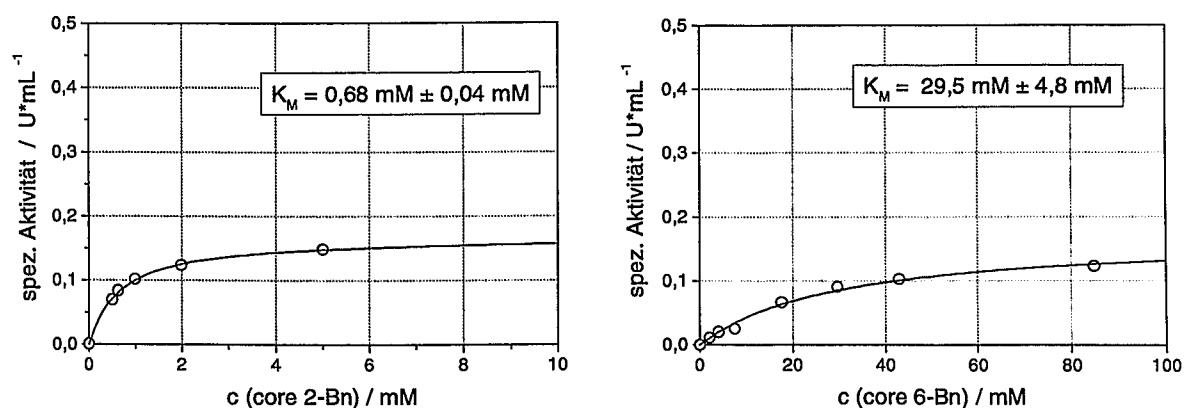


Abb. 5.8: Transformation der Folgeprodukte im Galactosidase/GlcNAc-Transferase-System:
links: Kinetik der core2-Bn-Hydrolyse; rechts: Kinetik der Transglycosylierung zu
core2-Bn (100 mM Citrat; pH 4,3; 37°C; rechts: 0,5 M Lac)

5.3 Kombiniertes Einsatz von Galactosidase und GlcNAc-Transferase¹

Zunächst wurde der kombinierte Einsatz der Galactosidase mit der core2-GlcNAc-Transferase untersucht.² Die Transferase glycosyliert das Galactosidase-Produkt core1 zu core2. Dieses ist jedoch ebenfalls ein Substrat für die Galactosidase – als Hydrolyseprodukt resultiert core6.

Die Galactosidase dient also dem Zweck, die core1-Struktur *in situ* bereitzustellen, da die GlcNAc-Transferase ausschließlich diese als Substrat akzeptiert. Weil auf der core6-Struktur ebenfalls der enzymatische Aufbau des Sialyl-Lewis^x-Saccharids möglich ist, stellt deren Aufbau eine interessante Alternative zur Synthese der core2-Struktur dar. Abbildung 5.9 zeigt das Reaktionssystem in einer vereinfachten Form.

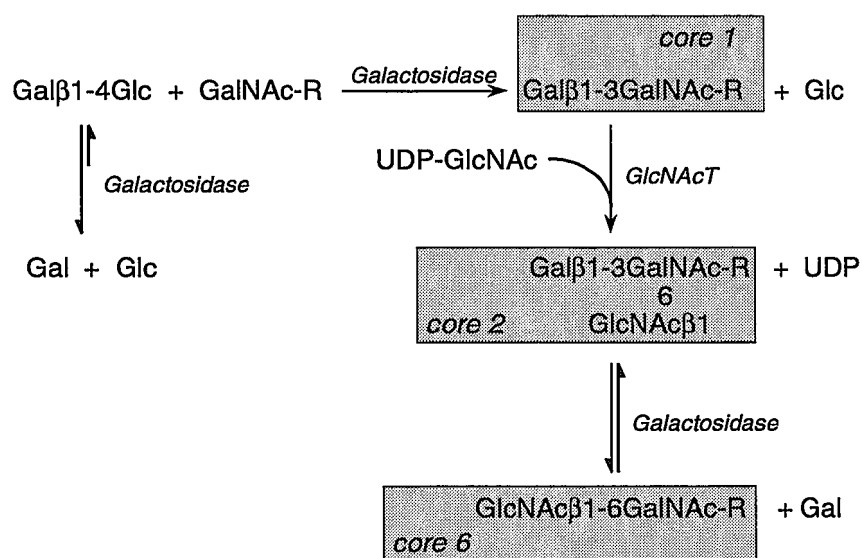


Abb. 5.9: Vereinfachte Darstellung des Galactosidase/GlcNAcT-Reaktionssystems

Zunächst wurde ein Syntheserversuch unternommen, um die Durchführbarkeit dieses Ansatzes zu zeigen. Da Nucleotide in der Regel inhibierend auf Glycosyltransferasen wirken (Kleineidam *et al.*, 1997), wurde eine Phosphatase³ zugesetzt, um das freigesetzte Uridin-Diphosphat zu hydrolysieren.

Die Ausbeuten nach drei Tagen betrugen 20% für core6-Bn und 14% für core2-Bn. Durch zehnfache Verdünnung der Reaktionslösung und erneuter Zugabe von Galactosidase kann eine vollständige Hydrolyse des core2-Produkts erzielt werden, so daß eine Gesamtausbeute von 34% resultiert. Der Verlauf der Synthese ist in Abbildung 5.10 dargestellt.

¹ Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden teilweise publiziert: G. Dudziak, S. Zeng, E.G. Berger, R. Gutiérrez Gallego, J.P. Kamerling, U. Kragl, C. Wandrey: "In situ generated O-glycan core1 structure as substrate for Gal(β1-3)GalNAc β-1,6-GlcNAc transferase" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8 (1998) 2595-2598.

² E.C. 2.4.1.102

³ CIAP: *calf intestine alkaline phosphatase*

Diese mäßige Ausbeute liegt in der Größenordnung anderer Mehrenzysysteme (Herrmann *et al.*, 1993a; Kren und Thiem, 1995). Der nächste Schritt mußte deshalb eine eingehende Untersuchung der Kinetik der GlcNAc-Transferase sowie die Optimierung des Gesamtsystems sein.

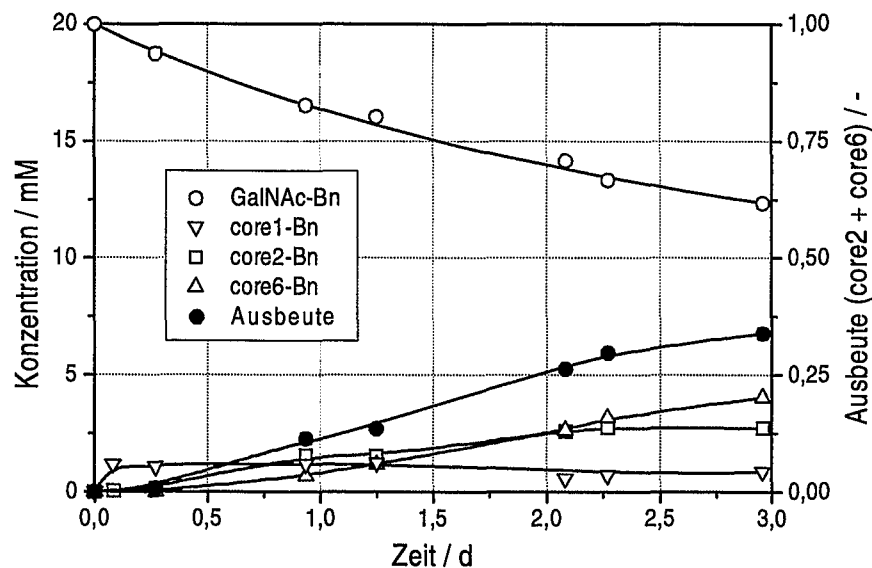


Abb. 5.10: Erster Syntheseversuch (0,5 M Lac; 20 mM GalNAc-Bn; 25 mM UDP-GlcNAc; 350 mU/mL Galactosidase; 33 mU/mL GlcNAcT; 10 U/mL CIAP; 100 mM MES; pH 5)

5.3.1 Aktivitäts- und Stabilitätsmessungen

Frühere Untersuchungen zeigten für die GlcNAc-Transferase ein breites Aktivitätsmaximum zwischen pH 6 und pH 7, in MES-Puffer wurden die höchsten Aktivitäten gefunden. Als Cofaktor dient Magnesium, das Enzym toleriert aber auch andere zweiwertige Kationen wie Kupfer, Cobalt oder Calcium unter Aktivitätseinbußen (Zeng *et al.*, 1997).

Eingehende quantitative Untersuchungen¹ zeigten eine starke Abhängigkeit der Aktivität von BSA-, Magnesium- und Pufferkonzentrationen:

- BSA wirkt aktivierend. Bei einer Konzentration von 0,5 mg/mL wird die maximale Enzymaktivität erreicht.
- Hohe Pufferkonzentrationen deaktivieren die Transferase. Für die weiteren Versuche wurde statt des 100 millimolaren MES-Puffers ein 50 millimolarer Puffer eingesetzt, wodurch eine Aktivitätssteigerung von etwa 15% erzielt werden konnte. Für Synthesen in

¹ Die GlcNAc-Transferase-Assays wurden in der Regel unter den folgenden Standardbedingungen durchgeführt: 1 mM core1-Bn, 5 mM UDP-GlcNAc, 10 mM MgCl₂, 1 mg/mL BSA, 50 mM MES-Puffer, pH 6,5; 37°C (vgl. Kap. 10.2.3). Abweichungen sind im einzelnen vermerkt.

größerem Maßstab wäre es denkbar, den pH durch Titration konstant zu halten, um ganz auf den Puffer verzichten zu können.

- Die maximale Enzymaktivität wird bei Zugabe von 4 mM MgCl_2 erreicht, eine weitere Konzentrationserhöhung zeigt keinen Einfluß.

Abbildung 5.11 zeigt einige Meßergebnisse. Eine Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Aktivität ergab eine Aktivierungsenergie von $51 \text{ kJ/mol} \pm 2 \text{ kJ/mol}$ (vgl. Formel 5.5).

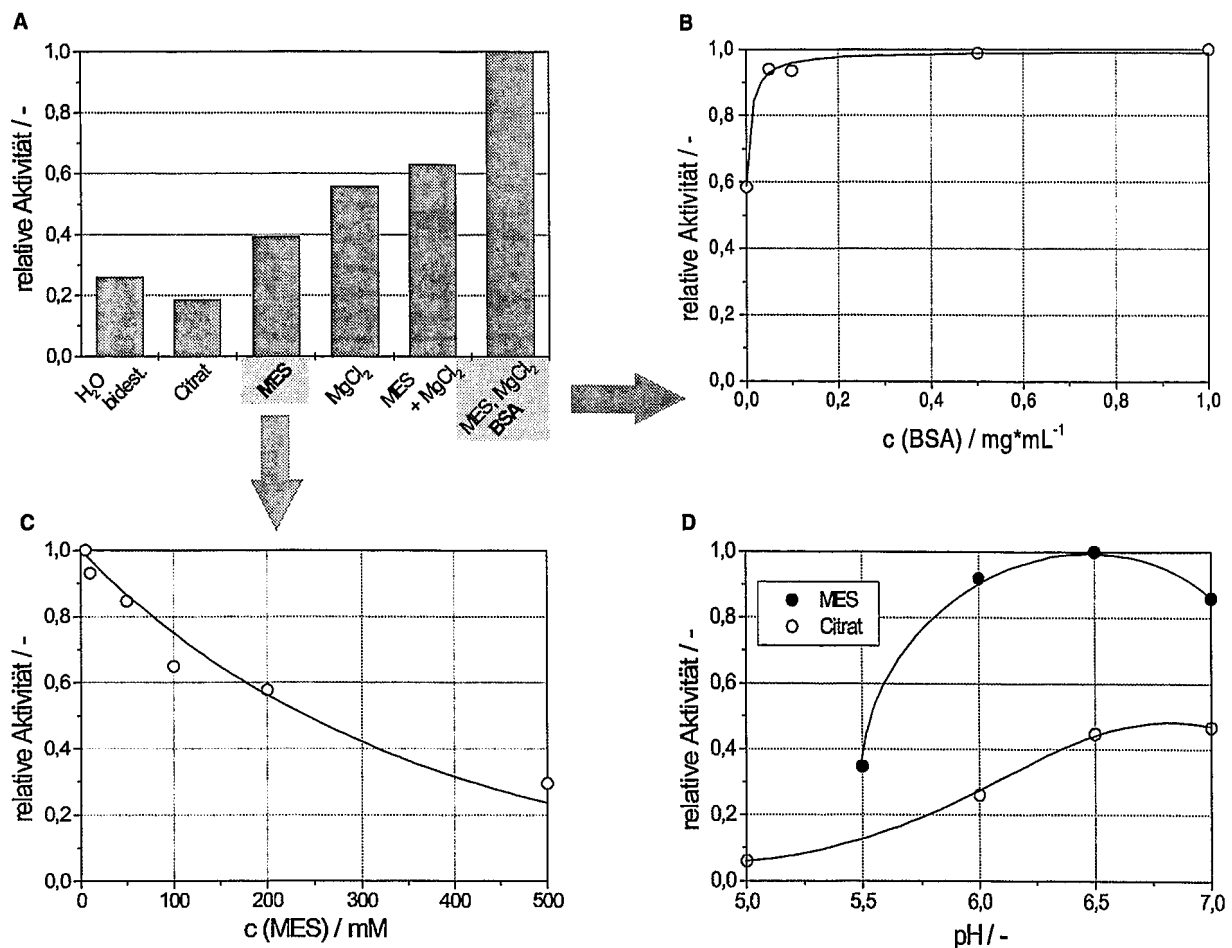


Abb. 5.11: GlcNAc-Transferase-Aktivität in Abhängigkeit vom Puffersystem;
 (A: 100 mM Puffer; 10 mM MgCl_2 ; 0,1 mg/mL BSA; B: 100 mM MES, 10 mM MgCl_2 ;
 D: 50 mM MES- und Citratpuffer)

Bei Stabilitätsmessungen zeigte sich nach der Verdünnung der konzentrierten Enzymlösung zunächst ein Anstieg der Aktivität. Bei Temperaturen von $30\text{--}37^\circ\text{C}$ erfolgte diese Aktivierung über einen Zeitraum von etwa einem Tag. Anschließend setzte eine starke Desaktivierung ein, die in der gleichen Größenordnung liegt wie die der Galactosidase. Auch durch Zusatz von BSA, Substraten oder Antioxidantien kann sie nicht abgeschwächt werden. Abbildung 5.12

zeigt die Desaktivierung in Abhängigkeit des pH-Werts und der Temperatur. Diese ungewöhnlichen Aktivitätsverläufe konnten bei einer Wiederholung der Messungen reproduziert werden. Die gefundenen Konstanten sind in Tabelle 5.4 zusammengefaßt.

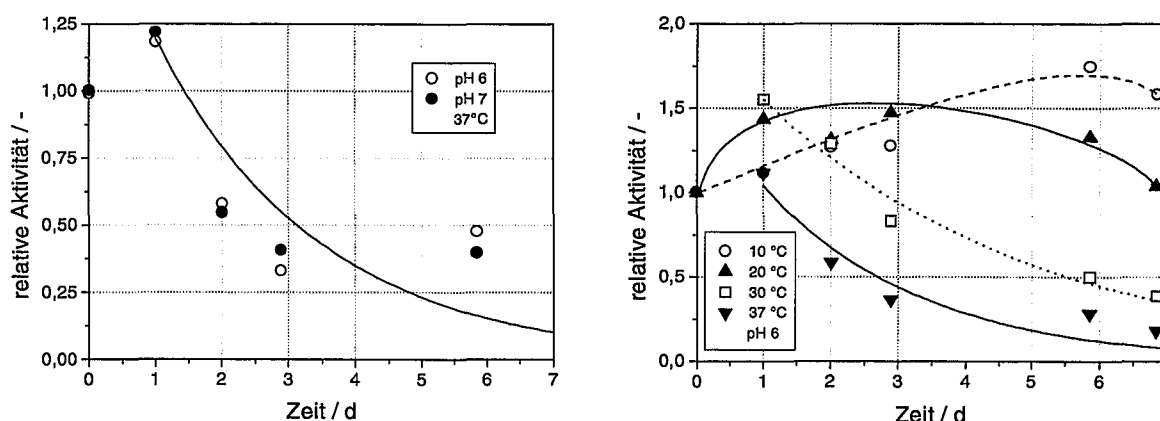


Abb. 5.12: Stabilität der GlcNAc-Transferase als Funktion der Temperatur und des pH;
(GalNAcT in 50 mM MES, 10 mM MgCl₂, 0,5 mg/mL BSA)

Parameter	Desaktivierungskonstante k / d^{-1}	Halbwertszeit τ / d^a
50 mM MES, pH 6, 37°C	$0,67 \pm 0,12$	1,0
50 mM MES, pH 7, 37°C	$0,67 \pm 0,12$	1,0
50 mM MES, pH 6, 30°C	$0,25 \pm 0,12$	2,8
50 mM MES, pH 6, 20°C	Aktivierung über einen Zeitraum von 3 Tagen	
50 mM MES, pH 6, 10°C	Aktivierung über einen Zeitraum von 6 Tagen	

^a Berechnet nach $\tau = \ln 2 / k$

Tab. 5.4: Desaktivierung der GlcNAc-Transferase

5.3.2 Kinetik der core2-Synthese

Für core2-GlcNAc-Transferasen aus anderen Quellen wurden bereits früher vereinzelte kinetische Untersuchungen angestellt (vgl. Tab. 5.5). Eine vollständige Untersuchung der Substratkinetiken und Inhibierungen konnte allerdings nicht gefunden werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die komplette Kinetik der core2-Bn-Synthese untersucht. Die kinetischen Parameter wurden mit dem Computerprogramm Scientist (Micromath, Salt Lake City, USA) für den gesamten Datensatz angepaßt. Als Modell diente eine Doppelsubstratkinetik mit kompetitiver Inhibierung des Nucleotidzuckers UDP-GlcNAc durch UDP.

$$v = v_{\max} \cdot \frac{c(\text{core1})}{K_M^{\text{core1}} + c(\text{core1})} \cdot \frac{c(\text{UDP-GlcNAc})}{K_M^{\text{UDP-GlcNAc}} + c(\text{UDP-GlcNAc}) + K_I^{\text{UDP-GlcNAc}} \cdot \frac{c(\text{UDP})}{K_I^{\text{UDP}}}} \quad (5.6)$$

mit:	v	$\mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$	Reaktionsgeschwindigkeit
	$v_{\max}$	$\mu\text{mol}/(\text{mL} \cdot \text{min})$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
	c	$\mu\text{mol}/\text{mL}$	Substratkonzentrationen
	K_M	$\mu\text{mol}/\text{mL}$	Michaelis-Menten-Konstanten
	K_I	$\mu\text{mol}/\text{mL}$	Inhibitorkonstante

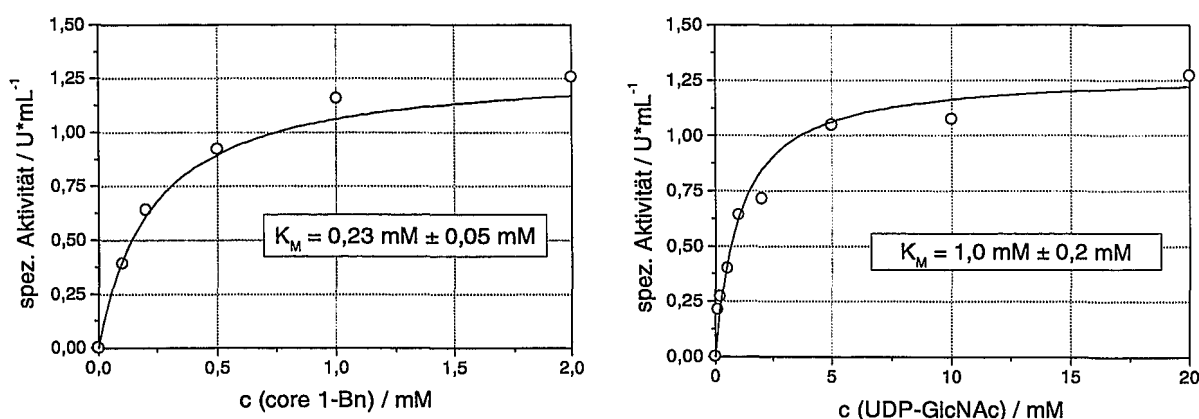


Abb. 5.13: Aktivität der GlcNAcT als Funktion der Substratkonzentrationen

Der K_M -Wert für UDP-GlcNAc ist mit 1 mM erstaunlich hoch, es wurden allerdings schon vergleichbare Werte für GlcNAc-Transferasen gefunden (Wingert und Cheng, 1984; Cheng *et al.*, 1985). Die K_M -Werte für Nucleotidzucker anderer Glycosyltransferasen bewegen sich in der Regel im mikromolaren Bereich. Der Wert für den Akzeptor core1-Bn beträgt nur 0,26 mM und damit etwa 1/10 des K_M -Werts für die Galactosidase-katalysierte core1-Bn-Hydrolyse (vgl. Abb. 5.6). Das System ist also gut geeignet, das Produkt der Transgalactosylierung abzufangen. In einem Galactosidase/GlcNAcT-System sollte das Zwischenprodukt core1-Bn also nur in einer minimalen Konzentration vorliegen, um so die Hydrolysereaktion im Vergleich zum GlcNAc-Transfer zu diskriminieren. Die GlcNAc-Transferase-Aktivität war also im ersten Syntheserversuch (Abb. 5.10) zu niedrig gewählt. Die Zusammenhänge sind in Abbildung 5.14 graphisch dargestellt.

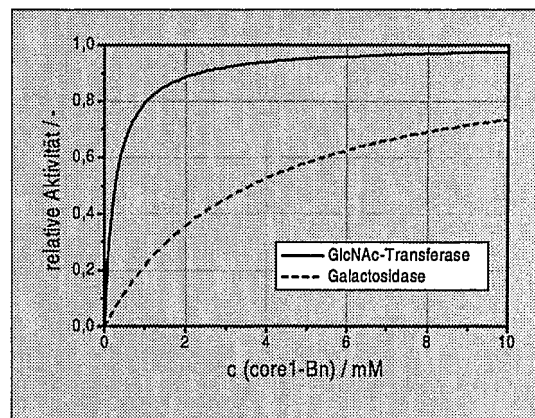
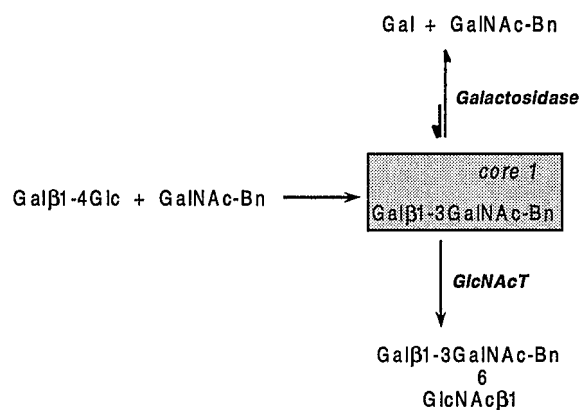


Abb. 5.14: Diskriminierung der Hydrolyse bei niedrigen core1-Bn-Konzentrationen

UDP, das Nebenprodukt der core2-Synthese, ist ein starker Inhibitor. Das Nucleotid kann jedoch mittels einer Phosphatase zu den Folgeprodukten Uridin und Phosphat hydrolysiert werden (Unverzagt *et al.*, 1990), die beide keine inhibierende Wirkung zeigen. Das Produkt core2-Bn zeigt ebenfalls keinen Einfluß auf die Enzymaktivität.

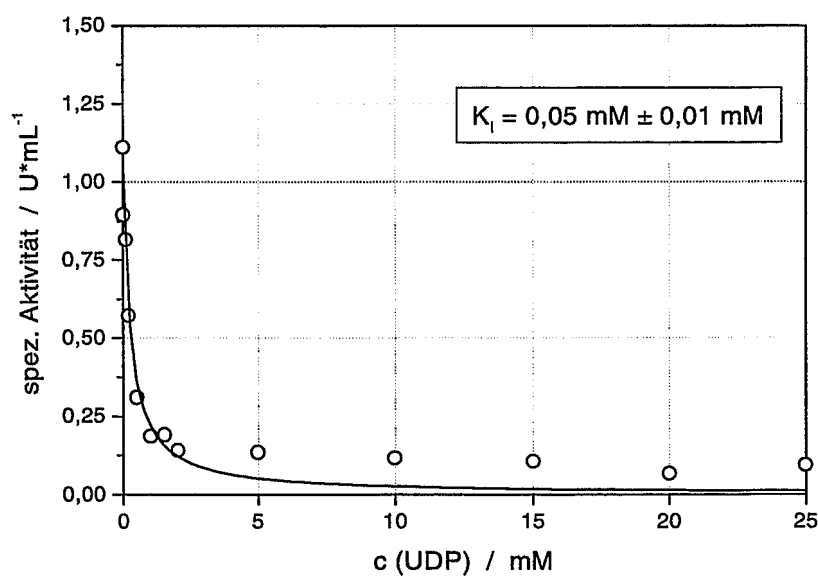


Abb. 5.15: Inhibition der GlcNAc-Transferase durch UDP

Die gefundenen kinetischen Daten sind zusammen mit Literaturwerten für GlcNAc-Transferasen aus anderen Quellen in Tabelle 5.5 zusammengefaßt (eigene Werte **halbfett**,

Literaturdaten *kursiv*). Der $v_{\max}$ -Wert wurde nicht berücksichtigt, da er von der Aktivität der Enzymlösung abhängt.

	K_M - bzw. K_I -Wert / mM	Enzymquelle
UDP-GlcNAc	$1,0 \pm 0,2$ <i>1,25</i> <i>1,03</i>	CHO <i>Schweinettracheen^a</i> <i>Kaninchenmagen^b</i>
core1-Bn	$0,23 \pm 0,05$	CHO
core1(α 1-Ph)	<i>0,49</i>	<i>Kaninchenmagen^b</i>
UDP	$0,05 \pm 0,01$ (K_i)	CHO

^a Cheng *et al.*, 1985; ^b Wingert und Cheng, 1984

Tab. 5.5: Kinetische Parameter für die core2-GlcNAc-Transferase – eigene Ergebnisse und *Literaturdaten*

5.3.3 Untersuchungen zum Einsatz einer Phosphatase

Zur Hydrolyse von Nucleotidzuckern stehen eine alkalische (CIAP) sowie eine saure Phosphatase zur Verfügung.¹ Beide wurden auf ihre Eignung zum Einsatz in Mehrenzysystemen untersucht.

Wie Abbildung 5.16 zeigt, ergänzen sich beide Enzyme sehr gut bezüglich ihrer pH-abhängigen Aktivitäten. Dabei wird deutlich, daß im ersten Satzreaktor-Versuch saure Phosphatase hätte eingesetzt werden müssen, da die alkalische Phosphatase bei pH 5 faktisch keine Aktivität mehr zeigt.

Auch bei pH 6 ist die relative Aktivität der sauren Phosphatase deutlich höher. Sie beträgt 30%, während für die alkalische Phosphatase nur noch eine Restaktivität von etwa 5% beobachtet wird. Da letztere jedoch um den Faktor 10 preiswerter ist² und zudem in Lösung mit 500facher spezifischer Aktivität geliefert wird, wurde der alkalischen Phosphatase bei einem pH-Wert von 6 der Vorzug gegeben. Das Enzym weist außerdem eine hervorragende Stabilität auf: Im Zeitraum von einer Woche konnten selbst bei 37°C keine Aktivitätseinbußen festgestellt werden. Die K_M -Werte für die Hydrolyse von Nucleotiden mit der alkalischen Phosphatase liegen im mikromolaren Bereich (Boehringer Mannheim, 1987).

¹ E.C. 3.1.3.1

² 1000 U der alkalischen Phosphatase kosten etwa ca. 100,- DM (Sigma).

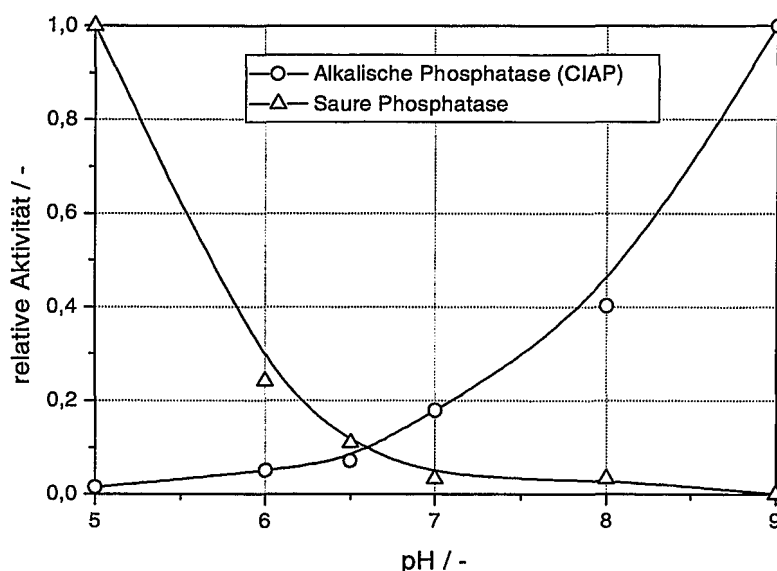


Abb. 5.16: Aktivitäten der alkalischen und sauren Phosphatase in Abhängigkeit vom pH-Wert (1 mM pnp-Phosphat; 10 mM MgCl_2 ; 50 mM MES; 37°C)

5.3.4 Synthese von core6-Bn

Basierend auf den Untersuchungen zu der Galactosidase und der GlcNAc-Transferase wurde eine halbempirische Optimierung des Mehrenzysystems durchgeführt. Eine rechnergestützte Modellierung kam aufgrund der Vielzahl der Galactosidase-katalysierten Parallel- und Folgereaktionen nicht in Frage. Abbildung 5.17 zeigt das Reaktionssystem, wie es bisher verstanden wurde. Die GlcNAc-Transferase-Reaktion ist durch „*GlcNAcT*“ gekennzeichnet, alle anderen Reaktionen werden durch die Galactosidase katalysiert. Hinzu kommt die Hydrolyse von UDP durch die Phosphatase. Insgesamt ergeben sich zahlreiche Quereinhibierungen, deren vollständige Analyse im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war.

Im Vergleich zum ersten Syntheseversuch wurden die folgenden Änderungen vorgenommen:

- **Einstellen des pH-Werts auf 6** statt 5. Dieser Wert ist nicht nur für Galactosidase und die GlcNAc-Transferase günstiger, hier kann auch die alkalische Phosphatase effektiv eingesetzt werden. (vgl. Kap. 5.2.1; 5.3.1; 5.3.3)
- **Erniedrigung der Pufferkonzentration** von 100 mM auf 50 mM. (vgl. Kap. 5.3.1)
- **Erhöhung der GlcNAcT-Aktivität** und Verringerung der Galactosidase-Aktivität. Hierzu wurde eine Reihe von fünf Versuchen mit unterschiedlichen Aktivitätsverhältnissen durchgeführt. (vgl. Kap. 5.3.2)

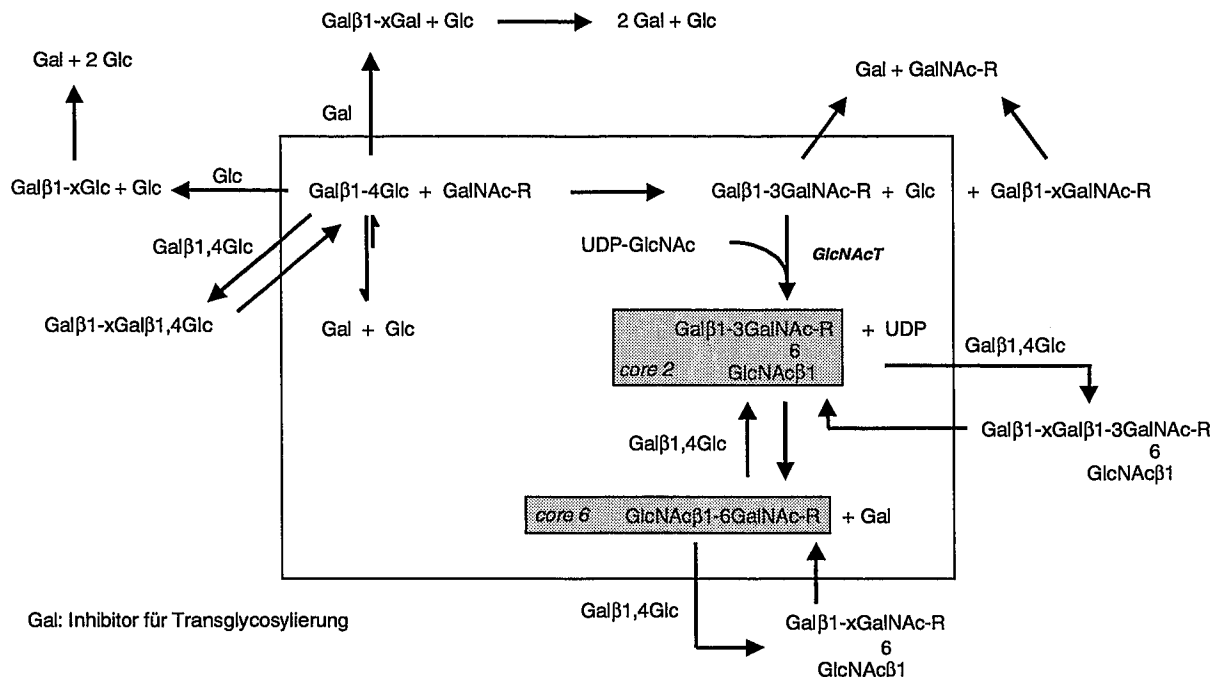


Abb. 5.17: Vollständiges (?) Reaktionssystem

Die Ausbeute konnte unter den neuen Bedingungen drastisch verbessert werden. Die Reaktion mit den günstigsten Parametern ist in Abbildung 5.18 dargestellt, hier konnte eine Gesamtausbeute von 90% für core6-Bn und core2-Bn erzielt werden.

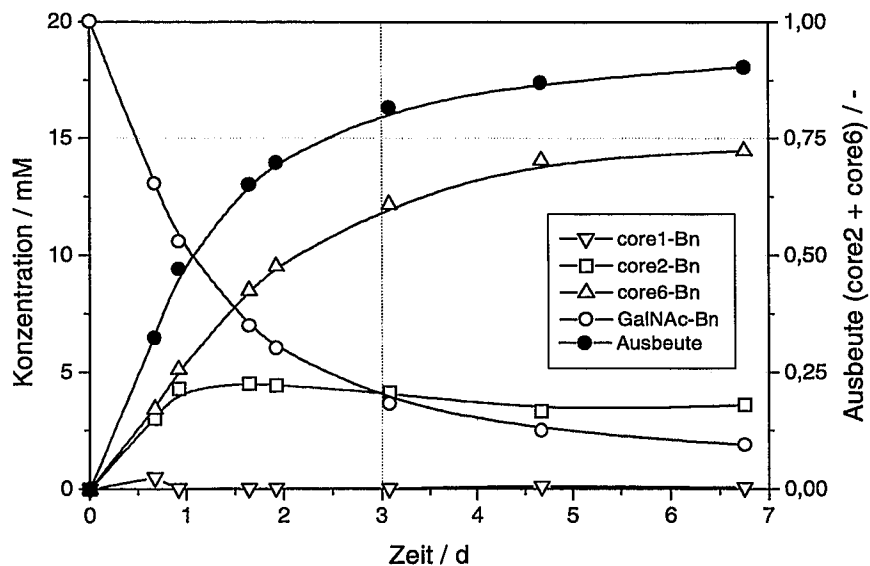


Abb. 5.18: Verbesserte Synthese (0,5 M Lac; 20 mM GalNAc-Bn; 25 mM UDP-GlcNAc; 250 mU/mL Galactosidase; 50 mU/mL GlcNAcT; 10 U/mL CIAP; 50 mM MES; pH6)

5.4 Optimierung der core2-Ausbeute mit einem genetischen Algorithmus¹

Im Rahmen der Optimierung der core6-Synthese wurden *batch*-Versuche bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. Eine Temperaturerniedrigung führte dabei nicht nur zur Erniedrigung der Reaktionsgeschwindigkeit, sondern außerdem zu einer Verschiebung des Verhältnisses der Produkte core2-Bn (5-3) und core6-Bn (5-4). Niedrige Reaktionstemperaturen favorisieren die core2-Bildung (Abb. 5.19). Dieses Ergebnis ließ sich nicht aus den bisher gefundenen kinetischen Daten ableiten.

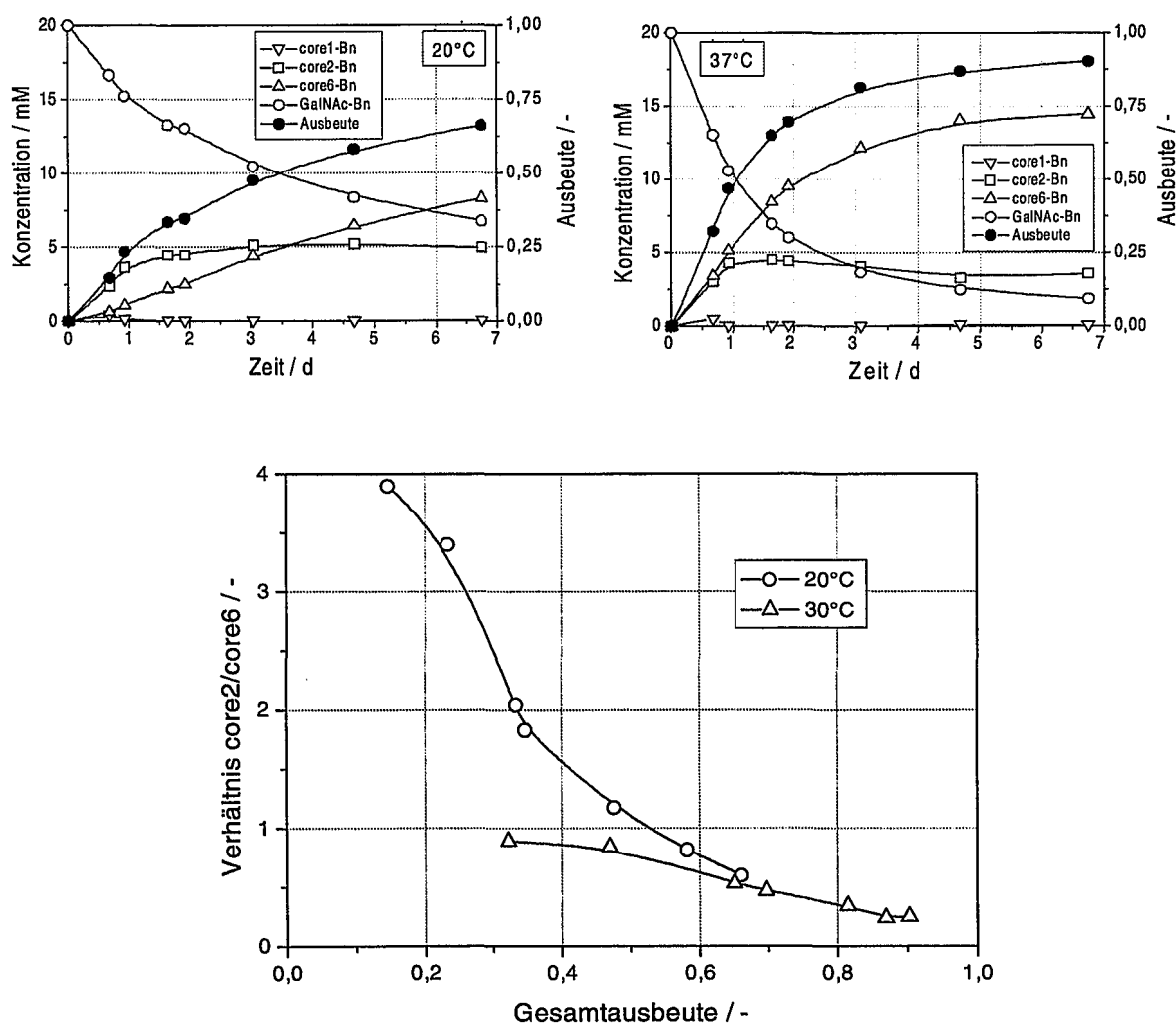


Abb. 5.19: Selektivitäten in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur;
oben: *batch*-Versuche bei 20°C (links) und 37°C (Parameter entsprechend Abb.5.18);
unten: core2/core6-Verhältnisse als Funktionen der Gesamtausbeuten²

¹ Diese Arbeiten wurden von Herrn Dipl.-Chem. Christoph Hoh im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführt.

² Die übliche reaktionstechnische Darstellungsweise wäre eine Auftragung der Selektivität von core2-Bn. Da die Ausbeute des Zwischenprodukts core1-Bn bei den folgenden Untersuchungen jedoch ausgeklammert werden soll, wurde diese Form gewählt.

Somit stellt sich die Frage, ob es möglich ist, komplexe Reaktionssysteme, die nicht vollständig mathematisch beschrieben werden können, effizient durch ein rein empirisches Verfahren zu optimieren. Als Kriterien wurden die Maximierung der core2-Bn-Ausbeute sowie der Selektivität gewählt, da mit der Temperaturabhängigkeit der Selektivität bereits ein interessantes, nicht vorhersehbares Phänomen gefunden worden war.¹ Das Potential einer *black box*-Optimierung wurde für dieses Reaktionssystem mittels eines genetischen Algorithmus ausgelotet.

5.4.1 Grundlagen zum genetischen Algorithmus

Genetische Algorithmen beruhen auf dem Prinzip natürlicher genetischer Prozesse und wurden in den späten 50er und frühen 60er Jahren zur Simulation ebendieser genutzt, um die von Watson und Crick publizierte Theorie der Vererbung (Watson und Crick, 1953) nachvollziehen und überprüfen zu können (Brunel University West London, 1998). 1962 übertrug Holland diese Optimierungsstrategie auf künstliche Systeme. Sein Ziel war es, eine Methode zu entwickeln, die es Computerprogrammen ermöglichen sollte, sich an ihre Umgebung zu adaptieren (Holland, 1992). Heute werden genetische Algorithmen in sehr unterschiedlichen Bereichen eingesetzt. Beispiele aus der Biotechnologie sind die Optimierung von Nährmedien (Weuster-Botz *et al.*, 1995; Weuster-Botz und Wandrey, 1995) und enzymatischen Synthesen (Uhlenbrock, 1994), Simulationen zur Protein-Faltung (Dandekar und Argos, 1992; Dandekar und Argos, 1997) sowie die computergestützte Modellierung von Rezeptor-Ligand-Strukturen (Jones *et al.*, 1995; Willet, 1995). Eine Einführung in die Thematik bietet die Monographie von Goldberg (Goldberg, 1989).

Der genetische Algorithmus bedient sich der drei elementaren Prozesse, die auch die natürliche Evolution (Darwin, 1859) bestimmen:

- **Selektion:** nur Individuen, die den vorgegebenen Zielen gerecht werden, überleben.
- **Reproduktion:** sie sichert den Bestand einer Art. Mit jeder neuen Generation werden einmal erworbene gute Merkmale beibehalten und untereinander durch *crossing-over* vermischt.
- **Mutation:** Zufällige Veränderung der Erbinformation, die unmittelbar oder in späteren Generationen eine Veränderung des Phänotyps zur Folge haben kann.

¹ Statt der Selektivität wurde das Konzentrationsverhältnis core2/core6 als Kriterium gewählt, da das Zwischenprodukt core1 hier unberücksichtigt bleiben soll.

5.4.2 Einrichten und Funktion des genetischen Algorithmus

Der genetische Algorithmus wird durch das Programm GALOP¹ emuliert. Im folgenden wird die Funktionsweise sowie die Initialisierung des Programms erläutert.

Definition der Selektionskriterien und Gewichtung

Da die Selektivität der core2-Bn-Trisaccharid-Bildung sowie die absolute Produktmenge maximiert werden sollten, wurden die folgenden Selektionskriterien formuliert:

- **Maximale core2-Bn-Konzentration**
- **Maximale Selektivität** für das Trisaccharid, ausgedrückt durch ein höchstmögliches Konzentrationsverhältnis core2-Bn/core6-Bn am Punkt der maximalen core2-Bn-Konzentration

Die Gewichtung der Selektionskriterien betrug 1:1.

Festlegen der Variationsparameter

Nach der Auswahl der Selektionskriterien mußten die Parameter bestimmt werden, die möglicherweise einen Einfluß auf die Zielfunktion haben und für jeden Parameter Variationsgrenzen festgesetzt werden. Tabelle 5.6 listet die gewählten sieben Parameter auf. Die Konzentration der alkalischen Phosphatase wurde nicht variiert, sie wurde grundsätzlich im Überschuß eingesetzt. An der Konzentration des MES-Puffers (50 mM) wurde aufgrund der Untersuchungen zur GlcNAc-Transferase-Aktivität ebenfalls festgehalten.

Parameter	Dimension	Variationsbreite	Schrittweite
GalNAc-Bn	mM	10-40 ^a	10
Lactose	mM	100-800	100
UDP-GlcNAc	mM	10-40	5
β-Galactosidase	mU/mL	250-1000 ^b	125
core2-GlcNAcT	mU/mL	50-250 ^b	50
pH	-	5,0-7,5 ^c	0,5
Temperatur	°C	10-50	10

^a Die Löslichkeitsgrenze für GalNAc-Bn liegt knapp oberhalb 40 mM.

^b Die Aktivitäten des Versuchs in Abb. 5.18 wurden als untere Grenzen gesetzt, da die Reaktion beschleunigt werden soll.

^c Maximal nutzbarer Bereich bei Verwendung von MES-Puffer.

Tab. 5.6: Parameter und ihre Variationsbreiten

¹ GALOP: *genetic algorithms for the optimization of processes*

Reproduktion und Mutation

Die Individuen, die sich in ihrer Umgebung behaupten konnten, werden durch *crossing over* rekombiniert und reproduziert. Die Individuen der neuen Generation werden zusätzlich durch Punktmutationen verändert. Beide Mechanismen sind in Abbildung 5.22 dargestellt.

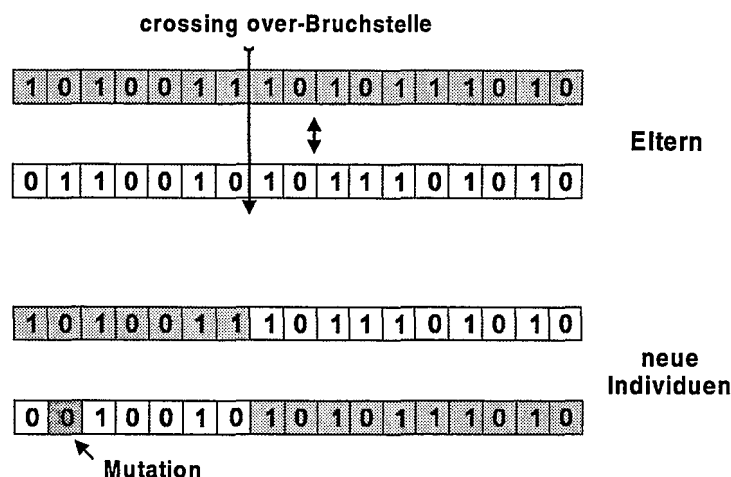


Abb. 5.22: *Crossing over* und Mutation

Das Programm GALOP erlaubt eine Auswahl verschiedener Methoden, nach denen die Individuen einer Generation in die nächste übernommen werden sollen. Die hier angewandte Methode wird "*keep best, ball bearing*"¹ genannt. Sie stellt sicher, daß die besten Individuen garantiert in die nächste Generation übernommen werden. Die *crossing over*-Rate wurde auf 0,95 festgesetzt, das heißt, 95% aller Individuen kreuzen ihr Genom. Die Mutationswahrscheinlichkeit wurde auf 0,05 gesetzt, was im Mittel einer Mutation pro *string* entspricht.

5.4.3 Ergebnisse der Optimierung

Die Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde über vier Generationen durchgeführt, was 56 Experimenten entspricht. Nach diesen vier Generationen konnten zwei lokale Maxima bezüglich der Selektionskriterien gefunden werden. Die generierten Individuen einer fünften Generation ließen keine wesentlichen Verbesserungen erwarten, daher wurden die Ergebnisse der ersten vier Generationen genutzt, um den Parameterraum gezielter in Gebieten zu durchsuchen, die eine nochmalige Verbesserung bezüglich der Zielfunktion versprochen. Zunächst sollen die Ergebnisse dieser ersten vier Generationen besprochen werden.

¹ *ball bearing* (engl.) = Kugellager. Die *ball bearing*-Methode kann als ein Kugellager beschrieben werden, daß sich um das Rouletterad dreht. Das Kugellager besteht aus soviel Kugeln, wie Individuen in die nächste Generation übernommen werden sollen. Die Kugeln haben zu ihren Nachbarn alle den gleichen Abstand, das Rad wird nur einmal gedreht. Dadurch wird eine höhere Gleichverteilung als bei einem gewöhnlichen Rouletterad erreicht.

Beste Individuen und *total fitness*

Für die Beurteilung des Erfolgs einer Optimierung sind zwei Größen interessant:

- Die Entwicklung des jeweils besten Individuums einer Generation.
- Die Entwicklung der gesamten Population einer Generation, ausgedrückt in der *total fitness*. Sie beschreibt die Gesamtgüte einer Population.

Die folgende Abbildung zeigt die Entwicklungen für beide Selektionskriterien.

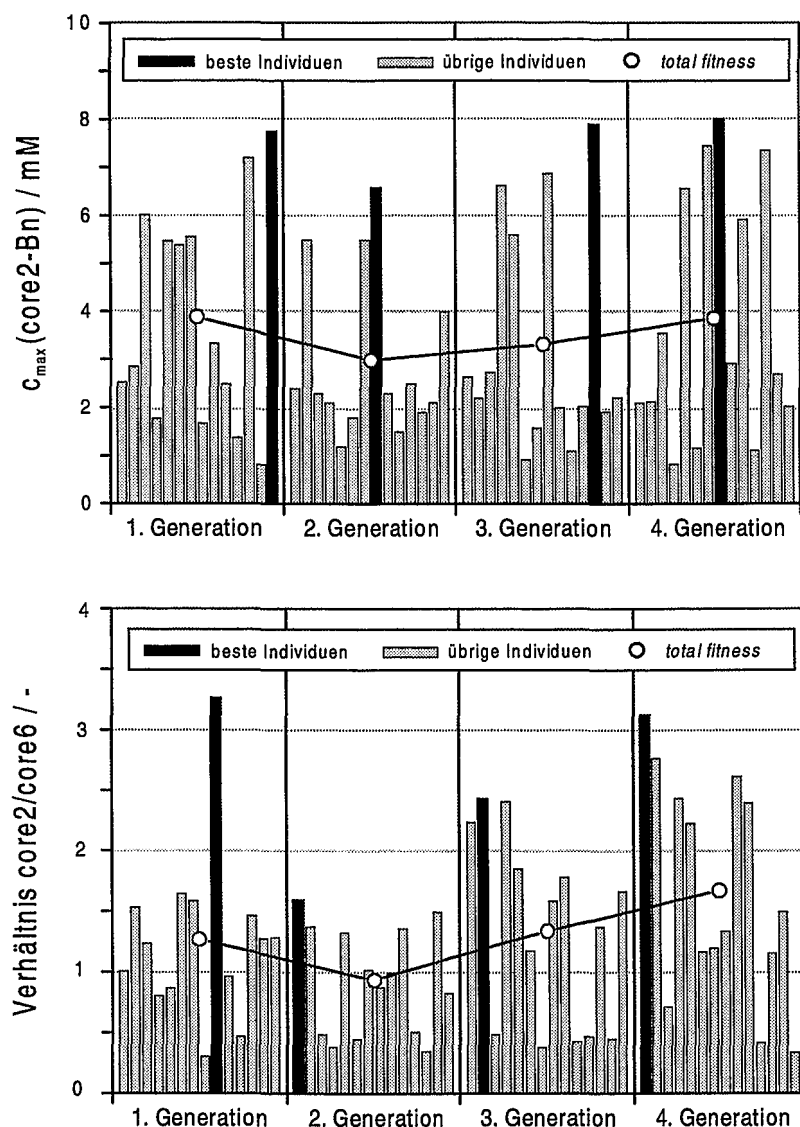


Abb. 5.23: Entwicklung der Individuen sowie der *total fitness*

Die Ergebnisse der ersten Generation sind erstaunlich gut: Die jeweils besten Individuen werden erst wieder in der dritten beziehungsweise vierten Generation erreicht. Diese Beobachtungen bedürfen einer Erläuterung, denn aufgrund des verwendeten Auswahl-

verfahrens finden sich die besten Individuen der ersten Generation auch in den folgenden wieder. Die Parameterkombinationen stellen zum Beispiel auch in der zweiten Generation die besten Individuen. Die gleichen Experimente haben demnach zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen geführt.

Sehr wahrscheinlich beruhen die starken Abweichungen auf einer unzureichenden Kontrolle des pH-Wertes in der ersten Generation, da eine geeignete pH-Elektrode zur Messung in einem Volumen von 100 μL zu Beginn der Arbeiten noch nicht zur Verfügung stand. Ab der zweiten Generation konnte die Reproduzierbarkeit deutlich verbessert werden.

Bezüglich der zwei Selektionskriterien fanden sich folgende Maxima:

- **Die maximal erreichbare core2-Bn-Konzentration** betrug 8 mM. Dieser Wert konnte somit im Vergleich zur vorausgehenden core6-Synthese verdoppelt werden (vgl. Abb. 5.18). Bei einer Ausgangskonzentration des GalNAc-Bn von 30 mM entspricht dies einer Ausbeute von 26,6%.
- **Das beste Konzentrationsverhältnis core2/core6** betrug 3,1. Die Parameter für dieses Maximum unterscheiden sich deutlich von denen für das Konzentrationsmaximum, bei dem nur ein Verhältnis von 1,3 erzielt werden konnte.

Die folgenden Abbildungen zeigen die jeweils besten Individuen.

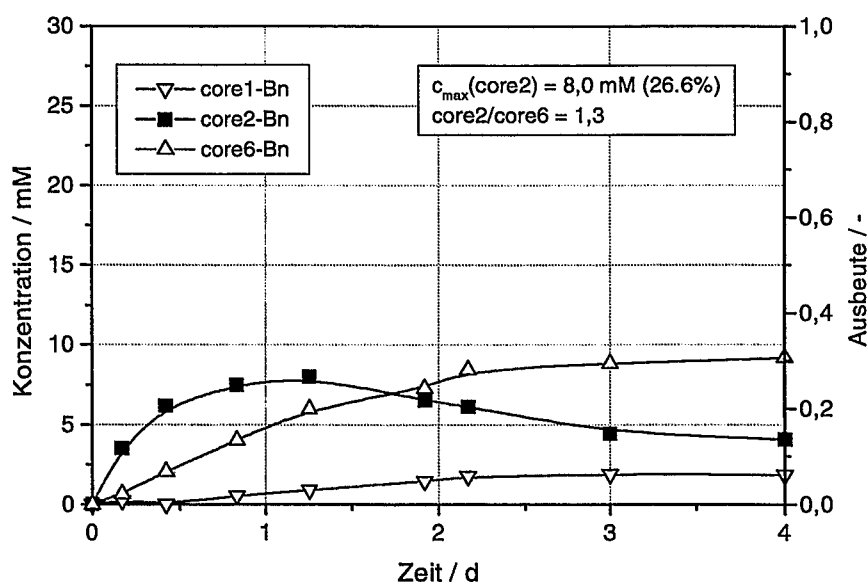


Abb. 5.24: Bestes Individuum bezüglich der core2-Bn-Maximalkonzentration;
(30 mM GalNAc-Bn; 30 mM UDP-GlcNAc; 0,5 M Lac; 150 mU/mL GlcNAcT; 250 mU Galactosidase; 10 U/mL CIAP; pH 6,5; 30°C)

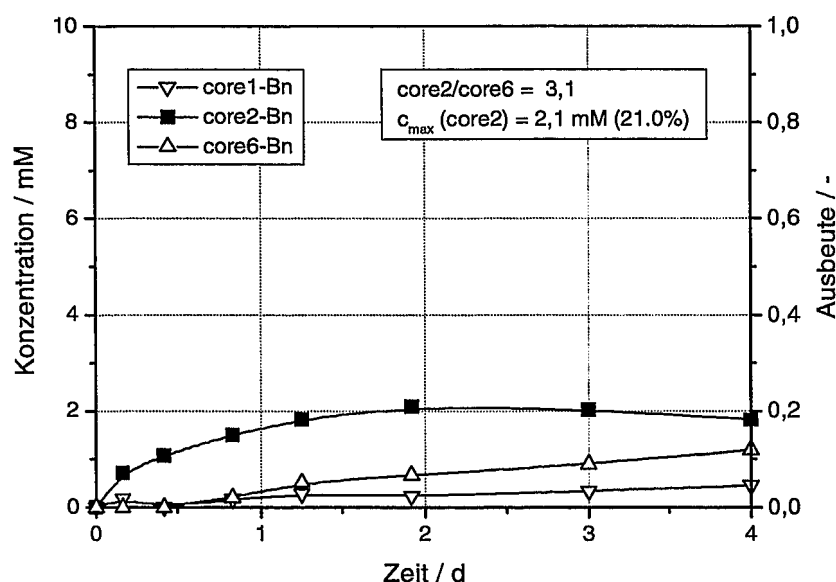


Abb. 5.25: Bestes Individuum bezüglich der Selektivität;
 (10 mM GalNAc-Bn; 10 mM UDP-GlcNAc; 0,6 M Lac; 150 mU/mL GlcNAcT;
 375 mU/mL Galactosidase; 10 U/mL CIAP; pH 6,5; 10°C)

Entwicklung der Parameter und weiterführende gezielte Optimierung

Die Entwicklungen der einzelnen Parameter wurden ausführlich in der Diplomarbeit von Christoph Hoh diskutiert (Hoh, 1999). Hier sollen nur die Ergebnisse herausgestellt werden, die zu einer weiteren Optimierung des Systems führten.

- **Ausgangskonzentration des GalNAc-Bn und UDP-GlcNAc:** In den bisher besten Individuen bezüglich der maximal erreichbaren core2-Bn-Konzentration betrug die Ausgangskonzentration beider Substrate 30 mM, obwohl eine höhere Produktkonzentration an der Löslichkeitsgrenze von GalNAc-Bn zu erwarten war. Der Maximalwert von 40 mM wurde von GALOP jedoch nicht vorgeschlagen. Daher wurde ein weiterer Versuch mit einer Konzentration von 40 mM für beide Komponenten unter sonst gleichen Bedingungen durchgeführt (Experiment 1 in Tabelle 5.7).
- **Reaktionstemperatur:** Die bisherige Optimierung läßt eindeutig erkennen, daß die Temperatur einen sehr großen Einfluß auf die Reaktionsverläufe hat: Hohe Selektivitäten wurden bei 10°C erzielt, maximale core2-Konzentrationen bei 30°C. Bei dem Versuch, hohe Selektivitäten mit hohen Produktkonzentrationen zu verbinden, wurden niedrige Reaktionstemperaturen mit den Parametern des besten Versuchs bezüglich der core2-Konzentration kombiniert. Darüber hinaus wurden die maximalen Konzentrationen der Substrate GalNAc-Bn und UDP-GlcNAc gewählt (40 mM). (Experimente 2 bis 5 in Tabelle 5.7).

Versuch	1 ^a	2 ^a	3 ^b	4 ^a	5 ^b
c_{max} (core2-Bn) / mM	10,2	10,3	9,5	10,1	10,1
core2/core6 / -	0,9	1,1	1,3	1,6	1,7
Ausbeute / -	0,255	0,258	0,238	0,253	0,253
c (GalNAc-Bn) / -	40	40	40	40	40
c (UDP-GlcNAc) / -	40	40	40	40	40
c (Lac) / mM	500	500	600	500	600
Akt. (Galactos.) / mU/mL	250	250	375	250	375
Akt. (GlcNAcT) / mU/mL	150	150	150	150	150
pH / -	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
T / °C	30	20	20	10	10

^a Die Experimente 1, 2 und 4 sind vom Individuum mit der besten core2-Bn-Konzentration durch Absenken der Reaktionstemperatur abgeleitet.

^b Die Versuche 3 und 5 basieren auf dem Individuum mit der besten Selektivität. Hier wurden die Substratkonzentrationen erhöht.

Tab. 5.7: Neue Individuen aus der gerichteten Optimierung

Die Ergebnisse zeigen weitere Verbesserungen bezüglich der maximalen core2-Bn-Konzentration. Eine Verbesserung hinsichtlich der Selektivität konnte nicht erzielt werden.

Das Ergebnis des Experimentes 1 ist nicht unbedingt überraschend: Die Ausbeute des core2-Produkts am Maximalpunkt beträgt hier 25,5% und ist damit nahezu identisch mit der Ausbeute von 26,6%, die während der Optimierung mit dem genetischen Algorithmus erzielt wurde. Bei ansonsten gleichen Bedingungen hat die Erhöhung der Substratkonzentrationen auf 40 mM also einen linearen Anstieg der erreichbaren Maximalkonzentration zur Folge.

Die Experimente 2 bis 5 ergeben trotz abgesenkter Reaktionstemperaturen ebenfalls sehr gute Werte für die core2-Bn-Maximalkonzentration (9,5 bis 10,3 mM). Bei einer Temperatur von 10°C konnte die maximale Konzentration von 6,6 mM auf 10 mM gesteigert werden. Auch im Vergleich zu einem sequentiellen Einsatz von Galactosidase und GlcNAcT konnte eine deutliche Ausbeutesteigerung erzielt werden. Nimmt man einen quantitativen Umsatz für die GlcNAc-Transferase-katalysierte Reaktion an, so könnten Gesamtausbeuten von maximal 15% erzielt werden (vgl. Abb. 5.6).

Die Experimente 1, 2 und 4 sind aufgrund der Variation nur eines Parameters, der Reaktionstemperatur, direkt miteinander vergleichbar. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, daß sich für diese Parameterkombinationen die core2-Bn-Maximalkonzentrationen nicht ändern, das

Verhältnis core2/core6 am Punkt von $c_{\max}$ wird mit sinkender Temperatur aber immer größer: 0,9 bei 30 °C; 1,1 bei 20°C; 1,6 bei 10°C. Die Abbildung 5.26 zeigt exemplarisch den Reaktionsverlauf des Experimentes 4:

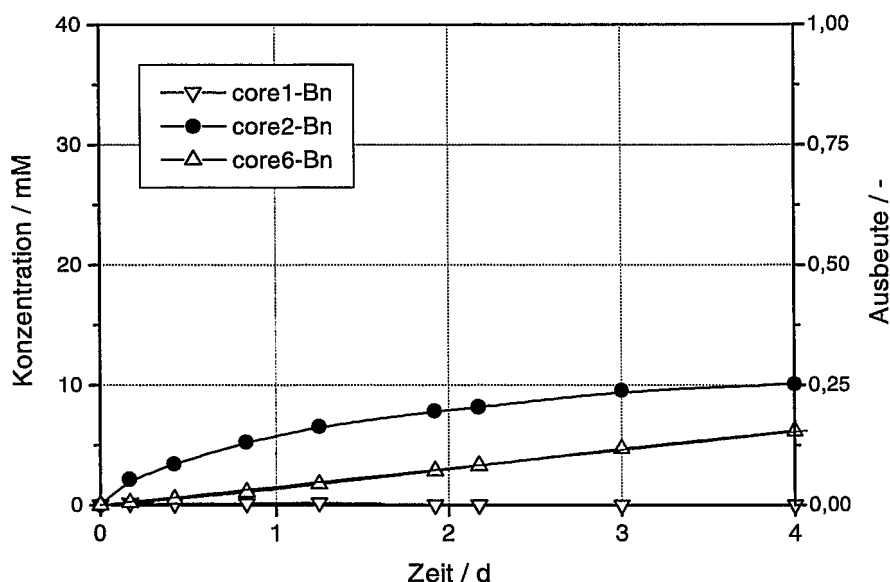


Abb. 5.26: Optimierte core2-Synthese bei 10°C (Experiment 4: 40 mM GalNAc-Bn; 40 mM UDP-GlcNAc; 0,5 M Lac; 150 mU/mL GlcNAcT; 250 mU/mL Galactosidase; pH 6,5; 10°C)

5.5 Kombiniertes Einsatz von Galactosidase und Sialyltransferase

Da beim Einsatz der GlcNAc-Transferase in Kombination mit der Galactosidase core6-Bn als Hauptprodukt entsteht, wurde ein zweites System untersucht, mit dem die core2-Struktur erzeugt werden kann. Fängt man das core1-Zwischenprodukt mit einer Sialyltransferase ab, so entsteht die Sialyl-core1-Struktur (Abb. 5.2). Für dieses System ergeben sich zwei Einsatzmöglichkeiten:

• Synthese von core2-Strukturen

Da die Sialyl-core1-Struktur kein Substrat für die GlcNAc-Transferase ist, muß der Neuraminsäurerest vor der Transformation zu core2-Produkten mittels einer Sialidase wieder abgespalten werden. Man kann hier also vom Einsatz einer enzymatischen Schutzgruppentechnik sprechen.¹

¹ Enzymatische Schutzgruppentechniken basieren in der Regel auf chemisch verknüpften Schutzgruppen, die selektiv durch enzymatische Hydrolyse abgespalten werden können (Waldmann und Sebastian, 1994; Sander und Waldmann, 1999). Die reversible enzymatische Übertragung von Zuckern wurde in der Vergangenheit zur regioselektiven Blockierung von Hydroxylgruppen an Oligosacchariden eingesetzt (Kashem *et al.*, 1992; Niemelä *et al.*, 1995; Rabinä *et al.*, 1998).

- **Synthese des tumorassoziierten Sialyl-T-Antigens (Sialyl-core1)**

Die Sialyl-core1-Struktur an sich ist ebenfalls von großem Interesse. An Mucin-Fragmenten könnte sie als Impfstoff oder Immunotherapeutikum eingesetzt werden (vgl. Kapitel 1.1.3). Dieser Ansatz wurde ebenfalls verfolgt und ist in Kapitel 7 beschrieben.

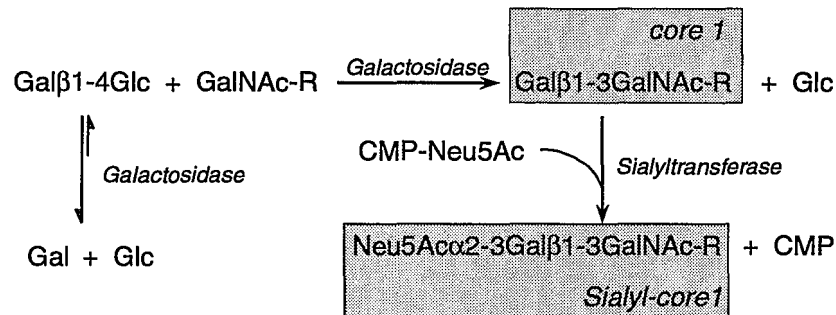


Abb. 5.27: Vereinfachte Darstellung des Galactosidase/Sialyltransferase-Systems

Die Aufreinigung der $\alpha 2,3\text{-O}$ -Sialyltransferase aus Schweine-Bauchspeicheldrüsen sowie Untersuchungen zum Substratspektrum wurden erstmals 1979 berichtet (Rearick *et al.*, 1979; Sadler *et al.*, 1979). In den neunziger Jahren wurde die Clonierung der murinen Enzyme publiziert (Lee *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1994).

Bei der für diese Arbeiten verwendeten Sialyltransferase handelt es sich um das lösliche humane Enzym, daß vom Copenhagener Arbeitskreis in Baculoviren cloniert und in Sf9-Zellen exprimiert wurde.¹ Es wurden zwei Enzympräparationen unterschiedlicher Reinheit eingesetzt: Erstere enthielt die in Copenhagen zur Homogenität aufgereinigte Sialyltransferase, letztere wurde durch Ultrafiltration des Zellüberstands und Umpuffern in MES-Puffer erhalten.² Die Sialyltransferase-Assays wurden in der Regel unter den folgenden Standardbedingungen durchgeführt: 1 mM core1-Bn, 1 mM CMP-Neuraminsäure, 1 mg/mL BSA, 50 mM MES-Puffer, pH 6,5; 37°C. Abweichungen sind im einzelnen vermerkt.

5.5.1 Aktivitäts- und Stabilitätsmessungen

Sialyltransferasen wurden in nahezu allen Untersuchungen in Cacodylatpuffer gehandhabt, das Aktivitätsoptimum für die $\alpha 2,3\text{-O}$ -Sialyltransferase liegt bei pH 6,5. Da Cacodylat sehr toxisch ist, war eine Substitution wünschenswert. Es konnte gezeigt werden, daß das Enzym in MES-Puffer nahezu die gleiche Aktivität besitzt; das Aktivitätsoptimum wurde ebenso bei pH 6,5 gefunden (vgl. Abb. 5.28).

¹ E.C. 2.4.99.4

² Es standen 14 U der aufgereinigten SiaT und 3 U des Diafiltrats zur Verfügung.

Aus der Temperaturabhängigkeit der Aktivität konnte für die Sialyltransferase-katalysierte Reaktion eine Aktivierungsenergie von 60 kJ/mol abgeleitet werden (vgl. Formel 5.5).

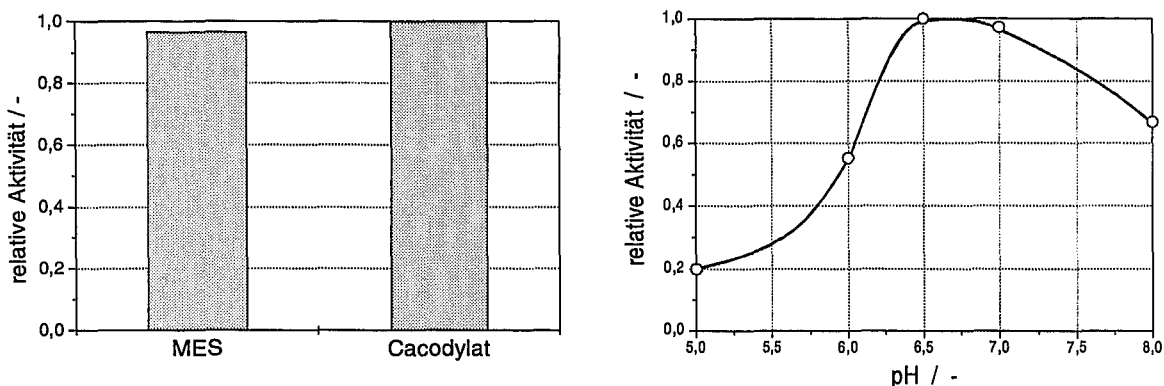


Abb. 5.28: Sialyltransferase-Aktivität in Abhängigkeit vom Puffersystem und vom pH-Wert
(links : 50 mM Puffer; pH 6,5; rechts 50 mM MES)

Die Sialyltransferase weist im Vergleich zur Galactosidase eine sehr geringe Stabilität auf, bei 37°C desaktiviert sie innerhalb von 12 Stunden. Eine leichte Stabilisierung konnte lediglich durch Zugabe von BSA erzielt werden (vgl. Abb. 5.29). Der pH-Wert 6,5 markiert nicht nur das Aktivitäts-, sondern auch das Stabilitätsoptimum.¹ Die Desaktivierungskonstanten und Halbwertszeiten sind in Tabelle 5.8 zusammengefaßt. Die Ergebnisse zeigen, daß Mehrenzsysteme mit dieser Sialyltransferase bei möglichst niedrigen Reaktionstemperaturen durchgeführt werden müssen.

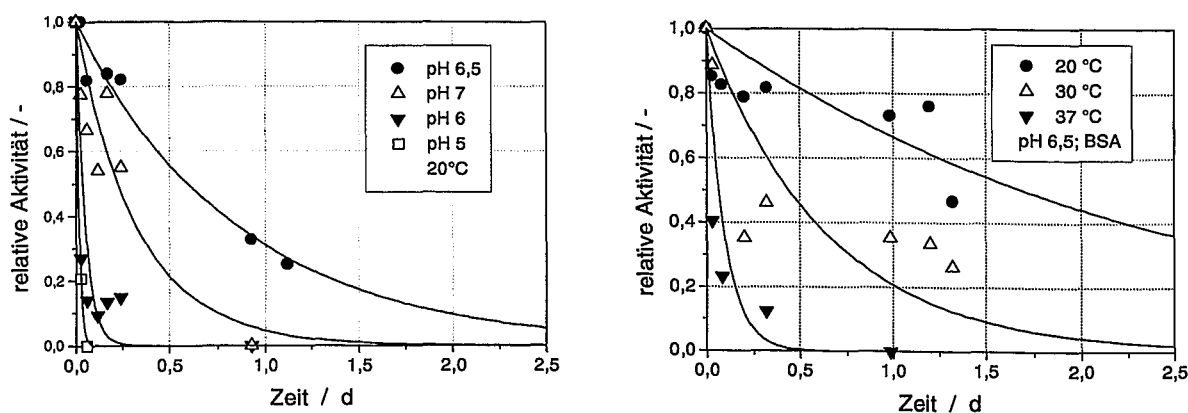


Abb. 5.29: Stabilität der Sialyltransferase als Funktion des pH und der Temperatur
(SiaT in 50 mM MES; Temperaturmessungen mit 1 mg/mL BSA)

¹ In Cacodylatpuffer wurde eine analoge Desaktivierung gefunden.

In einer Veröffentlichung von Reboul *et al.* wird die Desaktivierung der $\alpha 2,3$ -O-Sialyltransferase durch Dephosphorylierung mittels alkalischer Phosphatase beschrieben (Reboul *et al.*, 1992). Dieser Effekt konnte nicht nachvollzogen werden. Im direkten Vergleich bei der Synthese von Sialyl-core1-Bn konnte die Ausbeute durch Zugabe alkalischer Phosphatase um 10% erhöht werden.

Reaktionsbedingungen ^a	Desaktivierungskonstante k / d^{-1}	Halbwertszeit τ / d^b
pH 5; 20°C	66 ± 3	0,01
pH 6; 20°C	21 ± 5	0,03
pH 6,5; 20°C	$1,2 \pm 0,1$	0,6
pH 7; 20°C	$3,1 \pm 0,7$	0,2
pH 6,5; 37°C; 1mg/mL BSA	11 ± 5	0,06
pH 6,5; 30°C; 1 mg/mL BSA	$1,6 \pm 0,5$	0,4
pH 6,5; 20°C; 1 mg/mL BSA	$0,39 \pm 0,04$	1,8

^a 50 mM MES-Puffer

^b Berechnet nach $\tau = \ln 2 / k$

Tab. 5.8: Desaktivierung der Sialyltransferase

5.5.2 Kinetik der Sialyl-core1-Synthese

Ziel dieser Untersuchung war die vollständige kinetische Beschreibung der Sialyl-core1-Bn-Synthese. Bisher wurden für die Sialylierung mit der $\alpha 2,3$ -O-Sialyltransferase nur vereinzelte kinetische Konstanten bestimmt (vgl. Tabelle 5.9).

Die Parameteranpassung wurde mit dem Programm Scientist für den gesamten Datensatz vorgenommen. Als Modell diente eine Doppelsubstratkinetik mit kompetitiver Inhibierung des Nucleotidzuckers CMP-Neuraminsäure (vgl. Formel 5.6).

Die K_M -Werte für die Substrate liegen wie erwartet im mikromolaren Bereich. Der niedrige Wert von 0,2 mM für den Akzeptor zeigt, daß diese Glycosyltransferase sehr geeignet zur Katalyse einer Abfangreaktion ist. Wie im Falle der GlcNAc-Transferase wird bei niedriger Konzentration des Zwischenprodukts core1-Bn die Hydrolyse diskriminiert (vgl. Abb. 5.14).

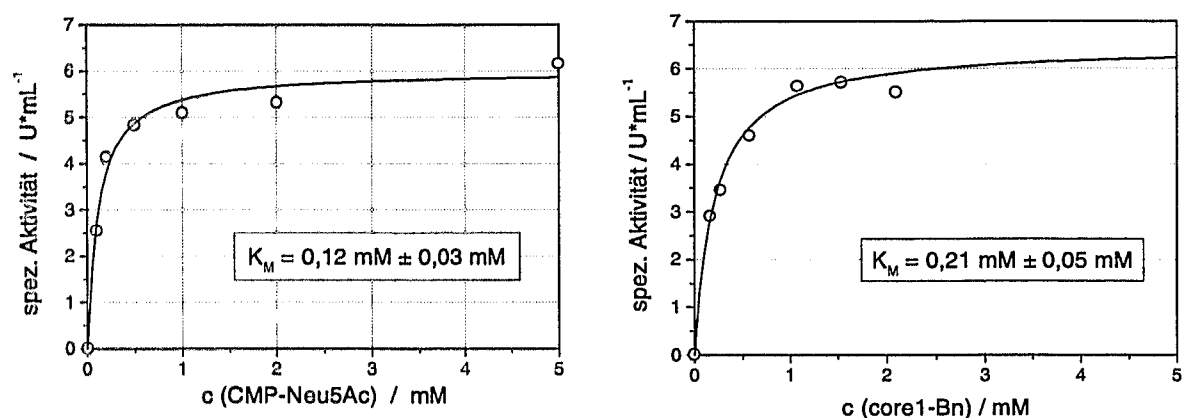


Abb. 5.30: Aktivität der Sialyltransferase als Funktion der Substratkonzentrationen

Im Gegensatz zur GlcNAc-Transferase, die nur durch Nucleotide inhibiert wird, konnte für die Sialyltransferase außerdem eine deutliche Inhibierung durch das CMP-Hydrolyseprodukt Cytidin nachgewiesen werden. Somit kann die Produktinhibierung während eines *batch*-Versuchs durch Zugabe von alkalischer Phosphatase nicht vollständig aufgehoben werden.

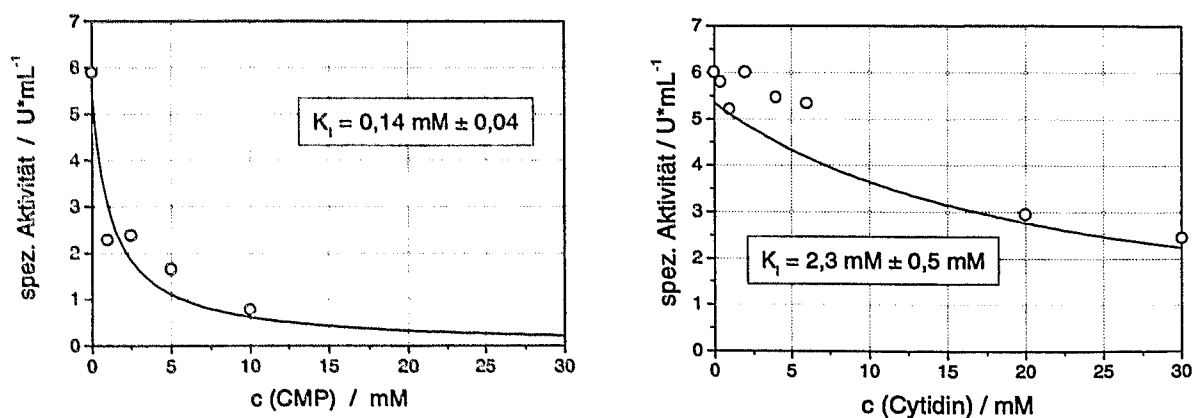


Abb. 5.31: Inhibierung der Sialyltransferase durch CMP und Cytidin

Die gefundenen kinetischen Daten sind zusammen mit Literaturwerten für α 2,3-*O*-Sialyltransferasen aus anderen Quellen in Tabelle 5.9 zusammengefasst (eigene Werte **halbfett**, Literaturdaten *kursiv*).

	K _M -bzw. K _I -Wert /mM (rel. v _{max} / -)		Enzymquelle
CMP-Neu5Ac	0,12 ± 0,03		Baculo/Sf9
Gal(β1-3)GalNAc(α1-Bn) (5-2)	0,21 ± 0,05		Baculo/Sf9
Gal(β1-3)GalNAc	0,41 ± 0,02 0,2	(0,65)	Schweineleber ^a Bauchspeicheldrüse (Schwein) ^b
Gal(β1-3)GalNAc(α1-Me)	0,94 ± 0,16	(1)	Schweineleber ^a
Gal(β1-3)GalNAc(α1-Thr)	0,27 ± 0,06		humane Plazenta ^c
Gal(β1-3)GalNAc(α1-pnp)	0,4 ± 0,1 0,036 ± 0,0003		Baculo/Sf9 Ratten-Zelllinie ^d
Gal(β1-3)Gal	5,9 ± 1,6	(0,26)	Schweineleber ^a
Gal(β1-3)GlcNAc	85	(0,3)	Bauchspeicheldrüse (Schwein) ^b
CMP	0,14 ± 0,04 0,05		Baculo/Sf9 Speicheldrüse (Schwein) ^e
Cytidin	2,3 ± 0,5 30		Baculo/Sf9 Speicheldrüse (Schwein) ^e

^a Lubineau *et al.*, 1997; ^b Rearick *et al.*, 1979; ^c Joziassé *et al.*, 1985

^d FR3T3-Zelllinie (Delannoy *et al.*, 1993); ^e Kleinedam *et al.*, 1997

Tab. 5.9: Kinetische Parameter für die α2,3-O-Sialyltransferase – eigene Ergebnisse und Literaturdaten

5.5.3 Synthese von Sialyl-core1-Bn

Die Optimierung des Sialyltransferase/Galactosidase-Systems wurde auf der Grundlage der kinetischen Untersuchungen sowie der Optimierung des Mehrenzysystems mit der GlcNAc-Transferase durchgeführt. Dabei spielten die folgenden Überlegungen eine Rolle:

- **Einstellen des pH-Werts auf 6,5**, da dieser Punkt das Aktivitäts- und Stabilitätsmaximum der Sialyltransferase ausmacht. Die Aktivität der Galactosidase sinkt bei diesem Wert weiter ab. Da das Produkt der Abfangreaktion in diesem System jedoch kein Substrat mehr für die Galactosidase ist, kann davon ausgegangen werden, daß bedeutend geringere Querinhibierungen auftreten. Das aktive Zentrum kann also nicht mehr durch die Substrate von Parallel- und Folgereaktionen belegt werden. Diese beiden hier beschriebenen Effekte sind gegenläufig und sollten sich zumindest teilweise ausgleichen.

- **Absenken der Reaktionstemperatur** auf 20°C aufgrund der Temperaturinstabilität der Sialyltransferase. Die damit verbundene Aktivitätserniedrigung wurde durch eine Verdoppelung der Enzymaktivitäten bezogen auf das GlcNAc-Transferase/Galactosidase-System teilweise aufgefangen.
- **Erhöhung der Nucleotidzucker-Konzentration** von 25 mM auf 30 mM, um den Zerfall der CMP-Neuraminsäure zu kompensieren, die wesentlich instabiler ist als das in Kap. 5.3 beschriebene UDP-*N*-Acetylglucosamin (Klein, 1994). Während der präparativen Synthesen wurde der Nucleotidzucker absatzweise zudosiert (*fed batch*-Verfahren).

Basierend auf dieser Parameterwahl wurde eine Versuchsreihe mit drei unterschiedlichen Aktivitätsverhältnissen von Galactosidase und Sialyltransferase durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß die zuerst gewählten Werte zu einem Ausbeuteoptimum von 90% führten. Bei der Halbierung einer Enzymaktivität wirkte diese jeweils limitierend. Der optimale Reaktionsverlauf ist in Abbildung 5.32 dargestellt. Die nahezu quantitative Ausbeute nach bereits zweieinhalb Tagen zeigt, daß die Galactosidase in diesem System bedeutend effektiver eingesetzt werden kann.

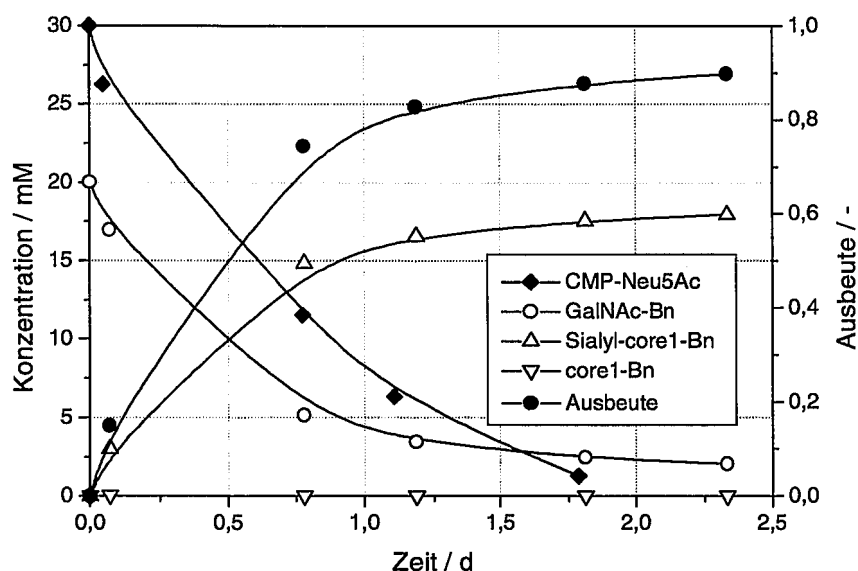


Abb. 5.32: Sialyl-core1-Bn-Synthese (0,5 M Lac; 20 mM GalNAc-Bn; 30 mM CMP-Neu5Ac; 500 mU/mL Galactosidase; 100 mU/mL SiaT; 10 U/mL CIAP; 50 mM MES; pH 6,5)

Bei einer präparativen Synthese wurde die umgepufferte Sialyltransferase eingesetzt. Da auch hierbei eine Ausbeute von 80% erzielt wurde,¹ kann auf eine Aufreinigung des Enzyms

¹ Es wurden 18 mg Sialyl-core1-Bn isoliert (vgl. Kap. 10.6.2).

verzichtet werden. Dieses Ergebnis ist bemerkenswert, da chromatographische Trennoperationen sehr kosten- und zeitintensiv sind.

5.6 Zusammenfassung

Charakterisierung der β -Galactosidase

- Eine β -Galactosidase aus Stierhoden wurde auf ihre Eignung zur Synthese von core1-Strukturen untersucht. Als Modellakzeptor diente GalNAc-Bn. Die Arbeiten umfaßten eine Analyse des Reaktionssystems sowie eine kinetische Untersuchung der core1-Bn-Synthese und Hydrolyse.
- Es konnte gezeigt werden, daß das Enzym core1-Bn mit einer Regioselektivität >95% bildet, ein weiteres Isomer konnte nicht detektiert werden. Die maximal erreichbare Ausbeute lag bei nur 15%. Somit ist es notwendig, das Produkt durch eine Glycosyltransferase-katalysierte Reaktion abzufangen.

Galactosidase/GlcNAcT-System zur Synthese von core6-Strukturen

- Eine GlcNAc-Transferase wurde kinetisch charakterisiert, um im Anschluß eine semiempirische Optimierung des Galactosidase/GlcNAcT-Systems durchführen zu können. In diesem Mehrenzsystem wird das Produkt der GlcNAcT-Folgereaktion durch die Galactosidase wieder hydrolysiert, so daß die core6-Struktur als Endprodukt gewonnen wird.
- Mit dem oben beschriebenen System konnte innerhalb von sieben Tagen eine Gesamtausbeute von 90% für core6-Bn und core2-Bn erzielt werden. Das core2-Produkt kann im Anschluß zu core6 hydrolysiert werden.

Optimierung der core2-Synthese mittels eines genetischen Algorithmus

- Bei den Untersuchungen zum obigen Mehrenzsystem konnte gezeigt werden, daß eine Vielzahl von Parallel- und Folgereaktionen eine vollständige mathematische Beschreibung erheblich erschweren. Somit stellte sich die Frage, ob eine empirische *black box*-Optimierung eines solchen Systems erfolgreich sein kann.
- Beispielhaft wurde die Optimierung der Ausbeute sowie der Selektivität des Zwischenprodukts core2-Bn mit einem genetischen Algorithmus untersucht. Dabei konnte eine Steigerung der core2-Konzentration von 4 mM auf 8 mM bei deutlicher Verbesserung der Selektivität erzielt werden.
- Basierend auf den durch den genetischen Algorithmus gewonnenen Erkenntnissen wurde eine gerichtete Optimierung durchgeführt. Die maximale core2-Konzentration von 10 mM entspricht einer Ausbeute von 25% und einem Verhältnis core2/core6 von 1,7.

Galactosidase/SiaT-System zur Synthese von core1-Strukturen

- Zur Synthese von Sialyl-core1-Strukturen wurde eine α 2,3-*O*-Sialyltransferase kinetisch charakterisiert und in einem Mehrenzysystem zusammen mit der Galactosidase aus Stierhoden eingesetzt.
- Die Zielkomponente konnte im semiempirisch optimierten System mit einer Ausbeute von 90% gewonnen werden.
- Die Sialyl-core1-Struktur kann zur weiteren enzymatischen Synthese von core2-Produkten eingesetzt werden. In diesem Fall muß die Neuraminsäure zunächst wieder durch eine Neuraminidase abgelöst werden, sie hat somit Schutzgruppenfunktion. Attraktiv ist aber auch das Trisaccharid selbst, das als tumorassoziiertes Antigen zur Immuntherapie oder als Vakzin eingesetzt werden könnte.
- Die funktionsreine Sialyltransferase, die mittels dreier chromatographischer Schritte aufgereinigt worden war, wurde in einem präparativen Ansatz durch das Diafiltrat des Zellüberstands ersetzt. Auf eine aufwendige Aufreinigung des Enzyms kann also verzichtet werden.

“Just a few decades ago, the saccharides bound to glycoproteins were considered little more than an irritation. ... They were considered a nuisance and were typically cleaved away to reveal the 'important part', the protein moiety, for structural and functional studies.”

P. Sears, C.-H. Wong; 1998

6 Enzymatische Glycosylierung von Peptiden

Der Aufbau komplexer Zuckerstrukturen, zumal als Glycopeptid, ist trotz aller Fortschritte der Glycotechnologie eine besondere Herausforderung: In der Vergangenheit wurde eine Reihe chemoenzymatischer¹ wie rein chemischer² Synthesen der Sialyl-Lewis^x-Struktur entwickelt. Außerdem wurden Anstrengungen unternommen, das Tetrasaccharid mit Peptiden zu verknüpfen. Thomas *et al.* publizierten 1998 einen *remodelling*-Ansatz: Ein natürliches *N*-Glycopeptid wurde aufgereinigt und die endständigen Zuckerstruktur bis auf die core-Struktur durch Glycosidasen abgebaut. Anschließend erfolgte der enzymatische Aufbau von Sialyl-Lewis^x. Inazu und Mitarbeiter berichteten kürzlich die chemoenzymatische Synthese von Glycopeptiden mit natürlichen *N*-Glycosiden (Yamamoto *et al.*, 1998; Mizuno *et al.*, 1999).

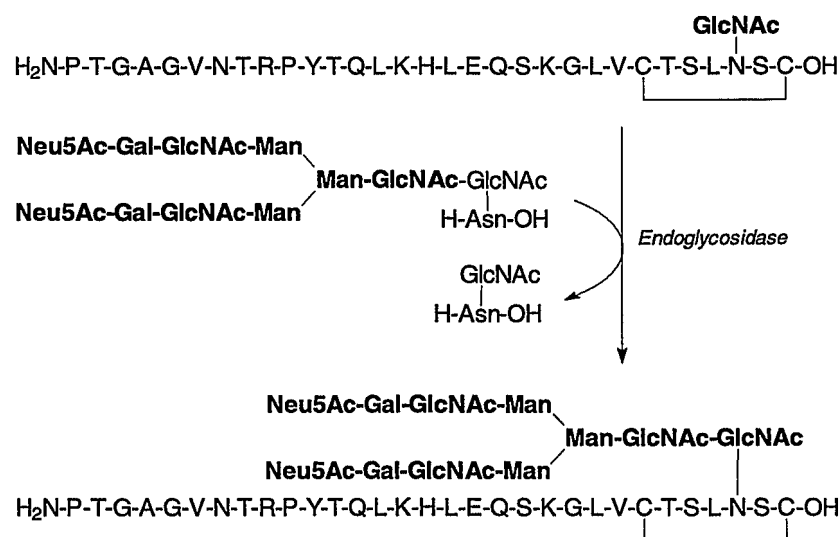


Abb. 6.1: Enzymatischer *en bloc*-Transfer natürlicher *N*-Glycoside (N = Asn = Asparagin)

¹ Ichikawa *et al.*, 1992; Öhrlein *et al.*, 1993; DeFrees *et al.*, 1996; Seppo *et al.*, 1996; Renkonen *et al.*, 1997; Palcic *et al.*, 1998; Wittmann *et al.*, 1998

² Kameyama *et al.*, 1991; Sprengard *et al.*, 1995; Sprengard *et al.*, 1996; Dekany *et al.*, 1997; Miyauchi *et al.*, 1997; Kiyoi *et al.*, 1998; Kretzschmar und Stahl, 1998

Dabei wird zunächst das GlcNAc-Peptid mittels chemischer Festphasensynthese hergestellt. Anschließend erfolgte die enzymatische *en bloc*-Übertragung verschiedener aus natürlichen Quellen isolierter *N*-Glycane. Als Biokatalysator wurde keine dem Biosyntheseweg entsprechende Oligosaccharyltransferase verwendet, sondern eine Endo-Glycosidase.¹ Die Ausbeuten für die enzymatischen Reaktionen lagen zwischen 3,5 und 7,5%. Abbildung 6.1 zeigt die enzymatische Transglycosylierung.

Der *de novo*-Aufbau natürlicher glycosidischer core-Strukturen mit komplexen Endmustern wie Sialyl-Lewis^x gelang jedoch noch nicht. Abbildung 6.2 zeigt bisher synthetisierte nicht-natürliche Glycopeptide beziehungsweise Glycopeptid-ähnliche Strukturen, die Sialyl-Lewis^x enthalten.

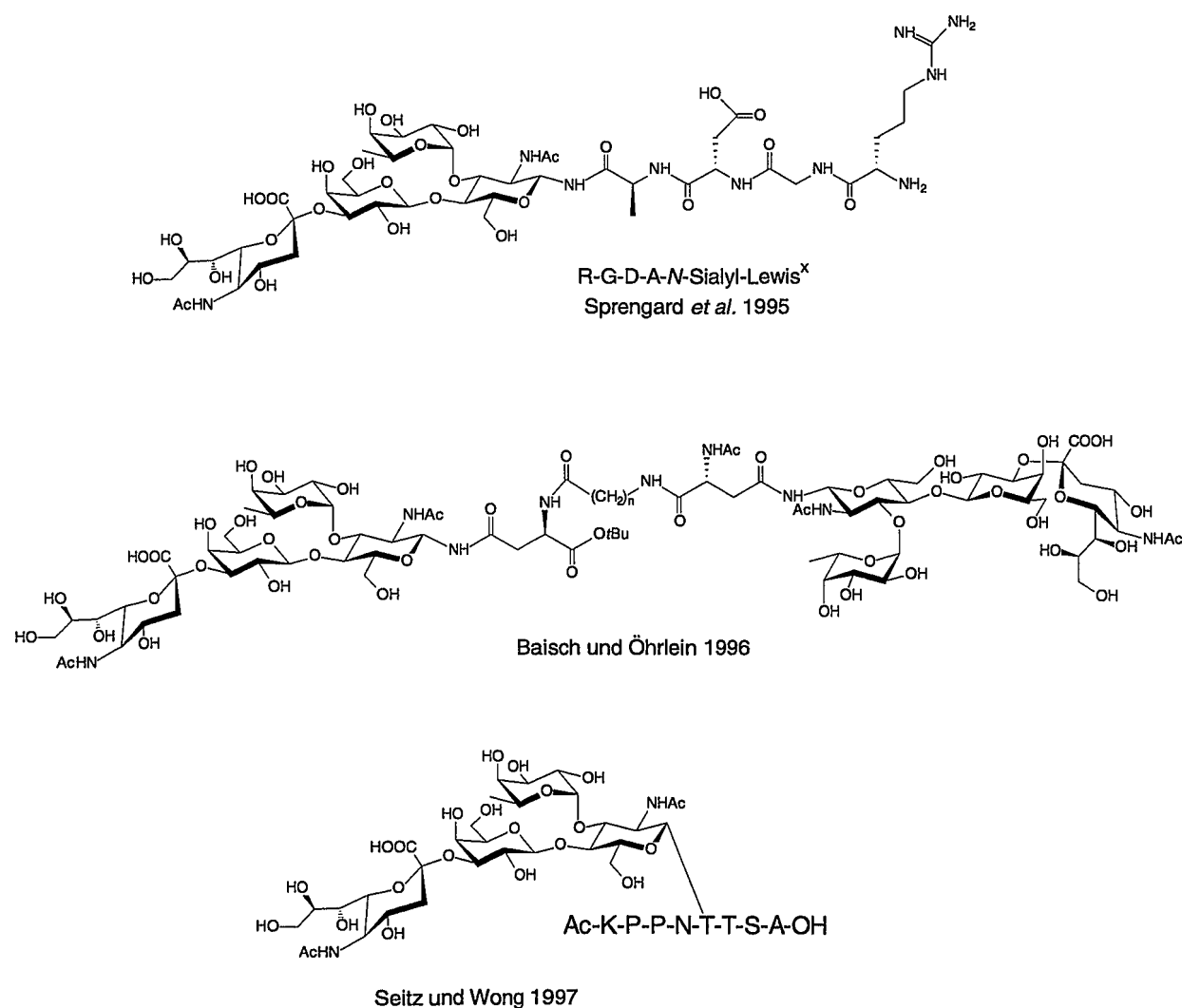


Abb. 6.2: Glycopeptide und Glycopeptidanaloga

¹ Man kann Glycosidasen in Endo- und Exo-Glycosidasen unterteilen. Erstere spalten Oligosaccharidketten ab, während letztere nur die endständigen Zucker hydrolysieren. Die β -Galactosidase aus Stierhoden ist somit eine Exo-Galactosidase.

Die Schwierigkeit der enzymatischen Glycopeptidsynthese liegt einerseits in der mangelhaften Verfügbarkeit der Glycosyltransferasen. Andererseits lieferten Glycosidase-katalysierte Reaktionen an sterisch anspruchsvollen Akzeptoren bisher immer unbefriedigende Ausbeuten. Die in Kapitel 5 beschriebenen Mehrenzysysteme wurden entwickelt, um erstmalig eine Glycosidase zum Aufbau *O*-glycosidischer Strukturen am Peptid nutzen zu können. Die Adaptierung dieser Reaktionssysteme an Glycopeptid-Akzeptoren kann jedoch erst der zweite Schritt sein. Zunächst muß die Synthese des GalNAc-*building blocks* erfolgen.

Als Zielstruktur wurde core2-ständiges Sialyl-Lewis^x gewählt.¹ Der Aufbau sollte wenn möglich am PSGL-1 N-Terminus erfolgen, da dieses Peptid als Beispielkomponente des EU-Projekts fungiert (Abb. 6.1, vgl. Kapitel 1.1.2). Parallel wurde die Glycosylierung eines Fragments des MUC1-*tandem repeats* untersucht, das aus 11 Aminosäuren besteht (MUC1a' – vgl. Tabelle 6.1). Es ist als Akzeptor attraktiv, da es sehr gut mit der verfügbaren GalNAc-Transferase 3 glycosyliert werden kann. Die Substratspektren der GalNAc-Transferasen werden ausführlich im folgenden Abschnitt diskutiert.

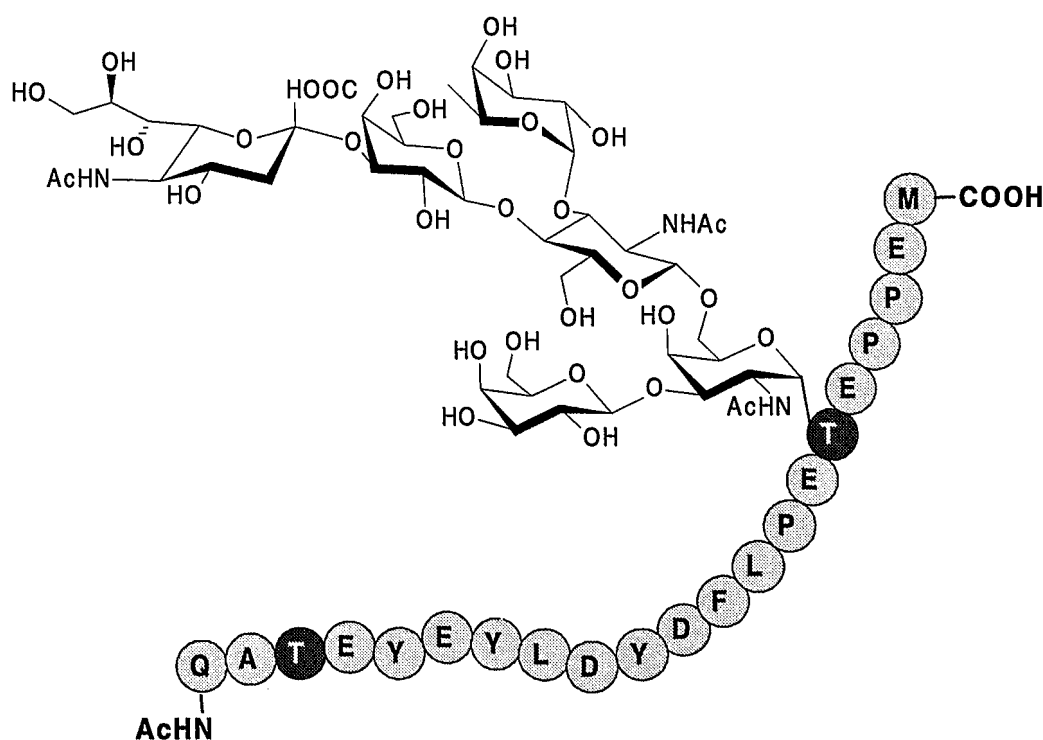


Abb. 6.3: Core2-ständiges Sialyl-Lewis^x am PSGL-1 N-Terminus (vgl. Abb. 1.3)

¹ Genaugenommen müsste man von core1-ständigem Sialyl-Lewis^x sprechen, da sich core1- und Sialyl-Lewis^x-Struktur überlappen. Der Verfasser hält den gewählten Ausdruck jedoch für prägnanter, da er explizit auf die verzweigte natürliche Struktur hinweist (vgl. Abb. 1.3).

6.1 GalNAc-Transfer

Der erste Schritt des enzymatischen Aufbaus *O*-glycosidischer core-Strukturen ist der Einsatz einer Polypeptid-GalNAc-Transferase zur Synthese des GalNAc-Peptids. Diese Aufgabe erfüllen *in vivo* eine Familie von GalNAc-Transferasen, von denen bisher erst einige cloniert, exprimiert und charakterisiert werden konnten (Clausen, 1998).

GalNAc-Transferasen glycosylieren Serin- und Threonin-Seitenketten, wobei nicht jedes Peptid, das diese Aminosäuren enthält, ein Substrat ist. Auf der Suche nach einem gemeinsamen Erkennungsmotiv wurden eine Vielzahl von Akzeptorstudien durchgeführt, bislang jedoch ohne besonderen Erfolg (Hill *et al.*, 1977; Elhammer *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1993; Hansen *et al.*, 1995; Stadie *et al.*, 1995; Brockhausen *et al.*, 1996). Somit können kaum Voraussagen über die Akzeptanz eines Peptids für eine bestimmte GalNAc-Transferase getroffen werden.

Die Transferasen weisen unterschiedliche, aber überlappende Spezifitäten für Akzeptorpeptide auf. Clausen und Mitarbeiter veröffentlichten Substratspektren der von ihnen exprimierten Enzyme – Tabelle 6.1 zeigt einige Beispiele (Wandall *et al.*, 1996; Bennett *et al.*, 1998).

Akzeptorpeptid ^a		GalNAcT1		GalNAcT2		GalNAcT3		GalNAcT4	
		K _M	v _{max}	K _M	v _{max}	K _M	v _{max}	K _M	v _{max}
MUC1a ^c	Sequenz	0,66		2,13		0,09		n.b. ^b	
AHGVTSAPDTR									
MUC2	PTTTP-	0,12		0,01		0,1		n.b.	
ISTTTMVTPTPTPTC									
MUC7	CPPTPSATT-	0,04	0,76	0,015	0,64	0,01	0,056	0,48	0,25
PAPPSSSAPPETAA									
PSGL-1	QATEYEY-		n.b.		n.b.		n.b.	0,02	0,003
LDYDFLPETEPPEM									
EA2		0,07	0,99	0,85	1,8	0,46	0,96	2,19	0,44
DSTTPAPTTK									
Donor		0,062 ^c		0,010 ^c		0,029 ^c		0,16 ^c	
UDP-GalNAc									

^a K_M / mM; v_{max} / nmol (min · µg)⁻¹

^b n. b.: nicht bestimmt – GalNAc-Transfer fand statt, der Umsatz war jedoch sehr niedrig.

^c mit MUC7 als Akzeptor.

Tab. 6.1: Substratspektren der GalNAc-Transferasen 1-4

6.1.1 Synthese des MUC1a'-GalNAc-building blocks

Da das Proteinfragment MUC1a' ein sehr gutes Substrat für die GalNAc-Transferase 3 ist, konnte die Synthese des GalNAc-Peptids innerhalb von 20 Stunden mit einer Ausbeute von 95% durchgeführt werden. Das bei der Reaktion freigesetzte Nucleotid UDP wurde durch alkalische Phosphatase hydrolysiert, um eine Inhibierung zu vermeiden. Das Produkt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt. In mehreren Synthesen konnten insgesamt 150 mg des GalNAc-Peptids (6-2) isoliert werden. Abbildung 6.4 zeigt den enzymatischen GalNAc-Transfer.

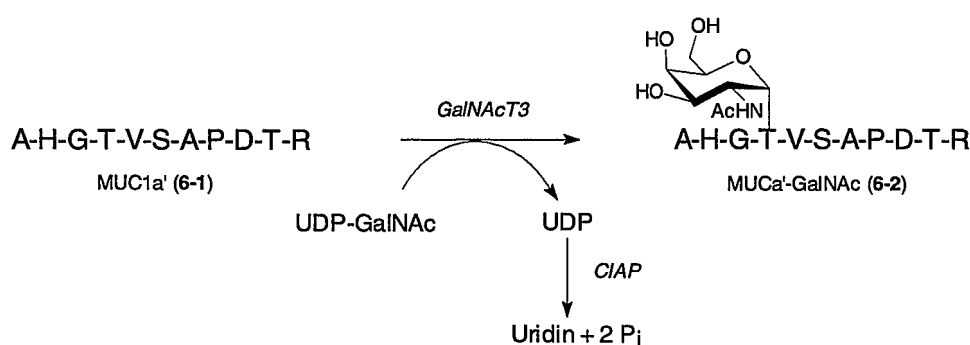


Abb. 6.4: Enzymatische Synthese des MUC1a'-GalNAc-building blocks

6.1.2 Untersuchungen zur Glycosylierung von PSGL-1

Nachdem die Glycosylierung des MUC1a' mit der GalNAc-Transferase 3 erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurden die Möglichkeiten zur Glycosylierung des PSGL-1 N-Terminus untersucht. Es bestanden die folgenden Alternativen:

- **Einsatz der GalNAcT4** – dieses Enzym zeigt mit dem PSGL-1-Peptid Aktivität, die allerdings sehr niedrig ist. MUC7, das von der Copenhagener Arbeitsgruppe als Assaysubstrat verwendet wird, besitzt einen fast hundertfach höheren $v_{\max}$ -Wert. Das Enzym glycosyliert selektiv das erste Threonin (Bennett *et al.*, 1998).
- **Einsatz der GalNAcT3**, die in ausreichenden Mengen verfügbar war (vgl. Kapitel 3.1). Es konnte bisher jedoch nicht gezeigt werden, welche Thr-Position glycosyliert wird. Zudem zeigt das Enzym eine extrem niedrige Aktivität für diesen Akzeptor.

Der erste Weg konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht verfolgt werden. Zwar wurde ein CHO-Clon aus Copenhagen in der Zellkultur des Instituts für Biotechnologie fermentiert, die Expressionsrate war jedoch sehr niedrig. Der Zellüberstand wies eine spezifische Aktivität von 0,23 U/L auf, was bei einem Volumen von 20 L einer Gesamtaktivität von etwa 5 units entsprach. Die Assays wurden jedoch mit dem MUC7-Fragment durchgeführt, so daß sich für

PSGL-1 eine Gesamtaktivität von 60 mU ergab. Wenn man zusätzlich berücksichtigt, daß bei der Enzymaufreinigung eine Ausbeute von maximal 50% zu erwarten ist, so wird deutlich, daß entweder eine Fermentation in erheblich größerem Maßstab oder aber ein effektiverer Clon erforderlich ist. Beides konnte bisher nicht realisiert werden.

Stattdessen wurden Versuche mit der GalNAc-Transferase 3 durchgeführt. Eine 1 mM PSGL-1-Lösung wurde mit einer spezifischen GalNAcT-Aktivität von 200 mU/mL zwei Tage inkubiert. Anschließend wurde das Haupt-, sowie ein Nebenprodukt chromatographisch aufgereinigt. Bei der massenspektrometrischen Analyse zeigte sich jedoch, daß beide eine kleinere Masse als das Substrat hatten und somit keine Glycosylierungsprodukte sein konnten. Das Peptid scheint also durch eine Protease-Nebenaktivität hydrolysiert worden zu sein. Da das Enzym-Substratverhältnis bei der Glycosylierung von MUC1a' 100-fach kleiner war, wurde diese Aktivität bei früheren Versuchen nicht bemerkt.

Da die GalNAcT3 nur mittels Ionentauschchromatographie gereinigt wurde, könnte eine Gelpermeationschromatographie angeschlossen werden, um das funktionsreine Enzym zu erhalten. Angesichts der Tatsache, daß kein glycosyliertes Produkt nachgewiesen werden konnte, wurde diese Idee wieder verworfen. Die Glycosylierung von PSGL-1 kann somit erst weiterverfolgt werden, wenn eine geeignete GalNAc-Transferase in hinreichenden Mengen zur Verfügung steht oder aber alternative Wege zum Aufbau des GalNAc-Peptids gefunden werden. Mögliche Ansätze werden in Kapitel 8.5.1 diskutiert.

6.2 Aufbau der core2-Struktur auf MUC1a'

Zu Beginn der Experimente mit MUC1'a-GalNAc als Akzeptor für Mehrenzymsysteme mußte der Nachweis erbracht werden, daß das Glycopeptid ein Substrat für die Galactosidase ist. Dazu wurde es mit Lactose als Donor und β -Galactosidase inkubiert. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels Kapillarelektrophorese untersucht.

Bei ersten Versuchen entstanden eine Reihe neuer *peaks*, die auf Hydrolyseprodukte und somit Protease-Nebenaktivitäten schließen ließen. In der Tat traten analoge *peak*-Muster bei einer Inkubation ohne Donorsubstrat auf. Die Proteaseaktivitäten konnten durch einen Inhibitorcocktail¹ jedoch wirkungsvoll unterdrückt werden, so daß der Verlust durch Hydrolyse in den folgenden Versuchen nie höher als 10% war. Abbildung 6.5 zeigt einen Transglycosylierungsversuch ohne Inhibitoren.

¹ Als Inhibitoren wurden Pepstatin (Rich *et al.*, 1985), Leupeptin (Aoyagi *et al.*, 1969) und PMSF (Phenylmethylsulfonyl-fluorid – Moss und Fahrney, 1978) verwendet (vgl. Kap. 10.6.3).

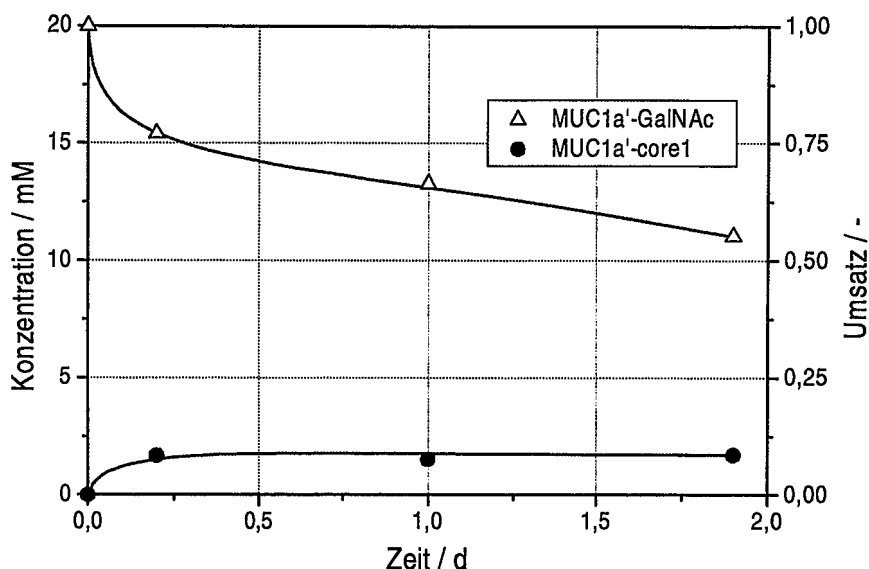


Abb. 6.5: Transglycosylierung und Hydrolyse durch Protease-Nebenaktivität
(0,5 M Lac; 20 mM MUC1a'-GalNAc; 1 U/mL Galactosidase; 50 mM MES pH6; 30°C)

Durch diese Messungen konnte gezeigt werden, daß MUC1a' ein Akzeptor für die Transgalactosylierung mit β -Galactosidase aus Stierhoden ist. Dabei wurde ausschließlich die Bildung eines Regioisomers beobachtet.¹ Die Aktivität des Enzyms mit MUC1a'-GalNAc als Akzeptor scheint im Vergleich zu GalNAc-Bn deutlich niedriger zu sein, was aber angesichts des bedeutend höheren sterischen Anspruchs des Glycopeptids auch erwartet werden konnte. Quantifiziert wurde diese Beobachtung nicht, da die für kinetische Messungen benötigte Menge des GalNAc-Peptids nicht zur Verfügung stand.

6.2.1 Präparativer Einsatz des Galactosidase/GlcNAcT-Mehrenzzymsystems

Die Galactosidase wurde daraufhin zusammen mit der GlcNAc-Transferase zur Synthese des core6-Glycosids eingesetzt. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Mit dem an das Glycopeptid adaptierten System konnte eine Ausbeute von 30% erzielt werden. Ein Regioisomer der core1-Struktur wurde nicht gebildet. Die Substratverluste durch die Protease-Nebenaktivität blieben dabei unter 10%. Der Reaktionsverlauf einer Synthese ist in Abbildung 6.6 dargestellt. Es konnten insgesamt 23 mg des Glycopeptids aufgereinigt werden.
- Bei *profiling*-Experimenten der Oxforder Gruppe zeigte sich, daß nicht die core6-Struktur, sondern die core2-Struktur gebildet wurde (vgl. Abb. 6.7 und Kap. 6.4).

¹ Sowohl bei der Analyse mit HPLC wie auch mittels Kapillarelektrophorese konnte nur ein Produktpeak detektiert werden.

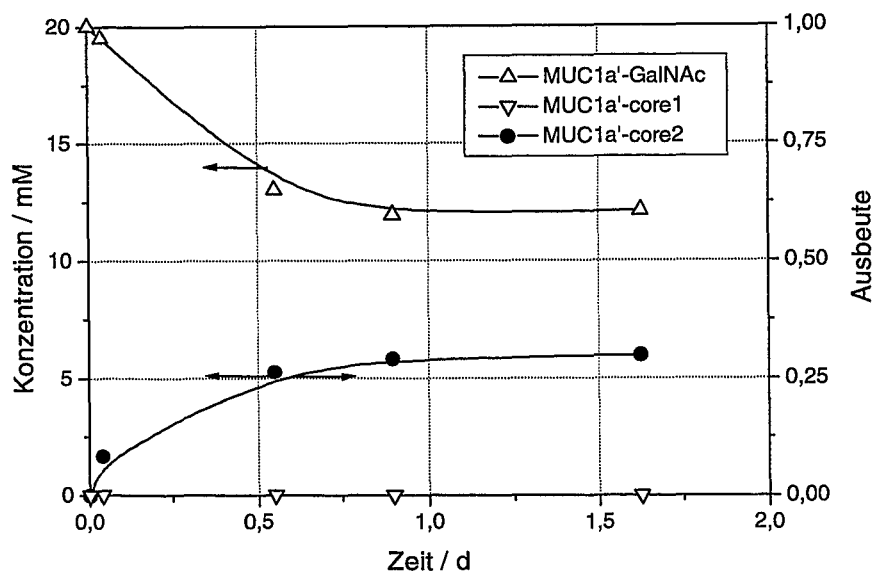


Abb. 6.6: MUC1a'-core2-Synthese (0,5 M Lac; 20 mM MUC1a'-GalNAc; 25 mM UDP-GlcNAc; 1 U/mL Galactosidase; 200 mU/mL GlcNAcT; 10 U/mL CIAP; 50 mM MES pH6; 30°C)

Wie bereits bei den Versuchen mit der Galactosidase allein festgestellt wurde, ist das Glycopeptid ein wesentlich schlechteres Substrat als die Modellkomponente GalNAc-Bn. Es ist allerdings nicht verständlich, warum die Ausbeute nach einem Tag stagniert, obwohl beide Enzyme noch aktiv sind. Die UDP-GlcNAc-Konzentration sowie die Konzentrationen von UDP, UMP und Uridin wurden mittels Kapillarelektrophorese bestimmt, hier kam es ebenfalls zu keinen Limitierungen oder nennenswerten Inhibierungen. Auch Versuche mit der 1,5-fachen Lactose-Konzentration brachten keine Verbesserung, somit muß auch der Galactosidase-Donor in ausreichender Konzentration vorhanden gewesen sein. Möglich wäre allenfalls eine starke Inhibierung durch freigesetzte Galactose (vgl. Kap. 5.2.2): Mit dem Glycopeptid als Akzeptor wird das Verhältnis von Transgalactosylierung und Hydrolyse der Lactose stärker als beim Modellsubstrat zur Hydrolyse verschoben sein. Wir konnten allerdings bereits in Kapitel 5.4 zeigen, daß dieses komplexe Reaktionssystem gedanklich nur teilweise durchdrungen wurde. Ein Lösungsansatz könnte eine empirische Optimierung mittels statistischer Versuchsplanung oder durch einen genetischen Algorithmus bieten. Dafür fehlten im Rahmen dieser Arbeit allerdings Zeit und Substrat.

Die Ergebnisse der Strukturuntersuchung sind sehr überraschend, mußte doch auch hier mit der Hydrolyse der core2-Struktur zu core6 gerechnet werden. Dies war jedoch eindeutig nicht der Fall. Auch bei späteren Hydrolyseversuchen von isoliertem MUC1a'-core2 mit β -Galactosidase aus Stierhoden konnte keine Produktbildung beobachtet werden.

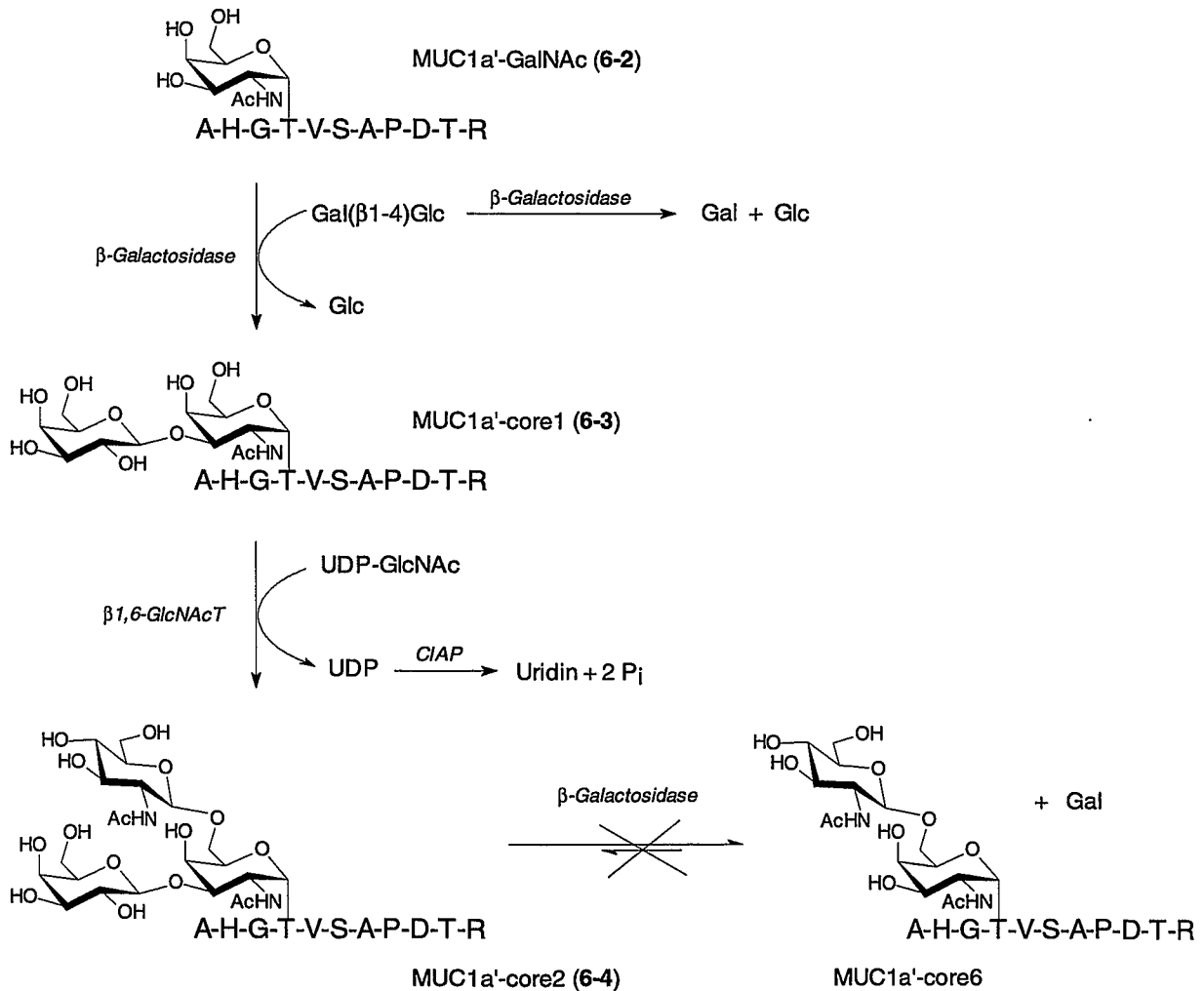


Abb. 6.7: Synthese von MUC1a'-core2

Möglicherweise liegt die Lösung in dem sterischen Anspruch der Galactosidase begründet: Ist MUC1a'-core1 bereits ein schlechtes Substrat, so ist das verzweigte core2-Produkt der Folgereaktion möglicherweise zu voluminös oder zu stark sterisch gehindert, als daß es von demselben Enzym wieder hydrolysiert werden kann. Schließlich konnte bereits für core2-Bn eine verminderte Hydrolyseaktivität festgestellt werden (vgl. Kap.5.3.2).

Das Fazit ist jedoch ein erfreuliches: Die core2-Struktur läßt sich mit der GlcNAc-Transferase erzeugen. Das deutlich labilere Galactosidase/Sialyltransferase-System, das zudem zwei weitere enzymatische Schritte zur Synthese der core2-Struktur erfordert, muß zu diesem Zweck nicht eingesetzt werden. Mit dem Alternativsystem wurden deshalb nur einige Versuche im analytischen Maßstab durchgeführt.

6.2.2 Untersuchungen zum Aufbau der Sialyl-core1-Struktur an MUC1a'

Auch für das Galactosidase/Sialyltransferase-System konnte gezeigt werden, daß es zur Glycosylierung des MUC1a'-Glycopeptids geeignet ist. In diesem Fall mußte jedoch die aufgereinigte Sialyltransferase eingesetzt werden (vgl. Kap. 5.5), da das Diafiltrat starke Protease-Aktivitäten enthielt, die sich auch durch diverse Inhibitoren nicht unterdrücken ließen. Abbildung 6.8 zeigt den Reaktionsverlauf eines analytischen Versuchs.

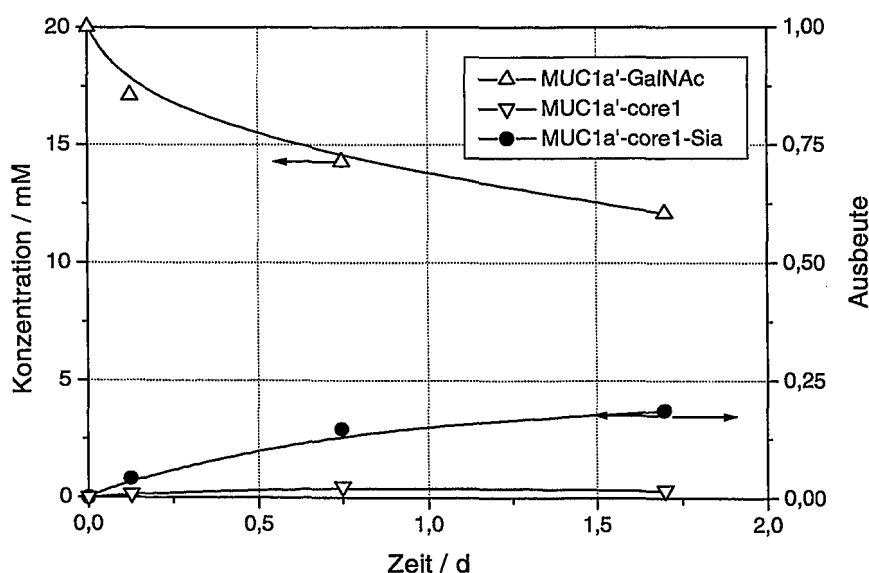


Abb. 6.8: Einsatz des Galactosidase/SiaT-Systems zur Glycosylierung von MUC1a'-GalNAc (0,5 M Lac; 20 mM MUC1a'-GalNAc; 30 mM CMP-Neu5Ac; 1 U/mL Galactosidase; 200 mU/mL SiaT; 10 U/mL CIAP; 50 mM MES pH6,5; 20°C)

6.3 Synthese der core2-ständigen Sialyl-Lewis^x-Struktur an MUC1a'

Zum Aufbau der Sialyl-Lewis^x-Struktur wurden drei weitere Glycosyltransferasen in Folge eingesetzt: eine Galactosyltransferase, eine Sialyltransferase und eine Fucosyltransferase. Die Zwischenprodukte mußten dabei nicht aufgereinigt werden.

In den folgenden Abschnitten werden die Substratspezifitäten der Enzyme erläutert sowie deren präparativer Einsatz beschrieben.

6.3.1 Galactosylierung

Die β 1-4-Galactosyltransferase¹ ist schon seit langem bekannt und wurde umfassend untersucht, da sie leicht aus Milch isoliert werden kann.² Obwohl das Enzym inzwischen aus verschiedenen Quellen cloniert (Appert *et al.*, 1986; Narimatsu *et al.*, 1986; Shaper *et al.*, 1986; Masri *et al.*, 1988; Nakazawa *et al.*, 1988) und in Bakterien und Hefepilzen exprimiert werden konnte (Kretdorn *et al.*, 1993; Kleene *et al.*, 1994; Herrmann *et al.*, 1995), ist das Kuhmilch-Isolat nach wie vor die preisgünstigste kommerziell erhältliche Variante.

Erst kürzlich konnten Clausen und Mitarbeiterinnen zeigen, daß die oben beschriebene β 1,4-GalT1 ein Mitglied einer Familie von β 1,4-Galactosyltransferasen ist, die β -N-Acetylglucosamin als Akzeptor transformieren (Almeida *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 1998; Schwientek *et al.*, 1998). Während die Akzeptorspezifitäten für einfache Zucker wie GlcNAc sehr ähnlich sind, ergeben sich für Oligosaccharide, wie zum Beispiel core1-Glycane deutliche Unterschiede: Mit dem Akzeptor core2-pnp³ wurde für alle Galactosyltransferasen außer der GalT4 eine starke Substratüberschußinhibierung gemessen (Ujita *et al.*, 1998). Die Aktivitätsmessungen sind in Abb. 6.9 wiedergegeben.

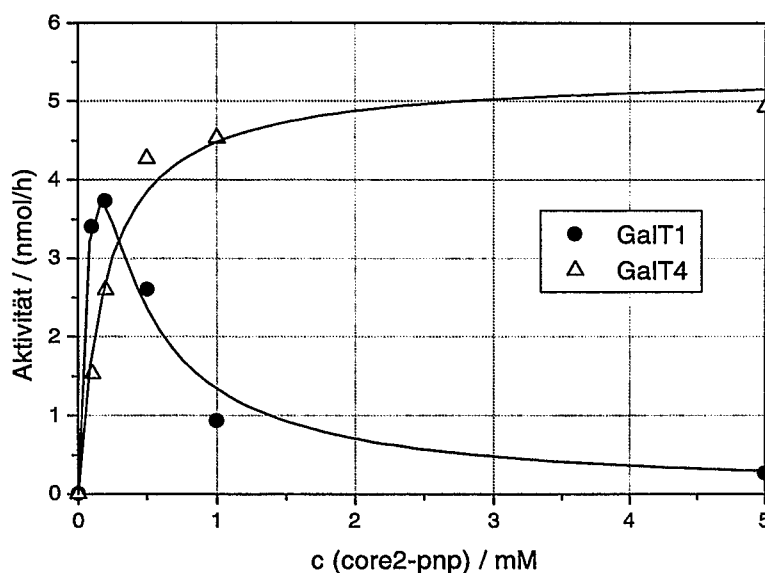


Abb. 6.9: Kinetik der core2-pnp-Galactosylierung⁴ nach Ujita *et al.*, 1998

¹ E.C. 2.4.1.38

² Aufreinigung: (Watkins und Hassid, 1962; Babad und Hassid, 1964; Babad und Hassid, 1966; Magee *et al.*, 1974); kinetisches Modell: (Khatra *et al.*, 1974); Review: (Ram und Munjal, 1985)

³ pnp: Paranitrophenyl

⁴ Der K_M -Wert für die GalT4 wurde von Ujita *et al.* mit 0,29 mM bestimmt, Parameter für die GalT1 fehlen. Die Aktivitätsmessungen für die GalT1 wurden zwar nachträglich mit einem Modell für Substratüberschußinhibierung (unkompetitive Inhibierung, Biselli *et al.*, 1995) angepaßt, die großen Standardabweichungen zeigen jedoch, daß dieses kaum geeignet ist, die Kinetik zu beschreiben ($K_I = 0,07 \text{ mM} \pm 0,14 \text{ mM}$; $K_M = 0,4 \text{ mM} \pm 0,8 \text{ mM}$).

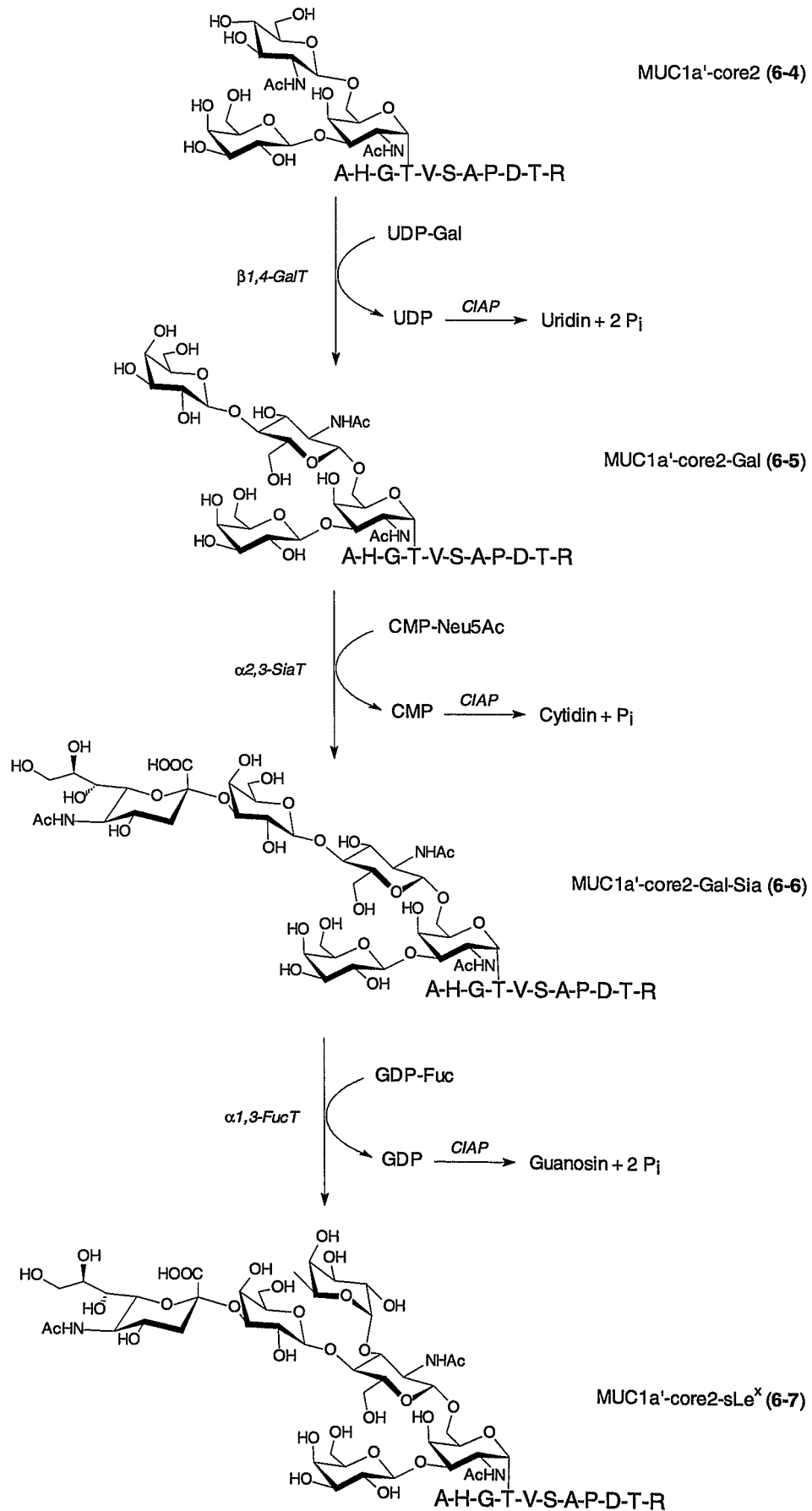


Abb. 6.10: Aufbau der Sialyl-Lewis^x-Struktur auf MUC1a'-core2

Da bei der Glycosylierung der peptidständigen core2-Struktur mit der Galactosyltransferase 1 eine analoge Substratüberschußinhibierung auftreten könnte, wurde das Glycopeptid in einer Konzentration von nur 1 mM eingesetzt.¹

Das aufgereinigte MUC1a'-core1 wurde mit einem zwanzigprozentigen Überschuß des Donors UDP-Gal umgesetzt; der Substrat-*peak* konnte nach 8 h nicht mehr detektiert werden. Abbildung 6.10 zeigt schematisch die Galactosylierung sowie die folgenden beiden Glycosylierungsschritte.

6.3.2 Sialylierung

Die hier verwendete Sialyltransferase unterscheidet sich von der core1-Sialyltransferase, die im Verbund mit der Stierhoden-Galactosidase eingesetzt wurde – beide Enzyme weisen ein völlig unterschiedliches Akzeptorspektrum auf. Die α 2,3-N-Sialyltransferase² überträgt Neuraminsäure auf Gal(β 1,4)GlcNAc- sowie auf Gal(β 1,3)GlcNAc-Strukturen, nicht jedoch auf core1.

Das Enzym wurde Anfang der achtziger Jahre erstmals aus Rattenlebern isoliert (Weinstein *et al.*, 1982), konnte später cloniert werden (Wen *et al.*, 1992; Gosselin *et al.*, 1994) und ist inzwischen kommerziell erhältlich. Es wurde von der Firma Calbiochem bezogen und von dieser in einem Baculo/*Spodoptera frugiperda*-System exprimiert (vgl. Kap. 3.1.1).

Zur Reaktionslösung der Galactosylierung wurde ein zwanzigprozentiger Überschuß an CMP-Neuraminsäure sowie Sialyltransferase zudosiert. Innerhalb von 18 Stunden konnte eine Ausbeute von 90% erzielt werden.

6.3.3 Fucosylierung

Die Familie der α 1,3-Fucosyltransferasen umfaßt bis heute sieben bekannte Enzyme. Erste Versuche zur Sialyl-Lewis^x-Synthese wurden mit einem Enzym aus humaner Milch durchgeführt (Prieels *et al.*, 1981). Später konnten eine Reihe humaner α 1,3-Fucosyltransferasen cloniert werden, die Sialyllactosamin zu Sialyl-Lewis^x transformieren: FucT3 (Kukowska-Latallo *et al.*, 1990), FucT6 (Koszdin und Bowen, 1992) sowie FucT7 (Natsuka *et al.*, 1994; Sasaki *et al.*, 1994). Die übrigen Enzyme katalysieren ausschließlich die Lewis^x-Synthese.³

¹ Für die folgenden Glycosylierungen ist die niedrige Substratkonzentration unproblematisch, da die K_M -Werte entsprechender Akzeptoren sowohl für die SiaT als auch für die FucT in der Regel im mikromolaren Bereich liegen (Wlasichuk *et al.*, 1993; Gosselin *et al.*, 1994; de Vries *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 1995; Dudziak, 1996; Gosselin und Palcic, 1996)

² E.C. 2.4.99.6

³ Lewis^x: Gal(β 1,4)[Fuc(α 1,3)]GlcNAc – die nichtsialylierte Variante.

Einige Fucosyltransferasen sind inzwischen kommerziell erhältlich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine rekombinante Fucosyltransferase III der Firma Calbiochem eingesetzt, die in einem Baculo/*Spodoptera frugiperda*-System exprimiert wurde.¹

Die Fucosylierung verlief analog zu den vorherigen Biotransformationen: Das Enzym sowie der Nucleotidzucker GDP-Fucose wurden zur Reaktionslösung zugegeben. Nach 18 Stunden konnte das Sialyl-Lewis^x-Produkt in 95%iger Ausbeute gewonnen werden. Das Glycopeptid wurde auf einer präparativen HPLC aufgereinigt.

Tabelle 6.2 faßt alle Reaktionsschritte zusammen. Eine isolierte Ausbeute über die fünfstufige Synthese wird nicht angegeben, da nach jedem Glycosylierungsschritt einige Milligramm des Glycopeptids für eine Strukturuntersuchung aufgereinigt wurden. Die Ausbeuten der chromatographischen Schritte sind jedoch im Methodenteil angegeben (vgl. Kap. 10.6.3).

Enzym	Spezifische Aktivität mU/mL	Ausbeute	Gesamtausbeute
GalNAcT3	20	95%	95%
Galactosidase/GlcNAcT	1000/200	30%	29%
β1,4-GalT	20	95%	27%
α2,3-SiaT	30	90%	24%
α1,3-FucT	50	95%	23%

Tab. 6.2: Synthese der core2-ständigen Sialyl-Lewis^x-Struktur an MUC1a⁴

6.3.4 O-Glycan-profiling²

Die enzymatisch synthetisierten glycopeptidständigen Zuckerstrukturen wurden von der Oxforder Arbeitsgruppe mittels Glycan-*profiling*-Experimenten analysiert. In Verbindung mit massenspektrometrischen Untersuchungen ist so eine eindeutige Strukturbestimmung möglich.

Beim *profiling* werden die Glycane vom Peptid abgespalten und mit einem UV-aktiven Rest verknüpft. Anschließend können die so markierten Oligosaccharide durch Glycosidasen gespalten und mittels HPLC-Analytik untersucht werden. Während N-Glycane durch den Einsatz von Endoglycosidasen abgespalten werden können, müssen O-Glycoside chemisch

¹ Inzwischen wurde von der Zürcher Arbeitsgruppe eine FucT III in CHO-Zellen cloniert. Bei der Kultivierung der rekombinanten Zellen in Jülich konnten 15 *units* des Enzyms gewonnen werden (Eisenkrätzer, 1999). Alternativ hätte auch eine FucT VI eingesetzt werden können, die von Frau Dipl.-Chem. Astrid Gödde durch kontinuierliche Kultivierung von CHO-Zellen produziert wurde (Gödde *et al.*, 1996).

² Die *profiling*-Experimente wurden von Dr. Louise Royle und Dr. Tony Merry in Oxford durchgeführt.

gespalten werden. Die Oxforder Arbeitsgruppe entwickelte eine Technik, bei der das Produkt mittels Hydrazinolyse gewonnen werden kann (Rudd *et al.*, 1997; Mattu *et al.*, 1998).

Zur Sequenzierung der Glycane wurden die Proben mit den folgenden Exoglycosidasen inkubiert:

- α 2,3-spezifische Sialidase zum Nachweis (α 2-3)-terminaler Neuraminsäure
- α 1,3(4)-Fucosidase (Mandeln) und α 1,6-Fucosidase (Rinderniere) zur Abspaltung der entsprechend verknüpften Fucosen
- β 1,4-Galactosidase (*Streptococcus pneumoniae*) zum Nachweis (β 1-4)-verknüpfter terminaler Galactose. (Sobald an diese Fucose geknüpft ist, wird keine Hydrolyse beobachtet)
- β 1,3/4-Galactosidase (Rinderhoden), die terminale (β 1-3)- und (β 1-4)-verknüpfte Galactosereste abspaltet.
- Hexosaminidase (*Streptococcus pneumoniae*) zum Nachweis von GlcNAc- (und GalNAc-) Zuckern.

Durch Sequenzierung des Glycopeptids **6-5** konnte gezeigt werden, daß es sich um ein Tetrasaccharid handelt, daß aus zwei Hexosaminen und zwei Galactosidaseresten besteht (vgl. Abb. 6.10). Die Hexosamine (GalNAc und GlcNAc) sind miteinander verknüpft und tragen als endständige Gruppe eine (β 1-4)-verknüpfte Galactose. Das erste Hexosamin weist zusätzlich eine Verzweigung durch eine (β 1-3)-verknüpfte Galactose auf. Die Analysenergebnisse bestätigen somit die Synthese der core2-Struktur (vgl. Kap. 6.2.1). Abbildung 6.11 zeigt die Chromatogramme zur Sequenzierung der Gal(β 1-4)-core2-Struktur.

Für die Folgeprodukte **6-6** und **6-7** konnte die Sialylierung in (α 2-3)-Position sowie die Fucosylierung des GlcNAc-Restes in (α 1-3)-Position nachgewiesen werden.

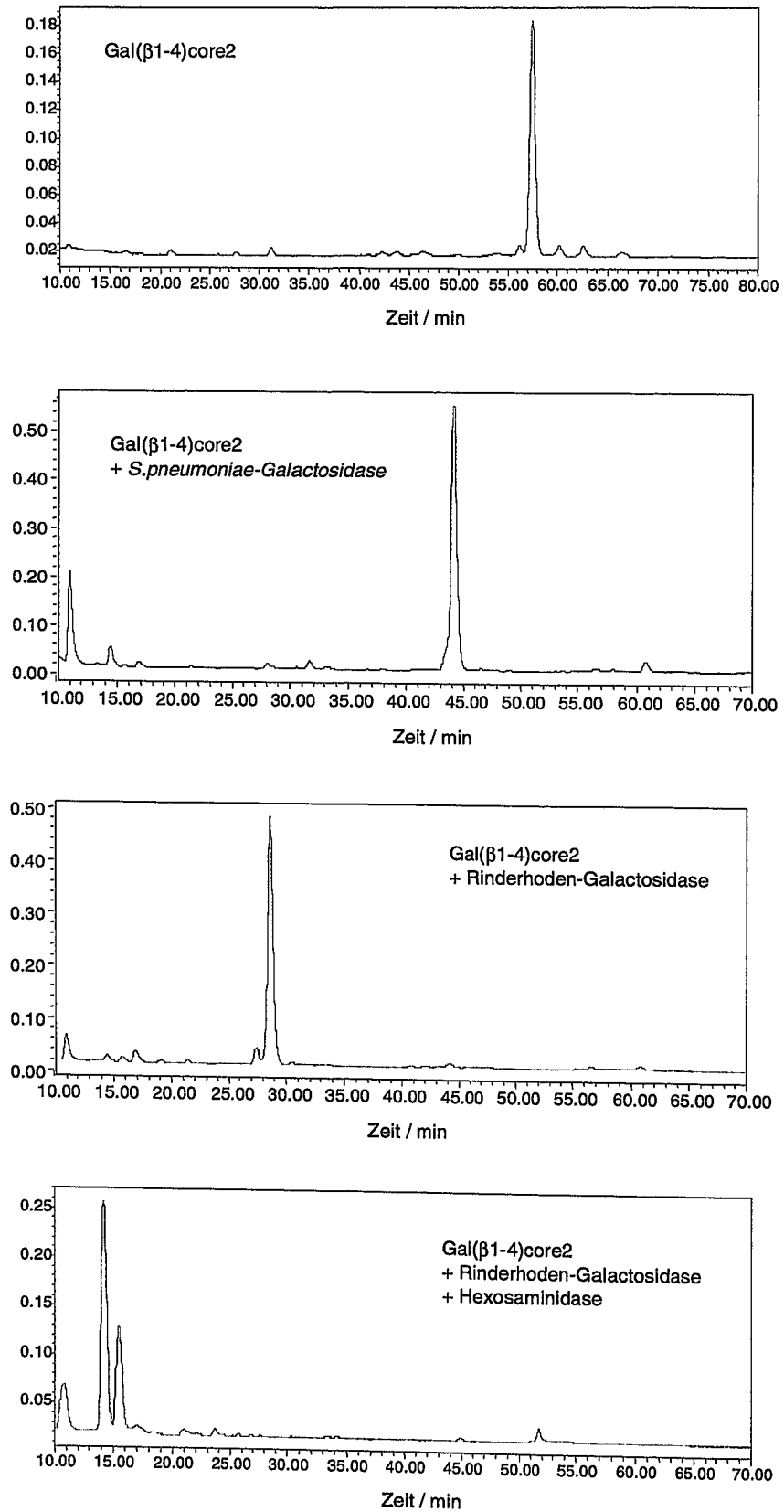


Abb. 6.11: O-Glycan-profiling zur Analyse der Gal(β1-4)core2-Struktur

6.4 Zusammenfassung

- Das Peptidfragment MUC1a' ist ein sehr gutes Substrat für die GalNAc-Transferase 3, die im Rahmen dieser Arbeit fermentiert und aufgereinigt wurde. Folglich konnte das GalNAc-Peptid mit einer Ausbeute von 95% erzeugt werden. Es wurden insgesamt 150 mg synthetisiert und aufgereinigt.
- Das PSGL-1-Peptid konnte mit der GalNAc-Transferase 3 nicht glycosyliert werden, da es faktisch kein Substrat für dieses Enzym ist.
- Die core2-Struktur konnte mit dem Galactosidase/GlcNAcT-System auf dem MUC1a'-GalNAc-Glycopeptid mit 30%iger Ausbeute aufgebaut werden. Überraschenderweise wird die core2-Struktur nicht in einer Folgereaktion zu core6 hydrolysiert. Diese präparative Synthese wurde erst durch die vorherige Optimierung des Reaktionssystems mittels der Modellkomponente GalNAc-Bn möglich. Unseres Wissens ist dies das erste Beispiel einer Transglycosylierung zur Darstellung *O*-glycosidischer Strukturen am Peptid. Es konnten insgesamt 23 mg des core2-Peptids aufgereinigt werden.
- Das Galactosidase/SiaT-System ist ebenfalls zur Synthese von core-Strukturen an Peptiden geeignet. Da sich die Zielstruktur auf kürzerem Weg mit dem oben genannten System erzeugen ließ, wurde auf eine präparative Anwendung verzichtet.
- Aufbauend auf MUC1a'-core2 wurde die Sialyl-Lewis^x-Struktur durch den Einsatz dreier kommerziell erhältlicher Glycosyltransferasen synthetisiert. Jedes der drei Glycopeptide wurde im Milligramm-Maßstab für Strukturuntersuchungen aufgereinigt.
- Die Gesamtausbeute über alle fünf enzymatischen Stufen betrug 23%.

7 Herstellung eines Bausteins für die chemische Glycopeptidsynthese¹

Parallel zur enzymatischen Glycosylierung von Peptiden wurde eine alternative Route zur Herstellung von Glycopeptiden untersucht. Dabei sollte zuerst eine Zuckerstruktur auf einer Aminosäure aufgebaut werden, um diese dann mittels Festphasensynthese in ein Peptid zu integrieren.

Die in den sechziger Jahren von Merrifield entwickelte Festphasensynthese (Merrifield, 1963) wird heute in Syntheseautomaten routinemäßig zur Herstellung von Peptiden eingesetzt. Dabei gelang es, auch Mannose-, GlcNAc- und GalNAc-verknüpfte Aminosäuren einzusetzen (Gururaja *et al.*, 1996; Klich *et al.*, 1997; Schleyer *et al.*, 1997; St. Hillaire *et al.*, 1998). Die so hergestellten Glycopeptide konnten nach dem Entschützen enzymatisch glycosyliert werden (Unverzagt *et al.*, 1990; Unverzagt *et al.*, 1994; Seitz und Wong, 1997). Bei den so erzeugten Strukturen handelte es sich allerdings in keinem Fall um natürliche Glycoside, da auch hier die nötigen Enzyme zur Synthese der core-Strukturen nicht zur Verfügung standen.

Zur chemischen Synthese natürlicher Glycopeptide müssen die Glycane an der geschützten Aminosäure aufgebaut werden (Schuster *et al.*, 1994). So wurde die Darstellung einer Reihe O-glycosidischer core-Strukturen publiziert (Paulsen *et al.*, 1995; Meinjohanns *et al.*, 1996; Qiu und Koganty, 1997a; Qiu und Koganty, 1997b). Die Nachteile chemischer Synthesen sind der hohe Aufwand und die geringen Ausbeuten: Während die core1-Struktur ausgehend vom GalNAc-Konjugat noch in bestenfalls 50% Ausbeute dargestellt werden konnte (Satyanarayana *et al.*, 1998), wurde das Trisaccharid core2 nur noch in maximal 28% Ausbeute gewonnen (Mathieux *et al.*, 1997). Abbildung 7.1 verdeutlicht die Komplexizität der Synthese.

Während die chemische Glycosidsynthese also nach wie vor sehr aufwendig ist und niedrige Ausbeuten liefert, wird die Peptid-Festphasensynthese durch den Einsatz glycosylierter Aminosäuren nicht notwendigerweise in ihrer Effizienz beeinträchtigt. So konnten Guo *et al.* ein Asparagin-verknüpftes N-Glycosid mit einer Ausbeute von 98% an ein Peptid koppeln (Guo *et al.*, 1997).

¹ Diese Ergebnisse entstanden in einem Projekt mit dem Arbeitskreis von Professor Kunz in Mainz. Die praktischen Arbeiten wurden in Kooperation mit Frau Dipl.-Chem. Nicole Bézay durchgeführt.

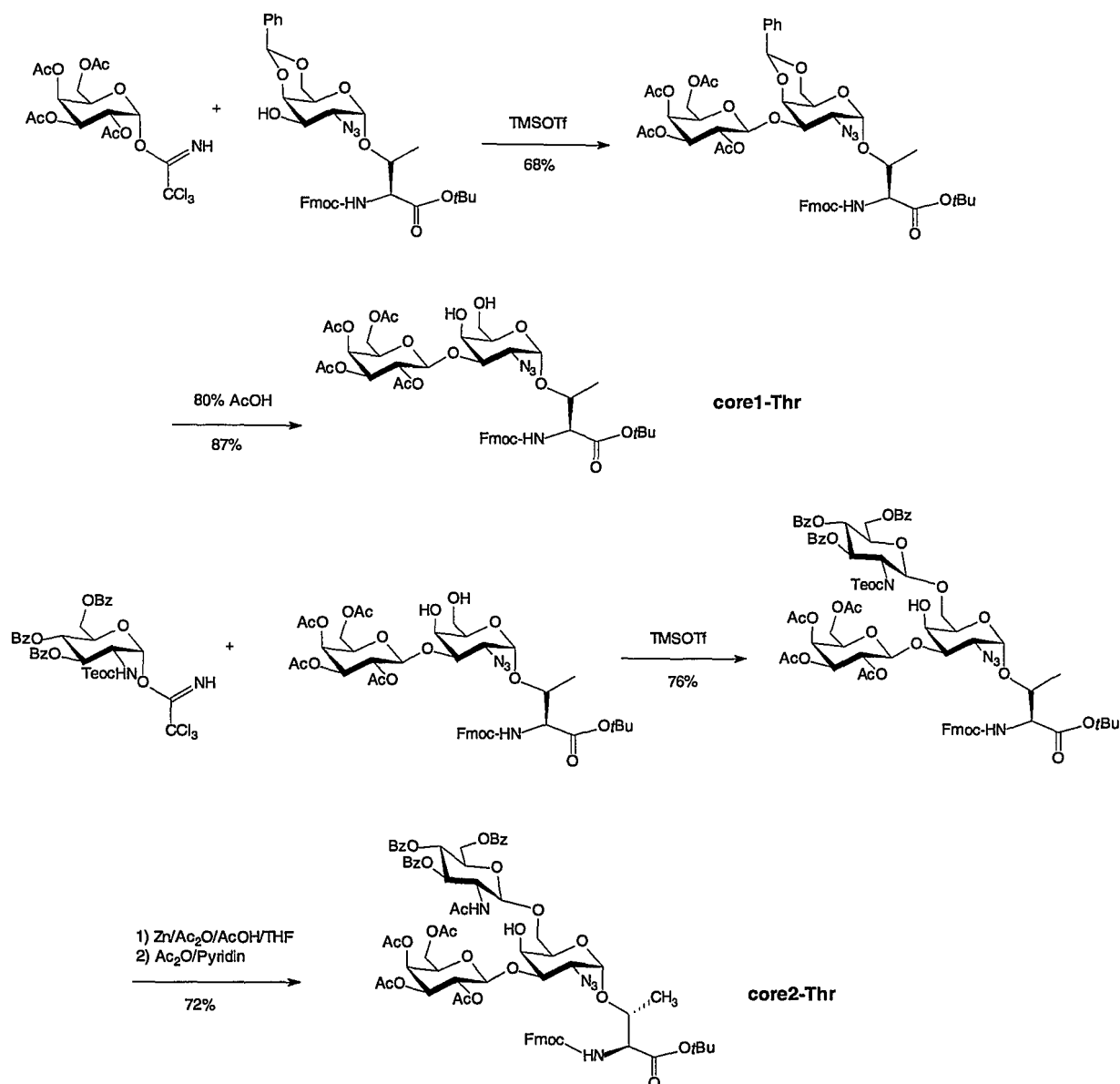


Abb. 7.1: Chemische Synthese von core2-Thr nach (Mathieux *et al.*, 1997)

Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis Prof. Kunz in Mainz werden die Vorteile der chemischen Synthese mit denen der enzymatischen Glycosylierung verbunden:

- **Der Einsatz der Festphasen-Peptidsynthese erlaubt die hochflexible Implementierung glycosylierter Aminosäuren mit sehr guten Ausbeuten.** Es können etwa *O*-Glycoside an Peptiden aufgebaut werden, die nicht von GalNAc-Transferasen als Substrate akzeptiert werden. (Der Aufbau von *N*-Glycosiden wird so überhaupt erst möglich, da der Großteil der nötigen Glycosyltransferasen für diese core-Strukturen nicht zur Verfügung stehen.)
- **Zuckerstrukturen können enzymatisch bedeutend effektiver und schneller aufgebaut werden.** Dabei sollen die optimierten Mehrenzzymsysteme zur Synthese *O*-glycosidischer

core-Strukturen eingesetzt werden. Da die core-Struktur-Synthese am Peptid einerseits mit deutlich reduzierten Ausbeuten verläuft (vgl. Kap. 6.2), andererseits aber auch komplexe Zuckerkonjugate mittels Festphasensynthese in Peptide integriert werden können, sollte die Synthese an der geschützten Aminosäure erfolgen.

Als Zielkomponente der enzymatischen Synthese wurde die Sialyl-core1-Struktur an Threonin gewählt (7-8). Dieses Aminosäure-Glycosid kann durch den kombinierten Einsatz von β -Galactosidase und α 2,3-O-Sialyltransferase synthetisiert (vgl. Kap. 5.5) und anschließend in einer chemischen Festphasensynthese in ein MUC4-*tandem repeat*-Fragment implementiert werden.¹ Die Gesamtsyntheseplanung ist in Abbildung 7.2 dargestellt.

Da Sialyl-T-substituiertes MUC4 ein tumorassoziiertes Antigen bei Leukämie ist (vgl. Kap.1.1.3), soll die Zielstruktur auf ihre Eignung als Impfstoff untersucht werden. Ziel ist die Entwicklung synthetischer Vakzine, die das Immunsystem gegen die von ihnen präsentierten Strukturen stimulieren.

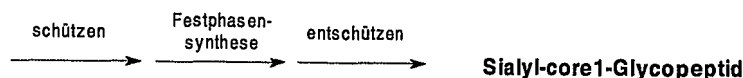
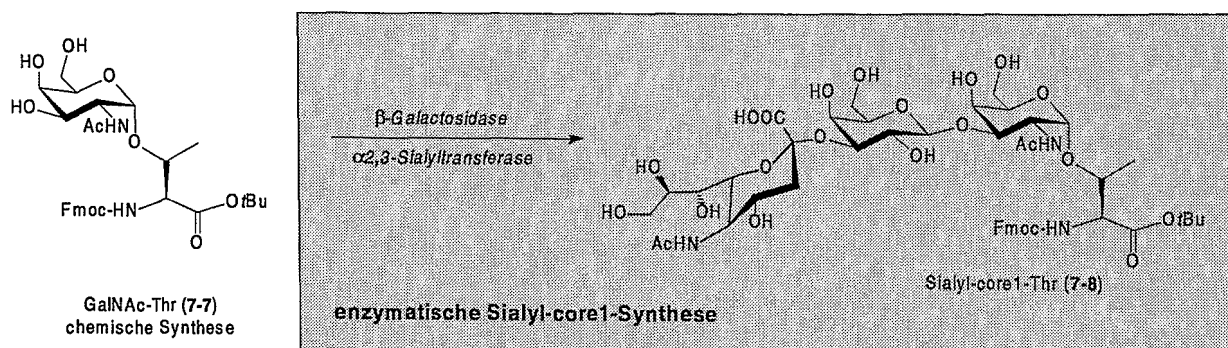


Abb. 7.2: Syntheseplan zur Darstellung eines Sialyl-core1-Glycopeptids die grau unterlegte enzymatische Synthese wurde im Rahmen der Promotionsarbeit durchgeführt.

7.1 Chemische Synthese des GalNAc-Thr-Bausteins

Die Synthese des GalNAc-Thr-Bausteins wurde von Frau Bézay in Mainz durchgeführt. Das Produkt (7-7) konnte in 25%iger Gesamtausbeute isoliert werden. Abbildung 7.3 resumiert die chemische Synthese, die von Liebe und Kunz 1997 publiziert wurde.

¹ MUC4-*tandem repeats* weisen die folgende Sequenz auf: TSSASTGHATPLPVTD (Gendler und Spicer, 1995). Es enthält somit eine Reihe potentieller Glycosylierungspositionen (T – Threonin; S – Serin). Verschiedene Glycopeptid-Regioisomere könnten somit in biologischen Tests auf ihre Eignung als Impfstoff getestet werden.

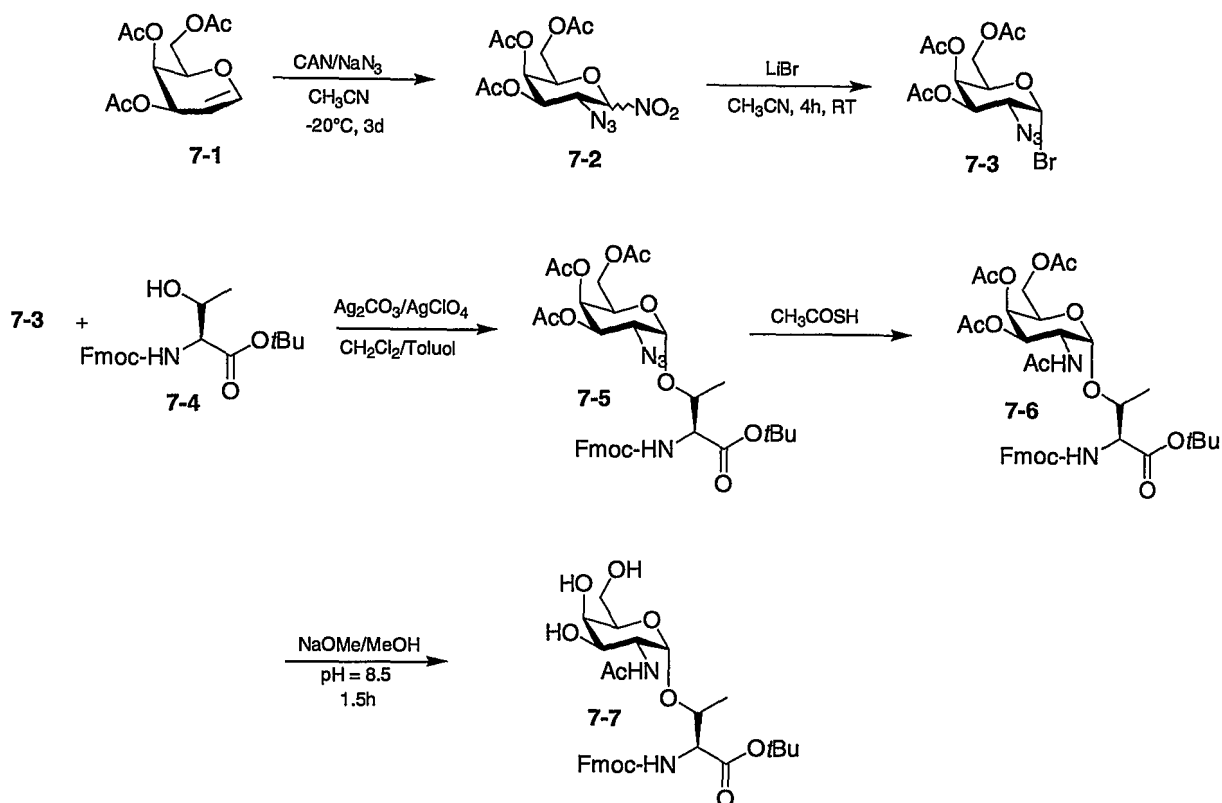


Abb. 7.3: Chemische Synthese von GalNAc-Thr (7-7)

7.2 Einsatz von Cyclodextrinen als Lösungsvermittler

Bei ersten Versuchen zur Glycosylierung des geschützten GalNAc-Thr-Akzeptors wurde deutlich, daß die Löslichkeit dieses Substrats von nur 1 mM ein beträchtliches Problem darstellt. Zur Steigerung dieses Wertes mußte somit ein Löslichkeitsvermittler eingesetzt werden. Denkbar sind in einem solchen Fall organische, mit Wasser mischbare Lösungsmittel. Die β -Galactosidase aus *E.coli* konnte zum Beispiel erfolgreich in einem Wasser/Acetonitril-Gemisch eingesetzt werden (Usui *et al.*, 1993). Ajisaka und Mitarbeitern gelang die Glycosylierung einer geschützten Aminosäure mit einer Ausbeute von 23%, da die verwendete Galactosidase Dimethylformamid als Cosolvens toleriert.¹ Eine weitere Möglichkeit stellt der Einsatz hydrophobisierter Enzyme in Zweiphasensystemen dar (Okahata und Mori, 1996; Mori *et al.*, 1997). Es ist allerdings kein Lösungsmittel bekannt, das von der β -Galactosidase aus Stierhoden oder der in Kombination eingesetzten $\alpha 2,3$ -N-Sialyltransferase toleriert wird. Alternativ wurde der Einsatz von Cyclodextrinen als Lösungsvermittlern untersucht.

Cyclodextrine sind zyklische, $\alpha 1,4$ -verknüpfte Glucose-Oligomere, die beim bakteriellen Abbau von Stärke entstehen. Dabei werden Hexamere als α -, Heptamere als β -Cyclodextrine

¹ Suzuki *et al.*, 1997 – hierbei handelt es sich um eine β -Galactosidase aus *B.circulans*, die in *E.coli* exprimiert wurde.

bezeichnet und so fort. Cyclodextrine wurden erstmals 1891 von Villiers isoliert (Villiers, 1891), aber erst später von Schardinger als Glucose-Zyklen erkannt (Schardinger, 1903). Sie werden mit isolierten mikrobiellen Enzymen produziert (Kobayashi, 1975; Hayashida und Kawakami, 1992)

α -Cyclodextrin bildet stabile Einschlußverbindungen mit Alkylketten. Während Benzol für das Hexamer zu groß ist, können Derivate komplexiert werden, indem sich das Cyclodextrin über einen Substituenten schiebt. β -Cyclodextrin lagert bereits sperrige Benzol-Derivate wie Naphthalin oder eben die hier verwendete Fmoc-Schutzgruppe ein, während γ -Cyclodextrin polyannelierte Ringsysteme, etwa Steroide, komplexieren kann. Reviews zu Cyclodextrinen finden sich bei French, 1957; Saenger, 1980; Wenz, 1994.

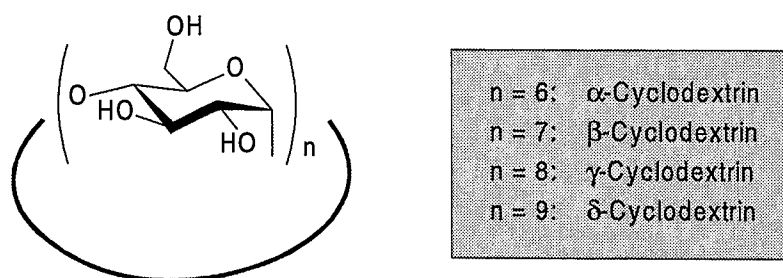


Abb. 7.4: Cyclodextrine

Die Einsatzmöglichkeiten für Cyclodextrine sind vielfältig: Da sie quasi nicht toxisch sind, können sie zur Formulierung von Pharmaka und Kosmetika sowie in der Lebensmitteltechnologie genutzt werden. Als stationäre Phasen zur Trennung in Flüssig- und Gaschromatographie werden sie seit fünfzehn Jahren eingesetzt. Anfang der neunziger Jahre wurden erstmalig enzymatische Synthesen mit Cyclodextrinen als Lösungsvermittler publiziert (Otero *et al.*, 1991; Woerdenbag *et al.*, 1991), in einem der Fälle eine Glucosidase-katalysierte Hydrolyse (Pekic und Lepojevic, 1991). Weitere Biotransformationen folgten (Matahira *et al.*, 1995; Murata *et al.*, 1996; Murata und Usui, 1997; Zelinski und Kula, 1997; Zelinski *et al.*, in Druck).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Cyclodextrine bezüglich ihrer Fähigkeiten als Komplexbildner des Fmoc-geschützten GalNAc-Threonin-Konjugats untersucht. Da die methylierten Derivate in der Regel stärker komplexieren als ihre unsubstituierten Analoga (Casu *et al.*, 1979), wurde bei den Lösungsversuchen 2,6-dimethyliertes β -Cyclodextrin¹ verwendet. Ferner stand ein Hydroxypropyl-Derivat zur Verfügung.² Mit γ -

¹ Heptakis-(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin

² Das Hydroxypropyl- β -cyclodextrin ist statistisch substituiert und trägt im Mittel einen Rest pro Glucose-Monomer.

Cyclodextrin wurde zusätzlich eine größere Kavität angeboten. Abbildung 7.5 zeigt die Substratlöslichkeit als Funktion der Cyclodextrin-Konzentrationen. Während die Löslichkeit des Hydroxypropyl- β -Cyclodextrins auf etwa 100 mM begrenzt ist, wurde die Löslichkeitsgrenze der beiden anderen nicht erreicht.

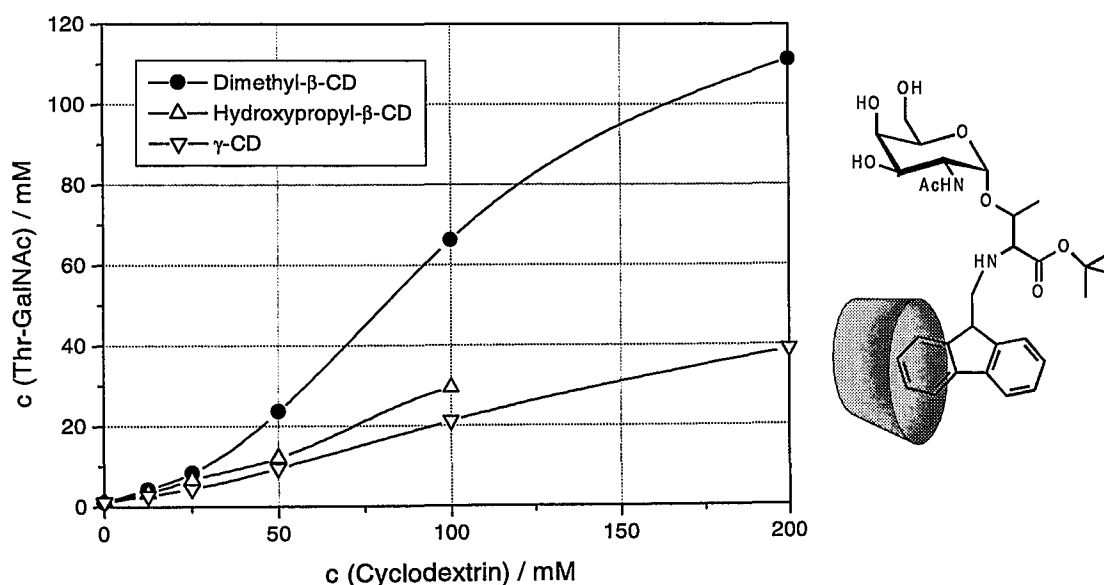


Abb. 7.5: Steigerung der Akzeptor-Löslichkeit durch Cyclodextrine (50 mM MES; pH 6,5); links: Löslichkeit in Abhängigkeit der Cyclodextrin-Konzentration; rechts: schematische Darstellung der Komplexbildung des Fmoc-Restes durch Cyclodextrine

Die besten Ergebnisse wurden mit Dimethyl- β -cyclodextrin erzielt. In einer 200 millimolaren Lösung konnte die Löslichkeit des GalNAc-Thr-Substrats um mehr als das einhundertfache gesteigert werden.

7.3 Glycosylierung der Cyclodextrin-Einschlußverbindung

Nachdem das Akzeptorsubstrat erfolgreich in Lösung gebracht werden konnte, wurde dessen Verfügbarkeit für die β -Galactosidase untersucht. Der Test fiel positiv aus: Der K_M -Wert von 17 mM ist günstiger als der für die Modellkomponente GalNAc-Bn (**5-1**) von 50 mM, die maximale Aktivität (v_{max}) beträgt jedoch nur 25%¹ (Abb. 7.6). Zusätzlich wurde die Bildung eines Regioisomers mit etwa 40% der Geschwindigkeit der core1-Thr-Synthese beobachtet. Eine derart eingeschränkte Regioselektivität wurde weder bei der Galactosylierung des GalNAc-Bn-Substrats noch bei der core1-Synthese am Peptid beobachtet.

¹ Für die Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsmessungen wurde eine Galactosidase-Aktivität von 500 mU/mL bezogen auf den Standardassay eingesetzt (Citratpuffer, pH 4,3). Diese Aktivität entspricht einem v_{max} -Wert von 240 mU/mL für die Transglycosylierung von GalNAc-Bn mit Lactose in MES-Puffer (pH 6,5).

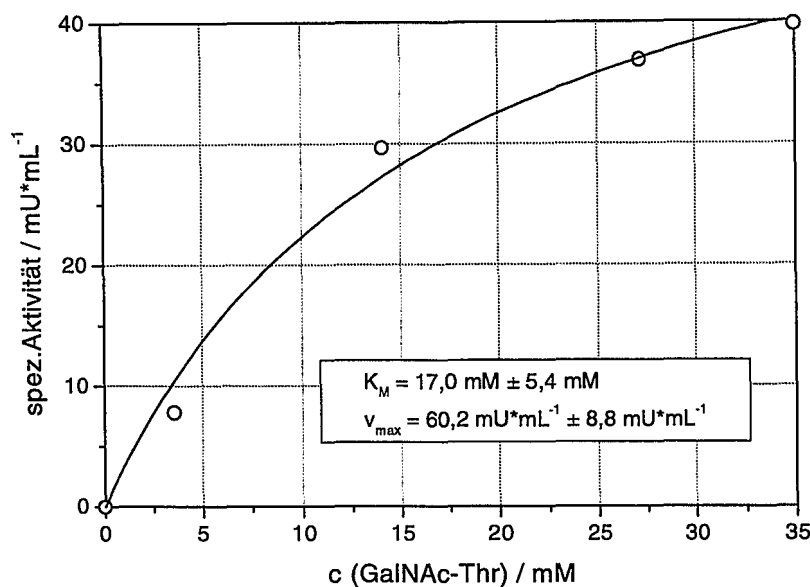


Abb. 7.6: Galactosidase-Aktivität als Funktion der GalNAc-Thr/Cyclodextrin-Konzentration
(0,5 M Lac; 50 mM MES; pH 6,5; 37°; $c[\text{GalNAc-Thr}]/c[\text{Cyclodextrin}] = 1/2$)

Es folgten Tests mit dem Galactosidase/Sialyltransferase-System, wobei wiederum in einer Versuchsreihe das optimale Aktivitätsverhältnis für die Enzyme gesucht wurde. Problematisch war die schnelle Desaktivierung der Sialyltransferase. Durch Nachdosierung dieses Enzyms konnte das Produkt bei insgesamt sehr hohen spezifischen Enzymaktivitäten mit 70% Ausbeute innerhalb von zwei Tagen synthetisiert werden. Die präparativen Synthesen, die mit geringeren Aktivitäten inkubiert wurden, erreichten Ausbeuten von 50%. Insgesamt konnten 120 mg der sialylierten core1-Struktur hergestellt und mittels präparativer HPLC isoliert werden. Abbildung 7.7 zeigt einen typischen Satzreaktor-Verlauf.

Das Glycan muß durch Acetylierung der OH-Gruppen und Methylierung der Carboxylgruppe geschützt werden, bevor es zur chemischen Glycopeptid-Festphasensynthese eingesetzt werden kann (Seitz und Kunz, 1997).

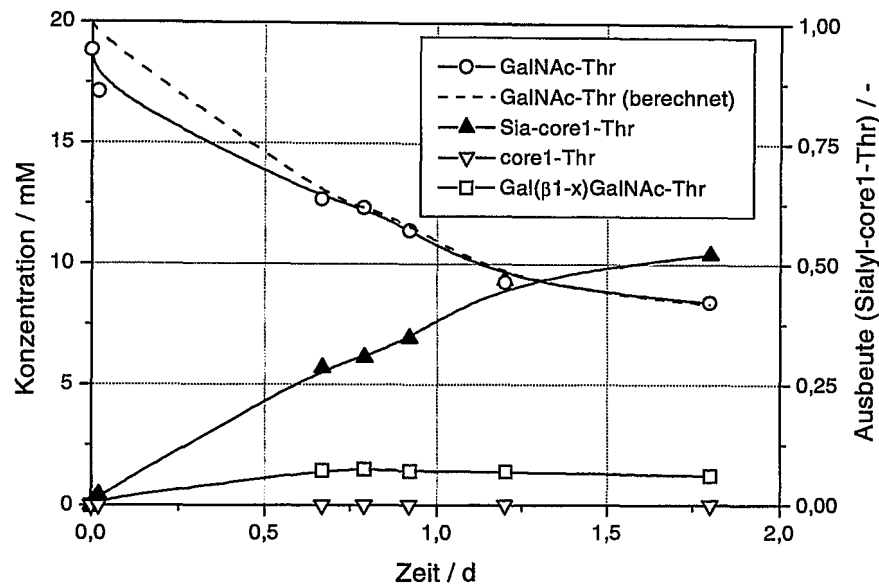


Abb. 7.7: Präparative Sialyl-core1-Thr-Synthese

(0,5 M Lac; 20 mM GalNAc-Thr; 40 mM Dimethyl-β-cyclodextrin; 25 mM CMP-Neu5Ac; 1 U/mL Galactosidase; 0,2 U/mL SiaT; 10 U/mL CIAP; 50 mM MES; pH 6,5)

7.4 Zusammenfassung

- In Kooperation mit dem Arbeitskreis Prof. Kunz in Mainz wurde eine chemoenzymatische Glycopeptidsynthese entwickelt, die die Vorteile des chemischen wie des enzymatischen Verfahrens vereint.
- Da die geschützte Aminosäure nahezu unlöslich in Wasser ist, wurden Cyclodextrine als Lösungsvermittler eingesetzt. Mit Dimethyl-β-cyclodextrin konnte die Löslichkeit des Substrats um das 100-fache gesteigert werden.
- Unter Einsatz des in Kapitel 5.5 beschriebenen Galactosidase/Sialyltransferase-Systems konnte die geschützte Aminosäure mit einer Sialyl-core1-Struktur präparativ mit 50%iger Ausbeute gewonnen werden. Die maximale Ausbeute lag bei 70%. Es konnten 100 mg isoliert werden.
- Das Produkt soll durch eine chemische Festphasensynthese in eine MUC4-*tandem repeat*-Sequenz implementiert und in biologischen Tests auf seine Eignung als Impfstoff gegen Leukämie getestet werden.

„Wieviel in der Welt auf Vortrag ankommt, kann man schon daraus ansehen, daß Wein, aus Kaffeetassen getrunken, ein sehr elendes Getränk ist.“

Georg Christoph Lichtenberg

8 Diskussion und Ausblick

In diesem Kapitel soll eine abschließende Bewertung unter den folgenden Aspekten erfolgen:

- Stärken und Limitierungen der in dieser Arbeit entwickelten Methoden
- Vergleich der Leistungsfähigkeit dieser Methoden mit etablierten Techniken
- Perspektiven für weiterführende Arbeiten

8.1 Beurteilung des Projekterfolgs

Ohne eine Zusammenarbeit mit zellbiologisch und analytisch tätigen Arbeitskreisen im Rahmen des EU-Projekts wäre diese Arbeit nicht realisierbar gewesen. Entscheidend für das Gelingen dieser Arbeit war dabei die Bereitstellung einer Reihe nicht kommerziell erhältlicher Enzyme. Aber auch käufliche Glycosyltransferasen wie die $\alpha 2,3$ -*O*-Sialyltransferase sind so teuer, daß deren Einsatz für umfangreiche kinetische Studien nur unter erheblichem finanziellen Aufwand möglich ist.¹ Ebenso wichtig war die Unterstützung bei der Identifizierung der Produkte: Das *O*-Glycan-*profiling*, eine Methode für Abspaltung, Abbau und chromatographische Analyse der *O*-Glycane, wurde erst im Rahmen dieses Projekts von der Oxforder Arbeitsgruppe entwickelt (vgl. Kap. 10.7).

Bei der Beurteilung der eigenen Arbeiten kann festgestellt werden, daß das Ziel des EU-Projekts im *in vitro*-Bereich prinzipiell erreicht wurde: Die enzymatische Synthese natürlicher *O*-Glycoside wurde beispielhaft durch den Aufbau eines Sialyl-Lewis^x-Hexasaccharids an einem MUC1-Peptidfragment demonstriert. Die Synthese der core-Struktur am Peptid durch die Einbindung einer Galactosidase-katalysierten Transglycosylierung gelang unseres Wissens hiermit erstmalig. Das einzige Ziel, das im Projektzeitraum von drei Jahren nicht realisiert werden konnte, war die Glycosylierung eines PSGL-1-Peptids.

Die sehr erfolgreiche Zusammenarbeit der am EU-Projekt beteiligten Institute wird voraussichtlich im Rahmen einzelner Promotionen oder eines Folgeprojekts weitergeführt werden. Statt einer einzelnen Zielstruktur soll dabei ein Spektrum von Glycopeptidstrukturen dargestellt werden. Ferner wird die Vermarktung von Glycosyltransferasen und Glycopeptiden diskutiert.

¹ Ein *unit* der Sialyltransferase kostet bei der Firma Calbiochem 1800 DM.

8.2 Bereitstellung der Glycosyltransferasen

8.2.1 Fermentation der GalNAc-Transferase 3

Die Glycosyltransferase GalNAcT3 wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit durch Infektion von Insektenzellen mit rekombinanten Baculoviren gewonnen. Dabei konnte eine gute Expressionsrate von 7,5 U/L erzielt werden, die mit anderen tierischen Zellkultursystemen wohl nur schwer zu erreichen ist (vgl. Kap. 3.1). Dennoch wurde dieses Enzym von der Copenhagener Arbeitsgruppe inzwischen in CHO-Zellen exprimiert.¹ Dem größeren Aufwand bei der Transfektion der Zellen sowie den oft geringeren Expressionsraten stehen klare Vorteile bei der Fermentation gegenüber. Werden durch stabile Transfektion CHO-Clone gewonnen, die die Fremd-DNA in ihr Genom integriert haben, so können diese nahezu beliebig oft passagiert werden.

Die Vermehrung der rekombinanten Baculovirus-DNA ist weitaus aufwendiger. Bei der Infektion der Insektenzellen müssen niedrige Virenkonzentrationen gewählt werden, um eine Degeneration der DNA zu vermeiden. Da die Virenproduktion jedoch nicht von der Produktion des Fremdproteins entkoppelt werden kann, ist die Kultur *per se* nicht stabil. CHO-Kulturen können dagegen sehr gut in kontinuierlicher Kultur gehalten werden. Bei der Produktion der β 1,6-GlcNAc-Transferase wurde dies im Rahmen des EU-Projekts demonstriert (Zeng *et al.*, 1997).

Als Produktionssysteme werden in Zukunft jedoch aller Voraussicht mikrobielle Systeme etabliert werden. Die Expressionsraten von Pilz- und Bakterienkulturen erreichen oft Größenordnungen von mehreren hundert *units* pro Liter (Elling, 1999). Tierische Zellkulturen werden in Zukunft möglicherweise nur noch zur Proteinherstellung genutzt werden, wenn die natürlichen Glycosylierungsmuster entscheidend für die Funktionalität sind. Bei Glycosyltransferasen ist dies nicht der Fall.

8.2.2 Aufreinigung der β 1,6-GlcNAc-Transferase

Mittels der IgG-Affinitätschromatographie konnte das Enzym sehr einfach und schnell funktionsrein gewonnen werden. Trotz der genannten Vorteile sollte bei einer Vermarktung dieses Enzyms eine Alternativtechnik zur Aufreinigung in Erwägung gezogen werden, da die Antikörper sehr teuer und die daraus hergestellten Chromatographieharze sehr empfindlich sind. Trotz vorgeschalteter Ultrafiltration wurde das IgG-Harz durch die Enzymlösung so stark des-

¹ Durch den Einsatz kontinuierlicher Kulturtechnik konnten im Institut für Biotechnologie inzwischen 300 *units* der GalNAcT3 aus CHO-Zellen gewonnen werden (Eisenkrätzer, 1999).

aktiviert, daß es nach fünf bis sechs Zyklen ausgetauscht werden mußte. Eine Alternative bietet die Anwendung konventioneller, robusterer Ionentauscherharze.¹

8.3 Synthese und Aufreinigung von Nucleotidzuckern

8.3.1 Bewertung der Synthese von GDP-Fucose

GDP-Fucose konnte durch eine chemische Synthese von nur zwei Stufen hergestellt werden (vgl. Kap. 4.1). Die isolierte Ausbeute von etwa 10% ist zwar vergleichsweise niedrig, dafür konnte jedoch der Aufwand für Synthese und Trennoperationen minimiert werden. Zudem kann beim Einsatz eines flüchtigen Puffers für die Ionentauschchromatographie auf die abschließende Nanofiltration verzichtet werden (vgl. Kap. 4.2). Man erhält ein zwar salzhaltiges, aber ansonsten reines Produkt, das als Substrat für Fucosyltransferasen geeignet ist.

Das Verfahren komplementiert die etablierten Synthesen, da es sehr gut zur schnellen Herstellung kleinerer Nucleotidzucker-Mengen bis in den Gramm-Maßstab geeignet ist. Aufgrund der unkomplizierten Synthesetechnik ist es besonders für biochemisch und biotechnologisch ausgerichtete Arbeitsgruppen geeignet.

8.3.2 Einsatz der Nanofiltration zur Aufreinigung von Feinchemikalien

In Verbindung mit der Ionentauschchromatographie ist die Nanofiltration eine effiziente Methode zur Aufreinigung von Nucleotidzuckern. Beide Aufreinigungsschritte sind zudem zur Maßstabsvergrößerung geeignet.

Für die Aufreinigung der CMP-Neuraminsäure konnte am Institut für Biotechnologie alternativ eine fraktionierte Fällung mit Methanol und Diethylether direkt aus der Reaktionslösung entwickelt werden (nach Martin und Schmidt, 1993). Dadurch entfällt der aufwendige chromatographische Schritt. Für Produkte, bei denen dies nicht möglich ist, wie zum Beispiel GDP-Mannose, konnte die hier untersuchte Methode im Gramm-Maßstab eingesetzt werden (Fey, 1997; Dudziak *et al.*, 1999). Auch zur Isolierung kleiner Produktmengen im Milligramm-Bereich, oft zu wenig für Fällungsversuche, ist die Nanofiltration sehr geeignet. So konnten 60 mg GDP-Fucose mit derselben Membran aufgereinigt werden wie die chemisch ähnliche GDP-Mannose. Zur Maßstabsverkleinerung konnte zudem ein geeignetes *cross flow*-Modul gefunden werden.

Eine weitere Einsatzmöglichkeit im thematischen Bereich dieser Arbeit ergibt sich bei der enzymatischen Glycosylierung von Peptiden (vgl. Kap. 6): Die Zwischenprodukte der ersten und zweiten Reaktionsstufe wurden chromatographisch gereinigt, da eine Reihe von Komponenten abgetrennt werden mußten:

¹ Für 530 DM erhält man bei Pharmacia wahlweise 10 mL IgG-Sepharose Fast Flow oder knapp 500 mL DEAE Sepharose Fast Flow.

- **Salze** der unterschiedlichen Pufferlösungen
- **Monosaccharide**, die im Galactosidase/GalNAc-Transferase-System durch Hydrolyse der in 0,5 molarer Konzentration eingesetzten Lactose entstehen.

Gelänge dies durch Nanofiltration, so könnten zwei chromatographische Schritte eingespart werden. Der vereinfachte Prozeß zur Glycosylierung von MUC1a' ist in Abbildung 8.1 dargestellt.¹

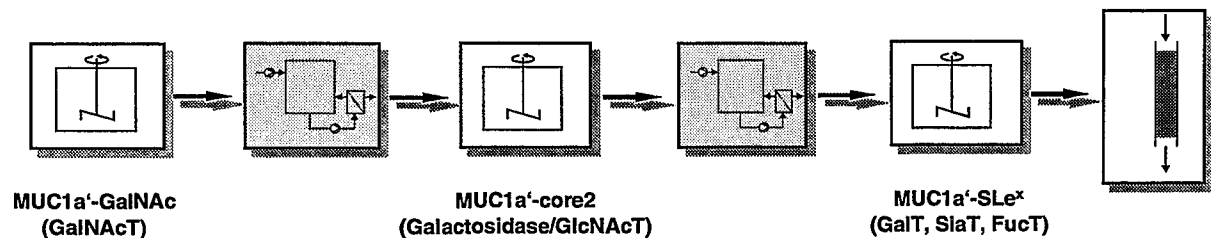


Abb. 8.1: Nanofiltration in der Glycopeptidsynthese – Substitution chromatographischer Trennoperationen durch Membranprozesse

Zur Bewertung der Einsatzmöglichkeiten der Nanofiltration wurden Retentionsmessungen mit MES-Puffer, Glucose, MUC1a'-Peptid sowie dem MUC1a'-GalNAc-Glycopeptid im *Mini-cross flow*-Modul durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8.2 wiedergegeben.

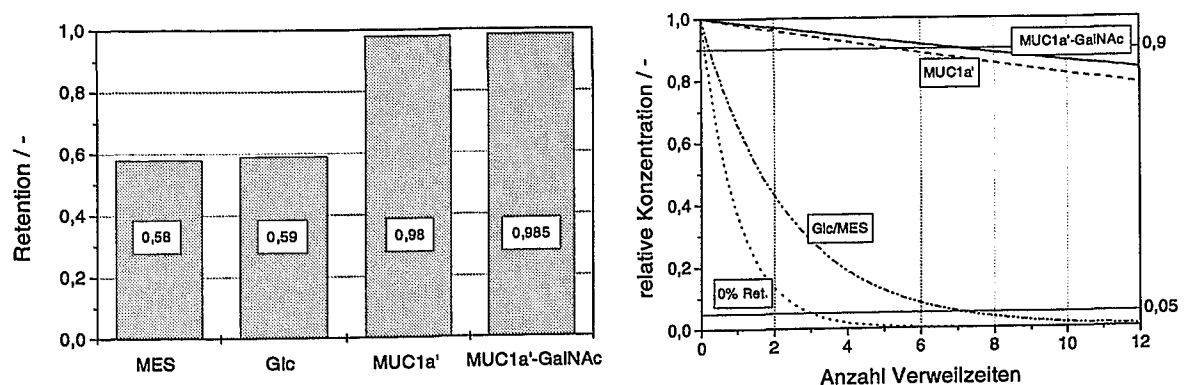


Abb. 8.2: Membrangestützte Aufreinigung von Glycopeptiden; Retentionsmessungen (links, MX07, 4°C) und simulierte Ausspülung der Reaktionskomponenten (rechts)

Die Retention des linearen Peptids ist zwar mäßig, für das verzweigte GalNAc-Analogon wurde jedoch mit 0,985 bereits ein Wert gefunden, der eine Abreicherung von Monosaccha-

¹ Die Enzyme können in der Reaktionslösung verbleiben, lediglich die Galactosidase müßte vor dem Einsatz der Galactosyltransferase durch eine Ultrafiltration abgetrennt werden.

riden und Pufferionen realistisch erscheinen läßt. Eine Simulation des Ausspülvorgangs zeigt, daß eine Verringerung des Monosaccharidgehalts auf 5% der Ausgangskonzentration bei 90%iger Ausbeute des GalNAc-Peptids möglich sein sollte.

Bei einer anschließenden Diafiltration wurde die Aufreinigung von MUC1a'-GalNAc aus der Reaktionslösung untersucht. Tris-Puffer zeigte mit einer Retention von 0,66 ein ähnliches Verhalten wie MES-Puffer, für das Produkt tat sich jedoch eine Bilanzlücke auf: Einerseits nahm die Konzentration des Glycopeptids im Retentat deutlich ab, andererseits konnte es nicht im Permeat wiedergefunden werden. Die Retention betrug 0,984 und entsprach somit dem Erwartungswert. Das Diafiltrationsexperiment ist in Abbildung 8.3 wiedergegeben.

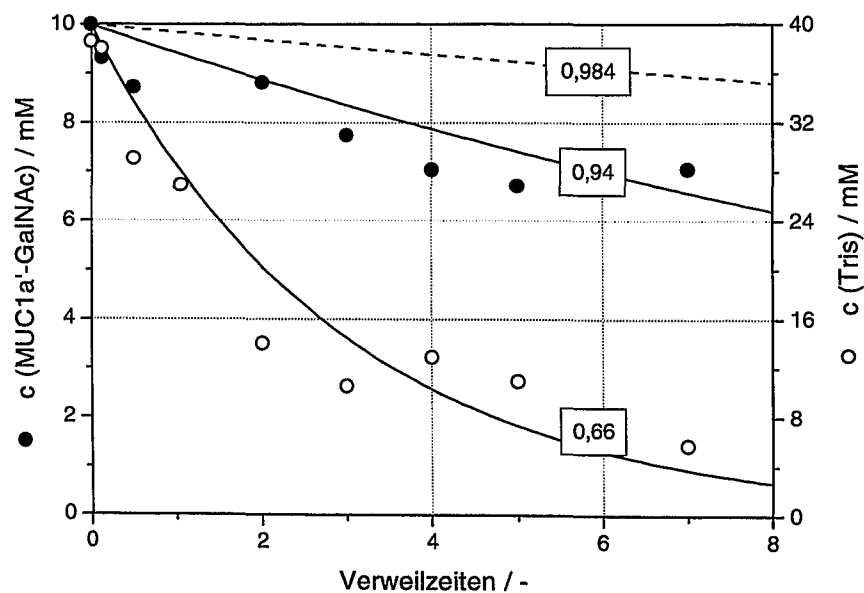


Abb. 8.3: Diafiltrationsexperiment zur Aufreinigung von Glycopeptiden; gestrichelte Linie: mittlere gemessene Retention für MUC1a'-GalNAc (MX07; 4°C)

Die Bilanzlücke wurde wahrscheinlich durch Adsorption des Glycopeptids an der Membran hervorgerufen. Da das Problem jedoch nicht durch Vorbelegung der Membran mit BSA gelöst werden konnte, wären umfangreichere Untersuchungen notwendig. Zum Beispiel könnten in einem erneuten Membranscreening Membranen gesucht werden, die sich durch eine geringe Proteinadsorption auszeichnen. Die prinzipielle Eignung der Nanofiltrationstechnik zur Aufreinigung von Glycopeptiden konnte jedoch bereits demonstriert werden.

8.4 Mehrenzysysteme zur Synthese O-glycosidischer core-Strukturen

8.4.1 Bewertung der Verfahren

Mit den hier vorgestellten Mehrenzysystemen konnten erstmalig Transglycosylierungsreaktionen zu annähernd quantitativen Ausbeuten geführt werden. Das Prinzip, das Produkt der Transglycosylierung *in situ* durch eine quasi irreversible Folgereaktion abzufangen und so dem Reaktionssystem zu entziehen, ist jedoch nicht neu. Aus diesem Grund soll das in dieser Arbeit untersuchte Galactosidase/Sialyltransferase-System (siehe Kap. 5.5) mit früheren Ansätzen verglichen werden.

Kren und Thiem sowie Herrmann *et al.* setzten Anfang der neunziger Jahre eine Galactosidase in Kombination mit einer Sialyltransferase zur Synthese von Trisacchariden ein. Die Reaktionssysteme waren komplexer als die hier untersuchten, da sie in beiden Fällen Enzyme zur Aktivierung der Neuraminsäure enthielten. Die Ausbeuten waren deutlich niedriger.¹ Das System von Herrmann *et al.* wurde bereits in Abbildung 1.9 skizziert. Im hier untersuchten System wurde CMP-Neuraminsäure in stöchiometrischen Mengen zugegeben, und zwar aus mehreren Gründen: Einerseits wurde der Nucleotidzucker im Institut für Biotechnologie mit einem effizienten enzymatischen Prozeß im Multigramm-Maßstab synthetisiert und aufgereinigt. Das Substrat stand also in hinreichender Menge zur Verfügung (vgl. Kap. 4, Abb. 4.2). Andererseits ist eine Entkopplung der Nucleotidzuckersynthese von der Oligosaccharidsynthese erforderlich, da bei der Optimierung der beiden Einzelreaktionen unterschiedliche Kriterien im Vordergrund stehen: Die CMP-Neuraminsäure-Synthese wurde im Hinblick auf ein möglichst kostengünstiges Gesamtverfahren entwickelt. Die Oligosaccharidsynthese ist jedoch nur eine von mehreren Stufen zum Aufbau O-glycosidischer Strukturen. Somit muß die Ausbeute in Bezug auf die Akzeptorkomponente maximiert werden. Der Preis des Nucleotidzuckers spielt dabei eine untergeordnete Rolle.²

Im Galactosidase/GlcNAc-Transferase-System ist der stöchiometrische Einsatz des UDP-GlcNAc notwendig, da UDP-GlcNAc chemoenzymatisch hergestellt wird. Zudem ist der Nucleotidzucker zu einem Grammpreis von 900 DM vergleichsweise preisgünstig erhältlich.

8.4.2 Verfügbarkeit der Galactosidase

Während Galactosidasen zur Knüpfung der (β 1-4)-Bindung äußerst preisgünstig in hohen Aktivitäten aus Mikroorganismen gewonnen werden können, muß das hier verwendete

¹ Die analytische Ausbeute bezogen auf das Donorsubstrat Neu5Ac betrug 45% bei Kren und Thiem. Herrmann *et al.* bestimmten die Ausbeute erst nach der Aufreinigung, sie lag bei 26%. In beiden Fällen wurde der Akzeptor im Überschuß eingesetzt. In den hier beschriebenen Systemen betrugen die Ausbeuten 90% bezogen auf den Akzeptor. Dabei wurden die Donoren im Überschuß eingesetzt, da mit Glycopeptiden sehr hochpreisige Akzeptoren umgesetzt werden sollten (vgl. die folgende Diskussion).

² Allein das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis^x – nicht verknüpft mit einem Aglycon – wird von der Firma Sigma zum Preis von 566 DM/mg angeboten.

Enzym aus Stierhoden aufgereinigt werden, weshalb der Preis eher dem von Glycosyltransferasen entspricht (vgl. Tab. 8.1).

Enzym	Preis / DM pro unit	Haupt-Regioisomer
Galactosidase (<i>B.circulans</i>)	<0,01 ^a	(β 1-4)
Galactosidase (<i>E.coli</i>)	0,04 ^b	(β 1-4)
Galactosidase (Stierhoden)	500^b	(β1-3)
β 1,4-Galactosyltransferase	60 ^b	
α 2,3-N-Sialyltransferase	1400 ^c	
α 1,3/4-Fucosyltransferase III	3700 ^c	

^a Daiwa Kasai, 1992; ^b Sigma, 1999; ^c Calbiochem, 1999

Tab. 8.1: Preise einiger Galactosidasen und Glycosyltransferasen.

Durch Clonierung der Stierhoden-Galactosidase und Expression in Bakterien oder Hefen könnten die Kosten massiv gesenkt werden. Im übrigen wurden kürzlich erstmalig mikrobielle Galactosidasen mit hoher (β 1-3)-Spezifität eingesetzt, beispielsweise ein Enzym aus *Xanthomonas manihotis* (Fujimoto, 1997). Eine β 1,3-spezifische Galactosidase aus *Bacillus circulans* konnte cloniert und in *Escherichia coli* exprimiert werden (Fujimoto *et al.*, 1998).

8.4.3 Synthese aktivierter Oligosaccharide

Einen interessanten Ansatz zur Synthese von Oligosacchariden verfolgt die Düsseldorfer Arbeitsgruppe um Dr. Elling. Durch den Einsatz von Glycosidasen und Glycosyltransferasen können aktivierte Oligosaccharide aufgebaut werden.¹ So konnte zum Beispiel die UDP-verknüpfte core1-Struktur mit der Stierhoden-Galactosidase gebildet werden. Übertrüge eine GalNAc-Transferase dieses Disaccharid, so könnte ein neuartiger Zugang zu core1-Glycopeptiden aufgezeigt werden.

Das aktivierte Disaccharid soll mit dem Galactosidase/Sialyltransferase-System synthetisiert werden. Die Neuraminsäure dient dabei als Schutzgruppe und wird im Anschluß wieder abgespalten. Die komplette Strategie ist in Abbildung 8.4 skizziert.

¹ Dieses Projekt wird von der DFG unterstützt (EL 135/4-1). Die hier beschriebenen praktischen Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dipl.-Biol. Veronika Nieder durchgeführt.

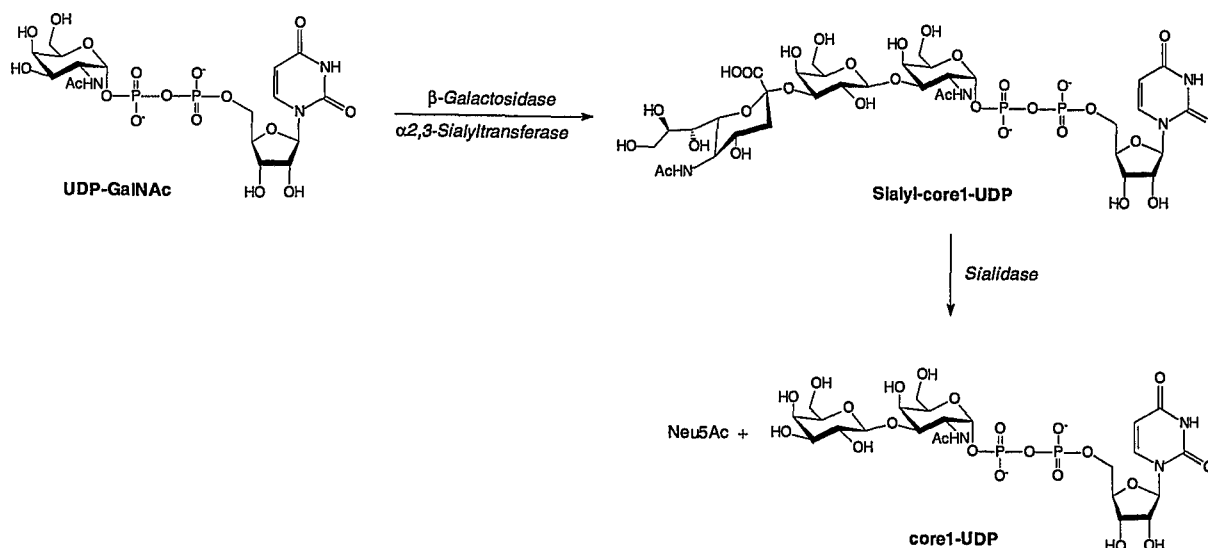


Abb. 8.4: Synthese von core1-UDP

Untersuchungen zeigten, daß das Transgalactosylierungsprodukt core1-UDP ein Substrat für die $\alpha 2,3$ -O-Sialyltransferase ist. In einem ersten Syntheserversuch mit dem Galactosidase/Sialyltransferase-System konnte innerhalb von zwei Tagen eine Ausbeute von etwa 30% erzielt werden. Dieser Wert sollte durch eine Optimierung des Verhältnisses der Enzymaktivitäten deutlich verbessert werden können. Abbildung 8.5 zeigt den Reaktionsverlauf.

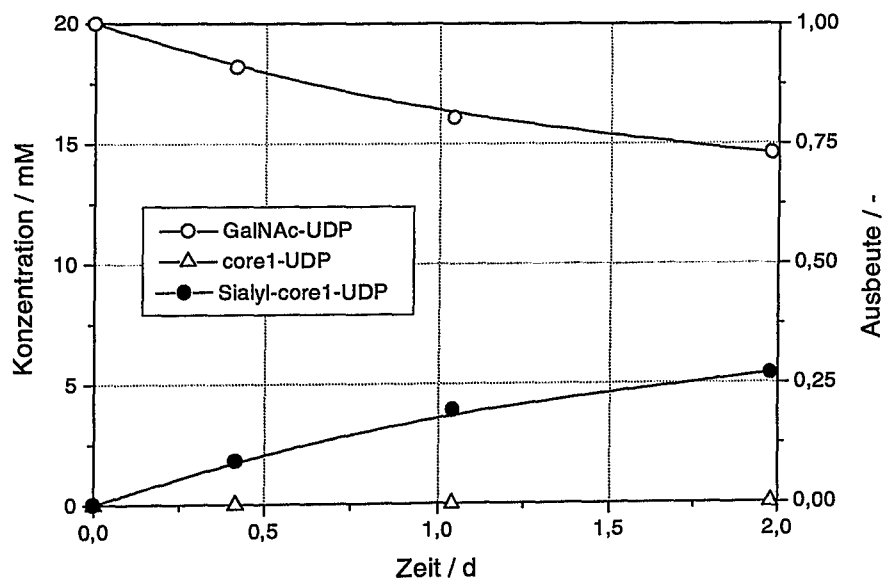


Abb. 8.5: Enzymatische Synthese von Sia-core1-UDP
 (0,5 M Lac; 20 mM UDP-GalNAc; 30 mM CMP-Neu5Ac; 500 mU/mL Galactosidase;
 100 mU/mL SiaT; 10 U/mL CIAP; 0,5 mg/mL BSA; 50 mM MES; pH 6,5)

8.5 Glycosylierung von Peptiden

Durch den Einsatz des Galactosidase/GlcNAc-Transferase-Systems in Verbindung mit der GalNAc-Transferase 3 konnte erstmals ein natürliches *O*-Glycosid enzymatisch an einem Peptid aufgebaut werden. Die resultierende core2-Struktur wurde durch den Einsatz kommerziell erhältlicher Glycosyltransferasen zum Sialyl Lewis^x-Hexasaccharid erweitert.

Da der PSGL-1 N-Terminus bislang noch nicht glycosyliert werden konnte, sollen hier einige Möglichkeiten zur Synthese der Zielstruktur diskutiert werden.

8.5.1 Aufbau von core-Strukturen auf PSGL-1

Zum Aufbau *O*-glycosidischer core-Strukturen können mehrere Möglichkeiten in Betracht gezogen werden:

- Verwendung der GalNAc-Transferase 4 und der β 1,3-Galactosyltransferase
- Einsatz der GalNAc-Transferase 4 sowie eines Mehrenzzymsystems
- *In vivo*-Produktion von PSGL-1-Glycopeptiden und *remodelling* der Zuckerstruktur

Verwendung der GalNAc-Transferase 4 und der β 1,3-Galactosyltransferase

Der PSGL-1 N-Terminus konnte nicht glycosyliert werden, da eine geeignete GalNAc-Transferase bisher nicht zur Verfügung stand (vgl. Kap. 6.1.2). Die GalNAc-Transferase 4 ist hierfür geeignet, sie zeigt mit PSGL-1 allerdings nur eine sehr geringe Aktivität. Erschwerend kommt hinzu, daß die Expressionsraten der bisher fermentierten CHO-Clone sehr niedrig sind. Zur Gewinnung von nur 100 mU müßte eine Fermentation in der Größenordnung von 70 Litern durchgeführt werden.¹

Die Galactosyltransferase zur Synthese der core1-Struktur ist bisher nicht rekombinant verfügbar, eine Aufreinigung aus natürlicher Quelle außerordentlich schwierig und zeitaufwendig. Diese Variante scheint somit kaum realisierbar.

Einsatz der GalNAc-Transferase 4 sowie eines Mehrenzzymsystems

Der Einsatz eines Galactosidase/Glycosyltransferase-Systems zur Synthese von core-Strukturen am Peptid sollte zwar grundsätzlich möglich sein, konnte aber bisher noch nicht an PSGL-1 demonstriert werden. Zudem müßte auch hier eine hinreichende Aktivität der GalNAc-Transferase 4 gewonnen werden.

¹ Die GalNAcT 4 konnte im Institut für Biotechnologie in Suspensionskultur mit einer Aktivität von 0,25 U/L exprimiert werden. Das Enzym zeigt für PSGL-1 eine relative Aktivität von 1,5% verglichen mit dem Assaypeptid (vgl. Tab. 6.1). Berücksichtigt man einen 50%igen Aktivitätsverlust bei der Aufreinigung und nimmt die Synthese des MUC1a'-GalNAc-Peptids als Maßstab, so ließen sich mit dieser Aktivität maximal 150 mg des PSGL-1-Undeca-peptids glycosylieren (vgl. Kap. 10.6.3).

***In vivo*-Produktion von Glycopeptiden**

Eine interessante Alternative wäre die Expression eines PSGL-1-Protein A-Fusionsproteins in CHO-Zellen. Das sekretierte Protein könnte durch IgG-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Aufgrund der in CHO-Zellen vorhandenen Glycosyltransferasen¹ würden am Peptid *in vivo* voraussichtlich sialylierte core1-Strukturen erzeugt. Die Neuraminsäure-Reste müßten demnach zunächst mit einer Sialidase abgespalten werden.² Basierend auf dem core1-Grundmuster könnte dann eine Reihe unterschiedlicher Strukturen mit Glycosyltransferasen aufgebaut werden. Abschließend würden die Produkte erneut an IgG-Sepharose aufgereinigt und der Protein A-Teil abgespalten.³ Das um den Aufreinigungs-tag verlängerte PSGL-1 hätte eine ausreichende Größe, um durch eine Ultrafiltrationsmembran zurückgehalten zu werden. Somit könnte eine einfache Aufreinigung der Zwischenprodukte realisiert werden.

Auf diese Weise vereinigte man in einer kombinierten *in vivo/in vitro*-Strategie die Vorteile beider Ansätze: Einerseits werden in einem zellkulturtechnischen Verfahren Glycosylierungsmuster auf dem Biosyntheseweg erzeugt, die enzymatisch nur schwer erhalten werden können. Andererseits können *in vitro* definierte Glycoside synthetisiert werden, während man *in vivo* immer Produktgemische erhält. Nicht zuletzt könnten so die *in vivo*- und *in vitro*-Teilprojekte bei einem Folgeprojekt noch stärker verzahnt werden (vgl. Kap. 1.4). Die Abbildung 8.6 faßt die Strategie zusammen.

Kritisch könnte bei diesem Ansatz die Produktivität des Systems sein: Obwohl in CHO-Kulturen Expressionsraten von bis zu 1 g Fremdprotein pro Liter erzielt wurden (Werner, 1994), sind Ausbeuten von 10-100 mg jedoch eher die Regel (Biselli, 1999).

¹ CHO-Zellen exprimieren GalNAc-Ts, SiaTs sowie die β 1,3-GalT zum Aufbau der core1-Struktur. Die core2-Struktur wird mangels β 1,6-GlcNAcT nicht erzeugt.

² Da Protein A außerdem N-Glycoside enthält, müßten diese eventuell durch Endoglycosidasen abgespalten werden.

³ Für diesen Zweck müßte eine *cleavage site* inseriert werden. Hierbei handelt es sich um eine Aminosäuresequenz, die spezifisch durch eine Protease gespalten wird.

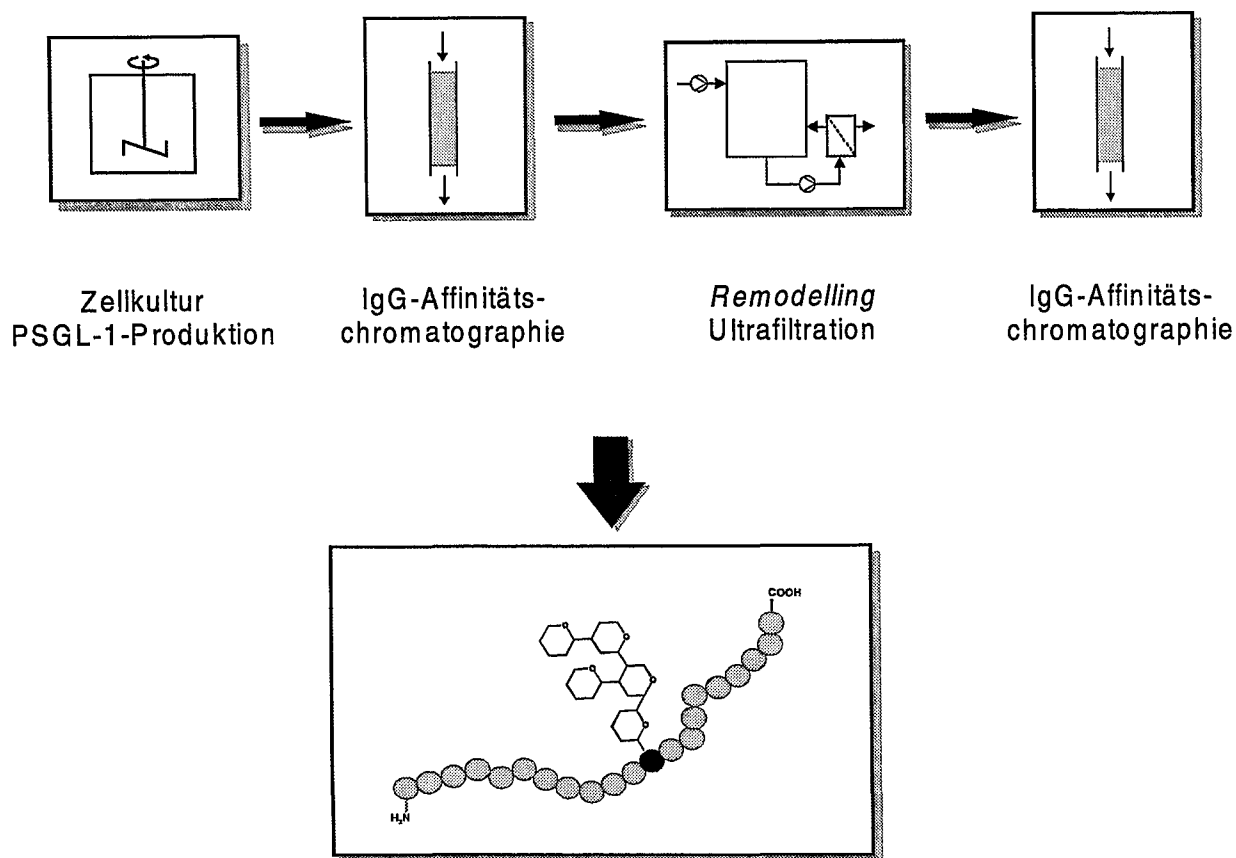


Abb. 8.6: Kombinierte *in vivo/in vitro*-Produktion glycosylierter PSGL-1-Peptide

8.5.2 Aufbau von Poly-LacNAc-Strukturen

Das in dieser Arbeit synthetisierte Hexasaccharid ist eines der einfachsten potentiell bioaktiven Glycoside an PSGL-1. Bei einer Analyse der PSGL-1-Glycane konnten außerdem sialylierte und fucosylierte Poly-LacNAc-Einheiten gefunden werden (Wilkins *et al.*, 1996). Da bisher nicht bekannt ist, ob diese verlängerten Strukturen biologisch relevant sind, wäre ihre Synthese ein interessantes Projekt. Die wichtigsten potentiell bioaktiven Glycane sind in Abbildung 8.7 dargestellt.

Die enzymatische Synthese von sialylierten und fucosylierten Poly-LacNAc-Oligosacchariden wurde in den letzten Jahren intensiv von einer finnischen Arbeitsgruppe untersucht (Renkonen *et al.*, 1997; Salminen *et al.*, 1997; Rabinä *et al.*, 1998). Da die für die Poly-LacNAc-Synthese benötigte β 1,3-GlcNAc-Transferase bisher nur sehr schlecht aus humanem Blutserum zugänglich war (Piller und Cartron, 1983; Yates und Watkins, 1983), wurde das Oligosaccharid für diese Arbeiten aus humanen Tumorzelllinien gewonnen (Leppänen *et al.*, 1991). Inzwischen konnte das Enzym von Fukuda und Mitarbeitern sowie von der Zürcher Arbeitsgruppe um Prof. Berger cloniert werden (Sasaki *et al.*, 1997), so daß eine präparative enzymatische Synthese der Poly-LacNAc-Struktur möglich scheint.

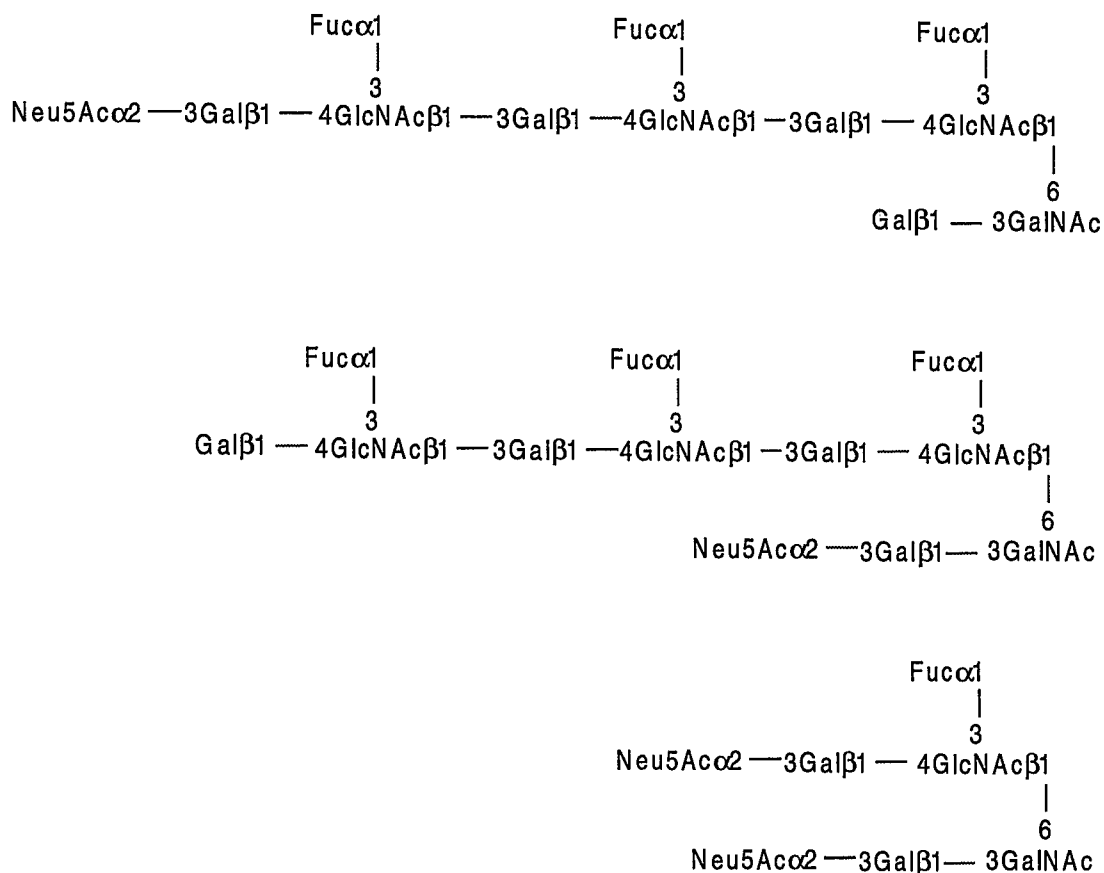


Abb. 8.7: An PSGL-1 gebundene O-Glycane; nach Wilkins *et al.*, 1996

Zur Poly-LacNAc-Synthese stehen mehrere Galactosyltransferasen zur Wahl (vgl. Kap. 6.3.1). Die Arbeitsgruppen um Clausen und Fukuda zeigten an para-Nitrophenyl-gebundenen Modellglycosiden, daß die Länge eines Poly-LacNAc-Saccharids auf die Aktivität der Galactosyltransferase 1 keinen Einfluß hat. Die Aktivität der Galactosyltransferase 4 ist dagegen reziprok zur Kettenlänge (Ujita *et al.*, 1998). Während also erstere möglicherweise effektiver beim Aufbau langer Ketten ist, könnte letztere zur Synthese definierter Kettenlängen eingesetzt werden.

Zur Herstellung mehrfach fucosylierter Strukturen müssen verschiedene Enzyme eingesetzt werden (vgl. Kap. 6.3.3). Es konnte gezeigt werden, daß durch den Einsatz der Fucosyltransferasen IV¹ und VII eine vollständige Fucosylierung möglich ist (Niemelä *et al.*, 1998). Die Kinetik der hier aufgeführten Enzyme wurde bisher nur in Ansätzen untersucht, für eine effektive Synthese wären umfangreiche Studien erforderlich. Enzyme, die zum Aufbau sialylierter und fucosylierter Poly-LacNAc-Strukturen eingesetzt werden können, sind in Abbildung 8.8 aufgeführt.

¹ Die Clonierung der FucT IV wurde erstmals 1991 von Lowe *et al.* publiziert.

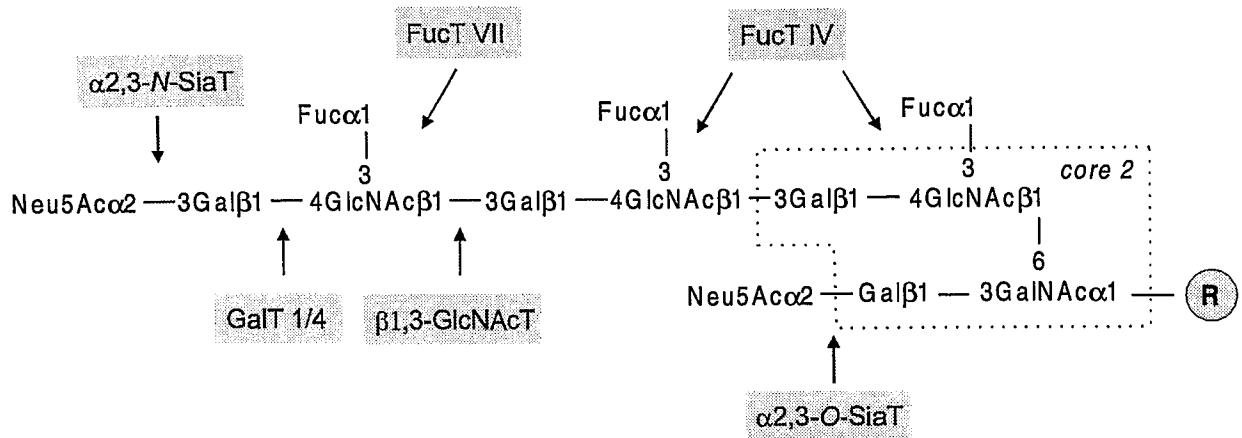


Abb. 8.8: Enzyme zum Aufbau sialylierter und fucosylierter Poly-LacNAc-Strukturen

8.6 Sulfatierung von PSGL-1

Die Aktualität der Fragestellungen des EU-Projektes läßt sich durch die Fülle neuer Erkenntnisse veranschaulichen, die während der letzten drei Jahre zu diesem Themengebiet publiziert wurden (vgl. Kap. 11). Dazu gehört auch das Wissen um die Sulfatierung des natürlichen PSGL-1-Proteins. Obwohl die enzymatische Sulfatierung nicht in der Projektplanung berücksichtigt wurde, konnten im Zuge dieser Arbeit erste Versuche zu dieser Thematik unternommen werden. Nach einer kurzen Einleitung werden die eigenen Fehlschläge beim Einsatz einer bakteriellen Sulfotransferase erläutert. Abschließend wird ein Enzym mit geeignetem Substratspektrum vorgestellt, das inzwischen von der Copenhagener Arbeitsgruppe cloniert werden konnte.

Die Sulfatierung von Tyrosyl-Seitenketten in Proteinen ist eine häufig anzutreffende posttranslationale Modifikation, schätzungsweise 10% aller Tyrosinreste in Proteinen sind sulfatiert (Huttner, 1987; Niehrs *et al.*, 1994). Sie findet wie die Glycosylierung im Golgi-Komplex statt (Bäuerle und Huttner, 1987). Obwohl die Bedeutung der Sulfatierung in den meisten Fällen unbekannt ist, konnte gezeigt werden, daß die biologische Aktivität einiger regulatorischer Peptide und Proteine erhöht wird (Bodanszky *et al.*, 1978; Penke *et al.*, 1984; Stone und Hofsteenge, 1986; Suiko und Liu, 1988; Hortin *et al.*, 1989; Hofsteenge *et al.*, 1990). Zudem kann Sulfatierung die biologische Halbwertszeit von Proteinen beeinflussen und die Sekretion beschleunigen (Niehrs *et al.*, 1994).

Die Aufreinigung einer Tyrosylprotein-Sulfotransferase wurde erstmalig 1990 von Niehrs und Huttner beschrieben (Niehrs und Huttner, 1990), die Clonierung zweier homologer Sequenzen aber erst 1998 publiziert (Beisswanger *et al.*, 1998; Ouyang und Moore, 1998; Ouyang *et al.*, 1998).

8.6.1 Untersuchungen zur Sulfatierung mit einer bakteriellen Sulfotransferase

Da die Tyrosylprotein-Sulfotransferase nur schwer zugänglich war, wurden Versuche zur Sulfatierung mit einer bakteriellen Arylsulfotransferase unternommen, die uns von der Firma *Bio-Technical Resources* (Manitowoc, USA) zu Verfügung gestellt worden war (Grund, 1995). Das Enzym, das aus *Clostridium innocuum* isoliert wurde, überträgt Sulfatgruppen auf phenolische OH-Gruppen, also auch auf Tyrosin. Als Donor diente Paranitrophenylsulfat (pnp-Sulfat – vgl. Abb. 8.9).¹

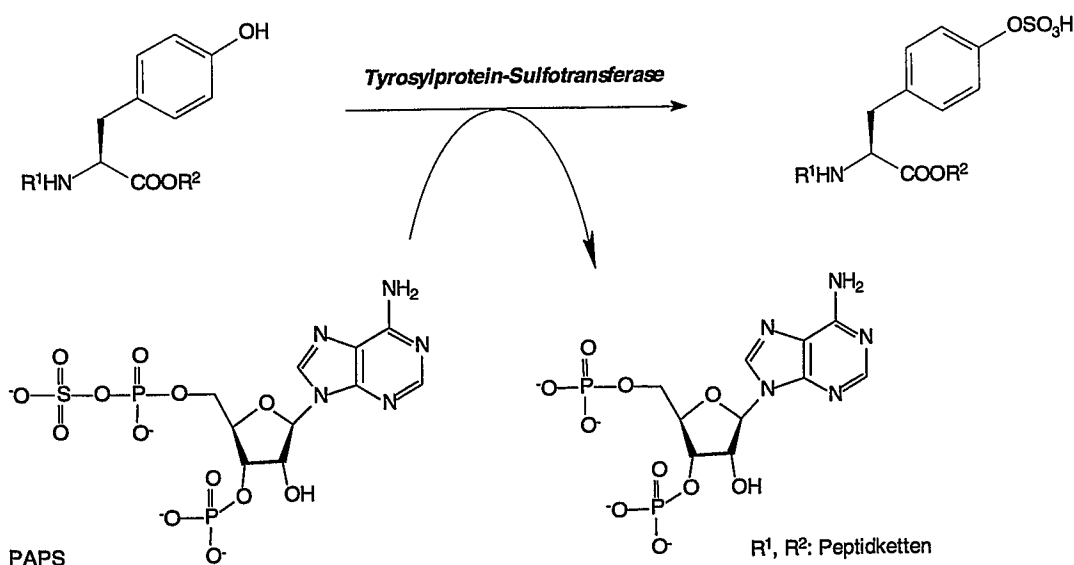
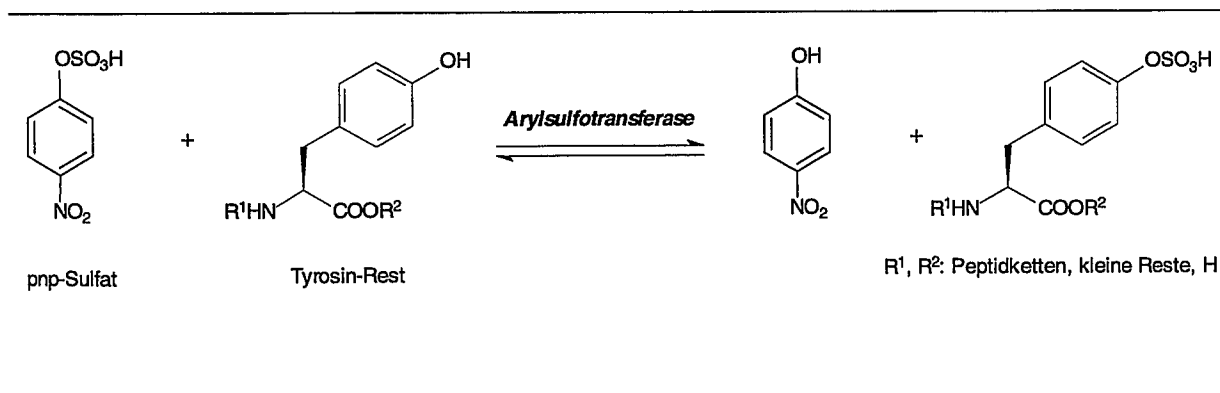


Abb. 8.9: Enzymatische Sulfatierung durch Aryl- und Tyrosylprotein-Sulfotransferase
(PAPS: 3'-Phosphoadenosin 5'-phosphosulfat)

Es zeigte sich jedoch, daß das Enzym vergleichbare Substratspezifitäten wie andere bisher untersuchte mikrobielle Sulfotransferasen aufweist. Dem Tyrosin benachbarte Säuregruppen,

¹ Es handelt sich dabei um eine Gleichgewichtreaktion, die durch einen Überschuß an pnp-Sulfat annähernd vollständig zum Produkt verschoben werden kann.

wie sie im PSGL-1 gehäuft anzutreffen sind, wirken inhibierend (Kobashi und Kim, 1986; Kobashi *et al.*, 1987). Dementsprechend konnte für das PSGL-1-Peptid keine Produktbildung nachgewiesen werden. Modifizierte Peptide, bei denen die Carbonsäuregruppen eliminiert worden waren, wurden dagegen sehr gut umgesetzt. Abbildung 8.10 zeigt die Sulfatierungsversuche. Da eine Substitution der Aminosäuren mit Carboxyl-Seitenketten mit Sicherheit Auswirkungen auf die biologische Aktivität des Peptids hat – schließlich sollen durch die Sulfatierung zusätzliche Säurefunktionen eingefügt werden – wurde von einem präparativen Einsatz des Enzyms abgesehen.¹

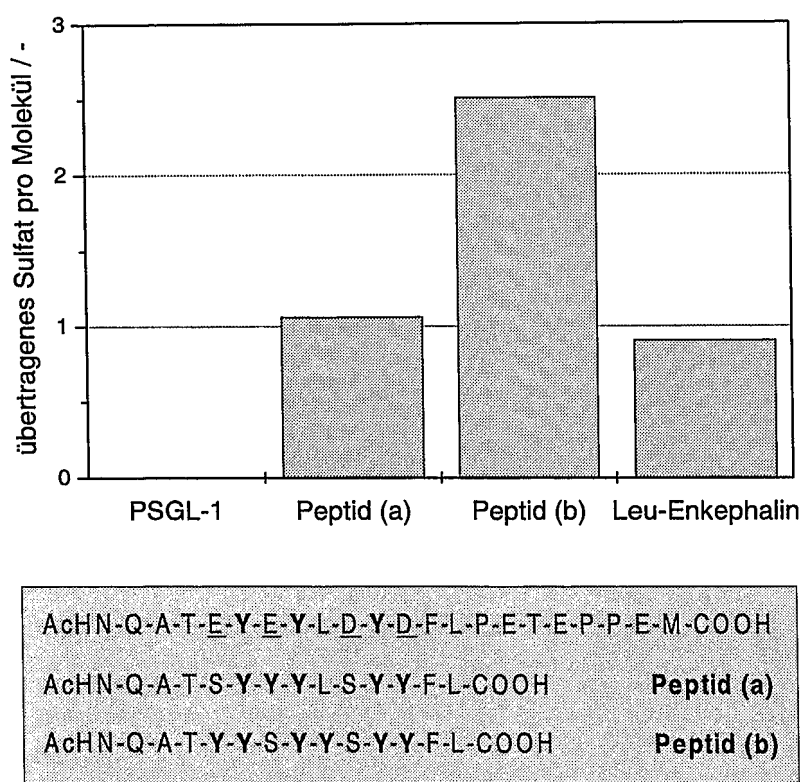


Abb. 8.10: Sulfatierung von Peptiden mit mikrobieller Arylsulfotransferase; Tests mit PSGL-1 N-Terminus, modifizierten PSGL-1-Peptiden und dem Assaypeptid Leu-Enkephalin (Y = Tyrosin, Aminosäuren mit Carbonsäure-Seitenketten unterstrichen; Assaybedingungen: 5 mM pnp-Sulfat; 0,5 mM Peptid; 100 mU/mL Sulfotransferase; 100 mM Tris; pH 8; 37°C, 16 h).

¹ Tatsächlich erhöhen Sulfat-, Phosphat- und Carboxylgruppen, aber auch Nitrat und Iodid die biologische Aktivität einiger Peptide in ähnlicher Weise (Hofsteenge *et al.*, 1990; Winant *et al.*, 1991; Muramatsu *et al.*, 1994).

8.6.2 Einsatz einer Tyrosylprotein-Sulfotransferase

Nachdem die Sequenzen zweier Tyrosylprotein-Sulfotransferase-Gene veröffentlicht worden waren, exprimierte die Copenhagener Arbeitsgruppe die beiden entsprechenden Enzyme in Baculo/Sf9-Systemen.

Tyrosylprotein-Sulfotransferasen katalysieren die Sulfatübertragung vom Sulfo-Nucleotid¹ auf Tyrosinreste in Peptiden, wobei bei diesem Enzym benachbarte Säurefunktionen aktivierend wirken (Niehrs *et al.*, 1990; Niehrs *et al.*, 1992; Bundgaard *et al.*, 1997). Die Sulfatierung eines PSGL-1 N-terminalen Peptides konnte nachgewiesen werden (Ouyang *et al.*, 1998). Da bis auf den Beweis der prinzipiellen Machbarkeit keine weiteren Arbeiten vorliegen, wäre die Untersuchung der PSGL-1-Sulfatierung in Zusammenarbeit mit dem Copenhagener und dem Utrechter Arbeitskreis ein interessantes Projekt. Folgende Aspekte könnten untersucht werden:

- **Fermentation und Aufreinigung einer Sulfotransferase:** Die Fermentation wurde bereits im Labormaßstab in Copenhagen durchgeführt, ein Aufreinigungsprotokoll allerdings noch nicht ausgearbeitet.
- **Untersuchung des Reaktionssystems und der Kinetik der Sulfotransferase:** Dies kann für das Enzym im allgemeinen sowie für PSGL-1-Peptide im speziellen erfolgen. So wäre zum Beispiel zu untersuchen, welche der drei Tyrosin-Reste sulfatiert werden. Um sich in diesem Gebiet von anderen biochemisch arbeitenden Arbeitskreisen abzuheben, wäre eine Strukturuntersuchung der Sulfopeptide mittels NMR-Spektroskopie durch den Utrechter Arbeitskreis erforderlich. Aufschlußreich könnte auch der Vergleich glycosylierter und nichtglycosylierter Peptide als Akzeptoren sein.
- **Präparative Synthese von Sulfopeptiden:** Auch hier können neben PSGL-1 andere Peptide bearbeitet werden. Sollte an einem EU-Folgeprojekt eine Firma beteiligt sein, die Peptide synthetisiert, so bestünde hier möglicherweise Interesse an der Entwicklung eines Standardprotokolls zur Sulfatierung.

8.7 Chemoenzymatische Glycopeptidsynthese

Durch die Integration eines enzymatischen Glycosylierungsschrittes in die chemische Glycopeptid-Synthese konnte ein schneller und effizienter Weg zu Aminosäure-Glycosiden aufgezeigt werden. Das Trisaccharid konnte so ausgehend von GalNAc-Threonin mit einer Ausbeute von 50% hergestellt werden, was mit chemischen Methoden bisher nicht erreicht werden kann (vgl. Kapitel 7). Zudem konnte die Zahl der Synthesestufen erheblich reduziert werden.

¹ 3'-Phosphoadenosin 5'-phosphosulfat (PAPS) – vgl. Abb. 8.9

Interessant wäre ein direkter Vergleich von chemischer sowie chemoenzymatischer Synthese mit der enzymatischen Glycosylierung. Dieser kann allerdings erst zu einem späteren Zeitpunkt angestellt werden, wenn die Implementierung des Sialyl-core1-Thr-Bausteins erfolgt sein wird. So muß noch gezeigt werden, daß das Trisaccharid in guter Ausbeute geschützt und in der Festphasensynthese eingesetzt werden kann.

Bei einem Blick in die Literatur finden sich eine Reihe weiterer tumorassoziierter Antigene, die mit den in dieser Arbeit untersuchten Methoden synthetisiert werden können, etwa die F1- α -Struktur Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)GalNAc (Qiu und Koganty, 1997a). Die Darstellung durch den Einsatz des Galactosidase/GlcNAc-Transferase-Systems sowie einer β 1,4-Galactosyltransferase ist in Abbildung 8.11 skizziert.

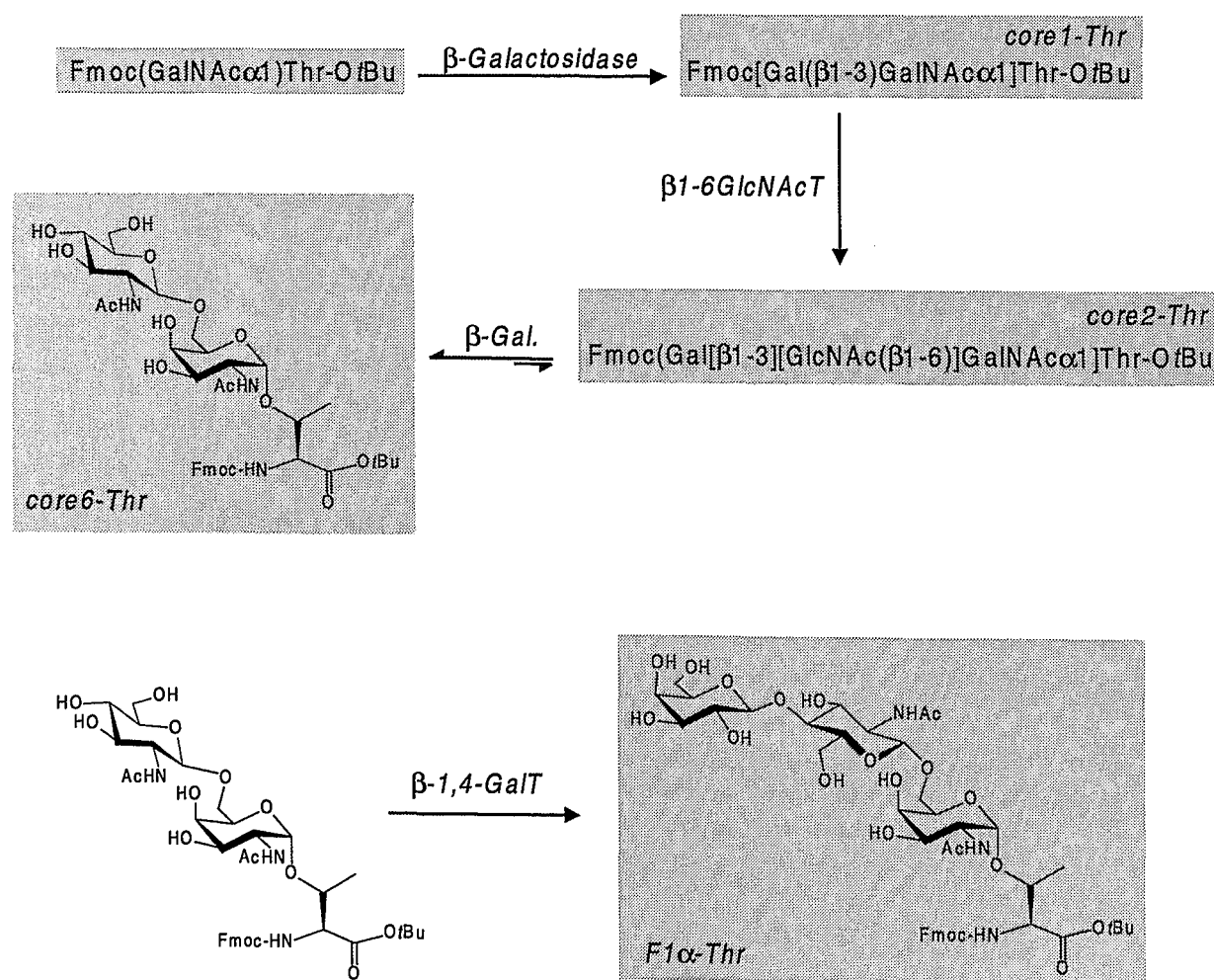


Abb. 8.11: Chemoenzymatische Synthese der F1- α -Struktur

„Schlage die Trommel und fürchte Dich nicht“

Heinrich Heine

9 Zusammenfassung

Gegenstand der Arbeit ist die Entwicklung und Optimierung enzymatischer Synthesen zur Synthese natürlicher *O*-glycosidischer Strukturen an Peptiden.

9.1 Bereitstellung von Glycosyltransferasen

- In einem 20 L-Reaktor wurden mit einem Baculo/Sf9-Expressionssystem **128 U einer GalNAc-Transferase 3 produziert**. Ein Teil des Enzyms, mit dem die Glycosylierung von Peptiden initiiert werden kann, wurde durch Ionentauschchromatographie aufgereinigt. Dabei konnten 21 U mit 57%iger Ausbeute gewonnen werden.
- Mittels IgG-Affinitätschromatographie wurden **14 U der core2-GlcNAc-Transferase aufgereinigt**. Die Ausbeute betrug 80%.

9.2 Synthese und Aufreinigung von Nucleotidzuckern

- Es wurde eine **zweistufige GDP-Fucose-Synthese** entwickelt. Die Ausbeute betrug 14%, was angesichts des hohen Preises des Produkts akzeptabel ist. Es wird zwar ein Anomerengemisch gebildet, das Nebenprodukt kann im Alkalischen jedoch selektiv hydrolysiert werden.
- Zur Entsalzung der Nucleotidzucker CMP-Neuraminsäure und GDP-Fucose nach der Aufreinigung durch Ionentauschchromatographie wurde ein **Nanofiltrationsverfahren** entwickelt. Die Ausbeuten betrugen >90% für CMP-Neuraminsäure und 88% für GDP-Fucose bei Reinheiten von 95% beziehungsweise 90%. Die Eignung des Verfahrens konnte durch die Aufreinigung von je 60 mg der Produkte demonstriert werden.

9.3 Reaktionstechnische Optimierung von Mehrenzysystemen

- Zur **Synthese *O*-glycosidischer core-Strukturen** wurde eine β -Galactosidase aus Stierhoden in Kombination mit einer β 1,6-GlcNAc-Transferase oder alternativ mit einer α 2,3-*O*-Sialyltransferase eingesetzt. Die Reaktionssysteme wurden untersucht und die Enzyme kinetisch charakterisiert.
- Nach der Optimierung der Mehrenzysysteme konnten die Produkte **core6-Bn und Sialyl-core1-Bn jeweils in Ausbeuten von 90%** erhalten werden. Somit wurden

Glycosidase-katalysierte **Transglycosylierungen** erstmals mit **nahezu quantitativen Ausbeuten** durchgeführt.

- Im Galactosidase/GlcNAc-Transferase-System wurde die Ausbeute des Zwischenprodukts core2-Bn mit einem genetischen Algorithmus verdoppelt. Durch diesen Erfolg konnte die Eignung eines empirischen Optimierverfahrens für komplexe Systeme demonstriert werden.

9.4 Enzymatische Glycosylierung von Peptiden

- Durch den Einsatz der GalNAc-Transferase 3 konnte das **MUC1a'-GalNAc-Glycopeptid** mit **95%iger Ausbeute** synthetisiert werden. Es wurden **150 mg des Produkts isoliert**. Das PSGL-1-Peptid konnte mit der GalNAc-Transferase 3 nicht glycosyliert werden, da es faktisch kein Substrat für dieses Enzym ist.
- Die core2-Struktur konnte mit dem Galactosidase/GlcNAc-Transferase-System auf dem Glycopeptid aufgebaut werden. Überraschenderweise wird die core2-Struktur nicht in einer Folgereaktion zu core6 hydrolysiert. Die **Ausbeute des core2-Peptids betrug 30%**. Unseres Wissens ist dies das **erste Beispiel einer Transglycosylierung zur Darstellung O-glycosidischer Strukturen am Peptid**.
- Aufbauend auf MUC1a'-core2 wurde die **Sialyl-Lewis^x-Struktur** durch den Einsatz dreier kommerziell erhältlicher Glycosyltransferasen synthetisiert. Das Hexasaccharid konnte mit einer **Gesamtausbeute von 23%** für alle fünf enzymatischen Reaktionsschritte am Peptid aufgebaut werden.
- Jedes Glycopeptid wurde im Milligramm-Maßstab aufgereinigt und den EU-Projekt-Partnern für Strukturuntersuchungen zur Verfügung gestellt.

9.5 Herstellung eines Bausteins zur chemischen Peptidsynthese

- In Kooperation mit dem Arbeitskreis Prof. Kunz in Mainz wurde eine chemoenzymatische Glycopeptidsynthese entwickelt, die Vorteile des chemischen wie des enzymatischen Verfahrens vereint. Dabei wird die Sialyl-core1-Trisaccharidstruktur enzymatisch auf einem GalNAc-Zucker aufgebaut, der mit einem geschützten Threonin-Rest verknüpft ist.
- Da die geschützte Aminosäure nahezu unlöslich in Wasser ist, wurden **Cyclodextrine** als Lösungsvermittler eingesetzt. Mit Dimethyl- β -cyclodextrin konnte die **Löslichkeit des Substrats um das 100-fache gesteigert** werden.
- Durch den Einsatz des Galactosidase/Sialyltransferase-Systems konnte das Produkt **Sialyl-core1-Thr** präparativ mit **50%iger Ausbeute** gewonnen werden. Es wurden **100 mg** isoliert.

„Und gib dir Mühe, nicht solchen Blödsinn zu schreiben. Fakten, Fakten und Fakten, und die Hauptsache, möglichst kurz.“

Fjodor Michailowitsch Dostojewskij, Die Dämonen

10 Material und Methoden

10.1 Analytik

10.1.1 HPLC-Systeme

HPLC-System 1

Das *reverse phase*-System wurde zur Analytik von Benzylglycosiden und Peptiden eingesetzt.

S 1100 Solvent Delivery System	Sykam, Gilching	
S 2000 HPLC-Controller	Sykam, Gilching	
S 8110 Niederdruckmischer	Sykam, Gilching	
851-AS Probengeber	Jasco, Groß-Zimmern	
2151 UV-Detektor	Pharmacia LKB, Freiburg	
C-R6A Chromatopac Integrator	Sykam, Gilching	
Vorsäule:	Lichrosorb RP-18 Cartridge	Merck, Darmstadt
Säule:	Lichrosorb RP-18	Merck, Darmstadt
Säulentemperatur:	25°C	
Eluent:	H ₂ O/CH ₃ CN/TFA (0,1%)	
Flußrate:	0,5 mL/min	
Wellenlänge:	195 nm oder 210 nm	

HPLC-System 2

System 2 wurde zur Untersuchung des Galactosidase/GlcNAc-Transferase-Systems mit Benzylglycosiden eingesetzt.

Vakuumtrogas ERMA-3312	ERMA CR., über Sykam	
S 1100 Solvent Delivery System	Sykam, Gilching	
851-AS Probengeber	Jasco, Groß-Zimmern	
Säulenofen GAT-CH-150	Gamma Analysen Technik, über Sykam	
UV-Detektor Linear™ 206 PHD	Linear Instruments, Northport Loop West (USA)	
Integrator Pyramid Software	Sykam, Gilching	
Vorsäule:	Micro-Guard Cation H Cartridge	Bio-Rad, München
Säule:	Aminex HPX-87-H (300*7.8 mm)	Bio-Rad, München
Säulentemperatur:	65°C	
Eluent:	6 mM H ₂ SO ₄	
Flußrate:	isokratisch bei 0,6 mL/min	

Wellenlänge: 195 nm

Abbildung 10.1 zeigt ein Beispielchromatogramm.

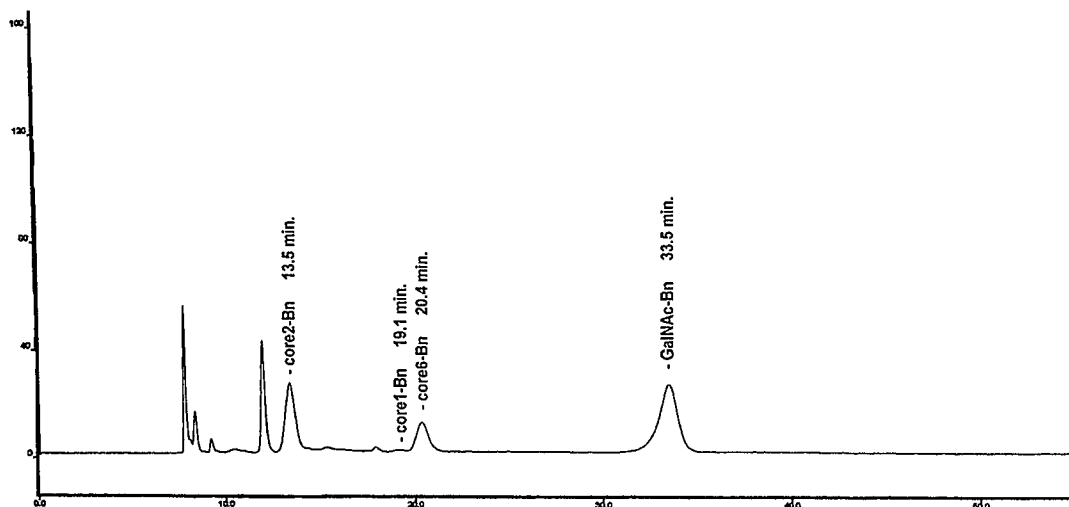


Abb. 10.1: Beispielchromatogramm des HPLC-Systems 2

HPLC-System 3

Eine von Ryll und Wagner veröffentlichte HPLC-Methode (Ryll und Wagner, 1991) wurde in modifizierter Form in Edmonton (Kanada) etabliert. Sie erlaubt die Trennung von Guanosin, GMP, GMP-Fuc, GDP, GDP-Fuc sowie die Auflösung der α - und β -Anomere der Zuckernucleotide.

HPLC-Pumpen 510 und 590
automated gradient controller
 UV-Detektor 1306

Waters
 Waters
 Biorad

Säule: Resolve C₁₈ 8·100 mm *radial pack* Waters
 Säulentemperatur: 20°C
 Eluent: A: 100 mM KH₂PO₄, 8 mM NBu₄HSO₄ (pH 5,3)
 B: 70% A, 30% Methanol
 Flußrate: 1 mL/min
 Wellenlänge: 254 nm
 Gradient:

0 min	0% B
2,5 min	0% B
5 min	50% B
30 min	100% B
34 min	100% B
35 min	0% B
45 min	0% B

HPLC-System 4

Eine präparative HPLC wurde zur Aufreinigung von Benzylglycosiden und Glycopeptiden eingesetzt.

125 P solvent module	Beckman, München
UV-Detektor 168 NM	Beckman, München
manuelles Ventil zur Probenaufgabe	Rheodyne, Cotati, USA
Fraktionssammler Frac 100	Pharmacia LKB, Freiburg
präparative RP-18-Säulen:	CS-Chromatographieservice, Langerwehe
Eluent:	H ₂ O/CH ₃ CN/TFA (0,1%)
Flußrate:	3-6 mL/min
Wellenlänge:	210 nm

10.1.2 Kapillarelektrophorese

Die Kapillarelektrophoresetechnik wurde Ende der siebziger Jahre entwickelt und etablierte sich inzwischen als Standard-Analyseverfahren in der Biochemie. Die Analyte wandern in einem elektrischen Feld, das Trennprinzip beruht auf unterschiedlichen Verhältnissen von Molekülladung zu Volumen. Die Kapillarelektrophorese ist also kein chromatographisches Verfahren,¹ und eignet sich somit sehr gut als komplementäre Methode zur HPLC. Obwohl die CE-Technik ursprünglich für die Protein- und Peptidtrennung entwickelt wurde (Grossman *et al.*, 1989), wird sie heute für eine Vielzahl von Trennproblemen eingesetzt, etwa zur Enantiomerentrennung (Terabe *et al.*, 1994; Vespalec und Bocek, 1997), zur Zucker- (Hoffstetter-Kuhn *et al.*, 1991; Vorndran *et al.*, 1992; Stefansson und Novotny, 1993) und zur Ionenanalyse (Jandik und Jones, 1991; Beck und Engelhardt, 1992).

Zum Einstieg in diesen Themenbereich sind im folgenden einige Monographien und Übersichtsartikel aufgeführt (Grossman und Colburn, 1992; Engelhardt *et al.*, 1993; Engelhardt *et al.*, 1994; Oefner und Chiesa, 1994; Roche *et al.*, 1997).

System:

MDQ mit Diodenarray-Detektor Beckman, München

Die Kapillarelektrophorese wurde für folgende Trennprobleme eingesetzt:

- **Analyse von Nucleotiden und Zuckernucleotiden**

Die Methode basiert auf einer von Engelhardt und Mitarbeitern entwickelten Nucleotid-Analytik (Engelhardt *et al.*, 1993) und wurde für die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen von Frau Beliczey optimiert.

Kapillare: L = 50 cm, ID = 75 µm; Puffer: 80 mM CAPS; pH 10,4; 30 kV

- **Analyse von Glycopeptiden**

Basierend auf einer Methode von Righetti *et al.* (Righetti und Nembri, 1997) wurde eine Glycopeptidanalytik entwickelt.

Kapillare: L = 50 cm, ID = 75 µm; Puffer: 25 mM Asparagin; 5% Trifluorethanol; 0,25% Hydroxyethylcellulose (M_w = 50.000 g/mol); pH 3,2; 30 kV

¹ Chromatographische Verfahren beruhen auf Wechselwirkungen zwischen stationärer und mobiler Phase. Bei der CE sind diese Wechselwirkungen idealerweise nicht vorhanden.

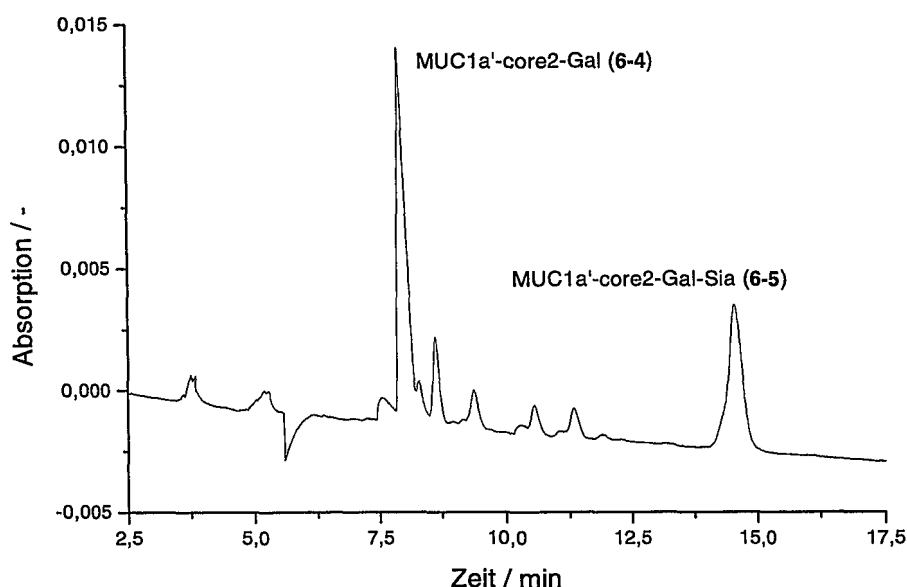


Abb. 10.2: Beispielerlektropherogramm für die Analyse von Glycopeptiden

10.2 Enzymassays

10.2.1 β -Galactosidase-Assay 1 - Hydrolyse

Als Assayreaktion dient die Hydrolyse von para-Nitrophenyl- β -galactosid (pnp-Gal). Das dabei freiwerdende *p*-Nitrophenol kann bei pH 10 als gelbes Phenolat quantifiziert werden. Assaybedingungen: 5 mM pnp-Gal in 100 μ L 100 mM Citrat; pH 4,3; 37°C. Die Reaktion wird durch einen pH-Shift mit 900 μ L Glycin-Puffer (250 mM, pH 10) abgestoppt. Je 200 μ L Probe werden in Microtiterplatten pipettiert und die Extinktion bei 405 nm im Microplattenleser gemessen. Die Reaktionszeiten werden so gewählt, daß die Umsätze in einem Bereich von 2-5% liegen.

Die volumenspezifische Aktivität A_V errechnet sich nach:

$$A_V = \frac{c(\text{pnp})}{t} \cdot \frac{V_{\text{Assaylösung}}}{V_{\text{Enzymlösung}}} \quad (10.1)$$

mit	A_V	U/mL	volumenspezifische Aktivität
	$c(\text{pnp})$	$\mu\text{mol/mL}$	Konzentration
	t	min	Zeit

10.2.2 β -Galactosidase-Assay 2 - Transglycosylierung

Standardbedingungen für die Transglycosylierungsreaktion: 30 mM GalNAc-Bn; 0,5 M Lac; 100 mM Citrat pH 4,3; 37°C. Die Reaktion wird durch zehnminütiges Erhitzen auf 95°C abgestoppt. Die Reaktionszeiten werden so gewählt, daß die Umsätze bezogen auf den Akzeptor GalNAc-Bn unter 5% liegen.

10.2.3 core2-GlcNAcT-Assay

Als Substrat dient Gal(β 1-3)GalNAc(α -Bn) (core1-Bn). Substrat und Produkt können auf den HPLC-Systemen 1 und 2 bei 195 nm detektiert werden. Assaybedingungen: 1 mM core1-Bn, 5 mM UDP-GlcNAc, 10 mM MgCl₂, 1 mg/mL BSA, 50 mM MES-Puffer, pH 6,5; 37°C. Die Reaktion wird durch zehnminütiges Kochen abgestoppt; die Reaktionszeiten werden so gewählt, daß die erzielten Umsätze bezogen auf core1-Bn unter 5% liegen. Die volumenspezifische Aktivität A_V errechnet sich analog zum Galactosidase-Assay (Formel 10.1). Die massenspezifische Aktivität A_M ist der Quotient der volumenspezifischen Aktivität und der Proteinkonzentration:

$$A_M = \frac{A_V}{c(\text{Protein})} \quad (10.2)$$

mit	A_M	U/mg	massenspezifische Aktivität
	A_V	U/mL	volumenspezifische Aktivität
	$c(\text{Protein})$	mg/mL	Proteinkonzentration

10.2.4 α 2,3-O-SiaT-Assay

Als Substrat dient Gal(β 1-3)GalNAc(α -Bn) (core1-Bn). Substrat und Produkt wurden auf HPLC-System 2 bei 195 nm detektiert. Assaybedingungen: 1 mM core1-Bn, 1 mM CMP-Neu5Ac, 1 mg/mL BSA, 50 mM MES-Puffer, pH 6,5; 37°C. Die Reaktion wird durch zehnminütiges Kochen abgestoppt; die Reaktionszeiten werden so gewählt, daß die erzielten Umsätze unter 5% liegen. Die volumenspezifische Aktivität A_V errechnet sich analog zum Galactosidase-Assay (Kap. 10.2.1).

10.2.5 Radioaktivassay GalNAcT

Die Aktivitätsmessungen während der Fermentation und Aufreinigung der GalNAcT3 wurden mit ¹³C-markiertem UDP-GalNAc durchgeführt. Assaybedingungen: 1mM Muc1a'; 100 μ M UDPGal (2000 cpm/nmol¹); 10 mM MnCl₂; 50 mM Tris pH 7; 50 μ L Assayvolumen; 37°C. Die Reaktionszeiten werden so gewählt, daß die erzielten Umsätze bezogen auf das core1-Bn unter 5% liegen. Die Reaktion wird durch Zugabe von 450 μ L Eiswasser abgestoppt und die Lösung auf Dowex 1x8 100-200 (500 μ L) aufgegeben. Dabei wird der nicht umgesetzte Nucleotidzucker auf dem Anionentauscher zurückgehalten. Man spült mit 0,5 mL Wasser und eluiert mit 1 mL Ethanol. Abschließend mißt man Proben aller Lösungen im Szintillationszähler.

¹ cpm: *Counts Per Minute* – Zerfallsrate des ¹³C-Isotops.

10.3 Bereitstellung der GalNAc-Transferase 3

Das GalNAcT-Gen wurde in einen pAcGP67-Vektor der Firma Pharmingen (San Diego, USA) cloniert. Das Glycoprotein gp67 ist eins der wichtigsten Oberflächenproteine des Baculovirus, daher verfügt sein Gen über eine effiziente Signalsequenz zur Proteinsekretion. Das Fremdprotein wird als ein gp67-Signalpeptid-Fusionsprotein unter der Kontrolle des starken Polyhedrin-Promoters exprimiert (Gruenwald und Heitz, 1993).

Zur Gewinnung rekombinanter Baculoviren wurden Sf9-Zellen mit dem pAcGP67-Plasmid sowie viraler DNA cotransfiziert. Rekombinante Viren konnten durch Plaque-Assays isoliert werden. Diese Arbeiten wurden vom Partner in Copenhagen durchgeführt (Bennett *et al.*, 1996).

10.3.1 Kultivierung der Sf9-Zellen

Die Zellen wurden zunächst in TC-100-Medium mit 10% fötalem Kälberserum kultiviert und dann schrittweise an serumfreies Sf-900-Medium adaptiert. Die Zusammensetzung der Medien findet sich im Anhang. Die Lagerung der T-Flaschen und Suspensionskulturen erfolgte im Brutschrank bei 27°C. *Spinner* wurden mit 80 rpm gerührt. Unter optimalen Bedingungen verdoppeln sich die Zellen etwa alle 24 Stunden und können in Suspensionskultur bis zu Dichten von 10^6 Zellen/mL bei Vitalitäten von über 90% in der exponentiellen Phase gehalten werden. Für detaillierte Arbeitsanweisungen sei hiermit auf Laborhandbücher verwiesen (Summers und Smith, 1987; King und Possee, 1992; O'Reilly *et al.*, 1994).

20 L-Fermenter

Der Rührkessel der Firma Applikon hat ein Arbeitsvolumen von 17 L und ein Mindestvolumen von 2 L. Auf der Rührwelle sind zwei Schrägblattrührer montiert. Die Sauerstoffversorgung erfolgt über einen Begasungskorb, der mit einem Silikonschlauch umwickelt ist (Schlauch: 4,5 mm Innendurchmesser; 0,3 mm Wandstärke; 15 m Länge). Zur Bestimmung des Sauerstoffgehalts ist eine O₂-Elektrode der Firma Mettler-Toledo eingebaut. Der Sauerstoffgehalt wird über die Zusammensetzung der Zuluft aus Preßluft und O₂ gesteuert. Medien-, Ernte- und Inokulumflaschen können über bedampfbare Sterilkupplungen angeschlossen werden.

Sterilisation und Steriltest: Zunächst werden alle Schläuche und Einbauten befeuchtet, anschließend wird die Anlage 60 min bei 121°C mit Dampf sterilisiert. Anschließend wird der Fermenter bis zum Mindestfüllstand mit Medium befüllt und der Rührer in Betrieb genommen. Ist die Anlage nach 48 h noch immer steril, so kann das Medium wieder abgepumpt und inokuliert werden.

Fermentationsbedingungen: 27°C; 100 rpm; Sauerstoff: 50% Luftsättigung. Der pH von etwa 6,2 wird durch das Medium eingestellt und braucht nicht geregelt werden. Zum Schutz gegen Scherbeanspruchung durch den Rührer wird dem Medium 0,1% Pluronsäure F-68 zugegeben (Murhammer und Goochee, 1988; Murhammer und Goochee, 1990; Michaels *et al.*, 1991). Die Infektion erfolgte mit einem MOI¹ von 0,5.

¹ Multiplicity of infection – Verhältnis Viren/Zellen

Lagerung

Die Zellen können in flüssigem Stickstoff bei -196°C langfristig gelagert werden. Entscheidend ist der Zustand der Zellen: Sie sollten eine Vitalität von mindestens 95% aufweisen und sich im exponentiellen Wachstum befinden. Um Kristallbildung zu verhindern, wird DMSO als Kryoprotektant verwendet. Darüberhinaus wird fötales Kälberserum supplementiert, da sich die Expressionsraten der Zellen nach häufigem Passagieren in serumfreiem Medium verringern (O'Reilly *et al.*, 1994)

10.3.2 Zellzahlbestimmung

Die angewendete Methode beruht auf der Anfärbung des Zytoplasmas toter Zellen mit Trypanblau. Die Membranen lebender Zellen sind in der Lage, die Diffusion des Farbstoffs ins Zellinnere zu verhindern.

Die Zählung der Zellen erfolgt mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer im Phasenkontrastmikroskop. Da die Kammer über vier Teilkammern mit einem Volumen von je $0,1\ \mu\text{L}$ verfügt, ergibt sich die Zellkonzentration nach:

$$c = \frac{n \cdot VF \cdot 10^4}{4} \quad (10.3)$$

mit	c	1/mL	Zellkonzentration
	n	-	Zellzahl pro Teilkammer
	VF	-	Verdünnungsfaktor

Die Vitalität der Population ergibt sich aus dem Anteil lebender Zellen:

$$\text{Vit} = \frac{c_v}{c} \quad (10.4)$$

mit	Vit	-	Vitalität
	c_v	1/mL	Konzentration vitaler Zellen
	c	1/mL	Zellkonzentration

10.3.3 Plaque-Assay

Zur Bestimmung der Virenkonzentration wurde die Methode nach Reed (Reed und Muench, 1938) angewendet. Hierbei wird die Stammlösung so weit verdünnt, bis jede Infektion von einem einzelnen Virus herrührt. Virentiter werden in pfu/mL^1 ausgedrückt.

1×10^4 Zellen in $100\ \mu\text{L}$ werden in jedes *microwell* einer Mikrotiterplatte pipettiert, nach 1 h wird Virenlösung in entsprechender Verdünnung in 1 mL Medium zugegeben. Nach sechs Tagen im Brutschrank zählt man die Infektionen. Abb. 10.3 zeigt ein Excel-spreadsheet zur Berechnung des Virentiters.

10.3.4 Umgang mit genetisch veränderten Organismen (GVO)

Alle Arbeitsschritte, bei denen mit zell- oder virenhaltigen Suspensionen umgegangen wird, werden in geschlossenen Systemen durchgeführt. Alle GVO-haltigen Flüssigkeiten müssen vor ihrer Entsorgung in geschlossenen Gefäßen für 20 min bei 121°C autoklaviert werden.

¹ Plaque Forming Units/mL

	A	B	C	D	E	F	G
1	dilutions	number of infected wells	number of uninfected wells	total number infected	total number uninfected	% total infected	above 0.5
2	0.00001	12	=B10-B5	=SUM(B5:B8)	=SUM(C5:C5)	=D5/(D5+E5)	=IF(F5>0.5,"TRUE","FALSE")
3	0.000001	8	=B10-B6	=SUM(B6:B8)	=SUM(C5:C6)	=D6/(D6+E6)	=IF(F6>0.5,"TRUE","FALSE")
4	0.0000001	1	=B10-B7	=SUM(B7:B8)	=SUM(C5:C7)	=D7/(D7+E7)	=IF(F7>0.5,"TRUE","FALSE")
5	0.00000001	0	=B10-B8	=SUM(B8:B8)	=SUM(C5:C8)	=D8/(D8+E8)	=IF(F8>0.5,"TRUE","FALSE")
6							
7	N° of wells	12					
8	mL/well	0.01					
9							
10	prop.dist.	= (H10-.05)/(H10-I10)					
11	log TCID	=J10-B13					
12	TCID ₅₀	=10^B14					
13	1/TCID ₅₀	=1/B15					
14	TCID ₅₀ /mL	=B16/B11					
15							
16	pfu/mL	=B17*0.69					

	H	I	J
1	% above 0.5	% below 0.5	log dilution above 50%
2	=IF(AND(G5="TRUE",G6="FALSE"),F5.0)	=IF(AND(G4="TRUE",G5="FALSE"),F5.0)	=IF(H5>0;LOG(A5),0)
3	=IF(AND(G6="TRUE",G7="FALSE"),F6.0)	=IF(AND(G5="TRUE",G6="FALSE"),F6.0)	=IF(H6>0;LOG(A6),0)
4	=IF(AND(G7="TRUE",G8="FALSE"),F7.0)	=IF(AND(G6="TRUE",G7="FALSE"),F7.0)	=IF(H7>0;LOG(A7),0)
5	=IF(AND(G8="TRUE",G9="FALSE"),F8.0)	=IF(AND(G7="TRUE",G8="FALSE"),F8.0)	=IF(H8>0;LOG(A8),0)
6			
7	=SUM (H5:H8)	=SUM(I5:I8)	=SUM(J5:J8)
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			

Abb.10.3: Excel-spreadsheet zur Berechnung des Virentiters

10.3.5 Ionenauschromatographie

Zwei Säulen werden mit 240 mL DEAE-Sepharcel-Anionentauscher bzw. 60 mL S-Sepharose Fast Flow-Kationentauscher-Gel gepackt, hintereinandergeschaltet und mit Puffer I equilibriert. Dann werden sie mit dem Diafiltrat in Puffer I beladen, die S-Sepharose-Säule wird mit Puffer I gespült und mit einem NaCl-Gradienten (Puffer I + II) eluiert.

Puffer I: 25 mM Bis-Tris, 10 mM NaCl, 2 mM MnCl_2 , pH 6
Puffer I: 25 mM Bis-Tris, 500 mM NaCl, 2 mM MnCl_2 , pH 6
Flußraten: 30 mL/h (Probenaufgabe, Spülen); 120 mL/h (Elution)

10.4 Aufreinigung der GlcNAc-Transferase

10.4.1 Herstellung eines IgG-Sephrose-Gels

Zur Herstellung von 10 mL Gel läßt man 2,85 g CNBr-aktivierte Sepharose (4 B Pharmacia) bei Raumtemperatur in 1 mM HCl (15 mL) quellen, bis sich eine einheitliche Suspension gebildet hat. Dann wäscht man mit 1 mM HCl. Anschließend werden 200 mg IgG in 15 mL Carbonat-Puffer gelöst. Zur Kopplung wird das abfiltrierte Sepharose-Gel in der Immunglobulin-Lösung suspendiert und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Die IgG-Sephrose wird abfiltriert und mit 5 Gelvolumina Carbonat-Puffer gewaschen, um überschüssigen Liganden auszuspülen. Im Anschluß werden die verbliebenen aktiven CNBr-Gruppen mit 25 mL des Tris-HCl-Puffer I durch Schütteln für 2 h bei Raumtemperatur geblockt. Das Gel wird erneut abfiltriert und dann dreimal hintereinander mit Acetat- und Tris-HCl-Puffer II gewaschen. Es wurde eine Beladung der Säule von 5,8 mg Protein pro mL Gelvolumen gemessen. Die IgG-Sephrose wird im Phosphat-Puffer bei 4°C gelagert.

Carbonat-Puffer: 0,1 M NaHCO_3 , 0,5 M NaCl, pH 8,5
Tris-HCl-Puffer (I): 0,1 M Tris, pH 8,0
Tris-HCl-Puffer (II): 0,1 M Tris, 0,5 M NaCl, pH 8,0
Acetat-Puffer: 0,1 M Na-Acetat, 0,5 M NaCl, pH 4,0
Phosphat-Puffer: 50 mM K_2HPO_4 , 1 mM MgCl_2 , 20% Ethanol, 0,02% NaN_3 , pH 7,2

10.4.2 IgG-Affinitätschromatographie

Die Säule wird mit dem Diafiltrat in PBS-Puffer beladen, gespült wird mit Tris-Puffer I, eluiert mit Glycin-HCl-Puffer. Zur Neutralisierung wird in den Reagenzgläsern des Fraktionssammlers Tris-Puffer II vorgelegt. Alle Flußraten betragen 100 mL/h.

PBS-Puffer: 11,5 g Na_2HPO_4 , 2 g KH_2PO_4 , 80 g NaCl, 2 g KCl, 10 L H_2O , pH 7,2
Tris-Puffer I: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,6
Glycin-HCl-Puffer: 0,1 M Glycin, pH 3
Tris-Puffer II: 0,3 M Tris, 0,3 M Glycin, pH 8,9

10.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Farbstoff *Coomassie Brilliant* Blau G250 wird bei diesem Assay als Färbereagenz eingesetzt (Bradford, 1972). Der Protein-Farbstoff-Komplex hat einen vielfach höheren Extinktionskoeffizienten als der freie Farbstoff. Mit Hilfe einer Eichkurve, die mit BSA-Standardlösungen aufgenommen wurde, können unbekannte Proteinkonzentrationen photometrisch bei einer Wellenlänge von 650 nm bestimmt werden. Für alle Bestimmungen wurde ein gebrauchsfertiges Bradford-Reagens der Firma Bio-Rad (München) verwendet. Dazu wurden 50 μL des Reagenzes mit 200 μL der Probelösung gemischt und nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten die Extinktion des Farbstoff-Protein-Komplexes im Mikroplattenleser gemessen.

10.5 Ultrafiltrationen zur Umpufferung von Enzymen

10.5.1 Sialyltransferase

Der Zellüberstand passierte zuerst eine Membran mit einer Ausschlußgrenze von 300 kDa zur Abtrennung der Baculoviren (Rodemann, 1997). Anschließend wurde das Fermentationsmedium in einer Rührzelle mit einer Membran des Typs YM-10 durch Zugabe von insgesamt zehn Volumina MES-Puffer (100 mM, pH 6,5) ausgespült und dreißigfach konzentriert. Die Enzymlösung mit einer spezifischen Aktivität von 350 mU/mL wurde bei -20°C eingefroren.

10.5.2 β -Galactosidase

Die Enzymlösungen der Firmen Oxford GlycoSciences und Sigma wurden in einer Rührzelle mit einer Membran des Typs YM-10 umgepuffert, das Sigma-Enzym mußte außerdem aufkonzentriert werden. Dies geschah durch den Austausch von insgesamt 10 Volumina mit 50 mM MES-Puffer (pH 6). Die Lösungen, die eine spezifische Aktivität von etwa 3 U/mL aufwiesen, wurden mit 1 mg/mL BSA und 0,02% NaN_3 versetzt und bei 4°C gelagert.

10.6 Synthesen

10.6.1 Kapitel 4

per-TMS-Fucose (4-2)

329 mg Fucose (2 mmol) wurden in Pyridin gelöst und 1,5 mL TMS-Cl (12 mmol) zugegeben. Nach 1 h wurde die Reaktionslösung mit 120 mL *n*-Pentan gemischt und mit kaltem Wasser extrahiert (5·20 mL). Die organische Phase wurde mit MgSO_4 getrocknet und filtriert. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittel wurde das Produkt per-TMS-Fuc in quantitativer Ausbeute erhalten (0,91 g).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz, 300K) δ (ppm) = 5,00 (s, H-1); 4,04-3,98 (q, H-5); 3,79, 3,57 (s, 3H, H-2, H-3, H-4); 1,09 (d, 3H, $J_{5,6}$ = 6 Hz, H-6).

UDP-*n*Bu₄N-Salz (4-4)

Das Butylammonium-Salz wurde aus dem kommerziell erhältlichen Natriumsalz gewonnen. Dazu löst man 0,5 g des Nucleotids (1 mmol) in 50 mL Wasser und gibt 30 mL Dowex 50Wx8 (H^+ , 200-400 mesh) zu. Anschließend filtriert man den Ionentauscherharz ab und titriert die Lösung mit 40%iger *n*Bu₄N(OH)-Lösung bis pH 7. Das Produkt GDP(*n*-Bu₄N) wurde lyophilisiert und in quantitativer Ausbeute erhalten.

GDP- β -Fucose (4-5b)

0,91 g per-TMS-Fuc (2 mmol) wurden in 3,3 mL CH_2Cl_2 gelöst. Anschließend wurden 284 μL TMS-I (2 mmol) bei 0°C zugegeben. Nach einer Stunde Rühren wurde 1 mmol GDP(*n*-Bu₄N) und ein Äquivalent Hünig-Base in 20 mL CH_2Cl_2 gelöst und diese Lösung bei 0°C mit der Hälfte der Lösung des Fucose-Derivats gemischt. Nach zweistündigem Rühren wurde auch die zweite Hälfte zugegeben. Nach zwei weiteren Stunden wurde die Reaktion durch Zudosierung von Bu₄NF-Lösung (1 M in THF, 2 mL) gestoppt. Es wurde ein GDP-

Fucose-Anomerengemisch ($\beta/\alpha = 1,6$) bei einer Ausbeute von 24% (14,3% GDP- β Fuc) erhalten.

Die Produktlösung wurde mit 100 mL Carbonat-Puffer (100 mM) verdünnt, um so das α -Anomer bei pH 11 selektiv zu hydrolysieren (RT, 12 h, 90% Ausbeute). Anschließend wurde auf pH 9 titriert und 100 U alkalische Phosphatase zugegeben, um GMP und GDP zu hydrolysieren. Nach 16 h bei RT wurde die Reaktionsmischung auf eine Anionentauschersäule aufgegeben (Dowex 1x2 100-200 mesh, 4°C) und der Nucleotidzucker mit einem LiCl-Gradienten (50-1000 mM) eluiert (88% Ausbeute).

Das Produkt wurde mit einer MX07-Nanofiltrationsmembran der Firma Osmonics entsalzt (vgl. Kap. 10.8). Es wurden 60 mg erhalten (88% Ausbeute).

¹H-NMR (D₂O, 300 MHz, 300K) F = Fucose; R = Ribose; G = Guanin; δ (ppm) = 8,128 (s, G-8); 5,950 (d, $J_{1,2} = 6$ Hz, R-1); 4,930 (dd, $J = 8$ Hz, F-1); 4,80 (R-2); 4,548 (m, R-3); 4,362 (m, R-4); 4,220 (m, R-5); 3,784 (q, F-5); 3,720 (dd, F-4); 3,670 (dd, F-3); 3,565 (dd, F-2); 1,220 (d, $J_{5,6} = 6$ Hz, F-6).

10.6.2 Kapitel 5¹

core2-Bn (5-3) und core6-Bn (5-4)

Gal(β 1-3)[*GlcNAc*(β 1-6)]*GalNAc*(α 1-Bn) (5-3) und *Gal*(β 1-3)*GalNAc*(α 1-Bn) (5-4)

Durch die Verdopplung der GlcNAcT-Aktivität im Vergleich zum besten Satzreaktorversuch (vgl. Abb. 5.18) und die Absenkung der Reaktionstemperatur wurde die Selektivität zum core2-Produkt verschoben. Die Reaktion wurde nach 2,5 Tagen abgebrochen. Das Reaktionsgemisch wurde auf der präparativen HPLC mit einer isokratischen Wasser/Acetonitril-Mischung (88/12 – v/v) aufgetrennt. Es konnten 3,4 mg core2-Bn und 4,8 mg core6-Bn isoliert werden.

2 mL MES (50 mM, pH 6); 0,5 M Lac; 20 mM GalNAc-Bn; 25 mM UDP-GlcNAc; 10 mM MgCl₂; 0,5 mg/mL BSA; 250 mU/mL Galactosidase; 100 mU/mL GlcNAcT; 10 U/mL CIAP; 37°C.

Eine 0,5 molare Lactose-Lösung ist autosteril, auf die Zugabe von Natriumazid kann daher verzichtet werden.

core2-Bn (5-3): FAB-MS (Glycerin) m/z 699,2 (M+Na⁺); 677,2 (M+H⁺); 569,2 (M+H⁺ - BnOH); 515,1 (GlcNAc-GalNAc-OBn+H⁺); 474,2 (Gal-GalNAc-OBn+H⁺); 407,1 (515,1 - BnOH); 312,1 (GalNAc-OBn+H⁺); 204,1 (M+H⁺ - Gal-GalNAc-OBn).

core6-Bn (5-4): FAB-MS (Glycerin) m/z 537,1 (M+Na⁺); 515,1 (M+H⁺); 407,1 (M+H⁺ - BnOH); 312,1 (GalNAc-OBn+H⁺); 204,1 (M+H⁺ - GalNAc-OBn).

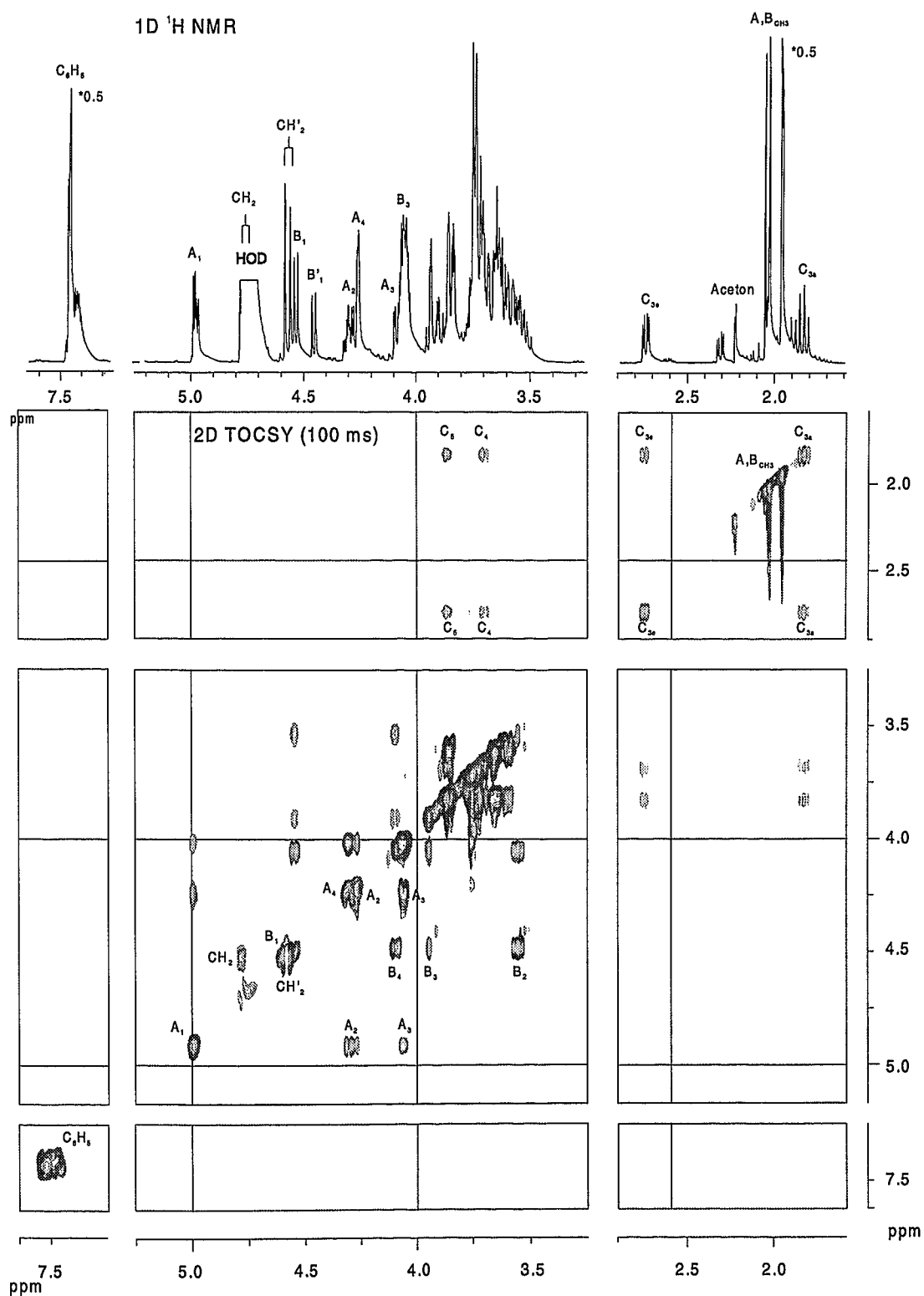
¹H-NMR: Es wurden sowohl eindimensionale als auch 2D TOCSY ¹H-NMR-Messungen durchgeführt. (500 MHz, D₂O, 300K, Referenz: internes Acetat δ 1,908) Das zweidimensionale Spektrum für Sialyl-core1-Bn ist in Abbildung 10.4 zu sehen, die chemischen Verschiebungen für core2-Bn, core6-Bn und Sialyl-core1-Bn sind in Tabelle 10.1 zusammengefasst. NMR-Daten für die Substanzen wurden bereits veröffentlicht (Pollex-Krüger *et al.*, 1993).

¹ Die Strukturuntersuchungen für die in diesem Kapitel beschriebenen Substanzen wurden freundlicherweise von Herrn Dipl.-Chem. Ricardo Gutiérrez Gallego (Arbeitskreis Utrecht) durchgeführt.

Proton	core2-Bn	core6-Bn	Sialyl-core1-Bn
C ₆ H ₅	7,429	7,440	7,449
CH' ₂	4,500	4,508	4,569
CH ₂	4,706	4,692	4,768
GalNAc H1	4,973	4,973	4,984
GalNAc H2	4,313	4,124	4,290
GalNAc H3	4,015	3,893	4,084
GalNAc H4	4,226	3,959	4,256
GalNAc H5	4,148	4,081	n.b. ^a
GalNAc H6a	3,704	3,703	3,738
GalNAc H6b	4,070	4,045	n.b.
GalNAc NAc	1,959	1,972	1,958
GlcNAc H1	4,543	4,518	-
GlcNAc H2	3,746	3,733	-
GlcNAc H3	3,539	3,542	-
GlcNAc H4	3,447	3,448	-
GlcNAc H5	3,474	3,478	-
GlcNAc H6a	3,730	3,741	-
GlcNAc H6b	3,930	3,934	-
GlcNAc NAc	1,964	1,968	-
Gal H1	4,430	-	4,532
Gal H2	3,499	-	3,540
Gal H3	3,601	-	4,067
Gal H4	3,893	-	3,932
Gal H5	3,630	-	n.b.
Gal H6a	n.b.	-	n.b.
Gal H6b	n.b.	-	n.b.
NeuAc H3a	-	-	1,836
NeuAc H3e	-	-	2,740
NeuAc H4	-	-	3,707
NeuAc H4	-	-	3,86*
NeuAc H6	-	-	3,6*
NeuAc H7	-	-	3,582
NeuAc H8	-	-	3,898
NeuAc H9a	-	-	3,86*
NeuAc H9b	-	-	3,6*
NeuAc NAc	-	-	2,029

* überlappende Signale

^a n.b.: nicht bestimmtTab. 10.1: Chemische Verschiebungen der Benzylglycoside (500 MHz; D₂O; 300K)

Abb. 10.4: 2D ^1H -TOCSY NMR-Spektrum von Sialyl-core1-Bn (5-5)

Sialyl-core1-Bn (5-5)

Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-3)GalNAc(α1-Bn)

Aufgrund der geringen Stabilität der CMP-Neu5Ac wurde der Nucleotidzucker absatzweise zudosiert: 10 mM zu Beginn des Experiments, 10 mM nach 8 h, 5 mM nach 32 h. Die präparative Synthese wurde mit dem SiaT-Diafiltrat durchgeführt (Kap. 10.5), die Ausbeute betrug 80%.

Reaktionsbedingungen: 2 mL MES (50 mM, pH 6,5); 0,5 M Lac; 20 mM GalNAc-Bn; 25 mM CMP-Neu5Ac; 0,5 mg/mL BSA; 500 mU/mL Galactosidase; 100 mU/mL SiaT; 10 U/mL CIAP; 20°C; 2 d.

Das Reaktionsgemisch wurde auf der präparativen HPLC mit einer isokratischen Wasser/Acetonitril-Mischung (88/12 – v/v; 0,1% TFA) aufgetrennt. Es konnten 18 mg Sialyl-core1-Bn isoliert werden, was einer Ausbeute von 74% für die chromatographische Aufreinigung entspricht.

MALDI-TOF-MS (2,5-Dihydroxybenzoesäure) *m/z* 955,8 (M+Na⁺).

10.6.3 Kapitel 6¹

MUC1a'-GalNAc (6-2)

AHGV(GalNAcα1)TSAPDTR

Reaktionsbedingungen einer repräsentativen Synthese: 4 mL Tris (50 mM, pH 7); 10 mM Muc1a'; 12 mM UDP-GalNAc; 10 mM MnCl₂; 0,5 mg/mL BSA; 10 U/mL CIAP; 20 mU/mL GlcNAcT; 30°C; 20 h; Ausbeute der Reaktion >95%.

Das Reaktionsgemisch wurde auf der präparativen HPLC mittels eines Wasser/Acetonitril-Gradienten (5%-60% MeCN in 30 min, 0,1% TFA) aufgetrennt. Es konnten 48 mg isoliert werden, was einer Ausbeute von 91% für Reaktion und Aufreinigung entspricht.

MUC1a'-core2 (6-4)

AHGV(GlcNAc[β1-6][Gal(β1-3)]GalNAcα1)TSAPDTR

Reaktionsbedingungen einer repräsentativen Synthese: 1,8 mL MES (50 mM, pH 6); 0,5 M Lac, 20 mM Muc1a'-GalNAc (48 mg); 25 mM UDP-GlcNAc; 10 mM MgCl₂; 0,5 mg/mL BSA; 1 U/mL Galactosidase; 200 mU/mL GlcNAcT; 10 U/mL CIAP; Proteaseinhibitoren: 100 µg/mL PMSF; 1 µg/mL Pepstatin; 0,5 µg/mL Leupeptin; 30°C; 40 h.

Zuerst wird das Peptid im Puffer gelöst und der pH-Wert korrigiert. Erst danach werden die übrigen Substrate sowie die Enzyme zugegeben. Ausbeute der Reaktion: 30%.

Das Reaktionsgemisch wurde auf der präparativen HPLC mittels eines Wasser/Acetonitril-Gradienten (5%-60% MeCN in 30 min, 0,1% TFA) aufgetrennt. Es konnten 17 mg aufgereinigt werden, was einer isolierten Ausbeute von 28% entspricht.

¹ Die massenspektrometrischen Untersuchungen der in diesem Kapitel beschriebenen Substanzen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Neville, Universität Oxford, durchgeführt.

MUC1a'-core2-Gal (6-5)

AHGV(Gal[β 1-4]GlcNAc[β 1-6][Gal(β 1-3)]GalNAc α 1)TSAPDTR

Reaktionsbedingungen: 12 mL MES (50 mM, pH 6,5); 1 mM Muc1a'-core2 (17 mg); 1,2 mM UDP-Gal; 10 mM MnCl₂; 0,5 mg/mL BSA; 2 U/mL CIAP; 20 mU/mL GalT; 30°C; 8 h; Ausbeute der Reaktion: 95%.

Eine Hälfte der Reaktionslösung wurde nicht aufgereinigt, sondern direkt weiter mit der Sialyltransferase umgesetzt. Die andere Hälfte wurde auf der präparativen HPLC mittels eines Wasser/Acetonitril-Gradienten (5%-60% MeCN in 30 min, 0,1% TFA) aufgetrennt. Es konnten 7,8 mg aufgereinigt werden, was einer isolierten Ausbeute von 84% entspricht.

MALDI-TOF-MS: m/z 1841,8 (M+H⁺).

O-Glycan-profiling: Die Glycanstrukturen dieser wie der folgenden Glycopeptidverbindungen wurden vom Kooperationspartner in Oxford sequenziert (vgl. Kap. 10.7)

MUC1a'-core2-Gal-Sia (6-6)

AHGV(Sia[α 2-3]Gal[β 1-4]GlcNAc[β 1-6][Gal(β 1-3)]GalNAc α 1)TSAPDTR

Zu 5 mL der obigen Reaktionslösung werden Enzym und Substrat in den folgenden Mengen zugegeben: 2 mM CMP-Neu5Ac; 30 mU/mL SiaT. Die Reaktion wurde bei 20°C durchgeführt, nach 1 d wurde eine Ausbeute von 90% erreicht.

Eine Hälfte der Reaktionslösung wurde nicht aufgereinigt, sondern direkt weiter mit der Fucosyltransferase umgesetzt. Die andere Hälfte wurde auf der präparativen HPLC mittels eines Wasser/Acetonitril-Gradienten (5%-60% MeCN in 60 min, 0,1% TFA) aufgetrennt. Es konnten 3,5 mg aufgereinigt werden (isolierte Ausbeute: 83%).

MALDI-TOF-MS: m/z 2132,5 (M+H⁺).

MUC1a'-core2-SLe^x (6-7)

AHGV(Sia[α 2-3]Gal[β 1-4][Fuc(α 1-3)]GlcNAc[β 1-6][Gal(β 1-3)]GalNAc α 1)TSAPDTR

Zu 2,3 mL der obigen Reaktionslösung wurden Enzym und Substrat in den folgenden Mengen zugegeben: 2 mM GDP-Fuc; 50 mU/mL SiaT. Die Reaktion wurde bei 20°C durchgeführt, nach 8 h konnte eine Ausbeute von 95% erzielt werden.

Die Produktlösung wurde auf der präparativen HPLC mittels eines Wasser/Acetonitril-Gradienten (5%-60% MeCN in 60 min, 0,1% TFA) aufgetrennt. Es konnten 3,2 mg aufgereinigt werden (isolierte Ausbeute: 86%).

MALDI-TOF-MS: m/z 2278,6 (M+H⁺).

10.6.4 Kapitel 7**GalNAc-Thr (7-7)**

Fmoc-(GalNAc α 1)Thr-OtBu

Der Baustein wurde in Mainz von Frau Bézay synthetisiert und analysiert.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ (ppm): 7,83-7,32 (m, 8H_{aromat.} Fmoc); 4,83 (d, 1H, H-1, J_{1,2} = 3,8 Hz); 4,53 (m, 2H, CH₂ Fmoc); 4,38-4,25 (m, 3H, T ^{β} , H-2, H-9 Fmoc); 4,17 (dd, 1H, T ^{α} , J_{T α , T β} = 10,0 Hz, J_{T α , NH} = 1,5 Hz); 3,93 (d, 1H, H-4, J = 2,6 Hz); 3,92-3,89 und 3,82-3,74 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b); 3,70 (dd, 1H, H-3, J_{2,3} = 11,0 Hz, J_{3,4} = 3,1 Hz); 2,04 (s, 3H, CH₃CON); 1,47 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,27 (d, 3H, T ^{γ} , J _{β , γ} = 6,5 Hz).

^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD). δ (ppm): 173,7 (C=O Amid); 171,1 (C=O Ester) 159,1 (C=O Urethan); 145,2, 142,7 ($\text{C}_{\text{quart.}}$ Fmoc); 128,8; 128,2; 126,1; 121,0 ($\text{C}_{\text{tert.}}$ Fmoc); 100,6 (C-1); 83,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 76,1 (T^β); 73,0; 70,3; 70,0 (C-3, C-4, C-5); 67,8 (CH_2 Fmoc); 62,8 (C-6); 60,8 (T^α); 50,9; 48,5 (C-9 Fmoc, C-2); 28,3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 23,2 (CH_3CON); 18,4 (T^γ).

Sialyl-core1-Thr (7-8)

Fmoc-[Neu5Ac(α 2-3)Gal(β 1-3)GalNAc α 1]Thr-OtBu

Das Aminosäure-Glycan wurde in Jülich synthetisiert und von Frau Bézay in Mainz analysiert.

Eine Stammlösung mit 100 mM GalNAc-Thr (7-7) und 200 Dimethyl- β -cyclodextrin in 50 mM MES pH 6,5 wurde hergestellt, indem beide Substanzen mit der Pufferlösung gemischt und 2 h geschüttelt wurden. Reaktionsbedingungen einer repräsentativen Synthese: 5 mL; 0,5 M Lac; 20 mM GalNAc-Thr; 40 mM Dimethyl- β -cyclodextrin; 25 mM CMP-Neu5Ac; 1 U/mL Galactosidase; 0,2 U/mL SiaT; 10 U/mL CIAP; 50 mM MES; pH 6,5; Analytik: HPLC-System 1 (40% MeCN; 0,1% TFA); 50% Ausbeute.

Das Produkt wurde auf der präparativen HPLC mittels eines Wasser/Acetonitril-Gradienten aufgetrennt:

0 min	10% MeCN
120 min	20% MeCN
180 min	20% MeCN
195 min	40% B
210 min	40% B
225 min	100% B

^1H -NMR (400 MHz, ^1H - ^1H -COSY, CD_3OD): A: GalNAc, B: Gal, C: Neu5Ac, T: Tyrosin; δ (ppm): 7,86-7,34 (m, $8\text{H}_{\text{aromat.}}$ Fmoc); 4,86 (d, H-1A, $J_{1,2} = 3,8$ Hz); 4,54 (d, 2H, CH_2 Fmoc, $J_{\text{CH}_2, \text{H-9}} = 6,5$ Hz); 4,51-4,37 (m, 2H, H-2A, H-1B); 4,32 (t, H-9 Fmoc, $J_{\text{CH}_2, \text{H-9}} = 6,5$ Hz); 4,20-4,17 (m, 2H, H-4A, T^α); 4,04 (dd, H-3B, $J_{3,2} = 9,4$ Hz, $J_{3,4} = 2,6$ Hz); 3,96-3,84 (m, 3H, H-3A, H-4B, H-9aC), 3,81-3,68 (m, 10H, H-5A, H-6aA, H-6bA, H-5B, H-6aB, H-6bB, H-4C, H-6C, H-7C, H-9bC); 3,66-3,60 (m, H-5C); 3,59-3,50 (m, 3H, H-2B, H-8C, T^β), 2,90 (d, H- 3_{eq} C, $J_{3_{\text{eq}}, 3_{\text{ax}}} = 10,9$ Hz); 2,05, 2,04 (2s, 6H, CH_3CON); 1,76 (t, H- 3_{ax} C); 1,48 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1,40, 1,31 (d, 3H, T^γ , $J_{\beta, \gamma} = 6,2$ Hz).

^{13}C -NMR (100 MHz, ^{13}C - ^1H -COSY, CD_3OD): A: GalNAc, B: Gal, C: Neu5Ac, T: Tyrosin; δ (ppm): 175,5, 174,8, 173,9 (C=O); 159,3 (C=O Urethan); 145,3, 142,7 ($\text{C}_{\text{quart.}}$ Fmoc); 128,9; 128,2; 126,1; 121,0 ($\text{C}_{\text{tert.}}$ Fmoc); 106,3 (C-1B); 100,9 (C-1A); 83,5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 78,9 (C-3A); 77,7 (C-3B); 76,7 (T^β); 76,3 (C-8C); 74,9 (C-5C); 72,7 (C-4B), 71,4, 69,4 (C-6C, C-7C); 70,7 (C-2B); 70,1 (C-4A); 69,1 (C-4C); 67,9 (CH_2 Fmoc); 66,7 (C-9C); 63,0, 62,9 (C-6A, C-6B); 61,3 (T^α); 55,9, 54,1 (C-5A, C-5B); 49,7, 48,4 (C-2A, C-9 Fmoc); 42,2 (C-3C); 28,4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 23,6, 22,6 (CH_3CON); 19,88 (T^γ). C-2C konnte nicht zugeordnet werden.

MALDI-TOF-MS: m/z 1093,1 ($\text{M}+\text{K}^+$); 1077 ($\text{M}+\text{Na}^+$).

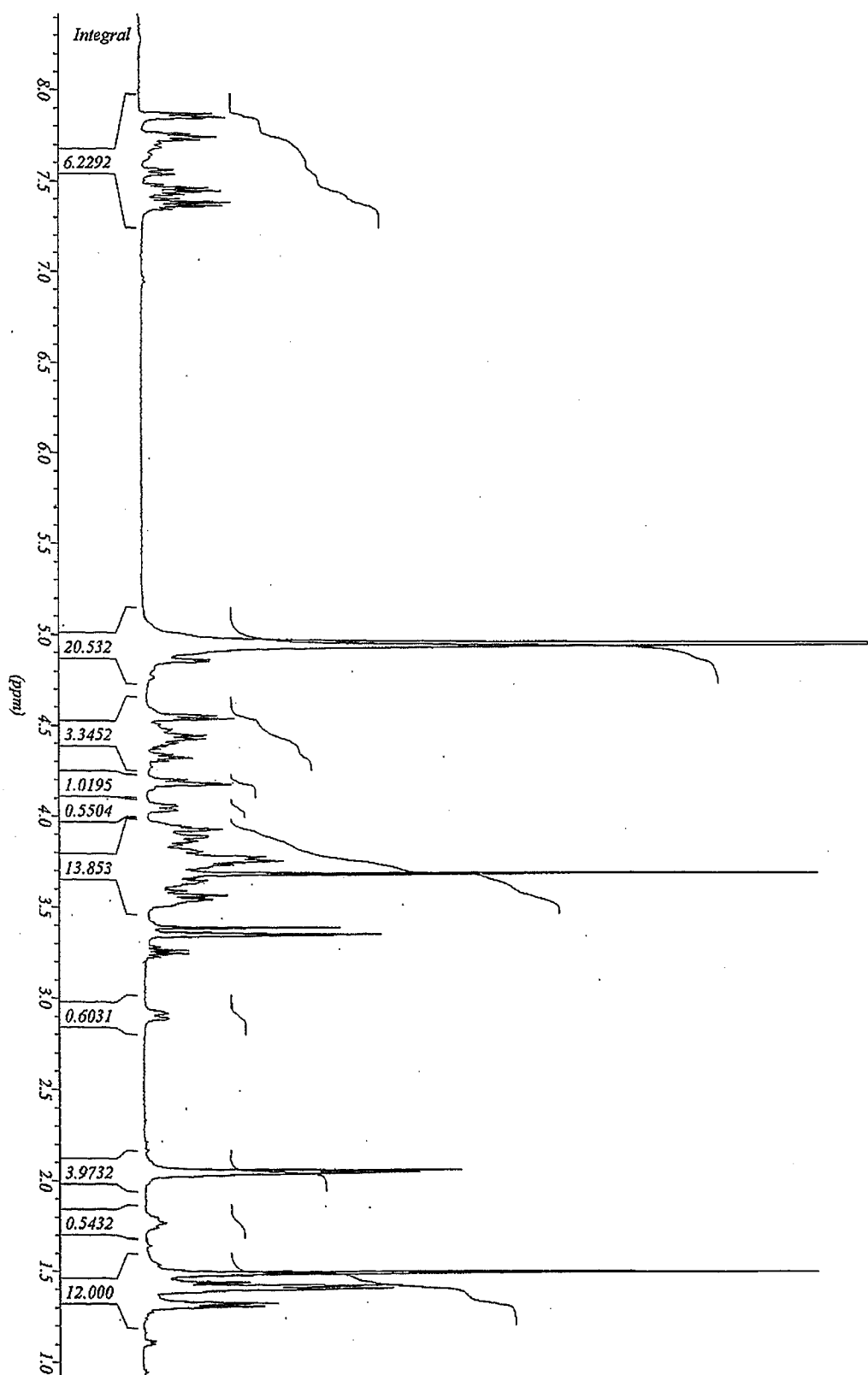


Abb. 10.5: ^1H -NMR-Spektrum von Sialyl-core1-Thr (7-8)

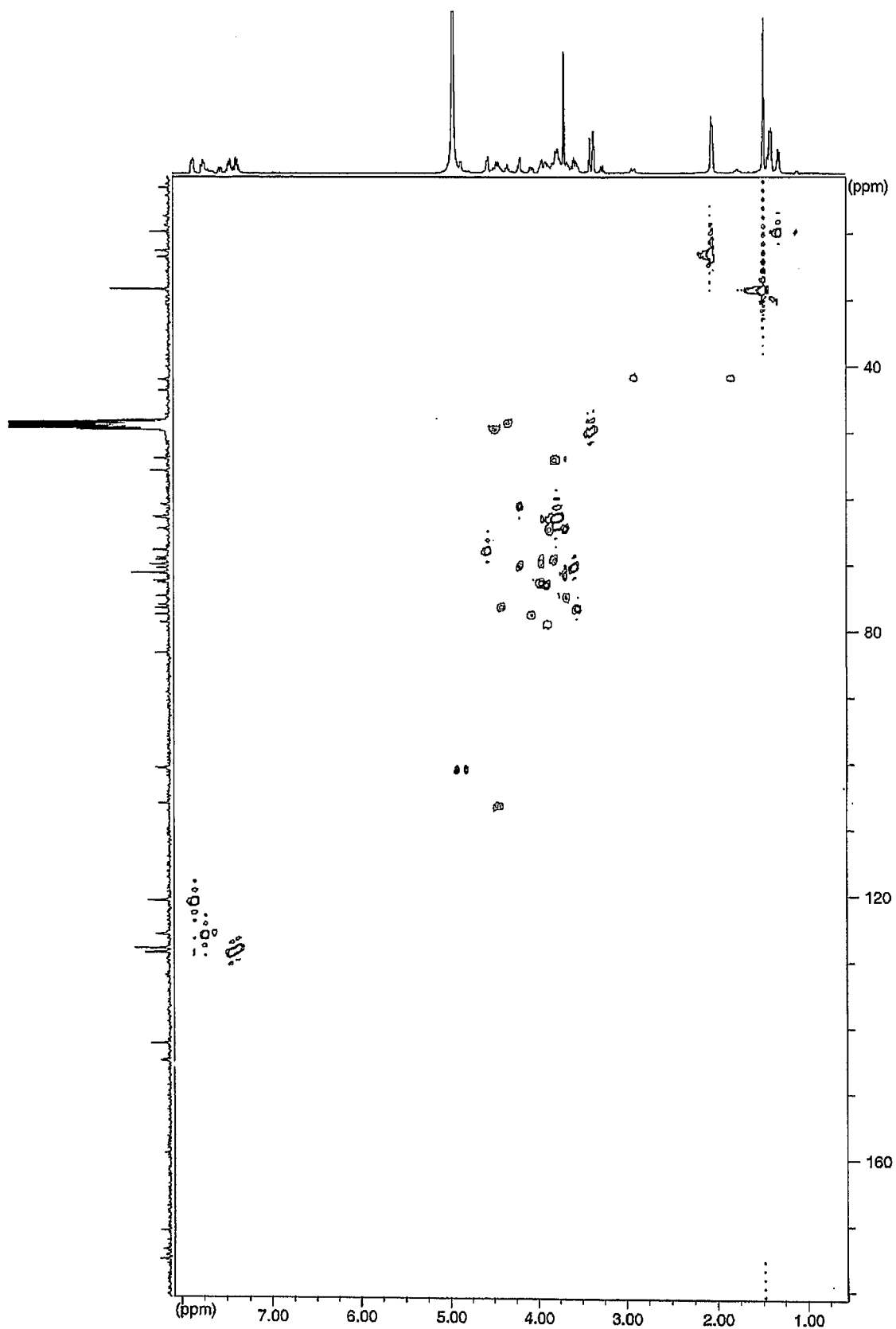


Abb. 10.6: ^{13}C - ^1H -COSY NMR-Spektrum von Sialyl-core1-Thr (7-8)

10.7 O-Glycan-profiling¹

Jedes der drei untersuchten Glycopeptide (6-5 - 6-7) wurde einer standardisierten Prozedur unterzogen, die im folgenden beschrieben ist. Die vollständigen Arbeitsanweisungen können der Veröffentlichung von Mattu *et al* entnommen werden (Mattu *et al*, 1998).

200 µg des Glycopeptids wurden bei 65°C für 4 h einer Hydrazinolyse unterzogen. 50% der Oligosaccharide wurden mit 2-Aminobenzamid verknüpft und mittels Papierchromatographie aufgereinigt.

Alle Proben wurden mit dem folgenden HPLC-System analysiert:

Waters 25690 separations Modul

Säule: GlycoSep N (Glyko, Novato, USA)

PufferA: 50 mM Ammoniumformiat pH 4,4

PufferB: Acetonitril

Gradient: 20% A – 58% A (152 min); 0,4 mL/min

Fluoreszenzdetektion: 330 nm (Ex)/ 420 nm (Em)

10.8 Nanofiltration

Das Filtrationsmodul der Firma Celfa nimmt Flachmembranen mit einem Durchmesser von 75 mm auf. Die Membranfläche beträgt insgesamt 43 cm², von denen 28 cm² verfügbar sind. Die Zahnradpumpe erzeugt einen *cross flow* von 2,9 m/s. Die Konzentrationen wurden wie folgt bestimmt: CMP-Neu5Ac: HPLC; GDP-Fuc: HPLC und CE; LiCl, Na-Formiat: Conductometer. Das Mini-Modul der Firma IftwD hat die folgenden Abmessungen: 8 cm · 1 cm effektive Membranfläche, 0,1 cm Kanaltiefe.

10.9 Materialien

10.9.1 Liste der verwendeten Enzyme

β-Galactosidase (Stierhoden)	Oxford GlycoSciences, Oxford (Großbritannien)
Fucosyltransferase	Sigma, München
β1,4-Galactosyltransferase	Calbiochem, (USA)
GalNAc-Transferase 3	Sigma, München
β1,6-GlcNAc-Transferase	Forschungszentrum Jülich
Phosphatase, alkalisch	Forschungszentrum Jülich
Phosphatase, sauer	Sigma, München
α2,3-O-Sialyltransferase	Sigma, München
α2,3-N-Sialyltransferase	Universität Kopenhagen (Dänemark)
	Calbiochem, (USA)

¹ Die *profiling*-Experimente wurden von Dr. Louise Royle und Dr. Tony Merry in Oxford durchgeführt.

10.9.2 Liste der verwendeten Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acetonitril	Merck, Darmstadt
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
GalNAc-Bn	Sigma, München
core1-Bn	Sigma, München
Bradford-Reagenz	Bio-Rad, München
Citronensäure Monohydrat	Merck, Darmstadt
CMP	Sigma, München
CMP-Neu5Ac	Forschungszentrum Jülich
CNBr-aktivierte Sepharose 4 B	Pharmacia Biotech, Freiburg
Cyclodextrine	Sigma, München
Cytidin	Sigma, München
Diethanolamin	Merck, Darmstadt
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dowex-Harze	Sigma, München
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fucose	Sigma, München
Galactose	Fluka, Buchs (Schweiz)
GDP-Fuc	Forschungszentrum Jülich
Glucose	Fluka, Buchs (Schweiz)
Glycin	Merck, Darmstadt
Guanosindiphosphat	Sigma, München
Hünig-Base	Aldrich, Steinheim
IgG (human, polyclonal)	Zentrale Laboratorien Rotes Kreuz Schweiz, Bern
IgG Sepharose 6 Fast Flow	Sigma, München
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Lactose	Sigma, München
Lithiumchlorid	Fluka, Buchs (Schweiz)
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumphosphat	Merck, Darmstadt
2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure (MES)	Sigma, München
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumformiat	Fluka, Buchs (Schweiz)
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
para-Nitrophenol	Fluka, Buchs (Schweiz)
pnp-Galactose	Sigma, München
para-Nitrophenylphosphat	Sigma, München
Peptide	Genosys, London (Großbritannien)
Salzsäure, konz.	Merck, Darmstadt

Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Trifluoressigsäure	Merck, Darmstadt
Trimethylsilyliodid	Aldrich, Steinheim
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma, München
Tween 20	Sigma, München
UDP	Sigma, München
UDP-Gal	Sigma, München
UDP-GalNAc	Sigma, München
UDP-GlcNAc	Sigma, München
Uridin	Sigma, München
Wasser, bidest.	Forschungszentrum Jülich

10.9.3 Liste der verwendeten Geräte

Amafilter; Langenhagen	Nanofiltrationsmembranen
Amicon, Witten	Ultrafiltrationszellen der Serie 8000
	Ultrafiltrationsmembran YM 10
Applikon	Fermenter
Beckman München	Zentrifuge Microfuge E
Beckmann Betazint, Wildbach	Szintillationszähler BF 8000
Celfa, Seewen (Schweiz)	Filtrationsmodul P28
Christ, Osterode	Gefriertrockner Alpha 2-4
Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg	Tischzentrifuge
Haake, Karlsruhe	Kryostat K20, DC3
	Wärmebad G-D8
	Wasserbad F 3 digital
IftwD, Kerschenbach	<i>Cross flow</i> -Minifiltrationsmodul
IKA Labortechnik, Staufen	Magnetrührer Ikamag RET-G
Ingold Meßtechnik, Steinbach	pH-Elektrode
Latek, Heidelberg	Teflonschläuche
	Verbindungsstücke
Labsystems, Frankfurt	Pipetten Finnpiquette Colour
LAUDA, Lauda-Königshofen	Wärmebad C6-CS
Leybold-Heareus, München	Ölschiebervakuumpumpen DIVAC 2.4 L,
	Trivac D 4B
	Vakuummeßgerät Thermovac TM 210
Metrohm, Herisau (CH)	pH-Meter 691
Mettler Toledo Europe, Gießen	InLab pH-Elektrode (Ø 3 mm)
	Sauerstoffelektrode
Millipore, Eschborn	Micropure Filtereinheiten
Molecular Devices Deutschland, München	Thermo Max Microplate Reader

National Labnet, Woodbridge (USA)	Tischzentrifuge
Osmonics (USA)	Nanofiltrationsmembranen
Pharmacia LKB, Freiburg	HPLC-Pumpe 2150
	Kolbenpumpe P-500
	UV-Detektor 2138 Uvicords
	Schreiber 2210 2-CH Recorder
	Fraktionssammler 2070 Ultrarack II
	Fraktionssammler Frac-100
	Chromatographie-Säulen
Sartorius, Göttingen	Sterilfilter, Vorfilter, Filterhalter
	Analysenwaage Analytic AC 210 P
	Laborwaage LC 2200 S
Schott Glas, Mainz	diverse Glasgeräte
Scientific Ind., Bohemia (USA)	Vortex Genie 2
Watson Marlow, Rotterdam (NL)	Schlauchpumpen 504 U und 503 U/RL
Zentrale Werkstatt FZJ	Begasungskorb für Applikon-Fermenter

„Um etwas interessant zu finden, muß
man es nur lange genug betrachten.“

Gustave Flaubert

11 Literatur

- Ajisaka, K., Fujimoto, H., Nishida, H. (1988). "Enzymic synthesis of disaccharides by use of the reversed hydrolysis activity of β -D-galactosidases" *Carbohydr. Res.* **180**, 35-42.
- Ajisaka, K., Fujimoto, H. (1989). "Regioselective synthesis of trisaccharides by use of a reversed hydrolysis activity of α - and β -D-galactosidase" *Carbohydr. Res.* **185**, 139-146.
- Almeida, R., Amado, M., David, L., Levery, S.B., Holmes, E.H., Merckx, G., van Kessel, A.G., Rygaard, E., Hassan, H., Bennett, E.P., Clausen, H. (1997). "A family of human β 4-galactosyltransferases" *J. Biol. Chem.* **272**, 31979-31991.
- Arlt, M., Hindsgaul, O. (1995). "Rapid chemical synthesis of sugar nucleotides in a form suitable for enzymatic oligosaccharide synthesis" *J. Org. Chem.* **60**, 14-15.
- Aoyagi, T., Takeuchi, T., Matsuzaki, A., Kawamura, K., Kondo, S., Hamada, M., Maeda, K., Umezawa, H. (1969). "Leupeptins, new protease inhibitors from actinomycetes" *J. Antibiot.* **22**, 283-286.
- Appelmelk, B.J., Simoons-Smit, I., Negrini, R., Moran, A.P., Aspinall, G.O., Forte, J.G., de Vries, T., Quan, H., Verboom, T., Maaskant, J.J., Ghiara, P., Kuipers, E.J., Bloemena, E., Tadema, T.M., Townsend, R.R., Tyagarajan, K., Crothers, J.M., Monteiro, M.A., Savio, A., de Graaf, J. (1996). "Potential role of molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and host Lewis blood group antigens in autoimmunity" *Infect. Immun.* **64**, 2031-2040.
- Appert, H.E., Rutherford, T.J., Tarr, G.E., Wiest, J.S., Thomford, N.R., McCorquodale, D.J. (1986). "Isolation of a cDNA coding for human galactosyltransferase" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**, 163-168.
- Augé, C., Gautheron, C. (1988). "An efficient synthesis of cytidine monophospho-sialic acids with four immobilized enzymes." *Tetrahedron Lett.* **29**, 789-790.
- Babad, H., Hassid, W.Z. (1964). "A soluble lactose synthesizing enzyme from bovine milk" *J. Biol. Chem.* **239**, 946.
- Babad, H., Hassid, W.Z. (1966). "Soluble uridine diphosphate D-galactose:D-glucose β -1,4-D-galactosyltransferase from bovine milk" *J. Biol. Chem.* **241**, 2672-2678.
- Bänteli, R., Ernst, B. (1997). "Synthesis of sialyl Lewis^x mimics: replacement of galactose by aromatic spacers" *Tetrahedron Lett.* **38**, 4059-4062.
- Bäuerle, P.A., Huttner, W.B. (1987). "Tyrosine sulfation is a *trans*-Golgi-specific protein modification" *J. Cell Biol.* **105**, 2655-2664.
- Baisch, G., Öhrlein, R. (1997). "Convenient chemoenzymatic synthesis of β -purine-diphosphate sugars (GDP-fucose-analogues)" *Bioorg. Med. Chem.* **5**, 383-391.
- Baisch, G., Öhrlein, R., Katopodis, A., Streiff, M., Kolbinger, F. (1997). "Synthetic potential of cloned fucosyl-transferase III and VI" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7**, 2447-2450.
- Baisch, G., Öhrlein, R. (1998). "Glycosyl-transferase catalyzed assemblage of sialyl-Lewis(x)-saccharopeptides" *Bioorg. Med. Chem.* **6**, 1673-1682.

- Baisch, G., Öhrlein, R., Streiff, M., Kolbinger, F. (1998). "Enzymatic synthesis of sialyl-Lewis^a-libraries with two nonnatural monosaccharide units" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 755-758.
- Baker, M.A., Taub, R.N., Kanani, A., Brockhausen, I., Hindenburg, A. (1985). "Increased activity of a specific sialyltransferase in chronic myelogenous leukemia" *Blood* **66**, 1068-1071.
- Baker, M.A., Kanani, A., Brockhausen, I., Schachter, H., Hindenburg, A., Taub, R.N. (1987). "Presence of cytidine 5'-monophospho-N-acetylneuraminic acid:Gal β 1-3GalNAc-R α (2-3)-sialyltransferase in normal human leukocytes and increased activity of this enzyme in granulocytes from chronic myelogenous leukemia patients" *Cancer Res.* **47**, 2763-2766.
- Balagué, C., Gambús, G., Carrato, C., Porchet, N., Aubert, J.-P., Kim, Y.S., Real, F.X. (1994). "Altered expression of MUC2, MUC4, and MUC5 mucin genes in pancreas tissues and cancer cell lines" *Gastroenterology* **106**, 1054-1061.
- Beck, W., Engelhardt, H. (1992). "Capillary electrophoresis of organic and inorganic cations with indirect UV detection" *Chromatographia* **33**, 313-316.
- Beecher, J.E., Andrews, A.T., Vulfson, E.N. (1990). "Glycosidases in organic solvents: transgalactosylation catalysed by polyethylene glycol-modified β -galactosidase" *Enzyme Microb. Tech.* **12**, 955-959.
- Beisswanger, R., Corbeil, D., Vannier, C., Thiele, C., Dohrmann, U., Kellner, R., Ashman, K., Niehrs, C., Huttner, W.B. (1998). "Existence of distinct tyrosylprotein sulfotransferase genes: Molecular characterization of tyrosylprotein sulfotransferase-2" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 11134-11139.
- Bennett, E.P., Hassan, H., Clausen, H. (1996). "cDNA cloning and expression of a novel human UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase" *J. Biol. Chem.* **271**, 17006-17012.
- Bennett, E.P., Hassan, H., Mandel, U., Mirgoridskaya, E., Roepstorff, P., Burchell, J., Taylor-Papadimitriou, J., Hollingsworth, M.A., Merks, G., van Kessel, A.G., Eiberg, H., Steffensen, R., Clausen, H. (1998). "Cloning of a human UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase that complements other GalNAc transferases in complete O-glycosylation of the MUC1 tandem repeat" *J. Biol. Chem.* **273**, 30472-30481.
- Berger, E.G. (1994). "Glycobiologie: Ein neuer Zugang zur Entzündungsforschung" *Neue Zürcher Zeitung*, 26. 5. 1994, Zürich.
- Bevilacqua, M., Stengelin, S., Gimbrone Jr., M.A., Seed, B. (1989). "Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins" *Science* **243**, 1160-1164.
- Bierhuizen, M.F.A., Fukuda, M. (1992). "Expression cloning of a cDNA encoding UDP-GlcNAc-Gal β 1-3-GalNAc-R (GlcNAc to GalNAc) β 1-6GlcNAc transferase by gene transfer into CHO cells expressing polyoma large tumor antigen" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9326-9330.
- Binch, H., Stangier, K., Thiem, J. (1998). "Chemical synthesis of GDP-L-galactose and analogues" *Carbohydr. Res.* **306**, 409-419.
- Biselli, M., Kragl, U., Wandrey, C. (1995). "Reaction engineering for enzyme-catalyzed biotransformations" in: Drauz, K., Waldmann, H. (Hrsg.): "Enzyme Catalysis in Organic Synthesis" VCH, Weinheim, 89-155.
- Biselli (1999). Persönliche Mitteilung.

- Bisswanger, H. (1979).** "Theorie und Methoden der Enzymkinetik" VCH, Weinheim.
- Bodanszky, M., Martinez, J., Priestley, G.P., Gardner, J.D., Mutt, V. (1978).** "Cholecystokinin (pancreozymin): synthesis and properties of a biologically active analogue of the C-terminal heptapeptide with ϵ -hydroxynorleucine sulfate" *J. Med. Chem.* **21**, 1030-1035.
- Boehringer Mannheim (1987).** "Biochemica Information".
- Borén, T., Falk, P., Roth, K., Larson, G., Normark, S. (1993).** "Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens" *Science* **262**, 1892-1895.
- Bradford, M.M. (1972).** "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.
- Bresalier, R., Ho, S., Schöppner, H., Kim, Y., Slesinger, M., Brodt, P., Byrd, J. (1996).** "Enhanced sialylation of mucin-associated carbohydrate structures in human colon cancer metastasis" *Gastroenterology* **110**, 1354-1367.
- Brockhausen, I., Möller, G., Merz, G., Adermann, K., Paulsen, H. (1990).** "Control of mucin synthesis: the peptide portion of synthetic O-glycopeptide substrates influences the activity of O-glycan core 1 UDP-galactose: polypeptide N-acetyl- α -galactosaminyl-R β 3-galactosyltransferase" *Biochemistry* **29**, 10206-10212.
- Brockhausen, I., Toki, D., Brockhausen, J., Peters, S., Bielfeldt, T., Kleen, A., Paulsen, H., Meldal, M., Hagen, F., Tabak, L.A. (1996).** "Specificity of O-glycosylation by bovine colostrum UDP-GalNAc: polypeptide α -N-acetylgalactosaminyltransferase using synthetic glycopeptide substrates" *Glycoconjugate J.* **13**, 849-856.
- Brockhausen, I., Schutzbach, J., Kuhns, W. (1998a).** "Glycoproteins and their relationship to human disease" *Acta Anat.* **161**, 36-78.
- Brockhausen, I., Yang, J., Dickinson, N., Ogata, S., Itzkowitz, S.H. (1998b).** "Enzymatic basis for sialyl-Tn expression in human colon cancer cells" *Glycoconjugate J.* **15**, 595-603.
- Brunel University West London (1998).** Artificial life and genetic algorithms, HTML-Dokument unter <http://www.brunel.ac.uk:8080/research/AI/alife/ga.htm>.
- Bülter, T., Wandrey, C., Elling, L. (1997).** "Chemoenzymatic synthesis of UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine" *Carbohydr. Res.* **305**, 469-473.
- Bundgaard, J.R., Vuust, J., Rehfeld, J.F. (1997).** "New consensus features for tyrosine O-sulfation determined by mutational analysis" *J. Biol. Chem.* **272**, 21700-21705.
- Burger, P.C., Lotscher, M., Streiff, M., Kleene, R., Kaissling, B., Berger, E.G. (1998).** "Immunocytochemical localization of α 2,3(N)-sialyltransferase (ST3Gal III) in cell lines and rat kidney tissue sections: evidence for Golgi and post-Golgi localization" *Glycobiology* **8**, 245-257.
- Burgess, S. (1977).** "Molecular weights of Lepidopteran baculovirus DNAs: derivation by electron microscopy" *J. Gen. Virol.* **37**, 501-510.
- Butcher, E.C., Picker, L.J. (1996).** "Lymphocyte homing and homeostasis" *Science* **272**, 60-65.
- Casu, B., Reggiani, M., Sanderson, G.R. (1979).** "Methylated cycloamyloses (cyclodextrins) and their inclusion properties" *Carbohydr. Res.* **76**, 59-66.
- Chen, W.Y., Bahl, O.P. (1991).** "Recombinant carbohydrate and selenomethionyl variants of human choriogonadotropin" *J. Biol. Chem.* **266**, 8192-8197.

- Chen, Y., Lichtenthaler, R.N. (1993). "Nichtporöse Membranen und ihre Anwendung" *Chem.-Ing.-Tech.* **65**, 901-913.
- Cheng, P.-W., Wingert, W.E., Little, M.R., Wei, R. (1985). "Mucin biosynthesis: properties of a bovine tracheal mucin β -6-N-acetylglucosaminyltransferase" *Biochem. J.* **227**, 405-412.
- Clausen, H. (1998). Persönliche Mitteilung.
- Cornish-Bowden, A. (1995). "Fundamentals of enzyme kinetics" Portland Press Ltd., London.
- Dandekar, T., Argos, P. (1992). "Potential of genetic algorithms in protein folding and protein engineering simulations." *Protein Eng.* **5**, 637-645.
- Dandekar, T., Argos, P. (1997). "Applying experimental data to protein fold prediction with the genetic algorithm" *Protein Eng.* **10**, 877-893.
- Danishefsky, S.J., Bilodeau, M.T. (1996). "Glycale in der organischen Synthese: die Entwicklung umfassender Strategien zum Aufbau von Oligosacchariden und Glyco-konjugaten mit biologischer Bedeutung" *Angew. Chem.* **108**, 1482-1522.
- Danzig, J., Tischer, W., Wandrey, C. (1995). "Continuous enzyme-catalyzed production of 6-aminopenicillanic acid and product concentration by reverse osmosis" *Chem. Eng. Technol.* **18**, 256-259.
- Darwin, C. (1859). "The origin of species by means of natural selection or the preservation of favoured races in the struggle for life" Murray, J. (Hrsg.).
- DeFrees, E.A., Phillips, L., Guo, L., Zalipsky, S. (1996). "Sialyl Lewis x liposomes as a multivalent ligand and inhibitor of E-selectin mediated cellular adhesion" *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 6101-6104.
- Dekany, G., Wright, K., Toth, I. (1997). "An economical synthesis of Lewis X, sialyl Lewis X and their alpha-galactosyl analogues" *J. Carbohydr. Chem.* **16**, 983-999.
- Delannoy, P., Pelczar, H., Vandamme, V., Verbert, A. (1993). "Sialyltransferase activity in FR3T3 cells transformed with ras oncogene: decreased CMP-Neu5Ac:Gal β 1-3GalNAc α -2,3-sialyltransferase" *Glycoconjugate J.* **10**, 91-98.
- Deschavanne, P.J., Viratelle, O.M., Yon, J.M. (1978). "Conformational adaptivity of the active site of β -galactosidase: interaction of the enzyme with some substrate analogous effectors" *J. Biol. Chem.* **253**, 833-837.
- de Vries, T., Srnka, C.A., Palcic, M.M., Swiedler, S.J., Eijnden, v.d., Macher, B.A. (1995). "Acceptor specificity of different length constructs of human recombinant α 1,3/4-fucosyltransferases" *J. Biol. Chem.* **270**, 8712-8722.
- Distler, J.J., Jourdian, G.W. (1973). "The purification and properties of β -galactosidase from bovine testes" *J. Biol. Chem.* **248**, 6772-6780.
- Dudziak, G. (1996). "Kinetische Analyse einer α 2,3-Sialyltransferase aus einem Baculovirus-Expressionssystem" Diplomarbeit, Universität Bonn.
- Dudziak, G., Zeng, S., Berger, E.G., Gutiérrez Gallego, R., Kamerling, J.P., Kragl, U., Wandrey, C. (1998). "In situ generated O-glycan core1 structure as substrate for Gal(β 1-3)GalNAc β -1,6-GlcNAc transferase" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 2595-2598.
- Dudziak, G., Fey, S., Hasbach, L., Kragl, U. (1999). "Nanofiltration for purification of nucleotide sugars" *J. Carbohydr. Chem.* **18**, 41-50.

- Dulkanchainun, T.S., Goss, J.A., Imagawa, D.K., Shaw, G.D., Anselmo, D.M., Kaldas, F., Wang, T., Zhao, D.L., Busuttil, A.A., Kato, H., Murray, N.G.B., KupiecWeglinski, J.W., Busuttil, R.W. (1998). "Reduction of hepatic ischemia/reperfusion injury by a soluble P-selectin glycoprotein ligand-1" *Annals of Surgery* **227**, 832-839.
- Eisenkrätzer, D. (1999). "Produktion rekombinanter Glykosyltransferasen mit Chinese-Hamster-Ovary-Zellen: Bioverfahrenstechnische und gentechnische Aspekte der Prozeßentwicklung" Dissertation, Universität Aachen.
- Elhammer, A.P., Kornfeld, S. (1986). "Purification and characterization of UDP-N-acetylgalactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase from bovine colostrum and murine lymphoma BW5147 cells" *J. Biol. Chem.* **261**, 5249-5255.
- Elhammer, A.P., Poorman, R.A., Brown, E., Maggiora, L.L., Hoogerheide, J.G., Kézdy, F.J. (1993). "The specificity of UDP-GalNAc-polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase as inferred from a database of in vivo substrates and from the in vitro glycosylation of proteins and peptides" *J. Biol. Chem.* **268**, 10029-10038.
- Elling, L. (1997). "Glycobiotechnology: Enzymes for the synthesis of nucleotide sugars" in: Scheper, T. (Hrsg.): "Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology" **58** Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 89-144.
- Elling, L. (1999). Persönliche Mitteilung.
- Engelhardt, H., Beck, W., Kohr, J., Schmitt, T. (1993). "Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten" *Angew. Chem.* **105**, 659-804.
- Engelhardt, H., Beck, W., Schmidt, T. (1994). "Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten" Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden.
- Fernández-Mayoralas, A. (1997). "Synthesis and modification of carbohydrates using glycosidases and lipases" *Topics Curr. Chem.* **186**, 1-21.
- Fey, S. (1997). "Reaktionstechnik der chemoenzymatischen Synthese natürlicher und nicht-natürlicher Guanosin-5'-diphospho-aktiverter Kohlenhydrate" Dissertation, Universität Bonn.
- Foxall, C., Watson, S.R., Dowbenko, C., Fennie, C., Lasky, L.A., Kiso, M., Hasegawa, A., Asa, D., Brandley, B.K. (1992). "The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the Sialyl Lewis^x oligosaccharide" *J. Cell Biol.* **117**, 895-902.
- Fraser, M.J. (1986). "Ultrastructural observations of virion maturation in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infected *Spodoptera frugiperda* cell cultures" *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* **95**, 189-195.
- French, D. (1957). "The Schardinger Dextrins" *Adv. Carbohydr. Chem.* **12**, 189-260.
- Fujimoto, H. (1997). "Regioselective synthesis of β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 3)-D-GlcNAc using β -galactosidase from *Xanthomonas manihotis*" *J. Carbohydr. Chem.* **16**, 967-970.
- Fujimoto, H., Miyasato, M., Ito, Y., Sasaki, T., Ajisaka, K. (1998). "Purification and properties of recombinant β -galactosidase from *Bacillus circulans*" *Glycoconjugate J.* **15**, 155-160.
- Fukuda, M. (1994). "Cell surface carbohydrates: cell-type specific expression" in: Fukuda, M., Hindsgaul, O. (Hrsg.): "Molecular glycobiology" Oxford University Press, Oxford, 1-52.
- Fukuda, M., Hindsgaul, O. (1994). "Molecular glycobiology" Oxford University Press, Oxford.
- Fukuda, M. (1995). "Carbohydrate-dependent cell adhesion" *Bioorg. Med. Chem.* **3**, 207-215.

- Furukawa, K., Roth, S. (1985). "Co-purification of galactosyltransferases from chick-embryo-liver" *Biochem. J.* **227**, 573-582.
- Gambert, U., Lio, R.G., Farkas, E., Thiem, J., Verez Bencomo, V., Lipták, A. (1997). "Galactosylation with β -galactosidase from bovine testes employing modified acceptor substrates" *Bioorg. Med. Chem.* **5**, 1285-1291.
- Gambert, U., Thiem, J. (1997a). "Chemical transformations employing glycosyltransferases" *Topics Curr. Chem.* **186**, 21-43.
- Gambert, U., Thiem, J. (1997b). "Chemoenzymatic synthesis of the Thomsen-Friedenreich antigen determinant" *Carbohydr. Res.* **299**, 85-89.
- Ge, Z.M., Chan, N.W.C., Palcic, M.M., Taylor, D.E. (1997). "Cloning and heterologous expression of an α 1,3-fucosyltransferase gene from the gastric pathogen *Helicobacter pylori*" *J. Biol. Chem.* **272**, 21357-21363.
- Gendler, S.J., Spicer, A.P. (1995). "Epithelial mucin genes" *Annu. Rev. Physiol.* **57**, 607-634.
- Geng, J.-G., Bevilacqua, M.P., Moore, K.L., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., Kim, J.M., Bliss, G.A., Zimmerman, G.A., McEver, R.P. (1990). "Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140" *Nature* **343**, 757-760.
- Gijzen, H.J.M., Qiao, L., Fitz, W., Wong, C.-H. (1996). "Recent advances in the chemoenzymatic synthesis of carbohydrates and carbohydrate mimetics" *Chem. Rev.* **96**, 443-473.
- Gödde, A., Kragl, U., Biselli, M., Katopodis, A., Bowen, B.R., Ernst, B., Wandrey, C. (1996). "Large-scale production of 1800 units of a recombinant soluble α -1,3-fucosyltransferase", *XVIII International Carbohydrate Symposium, Malmö*, 390.
- Goetz, D.J., Greif, C.M., Ding, H., Camphausen, R.T., Howes, S., Comess, K.M., Snapp, K.R., Kansas, G.S., Luscinskas, F.W. (1997). "Isolated P-selectin glycoprotein ligand-1 dynamic adhesion to P- and E-selectin" *J. Cell Biol.* **137**, 509-519.
- Gokhale, U.B., Hindsgaul, O., Palcic, M.M. (1990). "Chemical synthesis of GDP-fucose analogs and their utilization by the Lewis α (1 $\rightarrow$ 4) fucosyltransferase" *Can. J. Chem.* **68**, 1063-1071.
- Goldberg, D.E. (1989). "Genetic algorithms in search, optimization, and machine learning" Addison-Wesley, Reading, USA.
- Gosselin, S., Alhussaini, M., Streiff, M.B., Takabayashi, K., Palcic, M.M. (1994). "A continuous spectrometric assay for glycosyltransferases" *Anal. Biochem.* **220**, 92-97.
- Gosselin, S., Palcic, M.M. (1996). "Acceptor hydroxyl group mapping for human milk α 1-3 and α 1-3/4 fucosyltransferases" *Bioorg. Med. Chem.* **4**, 2023-2028.
- Granovsky, M., Bielfeldt, T., Peters, S., Paulsen, H., Meldal, M., Brockhausen, J., Brockhausen, I. (1994). "UDP-galactose:glycoprotein-N-acetyl-D-galactosamine 3- β -D-galactosyltransferase activity synthesizing O-glycan core 1 is controlled by the amino acid sequence and glycosylation of glycopeptide substrates" *Eur. J. Biochem.* **221**, 1039-1046.
- Graves, B.J., Crowther, R.L., Chandran, C., Rumberger, J.M., Li, S., Huang, K.-S., Presky, D.H., Familletti, P.C., Wolitzky, B.A., Burns, D.K. (1994). "Insight into E-selectin/ligand interaction from the crystal structure and mutagenesis of the lec/EGF domains" *Nature* **367**, 532-538.
- Greene, W.C. (1991). "The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection" *New Engl. J. Med.* **324**, 308-317.

- Greenwell, P. (1997).** "Blood group antigens: molecules seeking a function?" *Glycoconjugate J.* **14**, 159-173.
- Gröner, A. (1986).** "Specificity and safety of baculoviruses" in: Granados, R.R., Federici, B.A. (Hrsg.): "The biology of baculoviruses" 1 CRC Press, Boca Raton, 177-202.
- Groß, H.J., Bünsch, A., Paulson, J.C., Brossmer, R. (1987).** "Activation and transfer of novel synthetic 9-substituted sialic acids" *Eur. J. Biochem.* **168**, 595-602.
- Grossman, P.D., Colburn, J.C., Lauer, H.H., Nielsen, R.G., Riggan, R.M., Sittampalam, G.S., Rickard, E.C. (1989).** "Application of free-solution capillary electrophoresis to the analytical scale separation of proteins and peptides" *Anal. Chem.* **61**, 1186-1194.
- Grossman, P.D., Colburn, J.C. (Hrsg.) (1992).** "Capillary Electrophoresis: Theory and Practice", Academic Press, San Diego.
- Gruenwald, S., Heitz, J. (1993).** "Baculovirus expression vector system: procedures and methods manual" PharMingen, San Diego.
- Grund, A. (1995).** Persönliche Mitteilung.
- Guo, Z.-W., Nakahara, Y., Nakahara, Y., Ogawa, T. (1997).** "Festphasensynthese des Glycopeptidteils des Antigens CD 52 mit N-gebundenem Core-Pentasaccharid" *Angew. Chem.* **109**, 1527-1529.
- Gururaja, T., Ramasubbu, N., Levine, M.J. (1996).** "Solid-phase synthesis of human salivary mucin-derived O-linked glycopeptides" *Lett. Pept. Sci.* **3**, 79-88.
- Guss, B., Eliasson, M., Olsson, A., Uhlen, M., Frej, A.-K., Jörnvall, H., Flock, J.-I., Lindberg, M. (1986).** "Structure of the IgG-binding regions of streptococcal protein G" *EMBO J.* **5**, 1567-1575.
- Hällgren, C., Hindsgaul, O. (1995).** "An aminated GDP-fucose analog useful in the fucosyltransferase catalyzed addition of biological probes onto oligosaccharide chains" *J. Carbohydr. Chem.* **14**, 453-464.
- Hagen, F.K., Gregoire, C.A., Tabak, L.A. (1995).** "Cloning and sequence homology of a rat UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase" *Glycoconjugate J.* **12**, 901-909.
- Hagen, F.K., Ten Hagen, K.G., Beres, T.M., Balys, M.M., VanWuyckhuysse, B.C., Tabak, L.A. (1997).** "cDNA cloning and expression of a novel UDP-N-acetyl-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase" *J. Biol. Chem.* **272**, 13843-13848.
- Hagopian, A., Eylar, E.H. (1968).** "Studies on the receptor specificity of polypeptidyl-N-acetylgalactosaminyl transferase from bovine submaxillary glands" *Arch. Biochem. Biophys.* **128**, 422-433.
- Hansen, J.E., Lund, O., Engelbrecht, J., Bohr, H., Nielsen, J.O., Hansen, J.-E.S., Brunak, S. (1995).** "Prediction of O-glycosylation of mammalian proteins: specificity patterns of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase" *Biochem. J.* **308**, 801-813.
- Harrap, K. (1972).** "The structure of nuclear polyhedrosis viruses. I. The inclusion body." *Virology* **50**, 114-123.
- Hasbach, L. (1994).** "Charakterisierung von Nanofiltrations- und Umkehrosmosemembranen für die Produktisolierung aus enzymatischen Reaktionen" Examensarbeit, Universität Bonn.
- Hayashida, K., Kawakami, K. (1992).** "Enhancement of enzymatic production of cyclodextrins by adding polyethylene glycol or polypropylene glycol" *J. Ferment. Bioeng.* **73**, 239-240.

- Hedbys, L., Johansson, E., Mosbach, K., Larsson, P.-O. (1989a). "Synthesis of 2-acetamido-2-deoxy-3-O- β -D-galactopyranosyl-D-galactose by the sequential use of β -D-galactosidases from bovine testes and *Escherichia coli*" *Carbohydr. Res.* **186**, 217-223.
- Hedbys, L., Johansson, E., Mosbach, K., Larsson, P.-O., Gunnarsson, A., Svensson, S., Lönn, H. (1989b). "Synthesis of Gal β 1-3GlcNAc and Gal β 1-3GlcNAc β -SEt by an enzymatic method comprising the sequential use of β -D-galactosidases from bovine testes and *Escherichia coli*" *Glycoconjugate J.* **6**, 161-168.
- Heidlas, J.E., Lees, W.J., Pale, P., Whitesides, G.M. (1992a). "Gram-scale synthesis of uridine 5'-diphospho-N-acetylglucosamine - comparison of enzymatic and chemical routes" *J. Org. Chem.* **57**, 146-151.
- Heidlas, J.E., Lees, W.J., Whitesides, G.M. (1992b). "Practical enzyme-based synthesis of uridine 5'-diphosphogalactose and uridine 5'-diphospho-N-acetylgalactosamine on a gram scale" *J. Org. Chem.* **57**, 152-157.
- Herrmann, G.F. (1992). "Reaktionstechnische Analyse der β -Galactosidase-katalysierten Synthese von Disacchariden am Beispiel des N-Acetyl-lactosamins" Diplomarbeit, Universität Düsseldorf.
- Herrmann, G.F., Ichikawa, Y., Wandrey, C., Gaeta, F.C.A., Paulson, J.C., Wong, C.-H. (1993a). "A new multi-enzyme system for a one-pot synthesis of sialyl oligosaccharides: combined use of β -galactosidase and α (2,6)-sialyltransferase coupled with regeneration in situ of CMP-sialic acid" *Tetrahedron Lett.* **34**, 3091-3094.
- Herrmann, G.F., Kragl, U., Wandrey, C. (1993b). "Kontinuierliche katalytische Herstellung von N-Acetyl-lactosamin" *Angew. Chem.* **105**, 1399-1400.
- Herrmann, G.F., Krezdorn, C.H., Malissard, M., Kleene, R., Paschold, H., Weuster-Botz, D., Kragl, U., Berger, E.G., Wandrey, C. (1995). "Large-scale-production of a soluble human β 1,4-galactosyltransferase using a *Saccharomyces cerevisiae* expression system" *Prot. Expr. Purif.* **6**, 72-78.
- Higa, H., Paulson, J.C. (1985). "Sialylation of glycoprotein oligosaccharides with N-acetyl-, N-glycolyl-, and N-O-diacetylneuraminic acids" *J. Biol. Chem.* **260**, 8838-8849.
- Hill, H.D., Schwyzer, M., Steinman, H.M., Hill, R.L. (1977). "Ovine submaxillary mucin: primary structure and peptide substrates of UDP-N-acetylgalactosamine:mucin transferase" *J. Biol. Chem.* **252**, 3799-3804.
- Hink, W.F., Thomsen, D.R., Davidson, D.J., Meyer, A.L., Castellino, F.J. (1991). "Expression of three recombinant proteins using vaculovirus vectors in 23 insect cell lines" *Biotechnol. Prog.* **7**, 9-14.
- Hoffstetter-Kuhn, S., Paulus, A., Gassmann, E., Widmer, H.M. (1991). "Influence of borate complexation on the electrophoretic behavior of carbohydrates in capillary electrophoresis" *Anal. Chem.* **63**, 1541-1547.
- Hofsteenge, J., Stone, S.R., Donella-Deana, A., Pinna, L.A. (1990). "The effect of substituting phosphotyrosine for sulphotyrosine on the activity of hirudin" *Eur. J. Biochem.* **188**, 55-59.
- Hoh, C. (1999). "Optimierung der enzymatischen core2-Trisaccharid-Synthese: Anwendung eines genetischen Algorithmus" Diplomarbeit, Universität Bonn.
- Holland, J.H. (1992). "Genetische Algorithmen" *Spektrum der Wissenschaft* Sept. 1992, 44-51.

- Hollingsworth, M.A., Strawhecker, J.M., Caffrey, T.C., Mack, D.R. (1994). "Expression of MUC1, MUC2, MUC3 and MUC4 Mucin mRNAs in human pancreatic and intestinal tumor cell lines" *Int. J. Cancer* **57**, 198-203.
- Homeister, J.W., Zhang, M.K., Frenette, P.S., Hynes, R.O., Wagner, D.D., Lowe, J.B., Marks, R.M. (1998). "Overlapping functions of E- and P-selectin in neutrophil recruitment during acute inflammation" *Blood* **92**, 2345-2352.
- Homa, F.L., Hollander, T., Lehman, D., Elhammer, A.P. (1993). "Isolation and expression of a cDNA clone encoding a bovine UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase" *J. Biol. Chem.* **268**, 12609-12616.
- Homa, F.L., Baker, C.A., Thomsen, D.R., Elhammer, A.P. (1995). "Conversion of a bovine UDP-GalNAc:polypeptide, N-acetylgalactosaminyltransferase to a soluble, secreted enzyme, and expression in Sf9 cells" *Prot. Expr. Purif.* **6**, 141-148.
- Hortin, G.L., Farries, T.C., Graham, J.P., Atkinson, J.P. (1989). "Sulfation of tyrosine residues increases activity of the fourth component of complement" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1338-1342.
- Huber, R.E., Gaunt, M.T., Hurlburt, K.L. (1984). "Binding and reactivity at the "glucose" site of galactosyl- β -galactosidase (*Escherichia coli*)" *Arch. Biochem. Biophys.* **234**, 151-160.
- Huber, R.E., Kurz, G., Wallenfels, K. (1976). "A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of β -galactosidase (*E. coli*) on lactose" *Biochemistry* **15**, 1994-2001.
- Huttner, W.B. (1987). "Protein tyrosine sulfation" *Trends in Biochemical Sciences* **12**, 8525-8532.
- Ichikawa, Y., Dhen, G.-J., Wong, C.-H. (1991). "Enzyme-catalyzed synthesis of sialyl oligosaccharide with *in situ* regeneration of CMP-sialic acid" *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 4698-4700.
- Ichikawa, Y., Lin, Y.-C., Dumas, D.P., Shen, G.J., Garcia-Junceda, E., Williams, M.A., Bayer, R., Ketcham, C., Walker, L.E., Paulson, J.C., Wong, C.-H. (1992a). "Chemical-enzymatic synthesis and conformational analysis of sialyl Lewis x and derivatives" *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 9283-9298.
- Ichikawa, Y., Sim, M.M., Wong, C.-H. (1992b). "Efficient chemical synthesis of GDP-fucose" *J. Org. Chem.* **57**, 2943-2946.
- Ikeda, T., Kajimoto, T., Kondo, H., Wong, C.H. (1997). "Design and synthesis of an α -mannosyl terpenoid as selective inhibitor of P-selectin" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7**, 2485-2490.
- Ishida, H., Hosokawa, H., Kondo, H., Kiso, M., Hasegawa, A. (1997). "Synthesis of the 3'-C-carboxymethyl Lewis X derivative: a novel selectin blocker" *Carbohydr. Res.* **303**, 131-133.
- Jandik, P., Jones, W.R. (1991). "Optimization of detection sensitivity in the capillary electrophoresis of inorganic anions" *J. Chromatogr.* **546**, 431-443.
- Janeway, C.A., jr., Travers, P. (1995). "Immunologie" Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Jöbses, I., Martens, C., Tramper, J. (1991). "Lethal events during gas sparging in animal cell culture" *Biotechnol. Bioeng.* **37**, 484-490.

- Johansson, E., Hedbys, L., Mosbach, K., Larsson, P.-O. (1989). "Studies on the reversed α -mannosidase reaction in high concentrations of mannose" *Enzyme Microb. Tech.* **11**, 347-352.
- Johnston, G.I., Cook, R.G., Mc Ever, R.P. (1989). "Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: sequence similarity to proteins invlved in cell adhesion and inflammation" *Cell* **56**, 1033-1044.
- Jones, G., W., P., Glen, R.C. (1995). "Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation" *J. Mol. Biol* **245**, 43-53.
- Joziasse, D.H., Bergh, M.L.E., ter Hart, H.G.J., Koppen, P.L., Hooghwinkel, G.J.M., van den Eijnden, D.H. (1985). "Purification and enzymatic characterization of CMP-sialic acid: β -galactosyl 1- $\rightarrow$ 3-N-acetylgalactosaminide α 2- $\rightarrow$ 3-sialyltransferase from human placenta" *J. Biol. Chem.* **260**, 4941-4951.
- Kajihara, Y., Kodama, H., Endo, T., Hashimoto, H. (1998). "Novel features of acceptor recognition by β -(1- $\rightarrow$ 4)-galactosyltransferase" *Carbohydr. Res.* **306**, 361-378.
- Kaltner, H., Stierstorfer, B. (1998). "Animal lectins as cell adhesion molecules" *Acta Anat.* **161**, 162-179.
- Kameyama, A., Ishida, H., Kiso, M., Hasegawa, A. (1991). "Total synthesis of sialyl Lewis X" *Carbohydr. Res.* **209**, c1-c4.
- Kashem, M.A., Jiang, C., Venot, A.P., Alton, G.R. (1992). "Combined chemical-enzymic synthesis of an internally monofucosylated hexasaccharide corresponding to the CD-65/VIM-2 epitope: use of a terminal α 2-6-linked N-acetylneuraminic acid as a temporary blocking group" *Carbohydr. Res.* **230**, C7-C10.
- Khan, S.H., Hindsgaul, O. (1994). "Chemical synthesis of oligosaccharides" in: M. Fukuda, O.H. (Hrsg.): "Molecular Glycobiology" Oxford University Press, New York, 206-229.
- Khatra, B.S., Herries, C.G., Brew, K. (1974). "Some kinetic properties of human-milk galactosyl transferase" *Eur. J. Biochem.* **44**, 537-560.
- Kim, Y.J., Borsig, L., Varki, N.M., Varki, A. (1998). "P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9325-9330.
- King, L.A., Possee, R.D. (1992). "The baculovirus expression system - a laboratory guide" Chapman & Hall, London.
- Kirchhoff, C.G.S. (1814). "Ueber die Zuckerbildung beim Malzen des Getreides, und beim Bebrühen seines Mehls mit kochendem Wasser" *Schweiggers J.* **14**, 389-398.
- Kittelmann, M., Klein, T., Kragl, U., Wandrey, C., Ghisalba, O. (1995). "CMP-N-acetyl neuraminic-acid synthetase from *Escherichia coli*: fermentative production and application for the preparative synthesis of CMP-neuraminic acid" *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 59-67.
- Kiyoi, T., Inoue, Y., Ohmoto, H., Yoshida, M., Kiso, M., Kondo, H. (1998). "Synthesis of sialyl Lewis X pentasaccharide analogue for high-throughput screening of selectin blockers" *Bioorg. Med. Chem.* **6**, 587-593.
- Kleene, R., Krezdorn, C.H., Watzele, G., Meyhack, B., Herrmann, G.F., Wandrey, C., Berger, E.G. (1994). "Expression of soluble active human β 1,4-galactosyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**, 160-167.
- Klein, T. (1994). "Enzymkatalysierte Herstellung von Cytidinmonophosphat-N-acetylneuraminsäure mit einer Synthetase aus *Escherichia coli* (K235/CS1)" Dissertation, Universität Bonn.

- Kleineidam, R.G., Schmelter, T., Schwarz, R.T., Schauer, R. (1997). "Studies on the inhibition of sialyl- and galactosyltransferases" *Glycoconjugate J.* **14**, 57-66.
- Klich, G., Paulsen, H., Meyer, B., Meldal, M., Bock, K. (1997). "Synthesis and characterisation of highly glycosylated glycopeptides with Tn-antigenic structures corresponding to human glycophorin AN" *Carbohydr. Res.* **299**, 33-48.
- Kobashi, K., Kim, D.-H. (1986). "A novel sulfotransferase sulfates tyrosine-containing peptides and proteins" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **140**, 38-42.
- Kobashi, K., Kim, D.-H., Morikawa, T. (1987). "A novel type of arylsulfotransferase" *J. Protein Chem.* **6**, 237-244.
- Kobayashi, S. (1975). "Action mechanisms of *B.macerans* enzyme and preparation of cyclodextrins" *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **22**, 126-132.
- Kojima, N., Handa, K., Newman, W., Hakomori, S. (1992). "Inhibition of selectin-dependent tumor cell adhesion to endothelial cells and platelets by blocking O-glycosylation of these cells" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**, 1288-1295.
- Kompier, R., Tramper, J., Vlak, J.M. (1988). "A continuous process for the production of baculovirus using insect-cell cultures" *Biotechnol. Lett.* **10**, 849-854.
- Kondo, H., Ichikawa, Y., Wong, C.-H. (1992). " β -Sialyl phosphite and posphoramidite: synthesis and application to the chemoenzymatic synthesis of CMP-sialic acid and sialyl oligosaccharides" *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 8748-8750.
- Kool, M., Voncken, J.W., van Lier, F.L.J., Tramper, J., Vlak, J.M. (1991). "Detection and analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus mutants with defective interfering properties" *Virology* **183**, 739-746.
- Koszdin, K.L., Bowen, B.R. (1992). "The cloning and expression of a human α -1,3 fucosyltransferase capable of forming the E-selectin ligand" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 152-157.
- Kotera, Y., Fontenot, J., Pecher, G., Metzgar, R.S., Finn, O.J. (1994). "Humoral immunity against a tandem repeat epitope of human mucin MUC1 in sera from breast, pancreatic and colon cancer patients" *Cancer Res.* **54**, 2856-2860.
- Kragl, U., Gygax, D., Ghisalba, O., Wandrey, C. (1991). "Enzymatische zweistufige Synthese von N-Acetylneuraminsäure im Enzym-Membranreaktor" *Angew. Chem.* **103**, 854-855.
- Kragl, U. (1992). "Reaktionstechnik biokatalytischer Prozesse am Beispiel der kontinuierlichen enzymatischen Synthese von N-Acetylneuraminsäure" Dissertation, Universität Bonn.
- Kragl, U., Kittelmann, M., Ghisalba, O., Wandrey, C. (1995). "N-acetylneuraminic acid - from a rare chemical from natural sources to a multikilogram enzymatic synthesis for industrial application" *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **750**, 300-305.
- Kragl, U., Klein, T., Vasic-Racki, E., Kittelmann, M., Ghisalba, O., Wandrey, C. (1996). "Reaction engineering aspects of activated sugar production - CMP-Neu5Ac as example" *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **799**, 577-583.
- Kragl, U. (1997). "Reaktionstechnik der asymmetrischen Synthese mit Homogen- und Biokatalysatoren" Habilitationsschrift Bonn.
- Kren, V., Thiem, J. (1995). "Ein Multienzymsystem zur Eintopfsynthese des Sialyl-T-Antigens" *Angew. Chem.* **107**, 979-981.
- Kren, V., Thiem, J. (1997). "Glycosylation employing biosystems: from enzymes to whole cells" *Chem. Soc. Rev.* **26**, 463-473.

- Kretzschmar, G., Stahl, W. (1998). "Large scale synthesis of linker-modified sialyl Lewis^X, Lewis^X and N-acetylactosamine" *Tetrahedron* **54**, 6341-6358.
- Krezdorn, C.H., Watzele, G., Kleene, R.B., Ivanow, S.X., Berger, E.G. (1993). "Purification and characterization of recombinant human β 1-4 galactosyltransferase expressed in *Saccharomyces cerevisiae*" *Ber. J. Biochem.* **212**, 113-120.
- Kruse, W. (1995). "Enantioselektive enzymkatalysierte Reduktion von Ketonen im Enzym-Membranreaktor mit membrangestützter extraktiver Produktabtrennung – Verfahren zur Produktion chiraler hydrophober Alkohole." Dissertation Universität Bonn.
- Kuby, S.A., Lardy, H.A. (1953). "Purification and kinetics of β -D-galactosidase from *Escherichia coli*, strain K-12" *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 890-896.
- Kudszus (1998). Persönliche Mitteilung.
- Kukowska-Latallo, J.F., Larsen, R.D., Nair, R.P., Lowe, J.B. (1990). "A cloned human cDNA determines expression of a mouse stage-specific embryonic antigen and the Lewis blood group α -(1,3/1,4)fucosyltransferase" *Genes Dev.* **4**, 1288-1303.
- Kumamoto, K., Mitsuoka, C., Izawa, M., Kimura, N., Otsubo, N., Ishida, H., Kiso, M., Yamada, T., Hirohashi, S., Kannagi, R. (1998). "Specific detection of sialyl Lewis X determinant carried on the mucin GlcNAc β 1->6GalNAc α core structure as a tumor-associated antigen" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 514-517.
- Kumar, R., Camphausen, R.T., Sullivan, F.X., Cumming, D.A. (1996). "Core2 β -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase enzyme activity is critical for P-selectin glycoprotein ligand-1 binding to P-selectin" *Blood* **88**, 3872-3879.
- Kunz, H., Schultz, M. (1997). "Recent advances in the synthesis of glycopeptides" in: Large, D.G., Warren, C.D. (Hrsg.): "Glycopeptides and related compounds" Marcel Dekker Inc., ???, 23-78.
- Lampe, T.F.J., Weitz-Schmidt, G., Wong, C.-H. (1998). "Parallelsynthese von Sialyl-Lewis-X-Mimetika an fester Phase - ein Zugang zu Fucoseptid-Bibliotheken" *Angew. Chem.* **110**, 1761-1764.
- Larsen, G.R., Sako, D., Ahern, T.J., Shaffer, M., Erban, J., Sajer, S.A., Gibson, R.M., Wagner, D.D., Furie, B.C., Furie, B. (1992). "P-selectin and E-selectin" *J. Biol. Chem.* **267**, 11104-11110.
- Lasky, L.A., Singer, M.S., Yednock, T.A., Dowbenko, D., Fennie, C., Rodriguez, H., Nguyen, T., Stachel, S., Rosen, S.D. (1989). "Cloning of a lymphocyte homing receptor reveals a lectin domain" *Cell* **56**, 1045-1055.
- Lee, Y.-C., Kurosawa, N., Hamamoto, T., Nakaoka, T., Tsuji, S. (1993). "Molecular cloning and expression of Gal β 1,3GalNAc α 2,3-sialyltransferase from mouse brain" *Eur. J. Biochem.* **216**, 377-385.
- Lee, Y.-C., Kojima, N., Wada, E., Kurosawa, N., Nakaoka, T., Hamamoto, T., Tsuji, S. (1994). "Cloning and expression of cDNA for a new type of Gal β 1,3GalNAc α 2,3-sialyltransferase" *J. Biol. Chem.* **269**, 10028-10033.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. (1994). "Prinzipien der Biochemie" Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Leloir, L.F. (1971). "Two decades of research on the biosynthesis of saccharides" *Science* **172**, 1299-1303.

- Lemieux, R.U., Bock, K., Delbaere, L.T.J., Koto, S., Rao, V.S. (1980). "The conformations of oligosaccharides related to the ABH and Lewis human blood group determinants" *Can. J. Chem.* **58**, 631-653.
- Leppänen, A., Penttilä, L., Niemelä, R., Helin, J., Seppo, A., Lusa, S., Renkonen, O. (1991). "Human serum contains a novel β 1,6-*N*-acetylglucosaminyltransferase activity that is involved in midchain branching of oligo(*N*-acetylactosaminoglycans)" *Biochemistry* **30**, 9287-9296.
- Levenspiel, O. (1998). "Chemical Reaction Engineering" John Wiley & Sons, New York.
- Li, F., Wilkins, P.P., Crawley, S., Weinstein, J., Cummings, R.D., McEver, R.P. (1996). "Post translational modifications of recombinant P-selectin glycoprotein ligand-1 required for binding to P- and E-selectin" *J. Biol. Chem.* **271**, 3255-3264.
- Liang, R., Yan, L., Loebach, J., Ge, M., Uozumi, Y., Sekanina, K., Horan, N., Gildersleeve, J., Thompson, C., Smith, A., Biswas, K., Still, W.C., Kahne, D. (1996). "Parallel synthesis and screening of a solid phase carbohydrate library" *Science* **274**, 1520-1522.
- Licari, P., Bailey, J.E. (1991). "Factors influencing recombinant protein yields in an insect cell-baculovirus expression system: multiplicity of infection and intracellular protein degradation" *Biotechnol. Bioeng.* **37**, 238-246.
- Liebe, B., Kunz, H. (1997). "Solid phase synthesis of a sialyl-Tn-glycoundecapeptide of the MUC1 repeating unit" *Helvet. Chim. Acta* **80**, 1473.
- Liese, A. (1998). "Reaktorkonzepte für Biotransformationen in Zweiphasensystemen" Dissertation Universität Bonn.
- Lis, H., Sharon, N. (1993). "Protein glycosylation" *Eur. J. Biochem.* **218**, 1-27.
- Liu, W., Ramachandran, V., Kang, J., Kishimoto, T.K., Cummings, R.D., McEver, R.P. (1998). "Identification of N-terminal residues on P-selectin glycoprotein ligand-1 required for binding to P-selectin" *J. Biol. Chem.* **273**, 7078-7087.
- Ljunger, G., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. (1994). "Enzymatic synthesis of octyl- β -glucoside in octanol at controlled water activity" *Enzyme Microb. Tech.* **16**, 751-755.
- Lloyd, K.O., Burchell, J., Kudryashov, V., Yin, B.W.T., Taylor-Papadimitriou, J. (1996). "Comparison of O-linked carbohydrate chains in MUC-1 mucin from normal breast epithelial cell lines and breast carcinoma cell lines" *J. Biol. Chem.* **271**, 33325-33334.
- Lockhoff, O. (1998). "Ein Zugang zu Glycoconjugat-Bibliotheken durch Mehrkomponentenreaktionen" *Angew. Chem.* **110**, 3634-3637.
- Lowe, J.B., Kukowska-Latallo, J.F., Nair, R.P., Larsen, R.D., Marks, R.M., Macher, B.A., Kelly, R.J., Ernst, L.K. (1991). "Molecular cloning of a human fucosyltransferase gene that determines expression of the Lewis x and VIM-2 epitopes but not ELAM-1-dependent cell adhesion" *J. Biol. Chem.* **266**, 17467-17477.
- Lowe, J.B., Ward, P.A. (1997). "Therapeutic inhibition of carbohydrate-protein interactions *in vivo*" *J. Clin. Invest.* **99**, 822-826.
- Lubineau, A., Sommé, V., Augé, C. (1998). "Sialyltransferase-catalyzed transfer of KDN onto oligosaccharides" *J. Mol. Cat. B* **5**, 235-240.
- Lubineau, A., Basset-Carpentier, K., Augé, C. (1997). "Porcine liver (2 $\rightarrow$ 3) - α -sialyltransferase: substrate specificity studies and application of the immobilized enzyme to the synthesis of various sialylated oligosaccharide sequences" *Carbohydr. Res.* **300**, 161-167.

- Luckow, V.A., Summers, M.D. (1988). "Trends in the development of baculovirus expression vectors" *Bio/Technology* **6**, 47-55.
- Lundström, H., Brobjer, M., Österlöf, B., Moks, T. (1990). "A completely automated system for on-line monitoring of the production of a growth factor secreted during fermentation of *Escherichia coli*" *Biotechnol. Bioeng.* **36**, 1056-1062.
- Magee, S.C., Mawal, R., Ebner, K.E. (1974). "Multiple forms of galactosyltransferase from bovine milk" *Biochemistry* **13**, 99-102.
- Maiorella, B., Inlow, D., Shauger, A., Harano, D. (1988). "Large-scale insect cell-culture for recombinant protein production" *Bio/Technology* **6**, 1406-1410.
- Makino, S., Ueno, Y., Ishikawa, M., Hayakawa, Y., Hata, T. (1993). "Chemical synthesis of cytidine-5'-monophosphono-*N*-acetylneuraminic acid (CMP-Neu5Ac)" *Tetrahedron Lett.* **34**, 2775-2778.
- Marron, T.G., Woltering, T.J., Weitz-Schmidt, G., Wong, C.-H. (1996). "C-mannose derivatives as potent mimics of sialyl lewis x" *Tetrahedron Lett.* **37**, 9037-9040.
- Martin, T., Schmidt, R. (1993). "Convenient chemical synthesis of CMP-N-Acetylneuramate (CMP-Neu5Ac)" *Tetrahedron Lett.* **34**, 1765-1768.
- Masri, K.A., Appert, H.E., Fukuda, M.N. (1988). "Identification of the full length coding sequence for human galactosyltransferase (β -N-acetylglucosaminide: β 1,4-galactosyltransferase)" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 657-633.
- Matahira, Y., Tashiro, A., Sato, T., Kawagishi, H., Usui, T. (1995). "Enzymic synthesis of lacto-N-triose II and its positional analogues" *Glycoconjugate J.* **12**, 664-671.
- Mathieux, N., Paulsen, H., Meldal, M., Bock, K. (1997). "Synthesis of glycopeptide sequences of repeating units of the mucins MUC 2 and MUC 3 containing oligosaccharide side-chains with core 1, core 2, core 3, core 4 and core 6 structure" *Perkin Trans. 1*, 2359-2368.
- Mattu, T. S., Pleass, R. J., Willis, A. C., Kilian, M., Wormald, M. R., Lellouch, A. C., Rudd, P. M., Woof, J. M., Dwek, R. A. (1998). "The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab, and Fc regions and the role of *N*-glycosylation on Fc α receptor interactions" *J. Biol. Chem.* **273**, 2260-2272.
- McAuliffe, J.C., Hindsgaul, O. (1997). "Carbohydrate drugs - an ongoing challenge" *Chemistry & Industry*, 170-174.
- McGregor, W.C. (1989). "Concentration of L-phenylalanine with a reverse osmosis membrane" *J. Biotechnol.* **10**, 277-284.
- McGuire, E.J., Roseman, S. (1967). "Enzymatic synthesis of the protein-hexosamine linkage in sheep submaxillary mucin" *J. Biol. Chem.* **242**, 3745-3755.
- Meinjohanns, E., Meldal, M., Schleyer, A., Paulsen, H., Bock, K. (1996). "Efficient syntheses of core 1, core 2, core 3 and core 4 building blocks for SPS of mucin O-glycopeptides based on the N-Dts-method" *Perkin Trans. 1*, 985-993.
- Mendicino, J., Sivakami, S., Davila, M., Chandrasekaran, E.V. (1982). "Purification and properties of UDP-Gal:*N*-acetylgalactosaminide mucin: β 1,3-galactosyltransferase from swine trachea mucosa" *J. Biol. Chem.* **257**, 3987-3994.
- Merrifield, R.B. (1963). "Solid phase peptide synthesis: I. The synthesis of a tetrapeptide" *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149-2154.
- Messner, P. (1997). "Bacterial glycoproteins" *Glycoconjugate J.* **14**, 3-11.

- Michaelis, L., Menten, M. (1913). "Die Kinetik der Invertinwirkung" *Biochem. Z.* **49**, 333-369.
- Michaels, J.D., Petersen, J.F., McIntire, L.V., Papoutsakis, E.T. (1991). "Protection mechanisms of freely suspended animal cells (CRL 8018) from fluid-mechanical injury. viscometric and bioreactor studies using serum, pluronic F68 and polyethylene glycol" *Biotechnol. Bioeng.* **38**, 169-180.
- Miyauchi, H., Tanaka, M., Koike, H., Kawamura, N., Hayashi, M. (1997). "Synthesis and inhibitory effect of a sialyl Lewis x-acrylamide homopolymer at preventing cell adhesion" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7**, 985-988.
- Mizuno, M., Haneda, K., Iguchio, R., Muramoto, I., Kawakami, T., Aimoto, S., Yamamoto, K., Inazu, T. (1999). "Synthesis of a glycopeptide containing oligosaccharides: chemoenzymatic synthesis of Eel calcitonin analogues having natural N-linked oligosaccharides" *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 284-290.
- Mizuochi, T., Spellman, M.W., Larkin, M., Soloman, J., Basa, L.J., Feizi, T. (1988). "Carbohydrate structures of the human-immunodeficiency-virus (HIV) recombinant envelope glycoprotein gp120 produced in chinese-hamster ovary cells" *Biochem. J.* **254**, 599-603.
- Montero, E., Alonso, J., Canada, F.J., Fernández-Mayoralas, A., Martín-Lomas, M. (1998). "Regioselectivity of the enzymatic transgalactosidation of D- and L-xylose catalysed by β -galactosidases" *Carbohydr. Res.* **305**, 383-391.
- Moore, K.L. (1998). "Structure and function of P-selectin glycoprotein ligand-1" *Leukemia & Lymphoma* **29**, 1-15.
- Moore, K.L., Stults, N.L., Diaz, S., Smith, D.F., Cummings, R.C., Varki, A., McEver, R.P. (1992). "Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells" *J. Cell Biol.* **118**, 445-456.
- Moore, K.L., Eaton, S.F., Lyons, D.E., Lichtenstein, H.S., Cummings, R.C., McEver, R.P. (1994). "The P-selectin glycoprotein ligand from human neutrophils displays sialylated, fucosylated, O-linked poly-N- acetylglucosamine" *J. Biol. Chem.* **269**, 23318-23327.
- Mori, T., Fujita, S., Okahata, Y. (1997). "Transglycosylation in a two-phase aqueous-organic system with catalysis by a lipid-coated β -D-galactosidase" *Carbohydr. Res.* **298**, 65-73.
- Moss, D.E., Fahrney, C. (1978). "Kinetic analysis of differences in brain acetylcholinesterase from fish or mammalian sources" *Biochem. Pharmacol.* **27**, 2693-2698.
- Mulder, M. (1996). "Basic principles of membrane technology" Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Muramatsu, T. (1993). "Carbohydrate signals in metastasis and prognosis of human carcinomas" *Glycobiology* **3**, 294-296.
- Muramatsu, R., Nukui, E., Sukesada, A., Misawa, S., Komatsu, Y., Okayama, T., Wada, K., Morikawa, T., Hayashi, H., Kobashi, K. (1994). "Enzymatic O-sulfation of tyrosine residues in hirudins by sulfotransferase from *Eubacterium* A-44" *Eur. J. Biochem.* **223**, 243-248.
- Murata, T., Itoh, T., Hayakawa, Y., Usui, T. (1996). "Convenient synthesis of b-(1 $\rightarrow$ 3)-galactosyl disaccharide a-glycoside and its analogs as mimic units of mucin-type carbohydrate" *J. Biochem.* **120**, 851-855.
- Murata, T., Usui, T. (1997). "Preparation of oligosaccharide units library and its utilization" *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 1059-1066.

- Murata, T., Itoh, T., Usui, T. (1998). "Enzymatic synthesis of β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 3)-[β -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ 6)]- α -D-GalNAc-OC₆H₄NO₂-p as a carbohydrate unit of mucin-type 2 core" *Glycoconjugate J.* **15**, 575-582.
- Murhammer, D.W., Goochee, C.F. (1988). "Scaleup of insect cell cultures: protective effects of pluronic F-68" *Bio/Technology* **6**, 1411-1418.
- Murhammer, D.W., Goochee, C.F. (1990). "Sparged animal cell bioreactors: mechanism of cell damage and pluronic F-68 protection" *Biotechnol. Prog.* **6**, 391-397.
- Nakanishi, K., Matsuno, R., Torii, K., Yamamoto, K. (1983). "Properties of immobilized β -galactosidase from *Bacillus circulans*" *Enzyme Microb. Tech.* **5**, 115-120.
- Nakazawa, K., Ando, T., Kimura, T., Narimatsu, H. (1988). "Cloning and sequencing of a full length cDNA of mouse N-acetylglucosamine β [1-4]galactosyltransferase" *J. Biochem.* **104**, 165-168.
- Narimatsu, H., Sinha, S., Brew, K., Okayama, H., Qasba, P.K. (1986). "Cloning and sequencing of cDNA of bovine N-acetylglucosamine (β 1-4)galactosyltransferase" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4720-4724.
- Natsuka, S., Gersten, K.M., Zenita, K., Kannagi, R., Lowe, J.B. (1994). "Molecular cloning of a cDNA encoding a novel human leucocyte α -1,3-fucosyltransferase capable of synthesizing the sialyl Lewis x determinant" *J. Biol. Chem.* **269**, 16789-16794.
- Nguyen, P.L., Niehaus, G.A., Cherwitz, D.L., Kim, Y.S., Ho, S.B. (1996). "Membrane-bound (MUC1) and secretory (MUC2, MUC3, and MUC4) mucin gene expression in human lung cancer" *Tumor Biol.* **17**, 176-192.
- Niehhs, C., Huttner, W.B. (1990). "Purification and characterization of tyrosylprotein sulfotransferase" *EMBO J.* **9**, 35-42.
- Niehhs, C., Kraft, M., Lee, R.W.H., Huttner, W.B. (1990). "Analysis of the substrate specificity of tyrosylprotein sulfotransferase using synthetic peptides" *J. Biol. Chem.* **265**, 8525-8532.
- Niehhs, C., Huttner, W.B., Rüther, U. (1992). "In vivo expression and stoichiometric sulfation of the artificial protein sulfophilin, a polymer of tyrosine sulfation sites" *J. Biol. Chem.* **267**, 15938-15942.
- Niehhs, C., Beißwanger, R., Huttner, W.B. (1994). "Protein tyrosine sulfation, 1993 - an update" *Chemico-Biol. Interact.* **92**, 257-2712.
- Niemelä, R., Natunen, J., Brotherus, E., Saarikangas, A., Renkonen, O. (1995). " α 1,3-Fucosylation of branched blood group I-type oligo-(N-acetylglucosamine)glycans by human milk transferases is restricted to distal N-acetylglucosamine units: the resulting isomers are separated by WGA-agarose chromatography" *Glycoconjugate J.* **12**, 36-44.
- Niemelä, R., Natunen, J., Majuri, M.L., Maaheimo, H., Helin, J., Lowe, J.B., Renkonen, O., Renkonen, R. (1998). "Complementary acceptor and site specificities of Fuc-TIV and Fuc-TVII allow effective biosynthesis of sialyl-triLex and related polylactosamines present on glycoprotein counterreceptors of selectins" *J. Biol. Chem.* **273**, 4021-4026.
- Nilsson, K.G.I. (1989). "Enzymatic synthesis of di- and tri-saccharide glycosides, using glycosidases and β -D-galactoside 3- α -sialyltransferase" *Carbohydr. Res.* **188**, 9-17.
- Noble, R.D., Stern, A.S.E. (1995). "Membrane separations technology: principles and applications" Elsevier, Amsterdam.

- Nunez, H.A., O'Connor, J.V., Rosevear, P., Barker, R. (1981). "The synthesis and characterization of α - and β -L-fucopyranosyl phosphates and GDP fucose" *Can. J. Chem.* **59**, 2086-2095.
- Ochi, T., Hakomori, S.-I., Fujimoto, M., Okamura, M., Owaki, H., Wakitani, S., Shimaoka, Y., Hayashida, K., Tomita, T., Kawamura, S., Ono, K. (1993). "Therapeutic effect of intradermal injections with difucosyl lactosamine (dimeric Le^x) on patients with rheumatoid arthritis" *J. Rheumatol.* **20**, 2038-2045.
- Oefner, P.J., Chiesa, C. (1994). "Capillary electrophoresis of carbohydrates" *Glycobiology* **4**, 397-412.
- Öhrlein, R., Ernst, B., Berger, E.G. (1992). "Galactosylation of non-natural glycosides with human β -D-galactosyltransferase on a preparative scale" *Carbohydr. Res.* **236**, 335-338.
- Öhrlein, R., Hindsgaul, O., Palcic, M.M. (1993). "Use of the "core 2"-N-acetylglucosaminyltransferase in the chemical-enzymatic synthesis of a sialyl-Le^x-containing hexasaccharide found on O-linked glycoproteins" *Carbohydr. Res.* **244**, 149-159.
- Okahata, Y., Mori, T. (1996). "Effective transglycosylation catalysed by a lipid-coated β -D-galactosidase in organic solvents" *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 2861-2866.
- Olah, G.A., Narang, S.C. (1982). "Iodotrimethylsilane - a versatile synthetic reagent" *Tetrahedron* **38**, 2225-2277.
- O'Reilly, D.R., Miller, L.K., Luckow, V.A. (1994). "Baculovirus expression vectors" Oxford University Press, New York, Oxford.
- Otero, C., Cruzado, C., Ballesteros, A. (1991). "Use of cyclodextrins in enzymology to enhance the solubility of hydrophobic compounds" *Appl. Biochem. Biotechnol.* **27**, 185-194.
- Ouyang, Y.B., Moore, K.L. (1998). "Molecular cloning and expression of human and mouse tyrosylprotein sulfotransferase-8 and a tyrosylprotein sulfotransferase homologue in *Caenorhabditis elegans*" *J. Biol. Chem.* **273**, 24770-24774.
- Ouyang, Y.-B., Lane, W.S., Moore, K.L. (1998). "Tyrosylprotein sulfotransferase: purification and molecular cloning of an enzyme that catalyzes tyrosine O-sulfation, a common posttranslational modification of eukaryotic proteins" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2896-2901.
- Palcic, M.M., Hindsgaul, O. (1991). "Flexibility in the donor substrate specificity of β 1,4-galactosyltransferase: application in the synthesis of complex carbohydrates" *Glycobiology* **1**, 205-209.
- Palcic, M.M., Hindsgaul, O. (1996). "Glycosyltransferases in the synthesis of oligosaccharide analogs" *Trends Glycoscience Glycotechnol.* **8**, 37-49.
- Palcic, M.M., Li, H., Zanini, D., Bhella, R.S., Roy, R. (1998). "Chemoenzymatic synthesis of dendritic sialyl Lewis^x" *Carbohydr. Res.* **305**, 433-442.
- Paulsen, H. (1982). "Fortschritte bei der selektiven chemischen Synthese komplexer Oligosaccharide" *Angew. Chem.* **94**, 184-201.
- Paulsen, H., Peters, S., Bielfeld, T., Meldal, M., Bock, K. (1995). "Synthesis of the glycosyl amino acids Na-Fmoc-Ser[Ac4- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)-Ac2- α -D-GalN3p]OPfp and Na-Fmoc-Thr[Ac4- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)-Ac2- α -D-GalN3p]OPfp and the application in the solid-phase synthesis of multiply glycosylated mucin peptides with Tn and T antigenic structures" *Carbohydr. Res.* **268**, 17-34.
- Pekic, B., Lepojevic, Z. (1991). "Enzymatic transformation of desacetyl-ianatoside A into digitoxin by β -glucosidase action in cyclodextrin solutions" *Biotechnol. Lett.* **13**, 399-404.

- Penke, B., Hajna, F., Lonovics, J., Holzinger, G., Kadar, T., Telegdy, G., Rivier, J. (1984). "Synthesis of potent heptapeptide analogues of cholecystokinin" *J. Med. Chem.* **27**, 845-849.
- Piller, F., Cartron, J.-P. (1983). "UDP-GlcNAc:Gal β 1-4Glc(NAc) β 1-3N-acetylglucosaminyltransferase: identification and characterization in human serum" *J. Biol. Chem.* **258**, 12293-12299.
- Pollex-Krüger, A., Meyer, B., Stuike-Prill, R., Sinnwell, V., Matta, K.L., Brockhausen, I. (1993). "Preferred conformations and dynamics of five core structures of mucin type O-glycans determined by NMR spectroscopy and force field calculations" *Glycoconjugate J.* **10**, 365-380.
- Polley, M.J., Phillips, M.L., Wayner, E., Nudelman, E., Singhal, A.K., Hakomori, S.-I., Paulson, J.C. (1991). "CD62 and endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) recognize the same carbohydrate ligand, sialyl-lewis x" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6224-6228.
- Pouyani, T., Seed, B. (1995). "PSGL-1 recognition of P-selectin is controlled by a tyrosine sulfation consensus at the PSGL-1 amino terminus" *Cell* **83**, 333-343.
- Prieels, J.P., Monnom, D., Dolmans, M., Beyer, T.A., Hill, R.L. (1981). "Co-purification of the Lewis blood group N-acetylglucosaminide α 1 $\rightarrow$ 4 fucosyltransferase and an N-acetylglucosaminide α 1 $\rightarrow$ 3 fucosyltransferase from human milk" *J. Biol. Chem.* **256**, 10456-10463.
- Puck, T.T., Cieciura, S.J., Robinson, A. (1958). "Genetics of mammalian cells III: long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects" *J. Exp. Med.* **108**, 845-855.
- Qian, X., Hindsgaul, O., Li, H., Palcic, M.M. (1998). "Unexpected enzymatic fucosylation of the hindered tertiary alcohol of 3-C-methyl-N-acetylglucosamine produces a novel analogue of the LeX-trisaccharide" *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 2184-2185.
- Qiu, D., Koganty, R.R. (1997a). "Mucin type glycopeptides: synthesis of core 2, core 6 and F1- α building blocks and some unexpected reactions" *Tetrahedron Lett.* **38**, 45-48.
- Qiu, D., Koganty, R.R. (1997b). "A novel glycosyl donor for the synthesis of cancer specific core 5 and sialyl core 5 as glycopeptide building blocks" *Tetrahedron Lett.* **38**, 961-964.
- Räbinä, J., Natunen, J., Niemelä, R., Salminen, H., Ilves, K., Aitio, O., Maaheimo, H., Helin, J., Renkonen, O. (1998). "Enzymatic synthesis of site-specifically (α 1 $\rightarrow$ 3)-fucosylated polylactosamines containing either a sialyl Lewis x, a VIM-2, or a sialylated and internally difucosylated sequence" *Carbohydr. Res.* **305**, 491-499.
- Ragupathi, G., Park, T.K., Zhang, S., Kim, I.J., Graber, L., Adluri, S., Lloyd, K.O., Danishefsky, S.J., Livingston, P.O. (1997). "Durch Immunisierung von Mäusen zu Antikörpern gegen Krebszellen: ein kombinierter chemisch-immunologischer Ansatz für die Entwicklung eines Antitumorimpfstoffes" *Angew. Chem.* **109**, 66-69.
- Ram, B.P., Munjal, D.D. (1985). "Galactosyltransferases: physical, chemical, and biological aspects" *Crit. Rev. Biochem.* **17**, 257-311.
- Raman, L.P., Cheryan, M., Rajagopalan, N., Ray, M.S. (1994). "Consider nanofiltration for membrane separation" *Chem. Eng. Progress March*, 68-74.
- Rautenbach, A., Göschl, A. (1990). "Separation potential of nanofiltration membranes" *Desalination* **72**, 73-84.
- Rautenbach, R. (1995). "Membranverfahren: Vorlesungsskriptum", Aachen.

- Rearick, J.I., Sadler, J.E., Paulson, J.C., Hill, R.L. (1979). "Enzymatic characterization of β -D-galactoside $\alpha 2 \rightarrow 3$ sialyltransferase from porcine submaxillary gland" *J. Biol. Chem.* **254**, 4444-4451.
- Reboul, P., George, P., Geoffroy, J., Louisot, P., Broquet, P. (1992). "Study of O-glycan sialylation in C6 cultured glioma cells: regulation of a β -galactoside $\alpha 2,3$ sialyltransferase activity by Ca^{2+} /calmodulin antagonists and phosphatase inhibitors" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 1575-1581.
- Reed, L.J., Muench, H. (1938). "A simple method of estimating fifty per cent endpoints" *Am. J. Hyg.* **27**, 493-497.
- Renkonen, O., Toppila, S., Penttilä, L., Salminen, H., Helin, J., Maaheimo, H., Costello, C.E., Turunen, J.P., Renkonen, R. (1997). "Synthesis of a new nanomolar saccharide inhibitor of lymphocyte adhesion: different polylactosamine backbones present multiple sialyl Lewis x determinants to L-selectin in high-affinity mode" *Glycobiology* **7**, 453-461.
- Rich, D.H., Bernatowicz, M., Agarwal, N.S., Kawai, M., Salituro, F.G. (1985). "Inhibition of aspartic proteases by pepstatin and 3-methylstatine derivatives of pepstatin. Evidence for collected-substrate enzyme inhibition" *Biochemistry* **24**, 3165-3173.
- Righetti, P.G., Nembri, F. (1997). "Capillary electrophoresis of peptides in isoelectric buffers" *J. Chromatogr. A* **772**, 203-211.
- Roche, M.E., Oda, R.P., Landers, J.P. (1997). "Capillary electrophoresis in biotechnology" *Biotechnol. Prog.* **13**, 659-668.
- Rodemann, K.P. (1997). "Virusfiltration mit defektfreien Hohlfasermembranen" *Labor Praxis* Oktober, 26-28.
- Rohrmann, G.F. (1986). "Polyhedrin structure" *J. Gen. Virol.* **67**, 1499-1514.
- Ropp, P.A., Cheng, P.W. (1990). "Enzymatic synthesis of UDP-GlcN by a two step hollow fiber enzyme reactor system" *Anal. Biochem.* **187**, 104-108.
- Roth, J. (1995). "Biosynthesis 4c. Compartmentalization of glycoprotein synthesis" in: Montreuil, J., Vliegthart, J.F.G., Schachter, H. (Hrsg.): "Glycoproteins" **29** a Elsevier, Amsterdam, 287-311.
- Röttger, S., White, J., Wandall, H.H., Olivo, J.C., Stark, A., Bennett, E.P., Whitehouse, C., Berger, E.G., Clausen, H., Nilsson, T. (1998). "Localization of three human polypeptide GalNAc-transferases in HeLa cells suggests initiation of O-linked glycosylation throughout the Golgi apparatus" *J. Cell Science* **111**, 45-60.
- Roussel, P., Lamblin, G. (1996). "Human mucosal mucins in diseases" in: Montreuil, J., Vliegthart, J.F.G., Schachter, H. (Hrsg.): "Glycoproteins and disease" **30** Elsevier, Amsterdam, 351-393.
- Rudd, P. M., Morgan, B. P., Wormald, M. R., Harvey, D. J., van den Berg, C. W., Davis, S. J., Ferguson, M. A. J., Dwek, R. A. (1997). "The glycosylation of the complement regulatory protein, human erythrocyte CD59" *J. Biol. Chem.* **272**, 7229-7244.
- Rye, P.D., Bovin, N.V., Vlasova, E.V., Walker, R.A. (1995). "Monoclonal antibody LU-BCRU-G7 against a breast tumour-associated glycoprotein recognizes the disaccharides Gal beta 1-3GlcNAc" *Glycobiology* **5**, 385-389.
- Ryll, T., Wagner, R. (1991). "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.

- Sadler, J.E., Rearick, J.I., Paulson, J.C., Hill, R.L. (1979). "Purification to homogeneity of a β -galactoside $\alpha 2 \rightarrow 3$ sialyltransferase and partial purification of an α -N-galactosaminide $\alpha 2 \rightarrow 6$ sialyltransferase from porcine submaxillary glands" *J. Biol. Chem.* **254**, 4434-4443.
- Saenger, W. (1980). "Cyclodextrin-Einschlußverbindungen in Forschung und Industrie" *Angew. Chem.* **92**, 343-361.
- Sako, C., Chang, X.-J., Barone, K.M., Vachino, G., White, H.M., Shaw, G., Veldmann, G.M., Bean, K.M., Ahern, T.J., Furie, B., Cumming, D.A., Larsen, G.R. (1993). "Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin" *Cell* **75**, 1179-1186.
- Sako, C., Comess, K.M., Barone, K.M., Camphausen, R.T., Cumming, D.A., Shaw, G.C. (1995). "A sulfated peptide segment at the amino terminus of PSGL-1 is critical for P-selectin binding" *Cell* **83**, 323-331.
- Sala, R.F., MacKinnon, S.L., Palcic, M.M., Tanner, M.E. (1998). "UDP-N-trifluoroacetylglucosamine as an alternative substrate in N-acetylglucosaminyltransferase reactions" *Carbohydr. Res.* **306**, 127-136.
- Salmi, M., Jalkanen, S. (1997). "How do lymphocytes know where to go: current concepts and enigmas of lymphocyte homing" *Adv. Immunol.* **64**, 139-218.
- Salminen, H., Ahokas, K., Niemelä, R., Penttilä, L., Maaheimo, H., Helin, J., Costello, C.E., Renkonen, O. (1997). "Improved enzymatic synthesis of a highly potent oligosaccharide antagonist of L-selectin" *FEBS Lett.* **419**, 220-226.
- Sander, J., Waldmann, H. (1999). "Chemoenzymatische Synthese eines charakteristischen Glycophosphopeptids aus der Transaktivierungsdomäne des Serum-Response-Faktors" *Angew. Chem.* **111**, 1337-1339.
- Sasaki, H., Bothner, B., Dell, A., Fukuda, M. (1987). "Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA" *J. Biol. Chem.* **262**, 12059-12076.
- Sasaki, H., Kurata, K., Funayama, K., Nagata, M., Watanabe, E., Ohta, S., Hanai, N., Nishi, T. (1994). "Expression cloning of a novel $\alpha 1,3$ -fucosyltransferase that is involved in biosynthesis of the sialyl lewis x carbohydrate determinants in leukocytes" *J. Biol. Chem.* **269**, 14730-14737.
- Sasaki, K., Kurata, K., Ujita, M., Angata, K., Sekine, S., Nishi, T., Fukuda, M. (1997). "Expression cloning of cDNA encoding a human β -1,3-N-acetylglucosaminyltransferase that is essential for poly-N-acetyllactosamine synthesis" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 14292-14299.
- Sass, P.M. (1998). "The involvement of selectins in cell adhesion, tumor progression, and metastasis" *Cancer Investigation* **16**, 322-328.
- Sato, T., Furukawa, K., Bakker, H., VandenEijnden, D.H., VanDie, I. (1998). "Molecular cloning of a human cDNA encoding β -1,4-galactosyltransferase with 37% identity to mammalian UDP-Gal:GlcNAc β -1,4-galactosyltransferase" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 472-477.
- Satyanarayana, J., Gururaja, T.L., Naganagowda, G.A., Ramasubbu, N., Levine, M.J. (1998). "A concise methodology for the stereoselective synthesis of O-glycosylated amino acid building blocks: complete H-1 NMR assignments and their application in solid-phase glycopeptide synthesis" *Journal of Peptide Research* **52**, 165-179.
- Sauerbrei, B., Thiem, J. (1992). "Galactosylation and glucosylation by use of β -galactosidase" *Tetrahedron Lett.* **33**, 201-204.

- Schardinger, F. (1903).** "Über thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Milch, sowie über einige Umsetzungsprodukte derselben in kohlenhydrathaltigen Nährlösungen, darunter krystallisierte Polysaccharide (Dextrine) aus Stärke" *Zeitschr. f. Untersuchung d. Nahr.- u. Genußmittel* **6**, 865-880.
- Schleyer, A., Meldal, M., Renil, M., Paulsen, H., Bock, K. (1997).** "Direkte Festphasen-Glycosylierung von Peptiden an einem neuartigen Polyethylenglycol-Harz" *Angew. Chem.* **109**, 2064-2067.
- Schmidt, R.R., Wegmann, B., Jung, K.-H. (1991).** "Stereospecific synthesis of α - and β -L-fucopyranosyl phosphates and of GDP-fucose via trichloroacetimidate" *Liebigs. Ann. Chem.*, 121-124.
- Schultz, M., Kunz, H. (1995).** "Chemical and enzymatic synthesis of glycopeptides" in: P. Jollès, Jörnvall, H. (Hrsg.): "Interface between Chemistry and Biochemistry" Birkhäuser Verlag.
- Schuster, M., Wang, P., Paulson, J.C., Wong, C.-H. (1994).** "Solid-Phase chemical-enzymatic synthesis of glycopeptides and oligosaccharides" *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 1135-1136.
- Schwientek, T., Almeida, R., Levery, S.B., Holmes, E.H., Bennett, E., Clausen, H. (1998).** "Cloning of a novel member of the UDP-galactose:beta-N-acetylglucosamine β 1,4-galactosyltransferase family, beta 4Gal-T4, involved in glycosphingolipid biosynthesis" *J. Biol. Chem.* **273**, 29331-29340.
- Scott, K.E. (1995).** "Handbook of industrial membranes" Elsevier, Oxford.
- Sears, P., Wong, C.H. (1998).** "Enzyme action in glycoprotein synthesis" *Cell. Mol. Life Sciences* **54**, 223-252.
- Seelbach, K., Kragl, U. (1997).** "Nanofiltration membranes for cofactor retention in continuous enzymatic synthesis" *Enzyme Microb. Tech.* **20**, 389-392.
- Segel, I.H. (1975).** "Enzyme kinetics – behaviour and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems" John Wiley & Sons, New York.
- Seitz, O., Kunz, H. (1997).** "HYCRON, an allylic anchor for high-efficiency solid phase synthesis of protected peptides and glycopeptides" *J. Org. Chem.* **62**, 813-826.
- Seitz, O., Wong, C.H. (1997).** "Chemoenzymatic solution- and solid-phase synthesis of O-glycopeptides of the mucin domain of MAdCAM-1. A general route to O-LacNAc, O-sialyl-LacNAc, and O-sialyl-Lewis-X peptides" *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 8766-8776.
- Seppo, A., Turunen, J.P., Penttilä, L., Keane, A., Renkonen, O., Renkonen, R. (1996).** "Synthesis of a tetravalent sialyl Lewis x glycan, a high-affinity inhibitor of L-selectin-mediated lymphocyte binding to endothelium" *Glycobiology* **6**, 65-71.
- Shaper, N.L., Shaper, J.H., Meuth, J.L., Fox, J.L., Chang, H., Kirsch, I.R. (1986).** "Bovine galactosyltransferase: identification of a clone by direct immunological screening of a cDNA expression library" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**.
- Shinkai, A., Shinoda, K., Sasaki, K., Morishita, Y., Nishi, T., Matsuda, Y., Takahashi, I., Anazawa, H. (1997).** "High-level expression and purification of a recombinant human α -1,3-fucosyltransferase in baculovirus-infected insect cells" *Prot. Expr. Purif.* **10**, 379-385.
- Siegelman, M.H., van de Rijn, M., Weissman, I.L. (1989).** "Mouse lymph node homing receptor cDNA clone encodes a glycoprotein revealing tandem interaction domains" *Science* **243**, 1165-1172.
- Simanek, E.E., McGarvey, G.J., Jablonowski, J.A., Wong, C.-H. (1998).** "Selectin-carbohydrate interactions: from natural ligands to designed mimics" *Chem. Rev.* **98**, 833-862.

- Simon, E.S., Bednarski, M.D., Whitesides, G.M. (1988).** "Synthesis of CMP-Neu5Ac from N-acetylglucosamine: generation of CTP from CMP using adenylate kinase" *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 7159-7163.
- Skinner, M.P., Fournier, C.J., Andrews, R.K., Gorman, J.F., Chesterman, C.N., Berndt, M.C. (1989).** "Characterization of human platelet GMP-140 as a heparin-binding protein" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**, 1373-1379.
- Smith, G.E., Summers, M.D. (1978).** "Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases" *Virology* **89**, 517-527.
- Sommerer, N., Garem, A., Molle, D., Septier, C., LeQuere, J.L., Salles, C. (1998).** "Isolation of a peptidic fraction from the goat cheese water-soluble extract by nanofiltration for sensory evaluation studies" in: Contis, E.T., Ho, C.T., Mussinan, C.J., Parliment, T.H., Shahidi, F., Spanier, A.M. (Hrsg.): "Food Flavors: Formation, Analysis, and Packaging Influences" Elsevier Science B V, Amsterdam, 207-217.
- Sørensen, T., White, T., Wandall, H.H., Kristensen, A.K., Roepstorff, P., Clausen, H. (1995).** "UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase: identification and separation of two distinct transferase activities" *J. Biol. Chem.* **270**, 24166-24173.
- Sprengard, U., Kretzschmar, G., Bartnik, E., Hüls, C., Kunz, H. (1995).** "Synthese eines RGD-Sialyl-Lewis^x-Glykokonjugats: ein neuer hochwirksamer Ligand für P-Selektin" *Angew. Chem.* **107**, 1104-1107.
- Sprengard, U., Kunz, H., Hüls, C., Schmidt, W., Seiffge, D., Kretzschmar, G. (1996).** "Synthesis and biological activity of novel sialyl-Lewis^x conjugates" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **6**, 509-514.
- Springer, T.A. (1990).** "Adhesion receptors of the immune system" *Nature* **346**, 425-434.
- Springer, T.A. (1994).** "Traffic signals for lymphocyte recirculation and leucocyte emigration: the multistep paradigm" *Cell* **76**, 301-314.
- Srivastava, G., Kaur, K.J., Hindsgaul, O., Palcic, M.M. (1992).** "Enzymatic transfer of a preassembled trisaccharide antigen to cell surfaces using a fucosyltransferase" *J. Biol. Chem.* **267**, 22356-22361.
- Stadie, T.R.E., Chai, W., Lawson, A.M., Byfield, P.G.H., Hanisch, F.-G. (1995).** "Studies on the order and site specificity of GalNAc transfer to MUC-1 tandem repeats by UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase from milk or mammary carcinoma cells" *Eur. J. Biochem.* **229**, 140-147.
- Stangier, K., Palcic, M.M., Bundle, D.R., Hindsgaul, O., Thiem, J. (1998).** "Fucosyltransferase-catalyzed formation of L-galactosylated Lewis structures" *Carbohydr. Res.* **305**, 511-515.
- Staude, E. (1992).** "Membranen und Membranprozesse" VCH, Weinheim.
- Stefansson, M., Novotny, M. (1993).** "Electrophoretic resolution of monosaccharide enantiomers in borate-oligosaccharide complexation media" *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 11573-11580.
- St. Hillaire, P.M., Lowary, T.L., Meldal, M., Bock, K. (1998).** "Oligosaccharide mimetics obtained by novel, rapid screening of carboxylic acid encoded glycopeptide libraries" *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 13312-13320.
- Stiller, R., Thiem, J. (1992).** "Enzymatic synthesis of β -L-fucose-1-phosphate and GDP-fucose" *Liebigs. Ann. Chem.* **5**, 467-471.

- Stone, S.R., Hofsteenge, J. (1986). "Kinetics of the inhibition of thrombin by hirudin" *Biochemistry* **25**, 4622-4628.
- Sugiura, M., Kawasaki, T., Yamashina, I. (1982). "Purification and characterization of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosamine transferase from an ascites hepatoma, AH 66" *J. Biol. Chem.* **257**, 9501-9507.
- Suiko, M., Liu, M.-C. (1988). "Change in binding affinities of 3Y1 secreted fibronectin upon desulfation of tyrosine-O-sulfate" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**, 1094-1098.
- Sujino, K., Malet, C., Hindsgaul, O., Palcic, M.M. (1997). "Acceptor hydroxyl group mapping for calf thymus α -(1 $\rightarrow$ 3)-galactosyltransferase and enzymatic synthesis of α -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcpNAc analogs" *Carbohydr. Res.* **305**, 483-489.
- Summers, M.D., Smith, G.E. (1987). "A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures" Texas A&M University.
- Suzuki, K., Fujimoto, H., Ito, Y., Sasaki, T., Ajisaka, K. (1997). "An efficient synthesis of a Gal β 1-3GalNAc-serine derivative using β -galactosidase" *Tetrahedron Lett.* **38**, 1211-1214.
- TenHagen, B.G., Hagen, F.K., Balys, M.M., Beres, T.M., VanWuyckhuysse, B., Tabak, L.A. (1998). "Cloning and expression of a novel, tissue specifically expressed member of the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family" *J. Biol. Chem.* **273**, 27749-27754.
- Terabe, S., Otsuka, K., Nishi, H. (1994). "Separation of enantiomers by capillary electrophoretic techniques" *J. Chromatogr. A* **666**, 295-319.
- Thiem, J., Stangier, P. (1990). "Preparative-enzymatic formation of cytidine 5'-monophosphosialate by integrated cytidine 5'-triphosphate regeneration" *Liebigs. Ann. Chem.*, 1101-1105.
- Thiem, J. (1995). "Applications of enzymes in synthetic carbohydrate chemistry" *FEMS Microbiol. Rev.* **16**, 193-211.
- Thomas, V.H., Elhalabi, J., Rice, K.G. (1998). "Enzymatic synthesis of N-linked oligosaccharides terminating in multiple sialyl-Lewis(x) and GalNAc-Lewis(x) determinants: clustered glycosides for studying selectin interactions" *Carbohydr. Res.* **306**, 387-400.
- Timmer, J.M.K., Kromkamp, J., Robbertsen, T. (1994). "Lactid acid separation from fermentation broths by reverse osmosis and nanofiltration" *J. Membr. Sc.* **92**, 185-197.
- Toshima, K., Tatsuta, K. (1993). "Recent progress in O-glycosylation methods and its application to natural products synthesis" *Chem. Rev.* **93**, 1503-1531.
- Tramper, J., Williams, J., Joustra, D., Vlak, J. (1986). "Shear sensitivity of insect cells in suspension" *Enzyme Microb. Tech.* **8**, 33-36.
- Tsai, C.-Y., Park, W.K.C., Weitz-Schmidt, G., Ernst, B., Wong, C.-H. (1998). "Synthesis of sialyl Lewis x mimetics using the Ugi four component reaction" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 2333-2338.
- Tsuru, T., Shutou, T., Nakao, S.-I., Kimura, S. (1994). "Peptide and amino acid separation with nanofiltration membranes" *Sep. Sci. Technol.* **29**, 971-984.
- Tu, L., Chen, A., Delahunty, M.D., Moore, K.L., Watson, S.R., McEver, R.P., Tedder, T.F. (1996). "L-selectin binds to P-selectin glycoprotein ligand-1 on leukocytes: interactions between the lectin, epidermal growth factor, and consensus repeat domains of the selectins determine ligand binding specificity" *J. Immunol.* **157**, 3995-4004.
- Uchiyama, T., Hindsgaul, O. (1996). "Per-O-trimethylsilyl- α -L-fucopyranosyl iodide: a novel glycosylating agent for terminal α -L-fucosylation" *Synlett*, 499-502.

- Uchiyama, T., Hindsgaul, O. (1998) "Rapid conversion of unprotected galactose analogs to their UDP-derivatives for use in the chemo-enzymatic synthesis of unnatural oligosaccharides" *J. Carbohydr. Chem.* **17**, 1181-1191.
- Uhlenbrock, K. (1994). "Methoden zur reaktionstechnischen Optimierung enzymatischer Synthesen -dargestellt am Beispiel der enantioselektiven Reduktion von p-Chloracetophenon im organisch-wässrigen Zwei-Phasen-System." Dissertation, Universität Bonn.
- Ujita, M., McAuliffe, J., Schwientek, T., Almeida, R., Hindsgaul, O., Clausen, H., Fukuda, M. (1998). "Synthesis of poly-N-acetyllactosamine in core 2 branched O-glycans" *J. Biol. Chem.* **273**, 34843-34849.
- Unverzagt, C., Kunz, H., Paulson, J.C. (1990). "High-efficiency synthesis of sialyloligosaccharides and sialoglycopeptides" *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 9308-9309.
- Unverzagt, C., Kelm, S., Paulson, J.C. (1994). "Chemical and enzymatic synthesis of multivalent sialoglycopeptides" *Carbohydr. Res.* **251**, 258-301.
- Usui, T., Kubota, S., Ohi, H. (1993). "Convenient synthesis of β -D-galactosyl disaccharide derivatives using the β -D-galactosidase from *Bacillus circulans*" *Carbohydr. Res.* **244**, 315-323.
- Van den Steen, P., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Opdenakker, G. (1998). "Concepts and principles of O-linked glycosylation" *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **33**, 151-208.
- Varki, A. (1993). "Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct" *Glycobiology* **3**, 97-130.
- Varki, A. (1997). "Selectin ligands: will the real ones please stand up?" *J. Clin. Invest.* **99**, 158-162.
- Vaughn, J.L., Goodwin, R.H., Tompkins, G.J., McCawley, P. (1977). "The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (lepidoptera; noctuidae)" *In Vitro* **13**, 213-217.
- Verma, M., Davidson, E.A. (1994). "Mucin genes: structure, expression and regulation" *Glycoconjugate J.* **11**, 172-179.
- Vespalec, R., Bocek, P. (1997). "Chiral separations by capillary zone electrophoresis: present state of the art" *Electrophoresis* **18**, 843-852.
- Villiers, A. (1891). "Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique" *Compt. rend.* **112**, 536-538.
- Vliegenthart, J.F.G., Montreuil, J. (1995). "Primary structures of glycoprotein glycans" in: Montreuil, J., Vliegenthart, J.F.G., Schachter, H. (Hrsg.): "Glycoproteins" **29 a** Elsevier, Amsterdam, 13-28.
- Vogel, C., Bergemann, C., Ott, A.-J., Lindhorst, T.K., Thiem, J., Dahlhoff, W.V., Hällgren, C., Palcic, M.M., Hindsgaul, O. (1997). "Synthesis of carbon-backbone-elongated GDP-L-fucose derivatives as substrates for fucosyltransferase-catalysed reactions" *Liebigs Ann./Recueil*, 601-612.
- Vorndran, A.E., Oefner, P.J., Scherz, H., Bonn, G.K. (1992). "Indirect UV detection of carbohydrates in capillary zone electrophoresis" *Chromatographia* **33**, 163-168.
- Waldmann, H., Sebastian, D. (1994). "Enzymatic protecting group techniques" *Chem. Rev.* **94**, 911-937.
- Waldmann, H. (1995). "Enzymatic synthesis of O-glycosides" in: Waldmann, H. (Hrsg.): "Organic Synthesis Highlights II" VCH, Weinheim, 157-166.

- Wallenfels, K., Fischer, J. (1960). "Untersuchungen über milchzuckerspaltende Enzyme: Die Lactase des Kälberdarms" *Physiol. Chem. Hoppe-Seyler* **321**, 223-245.
- Wallenfels, K., Zarnitz, M.L., Laule, G., Bender, H., Keser, M. (1960). "Untersuchungen über milchzuckerspaltende Enzyme: Reinigung, Kristallisation und Eigenschaften der β -Galaktosidase von *Escherichia coli* ML 309" *Biochem. Z.* **331**, 459-485.
- Wandall, H.H., Hassan, H., Mirgorodskaya, K., Kristensen, A.K., Roepstorff, P., Bennett, E.P., Nielsen, P.A., Hollingsworth, M.A., Burchell, J., Taylor-Papadimitriou, J., Clausen, H. (1996). "Substrate specificities of three members of the UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family, GalNAc-T1, -T2, and -T3" *J. Biol. Chem.* **272**, 23503-23514.
- Wang, Y., Agrwal, N., Eckhardt, A.E., Stevens, R.D., Hill, R.L. (1993). "The acceptor substrate specificity of porcine submaxillary UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase is dependent on the amino acid sequences adjacent to serine and threonine residues" *J. Biol. Chem.* **268**, 22979-22983.
- Wang, Z.-G., Hindsgaul, O. (1998). "Combinatorial carbohydrate chemistry" *Glycoimmunology* **2**, 219-236.
- Watkins, W.M., Hassid, W.Z. (1962). "The synthesis of lactose by particulate enzyme preparation from guinea pig and bovine mammary glands" *J. Biol. Chem.* **237**, 1432-1440.
- Watson, J.D., Crick, F.H.C. (1953). "Molecular structure of nucleic acids" *Nature* **171**, 737-738.
- Watt, G.M., Lowden, P.A.S., Flitsch, S.L. (1997). "Enzyme-catalyzed formation of glycosidic linkages" *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 652-660.
- Weinstein, J., de Souza-e-Silva, U., Paulson, J.C. (1982). "Purification of a Gal β 1-4GlcNAc α -2,3-sialyltransferase and a Gal β 1-3(4)GlcNAc α -2,3-sialyltransferase to homogeneity from rat liver" *J. Biol. Chem.* **257**, 13835-13844.
- Wen, C.X., Livingston, B.D., Medzihradsky, K.F., Kelm, S., Burlingame, A.L., Paulson, J.C. (1992). "Primary structure of Gal β 1,3(4)GlcNAc α 2,3-sialyltransferase determined by mass spectrometry sequence analysis and molecular cloning" *J. Biol. Chem.* **267**, 21011-21019.
- Wenz, G. (1994). "Cyclodextrine als Bausteine supramolekularer Strukturen und Funktionseinheiten" *Angew. Chem.* **106**, 851-870.
- Werner, R.G. (1994). "Successful products and future business prospects", *12th Meeting of the European Society for Animal Cell Technology*.
- Weuster-Botz, D., Pramatarova, V., Spassov, G., Wandrey, C. (1995). "Use of a genetic algorithm in the development of a synthetic growth medium for *Arthrobacter simplex* with high hydrocortisone λ^1 -dehydrogenase activity" *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **64**, 386-392.
- Weuster-Botz, D., Wandrey, C. (1995). "Medium optimization by genetic algorithm for continuous production of formate dehydrogenase" *Process Biochemistry* **30**, 563-571.
- White, T., Bennett, E.P., Takio, K., Sørensen, T., Bonding, N., Clausen, H. (1995). "Purification and cDNA cloning of a human UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase" *J. Biol. Chem.* **270**, 24156-24165.
- Whitfield, D.M., Douglas, S.P. (1996). "Glycosylation reactions - present status future directions" *Glycoconjugate J.* **13**, 5-17.

- Wilkins, P.P., Moore, K.L., McEver, R.P., Cummings, R.C. (1995). "Tyrosine sulfation of P-selectin glycoprotein ligand-1 is required for high affinity binding to P-selectin" *J. Biol. Chem.* **270**, 22677-22680.
- Wilkins, P.P., McEver, R.P., Cummings, R.C. (1996). "Structures of the O-glycans on P-selectin glycoprotein ligand-1 from HL-60 cells" *J. Biol. Chem.* **271**, 18732-18742.
- Willet, P. (1995). "Genetic algorithms in molecular recognition and design" *Trend Biotechnol.* **13**, 516-521.
- Williams, D., Schachter, H. (1980). "Mucin synthesis: detection in canine submaxillary glands of an N-acetylglucosaminyltransferase which acts on mucin substrates" *J. Biol. Chem.* **255**, 11247-11252.
- Williams, M.A., Kitagawa, H., Datta, A.K., Paulson, J.C., Jamieson, J.C. (1995). "Large-scale expression of recombinant sialyltransferases and comparison of their kinetic properties with native enzymes" *Glycoconjugate J.* **12**, 755-761.
- Winant, R.C., Lazar, J.B., Johnson, P.H. (1991). "Chemical modifications and amino acid substitutions in recombinant hirudin that increase hirudin-thrombin affinity" *Biochemistry* **30**, 1271-1277.
- Wingert, W.E., Cheng, P.-W. (1984). "Mucin biosynthesis: characterization of rabbit small intestinal UDP-N-acetylglucosamine:galactose β -3-N-acetylgalactosaminide (N-acetylglucosamine $\rightarrow$ N-acetylgalactosamine) β -6-N-acetylglucosaminyltransferase" *Biochemistry* **23**, 690-697.
- Wirth, H.-P., Yang, M., Karita, M., Blaser, M.J. (1996). "Expression of human cell surface glycoconjugates Lewis x and Lewis y by *Helicobacter pylori* isolates is related to *cagA* status" *Infect. Immun.* **64**, 4598-4605.
- Wittmann, V., Takayama, S., Gong, K.W., Weitz-Schmidt, G., Wong, C.-H. (1998). "Ligand recognition by E- and P-selectin: chemoenzymatic synthesis and inhibitory activity of bivalent sialyl Lewis x derivatives and sialyl Lewis carboxylic acids" *J. Org. Chem.* **63**, 5137-5143.
- Wlasichuk, K.B., Kashem, M.A., Nikrad, P.V., Bird, P., Jiang, C., Venot, A.P. (1993). "Determination of the specificities of rat liver Gal(β 1-4)GlcNAc α 2,6-sialyltransferase and Gal(β 1-3/4)GlcNAc α 2,3-sialyltransferase using synthetic modified acceptors" *J. Biol. Chem.* **268**, 13971-13977.
- Woerdenbag, H.J., Pras, N., Frijlink, H.W., Lerk, C.F., Malingre, T.M. (1991). "Cyclodextrin-facilitated bioconversion of 17 β -estradiol by a phenoloxidase from *Mucuna pruriens* cell cultures" *Phytochemistry* **29**, 1551-1554.
- Wong, C.-H., Haynie, S.L., Whitesides, G.M. (1982). "Enzyme-catalyzed synthesis of N-acetylglucosamine with in situ regeneration of uridine 5'-diphosphate glucose and uridine 5'-diphosphate galactose" *J. Org. Chem.* **47**, 5416-5418.
- Wong, C.-H., Wang, R., Ichikawa, Y. (1992). "Regeneration of sugar nucleotide for enzymatic oligosaccharide synthesis: use of Gal-1-phosphate uridyltransferase in the regeneration of UDP-galactose, UDP-2-deoxygalactose, and UDP-galactosamine" *J. Org. Chem.* **57**, 4343-4344.
- Wong, C.-H., Halcomb, R.L., Ichikawa, Y., Kajimoto, T. (1995a). "Enzyme in der organischen Synthese: Das Problem der molekularen Erkennung von Kohlenhydraten (Teil 1)" *Angew. Chem.* **107**, 453-474.

- Wong, C.-H., Halcomb, R.L., Ichikawa, Y., Kajimoto, T. (1995b). "Enzyme in der organischen Synthese: Das Problem der molekularen Erkennung von Kohlenhydraten (Teil 2)" *Angew. Chem.* **107**, 569-593.
- Wong, C.H., Moris-Varas, F., Hung, S.C., Marron, T.G., Lin, C.C., Gong, K.W., Weitz-Schmidt, G. (1997). "Small molecules as structural and functional mimics of sialyl Lewis X tetrasaccharide in selectin inhibition: a remarkable enhancement of inhibition by additional negative charge and/or hydrophobic group" *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 8152-8158.
- Wrotnowski, C. (1997). "Glycocompounds' drug-like and hormonal-control roles gain recognition" *Genetic Engineering News*, (15. Mai), 18.
- Wunberg, T., Kallus, C., Opatz, T., Henke, S., Schmidt, W., Kunz, H. (1998). "Kohlenhydrate - multifunktionelle chirale Gerüste in der kombinatorischen Synthese" *Angew. Chem.* **110**, 2620-2622.
- Yamamoto, K., Fujimori, K., Haneda, K., Mizuno, M., Inazu, T., Kumagai, H. (1998). "Chemoenzymatic synthesis of a novel glycopeptide using a microbial endoglycosidase" *Carbohydr. Res.* **305**, 415-422.
- Yang, J., Bird, J., Siddiki, B., Chung, Y., Okuno, M., Sowa, M., Kim, Y., Matta, K., Brockhausen, I. (1994). "Alterations of O-glycan biosynthesis in human colon cancer tissue" *Glycobiology* **4**, 873-884.
- Yates, A.D., Watkins, W.M. (1983). "Enzymes involved in the biosynthesis of glycoconjugates. A UDP-2-acetamido-2-deoxy-D-glucose: β -D-Galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-saccharide (1 $\rightarrow$ 3)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyltransferase in human serum" *Carbohydr. Res.* **120**, 251-268.
- Yeh, J.-C., Ong, E., Fukuda, M. (1999). "Molecular cloning and expression of a novel β -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase that forms core 2, core 4, and I branches" *J. Biol. Chem.* **274**, 3215-3221.
- Yuasa, H., Palcic, M.M., Hindsgaul, O. (1995). "Synthesis of the carbocyclic analog of uridine 5'-(α -D-galactopyranosyl diphosphate) (UDP-Gal) as an inhibitor of b(1 $\rightarrow$ 4)-galactosyltransferase" *Can. J. Chem.* **73**, 2190-2195.
- Zara, J., Hagen, F.K., Ten Hagen, K.G., Van Wuyckhuysse, B.C., Tabak, L.A. (1996). "Cloning and expression of mouse UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-T3" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **228**, 38-44.
- Zelinski, T., Kula, M.-R. (1997). "Asymmetric enzymatic reduction of lipophilic ketones in aqueous solution containing cyclodextrins" *Biocat. Biotrans.* **15**, 57-74.
- Zelinski, T., Liese, A., Wandrey, C., Kula, M.-R. (in press). "Asymmetric reductions in aqueous media: enzymatic synthesis in cyclodextrin containing media" *Tetrahedron Asymm.*
- Zeng, S., Dinter, A., Eisenkrätzer, D., Biselli, M., Wandrey, C., Berger, E.G. (1997). "Pilot scale expression and purification of soluble protein A tagged β 1,6N-acetylglucosaminyltransferase in CHO cells" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 653-658.
- Zhao, Y., Sane, D.C. (1993). "Expression of a recombinant baculovirus for vitronectin in insect cells: purification, characterization of posttranslational modifications and functional studies of the recombinant protein" *Arch. Biochem. Biophys.* **304**, 434-442

Forschungszentrum Jülich



Jül-3696
September 1999
ISSN 0944-2952